



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

ZAVEDENÍ KONTAKTNÍCH TESTŮ EKOTOXICITY PRO HODNOCENÍ TERRESTRICKÝCH EKOSYSTÉMŮ

THE INTRODUCTION OF CONTACT ECOTOXICITY TESTS FOR THE ASSESSMENT OF TERRESTRIAL
ECOSYSTEMS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Pavlína Škarková

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce: **FCH-DIZ0130/2015** Akademický rok: **2015/2016**
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): **Ing. Pavlína Škarková**
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (P2834)
Studijní obor: Chemie životního prostředí (2805V003)
Vedoucí práce **prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.**
Konzultanti:

Název dizertační práce:

Zavedení kontaktních testů ekotoxicity pro hodnocení terrestrických ekosystémů

Zadání dizertační práce:

Zavést chov organismu *P. scaber*.
Provést tři testy toxicity s organismem *P. scaber*.
Testování toxicity vybraných anorganických sloučenin.

Termín odevzdání dizertační práce: 30.8.2016

Dizertační práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu dizertační práce. Toto zadání je přílohou dizertační práce.

Ing. Pavlína Škarková
Student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 18.9.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tématem předložené dizertační práce bylo provedení testů toxicity s využitím testovacího organismu ze zástupců suchozemských stejnonožců *Porcellio scaber*. Tento testovací organismus byl zvolen jako nejvhodnější pro posouzení toxicity vybraných anorganických sloučenin kontaminujících terestrický ekosystém.

Jeho výběr byl proveden na základě důkladně zpracované metodiky tohoto testu, dále známých biologických a biochemických vlastností výše specifikovaného živého organismu, případně na jeho ekologické relevantnosti. Kromě klasických endpointů, jakými jsou mortalita, změna hmotnosti testovacích jedinců a také vliv přítomnosti a koncentrace kontaminantů na konzumaci stravy, byly rovněž sledovány změny v morfometrické charakteristice, a to na úrovni tkání a buněk, cytotoxicita a rovněž byla posuzována možná bioakumulace v různých částech těla tohoto organismu.

Vybrané testované látky lze zařadit do oblasti nanočástic a anorganických solí. U vybraných nanočástic zlata byla provedena kompletní ekotoxikologická studie na několika úrovních organizace živé hmoty (organismus, tkáň, buňka). Pro vybrané soli byla provedena studie, která byla zaměřená především na chování organismů a klasické endpointy.

KLÍČOVÁ SLOVA

P. scaber, pozemní stejnonožci, toxicita, bioakumulace, nanočástice zlata, salinizace

ABSTRACT

The main topic of this dissertation thesis was focus on using toxicity tests with testing organism - terrestrial isopod *Porcellio scaber*. This organism was picked up as the most suitable for the studying of toxicity assessment of selected inorganic compounds which could contaminate terrestrial ecosystem.

This organism was selected for several reasons - sophisticated test methodology; well known biology and biochemistry of these animals and their ecological relevance. Besides classical endpoints such as mortality, change in mass of test specimens and the effect of the presence and concentration of contaminants onto food consumption; we monitored changes in the morphometric characteristics at the level of tissues and cells, the cytotoxicity and possibly bioaccumulation in various parts of the body of the organism.

Selected test substance in this thesis were nanoparticles and inorganic salts. Wherein for chosen gold nanoparticles was carried out a complete study presents several levels of organization of living matter (organism, tissue, cell). For selected salts compound, this study was carried out on the behavior of organisms and classical endpoints.

KEYWORDS

P. scaber, isopods, toxicity, bioaccumulation, gold nanoparticles, salinization

ŠKARKOVÁ, P. *Zavedení kontaktních testů ekotoxicity pro hodnocení terrestrických ekosystémů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 103 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně ocitovala. Disertační práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem školitele disertační práce a děkanu FCH VUT.

Podpis studenta

Poděkování:

Za cenné rady a všestrannou pomoc bych na tomto místě ráda poděkovala především prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc. Za podporu během celého studia patří velký dík mým rodičům a největší poděkování patří mému snoubenci – děkuji za trpělivost, lásku a podporu!

OBSAH

1_ ÚVOD	8
2_ TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1_ Ekotoxikologie, ekotoxicita, biotesty	9
2.2_ Suchozemští stejnonožci (<i>P. scaber</i>)	10
2.2.1_ Taxonomie	10
2.2.2_ Biologie a ekologie	10
2.2.3_ Testování toxicity na suchozemském stejnonožci (<i>P. scaber</i>)	12
2.2.4_ Založení chovu, chov a odběr jedinců	12
2.2.5_ Test akutní toxicity	13
2.2.6_ Integrita buněčné membrány v trávicích žlázách	15
2.2.7_ Bioakumulace	16
2.2.8_ Tloušťka epitelu hepatopankreatických buněk v trávicích žlázách	16
2.2.9_ Test únikového chování v půdě	20
2.2.10_ Test únikového chování vůči potravě	21
2.3_ Nanočástice	22
2.3.1_ Nanotechnologie	22
2.3.2_ Nanomateriály	22
2.3.3_ Použití nanomateriálů	22
2.3.4_ Nanočástice	22
2.3.5_ Zlaté nanočástice	23
2.3.6_ Toxicita nanočástic - Nanotoxicita	24
2.3.7_ Testování toxicity nanočástic na terestrických stejnonožcích	26
2.3.8_ Toxicita zlatých nanočástic	27
2.4_ Soli	28
2.4.1_ Salinizace půd	28
2.4.2_ Ekotoxicita solí	30
3_ EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1_ Chemikálie a materiál	31
3.2_ Testy toxicity v laboratořích CHTOŽP	33
3.2.1_ Zavedení testování na <i>P. scaber</i>	33
3.2.2_ Zavedení testu toxicity 14 dní	34
3.2.3_ Zavedení únikového testu v půdě	35
3.2.4_ Zavedení únikového testu vůči potravě	35
3.3_ Testy toxicity v laboratořích Bionanoteamu	36
3.3.1_ Testy toxicity zlatých nanočástic	36
3.3.2_ Testy toxicity anorganických solí	39
4_ VÝSLEDKY A DISKUZE	41
4.1_ Testy toxicity v laboratořích CHTOŽP	41
4.1.1_ Zavedení testu toxicity	41
4.1.2_ Zavedení únikového testu v půdě	42
4.1.3_ Zavedení únikového testu vůči potravě	43
4.2_ Testy toxicity v laboratořích Bionanoteamu	44
4.2.1_ Testy toxicity zlatých nanočástic	44
4.2.2_ Diskuze výsledků testů toxicity zlatých nanočástic	51
4.2.3_ Testy toxicity anorganických solí	53
4.2.4_ Diskuze výsledků toxicity anorganických solí	59
5_ ZÁVĚR	61

6	REFERENCE	62
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	73
8	PŘÍLOHY	74
8.1	PUBLIKACE V IMPAKTOVANÉM ČASOPISE	74
8.2	PUBLIKACE V RECENZOVANÉM ČASOPISE	88
9	ŽIVOTOPIS	100

1 ÚVOD

Půda je jednou ze základních složek životního prostředí. Její nepostradatelná úloha spočívá v zajištění koloběhu celé řady látek nezbytných pro existenci života. Obvykle je definována jako čtyřfázový systém skládající se z pevné, kapalné, plynné a organické fáze [1].

Odehrává se v ní podstatná část cyklů látek, prvků a energie. Jedná se především o dekompoziční procesy, které vedou k uvolňování jednoduchých živin potřebných pro primární produkci. Při těchto procesech podléhá odumřelá organická hmota v půdě složitému rozkladu, na kterém se podílejí nejen mikroorganismy, ale také půdní bezobratlí tzv. zoedafon. Z ekologického hlediska je jednou z nejvýznamnějších funkcí půdy dekompozice, dále mineralizace živin, při které dochází k uvolňování CO_2 a H_2O a rovněž syntéza složek humusu neboli humifikace. Rovněž jsou zde lokalizovány hlavní části cyklu dusíku, fosforu, síry a živin [2].

Do ekosystému půdy, která je stěžejní částí terestrických ekosystémů, může vstupovat nezanedbatelné množství látek přírodě cizích, tzv. polutantů. Polutanty mohou následně negativně ovlivnit společenstva dekompozitorů a jejich funkce. Takto dochází k výrazným změnám v cyklech organických látek a je narušována stabilita celého ekosystému.

Rozsah a povahu efektů polutantů na půdní organismy lze identifikovat pomocí celé řady ekotoxikologických testů. V této práci bude pojednáno o testech toxicity na suchozemských stejnonožcích (*P. scaber*), které bezesporu patří mezi jedny z nedůležitějších půdních dekompozitorů a svou velikostí od 15 do 25 mm reprezentují skupinu půdní makrofauny [3].

Existuje mnoho zdrojů znečištění půd a typů polutantů. Mezi nejčastěji se vyskytující patří polyaromatické uhlovodíky, pesticidy, těžké kovy i ostatní rizikové prvky, detergenty, polychlorované bifenylly a fenoly. O těchto kontaminantech již byla sepsána celá řada publikací, ve kterých byla řešena jejich toxicita, transformace, transport a biodostupnost v terestrickém prostředí [4,5].

V poslední době, tj. zejména s rostoucím vývojem vědního oboru nanotechnologie a také vzhledem k exponenciálně se zvyšující produkci nanomateriálů, se právě tyto látky dostávají nevyhnutelně do popředí zájmu odborníků z mnoha zemí. Zvyšující se množství jejich praktických aplikací vede ke zvýšenému riziku jejich úniku do životního prostředí. Navzdory skutečnosti, že roční produkce nanomateriálů je odhadována na tisíce tun a má strmě narůstající trend, možnosti zjišťování jejich skutečného vlivu na životní prostředí jsou doposud velice omezené. Proto je celá řada současných vědeckých prací zaměřena na sledování osudu nanomateriálů v terestrickém prostředí a na jejich toxicitu pro půdní organismy všech trofických úrovní. Avšak predikce účinků nanomateriálů je obvykle velice složitá, výsledky testů toxicity nejsou jednoznačné, protože toxicita všech druhů nanočástic je ovlivněna širokou škálou faktorů vztahujících se jak k vlastnostem studovaných nanočástic, jakými jsou např. velikost částic, měrný povrch, složení solvatujících iontů, tak také k matici, ve které test probíhá (pH, iontová síla, mocenství iontů, přítomnost chelatujících látek, huminových a fulvinových kyselin). Vysoké množství proměnných předurčuje komplikovanost relevantního ekotoxikologického testu [6-8].

Z výše uvedeného vyplývá, že u vybraných nanočástic je zapotřebí testovat nejen jejich toxicitu pro zvolený organismus, ale také přesně definovat jejich chemické a fyzikální vlastnosti.

Další skupinou látek vyskytujících se ve velké míře v životním prostředí a majících negativní vliv na půdy jsou soli. Ty se dostávají do půd nadměrným používáním minerálních hnojiv, posypem komunikací v zimním období a rovněž nadměrným zavlažováním, což vede k salinizaci půd, tj. zasolení, které může mít negativní vliv na zemědělství nebo lesnictví. Nadměrné množství solí v půdě rovněž ovlivňuje organismy různých trofických úrovní jako jsou především rostliny, mikroorganismy, různé druhy suchozemských živočichů, např. žížaly, roupice a chvostoskoky [9-15].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Ekotoxikologie, ekotoxicita, biotesty

Ekotoxikologie

Ekotoxikologie byla poprvé definovaná kolem roku 1969 členem Francouzské akademie věd, Dr. René Truhautem, a to jako oblast toxikologie věnující se zejména studiu toxických účinků vyvolaných přírodními a syntetickými polutanty na složky ekosystémů, tj. zejména na živočichy, rostlinstvo a mikroorganismy.

Ekotoxikologie je multidisciplinární vědou integrující toxikologii, chemii životního prostředí a ekologii. Je zaměřena především na analýzu a s ní související porozumění vlivu chemických látek na všechny biologické úrovně živé přírody. To by se mělo projevit zejména při ochraně živé přírody, dále při analýze a pochopení přímých a nepřímých účinků chemických látek na všechny biologické úrovně ekosystému, při studiu a hodnocení (škodlivých) účinků chemických látek, prevenci poškození a ohrožení ekosystémů, předpovědi a odhadech škodlivosti chemických látek, předpovědi a odhadu jejich rizik a v neposlední řadě rovněž při vývoji praktických nástrojů pro odhady škodlivosti a rizik [16,17].

