



**UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU
WYDZIAŁ CHEMII**

**Jakub Gruszka
Nr albumu 58946**

**BADANIA NANOCZĄSTEK SREBRA I TLENKU TYTANU(IV)
W PRÓBKACH ŚRODOWISKOWYCH I BIOLOGICZNYCH
Z ZASTOSOWANIEM TECHNIKI *SINGLE PARTICLE* ICP MS**

**Rozprawa doktorska
Kierunek: Chemia
Studia: III stopnia**

**Praca wykonana w Zakładzie Chemii Analitycznej
Katedra Chemii Analitycznej i Nieorganicznej
Promotor: prof. dr hab. Beata Godlewska-Żyłkiewicz
Promotor pomocniczy: dr Julita Malejko**

Białystok 2023

Składam najserdeczniejsze podziękowania:

Pani prof. dr hab. Beacie Godlewskiej-Żyłkiewicz

*za opiekę naukową, merytoryczną pomoc oraz cenne wskazówki
podczas pisania pracy*

Pani dr Julicie Malejko

*za poświęcony czas i wsparcie merytoryczne podczas realizacji
badań dotyczących pracy doktorskiej*

Panu prof. dr hab. Andrzejowi Bajguzowi oraz mgr Magdalenie Chmur

*za prowadzenie hodowli glonów *Desmodesmus subspicatus*
zastosowanych w badaniach biosorpcji i specjacji srebra*

Pani dr inż. Elżbiecie Skibie

*za udostępnienie roślin modelowych wykorzystanych
w badaniach dotyczących bioakumulacji i specjacji tytanu*

Praca doktorska powstała dzięki finansowemu wsparciu:

- Narodowego Centrum Nauki:

„Nowe metodyki analityczne w analizie specjacyjnej nanosrebra i nanozłota”
(Grant OPUS 8, 2014/15/B/ST4/04641), kierownik projektu: prof. dr hab. Beata
Izabella Godlewska-Żyłkiewicz, Uniwersytet w Białymstoku.

Spis treści

Spis treści.....	1
Wykaz często stosowanych skrótów	3
Wstęp	4
CZEŚĆ LITERATUROWA	7
1. Ogólna charakterystyka srebra.....	9
1.1. Zarys historyczny	9
1.2. Występowanie, wydobywanie oraz produkcja srebra	10
1.3. Właściwości fizykochemiczne Ag/AgNPs	13
1.4. Właściwości biologiczne form specjacyjnych srebra Ag ⁺ /AgNPs.....	16
1.5. Zastosowanie Ag/AgNPs	21
1.6. Antropogeniczne źródła emisji Ag ⁺ /AgNPs	26
1.7. Losy Ag ⁺ /AgNPs w środowisku wodnym	28
2. Ogólna charakterystyka tytanu.....	34
2.1. Zarys historyczny	34
2.2. Właściwości fizyczne i chemiczne Ti oraz TiO ₂	35
2.3. Wpływ TiO ₂ NPs na organizmy żywe	38
2.4. Zastosowanie Ti i TiO ₂	41
2.5. Losy TiO ₂ w środowisku naturalnym	44
3. Metody charakteryzowania oraz oznaczania nanocząstek metali	47
3.1. Rozkład próbek środowiskowych i biologicznych	51
3.1.1. Trawienie enzymatyczne próbek biologicznych.....	52
3.1.1.1. Przygotowanie próbek pochodzenia zwierzęcego	54
3.1.1.2. Przygotowanie próbek pochodzenia roślinnego.....	55
3.1.2. Trawienie próbek biologicznych w środowisku alkalicznym	59
4. Spektrometria mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną pracująca w trybie <i>pojedynczej cząstki</i>	61
4.1. Oznaczanie srebra techniką sp ICP MS – problemy analityczne	68
4.2. Oznaczanie TiO ₂ NPs techniką sp ICP MS	75
Cel pracy.....	82
CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA	85
5. Aparatura, sprzęt laboratoryjny, odczynniki, roztwory, terminologia stosowana w pracy oraz parametry pomiarowe.....	87
5.1. Aparatura i sprzęt laboratoryjny	87
5.2. Odczynniki	88
5.3. Roztwory	89
5.4. Terminologia stosowana w pracy	91
5.5. Parametry aparaturowe oraz pomiarowe spektrometrów ICP MS i HR CS GF AAS	92

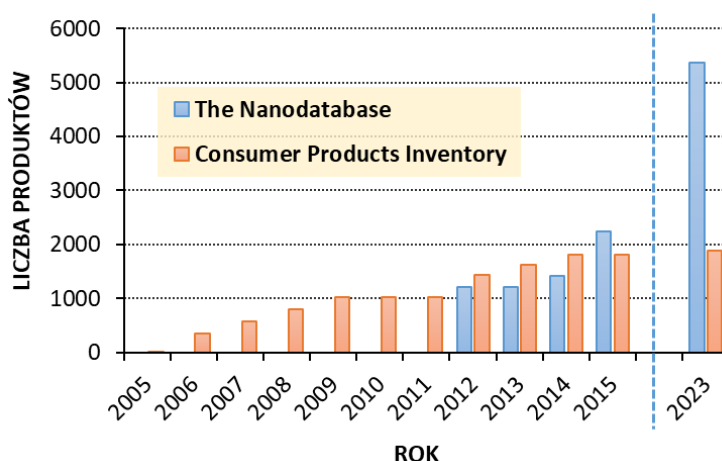
6.	Próbki środowiskowe i biologiczne - przygotowanie do badań i charakterystyka	95
6.1.	Układy modelowe stosowane w badaniach biosorpcji	95
6.2.	Badanie wpływu matrycy na przebieg oznaczenia oraz stabilność Ag ⁺ /AgNPs	96
6.3.	Hodowla i inkubacja glonów <i>Desmodesmus subspicatus</i>	96
6.4.	Hodowla grochu zwyczajnego <i>Pisum sativum L.</i>	97
6.5.	Procedura przygotowania i rozkładu próbek do analizy ICP MS i sp ICP MS	97
6.5.1.	Procedura ekstrakcji Ag ⁺ /AgNPs z komórek glonów	97
6.5.2.	Rozkład próbek korzeni, łodyg i liści grochu zwyczajnego do oznaczania TiO ₂ NPs	98
6.5.3.	Procedury mineralizacji próbek biologicznych	98
7.	Badania Ag ⁺ i AgNPs techniką sp ICP MS	100
7.1.	Optymalizacja metody oznaczania Ag ⁺ /AgNPs techniką sp ICP MS – badania w układach modelowych	100
7.2.	Parametry analityczne metody sp ICP MS	109
7.3.	Wpływ matrycy próbki na oznaczanie srebra techniką sp ICP MS oraz stabilność Ag ⁺ /AgNPs	111
8.	Badanie biosorpcji i analiza specjacyjna srebra w glonach oraz otaczającym je środowisku	114
8.1.	Biosorpcja Ag ⁺ i AgNPs przez glony <i>Desmodesmus subspicatus</i> w układach wodnych	115
8.2.	Analiza specjacyjna srebra techniką sp ICP MS w zawiesinach glonów	119
8.3.	Optymalizacja procesu lizy komórkowej	130
8.3.1.	Trawienie enzymatyczne	130
8.3.2.	Trawienie w środowisku alkalicznym	141
8.4.	Zastosowanie zoptymalizowanej metody oznaczania Ag ⁺ /AgNPs techniką sp ICP MS w próbkach środowiskowych i biologicznych	146
9.	Badania TiO ₂ NPs w próbkach grochu zwyczajnego techniką ICP MS i sp ICP MS	149
9.1.	Oznaczenie całkowitej zawartości tytanu w materiale roślinnym techniką ICP MS	151
9.2.	Optymalizacja i charakterystyka metody sp ICP MS – badania w układach modelowych	156
9.3.	Opracowanie procedury przygotowania próbek roślinnych do oznaczania TiO ₂ NPs techniką sp ICP MS	160
9.4.	Charakterystyka metody oznaczania TiO ₂ NPs techniką sp ICP MS w próbkach roślin	165
9.5.	Badanie pobierania i transformacji TiO ₂ NPs w roślinach	167
	Podsumowanie i wnioski	174
	Streszczenie	182
	Abstract	183
	Spis rysunków	184
	Spis tabel	188
	Dorobek naukowy	190
	Literatura	192

Wykaz często stosowanych skrótów

AF4	– przepływowe frakcjonowanie w asymetrycznym polu sił przepływu (ang. <i>Asymmetric Flow Field Flow Fractionation</i>)
BBM	– pożywka Bolda (ang. <i>Bold's Basal Medium</i>)
BED	– teoretycznie najmniejsza wielkość cząstek możliwa do wykrycia w danej próbce (ang. <i>Background Equivalent Diameter</i>)
CPE	– ekstrakcja w punkcie zmętnienia (ang. <i>Cloud Point Extraction</i>)
cps	– liczba zliczeń na sekundę (ang. <i>counts per second</i>)
DLS	– dynamiczne rozpraszanie światła (ang. <i>Dynamic Light Scattering</i>)
EC ₅₀	– średnie skuteczne stężenie (ang. <i>half-maximal effective concentration</i>)
EDTA	– kwas (etylenodiamino)tetraoctowy (ang. <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EDX	– spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (<i>Energy Dispersive X-ray Analysis</i>)
FFF	– frakcjonowanie przepływowe w polu sił przepływu (ang. <i>Field Flow Fractionation</i>)
HA	– kwas humusowy (ang. <i>Humic Acid</i>)
HDC	– chromatografia hydrodynamiczna (ang. <i>Hydrodynamic Chromatography</i>)
HPLC	– wysokosprawną chromatografią cieczową (ang. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
ICP MS	– spektrometria mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ang. <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
ICP QQQ	– tandemowy spektrometr mas typu potrójnego kwadrupola z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ang. <i>Triple Quadrupole ICP MS</i>)
LD ₅₀	– średnia dawka śmiertelna (ang. <i>median lethal dose</i>)
LOD	– granica wykrywalności (ang. <i>Limit of Detection</i>)
LOD _{size}	– granica wykrywalności rozmiarów cząstek (ang. <i>Size Limit of Detection</i>)
LOQ	– granica oznaczalności (ang. <i>Limit of Quantification</i>)
MNPs	– nanocząstki metaliczne (ang. <i>Metallic Nanoparticles</i>)
m/z	– stosunek masy do ładunku jonów (ang. <i>mass-to-charge ratio</i>)
NOM	– naturalna materia organiczna (ang. <i>Natural Organic Matter</i>)
NPs	– nanocząstki (ang. <i>nanoparticles</i>)
PVP	– poli(winylopirolidon) (ang. <i>poly(vinylpyrrolidone)</i>)
RM	– certyfikowany materiał odniesienia (ang. <i>Reference Material</i>)
ROS	– reaktywne formy tlenu (ang. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SEM	– skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SDS	– dodecylosiarczan(VI) sodu (ang. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
sp ICP MS	– spektrometria mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną pracującą w trybie pomiarowym „pojedynczej cząstki” (ang. <i>single particle ICP MS</i>)
TEM	– transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TMAH	– wodorotlenek tetrametyloamoniowy (ang. <i>Tetramethylammonium hydroxide</i>)
t_{pom}	– czas pomiaru (ang. <i> dwell time, reading time</i>)
t_{stab}	– czas stabilizacji (ang. <i>settling time</i>)
η_{neb}	– efektywność transportu próbki do strumienia plazmy (ang. <i>nebulization efficiency</i>)

Wstęp

W ostatnich dekadach obserwowany jest dynamiczny rozwój nanotechnologii mający na celu poprawę właściwości fizykochemicznych i biologicznych różnego rodzaju materiałów użytkowych. Liczba nanomateriałów skatalogowanych w bazie „Nano” wydawnictwa Springer Nature w 2020 r. przekroczyła 330 000 [1]. Dynamicznie wzrasta również liczba komercyjnie dostępnych produktów zawierających w swoim składzie nanomateriały węglowe, nanocząstki metali (MNPs) oraz tlenki metali (MONPs). Obecnie w bazach „The Nanodatabase” oraz „Consumer Products Inventory” zarejestrowanych jest odpowiednio 5 367 oraz 1 883 takich produktów [2,3] (Rys. 1). Produkowane są również tysiące ton ultradrobnych materiałów proszkowych zawierających w swoim składzie nanocząstki tlenków metali (np. tlenku tytanu(IV) - TiO_2 , tlenku ceru(IV) - CeO_2 , korundu - Al_2O_3 oraz krzemionki - SiO_2).



Rysunek 1. *Wzrost liczby komercyjnie dostępnych produktów użytkowych zawierających w swoim składzie nanomateriały*

Wraz ze wzrostem produkcji nanomateriałów rośnie stopień niekontrolowanej emisji tych indywiduów do różnych elementów biosfery. Nanocząstki metali oraz tlenków metali ze względu na niewielkie rozmiary (≤ 100 nm) zdolne są do pokonywania różnego rodzaju barier biologicznych (ściana komórkowa, bariera krew-mózg oraz krew-łożysko). Dodatkowo charakteryzują się większą reaktywnością w porównaniu do metali w skali makroskopowej, przez co może dochodzić do negatywnych oddziaływań między nanocząstkami (NPs) a ważnymi strukturami biologicznymi. Wpływ na toksyczność NPs mają m.in. indywidualne cechy organizmów żywych, liczne czynniki środowiskowe, geometria, kształt oraz stężenie NPs, a także rodzaj użytego do ich syntezy stabilizatora. Ważnym aspektem badań toksykologicznych jest również określenie ilości uwalnianego z NPs metalu w formie jonowej, która może być bardziej toksyczna niż nanocząstki danego metalu.

W celu lepszego poznania procesów biotransformacji NPs w środowisku przyrodniczym oraz w żywych komórkach, określenia ich toksyczności względem organizmów żywych występujących w różnych częściach biosfery, konieczne jest rozwijanie czułych metod analitycznych umożliwiających dokonanie pełnej charakterystyki jakościowej oraz ilościowej NPs w różnych matrycach środowiskowych. Obecnie w tym celu stosowane są techniki sprzężone, np. połączenie chromatografii hydrodynamicznej (HDC), wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej (HPLC), elektroforezy kapilarnej (CE) i przepływowego frakcjonowania w polu sił przepływu (FFF) ze spektrometrią mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ICP MS) lub zastosowanie wstępnego wydzielenia poszczególnych form analitu (np. poprzez ekstrakcję w punkcie zmętnienia (CPE)) przed ich oznaczaniem. Ciekawą alternatywę dla wymienionych technik stanowi zastosowanie spektrometrii mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną w trybie pomiarowym *single particle* (sp ICP MS). Technika sp ICP MS umożliwia jednoczesne oznaczenie metalu w formie jonowej oraz NPs o różnej wielkości. W podejściu tym eliminowane są potencjalne problemy analizy, takie jak adsorpcja na powierzchni kanału separacyjnego, oddziaływanie z membraną, wymóg stosowania eluentów oraz długi czas analizy, które mogą towarzyszyć wyżej wymienionym technikom sprzężonym, a także błędy towarzyszące wstępnemu wydzieleniu analitu. Główne problemy towarzyszące analizie nanocząstek techniką sp ICP MS związane są z ograniczeniami instrumentalnymi, spowodowanymi ograniczoną szybkością układów elektronicznych, czy układem wprowadzania próbki oraz odróżnieniem sygnału pochodzącego od NPs i rozpuszczonej frakcji metalu/tła. Różnice w budowie spektrometrów ICP MS oraz zróżnicowane podejście do analizy statystycznej/matematycznej otrzymanych sygnałów powodują konieczność wypracowywania indywidualnego podejścia do danego układu pomiarowego, analitu oraz matrycy próbki. Opracowanie metody sp ICP MS wymaga dobrania odpowiednich warunków pomiarowych obejmujących czas stabilizacji przed rozpoczęciem pomiaru, czas pomiaru i całkowity czas zbierania danych oraz optymalizacji procedury kalibracji, w tym wyboru odpowiedniego materiału odniesienia i jego stężenia, doboru stabilizatora, metody wyznaczania efektywności transportu próbki do strumienia plazmy. Powyższe problemy sprawiają, że opracowanie wiarygodnych metod umożliwiających badanie transformacji oraz określenie formy specyficjnej metali (jony, nanocząstki) w próbkach biologicznych i środowiskowych wymaga szeroko zakrojonych badań z udziałem różnych układów pomiarowych oraz próbek o zróżnicowanym składzie matrycy.

CZEŚĆ LITERATUROWA

1. Ogólna charakterystyka srebra

1.1. Zarys historyczny

Srebro jest metalem szlachetnym, który towarzyszy ludzkości od czasów starożytnych. Najstarsze przedmioty wykonane z tego kruszcu datowane na 4000 lat p.n.e. znaleziono na terenie starożytnej Sumerii [4]. Wartość srebra w tym okresie była szczególnie duża ze względu na ograniczoną dostępność metalu, który rzadko występuje w formie rodzimej, zaś metody pozyskiwania srebra z rud zawierających inne metale nie były powszechnie znane. Łacińska nazwa „*argentum*” figurująca w układzie okresowym pierwiastków jest odpowiednikiem greckiego słowa „*argyros*”, które przetłumaczyć można jako „lśniący”. Etymologia słowa „*srebro*” jest mniej oczywista i prawdopodobnie pochodzi od gockiego „*silubr*” [5].

Duży wpływ na zwiększenie dostępności tego metalu szlachetnego mieli Chaldejczycy, którzy ok. 2500 lat p.n.e. opracowali i upowszechnili metodę pozyskiwania srebra z rud siarczku ołowiu (galeny), które zawierały nawet do 20% Ag [6,7]. Metoda ta, zwana kupelacją wykorzystuje właściwości chemiczne metali szlachetnych, które podczas ogrzewania nie ulegają utlenianiu, w przeciwieństwie do ołowiu, który usuwany jest z mieszaniny w postaci PbO. Kolejną historyczną metodą otrzymywania srebra jest amalgamacja, w której dodawana do rozdrobnionego surowca rtęć tworzy amalgamaty. Następnie w celu usunięcia rtęci powstały roztwór podgrzewany jest w retorcie. Stosowalność metody ograniczona jest do rud zawierających srebro rodzime lub tworzących połączenia z chlorem.

Istotne postępy w ulepszeniu procedury pozyskiwania srebra ze złóż mineralnych odnotowano na początku XIX wieku. Na szczególną uwagę zasługuje metoda opracowana przez Parkesa w 1850 r. [8,9], w której do podgrzanej mieszaniny srebra i ołowiu dodawany jest cynk. W powstałym układzie ekstrakcyjnym metal szlachetny migruje do lżejszej warstwy ciekłego cynku (tzw. piany srebronośnej), która następnie oddzielana jest od ołowiu. Srebro otrzymuje się poprzez odparowanie cynku w odpowiedniej temperaturze lub stosując elektrolizę. Obecnie na skalę przemysłową srebro pozyskiwane jest ze źródeł pierwotnych w procesie ługowania cyjankowego, chlorkowego, amoniakalnego, za pomocą kwasu siarkowego (VI) lub tiosiarczynu (VI) sodu [10,11].

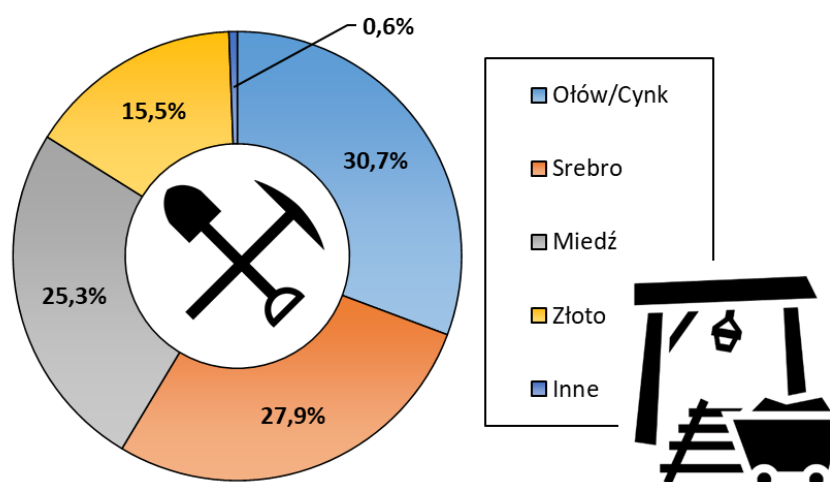
Historia wytwarzania nanocząstek srebra sięga końca XIX wieku. Jedną z pierwszych metod otrzymywania AgNPs opracował w 1889 roku M.C. Lea, który

przeprowadził redukcję roztworu AgNO_3 w obecności cytrynianu sodu. Otrzymał w ten sposób nanocząstki srebra o rozmiarach 7-9 nm [12,13]. Często spotykane, błędne definiowanie AgNPs jako nowych indywiduów chemicznych, intencjonalnie wytwarzanych przez człowieka zaledwie od kilku dekad wynika ze zmian w nazewnictwie. Pierwotnie materiał ten nazywany był srebrem koloidalnym. Wraz z rozwojem technologii umożliwiającej tworzenie, charakteryzowanie oraz obserwowanie struktur w skali nanometrycznej zmianie uległa nomenklatura. Dynamiczny rozwój nanotechnologii, który miał miejsce w ostatnim dwudziestoleciu XX wieku, związany m.in. z wynalezieniem skaningowego mikroskopu tunelowego [14] doprowadził do spopularyzowania przedrostka nano- w terminologii naukowo-technicznej. Do pierwszych komercyjnie dostępnych produktów zawierających AgNPs można zaliczyć: preparat leczniczy *Collargol* (1897 r.) [15], algicyd o nazwie handlowej *Algaedyn* (1950 r.) oraz filtry do wody (1970 r.) [16].

1.2. Występowanie, wydobywanie oraz produkcja srebra

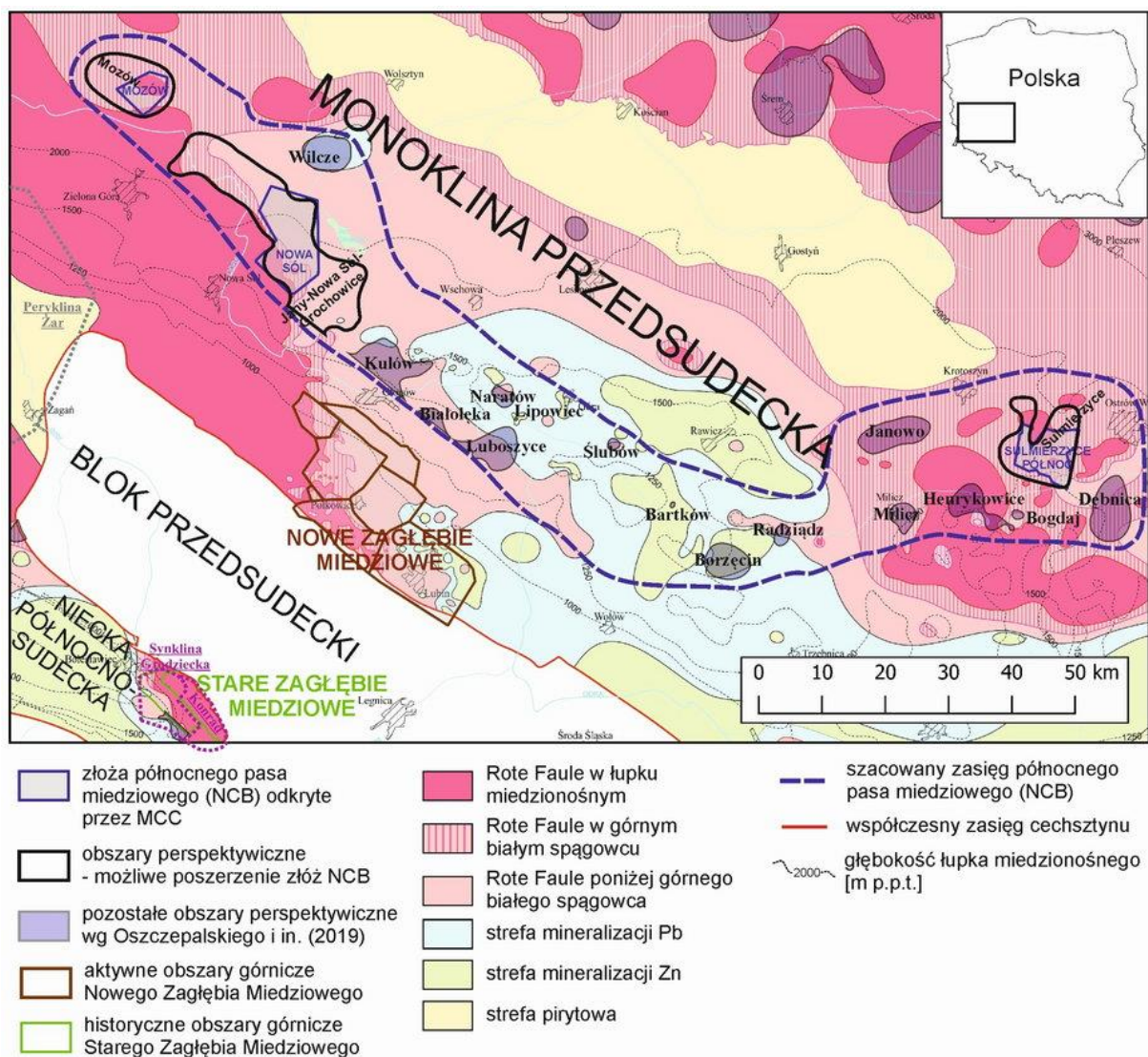
Pod względem zawartości w skorupie ziemskiej srebro zajmuje 68 miejsce (zawartość $0,07 - 0,08 \text{ mg kg}^{-1}$), natomiast pod względem rozpowszechnienia w kosmosie plasuje się na 65 miejscu. Obecnie liczba minerałów zawierających srebro skatalogowanych w bazach mindat [17], webmineral.com [18] oraz International Mineralogical Association (IMA) [19] wynosi odpowiednio 140, 167 oraz 194. Najliczniejszą grupę w bazie IMA stanowią minerały zawierające srebro w połączeniach z siarką – 141 (np. argentyt, stefanit, prustyt). Liczba minerałów, w których występuje połączenie srebra z tellurem (np. hessyt) i selenem (np. naumanit) wynosi odpowiednio 26 i 15. Metal ten występuje również w złożach hydrotermalnych tworząc połączenia ze złotem. W bazie IMA sklasyfikowano 12 minerałów zawierających oba metale szlachetne, przy czym najbardziej znanym jest elektrum [20].

Niespełna 28% srebra wydobywane jest w kopalniach, w których metal ten stanowi główne źródło dochodu. Pozostałe 72% Ag pozyskiwane jest jako produkt uboczny przy wydobyciu innych metali, np. miedzi, ołowiu, cynku i złota (Rys. 2).



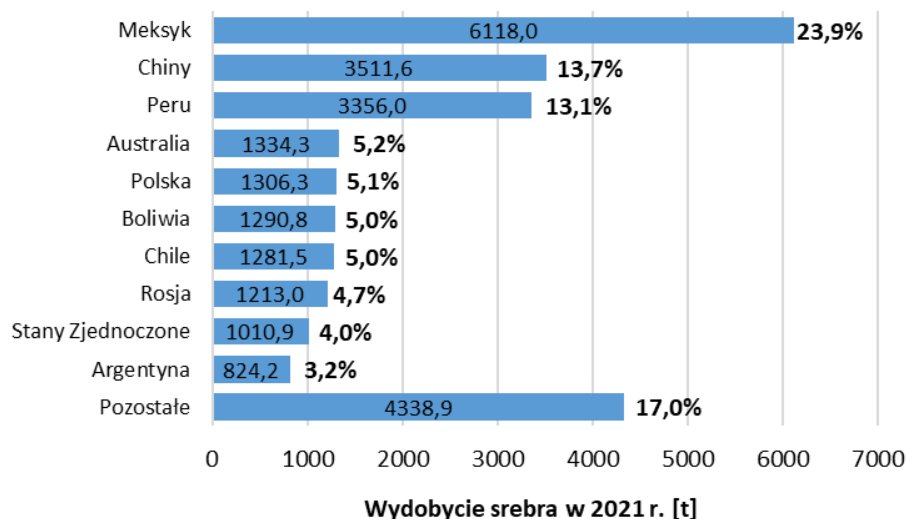
Rysunek 2. Pozyskiwanie srebra z kopalni, w których głównym źródłem dochodu jest eksploatacja określonych metali (2021 r.) [21]

Do państw posiadających największe zasoby srebra na świecie można zaliczyć: Peru, Chiny oraz Polskę. Ich rezerwy szacowane są odpowiednio na 98000, 71000 oraz 65000 t. Całkowite zasoby srebra na świecie oszacowane przez amerykańską agencję United States Geological Survey wynoszą 550000 t [22]. Wysoka pozycja Polski w powyższym rankingu jest konsekwencją niedawno odkrytych złóż Cu-Ag: Nowa Sól, Mozów oraz Sulmierzyce Północ. Szczególnie duży potencjał posiada złożo Nowa Sól, które pod względem wielkości oraz jakości klasyfikowane jest jako jedno z najlepszych złóż na świecie. Szacowane rezerwy srebra na obszarze ok. 120 km² wynoszą 36000 t [23]. Polskie złoża mineralne zawierające miedź oraz srebro znajdują się w południowej części kraju, na terenie niecki północnosudeckiej i monokliny przedsudeckiej (Rys. 3). Srebro pozyskiwane jest głównie jako produkt uboczny w kopalniach miedzi: Lubin, Rudna oraz Polkowice-Sieroszowice leżących na terenie Nowego Zagłębia Miedziowego. Kopalnie te należą do spółki KGHM Polska Miedź S.A., która w raporcie World Silver Survey 2022 w zestawieniu największych kopalni srebra na świecie zajęła pierwsze miejsce, natomiast w kategorii „największy producent srebra” uplasowała się na drugiej pozycji [21].



Rysunek 3. Położenie polskich złóż miedziowo-srebrowych [23]

W 2021 r. na świecie wydobyto ok. 25 585,5 t srebra, przy czym aż 23,9% srebrnego kruszcu pozyskano na terenie Meksyku (6 118,0 t) (Rys. 4). Kolejne istotne pozycje w zestawieniu zajęły Chiny (3 511,6 t) oraz Peru (3 356,0 t), czyli państwa posiadające największe rezerwy srebra na świecie. W Polsce wydobyto 1 306,3 t Ag, co odpowiadało 5,1% całkowitego wydobycia.



Rysunek 4. Wydobywanie srebra w 2021 r. – podział na państwa [21]

1.3. Właściwości fizykochemiczne Ag/AgNPs

Srebro należy do miedziowców, jest metalem przejściowym, który ze względu na stosunkowo dużą gęstość ($10,5 \text{ g cm}^{-3}$) zaliczany jest do metali ciężkich. Do najważniejszych właściwości fizycznych Ag można zaliczyć: srebrzystą barwę, silny połysk, dobrą ciągliwość i kowalność, wysoki współczynnik odbicia światła oraz najlepszą przewodność termiczną i elektryczną spośród metali (Tab. 1). Ze względu na dużą kruchość oraz niską odporność na czynniki mechaniczne, czyste srebro ma ograniczone zastosowanie. Powyższe ograniczenia częściowo niweluje dodatek innych metali, np. miedzi, która posiada podobne właściwości fizykochemiczne.

Tabela 1. Wybrane właściwości fizykochemiczne srebra [24,25]

Okres/Grupa	5/11	
Liczba atomowa	47	
Masa atomowa	$107,868 \text{ g mol}^{-1}$	
Konfiguracja elektronowa	$[\text{Kr}] 4d^{10}5s^1$	
Gęstość względna	$10,50 \text{ g cm}^{-3} (20^\circ\text{C})$	
Lepkość	$4,63 \text{ mPa s} (960^\circ\text{C})$	
Temperatura topnienia	$961,78^\circ\text{C}$	
Temperatura wrzenia	2162°C	
Pojemność cieplna	$235 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1} (25^\circ\text{C})$	
Promień atomowy	0,144 nm	
Promień jonowy	Ag^+	113 pm
	Ag^{2+}	89 pm
Energia jonizacji	$\text{Ag} \rightarrow \text{Ag}^+$	731 kJ mol^{-1}
	$\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^{2+}$	2072 kJ mol^{-1}
	$\text{Ag}^{2+} \rightarrow \text{Ag}^{3+}$	3361 kJ mol^{-1}

Standardowy potencjał elektrodowy	$\text{Ag} \rightarrow \text{Ag}^+$	+0,8
Elektroujemność (skala Paulinga)	1,93	
Powinowactwo elektronowe	125,6 kJ mol ⁻¹	
Opór właściwy	$1,59 \cdot 10^{-8} \Omega \cdot \text{m}$ (20°C)	
Przewodność cieplna	436 W m ⁻¹ K ⁻¹ (0°C) [26]	
Twardość (skala Vickersa)	251 MPa	
Wytrzymałość na rozciąganie	140 MPa	
Stabilne izotopy	¹⁰⁷ Ag (51,84%), ¹⁰⁹ Ag (46,16%)	
Współczynnik odbicia światła	~ 98% ($\lambda \geq 400 \text{ nm}$) [27]	

Srebro ze względu na wysoką odporność na czynniki chemiczne oraz atmosferyczne zaliczane jest do metali szlachetnych. Nie reaguje z wodą, zasadami oraz kwasami nieutleniającymi, natomiast roztwarza się w reakcji ze stężonymi kwasami utleniającymi (np. w HNO₃, gorącym H₂SO₄). Reakcja z wodą królewską w pierwszym etapie przebiega gwałtownie, następnie jest hamowana przez powstającą warstwę AgCl. W kontakcie ze związkami siarki (np. siarczkami, tiosiarczanami, siarkowodorem) oraz ozonem na powierzchni metalicznego srebra powstaje czarna, trudno rozpuszczalna warstwa siarczku srebra (Ag₂S, K_{sp} = 6,00 · 10⁻⁵¹ [28]). Ze względu na dodatni potencjał elektrodowy srebro nie wypiera wodoru z kwasów organicznych (np. C₃H₆O₃, CH₂O₂) oraz nieutleniających (np. H₃PO₄, HBr). W związkach przeważnie występuje na +I stopniu utlenienia, rzadziej na +II (np. w AgO, AgF₂) lub +III (np. w Ag₂O₃). Jony srebra(I) wykazują dużą reaktywność w stosunku do fluorowców (fluoru, chloru, bromu i jodu) oraz związków zawierających atomy siarki i azotu (np. azotanów, tiosiarczanów, cyjanków, amin).

Nanocząstki srebra (AgNPs) mają odmienne właściwości fizykochemiczne od srebra w formie makroskopowej oraz jonowej. Obiekty w skali nanometrycznej posiadają duży stosunek powierzchni do objętości. Wraz ze wzrostem stopnia rozdrobnienia AgNPs zmianie ulegają właściwości cieplne, elektryczne, optyczne, magnetyczne oraz katalityczne. Do unikalnych właściwości AgNPs można również zaliczyć działanie antystatyczne [29] oraz zdolność do efektywnego pochłaniania tlenu atomowego.

Temperatura topnienia nanocząstek srebra o rozmiarach 2,4 nm wynosi zaledwie 350°C, natomiast dla materiału nierozdrobnionego jest to wartość ok. 960°C [30]. Dodatek nanocząstek srebra do różnych układów (np. cieczy, materiałów kompozytowych) poprawia przewodność cieplną [31,32] i elektryczną [33,34]. Nanocząstki srebra pochłaniają i rozpraszają promieniowanie elektromagnetyczne w szerokim zakresie spektralnym, przy czym położenie maksimum absorpcji światła (λ_{max}) jest ściśle związane z rozmiarem AgNPs. W przypadku sferycznych nanocząstek srebra stabilizowanych cytrynianem (c-AgNPs) wraz ze wzrostem rozmiaru nanocząstek z 10 nm do 100 nm zaobserwowano przesunięcie λ_{max}

o ponad 100 nm (z 392,1 nm do 492,8 nm) [35]. Powyższe właściwości optyczne są konsekwencją występowania zlokalizowanego rezonansu plazmonów powierzchniowych (LSPR). Właściwości AgNPs zależą również od kształtu, rodzaju stabilizacji oraz funkcjonalizacji powierzchni nanocząstek. Obecnie syntezowane są m.in. nanocząstki srebra o geometrii sferycznej, trójkątnej, rurek, prętów, drutów, płytek, sześćio-, dziesięcio- oraz dwunastościanów [36,37,38,39]. AgNPs mogą być stabilizowane elektrostatycznie, sterycznie lub elektrosterycznie [40]. W przypadku pierwszego mechanizmu na powierzchni cząstek powstaje podwójna warstwa elektryczna, której obecność przeciwdziała przyciąganiu się cząstek za sprawą sił van der Waalsa. Ważnym parametrem stosowanym do określania stabilności układów koloidalnych jest potencjał Zeta (ζ), który zależy w dużym stopniu od pH oraz siły jonowej roztworu. Potencjał ζ dla układów o umiarkowanej stabilności mieści się w zakresie od ± 30 do ± 40 mV, natomiast wartości ≥ 40 mV świadczą o wysokiej stabilności dyspersji nanocząstek [41]. Do stabilizacji elektrostatycznej AgNPs stosowane są m.in. cytryniany oraz jonowe środki powierzchniowo czynne (np. dodecylosiarczan(VI) sodu (SDS)). Nanocząstki mogą być również stabilizowane poprzez przyłączenie do ich powierzchni polimerów lub niejonowych środków powierzchniowoczynnych o dużych masach cząsteczkowych [42]. W takim przypadku między NPs pokrytymi warstwą polimeru/surfaktanta występuje zawada steryczna skutecznie ograniczająca powstawanie agregatów. Obecnie nanocząstki srebra są najczęściej stabilizowane sterycznie za pomocą: poli(winylopirolidonu) (PVP) [43], kwasu poli(metakrylowego) (PMAA) [44], poli(winyloalkoholu) (PVA) [45] oraz poli(etylenoglikolu) (PEG) [46]. Ostatni z wymienionych mechanizmów stabilizacji jest wypadkową efektów elektrostatycznych i sterycznych. Przykładem jest stabilizacja elektrosteryczna AgNPs za pomocą rozgałęzionej poli(etylenoiminy) (BPEI), która posiada grupy aminowe ulegające jonizacji w roztworach o określonym pH [40]. Dodatkowo nanocząstki srebra poddawane są funkcjonalizacji mającej na celu m.in. zmianę ładunku powierzchniowego, wprowadzenie do struktury określonych grup chemicznych, tworzenie powłok dielektrycznych (np. SiO₂, Al₂O₃, TiO₂) zmieniających właściwości optyczne lub wprowadzenie warstwy fluorescencyjnej. Do zastosowań biologicznych AgNPs modyfikowane są m.in. białkami (np. albuminą surowicy bydlęcej), peptydami (np. glutationem) lub polisacharydami (np. chitozyną) [47]. Ze względu na duży stosunek powierzchni do objętości AgNPs wykazują wyższą reaktywność niż srebro w formie makroskopowej. W przeciwieństwie do srebra nierozdrobnionego w reakcji z kwasem solnym AgNPs wypierają wodór [48].

1.4. Właściwości biologiczne form specyjalnych srebra Ag^+ / $AgNPs$

Aktywność przeciwbakteryjna srebra jonowego

Srebro w formie jonowej wykazuje duże powinowactwo do grup o właściwościach elektronodonorowych, takich jak grupa aminowa, karboksylowa, tiolowa, fosforanowa i imidazolowa, które wchodzi w skład ważnych do prawidłowego funkcjonowania organizmów struktur biologicznych. Oddziaływania z grupami tiolowymi obecnymi w białkach prowadzą do powstawania trwałych połączeń zmieniających strukturę, konformację i blokujących miejsca aktywne, czego konsekwencją może być np. inaktywacja enzymów. Srebro jonowe wykazuje silniejsze działanie przeciwbakteryjne niż $AgNPs$ [49]. Efektywność bakteriobójcza Ag^+ jest wprost proporcjonalna do stężenia jonów srebra w środowisku. Dzięki efektowi oligodynamicznemu srebro wykazuje wysoką skuteczność antybakteryjną już przy niskich stężeniach [50].

Można wyróżnić kilka mechanizmów bakteriobójczego działania Ag^+ [51,52]:

- I. **Oddziaływanie z otoczką komórki bakteryjnej prowadzące do zaburzenia integralności błony komórkowej.** Konsekwencją destabilizacji wymienionej struktury jest zaburzenie w transporcie jonów potasowych oraz zmniejszenie poziomu adenozyntrifosforanu (ATP) związanego z fosfolipidami. W wyniku akumulacji srebra w otoczkę komórki bakteryjnej dochodzi do oddzielenia błony cytoplazmatycznej od ściany komórkowej. Efekt obserwowany jest zarówno w przypadku bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych [53,54]. Oddziaływanie ze srebrem może prowadzić do uszkodzenia/eliminacji wici bakteryjnej, co skutkuje upośledzeniem funkcji motorycznych komórki [49].
- II. **Oddziaływanie ze strukturami biologicznymi znajdującymi się we wnętrzu komórki (enzymami oraz kwasami nukleinowymi).** Oddziaływanie Ag^+ z białkami rybosomalnymi prowadzi do denaturacji natywnej struktury rybosomu i hamowania biosyntezy białek. Konsekwencją wiązania Ag^+ z kwasami nukleinowymi, np. poprzez zasady pirymidynowe, może być zahamowanie procesów transkrypcji genów oraz replikacji DNA [55].
- III. **Produkcja reaktywnych form tlenu (ROS) prowadząca do stresu oksydacyjnego.** Jest konsekwencją m.in. inaktywacji głównych białek łańcucha oddechowego, np. cytochromu b.

Powyższe mechanizmy przy odpowiednio długiej ekspozycji prowadzą do śmierci komórki bakteryjnej. Należy zaznaczyć, że efekt toksyczny jest uzależniony od rodzaju bakterii eksponowanych na Ag^+ . Sutterlin et al. [56] wykazali, że minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC, ang. *Minimal Bacterial Concentration*) srebra jonowego w przypadku bakterii Gram-dodatnich może być ponad 32-krotnie wyższe niż wartość MBC dla komórek bakterii Gram-ujemnych.

Aktywność biologiczna nanocząstek srebra

Właściwości biologiczne AgNPs zależą od wielu czynników m.in. kształtu, rozmiaru, stężenia, rodzaju użytego do syntezy stabilizatora, ładunku powierzchniowego oraz sposobu funkcjonalizacji powierzchni. Poza właściwościami fizykochemicznymi samych nanocząstek srebra, charakter i przebieg oddziaływania z organizmami żywymi determinowany jest przez liczne czynniki środowiskowe, np. pH, siłę jonową, czy stopień złożoności układu [57] oraz cechy osobnicze, w tym budowę organizmu, występowanie różnych mechanizmów blokujących wychwyt metali, mechanizmy detoksykacyjne. Ważnym czynnikiem jest również ilość uwalnianego z AgNPs metalu w formie jonowej, który może wykazywać inne działanie niż nanocząstki pierwotnie wprowadzane do środowiska. Do procesów obniżających aktywność biologiczną AgNPs można zaliczyć agregację nanocząstek, która jest konsekwencją spadku stabilności układu koloidalnego w czasie [58].

Rozmiar i kształt nanocząstek to czynniki mające istotny wpływ na właściwości biologiczne AgNPs. W licznych badaniach [59,60,61,62] dowiedziono, że wraz ze spadkiem średnicy AgNPs rośnie aktywność przeciwbakteryjna, szczególnie przy rozmiarach ≤ 10 nm [63,64]. Obecnie coraz częściej podejmowane są próby porównania właściwości biologicznych nanocząstek różniących się morfologią. Bharti et al. [38] dowiedli, że dziesięciościenne nanocząstki srebra wykazują 10-krotnie wyższą aktywność bakteriobójczą wobec mikroorganizmów: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* oraz *Pseudomonas aeruginosa* niż sferyczne AgNPs. Pal et al. [65] porównali efektywność biobójczą nanocząstek o geometrii sferycznej, trójkątnej oraz prętów wobec bakterii *Escherichia coli*. Najlepsze właściwości biobójcze wykazały nanocząstki o geometrii trójkątnej. Ciekawe porównanie właściwości biobójczych AgNPs o geometrii sferycznej, płytek, sześciątów oraz pręcików wobec bakterii *Staphylococcus aureus* przeprowadził Helmlinger et al. [66]. W badaniach wykazano, że na działanie bakteriobójcze nanocząstek duży wpływ ma powierzchnia właściwa oraz ilość uwalnianego srebra w formie jonowej.

Najwyższą aktywność bakteriobójczą wykazały nanopłytki srebra, z których uwalniane były największe ilości Ag^+ . Posiadały one również największą powierzchnię właściwą.

Kudrinskiy et al. [67] stwierdzili, że przy ocenie stopnia toksyczności AgNPs takie czynniki, jak ładunek powierzchniowy, stabilność koloidalna oraz zdolność do uwalniania Ag^+ mają większe znaczenie niż rozmiar cząstek. W innych badaniach [68] sprawdzono jaki wpływ na toksyczność AgNPs wobec bakterii *Bacillus* mają właściwości elektrostatyczne nanocząstek. W badaniach zastosowano AgNPs obdarzone różnymi ładunkami powierzchniowymi, od ujemnych po dodatnie (c-AgNPs < PVP-AgNPs < BPEI-AgNPs). Stwierdzono występowanie korelacji pomiędzy toksycznością, a wartością ładunku powierzchniowego. Najmniejszą szkodliwość wobec bakterii *Bacillus* wykazywały nanocząstki stabilizowane jonami cytrynianowymi. Mikroorganizmy *Bacillus* należą do grupy bakterii Gram-dodatnich, których ładunek ze względu na obecność grup karboksylowych, fosforanowych i aminowych w błonie komórkowej jest ujemny. Autorzy tłumaczyli niską toksyczność c-AgNPs występowaniem bariery elektrostatycznej wynikającej z obecności jednoimiennego ładunku elektrycznego na powierzchni bakterii i c-AgNPs. Stwierdzono również, że takie czynniki jak rozmiar i kształt NPs mają wpływ na toksyczność dopiero po pokonaniu wyżej wymienionej bariery elektrostatycznej. Należy podkreślić, że efekt toksyczny zależy od szczepu bakterii i budowy ściany komórkowej [64].

W licznych pracach naukowych [51,69,70,71] przeciwbakteryjne działanie AgNPs powiązano głównie z uwalnianiem srebra w formie jonowej oraz oddziaływaniem z zewnętrzną powierzchnią komórek. Do przenikania przez ścianę komórkową bakterii zdolne są jedynie nanocząstki o niewielkich rozmiarach (≤ 10 nm) [63]. Ekspozycja bakterii na działanie AgNPs prowadzi do generowania we wnętrzu komórek wyższych stężeń reaktywnych form tlenu (m.in. nadtlenu wodoru, rodnika hydroksylowego, anionu nadtlenkowego) niż w przypadku kontaktu z Ag^+ [51,55]. Bakteriobójcze działanie AgNPs związane jest również z zaburzeniem sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Hamowanie transdukcji sygnału realizowane jest poprzez defosforylację substratów peptydowych na resztach tyrozynowych [51,72,73].

Oddziaływanie Ag⁺/AgNPs z glonami

Głony są organizmami autotroficznymi należącymi do licznych grup systematycznych, np. zielenic, euglenin, krasnorostów, brunatnic i złotowiciowców. Powszechnie występują zarówno w wodach słodkich, jak i słonych oraz w powierzchniowych warstwach gleby. W ujęciu fykologicznym funkcjonuje podział na glony eukariotyczne i prokariotyczne, natomiast mikrobiolodzy wyróżniają tylko glony eukariotyczne, wyłączając sinice [74]. Organizmy te są wrażliwe na toksyczne działanie srebra. Dorobantu et al. [75] przeprowadzili badania wpływu Ag⁺ i AgNPs na bakterie (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*), drożdże (*Saccharomyces cerevisiae*) oraz glony (*Chlorella protothecoides*, *Euglena gracilis*). Srebro w obu formach wykazało największą toksyczność w stosunku do komórek glonów. W wyniku ekspozycji organizmów *Euglena gracilis* na działanie AgNPs stwierdzono, że nanocząstki są adsorbowane na zewnętrznej powierzchni ściany komórkowej, a efekt toksyczny związany jest głównie z frakcją jonową uwalnianą z AgNPs [76]. Li et al. [77] wykazali, że srebro w formie jonowej i nanocząstek obniża wydajność fotosyntezy i prowadzi do zmian morfologicznych komórek glonów *Euglena gracilis*. Przy czym stężenie efektywne prowadzące do zahamowania 50% wydajności fotosyntezy (EC₅₀, ang. *half-maximal effective concentration*) przy 2-godzinnej ekspozycji na AgNO₃ i AgNPs wyniosło odpowiednio 89 i 1487 nmol L⁻¹. Podczas ekspozycji *Chattonella marina* na działanie Ag⁺ oraz AgNPs stwierdzono występowanie silniejszego efektu toksyczności podczas kontaktu glonów ze srebrem w formie jonowej [78], a toksyczne działanie AgNPs przypisano Ag⁺ uwalnianemu z nanocząstek. W badaniach przeprowadzonych przez Oukarroum et al. [79] na glonach *Chlorella vulgaris* i *Dunaliella tertiolecta* wykazano, że ekspozycja na AgNPs prowadzi do spadku zawartości chlorofilu, tworzenia ROS oraz peroksydacji lipidów, co w konsekwencji doprowadza do śmierci komórek. Szczegółową analizę zmian morfologicznych oraz biochemicznych zachodzących w komórkach glonów *Chlorella vulgaris* podczas 96-godzinnej ekspozycji na AgNPs przeprowadzono w zespole Gagneten [80]. Zaobserwowano występowanie zmian w stężeniach chlorofilu-a, chlorofilu-b, feofityny oraz karotenoidów, których konsekwencją była zmiana barwy organizmów z zielonej na bladobrazową. Nanocząstki srebra doprowadziły do zahamowania wzrostu (EC₅₀ = 110 µg L⁻¹) oraz metabolizmu komórek. Zhang et al. [81] opisali wpływ ładunku powierzchniowego AgNPs na efektywność bioakumulacji tych indywidualów przez glony słodkowodne *Chlorella vulgaris*. W badaniach zastosowano dodatkowo (PEI-AgNPs) oraz ujemnie (c-AgNPs) naładowane nanocząstki srebra.

Wykazano, że w oddziaływaniu dodatnio naładowanych AgNPs z glonami dominowały przyciągające siły van der Waalsa, co przekładało się na dużą efektywność biosorpcji. W przypadku oddziaływania ujemnie naładowanych c-AgNPs z glonami przeważały siły odpychania elektrostatycznego, co wzmacniało barierę energetyczną i utrudniało zachodzenie biosorpcji. Stałe szybkości pobierania PEI-AgNPs były ~ 20-krotnie wyższe niż w przypadku ekspozycji na działanie c-AgNPs. Ważną rolę w procesie bioakumulacji AgNPs pełnią pozakomórkowe związki polimerowe (EPS, ang. *extracellular polymeric substances*) wytwarzane przez glony. EPS tworzą warstwę chroniącą komórki glonów przed czynnikami zewnętrznymi. Zbudowane są z białek, polisacharydów, kwasów nukleinowych, lipidów oraz substancji nieorganicznych, przy czym 70 – 80% całkowitego węgla organicznego w EPS pochodzi z dwóch pierwszych grup związków. Oddziaływanie EPS-AgNPs może prowadzić do zmniejszenia toksyczności nanocząstek poprzez wiązanie uwalnianego Ag^+ oraz ograniczenie możliwości przenikania srebra do wnętrza komórki [82].

W literaturze można znaleźć liczne doniesienia na temat negatywnego wpływu nanocząstek srebra na inne organizmy wodne, np. ryby [83,84] oraz skorupiaki [85,86], ale szerszy opis tego zagadnienia jest poza zakresem pracy doktorskiej.

Wpływ Ag^+ /AgNPs na organizm ludzki

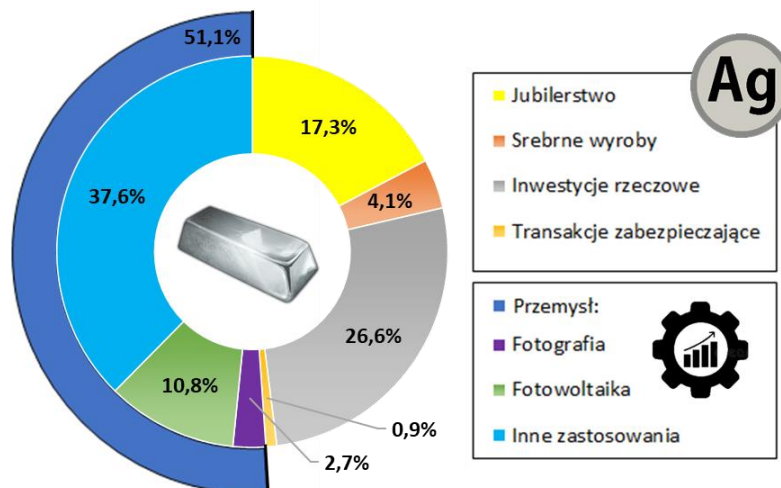
Dzienne spożycie srebra w diecie szacuje się na 70-90 μg [87]. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) dopuszczalne stężenie srebra w wodzie pitnej nie powinno przekraczać 0,1 $mg L^{-1}$, natomiast większość produktów spożywczych zawiera śladowe ilości srebra w przedziale od 10 do 100 $\mu g kg^{-1}$ [88]. Zawartość Ag w wodzie pitnej zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2017 r. nie może przekraczać wartości 0,01 $mg L^{-1}$ [89]. Srebro w organizmie wiązane jest głównie przez metalotioneiny obecne w wątrobie. Białka te posiadają w swojej strukturze liczne reszty cysteinowe i biorą aktywny udział w procesie detoksykacji organizmu z metali ciężkich. Zdrowe osoby wydalają ok. 1 μg Ag na dobę [90]. Nadmierne spożycie srebra może prowadzić do srebrzycy (argyrii), której charakterystycznym objawem jest niebieskoszara pigmentacja skóry, która może mieć charakter miejscowy lub uogólniony. Argyrie w postaci uogólnionej mogą wywołać dawki skumulowane w zakresie 70-1500 $mg Ag/kg$ masy ciała [91]. Średnia dawka śmiertelna (LD_{50}) przy podaniu doustnym $AgNO_3$ dla szczurów wynosi 1173 $mg kg^{-1}$ masy ciała, natomiast w przypadku srebra metalicznego nie obserwuje się toksycznego efektu w całym badanym zakresie ($LD_{50} > 2000 mg kg^{-1}$ masy ciała).

Nanocząstki srebra poza pożądanym działaniem biobójczym wobec mikroorganizmów chorobotwórczych mogą prowadzić do zaburzenia prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. AgNPs o różnych rozmiarach i kształtach przypisuje się działanie neurotoksyczne, hepatotoksyczne [92], genotoksyczne, cytotoksyczne, teratogenne [93] oraz wywołujące stany zapalne, np. płuc [94]. Szczególnie niebezpieczne są najmniejsze nanocząstki, które mogą pokonywać naturalne bariery biologiczne, takie jak błony komórkowe oraz bariery krwi-mózg i krew-łożysko. Nanocząstki przedostają się do organizmu drogą pokarmową, inhalacyjną oraz dermalną (w przypadku uszkodzenia skóry), a następnie są transportowane do głównych narządów. Skutkami ekspozycji na AgNPs są stres oksydacyjny, hamowanie aktywności mitochondriów, peroksydacja lipidów, uszkodzenie DNA i apoptoza komórek [95,96]. Po inhalacji AgNPs mogą uszkadzać śluzówkę nosa, a w skrajnych przypadkach prowadzić do zapalenia płuc [97]. Obecnie brakuje szczegółowych danych dotyczących dawek toksycznych AgNPs przy różnych drogach ekspozycji.

Badania *in vitro* [98] przeprowadzone z udziałem enzymów metabolicznych - dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) i gliceraldehydo-3-fosforanowej (GAPDH) eksponowanych na działanie AgNPs wykazały, że uwalniane z nanocząstek srebro jonowe wchodzi w interakcję z grupami tiolowymi obecnymi w białkach. Dehydrogenaza jabłczanowa posiada 8 grup tiolowych, ale żadna nie leży w centrum aktywnym. Nastęstwem wiązania Ag^+ przez wymienione grupy są zmiany strukturalne prowadzące do inaktywacji enzymu. W strukturze GAPDH występuje jedna grupa -SH w miejscu aktywnym enzymu. W tym przypadku konsekwencją związania srebra przez grupę tiolową jest natychmiastowa inaktywacja enzymu.

1.5. Zastosowanie Ag/AgNPs

Srebro ze względu na walory estetyczne oraz unikalne właściwości chemiczne (Tab. 1) i biologiczne stosowane jest w wielu sektorach gospodarki. Zastosowanie srebra w szeroko rozumianym przemyśle obejmującym m.in. branżę fotowoltaiczną, elektryczną i elektroniczną, samochodową oraz fotograficzną (Rys. 5) stanowi ponad połowę (51,1%) całkowitego zapotrzebowania na ten surowiec, które w 2021 r. wyniosło ~ 32,6 tys. ton srebra [21].



Rysunek 5. Zastosowanie srebra w różnych sektorach gospodarki w 2021 roku [21]

Najlepsza przewodność elektryczna spośród metali oraz dobra plastyczność srebra sprawia, że jest ono surowcem wykorzystywanym do produkcji półprzewodników, rezystorów, tranzystorów oraz kondensatorów. Zdecydowana większość układów scalonych oraz obwodów drukowanych wykorzystywanych w telekomunikacji, branży komputerowej oraz automatyce przemysłowej zawiera komponenty wykonane ze srebra. Rosnące zapotrzebowanie na ten surowiec jest konsekwencją rozwoju technologii oraz ogólnoswiatowych trendów związanych z działaniami proekologicznymi. Do najważniejszych działań w tym zakresie możemy zaliczyć ograniczenie do minimum stosowania ołowiu w stopach lutowniczych [99] oraz wzrost udziału energii ze źródeł odnawialnych (OZE) w całkowitym zużyciu energii. Obecnie do lutowania bezołowiowego stosowane są stopy cyny ze srebrem, miedzią, bizmutem lub antymonem.

Srebro stosowane jest również w przemyśle motoryzacyjnym, gdzie obecny kierunek zmian związany ze stopniowym odchodzeniem od paliw kopalnych prowadzi do wzrostu zapotrzebowania na ten surowiec. Produkowane w ciągu ostatnich dekad pojazdy spalinowe zawierały średnio 15-28 g Ag. Dla samochodów hybrydowych był to przedział 18-34 g Ag, natomiast produkcja nowoczesnych pojazdów elektrycznych wymaga zużycia ok. 25-50 g Ag na jednostkę [100]. Dodatek srebra do stopu ołowiu, z którego zbudowana jest anoda w akumulatorze samochodowym ma pozytywny wpływ na siłę elektromotoryczną i odporność na niskie temperatury oraz głębokie rozładowanie.

Znaczny wzrost zapotrzebowania na srebro obserwowany jest w przemyśle fotowoltaicznym, którego udział w 2021 r. kształtował się na poziomie 10,8% całkowitego popytu na surowiec (3 536,5 t) [21]. Dla porównania udział tego sektora w całkowitym

zapotrzebowaniu na srebro w 2014 r. wynosił zaledwie 6,6% (1 863,1 t) [101]. Obecnie na terenie Unii Europejskiej prowadzone są działania mające na celu osiągnięcie do 2030 r. co najmniej 32% udziału energii odnawialnej w końcowym zużyciu energii brutto [102]. Z tego powodu prognozowany jest stały wzrost zapotrzebowania na instalacje fotowoltaiczne i zużycie srebra w tym sektorze [103]. Przy czym należy zaznaczyć, że postęp technologiczny umożliwił zredukowanie ilości srebra potrzebnej do wyprodukowania ogniwa słonecznego z ok. 512 mg Ag w 2009 r. do 111 mg Ag w 2019 r. [104].

W fotografii analogowej i rentgenowskiej oraz w kinematografii wykorzystywane jest srebro w postaci halogenków (AgCl, AgI, AgBr), które ulegają rozkładowi pod wpływem światła. Zapotrzebowanie na srebro w tym sektorze w 2021 roku ukształtowało się na poziomie 892,7 t (2,7% całkowitego zapotrzebowania).

Właściwości katalityczne srebra wykorzystywane są w wielu reakcjach chemicznych o znaczeniu przemysłowym. Do najważniejszych można zaliczyć m.in. reakcję otrzymywania formaldehydu oraz tlenku etylenu. Oba wymienione związki stosowane są do produkcji tworzyw sztucznych. Roczne zużycie srebra do katalitycznego utleniania etylenu do tlenku etylenu kształtuje się na poziomie ok. 311,0 t [105].

Znane już od starożytności właściwości antyseptyczne srebra wykorzystywane są obecnie w medycynie, m.in. w branży farmaceutycznej, ortopedycznej oraz stomatologicznej, i w sektorze spożywczym. Do głównych związków zawierających Ag w preparatach farmaceutycznych można zaliczyć: azotan srebra (łac. *Lapis infernalis*), srebro koloidalne (łac. *Argentum colloidal*), sulfadiazynę srebra (łac. *Sulfathiazolum argentum*) oraz białczan srebra (łac. *Argentum proteinicum*) [106]. Srebro stosowane jest również w formie kompleksu TIAB (ang. *Titanium-Argenticum-Bezoicum*), w którym Ag^+ oraz chlorek benzalkoniowy związane są z tlenkiem tytanu(IV), który pełni funkcję nośnika. Wszystkie składniki kompleksu TIAB wykazują działanie przeciwbakteryjne, dodatkowo chlorek benzalkoniowy posiada właściwości keratolityczne [107]. Kompleks TIAB znalazł zastosowanie w wyrobach medycznych stosowanych m.in. w branży dermatologicznej, stomatologicznej [108] oraz ginekologicznej [109]. Wysoką aktywność przeciwbakteryjną wykazuje srebro w formie nanocząstek. Stwierdzono, że AgNPs w połączeniu z powszechnie stosowanymi antybiotykami o działaniu przeciwbakteryjnym, takimi jak penicylina G, ampicylina, wankomycyna, erytromycyna, chloramfenikol, kanamycyna oraz klindamycyna wykazują działanie synergiczne wobec bakterii *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* [110,111]. Połączenia rtęci z takimi metalami jak: srebro, cyna, cynk oraz miedź stosowane są

w stomatologii jako wypełnienia amalgamatowe [112]. Srebro (E174) jest barwnikiem stosowanym głównie w cukiernictwie do zdobienia różnych wyrobów, np. ciast i tortów.

Istotną część (48,9%) całkowitego zapotrzebowania na srebro stanowią obszary wykorzystujące walory estetyczne oraz wartość inwestycyjną tego metalu. Srebro jest kowalnym, miękkim, łatwym w obróbce metalem, znacznie tańszym od złota. Zastosowanie srebrnego kruszcu w jubilerstwie oraz produkcji srebrnych wyrobów (zastawy stołowej) w 2021 r. kształtowało się na poziomie odpowiednio 17,3% (5 642,2 t) oraz 4,1% (1 328,1 t) całkowitego zapotrzebowania na srebro. W raporcie *World Silver Survey 2022* [21] wyszczególniono również kategorie obejmujące inwestycje rzeczowe oraz transakcje zabezpieczające, których udział w całkowitym zapotrzebowaniu na Ag w 2021 r. wyniósł odpowiednio: 26,6% (8 668,5 t) oraz 0,9% (292,4 t).

Nanocząstki srebra ze względu na unikalne właściwości fizykochemiczne i biologiczne znalazły szerokie zastosowanie m.in. w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym, chemicznym, budowlanym, elektrycznym oraz tekstylnym. Dokładne określenie ilości AgNPs wyprodukowanych globalnie w skali roku nie jest możliwe. Szacuje się, że w 2018 r. wytworzono od 210 do 530 ton AgNPs, przy czym prognozowany jest ciągły wzrost produkcji tego nanomateriału [113]. Spośród 5367 produktów skatalogowanych obecnie w bazie „The Nanodatabase” aż 567 (10,6%) zawiera w swoim składzie nanocząstki srebra [2]. W tabeli 2 przedstawiono przykłady zastosowania AgNPs w różnych sektorach przemysłu oraz zalety dodatku tego nanomateriału.

Tabela 2. Przykłady zastosowania AgNPs w przemyśle i produktach codziennego użytku [114]

Rodzaj przemysłu	Produkty zawierające AgNP	Zalety dodatku AgNPs
Spożywczy i rolniczy	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Pojemniki do przechowywania żywności [115], wkłady do lodówek [116], butelki dla dzieci, deski do krojenia [117]. ➤ Systemy do uzdatniania wody [118]. 	Wydłużenie okresu przydatności do spożycia [119]. Działanie przeciwbakteryjne.
	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Nawozy, nanopestycydy [120], ➤ Pasze i karmy dla zwierząt [121]. 	Przyspieszenie wzrostu roślin. Pozytywny wpływ na efektywność pobierania składników odżywczych. Działanie przeciwdrobnoustrojowe i przeciw pasożytnicze.
Farmaceutyczny i medyczny	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Maści, kremy, żele i opatrunki stosowane na rany oraz zmiany skórne (np. opryszczkę [122], owrzodzenie [123], trądzik [124], grzybicę [125] i łuszczycę [126]), 	Przeciwdziałanie tworzeniu biofilmu, którego obecność zaburza proces gojenia się ran. Właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, przeciwpierwotniakowe,

	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Nośniki leków, środki stosowane w innowacyjnych, eksperymentalnych metodach leczenia nowotworów [127,128] oraz neutralizacji wirusa HIV [129] i COVID-19 [130], ➤ Preparaty dezynfekujące [131], ➤ Preparaty okulistyczne [132] i laryngologiczne, ➤ Medycyna inwazyjna (np. cewniki [133], implanty sercowo-naczyniowe [134], rurki intubacyjne [135], szwy [136]), implantologia (biomateriały rekonstrukcyjne, implanty [137,138]), protetyka (protezy), ➤ Diagnostyka obrazowa, biosensory [139], ➤ Stomatologia (pasty do zębów [140], kompozyty stomatologiczne, preparaty dokanałowe). 	<p>przeciwnowotworowe, przeciwzapalne. AgNPs posiadają szerokie spektrum działania – skutecznie eliminują ok. 650 rodzajów mikroorganizmów chorobotwórczych [141]. Dodatek AgNPs niweluje ryzyko rozwinięcia przez bakterie lekooporności.</p>
Kosmetyczny	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Środki do pielęgnacji włosów [142], ➤ Chusteczki nawilżane, dezodoranty, spray'e do butów, ➤ Kosmetyki przeciwsłoneczne [143]. 	<p>Działanie antystatyczne, bakteriobójcze oraz dezodorujące. Wzrost efektywności pochłaniania światła w zakresie UV-Vis.</p>
Chemiczny	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Katalizatory heterogeniczne stosowane, w syntezie związków organicznych [144,145]. ➤ Czujniki optyczne stosowane do wykrywania różnych związków, np. farmaceutyków [146], pozostałości pestycydów [147], lotnych związków organicznych [148], metali ciężkich [149], ➤ Systemy oczyszczania ścieków [150]. 	<p>Reaktywność, selektywność, stabilność oraz możliwość wielokrotnej regeneracji katalizatora. Występowanie zjawiska zlokalizowanego rezonansu plazmonów powierzchniowych (ang. <i>Localized surface plasmon resonance</i>, LSPR)</p>
Budowlany	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Farby, powłoki ochronne, emulsje [151,152], ➤ Instalacje sanitarne. 	<p>Działanie biobójcze. Poprawa właściwości fizykochemicznych emulsji (ciężar właściwy, wytrzymałość na ścieranie, efektywność krycia)</p>
Elektryczny i elektroniczny	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tusze przewodzące/obwody drukowane [153], pasty, kleje przewodzące, ➤ Czujniki, urządzenia do konwersji i magazynowania energii, ➤ Anteny [154], 	<p>Wysoka przewodność elektryczna, działanie antybakteryjne. Zmniejszenie strat energii, szczególnie przy wyższych częstotliwościach (>80 GHz).</p>
Tekstylny	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Odzież sportowa [155], wkładki do butów. 	<p>Działanie bakteriobójcze, przeciugrzybicze.</p>

Szerokie zastosowanie srebra w różnych procesach i systemach technologicznych oraz produktach użytkowych przekłada się na wzrost emisji tego metalu do różnych elementów biosfery.

1.6. Antropogeniczne źródła emisji Ag⁺/AgNPs

Srebro może być uwalniane do środowiska przyrodniczego na etapie wydobycia, przetwarzania, wykorzystania przemysłowego, składowania oraz przetwarzania odpadów. Do emisji Ag⁺/AgNPs z materiałów użytkowych może dochodzić podczas ich produkcji, użytkowania, degradacji oraz utylizacji [156]. Nanocząstki srebra mogą być uwalniane z tekstyliów podczas procesu prania, a następnie transportowane do kanalizacji [157]. Najprawdopodobniej większość AgNPs trafiając do ścieków ulega przekształceniu w siarczek srebra, który akumulowany jest w osadach ściekowych. Powstała biomasa wykorzystywana jest jako nawóz stosowany na gruntach rolnych, z których srebro może być uwalniane do wód powierzchniowych bądź pobierane przez rośliny [158]. Kolejnym potencjalnym źródłem emisji są farby, warstwy ochronne oraz powłoki zawierające AgNPs pokrywające powierzchnie eksponowane na działanie zróżnicowanych warunków atmosferycznych. Kaegi et al. [159] przeprowadzili eksperyment, w którym sprawdzono jakie ilości srebra uwalniane są z powierzchni panelu elewacyjnego pokrytego farbą zawierającą AgNPs. Po rocznej ekspozycji na działanie czynników atmosferycznych stwierdzono, że 30% AgNPs zostało uwolnione do środowiska, przy czym emisja ok. 80% tej wartości nastąpiła w trakcie pierwszych 2 miesięcy.

Przykładem ekosystemu zanieczyszczonego srebrem pochodzenia antropogenicznego jest rzeka Skudai położona w Malezji. Mat Lazim et al. [160] przeprowadzili w latach 2018 - 2019 badania, w których stwierdzono wystąpienie zanieczyszczenia wody rzecznej oraz osadów dennych srebrem, które przełożyło się na znaczną akumulację tego metalu w roślinach i rybach (Tab. 3). Szczególne obawy wzbudził poziom Ag wykryty w tkankach ryb (9,1 – 53,8 mg kg⁻¹), które stanowią pożywienie lokalnej ludności oraz ważny element łańcucha troficznego.

Tabela 3. Stężenia i zawartości srebra oznaczone w zanieczyszczonym ekosystemie rzeki Skudai w latach 2018 - 2019 [160]

Ekosystem	Element ekosystemu	Stężenie Ag [mg L ⁻¹] ^a / Zawartość Ag [mg kg ⁻¹] ^b
Rzeka Skudai w Malezji	Woda rzeczna	0,001 – 0,505 ^a
	Osady	0,036 – 28,115 ^b
	Rośliny	0,235 - 4,713 ^b
	Ryby (<i>Anabas testudineus</i> , <i>Oreochromis niloticus</i> , <i>Clarias macrocephalus</i> , <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> , <i>Channa striata</i> , <i>Barbus schwanenfeldii</i> , <i>Oreochromis mossambicus</i>)	9,144 - 53,784 ^b

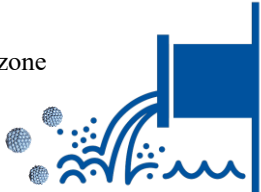
Poziomy srebro w słodkich wodach powierzchniowych oraz osadach rzecznych przeważnie mieszczą się w zakresach 1 – 30 ng L⁻¹ oraz 0,2 – 1,7 mg kg⁻¹ [161]. Dane dotyczące rzeczywistych stężeń srebra w wodach powierzchniowych są ograniczone ze względu na zbyt wysokie granice wykrywalności (LOD, ang. *Limit of Detection*) metod rutynowo stosowanych w laboratoriach analitycznych. Badania 425 próbek pochodzących z 84 stacji monitorujących jakość wód powierzchniowych na terenie Anglii i Walii wykazały, że w 346 próbkach srebro występowało na poziomie niższym niż granice oznaczalności metody ICP MS (LOQ, ang. *Limit of Quantification*) (LOQ = 6,6 ng L⁻¹). Przy czym w 280 próbkach wód nie wykryto srebra (LOD = 3 ng L⁻¹) [162]. Przykładowe stężenia i zawartości Ag w wodach powierzchniowych i organizmach wodnych przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Przykładowe stężenia i zawartości Ag w wodach powierzchniowych oraz organizmach wodnych występujących w różnych częściach świata [163]

Rodzaj próbki	Nazwa	Lokalizacja	Stężenie Ag [ng L ⁻¹] ^a / Zawartość Ag [mg kg ⁻¹] ^b , [µg g ⁻¹ s.m.] ^c	Lit.
Woda powierzchniowa	Jeziro Maggiore	Włochy	19,7 ^a	[164]
	Rzeki: Cishan, Agongdian i Toubiankeng	Kaohsiung, Tajwan	< LOD – 700 ^a LOD = 100 (ICP MS)	[165]
	Rzeki	84 stacje na terenie całej Wielkiej Brytanii	< LOD – 19,8 ^a LOD = 3 (ICP MS)	[162]
Osady rzeczne	Osady ujść rzek	Wielka Brytania	0,055 – 28,4 ^c	[166]
Bentos	Peryfiton	Ujście rzeki Calcasieu (USA)	0,1 – 3,6 ^b	[167]
Głony	<i>Fucus vesiculosus</i>	Wielka Brytania	0,066 ^c	[166]
Ryby	<i>Carassius auratus langsdorfii</i>	Rzeka Asakawa (Tokio, Japonia)	12 ^c	[168]
	<i>Campostomum anomalum</i>	Rzeka Big Bayou (Kentucky, USA)	1,32 – 2,73 ^b	[169]
	<i>Lepomis microlophus</i>	Stawy burzowe na terenie Greater Orlando (Floryda, USA)	0,001 - 0,458 ^b	[170]
	<i>Micropterus Salmoides</i>		0,042 – 0,419 ^b	
	<i>Lepomis Macrochirus</i>		0,001 – 0,028 ^b	
Ślimaki	<i>Littorina littorea</i>	Wielka Brytania	0,73 ^c	[166]
Małże	<i>Mytilus edulis</i>		0,02 ^c	
	<i>Scrobicularia plana</i>		0,098 ^c	
	<i>Macoma balthica</i>		0,460 ^c	
Pierścienice	<i>Nereis diversicolor</i>		0,100 ^c	
Skorupiaki	<i>Crangon crangon</i>	Belgia	0,32 – 1,51 ^c	[171]

Obecnie w literaturze naukowej brakuje danych dotyczących zawartości AgNPs w organizmach wodnych występujących w środowisku naturalnym. Stężenia nanocząstek srebra oznaczone w wodach powierzchniowych oraz oczyszczonych ściekach zestawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Stężenia AgNPs oznaczone w wodach powierzchniowych oraz oczyszczonych ściekach [172]

Ekosystem		Lokalizacja	Stężenie AgNPs [ng L ⁻¹]	Lit.
Rodzaj	Nazwa			
Rzeka	Izara	Niemcy	2,0 – 8,6	[173]
	Besòs	Hiszpania	0,4 – 0,9	[174]
	Ebro		0,4 – 0,7	
	Ijssel	Holandia	0,3 – 2,5	[175]
	Moza		0,3 – 6,6	
	Dommel		30	
Jezioro	Chiem	Niemcy	0,5 – 1,3	[173]
Oczyszczalnia ścieków Ścieki oczyszczone AgNPs 		Niemcy	0,7–11,1	[173]
		Hiszpania	0 – 7,2	[174]
		Wielka Brytania	2,7 – 12,7	[177]
		Holandia	13	[176]
			1000 – 1700	[178]

1.7. Losy Ag⁺/AgNPs w środowisku wodnym

Jony srebra trafiając do środowiska przyrodniczego mogą ulegać licznym przemianom. Związki organiczne i nieorganiczne zawierające srebro wykazują różną biodostępność, toksyczność oraz mobilność w środowisku przyrodniczym. Wytrącanie srebra w formie osadów o zróżnicowanej rozpuszczalności (Tab. 6) znacząco ogranicza mobilność tego metalu w środowisku wodnym.

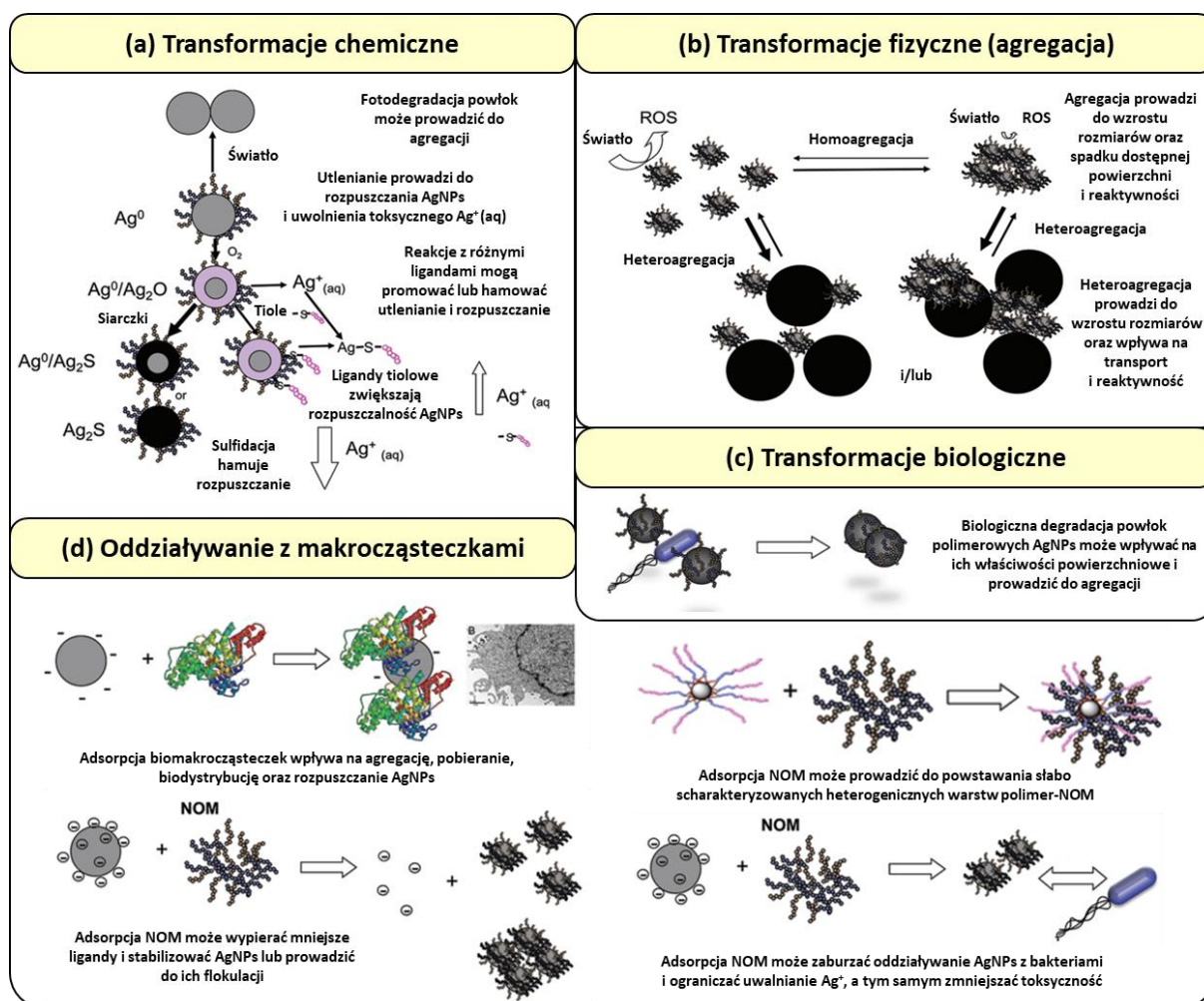
Tabela 6. Rozpuszczalność związków srebra o znaczeniu środowiskowym [28,179]

Nazwa związku	Wzór chemiczny	Iloczyn rozpuszczalności (K _{sp})
Siarczan(VI) srebra	Ag ₂ SO ₄	1,20 × 10 ⁻⁵
Chlorek srebra	AgCl	1,77 × 10 ⁻¹⁰
Tlenek srebra	Ag ₂ O	4,00 × 10 ⁻¹¹
Węglan srebra	Ag ₂ CO ₃	8,46 × 10 ⁻¹²
Siarczek srebra	Ag ₂ S	6,00 × 10 ⁻⁵¹

W przypadku obecności w środowisku jonów siarczkowych i chlorkowych termodynamicznie preferowane jest tworzenie siarczku i chlorku srebra. Pozostałe wymienione połączenia mają zdecydowanie mniejsze znaczenie.

W obecności naturalnej materii organicznej (ang. *natural organic matter*, NOM) Ag^+ mogą być przekształcane w AgNPs pod wpływem warunków termicznych, nietermicznych oraz fotochemicznych. Pozytywny wpływ na przebieg powyższej transformacji ma obecność jonowych form żelaza ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$). Powstałe w ten sposób AgNPs mogą być stabilne przez kilka miesięcy, co potencjalnie może przekładać się na ich mobilność w środowisku przyrodniczym [180,181,182,183].

Do parametrów środowiskowych oddziałujących na AgNPs występujące w wodach powierzchniowych można zaliczyć m.in. obecność jonów innych metali, siłę jonową, zawartość materii organicznej i rozpuszczonego tlenu, pH oraz światło [184,185]. Nanocząstki srebra mogą ulegać procesom agregacji, rozpuszczania oraz zmian morfologii powierzchni, co przekłada się na ich reaktywność, toksyczność oraz mobilność w środowisku (Rys. 6).



Rysunek 6. Przykłady transformacji AgNPs w środowisku wodnym o charakterze: **(a)** chemicznym, **(b)** fizycznym, **(c)** biologicznym oraz **(d)** oddziaływań z makrocząsteczkami [186]

Obecność innych metali w wodach naturalnych może prowadzić do destabilizacji AgNPs, przy czym kationy dwuwartościowe (np. Mg^{2+} , Ca^{2+}) mają większy wpływ na obniżenie stabilności niż jednowartościowe jony metali (np. K^+ , Na^+) [187]. Generalnie wzrost siły jonowej wpływa niekorzystnie na trwałość AgNPs [188]. El Badawy et al. [40] zbadali wpływ obecności różnych elektrolitów ($NaNO_3$, $NaCl$, $Ca(NO_3)_2$) na kinetykę agregacji AgNPs stabilizowanych elektrostatycznie (H_2 -AgNPs, c-AgNPs), sterycznie (PVP-AgNPs) i elektrosterycznie (BPEI-AgNPs). Kinetyka agregacji stabilizowanych elektrostatycznie cząstek była zgodna z klasyczną teorią Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO). W przypadku pozostałych mechanizmów stabilizacji duża odporność na agregację cząstek występowała nawet przy wysokich wartościach siły jonowej roztworu. Do podobnych wniosków doszli Angel et al. [189] badając trwałość c-AgNPs i PVP-AgNPs w syntetycznej wodzie słodkiej i naturalnej wodzie morskiej. Stwierdzono, że nanocząstki stabilizowane elektrostatycznie łatwiej ulegają rozpuszczaniu niż PVP-AgNPs, zarówno w wodzie słodkiej,

jak i morskiej. Obecna w wodach powierzchniowych naturalna materia organiczna stabilizuje sterycznie AgNPs niwelując destabilizujące działanie rosnącej siły jonowej [188,190]. Do poprawy stabilności AgNPs w środowisku może prowadzić również ich oddziaływanie z zewnątrzkomórkowymi białkami bakteryjnymi [191]. Niekorzystny wpływ na trwałość nanocząstek srebra ma obecność rozpuszczonego tlenu, która prowadzi do agregacji i rozpuszczania AgNPs [192,193]. Zachowanie AgNPs w środowisku zależy w dużym stopniu od pH otoczenia, które determinuje jaki ładunek powierzchniowy posiada nanocząstka. Piccapietra et al. [194] zaobserwowali, że ujemnie naładowane nanocząstki srebra stabilizowane jonami węglanowymi przy wartościach $\text{pH} < 4$ uzyskują dodatni ładunek powierzchniowy, co przekłada się na drastyczny wzrost stopnia agregacji. Podobną prawidłowość odnotowano w przypadku c-AgNPs i NaBH_4 -AgNPs [57]. Elzey et al. [195] zbadali zachowanie niestabilizowanych AgNPs w wodnym roztworze HNO_3 w zakresie pH 0,5 - 6,5. Zaobserwowano występowanie agregacji AgNPs przy $\text{pH} \geq 3$. W bardziej kwasowym środowisku w przedziale wartości pH 2,5 - 1,0 dochodziło do deagregacji nanocząstek, natomiast przy $\text{pH} \leq 0,5$ zaobserwowano częściowe lub całkowite rozpuszczenie AgNPs. Szybkość rozpuszczania AgNPs rośnie wraz ze spadkiem rozmiarów cząstek [196] i maleje wraz ze wzrostem pH [184,197]. Ekspozycja AgNPs na światło prowadzi do zwiększenia ilości uwalnianego srebra jonowego, ponieważ na powierzchni nanocząstki tworzy się warstwa Ag_2O , która łatwiej ulega rozpuszczeniu niż srebro metaliczne [198]. Należy zaznaczyć, że wpływ powyższych czynników na zachowanie AgNPs badano w układach modelowych o zdefiniowanym składzie chemicznym. Naturalne systemy wodne często charakteryzują się dużą złożonością oraz zmiennością co powoduje, że modelowanie transformacji AgNPs w środowisku jest problematyczne.

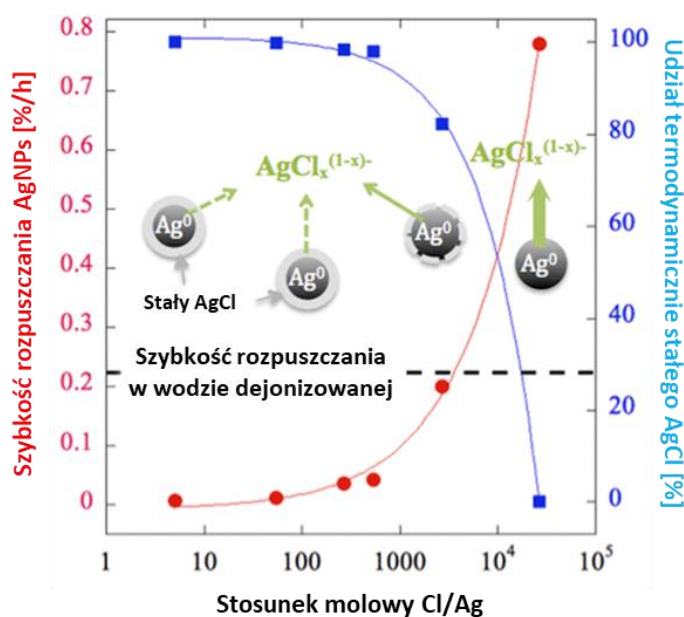
W naturalnych systemach wodnych AgNPs mogą ulegać reakcjom m.in. oksysulfidacji, oksychlorowania oraz oksofosforylacji. Pierwszym etapem wymienionych procesów jest oksydacja srebra na powierzchni AgNPs ($4\text{Ag}^0 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{Ag}_2\text{O}$), która jest termodynamicznie faworyzowana w temperaturze pokojowej ($\Delta G^0 = -11,25 \text{ kJ mol}^{-1}$). Efektywność przebiegu oksydacji wzrasta wraz ze zmniejszeniem rozmiarów AgNPs i zależy od wielu czynników, np. rodzaju stabilizacji NPs oraz ekspozycji na promieniowanie. Następnie utlenione AgNPs w wyniku reakcji z siarką, chlorem lub fosforem tworzą bardziej stabilne połączenia. Jednym z najtrwalszych związków srebra, uważanym za produkt końcowy wielu reakcji zachodzących w biosferze, jest Ag_2S . Tworzenie siarczku srebra może zachodzić, gdy:

- AgNPs ulegają utlenieniu do Ag^+ , a następnie jony srebra reagują z siarką wytrącając osad Ag_2S ,
- dochodzi do bezpośredniej oksysulfidacji powierzchniowych atomów AgNPs i tworzenia struktur typu rdzeń-powłoka (ang. *core-shell*) $\text{Ag}_2\text{S-Ag}$ [199].

Efektywność przemiany AgNPs w Ag_2S zależy w dużym stopniu od stosunku S/Ag. Ilości siarczku srebra na poziomie $> 1\%$ zaobserwowano w roztworach AgNPs, w których stosunek S/Ag wynosił $\geq 0,055$, natomiast całkowita transformacja do Ag_2S (brak srebra metalicznego) zachodziła przy wartości 1,079. Dodatkowo stwierdzono, że stosunek S/Ag silnie wpływa na właściwości AgNPs, takie jak skłonność do agregacji, wartość ładunku powierzchniowego oraz ilość srebra uwalnianego w postaci jonowej. Oksysulfidacja jest reakcją dwuetapową, która obejmuje stosunkowo szybki etap tworzenia Ag_2S (0-5 h) oraz wolniejsze formowanie superstechiometrycznych siarczków ($\text{Ag}_2\text{S}_n > 1$) [200]. Oddziaływanie AgNPs ze związkami siarki może prowadzić do zmian właściwości powierzchniowych nanocząstek, które są konsekwencją tworzenia się warstwy Ag_2S . Powstałe nanocząstki typu rdzeń/powłoka w warunkach redukujących wykazują dużą tendencję do agregacji, co skutecznie ogranicza ich mobilność w środowisku [201].

Kolejną istotną przemianą AgNPs zachodzącą w środowisku przyrodniczym jest oksychlorowanie. Chlor charakteryzuje się dużą reaktywnością w stosunku do srebra i jest obecny w większości naturalnych układów (np. wodach naturalnych) i w podłożach mikrobiologicznych. Odpowiednio niski stosunek Cl/Ag może mieć pozytywny wpływ na stabilność nanocząstek srebra poprzez formowanie na ich powierzchni warstwy AgCl, która ogranicza rozpuszczalność AgNPs [202]. Wzrost stężenia NaCl może mieć niekorzystny wpływ na stabilność AgNPs w przypadku stabilizacji elektrostatycznej (np. jonami cytrynianowymi) [40]. Teo et al. [203] zbadali przemiany AgNPs po 7 dniach od wprowadzenia do systemu wodnego (wody ultraczystej, z jeziora oraz morskiej) wykorzystując techniki: ICP MS, XPS, SEM oraz voltamperometrii cyklicznej (CV, ang. *Cyclic Voltammetry*). Nanocząstki srebra najefektywniej ulegały utlenieniu w wodzie morskiej, w której oznaczone stężenie Ag^+ było o jeden rząd wielkości większe niż stężenie w zawieszynie AgNPs sporządzonej w ultraczystej wodzie. Zaobserwowane różnice w efektywności przemiany Ag^0 w Ag^+ powiązano ze zróżnicowaną zawartością tlenu oraz jonów chlorkowych w badanych układach. Obecność rozpuszczonego tlenu przyczynia się do utlenienia powierzchniowych atomów srebra w AgNPs, natomiast jony chlorkowe łączą się ze srebrem tworząc rozpuszczalne kompleksy (AgCl_2^- , AgCl_3^{2-} , AgCl_4^{3-}) oraz nierozpuszczalny osad (AgCl) [204,205]. Tworzenie połączeń srebra z jonami chlorkowymi ściśle zależy od

stosunku Cl/Ag [206]. Wysoka wartość Cl/Ag ma korzystny wpływ na tworzenie rozpuszczalnych kompleksów o ogólnym wzorze $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ [207,208]. Przy wartości $\text{Ag}/\text{Cl} \leq 2675$ zaobserwowano wolniejsze rozpuszczanie AgNPs w porównaniu do próbki kontrolnej, którą stanowiła zawiesina nanocząstek srebra w wodzie dejonizowanej. Z kolei w układzie, w którym stosunek Cl/Ag wynosił 26750 nanocząstki srebra ulegały szybszemu rozpuszczaniu niż w próbce kontrolnej [209]. Wraz ze wzrostem udziału stosunku Cl/Ag dominuje udział rozpuszczalnych kompleksów $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$ w odniesieniu do ilości nierozpuszczalnego AgCl. Przy wartości $\text{Cl}/\text{Ag} \geq 26750$ chlorek srebra jest nietrwały termodynamicznie, a zawartość procentowa różnych form srebra w takim układzie wynosi odpowiednio 51, 27, oraz 22% dla AgCl_2^- , AgCl_3^{2-} oraz AgCl_4^{3-} (Rys. 7).



Rysunek 7. Zależność szybkości rozpuszczania AgNPs (●) oraz oczekiwanego termodynamicznie stałego AgCl (■) od stosunku molowego Cl/Ag. Szybkość rozpuszczania AgNPs w wodzie dejonizowanej pokazano linią przerywaną dla porównania [209]

Oksofosforylacja AgNPs, której produktem jest Ag_3PO_4 , ma najmniejsze znaczenie spośród wymienionych wyżej reakcji i w literaturze można znaleźć jedynie kilka prac poświęconych temu zagadnieniu [210].

Powyższe rozważania dotyczą przede wszystkim układów modelowych, w których stosowane są relatywnie wysokie stężenia srebra, znacznie odbiegające od poziomów środowiskowych. Z powodu zróżnicowania właściwości fizykochemicznych AgNPs, związków zawierających Ag oraz otaczającego je środowiska, modelowanie losów srebra w naturalnych systemach jest bardzo trudnym zadaniem. Wiele kwestii związanych

z mobilnością, transformacją oraz biodostępnością różnych form srebra dla organizmów żywych w warunkach środowiskowych wymaga dalszych badań.

