

STRESZCZENIE

Projektowane nanocząstki (ang. *engineered nanoparticles*, NPs), produkowane i stosowane w nanotechnologii, posiadają odmienne właściwości fizykochemiczne (tj., elektroniczne, magnetyczne, optyczne, chemiczne i mechaniczne) w porównaniu do analogicznych obiektów w skali mikro i makro, co pozwala na miniaturyzację wielu składników i urządzeń. Z tego powodu nanocząstki są produkowane i stosowane w coraz większych ilościach, znajdując zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu i w rolnictwie. Do nanocząstek produkowanych i wykorzystywanych w największych ilościach należą nanocząstki tlenku cynku (ZnO-nano), które stosuje się m.in. w filtrach przeciwsłonecznych, kosmetykach, farbách, opakowaniach żywności, panelach słonecznych czy też nawozach sztucznych. Rosnąca produkcja i wykorzystanie nanocząstek prowadzi do ich przedostawania się do środowiska, w tym do gleby, gdzie potencjalnie mogą być szkodliwe dla organizmów ją zamieszkujących.

Celem moich badań było porównanie toksykokinetyki oraz toksyczności cynku w formie nanocząstek (ZnO-nano) oraz jonowej (ZnCl_2) u dżdżownicy *Eisenia andrei*. To czy cynk pochodzący z różnych form tego metalu jest regulowany w odmienny sposób zbadalam z wykorzystaniem typowego eksperymentu toksykokinetycznego (Rozdział 2). W eksperymencie tym dżdżownice eksponowane były indywidualnie przez 21 dni na skażoną glebę Lufa 2.2 (faza kontaminacji), po czym zostały umieszczone w glebie nieskażonej (faza dekontaminacji) na kolejne 21 dni. Dżdżownice eksponowano na 250 i 500 mg Zn kg⁻¹ w formie ZnCl_2 oraz 500 i 1000 mg Zn kg⁻¹ w formie ZnO-nano. Wybrane stężenia odpowiadają stężeniom powodującym 25% i 50% spadek reprodukcji u tych zwierząt (odpowiednio EC₂₅ i EC₅₀). Regulację cynku w organizmie dżdżownic zbadalam poprzez pomiar stężeń wewnętrznych Zn w czasie eksperymentu, na podstawie których, z wykorzystaniem jednoprzedsiałowego modelu toksykokinetycznego, obliczyłam współczynniki tempa akumulacji oraz eliminacji. Porównanie współczynników wykazało, że (1) dżdżownice dobrze regulują Zn w swoim organizmie oraz (2) nie ma różnic w regulacji Zn pomiędzy badanymi formami tego metalu. Co ważne, po przeniesieniu dżdżownic do gleby nieskażonej (faza dekontaminacji) stężenie Zn wewnątrz organizmów dżdżownic wróciło we wszystkich zabiegach do tego sprzed ekspozycji.

Toksyczność ZnO-nano oraz jonów Zn została porównana przez określenie kosztów związanych z przeciwdziałaniem negatywnym skutkom powodowanym przez badane formy metalu (*Rozdział 3*). Koszty te określiłam poprzez pomiar dostępnych rezerw energetycznych (białek, węglowodanów, tłuszczów) oraz pomiar tempa respiracji na poziomie komórkowym i całego organizmu u dżdżownic eksponowanych w podobnym układzie eksperymentalnym jak w eksperymencie toksykokinetycznym. Niewielkie, ale statystycznie istotne zmiany, w stosunku do zwierząt w pozostałych zabiegach, zaobserwowałam w przypadku węglowodanów w fazie kontaminacji, w zabiegu z najwyższym stężeniem ZnO-nano oraz w przypadku komórkowej respiracji w fazie dekontaminacji w zabiegu z najwyższym stężeniem ZnCl₂. Jednak oprócz tych niewielkich zmian nie stwierdziłam znaczącego wpływu ekspozycji na pozostałe parametry. W badaniach tych wykazałam, że podwyższone stężenia Zn (ZnO-nano i ZnCl₂) nie mają wpływu na budżet energetyczny dorosłych dżdżownic.

W badaniach przedstawionych w *Rozdziale 4* porównałam cytotoksyczność Zn w postaci ZnO-nano i ZnCl₂ poprzez pomiar: 1) zmian w obrębie komórek nabłonka jelita oraz komórek chloragogenowych jelita, po 48-godzinnej ekspozycji na skażoną glebę oraz 2) stosunku ADP/ATP w całym ciele dżdżownic eksponowanych w takim samym układzie eksperymentalny jak w *Rozdziale 3*. Cytotoksyczny wpływ ZnO-nano lub Zn²⁺ w jelicie dżdżownic zbadałam z wykorzystaniem metod jakościowych i ilościowych. Badanie jakościowe wykazało u dżdżownic poddanych działaniu Zn zmiany w obrębie nabłonka i tkanki chloragogenowej jelita, bez różnic pomiędzy ZnO-nano i ZnCl₂. Z drugiej strony, różnice pomiędzy badanymi formami Zn zostały ujawnione w badaniu ilościowym, w postaci większego udziału resztek komórkowych (ang. *cellular debris*) w zabiegach z Zn jonowym niż w zabiegach z nanocząstkami ZnO, co przekłada się najpewniej na odmienną regulację badanych form Zn w komórkach przewodu pokarmowego. Nie zaobserwowałam natomiast żadnych różnic w stosunku ADP/ATP, ani między badanymi formami, ani między kontrolą i zabiegami z Zn.