Ekotoxicita

Ekotoxicita je schopnost látek působit toxicky na zdravý rozvoj přírody, na rovnováhu přírodních ekosystémů, především ekosystémů vod, půd a sedimentů. Nejedná se však pouze o toxické účinky mající vliv na jednotlivé živočichy a rostliny, ale zejména na toxické účinky mající dopad na ekosystémy jako celek. Významným faktorem ekotoxických látek je jejich stabilita v prostředí. Čím je látka stabilnější, tím může v prostředí působit dlouhodoběji a může ve větší míře poškozovat přírodu [16,17].

Biotest

Biotest (bioassay) je definován jako „zkouška“ využívající biologický systém, který zahrnuje expozici organismu testovaným materiálem a stanovuje jeho odpověď.

Principem biotestu je kontakt testované látky, směšného nebo přírodního vzorku za určitých, předem definovaných a kontrolovatelných podmínek, s detekčním systémem (zkušebním organismem, tkání, populací, společenstvem apod.). Z výsledků těchto testů lze následně posoudit, zda testovaná látka je toxická, zda vzorek vody obsahuje využitelné živiny a zda je za těchto podmínek sledovaná substance rozložitelná apod.

Biotest nepodává informaci o tom, která látka a v jakém množství je v příslušném vzorku obsažena, to je vyhrazeno až pro chemickou analýzu, může však velmi jednoduše a rychle prokázat, zda je nebo není ve vzorku biologicky aktivní [18-20].

Terestrické testy

Terestrické neboli kontaktní testy pracují se širokou škálou testovacích organismů všech trofických úrovní. Převážně se testuje přímo námi zkoumaný pevný materiál; může se jednat jak o testování přírodní kontaminované matrice (vytěžené půdy, sedimenty, kaly, popílky), tak lze testovat také matrici námi záměrně kontaminovanou v laboratorních podmínkách (artificiální půdy, LUFA půdy, potrava, aj.), a to v různých koncentračních řadách. V těchto případech je poměrně snadné následně vypočítat toxikologické hodnoty, např. LC50.

Výhodou terestrických testů je jejich ekologická relevantnost a schopnost odhalit ekotoxicitu také u látek, které nejsou ve vodě rozpustné. Pokud např. sediment obsahuje nebezpečné a toxické látky, jejichž rozpustnost je omezená nebo žádná, jako např. PAHs (polyaromatické uhlovodíky), PCBs (polychlorované bifenyly) a mnoho dalších persistentních organických polutantů, můžeme pomocí těchto testů určit, zda látky přítomné v dané matrici budou organismům biodostupné a v důsledku toho mohou tyto organismy negativně ovlivnit [17,20].

2.2 Suchozemští stejnonožci (*P. scaber*)

2.2.1 Taxonomie

P. scaber (Latrielle, 1804) patří do říše živočišné (*Animalia*), kmenu členovci (*Arthropoda*), podkmenu korýši (*Crustacea*), třídy rakovci (*Malacostraca*), do řádu stejnonožci (*Isopoda*), do podřádu (*Oniscoidea*), čeledi *Porcellionidae* a rodu *Porcellio* [21].

2.2.2 Biologie a ekologie

Suchozemští stejnonožci jsou jedinou skupinou z kmene korýšů, která se dokázala plně adaptovat na suchozemský způsob života. Vyvinuli se z vodních forem stejnonožců, avšak postrádají lipidní vrstvu, která by bránila odpařování a ztrátě vody, což je předurčuje k životu ve vlhkém prostředí [22,23].

Jsou to základní představitelé půdní fauny mající významný vliv na tvorbu půdy a její kvalitu, neboť se podílejí na rozkladných a půdotvorných procesech. Zpracují ročně více než 10 % organických zbytků, které se dostanou do půdy, čímž zrychlují proces humifikace. Přímo přispívají k homogenizaci organických zbytků a digestivně degradují celulózu a fenolické látky. Tyto organismy vylučují amoniak, čímž podstatně zvyšují koncentraci amonných iontů v organických zbytcích v půdě, které jsou velmi důležitým zdrojem dusíku. Mechanicky se podílejí především na tvorbě struktury půdy hloubením sítí nor, čímž umožňují výměnu plynů v půdě a vodní drenáž. Velmi známý je poznatek, že přítomnost a aktivita stejnonožců v půdě může sloužit jako bioindikátor environmentálního stresu [24-29].

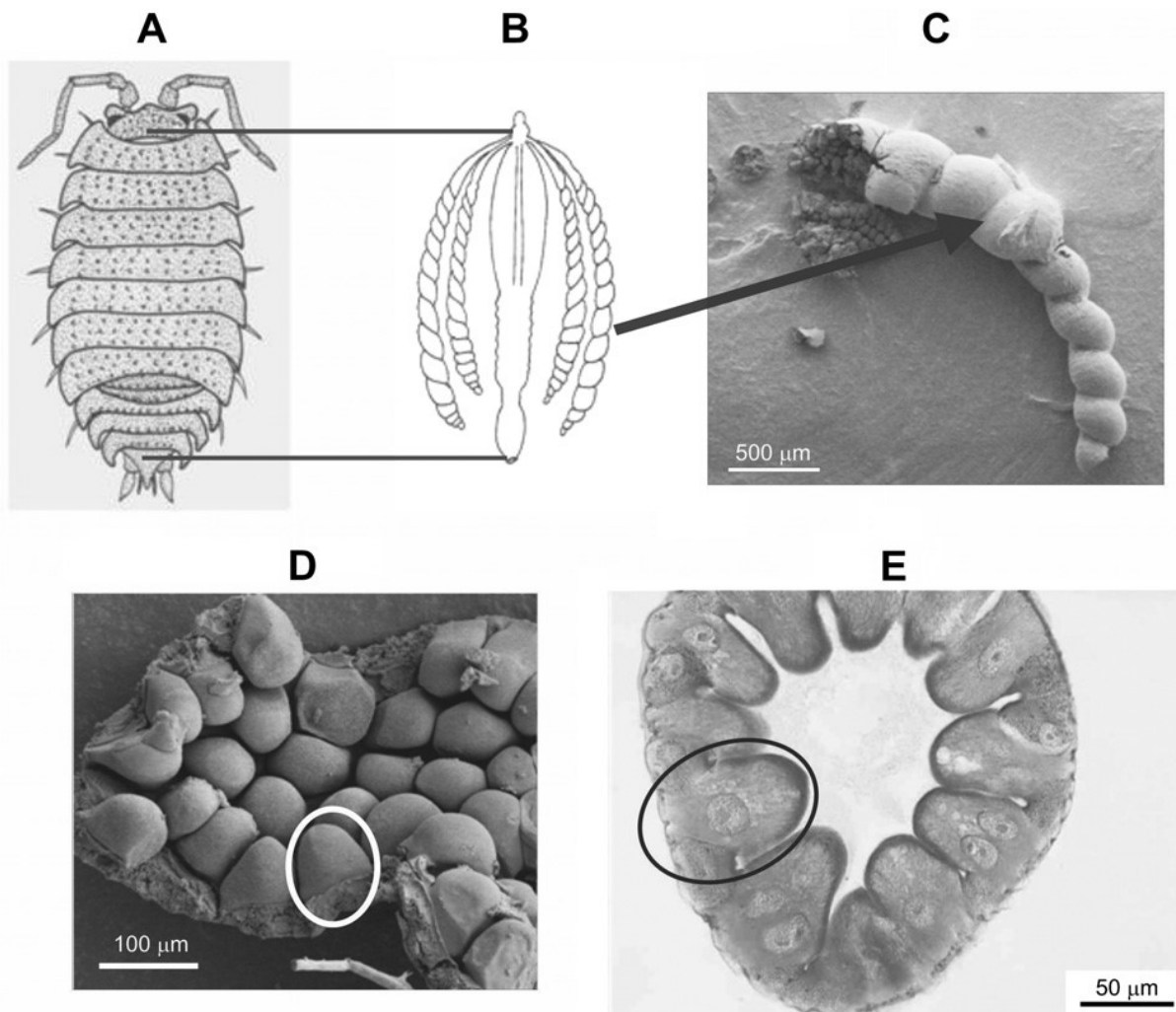
P. scaber má klenutý, oválný tvar těla s drsným dorsálním povrchem a jeho zbarvení se obecně liší podle pohlaví. Samci jsou tmavošedí až černí, samice bývají světlejší; jsou šedé, popř. hnědé nebo hnědé s šedými skvrnami. Délka těla dospělého jedince se pohybuje v rozmezí 15 až 25 mm. Jedná se o druh původně západoevropský, atlantický, v současné době je však jeho rozšíření téměř kosmopolitní. V ČR je hojně rozšířen po celém území, vyskytuje se zejména synantropně, tzn. v okolí lidských sídel, na skládkách, rumišťích, stavenišťích a ostatních narušených biotopech. *P. scaber* se vyznačuje především noční aktivitou, zejména po setmění a před rozbřeskem. Přes den se ukrývá pod různými předměty, nejčastěji kameny a dřevem. V noci vylézá z úkrytu a je možné je objevit i na místech, kde se přes den nikdy nevyskytují. Jejich potrava se skládá z různých organických zbytků, převážně rostlinného původu [24,30].

Trávicí soustavu u *P. scaber* tvoří žaludek a hepatopankreas, přičemž hepatopankreas je hlavním trávicím orgánem, který zastupuje funkce střev, jater a slinivky břišní. Dále je hlavním místem syntézy a sekrece trávicích enzymů, vstřebávání živin, skladování metabolické rezervy (lipidy a glykogen) a vylučování odpadů. Hepatopankreas se skládá ze čtyř trávicích žláz, které leží volně v tělní dutině (Obr. 1). Jejich epitel obsahuje dva typy buněk, velké B buňky, které vyčnívají do dutiny hepatopankreatu a menší S buňky ve tvaru klínu. Oba dva druhy buněk se vyskytují střídavě (Obr. 1). Toku tekutiny z a do hepatopankreatu je dosaženo kontrakcí tenké sítě svaloviny kolem trávicích žláz. Funkci sekreční a absorpční mají B buňky, které obvykle obsahují hodně tukových kapének, glykogenu a iontů kovů uchovávaných v tzv. granulích, zatímco S buňky akumulují kovové ionty, vápník a soli kyseliny močové. Bylo zjištěno, že B buňky obsahují všeobecně více tukových kapének, a to v porovnání s S buňkami, endoplasmatickým retikulem a volnými ribozomy a také mají hustší cytoplazmu. Tyto buňky, jejich morfologie a změny funkce jsou rovněž sledovanými endpointy v případě ekotoxikologických testů [31-36].

V testech toxicity, které střídaly fáze dostatku a deficitu stravy, byla prokázána reverzibilní plasticita B lymfocytů. Dále byly popsány morfologické změny B buněk během 24 hodin trvajícího trávicího cyklu. Tyto změny se pozorují na základě odlišností na histologické úrovni; velikost B buněk se změní od tvaru vypouklé kopule až po zcela rovnou plochu a dále

pak na ultrastrukturální úrovni, kde lze pozorovat akumulaci a následné vytlačování lipidových kapek. B buňky prochází těmito ultrastrukturální změnami během nedostatku potravy nebo konzumací potravy kontaminované kovy. Tato změna je pozorovatelná rovněž v období svlékání vnější kostry (exoskeletu) testovacích organismů. Naproti tomu u S buněk nebyla v žádných uskutečněných experimentech pozorována změna vzhledu, tvaru nebo funkcí [32,37-44].

Lipidy jsou důležitou zásobní látkou u všech bezobratlých. U *P. scaber* jsou uloženy v epitelu trávicího systému v první řadě v resorpčních buňkách. Jedna z jejich dalších funkcí je podpora vzniku nové vnější kostry při svlékání. Tukové kapénky v hepatopankreatu jsou redukovány během hladovění a poté opětovně obnoveny při dostatku potravy. Tyto kapénky jsou odpovědné za snížení reakce různých nutričních stresorů, např. potravy kontaminované těžkými kovy nebo pesticidy [35,36,39,40,45-51].



Obr. 1: Obrázek suchozemského stejnonožce:
 (A a B) anatomie trávicího systému
 (C) snímek z elektronové skenovací mikroskopie izolované trávicí žlázy
 (D) pohled na vnitřek trávicí žlázy - B buňka označena v kruhu
 (E) snímek ze světelného mikroskopu průřezu trávicí žlázy - B buňka označena v kruhu [70].