2. Ogólna charakterystyka tytanu

2.1. Zarys historyczny

Tytan został odkryty pod koniec XVIII wieku niezależnie przez pastora W. Gregora (Wielka Brytania, 1791 r.) oraz niemieckiego chemika M.H. Klaprotha (Węgry, 1795 r.) [211,212]. Obiektem badań Gregora, który wzbudził jego szczególne zainteresowanie był ilmenit – minerał o właściwościach magnetycznych, który zawierał niezidentyfikowany dotąd tlenek metalu. Nadał mu pierwotnie nazwę „manakanit” i poinformował o odkryciu Królewskie Towarzystwo Geologiczne w Kornwalii. Klaproth niezależnie stwierdził występowanie tlenku nieznanego metalu w rudzie rutyłu. Usłyszawszy o odkryciu pastora zakupił próbki ilmenitu, w których wykryto nieznaną związek i potwierdził odkrycie nowego pierwiastka. Nazwa „titan” pochodząca z mitologii greckiej została nadana przez Klaprotha. W 1825 roku szwedzki chemik J.J. Berzelius zredukował heksafluorotytanian potasu (K_2TiF_6) w obecności metalicznego potasu otrzymując tytan zanieczyszczony dużymi ilościami azotków. Istotny wkład w opracowanie metod umożliwiających otrzymanie tytanu o wyższej czystości mieli L.F. Nilson oraz O. Petterson. W swoich badaniach (1887 r.) chlorowali tlenek tytanu(IV), a następnie otrzymany tetrachlorek tytanu(IV) ($TiCl_4$) redukowali metalicznym sodem uzyskując tytan o czystości 95%. W 1910 roku metalurg M.A. Hunter przeprowadził redukcję $TiCl_4$ sodem w układzie zamkniętym otrzymując tytan o czystości 99%. W latach 20 XX wieku rozpoczęto przemysłową produkcję pigmentu TiO_2 metodą siarczanową. Kolejną ciekawą metodę otrzymywania metalicznego Ti opracowali w 1925 roku A.E. van Arkel i J.H. de Boer. Polega ona na ogrzewaniu związku zawierającego tytan i jodu w układzie próżniowym w celu uzyskania tetrajodku tytanu(IV) (TiI_4). Następnie otrzymany TiI_4 jest rozkładany termicznie na rozgrzanym włóknie wolframowym do metalicznego tytanu. Powyższa metoda pomimo niskiej efektywności została zastosowana do produkcji tytanu o wysokiej czystości dla przemysłu półprzewodnikowego. Przełomowym wydarzeniem w kontekście masowej produkcji tytanu było opracowanie przez Krolla (1940 r.) metody redukcji $TiCl_4$ w obecności magnezu [213]. Do 1941 roku Amerykańskie Biuro Górnictwa (USBM, ang. *United States Bureau of Mines*) używało małych reaktorów Krolla do produkcji 100-gramowych partii metalicznego tytanu. Do 1948 roku USBM było w stanie wytwarzać 91-kilogramowe partie Ti w małej pilotażowej fabryce [214,215,216,217].

Historia stosowania TiO₂NPs ma swoje początki w II połowie XX wieku. Nanocząstki tlenku tytanu(IV) stanowiły frakcję drobnodispersyjnego TiO₂ otrzymywanego, np. metodą pirolizy płomieniowej [218]. Badania nad możliwymi zastosowaniami TiO₂NPs sięgają 1985 roku, kiedy to opublikowano jedną z pierwszych prac na temat fotokatalitycznego działania bakteriobójczego tlenku tytanu(IV) [219,220].

2.2. Właściwości fizyczne i chemiczne Ti oraz TiO₂

Właściwości fizykochemiczne metalicznego tytanu

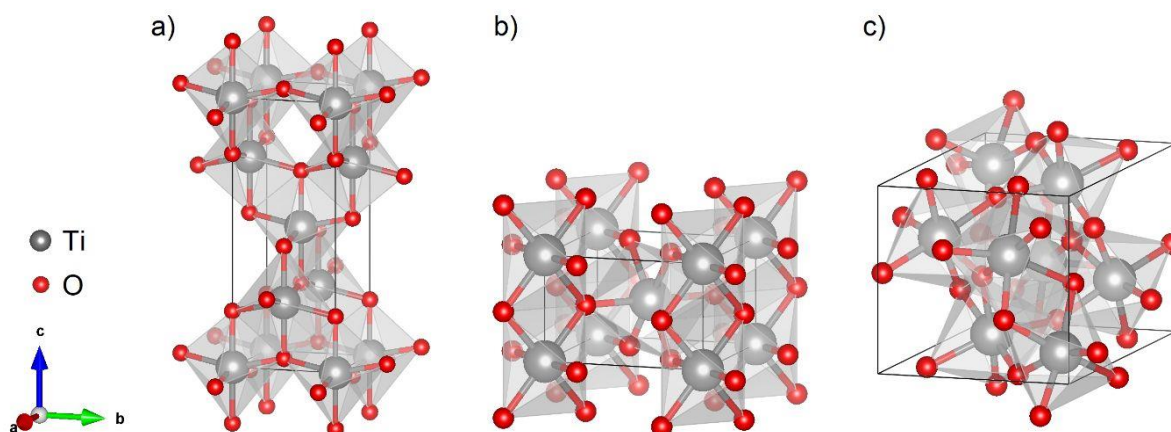
Tytan jest srebrzystym metalem przejściowym charakteryzującym się wysoką wytrzymałością mechaniczną oraz odpornością na korozję chemiczną i miejscową - naprężeniową, międzykrystaliczną oraz wżerową. Czysty Ti wykazuje dużą twardość, jest stosunkowo lekki i ciągliwy. Posiada również niską przewodność cieplną i elektryczną oraz dużą rezystywność właściwą (Tab. 7). Tytan stanowi dodatek do licznych stopów metali, które stosowane są m.in. w przemyśle militarnym, motoryzacyjnym, stoczniowym, lotniczym oraz biomedycznym. Funkcją dodatku Ti jest zmniejszenie masy i poprawa wytrzymałości mechanicznej, chemicznej oraz cieplnej materiałów użytkowych [221]. Pod względem rozpowszechnienia w skorupie ziemskiej zajmuje 9 miejsce (0,63%), a całkowite zasoby szacowane są na 600 mln ton [222]. Można wyróżnić dwie odmiany alotropowe tytanu: nisko- (α , stabilną poniżej temp. 882°C) oraz wysokotemperaturową (β , występującą w zakresie temperatur 882°C - 1670°C) [223].

Tabela 7. Wybrane właściwości fizykochemiczne tytanu [24,224]

Okres/Grupa	4/4	
Liczba atomowa	22	
Masa atomowa	47,867 g mol ⁻¹	
Konfiguracja elektronowa	[Ar]3d ² 4s ²	
Gęstość względna	4,51 g cm ⁻³ (20°C)	
Lepkość	4,4 mPa s (1476,9°C – 1776,9°C) [225]	
Temperatura topnienia	1670°C	
Temperatura wrzenia	3287°C	
Pojemność cieplna	524 J kg ⁻¹ K ⁻¹ (25°C)	
Promień atomowy	0,147 nm	
Promień jonowy (*dla koordynacji heksagonalnej) [226]	Ti ²⁺	86 pm
	Ti ³⁺	64 pm
	Ti ⁴⁺	60,5 pm
Energia jonizacji	Ti → Ti ⁺	659 kJ mol ⁻¹
	Ti ⁺ → Ti ²⁺	1310 kJ mol ⁻¹
	Ti ²⁺ → Ti ³⁺	2653 kJ mol ⁻¹
	Ti ³⁺ → Ti ⁴⁺	4175 kJ mol ⁻¹

Elektroujemność (skala Paulinga)	1,54
Powinowactwo elektronowe	7,622 kJ mol ⁻¹
Opór właściwy	4,20 · 10 ⁻⁷ Ω·m (20°C)
Przewodność cieplna	22,3 W m ⁻¹ K ⁻¹ (0°C) [26]
Twardość (skala Vickersa)	830 – 3420 MPa
Wytrzymałość na rozciąganie	450 - 850 MPa [222]
Moduł Younga	115,7 GPa
Stabilne izotopy	⁴⁶ Ti (8,25%), ⁴⁷ Ti (7,44%), ⁴⁸ Ti (73,72%), ⁴⁹ Ti (5,41%), ⁵⁰ Ti (5,18%)
Współczynnik odbicia światła	~ 15 - 44% (λ ≥ 400 nm) [227]

Tytan wykazuje dużą odporność chemiczną na działanie rozcieńczonych kwasów, zasad, amoniaku, nadtlenu wodoru, chloru, chlorków, siarkowodoru, siarczków, siarczanów oraz wody morskiej. Roztworza się natomiast w stężonych kwasach, np. w mieszaninie HF + HNO₃. Ulega korozji pod wpływem działania mocnych kwasów (np. HCl, HF, H₂SO₄) i zasad oraz organicznych kwasów o właściwościach redukujących (C₂H₂O₄, CH₂O₂). W temperaturze powyżej 800°C tytan reaguje z czystym azotem tworząc azotek tytanu (TiN) [222,228]. Odporność chemiczna tytanu wynika z silnego powinowactwa do tlenu. Metaliczny Ti łatwo ulega pasywacji pokrywając się warstwą tlenków (TiO, TiO₂, Ti₂O₃), które ograniczają możliwość uwalniania metalu w formie jonowej. Najbardziej rozpowszechnionym związkiem tytanu jest tlenek tytanu(IV) (TiO₂), który tworzy 3 odmiany polimorficzne: rutil, anataz oraz brukit [229] (Rys. 8). Najpowszechniejszymi formami TiO₂ są: tetragonalny rutil i anataz. Pod ciśnieniem normalnym rutil jest termodynamicznie stabilny w zakresie temperatur nie przekraczającym 1850°C (Tab. 8). Pozostałe 2 odmiany przechodzą w rutil pod wpływem temperatury powyżej 800 - 900°C.



Rysunek 8. Odmiany polimorficzne TiO₂: (a) anataz, (b) rutil, (c) brukit [229]

Inne ważne związki tytanu to tetrachlorek tytanu (TiCl_4) stosowany np. do produkcji zasłon dymnych oraz trichlorek tytanu (TiCl_3) wykorzystywany jako katalizator reakcji polimeryzacji, np. podczas otrzymywania polipropylenu [230]. Azotek tytanu (TiN) oraz węglík tytanu (TiC) stosowane są w przemyśle narzędziowym. Zastosowanie mają również tytaniań baru, strontu oraz sodu (BaTiO_3 , SrTiO_3 , Na_2TiO_3). Tytaniań(IV) baru wykorzystywany jest m.in. do produkcji mikrofonów oraz urządzeń ultradźwiękowych. SrTiO_3 posiada użyteczne właściwości optyczne, natomiast Na_2TiO_3 służy do pokrywania prętów spawalniczych [231].

Właściwości fizykochemiczne TiO_2

Tlenek tytanu(IV) silnie absorbuje promieniowanie UV oraz wykazuje właściwości fotokatalityczne. Czysty TiO_2 zaliczany jest do półprzewodników typu n. Pasma walencyjne wszystkich odmian polimorficznych tlenku tytanu(IV) posiada to samo położenie, zróżnicowane jest natomiast usytuowanie pasma przewodnictwa. Wielkość przerwy wzbronionej dla rutylu, brukitu i anatazu wynosi odpowiednio: 2,96, 3,02 oraz 3,23 eV. Wybrane właściwości odmian alotropowych TiO_2 (rutylu i anatazu) przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Wybrane właściwości fizykochemiczne TiO_2 w formie rutylu i anatazu [232,233]

Właściwość	Rutyl	Anataz
Powierzchnia właściwa [$\text{m}^2 \text{g}^{-1}$]	< 50	50 -120
Długość wiązania Ti-O [pm]	194	195
Układ krystalograficzny	Tetragonalny	
Współczynnik załamania światła	2,61	2,49
Stała dielektryczna	114	48
Twardość Mohsa	6,0 – 6,5	5,5 – 6,0
Gęstość (25°C) [g cm^{-3}]	4,27	3,90
Temperatura topnienia [°C]	1850	(przejście w rutyl)
Ciepło tworzenia (H^0) [kJ mol^{-1}]	941,6	866,7
Stabilność termiczna [°C]	> 1500	400 - 800

Wraz ze spadkiem rozmiarów cząstek TiO_2 poprawie ulegają właściwości fotokatalityczne, zdolność absorpcji promieniowania UV oraz hydrofilowość, które wynikają ze wzrostu powierzchni właściwej [234].

2.3. Wpływ TiO₂NPs na organizmy żywe

Na toksyczność TiO₂NPs ma wpływ forma krystaliczna, w której występują (anataz, rutil, brukit), wielkość cząstek, stopień agregacji oraz rodzaj funkcjonalizacji powierzchni. Nanocząstki tlenku tytanu(IV) mogą prowadzić do uszkodzenia DNA i płuc [235,236,237] poprzez produkcję reaktywnych form tlenu oraz stres oksydacyjny. Badania *in vitro* wykazały, że TiO₂NPs wykazują toksyczność wobec różnych typów komórek, w tym wątroby [238,239], fibroblastów skóry [240], mózgu [241], bakterii *Salmonelli* [242] i makrofagów pęcherzykowych [243]. Stwierdzono również cytotoksyczność TiO₂NPs wobec komórek ryb [244] i glonów [245].

Tlenek tytanu(IV) obecny w środowisku wodnym może być akumulowany przez rośliny oraz ryby. Asztemborska et al. [246] przeprowadzili badania z udziałem moczarki kanadyjskiej (*Elodea canadensis*) oraz ryb z gatunku *Danio rerio* eksponowanych na działanie 10 mg L⁻¹ TiO₂NPs o rozmiarach < 100 nm. Stwierdzono, że w rybach i roślinach narażonych na TiO₂NPs zawartości tytanu były wyższe niż w kontrolach, co świadczy o bioakumulacji nanocząstek tlenku tytanu(IV) i/lub jonów pochodzących z NPs. Należy zaznaczyć, że rośliny są ważnym elementem łańcucha troficznego, który może być potencjalnym źródłem nanocząstek dla organizmów wyższych, w tym także ludzi. Seitz et al. [247] przeprowadzili badania z udziałem obunogów (*Gammarus fossarum*) oraz rozwielitek (*Daphnia magna*) narażonych na działanie TiO₂ w formie anatazu (99%) oraz mieszaniny rutilu (30%) / anatazu (70%) o rozmiarach cząstek 55, 100 oraz 140 nm. Rozwielitki oraz obunogi eksponowano na tlenek tytanu(IV) odpowiednio w zakresach stężeń 0 - 16 oraz 0 - 5 mg L⁻¹. Stwierdzono, że w przypadku *Daphnia magna* nanocząstki anatazu o rozmiarach początkowych 55 nm wykazywały ok. 90% niższą wartość EC₅₀ w stosunku do mieszaniny nanocząstek rutilu i anatazu. Tlenek tytanu(IV) nie wywoływał szkodliwych efektów u obunogów *Gammarus fossarum* w całym badanym zakresie stężeń, niezależnie od właściwości fizykochemicznych TiO₂.

Stężenie tytanu w roślinach wynosi nawet 578 mg kg⁻¹ [248], przy czym w roślinach jadalnych mieści się przeważnie w zakresie 0,1 – 120 mg kg⁻¹. Tytan wpływa pozytywnie na wzrost różnych gatunków roślin, aktywność katalazy, peroksydazy, i reduktazy azotanowej oraz zawartość niektórych pierwiastków, chlorofilu i cukrów [249,250,251]. Komercyjnie dostępny nawóz o nazwie handlowej TYTANIT[®] zawierający tytan (8,5 g L⁻¹) stosowany jest w celu poprawy parametrów jakościowych oraz ilościowych plonów [252]. Zawartości tytanu oznaczone w różnych roślinach zestawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Zawartości tytanu w różnego rodzaju roślinach [248]

Rodzaj	Gatunek	Część rośliny	Zawartość Ti [mg kg ⁻¹ s.m.]	Lit.
Warzywa	Cebula zwyczajna (<i>Allium cepa</i> L.)	Bulwa	41	[253]
	Szparag lekarski (<i>Asparagus officinalis</i> L.)	Łodyga	180	
	Marchew zwyczajna (<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i>)	Korzeń	28	[254]
	Burak zwyczajny (<i>Beta vulgaris</i> L.)		27	
	Papryka roczna (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Owoc	110	[253]
	Ogórek siewny (<i>Cucumis sativus</i> L.)		19	
	Fasola zwykła (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Zielone strąki	72	[253]
	Kapusta warzywna (<i>Brassica oleracea</i> L.)	Liście	120	
Rośliny zielne	Wilec nabrzeżny (<i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R. Br.)		Liście	578
Mech	Gajnik lśniący (<i>Hylocomium splendens</i>)	Górne części rośliny	53	[256]
	Złotowłos strojny (<i>Polytrichum formosum</i> Hedw.)		6	[254]
Drzewa	Kasztanowiec pospolity (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.)	Liście	32	[257]
	Brzoza brodawkowata (<i>Betula pendula</i> Roth (<i>Betula alba</i>))	Liście	6	[254]
	Sosna (<i>Pinus</i> L.)	Igły	8	[254]

Tlenek tytanu(IV) był powszechnie uważany za związek nieszkodliwy oraz obojętny dla zdrowia człowieka. Dzielne spożycie TiO₂ mieści się w przedziale od 0,03 (dorośli powyżej 70 roku życia) do 13 mg/kg masy ciała (dzieci < 10 roku życia) [258]. Liczne badania toksykologiczne wskazują na szkodliwe działanie TiO₂NPs związane m.in. z powstawaniem stresu oksydacyjnego, zaburzeniem funkcji układu pokarmowego (np. okrężnicy, jelit) oraz działaniem genotoksycznym [259], cytotoksycznym i zapalnym. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC, ang. *International Agency for Research on Cancer*) zakwalifikowała TiO₂ do grupy związków o właściwościach potencjalnie kancerogennych dla ludzi [260,261]. Amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA, ang. *Food and Drug Administration*) zaakceptowała jednak stosowanie TiO₂ jako dodatku do żywności (barwnika) w ilościach nieprzekraczających 1% (w/w) oraz dopuściła TiO₂, jako składnik opakowań do kontaktu z żywnością [262]. Pierwszym krajem, który wprowadził zakaz stosowania TiO₂ w produktach spożywczych była Francja. W oparciu o rekomendacje Francuskiej Agencji Bezpieczeństwa Zdrowotnego Środowiska i Miejsca Pracy (ANSES, franc. *Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du*

travail) od dnia 1 stycznia 2020 r. zakazano stosowania dodatku E171 na terenie całego kraju. Ograniczenie początkowo wprowadzone na okres jednego roku zostało następnie przedłużone o kolejne 12 miesięcy. Dnia 6 maja 2021 r. Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA, ang. *European Food Safety Authority*) stwierdził, że dodatek TiO₂ może mieć negatywny wpływ na zdrowie ludzkie. Zaproponowany przez Komisję Europejską zakaz stosowania tlenku tytanu(IV) w produktach spożywczych na terenie Unii Europejskiej został zatwierdzony przez państwa członkowskie dnia 8 października 2021 r. i wprowadzony w życie 14 stycznia 2022 r. [263]. FDA po przeanalizowaniu opinii EFSA stwierdziła, że przedstawione badania nie są na tyle istotne, aby zmienić ich dotychczasowe stanowisko. Wątpliwości wobec zasadności zakazu stosowania TiO₂ wyraziła również brytyjska Agencja ds. Standardów Żywności (FSA, ang. *Food Standards Agency*) [264].

TiO₂ dostaje się do organizmów żywych najczęściej drogą inhalacyjną [265]. W badaniach prowadzonych na myszach stwierdzono, że NPs mogą być zatrzymywane w błonie śluzowej obszaru węchowego, a następnie transportowane do centralnego układu nerwowego i mózgu [266]. Badania dotyczące porównania toksyczności TiO₂ o różnych rozmiarach, formie krystalicznej i powierzchni przy podaniu dotchawiczym przeprowadzone na szczurach wykazały, że szkodliwość takich cząstek zależy raczej od morfologii ich powierzchni, niż od rozmiaru i powierzchni właściwej [267]. Inne badania prowadzone na szczurach pokazały, że długotrwałe narażenie na wdychanie TiO₂NPs może powodować raka płuc, a efektywność transportu nanocząstek do innych organów wewnętrznych wzrasta wraz ze zmniejszaniem się ich rozmiaru [268]. Z kolei badania epidemiologiczne wykazały, że osoby chorujące na astmę lub choroby układu krążenia, w przypadku narażenia zawodowego mogą być bardziej wrażliwe na działanie TiO₂. Nie potwierdzono jednak związku pomiędzy narażeniem ludzi na TiO₂ a ryzykiem raka płuc lub zmniejszeniem pojemności wentylacyjnej płuc [269]. Dopuszczalny limit narażenia na nanocząstki o rozmiarach < 100 nm, wyznaczony przez ekspertów Narodowego Instytutu Bezpieczeństwa i Higieny Pracy (ang. *National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH*), wynosi 0,3 mg m⁻³ przez 10 h dziennie podczas 40 godzinowego tygodnia pracy [268,270,271]. Raport przygotowany przez Organizację Rozwoju Nowych Energii i Technologii Przemysłowych (ang. *New Energy and Industrial Technology Development Organization, NEDO*) w Japonii definiuje maksymalne dopuszczalne narażenie jako 1,2 mg m⁻³ w ciągu 8 godzinowego dnia pracy i 40 godzinowego tygodnia pracy [272]. W oparciu o obowiązujące w Polsce metody, oszacowano, że wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) w powietrzu środowiska pracy dla nanocząstek TiO₂ może wynosić 0,3 mg m⁻³ [273].

Ludzie mogą być narażeni na działanie TiO_2 również drogą pokarmową z dodatków do żywności lub przez skórę z kosmetyków i kremów przeciwsłonecznych. Badania toksykologiczne przeprowadzone na szczurach po podaniu doustnym różnych form TiO_2NPs wskazywały na małą toksyczność badanych nanocząstek lub jej brak. Średnia dawka śmiertelna (LD_{50}) w przypadku mieszaniny nanocząstek w formie rutylu i anatazu wyniosła $> 2150 \text{ mg/kg}$ [274]. TiO_2NPs mogą jednak przenikać do układu krążenia, trafiając w ten sposób do wątroby, śledziony, płuc, nerek, a także mózgu [275,276]. Toksyczność TiO_2 uzależniona jest nie tylko od dawki, ale również od formy krystalicznej. Nano-anataz może wykazywać

100-krotnie wyższą toksyczność niż równoważna ilość TiO_2NPs w formie rutylu, ponieważ efektywniej generuje ROS [240,262,268]. Na toksyczność nanocząstek mogą wpływać również ich rozmiary. Do tej pory brak jest danych na temat toksyczności nanocząstek w wyniku działania na skórę. Prawdopodobnie przenikanie przez skórę możliwe jest jedynie w przypadku jej uszkodzenia (rany, oparzenia). Jednak ze względu na coraz szersze zastosowanie produktów kosmetycznych zawierających TiO_2 powinna zostać przeprowadzona ocena chronicznego (długotrwałego) narażenia ludzi na tego typu produkty oraz badania epidemiologiczne dotyczące narażenia na szkodliwe działanie TiO_2 drogą dermalną.

2.4. Zastosowanie Ti i TiO_2

Stopy tytanu są szeroko stosowane w lotnictwie m.in. w silnikach, ramach okiennych, łącznikach oraz przewodach hydraulicznych i wydechowych [221,277]. Wykorzystywane są również do produkcji silników, klocków hamulcowych, podwozi, układów wydechowych, sprężyn, śrub oraz elementów łączących w samochodach i motorach [278]. W powyższych zastosowaniach największe znaczenie ma wysoki stosunek wytrzymałości mechanicznej do masy oraz odporność termiczna tytanu. Kolejnym obszarem, w którym znalazł zastosowanie metaliczny tytan jest produkcja sprzętu sportowego m.in.: ram rowerowych, akcesoriów alpinistycznych, nart oraz rakiet tenisowych. Tytan coraz częściej stosowany jest również w jubilerstwie. W przeciwieństwie do wyrobów srebrnych nie wywołuje reakcji alergicznych oraz nie ciemnieje w kontakcie ze związkami siarki. Stop Ti-6Al-4V , ze względu na swoją biokompatybilność, właściwości mechaniczne i odporność na korozję, jest stosowany do produkcji wyrobów biomedycznych, w tym komponentów protetycznych, implantów dentystycznych oraz narzędzi chirurgicznych [221,279]. W kontekście zastosowania w implantologii i protetyce ważnym kryterium przemawiającym za tytanem jest stosunkowo niski moduł sprężystości Younga (Tab. 7), który spośród innych materiałów metalicznych jest

najbardziej zbliżony do sprężystości kości korowej (20 – 30 GPa). Dzięki temu nie dochodzi do dodatkowych naprężeń i uszkodzeń układu kostno-stawowego [222].

Tlenek tytanu(IV) jest jednym z najczęściej produkowanych pigmentów na świecie. Światowy rynek TiO_2 osiągnął w 2021 roku ok. 5 mln ton i oczekuje się, że do 2035 roku będzie rósł w tempie CAGR (ang. *compound annual growth rate*) na poziomie 4,92% [280]. Do produkcji TiO_2 na skalę przemysłową wykorzystywane są ilmenitowe koncentraty o niskiej zawartości tytanu, wysokotytanowe rutyle, szlaki tytanowe oraz mieszaniny wymienionych surowców, z których tlenek tytanu(IV) pozyskiwany jest za pomocą metody siarczanowej lub chlorkowej [281]. Związek ten stosowany jest jako biały barwnik w przemyśle papierniczym, włókienniczym i spożywczym oraz jako dodatek do różnego rodzaju farb i pigmentów. Cząstki TiO_2 , których rozmiary w co najmniej jednym wymiarze są mniejsze niż 100 nm, mogą stanowić nawet ~ 36% składu barwnika spożywczego E171 [262]. Nanocząstki tlenku tytanu(IV) w formie anatazu wykazują wyższą fotoaktywność niż ich rutowy odpowiednik. Lepiej absorbują promieniowanie UV oraz posiadają mniejszą zdolność rozpraszania i niższy współczynnik załamania światła, n (anataz $n = 2,49$, brukit $n = 2,58$, rutil $n = 2,61$ [233]). Nano-anataz wykorzystywany jest głównie do produkcji ogniw słonecznych, powłok samoczyszczących, a także do fotokatalitycznego rozkładu zanieczyszczeń organicznych i nieorganicznych, zwalczania grzybów, bakterii oraz wirusów. Natomiast nanocząstki tlenku tytanu(IV) w formie rutylu znalazły szerokie zastosowanie jako stabilizator UV w filtrach przeciwsłonecznych, tekstyliach i tworzywach sztucznych [282,283].

Przykłady zastosowania TiO_2 NPs w różnych gałęziach przemysłu i produktach codziennego użytku przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Zastosowanie TiO_2 NPs w przemyśle i produktach codziennego użytku [284]

Rodzaj przemysłu	Produkty zawierające tlenek tytanu(IV)	Zalety dodatku TiO_2
Spożywczy	<ul style="list-style-type: none"> ➤ produkty mleczne (sery, jogurty), wyroby cukiernicze, słodczyce (polewy, gumy do żucia, żelki, lody), przetwory rybne (np. surimi), gotowe zupy, buliony, sosy, przyprawy (np. musztarda), ➤ suszone warzywa, owoce kandyzowane, orzechy, piwa oraz wina [285], ➤ suplementy diety. 	Nadanie produktom pożądanej białej barwy oraz połysku, w niektórych przypadkach wzmocnienie smaku.
	<ul style="list-style-type: none"> ➤ materiały opakowaniowe oraz pojemniki służące do przechowywania żywności [286]. 	Działanie antydrobnoustrojowe w obecności promieniowania UV o słabym natężeniu.

Farmaceutyczny i medyczny	<ul style="list-style-type: none"> ➤ implanty, narzędzia chirurgiczne, ➤ materiały stomatologiczne, ➤ preparaty do odkażania narzędzi chirurgicznych, cewników, itp., ➤ systemy kontrolowanego dostarczania leków, terapia fotodynamiczna, inżynieria genetyczna, testy biologiczne, obrazowanie komórek [287], ➤ biosensory. 	Właściwości bakteriobójcze, zapobieganie infekcjom, przyspieszenie gojenia ran, szybszy wzrost tkanki kostnej, dobra biokompatybilność, stabilność chemiczna oraz termiczna, zwiększenie efektywności fotokatalitycznej; fotouczulanie, np. komórek nowotworowych; poprawa trwałości implantów stomatologicznych.
Kosmetyczny	<ul style="list-style-type: none"> ➤ kremy przeciwsłoneczne [288,289,290], ➤ pasty do zębów [291], szampony, balsamy, mydła, pomadki, pudry, podkłady, cienie do powiek, farby do włosów, lakiery do paznokci, kremy do pielęgnacji dzieci, preparaty „anti-aging”, dezodoranty. 	Ochrona przed szkodliwym działaniem promieniowania UV; czynnik wybielający, barwnik, środek zagęszczający.
Budowlany	<ul style="list-style-type: none"> ➤ powierzchnie samoczyszczące, samosterylizujące, ochronne (szkło [292], nawierzchnie betonowe, marmury [293], drewno [294], pokrycia tynków [295]), ➤ farby [296], pigmenty, lakiery, atramenty, ➤ tworzywa sztuczne, gumy, materiały ceramiczne, ➤ systemy oczyszczania powietrza [297] oraz wody [298] (np. usuwanie pozostałości pestycydów, konwersja CO₂, rozkład tlenków azotu, usuwanie dymu papierosowego), ➤ materiały nanokrystaliczne w fotoaktywnych ogniwach słonecznych. 	Poprawa właściwości powierzchni: wytrzymałości, twardości, współczynnika odbicia światła; działanie antykorozyjne, antystatyczne, hydrofobowe („efekt liścia lotosu” [299]), zwiększenie siły krycia farb, działanie przeciwporostowe, samoczyszczące, antybakteryjne, usuwanie odorów z zamkniętych przestrzeni (fotokatalityczna degradacja zanieczyszczeń).
Motoryzacyjny	<ul style="list-style-type: none"> ➤ powłoki ochronne, ➤ lusterka samochodowe. 	Ochrona przed promieniowaniem UV, nadawanie połysku, działanie antykorozyjne; właściwości samoczyszczące oraz przeciwmgłowe.
Papierniczy	<ul style="list-style-type: none"> ➤ artykuły papiernicze [300,301]. 	Biała błyszcząca barwa, zmniejszenie chropowatości powierzchni.
Tworzyw sztucznych	<ul style="list-style-type: none"> ➤ artykuły gospodarstwa domowego, żaluzje, rolety, meble ogrodowe. 	Ochrona przed odbarwieniem powierzchni wyeksponowanych na działanie promieniowania słonecznego.
Tekstylny	<ul style="list-style-type: none"> ➤ odzież sportowa [302], tkaniny nieprzemakalne oraz samoczyszczące ➤ modyfikowane syntetyczne włókna (np. poliestrowe, akrylowe oraz poliamidowe). 	Ochrona przed negatywnym działaniem promieniowania UV, działanie antybakteryjne, poprawa właściwości antystatycznych oraz odporności tkanin na zagniecenia.

Szerokie zastosowanie TiO₂NPs przyczynia się do zwiększenia jego niekontrolowanej emisji do środowiska przyrodniczego. Przykładem negatywnego oddziaływania tlenku tytanu(IV) na biosferę może być m.in. wybielanie rafy koralowej, które jest jednym

z czynników prowadzących do redukcji populacji organizmów występujących w tych cennych ekosystemach [303].

2.5. Losy TiO_2 w środowisku naturalnym

Emisja TiO_2

Nanocząstki tlenku tytanu(IV) mogą być emitowane do środowiska, np. z fotokatalicznych nanopowłok, betonów samoczyszczących, farb pokrywających zewnętrzne powierzchnie budynków oraz składowisk odpadów budowlanych i rozbiórkowych [304,305,306,307]. Kaegi et al. [308] przeprowadzili eksperyment, w którym eksponowali powierzchnie ($1,3 \text{ m}^2$) świeżo pokrytą farbą z TiO_2NPs na opady deszczu. W wodzie zebranej z eksperymentu podczas jednego pełnego opadu oznaczono tytan na poziomie $600 \mu\text{g L}^{-1}$. Równolegle przeprowadzono analogiczne badania z udziałem elewacji pokrytej farbą z TiO_2 , która została pomalowana 2 lata wcześniej. Oznaczone stężenie było 60-krotnie niższe ($\sim 10 \mu\text{g L}^{-1}$). Określono również stężenie Ti w odpływie miejskim, które wyniosło $\sim 16 \mu\text{g L}^{-1}$. We wszystkich zebranych próbkach wykryto TiO_2NPs . W kolejnym eksperymencie [307] zbadano poziom emisji TiO_2 ze składowisk odpadów budowlanych. Na podstawie stężeń oznaczonych w odciekach oszacowano wartość rocznej emisji TiO_2 do środowiska przyrodniczego, która wyniosła $\sim 500 \text{ g}$, z czego $\sim 5 \text{ g}$ stanowiły TiO_2NPs .

Tlenek tytanu(IV) może być uwalniany z tekstyliów podczas ich użytkowania oraz prania. Windler et al. [309] zbadali stopień uwalniania Ti podczas procesu prania z sześciu różnych tkanin funkcjonalizowanych TiO_2 . Stwierdzono uwalnianie Ti podczas jednego cyklu prania na poziomie od 0,01 do 3,4% wagowych całkowitego tytanu obecnego w tkaninie. Uwalniane do roztworu piorącego cząstki TiO_2 miały geometrię sferyczną oraz rozmiary w zakresie 60 – 350 nm.

Potencjalnym źródłem emisji TiO_2 do biosfery są ścieki [310,311]. Przepelnienia kanalizacji sanitarnej (SSO, ang. *Sanitary sewer overflow*) są częstym problemem, np. w Stanach Zjednoczonych. W 2004 r. na terenie USA doszło do 23 000 – 75 000 przypadków SSO, co doprowadziło do emisji 11 - 38 mld litrów nieoczyszczonych ścieków do środowiska przyrodniczego. W wodach powierzchniowych dotkniętych skutkami SSO stwierdzono wysokie stężenia cząstek TiO_2 , które osiągały poziom do $100 \mu\text{g L}^{-1}$ [311]. Ścieki surowe zawierają tytan na poziomie od 100 do prawie 3000 $\mu\text{g L}^{-1}$. W procesie oczyszczania zdecydowana większość tego metalu trafia do osadów ściekowych, które przetwarzane są na nawozy. Powstała biomasa wykorzystywana jest do użytkowania pól uprawnych, z których

tlenek tytanu(IV) może trafiać do wód powierzchniowych. Stężenie tytanu w oczyszczonych ściekach mieści się w zakresie 10 – 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ [312]. Slomberg et al. [313] zbadali emisję TiO_2 z fabryki produkującej pigmenty oraz oczyszczalni ścieków do wody rzecznej w okresie jesiennym i wiosennym. Znaczącą akumulację Ti wykryto w osadach ściekowych pochodzących z przemysłu i oczyszczalni ścieków pobranych w obu badanych okresach. Oznaczone stężenia Ti mieściły się w zakresie 75 – 193 mg kg^{-1} , czyli były od 21 do 55 razy wyższe od lokalnego tła biogeochemicznego. Badania potwierdziły uwalnianie TiO_2 pochodzenia antropogenicznego z obu źródeł do wody rzecznej. Stwierdzono, że zdecydowana większość TiO_2 uwalniana jest w postaci cząstek stałych o rozmiarach $> 0,20 \mu\text{m}$, które szybko osadzają się w pobliżu źródła emisji i gromadzą się w osadach dennych. Westerhoff et al. [314] przeprowadzili badania z udziałem 10 reprezentatywnych oczyszczalni ścieków, w których stwierdzono, że podczas uzdatniania wody usuwane jest ponad 96% tytanu.

Źródłem emisji TiO_2NPs do wód powierzchniowych są również kosmetyki przeciwsłoneczne szeroko stosowane w sezonie letnim. Badania przeprowadzone przez Gondikas et al. [315] na odcinku rzeki Stary Dunajec oddalonym o 50 metrów od kąpieliska wykazały obecność antropogenicznych nanocząstek tlenku tytanu(IV). Autorzy zwrócili uwagę na niską stabilność TiO_2NPs w badanym akwencie, które najprawdopodobniej ulegają agregacji i są deponowane w osadach rzecznych.

Agregacja TiO_2NPs

Duży wpływ na stopień agregacji TiO_2NPs ma pH otoczenia. Przy pH, w którym osiągnięty zostaje punkt ładunku zerowego (pH_{zpc}) nanocząstki tlenku tytanu(IV) wykazują największą skłonność do agregacji. Wartość pH_{zpc} zależy od rozmiaru TiO_2NPs , przy czym dla mniejszych NPs wartości są niższe, np. dla TiO_2NPs o rozmiarach 3,6 i 8,1 nm pH_{zpc} wyniosło odpowiednio 4,8 oraz 6,2 [316,317]. Na stabilność wpływa również struktura krystaliczna TiO_2 . Przy wartościach pH znacznie niższych niż pH_{zpc} TiO_2NPs (~ 6), nanocząsteczki rutylu wykazują wyższą stabilność niż TiO_2NPs w formie anatazu. Natomiast w przypadku środowiska zasadowego to nanocząstki anatazu trudniej ulegają agregacji. Dunphy et al. [316] wykazali, że rozmiar agregatów TiO_2 wzrasta, gdy pH zawiesin zbliża się do wartości pH_{zpc} . Stwierdzono również, że 80% zawieszonych TiO_2NPs i ich agregatów pozostaje mobilna w zakresie pH 1-12, z wyjątkiem wartości bliskich pH_{zpc} . Szybkość oraz stopień agregacji TiO_2NPs zależy również od siły jonowej. Przy pH ~4,5 i w obecności

0,0045 mol L⁻¹ NaCl, TiO₂NPs o rozmiarach 4 - 5 nm łatwo ulegają agregacji do rozmiarów w zakresie 50-60 nm. W przypadku wzrostu siły jonowej do 0,0165 mol L⁻¹ NaCl, w ciągu 15 minut zaobserwowano tworzenie się agregatów o rozmiarach mikrometrycznych. Przy zwiększaniu pH do 5,8 – 8,2 agregaty o wielkości w skali mikro powstawały w ciągu 5 minut, nawet przy niskiej sile jonowej 0,0084 – 0,0099 mol L⁻¹ NaCl. Znacznie szybsza agregacja TiO₂NPs miała miejsce w przypadku zastąpienia chlorku sodu roztworem CaCl₂ (siła jonowa: 0,0128 mol L⁻¹, pH 4,8) [318,319].

Kwasy humusowe mogą znacząco wpływać na transport TiO₂NPs, modyfikując ładunek elektryczny, rozmiar i chemiczny charakter cząstek. Stężenie NOM w wodach powierzchniowych mieści się w przedziale 0,1 – 20 mg L⁻¹, z czego większość stanowią substancje humusowe [320]. Powszechnie uważa się, że naturalna materia organiczna stabilizuje nanocząstki obecne w środowisku wodnym, lecz istnieją wyjątki. Zhu et al. [321] wykazali, że w przypadku zerowej siły jonowej agregacja TiO₂NPs jest promowana przez dodatek kwasu humusowego (HA, ang. *humic acid*), gdy pH jest niższe niż pH_{ZPC} TiO₂NPs (~ 6), ponieważ HA zmniejsza potencjał zeta nanocząstek tlenku tytanu(IV) poprzez neutralizację ładunku powierzchniowego. Przy pH = 4 i stężeniu HA 94,5 µg L⁻¹ potencjał zeta TiO₂NPs jest bliski zeru, co przekłada się na osiągnięcie maksymalnej agregacji. Na stabilność TiO₂NPs ma wpływ również pochodzenie HA. Kwasy humusowe obecne w glebie powstają głównie w wyniku powolnego rozkładu mikrobiologicznego ligniny, podczas gdy osadowe HA pochodzą przede wszystkim z pozostałości po procesie rozkładu glonów oraz bakterii. Obie grupy różnią się obfitością występowania oraz rodzajem grup funkcyjnych, co przekłada się na efektywność wiązania HA na powierzchni nanocząstek i ich stabilizację. Erhayem et al. [322] wykazali, że HA pochodzące z gleb łatwiej ulegają adsorpcji na powierzchni TiO₂NPs niż osadowe kwasy humusowe. Stwierdzono również, że efektywność adsorpcji HA skutecznie ogranicza obecność jonów fosforanowych, które prawdopodobnie konkurują z kwasem humusowym na powierzchni TiO₂NPs i/lub oddziałują z HA.

Pobieranie TiO₂NPs przez rośliny wyższe

Nanocząstki tlenku tytanu(IV) są efektywnie pobierane przez rośliny, przy czym największa ich ilość akumulowana jest w korzeniach. Następnie z systemu korzeniowego dystrybuowane są do łodyg i liści [323,324]. Larue et al. [325] przeprowadzili badania na roślinach *Triticum aestivum*, *Brassica napus* i *Arabidopsis thaliana* eksponowanych na TiO₂NPs o stężeniu i rozmiarach odpowiednio w zakresach: 0 – 1000 mg L⁻¹ oraz 12 – 140 nm. Korzystając z technik fluorescencji rentgenowskiej oraz transmisyjnej i skaningowej

mikroskopii elektronowej (TEM, SEM) stwierdzono, że pobrane przez rośliny nanocząstki nie uległy rozpuszczeniu oraz zmianie rozmiaru i formy krystalicznej podczas 7-dniowej ekspozycji. Powyższe obserwacje wskazują na ryzyko wędrowania TiO_2NPs wzdłuż łańcucha troficznego w formie niezmienionej. W większości prac tytan oznaczany był w całej roślinie [326] lub w jej różnych częściach [327]. Deng et al. [328] określili dystrybucję nanocząstek tlenku tytanu(IV) w korzeniach i liściach ryżu siennego (*Oryza sativa L.*) eksponowanego na działanie 5 lub 50 mg L^{-1} TiO_2 o pierwotnych rozmiarach w zakresie 19 - 232 nm. Autorzy wskazali na problemy związane z przygotowaniem materiału roślinnego do analizy oraz brakiem metod umożliwiających jakościowe i ilościowe oznaczenie TiO_2 w próbkach biologicznych. Rośliny we wszystkich opisanych eksperymentach były hodowane w systemach hydroponicznych.

3. Metody charakteryzowania oraz oznaczania nanocząstek metali

W zależności od celu analizy konieczne jest zastosowanie różnych technik analitycznych. Pełna charakterystyka nanocząstek metali oraz badanie ich transformacji w środowisku wymaga użycia kilku komplementarnych technik dostarczających różnych informacji na temat analitu.

Do określenia parametrów geometrycznych, takich jak kształt, rozmiar i rozkład wielkości, morfologii powierzchni oraz stopnia agregacji NPs można wykorzystać techniki mikroskopowe, takie jak transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM), skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) lub mikroskopia sił atomowych (AFM). Do określania rozmiarów NPs stosowane są również technika dynamicznego rozpraszania światła (DLS) oraz analiza śledzenia nanocząstek (NTA) [329]. Technikę NTA oraz metody mikroskopowe (TEM, SEM, AFM) można wykorzystać do wizualizacji nanocząstek obecnych w danej próbce. Mikroskopy elektronowe (TEM, SEM) można dodatkowo wyposażyć w przystawkę do mikroanalizy rentgenowskiej EDX, która umożliwia przeprowadzenie analizy jakościowej oraz ilościowej pierwiastków obecnych w badanej próbce [330]. Do uzyskania informacji dotyczących struktury krystalicznej, wielkości krystalitów oraz składu fazowego badanego materiału stosowana jest dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego (XRD) [331]. Określenie ładunku powierzchniowego nanocząstek oraz stabilności dyspersji jest możliwe dzięki wyznaczeniu potencjału elektrokinetycznego (Zeta) występującego na powierzchni kontaktu NP z roztworem elektrolitu. Urządzenia stosowane do pomiaru potencjału Zeta

wykorzystują elektroforetyczne rozpraszanie światła (ELS) lub połączenie elektroforezy z laserowym pomiarem ruchliwości cząstek w oparciu o efekt Dopplera (LDE).

W tabeli 11 przedstawiono metody analityczne służące do charakterystyki AgNPs i TiO₂NPs.

Tabela 11. Techniki analityczne stosowane do charakterystyki i oznaczania AgNPs i TiO₂NPs [284]

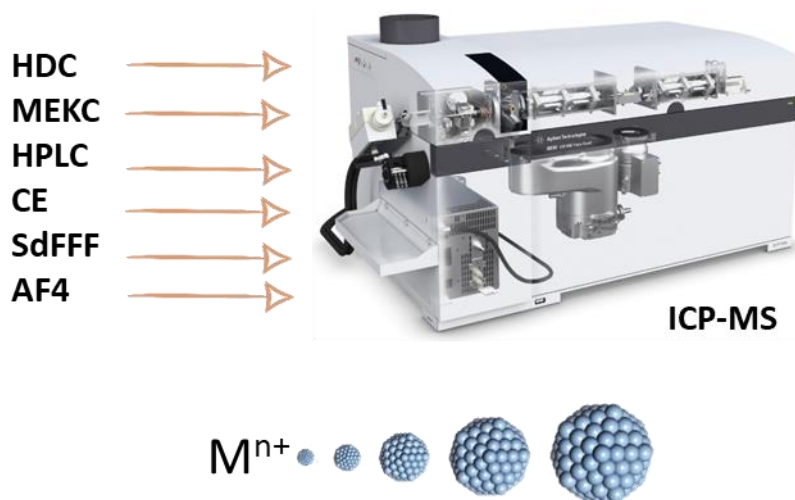
Techniki analityczne		Charakteryzowane właściwości NPs	Lit.
Mikroskopowe	Mikroskopia sił atomowych (AFM)	Kształt, ładunek powierzchniowy, rozmiar oraz rozkład wielkości cząstek; obrazowanie powierzchni struktur nanometrycznych w 3D	[332]
	Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)	Kształt, struktura, rozmiar oraz rozkład wielkości cząstek	[333]
	Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) oraz jej połączenie ze spektroskopią dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDX)	Morfologia powierzchni, kształt, struktura, rozmiar oraz rozkład wielkości cząstek; określenie składu chemicznego nanomateriałów	[334,335]
Rentgenowskie	Dyfrakcja rentgenowska (XRD)	Struktura krystaliczna oraz skład fazowy badanego materiału; skład chemiczny	[336,337]
	Rentgenowska spektrometria fotoelektronów (XPS)	Charakterystyka powierzchni	[338]
	Spektroskopia elektronowego rezonansu spinowego (ESR)	Wykrycie związków posiadających niesparowane elektrony	[339]
Spektroskopowe	Spektroskopia UV-Vis	Aktywność fotokatalityczna	
	Spektroskopia rozproszonego odbicia w zakresie UV-Vis (DR/UV-Vis)	Charakterystyka struktur	[340]
	Spektroskopia Ramana	Identyfikacja poszczególnych struktur krystalicznych (np. w przypadku TiO ₂ NPs: anatazu, rutyłu, brukitu) oraz ich wzajemnego stosunku ilościowego, np. anatazu do rutyłu	[339,341,342]
	Powierzchniowo wzmocniona spektroskopia Ramana (SERS)	Charakterystyka modyfikowanych/funkcjonalizowanych NPs oraz kompleksów NPs z substancjami organicznymi	[343,344]
	Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT IR)	Skład chemiczny nanomateriału	[337]
	Spektrometria mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ICP MS), optyczna spektrometria emisyjna z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ICP OES), atomowa spektrometria absorpcyjna z atomizacją elektrotermiczną (ETAAS)	Oznaczanie całkowitej zawartości metalu	[345,346,347]

	sp ICP MS; techniki sprzężone: rozdzielania z ICP MS (Rys. 9)	Oznaczanie stężenia liczbowego oraz masowego nanocząstek; odróżnianie NPs od rozpuszczonej frakcji metalu, określenie rozmiaru NPs, rozkładu wielkości oraz masy NPs	[348,349,350]
Inne	Technika adsorpcji i desorpcji azotu (metoda BET), porozymetria	Pole powierzchni właściwej, objętość porów	[351]
	Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)	Rozmiar oraz rozkład wielkości cząstek	[352]
	Analiza śledzenia nanocząstek (NTA)		
	Elektroforetyczne rozpraszanie światła (ELS), elektroforeza z laserowym pomiarem ruchliwości cząstek w oparciu o efekt Dopplera (LDE)	Wyznaczanie potencjału Zeta, ładunku powierzchniowego, punktu izoelektrycznego oraz stabilności dyspersji	[353]

Analiza nanocząstek metali w próbkach środowiskowych i biologicznych, ze względu na złożoną matrycę próbki w tym obecność potencjalnych interferentów, polidispersyjność NPs oraz ich występowanie na poziomie śladowym, często wymaga zastosowania etapu wydzielenia, a następnie frakcjonowania poszczególnych form fizykochemicznych analitu przed oznaczeniem. W analizie śladowej oddzielenie badanego analitu od matrycy próbki prowadzone jest za pomocą technik chromatograficznych, np. chromatografii wykluczenia (SEC, ang. *Size Exclusion Chromatography*) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC, ang. *High-Performance Liquid Chromatography*). Stosowane są również techniki ekstrakcyjne, np. ekstrakcja do punktu zmętnienia (CPE, ang. *Cloud Point Extraction*) lub do fazy stałej (SPE, ang. *Solid-Phase Extraction*); elektroforetyczne, np. elektroforeza kapilarna (CE, ang. *Capillary Electrophoresis*), a także wykorzystujące przepływowe frakcjonowanie w polu zewnętrznym (FFF, ang. *Field Flow Fractionation*), ultrawierowanie oraz ultrafiltrację [354].

Analiza specjacyjna metali w formie nanocząstek oraz frakcji jonowej jest trudniejsza niż oznaczenie całkowitej zawartości metalu. Nieprawidłowe przygotowanie próbki, takie jak zakwaszenie roztworu lub zastosowanie zbyt intensywnej sonikacji, może prowadzić do zmiany formy specjacyjnej metalu, czyli rozmiaru NPs lub ich rozpuszczenia. Wieloetapowe, skomplikowane procedury przygotowania próbek do analizy mogą prowadzić do strat analitu na przykład w wyniku adsorpcji na filtrach i membranach oraz zanieczyszczenia próbki. Obecnie do jakościowej oraz ilościowej analizy metali w formie jonowej oraz NPs stosowane są techniki sprzężone, wykorzystujące połączenie metod chromatograficznych bądź elektrochromatograficznych z ICP MS jako techniką detekcji (Rys. 9). Na szczególną uwagę

zasługują połączenia chromatografii hydrodynamicznej (HDC), micelarnej chromatografii elektrokinetycznej (MEKC, ang. *Micellar Electrokinetic Chromatography*), wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC), elektroforezy kapilarnej (CE) oraz przepływowego frakcjonowania w polu grawitacyjnym (SdFFF [355]) lub asymetrycznym polu sił przepływu (AF4) z ICP MS [356].



Rysunek 9. Techniki sprzężone stosowane w analizie specyacyjnej nanocząstek metali (objaśnienie skrótów nazw technik przedstawiono w tekście nad rysunkiem) [284]

Interesującą alternatywę dla technik sprzężonych stanowi zastosowanie spektrometrii mas z płamą indukcyjnie sprzężoną pracującą w trybie pomiarowym „pojedynczej cząstki” (sp ICP MS). Technika ta pozwala na jednoczesne oznaczanie NPs oraz rozpuszczonej frakcji badanego metalu. Zaletą sp ICP MS jest eliminacja problemów towarzyszących technikom sprzężonym, np. wymogu stosowania eluentów do rozdzału chromatograficznego, adsorpcją na powierzchni kanału separacyjnego, interakcjami z membraną, długim czasem analizy oraz pogorszeniem czułości. Ponadto, technika ta wymaga jedynie zainstalowania specjalnego oprogramowania do spektrometru ICP MS. Podstawy teoretyczne oraz przykłady zastosowania tej techniki do analizy NPs przedstawiono w rozdziale 4 pracy.

Newralgicznym etapem analizy śladowej metali w materiałach biologicznych i środowiskowych jest przygotowanie próbek. Niskie poziomy stężeń oraz złożone matryce próbek stanowią duży problem w przypadku oznaczeń całkowitej zawartości metalu. Stopień trudności wzrasta w przypadku analizy specyacyjnej, gdzie ważnym zadaniem jest zminimalizowanie ryzyka transformacji analitu podczas etapu przygotowania próbki.

3.1. Rozkład próbek środowiskowych i biologicznych

W celu oznaczenia całkowitej zawartości metalu w materiałach biologicznych i środowiskowych przeważnie wymagane jest roztworzenie próbki. Na szczególną uwagę w kontekście analizy śladowej zasługuje mineralizacja ciśnieniowa wspomagana promieniowaniem mikrofalowym. Do zalet powyższego podejścia można zaliczyć m.in. zmniejszenie ryzyka zanieczyszczenia próbki, krótki czas mineralizacji oraz zużycie niewielkich ilości odczynników [357]. Optymalizacja procedury rozkładu próbki wymaga doboru m.in. masy odważki, składu mieszaniny reakcyjnej oraz temperatury i ciśnienia w poszczególnych etapach mineralizacji. Szczególnie problematyczne jest roztwarzanie próbek środowiskowych do oznaczeń całkowitej zawartości tytanu, który przeważnie występuje w formie TiO_2 . Roztworzenie tlenku tytanu(IV) wymaga zastosowania wysokociśnieniowych systemów do mineralizacji wspomaganej mikrofalami oraz dodatku kwasu fluorowodorowego (HF). Użycie HF implikuje kolejne problemy, ponieważ wymagane jest zastosowanie odpowiednich naczyń laboratoryjnych oraz układów wprowadzających próbkę lub zneutralizowanie HF kwasem borowym.

Całkowite wydzielenie różnych form specyjalnych metalu z próbek biologicznych nie zawsze jest możliwe. Dotyczy to szczególnie metali wykazujących dużą reaktywność w stosunku do różnych struktur biologicznych (np. ścian i organelli komórkowych) obecnych w badanej próbce. Lepszą strategią uproszczenia matrycy próbki może być jej rozkład enzymatyczny lub za pomocą starannie dobranych odczynników w środowisku alkalicznym bądź kwasowym. Ważny jest taki dobór warunków rozkładu, aby maksymalnie ograniczyć transformacje analitu (m.in. rozpuszczanie/agregację nanocząstek oraz wytrącanie nierozpuszczalnych form metalu) uzyskując jak najefektywniejszy rozkład matrycy próbki.

W literaturze naukowej, w kontekście prowadzenia rozkładu próbek w środowisku alkalicznym oraz za pomocą enzymów stosowana jest zróżnicowana terminologia, nie zawsze precyzyjnie definiująca to, co autor danej pracy miał na myśli. Do najczęściej spotykanych sformułowań można zaliczyć: trawienie, rozkład, hydrolizę, solubilizację oraz ekstrakcję. W niniejszej pracy do opisu powyższych procesów używane są terminy „ekstrakcja” oraz „trawienie”.

3.1.1. Trawienie enzymatyczne próbek biologicznych

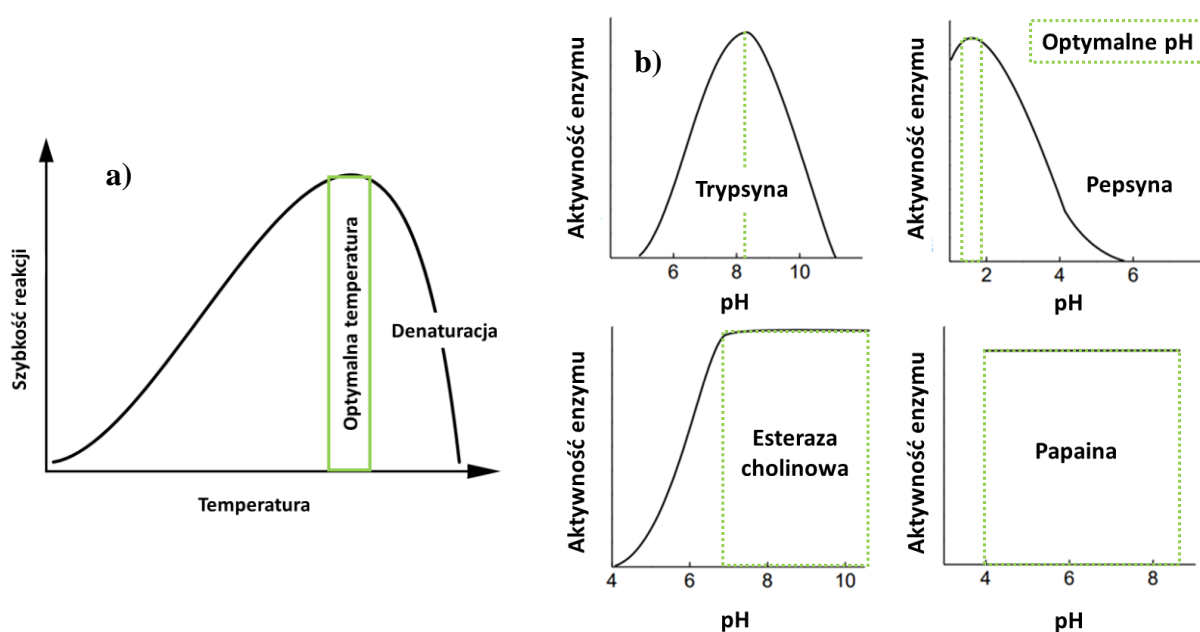
Enzymy są wielkocząsteczkowymi związkami zdolnymi do katalizowania szerokiej grupy reakcji chemicznych. W zdecydowanej większości są to białka, które pod wpływem temperatury i czynników chemicznych mogą ulegać denaturacji. Wyjątek stanowią rybozomy, które są cząsteczkami RNA wykazującymi właściwości katalityczne. Trawienie enzymatyczne próbki jest stosowane zarówno w przypadku całkowitego oznaczania metalu, jak i w analizie specyjnej [358]. Wykorzystywane są do tego celu enzymy hydrolityczne, do których zaliczamy:

- lipazy – hydrolizujące tłuszcze do długołańcuchowych kwasów tłuszczowych i glicerolu,
- amylazy – biorące udział w hydrolitycznym rozkładzie skrobi i glikogenu do maltozy i reszt polisacharydowych,
- proteazy – hydrolizujące wiązania peptydowe prowadząc do rozkładu białek.

Wśród enzymów proteolitycznych (proteaz) można wyróżnić peptydazy (np. pepsyna, tripsyna) oraz proteinazy (np. proteinaza K, pronaza E oraz subtylizyna). Dostępne są również mieszaniny różnych enzymów hydrolitycznych, np. pankreatyna zawierająca m.in. amylazę, lipazę oraz tripsynę. Wybór enzymu lub mieszaniny enzymów dokonywany jest na podstawie składu matrycy oraz właściwości fizykochemicznych analitu. Do najważniejszych czynników mających wpływ na aktywność enzymów można zaliczyć temperaturę, pH, stężenie enzymu oraz substratu biorącego udział w reakcji, a także obecność aktywatorów i inhibitorów enzymatycznych [359].

Optymalna temperatura, w której aktywność enzymu jest najwyższa zależy od jego pochodzenia. Enzymy ludzkie oraz zwierzęce przeważnie wykazują najwyższą aktywność w temperaturze zbliżonej do temperatury ciała (ok. 40°C). Obniżenie temperatury prowadzi do zmniejszenia aktywności enzymatycznej, aż do całkowitego zahamowania działania enzymu. Natomiast konsekwencją zastosowania zbyt wysokiej temperatury jest drastyczny spadek aktywności wynikający z denaturacji enzymu (Rys. 10a). Kolejnym parametrem, który należy uwzględnić przy trawieniu enzymatycznym próbki jest odczyn środowiska reakcyjnego. Optymalna wartość pH lub jej zakres wyznaczany jest na podstawie zależności szybkości reakcji od odczynu środowiska reakcyjnego (Rys. 10b). Pomiar prowadzone są w warunkach całkowitego nasycenia enzymu substratem oraz w stałej temperaturze w roztworze buforowym o odpowiedniej pojemności, co zapobiega zmianom wartości pH wywoływanym przez produkty reakcji. Zmiany wartości pH mogą prowadzić do jonizacji pewnych grup obecnych w strukturze enzymu (np. grup funkcyjnych aminokwasów

w centrach aktywnych), substratu oraz kompleksu enzym-substrat. Opisane przemiany mogą znacząco ograniczać aktywność enzymu lub całkowicie go inaktywować, zwłaszcza w przypadku, gdy jonizacja pewnych grup prowadzi do niekorzystnych zmian konformacyjnych w strukturze enzymu. Zastosowanie zbyt zasadowego lub kwasowego środowiska prowadzi do denaturacji enzymu. Przy wyborze roztworu buforowego należy uwzględnić optymalne pH enzymu oraz właściwości fizykochemiczne analitu.



Rysunek 10. (a) Wpływ temperatury na szybkość reakcji chemicznej katalizowanej enzymatycznie; (b) Zależność aktywności wybranych enzymów od wartości pH [359]

Szybkość reakcji katalizowanej enzymatycznie zależy w dużym stopniu od stężeń enzymu oraz substratu. W warunkach wysycenia enzymu substratem, przy zachowaniu stałej temperatury i pH, szybkość reakcji jest wprost proporcjonalna do stężenia enzymu.

Rozkład enzymatyczny wspomagany jest często energią ultradźwiękową. Celem sonikacji jest homogenizacja próbki i dezintegracja struktur biologicznych, np. ścian komórkowych. W tym celu stosowana jest sonda lub łaźnia ultradźwiękowa. Oba podejścia posiadają pewne zalety i ograniczenia. Zastosowanie łaźni ultradźwiękowej umożliwia równoczesne przygotowanie wielu próbek oraz dobrą kontrolę temperatury. Istotnym ograniczeniem jest relatywnie niska moc ultradźwięków ($1 - 5 \text{ W/cm}^2$), która często jest zbyt niska, aby umożliwić efektywną dezintegrację ścian komórkowych. Większą użyteczność w tym obszarze wykazuje sonda ultradźwiękowa, która generuje ultradźwięki o mocy $50 - 100 \text{ W/cm}^2$ [360]. Wadą stosowania dezintegratorów ultradźwiękowych jest zwiększone ryzyko zanieczyszczenia próbki związane z koniecznością wprowadzenia sondy do roztworu.

Co więcej głowica dezintegratora ultradźwiękowego wykonana z tytanu może powodować uwalnianie tego metalu podczas pracy sondy. Istotnym problemem w przypadku pracy z analitem wrażliwym na podwyższoną temperaturę jest szybkie nagrzewanie się próbki, co nawet w przypadku zastosowania trybu pracy pulsacyjnej wymaga zewnętrznego chłodzenia.

3.1.1.1. Przygotowanie próbek pochodzenia zwierzęcego

Trawienie enzymatyczne tkanek zwierzęcych oraz ludzkich odbywa się najczęściej w obecności proteiny K. Proteinaza K należy do grupy proteaz serynowych, których obecność prowadzi do degradacji większości białek poprzez hydrolizę wiązań peptydowych. Enzym ten jest stabilny w szerokim zakresie pH (4,0-12,0), przy czym najwyższą aktywność wykazuje w środowisku zasadowym (7,5-12,0) [361]. Maksymalna aktywność enzymatyczna osiągana jest w temperaturze wynoszącej 37°C. W zakresie temperatur 20-60°C aktywność nie spada poniżej poziomu 80% maksymalnej wartości [362].

Proteinaza K została z powodzeniem zastosowana do przygotowania próbek pochodzenia zwierzęcego, takich jak tkanki szczurów (wątroba, śledziona, płuca), myszy (wątroba, płuca), ryb z gatunku *Danio rerio* (jelita, wątroba, skrzela, mózg), dżdżownic, drobiu (mięso, wątroba) i mięsa zwierzyny łownej oraz tkanek pochodzenia ludzkiego (łożyska) do analizy metali w formie jonowej oraz nanocząstek. Zwierzęta oraz materiał biologiczny pochodzenia zwierzęcego lub ludzkiego eksponowane były na działanie nanocząstek metali szlachetnych, takich jak AgNPs [93,363,364,365,366,367,368,369] i AuNPs [370,371] lub tlenków metali (TiO₂NPs [372,373], CeO₂NPs [373,374]). Zwierzętom laboratoryjnym, najczęściej szczurom i myszom NPs podawane były drogą doustną, dożylną, dootrzewną lub dotchawiczą [363,370,371,372,374]. W przypadku organizmów modelowych reprezentujących środowisko wodne (ryby z gatunku *Danio rerio*) oraz gleby (dżdżownice) nanocząstki dodano do medium, w którym hodowane były zwierzęta [364,373]. W celu zbadania stopnia akumulacji i transferu AgNPs do jadalnych części kurczaka (mięśni, wątroby, nerek) oraz kurzych jaj nanocząstki podawane były kurom drogą doustną [368]. Procedura trawienia enzymatycznego za pomocą proteiny K została również zastosowana do przygotowania próbek mięsa kurczaka po dodaniu do niego AgNPs [365,366,367]. Badania te były prowadzone w ramach projektu NanoLyse, który miał na celu opracowanie matrycowego materiału odniesienia – mięsa z kurczaka zawierającego nanocząstki srebra. Proteinaza K została również wykorzystana do przygotowania próbek dziczyzny postrzelonej amunicją zawierająca ołów [375]. Eksperyment miał na celu

sprawdzenie czy w mięsie (w okolicy rany postrzałowej) obecne są nanocząstki ołowiu. Ciekawe badania przeprowadzono na modelowych tkankach łożyska ludzkiego, które poddano perfuzji *ex vivo* [93,369]. Do roztworu perfuzyjnego dodano AgNPs o multimodalnym rozkładzie wielkości stabilizowane za pomocą glikolu etylenowego lub karboksylanu sodu. Zbadano stopień akumulacji i transformacje AgNPs podczas 6-godzinnej perfuzji, które mogą przekładać się na potencjalne działanie teratogenne srebra. We wszystkich przedstawionych przypadkach zwierzęta i materiały biologiczne ekspozowane były na duże stężenia nanocząstek, znacznie przekraczające poziomy stężenie obecne w środowisku.

Zaproponowane procedury trawienia enzymatycznego w obecności proteinazy K charakteryzowały się dużym zróżnicowaniem warunków przeprowadzenia tego procesu. Temperatura inkubacji mieściła się w zakresie 37-65°C, natomiast czas 40 min – 16 h, przy czym najczęściej wybierana była temperatura 37°C oraz czas ≤ 3 h. Odczyn mieszaniny enzymatycznej mieścił się w zakresie wartości pH 7,4 - 9,5. Do utrzymania prawidłowego pH najczęściej stosowane były roztwory buforowe: 50 mmol L⁻¹ wodorowęglan amonu [93,367,369,371,373,374,375], 10 – 20 mmol L⁻¹ TRIS [363,365,366,368,370,372] oraz 20 mmol L⁻¹ HEPES [364]. Stosowano również dodatek środków powierzchniowo czynnych, takich jak Triton X-100 oraz SDS.

3.1.1.2. Przygotowanie próbek pochodzenia roślinnego

Ściany komórkowe roślin składają się głównie z polisacharydów: celulozy, hemiceluloz oraz pektyn, których średnia zawartość w roślinach naczyniowych w przeliczeniu na suchą masę wynosi odpowiednio 30%, 30% oraz 35%. Białka strukturalne stanowią natomiast od 1 do 5% suchej masy ścian komórkowych roślin [376].

Celuloza jest nierozgałęzionym, liniowym biopolimerem, w którym cząsteczki glukozy połączone są wiązaniami glikozydowymi. Masa celulozy w roślinach dwuliściennych, takich jak rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*), mieści się w przedziale od 15% (liście) do 33% (ściany łodyg) w przeliczeniu na suchą masę. Ściany komórkowe traw jednoliściennych zawierają natomiast około 6 – 10% celulozy w liściach i 20 – 40% w łodygach. Hemicelulozy występujące w ścianach komórkowych roślin to przeważnie rozgałęzione heteropolisacharydy o stosunkowo niskiej masie cząsteczkowej związane z ligniną i celulozą. Do najważniejszych hemiceluloz występujących w roślinach dwuliściennych można zaliczyć ksyloglukany, ksylany, mannany oraz glukomannany. Głównymi polisacharydami hemicelulozowymi występującymi w gatunkach trawiastych,

takich jak pszenica i jęczmień są arabinoksylany. W roślinach dwuliściennych celuloza i ksyloglukany występują w równych proporcjach. Pektyny stanowią szeroką, heterogeniczną grupę polisacharydów, w których strukturze ważnym składnikiem jest kwas D-galakturonowy. Zawartość pektyn w ścianach pierwotnych komórek roślin dwuliściennych i nietrawiastych roślin jednoliściennych kształtują się na poziomie ok. 35%. W przypadku traw i pierwotnych ścian komórkowych roślin komelinopodobnych zawartość pektyn wynosi od 2 do 10%, natomiast w ścianach komórkowych roślin drzewiastych nie przekracza 5% w przeliczeniu na suchą masę [376,377,378,379].

Zielenice stanowią dużą grupę zróżnicowanych morfologicznie fotosyntetyzujących eukariontów. Wytwarzają szeroką gamę ścian komórkowych o zróżnicowanym składzie chemicznym, począwszy od kompleksów celulozowo-pektynowych, a skończywszy na glikoproteinach bogatych w hydroksyprolinę. W większości przypadków ściany pokryte są macierzą pozakomórkową, która m.in. zapewnia fizyczną ochronę przed drobnoustrojami oraz bierze udział w procesach adhezji komórkowej. Glony z gromady zielenic mogą być pokryte wieloma warstwami łusek, posiadać krystaliczne powłoki glikoproteinowe lub grube wielowarstwowe włókniste ściany komórkowe [380,381]. Do najlepiej scharakteryzowanych zielenic pod względem budowy ściany komórkowej można zaliczyć gatunki *Scenedesmus* i *Chlorella*. Ściana komórkowa glonów *Chlorella* stanowi 13,6% całkowitej masy komórki i tworzą ją hemicelulozy (31,0%), glikoproteiny (27,0%), α – celuloza (15,4%), lipidy (9,2%) oraz glikozaminy (3,3%). W przypadku glonów *Scenedesmus* struktura ta zbudowana jest m.in. z celulozy (34,5%), glikoprotein (28,4%), lipidów (9,06%) oraz fosforu lipidowego (0,8%) [382].

Do rozkładu enzymatycznego materiałów pochodzenia roślinnego stosowany jest macerozym R-10, który stanowi mieszaninę celulazy ($0,1 \text{ U mg}^{-1}$), hemicelulaz ($0,25 \text{ U mg}^{-1}$) oraz pektynaz ($0,5 \text{ U mg}^{-1}$). Funkcją celulazy jest rozkład celulozy obecnej w ścianach komórkowych roślin do glukozy, celobiozy oraz wyższych polimerów glukozy. Hemicelulazy stanowią szeroką grupę enzymów hydrolizujących hemicelulozy, które przeważnie zbudowane są z reszt: glukozy, mannozy, galaktozy, arabinozy, ksylozy i kwasów heksauronowych (galakturonowego, glukuronowego oraz metyloglukuronowego) [383]. Rolą pektynaz jest rozkład związków pektynowych, przy czym należy zaznaczyć, że enzymy te wykazują zarówno działania pektynolityczne jak i hemicelulolityczne [384].

Macerozym R-10 został z powodzeniem wykorzystany do przygotowania próbek korzeni, pędów, łodyg, liści lub liścieni roślin jadalnych do analizy specjacyjnej metali techniką sp ICP MS (Tab. 12). Rośliny eksponowane były na działanie nanocząstek metali

szlachetnych (PtNPs [385], PdNPs [386], AuNPs [387] oraz AgNPs [388,389,390]), półszlachetnych (CuNPs [390]) oraz tlenków (ZnONPs [390,391], CeO₂NPs [392,394] oraz CuONPs [395]) lub siarczków metali (Ag₂SNPs [396]) przez system korzeniowy [385-388,390-394,396] lub liście [389,395]. Stężenia nanocząstek na które eksponowane były rośliny mieściły się w zakresie 0,02 – 30 mg L⁻¹. Wszystkie powyższe badania prowadzone były na roślinach hodowanych w systemach hydroponicznych.

Tabela 12. Opis procedur trawienia enzymatycznego próbek pochodzenia roślinnego w obecności macerozemu R-10 stosowanych przed oznaczeniem NPs techniką sp ICP MS

Analit	Rodzaj próbki/ przygotowanie próbki		Lit.
Droga ekspozycji			
Stężenie dodanego analitu [mg L ⁻¹]			
c-PtNPs 70 nm	Korzenie i pędy pieprzycy siewnej (<i>Lepidium sativum</i>); korzenie, łodygi, liścienie i liście gorczycy białej (<i>Sinapis alba</i>)/ Do 0,025 g próbki wysuszonego materiału roślinnego dodano 8 mL 2 mmol L ⁻¹ buforu cytrynianowego (pH 4,5). Zawiesinę homogenizowano przez 5 min przy użyciu sondy ultradźwiękowej, próbkę chłodzono lodem. Następnie do zawiesiny dodano 2 mL wodnego roztworu macerozemu R-10 (0,01 g sproszkowanego enzymu w przypadku trawienia korzeni lub 0,05 g w przypadku rozkładu pędów, liści, łodyg oraz liścieni). Próbkę mieszano w łaźni wodnej przez 24 h przy stałej temperaturze 37°C. Po inkubacji otrzymaną zawiesinę przefiltrowano za pomocą filtra strzykawkowego (wielkość porów 0,45 µm).		[385]
System korzeniowy			
0,5			
c-PdNPs 77 nm	Korzenie, łodygi i liście gorczycy białej (<i>Sinapis alba</i>)/ Próbkę przygotowano zgodnie z procedurą opracowaną przez Jiménez-Lamana et al. [385].		[386]
System korzeniowy			
1; 5			
PVP-AuNPs 40 nm	Pędy pomidorów zwyczajnych (<i>Solanum lycopersicum L.</i>)/ Pędy o długości 5-8 cm oddzielono od korzeni na wysokości 1 cm powyżej poziomu medium i pocięto na małe kawałki. Następnie dodano 8 mL 2 mmol L ⁻¹ buforu cytrynianowego. Do otrzymanego homogenatu dodano 2 mL roztworu macerozemu R-10 (1 g sproszkowanego enzymu w 20 mL wody, pH 3,5-7,0). Próbkę wytrząsano w temperaturze 37°C przez 24 h.		[387]
System korzeniowy			
0,2; 5			
c-AgNPs 10 nm	Korzenie i pędy rzodkiewnika pospolitego (<i>Arabidopsis thaliana</i>)/ Tkanki roślinne przemyto 3-krotnie wodą dejonizowaną i zhomogenizowano w obecności 2 mmol L ⁻¹ buforu cytrynianowego utrzymując pH w zakresie 3,5 – 7,0. Do homogenatu dodano 5% roztwór macerozemu R-10. Próbkę wytrząsano w temperaturze 37°C przez 24 h.		[388]
System korzeniowy			
0,02			
PVP-AgNPs 17 nm	Liście soi warzywnej (<i>Glycine max</i>) i ryżu siewnego (<i>Oryza sativa L.</i>)/ 0,1 g liści pocięto na małe kawałki i zhomogenizowano w 8 mL buforu cytrynianowego (2 mM, pH = 6,0). Do otrzymanego homogenatu dodano macerozemu R-10 – stosunek masy materiału roślinnego do masy sproszkowanego enzymu - 1:3. Próbkę inkubowano w temperaturze 37°C przez 36 h.		[389]
System korzeniowy lub liście			
0,1 - 30			
c-AgNPs ~ 35-38 nm, PEI-CuNPs ~ 35-79 nm, ZnONPs ~ 32-69 nm	Korzenie i pędy rzodkiewnika pospolitego (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Próbkę przygotowano zgodnie z procedurą opracowaną przez Jiménez-Lamana et al. [385].	[390]
System korzeniowy			

2			
ZnONPs 80-200 nm System korzeniowy 5	Liście i korzenie sałaty siewnej (<i>Lactuca sativa L.</i>)		[391]
CeO₂NPs 30-50 nm System korzeniowy 5; 50	Korzenie, łodygi i liście rzodkwi zwyczajnej (<i>Raphanus sativus L.</i>)		[392]
TiO₂NPs 30 i 100 nm System korzeniowy 5			[393]
CeO₂NPs 30-50 nm System korzeniowy 7	Pędy pomidorów zwyczajnych (<i>Solanum lycopersicum L.</i>), ogórka siewnego (<i>Cucumis sativus</i>), dyni zwyczajnej (<i>Cucurbita pepo</i>) i soi warzywnej (<i>Glycine max</i>)/ Materiał roślinny przemyto 3-krotnie wodą Milli-Q i pocięto na małe kawałki. Następnie dodano 9 mL 20 mmol L ⁻¹ buforu MES (kwas 2-[N-morfolino]-etanosulfonowy; pH = 5,0) i przeprowadzono homogenizację próbki. Do otrzymanego homogenatu dodano 1 mL roztworu macerozemu R-10 o stężeniu 30 mg mL ⁻¹ . W przypadku dyni i soi podwojono objętości buforu MES i roztworu enzymu. Próbkę wytrząsano w temperaturze 37°C przez 24 h.		[394]
CuONPs 20-100 nm Liście 1	Liście sałaty siewnej (<i>Lactuca sativa var. green leaf cultivar</i>), jarmużu (<i>Brassica oleracea, var. Acephala Lacinato</i>) i kapusty (<i>Brassica oleracea, var. Acephala</i>)/ Fragmenty liści o średnicy 6,35 mm wycięto z obszarów ekspozycyjnych na działanie CuONPs. Do próbki dodano 2 mL roztworu enzymu zawierającego 100 mg sproszkowanego macerozemu R-10. Otrzymaną mieszaninę wytrząsano w temperaturze 25°C przez 24 h.		[395]
PVP-Ag₂SNPs 59 nm System korzeniowy 10	Liście ogórka siewnego (<i>Cucumis sativus</i>) i pszenicy zwyczajnej (<i>Triticum aestivum L.</i>)/ Około 1-2 g (świeżej masy) liści wzbogaconych w Ag ⁺ lub Ag ₂ SNPs pocięto na 1-2 mm kawałki i zhomogenizowano w 16 mL buforu cytrynianowego (2 mM, pH = 5,6). Do homogenatu dodano 4 mL roztworu macerozemu R-10 sporządzonego przez rozpuszczenie 1 g enzymu w 20 mL wody. Próbkę wytrząsano w temperaturze 37°C przez 24 h.		[396]

Trawienie enzymatyczne próbek roślinnych w większości przypadków przeprowadzono w temperaturze 37°C podczas 24-godzinnej inkubacji. Wartości pH mieszanin mieściły się w zakresie, w którym macerozym R-10 wykazuje optymalną aktywność enzymatyczną (3,5 – 7,0). W celu utrzymania prawidłowego odczynu mieszaniny enzymatycznej stosowano 2 mmol L⁻¹ [385-392,396] bufor cytrynianowy lub 20 mmol L⁻¹ bufor MES [394]. Najczęściej stosowaną procedurą trawienia enzymatycznego było podejście zaproponowane przez Jiménez-Lamana et al. [385], w którym 25 mg suchej masy próbki roślinnej ekspozowano na działanie mieszaniny enzymatycznej. Końcowe stężenie macerozemu R-10 zastosowane do trawienia korzeni wyniosło 1 mg mL⁻¹, natomiast w przypadku pędów, liści, łodyg oraz liścieni była to wartość 5 mg mL⁻¹ (stosunek suchej masy próbki do masy enzymu wynosił odpowiednio 5:2 oraz 1:2). Najwyższe stężenie macerozemu R-10 wynoszące 50 mg mL⁻¹ zostało zastosowane do trawienia liści sałaty, jarmużu oraz kapusty wzbogaconych w CuONPs [395].

3.1.2. Trawienie próbek biologicznych w środowisku alkalicznym

Przygotowanie próbek do analizy nanocząstek metali poprzez trawienie w środowisku alkalicznym prowadzone jest głównie w obecności wodorotlenku tetrametyloamoniowego (TMAH) [397,398]. Większość procedur opisanych w literaturze odnosi się do materiałów pochodzenia zwierzęcego oraz ludzkiego (Tab. 13). Jedynie w kilku pracach TMAH zostało zastosowane do trawienia próbek roślinnych [399,400,401,402]. Metody przygotowania próbek zostały opracowane głównie pod kątem oznaczeń nanocząstek srebra oraz złota. Z przeglądu literaturowego sporządzonego przez Laycock et al. [397] wynika, że metody alkaliczne pod względem skuteczności, szybkości i wartości odzysków są lepsze niż trawienie enzymatyczne. Przy czym należy zaznaczyć, że do tej pory opublikowano niewiele prac poświęconych tej tematyce.

Tabela 13. Dokładny opis procedur trawienia próbek w środowisku alkalicznym (TMAH) stosowanych przed oznaczeniem NPs

Analit	Rodzaj próbki/ przygotowanie próbki	Lit.
Próbki zwierzęce i ludzkie		
AgNPs	Kał szczurów, którym doustnie podawano AgNPs (średni rozmiar NPs ~ 15 nm)/ Do 100 mg rozdrobnionej próbki kału dodano 2 mL 25% (w/w) TMAH i 400 µL 0,5% (w/w) cysteiny. Zawiesinę mieszano przez 24 h z prędkością 28 obr./min. i dopełniono do objętości 10 mL roztworem 0,1% cysteiny i 0,05% (w/w) Tritonu X-100. Następnie roztwór poddano sonikacji (1 min) i wirowaniu (15 min, temp. 21°C) z prędkością 3000 obr./min. Trawienie przeprowadzono dwukrotnie.	[403]
	Ludzkie komórki nowotworu wątroby (HepG2)/ Zawiesinę komórkową (500 000 komórek/mL) umieszczono na 96-dółkowej płytce, po 100 µL na dółek. Do zawiesiny na płytce dodano 4 mL TMAH i 1 mL 0,25% Tritonu X-100. Roztwór mieszano mechanicznie w temperaturze pokojowej przez 4 h. Następnie 2 mL roztworu rozcieńczono 0,05% (v/v) Tritonem X-100 do objętości końcowej 8 mL (stężenie końcowe TMAH - 5% (v/v)).	[404]
	Tkanki maczynne, łożyska i płody myszy, które eksponowano na działanie AgNPs drogą oddechową/ Ekstrakcję AgNPs przeprowadzono dodając do próbki 20% TMAH (20:1 w stosunku do masy próbki). Następnie mieszaninę poddano działaniu ultradźwięków (5 min, 38 W, tryb pracy pulsacyjnej – okres pracy/spoczynkowy: 6 s/ 2 s). Próbkę wytrząsano mechanicznie w temperaturze pokojowej przez całą noc.	[405]
	Wzbogacona tkanka ludzkiego łożyska/ Do 2 g tkanki łożyska ludzkiego dodano 2 mL buforu perfuzyjnego. Powstałą mieszaninę zhomogenizowano. W celu uniknięcia wzrostu bakterii dodano azydek sodu o stężeniu 200 mg L ⁻¹ . Następnie 0,2 g otrzymanego homogenatu zmieszano z 0,3 mL wody oraz 2 mL 25% (v/v) TMAH (do stężenia końcowego 20%). Próbkę poddano procesowi sonikacji w łaźni ultradźwiękowej (1 h, RT), a następnie mieszano w temperaturze pokojowej przez 23 h. Przed oznaczeniem srebra techniką sp ICP MS roztwory odpowiednio rozcieńczono utrzymując stężenie TMAH na poziomie 1% (v/v).	[369]
AuNPs	Śledziony szczurów, którym dożylnie podawano AuNPs o rozmiarach 60 nm/ Zhomogenizowaną próbkę śledziony (mokra masa : woda = 1 : 10 m/m) poddano sonikacji w łaźni ultradźwiękowej przez 1h. Następnie do 200 µL homogenatu dodano TMAH do końcowego stężenia 5% (v/v) oraz albuminę surowicy bydlęcej (BSA) w ilości teoretycznie pozwalającej na utworzenie monowarstw białka na powierzchniach nanocząstek (300 cząsteczek BSA/AuNPs o rozmiarze 60 nm). Próbkę o końcowej	[370]

	objętości 2 mL poddano procesowi sonikacji w łaźni ultradźwiękowej (1 h), a następnie mieszano w temperaturze pokojowej przez całą noc.	
	Śledzony oraz wątroby szczurów rasy Wistar, którym dootrzewnie podawano AuNPs o rozmiarach 10 nm/ Do 25 mg zliofilizowanej i zhomogenizowanej próbki dodano 200 µL wody Milli-Q. Zawiesinę poddano sonikacji (1 h). Następnie dodano TMAH do końcowego stężenia 5% (v/v) (końcowa objętość próbki 2 mL). Mieszaninę wytrząsano mechanicznie przez całą noc.	[371]
AgNPs, AuNPs	Mielone mięso wołowe, tkanka rozwielitki (<i>Daphnia magna</i>) oraz słodkowodnego skąposzczeta (gatunek <i>Lumbriculus variegatus</i>) wzbogacone w AgNPs lub AuNPs/ W przypadku wołowiny oraz <i>L. variegatus</i> odważono 0,5 g mokrej masy próbki i dodano 10 mL 20% TMAH (1:20). Dużo mniejszą masę zastosowano w przypadku <i>D. magna</i> – 1,75 mg. Podczas pierwszej godziny trawienia alkalicznego próbki poddawano sonikacji w łaźni ultradźwiękowej. Celem tego zabiegu było ułatwienie rozkładu tkanek oraz uniknięcie agregacji NPs. Trawienie prowadzono przez 24 h.	[406]
Próbki roślinne		
AgNPs	Ryż (<i>Oryza sativa</i> L.)/ Do wysuszonych, rozdrobnionych pędów (70 mg) lub korzeni (20 mg) dodano 2 mL 10% TMAH. Otrzymane zawiesiny wytrząsano z prędkością 300 obr./min, w temperaturze 25°C przez 4 h.	[401]
AgNPs, AuNPs	Rośliny kielkujące/ Próbkę przygotowano zgodnie z procedurą opracowaną przez Gray et al. [406].	[399]
AuNPs	Ziemniaki, rzodkiewki, marchewki i sałata/ 25 mg wysuszonej, zmielonej próbki zawieszono w 10 mL 5% (v/v) TMAH. Zawiesinę zhomogenizowano przy użyciu sondy ultradźwiękowej (moc: 100%, tryb pracy pulsacyjnej – okres pracy/spoczynkowy: 6 s/ 2 s). Podczas sonikacji próbki chłodzono zewnętrznie lodem. Próbki wytrząsano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Następnie poddano je 5 minutowej sonikacji (tryb pracy pulsacyjnej – okres pracy/spoczynkowy: 6 s/ 2 s), pozostawiono na ok. 30 min. i rozcieńczono 5% TMAH.	[400]
TiO₂NPs	Głony <i>Ulva rigida</i>, <i>Sargassum bacciferum</i>, <i>Ulva sp</i>, <i>Palmaria Palmata</i>/ Do około 1,0 g glonów dodano 7,5 mL 2,5% TMAH. Próbki poddano 2-godzinnej sonikacji w łaźni ultradźwiękowej i przefiltrowano.	[402]
Ścieki		
TiO₂NPs	Osad czynny (układ modelowy)/ Do 10 mg wysuszonego osadu dodano 1 mL 25% TMAH. Powstałą mieszaninę poddano 2-godzinnej sonikacji, rozcieńczono 5-krotnie wodą dejonizowaną (DW) i przesączono przez bibułę filtracyjną. Osad trzykrotnie przemyto DW, odwirowano i ponownie zawieszono w DW.	[407]

Jak wynika z powyższego zestawienia, trawienie w środowisku alkalicznym prowadzone jest w temperaturze pokojowej, w czasie od 4 do 24 godzin. Stosowane są stężenia TMAH w zakresie 2,5 – 25%. Ważnym etapem, który pozytywnie wpływa na efektywność trawienia próbek jest sonikacja przy użyciu łaźni [369,370,399,402,403,406,407] lub sondy ultradźwiękowej [400,405]. W kilku pracach zastosowano dodatek środka powierzchniowo czynnego Triton X-100 [403,404]. W większości badań zestawionych w tabeli 13 opisano przygotowanie próbek do analizy techniką sp ICP MS, która została szczegółowo opisana w kolejnym rozdziale.

4. Spektrometria mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną pracująca w trybie pojedynczej cząstki

Pomysł wykorzystania ICP MS do analizy pojedynczych cząstek został po raz pierwszy zaprezentowany na spotkaniu Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC*) w Davos (Szwajcaria) w 1991 roku przez Claude'a Degueldre'a oraz Johna McCarthy'ego. Przykładem praktycznego zastosowania proponowanego podejścia była analiza pojedynczych cząstek zawieszonych w powietrzu pod kątem zawartości cynku. Specjalnie zaprojektowany układ pozwalający na bezpośrednie wprowadzenie zanieczyszczonego powietrza do strumienia plazmy oraz udoskonalony system detekcji i zliczania jonów umożliwiły oznaczanie Zn na poziomie femtogramowym (10^{-15} g) [408,409,410]. Podstawy teoretyczne techniki sp ICP MS oraz zależności matematyczne opisujące sposób wyznaczania rozmiaru cząstek oraz ich stężenia zostały przedstawione w nowatorskich pracach Degueldre'a [411,412,413,414,415]. Użyteczność omawianej techniki potwierdziła analiza układów modelowych zawierających cząstki TiO_2 , $FeOOH$ oraz Al_2O_3 . Problem stanowiły wysokie granice wykrywalności rozmiarów cząstek (LOD_{size}), które w przypadku tlenku tytanu(IV) oraz hydroksotlenku żelaza(III) wyniosły odpowiednio ok. 100 i 200 nm [411]. Niższe wartości LOD_{size} uzyskano w przypadku oznaczeń cząstek tlenku cyrkonu(IV) [412], tlenku toru(IV) [413] oraz złota [415], odpowiednio 70, 80 oraz 25 nm.

Jednoczesne oznaczenie nanocząstek danego metalu oraz jego rozpuszczonej frakcji techniką sp ICP MS wymaga zastosowania odpowiednio dużych rozcieńczeń oraz małej prędkości przepływu próbki. Po rozcieńczeniu stężenie liczbowe badanych NPs przeważnie nie przekracza wartości $10^9 L^{-1}$, co odpowiada stężeniu masowemu na poziomie $ng L^{-1}$. Podejście to pozwala na wprowadzenie pojedynczych cząstek analitu do strumienia plazmy argonowej. Do plazmy w sposób ciągły wprowadzany jest badany roztwór zawierający analit o stężeniu C^M . Zarejestrowany sygnał R, wyrażony jako liczba zliczeń jonów o określonym stosunku masy do ładunku elektrycznego (m/z) na sekundę, opisuje równanie (1):

$$R = \eta_{neb}\eta_{ion}\eta_{interf}\eta_{trans}Q_{sam}A\frac{N_{Av}}{M_M}C^M \quad (1)$$

gdzie:

R - sygnał wyrażony jako liczba zliczeń na sekundę [cps],

η_{neb} - efektywność transportu cząstek do strumienia plazmy,

η_{ion} - efektywność procesu jonizacji,

η_{interf} - efektywność ekstrakcji i przechodzenia jonów ze strumienia plazmy do obszaru analizatora mas,

η_{trans} - efektywność transmisji jonów przez analizator mas do detektora,

Q_{sam} - szybkość przepływu próbki,
 A - rozpłaszczenie izotopu pierwiastka wybranego do pomiarów,
 N_{Av} - liczba Avogadro ($6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$),
 M_M - masa atomowa metalu M,
 C^M - stężenie masowe analitu.

W równaniu (1) można wyróżnić trzy składowe związane z:

- układem wprowadzania próbek ($K_{intr} = \eta_{neb} Q_{sam}$),
- charakterystyką spektrometru ($K_{ICP MS} = \eta_{ion} \eta_{interf} \eta_{trans}$),
- właściwościami oznaczanego metalu ($K_M = A \frac{N_{Av}}{M_M}$).

Uproszczony zapis równania (1) wygląda wówczas następująco:

$$R = K_{intr} K_{ICP MS} K_M C^M \quad (2)$$

Stężenie masowe nanocząstek zbudowanych z atomów metalu M (C_{NP}^M) posiadających geometrię sferyczną wyraża równanie (3):

$$C_{NP}^M = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{d}{2}\right)^3 \rho N_{NP} \quad (3)$$

gdzie:

d - średnica nanocząstki,
 ρ - gęstość nanocząstki,
 N_{NP} - stężenie liczbowe NPs.

Równanie (2) przyjmuje wówczas postać:

$$R = K_{intr} K_{ICP-MS} K_M K_{NP} N_{NP} \quad (4)$$

gdzie:

$K_{NP} = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{d}{2}\right)^3 \rho$ to czynnik uwzględniający sferyczną geometrię nanocząstki oraz gęstość metalu, z którego jest zbudowana.