W ostatnim rozdziale doktoratu (*Rozdział 5*) skupiłam się na ocenie toksyczności Zn (ZnO-nano vs. ZnCl₂), powodowanej przez długoterminową ekspozycję dżdżownic, tj. od stadium młodocianego do dorosłości. Młode (2-tygodniowe) osobniki narażone były przez 14 tygodni na szereg stężeń (125, 250, 500, 1000 mg Zn kg⁻¹) w postaci ZnO-nano lub ZnCl₂. W czasie trwania ekspozycji

sprawdzałam śmiertelność, tempo wzrostu i rozwój płciowy dżdżownic, a po zakończonej ekspozycji zmierzyłam respirację na poziomie komórkowym. Ekspozycja na najwyższe stężenia jonowe (500 i 1000 mg kg⁻¹) spowodowała 100% śmiertelność, podczas gdy w innych zabiegach śmiertelność nie przekroczyła 15% w ciągu całej ekspozycji. Ponadto zaobserwowałam wyższe tempo wzrostu dżdżownic eksponowanych na niskie i średnie stężenia ZnCl₂ (125 i 250 mg kg⁻¹) oraz na wszystkie stężenia ZnO-nano (125-1000 mg kg⁻¹) w porównaniu do kontroli, co najprawdopodobniej świadczyło o niedoborze Zn u osobników kontrolnych. Z kolei tempo respiracji mierzonej na poziomie komórkowym było istotnie wyższe u dżdżownic eksponowanych na ZnO-nano niż u tych eksponowanych na takie same niskie i średnie stężenia Zn (125 i 250 mg kg⁻¹) w postaci ZnCl₂. Wykazałam tym samym, że różnica między ZnO-nano i formą jonową może uwidaczniać się dopiero po długotrwałym narażeniu.

Podsumowując, kompleksowe badania przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej wykazały, że dorosłe dżdżownice skutecznie regulują stężenie Zn w swoich organizmach niezależnie od formy występowania cynku (ZnO-nano lub ZnCl₂). Ekspozycja na podwyższone stężenia obu form Zn nie powoduje u nich istotnych zmian w budżecie energetycznym i stosunku ADP/ATP mierzonych na poziomie całego organizmu. Krótkotrwała ekspozycja (48 h) ujawniła natomiast różnice w odpowiedziach komórkowych jelita dżdżownic narażonych na ZnO-nano lub ZnCl₂. Jednak najbardziej wyraźne różnice pomiędzy badanymi formami Zn ujawniły się po długotrwałej (14-tygodniowej) ekspozycji osobników młodocianych do stadium dorosłego. Reasumując, przedstawiona praca przyczyniła się do poszerzenia wiedzy na temat toksykokinetyki i toksyczności ZnO-nano u organizmów glebowych, wskazując trzy aspekty odgrywające ważną rolę w badaniach toksyczności nanocząstek, a tym samym w ocenie ryzyka ekologicznego (ang. *Ecological Risk Assessment*, ERA), jakie nanocząstki stanowią dla organizmów glebowych: 1) cytotoksyczność badana w określonych komórkach, 2) długotrwała ekspozycja oraz 3) badanie różnych stadiów rozwojowych organizmu.



(prof. dr hab. Ryszard Laskowski)

ABSTRACT

Engineered nanoparticles (NPs) have enhanced physio-chemical (electronic, magnetic, optical, chemical and mechanical) properties in comparison with properties of micro- and macro-objects, which allows for miniaturisation of many constituents and devices. Hence, NPs are increasingly produced, incorporated and used in many industrial sectors and agriculture. Among NPs produced and utilised in the largest quantities are zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) that are applied in, for example, sunscreens, cosmetics, paints, food packaging, solar panels and fertilisers. The increasing production and usage of NPs inevitably leads to their release into the environment. This generates uncertainties about the impact of NPs on different environmental compartments, including soil ecosystem, where NPs can be potentially hazardous to soil-dwelling organisms.