2.2.3 Testování toxicity na suchozemském stejnonožci (*P. scaber*)

Suchozemští stejnonožci, včetně druhu *P. scaber*, jsou často používanými organismy v testech toxicity. Hodnotí se zejména jejich reakce na různé fyziologické nebo experimentální podmínky, změny okolního prostředí a stravy. Existuje mnoho studií toxicity, ve kterých byl tento organismus pro testování rozličných chemických látek použit. Na základě těchto studií bylo zjištěno, že se jedná o vhodný testovací organismus v testech toxicity těžkých kovů [52-54], biocidů [55,56], veterinárních léčiv [57,58] a nanočástic [59-62]. V těchto testech se posuzovaly obvyklé toxikologické endpointy jako je mortalita, změna hmotnosti testovacích jedinců a konzumace stravy. Dále potom biochemické biomarkery a histopatologické změny.

Tyto organismy jsou široce používané pro testování toxicity různých látek a pravděpodobně jsou nejlepší volbou pro studium toxicity kontaminovaného terestrického ekosystému za kontrolovaných laboratorních podmínek. Splňují většinu z kritérií, které by měl testovací organismus mít: jejich biologie a fyziologie je dobře známá, je poměrně snadné (prostorově a časově nenáročné) chovat je v laboratořích a manipulovat s jednotlivými organismy. Dále je možné získat údaje o toxicitě na různých biologických úrovních (buňka, tkáň, jedinec). Kromě toho, suchozemští stejnonožci nepodléhají právním omezením v souvislosti s pokusy na zvířatech, jako obratlovci [63-65].

Kromě klasických endpointů jako je již zmiňovaná mortalita, změna hmotnosti testovacích jedinců a vliv přítomnosti a koncentrace kontaminantů na konzumaci potravy, lze měřit další změny v morfometrické charakteristice hepatopankreatu; a to především vliv na tloušťku hepatopankreatických buněk, popřípadě jejich ztenčování, nebo vliv na výskyt lipidových kapének, tj. snížení ukládání lipidových rezerv. Vytlačování lipidových kapének je obvykle spojeno se ztenčením epitelu. Mezi další zajímavé endpointy patří změna integrity buněčné membrány v trávicích žlázách a bioakumulace kovů v různých částech těla (trávící žlázy, střevo, zbytek těla), které jsou analyzovány odděleně. Kromě toho se zkoumá únikové chování těchto jedinců (z kontaminované do kontrolní půdy) a jejich preference v možnosti výběru potravy různých kvalit (kontaminovaná a nekontaminovaná) [65,66].

2.2.4 Založení chovu, chov a odběr jedinců

Suchozemští stejnonožci, *P. scaber*, se obvykle sbírají ručně, v co nejméně kontaminovaných oblastech; jedná se zpravidla o Národní parky a Chráněné krajinné oblasti. Sbírají se v zahradách, sadech, pod kůrou stromů, pod kameny a ve starých zemědělských usedlostech. Do laboratoří se transportují v plastových nádobách s otvory ve víku pro výměnu vzduchu; na dno se umístí vrstva ovlhčené standardní půdy LUFA 2.2 a vrstva opadanky.

Po transportu do laboratoře se připraví skleněné terárium (20 cm × 35 cm × 20 cm), na dno se dá opět vrstva půdy LUFA 2.2, která je mírně ovlhčena, dále se umístí množství kůry a kamenů, pod které se mohou stejnonožci schovat a jako potrava se přidá částečně rozložené listy lísky obecné (*Corylus avellana*). Důležitá je vysoká vlhkost, a proto se terárium musí pravidelně rosit. Světelný režim je 14 hodin světlo a 10 hodin tma. V každém teráriu jsou umístěny samice i samci, nejlépe ve větším počtu, obvykle 100 – 300 jedinců. Optimální je nechat zvířata adaptovat na laboratorní podmínky jeden měsíc a teprve potom se vyberou vhodní jedinci do toxikologických testů [67].

Do testů se vybírají jedinci v rozmezí tělesné hmotnosti 30 až 60 mg. Je dobré dbát na to, aby variabilita hmotností byla co nejmenší. Menší jedinci jsou nevhodní, a to pro vyšší citlivost nedospělého jedince, větší jedinci mohou být naproti tomu negativně ovlivněni vysokým věkem. Do každé testovací skupiny se snažíme vybrat jedince zastupující rovnoměrně obě pohlaví a vynecháváme potom ty jedince, kteří se začínají svlékat nebo

oplozené samice. Pokud se přesto tito jedinci v testech objeví, například se začnou svlékat v průběhu expozice, jsou výsledky jejich sledování z toxikologické studie vyloučeny [68].

2.2.5 Test akutní toxicity

Jedná se o test akutní toxicity, jehož expozice trvá čtrnáct dní. Metodika tohoto testu je důkladně a podrobně popsána v mnoha studiích autorky prof. Damjany Drobne [52,63,67].

Design testu je následující; obsahuje koncentrační řadu testované látky (obvykle tři koncentrace) a kontrolu. Každá koncentrace a kontrola je zpravidla testována prostřednictvím dvanácti až patnácti jedinců. Pro každou látku je tak zapotřebí přinejmenším 48 organismů. Test probíhá v Petriho miskách; do každé z nich je vložen testovací jedinec samostatně spolu s testovanou látkou aplikovanou na list lísky obecné.

Kontaminovaná matrice se připraví na základě protokolu vypracovaném podle Damjany Drobne [67]. Testované látky jsou suspendovány v deionizované vodě (Milli Q, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA [pH = 5,7, $\rho = 18,5 \text{ MOhm} \cdot \text{cm}$]), za použití vortexu (20 s, 2000 otáček za minutu). Testované substance se připravují čerstvé pro každý experiment; 100 μl připraveného roztoku se aplikuje na 100 mg suchého listu lísky obecné štětečkem a celá tato dávka musí být důkladně rozetřena po celém povrchu, aby testovaná matrice byla co nejvíce homogenní. Jedinci v kontrolní skupině jsou krmeni pouze listy lísky pokryté 100 μl deionizované vody. Horní víčko každé Petriho misky je ovlhčeno. Dále se Petriho misky s testovacím organismem a kontaminovaným popř. kontrolním listem důkladně označí a vloží se do plastového terária, jehož dno pokrývá vrstva mokrých filtračních papírů. Toto terárium je přikryto víkem s otvory pro výměnu vzduchu a je dostatečně oroseno vodou, aby se humidita vzduchu blížila 100 %.

V průběhu testu se provádí kontrola každý den, ovlhčuje se horní víčko Petriho misky a zaznamenává se případná mortalita. Po sedmi a čtrnácti dnech se sbírají fekální peletky. Ty se sbírají do předem zvážených zkumavek Eppendorf, nechají se jeden den vysušit na vzduchu a teprve potom se zváží.

Po čtrnáctidenní expozici nastává jeden den tzv. eliminační fáze v čistém prostředí, během které se jedinci přepraví do Petriho misky s listem lísky obecné cca 30 mg a zde jsou ponecháni z důvodu eliminace zbytků kontaminované stravy uvolněné ze střev. Zaznamenává se počet uhynulých jedinců. Poté jsou přeživší jedinci zváženi a následuje jejich pitva a analýza jednotlivých částí těla.

2.2.5.1 Mortalita, změna hmotnosti a stravovací parametry

Úmrtnost jedinců je zaznamenávána v průběhu a na konci testu. Z každé testovací skupiny, obvykle čítající 12 až 15 jedinců, jsou vyloučena zvířata, která zemřela v důsledku vyšší citlivosti organismu v průběhu svlékání a také vzhledem k vývoji marsupia (plodu) u samic. Zvířata, která zjevně zemřela z těchto důvodů, se následně nezapočítávají do statistických analýz mortality. Statistická významnost rozdílů mezi kontrolní skupinou a exponovanými skupinami zvířat se hodnotí pomocí Mann-Whitneyho U-testu (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$) za použití softwaru OriginPro 8.0 (OriginLab, Northampton, USA) [152].

Změna hmotnosti se hodnotí jako rozdíl mezi hmotností testovacího jedince na začátku a na konci expozice. Z těchto rozdílů se vyhodnotí jejich statistická významnost mezi kontrolní skupinou a exponovanými skupinami zvířat a to opět pomocí Mann-Whitneyho U-testu (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$) za použití softwaru OriginPro 8.0 (OriginLab, Northampton, USA).

O organismu *P. scaber* je dobře známo, že pomocí chemoreceptorů je schopen odhalit vysoké množství kovů obsažených v potravinách. Otravě způsobené konzumací této kontaminované potravy se snaží vyhnout několika způsoby; např. sníží spotřebu potravy, uniká z dosahu této potravy (dochází k jeho únikovému chování), reguluje rychlost konzumace potravin, ukládá kovy do hepatopankreatu v nerozpustné formě a vylučuje kovy ve formě fekálních peletek nebo moči. Proto je rychlým, jednoduchým a reprodukovatelným způsobem pro hodnocení toxicity kovů na pozemních stejnonožcích měření tzv. **Feeding parameters** (stravovací parametry): Feeding Rate (konzumace stravy), Fecal Production Rate (produkce fekálních peletek), Food Assimilation Efficiency (účinnost asimilace stravy), Assimilation Rate (asimilační rychlost) a Growth Efficiency (účinnost růstu), která byla popsána v následné vědecké studii [52].

Obecně platí, že sníží-li se konzumace stravy a produkce fekálních peletek a dojde-li také ke zvýšení účinnosti asimilace stravy, můžeme hovořit o nepříznivých účincích testované látky na tyto testovací organismy [52].

Výpočet parametrů stravování (pro jednotlivé zvíře) je následující:

$$\text{Feeding Rate (FR)} \quad FR = \frac{(W_{Ls} - W_{Le})}{W_{isop a}} \quad (E1)$$

$$\text{Fecal Production Rate (FPR)} \quad FPR = \frac{W_F}{W_{isop a}} \quad (E2)$$

$$\text{Food Assimilation Efficiency (FAE)} \quad FAE = \frac{((W_{Ls} - W_{Le}) - W_F)}{(W_{Ls} - W_{Le})} \quad (E3)$$

$$\text{Assimilation Rate (AR)} \quad AR = \frac{((W_{Ls} - W_{Le}) - W_F)}{W_{isop a}} \quad (E4)$$

$$\text{Growth Rate (GR)} \quad GE = \frac{(W_{isop e} - W_{isop s})}{W_{isop s}} \times 100 \quad (E5)$$

dw - dry weight; suchá hmotnost

fw - fresh weight; čerstvá hmotnost

W_{Ls} - leaf weight on start (mg; dw); hmotnost listu na začátku testu

W_{Le} - leaf weight at the end (mg; dw); hmotnost listu na konci testu

$W_{isop a}$ - average isopod weight; průměrná hmotnost stejnonožce v průběhu testu

$W_{isop s}$ - isopod weight on start (mg; fw); hmotnost stejnonožce na začátku testu

$W_{isop e}$ - isopod weight at the end (mg; fw); hmotnost stejnonožce na konci testu

W_F - faeces weight (mg); hmotnost fekálních peletek

FR - Feeding Rate (mg leaf/mg isopod) - konzumace stravy (mg listu/mg stejnonožce)

FPR - Fecal Production Rate (mg faeces/mg isopod) - produkce fekálních peletek (mg peletek/mg stejnonožce)

FAE - Food Assimilation Efficiency (mg leaf - mg faeces/ mg leaf) - účinnost asimilace stravy ((mg listu - mg peletek)/mg listu)

AR - Assimilation Ratio (mg leaf/mg isopod) - asimilační rychlost (mg listu/mg stejnonožce)

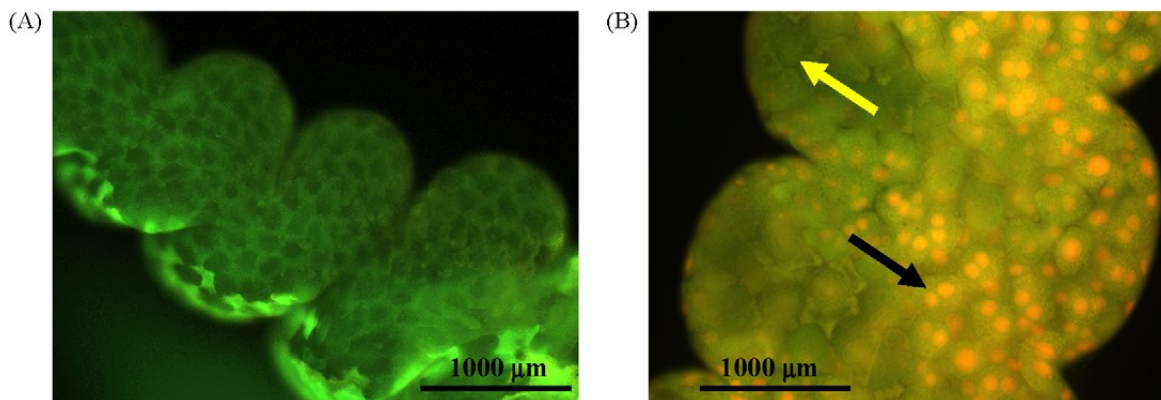
GE - Growth Efficiency (%) - účinnost růstu (%)

Statistická významnost rozdílů mezi kontrolní skupinou a exponovanými skupinami zvířat se rovněž hodnotí pomocí Mann-Whitneyho U-testu (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$) za použití softwaru OriginPro 8.0 (OriginLab, Northampton, USA).