Zarejestrowanie sygnału dla pojedynczej cząstki w trakcie jednego odczytu jest możliwe poprzez zastosowanie optymalnego rozcieńczenia próbki oraz odpowiednio dobranych parametrów pomiarowych, m.in. czasu pomiaru (t_{dwell}) i prędkości przepływu roztworu. Strumień wprowadzanych do plazmy NPs (Q_{NP}) oraz częstotliwość wykrytych nanocząstek (f_{NP}) są wówczas wprost proporcjonalne do stężenia liczbowego NPs (N_{NP}).

$$f_{NP} = Q_{NP} = \eta_{neb} Q_{sam} N_{NP} \quad (5)$$

W sytuacji, gdy wszystkie rejestrowane sygnały pochodzą od pojedynczych cząstek prawdziwe staje się równanie (6), natomiast intensywność sygnału nanocząstki (r_{NP}) można wyrazić równaniem (7)

$$\eta_{neb} Q_{sam} N_{NP} t_{dwell} = 1 \quad (6)$$

$$r_{NP} = K_{ICP\ MS} K_M K_{NP} \quad (7)$$

Parametr r_{NP} można wyrazić jako funkcję masy danego metalu, z którego zbudowana jest NP lub średnicy nanocząstki, które przedstawiają odpowiednio równanie 8 i 9.

$$r_{NP} = K_{ICP\ MS} K_M m_{NP} \quad (8)$$

$$r_{NP} = K_{ICP\ MS} K_M \frac{1}{6} \pi \rho d^3 \quad (9)$$

Podsumowując, analiza ilościowa nanocząstek techniką sp ICP MS przeprowadzana jest na podstawie liniowej zależności stężenia liczbowego NPs od częstotliwości zarejestrowanych sygnałów o charakterze impulsowym (równanie 5). Masa lub średnica nanocząstki określana jest na podstawie intensywności sygnału (równania 8 i 9). Zarejestrowanie odpowiednio dużej liczby impulsowych sygnałów dla pojedynczych NPs umożliwia wyznaczenie rozkładu masy oraz wielkości nanocząstek obecnych w próbce [416]. Określenie wielkości badanych NPs przeprowadzane jest w czterech etapach [417]:

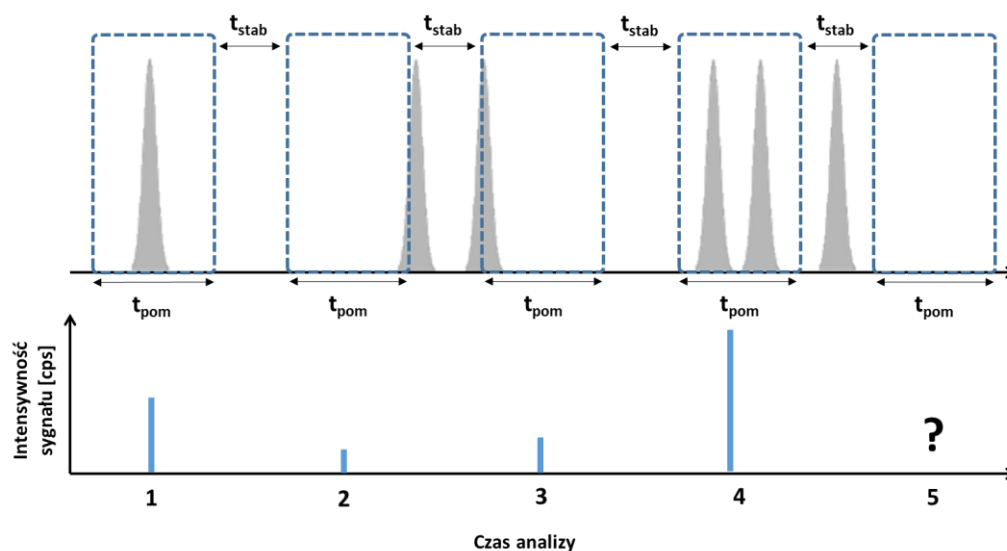
- 1) Zarejestrowanie wykresu kalibracyjnego dla jonów metalu, z którego zbudowane są badane nanocząstki (zależność intensywności sygnału (cps) od stężenia jonów ($\mu\text{g L}^{-1}$)).
- 2) Wyliczenie masy analitu wprowadzanej do strumienia plazmy w czasie pomiaru (tzw. strumień masy wyrażony w $\mu\text{g s}^{-1}$) na podstawie wcześniej wyznaczonej efektywności transportu próbki (η_{neb}).
- 3) Wykorzystanie zależności intensywności sygnału od strumienia masy do obliczenia mas pojedynczych cząstek wprowadzanych do strumienia plazmy.
- 4) Przeliczenie mas cząstek na ich średnice, przy założeniu, że posiadają geometrię sferyczną.

Kalibrację można również przeprowadzić przy użyciu wzorców NPs o różnych rozmiarach poprzez wygenerowanie bezpośredniej zależności między wielkością cząstek a sygnałem analitycznym. Nanocząstki użyte do wzorcowania powinny być bardzo dobrze scharakteryzowane, stabilne, posiadać jednorodny rozkład wielkości oraz budowę zbliżoną do oznaczanych NPs. Dużym problemem jest dostępność wzorców spełniających powyższe kryteria, przez co omawiane podejście jest rzadko stosowane [356]. W przypadku wzorców cząstek metalicznych zakresy liniowości krzywych kalibracyjnych zależą w znacznym stopniu od ich właściwości fizykochemicznych, takich jak temperatura wrzenia, gęstość oraz masa atomowa. Liniowość wykresów kalibracyjnych obejmuje ok. 3 rzędy wielkości dla masy cząstek oraz 1-2 rzędy wielkości dla rozmiaru cząstek [418].

W trakcie pomiarów techniką sp ICP MS wykorzystuje się specjalny tryb zbierania danych bazujący na pomiarze sygnału zmiennego w czasie (TRA, ang. *Time Resolved Analysis*). Można wyróżnić dwa przedziały pracy spektrometru w trybie TRA:

- czas pomiaru, t_{pom} , w którym dokonywana jest analiza jonów o określonym stosunku m/z,
- czas stabilizacji, t_{stab} przeznaczony na stabilizację detektora, w którym nie odbywa się pomiar.

W określonym czasie analizy przedziały pracy spektrometru powtarzają się cyklicznie [419,420] w sposób przedstawiony na rysunku 11. Podczas analizy całkowitej zawartości badanego metalu czasy integracji wynoszą 0,3 – 1,0 s, natomiast w przypadku trybu pojedynczej cząstki przeważnie stosowane są czasy pomiaru ≤ 10 ms. Obecnie komercyjnie dostępne spektrometry ICP MS dedykowane analizie NPs wyposażone są w udoskonalone, szybsze układy elektroniczne umożliwiające prowadzenie pomiarów nawet przy $t_{pom} \leq 100$ μ s [421,422] oraz zredukowanym do minimum t_{stab} . Przykładowe czasy pomiarów stosowane podczas analizy nanocząstek srebra techniką sp ICP MS w próbkach o zróżnicowanym składzie matrycy przedstawiono w tabeli 14 i 16. Wynoszą one od 0,05 do 20 ms.



Rysunek 11. Wpływ przedziałów pracy spektrometru w trybie TRA - czasu pomiaru (t_{pom}) i czasu stabilizacji (t_{stab}) na intensywność sygnału otrzymanego techniką sp ICP MS [419]

Prawidłowe określenie rozmiaru NPs wymaga zastosowania optymalnego czasu pomiaru. Pożądanym scenariuszem jest sytuacja, w której w pojedynczym oknie pomiarowym zostaje zarejestrowany impulsowy sygnał dla 1 nanocząstki. Zastosowanie zbyt krótkiego

t_{pom} zwiększa prawdopodobieństwo pomiaru < 1 nanocząstki w oknie pomiarowym, co może prowadzić do niedoszacowania rozmiaru NP. Konsekwencją zbyt długiego czasu pomiaru może być przeszacowanie średnicy nanocząstki związane z zarejestrowaniem więcej niż 1 NP w oknie pomiarowym (Rys. 11). W większości kwadropolowych spektrometrów ICP MS minimalny czas pomiaru wynosi kilka milisekund (np. 3 ms dla spektrometrów firmy Agilent Technologies z serii 7700, 7800 i 8800) oraz nie ma możliwości pomiaru więcej niż jednego izotopu w trakcie analizy [423,424].

Czas stabilizacji ma znaczący wpływ na przebieg oznaczenia NPs techniką sp ICP MS ze względu na impulsowy charakter rejestrowanych sygnałów. Nanocząstka metalu po wprowadzeniu do strumienia plazmy generuje „pakiet jonów”, który rejestrowany jest jako pik. Intensywność pików jest proporcjonalna do wielkości cząstek, natomiast ich częstotliwość wykorzystywana jest w analizie ilościowej. Im dłuższy t_{stab} tym większe prawdopodobieństwo, że wygenerowana „chmura jonów” dotrze do detektora w trakcie jego stabilizacji i nie zostanie zarejestrowana w postaci pików. Czas stabilizacji nie stanowi takiego problemu w przypadku tradycyjnych oznaczeń całkowitej zawartości analitu, w których sygnał ma charakter ciągły.

Długość całkowitego czasu zbierania danych (ang. *total acquisition time*) powinna umożliwiać zarejestrowanie sygnału dla optymalnej liczby nanocząstek (w rekomendowanym przez firmę Agilent przedziale 500 – 2500 NPs). Ze względu na generowanie dużej liczby punktów pomiarowych oraz większe zużycie próbki całkowity czas zbierania danych przeważnie nie przekracza 2 - 3 min.

Efektywność transportu próbki do strumienia plazmy (η_{neb}) jest istotnym parametrem techniki sp ICP MS. Jest to stosunek liczby nanocząstek wykrytych do teoretycznie wyliczonych na podstawie stężenia i średnicy NPs oraz gęstości metalu, z którego zbudowane są nanocząstki użyte do kalibracji [417]. Wartości η_{neb} w przypadku konwencjonalnych rozpylaczy pneumatycznych wynoszą zazwyczaj kilka procent (1 – 5% [422]). Zdecydowanie wyższymi wartościami η_{neb} oraz mniejszym zużyciem próbki charakteryzują się układy wyposażone w wysokoefektywne rozpylacze, np. MDG (ang. *Monodisperse Microdroplet Generator*), w których efektywność transportu próbki do strumienia plazmy wynosi $> 95\%$ [425,426,427]. Wartość η_{neb} uzależniona jest nie tylko od budowy systemu wprowadzania próbki, lecz także od prędkości przepływu gazu nośnego oraz właściwości fizykochemicznych wprowadzanego roztworu (np. lepkości). Wymienione czynniki implikują konieczność wyznaczania η_{neb} przed każdą analizą nanocząstek techniką sp ICP MS.

Wyznaczanie efektywności transportu próbki do strumienia plazmy może być przeprowadzone:

- 1) przy użyciu materiału odniesienia o zdefiniowanym rozmiarze nanocząstek,
- 2) korzystając z materiału odniesienia o znanym stężeniu liczbowym NPs,
- 3) metodą wagową (ang. *waste collection method*), w której wyznaczana jest różnica między objętością dostarczaną do spektrometru a objętością, która nie została wprowadzona do plazmy.

Pace et al. [422] dokonali porównania wymienionych metod. W przypadku użycia materiałów odniesienia zawierających NPs o zdefiniowanej wielkości i stężeniu liczbowym uzyskano podobne rezultaty ($\eta_{neb} \sim 9\%$). Efektywność transportu próbki do strumienia plazmy wyznaczona metodą wagową wyniosła $\sim 14,5\%$, jednak dalsze badania dowiodły, że była to wartość zawyżona. Autorzy podkreślili również, że metoda wagowa była najbardziej czasochłonna. Określenie η_{neb} pozostałymi metodami najczęściej przeprowadzane jest przy użyciu materiałów odniesienia zawierających AuNPs o nominalnym rozmiarze cząstek 30 lub 60 nm (odpowiednio RM 8012 lub RM 8013) produkowanych przez Narodowy Instytut Standaryzacji i Technologii (ang. *National Institute of Standards and Technology*, NIST). Niewielka dostępność materiałów odniesienia zawierających dobrze scharakteryzowane nanocząstki metali (MNPs) oraz tlenków metali (MONPs) sprawia, że materiały odniesienia AuNPs wykorzystywane są podczas oznaczeń innych nanocząstek, np. AgNPs i TiO₂NPs. Analiza NPs prowadzona jest wówczas przy założeniu, że badane nanocząstki wprowadzane są do strumienia plazmy z taką samą efektywnością jak AuNPs użyte do kalibracji. Jest to dość ryzykowne założenie rzutujące na wzrost niepewności pomiaru, dlatego wyznaczanie η_{neb} jest jednym z głównych problemów towarzyszących analizie NPs techniką sp ICP MS [428]. Sposoby wyznaczania η_{neb} zastosowane w badaniach AgNPs i TiO₂NPs przeprowadzonych z użyciem techniki sp ICP MS oraz ich wartości przedstawiono w tabelach 14 i 16. Warto również zaznaczyć, że w większości prac opisujących zastosowanie techniki sp ICP MS roztwory kalibracyjne oraz próbki sporządzane są w ultraczystej wodzie bez dodatku substancji stabilizujących.

Kolejny problem stanowi odróżnienie sygnału analitycznego pochodzącego od tła, rozpuszczonej frakcji metalu oraz NPs. Często przyjmowanym kryterium ustalania granic między tymi sygnałami jest 3 – 5 krotność odchylenia standardowego danej serii pomiarów. Impulsowe sygnały o wartości cps wyższej niż przyjęta granica zliczeń przypisywane są nanocząstkom badanego metalu, natomiast część sygnału poniżej ustalonej liczby zliczeń na

sekundę interpretowana jest jako tło, rozpuszczona frakcja metalu oraz nanocząstki o rozmiarach mniejszych niż granica wykrywalności rozmiaru cząstek (LOD_{size}).

Wartości granic wykrywalności (LOD) oraz oznaczalności (LOQ) analitu w przypadku metod wykorzystujących spektrometrię mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną zależą w dużym stopniu od stosunku sygnału do szumu (ang. *signal-to-noise ratio*, SNR). Szumy można podzielić na dwie grupy:

- zakłócenia występujące w czasie pomiaru będące konsekwencją nieoczekiwanego zachowania jonów w obszarze detektora (ang. *shot noise*),
- szumy będące następstwem procesów fizycznych, m.in. fluktuacji występujących w trakcie procesu jonizacji oraz transportu kropli do strumienia plazmy, dyfuzji jonów w plazmie argonowej i spektrometrze mas (ang. *flicker noise*) [429].

Na poziom zakłóceń towarzyszących analizie NPs w próbkach środowiskowych techniką sp ICP MS mają również wpływ: tło biogeochemiczne, udział rozpuszczonej frakcji analitu, polidispersyjność nanocząstek oraz właściwości fizyczne próbki, np. lepkość i gęstość roztworu.

Obecnie prowadzone są badania mające na celu opracowanie modeli matematycznych pozwalających na skuteczną dekonwolucję sygnałów analitycznych w celu uzyskania informacji dotyczących udziału tła, rozpuszczonej frakcji analitu oraz badanych NPs [429].

Ciekawym przykładem modelu matematycznego zastosowanego w analizie nanocząstek jest algorytm grupowania K-średnich (ang. *K-means clustering algorithm*) opracowany w zespole Westerhoffa [430]. Zaproponowane podejście umożliwia wykrycie oraz określenie udziału frakcji NPs będących zanieczyszczeniem jednorodnych mieszanin nanocząstek, np. zawiesin SiO_2 , Al_2O_3 lub CeO_2 stosowanych w procesie chemiczno-mechanicznego polerowania (ang. *Chemical Mechanical Polishing*, CMP). Konsekwencją obecności zbyt dużych NPs (ang. *impurity-size nanoparticles*) w zawiesinie jest wzrost ryzyka agregacji nanocząstek oraz niszczenia polerowanej takim materiałem powierzchni. Algorytm umożliwia ilościowe oznaczenie frakcji NPs stanowiących zanieczyszczenie na poziomie poniżej 2% masy nanocząstek o pożądanej, dominującej w zawiesinie wielkości. Różnica w rozmiarach NPs obecnych w mieszaninie musi wynosić co najmniej 20 nm. Dla porównania, w przypadku techniki DLS rozróżnienie jest możliwe, gdy różnica rozmiarów jest większa niż 30 nm [431]. Powstają również nowe narzędzia do obróbki i interpretacji sygnałów analitycznych otrzymywanych techniką sp ICP MS [432,433]. Przykładem jest platforma typu *open source* z interaktywnym interfejsem graficznym oparta na języku Python [434].

Zastosowanie techniki sp ICP MS, mimo wymienionych ograniczeń, pozwala na uzyskanie informacji dotyczących stężenia liczbowego i masowego (na poziomie $\leq \text{ng L}^{-1}$) oraz rozkładu rozmiarów nanocząstek występujących w analizowanej próbce. Niekwestionowaną zaletą tego podejścia, szczególnie w kontekście analizy specjacyjnej, jest możliwość jednoczesnego oznaczenia analitu w postaci NPs oraz rozpuszczonej frakcji metalu.

4.1. Oznaczanie srebra techniką sp ICP MS – problemy analityczne

Obecnie technika sp ICP MS jest coraz szerzej stosowana do oznaczania nanocząstek metali oraz tlenków metali w różnych próbkach [435]. Duża część prac poświęcona jest analizie nanocząstek srebra w układach modelowych, próbkach biologicznych, żywności, wodach wodociągowych, powierzchniowych oraz ściekach. W tabeli 14 przedstawiono przegląd wybranych prac z lat 2011 – 2018 z uwzględnieniem zakresu badań, zastosowanych czasów pomiarów (t_{pom}), sposobów wyznaczania efektywności transportu próbki do strumienia plazmy (η_{neb}) oraz ich wartości, a także uzyskanych granic wykrywalności rozmiarów cząstek (LOD_{size}). Technika sp ICP MS zastosowana została także do badania transformacji zachodzących *in vivo* w organizmach żywych [363], modelach symulujących układ pokarmowy [436] oraz innych układach zawierających składniki organiczne i nieorganiczne, np. roztworach modelowych [437], pożywkach [438,439], układach pilotażowych symulujących naturalne systemy wodno-lądowe [440]. Kolejnym obszarem zastosowania techniki sp ICP MS jest badanie stopnia uwalniania obu form srebra (Ag^+ , AgNPs) z różnych materiałów użytkowych, np. pojemników do przechowywania żywności [441]. Opracowywane są również metody umożliwiające oznaczanie nanocząstek o geometrii niesferycznej (np. nanodrutów [439]), w których otrzymane rozmiary wyrażone są jako ekwiwalent średnicy sferycznej. Mitrano et al. [417] porównali technikę sp ICP MS z AF4-ICP MS pod kątem możliwości jednoczesnego oznaczania obu form srebra (Ag^+ i AgNPs) oraz granic wykrywalności stężenia i rozmiaru AgNPs. Stwierdzono, że technika AF4-ICP MS umożliwia skuteczniejszą identyfikację NPs o rozmiarach $\geq 2 \text{ nm}$, natomiast wypada dużo gorzej podczas jednoczesnego oznaczania Ag^+ i AgNPs. Dodatkowo granice wykrywalności stężenia AgNPs przy zastosowaniu techniki AF4-ICP MS były o 3 rzędy wielkości wyższe niż w przypadku sp ICP MS (μg vs. ng). Minimalny rozmiar AgNPs możliwy do oznaczenia techniką sp ICP MS wyniósł $\sim 20 \text{ nm}$. Pace et al. [438] porównali technikę sp ICP MS z innymi technikami umożliwiającymi wymiarowanie

nanocząstek wykorzystującymi: dynamiczne rozpraszanie światła (DLS), śledzenie ruchu nanocząstek (NTA), transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM) oraz różnicową sedimentację odśrodkową (DCS). Autorzy wskazali na dużą użyteczność techniki sp ICP MS w oznaczaniu rozmiarów AgNPs na poziomach stężeń środowiskowych, które są problemem w przypadku pozostałych technik. Przy czym informacje otrzymywane przy użyciu innych technik mogą mieć charakter uzupełniający.

Do problemów analitycznych związanych z oznaczaniem AgNPs techniką sp ICP MS można zaliczyć straty analitu wynikające z adsorpcji na powierzchni naczyń laboratoryjnych i układu wprowadzającego próbkę [442] oraz zmniejszenia stabilności nanocząstek srebra. Problem interakcji analitu z powierzchnią układu wprowadzającego próbkę można rozwiązać poprzez bezpośrednie dozowanie badanego roztworu do rozpylacza z pominięciem automatycznego podajnika próbek oraz pompy perystaltycznej (ang. *direct self-aspiration into nebulizer*) [443]. Podejście to, ze względu na duże nakłady pracy jest mało atrakcyjne i trudne do zastosowania przy analizowaniu większych serii próbek. Podczas oznaczania całkowitej zawartości Ag zakwaszenie roztworu kwasem azotowym(V) zapobiega występowaniu tego problemu, jednak w przypadku analizy specjacyjnej może prowadzić do rozpuszczania AgNPs. Z tego powodu oraz w celu stabilizacji AgNPs stosowany jest dodatek środków powierzchniowo czynnych, np. Tritonu X-100 [444,445].

Na możliwości oznaczania nanocząstek srebra techniką sp ICP MS istotny wpływ ma obecność frakcji jonowej [446]. Laborda et al. [447] zauważyli, że dodatek Ag^+ prowadzi do wzrostu wartości LOD_{size} z 18 nm w układach bez srebra jonowego do 32 nm w obecności $300 \text{ ng L}^{-1} \text{ Ag}^+$. Innym parametrem, który obrazuje powyższy problem jest BED (ang. *Background Equivalent Diameter*) – teoretycznie najmniejszy rozmiar cząstek możliwy do wykrycia w danej próbce (parametr wyznaczany przez oprogramowanie MassHunter, specyficzny dla spektrometrów firmy Agilent), którego wartość rośnie wraz ze wzrostem udziału frakcji jonowej. Problem ten jest szczególnie istotny w przypadku spektrometrów umożliwiających prowadzenie pomiarów przy minimalnych czasach pomiaru (t_{pom}) na poziomie mikrosekund. Bezpośrednie, jednoczesne oznaczenie AgNPs o małych rozmiarach w obecności dużego nadmiaru frakcji jonowej może być niemożliwe, dlatego opracowywane są metody oznaczania obu form srebra, w których analiza sp ICP MS poprzedzona jest etapem izolacji/usunięcia Ag^+ metodami chromatografii jonowej (IEC) [448] lub wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) [449].

Kolejnym potencjalnym problemem towarzyszącym oznaczeniu srebra techniką sp ICP MS są interferencje spektralne wieloatomowe. Srebro występuje w środowisku

naturalnym w formie 2 stabilnych izotopów: ^{107}Ag (51,84%) i ^{109}Ag (46,16%). Ze względu na większe rozpowszechnienie w przyrodzie do oznaczeń wybierany jest przeważnie izotop ^{107}Ag , który może być obciążony interferencjami związanymi z obecnością cynku ($^{67}\text{Zn}^{40}\text{Ar}^+$ i $^{91}\text{Zr}^{16}\text{O}^+$) [450]. Z przeglądu literaturowego wynika, że niespektralne efekty matrycowe nie występują podczas oznaczania Ag w próbkach o stosunkowo prostej matrycy, np. wodach powierzchniowych [443], sokach owocowych [451]. Powyższy problem może jednak wystąpić w bardziej złożonych układach, np. ściekach. Podejściem, które niweluje wpływ efektów matrycowych na przebieg analizy jest zastosowanie rozcieńczenia izotopowego (IDA, ang. *Isotope Dilution Analysis*) [449,452]. Obecność złożonej matrycy próbki prowadzi do wzrostu wartości LOD_{size} , które w przypadku osadów [440] i ścieków [452, 453] osiągają wartości 30 – 40 nm (Tab. 14). Na przebieg oznaczenia oprócz składników występujących w próbce mogą mieć również wpływ odczynniki użyte do jej przygotowania, np. Triton X-114 stosowany podczas ekstrakcji do punktu zmętnienia [173], lub rozkładu (enzymy, TMAH) [369,406]) (Tab. 13). W przypadku wód powierzchniowych procedura przygotowania próbek ogranicza się jedynie do etapu filtracji, który jednak może prowadzić do strat analitu związanych z adsorpcją metalu na powierzchni filtrów.

Ważnym parametrem w technice sp ICP MS jest efektywność wprowadzania próbki do strumienia plazmy (η_{neb}), która zależy w dużym stopniu od budowy układu wprowadzającego próbkę, a także od wybranych warunków pomiarowych (np. prędkości przepływu gazu nośnego) i właściwości fizykochemicznych wprowadzanego roztworu. Wyznaczanie η_{neb} przeprowadzane jest najczęściej przy użyciu wzorca nanocząstek o dobrze scharakteryzowanym rozmiarze oraz znanej liczbie NPs (odpowiednio metoda (1) i (2) w tabeli 14). W przypadku oznaczania AgNPs techniką sp ICP MS w różnych układach wartości η_{neb} mieściły się w przedziale 2 – 11,2% (Tab. 14).

Przy opracowywaniu nowych metod analitycznych umożliwiających oznaczenie AgNPs w próbkach rzeczywistych problemem jest brak dobrze scharakteryzowanych matrycowych materiałów odniesienia (RM). W poprzedniej dekadzie w ramach europejskiego projektu *NanoLyse* podjęto próbę stworzenia matrycowego materiału odniesienia zawierającego AgNPs w mięsie kurczaka [365,366,367,436]. Jednak ze względu na ograniczoną stabilność AgNPs w mięsie (nawet w temp. -80°C), ich rozpuszczanie i duża reaktywność, np. w stosunku do grup tiolowych białek, opracowanie powyższego materiału jako RM nie powiodło się [454]. Finalnie materiał nie został wprowadzony do sprzedaży komercyjnej. Powyższy przykład obrazuje jak trudnym zagadnieniem jest analiza specjacyjna srebra w materiałach biologicznych i próbkach środowiskowych.

Tabela 14. Przegląd prac dotyczących oznaczania AgNPs techniką sp ICP MS

Próbka	Próbki/ Zakres badań, dodatkowe uwagi	t_{pom} [ms]	η_{neb} [%]; *sposób wyznaczania η_{neb}	LOD _{size} [nm]	Lit.
Układy modelowe	Porównano technikę sp ICP MS z AF4-ICP MS pod kątem: granic wykrywalności stężenia (ng L ⁻¹ vs. µg L ⁻¹) i rozmiaru NPs (20 nm vs. 2 nm). Stwierdzono, że technika AF4-ICP MS umożliwia skuteczniejszą identyfikację NPs o różnych rozmiarach, natomiast wypada dużo gorzej w przypadku jednoczesnego oznaczania Ag ⁺ i AgNPs.	10	5; (-)	20	[417]
	Zwrócono uwagę na problem z oznaczaniem małych AgNPs techniką sp ICP MS związany z obecnością frakcji jonowej srebra. W celu usunięcia Ag ⁺ zastosowano połączenie jonowymiennej chromatografii kolumnowej (IEC) z sp ICP MS. Uzyskane rozkłady wielkości AgNPs były zgodne z wartościami otrzymanymi technikami DLS i NTA. Powyższe podejście pozwoliło na uzyskanie poprawnych rozkładów wielkości AgNPs w obecności Ag ⁺ na poziomie ≤ 4 µg L ⁻¹ (w roztworze końcowym).	1	-; (1/2), (3)	15	[448]
	Do jednoczesnego oznaczania Ag ⁺ oraz AgNPs zastosowano technikę IDA-HPLC-sp ICP MS. Szczególny nacisk położono na separację różnych form srebra i oznaczenie frakcji jonowej. Stwierdzono, że zastosowanie rozcieńczenia izotopowego może mieć pozytywny wpływ na kompensację efektów matrycowych podczas analizy srebra w próbkach rzeczywistych. Rozmiar NPs potwierdzono za pomocą techniki DLS.	10	-; (-)	-	[449]
	W czystej wodzie MQ wartość LOD _{size} wyniosła 18 nm. Konsekwencją dodatku Ag ⁺ (300 ng L ⁻¹) był wzrost LOD _{size} do 32 nm.	5	-; (-)	18	[447]
	Pożywka dla glonów (AGM) z dodatkiem kwasu humusowego (HA) /Porównano różne techniki wyznaczania rozmiaru nanocząstek: DLS, DCS, NTA, TEM oraz sp ICP MS. Sprawdzono użyteczność techniki sp ICP MS do określania rozmiarów NPs w układach modelowych zawierających pożywkę dla glonów oraz dodatek 3 mg L ⁻¹ lub 10 mg L ⁻¹ HA w czasie 144 h ekspozycji. Stwierdzono, że AgNPs o rozmiarach 100 nm po przedostaniu się do środowiska naturalnego mogą pozostawać w swojej pierwotnej formie przez ≥ 7 dni. Podkreślono użyteczność techniki sp ICP MS w oznaczaniu rozmiarów nanocząstek na poziomach stężeń środowiskowych.	10	-; (2)	20	[438]
	Układ pokarmowy / Dokonano analizy specjacyjnej Ag w systemach symulujących ludzki układ pokarmowy (jama ustna, żołądek oraz jelita). W badaniach zastosowano mięso z kurczaka wzbogacone w PVP-AgNPs (kandydat na materiał odniesienia - „NanoLyse 14”).	10	< 10; (-)	-	[436]
	Osad z powierzchniowej warstwy (0-10 cm) układu pilotażowego symulującego system filtracji brzegu rzeki wzbogacony w „postarzane” AgNPs / Zbadano mechanizmy retencji oraz remobilizacji AgNPs, które przed wprowadzeniem do układu pilotażowego poddano kontrolowanemu procesowi „postarzania” w wodzie rzecznej, ekstrakcie z gleby oraz wodzie. Sprawdzono wpływ siły jonowej, sił mechanicznych oraz udziału NOM i Ca na efektywność procesu remobilizacji AgNPs. Po remobilizacji otrzymane roztwory przefiltrowano i poddano oznaczeniu	5	-; (-)	30	[440]

	techniką sp ICP MS w celu określenia stopnia agregacji NPs				
Próbki biologiczne	Mysie komórki nerwiaka niedojrzałego / Zbadano proces pobierania c-AgNPs o rozmiarach 50 i 75 nm przez komórki. W tym celu wykorzystano LA-ICP MS do bezpośredniej analizy komórek oraz ICP MS i sp ICP MS do oznaczenia zawartości srebra w lizatach komórkowych. Analiza lizatów techniką sp ICP MS wykazała formowanie się aglomeratów nanocząstek we wnętrzu komórek. Na podstawie obrazowania LA-ICP MS stwierdzono, że AgNPs o rozmiarach 75 nm adsorbowały się na powierzchni błon komórkowych, natomiast większość AgNPs o średnicy 50 nm przenikała do wnętrza komórek. Zaobserwowano również duże zróżnicowanie w pobieraniu NPs przez poszczególne komórki. Akumulacja NPs była w dużym stopniu uzależniona od ich rozmiarów. Przygotowanie próbek: Przemycie oraz liza komórek w 0,1% Tritonie X-100, rozcieńczenie.	3	3,9 - 4,5; (-)	22	[444]
	Tkanka szczura / Zbadano skutki doustnego podawania szczurom srebra w formie < 20 nm AgNPs, < 15 nm PVP-AgNPs ([Ag] = 90 mg/kg m.c.) lub AgNO ₃ ([Ag] = 9 mg/kg m.c.) po 28-dniowej ekspozycji. Srebro akumulowało się w wątrobie, śledzionie, jądrach, nerkach, mózgu oraz płucach szczurów. Ag ⁺ efektywniej przenikało do krwiobiegu oraz organów wewnętrznych niż AgNPs. Autorzy zaobserwowali również zachodzącą <i>in vivo</i> transformację Ag ⁺ w AgNPs. Pomiary sp ICP MS przeprowadzono dla 2 izotopów: ¹⁰⁷ Ag i ¹⁰⁹ Ag. Przygotowanie próbek: Trawienie enzymatyczne z udziałem proteiny K.	3	-; (-)	20	[363]
	Wzbożona tkanka ludzkiego łóżyska / Tkankę eksponowano <i>ex vivo</i> na działanie 27 nm PEG-AgNPs lub 34 nm AgCOONa NPs. Sprawdzono dwie strategie przygotowania próbek – trawienie enzymatyczne oraz alkaliczne. Trawienie enzymatyczne z udziałem proteiny K umożliwiło prawidłowe oznaczenie stężenia masowego i liczbowego oraz rozkładu wielkości NPs w tkance łóżyska. W przypadku drugiej strategii zaobserwowano negatywny wpływ TMAH na zmianę stanu AgNPs, który był prawdopodobnie konsekwencją wytrącania Ag(I) i/lub agregacji nanocząstek w środowisku alkalicznym. Autorzy stwierdzili również, że strategia dopasowywania matrycy wzorca jonowego Ag(I) użytego do kalibracji w obu procedurach przygotowania próbki (enzymatycznej oraz alkalicznej) prowadzi do uzyskania niedokładnych wyników. Wzrost udziału matrycy organicznej w próbce prowadził prawdopodobnie do zwiększenia siły adhezji jonów na powierzchni układu wprowadzającego próbkę. Przygotowanie próbek: Trawienie enzymatyczne z udziałem proteiny K oraz alkaliczne w obecności TMAH	3	5,8 - 11,2; (1/2)	25	[369]
	Hemolimfa rozwielitki (<i>Daphnia magna</i>), pożywka COMBO, próbki wodne / Dokonano oceny fizykochemicznej stabilności nanodrutów srebra (AgNWs) o wymiarach 65 nm x 20 μm i 30 nm x 2 μm pokrytych PVP lub krzemionką domieszkowaną glinem w pożywce. Stabilizacja PVP efektywniej chroniła nanodrut przed utlenianiem srebra i uwalnianiem Ag ⁺ niż nieorganiczna warstwa krzemionki domieszkowanej glinem znajdująca się na powierzchni AgNWs. Konsekwencją wyżej opisanych różnic była wyższa toksyczność AgNWs pokrytych nieorganiczną warstwą SiO ₂ -Al. względem rozwielitki w porównaniu do PVP-AgNWs. Granica wykrywalności w hemolimfie rozwielitki wyniosła ok. 10 μg kg ⁻¹ . Przeprowadzono również badania toksykologiczne, z których wynikało, że toksyczność wszystkich badanych AgNWs jest znacznie mniejsza niż toksyczność srebra jonowego. Dodatkowo nanodrut srebra charakteryzują się mniejszą toksycznością niż AgNPs.	10	-; (1)	30	[439]
	Tkanka rozwielitki (<i>Daphnia magna</i>), słodkowodnego skąposzczeta (gatunek <i>Lumbriculus variegatus</i>) oraz mielone mięso wołowe wzbożone w AgNPs / Ekstrakcja NPs z różnego rodzaju tkanek. Wartości odzysków Ag mięsiły się	10	4 – 6; (1)	-	[406]

	w przedziale 75 - 125%. Przygotowanie próbki: Trawienie alkaliczne w obecności TMAH				
Żywność	Woda, sok pomarańczowy i jabłkowy wzbogacone w AgNPs/ Dokonano walidacji metody umożliwiającej szybkie oznaczenie AgNPs oraz AuNPs w soku pomarańczowym i jabłkowym.	0,05	7,04; (2)	28,3 – 30,1	[451]
	Mięso z kurczaka wzbogacone w AgNPs/ Dokonano oznaczenia AgNPs techniką AF4-ICP MS z zastosowaniem detektorów MALS i DLS. Analizę srebra techniką sp ICP MS przeprowadzono przed i po frakcjonowaniu (AF4) zmineralizowanej enzymatycznie próbki. W przypadku technik AF4-ICP MS i sp ICP MS uzyskano odzyski Ag odpowiednio na poziomie ~ 80% i ~ 68%. Przygotowanie próbki: Trawienie enzymatyczne z udziałem proteiny K	3	-; (2)	15	[367]
	Mięso z kurczaka wzbogacone w AgNPs/ Metoda oznaczania AgNPs w mięsie kurczaka została poddana procesowi walidacji zgodnie z decyzją Komisji UE 2002/657/EC dotyczącą limitów pozostałości w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego. Przeprowadzono wiele analiz na 3 poziomach stężeń (5, 10, 25 mg kg ⁻¹) w trzech różnych dniach. Wyznaczono odporność, prawdziwość (rozmiar – 98-99%, stężenie – 91-101%), powtarzalność (rozmiar - <2%, stężenie - <11%), odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną (rozmiar - <6%, stężenie - <16%), liniowość (0,5 – 50 mg kg ⁻¹ , R ² > 0,99) oraz granice wykrywalności (LOD = 0,05 mg kg ⁻¹) i oznaczalności metody (LOQ = 0,1 mg kg ⁻¹). Autorzy stwierdzili, że AgNPs podczas 24-godzin od wprowadzenia do próbki ulegają w niewielkim stopniu rozpuszczeniu, a następnie tworzą Ag ₂ S. Otrzymane produkty trawienia enzymatycznego są stabilne przez 3 tygodnie w temperaturze 4°C. Przygotowanie próbki: Trawienie enzymatyczne z udziałem proteiny K	3	-; (1/2)	-	[365]
	Mięso z kurczaka wzbogacone w AgNPs/ Przeprowadzono badania międzylaboratoryjne, w których wzięło udział 10 laboratoriów z Europy, USA oraz Kanady. W przypadku określania średniej średnicy cząstek odchylenie standardowe powtarzalności uzyskane dla 2 homogenizatów mięsa z kurczaka wzbogaconego w AgNPs wyniosło odpowiednio 3 i 5%, natomiast odchylenie standardowe odtwarzalności 15 i 25%. Medialna średnica NPs wyznaczona dla obu homogenizatów była o 60% większa niż rozmiar nanocząstek w roztworze użyty do wzbogacenia próbek. Gorsze rezultaty uzyskano przy wyznaczaniu stężenia liczbowego NPs, gdzie odchylenie standardowe powtarzalności wyniosło 7 i 18%, natomiast odchylenie standardowe odtwarzalności 70 i 90%. Problem z odtwarzalnością związany jest z dużą reaktywnością AgNPs, które łatwo ulegają utlenianiu, kompleksowaniu, a także mogą być trwale wiązane przez białka. Uwolnione z nanocząstek srebro w formie jonowej może tworzyć <i>de novo</i> inne cząstki, np. AgCl, Ag ₂ S czy Ag ⁰ . Przygotowanie próbki: Trawienie enzymatyczne z udziałem proteiny K	3	-; (2)	15 - 20	[366]
	Dekoracje cukiernicze (srebrne perły zawierające barwnik E174), reprezentatywny nanomateriał NM-300K/ Określono rozkład wielkości pojedynczych agregatów i/lub aglomeratów zawierających AgNPs za pomocą techniki TEM. Strukturę krystaliczną cząstek wyznaczono za pomocą obrazowania HAADF-STEM połączonego ze spektrometrią EDX i mapowaniem próbki. Wskazano na problem z oznaczaniem nanocząstek srebra o rozmiarach mniejszych niż LOD _{size} , które stanowiły ~ 26% AgNPs obecnych w próbce.	3	-; (-)	13	[455]
	Pojemniki do przechowywania żywności (ocena stopnia migracji Ag)/ Przeprowadzono analizę specyficzną srebra w roztworach symulujących żywność (woda Milli-Q; 3% kwas octowy; 10 lub 90% etanol) przechowywanych w pojemnikach impregnowanych AgNPs. Badania przeprowadzono w temperaturze 20 - 70°C przy czasie ekspozycji ≤ 10 dni. Zaobserwowano uwalnianie Ag głównie w formie jonowej. Technika sp ICP MS oznaczono AgNPs o rozmiarach 18 -30 nm, które stanowiły 0,1 – 8,6% całkowitego srebra uwolnionego z pojemników.	10	≤ 10; (-)	20	[441]

Wody wodociągowe, powierzchniowe oraz ścieki	Woda wodociągowa/ Technika sp ICP MS oznaczono również cząstki zawierające Pb, Fe, Sn, Cu oraz Ti. Zaobserwowano występowanie zniekształceń linii podstawowej w przypadku oznaczania cząstek zawierających Cu (związanych z oddziaływaniem kompleksów miedzi z powierzchnią systemu wprowadzającego próbkę). Wprowadzano próbkę pomijając autosampler oraz pompę perystaltyczną.	10	-; (2)	13	[443]
	Woda pochodzenia naturalnego (potok Clear Creek); układy modelowe: woda dejonizowana, umiarkowanie twarda oraz wodociągowa/ Zbadano wpływ Cl ⁻ , S ²⁻ oraz rozpuszczonego węgla organicznego (DOC) na stabilność/rozpuszczalność 60 oraz 100 nm AgNPs stabilizowanych cytrynianem, kwasem taninowym lub PVP (< 24 h; 1 tydzień). Rozmiary AgNPs potwierdzono techniką AF4-ICP MS. Autorzy podkreślili użyteczność techniki w badaniach kinetyki rozpuszczania AgNPs w różnych warunkach. Technika umożliwiła jednocześnie oznaczenie frakcji jonowej oraz określenie spadku rozmiarów AgNPs.	10	2 – 5; (-)	25-30	[437]
	Woda z oczyszczalni ścieków, rzeki Isar i jezior prealpejskich (Niemcy)/ Do 40 mL nieprzefiltrowanej wody dodano 1 mL nasyconego roztworu EDTA, 400 μL 1 mol L ⁻¹ octanu sodu, 100 μL 1,25 mol L ⁻¹ kwasu octowego oraz 1 mL 10% (w/w) Tritonu X-114. Mieszaninę inkubowano w 40°C przez 30 min, a następnie wirowano przez 12 min z prędkością 5000 obr./min. Próbkę chłodzono w łaźni lodowej przez 3 min. Supernatant zdekantowano, a pozostałą fazę bogatą w środek powierzchniowo czynny, zawierającą AgNPs rozcieńczono w 500 μL etanolu i 9 mL wody. Dzięki zastosowaniu techniki CPE uzyskano granicę wykrywalności AgNPs wynoszącą 2 ng L ⁻¹ .	3	-; (1/2)	14	[173]
	Ścieki (oczyszczalnia ścieków miasta Peterborough) oraz woda rzeczna (Otonabee River)/ Zastosowano metodę rozcieńczeń izotopowych (dodatek ¹⁰⁹ Ag), zbadano zmianę rozmiarów AgNPs w środowisku wodnym w czasie przechowywania w różnych warunkach (temperatura, pH).	5	-; (2)	40	[452]
	Ścieki komunalne/ Zbadano efektywność jonizacji AgNPs, wpływ fosforanów, zakwaszania oraz filtracji na odzysk NPs. Obecność 2 mmol L ⁻¹ buforu fosforanowego prowadziła do spadku odzysków AgNPs i Ag ⁺ odpowiednio o 40 i 20%.	20	< 10; (-)	40	[453]
<p>*Wyznaczenie η_{neb}: na podstawie</p> <p>(1) materiału odniesienia o zdefiniowanym rozmiarze NPs,</p> <p>(2) materiału odniesienia o znanej liczbie NPs,</p> <p>(3) różnicy pomiędzy całkowitą objętością próbki wprowadzonej do spektrometru ICP MS a objętością, która nie została dostarczona do strumienia plazmy (metoda wagowa),</p> <p>(-) brak danych.</p>					

4.2. Oznaczanie TiO₂NPs techniką sp ICP MS

Podczas oznaczania Ti techniką sp ICP MS istotny jest wybór mierzonego izotopu. Czulość oznaczania danego izotopu zależy od jego naturalnej zawartości w przyrodzie, lecz przy wyborze należy również zwrócić uwagę na potencjalne interferencje pochodzące z matrycy badanej próbki, odczynników użytych do jej przygotowania, gazu nośnego oraz gazów reakcyjnych. Oznaczanie najbardziej rozpowszechnionego izotopu tytanu ⁴⁸Ti (73,72%) obarczone jest licznymi interferencjami izobarycznymi i wieloatomowymi (Tab. 15) co w przypadku, gdy stosowane są spektrometry wyposażone w pojedynczy kwadrupol powoduje błędne wyniki analiz. Stwarza to konieczność wyizolowania analitu lub wybrania do pomiaru innego izotopu, np. ⁴⁹Ti o rozpowszechnieniu 5,41% [456] lub ⁴⁷Ti o rozpowszechnieniu 7,44% [350].

Tabela 15. Wybrane przykłady interferencji izobarycznych oraz wieloatomowych występujące podczas oznaczania różnych izotopów tytanu techniką ICP MS [457]

Izotop	Rozpowszechnienie izotopu [%]	Interferencje izobaryczne	Interferencje wieloatomowe
⁴⁶ Ti ⁺	8,25	⁴⁶ Ca ⁺ (0,004 ^a)	³² S ¹⁴ N ⁺ , ¹⁵ N ₂ ¹⁶ O ⁺ , ¹⁴ N ¹⁶ O ₂ ⁺
⁴⁷ Ti ⁺	7,44	-	¹² C ³⁵ Cl ⁺ , ³⁰ Si ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ³¹ P ¹⁶ O ⁺ , ³² S ¹⁴ N ¹ H ⁺ , ³² S ¹⁵ N ⁺ , ³³ S ¹⁴ N ⁺ , ¹⁴ N ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ¹⁵ N ¹⁶ O ₂ ⁺
⁴⁸ Ti ⁺	73,72	⁴⁸ Ca ⁺ (0,187 ^a)	¹² C ₄ ⁺ , ³⁴ S ¹⁴ N ⁺ , ³³ S ¹⁵ N ⁺ , ³² S ¹⁶ O ⁺ , ¹⁴ N ¹⁷ O ₂ ⁺ , ¹⁴ N ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺ , ³⁶ Ar ¹² C ⁺
⁴⁹ Ti ⁺	5,41	-	¹² C ³⁷ Cl ⁺ , ³² S ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ³² S ¹⁷ O ⁺ , ³³ S ¹⁶ O ⁺ , ³⁴ S ¹⁵ N ⁺ , ¹⁴ N ¹⁷ O ₂ ¹ H ⁺ , ³⁵ Cl ¹⁴ N ⁺ , ³⁶ Ar ¹³ C ⁺ , ³¹ P ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ³¹ P ¹⁸ O ⁺ , ³⁶ Ar ¹² C ¹ H ⁺ ,
⁵⁰ Ti ⁺	5,18	⁵⁰ Cr ⁺ (4,345 ^a), ⁵⁰ V ⁺ (0,25 ^a)	³⁵ Cl ¹⁵ N ⁺ , ³⁵ Cl ¹⁴ N ¹ H ⁺ , ³⁶ S ¹⁴ N ⁺ , ³⁴ S ¹⁵ N ¹ H ⁺ , ³⁴ S ¹⁶ O ⁺ , ³³ S ¹⁷ O ⁺ , ³² S ¹⁸ O ⁺ , ³² S ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁴ N ⁺

^a rozpowszechnienie izotopu [%] powodującego interferencje izobaryczne

Do najważniejszych parametrów charakteryzujących spektrometr ICP MS można zaliczyć zdolność rozdzielczą (R). Eliminację licznych interferencji wieloatomowych umożliwia pomiar w trybie średniej rozdzielczości (R ~ 4000), nie rozwiązuje to natomiast problemu interferencji izobarycznych występujących w obecności ⁴⁸Ca. Oddzielenie sygnału izotopu ⁴⁸Ti (m/z = 47,948) od ⁴⁸Ca (m/z = 47,953) wymaga rozdzielczości na poziomie ok. 9590 [458], której nie zapewnia stosowanie spektrometrów ICP MS wyposażonych w pojedynczy kwadrupol (R < 400). Efektywną eliminację wpływu matrycy można uzyskać

stosując spektrometry o wyższej zdolności rozdzielczej, np. wyposażony w analizator czasu przelotu (ICP-TOF MS), sektorowy z podwójnym ogniskowaniem (DF SF ICP MS) lub wielodetektorowy (MC ICP MS) [459]. Na szczególną uwagę w kontekście eliminacji interferencji wieloatomowych oraz izobarycznych zasługuje tandemowy spektrometr mas typu potrójnego kwadrupola z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ICP QQQ). Użycie potrójnego kwadrupola (QQQ) składającego się z 2 analizatorów mas rozdzielonych komorą kolizyjno-reakcyjną pozwala na efektywne usunięcie interferujących jonów podwójnie naładowanych oraz wieloatomowych posiadających tę samą wartość stosunku m/z co oznaczany jon, umożliwiając tym samym prowadzenie oznaczeń ^{48}Ti .

W spektrometrze ICP QQQ przez pierwszy analizator mas (Q1) przepuszczane są jony o określonym stosunku m/z (badany analit i interferenty). Następnie w komorze zderzeniowo-reakcyjnej dochodzi do oddziaływania gazu reakcyjnego (np. NH_3 , NH_3/H_2 , O_2) z interferującymi jonami, a ich produkty nie przechodzą przez drugi kwadrupol (Q2) filtrujący jony o tym samym stosunku m/z co Q1. Można również przeprowadzić selektywną reakcję wybranego gazu z analitem w komorze kolizyjno-reakcyjnej. Następnie ustawić dla Q2 wartość m/z odpowiadającą produktowi tej reakcji, np. jonowi $^{48}\text{Ti}({}^{14}\text{N}_1\text{H}_3)_3({}^{14}\text{N}_1\text{H})^+$ lub $[{}^{48}\text{Ti}({}^{14}\text{N}_1\text{H})]^+$ w przypadku zastosowania NH_3 [258,458]. Ze względu na korozyjny charakter amoniaku, w celu zminimalizowania ryzyka uszkodzenia aparatury rekomendowane jest stosowanie dodatku gazu ochronnego (np. He , H_2), którego obecność może jednak obniżyć czułość oznaczenia.

Podczas oznaczania TiO_2NPs techniką sp ICP MS występują również inne trudności. Nanocząstki TiO_2 przeważnie posiadają niesferyczną geometrię cząstek, trudno ulegają jonizacji [429], wykazują silną tendencję do agregacji, a udział masy Ti w cząstce TiO_2 wynosi jedynie 59,93%, co łącznie przekłada się na niską czułość ich oznaczania techniką sp ICP MS. Trudność stanowi również brak materiałów odniesienia o dobrze zdefiniowanych rozmiarach TiO_2NPs , gdyż dostępne materiały zwykle charakteryzują się porowatą strukturą oraz wysoką polidispersyjnością. Jako przykład komercyjnie dostępnego materiału odniesienia, przy użyciu którego występują powyższe trudności można wyróżnić SRM 1898 produkowany przez NIST.

Ze względu na powyższe problemy w literaturze znajduje się jedynie kilkanaście prac poświęconych tego typu analizie. W tabeli 16 przedstawiono przykłady oznaczania nanocząstek tlenku tytanu(IV) w różnego typu matrycach z uwzględnieniem wybranego izotopu tytanu, zadanego czasu pomiaru (t_{pom}) oraz sposobu wyznaczania efektywności wprowadzania próbki do strumienia plazmy (η_{neb}). Do wyznaczania η_{neb} najczęściej

stosowano wzorce nanocząstek złota (AuNPs) o dobrze scharakteryzowanym rozmiarze oraz znanej liczbie NPs (odpowiednio metoda (1) i (2) w tabeli 16). Wartości η_{neb} mieściły się w przedziale: 1,0 – 8,5%. Występowanie licznych problemów analitycznych towarzyszących oznaczaniu TiO₂NPs techniką sp ICP MS przełożyło się na dużo szerszą rozpiętość uzyskanych wartości LOD_{size} w porównaniu do analogicznego zestawienia sporządzonego dla AgNPs (Tab. 14). Granice wykrywalności rozmiaru cząstek TiO₂ mieściły się w przedziale 10 – 173 nm w zależności od badanego układu i zastosowanego podejścia analitycznego (Tab. 16).

W przypadku próbek wzbogaconych w wapń (na poziomie $\leq 100 \text{ mg L}^{-1}$) najniższe wartości LOD_{size} uzyskano stosując wysokorozdzielczy spektrometr DF SF ICP MS (10 - 42 nm). Użycie do oznaczenia nanocząstek tlenku tytanu(IV) układu ICP QQQ wykorzystującego komorę reakcyjną z amoniakiem w tych samych układach modelowych charakteryzowało się dużo niższą efektywnością usuwania interferencji izobarycznych pochodzących od Ca, czego konsekwencją były kilkukrotnie wyższe wartości LOD_{size} (64 - 101 nm) [458].

Do tej pory technikę sp ICP MS najczęściej stosowano do oznaczania nanocząstek TiO₂ w wodach powierzchniowych, wodociągowych i rekreacyjnych oraz w ściekach, w których przewidywany poziom stężeń TiO₂NPs mieści się w przedziale od kilku ng L^{-1} do kilkudziesięciu $\mu\text{g L}^{-1}$. Granice wykrywalności tytanu wyznaczone dla wody rzecznej wzbogaconej w TiO₂NPs w formie anatazu i rutylu wyniosły odpowiednio 0,058 i 3,69 ng L^{-1} [350]. Przygotowanie próbek wód oraz ścieków do analizy ogranicza się najczęściej do ich filtracji. Obiektami wymagającymi bardziej skomplikowanej procedury przygotowania próbek (np. ekstrakcji) są produkty spożywcze oraz kosmetyki, np. kremy przeciwsłoneczne, charakteryzujące się dużą zawartością tłuszczu. Ważny jest zatem dobór odpowiedniej metody przygotowania próbki, który należy dostosować do rodzaju informacji jakie chcemy uzyskać. Należy również pamiętać, że etap ekstrakcji oraz homogenizacji może wpływać na zmianę rozmiaru cząstek obecnych w próbce. W produktach kosmetycznych i żywności rozkład wielkości cząstek tlenku tytanu(IV) wyznaczony techniką sp ICP MS mieścił się w przedziale 30 - 300 nm, z czego 10 - 40% całkowitej ilości badanych cząstek miało rozmiary $< 100 \text{ nm}$ [302].

Istotny problem w badaniach środowiskowych stanowi odróżnienie TiO₂NPs pochodzenia antropogenicznego od naturalnego tła biogeochemicznego. Informacje takie są ważne w monitoringu środowiska. Badania dotyczące określenia udziału TiO₂NPs pochodzących z kosmetyków przeciwsłonecznych były prowadzone w obrębie rekreacyjnych

zbiorników wodnych (rzek Clear Creek [456] i Salt River oraz basenów na terenie USA) w sezonie letnim. W wodach z pięciu basenów stężenie liczbowe nanocząstek TiO_2 mieściło się w przedziale $2,8 \cdot 10^6 - 4,4 \cdot 10^6 \text{ L}^{-1}$ i było o rząd wielkości niższe niż zawartość oznaczona w rzece Salt River. Stwierdzono również 80% wzrost zawartości cząstek zawierających tytan w porównaniu do tła biogeochemicznego w okresie szczytowej aktywności rekreacyjnej. Największe wykryte stężenie masowe cząstek tlenku tytanu(IV) wyniosło 659 ng L^{-1} .

Interesującym podejściem prowadzącym do poprawy wiarygodności określania stężenia liczbowego NPs jest zastosowanie nanocząstek tlenku ceru(IV) (CeO_2NPs) jako wzorca wewnętrznego. CeO_2NPs posiadają podobny potencjał Zeta oraz budowę do TiO_2NPs , co sprawia, że ich zachowanie w spektrometrze ICP MS podczas wprowadzenia próbki do strumienia plazmy jest bardzo podobne [302]. Innym testowanym podejściem było wykorzystanie metody dodatku wzorca TiO_2NPs o rozmiarze 40 nm do kosmetyków przeciwsłonecznych, w których wykryto nanocząstki tlenku tytanu(IV) o rozmiarach 32 - 40 nm [460]. Otrzymane wyniki w połowie przypadków były niższe niż zawartości deklarowane przez producenta oraz oznaczone w zmineralizowanych próbkach. Powyższe obserwacje tłumaczono różnicami w geometrii i budowie krystalicznej między nanocząstkami dodanymi a obecnymi w badanej próbce.

Podsumowując, oznaczanie TiO_2NPs techniką sp ICP MS wiąże się z występowaniem wielu problemów analitycznych. Do najważniejszych można zaliczyć: występowanie licznych interferencji wieloatomowych i izobarycznych oraz brak materiałów odniesienia zawierających TiO_2NPs o dobrze scharakteryzowanym rozmiarze cząstek. Problem stanowią również właściwości fizykochemiczne nanocząstek tlenku tytanu(IV), takie jak niesferyczna geometria cząstek, skłonność do agregacji oraz wysoka energia jonizacji.

Tabela 16. Analiza TiO_2 NPs techniką sp ICP MS

Rodzaj próbki/ dodatkowe uwagi, przygotowanie próbki	Wybrany izotop	t_{pom} [ms]	η_{neb} [%]; *sposób wyznaczania η_{neb} ; zastosowane wzorce oraz ich stężenia masowe	LOD _{size} [nm]	Lit.
Tkanki miękkie małż (<i>Mytilus galloprovincialis</i> , <i>Cerasto dermaedule</i> , <i>Ostrea edulis</i> , <i>Ensis ensis</i> , <i>Chlamys varia</i> , <i>Spisula solidissima</i> , <i>Ruditapes philippinarum</i> , <i>Ruditapes decussatus</i> , <i>Chlamys varia</i>)/ Granica wykrywalności opracowanej metody sp ICP MS wyniosła $5,28 \cdot 10^6$ NPs g^{-1} . Tkanki miękkie po oddzieleniu od muszli przemyto wodą. Następnie zostały poddane procesowi trawienia enzymatycznego wspomaganego ultradźwiękami z udziałem mieszaniny pankreatyny i lipazy.	^{49}Ti	0,1	1 – 5; (-); 60 nm c-AuNPs (NIST SRM 8013), 518 ng L^{-1}	24,4 – 30,4	[461]
Jelita, wątroba, skrzela oraz mózg słodkowodnej ryby danio pręgowany (<i>Danio rerio</i>) eksponowanej na działanie TiO_2 NPs (NM-104) o stężeniu 1 mg L^{-1} oraz wymienione wyżej narządy bezpośrednio wzbogacone w TiO_2 NPs/ Uzyskano niskie wartości odzysków TiO_2 NPs (na poziomie < 25%), które mogły być konsekwencjom interferencji izobarycznych pochodzącym od ^{48}Ca . Procedura przygotowania próbek obejmowała homogenizację, sonikację, trawienie enzymatyczne z udziałem proteiny K, usuwanie pozostałości matrycy biologicznej w obecności H_2O_2 oraz stabilizację NPs za pomocą SDS.	^{48}Ti	3	-; (1/2); 60 nm c-AuNPs (NIST SRM 8013), 50 ng L^{-1}	100	[373]
Mysie komórki nerwiaka niedojrzałego / Zbadano pobieranie TiO_2 NPs o rozmiarach 7 i 20 nm przez komórki nerwiaka. W tym celu wykorzystano LA-ICP MS do bezpośredniej analizy komórek oraz ICP MS i sp ICP MS do oznaczenia zawartości tytanu w lizatach komórkowych. Lizę przeprowadzono w 0,1% Tritonie X-100. Analiza lizatów techniką sp ICP MS wykazała formowanie się aglomeratów nanocząstek we wnętrzu komórek. Akumulacja NPs była w dużym stopniu uzależniona od rozmiarów TiO_2 NPs.	^{48}Ti	3	3,9 - 4,5; (-); 60 nm c-AuNPs (NIST SRM 8013), 100 ng L^{-1}	69	[444]
Tusze do tatuażu / Dokonano charakterystyki nano- oraz mikrocząstek zawierających Cu, Al oraz Ti przy użyciu technik: TEM, DLS, sp ICP MS, AF4-MALS oraz off-line ICP MS. Przygotowanie próbki do analizy sp ICP MS ograniczało się do jej rozcieńczenia.	^{47}Ti	5	-; (3); -, -	-	[462]
Tekstylna (podkładki na stół, chusteczki nawilżane, ściereczki z mikrofibry, body niemowlęce) / Badania wykazały, że z syntetycznych włókien do 80% uwalnianego tytanu występuje w formie cząstek o rozmiarach 27-200 nm. Natomiast w przypadku naturalnych włókien uwalniana jest niewielka ilość nanocząstek zawierających tytan lub nie obserwuje się takiego zjawiska. Próbkę umieszczono w pojemniku wypełnionym wodą milli-Q. Układ poddano sonikacji i 24-godzinnemu wytrząsaniu. Otrzymany ekstrakt przed analizą rozcieńczono. W celu stabilizacji uwolnionych cząstek zawierających Ti zastosowano dodatek Tritonu X-100 (do końcowego stężenia ok. 0,0001%).	^{48}Ti	0,1	6,5 - 7,5; (2); 60 nm AuNPs, -	27 - 33	[463]
Kremy przeciwsłoneczne / Przy wyznaczaniu η_{neb} wzorce AuNPs rozcieńczono dodając rozcieńczoną próbkę kremu przeciwsłonecznego (uwzględnienie matrycy próbki); zastosowano dodatek 40 nm	^{48}Ti	0,1	6,87; (2);	27 - 29	[460]

TiO ₂ NPs. Próbkę kremów po wstępnej homogenizacji zostały zawieszony w 1% Tritonie X-100. Otrzymane roztwory w celu uzyskania homogenicznych mieszanin poddano działaniu ultradźwięków oraz wirowania. Następnie dokonano odpowiedniego rozcieńczenia roztworów wodą Milli-Q.				50, 80 i 100 nm c-AuNPs (NanoComposix), (^a) odpowiednio ok. 69, 282 i 550 ng L ⁻¹						
E171, żywność (ciastka, cukierki, guma do żucia) oraz produkty do pielęgnacji ciała (pasty do zębów) / Scharakteryzowano TiO ₂ NPs w szerokiej gamie produktów (7 barwników E171, 24 produkty spożywcze oraz 3 środki do pielęgnacji ciała) za pomocą SEM, AF4-ICP MS oraz sp ICP MS. Rozkład matrycy organicznej uzyskano poprzez podgrzewanie próbki z H ₂ O ₂ . Do stabilizacji TiO ₂ NPs zastosowano albuminę surowicy bydlęcej.		⁴⁸ Ti	3,0	-; (2); 60 nm c-AuNPs (NIST SRM 8013), 50 ng L ⁻¹	20 - 50	[285]				
Produkty cukiernicze (guma do żucia) / Zbadano wpływ różnych gazów kolizyjnych/reakcyjnych (He, O ₂ , NH ₃) na przebieg oznaczenia TiO ₂ NPs; zastosowanie pojedynczego oraz potrójnego kwadrupola i pojedynczego kwadrupola z KED (gaz kolizyjny He); użycie wzorca wewnętrznego - CeO ₂ NPs (pomiar sekwencyjny). Przygotowanie próbki obejmowało ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami (w wodzie Milli-Q) i rozcieńczenie otrzymanych ekstraktów.		⁴⁸ Ti	10,0	5,8; (2); 30 nm c-AuNPs (NIST SRM 8012), 10 ng L ⁻¹	26	[258]				
Woda rzeczna (Verde River, Salt River) i wodociągowa; ścieki komunalne / Określono LOD _{size} dla 40 pierwiastków. Porównano wartości LOD _{size} dla TiO ₂ NPs w wodzie dejonizowanej z granicami uzyskanymi w wodach naturalnych oraz wodociągowych (91 vs. 130 ± 28 nm). Przygotowanie próbek ograniczało się do ich przefiltrowania (średnica porów filtra 0,7 μm).		⁴⁷ Ti, ⁴⁹ Ti	10,0	1,5 - 2,1; (1); 100 nm c-AuNPs (BBI), -	130 ± 28	[464, 465]				
Woda rzeczna (Missouri) wzbogacona w TiO₂NPs, woda na różnych etapach procesu uzdatniania / Modelowy system uzdatniania wody - ocena stopnia eliminacji TiO ₂ NPs/Ti na różnych etapach uzdatniania. Przygotowanie próbki do analizy sp ICP MS ograniczało się do jej rozcieńczenia (w przypadku, gdy było ono wymagane).		⁴⁷ Ti	0,1	7,5 - 8,5; (-); c-AgNPs, c-AuNPs (NanoComposix), -	65 - 70	[466]				
Woda rzeczna (Salt River)	/ Oznaczanie zmian zawartości TiO ₂ w wodach rekreacyjnych związanych z emisją antropogeniczną z równoczesnym monitorowaniem poziomu oksobenzonu. Próbkę wody przed oznaczeniem przefiltrowano.	⁴⁹ Ti	10,0	-; (2); 60 nm c-AuNPs (NIST SRM 8013), 50 ng L ⁻¹	148 ± 3	[303]				
Baseny rekreacyjne					173 ± 15					
Woda rzeczna (Clear Creek)					⁴⁹ Ti		3,0	~ 5; (-); 60 nm AuNPs (BBI), -	79	[456]
					⁴⁸ Ti			-; (-); 60 nm AuNPs (BBI), -	42	
Woda o dużej zawartości Ca (do 100 mg L⁻¹) – układy modelowe / Badanie wpływu wapnia na przebieg oznaczenia TiO ₂ NPs, zastosowanie dekonwolucji matematycznej opracowanej przez Cornelisa i Hassellöva [429]; uwzględnienie w rozważaniach matematycznych elipsoidalnego kształtu TiO ₂ NPs.		⁴⁸ Ti	3,0	7; (1); 60 nm c-AuNPs (BBI), (^a) 309 ng L ⁻¹	64 - 101	[458]				
	5,0		1; (1); 60 nm c-AuNPs (BBI), (^a) 309 ng L ⁻¹	10 - 43						

Woda rzeczna (Sawa) wzbogacona w TiO₂NPs/Ti(IV) / Woda wzbogacona w: Anataz (<25 nm, geometria sferyczna); Rutyl (< 100 nm, nanopłyty 10 x 40 nm, 5 wt% SiO ₂), wzorzec Ti(IV). Przygotowanie próbki do analizy sp ICP MS ograniczało się do jej rozcieńczenia.		⁴⁷ Ti	10,0	4,7 - 5,5; (1); 20 i 40 nm c-AgNPs (Sigma-Aldrich), 30 nm c-AuNPs (NIST SRM 8012), -	55	[350]
		⁴⁸ Ti			37	
Osady ściekowe / Do frakcjonowania chemicznego zastosowano modyfikowaną metodę ekstrakcji sekwencyjnej BCR. Wyodrębniono następujące frakcje: <ol style="list-style-type: none"> wymienną - łatwo rozpuszczalną w środowisku kwasowym (ekstrakcja 0,11 mol L⁻¹ kwasem octowym), redukowalną (ekstrakcja 0,5 mol L⁻¹ chlorkiem hydroksyloamonu zakwaszonym HNO₃ do pH 1,5), utleniającą (ogrzewanie w temp. 85°C w obecności 8,8 mol L⁻¹ H₂O₂, ekstrakcja 1 mol L⁻¹ octanem amonu zakwaszonym HNO₃ do pH 2,0), rezydualną. Technika sp ICP MS oznaczono nanocząstki tytanu, żelaza oraz cynku. Średnie stężenie liczbowe nanocząstek tytanu wyniosło 1,51·10 ⁹ NPs/g suchej masy osadu.		⁴⁷ Ti	0,1	-; (-), 30 i 60 nm c-AuNPs (NIST SRM 8012 i 8013), -	15 – 20	[467]
Ścieki komunalne	/ zastosowanie do obliczeń arkusza kalkulacyjnego opracowanego przez Holenderski Państwowy Instytut Kontroli Jakości Produktów Rolnych (ang. <i>Netherlands State Institute for Quality Control of Agricultural Products</i> , RIKILT). Próbki ścieków wpływających do oczyszczalni oraz obecnych w zbiorniku napowietrzającym poddano procesowi sedymentacji (6 h). Przeprowadzono następnie mineralizację ciśnieniową wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym otrzymanych osadów (1 g próbki w 7 mL 65% HNO ₃ i 1 mL 30% H ₂ O ₂). Mineralizaty po ochłodzeniu przefiltrowano (średnica porów filtra 0,22 μm). Otrzymane w ten sposób filtry poddano procesowi sonikacji, rozcieńczono i dokonano oznaczenia TiO ₂ NPs techniką sp ICP MS.	⁴⁷ Ti	3,0	-; (1/2); Rutyl (<100 nm TiO ₂ NPs), -	-	[468]
Osady ściekowe			10,0			
*Wyznaczenie η_{neb} : na podstawie <ol style="list-style-type: none"> materiału odniesienia o zdefiniowanym rozmiarze NPs, materiału odniesienia o znanej liczbie NPs, różnicy pomiędzy całkowitą objętością próbki wprowadzonej do spektrometru ICP MS a objętością, która nie została dostarczona do strumienia plazmy (metoda wagowa), brak danych, ^(a) stężenia masowe obliczone na podstawie stężeń liczbowych NPs.						

Cel pracy

Celem niniejszej rozprawy jest opracowanie metod badania nanocząstek srebra oraz tlenku tytanu(IV) techniką sp ICP MS w próbkach środowiskowych i biologicznych. Wybrane do badania NPs reprezentują odpowiednio nanocząstki metali oraz tlenków metali. Różnice we właściwościach fizykochemicznych obu analitów przekładają się na ich reaktywność w środowisku, toksyczność oraz różnorodność problemów analitycznych towarzyszących ich oznaczeniu techniką sp ICP MS. W rozprawie, ze względu na wyższą toksyczność, szczególna uwaga została poświęcona analizie specjacyjnej srebra. Należy zaznaczyć, że jest to nowe podejście do analizy specjacyjnej metali, które nie ogranicza się tylko do charakteryzowania związków nieorganicznych, kompleksów organicznych, struktur metaloorganicznych i kompleksów z makrocząsteczkami oraz określenia stopnia utlenienia i składu izotopowego [469,470]. W tym przypadku termin „analiza specjacyjna” stosujemy do określenia form fizykochemicznych metalu występujących w próbkach (forma jonowa, nanocząstki) oraz wyznaczenia rozmiarów i dystrybucji nanocząstek zawierających dany metal. Problemy występujące podczas tego typu analizy zależą w dużym stopniu od właściwości fizykochemicznych metalu, informacji jakie chcemy uzyskać oraz zastosowanego podejścia analitycznego. W pracy szczególny nacisk zostanie położony na opracowanie ilościowych metod umożliwiających jednoczesne oznaczenie Ag^+/AgNPs oraz analizę TiO_2NPs o różnych rozmiarach cząstek w próbkach biologicznych i środowiskowych. W celu zapewnienia wiarygodnych wyników pomiarów przeprowadzona zostanie optymalizacja procedur pod kątem wyeliminowania różnego rodzaju źródeł błędów systematycznych. Procedury zostaną również scharakteryzowane pod kątem metrologicznym.

Do problemów analitycznych występujących podczas analizy srebra w formie jonowej oraz NPs można zaliczyć straty analitu związane z jego adsorpcją na powierzchniach naczyń laboratoryjnych i systemu wprowadzającego próbkę oraz zmniejszeniem stabilności zawiesin NPs wynikającym z zastosowania dużych rozcieńczeń. Problem adsorpcji jonów Ag^+ jest zwykle eliminowany poprzez zakwaszenie roztworu, lecz rozwiązanie to nie może być stosowane w analizie specjacyjnej srebra ze względu na rozpuszczanie AgNPs . W pracy podjęto próbę rozwiązania tego problemu poprzez dobór substancji chemicznej zmniejszającej efekt adsorpcji analitu, poprawiającej stabilność NPs oraz zapobiegającej zmianom form specjacyjnych srebra.

Kolejnym celem badań jest opracowanie metody sp ICP MS umożliwiającej badanie transformacji obu form srebra (Ag^+ i AgNPs) w wodach powierzchniowych. Informacje dotyczące formy specjacyjnej Ag obecnej w środowisku wodnym mają istotne znaczenie ze względu na ich różne oddziaływanie na organizmy żywe (np. glony), w tym również działanie toksyczne. Jako modelowe organizmy wodne wybrano glony z gromady zielenic *Desmodesmus subspicatus*. Srebro w układzie glony – wody powierzchniowe może ulegać biosorpcji na powierzchni komórek glonów lub zostać pobrane przez mikroorganizmy do wnętrza komórek. Ocena stopnia biosorpcji oraz określenie udziału różnych form srebra w próbkach biologicznych na poziomach występujących w środowisku wymaga opracowania wiarygodnych narzędzi analitycznych. Kolejnym celem badań jest opracowanie metody analizy specjacyjnej srebra w komórkach glonów *D. subspicatus*. Istotnym problemem towarzyszącym tego typu badaniom są zmiany formy specjacyjnej podczas etapu przygotowania materiału roślinnego do badań. Dodatkowo ilościowe oznaczenie różnych form srebra w glonach może wymagać optymalizacji procedury ekstrakcji Ag lub rozkładu matrycy próbki. Opracowane metody analityczne powinny umożliwić zbadanie biosorpcji Ag przez organizmy modelowe oraz transformacji Ag^+/AgNPs w otaczającym je medium.

Nanocząstki tlenku tytanu(IV) mogą przedostawać się do gleb ze źródeł antropogenicznych (np. ze składowisk odpadów, nawozów) skąd mogą być pobierane przez rośliny. Obecność tych indywiduów może mieć negatywny wpływ na przebieg procesów fizjologicznych zachodzących w roślinach (np. fotosyntezy). Dodatkowo zakumulowane w organizmach roślinnych nanocząstki tlenku tytanu(IV) mogą w formie niezmienionej wędrować wzdłuż łańcucha troficznego. Celem drugiej części pracy jest zbadanie użyteczności techniki sp ICP MS do oznaczenia nanocząstek tlenku tytanu(IV) (TiO_2NPs) w roślinach. W badaniach jako roślina modelowa zostanie użyty groch zwyczajny (*Pisum sativum L.*). Oznaczanie TiO_2NPs w próbkach środowiskowych techniką sp ICP MS obarczone jest licznymi interferencjami wieloatomowymi oraz izobarycznymi. W badaniach podjęta zostanie próba eliminacji interferencji przy użyciu potrójnego kwadrupola oraz pomiarze mniej rozpowszechnionych izotopów tytanu (^{47}Ti lub ^{49}Ti). Zoptymalizowana zostanie procedura przygotowania materiału roślinnego do analizy sp ICP MS. Opracowana metoda posłuży do określenia biodystrybucji tytanu w różnych częściach roślin.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

5. Aparatura, sprzęt laboratoryjny, odczynniki, roztwory, terminologia stosowana w pracy oraz parametry pomiarowe

5.1. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- Tandemowy spektrometr mas typu potrójnego kwadrupola z plazmą indukcyjnie sprzężoną Agilent 8800 ICP QQQ wyposażony w automatyczny podajnik próbek (Autosampler SPS4) (Agilent Technologies, Singapur), oprogramowanie MassHunter 4.5;
- wysokorozdzielczy spektrometr absorpcji atomowej ContrAA 700 z elektrotermicznym atomizerem, detektorem CCD, wysokociśnieniową ksenonową lampą łukową oraz automatycznym podajnikiem próbek AS 52 S (Analytik Jena, Niemcy);
- analizator wielkości cząstek, potencjału zeta oraz masy cząsteczkowej Zetasizer Nano ZS model ZEN 3600 wyposażony w 4 mW laser helowo-neonowy (długość fali 633 nm), zakres wielkości cząstek 0,6 nm – 6 µm (Malvern Instruments, UK);
- transmisyjny mikroskop elektronowy Tecnai G2 T20 X-TWIN, napięcie przyśpieszające 200 kV, źródło elektronów LaB₆ (FEI, USA);
- spektrofotometr UV-Vis U-3900H (Hitachi, Japonia);
- waga analityczna model AS 220.R2 (RADWAG, Polska);
- waga analityczna model AS 60/220/C/2 (RADWAG, Polska);
- bramka antystatyczna model 11107767 (Mettler-Toledo GmbH Waagen, Niemcy);
- urządzenie do demineralizacji wody Direct – Q 3 (Merck Millipore, Niemcy);
- mikroprocesorowy dezintegrator ultradźwiękowy z automatycznym strojeniem VCX 500 (Sonics, USA);
- liofilizator Alpha 1–2 LDplus z podwójną komorą (Martin Christ, Niemcy);
- młynek kulowy TissueLyser LT (Qiagen, Niemcy);
- łąźnia ultradźwiękowa 120/240 W (Bandelin Sonorex, Niemcy);
- wirówki laboratoryjne MPW-250 i MPW-350 (MPW MED. INSTRUMENTS, Polska);
- miernik pH inoLab pH Level 1 (WTW, Niemcy):
 - elektroda szklana SenTix 21 (WTW, Niemcy);
- system do mineralizacji ciśnieniowej wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym ETHOS PLUS (Milestone, Włochy) oraz MARS 6 (CEM, USA),
- płyta grzewcza (Electro-Line, Polska);
- zestaw do filtracji próżniowej:
 - lejek szklany 300 mL, kłamra aluminiowa, kolba Büchnera 1000 mL, kolba zabezpieczająca 1000 mL, zestaw gumowych węży, pompka wodna,
 - nylonowe filtry membranowe, rozmiar porów 0,22 µm, średnica 47 mm, Yeti Membrane Filters (INFOCHROMA AG, Szwajcaria);

- mikropipety o pojemności: 1-10 μL , 10-100 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL , 500-5000 μL (Eppendorf, Niemcy);
- kolby Erlenmeyera ze szkła borokrzemowego o pojemności 250 mL (Simax, Czechy);
- tygle kwarcowe z pokrywkami,
- naczynka polipropylenowe (PP), polistyrenowe (PS) oraz polietylenowe (PE).

5.2. Odczynniki

Wzorce:

- Roztwór do strojenia ICP MS (zawierający Ce, Co, Li, Mg, Tl oraz Y), 0,01 mg mL^{-1} w 2% HNO_3 (Agilent Technologies, USA);
- Wzorzec złota do ICP MS, $999 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$ (w 5% HCl), TraceCERT® (Sigma-Aldrich, Szwajcaria);
- wzorzec srebra do ICP MS, $1000 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$ (w 2% HNO_3), TraceCERT® (Sigma-Aldrich, Szwajcaria);
- wzorzec indu do ICP MS, 1000 mg L^{-1} , $\text{In}(\text{NO}_3)_3$ w 2-3% HNO_3 (Merck, Niemcy);
- wzorzec rodu do ICP MS, 1000 mg L^{-1} , $\text{Rh}(\text{NO}_3)_3$ w 2-3% HNO_3 (Merck, Niemcy);
- wzorzec tytanu do ICP MS, $1000 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$ w 2% HNO_3 , TraceCERT® (Sigma-Aldrich, Szwajcaria);
- wzorzec wapnia do ICP MS, 1000 mg L^{-1} , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ w 0,5 mol L^{-1} HNO_3 (Merck, Niemcy);
- wzorzec platyny, $1000 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$, w 10% (v/v) HCl (Inorganic Ventures, USA).

Nanocząstki złota, srebra oraz tlenku tytanu(IV):

- nanocząstki złota o rozmiarach $60 \pm 3 \text{ nm}$ stabilizowane cytrynianem sodu, zawieszony w wodzie Milli-Q, $31,92 \pm 0,57 \text{ mg mL}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, USA);
- nanocząstki srebra o rozmiarach: $29 \pm 3 \text{ nm}$, $42 \pm 5 \text{ nm}$, $58 \pm 8 \text{ nm}$ stabilizowane PVP, zawieszony w wodzie Milli-Q, $0,022 \text{ mg mL}^{-1}$ (NanoComposix, USA);
- nanocząstki srebra o rozmiarach $77 \pm 9 \text{ nm}$ stabilizowane PVP, zawieszony w wodzie Milli-Q, $0,021 \text{ mg mL}^{-1}$ (NanoComposix, USA);
- nanocząstki srebra o rozmiarach: 30 ± 3 , 39 ± 5 , 59 ± 6 oraz $80 \pm 9 \text{ nm}$ stabilizowane cytrynianem sodu, zawieszony w wodzie Milli-Q, $0,021 \text{ mg mL}^{-1}$ (NanoComposix, USA);
- tlenek tytanu(IV) o rozmiarach nanocząstek $< 100 \text{ nm}$ (99,5%), nanoproszek, odmiana polimorficzna: rutył (Sigma-Aldrich, UK);
- tlenek tytanu(IV) o rozmiarach nanocząstek $< 100 \text{ nm}$ (99,5%), nanoproszek, odmiana polimorficzna: mieszanina rutyłu i anatazu (Sigma-Aldrich, Chiny);
- tlenek tytanu (IV) o rozmiarach cząstek $< 150 \text{ nm}$ (99,5%), zawiesina wodna (40 wt. % w H_2O), odmiana polimorficzna: mieszanina rutyłu i anatazu (Sigma-Aldrich, USA);

- certyfikowany materiał odniesienia RM 8017, rozmiar nanocząstek $74,6 \pm 3,8$ nm (wyznaczony za pomocą TEM), masa Ag $2,162 \pm 0,020$ mg (NIST, USA).

Stabilizatory:

- Triton X-100 (100%) (Sigma-Aldrich, USA);
- dodecylosiarczan(VI) sodu ($\geq 99,5\%$), ultra pure (ROTH, Niemcy);
- dwuwodny cytrynian sodu ($\geq 99\%$) (Sigma-Aldrich, Belgia);
- poliwinylpirolidon o średniej masie cząsteczkowej 40 kDa (Sigma-Aldrich, Chiny);

Odczynniki do trawienia enzymatycznego próbek:

- bufor cytrynianowy pH = 4,8 (25°C), 0,09 mol L⁻¹ (Sigma-Aldrich, USA);
- roztwór buforowy (kwas cytrynianowy/wodorotlenek sodu) pH = 6,00 (20°C), Certipur® (Supelco, Merck, Niemcy);
- pektynaza wyizolowana z grzybów strzępkowych z rodzaju *Rhizopus sp.* (Macerozyme R-10), aktywność enzymatyczna: 400 - 800 U/g (Sigma-Aldrich, Japonia);

Pozostałe:

- kwas humusowy, techniczny (Sigma-Aldrich, Szwajcaria);
- nadtlenek wodoru, 30% w/w w H₂O (Sigma-Aldrich, Niemcy);
- wodorotlenek amonu (~ 25%), cz.d.a. (Sigma-Aldrich, Niemcy);
- wodorotlenek tetrametyloamoniowy, TMAH, ~ 25% w H₂O (Sigma-Aldrich, USA);
- kwas borowy (99,97%) (Sigma-Aldrich, Indie);
- kwas fluorowodorowy (47-51%), TraceSelect Fluka Honeywell - Riedel de Haen (Sigma-Aldrich, Francja);
- kwas chlorowodorowy ($\geq 37\%$), TraceSelect Fluka Honeywell - Riedel de Haen (Sigma-Aldrich, Francja);
- kwas azotowy(V) ($\geq 69\%$), TraceSelect Fluka, Honeywell - Riedel de Haen (Sigma-Aldrich, Francja);
- kwas azotowy(V) (65%), cz.d.a. (Chempur, Polska);
- kwas azotowy(V) (65%), cz.d.a. (POCH S.A., Polska);
- aceton, cz.d.a. (POCH, Polska).

5.3. Roztwory

Roztwory robocze srebra jonowego sporządzano przez odpowiednie rozcieńczenie roztworu podstawowego Ag⁺ o stężeniu 1000 mg L⁻¹. Roztwory robocze nanocząstek srebra o rozmiarach 30, 40, 60 i 80 nm stabilizowanych PVP lub cytrynianem sodu przygotowywano

przez rozcieńczenie roztworów podstawowych o nominalnych stężeniach 21 lub 22 mg L⁻¹. Certyfikowany materiał odniesienia RM 8017 zawierający PVP-AgNPs o rozmiarach 75 nm przygotowano zgodnie z instrukcją producenta. Do zliofilizowanej zawartości fiolki dodano 2 mL wody Milli-Q i dokładnie wymieszano. Wszystkie roztwory wzorcowe zawierające srebro były sporządzane metodą wagową bezpośrednio przed analizą.

Roztwory robocze złota oraz tytanu w formie jonowej uzyskano poprzez rozcieńczenie roztworów podstawowych Au³⁺ i Ti⁴⁺ o stężeniach wynoszących odpowiednio 999 oraz 1000 mg L⁻¹. Roztwór c-AuNPs o rozmiarach 60 nm użyty do kalibracji podczas oznaczania TiO₂NPs techniką sp ICP MS otrzymano poprzez odpowiednie rozcieńczenie roztworu podstawowego o stężeniu 31,92 ± 0,57 mg mL⁻¹. Zawiesiny nanocząstek tlenku tytanu(IV) o rozmiarach <100 nm występujących w formie rutyłu oraz mieszaniny rutyłu i anatazu przygotowano poprzez zawieszenie 10 mg nanoproszku w 50 mL wody Milli-Q. Przed sporządzeniem roztworów roboczych powstałe zawiesiny oraz roztwór podstawowy TiO₂NPs o rozmiarach cząstek < 150 nm umieszczano w łaźni ultradźwiękowej i poddawano 4-minutowej sonikacji (moc: 100%).

W przypadku zawiesin zawierających AgNPs i TiO₂NPs szczególny nacisk położono na zachowanie krótkich odstępów czasu między sporządzaniem kolejnych roztworów, unikanie dozowania wzorca na ścianki naczyń laboratoryjnych oraz dynamiczne mieszanie mające na celu zminimalizowanie ryzyka strat analitu. Dodatkowo zawiesiny TiO₂NPs były poddawane sonikacji na każdym etapie rozcieńczeń (1 min, moc: 100%).

Wodne roztwory podstawowe dodecylosiarczanu(VI) sodu (SDS) oraz cytrynianu sodu o stężeniu 0,1 mol L⁻¹ sporządzano przez rozpuszczenie odpowiednio 0,5767 g oraz 0,5882 g odważki danej substancji w 20 mL wody Milli-Q. Roztwór roboczy 1% poliwinylpirolidonu (PVP) został przygotowany przez rozpuszczenie 1 g odważki w 100 mL wody Milli-Q. Roztwory robocze TMAH, wody amoniakalnej, metanolu oraz Tritonu X-100 sporządzano bezpośrednio z komercyjnie dostępnych odczynników o stężeniach procentowych odpowiednio 25, 25, ≥ 99,9 oraz 100%. W badaniach dotyczących wpływu substancji stabilizujących na oznaczenie różnych form srebra oraz tytanu w każdym etapie rozcieńczania stosowano stałe stężenie danego stabilizatora.

Wodną zawiesinę kwasu humusowego o stężeniu 100 mg L⁻¹ przygotowano przez zawieszenie 10 mg w 100 mL wody Milli-Q. Roztwór macerozymu R-10 sporządzono poprzez zawieszenie 187,5 lub 375,0 mg enzymu w 15 mL wody Milli-Q uzyskując stężenie wynoszące odpowiednio 12,5 lub 25,0 mg mL⁻¹. Roboczy roztwór buforu cytrynianowego

(pH = 4,8) o stężeniu 0,002 mol L⁻¹ otrzymano poprzez rozcieńczenie roztworu podstawowego o stężeniu 0,09 mol L⁻¹.

Kwas borowy (H₃BO₃) o stężeniu procentowym 4% stosowany do neutralizacji HF został sporządzony poprzez rozpuszczenie 10 g 99,97% H₃BO₃ w 250 mL wody Milli-Q.

5.4. Terminologia stosowana w pracy

BED (ang. Background Equivalent Diameter) – teoretycznie najmniejsza wielkość cząstek możliwa do wykrycia w danej próbce. Parametr wyznaczany przez oprogramowanie MassHunter 4.5 spektrometru ICP MS na podstawie wzoru:

$$BED = \sqrt[3]{\frac{6}{\pi} \cdot \frac{m_{bkgnd}}{10^{15} \cdot \rho_p}} \cdot 10^7 \quad (10)$$

m_{bkgnd} – wartość ślepej próby wyrażona jako ekwiwalent masy analitu [fg],

ρ_p – gęstość cząstki [g cm⁻³].

Efektywność ekstrakcji – stosunek masy analitu oznaczonej w ekstrakcie do całkowitej zawartości badanego metalu w materiale biologicznym, wyrażony w procentach.

Granica wykrywalności (LOD, ang. Limit of Detection) – najmniejsza ilość/stężenie analitu, które można wykryć z określonym prawdopodobieństwem za pomocą danej metody analitycznej. Wartości LOD w przypadku oznaczania całkowitej zawartości analitu techniką ICP MS wyrażono jako 3-krotność odchylenia standardowego serii wyników uzyskanych dla ślepej próby. Do wyznaczenia granicy wykrywalności wyrażonej jako stężenie liczbowe i masowe nanocząstek oraz stężenie masowe rozpuszczonej frakcji metalu zastosowano arkusz kalkulacyjny opracowany przez Laborde et al. [433].

Granica wykrywalności rozmiarów cząstek (LOD_{size}, ang. Size Limit of Detection) – najmniejszy rozmiar cząstek możliwy do wykrycia techniką sp ICP MS w danej próbce z określonym prawdopodobieństwem. Parametr ten wyznaczono korzystając z narzędzia opracowanego przez Laborde et al. [433] oraz zależności średniej liczby zliczeń od promienia lub średnicy AgNPs podniesionej do potęgi trzeciej. W celu wyznaczenia powyższej

zależności zarejestrowano sygnały dla wzorców nanocząstek o różnych rozmiarach i stałym stężeniu liczbowym wynoszącym $2,12 \cdot 10^7 \text{ L}^{-1}$.

$$LOD_{size} = \frac{3 \cdot SD}{a} \quad (11)$$

SD – odchylenie standardowe wyników uzyskanych dla ślepej próby,
a – współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej.

RF_{Ion} (ang. Response Factor) – współczynnik odpowiedzi wzorca jonowego metalu użytego podczas kalibracji w technice *single particle* ICP MS, wyrażony wzorem:

$$RF_{Ion} = \frac{I_{Ion} - I_{Blk}}{C_{Ion}} \quad (12)$$

I_{Ion} – sygnał zarejestrowany dla wzorca jonowego metalu [cps],

I_{Blk} – sygnał zarejestrowany dla ślepej próby [cps],

C_{Ion} – stężenie wzorca jonowego badanego metalu [$\mu\text{g L}^{-1}$].

5.5. Parametry aparaturowe oraz pomiarowe spektrometrów ICP MS i HR CS GF AAS

Badania analizy specjacyjnej srebra i tytanu oraz oznaczenia całkowitej zawartości obu metali w próbkach biologicznych i środowiskowych prowadzono przy użyciu spektrometru Agilent 8800 ICP QQQ wyposażonego w:

- nikłowy stożek zbierający oraz miedziany stożek próbkujący,
- układ soczewek ekstrakcyjnych „x-lens”,
- układ wprowadzający próbkę:
 - pompa perystaltyczna,
 - szklany, koncentryczny rozpylacz MicroMist,
 - kwarcowa komora mgielna typu Scotta (o podwójnym przepływie) chłodzona za pomocą ogniwa Peltiera,
 - kwarcowy palnik (średnica wewnętrzna: 2,5 mm),
- komora kolizyjno-reakcyjna (ORS3).

Oznaczenie całkowitej zawartości srebra i tytanu techniką ICP MS prowadzono w warunkach przedstawionych w tabeli 17.

Tabela 17. Warunki pomiarowe zastosowane do oznaczenia całkowitej zawartości Ag i Ti techniką ICP MS

Analit	Tryb pomiarowy	Mierzone izotopy	Parametry wspólne dla obu analitów
Srebro	No gas ^a He ^b	¹⁰⁷ Ag ¹⁰⁹ Ag ¹¹⁵ In	<p>Moc generatora RF: 1550 W, Czas integracji: 0,3 s, Prędkość przepływu gazu:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ nośnego: 1,07 L min⁻¹, ➤ pomocniczego: 1 L min⁻¹, ➤ plazmowego: 15 L min⁻¹.
	He MS/MS ^c	¹⁰⁷ Ag → ¹⁰⁷ Ag ¹⁰⁹ Ag → ¹⁰⁹ Ag ¹¹⁵ In → ¹¹⁵ In	
	Wzorzec wewnętrzny: 100 µg L ⁻¹ In w 5% HNO ₃		
Tytan	He MS/MS ^c	⁴⁶ Ti → ⁴⁶ Ti ⁴⁷ Ti → ⁴⁷ Ti ⁴⁹ Ti → ⁴⁹ Ti	<p>^a pomiar bez stosowania gazu reakcyjnego/kolizyjnego, ^b pomiar z użyciem gazu kolizyjnego - helu, ^c pomiar przy użyciu potrójnego kwadrupola; gaz kolizyjny - hel, ^d pomiar przy użyciu potrójnego kwadrupola; gaz reakcyjny - amoniak, ^e pomiar przy użyciu potrójnego kwadrupola; gaz reakcyjny – tlen.</p>
	NH ₃ MS/MS ^d	⁴⁶ Ti → ⁴⁶ Ti(NH ₃) ₆ ⁺ ⁴⁷ Ti → ⁴⁷ Ti(NH ₃) ₆ ⁺ ⁴⁸ Ti → ⁴⁸ Ti(NH ₃) ₆ ⁺	
	O ₂ MS/MS ^e	⁴⁸ Ti → ⁴⁸ TiO ⁺	
	Wzorzec wewnętrzny: 25 µg L ⁻¹ Rh w 0,1% HNO ₃		

W przypadku oznaczania całkowitej zawartości srebra i tytanu techniką ICP MS wartości LOD (obliczone jako 3-krotne odchylenia standardowe uzyskane dla ślepych prób) wyniosły odpowiednio 3,1 oraz 4,4 ng L⁻¹.

Warunki pomiarowe stosowane przy oznaczaniu AgNPs, TiO₂NPs oraz rozpuszczonej frakcji srebra i tytanu w trybie *single particle* ICP MS przedstawiono w tabeli 18.