The aim of this thesis was to study and compare the toxicokinetics and toxicity of Zn in a form of ZnO-NPs or ZnCl₂ in the *Eisenia andrei* earthworm. To assess whether the earthworms regulate body concentration of Zn derived from either ZnO-NPs or ZnCl₂ in a different manner (*Chapter 2*), a typical toxicokinetics experiment was performed in which adult animals were exposed individually for 21 days to contaminated Lufa 2.2 soil (contamination phase), whereupon they were switched to uncontaminated soil (decontamination phase) for another 21 days. Earthworms were exposed to sublethal concentrations of ZnCl₂ (250 and 500 mg Zn kg⁻¹) and ZnO-NPs (500 and 1000 mg Zn kg⁻¹), estimated to cause respectively 25% and 50% (i.e. EC₂₅ and EC₅₀) reduction in the earthworms' reproduction. The regulation of body Zn concentration was assessed by measuring Zn concentrations in earthworms over the period of the experiment, based on which the assimilation and elimination kinetics parameters have been calculated using a one-compartment model. The comparison of assimilation and elimination rate constants revealed that in general Zn was efficiently regulated by earthworms and no differences in regulation patterns were identified between the studied forms. Importantly, after transferring the animals to the uncontaminated soil, body Zn concentrations returned to levels from before the exposure in all Zn treatments.

The toxicity of ZnO-NPs in comparison with Zn ions (ZnCl₂) was studied by determining the costs associated with exposure to the studied Zn forms (*Chapter 3*).

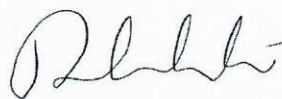
These costs were assessed by measuring total available energy reserves (proteins, carbohydrates, lipids) and energy consumption (determined as cellular and whole-body respiration rate) in earthworms exposed to ZnO-NPs or ZnCl₂ in a similar experimental setup as in the toxicokinetics study. Significantly lower carbohydrates content were observed in higher NPs treatment (1000 mg kg⁻¹) in the contamination phase, and significantly higher cellular respiration rate was observed in higher ionic treatment (500 mg kg⁻¹) in the decontamination phase in comparison to other treatments. Apart from those changes, no considerable effects were observed for other energy components, total available energy reserves or whole-body respiration, indicating that earthworms can cope with sublethal Zn concentrations without severe impact on their energy budget.

In the study presented in *Chapter 4* the cytotoxicity of Zn in a form of NPs or ions was compared by measuring: 1) the cellular changes and altered morphology of the epithelium tissue and chloragogen tissue in the earthworms' gastrointestinal (GI) tract after exposure for 48 h to contaminated soil; 2) the whole-body ADP/ATP ratio in earthworms exposed to the same experimental setup as in the second study, i.e. with contamination and decontamination phases. To determine the cytotoxic effect of Zn in the GI tract, qualitative and quantitative assays were performed. The former revealed that in all the Zn-treated earthworms' cellular changes were observed in both gut epithelium and chloragogen tissue, without any differences between the studied Zn forms. The quantitative study revealed differences between ZnO-NPs and ionic treatments with a higher proportion of cellular debris in the ionic treatments (250 and 500 mg kg⁻¹) than in the NPs treatments (500 and 1000 mg kg⁻¹), suggesting different regulation of those forms at the cellular level in the GI tract. No differences between the studied forms and between the control and Zn treatments were observed in the ADP/ATP ratio measured in the whole body.

In the study presented in *Chapter 5*, the long-term toxic effects of Zn (ZnO-NPs vs. ZnCl₂) were assessed in earthworms cultured from juvenile to adult stage. The two-week old juveniles were exposed for 14 weeks to the range of concentrations (125, 250, 500, 1000 mg kg⁻¹) in the form of ZnO-NPs or ZnCl₂. Mortality, growth rate, maturation during exposure and cellular respiration at the end of exposure were determined. This study revealed that exposure to the highest ionic treatments (500 and 1000 mg kg⁻¹) caused 100% mortality, while in the other treatments mortality did not exceeded 15% at the end of exposure. Moreover, growth rate was stimulated in

earthworms treated with ionic Zn at 125 and 250 mg kg⁻¹ and with ZnO-NPs at 125-1000 mg kg⁻¹ in comparison to the control, suggesting that the control earthworms might have been Zn deficient. Interestingly, different patterns of cellular respiration rate were observed in the earthworms treated with the two studied Zn forms (ZnO-NPs vs ZnCl₂) with significantly higher respiration in the NP treatments than in the ionic treatments at low and medium exposure concentrations (125 and 250 mg kg⁻¹), which implies that differences between ZnO-NPs and Zn ions might be more visible after long-term exposure than after short-term exposure.

To sum up, the comprehensive study presented in this doctoral thesis showed that adult earthworms can regulate Zn efficiently, without severe impact on their energy budget or cell metabolic status (ADP/ATP ratio), regardless of the Zn form to which they were exposed. Short-term exposure (48 h) unravelled differences between ZnO-NPs and ZnCl₂ in cell responses of the earthworms' GI tract. The most pronounced differences between ZnO-NPs and ZnCl₂ were observed after long-term (14 weeks) exposure of juveniles. Altogether, the presented thesis has contributed to broadening the knowledge about ZnO-NPs toxicokinetics and toxicity in soil-dwelling organisms and has shown that: (a) cytotoxicity in targeted cells, (b) prolonged exposure and (c) organisms' life stage may play a major role in the NP toxicity. Therefore, these factors should be of particular importance for the *Ecological Risk Assessment* (ERA) of nanoparticles in soil-dwelling invertebrates.



(prof. dr hab. Ryszard Laskowski)