2.2.6 Integrita buněčné membrány v trávicích žlázách

Atraktivní a často používaná metoda pro stanovení integrity buněčné membrány využívá dvou základních barviv, akridinovou oranž a ethidium bromid a je označována názvem AO/EB test. Tato *in vivo* technika je aplikovatelná na širokou škálu buněk. Na podkladě údajů prezentovaných v publikaci [65] je rovněž využitelná pro testování potencionální toxické interakce mezi nanočásticemi a biologickým systémem, a to i u suchozemských stejnonožců. Test AO/EB je založen na předpokladu, že změny v buněčné membránové integritě mají za následek rozdíly v propustnosti barviv v buňkách. Použitá barviva jsou tzv. fluorescenční sondy pro nukleové kyseliny, protože DNA je jen slabě fluorescentní nebo nefluorescentní; proto se pro vizualizaci a identifikaci chromozomů tyto sondy využívají. Akridinová oranž v důsledku jejího vmezeření do dvouvláknové nukleové kyseliny obarví buňky s neporušenými membránami a výsledkem je zelená fluorescence. Ethidium bromid naproti tomu projde pouze do buněk s destabilizovanými buněčnými membránami a po vmezeření do DNA ho můžeme identifikovat na základě oranžové fluorescence (Obr. 2) [65,69].

Tato zkouška následuje okamžitě po pitvě zvířete. Podstatou je umístění jedné trávicí žlázy na dobu pěti minut do roztoku obsahujícího směs barviv. Tato žláza je po uplynutí stanovené doby co nejšetněji přemístěna na podložní sklíčko mikroskopu a ihned vyfotografována, a to pomocí fluorescenčního mikroskopu s použitím excitačního filtru o vhodných hodnotách vlnových délek záření (obvykle mezi 450 - 490 nm) a emisního filtru 515 nm k vizualizaci nukleotidů obarvených ethidium bromidem a akridinovou oranží. Excitační filtr 365 nm a emisní filtr 397 nm se používá pro vizualizaci nukleotidů obarvených pouze ethidium bromidem. Míra buněčné membránové destabilizace je hodnocena vizuálně podle stupnice 0 až 9, přičemž stupeň nula značí nulové nebo téměř žádné poškození a stupeň devět označuje zcela zničené buněčné membrány v trávicích žlázách stejnonožců [70].



Obr. 2: Mikrofotografie hepatopankreatické tkáně *P. scaber* pořízena fluorescenčním mikroskopem.

(A) negativní kontrola, žádné nukleidy nejsou obarveny EB

(B) pozitivní kontrola, buňky s destabilizovanou membránou mají jádra obarvena EB (oranžová). Žlutá šipka na obrázku B představuje nepoškozené jádro (neobarvené EB) a černá šipka představuje poškozené jádro (obarvené EB) [65].

2.2.7 Bioakumulace

Suchozemští stejnonožci jsou známí svou schopností bioakumulovat velké množství kovů ve svých tkáních a přežít tak i v průmyslově znečištěných oblastech. Rovněž je známa jejich schopnost reagovat na kontaminaci těžkými kovy a to v závislosti na jejich koncentraci. Tyto schopnosti z nich dělají jednoho z nejoblíbenějších experimentálních organismů v terestrické ekotoxikologii. Pro lepší pochopení, jak jsou tito jedinci schopni se vypořádat se znečištěným prostředím těžkými kovy, jsou důležité znalosti o příjmu, asimilaci a vylučování těchto prvků z jejich těl [21,71].

Příjem kovů je závislý především na míře konzumace stravy, na dostupnosti kovů v potravinách a na pH ve vnitřním prostředí střev organismů [21,72].

P. scaber reaguje velmi dobře na vysoké koncentrace kovů v potravinách různými způsoby; nejčastější reakcí je však odmítání konzumace této potravy a hladovění. Na problematiku bioakumulace kovů a jejich vliv na jedince bylo zaměřeno již několik studií; například byly testovány kovy jako je Cu, Ni, Mn, Mg, Zn, které byly v různých koncentracích aplikované do potravy stejnonožců [32,73-75].

Výsledkem studie vlivu zinku na *P. scaber* bylo objevení jeho schopnosti vyhnout se otravě tímto kovem a to několika způsoby; regulací rychlosti konzumace kontaminované stravy, únikovým chováním, ukládáním kovů v hepatopankreatu ve formě nerozpustných granulí a vylučováním zinku ve formě fekálních pelettek, popř. močí [21,52,72,76-78].

Nově se zpracovávají i studie zabývající se bioakumulací nanočástic v tomto stejnonožci. Již bylo publikováno několik studií zkoumající tuto schopnost u nanočástic ZnO₂, Cu a CoFe₂O₄. Obvykle se měří obsah těchto nanočástic v jednotlivých částech testovacího organismu pomocí metod atomové absorpční spektrometrie (AAS), hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) nebo povrchové plazmové rezonance (LSPR) [61,79,80,82,83].

2.2.8 Tloušťka epitelu hepatopankreatických buněk v trávicích žlázách

Tloušťka epitelu je dalším endpointem využívaným pro sledování negativních dopadů toxikantů. Po pitvě organismu na konci testu akutní toxicity se jedna z trávicích žláz používá ke studiu vlivu testované látky na buňky trávicího epitelu. Okamžitě po jejím odpreparování z hepatopankreatu se vloží do Carnoy-B fixativa (absolutní alkohol, chloroform a ledová kyselina octová, v poměru 6: 3: 1).

O trávicích žlázách každého jedince se vede záznam, kde je popsán jejich tvar, barva a jakékoliv odchylky od stavu běžně analyzovaných žláz. V Carnoy-B fixativu se při laboratorní teplotě ponechá tkáň po dobu 24 hodin. Potom následuje dehydratace žláz, a to postupně v 70% alkoholu, 80% alkoholu, 96% alkoholu, absolutním alkoholem a xylenu. Dehydratovaná tkáň se vkládá do malého aluminiového boxu cca 1 x 1 x 1 cm obsahujícího vosk (Paraplast Plus); při teplotě 56° C se v něm tkáň ponechává 24 hodin. Potom se vosk nechá ztuhnout při laboratorní teplotě po dobu několika hodin, odstraní se aluminiová folie a žláza se připraví na řezání příčných řezů tzv. mikrotomů.

Příčné řezy jsou obvykle 8 mm široké, přičemž žláza se řeže po celé její délce. Tyto řezy jsou potom obarveny barvivou eozinem a hematoxylinem a jsou pořízeny jejich fotografie pomocí optického mikroskopu. Pro každou žlázu se analyzuje obvykle 10 až 20 histologických řezů, jak je vidět z následujícího obrázku (Obr. 3b). Každá žláza se dá rozdělit na šest sekcí a z každé je obvykle analyzován jeden až dva histologické řezy. Studie [66] prokázala, že se nevyskytly žádné významné rozdíly mezi trávicími žlázami v jednom testovacím organismu; proto se mohou ostatní žlázy použít k dalším analýzám.

Tloušťka epitelu se stanovuje obvykle s použitím ImageJ verze 1.48q softwaru pro analýzu obrazu, podle studie [66]. Snímky z optického mikroskopu jsou do něho importovány a následně analyzovány. Pro odhad průměrné epiteliální tloušťky (ET) každého příčného řezu hepatopankreatu se tento průřez znázorňuje jako kruh. Z hodnot vnějšího obvodu hepatopankreatu (HP) se vypočte poloměr hepatopankreatu (HR) (E6) a prostřednictvím následujících rovnic (E7, E8, E9 a E10) dojdeme až k námi sledovanému parametru tloušťky epitelu.

Výpočet parametrů hepatopankreatu, lumenu a tloušťky epitelu je následující:

$$\text{Poloměr hepatopankreatu (HR)} \quad HR = \frac{HP}{2\pi} \quad (E6)$$

$$\text{Plocha hepatopankreatu (HA)} \quad HA = \pi HR^2 \quad (E7)$$

$$\text{Plocha lumenu (LA)} \quad LA = HA - EA \quad (E8)$$

$$\text{Poloměr lumenu (LR)} \quad LR = \left(\frac{LA}{\pi}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (E9)$$

$$\text{Tloušťka epitelu (ET)} \quad ET = HR - LR \quad (E10)$$

Takto vypočtený parametr představuje odhad průměrné (vyhlazené) tloušťky epitelu. Průměrná tloušťka epitelu hepatopankreatu je stanovena jako průměr ze všech zkoumaných ekvidistantních sekcí. Změna tloušťky epitelu se vyhodnotí jako statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a exponovanými skupinami zvířat a to i v tomto případě pomocí Mann-Whitneyho U-testu (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$) za použití softwaru OriginPro 8.0 (OriginLab, Northampton, USA) [66].

2.2.8.1 Četnost výskytu lipidových kapének v B buňkách

Četnost lipidových kapének v B buňkách v hepatopankreatu se klasifikuje čtyřmi stupni [66]. Vychází ze znalosti abundance v nestresovaných organismech, kterými jsou jedinci odebráni přímo z terárií z laboratorní kultury a dále jedinci z kontrolních skupin z testu toxicity. Hojnost lipidových kapének v buňkách B hepatopankreatu je klasifikována podle čtyř tříd: a) řídká, b) nízká, c) střední, d) vysoká.

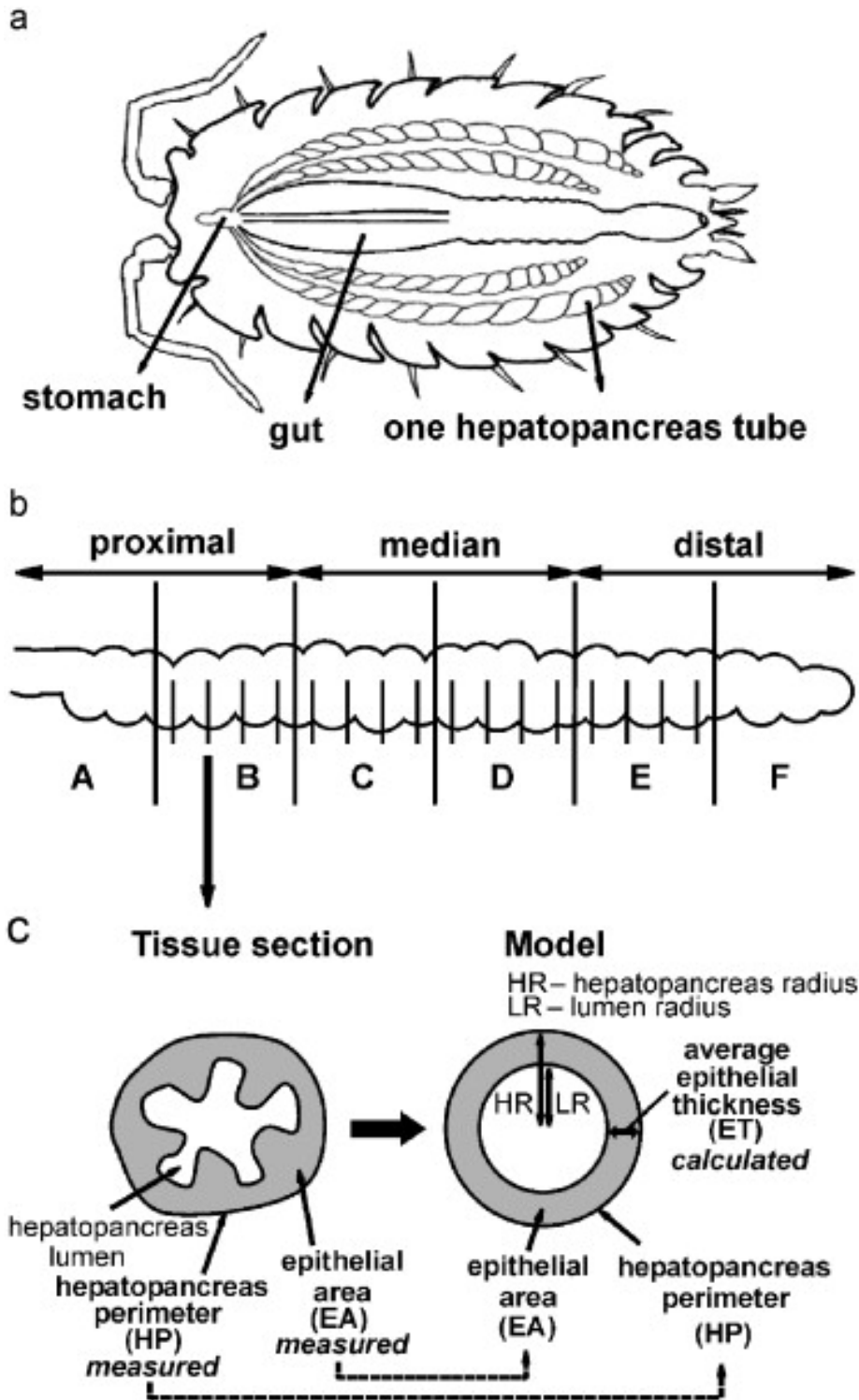
Tloušťka epitelu trávicích žláz *P. scaber* se hodnotí vizuálně na základě metodiky prezentované v literatuře [84]. Podle histologického vzhledu (tvar a velikost) B buněk trávicích žláz se organismy rozdělí do pěti stupňů poškození. Stupeň 1 představuje jedince, kteří mají zcela zploštělé B buňky, stupeň 2 představuje jedince, kteří mají B buňky zcela zploštělé spolu s oblastmi mírně zploštělých B buněk, popřípadě B buňky mající pyramidální tvar; stupněm 3 je označeno poškození B buněk, které nabývají pyramidový tvar a jen některé jsou mírně ploché, stupeň 4 potom představuje organismy, které mají velké B buňky ve tvaru kopule s oblastmi B buněk pyramidového nebo mírně zploštělého tvaru a stupeň 5 představuje jedince, kteří mají velké B buňky ve tvaru kopule (Tab. 1) [66,84].