Tabela 18. Optymalne warunki pomiarowe oznaczania srebra oraz tytanu techniką sp ICP MS

Parametr	AgNPs	TiO ₂ NPs	Parametry wspólne dla obu analizów
Tryb pomiarowy	No gas ^a	O ₂ MS/MS ^b	Moc generatora RF: 1550 W, Prędkość przepływu gazu: ➤ nośnego: 1,07 L min ⁻¹ , ➤ pomocniczego: 1 L min ⁻¹ , ➤ plazmowego: 15 L min ⁻¹ . Prędkość przepływu próbki: 0,346 mL min ⁻¹ , Czas pomiaru: 3 ms, Całkowity czas zbierania danych: 60 s, Metoda kalibracji: Na podstawie rozmiaru nanocząstek o dobrze zdefiniowanym rozkładzie wielkości Płukanie układu wprowadzającego próbkę pomiędzy pomiarami: 2% HNO ₃ (60 s, 0,3 rpm) + MQ (60 s, 0,3 rpm)
Przepływ gazu reakcyjnego	-	10%	
Mierzone izotopy	¹⁰⁷ Ag	⁴⁸ Ti → ⁴⁸ TiO ⁺	
Czas stabilizacji przed rozpoczęciem pomiaru	90 s	60 s	
Wzorzec NPs użyty do kalibracji	RM 8017 75 nm PVP-AgNPs	60 nm c-AuNPs	
Stężenie masowe/liczbowe wzorca NPs	50 ng L ⁻¹ 2,2·10 ⁷ L ⁻¹	50 ng L ⁻¹ 2,3·10 ⁷ L ⁻¹	

^a pomiar bez stosowania gazu reakcyjnego/kolizyjnego,

^b pomiar przy użyciu potrójnego kwadrupola; gaz reakcyjny – tlen.

Do oznaczenia tytanu w ślepych próbach oraz zmineralizowanych częściach roślin zastosowano technikę wysokorozdzielczej atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w kuwecie grafitowej z ciągłym źródłem promieniowania (HR CS GF AAS). Badania przeprowadzono na spektrometrze ContrAA 700 z elektrotermicznym atomizerem, detektorem CCD, wysokociśnieniową ksenonową lampą łukową oraz automatycznym podajnikiem próbek AS 52 S. Program temperaturowy zastosowany podczas oznaczeń Ti przedstawiono w tabeli 19. Modyfikacja powierzchni kuwety grafitowej została przeprowadzona przy użyciu 100 mg L⁻¹ platyny [471] na czterech pierwszych etapach programu.

Tabela 19. Program temperaturowy zastosowany do oznaczania tytanu techniką atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w kuwecie grafitowej (GFAAS)

Etap	Temperatura [°C]	Przyrost temperatury [°C s ⁻¹]	Czas utrzymania temperatury [s]
Suszenie I	80	6	10
Suszenie II	90	3	10
Suszenie III	110	3	5
Suszenie IV	1100	200	5
Suszenie V	80	NP	15
Suszenie VI	90	3	15
Suszenie VII	110	5	10
Piroliza	1400	300	10
Adaptacja gazu	1400	0	5
Atomizacja	2690	1500	10
Czyszczenie	2700	500	4
Modyfikator: 10 µL 100 mg L ⁻¹ Pt			

6. Próbkę środowiskowe i biologiczne - przygotowanie do badań i charakterystyka

6.1. Układy modelowe stosowane w badaniach biosorpcji

Pożywka BBM. W skład pożywki BBM (ang. *Bold's Basal Medium*) wchodzi makroelementy (25 g L⁻¹ NaNO₃; 2,5 g L⁻¹ CaCl₂·2H₂O; 7,5 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O; 7,5 g L⁻¹ K₂HPO₄; 17,5 g L⁻¹ KH₂PO₄ oraz 2,5 g L⁻¹ NaCl), kwas (etylenodiamino)tetraoctowy (50 g L⁻¹ EDTA; 31 g L⁻¹ KOH), żelazo (4,98 g L⁻¹ FeSO₄·7H₂O; 1 mL H₂SO₄), bor (11,42 g L⁻¹ H₃BO₃) oraz mikroelementy (8,82 g L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O; 1,44 g L⁻¹ MnCl₂·4H₂O; 0,71 g L⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O; 1,57 g L⁻¹ CuSO₄·5H₂O i 0,49 g L⁻¹ Co(NO₃)₂·6H₂O). Pożywkę doprowadzono do pH 7 przy pomocy 0,1 mol L⁻¹ NaOH i wysterylizowano w autoklawie.

Modelowa woda powierzchniowa została przygotowana poprzez 10-krotne rozcieńczenie pożywki BBM oraz dodatek 1 mg L⁻¹ kwasu humusowego. Woda posiadała pH = 6,53.

Woda rzeczna. Próbkę wody pobrano ze środka głównego nurtu rzeki Supraśl na głębokości ~ 30 cm pod powierzchnią wody do 2-litrowej butelki PET. Przed pobraniem próbki, pojemnik 3-krotnie opłukano wodą rzeczną. Butelkę wypełniono po brzegi i przetransportowano do laboratorium. Próbkę przed zastosowaniem przesączono próżniowo przez filtr nylonowy o średnicy porów 0,22 µm. Woda posiadała odczyn lekko zasadowy (pH = 7,6 – 8,0). Stężenie wybranych metali oznaczone techniką ICP MS wynosiło: 6,6 mg L⁻¹ Na, 10,2 mg L⁻¹ Mg, 1,7 mg L⁻¹ K, 11,6 mg L⁻¹ Ca, 0,2 mg L⁻¹ Cr, 93,6 mg L⁻¹ Mn, 127,0 mg L⁻¹ Fe, 0,1 mg L⁻¹ Co, 0,4 mg L⁻¹ Ni, 1,0 mg L⁻¹ Cu, 3,9 mg L⁻¹ Zn i 0,2 mg L⁻¹ Pb.

W wodzie oznaczono 12,4 mg L⁻¹ całkowitej zawartości węgla organicznego (TOC) oraz 11,4 mg L⁻¹ rozpuszczonego węgla organicznego (DOC).

6.2. Badanie wpływu matrycy na przebieg oznaczenia oraz stabilność Ag⁺/AgNPs

Do kolb Erlenmeyera o poj. 250 mL zawierających 50 mL badanego medium dodano 0,5 mL wodnego roztworu Ag⁺ lub 60 nm PVP-AgNPs o stężeniu 500 µg L⁻¹. Następnie badane układy wzbogacone w różne formy srebra mieszano z prędkością 160 obr./min przez 24 h w kontrolowanych, sterylnych warunkach (temperatura: 25 ± 0,5°C, okres naświetlania/ciemności: 16 h/8 h, natężenie światła: 50 µmol m⁻² s⁻¹). Dla każdego układu sporządzono dwie równoległe próbki.

6.3. Hodowla i inkubacja glonów *Desmodesmus subspicatus*

Synchronizację hodowli glonów *Desmodesmus subspicatus* (R. Chodat) Hegewald et Schmidt, szczep nr 54.80 (SAG, Niemcy) osiągnięto przy stałej zmianie okresów naświetlania oraz ciemności zgodnie z metodą zaproponowaną przez Prisonsa i Lorenzena [472]. Komórki glonów hodowano w pożywce BBM, którą przed użyciem doprowadzono do pH 7 i wysterylizowano w autoklawie. Hodowlę glonów prowadzono w Katedrze Biologii i Ekologii Roślin na Wydziale Biologii Uniwersytetu w Białymstoku.

Komórki glonów w wykładniczej fazie wzrostu były oddzielane od pożywki poprzez filtrację próżniową (wielkość porów filtra membranowego 0,2 µm), przemywane 50 mL wody Milli-Q i odsączone. Około 100 mg porcje tak przygotowanych glonów były stosowane do dalszych badań.

Inkubacja glonów z Ag⁺/AgNPs

Głony (100 mg) zawieszano w 50 mL wody Milli-Q, pożywki BBM lub modelowej wody powierzchniowej w kolbie Erlenmeyera o poj. 250 mL. Do wyżej opisanych układów dodano 500 µg L⁻¹ Ag⁺ lub AgNPs o rozmiarach 30, 40, 60, 75 lub 80 nm stabilizowane PVP lub jonami cytrynianowymi do końcowego stężenia srebra 5 µg L⁻¹. Próby kontrolne przygotowano w ten sam sposób bez dodatku analitu. Zawiesiny komórek glonów wzbogacone w różne formy srebra inkubowano przez 24 h w kontrolowanych, sterylnych warunkach (temperatura: 25 ± 0,5°C, szybkość wytrząsania: 160 obr./min, okres naświetlania/ciemności: 16 h/8 h, natężenie światła: 50 µmol m⁻² s⁻¹). Czas naświetlania i jego

intensywność odpowiadały naturalnym warunkom środowiskowym. Dla każdego układu sporządzono dwie równoległe próbki.

6.4. Hodowla grochu zwyczajnego *Pisum sativum* L.

Groch zwyczajny uprawiano hydroponicznie w pożywce Hoaglanda (pH = 5,9) zawierającej: KNO_3 ($0,51 \text{ g L}^{-1}$), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($1,18 \text{ g L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,49 \text{ g L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($0,14 \text{ g L}^{-1}$), H_3BO_3 ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($0,4 \text{ mg L}^{-1}$), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$), FeEDTA ($10,28 \text{ mg L}^{-1}$) i $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,02 \text{ mg L}^{-1}$). Uprawę prowadzono w kontrolowanych warunkach (temperatura $21 \pm 3^\circ\text{C}$, okres naświetlania/ciemności: 16 h/8 h, natężenie światła: $170 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Piątego dnia do pożywki dodano zawiesinę nanocząstek tlenku tytanu(IV) (rozmiar $< 150 \text{ nm}$) do otrzymania końcowego stężenia 10, 50 lub 100 mg L^{-1} (pożywkę wymieniało się co 48 h). Równoległe prowadzono hodowlę próbek kontrolnych - roślin modelowych nieeksponowanych na działanie nanocząstek tlenku tytanu (IV). Groch zwyczajny zebrano po 12 dniach ekspozycji na działanie TiO_2NPs , gdy rośliny osiągnęły stadium fenologiczne BBCH 15. Rośliny podzielono na korzenie oraz pędy lub łodygi i liście – po 2 równoległe próbki pochodzące z tej samej hodowli. Korzenie dokładnie przemyto 8 razy wodą dejonizowaną w celu usunięcia nanocząstek przylegających do powierzchni. Masę świeżych i wysuszonych (w temperaturze 60°C do stałej masy) części roślin zważono w celu określenia ilości biomasy i zawartości wody. Hodowlę roślin prowadzono w Instytucie Chemii Ogólnej i Ekologicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej.

6.5. Procedura przygotowania i rozkładu próbek do analizy ICP MS i sp ICP MS

6.5.1. Procedura ekstrakcji Ag^+ / AgNPs z komórek glonów

Do rozkładu ściany komórkowej glonów *Desmodesmus subspicatus* stosowano trzy procedury:

- 1) **Sonikacja, bezpośrednia ekstrakcja (Procedura 1)** - do komórek glonów dodano 5 mL 0,1% Tritonu X-100. Otrzymaną zawiesinę poddano lizie przy użyciu homogenizatora ultradźwiękowego (czas sonikacji: 15 min) w celu dezintegracji błon komórkowych [473]. Nierozpuszczalną pozostałość odwirowano (2 min z prędkością 3500 obr./min) i oddzielono od lizatu.

- 2) **Trawienie enzymatyczne w obecności macerozemu R-10 (Procedura 2)** – do komórek glonów dodano 8 mL buforu cytrynianowego o pH 6. Otrzymaną zawiesinę poddano sonikacji przy użyciu homogenizatora ultradźwiękowego (czas: 15 min). Następnie dodano 2 mL wodnego roztworu macerozemu R-10 o stężeniu 12,5 mg mL⁻¹. Zawiesiny termostatowano w łaźni wodnej w temperaturze 21°C przez 24 h i ponownie poddano sonikacji (czas: 5 min).
- 3) **Trawienie w środowisku alkalicznym (Procedura 3)** – do komórek glonów dodano 5 mL TMAH o stężeniu 10%. Otrzymaną zawiesinę poddano sonikacji przy użyciu homogenizatora ultradźwiękowego (czas: 15 min). Po 24-godzinnym trawieniu próbki w obecności TMAH w temperaturze pokojowej, zawiesiny ponownie poddano sonikacji (czas: 5 min).

W każdej procedurze zastosowano następujące parametry pracy sondy ultradźwiękowej: amplituda - 100%; tryb pracy pulsacyjnej – okres pracy/spoczynkowy: 5 s/ 3 s. W celu uniknięcia nadmiernego nagrzewania się próbki podczas etapu sonikacji, we wszystkich procedurach stosowano zewnętrzne chłodzenie próbki lodem.

6.5.2. Rozkład próbek korzeni, łodyg i liści grochu zwyczajnego do oznaczania TiO₂NPs

Zliofilizowane części roślin poddano trawieniu w środowisku alkalicznym. Do probówek polipropylenowych o pojemności 12 mL odważano 10 mg korzeni lub 20 mg pędów/łodyg/liści i dodawano 5 mL TMAH o stężeniu 10%. Otrzymaną zawiesinę poddawano sonikacji przy użyciu homogenizatora ultradźwiękowego (czas: 15 min). Po 24-godzinnym trawieniu próbki w obecności TMAH, zawiesiny ponownie poddano sonikacji (czas: 5 min). Ze względu na skłonność TiO₂NPs do agregacji, próbki wytrząsano przez cały okres trawienia. Sonda ultradźwiękowa pracowała w trybie pulsacyjnym – okres pracy/spoczynkowy: 5 s/ 3 s, amplituda - 100%. Podczas sonikacji próbkę chłodzono zewnętrznie lodem.

6.5.3. Procedury mineralizacji próbek biologicznych

Glony *Desmodesmus subspicatus*

Glony po przemyciu (100 mg) oraz nierozpuszczoną pozostałość po lizie (~ 100 – 150 mg) przeniesiono do naczyń teflonowych, dodano po 3,86 mL 69% HNO₃, 0,64 mL 30% H₂O₂ oraz 0,5 mL wody Milli-Q i poddano mineralizacji na mokro wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym w systemie ETHOS PLUS korzystając z programu

przedstawionego w tabeli 20. Mineralizaty przeniesiono ilościowo do pojemników o poj. 20 mL.

Tabela 20. Program mineralizacji glonów oraz nierozpuszczalnej pozostałości po lizie komórkowej, trawieniu enzymatycznym i roztwarzaniu w środowisku alkalicznym (mineralizator ETHOS PLUS)

Poziom	Czas [min]	Moc [W]	Maksymalna temperatura [°C]
1	1	250	140
2	1	0	160
3	5	250	170
4	5	400	180
5	5	650	200
Wentylacja – 30 min			

Groch zwyczajny *Pisum sativum L.*

Rozkład zliofilizowanych części roślin (10 mg korzeni oraz 20 mg pędów, łodyg i liści) przeprowadzono przy użyciu systemu do mineralizacji ciśnieniowej wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym MARS 6. Do naczyń teflonowych zawierających odważone próbki dodano 10 mL $\geq 69\%$ HNO₃ oraz 2 mL 47 - 51% HF. Następnie przeprowadzono mineralizację na mokro wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym stosując dwuetapowy program przedstawiony w tabeli 21. Po pierwszym etapie pojemniki rozszczelniono i w celu neutralizacji pozostałości kwasu fluorowodorowego do mineralizatu dodano 30 mL 4% H₃BO₃.

Tabela 21. Program mineralizacji materiału roślinnego i wzorca TiO₂NPs (mineralizator MARS 6)

Etap	Temperatura [°C]	Czas wzrostu temperatury [min]	Czas utrzymania temperatury [min]	Ciśnienie[psi]	Moc [W]
1	210	15	15	800	900 - 1050
2	170	15	15	800	900 - 1050

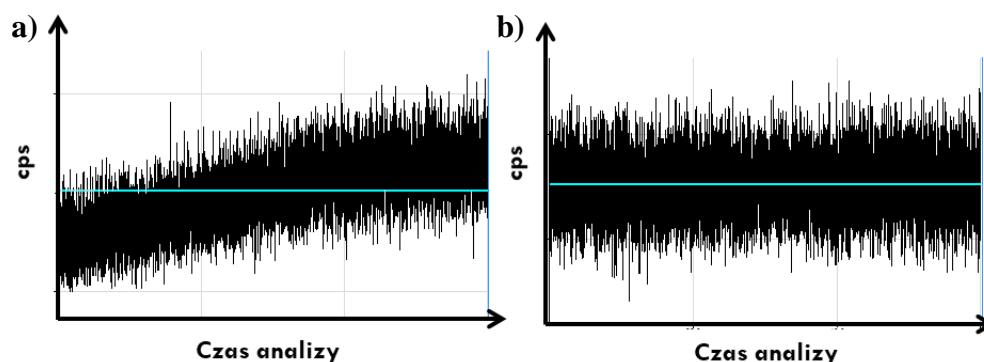
7. Badania Ag^+ i AgNPs techniką sp ICP MS

Główne problemy towarzyszące analizie nanocząstek techniką sp ICP MS związane są z ograniczeniami instrumentalnymi (szybkością układów elektronicznych, systemem wprowadzania próbki) oraz odróżnieniem sygnału pochodzącego od NPs i rozpuszczonej frakcji metalu/tła. Różnice w budowie dostępnych komercyjnie spektrometrów ICP MS oraz zróżnicowane podejście do analizy statystycznej/matematycznej otrzymanych sygnałów sprawiają, że konieczne jest opracowywanie indywidualnego podejścia do każdego układu pomiarowego, analitu oraz matrycy próbki.

7.1. Optymalizacja metody oznaczania Ag^+ /AgNPs techniką sp ICP MS – badania w układach modelowych

Wstępne badania z wykorzystaniem techniki sp ICP MS rozpoczęto od analizy wodnych układów modelowych zawierających Ag^+ i/lub AgNPs. Podejście to pozwoliło zdefiniować problemy towarzyszące tego typu analizie oraz dokonać wstępnej optymalizacji i wyboru procedury kalibracyjnej oraz parametrów pomiarowych, takich jak czas stabilizacji przed rozpoczęciem pomiaru, czas pomiaru oraz całkowity czas zbierania danych.

Na rysunku 12a pokazano sygnał jonów Ag^+ zarejestrowany przy czasie stabilizacji przed rozpoczęciem pomiaru wynoszącym 30 s (czas polecany standardowo). Jak widać, zarejestrowanie stałego w czasie sygnału srebra wymagało wydłużenia czasu stabilizacji do 90 s (Rys. 12b). Podobny efekt opisał w badaniach Liu et al. [474].

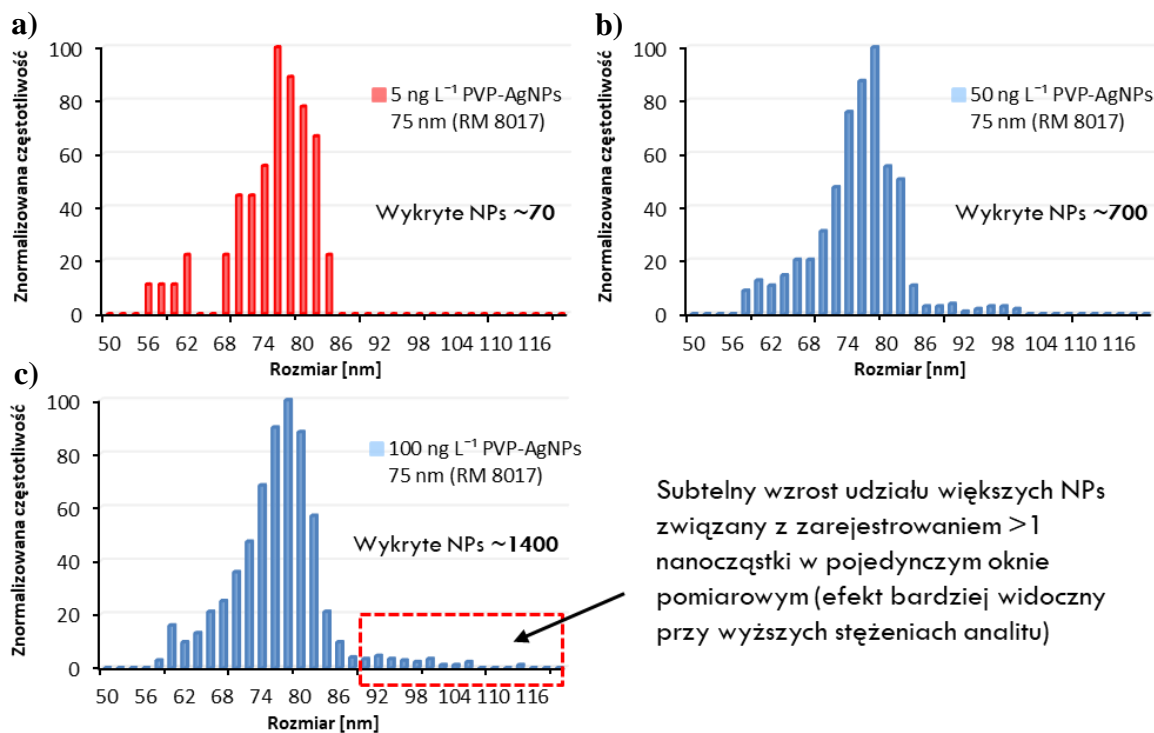


Rysunek 12. Sygnał analityczny zarejestrowany dla $1 \mu\text{g L}^{-1} \text{Ag}^+$ przy czasie stabilizacji przed rozpoczęciem pomiaru: (a) 30 s oraz (b) 90 s

Kolejnym parametrem, który ma istotny wpływ na przebieg oznaczenia NPs techniką sp ICP MS jest czas pomiaru (t_{pom}). Obecnie coraz szerzej stosowane są spektrometry

umożliwiający prowadzenie pomiarów przy t_{pom} rzędu kilku μs , których zastosowanie zmniejsza ryzyko zarejestrowania więcej niż 1 NPs w pojedynczym oknie pomiarowym. Czas przebywania nanocząstki w strumieniu plazmy wynosi przeważnie 300 – 500 μs , dlatego w celu zminimalizowania udziału błędu systematycznego przy oznaczaniu rozmiarów oraz stężenia liczbowego nanocząstek preferowane jest stosowanie $t_{\text{pom}} \leq 0,5$ ms. W moich badaniach ze względu na ograniczenia instrumentalne spektrometru ICP QQQ Agilent 8800 wybrano najkrótszy, możliwy czas pomiaru t_{pom} wynoszący 3 ms.

Prawidłowo dobrany całkowity czas zbierania danych powinien umożliwić zarejestrowanie sygnału dla odpowiednio dużej liczby nanocząstek (przedział rekomendowany: 500 - 2500 NPs). Parametr ten jest ściśle związany z rozcieńczeniem próbki. W literaturze można znaleźć prace, w których w celu zminimalizowania efektów matrycowych stosowano duże rozcieńczenia próbek wydłużając całkowity czas zbierania danych nawet do 600 s, co przy $t_{\text{pom}} = 3$ ms przekładało się na zarejestrowanie 200 tysięcy punktów pomiarowych podczas jednego pomiaru [93]. Do wstępnych badań wybrano całkowity czas zbierania danych wynoszący 60 s, który umożliwił zarejestrowanie 20 tysięcy punktów pomiarowych. Kalibrację układu pomiarowego przeprowadzono z użyciem materiału odniesienia NIST (RM 8017) o zdefiniowanym stężeniu oraz rozmiarze AgNPs ($74,6 \pm 3,8$ nm – rozmiar wyznaczony techniką TEM) stabilizowanych poliwinylpirolidonem (PVP). W celu zminimalizowania prawdopodobieństwa zarejestrowania więcej lub mniej niż 1 nanocząstki w pojedynczym oknie pomiarowym zoptymalizowano stężenie roztworu AgNPs stosowanego do kalibracji spektrometru (Rys. 13).



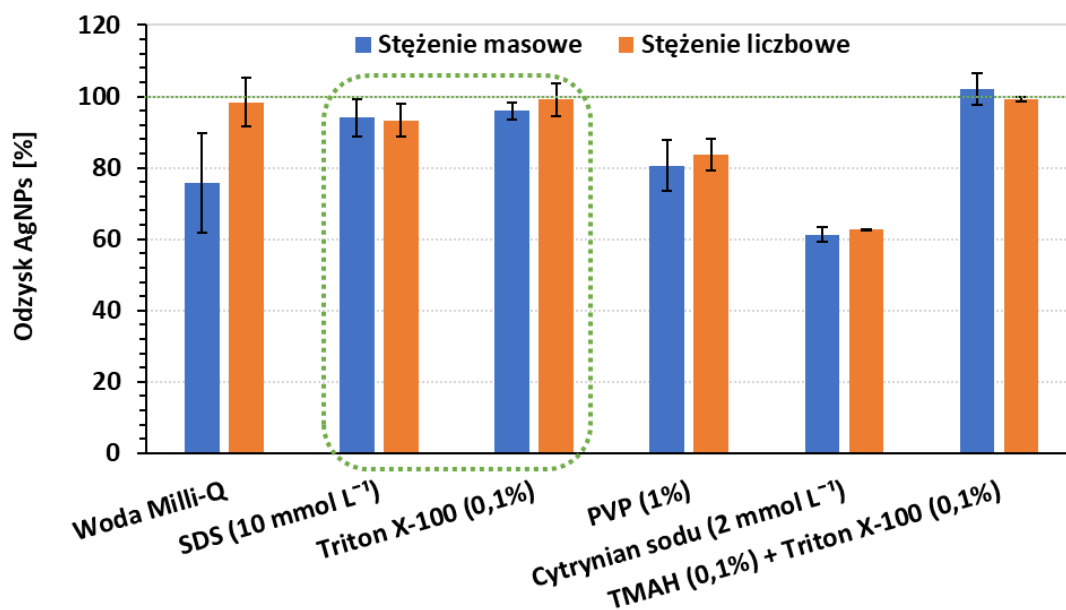
Rysunek 13. Rozkłady wielkości NPs uzyskane dla roztworów kalibracyjnych zawierających PVP-AgNPs 75 nm o stężeniu: (a) 5 ng L^{-1} , (b) 50 ng L^{-1} oraz (c) 100 ng L^{-1}

Prawidłowy rozkład wielkości NPs uzyskano dla stężenia 50 ng L^{-1} (Rys. 13b), natomiast przy dziesięciokrotnie niższym stężeniu wzorca wykryto zbyt małą liczbę NPs, przez co otrzymany histogram wielkości nanocząstek był niepełny (Rys 13a). W przypadku stężenia 100 ng L^{-1} zaobserwowano subtelny wzrost udziału nanocząstek o większych rozmiarach związany ze wzrostem prawdopodobieństwa zarejestrowania > 1 NPs w pojedynczym oknie pomiarowym (Rys. 13c). Efekt ten był jeszcze bardziej widoczny w przypadku wyższych stężeń AgNPs, gdzie wykryto ponad 2500 NPs. Do kalibracji układu pomiarowego wybrano stężenie PVP-AgNPs 75 nm wynoszące 50 ng L^{-1} , dla którego wykryto około 700 NPs podczas całkowitego czasu zbierania danych wynoszącego 60 s.

Wpływ substancji stabilizujących na przebieg oznaczenia Ag^+/AgNPs

Podczas oznaczania metali na poziomie śladowym roztwór jest zakwaszany w celu zminimalizowania ryzyka adsorpcji analitu na powierzchniach naczyń laboratoryjnych oraz układu wprowadzającego próbkę. Takie podejście nie może być stosowane w przypadku analizy specyjacyjnej metali, ponieważ może to prowadzić do rozpuszczania nanocząstek obecnych w badanej próbce. W wielu badaniach z wykorzystaniem techniki sp ICP MS próbki rozcieńczane są czystą wodą bez stosowania dodatkowych substancji stabilizujących.

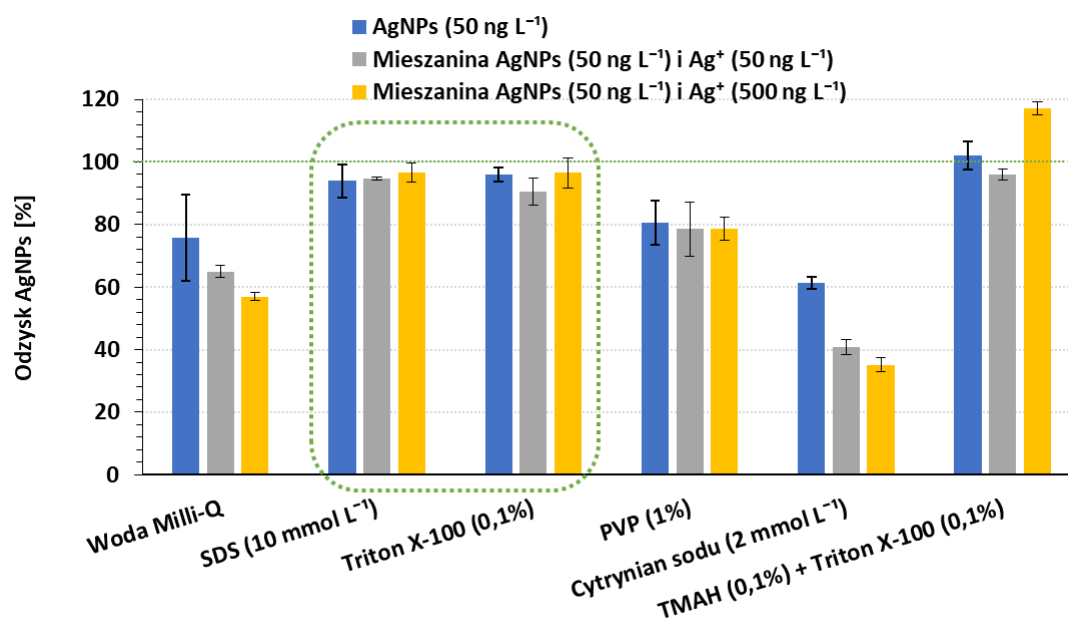
Podczas oznaczania AgNPs w wodnych roztworach modelowych (woda Milli-Q) stwierdzono występowanie strat analitu na poziomie 20 - 40%. Straty związane były z adsorpcją analitu na powierzchniach układu wprowadzającego próbkę oraz naczynek i końcówek do mikropipet stosowanych do sporządzania roztworów, a także zmniejszeniem stabilności zawiesiny nanocząstek wynikającym z zastosowania dużych rozcieńczeń roztworu podstawowego ($\sim 2 \cdot 10^7$ razy). W związku z tym zbadano jaki wpływ na przebieg oznaczenia AgNPs ma dodatek substancji stabilizujących o różnym charakterze chemicznym. W badaniach zastosowano: 10 mmol L⁻¹ dodecylosiarczan(VI) sodu (SDS; anionowy surfaktant), 0,1% Triton X-100 (niejonowy środek powierzchniowo czynny), 2 mmol L⁻¹ cytrynian sodu oraz 1% poliwinylpirolidon (PVP), które są wykorzystywane do elektrostatycznej (SDS, cytrynian sodu) oraz sterycznej (Triton X-100, PVP) stabilizacji nanocząstek. Celem badań było wybranie substancji chemicznej, która ma korzystny wpływ na zmniejszenie efektu adsorpcji analitu, poprawienie stabilności nanocząstek, a przy tym nie prowadzi do zmiany formy specjacyjnej srebra. Sprawdzone również, czy dodatek TMAH - odczynnika używanego do trawienia próbek w środowisku alkalicznym wpływa na przebieg oznaczenia Ag⁺ i AgNPs. Odzyski AgNPs liczone względem masy/stężenia liczbowego nanocząstek srebra dodanych do roztworu obliczonych na podstawie certyfikowanej wartości masy AgNPs (RM 8017). Wyniki badań przedstawiono na rysunkach 14,15,16.



Rysunek 14. Wpływ dodatku substancji o różnym charakterze chemicznym na wartości odzysków 50 ng L⁻¹ PVP-AgNPs 75 nm (RM 8017) ($n = 4$)

W roztworach zawierających nanocząstki stabilizowane 0,1% Tritonem X-100 oraz 10 mmol L⁻¹ SDS uzyskano wartości odzysków AgNPs w przedziale 93,3 – 105,8%. Dodatek PVP nie przyczynił się do poprawy odzysków, które wyniosły ~ 80%. Niekorzystny wpływ na oznaczenie AgNPs miał natomiast dodatek 2 mmol L⁻¹ cytrynianu sodu, gdyż zaobserwowano spadki wartości odzysków AgNPs do poziomu ~ 60%. W układach z dodatkiem 0,1% TMAH i 0,1% Tritonu X-100 uzyskano blisko 100% wartości odzysków AgNPs.

Obecność dużej ilości frakcji jonowej może utrudniać wykrycie nanocząstek w badanym układzie, ponieważ część sygnału może być błędnie interpretowana jako pochodząca od analitu w formie jonowej. Dlatego zbadano również wpływ dodatku Ag⁺ na wartości odzysków AgNPs przy jednakowym stężeniu obu frakcji oraz dziesięciokrotnym nadmiarze formy jonowej (Rys. 15). Stosowanie dodatku substancji stabilizującej niesie za sobą ryzyko niejednakowego oddziaływania na różne formy specjacyjne metalu, czego konsekwencją może być zróżnicowana efektywność wprowadzania poszczególnych form analitu do plazmy. Dlatego zasadne jest sprawdzenie możliwości jednoczesnego oznaczania obu form analitu (Ag⁺, AgNPs) w obecności danego stabilizatora (Rys. 15,16).

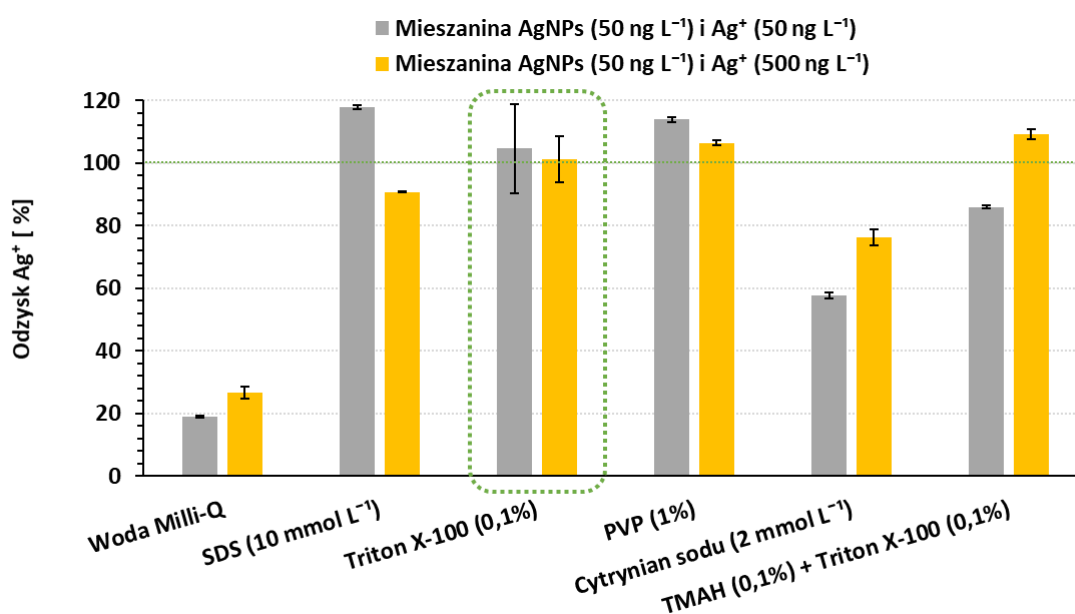


Rysunek 15. Wpływ dodatku substancji o różnym charakterze chemicznym na wartości odzysków 50 ng L⁻¹ PVP-AgNPs 75 nm (RM 8017) w obecności 50 i 500 ng L⁻¹ Ag⁺ (Stężenie masowe) (n ≥ 2)

W przypadku układów stabilizowanych środkami powierzchniowo czynnymi (Triton X-100, SDS) dodatek Ag⁺ nie wpływał na wartości odzysków nanocząstek srebra. Wartości odzysków AgNPs w układach modelowych zawierających cytrynian sodu oraz dodatek 50

i $500 \text{ ng L}^{-1} \text{ Ag}^+$ spadły odpowiednio do 41 i 35%. W przypadku wszystkich układów modelowych zawierających 1% PVP wartości odzysków AgNPs ukształtowały się na podobnym poziomie ($\sim 80\%$) i nie zaobserwowano wpływu frakcji jonowej na ten parametr.

Wysokie wartości odzysków AgNPs uzyskano w roztworach modelowych bez dodatku substancji stabilizujących, jednak towarzyszyły temu wyraźne straty srebra w formie jonowej (Rys. 16). Znaczące straty analitu zaobserwowano również w przypadku roztworów modelowych zawierających $\leq 100 \text{ ng L}^{-1} \text{ Ag}^+$, bez dodatku substancji stabilizujących. Stężenie wzorca Ag^+ stosowanego do kalibracji układu wynosiło 1000 ng L^{-1} i na tym poziomie bez problemu uzyskiwano ilościowe odzyski analitu ($99,6 \pm 1,2\%$). Natomiast w przypadku stężeń $\leq 100 \text{ ng L}^{-1}$ zaobserwowano wyraźne straty srebra w formie jonowej (np. odzyski $50 \text{ ng L}^{-1} \text{ Ag}^+$ były na poziomie $60,4 \pm 10,7\%$).

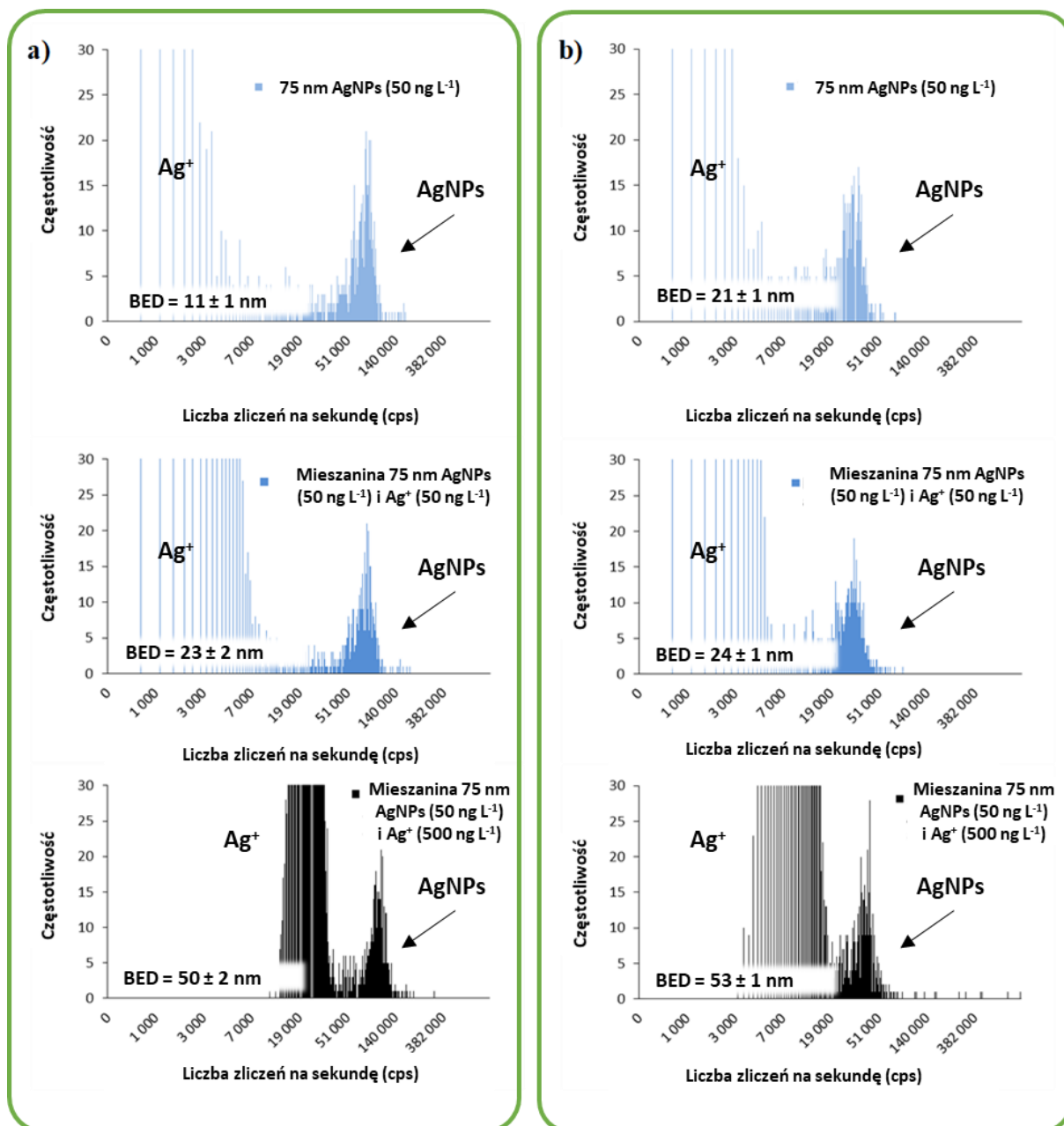


Rysunek 16. Wpływ dodatku substancji o różnym charakterze chemicznym oraz obecności 50 ng L^{-1} PVP-AgNPs 75 nm (RM 8017) na wartości odzysków 50 lub $500 \text{ ng L}^{-1} \text{ Ag}^+$ ($n \geq 2$)

Korzystny wpływ na odzysk Ag^+ miał dodatek każdej z badanych substancji. Jednak najlepsze rezultaty ponownie uzyskano dla układów z dodatkiem 0,1% Tritonu X-100. Zaletą zastosowania 0,1% Tritonu X-100 w porównaniu do 10 mmol L^{-1} SDS jest również niższy poziom tła, który w przypadku czystych roztworów wymienionych surfaktantów wyniósł odpowiednio 16 ± 2 oraz 48 ± 4 NPs. Lepszą stabilność AgNPs w Tritonie X-100 można wytłumaczyć wyższą wydajnością włączania AgNPs do miceli tworzonych przez ten surfaktant. Jednoczesne ilościowe oznaczenie srebra w formie nanocząstek i jonów w układach stabilizowanych 0,1% Tritonem X-100 przeprowadzono nawet przy

dziesięciokrotnie wyższym stężeniu Ag^+ w stosunku do stężenia AgNPs. W przypadku wszystkich układów zawierających 0,1% TMAH i 0,1% Triton X-100 uzyskano odzyski Ag^+ i AgNPs mieszczące się odpowiednio w przedziałach 85,9 – 109,3% oraz 96,0 – 117,2%.

W powyższych badaniach nie zaobserwowano rozpuszczania AgNPs. Średni rozmiar nanocząstek srebra oznaczonych techniką sp ICP MS mieścił się w przedziale: 71 – 77 nm, co było zgodne z certyfikowaną wartością odniesienia wyznaczoną techniką TEM – $74,6 \pm 3,8$ nm. Na podstawie powyższych obserwacji do stabilizacji roztworów w dalszej części pracy wybrano 0,1% Triton X-100. Na wykresach zależności częstotliwości sygnału od liczby zliczeń na sekundę zaobserwowano zmniejszenie odległości pomiędzy frakcją jonową a nanocząstkami wraz ze wzrostem stężenia Ag^+ (Rys. 17). Efekt ten był bardziej wyraźny w przypadku układów z dodatkiem TMAH, czyli w roztworach zawierających większą ilość matrycy organicznej, co widać na rysunku 17b. Można zatem przypuszczać, że obecność w roztworze pomiarowym jonów oraz matrycy organicznej może przekładać się na wzrost wartości LOD_{size} . Dla przygotowanych w 0,1% Tritonie X-100 i 0,1% TMAH + 0,1% Triton X-100 roztworów modelowych wyznaczono wartości parametru BED (Rys. 17), który określa teoretycznie najmniejszy rozmiar cząstek możliwy do wykrycia w danej próbce.

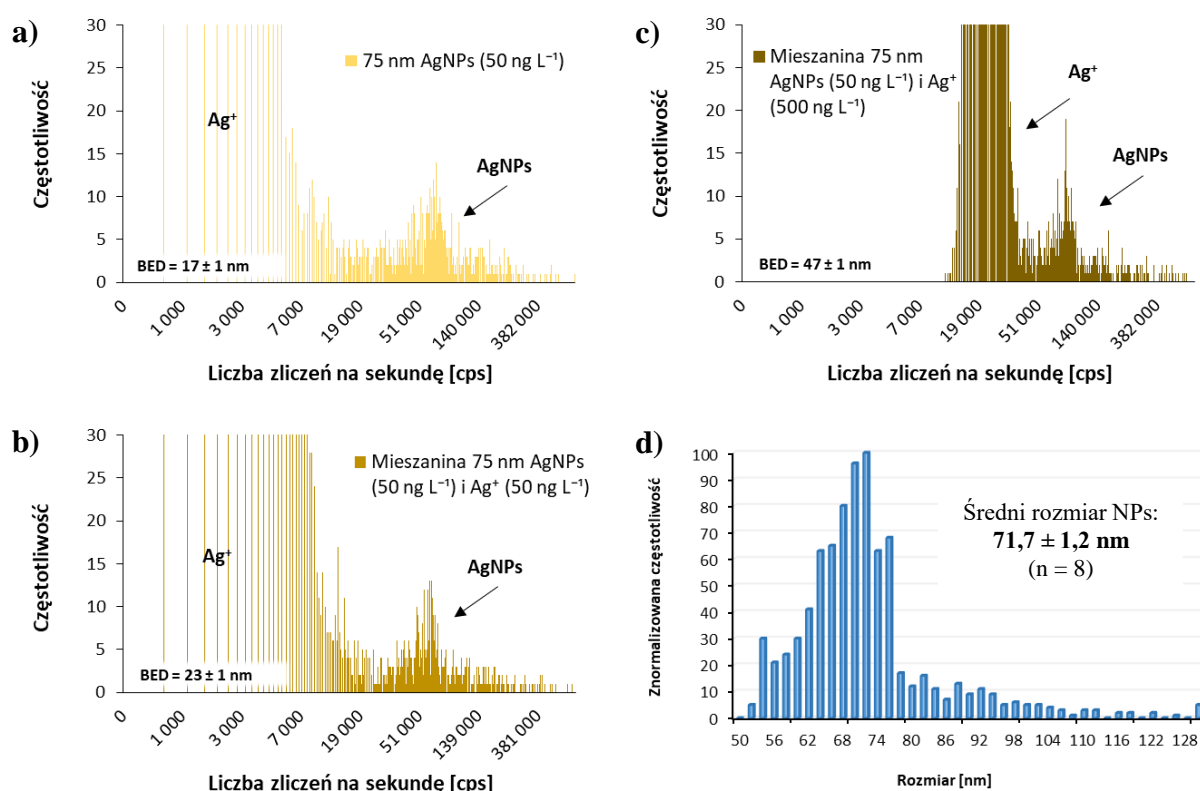


Rysunek 17. Wpływ obecności frakcji jonowej na rozdzielanie sygnału pochodzącego od Ag^+ i AgNPs (a) w roztworze 0,1% Tritonu; (b) w 0,1% TMAH + 0,1% Tritonie X-100

Stwierdzono, że wraz ze wzrostem udziału frakcji jonowej rośnie wartość parametru BED. Obecność srebra w formie jonowej prowadzi do wzrostu wartości BED z 11 ± 1 nm do 23 ± 2 nm w obecności $50 \text{ ng L}^{-1} \text{ Ag}^+$ oraz do 50 ± 2 nm w układach z dodatkiem $500 \text{ ng L}^{-1} \text{ Ag}^+$ dla roztworów stabilizowanych Tritonem X-100. W analogicznych układach zawierających dodatek 0,1% TMAH + 0,1% Triton X-100 wyznaczono 2-krotnie wyższą wartość BED dla roztworów niezawierających Ag^+ (21 ± 1 nm vs. 11 ± 1 nm), natomiast w przypadku mieszanin modelowych zawierających frakcję jonową stwierdzono wzrost wartości BED do 24 ± 1 nm oraz 53 ± 1 nm odpowiednio dla układów z dodatkiem 50 oraz

500 ng L⁻¹ Ag⁺. Jest to zgodne z obserwacjami Schwertfegera et al. [446], którzy wykazali, że wzrost stężenia frakcji jonowej oznaczanego metalu prowadzi do wzrostu wielkości oraz spadku liczby wykrytych nanocząstek. Stopień negatywnego wpływu obecności rozpuszczonego analitu zależy od jego stężenia i rozmiarów oznaczanych cząstek. Odpowiednie rozcieńczenie próbki w celu zmniejszenia udziału sygnału pochodzącego od frakcji jonowej poprawia dokładność oznaczeń rozmiarów cząstek i ich stężenia liczbowego. Należy jednak zaznaczyć, że takie podejście często wymaga wydłużenia całkowitego czasu zbierania danych w celu uzyskania statystycznie istotnej liczby zliczeń pochodzących od nanocząstek obecnych w rozcieńczonej próbce.

Zbadano również wpływ prostej matrycy, którą stanowiła woda pitna (wodociągowa) na przebieg jednoczesnego oznaczenia obu form srebra (Rys. 18).



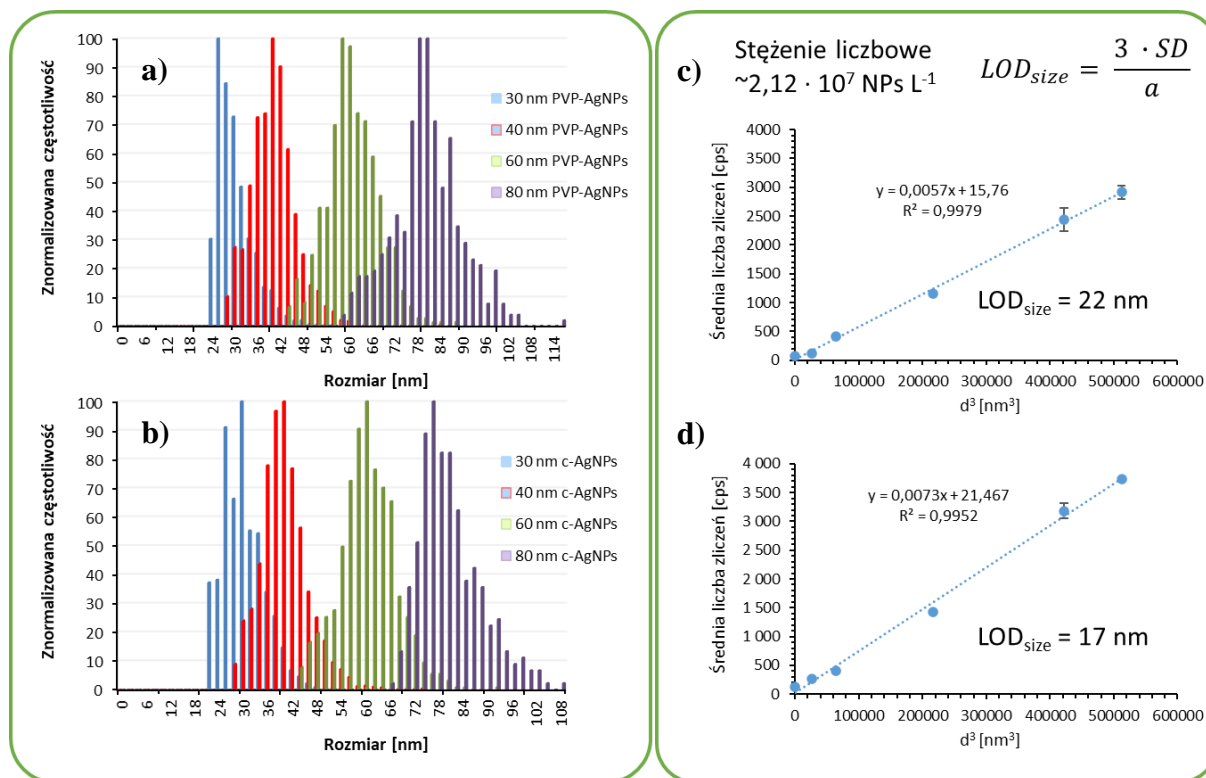
Rysunek 18. (a-c) Wpływ obecności frakcji jonowej na możliwość rozdzielnia sygnału pochodzącego od Ag⁺ i AgNPs w wodzie wodociągowej; (d) Rozkład wielkości AgNPs uzyskany dla 75 nm AgNPs (RM 8017) w wodzie wodociągowej

Zaobserwowano wpływ matrycy próbki na rozkład wielkości nanocząstek srebra oraz wartości odzysków AgNPs dodanych do wody wodociągowej. Przedstawiony na rysunku 18d histogram charakteryzuje się wyższym udziałem większych nanocząstek w porównaniu do rozkładu uzyskanego dla układu modelowego PVP-AgNPs 75 nm zawieszonych w wodzie

Milli-Q (Rys. 13b), co wskazuje na wystąpienie zjawiska agregacji. Wykryto również większą liczbę NPs (~ 900 vs. ~ 700 NPs). Wartości odzysków dla nanocząstek srebra wyniosły $143,9 \pm 17,1\%$, natomiast dla srebra jonowego $96,8 \pm 10,3\%$. Powyższe obserwacje wskazują na potencjalne problemy, które mogą wystąpić podczas oznaczania AgNPs w bogatszych w matrycę próbkach biologicznych i środowiskowych.

7.2. Parametry analityczne metody sp ICP MS

W wybranych warunkach, stosując jako stabilizator 0,1% Triton X-100 dokonano charakterystyki jakościowej wzorców nanocząstek srebra firmy NanoComposix stabilizowanych PVP (PVP-AgNPs) oraz cytrynianem sodu (c-AgNPs). Dla obu serii wzorców uzyskano zbliżone histogramy przedstawiające rozmiar nanocząstek (Rys. 19a, 19b) i nie wykryto frakcji jonowej srebra. Wyznaczono również teoretyczną wartość granicy wykrywalności rozmiarów AgNPs (LOD_{size}) dla układów modelowych PVP-AgNPs stabilizowanych 0,1% Tritonem X-100 oraz 0,1% Tritonem X-100 z dodatkiem 0,1% TMAH. W celu określenia LOD_{size} wykreślono zależność średniej liczby zliczeń od średnicy AgNPs podniesionej do potęgi trzeciej [432,447] (Rys. 19c, 19d). Średnia liczba zliczeń rejestrowana była przy stałej wartości stężenia liczbowego ($2,12 \cdot 10^7 L^{-1}$) dla PVP-AgNPs o rozmiarach 30, 40, 60, 75 oraz 80 nm. Wyznaczono również granice wykrywalności metody oraz precyzję oznaczania masy i rozmiarów nanocząstek wyrażoną jako względne odchylenie standardowe uzyskane przy pomiarach $50 ng L^{-1}$ PVP-AgNPs 75 nm ($n = 5$). Parametry analityczne metody wyznaczono również przy użyciu arkusza kalkulacyjnego opracowanego przez Laborde et al. [433] (Tab. 22).



Rysunek 19. Rozkłady wielkości cząstek uzyskane dla wzorców: **(a)** PVP-AgNPs oraz **(b)** c-AgNPs; Zależności średniej liczby zliczeń od średnicy PVP-AgNPs uzyskane dla układów z: **(c)** 0,1% Tritonem X-100 oraz **(d)** 0,1% Tritonem X-100 + 0,1% TMAH

Tabela 22. Parametry analityczne metody sp ICP MS uzyskane dla układów modelowych

Układ	Granice wykrywalności			Precyzja (RSD [%]) (n = 5)		RF [kcps ($\mu\text{g L}^{-1}$) ⁻¹] (*wzrost RF)
	Rozmiar [nm]	Stężenie liczbowe	Stężenie masowe	Określenie rozmiaru	Oznaczenie masy	
0,1% Triton X-100	17 22 ^a 10 ^b	$9,9 \cdot 10^5 \text{ L}^{-1}$ $5,9 \cdot 10^4 \text{ g}^{-1}$	$0,09 \text{ ng L}^{-1}$ $0,01 \text{ ng g}^{-1}$	0,8 1,1 ^c	4.0	$44,3 \pm 8,6$ (n = 14) *1,00
0,1% TMAH + 0,1% Triton X-100	20 17 ^a 11 ^b	$9,7 \cdot 10^5 \text{ L}^{-1}$ $5,8 \cdot 10^4 \text{ g}^{-1}$	$0,11 \text{ ng L}^{-1}$ $0,01 \text{ ng g}^{-1}$	0,7 0,7 ^c	3.9	$67,8 \pm 2,8$ (n = 2) *1,53

RF – współczynnik odpowiedzi wzorca jonowego,

^a wyznaczony na podstawie zależności średniej liczby zliczeń od średnicy AgNPs podniesionej do potęgi trzeciej,

^b BED – obliczony przez oprogramowanie,

^c odtwarzalność (n = 14),

* wzrost wartości RF względem wartości uzyskanych dla 0,1% Tritonu X-100.

Teoretycznie najmniejszy rozmiar nanocząstek możliwy do wykrycia techniką sp ICP MS przy użyciu spektrometru Agilent 8800 ICP-QQQ wyniósł 17 - 22 nm. Podany przedział jest zgodny z wartościami literaturowymi uzyskiwanymi dla próbek o prostej matrycy, przy

zastosowaniu milisekundowych czasów pomiaru (t_{pom}) (Tab. 14, np. [417,438,447,448]). Granica wykrywalności rozmiaru obliczona dla kalibracji w roztworze 0,1% TMAH + 0,1% Triton X-100 ($\text{LOD}_{\text{size}} = 20 \text{ nm}$) jest bardzo zbliżona do wartości wyznaczonej przez Abad-Alvaro et al. [445] dla układu 2,5% TMAH + 0,1% Triton X-100 ($\text{LOD}_{\text{size}} = 19 \text{ nm}$). Granice oznaczalności (obliczone jako 3-krotność LOD) dla układu 0,1% TMAH + 0,1% Triton X-100 wyniosły $2,9 \cdot 10^6 \text{ L}^{-1}$ ($1,7 \cdot 10^5 \text{ g}^{-1}$) oraz $0,3 \text{ ng L}^{-1}$ ($0,02 \text{ ng g}^{-1}$).

Współczynnik odpowiedzi wzorca jonowego (RF) dla układów z dodatkiem 0,1% TMAH był o 53% wyższy niż w przypadku układu zawierającego tylko Triton X-100 (Tab. 22). Podobne rezultaty uzyskali Vidmar et al. [369], którzy odnotowali 54% wzrost wartości RF dla Au^{3+} w obecności 1% TMAH w porównaniu do współczynnika odpowiedzi wzorca jonowego w czystej wodzie. Powyższe zjawisko jest konsekwencją wzrostu efektywności wprowadzania próbki do strumienia plazmy z 6 - 8% do ~ 11%.

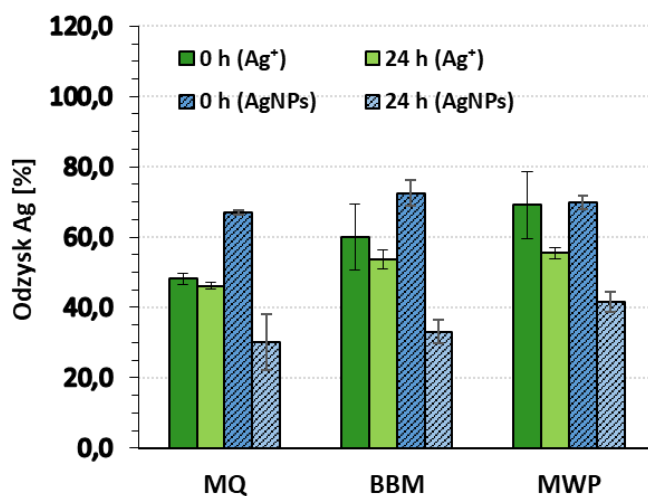
Badania wykazały wyraźny wpływ wzrostu stężenia frakcji jonowej oraz obecności innych składników próbki (np. 0,1% TMAH) na zwiększenie wartości BED, co przekłada się również na wzrost wartości granic wykrywalności rozmiarów cząstek. Dlatego podczas oznaczania srebra w próbkach środowiskowych można spodziewać się wyższych wartości LOD_{size} od podanych w tabeli 22. Należy również zaznaczyć, że wyznaczone różnymi metodami wartości teoretycznie najmniejszych możliwych do wykrycia NPs (BED, LOD_{size}) często nie odzwierciedlają rzeczywistych możliwości oznaczenia nanocząstek w próbkach zawierających złożoną matrycę. Wartości LOD_{size} podawane w większości prac obecnych w literaturze (Tab. 14 i 16) wyznaczone są dla czystych roztworów stosowanych do kalibracji aparatu.

7.3. Wpływ matrycy próbki na oznaczanie srebra techniką sp ICP MS oraz stabilność Ag^+/AgNPs

W celu zbadania wpływu matrycy próbki na oznaczanie Ag^+ i AgNPs techniką sp ICP MS sporządzono roztwory zawierające $5 \mu\text{g L}^{-1}$ srebra w formie jonowej lub nanocząstek o rozmiarach 60 nm w wodzie Milli-Q (MQ), pożywce BBM (BBM) lub 10-krotnie rozcieńczonej pożywce BBM z dodatkiem 1 mg L^{-1} kwasu humusowego (MWP) ($\text{pH} = 6,53$). Woda Milli-Q jest pozbawiona praktycznie wszystkich składników nieorganicznych i organicznych, natomiast pożywka BBM zawiera w swoim składzie duże ilości soli nieorganicznych oraz EDTA, których obecność zapewnia optymalny wzrost glonów. Ostatnie medium - modelowa woda powierzchniowa (MPW) odtwarzało skład wody

powierzchniowej o stosunkowo niskiej zawartości naturalnej materii organicznej (NOM), którą reprezentuje kwas humusowy [320]. Zastosowanie w badaniach wystandaryzowanej wody modelowej umożliwiło prowadzenie wszystkich eksperymentów w odtwarzalnych warunkach. Stosowane w badaniach wstępnych naturalne wody powierzchniowe charakteryzowały się dość dużym zróżnicowaniem składu matrycy oraz ograniczoną stabilnością w czasie przechowywania. Po rozmrożeniu przefiltrowanych próbek wody rzecznej obserwowano wytrącanie się osadu. Skład i sposób przygotowania powyższych układów modelowych opisano w rozdziale 6.1.

Analizę specjacyjną srebra techniką sp ICP MS przeprowadzono bezpośrednio po dodaniu analitu do badanego medium (0 h) oraz po 24-godzinnym mieszaniu w kontrolowanych warunkach (24 h). W przypadku pomiaru bezpośrednio po dodaniu srebra rzeczywisty czas pomiędzy sporządzeniem roztworu, a zarejestrowaniem sygnału nie przekraczał 15 min. Nie zaobserwowano również spadku liczby zliczeń w przypadku kolejnych powtórzeń, co wskazuje na szybkie ustalenie się równowagi w badanych układach. Przed pomiarem roztwory zawierające srebro w formie jonowej lub nanocząstek o rozmiarach 60 nm rozcieńczano odpowiednio 5 lub 100-krotnie 0,1% Tritonem X-100. We wszystkich układach badanych bezpośrednio po dodaniu Ag^+ lub PVP-AgNPs 60 nm zaobserwowano straty analitu na poziomie 27,5 – 51,9% (Rys. 20) związane z adsorpcją srebra na ściankach kolb Erlenmeyera. Najniższe wartości odzysków badanych form srebra uzyskano w układach, w których matrycę próbki stanowiła woda Milli-Q (Tab. 23).



Rysunek 20. Wartości odzysków srebra w różnych mediach, bezpośrednio po dodaniu analitu i po 24 h (MQ – woda Milli-Q, BBM – pożywka, MWP – modelowa woda powierzchniowa)

Tabela 23. Wartości odzysków srebra bezpośrednio po dodaniu analitu oraz po 24 h

Układy zawierające 5 µg L ⁻¹ Ag ⁺			
Medium	Odzysk Ag po 0 h ± SD [%]; n = 2	Odzysk Ag po 24 h ± SD [%]; n = 2	Względny spadek wartości sygnału po 24 h [%]
MQ	48,1 ± 1,7	46,1 ± 1,0	4,3
BBM	60,0 ± 9,4	53,7 ± 2,6	10,6
MWP	69,1 ± 9,6	55,5 ± 1,6	19,6
Układy zawierające 5 µg L ⁻¹ PVP-AgNPs o rozmiarach 60 nm			
Medium	Odzysk Ag po 0 h ± SD [%]; n = 2	Odzysk Ag po 24 h ± SD [%]; n = 2	Względny spadek wartości sygnału po 24 h [%]
MQ	67,0 ± 0,5	30,1 ± 7,9	55,1
BBM	72,5 ± 3,6	33,0 ± 3,3	54,5
MWP	69,9 ± 1,8	41,6 ± 2,8	40,5

Obecność EDTA i składników nieorganicznych wchodzących w skład pożywki BBM oraz kwasu humusowego miała pozytywny wpływ na wartości odzysków jonów Ag⁺ bezpośrednio po dodaniu analitu. Wartości odzysków srebra jonowego w układach zawierających wodę Milli-Q, pożywkę BBM oraz MWP wyniosły odpowiednio: 48,1%, 60,0% oraz 69,1%. Po 24 h we wszystkich badanych układach wartości odzysków Ag⁺ spadły do podobnego poziomu (46,1 – 55,5%), przy czym najniższą wartość odnotowano w przypadku wody Milli-Q, a najwyższą w medium zawierającym kwas humusowy.

Odzysk nanocząstek srebra bezpośrednio po dodaniu analitu do wszystkich badanych układów wyniósł ok. 70%. Po 24 godzinach względny spadek wartości sygnału PVP-AgNPs 60 nm w wodzie Milli-Q, pożywce BBM oraz 10-krotnie rozcieńczonej pożywce BBM z dodatkiem 1 mg L⁻¹ HA wyniósł odpowiednio 55,1%, 54,5% oraz 40,5%. Najmniejszy spadek wartości sygnału AgNPs po 24 h odnotowano w układach zawierających kwas humusowy. Wyniki te są zgodne z literaturą, gdyż pozytywny wpływ substancji organicznych na stabilność nanocząstek był już opisany [475,476]. Efekt ten związany jest z odpychaniem elektrostatycznym NPs po pokryciu ich powierzchni NOM. Zmiana siły jonowej prowadzi do niewielkiego wzrostu stabilności NPs w czasie jednak efekt związany z obecnością NOM jest dominujący.

W układach, gdzie srebro nie jest w żaden sposób stabilizowane często obserwowane są straty analitu wynikające z adsorpcji Ag na powierzchni naczyń laboratoryjnych [442] oraz układu wprowadzającego próbkę [477].

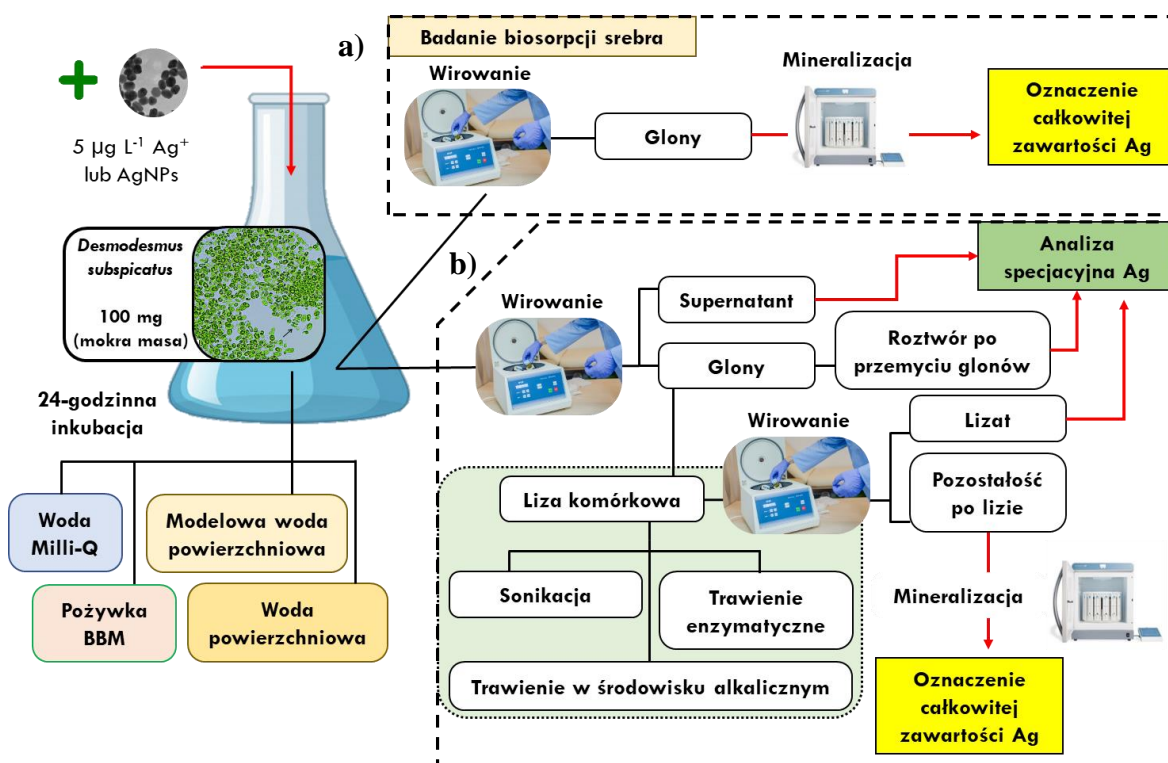
Lepszych rezultatów pod względem odzysków srebra można spodziewać się w przypadku zawiesin glonów, gdyż ich komórki ze względu na obecność na powierzchni ściany komórkowej substancji egzopolimerowych są w stanie wiązać metale ciężkie obecne w otaczającym je medium [82].

W kolejnej serii eksperymentów zbadano stabilność Ag^+ i AgNPs w wodzie Milli-Q, pożywce BBM oraz MWP zawierających komórki glonów. Badania potwierdziły, że obecność materiału biologicznego znacznie ogranicza adsorpcję obu form analitu na powierzchni naczyń, co może być związane z silnym oddziaływaniem srebra z substancjami egzopolimerowymi wydzielanymi przez glony oraz składnikami ściany komórkowej. Odzyski srebra po 24 h inkubacji komórek glonów z Ag^+ lub AgNPs w badanych układach mieściły się odpowiednio w przedziałach 97,4 – 106,3% oraz 90,0 – 113,6%.

8. Badanie biosorpcji i analiza specjacyjna srebra w glonach oraz otaczającym je środowisku

W tym rozdziale opisano badania dotyczące biosorpcji różnych form srebra przez glony, a następnie badania specjacji srebra w komórkach glonów i otaczającym je medium. Przygotowanie komórek glonów do badań oraz procedurę ich inkubacji ze srebrem opisano w rozdziale 6.3. Warto podkreślić, że badania prowadzono stosując śladowe ilości srebra, na poziomach występujących w zanieczyszczonych wodach powierzchniowych [160]. Badania biosorpcji opisane w literaturze prowadzone są często w obecności wysokich stężeń NPs na poziomach rzędu mg L^{-1} [389] oraz w układach nie zawierających innych substancji, które mogą mieć istotny wpływ na przebieg tego procesu.

Na rysunku 21 przedstawiono schematy postępowania stosowane podczas badań efektywności biosorpcji (Rys. 21a) oraz specjacji srebra (Rys. 21b).



Rysunek 21. Schemat przygotowania próbek do: (a) badania biosorpcji oraz (b) analizy specyjacyjnej $Ag^+/AgNPs$. Całkowitą zawartość srebra oznaczano techniką ICP MS. W analizie specyjacyjnej srebra stosowano technikę sp ICP MS.

8.1. Biosorpcja Ag^+ i $AgNPs$ przez glony *Desmodesmus subspicatus* w układach wodnych

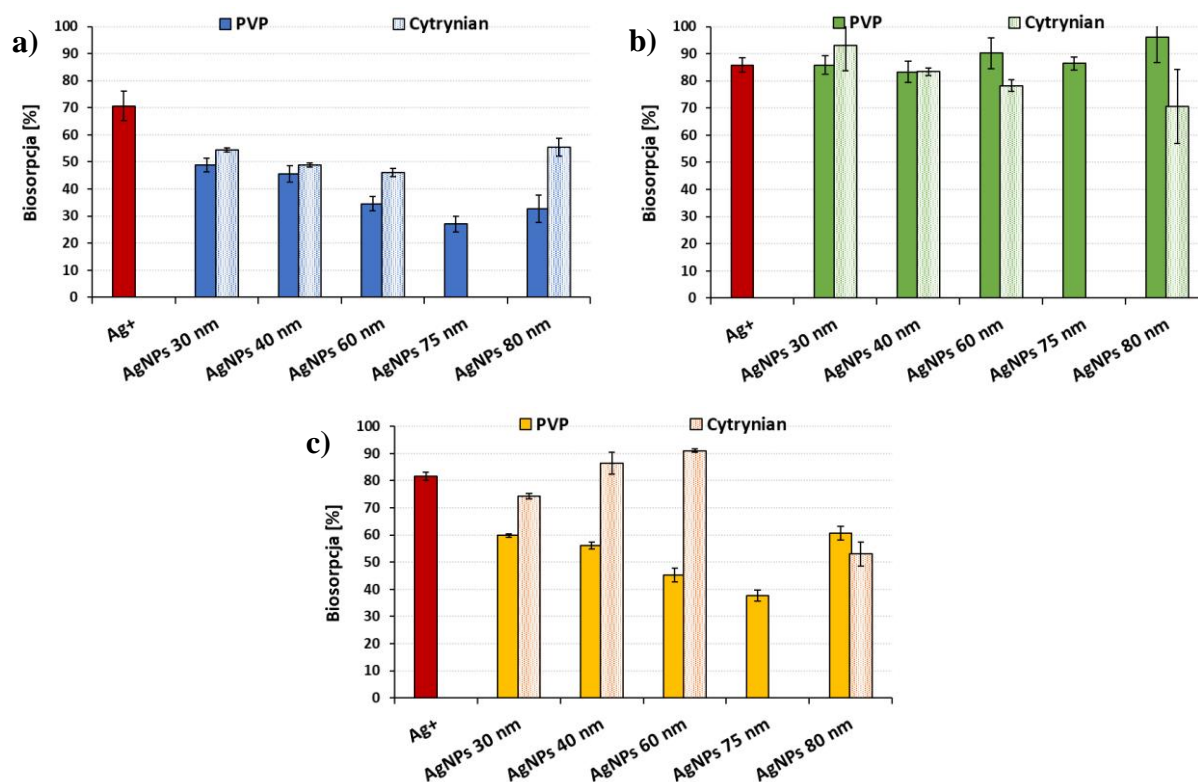
Srebro może wchodzić w interakcję z glonami ulegając sorpcji (biosorpcji) w miejscach aktywnych występujących na powierzchni komórek oraz bioakumulacji wewnątrz komórek w procesie związanym z metabolizmem komórkowym. Pobieranie NPs przez komórki może zachodzić w wyniku endocytozy lub biernej dyfuzji przez ścianę komórkową. Biosorpcja jest procesem szybkiego, odwracalnego wiązania metali przez biomasę, który ma charakter bierny. Może dochodzić do adsorpcji fizycznej oraz chemicznej metali, która jest następstwem takich procesów jak kompleksowanie, chelatowanie, mikrostrącanie oraz wymiana jonowa.

Efektywność biosorpcji (w skrócie biosorpcję) ($B(\%)$) zdefiniowano jako stosunek całkowitej masy analitu oznaczonej w komórkach glonów po ich mineralizacji ($m_{całkowita}$) do masy nominalnej dodanej do układu modelowego (m_{dodana}), wyrażony w procentach (równanie 13). Parametr ten określa jaka część analitu uległa procesom bioakumulacji i adsorpcji na powierzchni komórek. Parametr ten wyrażono również jako masę srebra przypadającą na gram suchej masy glonów ($mg\ g^{-1}$) i oznaczono literą U.

$$B(\%) = \frac{m_{\text{całkowita}}}{m_{\text{dodana}}} \cdot 100\% \quad (13)$$

Efektywność biosorpcji Ag^+ oraz AgNPs o rozmiarach 30, 40, 60, 75 i 80 nm przez glony *Desmodesmus subspicatus* badano w wodzie Milli-Q (MQ), pożywce BBM (BBM) oraz modelowej wodzie powierzchniowej (MWP). W badaniach wykorzystano dwa rodzaje wzorców AgNPs różniące się sposobem stabilizacji nanocząstek. Pierwsza seria wzorców nanocząstek srebra stabilizowana była sterycznie za pomocą PVP, natomiast druga elektrostatycznie jonami cytrynianowymi. Komórki glonów po 24 h inkubacji oddzielono od badanego medium i zmineralizowano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 6.5.3. Mineralizaty rozcieńczono wodą Milli-Q do otrzymania końcowego stężenia HNO_3 wynoszącego 5%. Całkowitą zawartość srebra w glonach *Desmodesmus subspicatus* oznaczono techniką ICP MS w warunkach pomiarowych przedstawionych w tabeli 17.

Efektywność biosorpcji badanych form srebra przez komórki glonów zawieszonych w układach o różnej matrycy, po inkubacji przedstawiono na rysunku 22. Najniższą efektywność biosorpcji srebra zaobserwowano w układach, w których komórki glonów zawieszono były w wodzie Milli-Q, natomiast najwyższą w pożywce BBM (Tab. 24).



Rysunek 22. Biosorpcja Ag^+ i AgNPs stabilizowanych PVP oraz jonami cytrynianowymi przez komórki glonów po 24 h inkubacji w: (a) wodzie Milli-Q (MQ), (b) pożywce BBM (BBM) oraz (c) modelowej wodzie powierzchniowej (MWP) ($n = 2$)

Tabela 24. Efektywność biosorpcji różnych form srebra na komórkach glonów po 24 h inkubacji w układach o różnej matrycy

Forma analitu	Woda Milli-Q (MQ)		Pożywka BBM (BBM)		Modelowa woda powierzchniowa (MWP)	
	*B ± SD [%]	**U ± SD [mg g ⁻¹]	*B ± SD [%]	**U ± SD [mg g ⁻¹]	*B ± SD [%]	**U ± SD [mg g ⁻¹]
Ag ⁺	70,7 ± 5,4	6,3 ± 0,3	85,8 ± 2,7	7,2 ± 0,1	81,5 ± 1,5	6,5 ± 0,1
PVP-AgNPs 30 nm	48,9 ± 2,5	4,2 ± 0,5	85,8 ± 3,5	7,6 ± 0,4	59,8 ± 0,6	6,0 ± 0,1
PVP-AgNPs 40 nm	45,5 ± 3,0	4,0 ± 0,2	83,3 ± 4,0	7,7 ± 0,3	56,1 ± 1,2	5,5 ± 0,3
PVP-AgNPs 60 nm	34,6 ± 2,6	3,1 ± 0,1	90,2 ± 5,7	7,9 ± 0,2	45,2 ± 2,5	4,6 ± 0,4
PVP-AgNPs 75 nm	27,0 ± 3,0	2,2 ± 0,4	86,4 ± 2,4	8,0 ± 0,1	37,7 ± 2,0	3,9 ± 0,2
PVP-AgNPs 80 nm	32,6 ± 5,0	2,4 ± 0,2	96,0 ± 9,3	8,7 ± 0,2	60,6 ± 2,5	6,3 ± 0,1
c-AgNPs 30 nm	54,4 ± 0,7	5,4 ± 0,8	93,2 ± 9,3	8,6 ± 1,2	74,3 ± 1,1	6,7 ± 0,2
c-AgNPs 40 nm	48,8 ± 0,8	5,0 ± 0,1	83,4 ± 1,4	8,1 ± 0,1	86,4 ± 4,1	7,3 ± 0,3
c-AgNPs 60 nm	46,1 ± 1,4	4,7 ± 0,3	78,2 ± 2,2	8,6 ± 0,2	91,0 ± 0,6	7,4 ± 0,1
c-AgNPs 80 nm	55,4 ± 3,4	6,4 ± 0,4	70,6 ± 13,7	7,4 ± 0,2	53,0 ± 4,4	4,5 ± 0,5
*B – Biosorpcja, n = 2, **U – Pobieranie, n = 2.						

Eksperyment wykazał, że podział srebra jonowego między roztworem testowym a glonami zależy w niewielkim stopniu od obecności innych substancji w badanym medium (Tab. 24). Biosorpcja AgNPs przez glony w wodzie Milli-Q zależy od rozmiarów nanocząstek i spada z 54,4% do 27,0% wraz ze wzrostem średnicy NP (w przedziale 30 – 75 nm). Odstępstwo od tej zależności występowało w przypadku AgNPs o rozmiarach 80 nm w układach MQ i MWP (Rys. 22, Tab. 24). Biosorpcja AgNPs w modelowej wodzie powierzchniowej w przypadku wzorców stabilizowanych PVP była o 10,6 – 28,0 punktów procentowych wyższa niż w wodzie MQ i zaobserwowano podobną zależność B(%) od rozmiarów nanocząstek. W układach z modelową wodą powierzchniową obie serie wzorców wykazywały duże zróżnicowanie pod względem wartości biosorpcji. Szczególnie w przypadku wzorców AgNPs o rozmiarach 60 nm, gdzie efektywność biosorpcji nanocząstek stabilizowanych cytrynianem była ponad 2-krotnie wyższa. W pożywce BBM, która zawierała najwyższe stężenia kationów metali, odnotowano najefektywniejszą biosorpcję srebra od 78,2 do 96,0%. W ujęciu masowym największe pobieranie Ag⁺ i AgNPs przez glony nastąpiło w pożywce BBM, mniejsze w MWP, a najmniejsze w wodzie MQ (Tab. 24). Na tej podstawie można stwierdzić, że na pobieranie srebra przez *D. subspicatus*

istotny wpływ mają warunki środowiskowe. Wyniki uzyskane w czystej wodzie MQ istotnie różnią się od rezultatów otrzymanych w pozostałych układach. Dlatego szczególnie nacisk należy położyć na badania z udziałem składników występujących w matrycach próbek rzeczywistych, których obecność wpływa na przebieg biosorpcji i stabilność różnych form srebra.

Obserwowany wzrost efektywności biosorpcji AgNPs wraz ze wzrostem udziału innych składników obecnych w badanych układach może być również konsekwencją zastosowania wirowania w celu oddzielania glonów od otaczającego je medium. Można przypuszczać, że w układach z pożywką BBM, zawierającą bardzo duże ilości składników nieorganicznych, podczas odwirowywania glonów dochodziło do całkowitej sedymentacji AgNPs, przez co wszystkie badane NPs niezależnie od rozmiaru i sposobu stabilizacji opadały na dno i były łatwiej wiązane przez komórki glonów. Przy czym należy zaznaczyć, że glony po odwirowaniu były przemywane w celu usunięcia srebra słabo związanego z materiałem biologicznym. W modelowej wodzie powierzchniowej, przy 10-krotnie niższym stężeniu soli nieorganicznych efekt ten mógł mieć mniejsze znaczenie przez co zależność biosorpcji PVP-AgNPs od rozmiarów NPs miała podobny charakter do analogicznej zależności wyznaczonej dla układów niezawierających dodatkowych składników (MQ). Ciekawe wyniki uzyskano dla wzorców AgNPs stabilizowanych elektrostatycznie w układach stanowiących modelową wodę powierzchniową. Otrzymane w tym przypadku wartości biosorpcji mogą być związane z neutralizacją ładunku powierzchniowego nanocząstek przez kationy metali obecne w układzie, przez co łatwiej dochodziło do wiązania AgNPs przez ujemnie naładowane komórki glonów. Powyższy efekt nie występował w wodzie Milli-Q, gdzie przebieg biosorpcji srebra w przypadku obu sposobów stabilizacji nanocząstek miał podobny charakter.

Trudno jest porównać efektywność biosorpcji różnych form srebra z danymi literaturowymi, ponieważ dla różnych gatunków organizmów modelowych podawane są głównie wartości EC50 lub IC50 (stężenia przy których uzyskiwane jest 50% maksymalnej odpowiedzi) (np. [76]). W pracy [478] stwierdzono jednak, że żywe komórki słodkowodnych glonów *Parachlorella kessleri* są w stanie usunąć 68% srebra jonowego w ciągu 24 godzin, co jest bardzo zbliżone do danych uzyskanych w tym badaniu. Porównanie danych dotyczących biosorpcji AgNPs jest jeszcze trudniejsze, ponieważ efektywność tego procesu zależy również od rozmiaru, kształtu i rodzaju stabilizacji AgNPs. Biosorpcja srebra po 24-godzinnej ekspozycji słodkowodnych glonów *Raphidocelis subcapitata* na AgNPs (3 – 8 nm, pokryte materiałem alkanowym) przy stężeniach 15 i 30 mg L⁻¹ wyniosła odpowiednio 21

i 31%, a pobieranie 45,0 i 93,7 mg g⁻¹ s.m. Glony narażone na działanie Ag⁺ (w formie AgNO₃) osiągnęły 2-3-krotnie wyższe współczynniki biokoncentracji srebra [479]. Wiadomo jednak, że procesy biosorpcji zachodzące w środowisku naturalnym zależą od indywidualnych właściwości organizmów żywych, formy specjacyjnej metalu oraz licznych czynników związanych z otoczeniem, takich jak siła jonowa, pH, obecność NOM, temperatura i światło opisanych w rozdziale 1.7.

Dlatego w kolejnym etapie badań sprawdzono jakim przemianom ulegają różne formy analitu w glonach oraz otaczającym je wystandaryzowanym i naturalnym środowisku, które stanowiła woda Milli-Q, pożywka BBM oraz woda powierzchniowa (rzeczna).

8.2. Analiza specjacyjna srebra techniką sp ICP MS w zawiesinach glonów

Do zbadania specjacji i transformacji jonów oraz nanocząstek srebra w wodach i organizmach wodnych wykorzystano technikę sp ICP MS. Celem badań było określenie udziału różnych form srebra w komórkach glonów oraz otaczającym je medium po 24 h procesie inkubacji. Analizę specjacyjną form srebra prowadzono w próbkach otrzymanych po podzieleniu układów modelowych na 4 frakcje: w supernatantach, czyli medium po oddzieleniu komórek glonów, roztworach po przemyciu odwirowanych glonów, lizatach komórkowych oraz nierozpuszczonej pozostałości po lizie. Całkowitą zawartość Ag w ostatniej frakcji oraz w próbkach glonów po inkubacji oznaczono techniką ICP MS po ich mineralizacji (Rys. 21b). We wszystkich eksperymentach opisanych w dalszej części pracy stosowano wzorce AgNPs stabilizowane sterycznie za pomocą PVP.

Schemat przeprowadzenia eksperymentu przedstawiono na rysunku 21b. Do kolb zawierających glony zawieszony w wodzie Milli-Q, pożywce BBM oraz wodzie powierzchniowej (WP) dodano Ag⁺ lub AgNPs 40 nm do końcowego stężenia 5 µg L⁻¹. Układy wzbogacone w różne formy srebra inkubowano przez 24 h w standardowych warunkach, szczegółowo opisanych w rozdziale 6.3. Zawiesinę komórkową przeniesiono do szklanej probówki okrągłodennej wraz z dwoma porcjami 2 mL wody Milli-Q, którymi przepłukano kolbę Erlenmeyera. Próbkę wirowano przez 10 min z prędkością 4000 obr./min. Następnie supernatant przeniesiono do pojemnika scyntylicyjnego o poj. 60 mL, a komórki glonów przemyto 5 mL wody Milli-Q w celu usunięcia słabo związanych form srebra. Wodę, którą przemyto komórki glonów przeniesiono do pojemnika o poj. 20 mL, a komórki glonów poddano lizie z wykorzystaniem sondy ultradźwiękowej. Nierozpuszczalną pozostałość po lizie odwirowano i oddzielono od lizatu.

Supernatanty, woda użyta do przemycia glonów oraz lizaty komórkowe zostały odpowiednio rozcieńczone. Srebro w formie jonowej oraz nanocząstek oznaczono w nich techniką sp ICP MS. Kalibrację układu pomiarowego oraz oznaczenia prowadzono w obecności 0,1% Tritonu X-100. Równolegle oznaczano całkowitą zawartość srebra w glonach po oddzieleniu ich od supernatantu i przemyciu. Pierwszego dnia oznaczano Ag^+ i AgNPs w supernatantach oraz roztworach po przemyciu. Kolejnego dnia prowadzono analizę specjacyjną srebra w lizatach komórkowych. Lizaty przechowywano w temperaturze 4°C.

Dokładny opis procedur przygotowania próbek do analizy specjacyjnej, dezintegracji błon komórkowych przy użyciu sondy ultradźwiękowej (Procedura 1) oraz mineralizacji pozostałości po lizie przedstawiono w podrozdziałach: 6.5.1. oraz 6.5.3.

W celu sprawdzenia, czy w trakcie zastosowanej procedury nie następują straty analitu obserwowane wcześniej w układach modelowych nie zawierających materiału biologicznego przeprowadzono bilans masy. W tym celu zsumowano masę srebra oznaczoną w poszczególnych frakcjach (m_{suma}) (równanie 14) i porównano ją z masą srebra dodanego do układu (m_{dodana}). Na tej podstawie obliczono całkowite odzyski srebra. Odzysk wyrażono jako stosunek całkowitej masy srebra oznaczonej we frakcjach po inkubacji i procedurze ekstrakcji do nominalnej masy analitu dodanej do układu (równanie 15).

$$m_{suma} = m_{supernatant} + m_{przemycie} + m_{lizat} + m_{pozostałość} \quad (14)$$

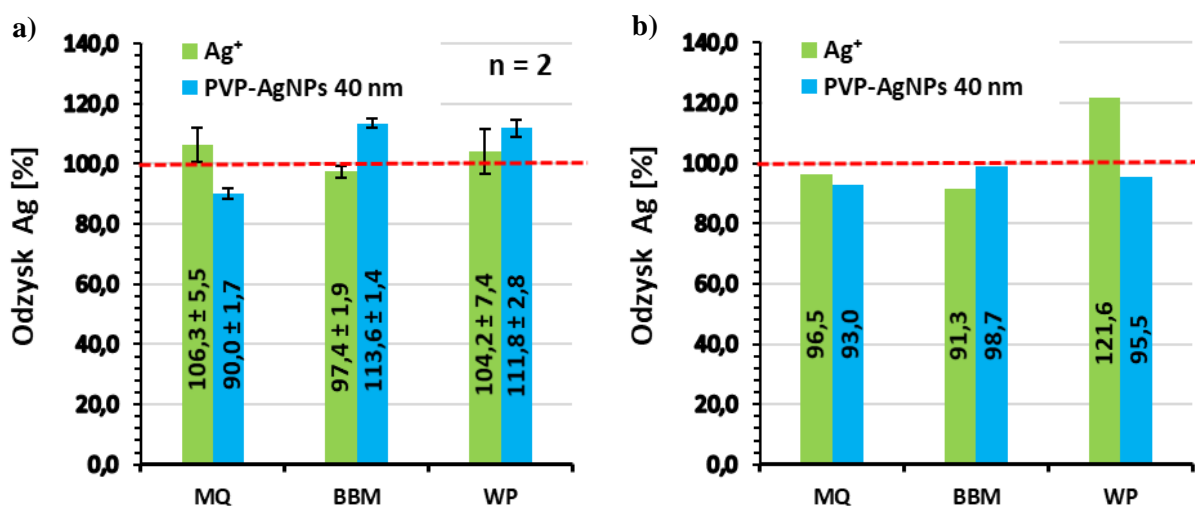
$$R(\%) = \frac{m_{suma}}{m_{dodana}} \cdot 100\% \quad (15)$$

$m_{supernatant}$, $m_{przemycie}$, m_{lizat} , $m_{pozostałość}$ – masy analitu oznaczone odpowiednio w supernatancie, roztworze po przemyciu glonów, lizacie komórkowym oraz nierozpuszczalnej pozostałości po lizie.

Wartości odzysków srebra mieściły się w przedziałach: 88,8 – 110,2% podczas inkubacji w wodzie Milli-Q, 96,1 – 114,6% w pożywce BBM oraz 98,9 – 113,8% w wodzie powierzchniowej (Rys. 23a), co świadczy o braku strat analitu.

W celu sprawdzenia czy procedura lizy komórkowej z użyciem sondy ultradźwiękowej ma wpływ na wyniki ilościowego oznaczenia srebra w układach wzbogaconych w Ag^+ lub AgNPs równolegle przeprowadzono dodatkowy eksperyment, w którym komórki glonów po inkubacji zmineralizowano i oznaczono w nich całkowitą

zawartość srebra techniką ICP MS. Odzysk w tych układach obliczono jako stosunek sumy mas srebra oznaczonych w supernatancie i zmineralizowanych glonach do nominalnej masy Ag dodanej do układu (wyrażony w %). Również w tym przypadku uzyskano ilościowe wartości odzysków (91,3 – 121,6%) (Rys. 23b). Stwierdzono również zgodność sumy mas Ag oznaczonych w lizatach (sp ICP MS) i nierozpuszczalnej pozostałości po lizie (ICP MS) z wartościami uzyskanymi dla zmineralizowanych komórek glonów (ICP MS). W przypadku obu opisanych wyżej eksperymentów całkowite wartości odzysków srebra mieściły się w przedziale: 88,8% - 121,6%. Badania potwierdziły, że obecność materiału biologicznego znacznie ogranicza adsorpcję obu form analitu na powierzchni naczyń laboratoryjnych. Nie stwierdzono wpływu etapu sonikacji na wynik oznaczenia ilościowego obu form srebra.

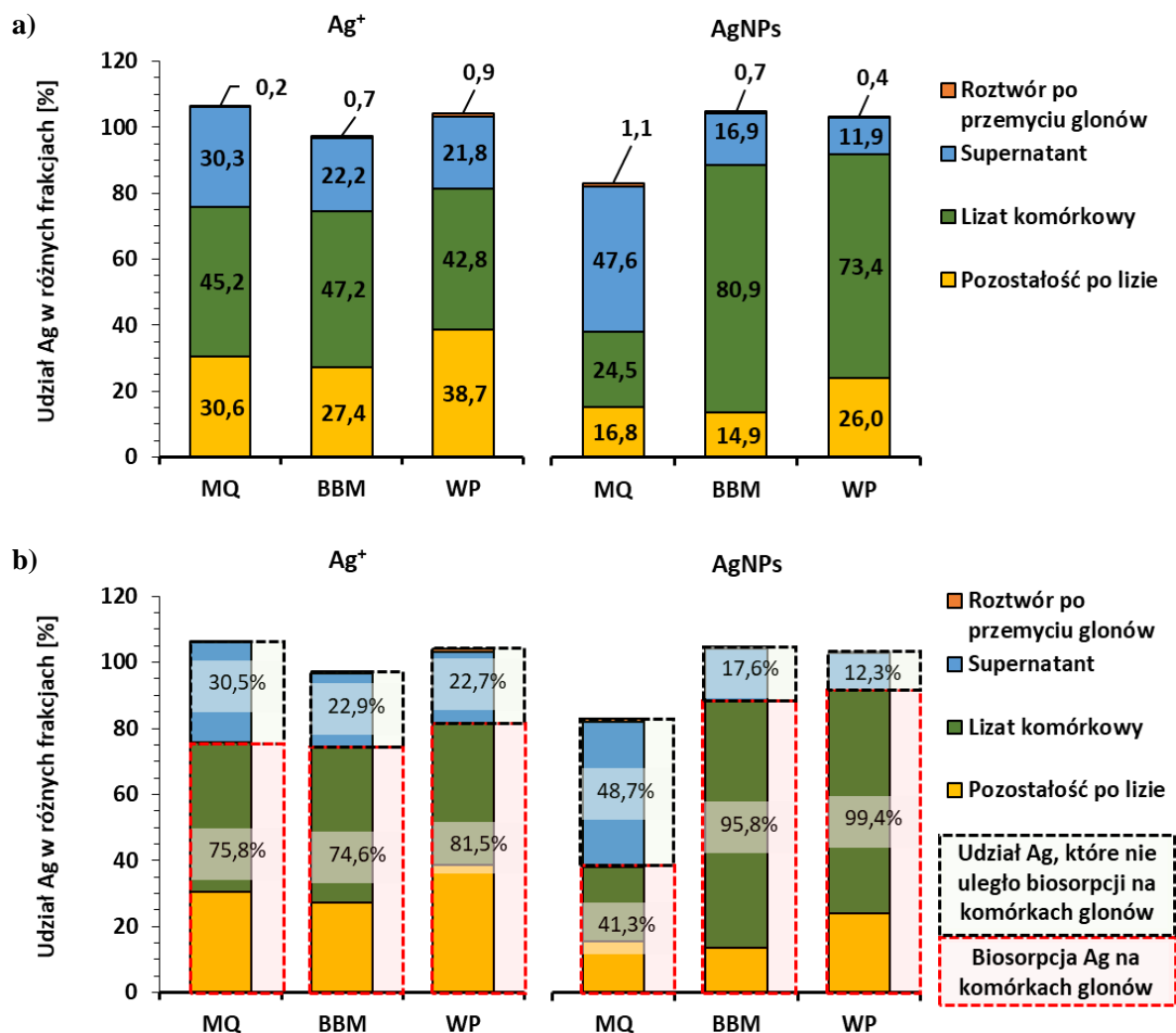


Rysunek 23. Wartości odzysków srebra z układów wzbogaconych w $5 \mu g L^{-1} Ag^+$ lub AgNPs 40 nm po oznaczeniu i zsumowaniu masy Ag w: (a) 4 frakcjach (supernatantach, roztworach po przemyciu glonów, lizatach i nierozpuszczalnej pozostałości po lizie); (b) supernatantach, roztworach po przemyciu oraz zmineralizowanych glonach (MQ – woda Milli-Q, BBM – pożywka BBM, WP – woda powierzchniowa)

Warto również wspomnieć, że aby uniknąć zatkania układu wprowadzającego próbkę przed pomiarami ICP MS, początkowo rozważano oddzielanie lizatów komórkowych glonów od frakcji nierozpuszczalnej przy użyciu filtrów membranowych o średnicy porów $0,22 \mu m$, zgodnie z podejściem proponowanym w literaturze do oznaczania nanocząstek innych metali [385,386]. Jednak podczas badań przeprowadzonych na roztworach wzorcowych stwierdzono występowanie strat analitu podczas etapu filtracji na poziomie około 70% w przypadku Ag^+ oraz 60% w układach z AgNPs. Z tego powodu w badaniach do oddzielania lizatów od pozostałości po lizie zastosowano procedurę wirowania. Należy jednak mieć świadomość, że

podczas wirowania istnieje ryzyko utraty większych nanocząstek wraz z frakcją resztkową. Powyższy efekt zaobserwowano np. podczas wirowania i filtracji próbek mięsa [367].

Udział srebra w poszczególnych frakcjach badanych układów przedstawiono na rysunku 24a. Suma masy srebra oznaczonego w lizacie komórkowym oraz pozostałości po lizie stanowiła masę Ag, która uległa biosorpcji na komórkach glonów *Desmodesmus subspicatus* (Rys. 24b).



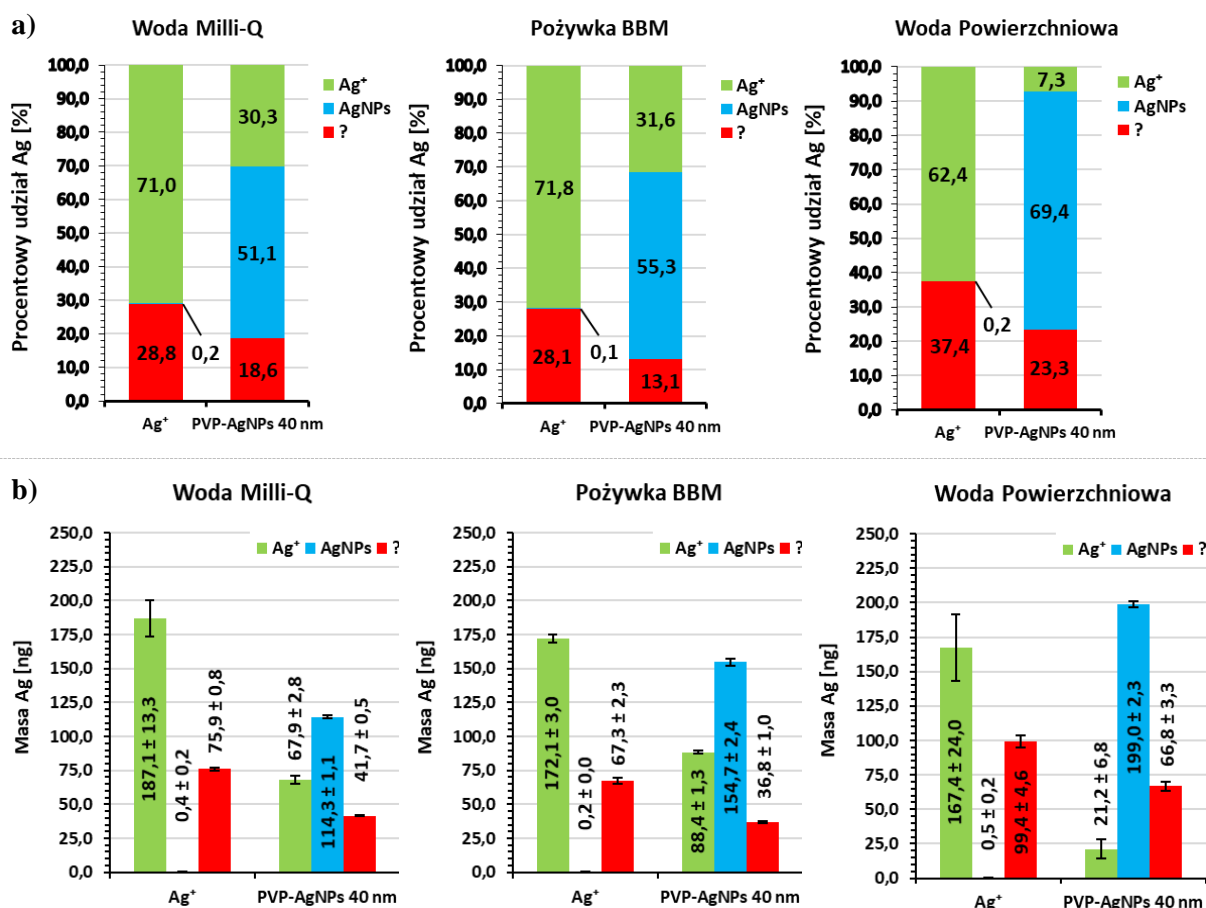
Rysunek 24. (a) Procentowy udział srebra w różnych frakcjach badanych układów wzbogaconych w $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{Ag}^+$ lub AgNPs 40 nm względem ilości Ag dodanej do układu; **(b)** udział srebra, które uległo biosorpcji na komórkach glonów oraz występowało w medium w formie niezwiązanej z materiałem biologicznym (MQ – woda Milli-Q, BBM – pożywka BBM, WP – woda powierzchniowa)

W przypadku układów wzbogaconych w Ag^+ we wszystkich mediach uzyskano podobny obraz podziału srebra pomiędzy poszczególne frakcje. Udział srebra w supernatantach, lizatach oraz pozostałościach po lizie wynosił odpowiednio: 21,8% - 30,3%; 42,8% - 47,2% oraz 27,4% - 38,7% ilości srebra dodanej do układu.

W układzie inkubowanym z AgNPs w wodzie Milli-Q prawie połowa srebra znajdowała się w supernatancie, natomiast w przypadku inkubacji w pozostałych mediach były to wartości nieprzekraczające 17%. Udział Ag w supernatantach, lizatach oraz pozostałościach po lizie mieścił się odpowiednio w przedziałach: 11,9% - 47,6%; 24,5% - 80,9% oraz 14,9 - 26,0% srebra dodanego do układu. Na podstawie otrzymanych wartości określono efektywność biosorpcji Ag^+ oraz AgNPs 40 nm, którą wyrażono jako sumę procentowych udziałów srebra w lizatach komórkowych oraz nierozpuszczalnych pozostałościach po lizie (Rys. 24b). Wyznaczona efektywność biosorpcji Ag^+ w wodzie Milli-Q i pożywce BBM była zgodna z wynikami uzyskanymi w rozdziale 8.1 (75,8% vs. 70,7% oraz 74,6% vs. 85,8%). Identyczne wartości uzyskano w przypadku modelowej wody powierzchniowej (MWP) oraz wody rzecznej (WP) – 81,5%. Dużą zgodność wyznaczonych wartości odnotowano również w układach wzbogaconych w AgNPs 40 nm, gdzie zestawienia efektywności biosorpcji w wodzie Milli-Q i pożywce BBM wyglądały następująco: 41,3% vs. 45,5%; 95,8% vs. 83,3%. Efektywność biosorpcji AgNPs 40 nm w wodzie powierzchniowej wyniosła 99,4%, dla porównania wartość uzyskana w rozdziale 8.1. dla modelowej wody powierzchniowej wyniosła jedynie 56,1%. Powyższe wyniki wskazują na podobny przebieg procesu biosorpcji jonów Ag^+ niezależnie od składu roztworu modelowego. Biosorpcja AgNPs w dużo większym stopniu zależała od środowiska otaczającego organizmy wodne.

Z punktu widzenia analizy środowiskowej i oddziaływania srebra na organizmy żywe (mogące wywoływać działanie toksyczne), ważna jest wiedza w jakiej formie srebro występuje w komórkach glonów i otaczającym je medium oraz czy ulega w takich układach transformacji. Aby znaleźć odpowiedzi na te pytania wykorzystano powyższe wyniki do obliczenia udziału obu form srebra (Ag^+ , AgNPs) w badanych układach. W przypadku układów wzbogaconych w $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{Ag}^+$ lub AgNPs 40 nm (250 ng Ag), w których medium stanowiła woda Milli-Q lub pożywka BBM uzyskano podobny podział oznaczonego srebra na frakcję jonową, nanocząstek oraz całkowitego srebra w nierozpuszczalnej pozostałości po lizie (Rys. 25). Powyższe obserwacje są szczególnie interesujące w przypadku układów z dodatkiem AgNPs 40 nm, dla których po 24-h inkubacji stwierdzono znaczące różnice w efektywności biosorpcji Ag na komórkach glonów w wodzie Milli-Q i pożywce BBM (Rys. 24b). W obu mediach podczas inkubacji około 30% masy dodanych nanocząstek uległo rozpuszczeniu. Inny obraz uzyskano w przypadku wody powierzchniowej, gdzie podczas inkubacji układów z dodatkiem AgNPs 40 nm udział frakcji jonowej nie przekraczał 10% masy dodanych nanocząstek. Mniejsza ilość uwolnionego z AgNPs srebra jonowego

związana jest prawdopodobnie z obecnością substancji organicznych (NOM), które mają korzystny wpływ na stabilność nanocząstek.

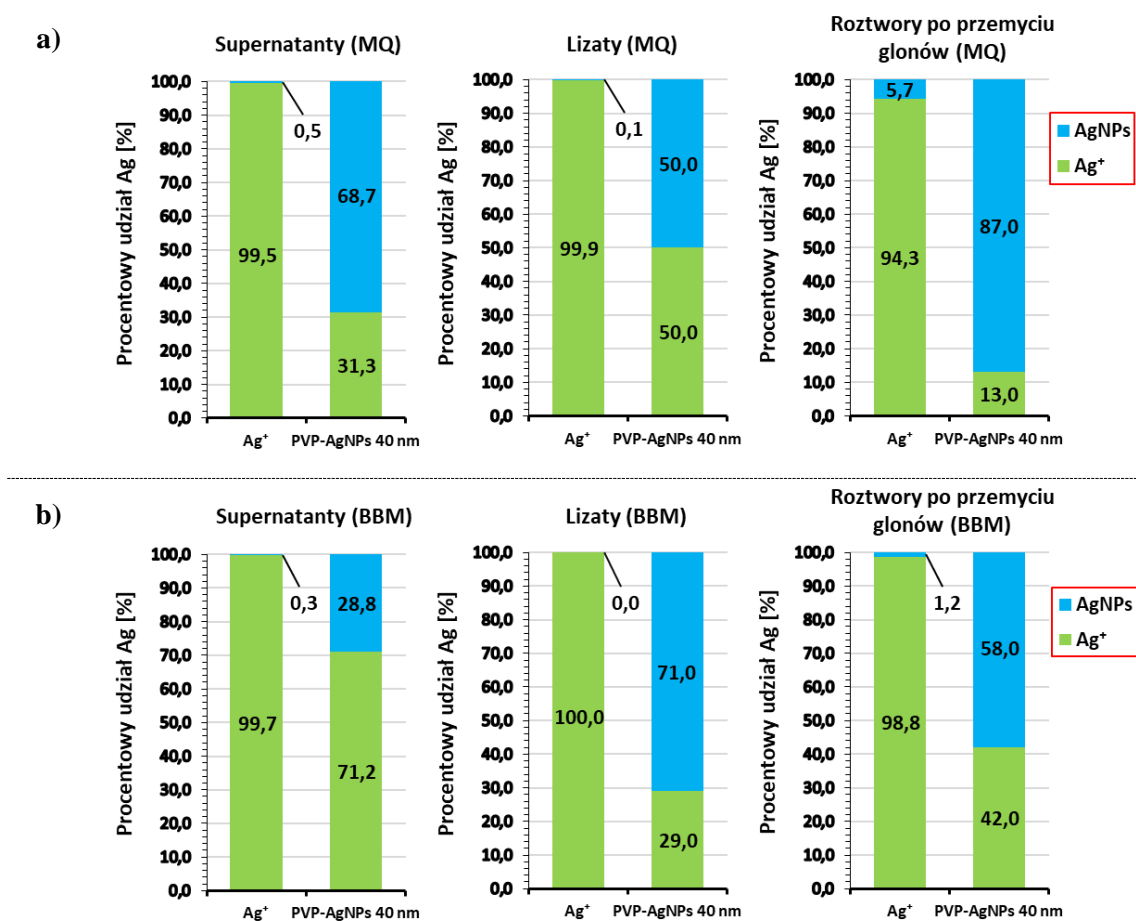


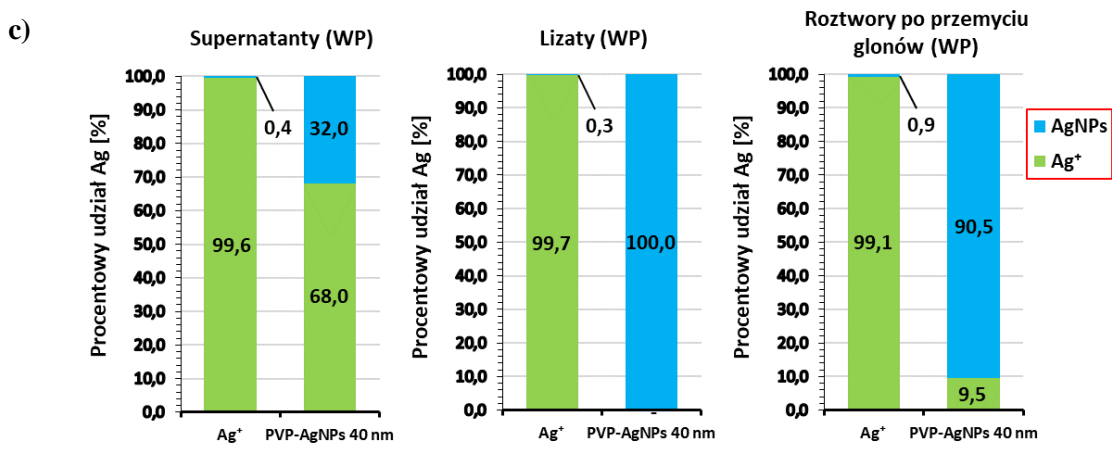
Rysunek 25. Specjacja srebra w układach wzbogaconych w $5 \mu\text{g L}^{-1}$ Ag⁺ lub PVP-AgNPs 40 nm: (a) procentowy udział poszczególnych form srebra w całkowitej masie oznaczonej w układzie, (b) masa poszczególnych frakcji srebra oznaczona w układzie; (?) – całkowite srebro oznaczone w nierozpuszczalnej pozostałości po lizie

Istotnym problemem, który zidentyfikowano stosując opisane podejście jest duży udział srebra w nierozpuszczalnej pozostałości po lizie, czego konsekwencją jest utrata części informacji dotyczących specjacji Ag. W przypadku układów wzbogaconych w Ag⁺ oraz AgNPs 40 nm procentowy udział srebra oznaczonego w pozostałości po lizie mieścił się odpowiednio w przedziałach: 28,1% - 37,4% oraz 13,1% - 23,3%. We wszystkich badanych mediach zawartość srebra w pozostałości po lizie po 24-h inkubacji z dodatkiem Ag⁺ była większa w porównaniu do układów wzbogaconych w AgNPs 40 nm, co może świadczyć o efektywniejszym wiązaniu Ag⁺ przez komórki glonów.

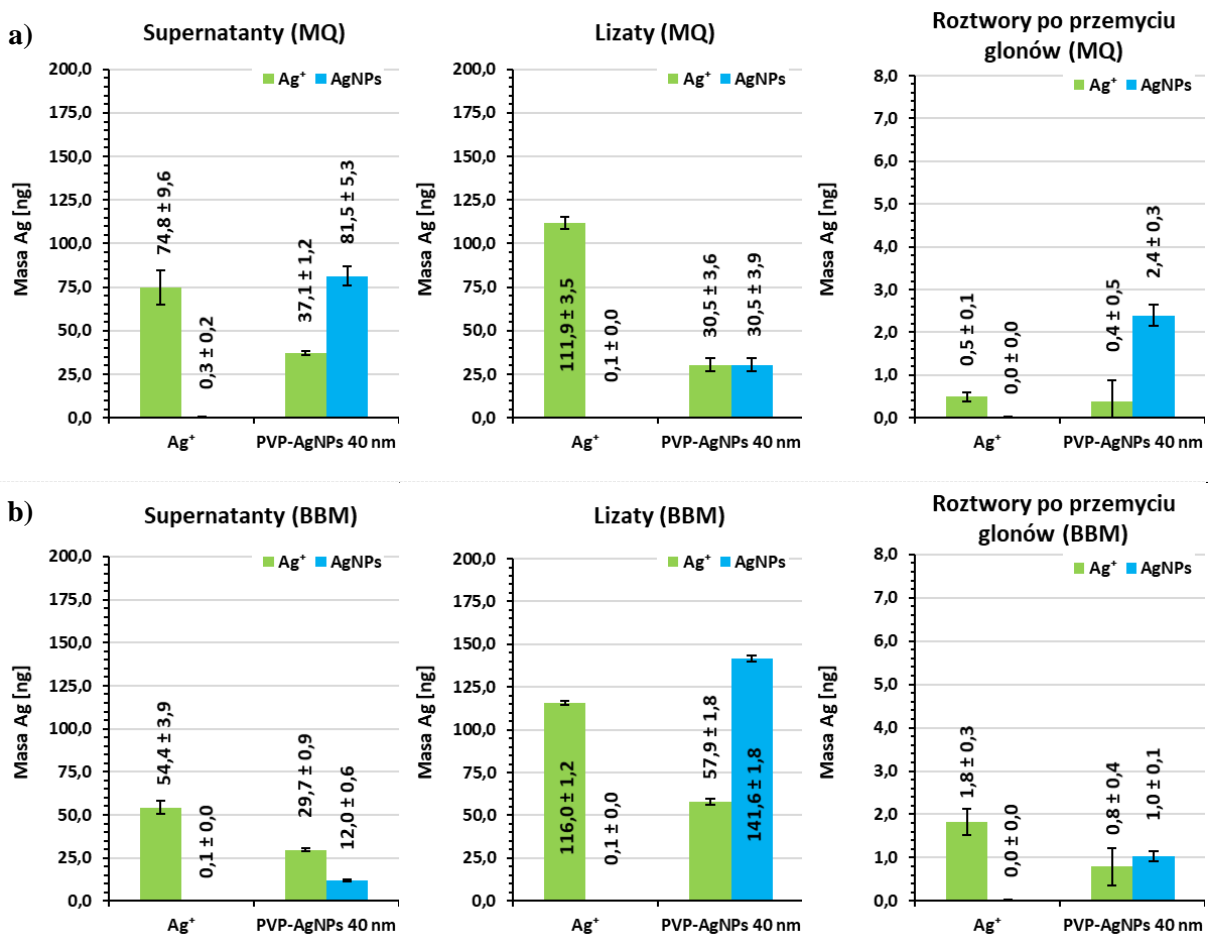
W celu uzyskania bardziej szczegółowych informacji, dotyczących specjacji srebra w supernatantach, lizatach oraz roztworach po przemyciu powyższe wyniki przeliczono

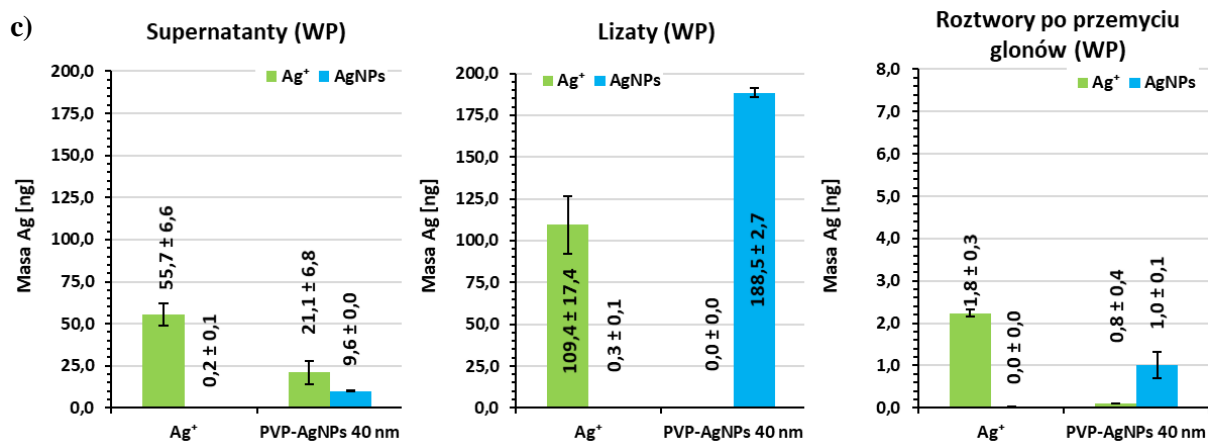
i zestawiono w formie graficznej na rysunkach 26 i 27. Podejście to pozwoliło uzyskać informację na temat transformacji Ag i podziału różnych form srebra pomiędzy poszczególnymi frakcjami badanych układów. W przypadku wszystkich układów wzbogaconych w Ag^+ nie zaobserwowano transformacji dodanej formy srebra. Udział wykrytych nanocząstek nie przekraczał 0,5% całkowitej ilości srebra oznaczonej w supernatancie lub lizacie (Rys. 26). W układach inkubowanych z dodatkiem nanocząstek srebra oznaczono zarówno AgNPs jak i Ag^+ . Stosunek obu form srebra zależał od rodzaju badanej frakcji (supernatant, lizat) oraz od rodzaju medium, w którym prowadzono inkubację. Największą masę AgNPs, które nie uległy biosorpcji oznaczono w medium, które stanowiła woda Milli-Q. W przypadku pożywki BBM oraz wody powierzchniowej uzyskano bardzo podobny udział obu form srebra, przy czym całkowita masa Ag oznaczona w supernatantach była odpowiednio 3- i 4-krotnie niższa niż masa oznaczona w supernatantach otrzymanych po inkubacji glonów w wodzie Milli-Q (Rys. 26 i 27).





Rysunek 26. Procentowy udział Ag⁺ oraz AgNPs oznaczony w różnych frakcjach badanych układów wzbogaconych w 5 µg L⁻¹ Ag⁺ lub AgNPs 40 nm: (a) woda Milli-Q, (b) pożywka BBM, (c) woda powierzchniowa



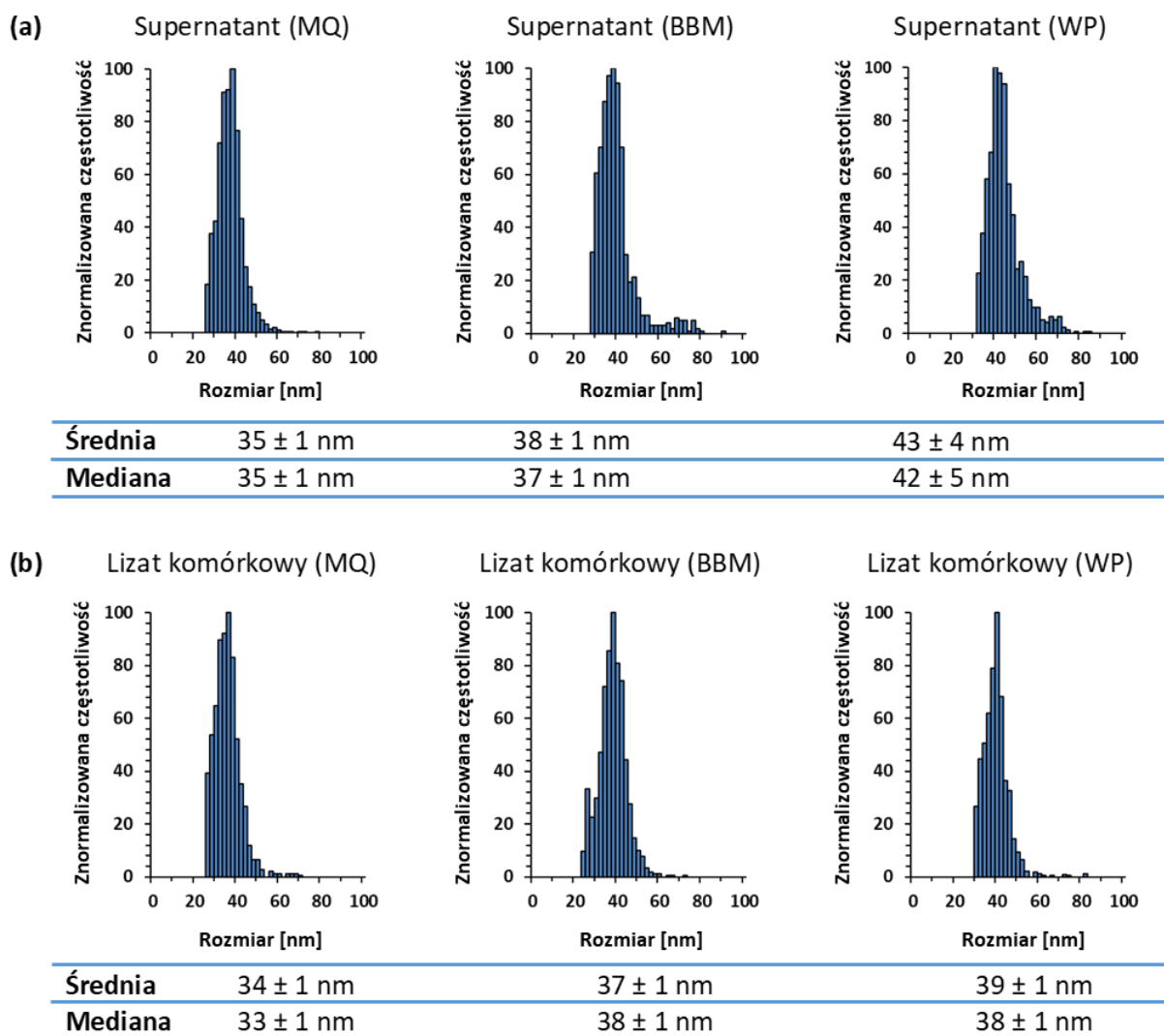


Rysunek 27. Masy Ag^+ oraz $AgNPs$ oznaczone w różnych frakcjach badanych układów wzbogaconych w $5 \mu g L^{-1}$ Ag^+ lub $AgNPs$ 40 nm: (a) woda Milli-Q, (b) pożywka BBM, (c) woda powierzchniowa

W supernatantach pochodzących z układów zawierających pożywkę BBM oraz wodę powierzchniową uzyskano bardzo podobny udział obu form srebra zarówno w ujęciu procentowym jak i masowym. Inny obraz uzyskano w wodzie MQ, czyli układzie pozbawionym dodatkowych składników nieorganicznych (kationów i anionów) oraz związków organicznych (EDTA, NOM). Na rysunku 27 przedstawiono również masy srebra oznaczone w roztworach uzyskanych po przemyciu glonów, których udział w całkowitym srebrze oznaczonym w układach nie przekraczał 1,1%.

Spośród lizatów najmniejsze ilości srebra oznaczono w lizatach komórkowych glonów, które inkubowano w wodzie Milli-Q z dodatkiem $AgNPs$ 40 nm, gdzie połowa oznaczonej masy srebra interpretowana była jako frakcja jonowa. Ponad 3-krotnie wyższe masy srebra oznaczono w pozostałych lizatach. W przypadku pożywki BBM prawie 30% oznaczonego w lizatach srebra interpretowana była jako frakcja jonowa, natomiast w wodzie powierzchniowej całe oznaczone srebro występowało w formie nanocząstek (Rys. 27c).

Zbadano również wpływ różnych mediów na transformację $AgNPs$ podczas procesu inkubacji. Rozkłady wielkości nanocząstek przedstawiono na rysunku 28.



Rysunek 28. Rozkłady wielkości cząstek uzyskane techniką *sp ICP MS* po inkubacji komórek glonów z PVP-AgNPs 40 nm w mediach o zróżnicowanym składzie matrycy w: **(a)** supernatantach oraz **(b)** lizatach uzyskanych po rozbiciu komórek ultradźwiękami

Stwierdzono występowanie agregacji AgNPs w supernatantach układu BBM, który charakteryzował się dużą siłą jonową wynikającą z obecności kationów dwuwartościowych m.in. Ca^{2+} , Mg^{2+} . Zjawisko to jest opisywane w literaturze jako „efekt mostkowania wywołany przez kationy” i może mieć wpływ na losy nanocząstek w wodach twardych. Agregacja AgNPs była niższa w wodzie powierzchniowej, ponieważ obecność naturalnej materii organicznej może zwiększać stabilizację NPs o charakterze elektrostatycznym i sterycznym. Analiza wielkości NP (średnia i mediana rozmiarów) wykazała, że AgNPs 40 nm były częściowo rozpuszczane w wodzie Milli-Q i w mniejszym stopniu w pożywce BBM, ale ich wielkość nie zmieniła się w wodzie powierzchniowej. Powyższe obserwacje są zgodne z wynikami badań dotyczącymi stabilności AgNPs w sztucznych i naturalnych systemach wodnych przeprowadzonych przez Zou et al. [192].

Histogramy rozkładu wielkości nanocząstek zarejestrowane dla poszczególnych lizatów komórkowych (uzyskanych metodą bezpośredniej ekstrakcji, Procedura 1) przedstawiono na rysunku 28b. Wielkość AgNPs w lizatach komórkowych była nieco mniejsza niż w supernatantach. Przy czym należy zaznaczyć, że obraz uzyskany dla tych lizatów nie jest pełny ze względu na fakt, że duża część analitu jest związana z nierozpuszczalną pozostałością po lizie. W literaturze znajdują się doniesienia na temat wykorzystania żywych komórek mikroglonów do syntezy nanocząstek metalicznych w jednoetapowym procesie, do którego dochodzi podczas inkubacji komórek glonów w roztworze wodnym z dodatkiem metalu w formie jonowej [480]. Po syntezie nanocząstki uwalniane są do otaczającego je medium. W swoich badaniach nie zaobserwowałem formowania się AgNPs w supernatantach otrzymanych po biosorpcji Ag^+ przez glony. Dla wszystkich układów wzbogaconych w srebro jonowe frakcja wykrytych nanocząstek nie przekraczała 0,5% całkowitej ilości Ag oznaczonej w supernatancie lub lizacie. Należy jednak zaznaczyć, że mogły powstawać AgNPs znacznie mniejsze niż $\text{LOD}_{\text{size}} \sim 22$ nm. Badania prowadzone w naszym zespole dotyczące glonów *Desmodesmus subspicatus* eksponowanych na działanie jonów złota wykazały, że podczas inkubacji dochodziło do tworzenia AuNPs o rozmiarach 6 – 7 nm [473].

Ze względu na niski udział srebra oznaczonego w roztworach po przemyciu glonów ($\leq 1,1\%$) w stosunku do całkowitej zawartości srebra w układzie (≤ 3 ng vs. ~ 250 ng) dalsze badania prowadzone były z pominięciem tej frakcji. Z równania 14 usunięto zmienną $m_{\text{przemycie}}$.

W badaniach przedstawionych w powyższej części rozprawy opracowano procedurę oddzielania glonów od otaczającego je medium. Badane układy podzielono na 4 frakcje: supernatanty, roztwory po przemyciu glonów, lizaty komórkowe oraz nierozpuszczalną pozostałość po lizie, którą oddzielono od lizatu poprzez odwirowanie. Stwierdzono, że procedura filtracji prowadzi do znaczących strat analitu. We wszystkich układach uzyskane odzyski srebra mieściły się w przedziale 88,8 – 121,6%. Opracowana metoda pozwoliła na częściowe zbadanie transformacji oraz specjacji srebra w układzie woda - glony *D. subspicatus*. Problem w zaproponowanym podejściu stanowiła utrata znacznej części informacji dotyczących specjacji Ag w komórkach glonów. Ze względu na nieefektywne uwalnianie srebra z komórek glonów do roztworu lizatu podczas etapu dezintegracji ścian komórkowych przy użyciu sondy ultradźwiękowej. Powstałe w ten sposób fragmenty komórek dekantują i tworzą frakcję nierozpuszczalnej pozostałości zawierającą od 14,9% do 38,7% srebra dodanego do układu.

Dlatego w dalszej części pracy podjęto próbę opracowania sposobu poprawy efektywności rozkładu ścian komórkowych. W tym celu przetestowano trawienie enzymatyczne w obecności macerozymu R-10 oraz ekstrakcję alkaliczną przy użyciu wodorotlenku tetrametyloamoniowego.

8.3. Optymalizacja procesu lizy komórkowej

Przetestowano dwie często polecane w literaturze strategie przygotowania próbek do analizy specjacyjnej srebra: trawienie enzymatyczne oraz alkaliczne. Enzymatyczne trawienie komórek glonów prowadzono w obecności macerozymu R-10, który stosowany jest do rozkładu próbek roślinnych (Tab. 12). Trawienie w środowisku alkalicznym prowadzono w obecności wodorotlenku tetrametyloamoniowego (TMAH), który do tej pory stosowany był głównie podczas przygotowywania próbek pochodzenia zwierzęcego/ludzkiego do analizy specjacyjnej metali z wykorzystaniem technik sprzężonych (Tab. 13). W obu podejściach odpowiednio dobrano warunki rozkładu próbki (stężenie użytych odczynników, temperatura, czas inkubacji, pH), aby maksymalnie ograniczyć transformacje analitu (m.in. rozpuszczanie/agregacje nanocząstek oraz wytrącanie metalu w formie jonowej), a jednocześnie uzyskać jak najefektywniejszy rozkład matrycy próbki (ścian i organelli komórkowych) i uwalnianie analitu z materiału biologicznego do roztworu. W badaniach zwrócono uwagę na potencjalne efekty matrycowe związane z obecnością odczynników użytych do trawienia alkalicznego bądź enzymatycznego oraz produktów rozkładu matrycy próbki. Badania prowadzono stosując wzorce AgNPs o rozmiarach 40, 60 i 75 nm stabilizowane sterycznie za pomocą PVP.

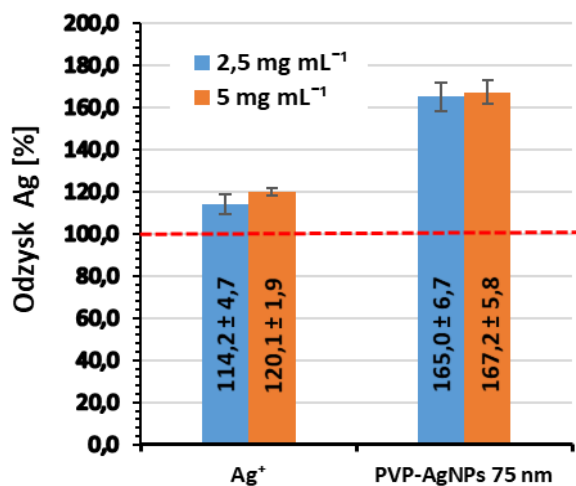
8.3.1. Trawienie enzymatyczne

Enzymatyczne trawienie komórek glonów wzbogaconych w Ag^+ lub AgNPs o rozmiarach 75 nm (RM 8017) zostało przeprowadzone w obecności macerozymu R-10, który stosowany jest do przygotowywania próbek roślinnych do analizy nanocząstek metali m.in. techniką sp ICP MS [385,386,387]. Na efektywność trawienia enzymatycznego próbek istotny wpływ ma stężenie enzymu, temperatura oraz pH roztworu.

Badania wstępne dotyczyły sprawdzenia stabilności wzorców NPs podczas trawienia enzymatycznego. Do roztworu zawierającego wzorzec AgNPs 40 nm ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) dodano $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ enzymu i pozostawiono na 24 godziny w temperaturze 30°C ($\text{pH} = 4,8$). Zawiesinę poddano sonikacji przy użyciu homogenizatora ultradźwiękowego bezpośrednio po dodaniu

wszystkich odczynników (czas: 15 min) oraz po 24-godzinnej inkubacji (czas: 5 min). Stężenie AgNPs oznaczono techniką sp ICP MS stosując kalibrację w 0,1% Tritonie X-100. Stwierdzono, że odzysk srebra wyniósł $104,1 \pm 0,1\%$, nie zaobserwowano również zmian rozmiarów nanocząstek po kontakcie z enzymem.

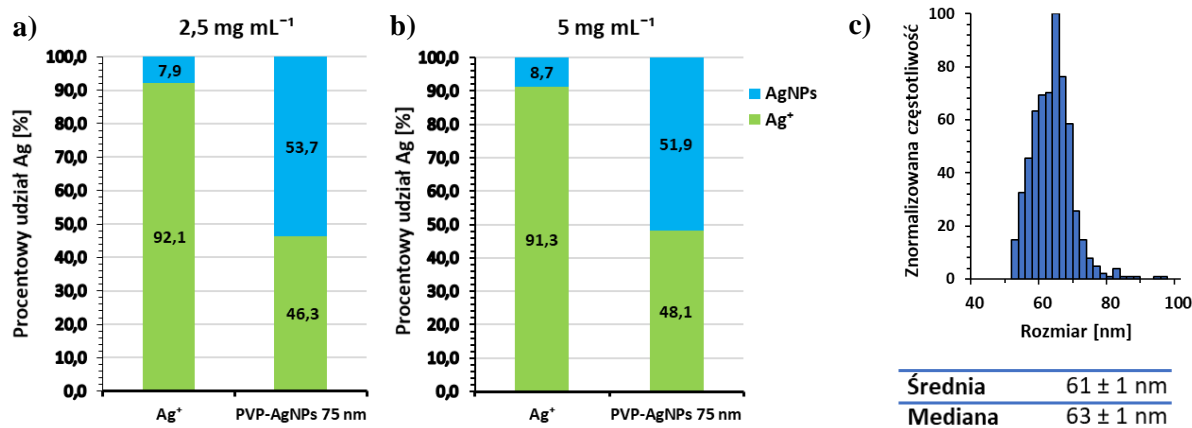
Taką samą procedurę zastosowano do ekstrakcji nanocząstek srebra z komórek glonów inkubowanych z AgNPs 75 nm. W badaniach stosowana była stała masa glonów, wynosząca po odsączeniu 100 mg (sucha masa ~ 40 mg), zawieszona w 50 mL wody Milli-Q. Zbadano wpływ dwóch stężeń macerozemu R-10 (2,5 oraz 5 mg mL⁻¹) na efektywność trawienia enzymatycznego glonów oraz wartości odzysków srebra (Rys. 29). Ponieważ aktywność enzymu zależy od temperatury, trawienie przeprowadzono w temperaturze 30°C, w pH = 4,8 przy 24-godzinnej ekspozycji na działanie enzymu. Po tym czasie w obu przypadkach uzyskano jednorodne zawiesiny, które następnie odpowiednio rozcieńczono 0,1% Tritonem X-100 i poddano oznaczeniu techniką sp ICP MS. Odzysk srebra wyrażono jako stosunek sumy mas srebra oznaczonych we wszystkich frakcjach układu do masy nominalnej Ag dodanej do układu wyrażony w procentach.



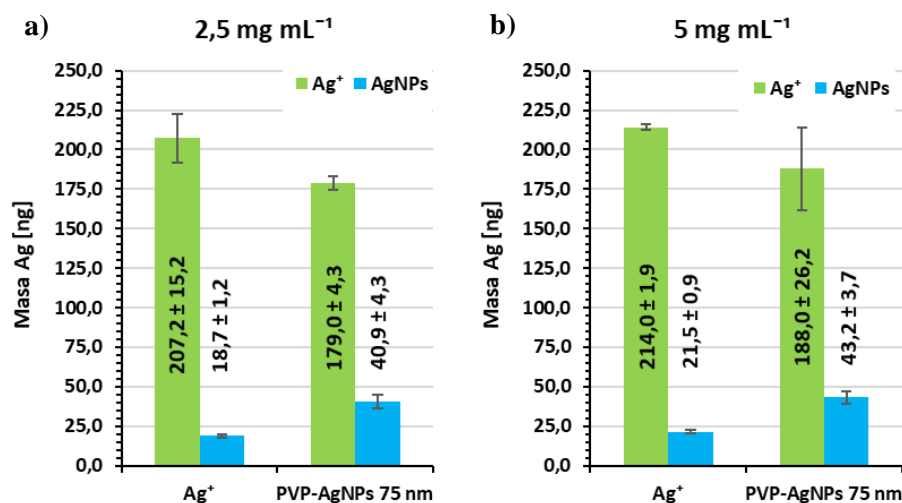
Rysunek 29. Wartości odzysków srebra uzyskane dla układów wzbogaconych w $5 \mu\text{g L}^{-1}$ Ag⁺ lub PVP-AgNPs 75 nm po 24-godzinnym trawieniu enzymatycznym (kalibracja w 0,1% Tritonie X-100) ($n = 2$); stężenie macerozemu R-10: 2,5 mg mL⁻¹ oraz 5 mg mL⁻¹

Wartości odzysków srebra uzyskane dla układów wzbogaconych w Ag⁺ mieściły się w przedziale 110,9 – 121,4%. W przypadku zastosowania obu stężeń enzymu gorsze rezultaty uzyskano w układach z dodatkiem AgNPs dla których całkowite odzyski srebra wyniosły 139,1 – 171,6%. Rozmiary NPs wyznaczone w tych zawiesinach były o 15 – 25% mniejsze

od rozmiarów dodanego wzorca, co wskazywało na zjawisko rozpuszczania AgNPs podczas inkubacji z enzymem (Rys. 30, 31).



Rysunek 30. Procentowy udział obu form srebra oznaczonych w układach wzbogaconych w $5 \mu\text{g L}^{-1}$ Ag^+ lub AgNPs 75 nm przy zastosowaniu kalibracji w 0,1% Tritonie X-100, po 24-godzinny trawieniu enzymatycznym - stężenie macerozemu R-10: (a) $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ oraz (b) 5 mg mL^{-1} ; (c) Rozkład wielkości AgNPs uzyskany po trawieniu enzymatycznym glonów wzbogaconych w AgNPs 75 nm w obecności 5 mg mL^{-1} macerozemu R-10



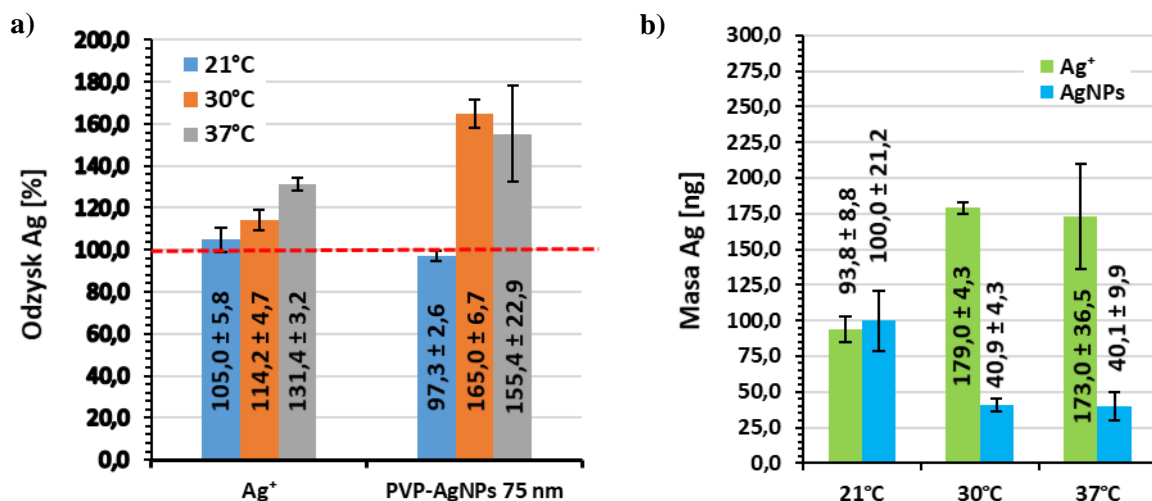
Rysunek 31. Masa srebra oznaczona w lizatach komórkowych przy zastosowaniu kalibracji w 0,1% Tritonie X-100, po 24-godzinny trawieniu enzymatycznym - stężenie macerozemu R-10: (a) $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ oraz (b) 5 mg mL^{-1}

Stwierdzono, że niespełna połowa srebra oznaczonego w układach wzbogaconych w AgNPs interpretowana była jako frakcja jonowa. Zmianie uległ również rozkład wielkości nanocząstek, który był wyraźnie przesunięty w stronę mniejszych rozmiarów AgNPs . Średnia wielkość nanocząstek srebra zmniejszyła się z $74,6 \pm 3,8 \text{ nm}$ (Rys. 13b) do $61 \pm 1 \text{ nm}$ (mediana: $63 \pm 1 \text{ nm}$) (Rys. 30c). Z tego względu, w celu znalezienia warunków, w których nie dochodzi do zmiany formy analitu, którą zaobserwowano podczas inkubacji z enzymem,

przeprowadzono optymalizację procedury trawienia enzymatycznego. Oprócz stężenia enzymu istotny wpływ na wystąpienie rozpuszczania AgNPs może mieć temperatura oraz pH buforu dodawanego do mieszaniny enzymatycznej. Dlatego w kolejnych etapach badań postawiono sprawdzić wpływ tych parametrów na specjację oraz przebieg oznaczenia srebra techniką sp ICP MS.

Ze względu na podobną efektywność trawienia enzymatycznego, bardzo zbliżone wartości odzysków srebra (Rys. 29) i wyniki analizy specjacyjnej (Rys. 30, 31) dalsze rozważania ograniczono do niższego stężenia macerozemu R-10 ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$), które zostało uznane za optymalne.

Istotny wpływ na efektywność trawienia enzymatycznego ma temperatura inkubacji materiału biologicznego z enzymem. W większości badań opisanych w części literaturowej (Tab. 12, [385-394,396]) stosowana była temperatura 37°C . Wyjątek stanowiła procedura przygotowania materiału roślinnego do oznaczania CuONPs (25°C) [395], które są podatne na rozpuszczanie w podwyższonej temperaturze. Podobne ryzyko uwalniania frakcji jonowej występuje w przypadku AgNPs. Dlatego zbadano również wpływ niższych temperatur na efektywność rozkładu materiału roślinnego, wartości odzysków Ag oraz udział poszczególnych form srebra w układzie po inkubacji. Oprócz optymalnej temperatury, w której aktywność enzymatyczna macerozemu R-10 jest najwyższa (37°C) przeprowadzono również 24-godzinne trawienie enzymatyczne w temperaturze 21 oraz 30°C przy pH 4,8. Na rysunku 32a przedstawiono wartości odzysków uzyskane dla badanych układów przy zastosowaniu kalibracji w 0,1% Tritonie X-100.

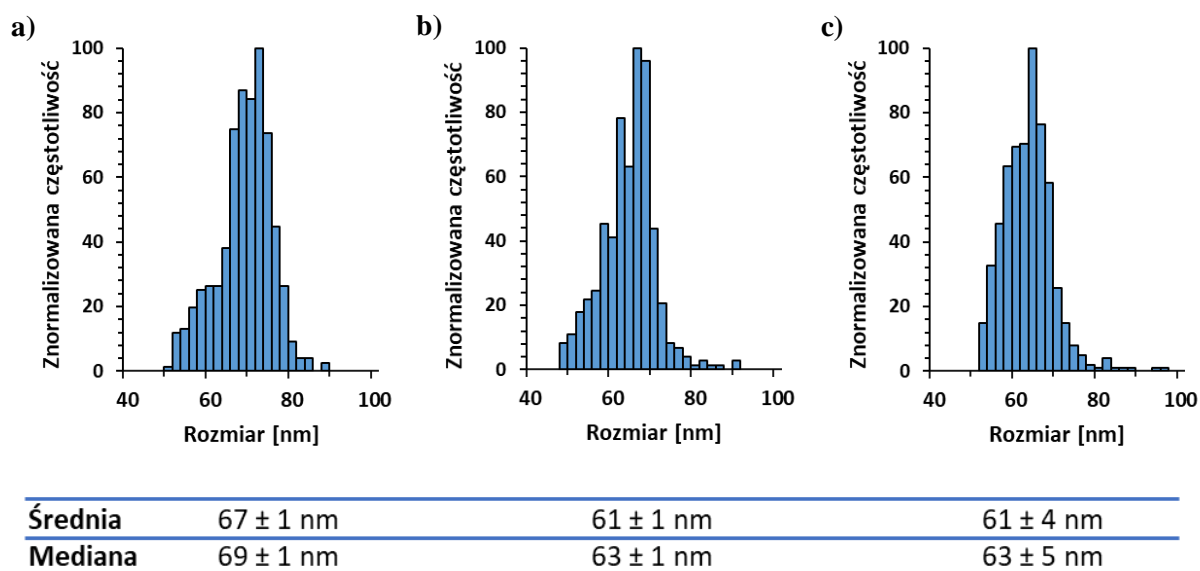


Rysunek 32. (a) Wartości odzysków srebra uzyskane dla układów wzbogaconych w $5 \mu\text{g L}^{-1}$ Ag⁺ lub AgNPs 75 nm po 24-godzinnym trawieniu enzymatycznym w różnych temperaturach. (b) Masa srebra oznaczona w lizatach komórkowych (układy wzbogacone w $5 \mu\text{g L}^{-1}$ AgNPs 75 nm) po 24-godzinnym trawieniu enzymatycznym w różnych temperaturach; stężenie macerozemu R-10: $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$, pH = 4,8, kalibracja w 0,1% Tritonie X-100

Stwierdzono, że wartości całkowitych odzysków srebra oznaczone w badanych układach rosły wraz ze wzrostem temperatury stosowanej podczas etapu trawienia enzymatycznego zarówno w przypadku układów wzbogaconych w Ag⁺, jak i AgNPs (Rys. 32a). Ilościowe odzyski srebra dodanego do układów uzyskano przy temperaturze trawienia 21°C. Wzrost wartości tego parametru do 30°C oraz 37°C przełożył się na uzyskanie zbyt wysokich odzysków Ag, które wyniosły odpowiednio $114,2 \pm 4,7\%$ i $131,4 \pm 3,2\%$ w przypadku układów z Ag⁺ oraz $165,0 \pm 6,7\%$ i $155,4 \pm 22,9\%$ dla układów z dodatkiem AgNPs. W dalszej części pracy została podjęta próba wyjaśnienia obserwowanych zjawisk.

Po przeanalizowaniu mas poszczególnych frakcji srebra (Ag⁺, AgNPs) oznaczonych w lizatach komórkowych glonów ekspozowanych na działanie AgNPs (Rys. 32b) stwierdzono, że we wszystkich badanych temperaturach część dodanych do układu nanocząstek uległa rozpuszczeniu. Potwierdziły to uzyskane rozkłady wielkości AgNPs, gdzie wraz ze wzrostem temperatury trawienia enzymatycznego dochodziło do przesunięcia rozkładu wielkości nanocząstek w kierunku mniejszych AgNPs (Rys. 33). Rozmiary AgNPs zmniejszyły się do 67 nm (mediana 69 nm) w 21°C do 61 nm (mediana 63 nm) w 30°C i do 61 nm (mediana 63 nm) podczas trawienia w 37°C. W pracy nie badano temperatur niższych niż 21°C (temperatura pokojowa) ze względu na spadek aktywności enzymatycznej charakterystyczny dla większości enzymów, który występuje przy niższych temperaturach. Biorąc pod uwagę ilościowe odzyski srebra oraz najmniejszą ilość srebra w formie jonowej

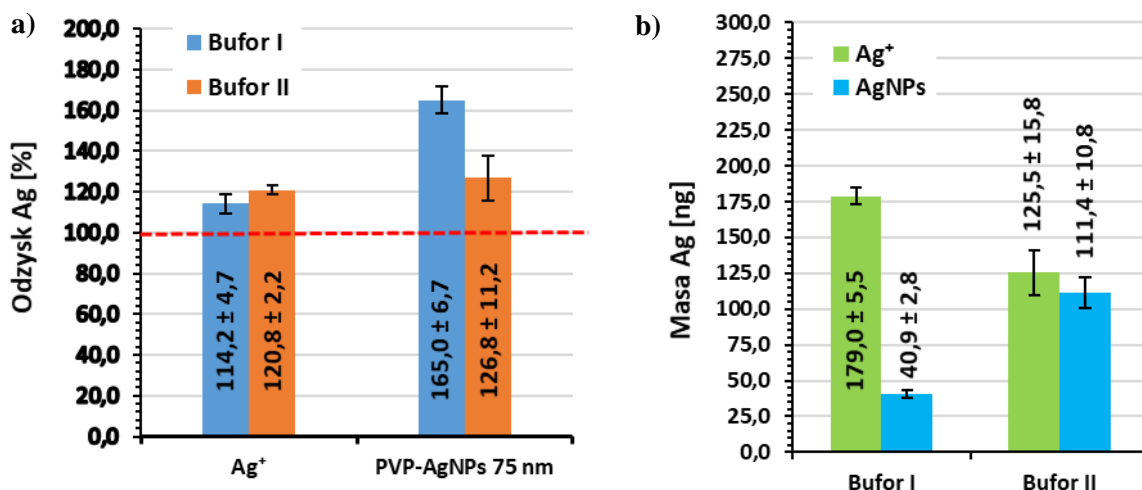
wykrytego w układach wzbogaconych w AgNPs za optymalną temperaturę trawienia uznano 21°C.



Rysunek 33. Rozkłady wielkości nanocząstek srebra uzyskane po trawieniu enzymatycznym glonów wzbogaconych w AgNPs 75 nm w obecności 2,5 mg mL⁻¹ macerozemu R-10 w temperaturze: (a) 21°C, (b) 30°C oraz (c) 37°C

Kolejnym parametrem, który może wpływać na specjację srebra podczas rozkładu matrycy próbki jest wartość pH zastosowanego buforu. Macerozým R-10 wykazuje optymalną aktywność enzymatyczną w zakresie pH 3,5 – 7,0. Stosowana podczas ekstrakcji mieszanina enzymatyczna zawierająca dodatek 2 mmol L⁻¹ buforu cytrynianowego (bufor I) miała pH ~ 4,8, wartość ta wzrosła do ~ 5,75 po 24-godzinnej inkubacji w obecności enzymu. Jednak w środowisku kwasowym może dochodzić do rozpuszczania AgNPs.

Obserwowany wzrost udziału frakcji jonowej może być spowodowany zbyt niskim pH środowiska. Sprawdzone zatem wpływ buforu cytrynianowego o wyższym pH (~ 6; bufor II) na przebieg trawienia enzymatycznego oraz oznaczenia srebra w lizatach komórkowych techniką sp ICP MS. Wartość pH mieszaniny enzymatycznej zawierającej bufor II bezpośrednio po sporządzeniu wyniosła ~ 6,02, natomiast po 24-godzinnym trawieniu enzymatycznym wzrosła do ~ 6,18. Na rysunku 34a przedstawiono porównanie wartości odzysków srebra uzyskane po trawieniu enzymatycznym w przypadku zastosowania obu badanych buforów.



Rysunek 34. (a) Wartości odzysków srebra uzyskane dla układów wzbogaconych w $5 \mu\text{g L}^{-1}$ Ag⁺ lub AgNPs 75 nm po 24-godzinnym trawieniu enzymatycznym w obecności buforu I (pH = 4,8) lub buforu II (pH = 6,0). (b) Masa srebra oznaczona w lizatach komórkowych (układy wzbogacone w $5 \mu\text{g L}^{-1}$ AgNPs 75 nm) po 24-godzinnym trawieniu enzymatycznym w obecności buforu I (pH = 4,8) lub buforu II (pH = 6,0); stężenie macerozemu R-10: $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$, temperatura trawienia: 30°C , kalibracja w 0,1% Tritonie X-100

Stwierdzono, że w przypadku układów z dodatkiem Ag⁺ wartości całkowitych odzysków srebra uzyskane przy zastosowaniu obu badanych buforów były podobne. Istotne różnice odnotowano natomiast w przypadku układów wzbogaconych w AgNPs, gdzie wartości odzysków Ag w buforze I wyniosły $165,0 \pm 6,7\%$, a dla buforu II spadły do $126,8 \pm 11,2\%$. Zastosowanie buforu II o wyższym pH przyczyniło się też do zmniejszenia udziału frakcji jonowej oznaczonej w glonach (Rys. 34b), dlatego bufor ten został wybrany do dalszych badań.

Na podstawie opisanych powyżej eksperymentów stwierdzono, że najlepsze rezultaty pod względem efektywności trawienia matrycy próbki oraz ograniczenia procesu rozpuszczania AgNPs podczas przygotowania materiału roślinnego uzyskano przy stężeniu macerozemu R-10: $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$, temperaturze trawienia enzymatycznego: 30°C oraz stosując bufor cytrynianowy o pH = 6,0. Jednak w zaproponowanym podejściu uzyskano zbyt wysokie wartości odzysków srebra (szczególnie w układach z dodatkiem AgNPs). Warto zauważyć, że we wstępnych badaniach z użyciem samego enzymu (bez materiału roślinnego) uzyskano ilościowe odzyski srebra. W dalszej części pracy postanowiono zbadać możliwe przyczyny powyższych obserwacji.

Badania interferencji spektralnych i efektów matrycowych

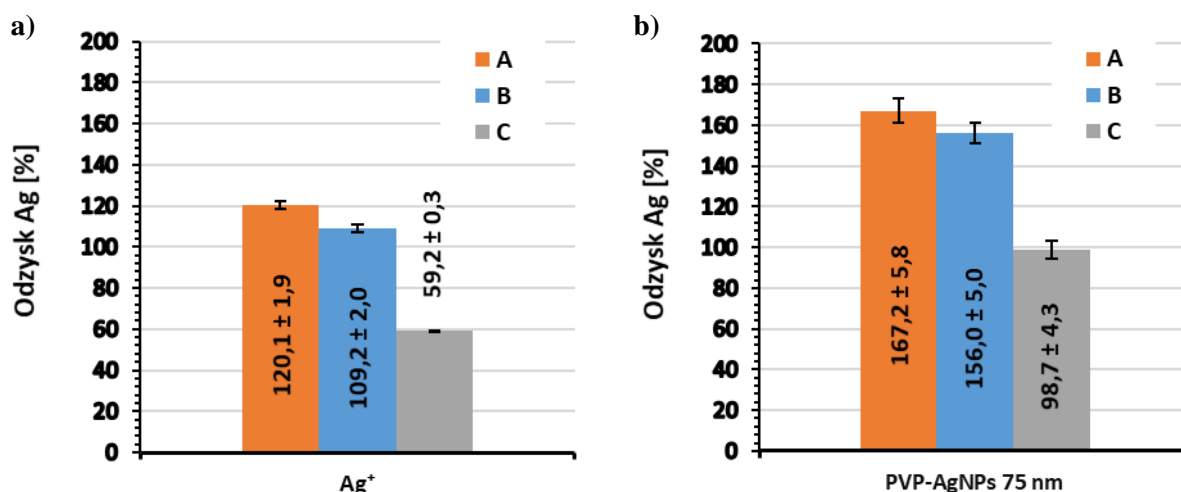
Obserwowane przeszacowania mogą być również konsekwencją interferencji spektralnych (wieloatomowych i/lub izobarycznych) oraz niespektralnych, które mogą towarzyszyć oznaczeniom metali śladowych techniką ICP MS. Interferencje wieloatomowe mogą pochodzić z gazu plazmowego, matrycy próbki, gazu atmosferycznego i/lub roztworu rozpuszczalnika. W badaniach zarejestrowano wysoki poziom tła (600 cps) dla lizatu komórek glonów uzyskanego przy zastosowaniu bezpośredniej ekstrakcji ultradźwiękowej. Nieprawidłowe odjęcie sygnału tła prowadzi do niedoszacowania liczby wykrytych nanocząstek i może istotnie wpływać na wyniki. Interferencje spektralne generują wyższy sygnał tła i mogą być interpretowane jako rozpuszczalna frakcja metalu mierzona techniką sp ICP MS [450]. Interferencje wieloatomowe podczas oznaczania izotopu ^{107}Ag mogą być związane z powstawaniem jonów $^{67}\text{Zn}^{40}\text{Ar}^+$ i $^{91}\text{Zr}^{16}\text{O}^+$ z glonów zanieczyszczonych składnikami medium inkubacyjnego (BBM, MWP lub WP). Jednak ze względu na zastosowanie etapu płukania komórek glonów wodą Milli-Q przed lizą wystąpienie takiego efektu było mało prawdopodobne. Innym możliwym źródłem zakłóceń mogła być naturalna zawartość Zn w hodowanych glonach. W celu wyeliminowania interferencji pochodzących od Zn przeprowadzono pomiary przy użyciu potrójnego kwadrupola w trybie pomiarowym MS/MS. Lizaty komórek glonów zastosowano jako próbki kontrolne, do których dodano 1 i 10 mg L⁻¹ Zn. Otrzymane układy poddano analizie techniką ICP MS w trybie „no gas” i z zastosowaniem gazu kolizyjnego (helu). Dodatek 1 mg L⁻¹ Zn spowodował wzrost sygnału tła z 600 do 1024 zliczeń, podczas gdy obecność 10 mg L⁻¹ Zn wpłynęła na dalszy nieznaczny wzrost sygnału tła do wartości 1173 zliczeń. Zastosowanie He jako gazu kolizyjnego z szybkością przepływu 3 ml min⁻¹ pozwoliło na zmniejszenie sygnału zarejestrowanego dla próbki kontrolnej do 320 zliczeń. Sygnały uzyskane w obecności obu badanych stężeń Zn były podobne (340 i 342 zliczeń). Zastosowanie powyższych trybów pomiarowych nie doprowadziło do całkowitej eliminacji sygnału tła.

Z przeglądu literatury wynika, że na określenie rozmiarów nanocząstek może mieć wpływ różnica w efektywności wprowadzania do strumienia plazmy roztworów kalibracyjnych i lizatów, które mają postać niejednorodnych zawiesin. Na przykład Witzler et al. [481] zaobserwowali przeszacowanie stężenia cząstek w przedziale 118 – 180%, pomimo iż szacunkowy rozmiar nanocząstek różnił się nie więcej niż o 5%.

Na tym etapie badań stwierdzono, że problem przeszacowań wartości odzysków Ag może być spowodowany efektami matrycowymi. Spróbowano go rozwiązać poprzez

dopasowanie matrycy na etapie kalibracji metody. Lizaty komórkowe ze względu na stosunkowo dużą zawartość substancji organicznych mogą być wprowadzane do strumienia plazmy z inną efektywnością niż roztwory kalibracyjne w 0,1% Tritonie X-100 (Procedura A).

Kolejnym etapem badań było zatem sprawdzenie innych wariantów kalibracji: z dopasowaniem stężenia macerozemu R-10, buforu cytrynianowego i Tritonu X-100 (Procedura B); w obecności 50-krotnie rozcieńczonego lizatu komórkowego uzyskanego po trawieniu enzymatycznym przeprowadzonym w tych samych warunkach co trawienie glonów wzbogaconych w Ag, z dodatkiem 0,1% Tritonu X-100 (Procedura C) (Rys. 35). W przypadku zastosowania procedury B w roztworze do kalibracji znajdowały się wszystkie reagenty stosowane do trawienia enzymatycznego. W procedurze C kalibrację przeprowadzono w obecności 50-krotnie rozcieńczonych lizatów komórkowych otrzymanych po trawieniu enzymatycznym. Rozcieńczenie takie wybrano, ponieważ w przypadku układów wzbogaconych w Ag⁺ i AgNPs lizaty rozcieńczano przed oznaczeniem odpowiednio 50- oraz 80-krotnie.



Rysunek 35. Wartości odzysków srebra uzyskane dla układów wzbogaconych w: (a) Ag⁺ oraz (b) AgNPs 75 nm przy różnych wariantach kalibracji: **Procedura A** – w 0,1% Tritonie X-100, **Procedura B** – z dopasowaniem stężenia macerozemu R-10, buforu cytrynianowego i Tritonu X-100, **Procedura C** - w obecności 50-krotnie rozcieńczonego lizatu komórkowego glonów z dodatkiem 0,1% Tritonu X-100; stężenie macerozemu R-10: 2,5 mg mL⁻¹; temperatura 30°C; (n = 2)

Przeprowadzenie kalibracji z dopasowaniem stężenia enzymu, buforu cytrynianowego oraz Tritonu X-100 (Procedura B) przyczyniło się do poprawy wartości odzysków Ag, które zmniejszyły się o ok. 11 punktów procentowych w stosunku do wartości uzyskanych przy kalibracji w 0,1% Tritonie X-100. Odzyski uzyskane dla układów wzbogaconych w srebro

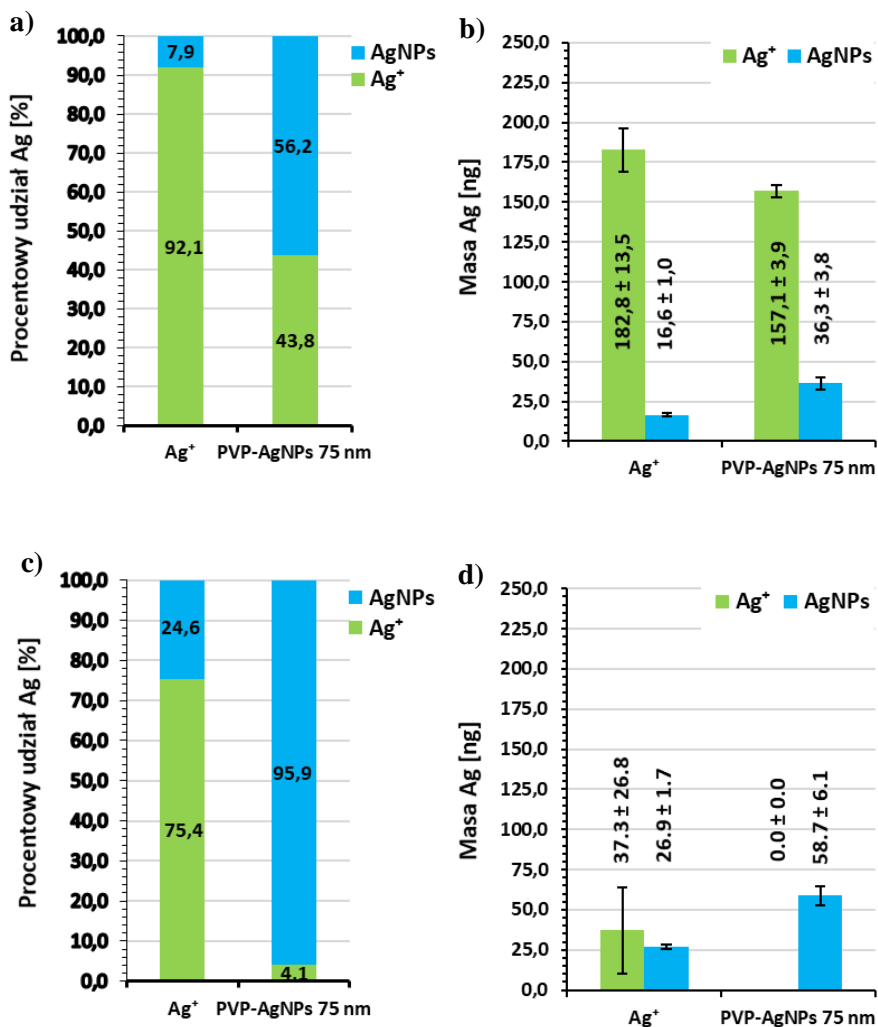
jonowe oraz nanocząstki srebra mieściły się odpowiednio w przedziałach: 107,2% - 111,2% oraz 151,2% - 161,0%.

W przypadku zastosowania procedury C zaobserwowano spadek wartości odzysków Ag o ok. 65 punktów procentowych. Przełożyło się to na znaczne niedoszacowanie zawartości srebra w układach wzbogaconych w Ag^+ i uzyskanie blisko 100-procentowych odzysków Ag w przypadku układów z dodatkiem AgNPs. Wartości odzysków srebra wyniosły odpowiednio: 59,1% - 59,3% i 94,4% - 103,0%.

Problem z ilościowym oznaczeniem srebra jonowego może być również konsekwencją efektów matrycowych. Średnie wartości sygnałów analitycznych zarejestrowanych dla ślepych prób w przypadku kalibracji w 0,1% Tritonie X-100 oraz pierwszego i drugiego wariantu kalibracji wyniosły odpowiednio 108, 141 oraz 600 cps. Przez wysokie wartości sygnałów uzyskanych dla ślepych prób zawierających 50-krotnie rozcieńczony lizat komórkowy część sygnału pochodzącego od frakcji jonowej była prawdopodobnie błędnie interpretowana jako tło, co częściowo tłumaczy zaistniałe niedoszacowania zawartości srebra. Nie stwierdzono wpływu stężenia enzymu na wartości odzysków i przebieg oznaczenia srebra. Uzyskane lizaty komórkowe posiadały podobne zagęszczenie. Przy zastosowaniu mniejszych niż 50-krotne rozcieńczeń dochodziło do zapychania układu wprowadzającego próbkę.

Poszczególne warianty kalibracji zostały również rozpatrzone pod kątem uzyskanych informacji dotyczących specjacji srebra w badanych układach. Zastosowanie procedury B miało niewielki wpływ na zmianę stosunku obu form srebra oznaczonych w układach wzbogaconych w AgNPs (Rys. 36a). Średni rozmiar nanocząstek srebra wyniósł $60,9 \pm 0,9$ nm (identyczny jak w przypadku kalibracji w 0,1% Tritonie X-100). Zupełnie inny obraz uzyskano przy kalibracji przeprowadzonej w obecności 50-krotnie rozcieńczonego lizatu komórkowego z dodatkiem 0,1% Tritonu X-100 (Procedura C) (Rys. 36c). W przypadku układów z dodatkiem AgNPs całe srebro oznaczone w lizatach komórkowych interpretowane było jako nanocząstki (Rys 36d), przy czym wartość średniego rozmiaru AgNPs spadła do $57,5 \pm 0,9$ nm. Zmianie uległ również stosunek obu form Ag w układach wzbogaconych w srebro jonowe. Masa AgNPs oznaczona w tych układach wzrosła średnio o 43,6% względem wartości oznaczonych przy kalibracji w 0,1% Tritonie X-100 ($28,7 \pm 2,3$ ng vs. $20,0 \pm 1,6$ ng). Procentowy udział obu form Ag przedstawiony na rysunkach 36a i 36b wyliczany był względem całkowitej zawartości srebra uzyskanej przy zastosowaniu określonej procedury kalibracji. Zastosowanie procedury C, mimo dokładnego dopasowania matrycy w przypadku układów wzbogaconych w Ag^+ doprowadziło do znacznego

niedoszacowania wartości całkowitych odzysków srebra. Blisko 100-procentowe wartości tego parametru uzyskano natomiast dla układów z dodatkiem AgNPs. Z drugiej strony rozkład wielkości nanocząstek wyznaczony w tych układach wyraźnie przesunięty był w stronę mniejszych AgNPs, co może świadczyć o częściowym rozpuszczaniu się nanocząstek i uwalnianiu srebra w postaci jonowej, które nie została wykryte.



Rysunek 36. Procentowy udział obu form srebra oraz ich masy oznaczone w układach wzbogaconych w $5 \mu\text{g L}^{-1}$ Ag⁺ lub AgNPs 75 nm przy zastosowaniu kalibracji: **(a,b)** z dopasowaniem stężenia macerozemu R-10, buforu cytrynianowego i Tritonu X-100 (**Procedura B**) oraz **(c,d)** w obecności 50-krotnie rozcieńzonego lizatu komórkowego glonów z dodatkiem 0,1% Tritonu X-100 po 24-godzinnym trawieniu enzymatycznym - stężenie macerozemu R-10: $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ (**Procedura C**)

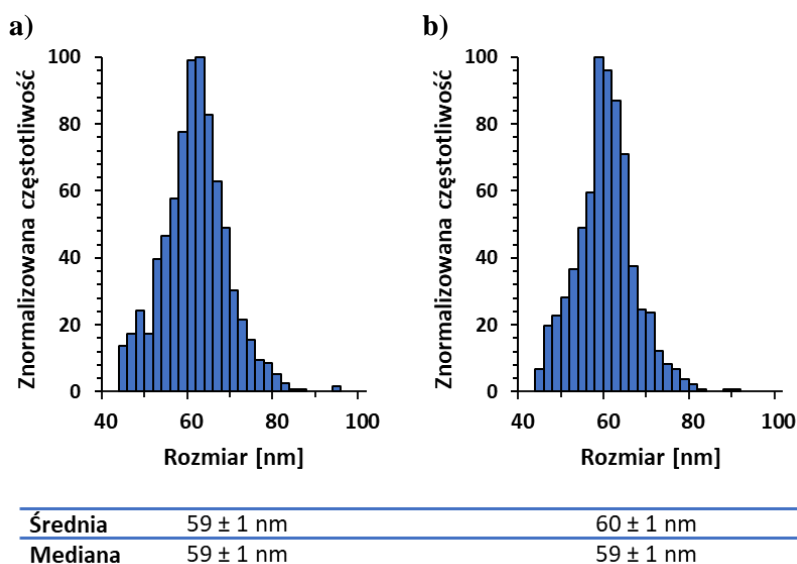
Podsumowując, modyfikacja procedury trawienia enzymatycznego nie poprawiała istotnie uzyskanych wyników, zarówno pod względem odzysków srebra, jak i wielkości nanocząstek (zawsze wykazując rozpuszczanie AgNPs). Kalibracja przy użyciu wzorców zawierających wszystkie odczynniki trawiące (procedura B, Rys. 35) pozwoliła na poprawę

odzysków AgNPs z komórek glonów w porównaniu do kalibracji w Tritonie X-100 (procedura A, Rys. 35) zaledwie o 11 punktów procentowych. Stosując drugie podejście (procedura C, Rys. 35), odzysk AgNPs z komórek glonów był ilościowy ($98,7 \pm 4,3\%$), natomiast w przypadku układów wzbogaconych w Ag^+ wyniósł zaledwie $62,2 \pm 7,2\%$. Podczas zastosowania kalibracji z dopasowaniem matrycy rozmiar AgNPs wyniósł $77,0 \pm 1,0$ nm (mediana: $77,0 \pm 0,2$ nm). Wyniki te sugerują, że obserwowane zmiany rozmiarów AgNPs nie były spowodowane rozpuszczaniem nanocząstek zachodzącym podczas etapu trawienia enzymatycznego, lecz interferencjami występującymi podczas oznaczania AgNPs techniką sp ICP MS (do podobnych wniosków doszli Abad-Alvaro et al [445]). Stwierdzono zatem, że tylko kalibracja z dopasowaniem matrycy może zapewnić dokładne wyniki analizy AgNPs. Ponieważ jednak procedura ta jest bardzo pracochłonna i zawsze wymaga dopasowania współczynnika rozcieńczenia matrycy do zawartości analitu w próbce, jest trudna do zastosowania w badaniach rutynowych. Warto wspomnieć, że we wszystkich przypadkach trawienie enzymatyczne nie umożliwiała przeprowadzania całkowitego rozkładu materiału roślinnego.

W kolejnym etapie badań postanowiono sprawdzić wpływ trawienia w środowisku alkalicznym na efektywność rozkładu komórek glonów oraz przebieg oznaczenia srebra techniką sp ICP MS.

8.3.2. Trawienie w środowisku alkalicznym

Wodorotlenek tetrametyloamonowy (TMAH) jest często używany do trawienia próbek biologicznych (Tab. 13), ponieważ powoduje hydrolityczne rozszczepienie i metylację wiązań estrowych, amidowych i niektórych eterowych oraz jest w stanie rozrywać chemiczne wiązania dwusiarczkowe w białkach [398]. Jednak TMAH jako mocna zasada, może indukować wytrącanie srebra. W celu sprawdzenia wpływu środowiska alkalicznego stosowanego podczas trawienia próbek na stabilność obu form srebra przeprowadzono badania na układach modelowych zawierających 5, 10 i 20% v/v TMAH z dodatkiem $5 \mu\text{g L}^{-1}$ Ag^+ lub AgNPs 60 nm. Zbadano również wpływ materii organicznej, którą reprezentował kwas humusowy (HA, 1 mg L^{-1}) na stabilność i przebieg oznaczenia Ag^+/AgNPs techniką sp ICP MS. Chociaż rozmiary AgNPs otrzymane dla wszystkich układów były zgodne (TMAH – średni rozmiar 59 ± 1 nm, mediana 59 ± 1 nm, TMAH + HA – średni rozmiar 60 ± 1 nm i mediana 59 ± 1 nm) (Rys. 37), odzyski srebra były wyższe od 3 do 15% w obecności materii organicznej.

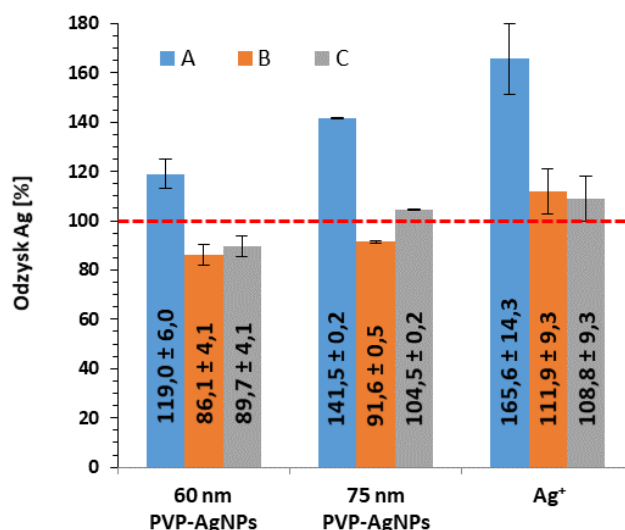


Rysunek 37. Rozkłady wielkości nanocząstek srebra otrzymane techniką sp ICP MS dla układów zawierających $5 \mu\text{g L}^{-1}$ AgNPs 60 nm w (a) 10% TMAH, (b) 10% TMAH z dodatkiem 1 mg L^{-1} HA

Z przeglądu literaturowego wynika, że do tej pory nie stosowano trawienia alkalicznego w obecności TMAH do ekstrakcji AgNPs z komórek glonów. Przeprowadzono zatem optymalizację procesu. Komórki po inkubacji z Ag^+ i AgNPs 60 nm, oddzieleniu i przemyciu zawieszano w 5%, 7,5%, 10% i 20% roztworach TMAH w celu dobrania optymalnego stężenia zapewniającego rozkład matrycy i skuteczne uwalnianie obu form srebra z komórek. Wszystkie próbki poddano działaniu ultradźwięków przez 15 min na początku każdego trawienia w celu umożliwienia rozerwania komórek glonów oraz przez 5 min po 24 godzinach. Po trawieniu w środowisku alkalicznym lizaty analizowano metodą sp ICP MS. Zaobserwowano, że ilość cząstek srebra ekstrahowanych z komórek glonów wzrastała wraz ze wzrostem stężenia TMAH od 5% do 10% (2-krotnie dla AgNPs i 1,4-krotnie dla Ag^+) i była porównywalna dla stężeń 10% i 20%. W dalszych doświadczeniach komórki glonów trawiono w obecności 10% TMAH. Odzysk srebra wyniósł $98,0 \pm 3,4\%$ dla AgNPs i $121,9 \pm 1,1\%$ dla Ag^+ . Warto wspomnieć, że dzięki wysokiej wydajności trawienia materiału biologicznego nie było konieczności wirowania lub filtrowania próbek, co przełożyło się na dobre odzyski srebra.

W celu sprawdzenia wpływu procedury trawienia alkalicznego na odzysk srebra i rozkład wielkości cząstek, przeprowadzono eksperyment polegający na wzbogacaniu próbek kontrolnych glonów. Do 0,1 g mokrej masy glonów dodano Ag^+ , 60 nm AgNPs lub 75 nm AgNPs (RM 8017) do końcowego stężenia srebra $2,5 \mu\text{g g}^{-1}$. Trawienie alkaliczne przeprowadzono zgodnie z procedurą 3 opisaną w rozdziale 6.5.1. Otrzymane lizaty

komórkowe rozcieńczono 0,1% Tritonem X-100 i poddano analizie techniką sp ICP MS przy użyciu trzech wariantów kalibracji obejmujących przygotowanie wzorca jonowego oraz AgNPs w: 0,1% Tritonie X-100 (Procedura A), 0,1% TMAH + 0,1% Tritonie X-100 (Procedura B) oraz lizacie komórkowym bez dodatku srebra, otrzymanym po trawieniu TMAH (100-krotnie rozcieńczonym 0,1% Tritonem X-100) (Procedura C). Wyniki przedstawiono na rysunku 38.



Rysunek 38. Odzyski srebra uzyskane dla komórek glonów wzbogaconych w Ag⁺ lub AgNPs (bez inkubacji), wyekstrahowanych 10% TMAH i oznaczonych metodą sp ICP MS (n = 2). **Procedura A** – kalibracja w 0,1% Tritonie X-100; **Procedura B** – kalibracja w 0,1% TMAH + 0,1% Tritonie X-100; **Procedura C** – kalibracja w lizacie komórkowym rozcieńczonym 0,1% Tritonem X-100.

Badania wykazały, że wzorzec jonowy (stosowany do określenia odpowiedzi spektrometru ICP MS (RF)) oraz nanocząstek srebra (używany do wyznaczenia efektywności wprowadzania próbki do strumienia plazmy (η_{neb})) nie mogą być sporządzone w samym Tritonie X-100, ze względu na przeszacowanie wartości odzysków srebra uzyskane dla lizatów komórkowych. Ilościowe odzyski srebra uzyskano, gdy roztwory kalibracyjne przygotowano w mieszaninie TMAH (roztwór trawiący) i Tritonu X-100 (środek stabilizujący) oraz w przypadku dopasowania matrycy (Rys. 38, odpowiednio procedury B i C). W dalszych badaniach zastosowano prostsze podejście, a mianowicie kalibrację w układzie 0,1% TMAH + 0,1% Triton X-100. Różnice w wartościach odzysku srebra są związane z odpowiedzią ICP MS dla wzorca Ag⁺, która była znacznie wyższa w przypadku roztworów sporządzonych w TMAH + Triton X-100 i lizacie komórkowym (o 53% i 51 %) w porównaniu z odpowiedzią w samym Tritonie X-100. Zwiększenie intensywności sygnału Ag⁺ w obecności TMAH zaobserwowali również Abad-Alvaro et al. [445]. Charakterystykę analityczną obu zaproponowanych wariantów kalibracji przedstawiono w tabeli 25. Dla

porównania umieszczono w niej również parametry analityczne kalibracji z dopasowaniem matrycy (zastosowanej przy trawieniu enzymatycznym). Warto zwrócić uwagę na wartości LOD_{size} , które są wyższe w przypadku kalibracji przeprowadzonej w obecności matrycy roślinnej. Ze względu na różnice w intensywności sygnałów uzyskanych w różnych dniach pomiarowych wzrost wartości RF wyznaczono względem sygnałów uzyskanych tego samego dnia dla wzorca Ag^+ w 0,1% Tritonie X-100.

Mimo, że odzysk srebra był zależny od zastosowanego wariantu kalibracji (Rys. 38), rozmiary AgNPs wyekstrahowanych z komórek glonów były podobne we wszystkich trzech podejściach (Tab. 26).

Tabela 25. Parametry analityczne metody oznaczania srebra techniką sp ICP MS uzyskane przy różnych wariantach kalibracji

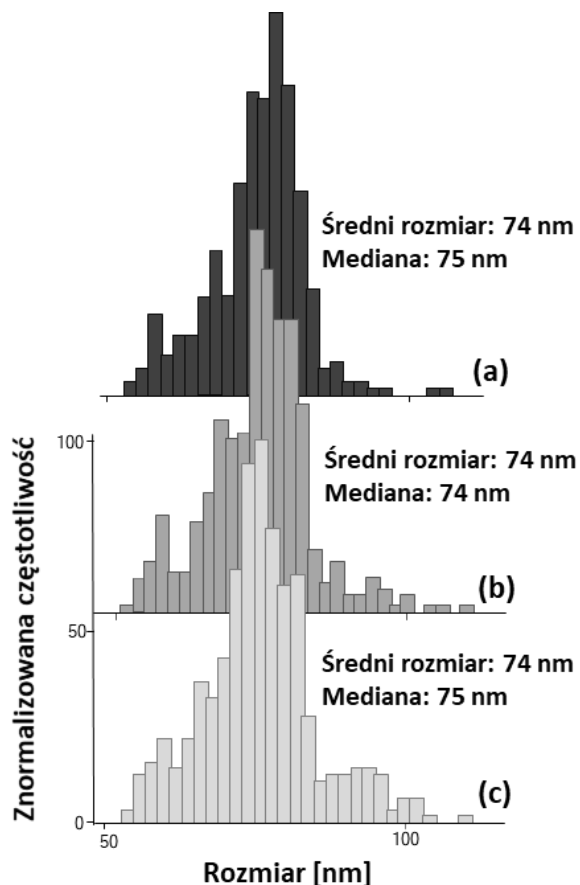
Układ	Granice wykrywalności			Precyzja (RSD [%]) (n = 5)		RF [kpcps ($\mu\text{g L}^{-1}$) ⁻¹] (*wzrost RF)
	Rozmiar [nm]	Stężenie liczbowe	Stężenie masowe	Określenie rozmiaru	Oznaczenie masy	
0,1% TMAH + 0,1% Triton X-100	20 11 ^b	$9,7 \cdot 10^5 \text{ L}^{-1}$ $5,8 \cdot 10^4 \text{ g}^{-1}$	$0,11 \text{ ng L}^{-1}$ $0,01 \text{ ng g}^{-1}$	0,7 0,7 ^c	3,9	$67,8 \pm 2,8$ (n = 2) *1,53
Lizat komórkowy (TMAH) + 0,1% Triton X-100	32 31 ^b	$1,3 \cdot 10^6 \text{ L}^{-1}$ $7,9 \cdot 10^4 \text{ g}^{-1}$	$0,42 \text{ ng L}^{-1}$ $0,03 \text{ ng g}^{-1}$	0,7	2,5	$40,9 \pm 0,8$ (n = 2) *1,51
Lizat komórkowy (Macerozym R-10) + 0,1% Triton X-100	33 36 ^b	$9,4 \cdot 10^5 \text{ L}^{-1}$ $5,6 \cdot 10^4 \text{ g}^{-1}$	$0,22 \text{ ng L}^{-1}$ $0,02 \text{ ng g}^{-1}$	0,6	3,1	$32,5 \pm 0,5$ (n = 2) *1,06

RF – współczynnik odpowiedzi wzorca jonowego,
^a wyznaczony na podstawie zależności średniej liczby zliczeń od średnicy AgNPs podniesionej do potęgi trzeciej,
^b BED – obliczony przez oprogramowanie,
* wzrost wartości RF względem wartości uzyskanych dla 0,1% Tritonu X-100.

Tabela 26. Rozmiar AgNPs wyekstrahowanych 10% TMAH ze wzbogaconych próbek glonów wyznaczony techniką sp ICP MS przy zastosowaniu różnych wariantów kalibracji (n = 4)

Forma srebra	Rozmiar AgNPs (Średnia) \pm SD [nm]	Rozmiar AgNPs (Mediana) \pm SD [nm]	Najczęściej występujący rozmiar AgNPs \pm SD (nm)
Kalibracja w 0,1% Tritonie X-100 (Procedura A)			
75 nm PVP-AgNPs (RM 8017)	$74,5 \pm 0,7$	$75,0 \pm 0,0$	$77,0 \pm 1,4$
60 nm PVP-AgNPs	$62,8 \pm 1,0$	$61,3 \pm 0,5$	$59,0 \pm 2,0$
Kalibracja w 0,1% TMAH + 0,1% Tritonie X-100 (Procedura B)			
75 nm PVP-AgNPs (RM 8017)	$73,5 \pm 0,7$	$74,5 \pm 0,7$	$75,0 \pm 1,4$

60 nm PVP-AgNPs	$62,0 \pm 1,6$	$61,8 \pm 1,3$	$63,0 \pm 2,0$
Kalibracja z dopasowaniem matrycy w obecności 0,1% Tritonu X-100 (Procedura C)			
75 nm PVP-AgNPs (RM 8017)	$74,5 \pm 0,7$	$75,0 \pm 0,0$	$77,0 \pm 1,4$
60 nm PVP-AgNPs	$62,5 \pm 0,6$	$61,0 \pm 0,8$	$59,0 \pm 2,0$



Rysunek 39. Rozkłady wielkości AgNPs uzyskane za pomocą techniki sp ICP MS dla (a) 75 nm AgNPs w 0,1% Tritonie X-100, (b) 75 nm AgNPs w 0,1% TMAH + 0,1% Tritonie X-100, (c) 75 nm AgNPs ekstrahowanych za pomocą 10% TMAH ze wzbogaconych kontrolnych próbek komórek glonów [482]

Jak widać na rysunku 39, rozkłady wielkości cząstek uzyskane po trawieniu alkalicznym komórek glonów wzbogaconych w 75 nm AgNPs (RM 8017) były podobne do rozkładów wyznaczonych dla zawiesin sporządzonych w 0,1% Tritonie X-100 i 0,1% TMAH + 0,1% Triton X-100. Średnie i mediany wielkości (pokazane na rysunkach 39a, 39b i 39c) były zgodne z wartością odniesienia ($74,6 \pm 3,8$ nm). Rozmiary cząstek określone w próbkach wzbogaconych w 60 nm AgNPs (średni rozmiar: 63 ± 1 nm, mediana rozmiaru: 61 ± 1 nm) były również zgodne z nominalną średnicą AgNPs podawaną przez producenta (58 ± 8 nm). Powyższe obserwacje wskazują na to, że trawienie alkaliczne nie wpłynęło na zmianę

rozmiarów AgNPs, m.in. poprzez agregację. Ponadto frakcja jonowa wykryta w lizatach komórkowych była równa $8,3 \pm 0,2\%$ dla próbek wzbogaconych w 75 nm AgNPs (RM 8017) i $9,0 \pm 0,2\%$ dla próbek z dodatkiem 60 nm AgNPs, co można uznać za satysfakcjonujący wynik. W przypadku próbek wzbogaconych w Ag^+ frakcja jonowa stanowiła $97,1 \pm 0,9\%$, co sugeruje, że podczas alkalicznego trawienia komórek glonów nie dochodziło do wytrącania jonów srebra. Jest to prawdopodobnie wynikiem tworzenia się kompleksów Ag^+ z grupami funkcyjnymi obecnymi w warstwie substancji egzopolimerowych występującej na powierzchni komórek, takimi jak grupy karboksylowe [82].