2.2.8.2 Stanovení fyziologického stavu jedinců na základě morfometrických změn v hepatopankreatu

Na základě tloušťky epitelu trávicích žláz (tvar a velikost) B buněk (stupňů) a na základě rozdělení podle četnosti výskytu lipidových kapiček v B buňkách (tříd) se organismy rozdělují do tří skupin, z nichž každá má odlišný fyziologický stav (Obr. 4) [84].

Do skupiny A patří jedinci, kteří nebyli vystaveni stresu, „non-stressed“, tloušťka epitelu stupně 4 a 5 a třída abundance lipidových kapének c nebo d. Druhou skupinu B tvoří organismy pod mírným stresem „moderately stressed“, tloušťka epitelu stupně 3 a třída

abundance d nebo c. Třetí skupinu tvoří jedinci velmi stresovaní „severely stressed“, tloušťka epitelu stupně 1 a 2 a třída abundance a až d (Tab. 1).













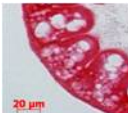

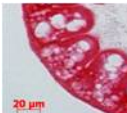


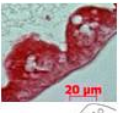





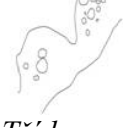




Obr. 3: *P. scaber*.

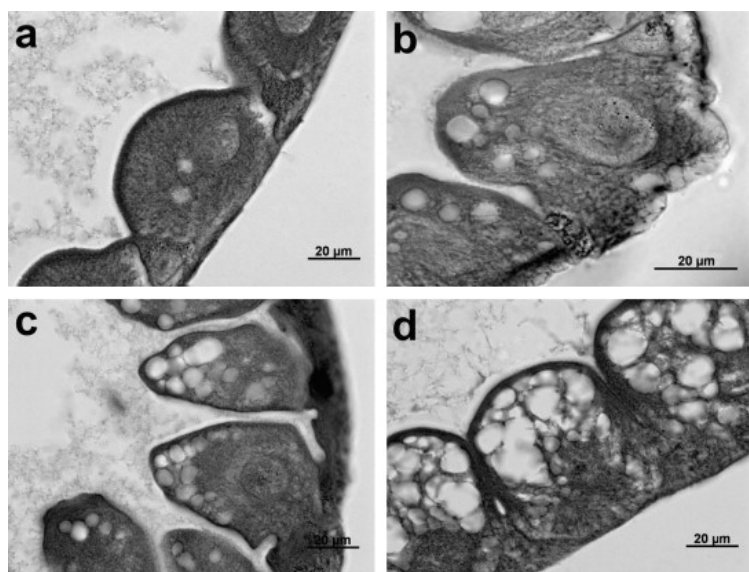
(a) Schéma trávicího systému.

(b) Zóny trávicí žlázy

(c) Stanovení epiteliální tloušťky průřezu [66].

Tab. 1: Fyziologický stav jedinců na základě morfometrických změn v hepatopankreatu [85].

Endpoint	Fyziologický stav stejnonožců					
	Nestresované organismy		Mírně stresované organismy		Stresované organismy	
Tloušťka epitelu trávicích žláz (stupně)	Stupeň 5	Stupeň 4	Stupeň 3	Stupeň 2	Stupeň 1	
						
						
Četnost lipidových kapének v B buňkách (třídy)	Nestresované organismy		Mírně stresované organismy		Stresované organismy	
	Třída d	Třída c	Třída d	Třída c	Třída a	Třída b
						
						
					Třída d	Třída c
						
						



Obr. 4: Četnost lipidových kapének v B buňkách v hepatopankreatu (a-d). Hojnost lipidových kapek: (a) řídké; (b) nízká; (c) střední; (d) vysoká [84].

2.2.9 Test únikového chování v půdě

Test únikového chování je rychlý screeningový test pro hodnocení půdy a vlivu znečišťujících látek a chemikálií na chování testovacích organismů. Tento způsob testování odráží biologickou dostupnost kontaminantu v půdách.

Test únikového chování vůči záměrně kontaminované půdě s terestrickými stejnonožci byl proveden s několika zástupci těchto druhů: *Porcellio laevis*, *Porcellionides pruinosus* a *P. scaber*. Testovanými látkami byly pesticidy, kovy (zinek a kadmium) a veterinární léčiva [86-90].

Princip tohoto testu spočívá v tom, že určitý počet dospělých jedinců je ve stejném čase vystaven působení kontrolní a testované přírodní půdě nebo půdě, která byla v laboratoři kontaminována testovanou látkou. Obě dvě tyto půdy jsou přitom obsaženy v jednom testovacím systému a jedinec má možnost přestupu do preferované půdy. Délka testu se liší v závislosti na druhu použitého organismu (od několika hodin do několika dní); nejčastěji však tento test trvá 48 hodin.

V testovacím systému jsou umístěny dvě plastové nádobky, které jsou naplněny ovlhčenými substráty do výšky několika, obvykle tří centimetrů. Jedna nádobka je naplněna nekontaminovanou kontrolní půdou, zatímco druhá obsahuje kontaminovanou půdu; mezi těmito dvěma nádobkami je propojení plastovou trubicí o průměru 1 cm a délce 2 cm, přes kterou může testovací organismus volně migrovat mezi oběma druhy půd (Obr. 5).

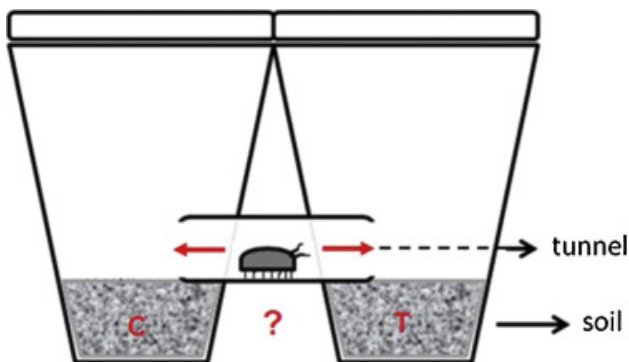
Po vložení organismu do půdy se nádobka označí a uzavře plastovým víčkem s otvory, které umožňují dostatečné provzdušnění. Migrace organismů může bez problémů probíhat mezi oběma substráty. Test probíhá v termostatu nebo klimatizované místnosti se stálým světelným a teplotním režimem; kromě toho se dohlíží na humiditu prostředí, která by se měla blížit ke 100 procentům. V průběhu testu se celkem desetkrát kontroluje a zaznamenává pozice testovacího organismu v každém testovacím systému. Obvykle je zapotřebí dvanáct až patnáct jedinců pro jednu testovanou koncentraci.

Odečtená data v průběhu testu jsou transformována na podkladě následující rovnice na hodnotu A, tzv. únikovost.

$$A = \frac{N - 2 \cdot T}{N} \quad (E11)$$

Hodnota N je počet kontrol uskutečněných za test a hodnota T je počet kontrol, při kterých byli sledovaní jedinci v kontaminované půdě. Pokud je hodnota únikovosti negativní, nejedná se o preferenci kontrolní půdy a testovaná látka v dané koncentraci není testovacími organismy vyhodnocena jako nebezpečná.

Ve statistické analýze vyhodnocených dat únikovosti se zpravidla používá tzv. "funkce habitatu". Tato funkce znamená, že pokud je únikovost z kontrolní půdy pod hodnotou dvaceti procent, nejedná se o únikovost vůči testované substanci. Platí to také opačně; pokud je méně jak 20% únikovost z kontrolní půdy, nejedná se o preferenci kontrolní půdy [87,91].



Obr. 5: Schéma únikového testu v půdě. C - kontrolní část, T - kontaminovaná část.

2.2.10 Test únikového chování vůči potravě

V porovnání s testem únikového chování v půdě, který je spíše rychlou screeningovou metodou trvající 48 hodin, se jedná o test probíhající za stejných podmínek jako test akutní toxicity.

V tomto testu je posuzovaná látka opět testována v několika rozdílných koncentracích, tj. koncentrační řadě, která má minimálně tři koncentrace. Z důvodu posouzení optimálního průběhu testu a jeho podmínek je do testovacího schématu rovněž zařazena kontrola. Zpravidla se testuje pro každou koncentraci a kontrolu skupina dvanácti až patnácti jedinců. Test probíhá v Petriho miskách, přičemž do každé misky je vložen testovací jedinec samostatně spolu se dvěma zdroji potravy; jedná se vždy o jeden list lísky obecné, který je rozdělený na dvě části; první část cca 50 mg je nekontaminovaná, druhá část listu lísky obecné, opět cca 50 mg, je kontaminovaná.

Kontaminovaná matrice se připraví stejně jako v testu akutní toxicity. Testované látky jsou suspendovány v deionizované vodě (Milli Q, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA [pH = 5,7, $\rho = 18,5 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$]), za použití vortexu (20 s, 2000 otáček za minutu). Chemikálie se připravují čerstvé pro každý experiment; 50 μl připraveného roztoku se aplikuje na 50 mg suchého listu lísky obecné štětečkem a musí být důkladně rozetřeno po celém povrchu tak, aby testovaná matrice byla co nejvíce homogenní. Testovací jedinci mají současně umístěny dva díly jednoho listu do Petriho misky, každý cca o hmotnosti 50 mg; na jeden je aplikována testovaná látka a na druhý pouze deionizovaná voda. Jedinci v kontrolní skupině jsou krmeni pouze dvěma kusy listu lísky obecné pokrytými 50 μl deionizované vody (každý lístek). Horní víčko každé Petriho misky je ovlhčeno. Následně se Petriho misky důkladně označí a vloží se do plastového terária, jehož dno pokrývá vrstva mokřích papírových utěrek. Toto terárium je přikryto víkem s otvory pro výměnu vzduchu a dostatečně oroseno vodou, aby se humidita vzduchu blížila 100 procentům [67].

V průběhu testu se provádí kontrola každý den, přičemž se ovlhčuje horní víčko Petriho misky a také se zaznamenává případná mortalita. Po sedmi a čtrnácti dnech se sbírají fekální peletky. Ty se sbírají do předem zvážených zkumavek Eppendorf, nechají se jeden den vysušit na vzduchu a zváží se.

Po čtrnáctidenní expozici nastává jeden den v tzv. eliminační fázi v čistém prostředí; jedinci se přepraví do Petriho misky s listem lísky obecné cca 30 mg, kde jsou ponecháni z důvodu vyčištění střev od zbytků kontaminované stravy. Kromě počtu uhynulých jedinců se zaznamenává počet a hmotnost přeživších jedinců.