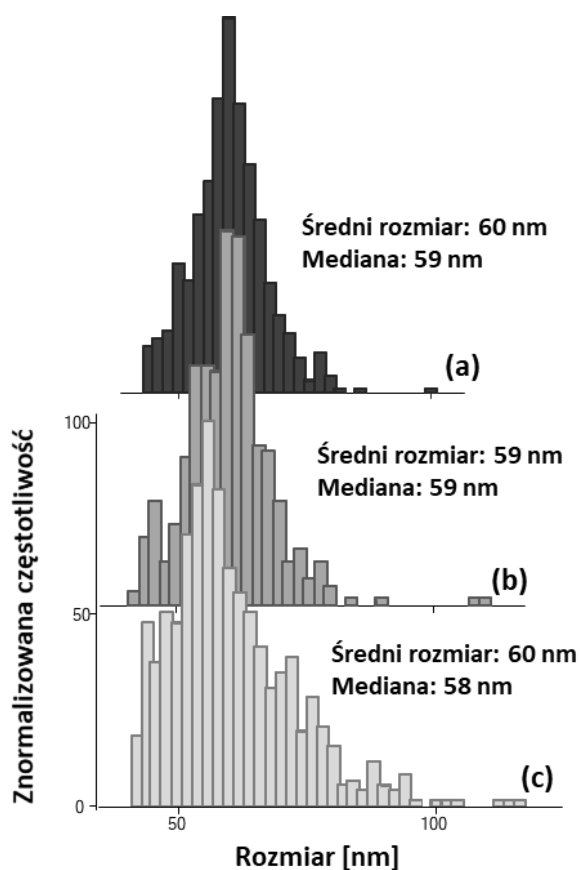
Najlepsze rezultaty pod względem efektywności trawienia matrycy próbki, odzysków obu form srebra (Ag^+ , AgNPs) oraz zminimalizowania ryzyka transformacji analitu wpływających na wyniki pomiarów uzyskano przy zastosowaniu procedury trawienia alkalicznego w obecności 10% TMAH. Zoptymalizowaną metodę przygotowania materiału roślinnego zastosowano do zbadania specjacji srebra w układzie woda powierzchniowa – glony *Desmodesmus subspicatus*.

8.4. Zastosowanie zoptymalizowanej metody oznaczania Ag^+ /AgNPs techniką sp ICP MS w próbkach środowiskowych i biologicznych

Opracowaną metodę zastosowano do określenia losów różnych form srebra (Ag^+ , AgNPs) w układach zawierających wodę rzeczną oraz zielenice *D. subspicatus*. Komórki glonów zawieszono w wodzie powierzchniowej pobranej z rzeki Supraśl (pH = 7,6 – 8,0) wzbogaconej w Ag^+ lub 60 nm AgNPs i inkubowano w kontrolowanych, sterylnych warunkach przez 24 godziny (zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 6.3.). Supernatanty otrzymane po inkubacji oraz lizaty komórkowe przygotowane zgodnie z zoptymalizowaną procedurą trawienia alkalicznego (Procedura 3 - opisana w podrozdziale 6.5.1.) badano przy użyciu techniki sp ICP MS. Wyniki analizy specjacyjnej srebra w supernatantach i lizatach komórkowych przedstawiono w tabeli 27.

Histogramy rozkładu wielkości cząstek przedstawiono na rysunkach 40a, 40b i 40c. Można zauważyć, że rozkład uzyskany dla AgNPs wyekstrahowanych z komórek glonów (Rys. 40c) jest szerszy niż rozkłady wielkości AgNPs zarejestrowane dla roztworów modelowych przygotowanych w 0,1% Tritonie X-100 + 0,1% TMAH (Rys. 40a) i w supernatantach (Rys. 40b). Pomimo, że średnie i mediany rozmiarów AgNPs wyekstrahowanych z komórek glonów były zbliżone do średnicy nominalnej (58 ± 8 nm), zaobserwowano większy udział mniejszych i większych nanocząstek. Ponieważ nie było to

tak widoczne w eksperymencie ze wzbogaconymi próbkami kontrolnymi glonów (Rys. 39c), zmiany obserwowane w rozkładach wielkości AgNPs uzyskanych dla lizatów komórkowych (Rys. 40c) są najprawdopodobniej wynikiem oddziaływań AgNPs z komórkami glonów podczas 24-godzinnej inkubacji.



Rysunek 40. Rozkłady wielkości AgNPs uzyskane za pomocą techniki sp ICP MS dla (a) 60 nm AgNPs w 0,1% TMAH + 0,1% Tritonie X 100, (b) supernatantów otrzymanych po 24-godzinnej inkubacji glonów w wodzie powierzchniowej wzbogaconej w 60 nm AgNPs oraz (c) lizatów komórkowych otrzymanych po trawieniu TMAH glonów ekspozycyjnych na działanie 60 nm AgNPs przez 24 godziny [482]

Tabela 27. Stężenia i zawartości srebra oznaczone techniką sp ICP MS w supernatantach i lizatach komórkowych glonów (trawionych 10% TMAH) po 24 h inkubacji z Ag⁺ lub 60 nm PVP-AgNPs w wodach powierzchniowych (n = 2)

Próbka	Ag ⁺	AgNPs	
	Stężenie/Zawartość srebra jonowego	Stężenie masowe	Stężenie liczbowe
<i>Supernatanty</i>	µg L ⁻¹	µg L ⁻¹	L ⁻¹
Próbka kontrolna	0,035 ± 0,001	0,007 ± 0,001	-

Układ wzbogacony w Ag ⁺	1,106 ± 0,195	0,013 ± 0,001	-
Układ wzbogacony w 60 nm PVP-AgNPs	0,610 ± 0,042	0,347 ± 0,045	2,3·10 ⁸ ± 2,2·10 ⁷
Lizaty komórkowe	μg g ⁻¹	μg g ⁻¹	NPs g ⁻¹
Próbka kontrolna	0,057 ± 0,024	0,007 ± 0,003	-
Układ wzbogacony w Ag ⁺	1,751 ± 0,123	0,007 ± 0,001	-
Układ wzbogacony w 60 nm PVP-AgNPs	0,481 ± 0,149	0,966 ± 0,129	6,1·10 ⁸ ± 2,2·10 ⁷

Biosorpcja srebra w przypadku układów wzbogaconych w Ag⁺ oraz 60 nm AgNPs wyniosła odpowiednio 71,3 ± 6,4% oraz 59,9 ± 5,4%, zaś biosorpcja srebra w układzie woda rzeczna – glony *Desmodesmus subspicatus* wyniosła 93,7 ± 6,6% dla Ag⁺ i 80,1 ± 7,5% dla AgNPs. W przypadku próbek uzyskanych po inkubacji z Ag⁺ frakcja jonowa stanowiła 99% całkowitego srebra oznaczonego w układzie. Należy jednak zaznaczyć, że część tej frakcji mogły stanowić nanocząstki o rozmiarach mniejszych niż LOD_{size} (< 25 nm w supernatantach i < 34 nm w lizatach komórkowych) obliczone przy użyciu narzędzia opracowanego przez Laborde et al. [433]. Biosynteza AgNPs z jonów srebra przez żywe komórki glonów została już wykazana w literaturze [483]. Identyfikacja obecności małych nanocząstek wymaga dalszych badań z zastosowaniem innych technik, takich jak TEM i HPLC-ICP MS z wykorzystaniem kolumny z odwróconą fazą (RP) lub chromatografii wykluczenia (SEC), które są rozwijane w naszym zespole.

Obecność rozpuszczonej frakcji metalu i/lub nanocząstek mniejszych niż LOD_{size} stwierdzono również w próbkach uzyskanych po inkubacji z 60 nm AgNPs. Frakcja ta stanowiła 33% całkowitego srebra oznaczonego w komórkach glonów i 64% srebra oznaczanego w środowisku pozakomórkowym (wodzie powierzchniowej). Ponieważ rozpuszczanie AgNPs nie było obserwowane w wodzie powierzchniowej bez glonów, transformacja nanocząstek była najprawdopodobniej wynikiem interakcji z komórkami glonów i/lub substancjami egzopolimerowymi wytwarzanymi przez te mikroorganizmy. Utlenianie AgNPs w środowisku biologicznym prowadzące do wytwarzania Ag⁺ zostało już opisane w literaturze. Uwalnianie srebra jonowego z AgNPs zaobserwowano w badaniach prowadzonych na glonach *Euglena gracilis* [77], *Chlamydomonas reinhardtii* [484] lub *Pseudokirchliniella subcapitata* [485]. Jednak należy zaznaczyć, że mechanizm oddziaływania AgNPs z różnymi gatunkami glonów pozostaje niejasny i będzie wymagał dalszych badań.

W trakcie wykonywania tej części pracy doktorskiej opracowałem metodę sp ICP MS umożliwiającą śledzenie losów oraz przemian Ag^+ i AgNPs w wodach powierzchniowych i komórkach glonów. Stwierdziłem, że składniki środowiska, takie jak kationy nieorganiczne i matryca organiczna mają wpływ na efektywność pobierania przez glony różnych form srebra. Biosorpcja AgNPs była zależna od ich rozmiaru i zmniejszała się wraz ze wzrostem wielkości cząstek (w przedziale 30 – 75 nm) (Rys. 22, Tab. 24). Wybór odpowiednich odczynników i warunków trawienia ma kluczowe znaczenie dla dokładnego określenia wielkości i stężenia AgNPs związanych z komórkami glonów. Zbadałem trzy różne podejścia mające na celu dezintegrację błon komórkowych i uwolnienie srebra z komórek *D. subspicatus*: bezpośrednią ekstrakcję w Tritonie X-100, trawienie enzymatyczne macerozymem R-10 i trawienie alkaliczne w obecności wodorotlenku tetrametyloamoniowego (TMAH). We wszystkich podejściach zastosowałem etap sonikacji przy użyciu sondy ultradźwiękowej. Najbardziej efektywną degradację matrycy i uwalnianie różnych form srebra odnotowałem w przypadku zastosowania zoptymalizowanego trawienia alkalicznego w obecności TMAH (10% TMAH, 24 h, temperatura pokojowa). Ponadto podczas analizy skomplikowanych próbek, takich jak lizaty komórek glonów, do uzyskania wiarygodnych wyników niezbędne było zastosowanie kalibracji z dopasowaniem matrycy (Rys. 38), która umożliwiła uzyskanie ilościowych odzysków srebra. Opracowana metoda sp ICP MS charakteryzuje się bardzo niskimi granicami wykrywalności ($0,11 \text{ ng L}^{-1}$ i $9,7 \cdot 10^5 \text{ NPs L}^{-1}$), co czyni ją odpowiednią do analizy próbek środowiskowych i biologicznych. Głównym ograniczeniem tej metody jest granica wykrywalności wielkości cząstek ($\text{LOD}_{\text{size}} \sim 20 \text{ nm}$), która zależy od czułości spektrometru ICP MS oraz poziomu sygnału tła.

9. Badania TiO_2NPs w próbkach grochu zwyczajnego techniką ICP MS i sp ICP MS

Nanocząstki TiO_2 przedostają się do różnych elementów biosfery ze źródeł naturalnych i antropogenicznych skąd mogą być pobierane przez rośliny wyższe. Obecność TiO_2NPs może mieć negatywny wpływ na prawidłowe funkcjonowanie roślin, np. poprzez zaburzanie procesów fizjologicznych takich jak fotosynteza. Z przeglądu literaturowego wynika, że nanocząstki tlenku tytanu(IV) pobrane przez rośliny mogą być stabilne i nie ulegać transformacji przez okres co najmniej 7 dni [325]. Stwarza to ryzyko przekazywania TiO_2NPs w formie niezmięnionej wzdłuż łańcucha troficznego. W badaniach jako roślinę modelową zastosowano groch zwyczajny (*Pisum sativum L.*). Dokładny opis hydroponicznej

hodowli grochu eksponowanego na działanie 0, 10, 50 oraz 100 mg L⁻¹ TiO₂NPs przedstawiono w rozdziale 6.4.

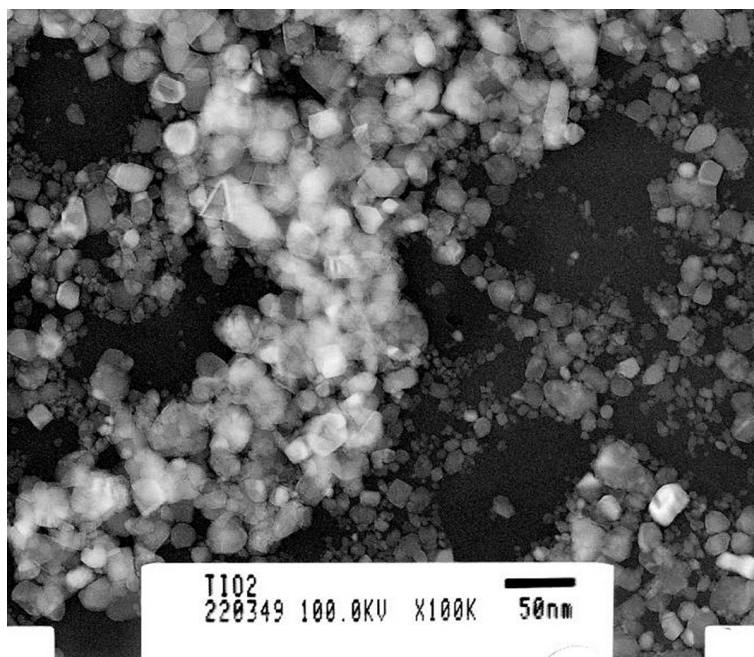
W tym rozdziale opisano badania dotyczące bioakumulacji oraz biodystrybucji tlenku tytanu(IV) w grochu zwyczajnym. W celu oznaczenia całkowitej zawartości Ti w różnych częściach roślin dokonano optymalizacji procedury rozkładu próbek roślin oraz metody oznaczania tytanu techniką ICP MS. Zbadano również użyteczność techniki sp ICP MS do określenia rozmiarów cząstek TiO₂ zakumulowanych w korzeniach, łodygach oraz liściach grochu zwyczajnego. Analiza rozmiarów cząstek tlenku tytanu(IV) wymagała optymalizacji procedury uwalniania TiO₂ z materiału roślinnego i dobrania odpowiednich warunków pomiarowych oraz procedury kalibracji.

Oznaczanie tytanu w próbkach środowiskowych i biologicznych techniką ICP MS i sp ICP MS wiąże się z występowaniem licznych interferencji izobarycznych i wieloatomowych. W badaniach podjęto próbę eliminacji interferencji przy użyciu potrójnego kwadrupola oraz pomiaru mniej rozpowszechnionych izotopów tytanu (⁴⁷Ti lub ⁴⁹Ti). Takie rozwiązanie powoduje jednak obniżenie czułości oznaczania tytanu, co w połączeniu z niską efektywnością jonizacji TiO₂NPs, silną tendencją do agregacji oraz niesferycznym kształtem czyni, że ich oznaczanie jest wyzwaniem analitycznym. Dodatkowo trzeba wspomnieć, że udział masy Ti w cząstce TiO₂ wynosi zaledwie 59,93%. Podczas analizy TiO₂NPs techniką sp ICP MS oznaczany jest tytan, a następnie otrzymana masa przeliczana jest na masę tlenku tytanu(IV), co wprowadza dodatkowe założenie. Brakuje również materiałów odniesienia i wzorców zawierających TiO₂NPs o dobrze scharakteryzowanych rozmiarach, które mogłyby być z powodzeniem zastosowane do wyznaczania efektywności wprowadzania próbki do strumienia plazmy. Podczas analizy TiO₂NPs do wyznaczania η_{neb} stosowane są nanocząstki innych metali, np. złota. Warto podkreślić, że zastosowanie do kalibracji nanocząstek o odmiennych właściwościach fizykochemicznych od oznaczanych, wiąże się z ryzykiem powstania błędu systematycznego wynikającego z różnic w rzeczywistej efektywności wprowadzenia obu rodzajów nanocząstek.

W badaniach wstępnych w przypadku prób sporządzenia wodnych roztworów TiO₂NPs w formie rutyli i mieszaniny rutil/anataz przy użyciu komercyjnie dostępnych nanoproszków (TiO₂NPs < 100 nm) występowały problemy z uzyskaniem stabilnych dyspersji. Pomimo, że na przygotowane z odważek roztwory podstawowe przed każdym rozcieńczeniem działano ultradźwiękami, obserwowano agregację cząstek, które opadały na dno tworząc biały osad. Wartości odzysków TiO₂ wyrażone jako stosunek masy oznaczonej techniką sp ICP MS do masy nominalnej podanej przez producenta nie przekraczały 35%.

Dokładny opis przygotowania roztworów przedstawiono w rozdziale 5.3. Dużo większą stabilność wykazywał wzorec w formie wodnej zawiesiny TiO_2NPs < 150 nm (40 wt. %). Wykorzystując techniki TEM i DLS stwierdzono, że TiO_2NPs posiadają niesferyczny kształt, a ich średni rozmiar wyznaczony techniką transmisyjnej mikroskopii elektronowej wyniósł 27 ± 10 nm (przykładowe zdjęcie TEM - Rys. 41). Przy czym stwierdzono również obecność frakcji TiO_2NPs o rozmiarach mniejszych niż 10 nm. Rozmiar TiO_2NPs oraz potencjał zeta wyznaczone techniką DLS wyniosły odpowiednio 134 ± 3 nm oraz $35,3 \pm 1,8$ mV. Wzorec TiO_2NPs < 150 nm w postaci wodnej zawiesiny został zastosowany we wszystkich eksperymentach opisanych w dalszej części pracy.

Odważanie nanoproszków oraz wysuszonych i zliofilizowanych części roślin ze względu na obecność ładunku elektrostatycznego wymagało zastosowania bramki antystatycznej.



Rysunek 41. Zdjęcie otrzymane dla wzorca TiO_2NPs < 150 nm za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego

9.1. Oznaczenie całkowitej zawartości tytanu w materiale roślinnym techniką ICP MS

Optymalizacja metody rozkładu nanocząstek TiO_2NPs (< 150 nm)

Mineralizacja próbek środowiskowych i biologicznych zawierających tlenek tytanu(IV) w celu oznaczenia całkowitej zawartości Ti jest trudniejsza niż przygotowanie

próbek do oznaczenia całkowitej zawartości srebra. W literaturze autorzy stosują różne procedury roztwarzania materiału roślinnego przed oznaczaniem, często typowe do rozkładu próbek roślinnych, czyli kwas azotowy(V) z dodatkiem nadtlenu wodoru (np. [486]). Jednak naszym zdaniem całkowite roztworzenie TiO_2 może wymagać zastosowania wysokociśnieniowych systemów do mineralizacji wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym oraz dodatku kwasu fluorowodorowego (HF). Problemem przy użyciu HF jest konieczność zastosowania odpowiedniego układu wprowadzającego próbkę lub neutralizacji kwasu fluorowodorowego przed wprowadzeniem do komory mgielnej i palnika spektrometru ICP MS. W literaturze można znaleźć również prace, w których autorzy proponują zastosowanie odpowiednio dużych rozcieńczeń mineralizatów, tak aby stężenie HF nie przekraczało 2% [262]. W moich badaniach stosowany był układ wprowadzający próbkę zawierający elementy wykonane z kwarcu. Dlatego badania rozpocząłem od sprawdzenia efektywności roztwarzania tlenku tytanu(IV) bez stosowania kwasu fluorowodorowego oraz z kwasem fluorowodorowym, ale zmniejszając rekomendowaną przez producenta mineralizatora objętość stężonego HF z 2 mL do 1 mL. W ten sposób próbowałem uniknąć konieczności wykonywania dodatkowych operacji związanych z neutralizacją pozostałości HF. Sprawdziłem również jaki wpływ na wartości odzysków całkowitej zawartości Ti mają procedury z odparowaniem oraz neutralizacją HF przy użyciu H_3BO_3 .

W badaniach wstępnych z udziałem 50 μL wodnej zawiesiny $\text{TiO}_2\text{NPs} < 150 \text{ nm}$ (40 wt. %) ($m_{\text{Ti}} \sim 13,8 \text{ mg}$) przetestowałem sześć procedur mineralizacji z wykorzystaniem różnych mieszanin odczynników:

- 1) 2,5 mL 69% HNO_3 + 7,5 mL $\geq 37\%$ HCl (stosunek 1:3, woda królewska),
- 2) 12 mL 69% HNO_3 + 2 mL $\geq 37\%$ HCl (stosunek 6:1),
- 3) 10 mL 69% HNO_3 + 2 mL 47 – 51% HF,
- 4) 10 mL 69% HNO_3 + 1 mL 47 – 51% HF,
- 5) 10 mL 69% HNO_3 + 2 mL 47 – 51% HF, a następnie odparowanie HF,
- 6) 10 mL 69% HNO_3 + 2 mL 47 – 51% HF, a następnie neutralizacja HF przy użyciu 30 mL 4% H_3BO_3 ,

W badaniach zastosowałem system do mineralizacji ciśnieniowej wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym firmy CEM model MARS 6. Dwuetapowy program mineralizacji zastosowany przy ostatniej procedurze został przedstawiony w tabeli 21 (podrozdział 6.5.3.). W pozostałych wariantach roztwarzania wzorca TiO_2 ograniczono się do pierwszego etapu. W przypadku każdej procedury sporządzono po dwie równoległe próbki i ślepe próby. Odparowanie pozostałości kwasu fluorowodorowego przeprowadzono

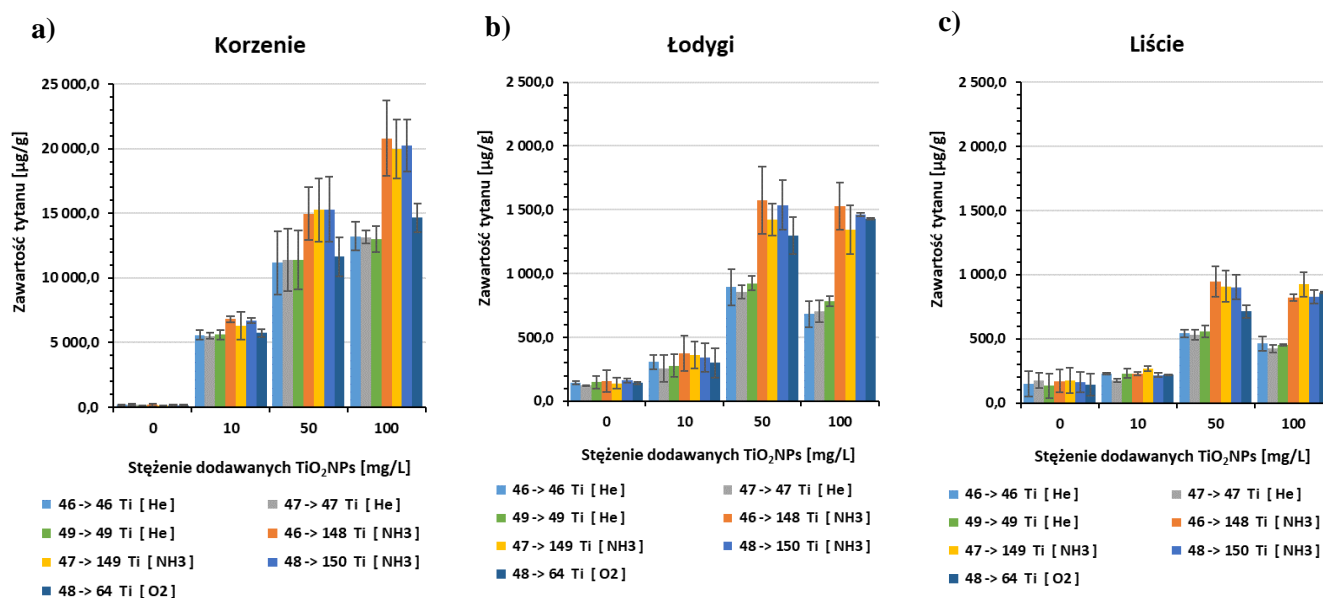
w tygłach kwarcowych. Mineralizat odparowano prawie do sucha, a następnie dodano 2 mL 69% HNO₃. Otrzymany roztwór przeniesiono ilościowo do pojemnika o pojemności 20 mL. Tygłe opłukano 3-krotnie 1 mL wody Milli-Q i dołączono do badanego roztworu.

Niestety, w przypadku dwóch pierwszych procedur ((1) i (2) bez dodatku HF) roztworzenie TiO₂ nie było ilościowe nawet przy kilkukrotnym powtórzeniu cyklu mineralizacji. We wszystkich roztworach otrzymanych po procesie roztwarzania pozostawał obfity biały osad. Klarowne mineralizaty uzyskano natomiast w przypadku pozostałych procedur. Zmniejszenie objętości stężonego HF o połowę nie przełożyło się na wizualne różnice w klarowności roztworów. Mineralizaty otrzymane przy użyciu procedury (3) i (4) oznaczono techniką ICP MS stosując warunki pomiarowe przedstawione w tabeli 17. Wszystkie wzorce kalibracyjne przygotowano w 0,1% HNO₃, jako wzorzec wewnętrzny zastosowano rod (25 µg L⁻¹ Rh, mierzony izotop ¹⁰³Rh). Rozcieńczenie roztworów zostało dobrane tak, aby stężenie HF nie przekraczało 1%. W przypadku zastosowania objętości HF rekomendowanej przez producenta CEM (2 mL) wartości odzysków Ti wyniosły 90,5 ± 2,2%, natomiast dla mniejszej objętości (1 mL) 86,1 ± 2,4%. Pomimo zastosowania dużych rozcieńczeń mineralizatów, po wykonaniu kilku serii oznaczeń zaobserwowano wystąpienie przebarwień na powierzchni komory mgielnej wykonanej z kwarcu. Dlatego postanowiono zastosować dodatkowy etap pozwalający na neutralizację HF. W procedurze (5) podczas odparowania pozostałości kwasu fluorowodorowego dochodziło do częściowego wytrącenia tytanu, co przełożyło się na straty analitu. Dodatkowo procedura była bardzo czasochłonna. Dobre rezultaty uzyskano natomiast przy zastosowaniu dodatkowego etapu mineralizacji z kwasem borowym (procedura 6), gdzie odzysk tytanu z wzorca TiO₂ wyniósł 89,8 ± 1,0%. Do dalszych badań wybrano procedurę z etapem neutralizacji HF przy użyciu H₃BO₃.

Powyższe rozważania dotyczyły wzorca tlenku tytanu (IV). W celu określenia użyteczności wybranej procedury do przygotowania próbek roślinnych przetestowano ją również pod kątem wartości odzysków tytanu uzyskanych dla próbek kontrolnych korzeni wzbogaconych w TiO₂. W tym celu do 10 mg zliofilizowanych i zhomogenizowanych korzeni dodano 50 µL wzorca TiO₂NPs < 150 nm. Otrzymane zawiesiny poddano mineralizacji przy użyciu procedury (6). Równolegle zmineralizowano próbki kontrolne korzeni bez dodatku wzorca. Wartości odzysków Ti w tym eksperymencie wyniosły 95,1 ± 12,3%, co świadczy o poprawności metody. Opracowaną metodę zastosowano do rozkładu korzeni, łodyg i liści grochu zwyczajnego.

Oznaczanie Ti techniką ICP MS w roślinach

Wybraną procedurę mineralizacji zastosowano do rozkładu zliofilizowanych części roślin (10 mg korzeni oraz 20 mg łodyg i liści). Badania obejmowały rośliny, które podczas hodowli eksponowane były na działanie 0, 10, 50 oraz 100 mg L⁻¹ TiO₂NPs. Z uwagi na obecność matrycy roślinnej zawierającej składniki mogące mieć wpływ na przebieg oznaczenia, np. wapń (prowadzący do powstawania interferencji izobarycznych) oraz siarkę, azot i fosfor mogące tworzyć addukty o tym samym stosunku m/z co badany izotop (interferencje wielotomowe) (Tab. 15) pomiary ICP MS przeprowadzono w 7 trybach. Wszystkie wzorce kalibracyjne przygotowano w 0,1% kwasie azotowym(V), jako wzorec wewnętrzny zastosowano 25 µg L⁻¹ Rh (mierzony izotop ¹⁰³Rh) [487]. Sygnały zarejestrowano dla trzech izotopów tytanu (⁴⁶Ti, ⁴⁷Ti oraz ⁴⁹Ti) w trybie pomiarowym z użyciem helu jako gazu kolizyjnego (⁴⁶Ti → ⁴⁶Ti, ⁴⁷Ti → ⁴⁷Ti, ⁴⁹Ti → ⁴⁹Ti). Pomiary przeprowadzono również z użyciem gazów reakcyjnych: 3 tryby pomiarowe z amoniakiem (⁴⁶Ti → ⁴⁶Ti(NH₃)₆⁺, ⁴⁷Ti → ⁴⁷Ti(NH₃)₆⁺, ⁴⁸Ti → ⁴⁸Ti(NH₃)₆⁺) oraz tryb z tlenem (⁴⁸Ti → ⁴⁸TiO⁺). Z przeglądu literaturowego wynika, że oznaczanie najbardziej rozpowszechnionego izotopu tytanu (⁴⁸Ti, A = 73,72%) w próbkach roślinnych ze względu na liczne interferencje izobaryczne oraz wieloatomowe powinno być przeprowadzone przy użyciu wysokorozdzielczych spektrometrów ICP MS lub spektrometrów ICP-QQQ z zastosowaniem odpowiedniego gazu reakcyjnego. Na rysunku 42 przedstawiono wyniki uzyskane podczas oznaczeń całkowitej zawartości Ti w materiale roślinnym przy użyciu wymienionych powyżej trybów pomiarowych.

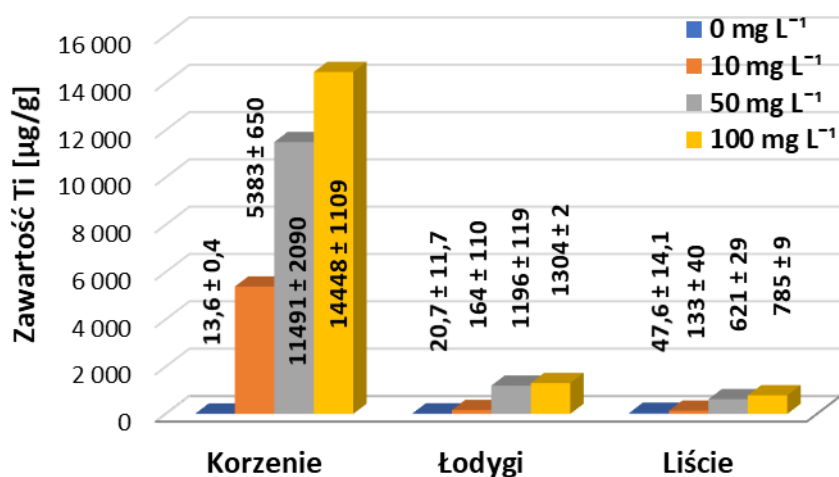


Rysunek 42. Całkowite zawartości Ti oznaczone techniką ICP MS przy użyciu 7 trybów pomiarowych w: (a) korzeniach, (b) łodygach oraz (c) liściach

Pomimo przeprowadzenia pomiarów dla różnych izotopów tytanu (^{46}Ti , ^{47}Ti , ^{48}Ti , ^{49}Ti) oraz trybów pomiarowych z zastosowaniem potrójnego kwadrupola w próbkach kontrolnych oznaczono stosunkowo duże zawartości tytanu. W przypadku korzeni, łodyg oraz liści były to wartości mieszczące się odpowiednio w przedziałach: 128,5 – 199,9; 121,6 – 163,3 oraz 133,1 – 175,1 $\mu\text{g g}^{-1}$. Wysokie stężenie tytanu wykryto również w ślepych próbkach, które zawierały wszystkie odczynniki użyte do mineralizacji próbek i zostały poddane tej samej procedurze co badany materiał roślinny. Oznaczone w ślepych próbkach stężenie Ti wyniosło $48,5 \pm 6,4 \mu\text{g L}^{-1}$. Dlatego postanowiono zbadać, czy otrzymane wyniki odzwierciedlają rzeczywistą zawartość tytanu w próbkach, czy są konsekwencją nieusuniętych interferencji izobarycznych i/lub wieloatomowych.

W tym celu przeprowadzono pomiary dla tych samych mineralizatorów (ślepych prób, próbek kontrolnych liści i korzeni oraz próbek liści i korzeni grochu eksponowanego na działanie $50 \text{ mg L}^{-1} \text{ TiO}_2\text{NPs}$) przy użyciu wysokorozdzielczej atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w kuwecie grafitowej z ciągłym źródłem promieniowania (HR CS GF AAS). Do badań wybrano technikę nieobarczoną interferencjami występującymi przy zastosowaniu spektrometrii mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną. Stężenie Ti oznaczone techniką GFAAS w ślepych próbkach było ponad 5-krotnie niższe niż w przypadku analizy ICP MS ($9,3 \pm 2,1$ vs. $48,5 \pm 6,4 \mu\text{g L}^{-1}$). Wyniki uzyskane dla prób kontrolnych oraz części grochu eksponowanego na działanie $50 \text{ mg L}^{-1} \text{ TiO}_2\text{NPs}$ były zgodne z wartościami uzyskanymi w trybie pomiarowym z użyciem tlenu jako gazu reakcyjnego po odjęciu masy Ti

oznaczonej w ślepych próbach. Z tego względu tryb pomiarowy z użyciem tlenu jako gazu reakcyjnego został uznany za optymalny. Wyniki uzyskane podczas oznaczenia tytanu w trybie przesunięcia masy MS/MS ($^{48}\text{Ti}^+ \rightarrow ^{48}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$) przedstawiono na rysunku 43. W części prac opisanych w literaturze do eliminacji interferencji zalecany jest tryb z użyciem amoniaku jako gazu reakcyjnego [457]. Jednak w powyższych badaniach stwierdzono, że zastosowanie tego podejścia prowadzi do uzyskania wyników znacznie odbiegających od zawartości wyznaczonych techniką HR CS GFAAS (zwłaszcza w przypadku korzeni).

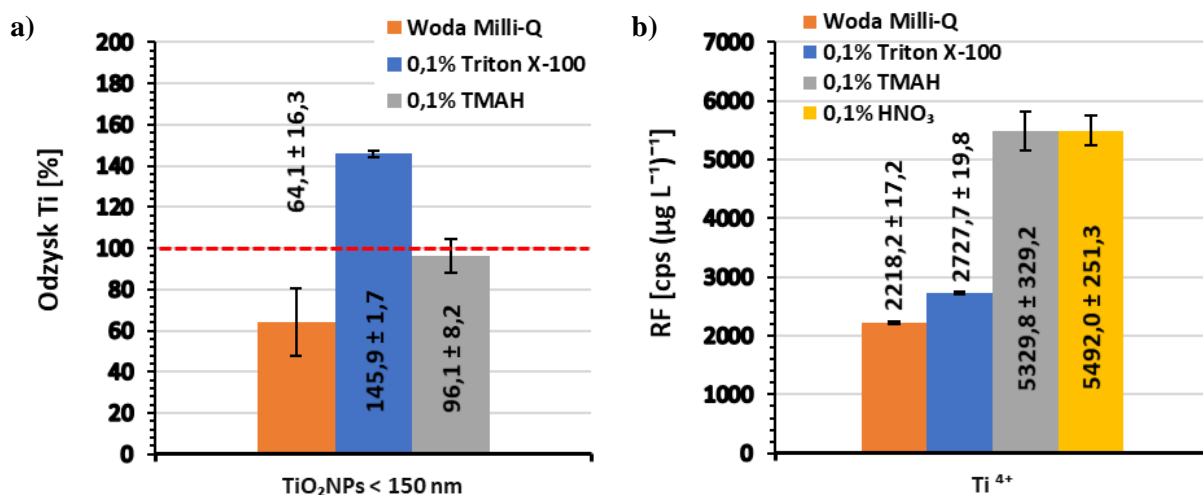


Rysunek 43. Zawartości Ti oznaczone techniką ICP MS/MS w różnych częściach roślin eksponowanych na działanie 0, 10, 50 oraz 100 mg L⁻¹ TiO₂NPs przy użyciu tlenu jako gazu reakcyjnego ($^{48}\text{Ti} \rightarrow ^{48}\text{TiO}^+$) po odjęciu wartości uzyskanych dla ślepych prób

9.2. Optymalizacja i charakterystyka metody sp ICP MS – badania w układach modelowych

Pierwszym etapem pracy było sprawdzenie czy podczas oznaczania TiO₂NPs techniką sp ICP MS, podobnie jak w przypadku oznaczania AgNPs, wymagany jest dodatek substancji stabilizującej. Badania wstępne przeprowadzono z udziałem roztworów zawierających 600 ng L⁻¹ TiO₂NPs < 150 nm sporządzonych w wodzie Milli-Q, 0,1% Tritonie X-100 oraz 0,1% TMAH. Triton X-100 został wybrany do badań ze względu na pozytywny wpływ na oznaczanie AgNPs w poprzedniej części pracy. Natomiast TMAH zbadano pod kątem potencjalnego zastosowania do przygotowania materiału roślinnego poprzez trawienie alkaliczne. Pomiary prowadzono z użyciem potrójnego kwadrupola, w trybie wykorzystującym tlen jako gaz reakcyjny ($^{48}\text{Ti} \rightarrow ^{48}\text{TiO}^+$), dla którego uzyskano najlepsze rezultaty podczas oznaczenia całkowitej zawartości tytanu po mineralizacji próbek. Dodatkowo tryb ten jest rekomendowany w wielu pracach dotyczących analizy TiO₂NPs

techniką sp ICP MS [258,393,488]. Dane przetwarzano przy użyciu oprogramowania Agilent MassHunter 4.5. Charakterystykę cząstek TiO_2 przeprowadzono za pomocą techniki sp ICP MS. Dane zebrano w trybie opartym na pomiarze sygnału zmiennego w czasie (TRA). Efektywność transportu próbki do strumienia plazmy wyznaczano codziennie metodą opartą o zastosowanie wzorca nanocząstek o zdefiniowanym rozmiarze [422]. W tym celu stosowano wzorec c-AuNPs 60 nm. System wprowadzania próbek płukano 2% HNO_3 (60 s, 0,3 obr./min) i wodą Milli-Q (60 s, 0,3 obr./min) przed każdym pomiarem. Warunki pomiarowe zastosowane przy oznaczaniu TiO_2 NPs techniką sp ICP MS przedstawiono w tabeli 18. Na rysunku 44a zestawiono wartości odzysków Ti uzyskane dla 600 ng L^{-1} TiO_2 NPs przy kalibracji w wodzie Milli-Q i w obecności pozostałych badanych substancji.

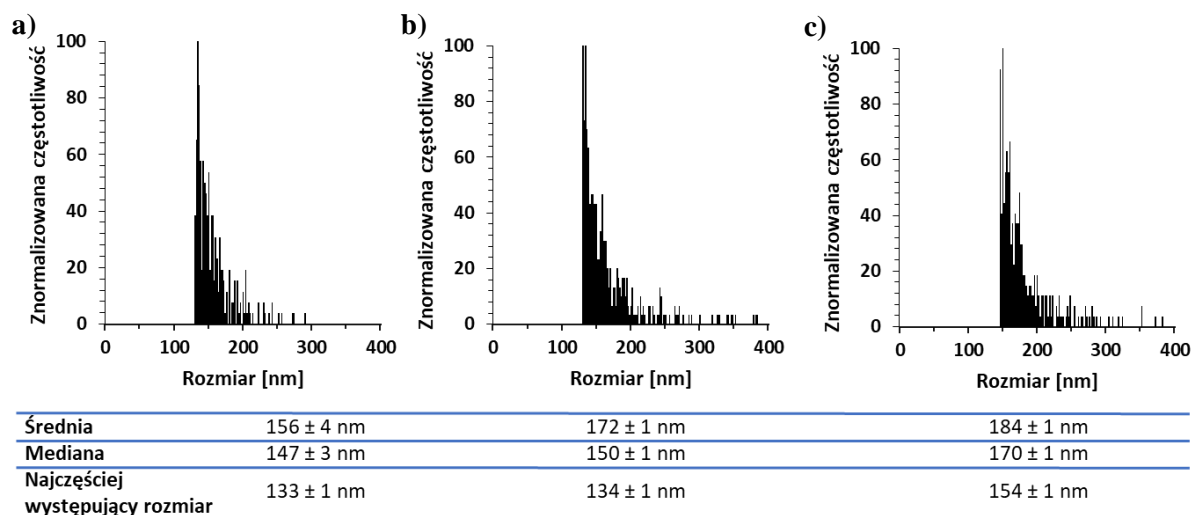


Rysunek 44. (a) Wpływ dodatku 0,1% Tritonu X-100 i 0,1% TMAH na wartości odzysków tytanu oznaczonego techniką sp ICP MS. (b) Współczynnik odpowiedzi wzorca jonowego Ti (RF) uzyskany w różnych układach ($n = 2$)

Przy przeprowadzeniu kalibracji w wodzie Milli-Q wartości odzysków Ti były niedoszacowane ($64,1 \pm 8,9\%$). Z kolei zastosowanie 0,1% Tritonu X-100, który miał pozytywny wpływ na przebieg oznaczania AgNPs doprowadziło do przeszacowania wyników ($145,9 \pm 1,7\%$). Ilościowe odzyski tytanu uzyskano natomiast przy zastosowaniu kalibracji w 0,1% TMAH. Sprawdzone również jakie współczynniki odpowiedzi wzorca jonowego (RF) uzyskano przy różnych wariantach kalibracji. Ze względu na straty tytanu w formie jonowej do których może dochodzić na etapie kalibracji można znaleźć w literaturze prace, w których roztwory kalibracyjne Ti^{4+} sporządzano w kwasie azotowym(V) (np. 0,1% [488]). Wartości RF w przypadku wzorca jonowego sporządzonego w wodzie Milli-Q i 0,1% Tritonu X-100 były znacznie niższe niż odpowiedź uzyskana dla roztworu Ti^{4+} w 0,1% HNO_3

(Rys. 44b). Co ciekawe, wartość RF wyznaczona dla kalibracji w 0,1% TMAH była bardzo zbliżona do wartości otrzymanej w 0,1% HNO₃.

Sprawdzono również, jaki wpływ na rozkład wielkości TiO₂ uzyskany techniką sp ICP MS ma dodatek 0,1% TMAH oraz 0,1% Tritonu X-100. Uzyskane rozkłady wielkości cząstek tlenku tytanu(IV) przedstawiono na rysunku 45.



Rysunek 45. Rozkłady wielkości cząstek TiO₂ uzyskane techniką sp ICP MS dla roztworów zawierających 600 ng L⁻¹ TiO₂NPs < 150 nm sporządzonych w (a) wodzie Milli-Q, (b) 0,1% TMAH oraz (c) 0,1% Tritonie X-100 (n ≥ 2)

W przypadku układów bez dodatku badanych substancji średni rozmiar cząstek TiO₂ wyniósł 156 ± 4 nm (mediana: 147 ± 3 nm). Natomiast w obecności 0,1% TMAH oraz 0,1% Tritonu X-100 uzyskano średnie rozmiary cząstek tlenku tytanu(IV) wynoszące odpowiednio 172 ± 1 nm (mediana 150 ± 1 nm) oraz 184 ± 1 nm (mediana 170 ± 1 nm). Nanocząstki TiO₂ łatwo ulegają agregacji, zatem obserwowane przesunięcia rozkładów wielkości cząstek w stronę większych rozmiarów mogą być konsekwencją tego efektu. Warto zaznaczyć, że agregacja wystąpiła pomimo zastosowania sonikacji na każdym etapie rozcieńczeń. Najmniejsze rozmiary cząstek TiO₂ uzyskano w roztworze zawierającym czystą wodę Milli-Q. Jednak biorąc pod uwagę straty analitu odnotowane w tym układzie (Rys. 44a) można przypuszczać, że większe agregaty TiO₂NPs mogły nie zostać wprowadzone do strumienia plazmy. Podczas oznaczania TiO₂NPs w wodzie Milli-Q dochodziło do spadku wartości sygnału w czasie, który obserwowany był przy kolejnych powtórzeniach, co przełożyło się na większe odchylenia zarówno w przypadku odzysków Ti (Rys. 44a), jak i rozmiarów TiO₂NPs (Rys. 45) uzyskanych w tych układach. Ze względu na ilościowe odzyski Ti do dalszych badań została wybrana kalibracja z zastosowaniem 0,1% TMAH.

Charakterystykę analityczną metody oznaczania nanocząstek tlenku tytanu(IV) techniką sp ICP MS przy zastosowaniu kalibracji w wodzie MQ i 0,1% TMAH przedstawiono w tabeli 28. Granice wykrywalności rozmiarów oraz stężeń liczbowych i masowych obliczono przy użyciu narzędzia opracowanego przez Laborde et al. [433]. Rozmiary teoretycznie najmniejszych możliwych do wykrycia nanocząstek (BED) i LOD_{size} mieściły się w zakresie 60 – 65 nm.

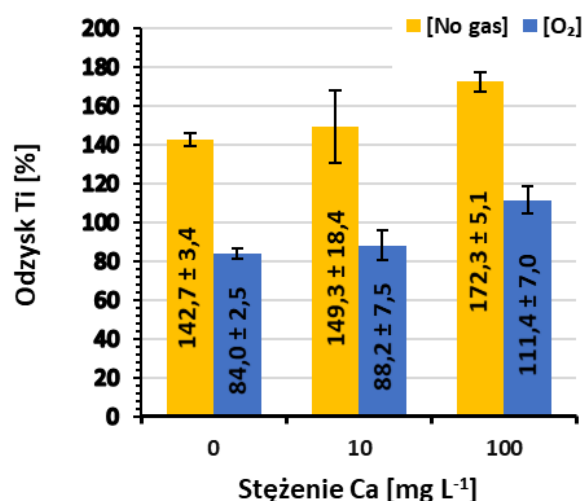
Tabela 28. Parametry analityczne metody oznaczania TiO_2NPs techniką sp ICP MS uzyskane przy różnych wariantach kalibracji

Układ	Granice wykrywalności			Precyzja (RSD [%]) (n = 3)		RF [cps ($\mu\text{g L}^{-1}$) ⁻¹]
	Rozmiar [nm]	Stężenie liczbowe	Stężenie masowe	Określenie rozmiaru	Oznaczenie masy	
Woda Milli-Q	62 65 ^a	$1,2 \cdot 10^6 \text{ L}^{-1}$ $3,0 \cdot 10^5 \text{ g}^{-1}$	$1,19 \text{ ng L}^{-1}$ $0,30 \text{ ng g}^{-1}$	5,1	20,4	$2\,218,2 \pm 17,2$ (n = 2)
0,1% TMAH	60 60 ^a	$2,4 \cdot 10^6 \text{ L}^{-1}$ $6,0 \cdot 10^5 \text{ g}^{-1}$	$1,07 \text{ ng L}^{-1}$ $0,27 \text{ ng g}^{-1}$	2,5	3,4	$5\,329,8 \pm 329,2$ (n = 2)

RF – współczynnik odpowiedzi wzorca jonowego,
^a BED – obliczony przez oprogramowanie.

Ze względu na potencjalne interferencje izobaryczne związane z obecnością wapnia w próbkach biologicznych sprawdzono również jaki wpływ na uzyskane wyniki ma obecność 10 oraz 100 mg L^{-1} Ca w modelowym układzie zawierającym 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ TiO_2NPs . Próbki modelowe rozcieńczono 5000 razy w 0,1% TMAH i oznaczono w trybie pomiarowym „no gas” oraz z użyciem tlenu jako gazu reakcyjnego (stosując warunki pomiarowe przedstawione w tabeli 18). Zastosowano procedurę kalibracji, w której wszystkie roztwory wzorcowe zostały sporządzone w 0,1% TMAH. W przypadku zastosowania trybu „no gas” uzyskano zbyt wysokie wartości odzysków Ti, które były średnio 1,6-krotnie wyższe niż odzyski uzyskane dla tych samych układów w trybie pomiarowym z zastosowaniem tlenu (Rys. 46). Nie stwierdzono jednak pozytywnego wpływu zastosowania trybu tlenowego na eliminację interferencji izobarycznych, ponieważ względny wzrost wartości sygnału w obecności wapnia był podobny w obu trybach pomiarowych. Przy czym względny wzrost wartości sygnału dla układu zawierającego Ca i TiO_2NPs w stosunku 10 000 : 3 wyniósł zaledwie 5% w porównaniu do układu zawierającego same nanocząstki tlenku tytanu(IV). Pozytywny wpływ zastosowania tlenu oraz wodoru na eliminację interferencji pochodzących od wapnia wykazali Wojcieszek et al. [393], którzy uzyskali dobre rezultaty nawet w obecności 50 mg L^{-1} Ca. W swoich badaniach, ze względu na brak możliwości technicznych

zastosowania wodoru, ograniczyłem się do zbadania wpływu samego tlenu na przebieg oznaczeń TiO₂NPs techniką sp ICP MS.



Rysunek 46. Wpływ obecności 10 oraz 100 mg L⁻¹ Ca na wartości odzysków tytanu przy zastosowaniu trybów pomiarowych: „no gas” i z użyciem tlenu jako gazu reakcyjnego (n ≥ 2)

Badania przeprowadzone z wykorzystaniem innych trybów pomiarowych w celu eliminacji potencjalnych interferencji związanych z obecnością innych składników w materiale roślinnym zostały przeprowadzone na próbkach korzeni oraz liści grochu zwyczajnego wzbogaconych w TiO₂NPs. Wyniki zostały opisane w dalszej części dysertacji.

W kolejnej części badań opisano optymalizację procedury przygotowania materiału roślinnego do analizy TiO₂NPs techniką sp ICP MS.

9.3. Opracowanie procedury przygotowania próbek roślinnych do oznaczania TiO₂NPs techniką sp ICP MS

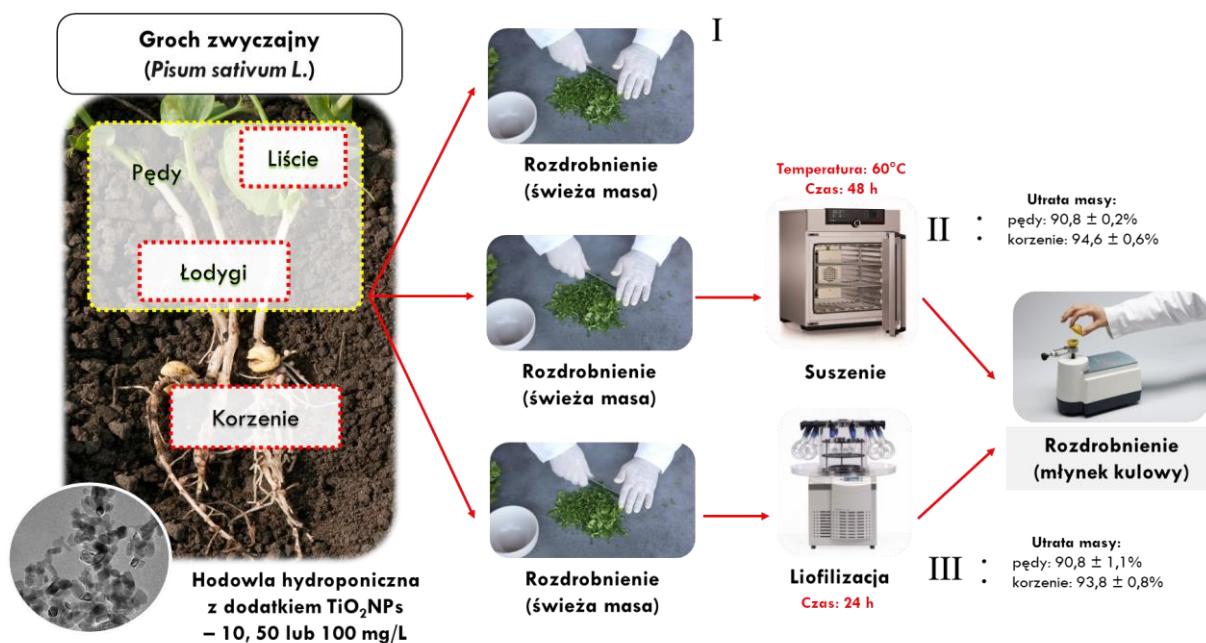
Etapem mającym istotny wpływ na uzyskane wyniki jest przygotowanie materiału roślinnego do oznaczenia TiO₂NPs techniką sp ICP MS. Optymalizacja tej procedury ma na celu zminimalizowanie ryzyka zmiany formy fizykochemicznej analitu (np. rozpuszczania, agregacji nanocząstek). Poziom rozdrobnienia oraz homogenizacji materiału roślinnego przekłada się również na efektywność uwalniania analitu z matrycy próbki. Dlatego wybór procedury wstępnego przygotowania próbek jest ściśle związany z optymalizacją procedury trawienia materiału roślinnego opisaną w kolejnym podrozdziale.

W badaniach wykorzystano rośliny pochodzące z dwóch hodowli hydroponicznych prowadzonych w różnych okresach (hodowla I i II). Procedurę hodowli grochu zwyczajnego opisano szczegółowo w rozdziale 6.4. Rośliny pochodzące z hodowli I podzielono na

korzenie oraz pędy i wykorzystano do optymalizacji całej procedury przygotowania próbek do oznaczenia TiO_2NPs techniką sp ICP MS. Pozostałe eksperymenty zostały przeprowadzone z udziałem roślin pochodzących z hodowli II, które podzielono na korzenie, łodygi oraz liście.

Badane części roślin (korzenie, pędy, łodygi, liście) zostały wstępnie rozdrobnione przy użyciu noża ceramicznego. Zbadano 3 procedury przygotowania próbek (Rys. 47), które obejmowały:

- I. Rozdrobnienie.
- II. Suszenie wstępnie rozdrobnionych części roślin w tyglach kwarcowych w temperaturze 60°C przez 48 h (do uzyskania suchej masy) w suszarce laboratoryjnej. Wyszuszony materiał roślinny przeniesiono następnie do probówek typu Eppendorf z dnem soczewkowym i rozdrobniono przy użyciu młynka kulowego.
- III. Liofilizacja rozdrobnionych próbek i zmielenie w młynku kulowym.



Rysunek 47. Procedury wstępnego przygotowania materiału roślinnego do analizy TiO_2NPs techniką sp ICP MS

Procedura I polegająca jedynie na rozdrobnieniu materiału była technicznie najprostsza do przeprowadzenia, jednak poziom uzyskanej homogeniczności próbki budził zastrzeżenia. Lepszą homogeniczność materiału roślinnego uzyskano natomiast przy zastosowaniu dwóch pozostałych procedur z użyciem młynka kulowego. Średnia utrata masy przy zastosowaniu etapu suszenia (procedura II) w przypadku korzeni oraz pędów wyniosła odpowiednio $94,6 \pm 0,6\%$ oraz $90,8 \pm 0,2\%$. Identyczne rezultaty uzyskano przy zastosowaniu

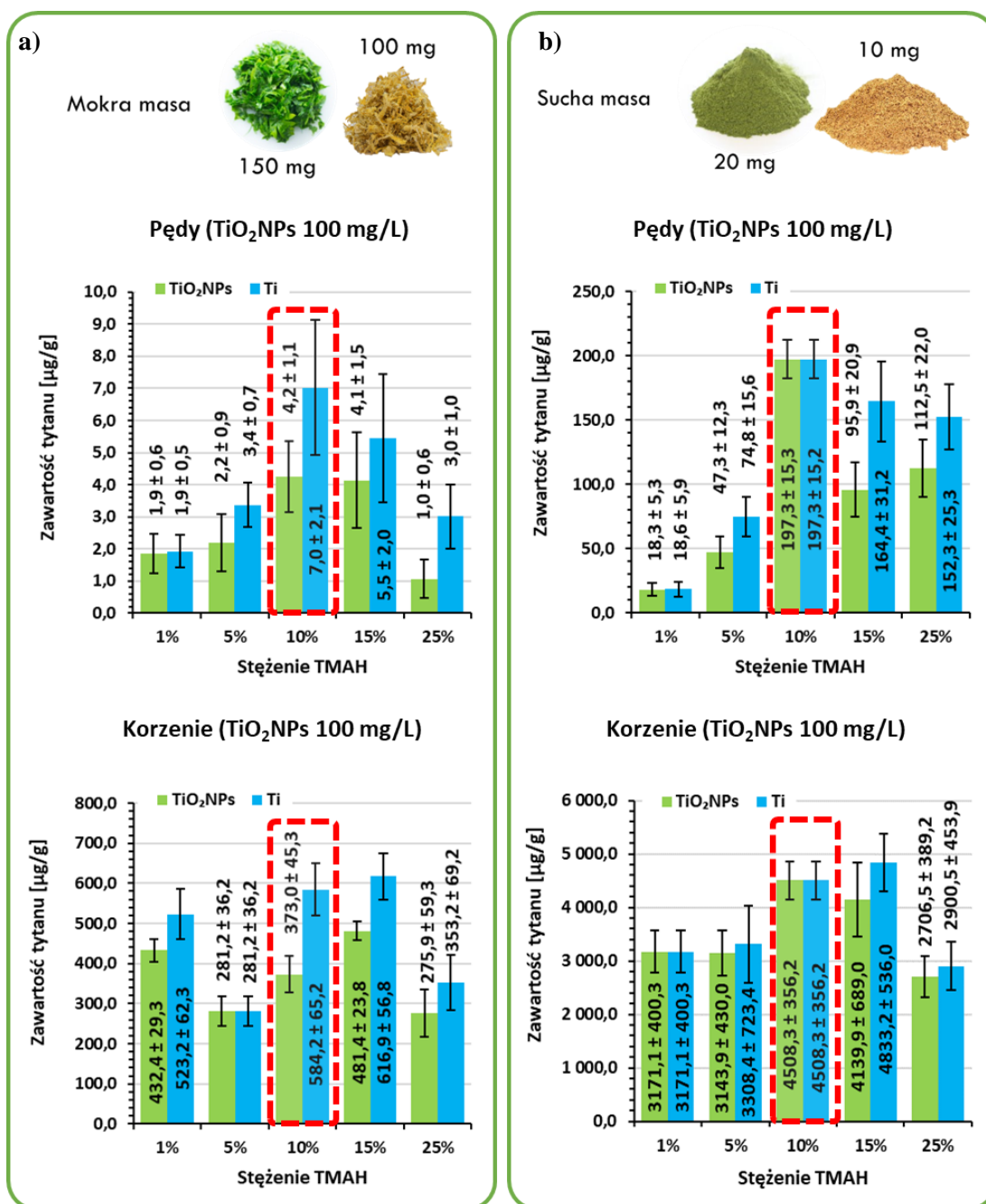
liofilizacji (procedura III), gdzie utrata masy wyniosła odpowiednio $90,8 \pm 1,1\%$ dla pędów oraz $93,8 \pm 0,8\%$ dla korzeni. Przy czym etap liofilizacji był mniej czasochłonny niż suszenie próbek (24 h vs. 48 h).

Podczas homogenizacji materiału roślinnego w młynku kulowym stosowano kulki wykonane ze stali, a dezintegrację ścian komórkowych planowano przeprowadzić przy użyciu sondy ultradźwiękowej wykonanej z tytanu, dlatego konieczne było sprawdzenie czy nie uwalnia się z tych elementów Ti. W tym celu do trzech próbek typu Eppendorf zawierających kulki stosowane do mielenia dodano 1 mL wody Milli-Q i pozostawiono na dobę. Natomiast głowice dezintegratora zanurzono w 5 mL wody Milli-Q i przeprowadzono 15 minutową sonikację w warunkach zastosowanych do przygotowania próbek glonów (opisanych w rozdziale 6.5.1.). Następnie w otrzymanych roztworach oznaczono tytan techniką sp ICP MS w warunkach przedstawionych w tabeli 18. Na podstawie otrzymanych wyników wykluczono możliwość uwalniania Ti ze sprzętu stosowanego do homogenizacji.

Do oznaczenia nanocząstek tlenku tytanu(IV) w materiale roślinnym techniką sp ICP MS, konieczne jest uwolnienie analitu z matrycy próbki. Aby oddzielić i oznaczyć ilościowo nanocząstki tlenków metali w próbkach biologicznych stosowane są różne procedury analityczne, m.in. trawienie w środowisku alkalicznym [402,407] lub w obecności odpowiedniego enzymu [391-395]. Z uwagi na satysfakcjonujące wyniki otrzymane podczas oznaczania AgNPs w komórkach glonów przy wykorzystaniu metody trawienia alkalicznego w obecności TMAH, postanowiono zastosować tę samą strategię do uwolnienia TiO_2 z różnych części grochu poddanym trzem procedurom wstępnego przygotowania próbki. W kolejnym etapie badań sprawdzono, jaki wpływ na efektywność uwalniania analitu mają procedury wstępnego przygotowania próbek.

Pierwszym etapem było zbadanie efektywności uwalniania tytanu z pędów i korzeni, z mokrej masy roślin po ich wstępnym rozdrobieniu oraz z suchej masy (po suszeniu i homogenizacji). Obie serie próbek poddano 24-godzinnemu trawieniu w obecności 1%, 5%, 10%, 15% oraz 25% TMAH (5 mL) w temperaturze pokojowej ($21^\circ C$). W przypadku trawienia mokrej masy pędów oraz korzeni odważono odpowiednio 150 oraz 100 mg próbki, natomiast dla suchego materiału roślinnego były to masy 20 oraz 10 mg. Otrzymane zawiesiny poddawano sonikacji przy użyciu homogenizatora ultradźwiękowego bezpośrednio po dodaniu odczynników (czas: 15 min) oraz po 24-godzinnym trawieniu próbki (czas: 5 min). Ze względu na skłonność TiO_2 NPs do agregacji, próbki wytrząsano przez cały okres trawienia. Sonda ultradźwiękowa pracowała w trybie pulsacyjnym (okres pracy/spoczynkowy: 5 s/ 3 s, amplituda - 100%). Podczas sonikacji próbki chłodzono

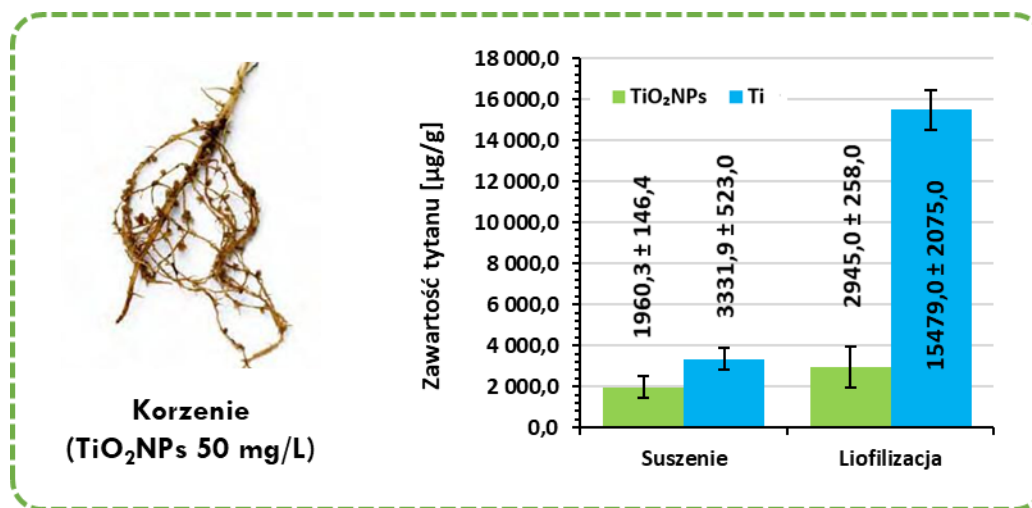
zewnątrznie lodem. Na rysunku 48 przedstawiono zawartości tytanu w formie TiO_2NPs oraz całkowite zawartości Ti oznaczone techniką sp ICP MS w obu seriach próbek. Oznaczenia przeprowadzono stosując warunki pomiarowe przedstawione w tabeli 18.



Rysunek 48. Zawartości Ti i TiO_2NPs oznaczone techniką sp ICP MS po trawieniu alkalicznym (a) mokrej i (b) suchej masy pędów oraz korzeni w obecności różnych stężeń TMAH ($n = 2$)

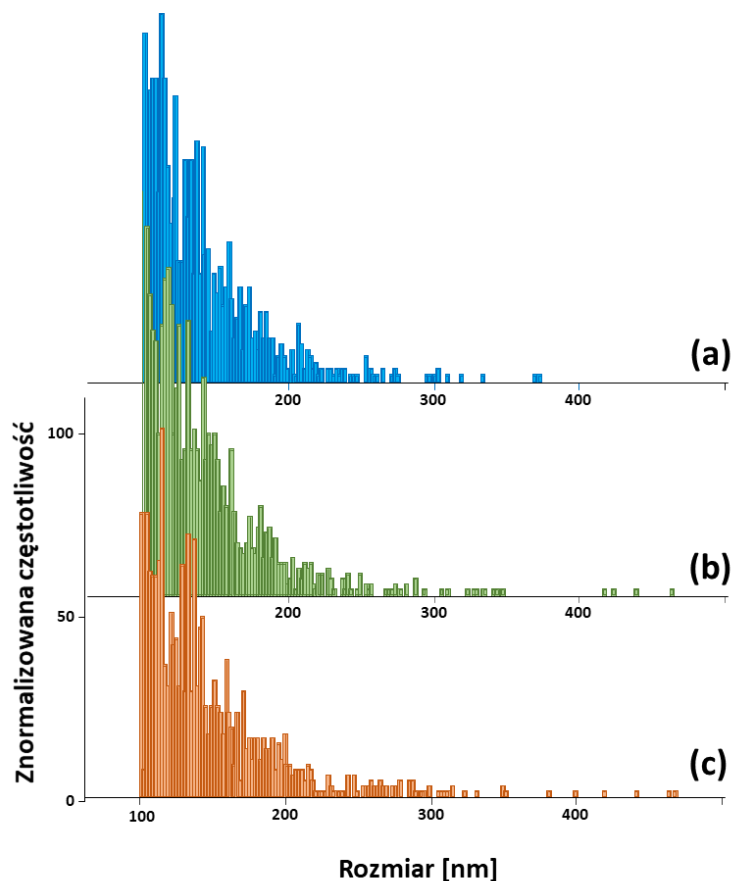
Największą efektywność uwalniania tytanu z materiału roślinnego uzyskano przy zastosowaniu trawienia alkalicznego wysuszonych części roślin w obecności 10% TMAH. W przypadku świeżego materiału roślinnego (mokra masa) efektywność trawienia próbek oraz uwalniania tytanu była znacznie niższa niż w przypadku próbek poddanych procedurze

suszenia i homogenizacji. Dokonano również porównania efektywności uwalniania tytanu z wysuszonego oraz zliofilizowanego materiału roślinnego poddanego trawieniu w obecności 10% TMAH (Rys. 49). Efektywność uwalniania tytanu ze zliofilizowanych korzeni była 2-6-krotnie wyższa niż w przypadku uwalniania Ti z wysuszonego materiału roślinnego i z tego względu procedura liofilizacji została wybrana do dalszych badań.



Rysunek 49. Zawartości Ti i TiO₂NPs oznaczone techniką sp ICP MS po trawieniu alkalicznym w obecności 10% TMAH wysuszonych oraz zliofilizowanych korzeni grochu zwyczajnego ekspozowanych na działanie TiO₂NPs o stężeniu 50 mg L⁻¹ (n = 2)

Ze względu na potencjalne transformacje TiO₂NPs, do których może dochodzić podczas procedury trawienia alkalicznego, należy sprawdzić, czy warunki prowadzenia takiego procesu są odpowiednie do danego rodzaju próbki oraz analitu. Stabilność nanocząstek tlenku tytanu(IV) podczas procedury ekstrakcji sprawdzono stosując zawiesinę TiO₂NPs (600 ng L⁻¹) w 0,1% TMAH oraz kontrolne próbki zliofilizowanych korzeni i liści z dodatkiem TiO₂NPs (600 ng L⁻¹). Zawiesiny analizowano bezpośrednio po przygotowaniu oraz po 24-godzinnej procedurze trawienia alkalicznego. Zarówno rozkłady wielkości cząstek, jak i odzyski Ti kontrolowano przy użyciu techniki sp ICP MS. Odzysk TiO₂NPs z kontrolnych próbek korzeni wzbogaconych w 600 ng L⁻¹ TiO₂NPs wyniósł około 76%. Nie zaobserwowano różnic pomiędzy diagramami rozkładu wielkości TiO₂NPs uzyskanymi w 0,1% TMAH i w wzbogaconych próbkach kontrolnych (Rys. 50), nawet po 24-godzinnym trawieniu alkalicznym. Średni rozmiar TiO₂NPs w 0,1% TMAH wyniósł 144 nm (mediana: 133 nm), natomiast najczęściej występujący rozmiar 108 nm. Uzyskane wartości były zbliżone do rozmiarów wyznaczonych dla próbek kontrolnych wzbogaconych w TiO₂NPs (średnia: 142 - 148 nm, mediana: 129 - 134 nm, najczęściej występujący rozmiar 104 - 116 nm).



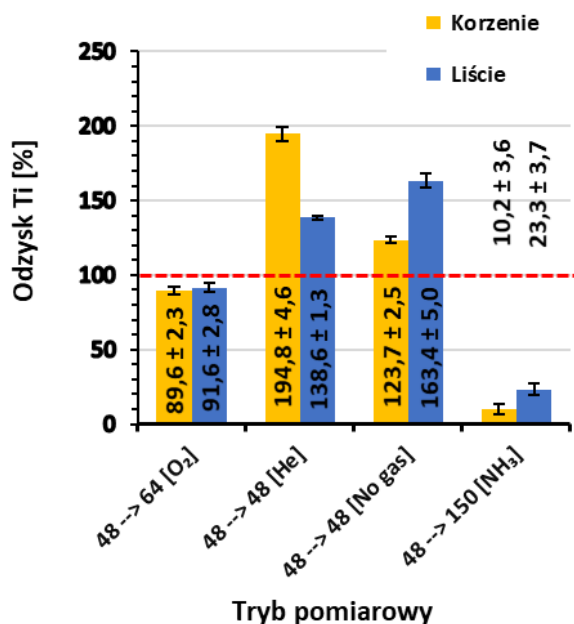
Rysunek 50. Rozkłady wielkości cząstek TiO_2 uzyskane techniką *sp ICP MS* dla: **(a)** zawiesiny TiO_2 NPs (600 ng L^{-1}) w 0,1% TMAH oraz próbek kontrolnych zliofilizowanych korzeni i liści wzbogaconych w 600 ng L^{-1} TiO_2 NPs, poddanych trawieniu alkalicznemu w obecności 10% TMAH, odpowiednio **(b)** i **(c)**

9.4. Charakterystyka metody oznaczania TiO_2 NPs techniką *sp ICP MS* w próbkach roślin

Z uwagi na krótki czas przebywania pojedynczej nanocząstki w strumieniu plazmy (ok. 300 – 500 μs), niemożliwe jest przełączanie izotopu podczas pomiaru techniką *sp ICP MS* (zmiana mierzonego izotopu zajmuje ok. 50 ms), dlatego podczas analizy może być monitorowany tylko jeden izotop Ti. Do oznaczeń wybrano najbardziej rozpowszechniony izotop tytanu - ^{48}Ti ($A = 73,72\%$).

Przed przystąpieniem do analizy nanocząstek tlenku tytanu(IV) w częściach grochu zwyczajnego eksponowanego na działanie 0, 10, 50 oraz 100 mg L^{-1} TiO_2 NPs techniką *single particle ICP MS* sprawdzono wpływ innych trybów pomiarowych na przebieg oznaczenia w obecności matrycy roślinnej. W tym celu do roztworów otrzymanych po trawieniu próbek kontrolnych korzeni i liści w obecności 10% TMAH dodano TiO_2 NPs do końcowego stężenia

600 ng L⁻¹. W otrzymanych zawiesinach oznaczono tytan techniką sp ICP MS w 4 trybach: „no gas” (⁴⁸Ti → ⁴⁸Ti), trybie kolizyjnym z He (⁴⁸Ti → ⁴⁸Ti) oraz w 2 trybach z gazem reakcyjnym: O₂ (⁴⁸Ti → ⁴⁸TiO⁺) oraz NH₃ (⁴⁸Ti → ⁴⁸Ti(NH₃)₆⁺). Uzyskane wartości odzysków przedstawiono na rysunku 51.



Rysunek 51. Wartości odzysków tytanu uzyskane dla próbek kontrolnych grochu wzbogaconych w TiO₂NPs (600 ng L⁻¹) techniką sp ICP MS przy zastosowaniu różnych trybów pomiarowych (n = 2)

Zastosowanie trybów pomiarowych bez gazu oraz z helem jako gazem kolizyjnym doprowadziło do uzyskania zbyt dużych wartości odzysków, które mieściły się w przedziale 121,2 – 200,2%. Powyższy efekt jest konsekwencją interferencji wieloatomowych i izobarycznych, którymi obarczony jest najbardziej rozpowszechniony izotop tytanu (⁴⁸Ti). Ilościowe odzyski Ti uzyskano stosując tlen jako gaz reakcyjny zarówno w przypadku wzbogaconych próbek korzeni, jak i roślin. Zastosowanie tlenu do oznaczania TiO₂NPs techniką sp ICP MS jest rekomendowane w wielu pracach (O₂ [258], O₂/H₂ [393,488]). W literaturze do eliminacji interferencji polecane jest również zastosowanie amoniaku jako gazu reakcyjnego i pomiaru masy odpowiadającej adduktom, które tworzy z tytanem, np. ⁶³TiNH [458] lub ⁴⁸Ti(NH₃)₆⁺ [457]. Jednak w swoich badaniach nie uzyskałem dobrych odzysków Ti z użyciem NH₃ jako gazu reakcyjnego, a intensywność otrzymanych sygnałów była bardzo niska. Dlatego do dalszych badań wybrano tryb z użyciem O₂ jako gazu reakcyjnego i pomiaru przesunięcia masy MS/MS (⁴⁸Ti⁺ → ⁴⁸Ti¹⁶O⁺).

Granice wykrywalności stężenia masowego i liczbowego TiO₂NPs oraz wartości LOD_{size} w obecności matrycy roślinnej obliczono za pomocą narzędzia opracowanego przez Laborde et al. [433]. Granice wykrywalności rozmiarów TiO₂NPs określone przy użyciu

ślepych prób (kontroli uzyskanych po trawieniu alkalicznym, rozcieńczonych 0,1% TMAH) i kryterium 5σ wyniosły 68 nm. Natomiast granice wykrywalności stężenia masowego oraz liczbowego TiO_2NPs wynosiły odpowiednio $1,48 \text{ ng L}^{-1}$ ($0,37 \text{ ng g}^{-1}$ dla liści/łodyg i $0,74 \text{ ng g}^{-1}$ dla korzeni) oraz $2,2 \cdot 10^6 \text{ L}^{-1}$ ($5,6 \cdot 10^5 \text{ g}^{-1}$ dla liści/łodyg i $1,1 \cdot 10^6 \text{ g}^{-1}$ dla korzeni). Precyzja wyrażona jako względne odchylenie standardowe wyznaczone na podstawie 3 powtórzeń w przypadku próbek rzeczywistych zawierających TiO_2 obejmowała zakres 1,6% - 12,3%, w zależności od badanej próbki. Uzyskane parametry analityczne przedstawiono w tabeli 29. Podobnie jak w przypadku badań dotyczących srebra obecność matrycy roślinnej w badanych układach prowadziła do pogorszenia granic wykrywalności rozmiarów, które wzrosły z 60 nm w 0,1% TMAH do 68 nm w obecności lizatów próbek kontrolnych korzeni i liści.

Tabela 29. Parametry analityczne metody oznaczania TiO_2NPs techniką sp ICP MS uzyskane w obecności matrycy próbki

Lizat otrzymany po trawieniu w obecności 10% TMAH	Granice wykrywalności			Precyzja (RSD [%]) (n = 3)		RF [cps ($\mu\text{g L}^{-1}$) ⁻¹]
	Rozmiar [nm]	Stężenie liczbowe	Stężenie masowe	Określenie rozmiaru	Oznaczenie masy	
Korzenie	68 70 ^a	$2,2 \cdot 10^6 \text{ L}^{-1}$ $1,1 \cdot 10^6 \text{ g}^{-1}$	$1,48 \text{ ng L}^{-1}$ $0,74 \text{ ng g}^{-1}$	1,6	8,2	$5\,425,2 \pm 303,8$ (n = 2)
Liście	68 72 ^a	$2,2 \cdot 10^6 \text{ L}^{-1}$ $5,6 \cdot 10^5 \text{ g}^{-1}$	$1,48 \text{ ng L}^{-1}$ $0,37 \text{ ng g}^{-1}$	3,8	12,3	$5\,469,4 \pm 298,2$ (n = 2)

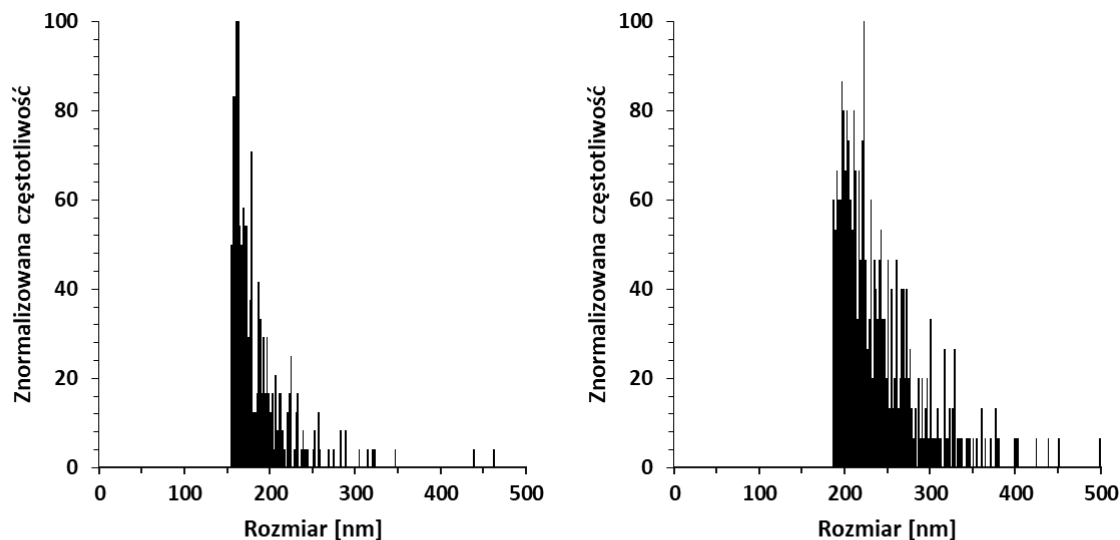
RF – współczynnik odpowiedzi wzorca jonowego,
^a BED – obliczony przez oprogramowanie.

Kolejną serię eksperymentów przeprowadzono w celu sprawdzenia, czy całkowita zawartość tytanu oznaczona w ekstraktach alkalicznych była zgodna z wartościami uzyskanymi po mineralizacji materiału roślinnego. Odzyski obliczono jako stosunek stężenia Ti oznaczonego w ekstraktach roślinnych techniką sp ICP MS do stężenia tytanu w zmineralizowanych częściach roślin wyznaczonego techniką ICP MS. Wartości odzysków Ti mieściły się w przedziale 88% - 135% (wartość średnia $101 \pm 15\%$ dla n = 20) (Tab. 30). Wyniki te potwierdzają użyteczność zastosowanej procedury do oznaczania TiO_2NPs w różnych częściach roślin.

9.5. Badanie pobierania i transformacji TiO_2NPs w roślinach

Badania rozpoczęto od oznaczenia rozmiarów cząstek tlenku tytanu(IV) w pożywce użytej podczas hodowli hydroponicznej. Analiza wielkości cząstek TiO_2 przeprowadzona

w roztworach przed rozpoczęciem eksperymentu i po zakończeniu hodowli roślin modelowych wykazała występowanie zjawiska agregacji TiO₂NPs. Średni rozmiar TiO₂ wzrósł z 183 ± 3 nm (mediana: 170 ± 1 nm) oznaczonych w próbkach przed rozpoczęciem hodowli do 247 ± 2 nm (mediana: 224 ± 2 nm) po zakończeniu eksperymentu (Rys. 52).



Średnia	183 ± 3 nm	247 ± 2 nm
Mediana	170 ± 1 nm	224 ± 2 nm
Najczęściej występujący rozmiar	160 ± 4 nm	220 ± 4 nm

Rysunek 52. Rozkłady wielkości cząstek TiO₂ uzyskane techniką sp ICP MS dla pożywki zawierającej 10 mg L⁻¹ TiO₂NPs (a) przed rozpoczęciem oraz (b) po zakończeniu hodowli

Całkowite zawartości tytanu (oznaczone techniką ICP MS i sp ICP MS), zawartości masowe oraz liczbowe cząstek TiO₂ w korzeniach, łodygach i liściach eksponowanych na działanie różnych stężeń TiO₂NP przedstawiono w tabeli 30.

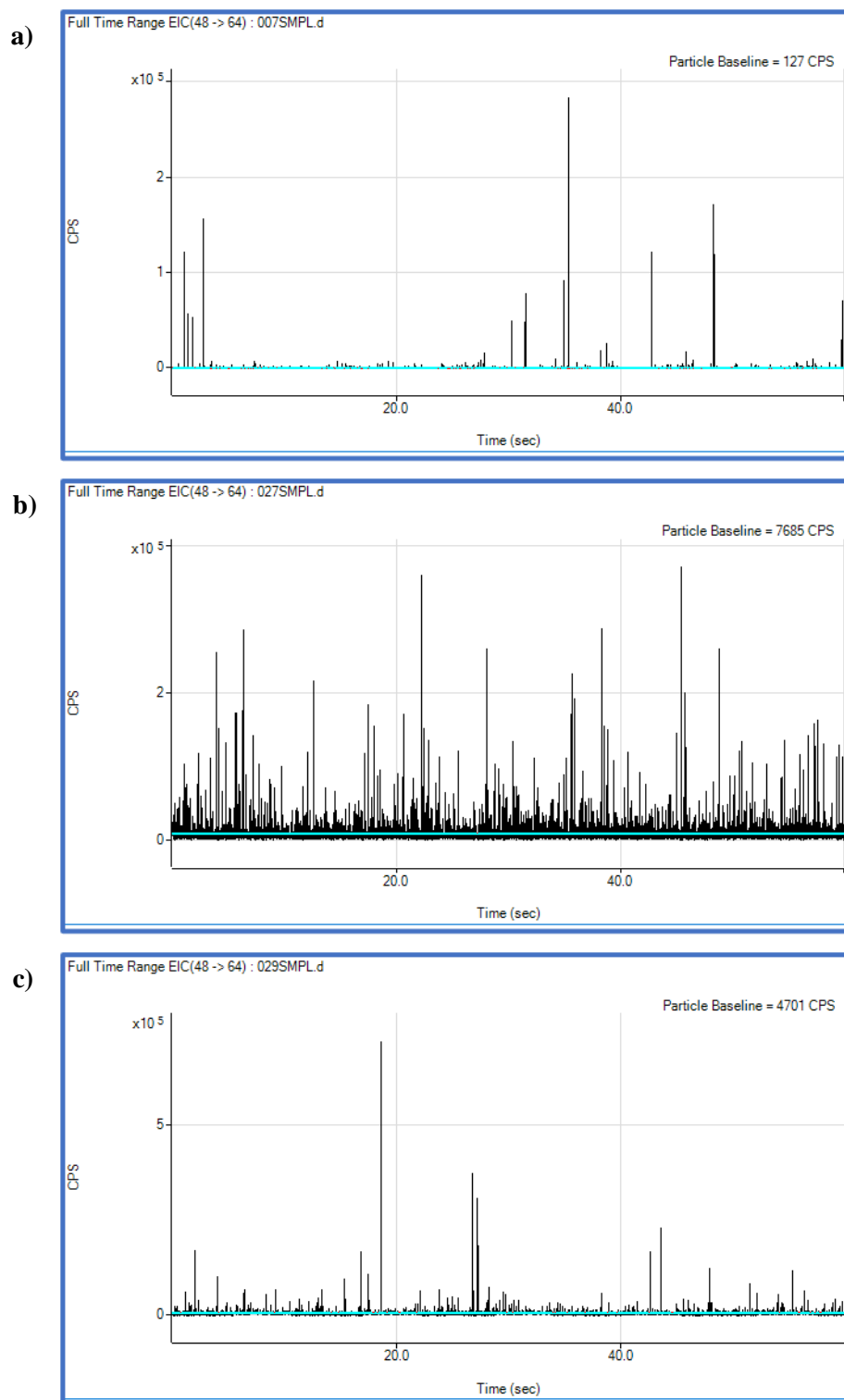
Tabela 30. Zawartość Ti i TiO₂NPs oraz liczba nanocząstek tlenku tytanu(IV) oznaczona w korzeniach, łodygach oraz liściach grochu zwyczajnego uprawianego w pożywce Hoaglanda z dodatkiem TiO₂ (n ≥ 2)

TiO ₂ NPs dodane do układu [mg L ⁻¹]	Całkowita zawartość Ti oznaczona w materiale roślinnym [µg g ⁻¹] techniką ICP MS		
	Korzenie	Łodygi	Liście
0	13,6 ± 0,4	20,7 ± 11,7	47,6 ± 14,1
10	5 383 ± 650	164 ± 110	133 ± 40
50	11 491 ± 2 090	1 196 ± 119	621 ± 29
100	14 448 ± 1 109	1 304 ± 2	785 ± 9
TiO ₂ NPs dodane do układu [mg L ⁻¹]	Całkowita zawartość Ti oznaczona w materiale roślinnym [µg g ⁻¹] techniką sp ICP MS		
	Korzenie	Łodygi	Liście
0	52,9 ± 29,2	37,5 ± 20,1	56,2 ± 15,5
10	6 156 ± 663	326 ± 71	210 ± 69

50	15 479 ± 2 075	1 294 ± 403	765 ± 124
100	12 704 ± 1495	1 225 ± 60	803 ± 249
TiO₂NPs dodane do układu [mg L⁻¹]	Odzysk Ti [%] wyznaczony względem wartości oznaczonych w zmineralizowanych próbkach grochu techniką ICP MS		
	Korzenie	Łodygi	Liście
10	107,8 ± 12,4	112,2 ± 18,3	96,2 ± 7,9
50	130,5 ± 5,2	98,6 ± 15,3	106,8 ± 11,5
100	87,3 ± 15,1	85,5 ± 5,6	93,6 ± 16,9
TiO₂NPs dodane do układu [mg L⁻¹]	Zawartość TiO₂NPs oznaczona w materiale roślinnym [µg g⁻¹]		
	Korzenie	Łodygi	Liście
0	7,3	1,7*	1,7*
10	2 842 ± 582	34 ± 13	26 ± 7
50	2 945 ± 258	182 ± 3	117 ± 35
100	7 570 ± 1 761	158 ± 19	242 ± 12
TiO₂NPs dodane do układu [mg L⁻¹]	Liczba TiO₂NPs oznaczona w materiale roślinnym [NPs g⁻¹]		
	Korzenie	Łodygi	Liście
0	2,06 • 10 ⁹	8,54 • 10 ⁸	8,54 • 10 ⁸
10	1,01 ± 0,16 • 10 ¹²	5,57 ± 3,37 • 10 ⁹	6,92 ± 1,04 • 10 ⁹
50	0,53 ± 0,06 • 10 ¹²	6,07 ± 0,61 • 10 ¹⁰	2,83 ± 0,75 • 10 ¹⁰
100	2,59 ± 0,51 • 10 ¹²	4,83 ± 0,59 • 10 ¹⁰	6,01 ± 0,49 • 10 ¹⁰
* Nazienne części roślin (łodygi i liście)			

Całkowita zawartość tytanu we wszystkich roślinach eksponowanych na działanie TiO₂NPs była znacznie wyższa niż w próbkach kontrolnych. Szczególnie dużą akumulację Ti stwierdzono w korzeniach roślin eksponowanych na działanie TiO₂NPs o stężeniu 10, 50 oraz 100 mg L⁻¹, gdzie zawartości Ti w stosunku do próbek kontrolnych wzrosły odpowiednio 400, 850 i 1060 razy. Tytan transportowany był do nadziemnych części roślin, gromadząc się w łodygach i liściach na znacznie niższym poziomie niż w korzeniach. Zawartość tytanu w łodygach wzrosła od 8 do 63 razy, a w liściach zaledwie od 3 do 16 razy w odniesieniu do próbek kontrolnych.

Zawartość TiO₂NPs w tkankach roślin oznaczono techniką sp ICP MS po trawieniu alkalicznym w obecności 10% TMAH zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 6.5.2. Sygnały zarejestrowane dla wszystkich części roślin (Rys. 53) posiadały liczbę zliczeń umożliwiającą wiarygodne oznaczenie TiO₂. Najwyższe zawartości TiO₂ oznaczono w korzeniach (od 2842 do 7570 µg g⁻¹ w zależności od stężenia TiO₂NPs dodanego do hodowli), natomiast znacznie niższe w łodygach (34 - 182 µg g⁻¹) oraz liściach (26 - 242 µg g⁻¹). Przy czym należy zaznaczyć, że korzenie na wstępnym etapie przygotowania próbki były myte co najmniej 8-krotnie w celu usunięcia słabo związanych form tytanu oraz innych składników obecnych w pożywce. Ogólnie rzecz biorąc, wzrastające stężenie TiO₂NPs w pożywce przekładało się na wzrost ich zawartości w tkankach roślinnych. W przypadku całkowitej zawartości Ti również zaobserwowano podobną prawidłowość.



Rysunek 53. Sygnały uzyskane techniką *sp ICP MS* dla **(a)** próbek kontrolnych korzeni, **(b)** korzeni roślin eksponowanych na działanie $50 \text{ mg L}^{-1} \text{ TiO}_2\text{NPs}$ oraz **(c)** liści roślin eksponowanych na działanie $50 \text{ mg L}^{-1} \text{ TiO}_2\text{NPs}$

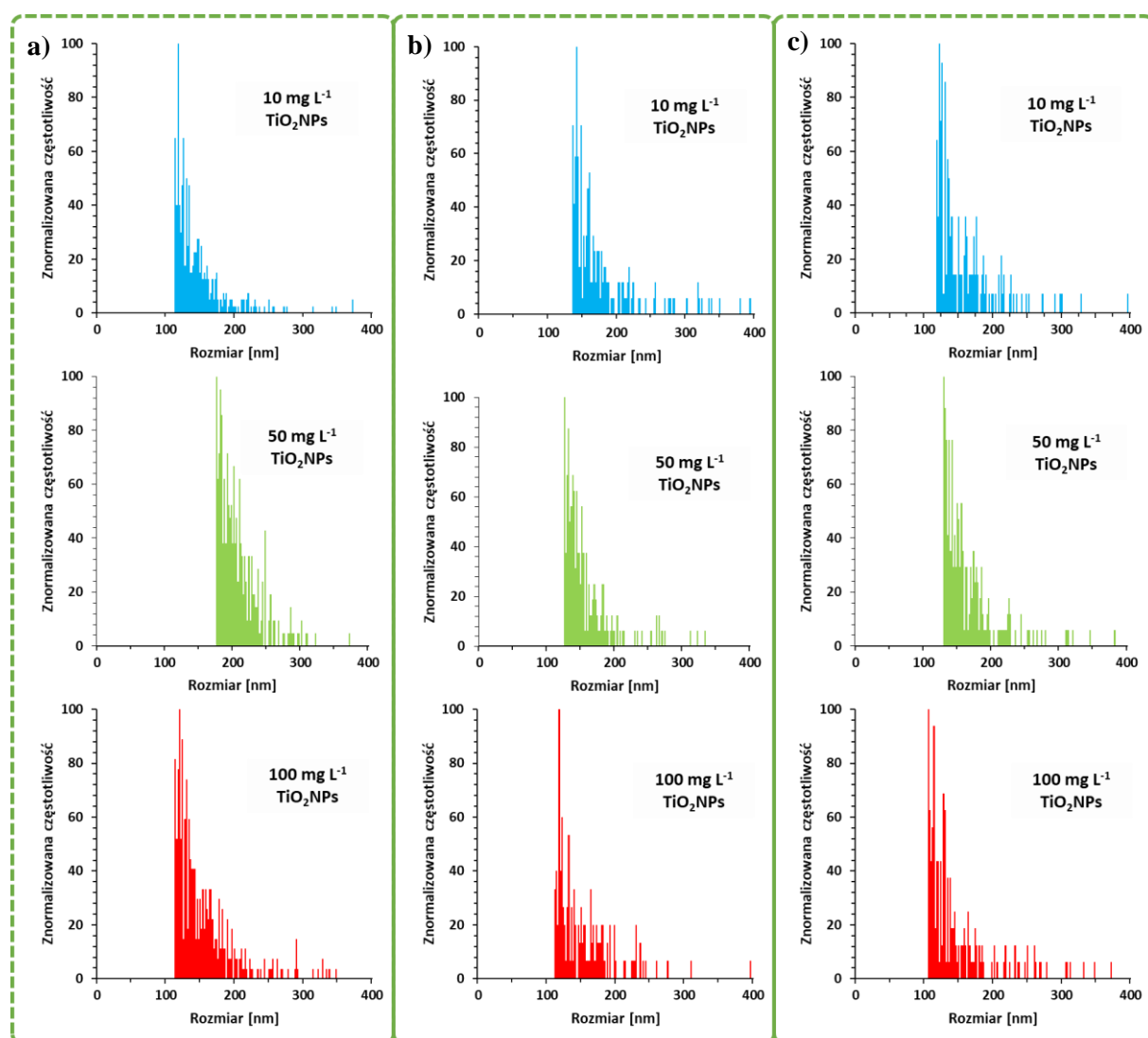
W celu zbadania transformacji TiO₂NPs podczas transportu w roślinach wyznaczono średnie, mediany oraz najczęściej występujące rozmiary cząstek TiO₂. Uzyskane wartości przedstawiono w tabeli 31.

Tabela 31. Średnia, mediana oraz najczęściej występujący rozmiar TiO₂ oznaczony w korzeniach, łodygach oraz liściach grochu zwyczajnego techniką sp ICP MS (n = 2)

Część rośliny modelowej	TiO ₂ NPs dodane do układu [mg L ⁻¹]	Rozmiar TiO ₂ (Średnia) ± SD [nm]	Rozmiar TiO ₂ (Mediana) ± SD [nm]	Najczęściej występujący rozmiar TiO ₂ ± SD [nm]
Korzenie	10	146 ± 3	132 ± 2	119 ± 4
	50	211 ± 4	196 ± 5	174 ± 12
	100	158 ± 2	141 ± 2	125 ± 4
Łodygi	10	187 ± 5	160 ± 6	137 ± 4
	50	157 ± 5	139 ± 4	127 ± 2
	100	160 ± 4	138 ± 4	114 ± 5
Liście	10	170 ± 8	149 ± 9	130 ± 12
	50	168 ± 2	149 ± 2	132 ± 2
	100	153 ± 5	126 ± 4	109 ± 5

Rozmiar, kształt i ładunek powierzchniowy NPs mają istotny wpływ na ich pobieranie i biodystrybucję w roślinach. Mittal et al. [489] spekulowali, że małe nanocząstki wykazują większą mobilność i są bardziej podatne na pobieranie i transport do nadziemnych części roślin. Wyniki przedstawione na rysunku 54 pokazują, że TiO₂NP charakteryzowały się szerokim zakresem rozmiarów cząstek, które wykryto w różnych częściach roślin. Pomimo, iż spektrometria mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną pracująca w trybie pojedynczej cząstki uznawana jest za jedną z wiodących technik wykrywania nanocząstek w próbkach biologicznych i środowiskowych, posiada pewne ograniczenia. Cząstki mniejsze niż granica wykrywalności rozmiarów identyfikowane są jako tło i nie są uwzględniane na diagramach przedstawiających uzyskane rozkłady wielkości TiO₂. Na podstawie otrzymanych histogramów nie stwierdzono znaczących zmian w rozmiarach oznaczonych cząstek TiO₂ związanych ze zwiększeniem stężenia TiO₂NPs w pożywce użytej podczas hodowli roślin. W tabeli 30 przedstawiono rozmiary cząstek TiO₂, które wykryto w różnych częściach roślin. Wartości te zostały wyrażone jako średnie, mediany oraz najczęściej występujące rozmiary cząstek. Nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy tymi wartościami, które są do siebie zbliżone. Stężenia TiO₂NPs zastosowane w tych badaniach nie doprowadziły do samoagregacji nanocząstek tlenku tytanu(IV). Za migrację cząstek TiO₂ do górnych partii roślin prawdopodobnie odpowiedzialny jest w znacznym stopniu transport bierny w ksylemie [490]. Za ograniczenie migracji TiO₂ do nadziemnych części roślin odpowiada kilka mechanizmów. Nanocząstki tlenku tytanu(IV) mogą adsorbować się na komórkach naskórka

korzeni przez co ich transport do części nadziemnych jest ograniczony. Dodatkowo wykazano, że część TiO_2NPs zaadsorbowanych na zewnętrznej powierzchni korzeni nie jest usuwana podczas płukania przed trawieniem [328], przez co może być błędnie oznaczona jako frakcja, która została pobrana przez roślinę. W badaniach zaobserwowano, że większość tytanu została zakumulowana w korzeniach grochu, podczas gdy tylko ograniczona ilość uległa dystrybucji do górnych części roślin (łodyg i liści). Stwierdzono także, że zwiększenie stężenia TiO_2NPs dodanych do pożywki z 50 do 100 mg L^{-1} nie prowadzi do istotnego wzrostu zawartości Ti we wszystkich badanych częściach roślin. Związane jest to z ograniczeniem transportu wody do górnych części roślin.



Rysunek 54. Rozkłady wielkości cząstek TiO_2 uzyskane techniką *sp ICP MS* dla (a) korzeni, (b) łodyg oraz (c) liści grochu zwyczajnego uprawianego w systemie hydroponicznym z dodatkiem 10, 50 oraz 100 mg L^{-1} TiO_2NPs

Podsumowując, w powyższej części badań opracowałem metodę rozkładu materiału roślinnego zawierającego TiO₂NPs przy użyciu mineralizacji ciśnieniowej wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym w obecności stężonych kwasów: HNO₃ i HF. Ze względu na negatywne działanie kwasu fluorowodorowego na układ wprowadzający próbkę konieczne było zastosowanie etapu neutralizacji HF przy użyciu kwasu borowego. Do oznaczenia całkowitej zawartości Ti wybrałem najbardziej rozpowszechniony izotop tytanu - ⁴⁸Ti (A = 73,72%), który mierzyłem w trybie przesunięcia masy MS/MS (⁴⁸Ti⁺ → ⁴⁸Ti¹⁶O⁺), stosując tlen jako gaz reakcyjny w celu wyeliminowania potencjalnych interferencji izobarycznych oraz wieloatomowych.

Przeprowadzenie oznaczenia TiO₂NPs w grochu zwyczajnym (*Pisum sativum L.*) wymagało optymalizacji procedury uwalniania analitu z materiału roślinnego. W tym celu zbadałem różne metody wstępnego przygotowania próbek grochu (rozdrobienie, suszenie oraz liofilizację). Do uwolnienia TiO₂NPs z materiału roślinnego zastosowałem procedurę trawienia alkalicznego w obecności wodorotlenku tetrametyloamoniowego, która wymagała optymalizacji stężenia TMAH. Najlepsze rezultaty pod względem efektywności uwalniania tytanu z próbek grochu uzyskałem podczas trawienia alkalicznego zliofilizowanych i zhomogenizowanych części roślin w obecności 10% TMAH.

Oznaczenie TiO₂NPs techniką sp ICP MS przeprowadziłem z użyciem tlenu jako gazu reakcyjnego. Otrzymane zawartości tytanu były zgodne z wynikami uzyskanymi techniką ICP MS po mineralizacji próbek. W korzeniach oznaczyłem od 2842 do 7570 μg g⁻¹ cząstek tlenku tytanu(IV) (w zależności od stężenia TiO₂NPs dodanego do hodowli), natomiast znacznie niższe zawartości uzyskałem w łodygach (34 - 182 μg g⁻¹) oraz liściach (26 - 242 μg g⁻¹). Zaobserwowałem, że wzrastające stężenie nanocząstek tlenku tytanu(IV) w pożywce przekładało się na wzrost ich zawartości w materiale roślinnym. Na podstawie otrzymanych rozkładów wielkości cząstek TiO₂ nie stwierdzono znaczących zmian w rozmiarach związanych ze zwiększeniem stężenia TiO₂NPs w pożywce użytej podczas hodowli roślin.

Podsumowanie i wnioski

Badanie biosorpcji i analiza specjacyjna srebra w glonach oraz otaczającym je środowisku

W rozprawie doktorskiej opisałem badania dotyczące biosorpcji Ag^+ /AgNPs oraz analizy specjacyjnej srebra w komórkach glonów *Desmodesmus subspicatus* i otaczającym je medium. W badaniach glony eksponowane były na śladowe ilości srebra ($\mu\text{g L}^{-1}$), które odpowiadały poziomom mogącym występować w zanieczyszczonych wodach powierzchniowych.

Zbadałem efektywność biosorpcji srebra jonowego oraz AgNPs o rozmiarach 30, 40, 60, 75 i 80 nm przez glony zawieszone w wodzie Milli-Q (MQ), pożywce BBM oraz w modelowej wodzie powierzchniowej (MWP). W badaniach zastosowałem wzorce AgNPs stabilizowane elektrostatycznie jonami cytrynianowymi oraz sterycznie za pomocą PVP. Aby uniknąć strat analitu podczas filtracji glony oddzielałem od medium testowego poprzez odwirowanie. Wykazałem, że proces biosorpcji Ag^+ zależy w niewielkim stopniu od obecności innych składników w badanym medium. Dużo większe zróżnicowanie przebiegu tego procesu zaobserwowałem w układach wzbogaconych w AgNPs. Stwierdziłem, że wraz ze wzrostem rozmiarów nanocząstek w zakresie 30 – 75 nm występuje spadek efektywności biosorpcji AgNPs przez glony zawieszone w wodzie Milli-Q oraz MWP. Istotny wpływ na efektywność biosorpcji AgNPs miał skład roztworu testowego, w którym zawieszono były glony. W pożywce BBM bogatej w sole nieorganiczne dochodziło do praktycznie całkowitej biosorpcji AgNPs dodanych do układu niezależnie od rozmiaru i sposobu stabilizacji nanocząstek. Z kolei w układach niezawierających dodatkowych składników (MQ) efektywność biosorpcji obu badanych serii wzorców była podobna i mieściła się w przedziale 27,0 – 55,4% (Rys. 22, Tab. 24). W układach z MWP nanocząstki stabilizowane elektrostatycznie efektywniej ulegały biosorpcji niż PVP-AgNPs, co było prawdopodobnie związane z neutralizacją ładunku powierzchniowego c-AgNPs przez kationy metali obecne w układzie, przez co łatwiej dochodziło do wiązania AgNPs przez ujemnie naładowane komórki glonów. Powyższe obserwacje pokazują jak problematycznym zadaniem jest badanie losów Ag^+ /AgNPs w próbkach biologicznych i środowiskowych. Wykazałem, że biosorpcja AgNPs przez glony zależy od składu otaczającego je medium oraz właściwości fizykochemicznych nanocząstek, takich jak rozmiar oraz rodzaj stabilizacji. Należy jednak zaznaczyć, że wiele innych parametrów może również wpływać na przebieg tego procesu w naturalnych systemach wodnych.

We wstępnej optymalizacji metody oznaczania srebra techniką sp ICP MS dokonałem doboru odpowiednich warunków pomiarowych, takich jak czas pomiaru, całkowity czas zbierania danych i czas stabilizacji spektrometru przed rozpoczęciem pomiaru oraz stężenia wzorca AgNPs użytego do wyznaczenia efektywności transportu próbki do strumienia plazmy. Ze względu na obserwowane podczas oznaczeń Ag⁺/AgNPs straty analitu, konieczne było zastosowanie dodatku substancji stabilizującej. Spośród przebadanych pod tym kątem substancji o różnym charakterze chemicznym (SDS, Triton X-100, PVP, cytrynian sodu) najlepsze ilościowe odzyski srebra uzyskałem stosując 0,1% Triton X-100 oraz TMAH (0,1%). Zbadałem również wpływ obecności frakcji jonowej na oznaczenia AgNPs. Ilościowe oznaczenie obu form srebra w obecności 0,1% Tritonu X-100 było możliwe nawet przy 10-krotnym nadmiarze frakcji jonowej. Na podstawie wyznaczonych wartości BED stwierdziłem, że wzrost udziału Ag⁺ przekłada się na pogorszenie możliwości oznaczania nanocząstek o mniejszych rozmiarach. Rozmiar teoretycznie najmniejszych nanocząstek możliwych do wykrycia zwiększa się również w przypadku obecności innych składników, np. TMAH. Przeprowadziłem charakterystykę analityczną dla procedur kalibracji, w których roztwory zostały sporządzone w 0,1% Tritonie X-100 oraz 0,1% Tritonie X-100 + 0,1% TMAH. Wartości LOD_{size} oraz BED w obu podejściach wyniosły 10 – 22 nm, natomiast granice wykrywalności nanocząstek w ujęciu masowym i liczbowym mieściły się odpowiednio w zakresach 0,09 – 0,11 ng L⁻¹ (~ 0,01 ng g⁻¹) oraz 9,7·10⁵ – 9,9·10⁵ L⁻¹ (5,8·10⁴ - 5,9·10⁴ g⁻¹) (Tab. 22).

Zbadałem jaki wpływ na stabilność oraz przebieg oznaczenia Ag⁺ i AgNPs ma skład roztworu testowego, który stanowiła woda Milli-Q, pożywka BBM oraz modelowa woda powierzchniowa (MPW). We wszystkich układach bezpośrednio po dodaniu Ag⁺/AgNPs zaobserwowałem straty analitu na poziomie 27,5 – 51,9% związane z adsorpcją srebra na powierzchni naczyń laboratoryjnych, przy czym najniższe wartości odzysków uzyskałem w układach z wodą Milli-Q. Najwyższe odzyski srebra po 24 h odnotowałem w MPW zawierającej kwas humusowy. Efekt ten był związany z elektrostatycznym odpychaniem NPs po pokryciu ich powierzchni naturalną materią organiczną. W przypadku analogicznych układów wzbogaconych w Ag⁺/AgNPs zawierających komórki glonów nie występowały straty analitu, a uzyskane wartości odzysków srebra mieściły się w przedziale 90,0 – 113,6%.

Opracowałem metodę oznaczania srebra w formie jonowej oraz nanocząstek w komórkach glonów i otaczającym je medium techniką sp ICP MS. Badane układy podzieliłem na 4 frakcje: supernatanty, roztwory uzyskane po przemyciu glonów, lizaty komórkowe oraz nierozpuszczalną pozostałość po lizie. Dezintegracje ścian komórkowych

przeprowadziłem przy użyciu sondy ultradźwiękowej w obecności 0,1 % Tritonu X-100. W celu sprawdzenia, czy w trakcie zastosowanej procedury nie występują straty analitu, które obserwowałem w układach modelowych nie zawierających komórek glonów sporządziłem bilans masy. Otrzymałem ilościowe odzyski srebra dodanego do układu woda - glony *D. subspicatus*, a opracowana metoda pozwoliła na określenie biosorpcji oraz uzyskanie częściowych informacji na temat transformacji i specjacji srebra w glonach oraz otaczającym je medium. W przypadku układów zawierających dodatek Ag^+ udział masy AgNPs nie przekraczał 0,5% całkowitej zawartości Ag oznaczonej w układach, co może świadczyć o tym, że nie wystąpiła synteza nanocząstek lub powstałe NPs są mniejsze niż LOD_{size} . Natomiast w przypadku układów modelowych MQ i BBM wzbogaconych w AgNPs stwierdziłem, że podczas inkubacji 30% masy dodanych nanocząstek uległo przemianom w formę jonową. W analogicznym układzie zawierającym wodę powierzchniową i AgNPs po inkubacji rozpuszczeniu uległo tylko 10% dodanego srebra, co może wskazywać na większą stabilność nanocząstek w naturalnych systemach wodnych zawierających NOM. Stwierdziłem dużą zgodność wartości biosorpcji wyznaczonych techniką ICP MS po mineralizacji glonów oraz sp ICP MS przy zastosowaniu powyższej metody dla układów MQ i BBM. Jednak ze względu na niecałkowite uwalnianie srebra z komórek glonów do roztworu lizatu podczas dezintegracji ścian komórkowych przy użyciu sondy ultradźwiękowej nie określono formy specjacyjnej od 14,9 do 38,7% srebra dodanego do układu. Zaobserwowałem, że srebro jonowe jest efektywniej wiązane przez komórki glonów niż AgNPs i trudniej ulega uwolnieniu do roztworu lizatu podczas zastosowanej procedury dezintegracji. Dlatego przeprowadziłem badania mające na celu poprawę efektywności rozkładu ścian komórkowych. W tym celu przetestowałem trawienie enzymatyczne w obecności macerozemu R-10 oraz w środowisku alkalicznym przy użyciu wodorotlenku tetrametyloamoniowego (TMAH).

W badaniach wstępnych sprawdziłem jaki wpływ na przebieg oznaczenia techniką sp ICP MS oraz wartości odzysków AgNPs mają warunki stosowane podczas trawienia enzymatycznego. Eksperyment przeprowadziłem w obecności $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ macerozemu R-10, w temperaturze 30°C oraz stosując bufor o $\text{pH} = 4,8$. Uzyskałem ilościowe odzyski srebra oraz nie stwierdziłem rozpuszczania AgNPs w wyniku kontaktu z enzymem. Dlatego zastosowałem powyższe warunki do trawienia próbek glonów inkubowanych z AgNPs. Podczas oznaczania AgNPs w otrzymanych lizatach zaobserwowałem spadek rozmiarów nanocząstek o 15 – 25%, co mogło świadczyć o rozpuszczaniu AgNPs. Połowa srebra oznaczonego w układzie interpretowana była jako

frakcja jonowa. Dodatkowo uzyskałem zbyt wysokie wartości odzysków srebra. Ze względu na powyższe obserwacje dokonałem optymalizacji warunków trawienia, które mogą mieć wpływ na rozpuszczanie nanocząstek srebra oraz aktywność enzymatyczną, takich jak stężenie enzymu, temperatura oraz pH zastosowanego buforu. Najlepszą efektywność trawienia materiału roślinnego oraz ograniczenie procesu rozpuszczania nanocząstek srebra podczas przygotowania próbek glonów otrzymałem przy zastosowaniu stężenia macerozymu R-10: $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$, temperaturze trawienia: 30°C oraz stosując bufor cytrynianowy o $\text{pH} = 6,0$. Jednak podczas oznaczeń nadal uzyskiwałem zbyt wysokie wartości odzysków srebra (szczególnie w układach wzbogaconych w AgNPs). Przeprowadzone badania z wykorzystaniem komory kolizyjnej spektrometru ICP MS wykazały, że efekty nie były spowodowane występowaniem interferencji wieloatomowych. Na tym etapie badań stwierdziłem, że zbyt wysokie odzyski Ag mogą być następstwem efektów matrycowych związanych z różną efektywnością wprowadzania do strumienia plazmy wzorców i próbek lizatów komórkowych. Problem ten spróbowałem rozwiązać przeprowadzając kalibrację z dopasowaniem matrycy. Przy zastosowaniu kalibracji z dopasowaniem matrycy w układach wzbogaconych w AgNPs uzyskałem ilościowe odzyski srebra ($98,7 \pm 4,3\%$), natomiast dla układów z dodatkiem srebra jonowego otrzymane wartości odzysków wyniosły zaledwie $62,2 \pm 7,2\%$. Stwierdziłem natomiast, że zastosowania tego wariantu kalibracji umożliwiło uzyskanie poprawnego rozmiaru AgNPs. Wyniki te sugerują, że obserwowane zmiany wielkości AgNPs nie były spowodowane rozpuszczaniem AgNPs zachodzącym na etapie trawienia enzymatycznego, lecz interferencjami występującymi podczas oznaczania AgNPs techniką sp ICP MS (efekt ten został już opisany w literaturze [445]). Stwierdziłem zatem, że kalibracja z dopasowaniem matrycy może zapewnić dokładne wyniki oznaczania nanocząstek srebra. Jednak ze względu na dużą praco- i czasochłonność oraz konieczność dopasowania współczynnika rozcieńczenia matrycy do zawartości analitu w próbce, jest mało atrakcyjna w kontekście jej zastosowania w badaniach rutynowych. Warto również wspomnieć, że we wszystkich przypadkach trawienie enzymatyczne nie umożliwiała przeprowadzania całkowitego rozkładu materiału roślinnego. Dlatego w kolejnej części pracy sprawdziłem jaki wpływ na efektywność rozkładu komórek glonów oraz przebieg oznaczenia srebra techniką sp ICP MS ma zastosowanie trawienia alkalicznego w obecności wodorotlenku tetrametyloamoniowego (TMAH).

Zbadałem wpływ obecności 5, 10 i 20% v/v TMAH i materii organicznej, którą reprezentował kwas humusowy (HA) na stabilność oraz przebieg oznaczenia obu form srebra (Ag^+ , AgNPs) techniką sp ICP MS. W celu doboru optymalnego stężenia wodorotlenku

tetrametyloamoniowego komórki glonów po inkubacji z Ag^+ i AgNPs, oddzieleniu i przemyciu zawiesiłem w 5%, 7,5%, 10% oraz 20% roztworach TMAH. Otrzymane zawiesiny poddałem następnie działaniu ultradźwięków w celu przeprowadzenia efektywnej dezintegracji ścian komórkowych zarówno bezpośrednio po uzyskaniu mieszanin, jak i po 24-godzinnym trawieniu próbek. Zaobserwowałem, że ilość cząstek srebra ekstrahowanych z komórek glonów wzrastała wraz ze wzrostem stężenia TMAH od 5% do 10% i była porównywalna dla stężeń 10% i 20%. Z tego względu za optymalne uznałem 10% stężenie TMAH, które wybrałem do dalszych badań. W przypadku układów wzbogaconych w Ag^+ oraz AgNPs uzyskałem odzyski srebra wynoszące odpowiednio $121,9 \pm 1,1\%$ oraz $98,0 \pm 3,4\%$. Warto wspomnieć, że dzięki wysokiej efektywności trawienia próbek roślinnych nie było konieczności filtrowania lub wirowania próbek, co przełożyło się na dobre odzyski Ag.

W badaniach wykazałem, że wzorzec Ag^+ (używany do określenia odpowiedzi spektrometru ICP MS (RF)) oraz AgNPs (stosowany do wyznaczenia η_{neb}) nie mogą być sporządzone w samym Tritonie X-100, ze względu na zbyt wysokie wartości odzysków Ag uzyskane dla lizatów komórkowych. Ilościowe odzyski srebra otrzymałem natomiast przy zastosowaniu roztworów kalibracyjnych sporządzonych w 0,1% TMAH + 0,1% Tritonie X-100 oraz przeprowadzając kalibrację z dopasowaniem matrycy. Do dalszych badań wybrałem wariant kalibracji z zastosowaniem 0,1% TMAH + 0,1% Triton X-100, która jest łatwiejsza do przeprowadzenia. Zaobserwowałem, że odpowiedź wzorca jonowego w przypadku roztworów sporządzonych w TMAH + Triton X-100 i lizacie komórkowym była o ponad połowę wyższa w porównaniu do wartości RF uzyskanej w samym Tritonie X-100.

Przeprowadziłem charakterystykę analityczną wymienionych powyżej procedur kalibracji (Tab. 22 i 25). W przypadku wariantu z dopasowaniem matrycy zaobserwowałem wzrost wartości LOD_{size} oraz BED, z 10 - 22 nm (w 0,1% Tritonie X-100) do 31 - 32 nm. Natomiast granice wykrywalności AgNPs w ujęciu masowym i liczbowym wyniosły odpowiednio $0,42 \text{ ng L}^{-1}$ ($0,03 \text{ ng g}^{-1}$) oraz $1,3 \cdot 10^6 \text{ L}^{-1}$ ($7,9 \cdot 10^4 \text{ g}^{-1}$). Zaobserwowałem, że odzysk Ag był zależny od zastosowanego wariantu kalibracji (Rys. 38), natomiast rozmiary AgNPs oznaczonych w lizatach komórkowych były podobne we wszystkich trzech podejściach (Tab. 26). Stwierdziłem, że trawienie alkaliczne w obecności 10% TMAH nie wpłynęło na zmianę wielkości AgNPs (np. poprzez agregację), natomiast frakcja jonowa oznaczona w lizatach nie przekraczała 10%. W przypadku próbek zawierających dodatek Ag^+ frakcja jonowa stanowiła $97,1 \pm 0,9\%$, co świadczy o tym, że podczas trawienia alkalicznego materiału roślinnego nie dochodziło do wytrącania jonów srebra. Jest to prawdopodobnie konsekwencją tworzenia się kompleksów Ag^+ z grupami funkcyjnymi obecnymi w warstwie

substancji egzopolimerowych występującej na powierzchni komórek (np. grupami karboksylowymi).

Najlepsze rezultaty pod względem efektywności trawienia matrycy próbki, odzysków obu form srebra (Ag^+ , AgNPs) oraz ograniczenia ryzyka transformacji analitu uzyskałem stosując procedurę trawienia alkalicznego w obecności 10% TMAH. Zoptymalizowaną metodę przygotowania komórek glonów zastosowałem do zbadania specjacji srebra w układzie woda powierzchniowa – glony *D. subspicatus*. Frakcja interpretowana jako srebro jonowe stanowiła 33% całkowitego Ag oznaczonego w komórkach glonów oraz 64% srebra oznaczanego w otaczającym je środowisku (wodzie powierzchniowej). Transformacja AgNPs była najprawdopodobniej konsekwencją oddziaływania ze składnikami komórek glonów oraz substancjami egzopolimerowymi produkowanymi przez te mikroorganizmy.

Badania TiO_2NPs w próbkach grochu zwyczajnego techniką ICP MS i sp ICP MS

W części pracy dotyczącej analizy TiO_2NPs przeprowadziłem optymalizację procedury mineralizacji materiału roślinnego wzbogaconego w nanocząstki tlenku tytanu(IV). Badania wstępne przeprowadziłem na wzorcu TiO_2NPs , który poddano rozkładowi w wysokociśnieniowym systemie do mineralizacji wspomaganą mikrofalami, przy zastosowaniu 6 procedur. Podjąłem próbę mineralizacji wzorca w obecności różnych stosunków stężonych kwasów HNO_3 i HCl (1:3 oraz 6:1), różnych objętości HNO_3 i HF oraz z zastosowaniem dodatkowego etapu neutralizacji HF poprzez odparowanie lub użycie kwasu borowego. Zastosowanie procedur bez kwasu fluorowodorowego nie pozwoliło na poprawne przeprowadzenie mineralizacji TiO_2NPs , natomiast w przypadku wariantów z dodatkiem HF bez etapu neutralizacji podczas oznaczenia tytanu dochodziło do uszkodzenia elementów wykonanych z kwarcu (komory mgielnej, palnika) przy stężeniach HF w roztworach końcowych nie przekraczających 1%. Procedura z zastosowaniem etapu neutralizacji HF polegająca na odparowaniu roztworu prowadziła do wytrącenia tytanu, co przekładało się na straty analitu. Ilościowe odzyski Ti uzyskałem przy użyciu procedury z kwasem borowym. Dlatego podejście to zastosowałem do mineralizacji korzeni, łodyg oraz liści grochu zwyczajnego.

Zbadałem możliwość oznaczenia tytanu przy użyciu techniki ICP MS z wykorzystaniem 7 trybów pomiarowych. Sygnały zarejestrowałem dla izotopów ^{46}Ti , ^{47}Ti oraz ^{49}Ti w trybie pomiarowym wykorzystującym hel jako gaz kolizyjny ($^{46}\text{Ti} \rightarrow ^{46}\text{Ti}$, $^{47}\text{Ti} \rightarrow ^{47}\text{Ti}$, $^{49}\text{Ti} \rightarrow ^{49}\text{Ti}$). Przeprowadziłem również badania z użyciem gazów reakcyjnych: 3 tryby

pomiarowe z amoniakiem ($^{46}\text{Ti} \rightarrow ^{46}\text{Ti}(\text{NH}_3)_6^+$, $^{47}\text{Ti} \rightarrow ^{47}\text{Ti}(\text{NH}_3)_6^+$, $^{48}\text{Ti} \rightarrow ^{48}\text{Ti}(\text{NH}_3)_6^+$) oraz 1 tryb z tlenem ($^{48}\text{Ti} \rightarrow ^{48}\text{TiO}^+$). Stosując opisane powyżej podejścia, oznaczyłem relatywnie duże stężenia Ti w przypadku zarówno próbek ślepych, jak i kontrolnych. Aby potwierdzić, czy uzyskane wyniki odzwierciedlają rzeczywistą obecność tytanu w próbkach, przeprowadziłem badania przy użyciu techniki HR CS GFAAS, która nie jest obarczona interferencjami występującymi przy zastosowaniu ICP MS. Stwierdziłem, że uzyskane techniką ICP MS zawartości tytanu w ślepych próbach są wynikiem interferencji, których nie eliminowało zastosowanie wszystkich badanych trybów pomiarowych. Zawartości Ti oznaczone w różnych częściach grochu techniką HR CS GFAAS były zgodne z wynikami uzyskanymi techniką ICP MS przy użyciu tlenu i pomiarze przesunięcia masy MS/MS ($^{48}\text{Ti}^+ \rightarrow ^{48}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$), który wybrałem do dalszych badań.

We wstępnych badaniach mających na celu oznaczenie TiO_2NPs techniką sp ICP MS w materiale roślinnym sprawdziłem czy podobnie jak w przypadku analizy specjacyjnej srebra wymagane jest zastosowanie dodatku substancji stabilizującej. Zbadałem wpływ 0,1% Tritonu X-100 oraz 0,1% TMAH na przebieg oznaczenia tytanu techniką sp ICP MS. Zaobserwowałem pozytywny wpływ przeprowadzenia kalibracji w 0,1% TMAH na wartości odzysków tytanu i podejście to zastosowałem w dalszej części badań. Dla wybranej procedury wyznaczyłem parametry analityczne.

Opracowałem metodę przygotowania próbek do oznaczenia tytanu techniką sp ICP MS w różnych częściach roślin. W badaniach wstępnych sprawdziłem wpływ trzech procedur przygotowania materiału roślinnego (rozdrobienia, suszenia oraz liofilizacji) na efektywność uwalniania tytanu. Do trawienia próbek roślinnych zastosowałem procedurę opracowaną do uwalniania srebra z komórek glonów w środowisku alkalicznym, która wymagała optymalizacji stężenia TMAH. Największą efektywność uwalniania tytanu z materiału roślinnego uzyskałem przy zastosowaniu procedury z liofilizacją oraz trawieniem alkalicznym w obecności 10% TMAH.

Analizę nanocząstek tlenku tytanu(IV) techniką sp ICP MS przeprowadziłem z zastosowaniem O_2 jako gazu reakcyjnego. Uzyskane zawartości Ti były zgodne z wynikami otrzymanymi techniką ICP MS po mineralizacji próbek. W korzeniach oznaczyłem od 2842 do 7570 $\mu\text{g g}^{-1}$ cząstek TiO_2 , natomiast w łodygach oraz liściach uzyskałem znacznie niższe zawartości tlenku tytanu(IV) mieszczące się odpowiednio w przedziałach: 34 - 182 $\mu\text{g g}^{-1}$ oraz 26 - 242 $\mu\text{g g}^{-1}$. Zaobserwowałem, że wzrastające stężenie nanocząstek tlenku tytanu(IV) w pożywce przekładało się na wzrost ich zawartości w materiale roślinnym. Na podstawie otrzymanych histogramów nie stwierdziłem znaczących zmian wielkości cząstek

TiO₂ związanych ze zwiększeniem stężenia TiO₂NPs w pożywce użytej podczas hodowli roślin.

Podczas prowadzenia optymalizacji procedur przygotowania próbek do analizy oraz parametrów pomiarowych oznaczania NPs techniką sp ICP MS szczególną uwagę poświęciłem identyfikacji wszystkich źródeł błędów systematycznych (adsorpcja, zanieczyszczenie sprzętem laboratoryjnym, kalibracja, ekstrakcja, występowanie interferencji) oraz opracowaniu sposobów ich eliminacji. W badaniach szczególny nacisk położyłem na opracowanie ilościowych metod oznaczania nanocząstek obu metali. W tym celu na każdym etapie optymalizacji metody sprawdzane były odzyski srebra z wykorzystaniem materiału odniesienia. Zadanie to było trudniejsze w przypadku oznaczania nanocząstek tlenku tytanu(IV), gdyż nie dysponowałem odpowiednim materiałem odniesienia. Opracowane metody scharakteryzowałem pod kątem metrologicznym, a następnie zastosowałem je do badania nanocząstek w próbkach rzeczywistych: wodach powierzchniowych, mikroorganizmach roślinnych oraz tkankach roślin.

Streszczenie

W niniejszej rozprawie opracowano metody umożliwiające badanie nanocząstek srebra (AgNPs) oraz tlenku tytanu(IV) (TiO₂NPs) techniką sp ICP MS w próbkach środowiskowych i biologicznych. Wybrane do badań NPs reprezentują odpowiednio nanocząstki metali oraz tlenków metali. W pracy, ze względu na wyższą toksyczość, większą uwagę poświęcono analizie specjacyjnej srebra. Szczególny nacisk położono na opracowanie ilościowych metod umożliwiających jednoczesne oznaczenie Ag⁺/AgNPs oraz analizę TiO₂NPs o różnych rozmiarach cząstek odpowiednio w układach woda powierzchniowa - glony *Desmodesmus subspicatus* oraz w grochu zwyczajnym (*Pisum sativum L.*). W celu zapewnienia wiarygodnych wyników pomiarów przeprowadzono optymalizację procedur pod kątem wyeliminowania różnego rodzaju źródeł błędów systematycznych związanych m.in. z adsorpcją analitu, zanieczyszczeniem sprzętem laboratoryjnym, kalibracją, ekstrakcją oraz występowaniem interferencji. Procedury scharakteryzowano również pod kątem metrologicznym.

Informacje dotyczące formy specjacyjnej Ag obecnej w naturalnych systemach wodnych mają istotne znaczenie ze względu na ich różne oddziaływanie na organizmy żywe (np. glony), w tym również działanie toksyczne. Opracowane metody zostały zastosowane do badania transformacji Ag⁺/AgNPs w wodach powierzchniowych. Wyznaczono efektywność biosorpcji oraz udział różnych form srebra w próbkach biologicznych na poziomach mogących występować w systemach naturalnych. Przeprowadzono analizę specjacyjną srebra w komórkach glonów i otaczającym je środowisku. Ilościowe oznaczenie różnych form srebra w glonach wymagało optymalizacji procedury uwalniania Ag z matrycy próbki.

W drugiej części pracy zbadano użyteczność techniki sp ICP MS do oznaczenia nanocząstek tlenku tytanu(IV) w roślinach. W badaniach rośliną modelową stanowił groch zwyczajny (*Pisum sativum L.*) pochodzący z hodowli hydroponicznej. Oznaczanie TiO₂NPs w próbkach środowiskowych techniką sp ICP MS obarczone jest licznymi interferencjami wieloatomowymi oraz izobarycznymi. W pracy podjęto próbę eliminacji interferencji przy użyciu potrójnego kwadrupola oraz pomiarze mniej rozpowszechnionych izotopów tytanu (⁴⁷Ti lub ⁴⁹Ti). Zoptymalizowana została również procedura przygotowania materiału roślinnego do analizy sp ICP MS. Opracowane metody umożliwiły zbadanie biodystrybucji tytanu w różnych częściach roślin.

Abstract

In this work, methods have been developed for the study of silver nanoparticles (AgNPs) and titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) using the sp ICP MS technique in environmental and biological samples. The NPs selected for the study represent metal and metal oxide nanoparticles, respectively. Due to its higher toxicity, more attention was paid to the speciation analysis of silver. Particular emphasis was placed on the development of quantitative methods enabling the simultaneous determination of Ag⁺/AgNPs and the analysis of TiO₂NPs with different particle sizes in the systems of surface water - *Desmodesmus subspicatus* algae and in pea plants (*Pisum sativum L.*), respectively. In order to ensure reliable measurement results, procedures were optimized to eliminate various types of sources of systematic errors related to e.g. analyte adsorption, laboratory equipment contamination, calibration, extraction and interference. The procedures were also characterized in terms of metrology.

Information on the species of Ag present in natural water systems is important due to its various effects on living organisms (e.g. algae), including toxic effects. The developed methods were used to study the transformation of Ag⁺/AgNPs in surface waters. The efficiency of biosorption and the share of various forms of silver in biological samples were determined at levels that may occur in natural systems. A speciation analysis of silver was carried out in algal cells and their surrounding environment. Quantification of different forms of silver in algae required optimization of the Ag release procedure from the sample matrix.

In the second part of the work, the usefulness of the sp ICP MS technique for the determination of titanium dioxide nanoparticles in plants was examined. The model plant in the study was pea (*Pisum sativum L.*) from hydroponic culture. Determination of TiO₂NPs in environmental samples using the sp ICP MS technique is burdened with numerous polyatomic and isobaric interferences. The work attempts to eliminate interference using the triple quadrupole system and the measurement of less common isotopes of titanium (⁴⁷Ti or ⁴⁹Ti). The procedure for preparing plant material for sp ICP MS analysis has also been optimized. The developed methods made it possible to study the biodistribution of titanium in various parts of plants.

Spis rysunków

- Rysunek 1.** *Wzrost liczby komercyjnie dostępnych produktów użytkowych zawierających w swoim składzie nanomateriały (str. 4)*
- Rysunek 2.** *Pozyskiwanie srebra z kopalni, w których głównym źródłem dochodu jest eksploatacja określonych metali (2021 r.) [21] (str. 11)*
- Rysunek 3.** *Położenie polskich złóż miedziowo-srebrowych [23] (str. 12)*
- Rysunek 4.** *Wydobycie srebra w 2021 r. – podział na państwa [21] (str. 13)*
- Rysunek 5.** *Zastosowanie srebra w różnych sektorach gospodarki w 2021 roku [21] (str. 22)*
- Rysunek 6.** *Przykłady transformacji AgNPs w środowisku wodnym o charakterze: (a) chemicznym, (b) fizycznym, (c) biologicznym oraz (d) oddziaływań z makrocząsteczkami [186] (str. 30)*
- Rysunek 7.** *Zależność szybkości rozpuszczania AgNPs (●) oraz oczekiwanego termodynamicznie stałego AgCl (■) od stosunku molowego Cl/Ag. Szybkość rozpuszczania AgNPs w wodzie dejonizowanej pokazano linią przerywaną dla porównania [209] (str. 33)*
- Rysunek 8.** *Odmiany polimorficzne TiO₂: (a) anataz, (b) rutil, (c) brukit [229] (str. 36)*
- Rysunek 9.** *Techniki sprzężone stosowane w analizie specjacyjnej nanocząstek metali (objaśnienie skrótów nazw technik przedstawiono w tekście nad rysunkiem) [284] (str. 50)*
- Rysunek 10.** *(a) Wpływ temperatury na szybkość reakcji chemicznej katalizowanej enzymatycznie; (b) Zależność aktywności wybranych enzymów od wartości pH [359] (str. 53)*
- Rysunek 11.** *Wpływ przedziałów pracy spektrometru w trybie TRA - czasu pomiaru (t_{pom}) i czasu stabilizacji (t_{stab}) na intensywność sygnału otrzymanego techniką sp ICP MS [419] (str. 64)*
- Rysunek 12.** *Sygnał analityczny zarejestrowany dla $1 \mu\text{g L}^{-1} \text{Ag}^+$ przy czasie stabilizacji przed rozpoczęciem pomiaru: (a) 30 s oraz (b) 90 s (str. 100)*
- Rysunek 13.** *Rozkłady wielkości NPs uzyskane dla roztworów kalibracyjnych zawierających PVP-AgNPs 75 nm o stężeniu: (a) 5 ng L^{-1} , (b) 50 ng L^{-1} oraz (c) 100 ng L^{-1} (str. 102)*
- Rysunek 14.** *Wpływ dodatku substancji o różnym charakterze chemicznym na wartości odzysków 50 ng L^{-1} PVP-AgNPs 75 nm (RM 8017) ($n = 4$) (str. 103)*
- Rysunek 15.** *Wpływ dodatku substancji o różnym charakterze chemicznym na wartości odzysków 50 ng L^{-1} PVP-AgNPs 75 nm (RM 8017) w obecności 50 i $500 \text{ ng L}^{-1} \text{Ag}^+$ (Stężenie masowe) ($n \geq 2$) (str. 104)*
- Rysunek 16.** *Wpływ dodatku substancji o różnym charakterze chemicznym oraz obecności 50 ng L^{-1} PVP-AgNPs 75 nm (RM 8017) na wartości odzysków 50 lub $500 \text{ ng L}^{-1} \text{Ag}^+$ ($n \geq 2$) (str. 105)*
- Rysunek 17.** *Wpływ obecności frakcji jonowej na rozdzielenie sygnału pochodzącego od Ag^+ i AgNPs (a) w roztworze 0,1% Tritonu; (b) w 0,1% TMAH + 0,1% Tritonie X-100 (str. 107)*
- Rysunek 18.** *(a-c) Wpływ obecności frakcji jonowej na możliwość rozdzielnia sygnału pochodzącego od Ag^+ i AgNPs w wodzie wodociągowej; (d) Rozkład wielkości AgNPs uzyskany dla 75 nm AgNPs (RM 8017) w wodzie wodociągowej (str. 108)*
- Rysunek 19.** *Rozkłady wielkości cząstek uzyskane dla wzorców: (a) PVP-AgNPs oraz (b) c-AgNPs; Zależności średniej liczby zliczeń od średnicy PVP-AgNPs uzyskane dla układów z: (c) 0,1% Tritonem X-100 oraz (d) 0,1% Tritonem X-100 + 0,1% TMAH (str. 110)*
- Rysunek 20.** *Wartości odzysków srebra w różnych mediach, bezpośrednio po dodaniu analitu i po 24 h (MQ – woda Milli-Q, BBM – pożywka, MWP – modelowa woda powierzchniowa) (str. 112)*

- Rysunek 21.** Schemat przygotowania próbek do: **(a)** badania biosorpcji oraz **(b)** analizy specjacyjnej Ag^+/AgNPs . Całkowitą zawartość srebra oznaczano techniką ICP MS. W analizie specjacyjnej srebra stosowano technikę sp ICP MS. (str. 115)
- Rysunek 22.** Biosorpcja Ag^+ i AgNPs stabilizowanych PVP oraz jonami cytrynianowymi przez komórki glonów po 24 h inkubacji w: **(a)** wodzie Milli-Q (MQ), **(b)** pożywce BBM (BBM) oraz **(c)** modelowej wodzie powierzchniowej (MWP) ($n = 2$) (str. 116)
- Rysunek 23.** Wartości odzysków srebra z układów wzbogaconych w $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{Ag}^+$ lub AgNPs 40 nm po oznaczeniu i zsumowaniu masy Ag w: **(a)** 4 frakcjach (supernatantach, roztworach po przemyciu glonów, lizatach i nierozpuszczalnej pozostałości po lizie); **(b)** supernatantach, roztworach po przemyciu oraz zmineralizowanych glonach (MQ – woda Milli-Q, BBM – pożywka BBM, WP – woda powierzchniowa) (str. 121)
- Rysunek 24.** **(a)** Procentowy udział srebra w różnych frakcjach badanych układów wzbogaconych w $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{Ag}^+$ lub AgNPs 40 nm względem ilości Ag dodanej do układu; **(b)** udział srebra, które uległo biosorpcji na komórkach glonów oraz występowało w medium w formie niezwiązanej z materiałem biologicznym (MQ – woda Milli-Q, BBM – pożywka BBM, WP – woda powierzchniowa) (str. 122)
- Rysunek 25.** Specjacja srebra w układach wzbogaconych w $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{Ag}^+$ lub PVP- AgNPs 40 nm: **(a)** procentowy udział poszczególnych form srebra w całkowitej masie oznaczonej w układzie, **(b)** masa poszczególnych frakcji srebra oznaczona w układzie; (?) – całkowite srebro oznaczone w nierozpuszczalnej pozostałości po lizie (str. 124)
- Rysunek 26.** Procentowy udział Ag^+ oraz AgNPs oznaczony w różnych frakcjach badanych układów wzbogaconych w $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{Ag}^+$ lub AgNPs 40 nm: **(a)** woda Milli-Q, **(b)** pożywka BBM, **(c)** woda powierzchniowa (str. 126)
- Rysunek 27.** Masy Ag^+ oraz AgNPs oznaczone w różnych frakcjach badanych układów wzbogaconych w $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{Ag}^+$ lub AgNPs 40 nm: **(a)** woda Milli-Q, **(b)** pożywka BBM, **(c)** woda powierzchniowa (str. 126, 127)
- Rysunek 28.** Rozkłady wielkości cząstek uzyskane techniką sp ICP MS po inkubacji komórek glonów z PVP- AgNPs 40 nm w mediach o zróżnicowanym składzie matrycy w: **(a)** supernatantach oraz **(b)** lizatach uzyskanych po rozbiciu komórek ultradźwiękami (str. 128)
- Rysunek 29.** Wartości odzysków srebra uzyskane dla układów wzbogaconych w $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{Ag}^+$ lub PVP- AgNPs 75 nm po 24-godzinnym trawieniu enzymatycznym (kalibracja w 0,1% Tritonie X-100) ($n = 2$); stężenie macerozymu R-10: 2,5 mg mL^{-1} oraz 5 mg mL^{-1} (str. 131)
- Rysunek 30.** Procentowy udział obu form srebra oznaczonych w układach wzbogaconych w $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{Ag}^+$ lub AgNPs 75 nm przy zastosowaniu kalibracji w 0,1% Tritonie X-100, po 24-godzinnym trawieniu enzymatycznym - stężenie macerozymu R-10: **(a)** 2,5 mg mL^{-1} oraz **(b)** 5 mg mL^{-1} ; **(c)** Rozkład wielkości AgNPs uzyskany po trawieniu enzymatycznym glonów wzbogaconych w AgNPs 75 nm w obecności 5 mg mL^{-1} macerozymu R-10 (str. 132)
- Rysunek 31.** Masa srebra oznaczona w lizatach komórkowych przy zastosowaniu kalibracji w 0,1% Tritonie X-100, po 24-godzinnym trawieniu enzymatycznym - stężenie macerozymu R-10: **(a)** 2,5 mg mL^{-1} oraz **(b)** 5 mg mL^{-1} (str. 132)
- Rysunek 32.** **(a)** Wartości odzysków srebra uzyskane dla układów wzbogaconych w $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{Ag}^+$ lub AgNPs 75 nm po 24-godzinnym trawieniu enzymatycznym w różnych temperaturach. **(b)** Masa srebra oznaczona w lizatach komórkowych (układy wzbogacone w $5 \mu\text{g L}^{-1} \text{Ag}^+$ lub AgNPs 75 nm) po 24-godzinnym trawieniu enzymatycznym w różnych temperaturach;

stężenie macerozemu R-10: 2,5 mg mL⁻¹, pH = 4,8, kalibracja w 0,1% Tritonie X-100 (str. 134)

Rysunek 33. Rozkłady wielkości nanocząstek srebra uzyskane po trawieniu enzymatycznym glonów wzbogaconych w AgNPs 75 nm w obecności 2,5 mg mL⁻¹ macerozemu R-10 w temperaturze: (a) 21°C, (b) 30°C oraz (c) 37°C (str. 135)

Rysunek 34. (a) Wartości odzysków srebra uzyskane dla układów wzbogaconych w 5 µg L⁻¹ Ag⁺ lub AgNPs 75 nm po 24-godzinnym trawieniu enzymatycznym w obecności buforu I (pH = 4,8) lub buforu II (pH = 6,0). (b) Masa srebra oznaczona w lizatach komórkowych (układy wzbogacone w 5 µg L⁻¹ AgNPs 75 nm) po 24-godzinnym trawieniu enzymatycznym w obecności buforu I (pH = 4,8) lub buforu II (pH = 6,0); stężenie macerozemu R-10: 2,5 mg mL⁻¹, temperatura trawienia: 30°C, kalibracja w 0,1% Tritonie X-100 (str. 136)

Rysunek 35. Wartości odzysków srebra uzyskane dla układów wzbogaconych w: (a) Ag⁺ oraz (b) AgNPs 75 nm przy różnych wariantach kalibracji: **Procedura A** – w 0,1% Tritonie X-100, **Procedura B** – z dopasowaniem stężenia macerozemu R-10, buforu cytrynianowego i Tritonu X-100, **Procedura C** – w obecności 50-krotnie rozcieńczonego lizatu komórkowego glonów z dodatkiem 0,1% Tritonu X-100; stężenie macerozemu R-10: 2,5 mg mL⁻¹; temperatura 30°C; (n = 2) (str. 138)

Rysunek 36. Procentowy udział obu form srebra oraz ich masy oznaczone w układach wzbogaconych w 5 µg L⁻¹ Ag⁺ lub AgNPs 75 nm przy zastosowaniu kalibracji: (a,b) z dopasowaniem stężenia macerozemu R-10, buforu cytrynianowego i Tritonu X-100 (**Procedura B**) oraz (c,d) w obecności 50-krotnie rozcieńczonego lizatu komórkowego glonów z dodatkiem 0,1% Tritonu X-100 po 24-godzinnym trawieniu enzymatycznym - stężenie macerozemu R-10: 2,5 mg mL⁻¹ (**Procedura C**) (str. 140)

Rysunek 37. Rozkłady wielkości nanocząstek srebra otrzymane techniką sp ICP MS dla układów zawierających 5 µg L⁻¹ AgNPs 60 nm w (a) 10% TMAH, (b) 10% TMAH z dodatkiem 1 mg L⁻¹ HA (str. 142)

Rysunek 38. Odzyski srebra uzyskane dla komórek glonów wzbogaconych w Ag⁺ lub AgNPs (bez inkubacji), wyekstrahowanych 10% TMAH i oznaczonych metodą sp ICP MS (n = 2). **Procedura A** – kalibracja w 0,1% Tritonie X-100; **Procedura B** – kalibracja w 0,1% TMAH + 0,1% Tritonie X-100; **Procedura C** – kalibracja w lizacie komórkowym rozcieńczonym 0,1% Tritonem X-100. (str. 143)

Rysunek 39. Rozkłady wielkości AgNPs uzyskane za pomocą techniki sp ICP MS dla (a) 75 nm AgNPs w 0,1% Tritonie X-100, (b) 75 nm AgNPs w 0,1% TMAH + 0,1% Tritonie X-100, (c) 75 nm AgNPs ekstrahowanych za pomocą 10% TMAH ze wzbogaconych kontrolnych próbek komórek glonów [482] (str. 145)

Rysunek 40. Rozkłady wielkości AgNPs uzyskane za pomocą techniki sp ICP MS dla (a) 60 nm AgNPs w 0,1% TMAH + 0,1% Tritonie X 100, (b) supernatantów otrzymanych po 24-godzinnej inkubacji glonów w wodzie powierzchniowej wzbogaconej w 60 nm AgNPs oraz (c) lizatów komórkowych otrzymanych po trawieniu TMAH glonów eksponowanych na działanie 60 nm AgNPs przez 24 godziny [482] (str. 147)

Rysunek 41. Zdjęcie otrzymane dla wzorca TiO₂NPs < 150 nm za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (str. 151)

Rysunek 42. Całkowite zawartości Ti oznaczone techniką ICP MS przy użyciu 7 trybów pomiarowych w: (a) korzeniach, (b) łodygach oraz (c) liściach (str. 155)

Rysunek 43. Zawartości Ti oznaczone techniką ICP MS/MS w różnych częściach roślin eksponowanych na działanie 0, 10, 50 oraz 100 mg L⁻¹ TiO₂NPs przy użyciu tlenu jako

gazu reakcyjnego ($^{48}\text{Ti} \rightarrow ^{48}\text{TiO}^+$) po odjęciu wartości uzyskanych dla ślepych prób (str. 156)

- Rysunek 44.** (a) Wpływ dodatku 0,1% Tritonu X-100 i 0,1% TMAH na wartości odzysków tytanu oznaczonego techniką sp ICP MS. (b) Współczynnik odpowiedzi wzorca jonowego Ti (RF) uzyskany w różnych układach ($n = 2$) (str. 157)
- Rysunek 45.** Rozkłady wielkości cząstek TiO_2 uzyskane techniką sp ICP MS dla roztworów zawierających $600 \text{ ng L}^{-1} \text{ TiO}_2\text{NPs} < 150 \text{ nm}$ sporządzonych w (a) wodzie Milli-Q, (b) 0,1% TMAH oraz (c) 0,1% Tritonie X-100 ($n \geq 2$) (str. 158)
- Rysunek 46.** Wpływ obecności 10 oraz $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}$ na wartości odzysków tytanu przy zastosowaniu trybów pomiarowych: „no gas” i z użyciem tlenu jako gazu reakcyjnego ($n \geq 2$) (str. 160)
- Rysunek 47.** Procedury wstępnego przygotowania materiału roślinnego do analizy TiO_2NPs techniką sp ICP MS (str. 161)
- Rysunek 48.** Zawartości Ti i TiO_2NPs oznaczone techniką sp ICP MS po trawieniu alkalicznym (a) mokrej i (b) suchej masy pędów oraz korzeni w obecności różnych stężeń TMAH ($n = 2$) (str. 163)
- Rysunek 49.** Zawartości Ti i TiO_2NPs oznaczone techniką sp ICP MS po trawieniu alkalicznym w obecności 10% TMAH wysuszonych oraz zliofilizowanych korzeni grochu zwyczajnego eksponowanych na działanie TiO_2NPs o stężeniu 50 mg L^{-1} ($n = 2$) (str. 164)
- Rysunek 50.** Rozkłady wielkości cząstek TiO_2 uzyskane techniką sp ICP MS dla: (a) zawiesiny TiO_2NPs (600 ng L^{-1}) w 0,1% TMAH oraz próbek kontrolnych zliofilizowanych korzeni i liści wzbogaconych w $600 \text{ ng L}^{-1} \text{ TiO}_2\text{NPs}$, poddanych trawieniu alkalicznemu w obecności 10% TMAH, odpowiednio (b) i (c) (str. 165)
- Rysunek 51.** Wartości odzysków tytanu uzyskane dla próbek kontrolnych grochu wzbogaconych w TiO_2NPs (600 ng L^{-1}) techniką sp ICP MS przy zastosowaniu różnych trybów pomiarowych ($n = 2$) (str. 166)
- Rysunek 52.** Rozkłady wielkości cząstek TiO_2 uzyskane techniką sp ICP MS dla pożywki zawierającej $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ TiO}_2\text{NPs}$ (a) przed rozpoczęciem oraz (b) po zakończeniu hodowli (str. 168)
- Rysunek 53.** Sygnały uzyskane techniką sp ICP MS dla (a) próbek kontrolnych korzeni, (b) korzeni roślin eksponowanych na działanie $50 \text{ mg L}^{-1} \text{ TiO}_2\text{NPs}$ oraz (c) liści roślin eksponowanych na działanie $50 \text{ mg L}^{-1} \text{ TiO}_2\text{NPs}$ (str. 170)
- Rysunek 54.** Rozkłady wielkości cząstek TiO_2 uzyskane techniką sp ICP MS dla (a) korzeni, (b) łodyg oraz (c) liści grochu zwyczajnego uprawianego w systemie hydroponicznym z dodatkiem 10, 50 oraz $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ TiO}_2\text{NPs}$ (str. 172)

Spis tabel

- Tabela 1.** *Wybrane właściwości fizykochemiczne srebra* [24,25] (str. 13)
- Tabela 2.** *Przykłady zastosowania AgNPs w przemyśle i produktach codziennego użytku* [114] (str. 24)
- Tabela 3.** *Stężenia i zawartości srebra oznaczone w zanieczyszczonym ekosystemie rzeki Skudai w latach 2018 - 2019* [160] (str. 26)
- Tabela 4.** *Przykładowe stężenia i zawartości Ag w wodach powierzchniowych oraz organizmach wodnych występujących w różnych częściach świata* [163] (str. 27)
- Tabela 5.** *Stężenia AgNPs oznaczone w wodach powierzchniowych oraz oczyszczonych ściekach* [172] (str. 28)
- Tabela 6.** *Rozpuszczalność związków srebra o znaczeniu środowiskowym* [28,179] (str. 28)
- Tabela 7.** *Wybrane właściwości fizykochemiczne tytanu* [24,224] (str. 35, 36)
- Tabela 8.** *Wybrane właściwości fizykochemiczne TiO_2 w formie rutylu i anatazu* [232,233] (str. 37)
- Tabela 9.** *Zawartości tytanu w różnego rodzaju roślinach* [248] (str. 39)
- Tabela 10.** *Zastosowanie TiO_2 NPs w przemyśle i produktach codziennego użytku* [284] (str. 42, 43)
- Tabela 11.** *Techniki analityczne stosowane do charakterystyki i oznaczania AgNPs i TiO_2 NPs* [284] (str. 48, 49)
- Tabela 12.** *Opis procedur trawienia enzymatycznego próbek pochodzenia roślinnego w obecności macerozumu R-10 stosowanych przed oznaczeniem NPs techniką sp ICP MS* (str. 57, 58)
- Tabela 13.** *Dokładny opis procedur trawienia próbek w środowisku alkalicznym (TMAH) stosowanych przed oznaczeniem NPs* (str. 59, 60)
- Tabela 14.** *Przegląd prac dotyczących oznaczania AgNPs techniką sp ICP MS* (str. 71 - 74)
- Tabela 15.** *Wybrane przykłady interferencji izobarycznych oraz wieloatomowych występujące podczas oznaczania różnych izotopów tytanu techniką ICP MS* [457] (str. 75)
- Tabela 16.** *Analiza TiO_2 NPs techniką sp ICP MS* (str. 79 - 81)
- Tabela 17.** *Warunki pomiarowe zastosowane do oznaczenia całkowitej zawartości Ag i Ti techniką ICP MS* (str. 93)
- Tabela 18.** *Optymalne warunki pomiarowe oznaczania srebra oraz tytanu techniką sp ICP MS* (str. 94)
- Tabela 19.** *Program temperaturowy zastosowany do oznaczania tytanu techniką atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w kuwecie grafitowej (GFAAS)* (str. 95)
- Tabela 20.** *Program mineralizacji glonów oraz nierozpuszczalnej pozostałości po lizie komórkowej, trawieniu enzymatycznym i roztwarzaniu w środowisku alkalicznym (mineralizator ETHOS PLUS)* (str. 99)
- Tabela 21.** *Program mineralizacji materiału roślinnego i wzorca TiO_2 NPs (mineralizator MARS 6)* (str. 99)
- Tabela 22.** *Parametry analityczne metody sp ICP MS uzyskane dla układów modelowych* (str. 110)
- Tabela 23.** *Wartości odzysków srebra bezpośrednio po dodaniu analitu oraz po 24 h* (str. 113)
- Tabela 24.** *Efektywność biosorpcji różnych form srebra na komórkach glonów po 24 h inkubacji w układach o różnej matrycy* (str. 117)
- Tabela 25.** *Parametry analityczne metody oznaczania srebra techniką sp ICP MS uzyskane przy różnych wariantach kalibracji* (str. 144)
- Tabela 26.** *Rozmiar AgNPs wykstrahowanych 10% TMAH ze wzbogaconych próbek glonów wyznaczony techniką sp ICP MS przy zastosowaniu różnych wariantów kalibracji ($n = 4$)* (str. 144, 145)

- Tabela 27.** *Stężenia i zawartości srebra oznaczone techniką sp ICP MS w supernatantach i lizatach komórkowych glonów (trawionych 10% TMAH) po 24 h inkubacji z Ag⁺ lub 60 nm PVP-AgNPs w wodach powierzchniowych (n = 2) (str. 147, 148)*
- Tabela 28.** *Parametry analityczne metody oznaczania TiO₂NPs techniką sp ICP MS uzyskane przy różnych wariantach kalibracji (str. 159)*
- Tabela 29.** *Parametry analityczne metody oznaczania TiO₂NPs techniką sp ICP MS uzyskane w obecności matrycy próbki (str. 167)*
- Tabela 30.** *Zawartość Ti i TiO₂NPs oraz liczba nanocząstek tlenku tytanu(IV) oznaczona w korzeniach, łodygach oraz liściach grochu zwyczajnego uprawianego w pożywce Hoaglanda z dodatkiem TiO₂ (n ≥ 2) (str. 168, 169)*
- Tabela 31.** *Średnia, mediana oraz najczęściej występujący rozmiar TiO₂ oznaczony w korzeniach, łodygach oraz liściach grochu zwyczajnego techniką sp ICP MS (n = 2) (str. 171)*

Dorobek naukowy

1) Publikacje wchodzące w skład dysertacji:

- **J. Gruszka**, J. Malejko, B. Godlewska-Żyłkiewicz, *Nanocząstki tlenku tytanu(IV) – zastosowanie w produktach użytkowych, badania właściwości i oznaczanie techniką spektrometrii mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną pracującą w trybie pojedynczej cząstki*, Wiad. Chem., 73, 5-6, 2019, (PL ISSN 0043-5104).
- **J. Gruszka**, J. Malejko, A. Bajguz, B. Godlewska-Żyłkiewicz, *Method development for speciation analysis of silver nanoparticles and silver ions in green algae and surface waters at environmentally relevant concentrations using single particle ICP-MS*, J. Anal. At. Spectrom. 2022, 37, 1208-1222.
- E. Skiba, M. Pietrzak, S. Michlewska, **J. Gruszka**, J. Malejko, B. Godlewska-Żyłkiewicz and W. M. Wolf, *Photosynthesis Governed by Nanoparticulate Titanium Dioxide. The Pisum Sativum L. Case Study*, https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=4325881 (artykuł w recenzji), 2023.

2) Prace, które nie wchodzą w zakres niniejszej rozprawy:

- **J. Gruszka**, E. Zambrzycka-Szelewa, J.S. Kulpa, B. Godlewska-Żyłkiewicz, *Discrimination between ionic silver and silver nanoparticles in consumer products using graphite furnace atomic absorption spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 33, 2018, 2133-2142.
- **J. Gruszka**, A. Martyna, B. Godlewska-Żyłkiewicz, *Chemometric approach to discrimination and determination of binary mixtures of silver ions and nanoparticles in consumer products by graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Talanta, 2021, 230, 122319.

3) Rozdziały w monografiach naukowych:

- **J. Gruszka**, J. Malejko, B. Godlewska-Żyłkiewicz, *Oznaczanie nanocząstek srebra techniką sp ICP MS – kalibracja metody*, W: Z. Hubicki (red.), *Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości*, Wydawnictwo UMCS, Lublin 2021.

4) Zaangażowanie w realizację projektów badawczych:

- „*Nowe metodyki analityczne w analizie specjacyjnej nanosrebra i nanozłota*” (OPUS 8), kierownik projektu: prof. dr hab. Beata Izabella Godlewska-Żyłkiewicz, Uniwersytet w Białymstoku, Wydział Biologiczno-Chemiczny – **wykonawca (2017-2019 r.)**,
- „*Badanie możliwości zastosowania spektrometrii mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną w trybie single particle do jednoczesnego oznaczania nanocząstek tlenku tytanu (IV) oraz tytanu w formie jonowej*” (grant młodego naukowca BMN), Uniwersytet w Białymstoku, Wydział Biologiczno-Chemiczny – **kierownik/wykonawca (2018-2019 r.)**.

5) Udział w konferencjach naukowych:

- **Current Environmental Issues 2019**, Białystok, 24-26 września 2019 r., **Jakub Gruszka**, Julita Malejko, Beata Godlewska-Żyłkiewicz, „*Application of single particle ICP MS for determination of silver and titanium dioxide nanoparticles and their ionic counterparts in environmental matrices*” (Poster),

- **20th European Meeting on Environmental Chemistry EMEC20**, Łódź, 2-5 grudnia 2019 r., Jakub Gruszka, J. Malejko, A. Bajguz, B. Godlewska-Żyłkiewicz, „*Application of Single Particle ICP MS for Speciation Analysis of AgNPs and Ag⁺ Ions in Surface Waters and Green Algae*” (Poster).
- **Konferencja Naukowa Chemików „Łączy nas chemia”**, Białystok, 25-26 maja 2018 r., Jakub Gruszka, Elżbieta Zambrzycka-Szelewa, Beata Godlewska-Żyłkiewicz, „*Czy możliwa jest bezpośrednia analiza specyjacyjna srebra za pomocą techniki atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w kuwecie grafitowej?*” (Poster),
- **Konwersatorium Spektrometrii Atomowej**, Białystok 24-26 września 2018 r., Jakub Gruszka, Elżbieta Zambrzycka-Szelewa, Janusz Kulpa, Beata Godlewska-Żyłkiewicz, „*Badanie możliwości wykorzystania techniki atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w kuwecie grafitowej do bezpośredniej analizy specyjacyjnej srebra*” (Poster),
- **XV Ogólnopolskie Sympozjum „Nauka i przemysł – metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości”**, Lublin, 29-30 czerwca 2021 r., Jakub Gruszka, Julita Malejko, Beata Godlewska-Żyłkiewicz, „*Oznaczanie nanocząstek srebra techniką sp ICP MS - kalibracja metody*” (Poster).
- **Konwersatorium Spektrometrii Atomowej**, Białystok, 6-8 września 2021 r., J. Gruszka, J. Malejko, B. Godlewska-Żyłkiewicz, A. Bajguz „*Przygotowanie materiału roślinnego do oznaczania nanocząstek metali techniką SP ICP MS*” (Komunikat).

6) **Udział w międzynarodowych kursach specjalistycznych:**

- *Advanced Workshop on Solution Chemistry of Technology Critical Elements*, Białystok, 22-23 stycznia 2019 r.

7) **Nagrody i osiągnięcia:**

- II miejsce w konkursie na najlepszego absolwenta II stopnia na kierunku chemia w roku 2017,
- II miejsce w konkursie na najlepszy poster na **X Polskiej Konferencji Chemii Analitycznej „Od chemii wszystko się zaczyna”**,
- Nagroda za najlepszy poster na międzynarodowej konferencji **20th European Meeting on Environmental Chemistry EMEC20**.
- I miejsce w konkursie na najlepszy poster na **XV Ogólnopolskim Sympozjum „Nauka i przemysł – metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości”**.

LITERATURA

- [1] <https://nano.nature.com/> (dostęp: 05.11.2020 r.).
- [2] <https://nanodb.dk/> (dostęp: 29.03.2023 r.).
- [3] <https://www.nanotechproject.tech/cpi/products/> (dostęp: 29.03.2023 r.).
- [4] <https://www.britannica.com/art/silverwork> (dostęp: 19.09.2022 r.).
- [5] E. C. Polomé, *Dictionaries: Journal of the Dictionary Society of North America*, 1989, **11**, 65–80.
- [6] Z. Goffer, *Archaeological Chemistry*, John Wiley & Sons, 2006.
- [7] <http://www.minerals.net/mineral/galena.aspx> (dostęp: 22.12.2022 r.).
- [8] R. F. Tylecote, *A History of Metallurgy*, Institute of Materials, Londyn 1992, str. 158.
- [9] J. Percy, *Extraction of silver from lead*, [W:] J.Murray (red.), *The metallurgy of lead, including desilverisation and cupellation*, Londyn 1870, str.121-148.
- [10] T. Chmielewski, *Ługowanie metali z rud, koncentratów, półproduktów i odpadów*, *Fizykochem. Probl. Miner.*, 1996, **30**, 217-231.
- [11] M. Saternus, A. Fornalczyk, J. Willner, H. Kania, *Metody odzysku srebra z produktów ubocznych i wtórnych*, *Przem. Chem.*, 2016, **95(1)**, 78-83.
- [12] M.C. Lea, *Allotropic forms of silver*, *Am. J. Sci.*, 1889, **222**, 476–491.
- [13] B. Nowack, H.F. Krug, M. Height, *120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers*, *Environ. Sci. Technol.*, 2011, **45**, 1177–1183.
- [14] G. Binnig, H. Rohrer, *Scanning tunneling microscopy*, *Surf. Sci.*, 1983, **126**, 236–244.
- [15] J.M. Fortescue-Brickdale, *Collargol: A Review of Some of Its Clinical Applications, with Experiments on Its Antiseptic Action*, *Bristol. Med. Chir. J.*, 1903, **21**, 337–344.
- [16] V. Gupta, A. Kumar, *Nanosilver Products - A Review*, *Asian J. Biochem. Pharm.Res.*, 2014, **4**, 1623.
- [17] <https://www.mindat.org/> (dostęp: 01.02.2023 r.).
- [18] <https://webmineral.com/> (dostęp: 01.02.2023 r.).
- [19] <https://rruff.info/ima/> (dostęp: 01.02.2023 r.).
- [20] G. A. Palyanova, *Gold and silver minerals in sulfide ore*, *Geol. Ore Deposits*, 2020, **62**, 383–406.
- [21] The Silver Institute, *World Silver Survey 2022*, *Metal Focus* 2022.
- [22] U.S. Geological Survey, *Mineral Commodity Summaries*, Styczeń 2023, 160-161.
- [23] S. Speczik, K. Szamałek, J. Wierchowicz, K. Zieliński, A. Pietrzela, T. Bieńko, *The new Northern Copper Belt of south-western Poland a summary*, *Acta Geol. Pol.*, 2022, **72**, 469-477.
- [24] T. Szymczyk, S. Rabej, A. Pielesz, J. Desselberger, *Tablice matematyczne, fizyczne, astronomiczne*, Świat Książki, PPU „PARK”, Warszawa, 2003, str. 171-378.
- [25] <https://www.rsc.org/periodic-table/element/47/silver> (dostęp: 12.04.2023 r.).
- [26] C. Uher, *Thermal conductivity of metals*, [W:] T.M. Tritt (red.), *Thermal conductivity: theory, properties, and applications*, Kluwer Academic / Plenum Publishers, Nowy Jork, 2004, str.21-46.
- [27] University of California, (2000). *DURABLE SILVER COATING FOR MIRRORS* [online]. Wynalazcy: J.D. Wolfe, N.L. Thomas, 20 czerwca. Zgłoszony: 09.06.1999 r. United States Patent USOO6078425A. (dostęp: 10.03.2023 r.). Dostępny w: <https://patentimages.storage.googleapis.com/df/6f/3a/895732366e8b2b/US6078425.pdf>.
- [28] M.L. Nguyen, J.A. Murphy, L.C. Hamlet, B.L.T. Lau, *Ligand-Dependent Ag₂S Formation: Changes in Deposition of Silver Nanoparticles with Sulfidation*, *Environ. Sci.: Nano*, 2018, **5**, 1090–1095.
- [29] H. Memon, H. Wang, S. Yasin, A. Halepoto, *Influence of Incorporating Silver Nanoparticles in Protease Treatment on Fiber Friction, Antistatic, and Antibacterial Properties of Wool Fibers*, *J. Chem.*, 2018, **2018**, 1-8.
- [30] M. Maruyama, R. Matsubayashi, H. Iwakuro, S. Isoda, T. Komatsu, *Silver nanosintering: a lead-free alternative to soldering*, *Appl. Phys. A*, 2008, **93**, 467–470.
- [31] S. Iyahrāja, J. S. Rajadurai, *Study of thermal conductivity enhancement of aqueous suspensions containing silver nanoparticles*, *AIP Advances*, 2015, **5**, 1-8.
- [32] Y. Bakhshan, F. Samari, M. Ghaemi, S. Ghafarigousheh, A. Kakoe, *Experimental Study on the Thermal Conductivity of Silver Nanoparticles Synthesized Using Sargassum Angostifolium*, *Iran. J. Sci. Technol. Trans. Mech. Eng.*, 2019, **43 (Suppl 1)**, S251-S257.
- [33] S. Khasim, A. Pasha, M. Lakshmi, C. Panneerselvam, A.A.A. Darwish, T.A. Hamdalla, S. Alfadhli, S.A. Al-Ghamdi, *Conductivity and dielectric properties of heterostructures based on novel graphitic carbon nitride and silver nanoparticle composite film for electronic applications*, *Dig. J. Nanomater. Bios.*, 2022, **17(4)**, 1089-1098.
- [34] M. Diantoro, T. Suprayogi, U. Sa'adah, N. Mufti, A. Fuad, A. Hidayat, H. Nur, M. Diantoro, T. Suprayogi, U. Sa'adah, N. Mufti, A. Fuad, A. Hidayat, H. Nur, *Modification of Electrical Properties of Silver Nanoparticle*, *IntechOpen*, 2018.

- [35] D. Paramelle, A. Sadovoy, S. Gorelik, P. Free, J. Hobley, D. G. Fernig, *A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra*, *Analyst*, 2014, **139**, 4855–4861.
- [36] B. Khodashenas, H. Ghorbani, *Synthesis of silver nanoparticles with different shapes*, *Arab. J. Chem.*, 2015, **7(8)**, 1-16.
- [37] O. Mikhailov, *Progress in the synthesis of Ag nanoparticles having manifold geometric forms*, *Rev. Inorg. Chem.*, 2018, **38(1)**, 21-42.
- [38] S. Bharti, S. Mukherji, S. Mukherji, *Enhanced antibacterial activity of decahedral silver nanoparticles*, *J. Nanopart. Res.*, 2021, **23**, 36.
- [39] A.L. González, C. Noguez, J. Beránek, A.S. Barnard, *Size, Shape, Stability, and Color of Plasmonic Silver Nanoparticles*, *J. Phys. Chem. C*, 2014, **118**, 9128–9136.
- [40] A.M. El Badawy, K.G. Scheckel, M. Suidan, T. Tolaymat, *The impact of stabilization mechanism on the aggregation kinetics of silver nanoparticles*, *Sci. Total Environ.*, 2012, **429**, 325–331.
- [41] D.J. Pochapski, C. Carvalho dos Santos, G. W. Leite, S.H. Pulcinelli, C.V. Santilli, *Zeta Potential and Colloidal Stability Predictions for Inorganic Nanoparticle Dispersions: Effects of Experimental Conditions and Electrokinetic Models on the Interpretation of Results*, *Langmuir*, 2021, **37**, 13379–13389.
- [42] V. Selvamani, *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*, [W:] S.S. Mohapatra, S. Ranjan, N. Dasgupta, R.K. Mishra, S. Thomas (red.), *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*, Elsevier, 2019, str. 425–444.
- [43] H. Wang, X. Qiao, J. Chen, X. Wang, S. Ding, *Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles*, *Mater. Chem. Phys.*, 2005, **94**, 449–453.
- [44] C.M.C. Falcão, A. Andrade, V.N. Holanda, R.C.B.Q. de Figueiredo, E.A. Ximenes, A.S.L. Gomes, *Activity of poly(methacrylic acid)-silver nanoparticles on fluconazole-resistant *Candida albicans* strains: Synergistic and cytotoxic effects*, *J. App. Microbiol.*, 2022, **132**, 4300–4309.
- [45] D. Pencheva, R. Bryaskova, T. Kantardjiev, *Polyvinyl alcohol/silver nanoparticles (PVA/AgNps) as a model for testing the biological activity of hybrid materials with included silver nanoparticles*, *Mater. Sci. Eng. C*, 2012, **32**, 2048–2051.
- [46] D. Radziuk, A. Skirtach, G. Sukhorukov, D. Shchukin, H. Möhwald, *Stabilization of Silver Nanoparticles by Polyelectrolytes and Poly(ethylene glycol)*, *Macromol. Rapid Commun.*, 2007, **28**, 848–855.
- [47] A. Ravindran, P. Chandran, S.S. Khan, *Biofunctionalized silver nanoparticles: Advances and prospects*, *Colloids Surf. B*, 2013, **105**, 342–352.
- [48] L. Li, Y.-J. Zhu, *High chemical reactivity of silver nanoparticles toward hydrochloric acid*, *J. Colloid Interface Sci.*, 2006, **303**, 415–418.
- [49] W.-R. Li, T.-L. Sun, S.-L. Zhou, Y.-K. Ma, Q.-S. Shi, X.-B. Xie, X.-M. Huang, *A comparative analysis of antibacterial activity, dynamics, and effects of silver ions and silver nanoparticles against four bacterial strains*, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2017, **123**, 304–310.
- [50] P. Prasher, M. Singh, H. Mudila, *Oligodynamic Effect of Silver Nanoparticles: a Review*, *BioNanoSci.*, 2018, **8**, 951–962.
- [51] A. Kędziora, M. Speruda, E. Krzyżewska, J. Rybka, A. Łukowiak, G. Bugla-Płoskońska, *Similarities and Differences between Silver Ions and Silver in Nanoforms as Antibacterial Agents*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, **19**, 444.
- [52] S. Tang, J. Zheng, *Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects*, *Adv. Healthcare Mater.*, 2018, **7**, 1701503.
- [53] W.K. Jung, H.C. Koo, K.W. Kim, S. Shin, S.H. Kim, Y.H. Park, *Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli**, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, **74**, 2171–2178.
- [54] C.P. Randall, A. Gupta, N. Jackson, D. Busse, A.J. O’Neill, *Silver resistance in Gram-negative bacteria: a dissection of endogenous and exogenous mechanisms*, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2015, **70**, 1037–1046.
- [55] T.C. Dakal, A. Kumar, R.S. Majumdar, V. Yadav, *Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles*, *Front. Microbiol.*, 2016, **7**, 1831.
- [56] S. Sütterlin, E. Tano, A. Bergsten, A-B. Tallberg, A. Melhus, *Effects of Silver-based Wound Dressings on the Bacterial Flora in Chronic Leg Ulcers and Its Susceptibility In Vitro to Silver*, *Acta Derm. Venereol.*, 2012, **92**, 34–39.
- [57] A.M. El Badawy, T.P. Luxton, R.G. Silva, K.G. Scheckel, M.T. Suidan, T.M. Tolaymat, *Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions*, *Environ. Sci. Technol.*, 2010, **44**, 1260–1266.
- [58] P. Bélteky, A. Rónavári, N. Igaz, B. Szerencsés, I.Y. Tóth, I. Pfeiffer, M. Kiricsi, Z. Kónya, *Silver nanoparticles: aggregation behavior in biorelevant conditions and its impact on biological activity*, *Int. J. Nanomedicine*, 2019, **14**, 667–687.

- [59] Z. Lu, K. Rong, J. Li, H. Yang, R. Chen, *Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria*, J. Mater. Sci.: Mater. Med., 2013, **24**, 1465–1471.
- [60] C. Khurana, A.K. Vala, N. Andhariya, O.P. Pandey, B. Chudasama, *Antibacterial activity of silver: The role of hydrodynamic particle size at nanoscale*, J. Biomed. Mater. Res., 2014, **102**, 3361–3368.
- [61] A. Ivask, I. Kurvet, K. Kasemets, I. Blinova, V. Aruoja, S. Suppi, H. Vija, A. Käkinen, T. Titma, M. Heinlaan, M. Visnapuu, D. Koller, V. Kisand, A. Kahru, *Size-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles to Bacteria, Yeast, Algae, Crustaceans and Mammalian Cells In Vitro*, PLoS ONE, 2014, **9**, 1–14.
- [62] M.A. Raza, Z. Kanwal, A. Rauf, A.N. Sabri, S. Riaz, S. Naseem, *Size- and Shape-Dependent Antibacterial Studies of Silver Nanoparticles Synthesized by Wet Chemical Routes*, Nanomaterials (Basel), 2016, **6**, 74.
- [63] J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramirez, M.J. Yacaman, *The bactericidal effect of silver nanoparticles*, Nanotechnology, 2005, **16**, 2346–2353.
- [64] N. Durán, M. Durán, M.B. de Jesus, A.B. Seabra, W.J. Fávaro, G. Nakazato, *Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity*, Nanomedicine, 2016, **12**, 789–799.
- [65] S. Pal, Y.K. Tak, J.M. Song, *Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium Escherichia coli*, Appl. Environ. Microbiol., 2007, **73**, 1712–1720.
- [66] J. Helmlinger, C. Sengstock, C. Groß-Heitfeld, C. Mayer, T. A. Schildhauer, M. Köller, M. Epple, *Silver nanoparticles with different size and shape: equal cytotoxicity, but different antibacterial effects*, RSC Adv., 2016, **6**, 18490–18501.
- [67] A. Kudrinskiy, P. Zherebin, A. Gusev, O. Shapoval, J. Pyee, G. Lisichkin, Y. Krutyakov, *New Relevant Descriptor of Linear QNAR Models for Toxicity Assessment of Silver Nanoparticles*, Nanomaterials, 2020, **10**, 1459.
- [68] A.M. El Badawy, R.G. Silva, B. Morris, K.G. Scheckel, M.T. Suidan, T.M. Tolaymat, *Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles*, Environ. Sci. Technol., 2011, **45**, 283–287.
- [69] C. Beer, R. Foldbjerg, Y. Hayashi, D.S. Sutherland, H. Autrup, *Toxicity of silver nanoparticles—Nanoparticle or silver ion?*, Toxicol. Lett., 2012, **208**, 286–292.
- [70] A. Ivask, A. El Badawy, C. Kaweeteerawat, D. Boren, H. Fischer, Z. Ji, C. H. Chang, R. Liu, T. Tolaymat, D. Telesca, J.I. Zink, Y. Cohen, P.A. Holden, H.A. Godwin, *Toxicity Mechanisms in Escherichia coli Vary for Silver Nanoparticles and Differ from Ionic Silver*, ACS Nano, 2014, **8**, 374–386.
- [71] B. Le Ouay, F. Stellacci, *Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight*, Nano Today, 2015, **10**, 339–354.
- [72] S. Shrivastava, T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao, D. Dash, *Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles*, Nanotechnology, 2007, **18**, 225103.
- [73] N. Tripathi, M.K. Goshisht, *Recent Advances and Mechanistic Insights into Antibacterial Activity, Antibiofilm Activity, and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles*, ACS Appl. Bio Mater., 2022, **5**, 1391–1463.
- [74] T. Skowroński, R. Kalinowska, B. Pawlik-Skowrońska, *Glony środowisk zanieczyszczonych metalami ciężkimi*, Kosmos, 2002, **51**, 165–173.
- [75] L.S. Dorobantu, C. Fallone, A.J. Noble, J. Veinot, G. Ma, G.G. Goss, R.E. Burrell, *Toxicity of silver nanoparticles against bacteria, yeast, and algae*, J. Nanopart. Res., 2015, **17**, 172.
- [76] Y. Yue, X. Li, L. Sigg, M.J.-F. Suter, S. Pillai, R. Behra, K. Schirmer, *Interaction of silver nanoparticles with algae and fish cells: a side by side comparison*, J. Nanobiotechnol., 2017, **15**, 16.
- [77] X. Li, K. Schirmer, L. Bernard, L. Sigg, S. Pillai, R. Behra, *Silver nanoparticle toxicity and association with the alga Euglena gracilis*, Environ. Sci.: Nano, 2015, **2**, 594–602.
- [78] D. He, J.J. Dorantes-Aranda, T.D. Waite, *Silver Nanoparticle—Algae Interactions: Oxidative Dissolution, Reactive Oxygen Species Generation and Synergistic Toxic Effects*, Environ. Sci. Technol., 2012, **46**, 8731–8738.
- [79] A. Oukarroum, S. Bras, F. Perreault, R. Popovic, *Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, Chlorella vulgaris and Dunaliella tertiolecta*, Ecotoxicol. Environ. Saf., 2012, **78**, 80–85.
- [80] N. Romero, F.F. Visentini, V.E. Márquez, L.G. Santiago, G.R. Castro, A.M. Gagneten, *Physiological and morphological responses of green microalgae Chlorella vulgaris to silver nanoparticles*, Environ. Res., 2020, **189**, 109857.
- [81] J. Zhang, Q. Xiang, L. Shen, J. Ling, C. Zhou, J. Hu, L. Chen, *Surface charge-dependent bioaccumulation dynamics of silver nanoparticles in freshwater algae*, Chemosphere, 2020, **247**, 125936.
- [82] K. Zhou, Y. Hu, L. Zhang, K. Yang, D. Lin, *The role of exopolymeric substances in the bioaccumulation and toxicity of Ag nanoparticles to algae*, Sci. Rep., 2016, **6**, 32998.
- [83] M. Khoshnamvand, Z. Hao, O.O. Fadare, P. Hanachi, Y. Chen, J. Liu, *Toxicity of biosynthesized silver nanoparticles to aquatic organisms of different trophic levels*, Chemosphere, 2020, **258**, 127346.
- [84] M.S. Khan, F. Jabeen, N. Qureshi, M. Shakeel, A. Noureen, *Toxicity of silver nanoparticles in fish: a critical review*, J. Bio. & Env. Sci., 2015, **6(5)**, 211–227.

- [85] J. Hou, Y. Zhou, C. Wang, S. Li, X. Wang, *Toxic Effects and Molecular Mechanism of Different Types of Silver Nanoparticles to the Aquatic Crustacean Daphnia magna*, Environ. Sci. Technol., 2017, **51**, 12868–12878.
- [86] E.K. Sohn, S.A. Johari, T.G. Kim, J.K. Kim, E. Kim, J.H. Lee, Y.S. Chung, I.J. Yu, *Aquatic Toxicity Comparison of Silver Nanoparticles and Silver Nanowires*, Biomed Res. Int., 2015, 2015, e893049.
- [87] S. Wijnhoven, W. Peijnenburg, C. Herberts, W. Hagens, A. Oomen, E. Heugens, B. Roszek, J. Bisschops, I. Gosens, D. Van de meent, S. Dekkers, W.H. Jong, M. Zijverden, A. Nne, A. Sips, G. Re, *Nano-silver - A review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment*, Nanotoxicology, 2009, **3(2)**, 109-138..
- [88] *Silver in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality*, Geneva: World Health Organization; 2021 (WHO/HEP/ECH/WSH/2021.7). Licencja: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [89] Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2017 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz. U. z 2017 r. poz. 2294), art. 13.
- [90] R. Zelazowska and K. Pasternak, *Metale szlachetne: srebro [Ag], złoto [Au], platyna [Pt] w biologii i medycynie*, Bromatol. Chem. Toksykol., 2007, **40**, 205–209.
- [91] N. Hadrup, A.K. Sharma, K. Loeschner, *Toxicity of silver ions, metallic silver, and silver nanoparticle materials after in vivo dermal and mucosal surface exposure: A review*, Regul. Toxicol. Pharmacol., 2018, **98**, 257–267.
- [92] J. Xie, W. Dong, R. Liu, Y. Wang, Y. Li, *Research on the hepatotoxicity mechanism of citrate-modified silver nanoparticles based on metabolomics and proteomics*, Nanotoxicology, 2018, **12**, 18–31.
- [93] J. Vidmar, K. Loeschner, M. Correia, E.H. Larsen, P. Manser, A. Wichser, K. Boodhia, Z.S. Al-Ahmady, J. Ruiz, D. Astruc, T. Buerki-Thurnherr, *Translocation of silver nanoparticles in the ex vivo human placenta perfusion model characterized by single particle ICP-MS*, Nanoscale, 2018, **10**, 11980–11991.
- [94] L.Z. Flores-López, H. Espinoza-Gómez, R. Somanathan, *Silver nanoparticles: Electron transfer, reactive oxygen species, oxidative stress, beneficial and toxicological effects. Minireview*, J. Appl. Toxicol., 2019, **39**, 16–26.
- [95] E. Rezvani, A. Rafferty, C. McGuinness, J. Kennedy, *Adverse effects of nanosilver on human health and the environment*, Acta Biomater., 2019, **94**, 145–159.
- [96] I.G. Theodorou, M.P. Ryan, T.D. Tetley, A.E. Porter, *Inhalation of Silver Nanomaterials—Seeing the Risks*, Int. J. Mol. Sci., 2014, **15**, 23936–23974.
- [97] H. Langauer-Lewowicka, K. Pawlas, *Nanocząstki srebra – zastosowanie i zagrożenie dla zdrowia i środowiska*, Med. Środ., 2015, **18**, 7–11.
- [98] H.S. Jiang, Y. Zhang, Z.W. Lu, R. Lebrun, B. Gontero, W. Li, *Interaction between Silver Nanoparticles and Two Dehydrogenases: Role of Thiol Groups*, Small, 2019, **15**, 1900860.
- [99] Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2011/65/UE z dnia 8 czerwca 2011 r. w sprawie ograniczenia stosowania niektórych niebezpiecznych substancji w sprzęcie elektrycznym i elektronicznym (Dz. Urz. UE L 174 z 01.07.2011, str. 88, z późn. zm.).
- [100] The Silver Institute, *Silver's growing role in the automotive industry*, Metals Focus 2021.
- [101] The Silver Institute, *World Silver Survey 2016*, Thomson Reuters 2016.
- [102] Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2018/2001 z dnia 11 grudnia 2018 r. w sprawie promowania stosowania energii ze źródeł odnawialnych (Dz. Urz. UE L 328/82 z 21.12.2018).
- [103] S. Lo Piano, A. Saltelli, J.P. van der Sluijs, *Silver as a Constraint for a Large-Scale Development of Solar Photovoltaics? Scenario-Making to the Year 2050 Supported by Expert Engagement and Global Sensitivity Analysis*, Front. Energy Res., 2019, **7(56)**, 1-13.
- [104] The Silver Institute, *Silver's important role in solar power*, CRU Consulting 2020.
- [105] <https://www.silverinstitute.org/silver-catalysts/> (dostęp: 08.01.2023 r.).
- [106] K. Wasilewska, E. Szymańska, K. Winnicka, *Zastosowanie związków srebra w recepturze aptecznej*, 2019, **3**, 36-39.
- [107] P. Kowalczyk, M. Szymczak, M. Maciejewska, Ł. Laskowski, M. Laskowska, R. Ostaszewski, G. Skiba, I. Franiak-Pietryga, *All That Glitters Is Not Silver—A New Look at Microbiological and Medical Applications of Silver Nanoparticles*, Int. J. Mol. Sci., 2021, **22**, 854.
- [108] D. Lauritano, F. Cura, V. Candotto, R. Gaudio, M.D. F. Carinci, *Evaluation of the efficacy of titanium dioxide with monovalent silver ions covalently linked (TIAB) as an adjunct to scaling and root planning in the management of chronic periodontitis using PCR analysis: A microbiological study*, J. Biol. Regul. Homeost. Agents, 2015, **29**, 127–130.
- [109] B. Mączyńska, A. Junka, *Etiologia i patogenezę zakażeń pochwy u kobiet – srebro w cząsteczce TIAB jako alternatywna metoda leczenia infekcji. Okiem mikrobiologa*. Forum Zakażeń, 2016, **7(3)**, 167–174.

- [110] A.R. Shahverdi, A. Fakhimi, H.R. Shahverdi, S. Minaian, *Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aureus and Escherichia coli*, *Nanomed: Nanotechnol. Biol. Med.*, 2007, **3**, 168–171.
- [111] I.-S. Hwang, J.H. Hwang, H. Choi, K.-J. Kim, D. Lee, *Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved*, *J. Med. Microbiol.*, 2012, **61**, 1719–1726.
- [112] <https://www.fda.gov/medical-devices/dental-amalgam-fillings/information-patients-about-dental-amalgam-fillings> (dostęp: 28.02.2023 r.).
- [113] S. Temizel-Sekeryan, A.L. Hicks, *Global environmental impacts of silver nanoparticle production methods supported by life cycle assessment*, *Resour. Conserv. Recycl.*, 2020, **156**, 104676.
- [114] J. Talapko, T. Matijević, M. Juzbašić, A. Antolović-Požgain, I. Škrlec, *Antibacterial Activity of Silver and Its Application in Dentistry, Cardiology and Dermatology*, *Microorganisms*, 2020, **8**, 1400.
- [115] T.V. Duncan, *Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors*, *J. Colloid Interface Sci.*, 2011, **363**, 1–24.
- [116] Y. Kampmann, E. De Clerck, S. Kohn, D.K. Patchala, R. Langerock, J. Kreyenschmidt, *Study on the antimicrobial effect of silver-containing inner liners in refrigerators*, *J. Appl. Microbiol.*, 2008, **104**, 1808–1814.
- [117] S. Addo Ntim, T.A. Thomas, T.H. Begley, G.O. Noonan, *Characterization and potential migration of silver nanoparticles from commercially available polymeric food contact materials*, *Food Addit. Contam.: Part A*, 2015, **32**, 1003–1011.
- [118] R.R. Gadkari, S.W. Ali, R. Alagirusamy, A. Das, *Silver Nanoparticles in Water Purification: Opportunities and Challenges*, [W:] M. Oves, M. Zain Khan, I.M.I. Ismail (red.), *Modern Age Environmental Problems and their Remediation*, Springer International Publishing, Cham, 2018, str. 229–237.
- [119] H. Tavakoli, H. Rastegar, M. Taherian, M. Samadi, H. Rostami, *The effect of nano-silver packaging in increasing the shelf life of nuts: An in vitro model*, *Ital. J. Food Saf.*, 2017, **6**, 156–161.
- [120] R. Anand, M. Bhagat, *Silver nanoparticles (AgNPs): as nanopesticides and nanofertilizers*, *MOJ Biol. Med.* 2019, **4(1)**, 19–20.
- [121] M.J. Adegbeye, M.M.M.Y. Elghandour, A. Barbabosa-Pliego, J.C. Monroy, M. Mellado, P. Ravi Kanth Reddy, A.Z.M. Salem, *Nanoparticles in Equine Nutrition: Mechanism of Action and Application as Feed Additives*, *J. Equine Vet. Sci.*, 2019, **78**, 29–37.
- [122] A. Akbarzadeh, L. Kafshdooz, Z. Razban, A. Dastranj Tbrizi, S. Rasoulpour, R. Khalilov, T. Kavetsky, S. Saghfi, A.N. Nasibova, S. Kaamyabi, T. Kafshdooz, *An overview application of silver nanoparticles in inhibition of herpes simplex virus*, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 2018, **46**, 263–267.
- [123] C.A.A. Hernández, K. Juárez-Moreno, M.E. Castañeda-Juárez, H. Almanza-Reyes, A. Pestryakov, N. Bogdanchikova, *Silver Nanoparticles for the Rapid Healing of Diabetic Foot Ulcers*, *Int. J. Med. Nano Res.*, 2017, **4**, 1–6.
- [124] S.L. Prabu, A. Umamaheswari, S. Rajakumar, P. Bhuvaneshwari, S. Muthupetchi, *Development and Evaluation of Gel Incorporated with Synthesized Silver Nanoparticle from Ocimum gratissimum for the Treatment of Acne Vulgaris*, *Am. J. Adv. Drug Deliv.*, 2017, **5**, 107–117.
- [125] N. Anasane, P. Golińska, M. Wypij, D. Rathod, H. Dahm, M. Rai, *Acidophilic actinobacteria synthesised silver nanoparticles showed remarkable activity against fungi-causing superficial mycoses in humans*, *Mycoses*, 2016, **59**, 157–166.
- [126] D. Crisan, K. Scharffetter-Kochanek, M. Crisan, S. Schatz, A. Hainzl, L. Olenic, A. Filip, L.A. Schneider, A. Sindrilari, *Topical silver and gold nanoparticles complexed with Cornus mas suppress inflammation in human psoriasis plaques by inhibiting NF- κ B activity*, *Exp. Dermatol.*, 2018, **27**, 1166–1169.
- [127] D Kovács, N. Igaz, M.K. Gopisetty, M. Kiricsi, *Cancer Therapy by Silver Nanoparticles: Fiction or Reality?*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, **23(2)**, 839.
- [128] S. Montalvo-Quiros, G. Aragonese-Cazorla, L. Garcia-Alcalde, M. Vallet-Regí, B. González, J. L. Luque-García, *Cancer cell targeting and therapeutic delivery of silver nanoparticles by mesoporous silica nanocarriers: insights into the action mechanisms using quantitative proteomics*, *Nanoscale*, 2019, **11**, 4531–4545.
- [129] H.H. Lara, N.V. Ayala-Nuñez, L. Ixtepan-Turrent, C. Rodriguez-Padilla, *Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1*, *J. Nanotechnol.*, 2010, **8**, 1–10.
- [130] N.S. Al-Radadi, A.M. Abu-Dief, *Silver nanoparticles (AgNPs) as a metal nanotherapy: possible mechanisms of antiviral action against COVID-19*, *Inorg. Nano-Met. Chem.*, 2022, 1–19.
- [131] S.P. Deshmukh, S.M. Patil, S.B. Mullani, S.D. Delekar, *Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review*, *Mater. Sci. Eng. C*, 2019, **97**, 954–965.
- [132] A.S. Nikolov, N.E. Stankova, D.B. Karashanova, N.N. Nedyalkov, E.L. Pavlov, K. Tz. Koev, Hr. Najdenski, V. Kussovski, L.A. Avramov, C. Ristoscu, M. Badiceanu I.N. Mihailescu, *Synergistic effect in a two-phase laser procedure for production of silver nanoparticles colloids applicable in ophthalmology*, *Opt. Laser Technol.*, 2021, **138**, 106850.