Zbytky každého kousku listu jsou zváženy a hodnoty jsou zaznamenány. Vyhodnocuje se především preference ve volbě potravy. Statistická významnost rozdílů mezi konzumací kontaminovaných a nekontaminovaných listů pro všechny koncentrace testovaných skupin látek se opět hodnotí pomocí Mann-Whitneyho U-testu (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$) za použití softwaru OriginPro 8.0 (OriginLab, Northampton, USA).

2.3 Nanočástice

2.3.1 Nanotechnologie

Nanotechnologie je definována jako „Technologie, která se zabývá projektováním, charakterizací, produkcí a používáním struktur, zařízení a systémů v měřítku řádově nanometrů (obvykle 1-100 nm).“ Za jednoho ze zakladatelů nanotechnologie je považován Richard P. Feynman, který svoji zcela přelomovou vizi představil na zasedání Americké fyzikální společnosti na Kalifornské technologické univerzitě v prosinci 1959; jeho přednáška nesla název „There is plenty of room at the bottom“ („Tam dole je spousta místa“) a její obsah byl směřován do oblasti „nanosvěta“. Tento průkopník byl mnohými považován za snílka a předběhl svou dobu o několik desetiletí [92].

2.3.2 Nanomateriály

Nanomateriály jsou materiály, které mají strukturované komponenty s alespoň jedním rozměrem menším než 100 nm. Materiály se dělí podle počtu rozměrů v nanoměřítku.

Jeden rozměr v nanometrickém měřítku - vrstvy, tenké filmy.

Dva rozměry v nanometrickém měřítku - nanodrátky a nanotrubičky.

Tři rozměry v nanometrickém měřítku - nanočástice, kvantové tečky [92].

2.3.3 Použití nanomateriálů

Význam nanomateriálů a nanotechnologií prudce vzrůstá, a to vzhledem k širokému poli uplatnění a použití v různých průmyslových odvětvích, konzumních produktech a také ve zdravotnické péči. V současné době dochází k intenzivnímu průniku nanotechnologií do mnoha průmyslových odvětví; velký potenciál skýtá zejména uplatnění na poli katalyzátorů z nanostrukturovaných materiálů, aplikovaných především v chemickém průmyslu a v polovodičových strukturách [93].

Dalším prudce rostoucím odvětvím je molekulární medicína. Produkty nanotechnologií mají schopnost průniku k cílovým orgánům a tkáním s jejich následným ovlivněním. Některé nanomateriály mohou snadno pronikat dokonce až do jednotlivých buněk, kde mohou fungovat jako nosiče léčiv nebo jako nosiče kontrastních látek pro zobrazování tkání nebo pro diagnostiku některých onemocnění, dále v regenerativní medicíně, kde se jedná o hojení ran a v tkáňovém inženýrství a v nanobiofarmaceutice. Významný rozvoj nanotechnologických aplikací je rovněž očekáván v potravinářství, zejména ve vývoji nových obalových materiálů, aditiv, stabilizátorů nebo při přípravě nových potravin a rovněž při vývoji nanofiltrů pro filtraci pitné a podzemní vody [94-99].

Nanotechnologie se také uplatňují ve velmi citlivých nanosenzorech, ve fotonice, plazmonice, textilním a automobilovém průmyslu. V oblasti ochrany životního prostředí potom nacházejí nanočástice uplatnění v nanoremediacích, tj. při odstraňování a čištění rozsáhlých kontaminovaných oblastí [94].

2.3.4 Nanočástice

Jedná se o materiál, který má všechny tři rozměry v nanometrickém rozsahu. Běžně připravované nanočástice dosahují rozměrů 1-100 nm. V současné době existuje velké množství různých typů nanočástic, a to ať již z hlediska struktury nebo chemického složení.

Na základě struktury jsou významné tyto typy nanočástic:

Nanoklastr: soubor atomů nebo molekul vázaný slabými interakcemi.

Nanokrystal: krystalická nanočástice, atomy jsou vázány kovalentními vazbami.

Kvantová tečka: polovodičová nanočástice [92].

Z hlediska využití nanočástic jsou typickými zástupci:

fullereny, uhlíkové nanotrubky, stříbrné nanočástice, zlaté nanočástice, oxid titaničitý, oxid zinečnatý, oxid měďnatý, oxid ceričitý, oxid hlinitý, kvantové tečky a magnetické nanočástice železa a jeho oxidů.

2.3.5 Zlaté nanočástice

Historie zlatých nanočástic je dlouhá, protože byly nevědomky připravovány již před počátkem letopočtu ve starém Egyptě, dále také starořímskými a později středověkými skláři při výrobě uměleckých artefaktů nebo honosných vitrážových oken. Tyto předměty působí svou schopností odrážet vlnové délky v rubínových barvách uhrančivě na mysl mnoha lidí dodnes. Důležitou aplikovanou příměsí bylo tzv. tekuté zlato, ze kterého redukcí za specifických podmínek vznikaly v roztaveném skle nanočástice.

V dnešní době se nejčastěji používají dvě syntézy zlatých nanočástic, a to redukce z roztoku nebo vakuové napařování. V laboratoři je syntéza nejčastěji prováděna ve vodném roztoku redukcí kyseliny tetrachlorozlatité (HAuCl_4) citrátem sodným (Faraday, Turkevich), a to za varu pod zpětným chladičem. Takto připravený koloid by správně měl mít hlavní absorpční pík při 520 nm a jeho barva by měla být jasně červená. Druhým používaným způsobem je vakuové napařování. Zlatý prášek je odpařován ve vakuované aparatuře a zároveň je do reaktoru přiváděna vodní pára. Páry kovu i vody následně kondenzují na chlazených stěnách reaktoru a tvoří takto ledový povlak obsahující nanočástice. Rozpuštěním ledu vzniká fialově zbarvený koloid, jehož odhadovaná koncentrace zlata je 0,002 mol/l; tento koloid vykazuje hlavní pík absorpčního spektra UV/VIS spektroskopie při 550 nm. K takovému koloidu není třeba přidávat žádné stabilizační činidlo a částice jsou stabilní i po dobu přesahující jeden rok [100,101].

Koloid nanočástic malých velikostí (9 - 40 nm) se jeví jako jasně červený. Pro jeho optické vlastnosti jsou rozhodující jeho velikost a tvar částic. U větších nanočástic a celých agregátů dochází naopak k modrému posunu a koloid má modrou barvu. Při absolutním vysrážení částic je roztok našedlý až bezbarvý. Bylo prokázáno, že změnu barvy z červené na modrou vyvolává přítomnost kationtů ze solí, které se používají na stabilizaci koloidů. Kationty se adsorbují na povrch nanočástic, přičemž mění velikost jejich vzájemné elektrostatické odpudivé síly dané jejich přirozeným negativním nábojem, což jim umožňuje se dostat k sobě blíže. Částice, případně celý agregát je potom schopen rezonance s delšími vlnovými délkami a následně emituje kratší vlnové délky [100,101].

Možnost použití zlatých nanočástic je poměrně široká, zejména pokud jsou aplikovány v oblasti biosenzorů, katalýz, elektroniky a také kosmetiky. Zlaté nanočástice, a to speciálně modifikované různými funkčními ligandy, jsou posuzovány především z hlediska využití v analyticko-biochemických metodách, případně vzhledem k jejich elektrochemickým a optickým vlastnostem, vyplývajícím z velikosti částic nebo agregátů. Také již byly vyvinuty kolorimetrické detekční metody pro rakovinné buňky v suspenzi používající modifikované nanočástice (oligonukleové kyseliny nebo proteiny, které vážou specifické cílené molekuly); v tomto případě dochází ke změně barvy indikující přítomnost rakovinných buněk.

Publikovány byly rovněž metody využívající zlaté částice k měření enzymatické aktivity [102,103].

2.3.6 Toxicita nanočástic - Nanotoxicita

Rychlý rozvoj produkce nanomateriálů, především jejich použití v řadě průmyslových odvětví, však s sebou nese zvýšenou potřebu hlubšího porozumění mechanismů jejich interakce s živými organismy. Tato potřeba je dána především unikátními vlastnostmi nanočástic plynoucími z jejich malých rozměrů a tím i jejich schopností pronikat v organismu do tkání i buněk [104].

Toxicita nanočástic se od konvenčních chemických látek liší, což je dáno především odlišností základních fyzikálně-chemických vlastností. Převážně se přitom jedná o velikost částic a jejich povrch. S klesající velikostí částic nepřímo úměrně roste plocha jejich povrchu a dochází ke zvýšení volné Gibbsovy energie, která odráží reaktivitu daných částic. Gibbsova energie výrazně roste s klesající velikostí částic, což se projevuje výrazně vyšší chemickou reaktivitou menších částic [105].

Předpokládá se, že právě významně odlišné a specifické fyzikálně-chemické vlastnosti nanomateriálů, a to spolu s jejich chemickým složením, jsou primárně zodpovědné za jejich samotný toxický účinek a toxikokinetiku (jejich absorpci, distribuci, biotransformaci a eliminaci v organismu); také ovlivňují jejich osud a transformaci v životním prostředí. Zatím není zcela jasné, které charakteristiky jsou přesně spojeny s nebezpečným potenciálem různých nanomateriálů. Tato skutečnost přináší určitou nejistotu při rozhodování; je zapotřebí se rozhodnout, jaké parametry je nezbytné zjišťovat prostřednictvím studií zaměřenými na posuzování rizik spojených s expozicí nanomateriálům. Navíc mohou být pro různé typy nanomateriálů stěžejní jiné charakteristiky; například nanočástice stejného chemického složení mohou vykazovat rozdílnou toxicitu, a to v závislosti na odlišné velikosti částic, povrchové modifikaci apod. [106].

Rozdíly mezi testováním toxicity nanočástic a konvenčních chemických látek daly vznik novému oboru, nanotoxikologii, která je zaměřena zejména na testování toxicity nanomateriálů. Přitom má brát v potaz nové vlastnosti těchto materiálů (Obr.6) [105].

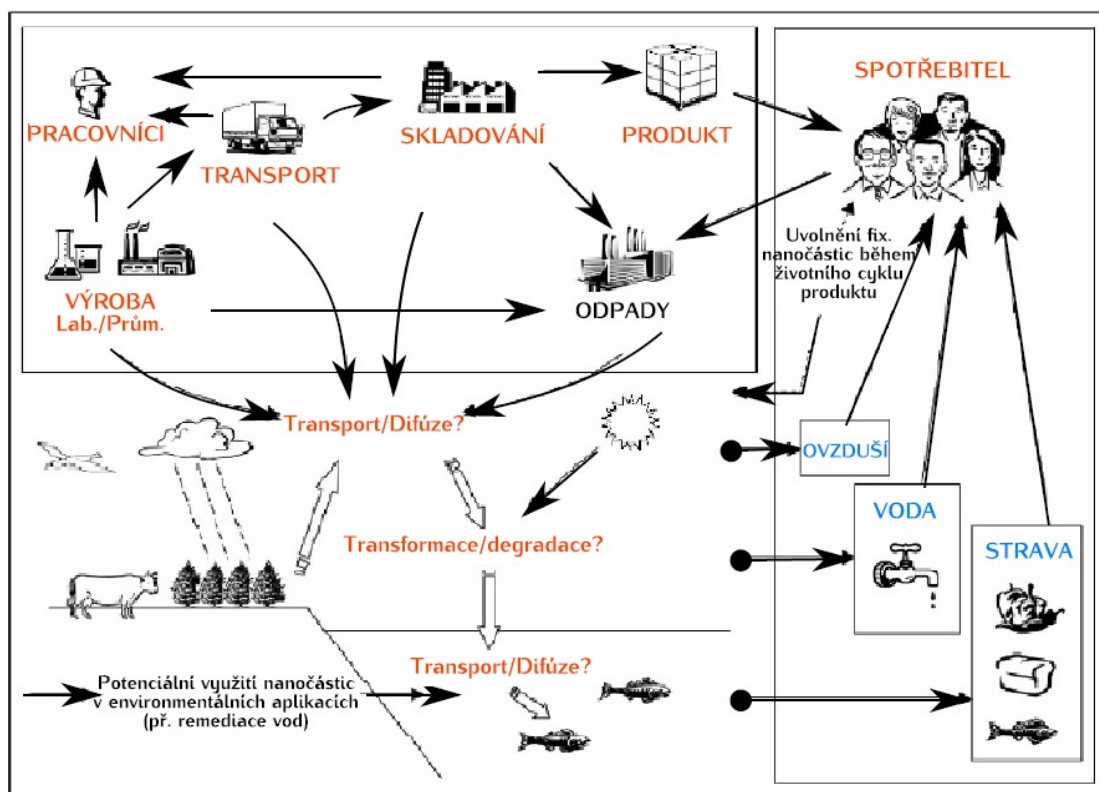
Testy toxicity nanočástic se provádí v akvatickém i v terestrickém prostředí. Publikované vědecké práce s vodními organismy však značně převyšují. Mezi nejčastěji používané akvatické testy patří testy toxicity na sladkovodních organismech, tj. zástupci nižšího koryše *Thamnocephalus platyrus*, dále na zástupci planktonních koryšů, např. *Daphnia magna* a *Caeriodaphnia dubia*, případně na nezmaru štíhlém (*Hydra attenuata*). V prostředí slané vody jsou používáni zástupci podtřídy klanonožců, vznášivky (*Gymnoplea*), buchanky (*Cyclopoidea*) nebo plazivky (*Harpacticoida*), přičemž nejčastěji bývá zvolen organismus slávky jedlé (*Mytilus edulis*) [107].

V oblasti terestrických organismů jsou testovacími organismy především žížaly *Eisenia fetida* a *Lumbricus terrestris*, hlístice *Caenorhabditis elegans*, chvostokoci *Folsomia candida*, roupice *Enchytraeus crypticus* a stejnonožci *P. scaber* [107].

	<i>Klasická toxikologie</i>	<i>Nanotoxikologie</i>
Klíčové parametry	1. Hmotnost / koncentrace	1. Hmotnost / koncentrace 2. Velikost 3. Struktura 4. Specifický povrch 5. Povrchové modifikace 6. Povrchový náboj ...

Obr. 6: Stěžejní parametry pro vyjádření dávky v klasické toxikologii a nanotoxikologii [105].

Dalším problémem kromě toxicity nanočástic je jejich dosud těžko definovaný osud v životním prostředí; sice existuje několik prací zabývajících se touto problematikou, avšak vzhledem k rozličným vlastnostem těchto materiálů je i těžká predikce jejich transportu mezi jednotlivými složkami životního prostředí, distribuce, transformace nebo potenciálu pro dálkový přenos (Obr. 7) [108-110].



Obr. 7: Životní cyklus nanomateriálů v prostředí [104].

2.3.7 Testování toxicity nanočástic na terestrických stejnonožcích

Suchozemští stejnonožci, včetně druhu *P. scaber*, jsou často používanými organismy v testech toxicity, přičemž se hodnotí především jejich reakce na různé fyziologické nebo experimentální podmínky, na změny okolního prostředí a stravy. Tento organismus se prokázal jako velice vhodný pro testování toxicity nanočástic, protože již bylo publikováno několik studií, které se zabývají vlivem nanočástic na různých biologických úrovních v tomto testovacím organismu.

Mezi nejčastější testované nanočástice patří nanočástice stříbra a rozličné oxidy, např. oxid titaničitý, oxid zinečnatý a oxid ceričitý.

Ve studii [61] byla zkoumána možnost bioakumulace oxidu zinečnatého do jednotlivých částí těla *P. scaber*; u tohoto organismu docházelo k bioakumulaci v závislosti na dávce, avšak potenciál pro bioakumulaci byl značný.

U oxidu titaničitého, který byl předmětem výzkumu ve více studiích, nebyly prokázány žádné nežádoucí účinky v expoziční koncentraci až do 5000 µg nanočástic/g suché stravy, a to i pro expozice trvající 14 až 28 dnů. Sledovány byly zejména vlivy na mortalitu, změnu hmotnosti organismu nebo na stravování a asimilaci přijaté potravy. Menší a statisticky nevýznamný efekt na integritu buněčné membrány a indikace oxidačního stresu byla prokázána v jiné publikaci [67]. V následující práci [85] byl zase sledován vliv na tloušťku epitelu trávicí žlázy organismu a na hojnost výskytu intracelulárních lipidů v tomto epitelu. Tyto dva parametry byly zkombinovány, a to jako vyjádření fyziologického stavu u těchto zvířat. Bylo zjištěno, že negativní vliv na fyziologický stav testovacích organismů byl zřejmý již od koncentrace 1000 µg nanočástic/g stravy [67,85,111].

V další práci [65], která se zabývala především testováním oxidu titaničitého, oxidu zinečnatého a fulerenu C60, byl proveden test integrity buněčné membrány v trávicích žlázách tohoto organismu. Fulereny C60 byly nejvíce biologicky účinné a jejich efekt na buněčnou membránu byl značný (Mann-Whitneyho U-testu, $p < 0,01$).

V práci, která byla zaměřena na studium toxicity nanočástic stříbra, nebyl zaznamenán žádný nepříznivý vliv na klasické toxikologické parametry, jakými jsou mortalita, změna hmotnosti a vliv na příjem a asimilaci potravy. V tomto případě však byla prokázána přítomnost Ag uvnitř buněk, pravděpodobně v důsledku asimilace rozpuštěných Ag iontů z testovaných nanočástic. Asimilace většího množství kovových iontů v S-buňkách je dobře známa, a to jako detoxikační mechanismus stejnonožců [62].

Rovněž byla sledována kombinovaná toxicita nanočástic a polyaromatických uhlovodíků [112]. Z nanočástic byl testován CeO_2 , které se používá jako aditivum pohonných hmot dieselových motorů, kde má funkci katalyzátoru oxidačních procesů. Z uhlovodíků byl vybrán fenantren, a to jako jedna z hlavních složek obsažených ve výfukových plynech. V rámci této studie nebyla prokázána toxicita pro terestrické stejnonožce (*P. pruinus*) a také nebyl zjištěn žádný vliv na mortalitu a růst těchto organismů [112].

2.3.8 Toxicita zlatých nanočástic

Toxicita zlatých nanočástic byla dosud posuzována především prostřednictvím akvatických testů. Využití terestrických testů bylo spíše sporadické. Z akvatických testů provedených s nanočásticemi zlata lze v literatuře najít informace o testech na sladkovodních řasách, na sladkovodních korýších *D. magna*, na embryích sladkovodních ryb (*Danio rerio*) a na dospělých sladkovodních rybách (*D. rerio*) [113-119].

Nicméně, výsledky těchto studií nejsou jednotné; zatímco někteří autoři uvádějí, že zlaté nanočástice jsou toxické pro testovací organismy [116,118], jiní autoři docházejí k závěru, že nejsou toxické pro stejné druhy organismů [117,120]. Další zajímavá studie přinesla nové poznatky, které byly získané při provádění testu na bakteriích *Salmonella typhimurium*; výsledky ukazují, že zlaté nanočástice mohou být absorbovány na povrchu bakterie, avšak nejsou schopny proniknout do bakterie [122].

Publikované články naznačují, že toxicita nanočástic úzce souvisí s vlastnostmi jejich povrchu, včetně potahového materiálu, kterým je zajištěna stabilita částic, dále pak na velikosti a tvaru nanočástice. Proto se výsledky jednotlivých studií od sebe významně liší. Z výše uvedeného vyplývá, že je velice důležité vždy přesně definovat fyzikálně chemické vlastnosti testovaných nanočástic [121,122].

Studii využívajících terestrické organismy vzniklo pouze několik. Z jedné vědecké publikace [124] vyplynulo, že nanočástice zlata jsou biologicky dostupné z půdy pro modelový organismus *E. fetida* a mají rovněž potenciál vstupovat do potravního řetězce. Zlaté nanočástice byly distribuovány do tkání a ovlivnily tak reprodukci u testovacích organismů. Ve zmíněné studii, ve které byly použity nanočástice o dvou rozměrech (\emptyset 20 nebo 55 nm) bylo zjištěno, že velikost částic v tomto případě neměla vliv na koncentrace nahromaděné v jednotlivých tkáních. Naproti tomu, a to podle počtu nahromaděných velikostních frakcí částic, byly jako více biologicky dostupné vyhodnoceny nanočástice o velikosti 20 nm. Rozdíly v biologické dostupnosti mohou mít vztah k agregaci v porézním prostředí [124].

Dalším modelovým půdním organismem, který byl použit pro studium toxicity zlatých nanočástic (\emptyset 4 nm, potažené citrátem), byl *C. elegans* (háďátka obecné). Závěr této studie tvořilo posouzení těchto nanočástic jako biologicky dostupných, a to s možným nepříznivým účinkem na buněčné úrovni. Toto tvrzení vycházelo z prokázané významné diferenciální exprese 797 genů [125].

Modelová rostlina *Nicotiana tabacum* a modelový testovací organismus jako zástupce fytofágního hmyzu *Manduca sexta* se používají ke sledování příjmu kontaminantů rostlinami a ke zhodnocení potenciálu pro trofický převod. Testovanými látkami byly v tomto případě nanočástice zlata o velikosti \emptyset 5, 10 a 15 nm. Výsledky této studie byly prioritní, protože poskytly první důkazy o trofickém přenosu, a to z půdního prostředí primárním producentem na primárního konzumenta, stejně jako první důkaz o schopnosti bioakumulace těchto nanočástic ve tkáních [126].

Účinky na testovací organismus *Drosophila melanogaster* byly u těchto nanočástic rovněž studovány. Při expozici došlo k silnému nárůstu mortality a snížení schopnosti reprodukce, dále k fragmentaci DNA a k nadměrné expresi stresových proteinů HSP70. Nanočástice byly homogenně distribuovány do mnoha tkání i do reprodukčních orgánů [127].

2.4 Soli

2.4.1 Salinizace půd

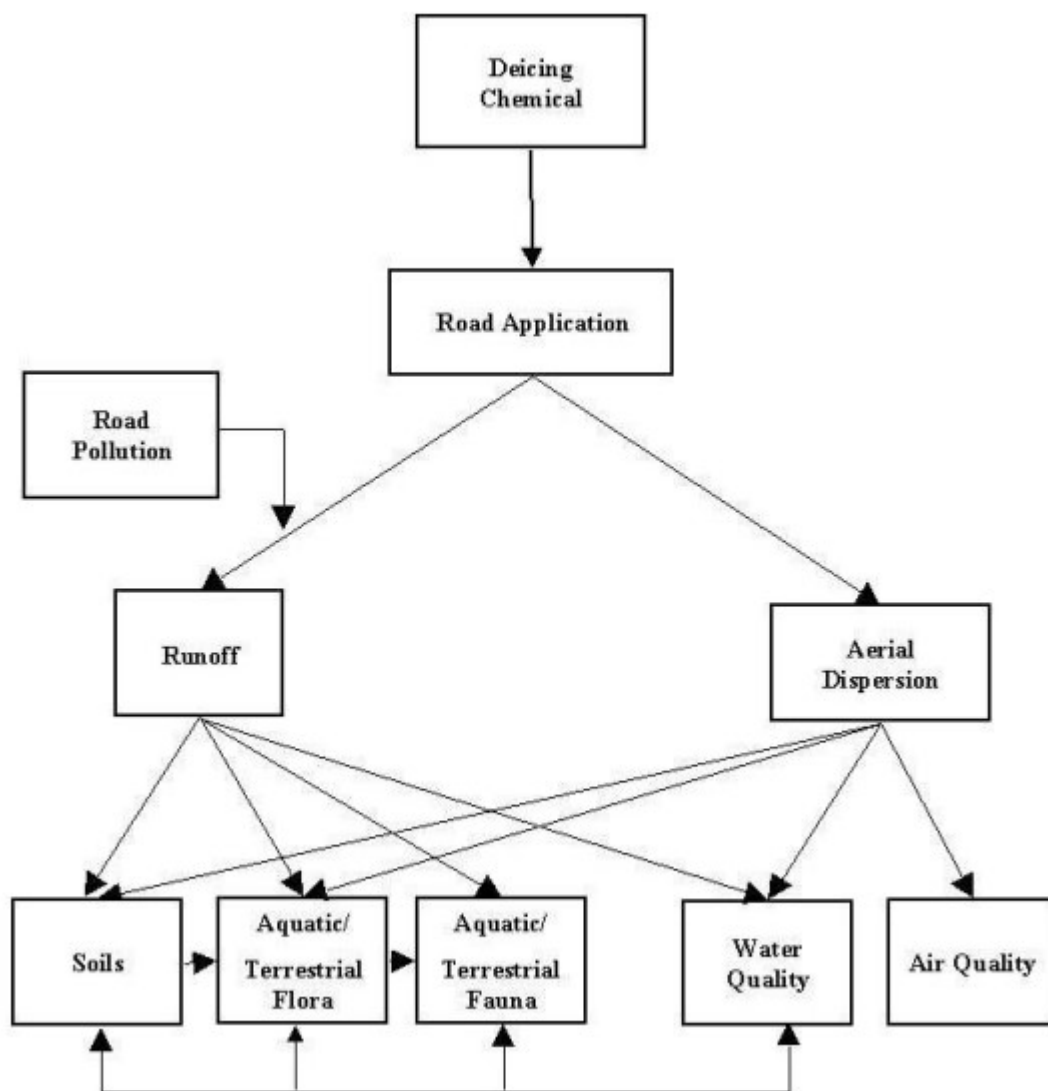
Půda neboli pedosféra je nejsvrchnější vrstvou zemské kůry. Vznikala v průběhu dlouhých let, a to zvětráváním matečních hornin a organických zbytků. Na procesu zvětrávání se podílí soubor půdotvorných faktorů, kterými jsou především voda, vítr, rostliny a živočichové, dále činnost člověka aj. Všechny živé složky, které s půdou přicházejí do vzájemné interakce, ji zpětně zase ovlivňují. Velmi významně zasahuje půda také do koloběhu vody a vzhledem k destruentům, kteří se v ní vyskytují, uzavírá rovněž cykly všech základních prvků [1,2].