- [133] D. Roe, B. Karandikar, N. Bonn-Savage, B. Gibbins, J.-B. Rouillet, *Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles*, J. Antimicrob. Chemother., 2008, **61**, 869–876.
- [134] A. de Mel, K. Chaloupka, Y. Malam, A. Darbyshire, B. Cousins, A.M. Seifalian, *A silver nanocomposite biomaterial for blood-contacting implants*, J. Biomed. Mater. Res.: Part A, 2012, **100A**, 2348–2357.
- [135] M.H. Kollef, B. Afessa, A. Anzueto, C. Veremakis, K.M. Kerr, B.D. Margolis, D.E. Craven, P.R. Roberts, A.C. Arroliga, R.D. Hubmayr, M.I. Restrepo, W.R. Auger, R. Schinner, NASCENT Investigation Group, *Silver-coated endotracheal tubes and incidence of ventilator-associated pneumonia: the NASCENT randomized trial*, J. Am. Med. Assoc., 2008, **300**, 805–813.
- [136] T. Baygar, N. Sarac, A. Ugur, I.R. Karaca, *Antimicrobial characteristics and biocompatibility of the surgical sutures coated with biosynthesized silver nanoparticles*, Bioorg. Chem., 2019, **86**, 254–258.
- [137] M. Ziabka, E. Menaszek, J. Tarasiuk, S. Wroński, *Biocompatible Nanocomposite Implant with Silver Nanoparticles for Otology—In Vivo Evaluation*, Nanomaterials, 2018, **8**, 764.
- [138] S.K. Nandi, A. Shivaram, S. Bose, A. Bandyopadhyay, *Silver nanoparticle deposited implants to treat osteomyelitis*, J. Biomed. Mater. Res.: Part B Appl. Biomater., 2018, **106**, 1073–1083.
- [139] P. Tan, H. Li, J. Wang, S.C.B. Gopinath, *Silver nanoparticle in biosensor and bioimaging: Clinical perspectives*, Biotechnol. Appl. Biochem., 2021, **68**, 1236–1242.
- [140] J. Junevičius, J. Žilinskas, K. Česaitis, G. Česaitienė, D. Gleiznys, Ž. Maželienė, *Antimicrobial activity of silver and gold in toothpastes: A comparative analysis*, Stomatologija, 2015, **17**, 9–12.
- [141] J. Annamalai, T. Nallamuthu, *Green synthesis of silver nanoparticles: characterization and determination of antibacterial potency*, Appl. Nanosci., 2016, **6**, 259–265.
- [142] Y. Tang, Z. Zhang, S. Yang, G. J. Smith, L. Liu, *Diatomite encapsulated AgNPs as novel hair dye cosmetics: Preparation, performance, and toxicity*, Colloids Surf. B: Biointerfaces, 2021, **200**, 111599.
- [143] G.V. Arroyo, A.T. Madrid, A.F. Gavilanes, B. Naranjo, A. Debut, M.T. Arias, Y. Angulo, *Green synthesis of silver nanoparticles for application in cosmetics*, J. Environ. Sci. Health: Part A, 2020, **55**, 1304–1320.
- [144] L.S. Ardakani, A. Surendar, L. Thangavelu, T. Mandal, *Silver nanoparticles (Ag NPs) as catalyst in chemical reactions*, Synth. Commun., 2021, **51**, 1516–1536.
- [145] X.-Y. Dong, Z.-W. Gao, K.-F. Yang, W.-Q. Zhang, L.-W. Xu, *Nanosilver as a new generation of silver catalysts in organic transformations for efficient synthesis of fine chemicals*, Catal. Sci. Technol., 2015, **5**, 2554–2574.
- [146] A. Jouyban, E. Rahimpour, *Optical sensors based on silver nanoparticles for determination of pharmaceuticals: An overview of advances in the last decade*, Talanta, 2020, **217**, 121071.
- [147] R. Singh, P. Thakur, A. Thakur, H. Kumar, P. Chawla, J. Rohit, R. Kaushik, N. Kumar, *Colorimetric sensing approaches of surfacemodified gold and silver nanoparticles for detection of residual pesticides: a review*, Int. J. Environ. Anal. Chem., 2021, **101(15)**, 3006–3022.
- [148] T.T. Tung, M. Castro, T.Y. Kim, K.S. Suh, J.-F. Feller, *High stability silver nanoparticles–graphene/poly(ionic liquid)-based chemoresistive sensors for volatile organic compounds’ detection*, Anal. Bioanal. Chem., 2014, **406**, 3995–4004.
- [149] A. Rossi, M. Zannotti, M. Cuccioloni, M. Minicucci, L. Petetta, M. Angeletti, R. Giovannetti, *Silver Nanoparticle-Based Sensor for the Selective Detection of Nickel Ions*, Nanomaterials, 2021, **11**, 1733.
- [150] R.R. Remya, A. Julius, T.Y. Suman, L. Aranganathan, T.S. Dhas, V. Mohanavel, A. Karthick, M. Muhibbullah, *Biofabrication of Silver Nanoparticles and Current Research of Its Environmental Applications*, J. Nanomater., 2022, **2022**, 1–11.
- [151] A. Kumar, P.K. Vemula, P.M. Ajayan, G. John, *Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil*, Nat. Mater., 2008, **7**, 236–241.
- [152] T.B. Asafa, R.A. Odediji, T.O. Salaudeen, A. Lateef, M.O. Durowoju, M.A. Azeez, T.A. Yekeen, I.C. Oladipo, H.M. Irshad, S.H. Abbas, *Physico-mechanical properties of emulsion paint embedded with silver nanoparticles*, Bull. Mater. Sci., 2021, **44**, 7.
- [153] J. Zhang, M. Ahmadi, G. Fargas, N. Perinka, J. Reguera, S. Lanceros-Méndez, L. Llanes, E. Jiménez-Piqué, *Silver Nanoparticles for Conductive Inks: From Synthesis and Ink Formulation to Their Use in Printing Technologies*, Metals, 2022, **12**, 234.
- [154] A.H. Alshehri, M. Jakubowska, A. Młodziak, M. Horaczek, D. Rudka, C. Free, J.D. Carey, *Enhanced Electrical Conductivity of Silver Nanoparticles for High Frequency Electronic Applications*, ACS Appl. Mater. Interfaces 2012, **4**, 7007–7010
- [155] D.H.A.K. Abouzaid, O.M. Mohsen, *The Effect of Changing Structural Factors and Treating with Silver Nanoparticles on the Functional and Microbiological Properties of Cotton Sportswear*, J. Appl. Art Sci., 2022, **9**, 1–13.
- [156] E. McGillicuddy, I. Murray, S. Kavanagh, L. Morrison, A. Fogarty, M. Cormican, P. Dockery, M. Prendergast, N. Rowan, D. Morris, *Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology*, Sci. Total Environ., 2017, **575**, 231–246.

- [157] D. Voelker, K. Schlich, L. Hohndorf, W. Koch, U. Kuehnen, C. Polleichtner, C. Kussatz, K. Hund-Rinke, *Approach on environmental risk assessment of nanosilver released from textiles*, Environ. Res., 2015, **140**, 661–672.
- [158] R. Kaegi, A. Voegelin, C. Ort, B. Sinnet, B. Thalmann, J. Krismer, H. Hagendorfer, M. Elumelu, E. Mueller, *Fate and transformation of silver nanoparticles in urban wastewater systems*, Water Res., 2013, **47**, 3866–3877.
- [159] R. Kaegi, B. Sinnet, S. Zuleeg, H. Hagendorfer, E. Mueller, R. Vonbank, M. Boller, M. Burkhardt, *Release of silver nanoparticles from outdoor facades*, Environ. Pollut., 2010, **158**, 2900–2905.
- [160] Z. Mat Lazim, S. Salmiati, M. Marpongahun, N.Z. Arman, M.R. Mohd Haniffah, S. Azman, E.L. Yong, M.R. Salim, *Distribution of Silver (Ag) and Silver Nanoparticles (AgNPs) in Aquatic Environment*, Water, 2023, **15**, 1349.
- [161] J. Fisher, S. Benner, P. Golden, R. Edwards, *Silver Toxicity: a brief overview*, (<https://leg.mt.gov/content/Committees/Interim/2019-2020/Water-Policy/Meetings/Jan-2020/Ag%20Toxicity%20literature%20review%20%2812-16-15%29.pdf>) (dostęp: 18.04.2023 r.), Uniwersytet Stanowy w Boise, 2015.
- [162] A. Peters, P. Simpson, G. Merrington, K. Rothenbacher, L. Sturdy, *Occurrence and Concentration of Dissolved Silver in Rivers in England and Wales*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 2011, **86**, 637–641.
- [163] H.T. Ratte, *Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: A review*, Environ. Toxicol. Chem., 1999, **18** (1), 89–108.
- [164] R. Aznar, F. Barahona, O. Geiss, J. Ponti, T.J. Luis, J. Barrero-Moreno, *Quantification and size characterization of silver nanoparticles in environmental aqueous samples and consumer products by single particle-ICPMS*, Talanta, 2017, **175**, 200–208.
- [165] Y. Chang, Y. Shih, C.-H. Su, H.-C. Ho, *Comparison of Three Analytical Methods to Measure the Size of Silver Nanoparticles in Real Environmental Water and Wastewater Samples*, J. Hazard. Mater., 2017, **322**, 95–104.
- [166] W.J. Langston, G.R. Burt, *Bioindicators of Ag availability in UK estuaries*, 2nd Argentum International Conference on the Transport, Fate, and Effects of Silver in the Environment, Madison, WI, USA, 1994, str. 125–130.
- [167] G.J. Ramelow, R.S. Maples, R.L. Thompson, C.S. Mueller, C. Webre, J.N. Beck, *Periphyton as Monitors for Heavy Metal Pollution in the Calcasieu River Estuary*, Environ. Pollut., 1987, **43**, 247–261.
- [168] M. Yamazaki, Y. Tanizaki, T. Shimokawa, *Silver and other trace elements in a freshwater fish, Carasius auratus langsdorfii, from the Asakawa River in Tokyo, Japan*, Environ. Pollut., 1996, **94**, 83–90.
- [169] W.J. Birge, J.R. Shaw, D.J. Price, J.A. Zuiderveen, *Persistence, bioaccumulation and toxicity of silver in freshwater systems*, 4th Argentum International Conference on the Transport, Fate, and Effects of Silver in the Environment, Madison, WI, USA, 1996, str. 113–120.
- [170] K.R. Campbell, *Silver accumulation in three species of fish (family: Centrarchidae) in stormwater treatment ponds*, Fla. Sci., 1994, **57**, 34–42.
- [171] K.K. Bertine, E.D. Goldberg, *Trace elements in clams, mussels, and shrimp*, Limnol. Oceanogr., 1972, **17**, 877–884.
- [172] R. Ramirez, V. Martí, R.M. Darbra, *Environmental Risk Assessment of Silver Nanoparticles in Aquatic Ecosystems Using Fuzzy Logic*, Water, 2022, **14**, 1885.
- [173] L. Li, M. Stoiber, A. Wimmer, Z. Xu, C. Lindenblatt, B. Helmreich, M. Schuster, *To What Extent Can Full-Scale Wastewater Treatment Plant Effluent Influence the Occurrence of Silver-Based Nanoparticles in Surface Waters?*, Environ. Sci. Technol., 2016, **50**, 6327–6333.
- [174] J. Sanchís, J. Jiménez-Lamana, E. Abad, J. Szpunar, M. Farré, *Occurrence of Cerium-, Titanium-, and Silver-Bearing Nanoparticles in the Besòs and Ebro Rivers*, Environ. Sci. Technol., 2020, **54**, 3969–3978.
- [175] R.J.B. Peters, G. van Bommel, N.B.L. Milani, G.C.T. den Hertog, A. K. Undas, M. van der Lee, H. Bouwmeester, *Detection of nanoparticles in Dutch surface waters*, Sci. Total Environ., 2018, **621**, 210–218.
- [176] A.A. Markus, P. Krystek, P.C. Tromp, J.R. Parsons, E.W.M. Roex, P. de Voogt, R.W.P.M. Laane, *Determination of metal-based nanoparticles in the river Dommel in the Netherlands via ultrafiltration, HR-ICP-MS and SEM*, Sci. Total Environ., 2018, **631–632**, 485–495.
- [177] A.C. Johnson, M.D. Jürgens, A.J. Lawlor, I. Cisowska, R.J. Williams, *Particulate and colloidal silver in sewage effluent and sludge discharged from British wastewater treatment plants*, Chemosphere, 2014, **112**, 49–55.
- [178] P.S. Bäuerlein, E. Emke, P. Tromp, J.A.M. H. Hofman, A. Carboni, F. Schooneman, P. de Voogt, A.P. van Wezel, *Is there evidence for man-made nanoparticles in the Dutch environment?*, Sci. Total Environ., 2017, **576**, 273–283.
- [179] C. Levard, E.M. Hotze, G.V. Lowry, G.E. Brown, *Environmental Transformations of Silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity*, Environ. Sci. Technol., 2012, **46**, 6900–6914.

- [180] V.K. Sharma, J. Filip, R. Zboril, R.S. Varma, *Natural inorganic nanoparticles – formation, fate, and toxicity in the environment*, Chem. Soc. Rev., 2015, **44**, 8410–8423.
- [181] W.-C. Hou, B. Stuart, R. Howes, R.G. Zepp, *Sunlight-Driven Reduction of Silver Ions by Natural Organic Matter: Formation and Transformation of Silver Nanoparticles*, Environ. Sci. Technol., 2013, **47**, 7713–7721.
- [182] V.K. Sharma, C.M. Sayes, B. Guo, S. Pillai, J.G. Parsons, C. Wang, B. Yan, X. Ma, *Interactions between silver nanoparticles and other metal nanoparticles under environmentally relevant conditions: A review*, Sci. Total Environ., 2019, **653**, 1042–1051.
- [183] A. Badireddy, J. Farner, S. Marinakos, S. Chellam, M. Wiesner, *Formation of Silver Nanoparticles in Visible Light-Illuminated Waters: Mechanism and Possible Impacts on the Persistence of AgNPs and Bacterial Lysis*, Environ. Eng. Sci., 2014, **31**, 338–349.
- [184] W. Zhou, Y.-L. Liu, A.M. Stallworth, C. Ye, J.J. Lenhart, *Effects of pH, Electrolyte, Humic Acid, and Light Exposure on the Long-Term Fate of Silver Nanoparticles*, Environ. Sci. Technol., 2016, **50**, 12214–12224.
- [185] W. Zhang, B. Xiao, T. Fang, *Chemical transformation of silver nanoparticles in aquatic environments: Mechanism, morphology and toxicity*, Chemosphere, 2018, **191**, 324–334.
- [186] G.V. Lowry, K.B. Gregory, S.C. Apte, J.R. Lead, *Transformations of Nanomaterials in the Environment*, Environ. Sci. Technol., 2012, **46**, 6893–6899.
- [187] N. Akaighe, S.W. Depner, S. Banerjee, V.K. Sharma, M. Sohn, *The effects of monovalent and divalent cations on the stability of silver nanoparticles formed from direct reduction of silver ions by Suwannee River humic acid/natural organic matter*, Sci. Total Environ., 2012, **441**, 277–289.
- [188] Y. Yin, X. Yang, X. Zhou, W. Wang, S. Yu, J. Liu, G. Jiang, *Water chemistry controlled aggregation and photo-transformation of silver nanoparticles in environmental waters*, J. Environ. Sci., 2015, **34**, 116–125.
- [189] B.M. Angel, G.E. Batley, C.V. Jarolimek, N.J. Rogers, *The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems*, Chemosphere, 2013, **93**, 359–365.
- [190] M. Delay, T. Dolt, A. Woellhaf, R. Sembritzki, F.H. Frimmel, *Interactions and stability of silver nanoparticles in the aqueous phase: Influence of natural organic matter (NOM) and ionic strength*, J. Chromatogr. A, 2011, **1218**, 4206–4212.
- [191] S.S. Khan, P. Srivatsan, N. Vaishnavi, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran, *Interaction of silver nanoparticles (SNPs) with bacterial extracellular proteins (ECPs) and its adsorption isotherms and kinetics*, J. Hazard. Mater., 2011, **192**, 299–306.
- [192] X. Zou, P. Li, J. Lou, X. Fu, H. Zhang, *Stability of single dispersed silver nanoparticles in natural and synthetic freshwaters: Effects of dissolved oxygen*, Environ. Pollut., 2017, **230**, 674–682.
- [193] W. Zhang, Y. Yao, K. Li, Y. Huang, Y. Chen, *Influence of dissolved oxygen on aggregation kinetics of citrate-coated silver nanoparticles*, Environ. Pollut., 2011, **159**, 3757–3762.
- [194] F. Piccapietra, L. Sigg, R. Behra, *Colloidal Stability of Carbonate-Coated Silver Nanoparticles in Synthetic and Natural Freshwater*, Environ. Sci. Technol., 2012, **46**, 818–825.
- [195] S. Elzey, V.H. Grassian, *Agglomeration, isolation and dissolution of commercially manufactured silver nanoparticles in aqueous environments*, J. Nanopart. Res., 2010, **12**, 1945–1958.
- [196] T.S. Peretyazhko, Q. Zhang, V.L. Colvin, *Size-Controlled Dissolution of Silver Nanoparticles at Neutral and Acidic pH Conditions: Kinetics and Size Changes*, Environ. Sci. Technol., 2014, **48**, 11954–11961.
- [197] L.R. Pokhrel, B. Dubey, P.R. Scheuerman, *Natural water chemistry (dissolved organic carbon, pH, and hardness) modulates colloidal stability, dissolution, and antimicrobial activity of citrate functionalized silver nanoparticles*, Environ. Sci.: Nano, 2014, **1**, 45–54.
- [198] J.M. Gorham, R.I. MacCuspie, K.L. Klein, D.H. Fairbrother, R.D. Holbrook, *UV-induced photochemical transformations of citrate-capped silver nanoparticle suspensions*, J. Nanopart. Res., 2012, **14**, 1139.
- [199] J.L. Elechiguerra, L. Larios-Lopez, C. Liu, D. Garcia-Gutierrez, A. Camacho-Bragado, M.J. Yacaman, *Corrosion at the nanoscale: the case of silver nanowires and nanoparticles*, Chem. Mater., 2005, **17(24)**, 6042–6052.
- [200] B. Kim, Ch.-S. Park, M. Murayama, M.F. Hochella Jr., *Discovery and characterization of silver sulfide nanoparticles in final sewage sludge products*, Environ. Sci. Technol., 2010, **44(19)**, 7509–7514.
- [201] C. Levard, B.C. Reinsch, F.M. Michel, C. Oumahi, G.V. Lowry, G.E. Brown, *Sulfidation Processes of PVP-Coated Silver Nanoparticles in Aqueous Solution: Impact on Dissolution Rate*, Environ. Sci. Technol., 2011, **45**, 5260–5266.
- [202] Y. Li, J. Zhao, E. Shang, X. Xia, J. Niu, J. Crittenden, *Effects of chloride ions on dissolution, ROS generation, and toxicity of silver nanoparticles under UV irradiation*, Environ. Sci. Technol., 2018, **52(8)**, 4842–4849.
- [203] W.Z. Teo, M. Pumera, *Fate of silver nanoparticles in natural waters; integrative use of conventional and electrochemical analytical techniques*, RSC Adv., 2014, **4**, 5006.
- [204] L. Li, Z. Xu, A. Wimmer, Q. Tian, X. Wang, *New insights into the stability of silver sulfide nanoparticles in surface water: dissolution through hypochlorite oxidation*, Environ. Sci. Technol., 2017, **51(14)**, 7920–7927.

- [205] A.D. Dwivedi, S.P. Dubey, M. Sillanpää, Y.-N. Kwon, Ch. Lee, R.S. Varma, *Fate of engineered nanoparticles: implications in the environment*, *Coord. Chem. Rev.*, 2015, **287**, 64-78.
- [206] C. Levard, E.M. Hotze, G.V. Lowry, G.E. Brown Jr., *Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity*, *Environ. Sci. Technol.*, 2012, **46**, 6900-6914.
- [207] X. Li, J.J. Lenhart, H.W. Walker, *Dissolution-accompanied aggregation kinetics of silver nanoparticles*, *Langmuir*, 2010, **26(22)**, 16690-16698.
- [208] Ch.-M. Ho, S.K.-W. Yau, Ch.-N. Lok, M.-H. So, Ch.-M. Che, *Oxidative dissolution of silver nanoparticles by biologically relevant oxidants: a kinetic and mechanistic study*, *Chem. Asian J.*, 2010, **5**, 285-293.
- [209] C. Levard, S. Mitra, T. Yang, A.D. Jew, A.R. Badireddy, G.V. Lowry, G.E. Brown Jr., *Effect of chloride on dissolution rate of silver nanoparticles and toxicity to E. coli*, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, **47(11)**, 5738-5745.
- [210] V. Srivastava, D. Gusain, Y.C. Sharma, *Critical review on the toxicity of some widely used engineered nanoparticles*, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2015, **54**, 6209-6233.
- [211] A. Russell, *The Rev. William Gregor (1761-1817), discoverer of titanium*, *Mineral. Mag. J. Mineral. Soc.*, 1955, **30**, 617-624.
- [212] M. E. Weeks, *The discovery of the elements. XI. Some elements isolated with the aid of potassium and sodium: Zirconium, titanium, cerium, and thorium*, *J. Chem. Educ.*, 1932, **9**, 1231.
- [213] W. Kroll, *The Production of Ductile Titanium*, *Trans. Electrochem. Soc.*, 1940, **78**, 35-47.
- [214] P.C. Turner, A.D. Hartman, J.S. Hansen, S.J. Gerdemann, *Low cost titanium--myth or reality*, TMS (The Minerals, Metals & Materials Society), Warrendale, 2001, 1-25.
- [215] S.J. Oosthuizen, *Titanium: the innovators' metal-Historical case studies tracing titanium process and product innovation*, *J. South. Afr. Inst. Min. Metall.*, 2011, **111**, 781-786.
- [216] O. Takeda, T. Ouchi, T.H. Okabe, *Recent Progress in Titanium Extraction and Recycling*, *Metall. Mater. Trans. B*, 2020, **51**, 1315-1328.
- [217] M. Panigrahi, R.K. Paramguru, R.C. Gupta, E. Shibata, T. Nakamura, *An Overview of Production of Titanium and an Attempt to Titanium Production with Ferro-Titanium*, *High Temp. Mater. Process.*, 2010, **29**, 495-514.
- [218] P. Nyamukamba, O. Okoh, H. Mungondori, R. Taziwa, S. Zinya, P. Nyamukamba, O. Okoh, H. Mungondori, R. Taziwa, S. Zinya, *Synthetic Methods for Titanium Dioxide Nanoparticles: A Review*, IntechOpen, 2018.
- [219] T. Matsunaga, R. Tomoda, T. Nakajima, H. Wake, *Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1985, **29**, 211-214.
- [220] D. Ziental, B. Czarzynska-Goslinska, D.T. Mlynarczyk, A. Glowacka-Sobotta, B. Stanisiz, T. Goslinski, L. Sobotta, *Titanium Dioxide Nanoparticles: Prospects and Applications in Medicine*, *Nanomaterials (Basel)*, 2020, **10**, 387.
- [221] C. Veiga, J. Davim, A. Loureiro, *Properties and applications of titanium alloys: A brief review*, *Rev. Adv. Mater. Sci.*, 2012, **32**, 133-148.
- [222] B. Jedynak, E. Mierzwińska-Nastalska, *Tytan – właściwości i zastosowanie w protetyce stomatologicznej*, *Dental Forum*, 2013, **1**, 1-4.
- [223] P. Pushp, S.M. Dasharath, C. Arati, *Classification and applications of titanium and its alloys*, *Mater. Today: Proc.*, 2022, **54**, 537-542.
- [224] <https://www.rsc.org/periodic-table/element/22/titanium> (dostęp: 12.04.2023 r.).
- [225] T. Ishikawa, P.-F. Paradis, *Thermophysical Properties of Molten Refractory Metals Measured by an Electrostatic Levitator*, *J. Electron. Mater.*, 2005, **34**, 1526-1532.
- [226] F.R. Gamble, *Ionicity, Atomic Radii, and Structure in the Layered Dichalcogenides of Group IVb, Vb, and VIb Transition Metals*, *J. Solid State Chem.*, 1974, **9**, 358-367.
- [227] N. Muslim, Y. W. Soon, C.M. Lim, Y. Voo, *Influence of sputtering power on properties of titanium thin films deposited by rf magnetron sputtering*, *ARNP J. Eng. Appl. Sci.*, 2015, **10**, 7184-7189.
- [228] M. Mierzwa, *Wszechstronne zastosowanie tytanu z uwzględnieniem aspektów medycznych*, *Manag. Syst. Prod.*, 2013, **4(12)**, 1-9.
- [229] M. Kowalkińska, A. Zielińska-Jurek, *Różne oblicza nanostruktur tlenku tytanu(IV)*, (<http://laborant.pl/index.php/rozne-oblicza-nanostruktur-tlenku-tytanu-iv>) (dostęp: 11.04.2023 r.).
- [230] K. Soga, M. Terano, *A convenient method for the preparation of a highly active MgCl₂-supported TiCl₃ catalyst for the polymerization of propylene*, *Makromol. Chem.*, 1981, **182**, 2439-2443.
- [231] M. Mierzwa, *Wszechstronne zastosowanie tytanu z uwzględnieniem aspektów medycznych*, *Manag. Syst. Prod.*, 2013, **4(12)**, 15-19.
- [232] J. Grzechowiak, I. Wereszczako-Zielińska, *Kataliza w ochronie środowiska - Zastosowanie TiO₂*, *Przem. Chem.*, 2000, **79**, 263-266.

- [233] T. Thirugnanasambandan, M. Alagar, *Titanium dioxide (TiO₂) Nanoparticles - XRD Analyses – An Insight*, (<http://arxiv.org/abs/1307.1091>) (dostęp: 11.04.2023 r.).
- [234] K. Kosmala, R. Szymańska, *Nanocząstki tlenku tytanu (IV). otrzymywanie, właściwości i zastosowanie*, Kosmos, 2016, **65**, 235–245.
- [235] B. Trouiller, R. Reliene, A. Westbrook, P. Solaimani, R.H. Schiestl, *Titanium Dioxide Nanoparticles Induce DNA Damage and Genetic Instability In vivo in Mice*, *Cancer Res.*, 2009, **69**, 8784–8789.
- [236] H.-W. Chen, S.-F. Su, C.-T. Chien, W.-H. Lin, S.-L. Yu, C.-C. Chou, J.J. W. Chen, P.-C. Yang, *Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice*, *FASEB J.*, 2006, **20(13)**, 2393–2395.
- [237] J. Wang, Y. Fan, *Lung Injury Induced by TiO₂ Nanoparticles Depends on Their Structural Features: Size, Shape, Crystal Phases, and Surface Coating*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, **15**, 22258–22278.
- [238] S.M. Hussain, K.L. Hess, J.M. Gearhart, K.T. Geiss, J.J. Schlager, *In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells*, *Toxicol. in Vitro*, 2005, **19**, 975–983.
- [239] B. Sha, W. Gao, S. Wang, F. Xu, T. Lu, *Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles differs in four liver cells from human and rat*, *Compos. B. Eng.*, 2011, **42**, 2136–2144.
- [240] C.M. Sayes, R. Wahi, P.A. Kurian, Y. Liu, J.L. West, K.D. Ausman, D.B. Warheit, V.L. Colvin, *Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells*, *Toxicol. Sci.*, 2006, **92**, 174–185.
- [241] Y. Liu, Z. Xu, X. Li, *Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in rat neuroglia cells*, *Brain Inj.*, 2013, **27**, 934–939.
- [242] G.D. Venkatasubbu, R. Baskar, T. Anusuya, C.A. Seshan, R. Chelliah, *Toxicity mechanism of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles against food pathogens*, *Colloids Surf. B*, 2016, **148**, 600–606.
- [243] R. Liu, X. Zhang, Y. Pu, L. Yin, Y. Li, X. Zhang, G. Liang, X. Li, J. Zhang, *Small-Sized Titanium Dioxide Nanoparticles Mediate Immune Toxicity in Rat Pulmonary Alveolar Macrophages In Vivo*, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2010, **10**, 5161–5169.
- [244] W.F. Vevers, A.N. Jha, *Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on fish cells in vitro*, *Ecotoxicology*, 2008, **17**, 410–420.
- [245] A. AL-Ammari, L. Zhang, J. Yang, F. Wei, C. Chen, D. Sun, *Toxicity assessment of synthesized titanium dioxide nanoparticles in fresh water algae *Chlorella pyrenoidosa* and a zebrafish liver cell line*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2021, **211**, 111948.
- [246] M. Asztemborska, M. Jakubiak, R. Stęborowski, E. Chajduk, G. Bystrzejewska-Piotrowska, *Water Air Soil Pollut.*, 2018, **229**, 208.
- [247] F. Seitz, R.R. Rosenfeldt, S. Schneider, R. Schulz, M. Bundschuh, *Size-, surface- and crystalline structure composition-related effects of titanium dioxide nanoparticles during their aquatic life cycle*, *Sci. Total Environ.*, 2014, **493**, 891–897.
- [248] S. Lyu, X. Wei, J. Chen, C. Wang, X. Wang, D. Pan, *Titanium as a Beneficial Element for Crop Production*, *Front. Plant Sci.*, 2017, **8**, 597.
- [249] K.M. Buettner, A.M. Valentine, *Bioinorganic Chemistry of Titanium*, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 1863–1881.
- [250] I. Pais, *The biological importance of titanium*, *J. Plant Nutr.*, 1983, **6**, 3–131.
- [251] M. Hrubý, P. Cígler, S. Kuzel, *Contribution to understanding the mechanism of titanium action in plant*, *J. Plant Nutr.*, 2002, **25**, 577–598.
- [252] A. Kocon, A. Grenda, *Wpływ tytanitu na fotosyntezę, plon oraz pobranie składników pokarmowych przez rośliny rzepaku*, *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 2004, **502**, 135–140.
- [253] J.J. Connor, H.T. Shacklette, R.J. Ebens, J.A. Erdman, A.T. Miesch, R.R. Tidball, H.A. Tourtelot, *Background geochemistry of some rocks, soils, plants, and vegetables in the conterminous United States, with sections on field studies*, 1975.
- [254] B.A. Markert, *Instrumental Element and Multi-Element Analysis of Plant Samples: Methods and Applications*, Wiley, New York, I wydanie, 1996, 1–312.
- [255] R.S. Ramakrishna, A.A. Paul, J.P.R. *Uptake of titanium and iron by Ipomoea biloba from titaniferrous sands*, *Fonseka, Environ. Exp. Bot.*, 1989, **29**, 293–300.
- [256] T. Berg, E. Steinnes, *Recent trends in atmospheric deposition of trace elements in Norway as evident from the 1995 moss survey*, *Sci. Total Environ.*, 1997, **208**, 197–206.
- [257] M.M. Guha, R.L. Mitchell, *The trace and major element composition of the leaves of some deciduous trees*, *Plant Soil*, 1966, **24**, 90–112.
- [258] S. Candás-Zapico, D.J. Kutscher, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, *Single particle analysis of TiO₂ in candy products using triple quadrupole ICP-MS*, *Talanta*, 2018, **180**, 309–315.
- [259] J. Shi, S. Han, J. Zhang, Y. Liu, Z. Chen, G. Jia, *Advances in genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in vivo and in vitro*, *NanoImpact*, 2022, **25**, 100377.
- [260] International Agency for Research on Cancer, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Carbon Black, Titanium dioxide and Talc.*, 2010, **93**, 1–466.

- [261] National Institute for Occupational Safety and Health, *Occupational Exposure to Titanium Dioxide*, 2011, **63**, 1-140.
- [262] A. Weir, P. Westerhoff, L. Fabricius, K. Hristovski, N. von Goetz, *Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products*, *Environ. Sci. Technol.*, 2012, **46**, 2242-2250.
- [263] S. Boutillier, S. Fourmentin, B. Laperche, *History of titanium dioxide regulation as a food additive: a review*, *Environ. Chem. Lett.*, 2022, **20**, 1017-1033.
- [264] D.R., Schoneker, *Why Would the EU Want to Ban Titanium Dioxide in Pharmaceutical Products? What Would Be the Potential Impact on Patients?*, *J. Excip. Food Chem.*, 2023, **13(4)**, 94-98.
- [265] M. Shakeel, F. Jabeen, S. Shabbir, M.S. Asghar, M.S. Khan, A.S. Chaudhry, *Toxicity of nano-titanium dioxide (TiO₂-NP) through various routes of exposure: a review*, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2016, **172**, 1-36.
- [266] J. Wang, Y. Liu, F. Jiao, F. Lao, W. Li, Y. Gu, Y. Li, C. Ge, G. Zhou, B. Li, Y. Zhao, Z. Chai, Ch. Chen, *Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles*, *Toxicology*, 2008, **254**, 82-90.
- [267] D.B. Warheit, T.R. Webb, Ch.M. Sayes, V.L. Colvin, K.L. Reed, *Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area*, *Toxicol. Sci.*, 2006, **91**, 227-236.
- [268] H. Shi, R. Megaye, V. Castranova, J. Zhao, *Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data*, *Part. Fibre Toxicol.*, 2013, **10**, 1-33.
- [269] P.M. Hext, J.A. Tomenson, P. Thompson, *Titanium dioxide: inhalation toxicology and epidemiology*, *Ann. Occup. Hyg.*, 2005, **49(6)**, 461-472.
- [270] P.A. Schulte, C.L. Geraci, V. Murashov, E.D. Kuempel, R.D. Zumwalde, V. Castranova, M.D. Hoover, L. Hodson, K.F. Martinez, *Occupation safety and health criteria for responsible development of nanotechnology*, *J. Nanopart. Res.*, 2014, **16**, 1-17.
- [271] A.R. Ribeiro, P.E. Leite, P. Falagan-Lotsch, F. Benetti, C. Micheletti, H.C. Budtz, N.R. Jacobsen, P.N. Lisboa-Filho, L.A. Rocha, D. Kühnel, D. Hristozov, J.M. Granjeiro, *Challenges on the toxicological predictions of engineered nanoparticles*, *NanoImpact*, 2017, **8**, 59-72.
- [272] Y. Morimoto, N. Kobayashi, N. Shinohara, T. Myojo, I. Tanaka, J. Nakanishi, *Hazard assessments of manufactured nanomaterials*, *J. Occup. Health*, 2010, **52**, 325-334.
- [273] A.M. Świdwińska-Gajewska, S. Czerczak, *Nanocząstki ditlenku tytanu - dopuszczalne poziomy narażenia zawodowego*, *Med. Pr.*, 2014, **65(3)**, 407-418.
- [274] Scientific Committee on Consumer Safety, *OPINION ON Titanium Dioxide (nano form) as UV-Filter in sprays (SCCS/1583/17)*.
- [275] B. Pelaz, G. Charron, Ch. Pfeiffer, Y. Zhao, J.M. de la Fuente, X.-J. Liang, W.J. Parak, P. del Pino, *Interfacing engineered nanoparticles with biological systems: anticipating adverse nano-bio interactions*, *Small*, 2013, **9**, 1573-1584.
- [276] X. He, W.G. Aker, P.P. Fu, H.-M. Hwang, *Toxicity of engineered metal oxide nanomaterials mediated by nano-bio-eco-interactions: a review and perspective*, *Environ. Sci.: Nano*, 2015, **2**, 564-582.
- [277] Ł. Dudek, T. Hryniewicz, K. Rokosz, *Zastosowanie tytanu i wybranych stopów tytanu w lotnictwie, Autobusy : technika, eksploatacja, systemy transportowe*, 2016, **8**, 62-66.
- [278] F.H. Froes, H. Friedrich, J. Kiese, D. Bergoint, *Titanium in the family automobile: The cost challenge*, *JOM*, 2004, **56**, 40-44.
- [279] A.M. Khorasani, M. Goldberg, E.H. Doeven, G. Littlefair, *Titanium in Biomedical Applications - Properties and Fabrication: A Review*, *J. Biomater. Tissue Eng.*, 2015, **5**, 593-619.
- [280] ChemAnalyst, *Global Titanium Dioxide Market Analysis: Plant Capacity, Production, Process, Operating Efficiency, Demand & Supply, End-User Industries, Foreign Trade, Sales Channel, Regional Demand, Company Share, 2015-2035*, ID: 5743534, 2023 r.
- [281] G. Auer, W.-D. Griebler, B. Jahn, *White Pigments*, [W:] G. Buxbaum, G. Pfaff (red.), *Industrial Inorganic Pigments*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, 2005, str. 51-97.
- [282] VARNER, K.E., K. Rindfusz, A. Gaglione, E. Viveiros. *Nano Titanium Dioxide Environmental Matters: State of the Science Literature Review*, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-10/089, 2010.
- [283] Y. Zheng, B. Nowack, *Size-Specific, Dynamic, Probabilistic Material Flow Analysis of Titanium Dioxide Releases into the Environment*, *Environ. Sci. Technol.*, 2021, **55**, 2392-2402.
- [284] J. Gruszka, J. Malejko, B. Godlewska-Żyłkiewicz, *Nanocząstki tlenku tytanu(IV) : zastosowanie w produktach użytkowych, badania właściwości i oznaczanie techniką spektrometrii mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną pracującą w trybie pojedynczej cząstki*, *Wiad. Chem.*, 2019, **73(5-6)**, 367-400.
- [285] R.J.B. Peters, G. van Bommel, Z. Herrera-Rivera, H.P.F.G. Helsper, H.J.P. Marvin, S. Weigel, P.C. Tromp, A.G. Oomen, A.G. Rietveld, H. Bouwmeester, *Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: analytical methods to define nanoparticles*, *J. Agric. Food Chem.*, 2014, **62**, 6285-6293.

- [286] H. Bodaghi, Y. Mostofi, A. Oromiehie, Z. Zamani, B. Ghanbarzadeh, C. Costa, A. Conte, M.A. Del Nobile, *Evaluation of the photocatalytic antimicrobial effects of a TiO₂ nanocomposite food packaging film by in vitro and in vivo tests*, LWT-Food. Sci. Technol., 2013, **50**, 702-706.
- [287] Z.F. Yin, L. Wu, H.G. Yang, Y.H. Su, *Recent progress in biomedical applications of titanium dioxide*, Phys. Chem. Chem. Phys., 2013, **15**, 4844-4858.
- [288] T.A. Egerton, I.R. Tooley, *UV absorption and scattering properties of inorganic-based sunscreens*, Int. J. Cosmet. Sci., 2012, **34**, 117-122.
- [289] B. Faure, G. Salazar-Alvarez, A. Ahniyaz, I. Villaluenga, G. Berrioizabal, Y.R. de Miguel, L. Bergström, *Dispersion and surface functionalization of oxide nanoparticles for transparent photocatalytic and UV-protecting coatings and sunscreens*, Sci. Technol. Adv. Matter, 2013, **14**, 1-23.
- [290] T.G. Smijs, S. Pavel, *Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness*, Nanotechnol. Sci. Appl., 2011, **4**, 95-112.
- [291] C. Rompelberg, M.B. Heringa, G. van Donkersgoed, J. Drijvers, A. Roos, S. Westenbrink, R. Peters, G. van Bommel, W. Brand, A.G. Oomen, *Oral intake of added titanium dioxide and its nanofraction from food products, food supplements and toothpaste by the Dutch population*, Nanotoxicology, 2016, **10**, 1404-1414.
- [292] F. Li, Q. Li, H. Kim, *Spray deposition of electrospun TiO₂ nanoparticles with self-cleaning and transparent properties onto glass*, Appl. Surf. Sci., 2013, **276**, 390-396.
- [293] Ch. Kapridaki, P. Maravelaki-Kalaitzaki, *TiO₂-SiO₂-PDMS nano-composite hydrophobic coating with self-cleaning properties for marble protection*, Prog. Org. Coat., 2013, **76**, 400-410.
- [294] G. Rassam, Y. Abdi, A. Abdi, *Deposition of TiO₂ nano-particles on wood surfaces for UV and moisture protection*, J. Exp. Nanosci., 2012, **7**, 468-476.
- [295] N. Shandilya, O. Le Bihan, Ch. Bressot, M. Morgener, *Emission of titanium dioxide nanoparticles from building materials to the environment by wear and weather*, Environ. Sci. Technol., 2015, **49**, 2163-2170.
- [296] A. Al-Kattan, A. Wischser, R. Vonbank, S. Brunner, A. Ulrich, S. Zuin, B. Nowack, *Release of TiO₂ from paints containing pigment-TiO₂ or nano-TiO₂ by weathering*, Environ. Sci.: Processes Impacts, 2013, **15**, 2186-2193.
- [297] V. Binas, D. Venieri, D. Kotzias, G. Kiriakidis, *Modified TiO₂ based photocatalysts for improved air and health quality*, J. Materiomics, 2017, **3**, 3-16.
- [298] M.M. Mahlambi, C.J. Ngila, B.B. Mamba, *Recent developments in environmental photocatalytic degradation of organic pollutants: the case of titanium dioxide nanoparticles - a review*, J. Nanomater, 2015, **2015**, 1-29.
- [299] A. Kaleta, A. Kołodziej, *Zastosowanie nanocząstek w budownictwie*, Rocz. Inż. Bud., 2012, **12**, 25-28.
- [300] S. El-Sherbiny, F. Morsy, M. Samir, O.A. Fouad, *Synthesis, characterization and application of TiO₂ nanopowders as special paper coating pigment*, Appl. Nanosci., 2014, **4**, 305-313.
- [301] I. Chauhan, P. Mohanty, *In situ decoration of TiO₂ nanoparticles on the surface of cellulose fibers and study of their photocatalytic and antibacterial activities*, Cellulose, 2015, **22**, 507-519.
- [302] A.K. Yetisen, H. Qu, A. Manbachi, H. Butt, M.R. Dokmeci, J.P. Hinstroza, M. Skorobogatiy, A. Khademhosseini, S.H. Yun, *Nanotechnology in textiles*, ACS Nano, 2016, **10**, 3042-3068.
- [303] A.K. Venkatesan, R.B. Reed, S. Lee, X. Bi, D. Hanigan, Y. Yang, J.F. Ranville, P. Herckes, P. Westerhoff, *Detection and sizing of Ti-containing particles in recreational waters using single particle ICP-MS*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 2018, **100**, 120-126.
- [304] N. Shandilya, O. Le Bihan, C. Bressot, M. Morgener, *Emission of Titanium Dioxide Nanoparticles from Building Materials to the Environment by Wear and Weather*, Environ. Sci. Technol., 2015, **49**, 2163-2170.
- [305] N. Shandilya, O. Le Bihan, C. Bressot, M. Morgener, *Evaluation of the Particle Aerosolization from n-TiO₂ Photocatalytic Nanocoatings under Abrasion*, J. Nanomater., 2014, **2014**, 1-12.
- [306] N. Bossa, P. Chaurand, C. Levard, D. Borschneck, H. Miche, J. Vicente, C. Geantet, O. Aguerre-Chariol, F.M. Michel, J. Rose, *Environmental exposure to TiO₂ nanomaterials incorporated in building material*, Environ. Pollut., 2017, **220**, 1160-1170.
- [307] R. Kaegi, A. Englert, A. Gondikas, B. Sinnet, F. von der Kammer, M. Burkhardt, *Release of TiO₂ - (Nano) particles from construction and demolition landfills*, NanoImpact, 2017, **8**, 73-79.
- [308] R. Kaegi, A. Ulrich, B. Sinnet, R. Vonbank, A. Wichser, S. Zuleeg, H. Simmler, S. Brunner, H. Vonmont, M. Burkhardt, M. Boller, *Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment*, Environ. Pollut., 2008, **156**, 233-239.
- [309] L. Windler, C. Lorenz, N. von Goetz, K. Hungerbühler, M. Amberg, M. Heuberger, B. Nowack, *Release of Titanium Dioxide from Textiles during Washing*, Environ. Sci. Technol., 2012, **46**, 8181-8188.
- [310] A.M. Saharia, Z. Zhu, N. Aich, M. Baalousha, J.F. Atkinson, *Modeling the transport of titanium dioxide nanomaterials from combined sewer overflows in an urban river*, Sci. Total Environ., 2019, **696**, 133904.

- [311] F. Loosli, J. Wang, S. Rothenberg, M. Bizimis, C. Winkler, O. Borovinskaya, L. Flamigni, M. Baalousha, *Sewage spills are a major source of titanium dioxide engineered (nano)-particle release into the environment*, *Environ. Sci.: Nano*, 2019, **6**, 763–777.
- [312] M.A. Kiser, P. Westerhoff, T. Benn, Y. Wang, J. Pérez-Rivera, K. Hristovski, *Titanium Nanomaterial Removal and Release from Wastewater Treatment Plants*, *Environ. Sci. Technol.*, 2009, **43**, 6757–6763.
- [313] D.L. Slomberg, M. Auffan, N. Guéniche, B. Angeletti, A. Campos, D. Borschneck, O. Aguerre-Chariol, J. Rose, *Anthropogenic Release and Distribution of Titanium Dioxide Particles in a River Downstream of a Nanomaterial Manufacturer Industrial Site*, *Front. Environ. Sci.*, 2020, **8**, 76.
- [314] P. Westerhoff, G. Song, K. Hristovski, M.A. Kiser, *Occurrence and removal of titanium at full scale wastewater treatment plants: implications for TiO₂ nanomaterials*, *J. Environ. Monit.*, 2011, **13**, 1195.
- [315] A.P. Gondikas, F. von der Kammer, R.B. Reed, S. Wagner, J.F. Ranville, T. Hofmann, *Release of TiO₂ Nanoparticles from Sunscreens into Surface Waters: A One-Year Survey at the Old Danube Recreational Lake*, *Environ. Sci. Technol.*, 2014, **48**, 5415–5422.
- [316] K.A. Dunphy Guzman, M.P. Finnegan, J.F. Banfield, *Influence of Surface Potential on Aggregation and Transport of Titania Nanoparticles*, *Environ. Sci. Technol.*, 2006, **40**, 7688–7693.
- [317] M.P. Finnegan, H. Zhang, J.F. Banfield, *Phase Stability and Transformation in Titania Nanoparticles in Aqueous Solutions Dominated by Surface Energy*, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 1962–1968.
- [318] R.A. French, A.R. Jacobson, B. Kim, S.L. Isley, R.L. Penn, P.C. Baveye, *Influence of Ionic Strength, pH, and Cation Valence on Aggregation Kinetics of Titanium Dioxide Nanoparticles*, *Environ. Sci. Technol.*, 2009, **43**, 1354–1359.
- [319] V.K. Sharma, *Aggregation and toxicity of titanium dioxide nanoparticles in aquatic environment—A Review*, *J. Environ. Sci. Health A*, 2009, **44**, 1485–1495.
- [320] A. Rodrigues, A. Brito, P. Janknecht, M.F. Proença, R. Nogueira, *Quantification of humic acids in surface water: effects of divalent cations, pH, and filtration*, *J. Environ. Monit.*, 2009, **11**, 377–382.
- [321] M. Zhu, H. Wang, A.A. Keller, T. Wang, F. Li, *The effect of humic acid on the aggregation of titanium dioxide nanoparticles under different pH and ionic strengths*, *Sci. Total Environ.*, 2014, **487**, 375–380.
- [322] M. Erhayem, M. Sohn, *Effect of humic acid source on humic acid adsorption onto titanium dioxide nanoparticles*, *Sci. Total Environ.*, 2014, **470–471**, 92–98.
- [323] R. Singh, K. Patel, I. Tripathi, *Interaction of Titanium Dioxide Nanoparticles with Plants in Agro-ecosystems*, [W:] P. Singh, R. Singh, P. Verma, R. Bhadouria, A. Kumar, M. Kaushik (red.), *Plant-Microbes-Engineered Nano-particles (PM-ENPs) Nexus in Agro-Ecosystems: Understanding the Interaction of Plant, Microbes and Engineered Nano-particles (ENPS)*, Springer International Publishing, Cham, 2021, str. 49–72.
- [324] M. Šebesta, I. Ramakanth, O. Zvěřina, M. Šeda, P. Diviš, M. Kolenčík, *Effects of Titanium Dioxide Nanomaterials on Plants Growth*, [W:] A.P. Ingle (red.), *Nanotechnology in Plant Growth Promotion and Protection*, Wiley, I wydanie, 2021, str. 17–44.
- [325] C. Larue, H. Khodja, N. Herlin-Boime, F. Brisset, A.M. Flank, B. Fayard, S. Chaillou, M. Carrière, *Investigation of titanium dioxide nanoparticles toxicity and uptake by plants*, *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2011, **304**, 012057.
- [326] A. Chahardoli, H. Sharifan, N. Karimi, S.N. Kakavand, *Uptake, translocation, phytotoxicity, and hormetic effects of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) in Nigella arvensis L.*, *Sci. Total Environ.*, 2022, **806**, 151222.
- [327] H. Dağhan, N. Gülmezoğlu, N. Köleli, B. Karakaya, *Impact of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NPs) on growth and mineral nutrient uptake of wheat (Triticum vulgare L.)*, *Biotech Studies*, 2020, **29**, 69–76.
- [328] Y. Deng, E.J. Petersen, K.E. Challis, S.A. Rabb, R.D. Holbrook, J.F. Ranville, B.C. Nelson, B. Xing, *Multiple Method Analysis of TiO₂ Nanoparticle Uptake in Rice (Oryza sativa L.) Plants*, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, **51**, 10615–10623.
- [329] V. Filipe, A. Hawe, W. Jiskoot, *Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates*, *Pharm. Res.*, 2010, **27(5)**, 796–810.
- [330] A. Barbacki, *Mikroskopia elektronowa*, Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej, Poznań 2003.
- [331] P. de Almeida, J. van Deelen, C. Catry, H. Sneyers, T. Pataki, R. Andriessen, C. van Roost, J.M. Kroon, *Microstructure characterization of titanium dioxide nanodispersions and thin films for dye-sensitized solar cell devices*, *Appl. Phys. A*, 2004, **79**, 1819–1828.
- [332] A. Rao, M. Schoenenberger, E. Gnecco, Th. Glatzel, E. Meyer, D. Brändlin, L. Scandella, *Characterization of nanoparticles using atomic force microscopy*, *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2007, **61**, 971–976.
- [333] T.A. Egerton, I.R. Tooley, *Physical characterization of titanium dioxide nanoparticles*, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 2014, **36**, 195–206.
- [334] A. Patri, T. Umbreit, J. Zheng, K. Nagashima, P. Goering, S. Francke-Carroll, E. Gordon, J. Weaver, T. Miller, N. Sadrieh, S. McNeil, M. Stratmeyer, *Energy dispersive X-ray analysis of titanium dioxide nanoparticle distribution after intravenous and subcutaneous injection in mice*, *J. Appl. Toxicol.*, 2009, **29**, 662–672.

- [335] M. Cieślak, D. Puchowicz, I. Kamińska, *SEM/EDS and Raman micro-spectroscopy examination of titanium-modified polipropylen fibres*, *Fibres Text. East. Eur.*, 2014, **22**, 47-53.
- [336] H. Zhang, J.F. Banfield, *Structural characteristics and mechanical and thermodynamic properties of nanocrystalline TiO₂*, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 9613-9644.
- [337] V. Parthasarathi, G. Thilagavathi, *Synthesis and characterization of titanium dioxide nanoparticles and their applications to textiles for microbe resistance*, *J. Textil. Appar. Technol. Manag.*, 2009, **6**, 1-8.
- [338] B. Erdem, R.A. Hunsicker, G.W. Simmons, E.D. Sudol, V.L. Dimonie, M.S. El-Aasser, *XPS and FTIR surface characterization of TiO₂ particles used in polymer encapsulation*, *Langmuir*, 2001, **17**(9), 2664-2669.
- [339] E.O. Oseghe, P.G. Ndungu, S.B. Jonnalagadda, *Synthesis, characterization, and application of TiO₂ nanoparticles - effect of pH adjusted solvent*, *J. Adv. Oxid. Technol.*, 2015, **18**, 253-263.
- [340] M. Hussain, R. Ceccarelli, D.L. Marchisio, D. Fino, N. Russo, F. Geobaldo, *Synthesis, characterization, and photocatalytic application of novel TiO₂ nanoparticles*, *Chem. Eng. J.*, 2010, **157**, 45-51.
- [341] S. Triebold, G.L. Luvizotto, R. Tolosana-Delgado, T. Zack, H. von Eynatten, *Discrimination of TiO₂ polymorphs in sedimentary and metamorphic rocks*, *Contrib. Mineral. Petrol.*, 2011, **161**, 581-596.
- [342] V.H. Castrejón-Sánchez, E. Camps, M. Camacho-López, *Quantification of phase content in TiO₂ thin films by Raman spectroscopy*, *Superficies y Vacío*, 2014, **27**, 88-92.
- [343] A. León, P. Reuquen, C. Garín, R. Segura, P. Vargas, P. Zapata, P.A. Orihuela, *FTIR and Raman characterization of TiO₂ nanoparticles coated with polyethylene glycol as carrier for 2-methoxyestradiol*, *Appl. Sci.*, 2017, **7**, 1-9.
- [344] X. Cao, Ch. Ma, Z. Gao, J. Zheng, L. He, D.J. McClements, H. Xiao, *Characterization of the interactions between titanium dioxide nanoparticles and polymethoxyflavones using surface-enhanced Raman spectroscopy*, *J. Agric. Food Chem.*, 2016, **64**, 9436-9441.
- [345] P. Krystek, J. Tentschert, Y. Nia, B. Trouiller, L. Noël, M.E. Goetz, A. Papin, A. Luch, T. Guérin, W.H. de Jong, *Method development and inter-laboratory comparison about the determination of titanium from titanium dioxide nanoparticles in tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 3853-3861.
- [346] E.J. Dos Santos, M.P. Dos Santos, A.B. Herrmann, R.E. Sturgeon, *Rapid determination of Ti in TiO₂ by ICP OES*, *Anal. Methods*, 2016, **8**, 6463-6467.
- [347] M. Golasik, M. Herman, B. Jasiewicz, M. Teşiorowski, W. Piekoszewski, *Development of a method for the determination of titanium in tissue by graphite furnace atomic absorption spectrometry for clinical analysis*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, **29**, 1844-1849.
- [348] B. Meermann, V. Nischwitz, *ICP-MS for the analysis at the nanoscale - a tutorial review*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2018, **33**, 1432-1468.
- [349] J.P.F.G. Helsper, R.J.B. Peters, M.E.M. van Bommel, Z.E.H. Rivera, S. Wagner, F. von der Kammer, P.C. Tromp, T. Hofmann, S. Weigel, *Physicochemical characterization of titanium dioxide pigments using various techniques for size determination and asymmetric flow field flow fractionation hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 6679-6691.
- [350] J. Vidmar, R. Milačič, J. Ščančar, *Sizing and simultaneous quantification of nanoscale titanium dioxide and a dissolved titanium form by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry*, *Microchem. J.*, 2017, **132**, 391-400.
- [351] B. Grzmil, M. Gleń, B. Kic, K. Lubkowski, *Preparation and characterization of single-modified TiO₂ for pigmentary applications*, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2011, **50**, 6535-6542.
- [352] Z. Luo, Z. Wang, B. Xu, I.L. Sarakiotis, G. Du Laing, Ch. Yan, *Measurement and characterization of engineered titanium dioxide nanoparticles in the environment*, *J. Zhejiang Univ.-Sci. A (Appl. Phys. & Eng.)*, 2014, **15**, 593-605.
- [353] Ch. Zhang, J. Lohwacharin, S. Takizawa, *Properties of residual titanium dioxide nanoparticles after extended periods of mixing and settling in synthetic and natural waters*, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 1-11.
- [354] A. López-Serrano, R.M. Olivas, J.S. Landaluze, C. Cámara, *Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact*, *Anal. Methods*, 2014, **6**, 38-56.
- [355] R.B. Reed, Ch.P. Higgins, P. Westerhoff, S. Tadjiki, J.F. Ranville, *Overcoming challenges in analysis of polydisperse metal-containing nanoparticles by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, **27**, 1093-1100.
- [356] B. Meermann, V. Nischwitz, *ICP-MS for the analysis at the nanoscale - a tutorial review*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2018, **33**, 1432-1468.
- [357] E. Ślęzak, J. Poluszyńska, P.P. Wiczorek, I. Sławińska, *Mineralizacja mikrofalowa jako efektywna metoda roztwarzania stałych próbek środowiskowych*, *Prace ICiMB*, 2016, **9**(26), 151-159.
- [358] P. Bermejo, J.L. Capelo, A. Mota, Y. Madrid, C. Camara, *Enzymatic digestion and ultrasonication: a powerful combination in analytical chemistry*, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2004, **23**(9), 654-663.

- [359] J. Kowalska, D. Krowarsch, I. Lorenc-Kubis, D. Nowak, A. Polanowski, A. Sokołowska, A. Szalewicz, A. Wilimowska-Pelc, Z. Wróblewski, J. Ciuraszkiewicz, *Enzymy*, [W:] A. Polanowski (red.), *Laboratorium z biochemii dla studentów biologii, biotechnologii i ochrony środowiska*, Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 2005, str. 1-69.
- [360] J.L. Capelo-Martinez, P. Ximenez-Embun, Y. Madrid, C. Camara, *Advanced oxidation processes for sample treatment in atomic spectrometry*, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2004, **23**(4), 331-340.
- [361] W. Ebeling, N. Hennrich, M. Klockow, H. Metz, H.D. Orth, H. Lang, *Proteinase K from *Tritirachium album* Limber*, *Eur. J. Biochem.*, 1974, **47**, 91-97.
- [362] J. Bajorath, W. Saenger, G. Pada Pal, *Autolysis and inhibition of proteinase K, a subtilisin-related serine proteinase isolated from the fungus *Tritirachium album* Limber*, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.*, 1988, **954**, 176-182.
- [363] M. van der Zande, R.J. Vandebriel, E. van Doren, E. Kramer, Z. Herrera Rivera, C.S. Serrano-Rojero, E.R. Gremmer, J. Mast, R.J. Peters, P.C. Hollman, P.J. Hendriksen, H.J. Marvin, A.A. Peijnenburg, H. Bouwmeester, *Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-days oral exposure*, *ACS Nano*, 2012, **6**, 7427-7442.
- [364] S. Makama, R. Peters, A. Undas, N.W. van den Brink, *A novel method for the quantification, characterisation and speciation of silver nanoparticles in earthworms exposed in soil*, *Environ. Chem.*, 2015, **12**, 643-651.
- [365] R.J. Peters, Z.H. Rivera, G. van Bommel, H.J. Marvin, S. Weigel, H. Bouwmeester, *Development and validation of single particle ICP-MS for sizing and quantitative determination of nano-silver in chicken meat*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 3875-3885.
- [366] S. Weigel, R. Peters, K. Loeschner, R. Grombe, T. P. J. Linsinger, *Results of an interlaboratory method performance study for the size determination and quantification of silver nanoparticles in chicken meat by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (sp-ICP-MS)*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, **409**, 4839-4848.
- [367] K. Loeschner, J. Navratilova, C. Kobler, K. Molhave, S. Wagner, F. von der Kammer, E.H. Larsen, *Detection and characterization of silver nanoparticles in chicken meat by asymmetric flow field flow fractionation with detection by conventional or single particle ICP-MS*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, **405**, 8185-8195.
- [368] F. Gallochio, G. Biancotto, V. Cibin, C. Losasso, S. Belluco, R. Peters, G. van Bommel, C. Cascio, S. Weigel, P. Tromp, F. Gobbo, S. Catania, A. Ricci, *Transfer study of silver nanoparticles in poultry production*, *J. Agric. Food Chem.*, 2017, **65**, 3767-3774.
- [369] J. Vidmar, T. Buerki-Thurnherr, K. Loeschner, *Comparison of the suitability of alkaline or enzymatic sample pre-treatment for characterization of silver nanoparticles in human tissue by single particle ICP-MS*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2018, **33**, 752-761.
- [370] K. Loeschner, M.S.J. Brabrand, J.J. Sloth, E.H. Larsen, *Use of alkaline or enzymatic sample pretreatment prior to characterization of gold nanoparticles in animal tissue by single-particle ICPMS*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 3845-3851.
- [371] J. Soto-Alvaredo, C. Lopez-Chaves, C. Sanchez-Gonzalez, M. Montes-Bayon, J. Llopis, J. Bettmer, *Speciation of gold nanoparticles and low-molecular gold species in Wistar rat tissues by HPLC coupled to ICP-MS*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, **32**, 193-199.
- [372] R. Tassinari, F. Cubadda, G. Moracci, F. Aureli, M. D'Amato, M. Valeri, B. De Berardis, A. Raggi, A. Mantovani, D. Passeri, M. Rossi, F. Maranghi, *Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen*, *Nanotoxicology*, 2014, **8**, 654-662.
- [373] F. Abdolapur Monikh, L. Chupani, E. Zuskova, R. Peters, M. Vancová, M.G. Vijver, P. Porcal, W.J.G.M. Peijnenburg, *Method for extraction and quantification of metal-based nanoparticles in biological media: number-based biodistribution and bioconcentration*, *Environ. Sci. Technol.*, 2019, **53**, 946-953.
- [374] J. Modrzynska, T. Berthing, G. Ravn-Haren, K. Kling, A. Mortensen, R.R. Rasmussen, E.H. Larsen, A.T. Saber, U. Vogel, K. Loeschner, *In vivo-induced size transformation of cerium oxide nanoparticles in both lung and liver does not affect long-term hepatic accumulation following pulmonary exposure*, *PLoS One*, 2018, **13**, 1-22.
- [375] B. Kollander, F. Widemo, E. Agren, E.H. Larsen, K. Loeschner, *Detection of lead nanoparticles in game meat by single particle ICP-MS following use of lead-containing bullets*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, **409**, 1877-1885.
- [376] M. Ochoa-Villarreal, E. Aispuro-Hernández, I. Vargas-Arispuro, M.Á. Martínez-Téllez, *Plant Cell Wall Polymers: Function, Structure and Biological Activity of Their Derivatives*, [W:] A. De Souza Gomes (red.), *Polymerization*, IntechOpen, Londyn 2012, str. 63-86.

- [377] B.L. Ridley, M.A. O'Neill, D. Mohnen, *Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-released signaling*, *Phytochemistry*, 2001, **57**, 929-967.
- [378] P. Wojtaszek, *Ściana komórkowa*, [W:] P. Wojtaszek, A. Woźny, L. Ratajczak (red.), *Biologia komórki roślinnej (tom 1)*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006, str. 227-269.
- [379] D. Solecka, *Ściana komórki roślinnej - struktura z przeszłością*, *Kosmos*, 2015, **64(3)**, 415-429.
- [380] D.S. Domozych, M. Ciancia, J.U. Fangel, M.D. Mikkelsen, P. Ulvskov, W.G.T. Willats, *The cell walls of green algae: a journey through evolution and diversity*, *Front. Plant Sci.*, 2012, **3**, 1-7.
- [381] P.-H. Baudalet, G. Ricochon, M. Linder, L. Muniglia, *A new insight into cell walls of Chlorophyta*, *Algal Res.*, 2017, **25**, 333-371.
- [382] J. Burczyk, *Ściana komórkowa glonów (sinic i zielenic) – jej budowa i funkcja*, [W:] J. Kawiak, W. Kilariski, J. Michejda, M. Olszewska (red.), *Postępy biologii komórki*, Polskie Towarzystwo Anatomiczne, Warszawa 1977, str. 43-63.
- [383] M. Wesołowska-Trojanowska, Z. Targoński, *Hemicelulazy – właściwości, otrzymywanie i zastosowanie*, *Nauki Inż. Technol.*, 2015, **2(17)**, 79-94.
- [384] K. Nowosad, M. Sujka, *Niekonwencjonalne metody ekstrakcji – ekstrakcja ekologiczna*, *Wiad. Chem.*, 2019, **73**, 565-579.
- [385] J. Jiménez-Lamana, J. Wojcieszek, M. Jakubiak, M. Asztemborska, J. Szpunar, *Single particle ICP-MS characterization of platinum nanoparticles uptake and bioaccumulation by *Lepidium sativum* and *Sinapis alba* plants*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2016, **31**, 2321-2329.
- [386] K. Kińska, J. Jiménez-Lamana, J. Kowalska, B. Krasnodebska-Ostręga, J. Szpunar, *Study of the uptake and bioaccumulation of palladium nanoparticles by *Sinapis alba* using single particle ICP-MS*, *Sci. Total Environ.*, 2018, **615**, 1078-1085.
- [387] Y. Dan, W. Zhang, R. Xue, X. Ma, Ch. Stephan, H. Shi, *Characterization of gold nanoparticle uptake by tomato plants using enzymatic extraction followed by single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry analysis*, *Environ. Sci. Technol.*, 2015, **49**, 3007-3014.
- [388] D. Bao, Z.G. Oh, Z. Chen, *Characterization of silver nanoparticles internalized by arabidopsis plants using single particle ICP-MS analysis*, *Front. Plant Sci.*, 2016, **7**, 32.
- [389] C.C. Li, F. Dang, M. Li, M. Zhu, H. Zhong, H. Hintelmann, D.M. Zhou, *Effects of exposure pathways on the accumulation and phytotoxicity of silver nanoparticles in soybean and rice*, *Nanotoxicology*, 2017, **11**, 699-709.
- [390] J. Nath, I. Dror, P. Landa, T. Vanek, I. Kaplan-Ashiri, B. Berkowitz, *Synthesis and characterization of isotopically labeled silver, copper and zinc oxide nanoparticles for tracing studies in plants*, *Environ. Pollut.*, 2018, **242**, 1827-1837.
- [391] J. Wojcieszek, J. Jiménez-Lamana, K. Bierla, M. Asztemborska, L. Ruzik, M. Jarosz, J. Szpunar, *Elucidation of the fate of zinc in model plants using single particle ICP-MS and ESI tandem MS*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2019, **34**, 683-693.
- [392] J. Wojcieszek, J. Jimenez-Lamana, K. Bierla, L. Ruzik, M. Asztemborska, M. Jarosz, J. Szpunar, *Uptake, translocation, size characterization and localization of cerium oxide nanoparticles in radish (*Raphanus sativus* L.)*, *Sci. Total Environ.*, 2019, **683**, 284-292.
- [393] J. Wojcieszek, J. Jiménez-Lamana, L. Ruzik, M. Asztemborska, M. Jarosz, J. Szpunar, *Characterization of TiO₂ NPs in Radish (*Raphanus sativus* L.) by Single-Particle ICP-QQQ-MS*, *Front. Environ. Sci.*, 2020, **8(100)**, 1-12.
- [394] Y. Dan, X. Ma, W. Zhang, K. Liu, C. Stephan, H. Shi, *Single particle ICP-MS method development for the determination of plant uptake and accumulation of CeO₂ nanoparticles*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5157-5167.
- [395] A.A. Keller, Y. Huang, J. Nelson, *Detection of nanoparticles in edible plant tissues exposed to nanocopper using single-particle ICP-MS*, *J. Nanoparticle Res.*, 2018, **20**, 101.
- [396] P. Wang, E. Lombi, S. Sun, K.G. Scheckel, A. Malysheva, B.A. McKenna, N.W. Menzies, F.-J. Zhao, P.M. Kopittke, *Characterizing the uptake, accumulation and toxicity of silver sulfide nanoparticles in plants*, *Environ. Sci.: Nano*, 2017, **4**, 448-460.
- [397] A. Laycock, N.J. Clark, R. Clough, R. Smith, R. D. Handy, *Determination of metallic nanoparticles in biological samples by single particle ICP-MS: a systematic review from sample collection to analysis*, *Environ. Sci. Nano*, 2022, **9**, 420-453.
- [398] J.A. Nóbrega, M.C. Santos, R.A. De Sousa, S. Cadore, R.M. Barnes, M. Tatro, *Sample preparation in alkaline media*, *Spectrochim. Acta B: At. Spectrosc.*, 2006, **61**, 465-495.
- [399] S. Park, H. K. Sung, Y. Kim, *Green Synthesis of Metal Nanoparticles Using Sprout Plants: Pros and Cons*, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2016, **16**, 4444-4449.

- [400] J. Malejko, B. Godlewska-Żyłkiewicz, T. Vanek, P. Landa, J. Nath, I. Dror, B. Berkowitz, *Uptake, translocation, weathering and speciation of gold nanoparticles in potato, radish, carrot and lettuce crops*, J. Hazard. Mater., 2021, **418**, 126219.
- [401] Q. Yang, W. Shan, L. Hu, Y. Zhao, Y. Hou, Y. Yin, Y. Liang, F. Wang, Y. Cai, J. Liu, G. Jiang, *Uptake and Transformation of Silver Nanoparticles and Ions by Rice Plants Revealed by Dual Stable Isotope Tracing*, Environ. Sci. Technol., 2019, **53**, 625–633.
- [402] J.J. López-Mayán, S. del-Ángel-Monroy, E. Peña-Vázquez, M.C. Barciela-Alonso, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, *Titanium dioxide nanoparticles assessment in seaweeds by single particle inductively coupled plasma – Mass spectrometry*, Talanta, 2022, **236**, 122856.
- [403] J. Jiménez-Lamana, F. Laborda, E. Bolea, I. Abad-Alvaro, J.R. Castillo, J. Bianga, M. He, K. Bierla, S. Mounicou, L. Ouerdane, S. Gaillet, J.-M. Rouanet, J. Szpunar, *An insight into silver nanoparticles bioavailability in rats*, Metallomics, 2014, **6**, 2242-2249.
- [404] E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, F. Laborda, I. Abad-Alvaro, C. Blade, L. Arola, J.R. Castillo, *Detection and characterization of silver nanoparticles and dissolved species of silver in culture medium and cells by AsFIFFF-UV-Vis-ICPMS: application to nanotoxicity tests*, Analyst, 2014, **139**, 914-922.
- [405] L. Campagnolo, M. Massimiani, L. Vecchione, D. Piccirilli, N. Toschi, A. Magrini, E. Bonanno, M. Scimeca, L. Castagnozzi, G. Buonanno, L. Stabile, F. Cubadda, F. Aureli, P. H. Fokkens, W. G. Kreyling, F. R. Cassee, A. Pietrousti, *Silver nanoparticles inhaled during pregnancy reach and affect the placenta and the foetus*, Nanotoxicology, 2017, **11**, 687–698.
- [406] E.P. Gray, J.G. Coleman, A.J. Bednar, A.J. Kennedy, J.F. Ranville, C.P. Higgins, *Extraction and analysis of silver and gold nanoparticles from biological tissues using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry*, Environ. Sci. Technol., 2013, **47**, 14315-14323.
- [407] S. Park, Y. Kim, *Feasibility study on the extraction of TiO₂ nanoparticle exposed in the activated sludge using alkaline digestion*, J. Ind. Eng. Chem., 2016, **41**, 62–67.
- [408] T. Nomizu, S. Kaneco, T. Tanaka, T. Yamamoto, H. Kawaguchi, *Determination of femto-gram amounts of zinc and lead in individual airborne particles by inductively coupled plasma mass spectrometry with direct air-sample introduction*, Anal. Sci., 1993, **9**, 843-846.
- [409] S. Kaneco, T. Nomizu, T. Tanaka, N. Mizutani, H. Kawaguchi, *Optimization of operating conditions in analysis by inductively coupled plasma individual airborne mass spectrometry particle*, Anal. Sci., 1995, **11**, 835-840.
- [410] T. Nomizu, N. Hoshino, S. Kaneco, H. Hayashi, T. Tanaka, H. Kawaguchi, K. Kitagawa, *Successive measurement of femto-gram elemental content in individual airborne particles by ICP-MS*, Anal. Sci., 2001, **17**, 61-64.
- [411] C. Degueldre, P.-Y. Favarger, *Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma mass spectroscopy: a feasibility study*, Colloids Surf. A, 2003, **217**, 137-142.
- [412] C. Degueldre, P.-Y. Favarger, C. Bitea, *Zirconia colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry*, Anal. Chim. Acta, 2004, **518**, 137-142.
- [413] C. Degueldre, P.-Y. Favarger, *Thorium colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry*, Talanta, 2004, **62**, 1051-1054.
- [414] C. Degueldre, P.-Y. Favarger, R. Rossé, S. Wold, *Uranium colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry*, Talanta, 2006, **68**, 623-628.
- [415] C. Degueldre, P.-Y. Favarger, S. Wold, *Gold colloid analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry in a single particle mode*, Anal. Chim. Acta, 2006, **555**, 263-268.
- [416] F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea, J.R. Castillo, *Critical considerations for the determination of nanoparticles number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS*, J. Anal. At. Spectrom., 2013, **28**, 1220-1232.
- [417] D.M. Mitrano, A. Barber, A. Bednar, P. Westerhoff, Ch.P. Higgins, J.F. Ranville, *Silver nanoparticle characterization using single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and asymmetrical flow field flow fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS)*, J. Anal. At. Spectrom., 2012, **27**, 1131-1142.
- [418] W.-W. Lee, W.-T. Chan, *Calibration of single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry (SP-ICP-MS)*, J. Anal. At. Spectrom., 2015, **30**, 1245-1254.
- [419] Ch. Stephan, K. Neubauer, *Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: Understanding how and why*. White paper PerkinElmer, Inc., Shelton, CT, 2014.
- [420] F. Laborda, E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, *Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles in environmental samples*, Trends Environ. Anal. Chem., 2016, **9**, 15–23.
- [421] M. Yamanaka, K. Yamanaka, T. Itagaki, S. Wilbur, E. McCurdy, *Automated, high sensitivity analysis of single nanoparticles using the Agilent 7900 ICP-MS with Single Nanoparticle Application Module*, Application note Agilent Technologies, Inc., 2015, Publication number: 5991-5891EN.

- [422] H.E. Pace, N.J. Rogers, Ch. Jarolimek, V.A. Coleman, Ch.P. Higgins, J.F. Ranville, *Determining Transport Efficiency for the Purpose of Counting and Sizing Nanoparticles via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 9361-9369.
- [423] A. Hineman, Ch. Stephan, *Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, **29**, 1252-1257.
- [424] J.W. Olesik, P.J. Gray, *Consideration for measurement of individual nanoparticles or microparticles by ICP-MS: determination of the number of particles and the analyte mass in each particle*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, **27**, 1143-1155.
- [425] S. Gschwind, H. Hagendorfer, D.A. Frick, D. Günther, *Mass Quantification of Nanoparticles by Single Droplet Calibration Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, *Anal. Chem.*, 2013, **85**(12), 5875-5883.
- [426] S. Gschwind, L. Flamigni, J. Koch, O. Borovinskaya, S. Groh, K. Niemax, D. Günther, *Capabilities of inductively coupled plasma mass spectrometry for the detection of nanoparticles carried by monodisperse microdroplets*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, **26**, 1166-1174.
- [427] B. Franze, I. Strenge, C. Engelhard, *Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: evaluation of three different pneumatic and piezo-based sample introduction systems for the characterization of silver nanoparticles*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, **27**, 1074-1083.
- [428] J. Tuoriniemi, G. Cornelis, M. Hassellöv, *Improving the accuracy of single particle ICPMS for measurement of size distributions and number concentrations of nanoparticles by determining analyte partitioning during nebulisation*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, **29**, 743-752.
- [429] G. Cornelis, M. Hassellöv, *A signal deconvolution method to discriminate smaller nanoparticles in single particle ICP-MS*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, **29**, 134-144.
- [430] X. Bi, S. Lee, J.F. Ranville, P. Sattigeri, A. Spanias, P. Herckes, P. Westerhoff, *Quantitative resolution of nanoparticle sizes using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry with the K-means clustering algorithm*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, **29**, 1630-1639.
- [431] M. Filella, J. Zhang, M.E. Newman, J. Buffle, *Analytical applications of photon correlation spectroscopy for size distribution measurements of natural colloidal suspensions: capabilities and limitations*, *Colloids Surf., A*, 1997, **120**, 27-46.
- [432] R. Peters, Z. Herrera-Rivera, A. Undas, M. van der Lee, H. Marvin, H. Bouwmeester, S. Weigel, *Single particle ICP-MS combined with a data evaluation tool as a routine technique for the analysis of nanoparticles in complex matrices*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2015, **30**, 1274-1285.
- [433] F. Laborda, A.C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea, J.R. Castillo, *About detectability and limits of detection in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry*, *Spectrochim. Acta B: At. Spectrosc.*, 2020, **169**, 105883.
- [434] T.E. Lockwood, R.G. de Vega, D. Clases, *An interactive Python-based data processing platform for single particle and single cell ICP-MS*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2021, **36**, 2536-2544.
- [435] D. Mozhayeva, C. Engelhard, *A critical review of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry – A step towards an ideal method for nanomaterial characterization*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2020, **35**, 1740-1783.
- [436] K. Ramos, L. Ramos, M.M. Gómez-Gómez, *Simultaneous characterization of silver nanoparticles and determination of dissolved silver in chicken meat subjected to in vitro human gastrointestinal digestion using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry*, *Food Chem.*, 2017, **221**, 822-828.
- [437] D.M. Mitrano, J.F. Ranville, A. Bednar, K. Kazor, A.S. Hering, C.P. Higgins, *Tracking dissolution of silver nanoparticles at environmentally relevant concentrations in laboratory, natural, and processed waters using single particle ICP-MS (spICP-MS)*, *Environ. Sci.: Nano*, 2014, **1**, 248-259.
- [438] H.E. Pace, N.J. Rogers, Ch. Jarolimek, V.A. Coleman, E.P. Gray, Ch.P. Higgins, J.F. Ranville, *Single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry: a performance evaluation and method comparison in the determination of nanoparticle size*, *Environ. Sci. Technol.*, 2012, **46**, 12272-12280.
- [439] L.D. Scanlan, R.B. Reed, A.V. Loguinov, P. Antczak, A. Tagmount, S. Aloni, D.T. Nowinski, P. Luong, Ch. Tran, N. Karunaratne, D. Pham, X.X. Lin, F. Falciani, Ch.P. Higgins, J.F. Ranville, Ch.D. Vulpe, B. Gilbert, *Silver nanowire exposure results in internalization and toxicity to Daphnia magna*, *ACS Nano*, 2013, **7**(12), 10681-10694.
- [440] L. Degenkolb, G. Metreveli, A. Philippe, A. Brandt, K. Leopold, L. Zehlike, H.-J. Vogel, G.E. Schaumann, T. Baumann, M. Kaupenjohann, F. Lang, S. Kumahor, S. Klitzke, *Retention and remobilization mechanisms of environmentally aged silver nanoparticles in an artificial riverbank filtration system*, *Sci. Total Environ.*, 2018, **645**, 192-204.
- [441] K. Ramos, M.M. Gómez-Gómez, C. Cámara, L. Ramos, *Silver speciation and characterization of nanopartilces released from plastic food containers by single particle ICPMS*, *Talanta*, 2016, **151**, 83-90.

- [442] A. Malysheva, A. Ivask, C. Hager, G. Brunetti, E.R. Marzouk, E. Lombi, N.H. Voelcker, *Sorption of silver nanoparticles to laboratory plastic during (eco)toxicological testing*, *Nanotoxicology*, 2016, **10**, 385–390.
- [443] A.K. Venkatesan, B.T. Rodriguez, A.R. Marcotte, X. Bi, J. Schoepf, J.F. Ranville, P. Herckes, P. Westerhoff, *Using single-particle ICP-MS for monitoring metal-containing particles in tap water*, *Environ. Sci.: Water Res. Technol.*, 2018, **4**, 1923–1932.
- [444] I.L. Hsiao, F.S. Bierkandt, P. Reichardt, A. Luch, Y.J. Huang, N. Jakubowski, J. Tentschert, A. Haase, *Quantification and visualization of cellular uptake of TiO₂ and Ag nanoparticles: comparison of different ICP-MS techniques*, *J. Nanobiotechnol.*, 2016, **14**, 50.
- [445] I. Abad-Alvaro, D. Leite, D. Bartczak, S. Cuello-Nunez, B. Gomez-Gomez, Y. Madrid, M. Aramendia, M. Resano, H. Goenaga-Infante, *An insight into the determination of size and number concentration of silver nanoparticles in blood using single particle ICP-MS (spICP-MS): feasibility of application to samples relevant to in vivo toxicology studies*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2021, **36**, 1180–1192.
- [446] D.M. Schwertfeger, J.R. Velicogna, A.H. Jesmer, R.P. Scroggins, J.I. Princz, *SP-ICP-MS Analysis of Metallic Nanoparticles in Environmental Samples with Large Dissolved Analyte Fractions*, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 9908–9914.
- [447] F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea, J.R. Castillo, *Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(I) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, **26**, 1362–1371.
- [448] M. Hadioui, C. Peyrot, K.J. Wilkinson, *Improvements to single particle ICPMS by the online coupling of ion exchange resins*, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 4668–4674.
- [449] C.A. Sötebier, S.M. Weidner, N. Jakubowski, U. Panne, J. Bettmer, *Separation and quantification of silver nanoparticles and silver ions using reversed phase high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry in combination with isotope dilution analysis*, *J. Chromatogr. A*, 2016, **1468**, 102–108.
- [450] M. Loula, A. Kaňa, O. Mestek, *Non-spectral interferences in single-particle ICP-MS analysis: An underestimated phenomenon*, *Talanta*, 2019, **202**, 565–571.
- [451] M. Witzler, F. Kullmer, A. Hirtz, K. Gunther, *Validation of gold and silver nanoparticle analysis in fruit juices by single-particle ICP-MS without sample pretreatment*, *J. Agric. Food Chem.*, 2016, **64**, 4165–4170.
- [452] L. Telgmann, C.D. Metcalfe, H. Hintelmann, *Rapid size characterization of silver nanoparticles by single particle ICP-MS and isotope dilution*, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 2014, **29**, 1265–1272.
- [453] D.M. Mitrano, E.K. Leshner, A. Bednar, J. Monserud, Ch.P. Higgins, J.F. Ranville, *Detecting nanoparticulate silver using single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry*, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2012, **31**, 115–121.
- [454] K. Loeschner, J. Navratilova, R. Grombe, T.P.J. Linsinger, C. Købler, K. Mølhav, E.H. Larsen, *In-house validation of a method for determination of silver nanoparticles in chicken meat based on asymmetric flow field-flow fractionation and inductively coupled plasma mass spectrometric detection*, *Food Chem.*, 2015, **181**, 78–84.
- [455] E. Verleysen, E. Van Doren, N. Waegeneers, P.-J. De Temmerman, M. Abi Daoud Francisco, J. Mast, *TEM and SP-ICP-MS analysis of the release of silver nanoparticles from decoration of pastry*, *J. Agric. Food Chem.*, 2015, **63**, 3570–3578.
- [456] R.B. Reed, D.P. Martin, A.J. Bednar, M.D. Montañó, P. Westerhoff, J.F. Ranville, *Multi-day diurnal measurements of Ti-containing nanoparticles and organic sunscreen chemical release during recreational use of a natural surface water*, *Environ. Sci.: Nano*, 2017, **4**, 69–77.
- [457] L. Balcaen, E. Bolea-Fernandez, M. Resano, F. Vanhaecke, *Accurate determination of ultra-trace levels of Ti in blood serum using ICP-MS/MS*, *Anal. Chim. Acta*, 2014, **809**, 1–8.
- [458] M. Tharaud, A.P. Gondikas, M.F. Benedetti, F. von der Kammer, T. Hofmann, G. Cornelis, *TiO₂ nanomaterials detection in calcium rich matrices by spICPMS. A matter of resolution and treatment*, *J. Anal. At. Spectrom.* 2017, **32**, 1400–1411.
- [459] S. Yongyang, W. Wei, L. Zhiming, D. Hu, Z. Guoqing, X. Jiang, R. Xiangjun, *Direct detection and isotope analysis of individual particles in suspension by single particle mode MC-ICP-MS for nuclear safety*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2015, **30**, 1184–1190.
- [460] Y. Dan, H. Shi, Ch. Stephan, X. Liang, *Rapid analysis of titanium dioxide nanoparticles in sunscreens using single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry*, *Microchem. J.*, 2015, **122**, 119–126.
- [461] M.V. Taboada-López, S. Iglesias-López, P. Herbello-Hermelo, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Pineiro, *Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis for isolating titanium dioxide nanoparticles from bivalve mollusk before sp-ICP-MS*, *Anal. Chim. Acta*, 2018, **1018**, 16–25.
- [462] B. Bocca, E. Sabbioni, I. Mičetić, A. Alimonti, F. Petrucci, *Size and metal composition characterization of nano- and microparticles in tattoo inks by a combination of analytical techniques*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, **32**, 616–62.

- [463] A. Mackevica, M.E. Olsson, S.F. Hansen, *Quantitative characterization of TiO₂ nanoparticle release from textiles by conventional and single particle ICP-MS*, J. Nanoparticle Res., 2017, 20.
- [464] S. Lee, X. Bi, R.B. Reed, J.F. Ranville, P. Herckes, P. Westerhoff, *Nanoparticle size detection limits by single particle ICP-MS for 40 elements*, Environ. Sci. Technol., 2014, **48**, 10291-10300.
- [465] Y. Yang, P. Westerhoff, *Presence in, and release of, nanomaterials from consumer products*, [W:] D.G. Capco, Y. Chen (red.), *Nanomaterial*, Springer, Nowy Jork 2014, str. 1-17.
- [466] A.R. Donovan, C.D. Adams, Y. Ma, C. Stephan, T. Eichholz, H. Shi, *Single particle ICP-MS characterization of titanium dioxide, silver and gold nanoparticles during drinking water treatment*, Chemosphere, 2016, **144**, 148-153.
- [467] F. Tou, Y. Yang, J. Feng, Z. Niu, H. Pan, Y. Qin, X. Guo, X. Meng, M. Liu and M. F. Hochella, *Environmental risk implications of metals in sludges from waste water treatment plants: the discovery of vast stores of metal-containing nanoparticles*, Environ. Sci. Technol., 2017, **51**, 4831-4840.
- [468] S.P. Bitragunta, S.G. Palani, A. Gopala, S.K. Sarkar, V.R. Kandukuri, *Detection of TiO₂ nanoparticles in municipal sewage treatment plant and their characterization using single particle ICP-MS*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 2017, **98**, 595-600.
- [469] D.M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.-G. Danielsson, H. Muntau, H.P. van Leeuwen, R. Lobinski, *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000)*, Pure Appl. Chem., 2000, **72**, 1453-1470.
- [470] D.M. Templeton, H. Fujishiro, *Terminology of elemental speciation - An IUPAC perspective*, Coord. Chem. Rev., 2017, **352**, 424-431.
- [471] L. Rello, A.C. Lapeña, M. Aramendía, M.A. Belarra, M. Resano, *A dried urine spot test to simultaneously monitor Mo and Ti levels using solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Spectrochim. Acta B: At. Spectrosc., 2013, **81**, 11-19.
- [472] A. Prison, H. Lorenzen, *Synchronized dividing algae*, Annu. Rev. Plant Physiol., 1966, **17**, 439-458.
- [473] J. Malejko, N. Szymańska, A. Bajguz, B. Godlewska-Żyłkiewicz, *Studies on the uptake and transformation of gold (III) and gold nanoparticles in a water - green algae environment using mass spectrometry techniques*, J. Anal. At. Spectrom., 2019, **34**, 1485-1496.
- [474] J. Liu, K.E. Murphy, M.R. Winchester, V.A. Hackley, *Overcoming challenges in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry measurement of silver nanoparticles*, Anal. Bioanal. Chem., 2017, **409**, 6027-6039.
- [475] I.L. Gunsolus, M.P.S. Mousavi, K. Hussein, P. Bühlmann, Ch.L. Haynes, *Effects of humic and fulvic acids on silver nanoparticles stability, dissolution, and toxicity*, Environ. Sci. Technol., 2015, **49**, 8078-8086.
- [476] I. Fernando, Y. Zhou, *Concentration dependent effect of humic acid on the transformations of silver nanoparticles*, J. Mol. Liq., 2019, **284**, 291-299.
- [477] B. Schmidt, K. Loeschner, N. Hadrup, A. Mortensen, J.J. Sloth, C.B. Koch, E.H. Larsen, *Quantitative characterization of gold nanoparticles by field-flow fractionation coupled online with light scattering detection and inductively coupled plasma mass spectrometry*, Anal. Chem., 2011, **83**, 2461-2468.
- [478] J. Kadukova, *Surface sorption and nanoparticle production as a silver detoxification mechanism of the freshwater alga Parachlorella kessleri*, Bioresour. Technol., 2016, **216**, 406-413.
- [479] F. Ribeiro, J.A. Gallego-Urrea, R.M. Goodhead, C.A.M. Van Gestel, J. Moger, A.M.V.M. Soares, S. Loureiro, *Uptake and elimination kinetics of silver nanoparticles and silver nitrate by Raphidocelis subcapitata: The influence of silver behaviour in solution*, Nanotoxicology, 2015, **9**, 686-695.
- [480] P. Khanna, A. Kaur, D. Goyal, *Algae-based metallic nanoparticles: Synthesis, characterization and applications*, J. Microbiol. Methods, 2019, **163**, 105656.
- [481] M. Witzler, F. Küllmer, K. Günther, *Validating a Single-Particle ICP-MS Method to Measure Nanoparticles in Human Whole Blood for Nanotoxicology*, Anal. Lett., 2018, **51**, 587-599.
- [482] J. Gruszka, J. Malejko, A. Bajguz, B. Godlewska-Żyłkiewicz, *Method development for speciation analysis of silver nanoparticles and silver ions in green algae and surface waters at environmentally relevant concentrations using single particle ICP-MS*, J. Anal. At. Spectrom., 2022, **37**, 1208-1222.
- [483] L.J. Hazeem, G. Kuku, E. Dewailly, C. Slomianny, A. Barras, A. Hamdi, R. Boukherroub, M. Culha, M. Bououdina, *Toxicity Effect of Silver Nanoparticles on Photosynthetic Pigment Content, Growth, ROS Production and Ultrastructural Changes of Microalgae Chlorella vulgaris*, Nanomaterials, 2019, **9**, 914.
- [484] F. Piccapietra, C.G. Allué, L. Sigg, R. Behra, *Intracellular silver accumulation in Chlamydomonas reinhardtii upon exposure to carbonate coated silver nanoparticles and silver nitrate*, Environ. Sci. Technol., 2012, **46**, 7390-7397.
- [485] A. Malysheva, N. Voelcker, P.E. Holm, E. Lombi, *Unraveling the Complex Behavior of AgNPs Driving NP-Cell Interactions and Toxicity to Algal Cells*, Environ. Sci. Technol., 2016, **50**, 12455-12463.

-
- [486] Q. Abbas, B. Yousaf, M.A. Mujtaba Munir, A.I. Cheema, I. Hussain, J. Rinklebe, *Biochar-mediated transformation of titanium dioxide nanoparticles concerning TiO₂NPs-biochar interactions, plant traits and tissue accumulation to cell translocation*, Environ. Pollut., 2021, **270**, 116077.
- [487] J. Vidmar, R. Milačič, V. Golja, S. Novak, J. Ščančar, *Optimization of the procedure for efficient dispersion of titanium dioxide nanoparticles in aqueous samples*, Anal. Methods, 2016, **8**, 1194–1201.
- [488] J. Noireaux, S. López-Sanz, J. Vidmar, M. Correia, L. Devoille, P. Fiscaro, K. Loeschner, *Titanium dioxide nanoparticles in food: comparison of detection by triple-quadrupole and high-resolution ICP-MS in single-particle mode*, J. Nanopart. Res., 2021, **23**, 102.
- [489] D. Mittal, G. Kaur, P. Singh, K. Yadav, S.A. Ali, *Nanoparticle-Based Sustainable Agriculture and Food Science: Recent Advances and Future Outlook*, Front. Nanotechnol., 2020, **2**, 579954.
- [490] J.D. Hubbard, A. Lui, M.P. Landry, *Multiscale and multidisciplinary approach to understanding nanoparticle transport in plants*, Curr. Opin. Chem. Eng., 2020, **30**, 135–143.