Zasolené půdy jsou v důsledku zvýšené osmotické vazby vody suché. Důvodem je zejména vyšší koncentrace solí. Ty se dostávají do půd obvykle nadměrným používáním minerálních hnojiv, dále posypem komunikací v zimním období a nadměrným zavlažováním. Největší podíl na zasolení půdy v našich podnebných podmínkách má chemický posyp komunikací. Pro chemický posyp se používá nejčastěji chlorid sodný, případně v menší míře chlorid vápenatý a chlorid hořečnatý. Chlorid sodný je nejčastěji používaná sůl k ošetření vozovek; jeho hlavní výhodou je nízká cena a snadná skladovatelnost v porovnání s ostatními (anorganickými) solemi. Chlorid vápenatý je vzhledem k nepoměrně vyšší ceně, v porovnání s NaCl, méně často používaný samostatně. Přidává se však k NaCl a to tak, že se suché krystaly NaCl zkrápí roztokem CaCl₂.

Účinek solí na půdu a organismy v ní žijící je ovlivněn především polohou komunikace, na kterou se posypová sůl aplikuje a charakterem okolního terénu (lokality pod úrovní komunikace, sníženiny, mokřady a obecně podmáčená místa s vysokou hladinou podzemní vody, špatně propustné půdy). Kromě toho je ovlivňována také intenzitou solení a technologií údržby, kterou ovlivňují některé faktory: pořadí důležitosti komunikace, hustota provozu, frekvence údržby, a to v závislosti na povětrnostních podmínkách, pluhování a posypu. Dalšími abiotickými faktory jsou srážková činnost, intenzita slunečního záření a teplota. Předpokládaný osud solí v životním prostředí je znázorněn na následujícím obrázku (Obr. 8).

Vysoká slanost půdy snižuje její kvalitu, která je zpravidla spojována s nahromaděním iontů Na⁺ a Cl⁻ v důsledku používání NaCl jako posypové soli při údržbě komunikací; toto zasolení je tzv. liniové. Rostliny v blízkosti silnic mohou být poškozeny dvěma způsoby: jednak přímým stykem, tj. po aplikaci solí na povrch komunikací. Nepřímo potom tak, že solí jsou pozměněny vlastnosti půdy, zejména její struktura, dynamika půdních procesů a chemismus půdy. Přes kořenový systém potom dochází ke kontaktu rostlin s touto poškozenou půdou.

U rostlin vyskytujících se na zasolených půdách obvykle dochází k sesychání a nekrotizaci listů a jehlic, u listnatých stromů k předčasnému podzimnímu vybarvování a opadu; při růstu nových listů jsou listy menší a je jich méně (růstové odchylky). V literatuře se rovněž popisuje odumírání větví nebo části koruny, zpomalený růst, špatná násada květů a také plodů. V extrémních případech nejsou v dané půdě rostliny schopné přežít vůbec. Na zasolených půdách jsou schopny růst halofyty preferující vyšší obsah solí v půdě. Často se mezi nimi nacházejí sukulentní druhy. Obvykle na nich však nejsou schopny růst obiloviny, případně další rostliny pocházející ze zemědělské produkce [10,11,128,129].



Obr. 8: Popis osudu posypových solí v životním prostředí [129].

2.4.2 Ekotoxicita solí

Jak je zmíněno v předchozí kapitole, nadměrné množství solí v půdě nejen negativně ovlivňuje rostliny, avšak má rovněž dopad na organismy dalších trofických úrovní. Vlivy na půdní mikroorganismy byly sledovány v několika studiích [12,13]; citlivé druhy byly inhibovány v koncentracích obsahujících 60 mg/kg sodíku a 90 mg/kg chloridů. Mikroorganismy jsou důležité při udržování půdní struktury; v případě, když jsou inhibovány, je půda náchylnější k erozi [130,131].

Testy toxicity byly provedeny v několika Owojoriových studiích na různých terestrických organismech, např. žížalách *E. fetida*, roupicích *Enchytraeus albidus* a chvostoskocích *F. candida*. V jeho studiích bylo použito metod aplikovaných v několika testech: 28 denní test toxicity podle OECD na žížalách, 28 denní test toxicity podle OECD na roupicích, 28 denní test toxicity podle ISO normy na chvostoskocích a 48 hodinový test únikového chování žížal podle normy ISO. Nejvíce jeho publikovaných poznatků je zaměřeno na testování toxicity NaCl na organismu *E. fetida*. V jeho studii z roku 2008 [132] jsou prezentovány hodnoty toxicity NaCl pro *Eisenia fetida* LC50d28=5436 mg/kg suché půdy, EC50d28=4985 mg/kg suché půdy a EC50d28=2020 mg/kg suché půdy pro produkci kokonů. V jeho následující práci [15] jsou prezentovány letální koncentrace pro vybranou škálu solí, tj. pro NaCl, NaNO₃, NaHCO₃, Na₂HPO₄ a Na₂SO₄. Z těchto testovaných sloučenin byl nejvíce toxický NaNO₃ (LC50=4504,7 mg/kg suché půdy) a nejméně toxickými sloučeninami byly NaHCO₃ (LC50≥7305,4 mg/kg suché půdy) a NaCl (LC50=9240,8 mg/kg suché půdy). Bylo zjištěno, že v porovnání s hodnotami stanovenými pro mikroorganismy jsou žížaly méně citlivé k zasolení půdy [9,14,15,132].

V testech únikového chování byla sledována rychlá odezva na kontaminovanou půdu u dvou druhů žížal. Hodnoty únikovosti se pro jednotlivé druhy žížal lišily a poukázaly tak na obecně známé toxikologické pravidlo, tj. že každý organismus je vůči testované látce jinak citlivý, tj. že výsledky ekotoxikologických testů jsou nepřenositelné; kromě toho je velice důležité důkladně posoudit, z jakých ekotoxikologických testů se bude skládat celá testovací baterie. Bylo zjištěno, že u prvního druhu žížaly *Aporrectodea caliginosa* byla hodnota únikovosti 667 mg NaCl/kg suché půdy a u druhého druhu žížaly *E. fetida* byla tato hodnota 1164 mg NaCl/kg suché půdy, tj. téměř dvojnásobná. Žádný jiný test únikového chování prováděný v souvislosti s testováním solí nebyl v dostupné literatuře nalezen [9].

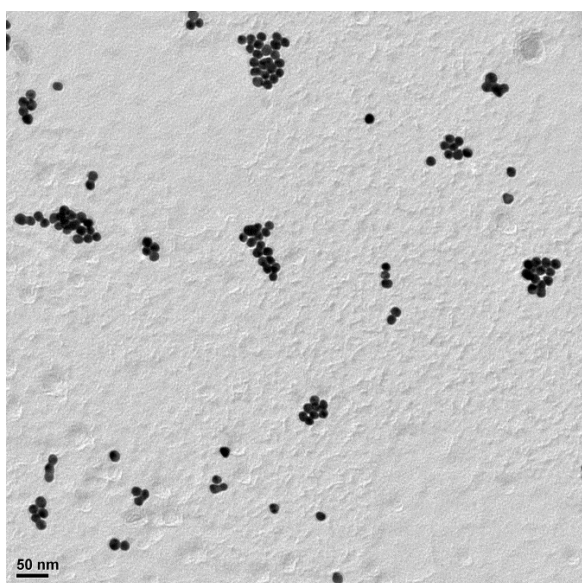
Při sledování toxicity solí je rovněž důležité vzít v úvahu to, že každá sůl se skládá z kationtu a aniontu, a proto je toxicita soli výsledkem silně závislým na konkrétním kation-anion páru. Individuální toxicita jednotlivých iontů, ze kterých se skládá testovaná sůl, může být proto snížena nebo naopak zvýšena; tento poznatek však je velice individuální a u každé soli je jedinečný. Tato problematika byla popsána v několika studiích, např. v následující publikaci je uvedeno [133], že různé soli vykazovaly rozdílné účinky na testovací organismy, přestože se testovalo pouze několik druhů kationtů a aniontů; z výsledků bylo patrné, že toxicita je způsobena specifickými mechanismy probíhajícími mezi ionty. Výsledky této studie představují obecný trend toxicity pro *P. subcapitata*: KCl=NaCl > Na₂SO₄=CaCl₂ > K₂SO₄; obecný trend akutní a chronické toxicity pro *L. minor* byl v pořadí: Na₂SO₄>NaCl=KCl>CaCl₂>K₂SO₄ [133].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie a materiál

Testované chemikálie

Nanočástice zlata byly dodány společností INMETRO (National Institute of Metrology, Quality and Technology; Rio De Janeiro, Brazílie). Jednalo se o růžovočervený vodný roztok obsahující 0,006 % (w/w) zlata. Nominální průměrná velikost částic byla 15,7 nm, ζ -potenciál byl -30.4 mV a jejich tvar byl sféroidní, jak je vidět na následujícím obrázku (Obr. 9).



Obr. 9. TEM fotografie zlatých nanočástic, fotografii dodal INMETRO.

Chlorid zlatitý ($\text{AuCl}_3 \geq 99.99\%$ stopové prvky, CAS číslo 13453-07-1), Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo).

Chlorid sodný, chlorid draselný, dusičnan sodný, dusičnan draselný, analytické čistoty, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo).

Chemikálie potřebné pro pitvu zvířat následují po expozici

Fyziologický roztok pro *P. scaber* byl připraven podle publikovaného protokolu Hagedorn & Ziegler [135]. Tris(hydroxymethyl)aminomethan, chlorid sodný, chlorid draselný, chlorid hořečnatý a glukóza byly dodány společností Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo). Všechny chemikálie byly analytické čistoty (EMSURE[®]). Roztok byl připraven použitím deionizované vody (Milli Q, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA [pH=5.7, $\rho=18.5 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$]).

Chemikálie potřebné pro přípravu histologických sekcí

Absolutní ethanol, analytické čistoty (EMPARTA[®], Merck, Darmstadt, Německo).
Ledová kyselina octová $\geq 99.85\%$, analytické čistoty (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo).
Xyleny, ACS činidlo, $\geq 98.5\%$ xyleny + ethylbenzen (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo).
Chloroform, analytické čistoty (EMSURE[®], Merck, Darmstadt, Německo).
Paraplast Plus[®] vosk pro vkládání tkání (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo).
Pertex[®] zalévací médium (Leica Biosystems, Nussloch, Německo).
Disodná sůl eosinu Y, obsah barviva $\geq 85\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo).
Hematoxylin v krystalické formě pro mikroskopii (Merck, Darmstadt, Německo).

Deionizovaná voda (Milli Q, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA [pH=5.7, $\rho=18.5 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$]).

Carnoy-B, histologické fixativum, bylo připraveno smícháním absolutního alkoholu, chloroformu a ledové kyseliny octové v objemovém poměru 6:3:1.

Chemikálie potřebné pro stanovení integrity buněčné membrány

Akridinová oranž, dvouprocentní vodný roztok (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo).

Ethidium bromid jednoprocenní vodný roztok (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo).

Deionizovaná voda (Milli Q, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA [pH=5.7, $\rho=18.5 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$]).

Chemikálie potřebné pro přípravu vzorků pro měření na AAS

65% dusičná kyselina, analytické čistoty (Fischer Scientific, Loughborough, Leicester, UK)

30% H_2O_2 , analytické čistoty (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Itálie)

Deionizovaná voda (Milli Q, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA [pH=5.7, $\rho=18.5 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$]).

Standard zlata pro AAS, 1 mg Au/ml (*TraceCERT*[®], Sigma Aldrich, Steinheim, Německo).

Chemikálie potřebné pro zavedení testu v laboratořích CHTOŽP

Chlorid kobaltnatý dihydrát (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo), destilovaná voda.

3.2 Testy toxicity v laboratořích CHTOŽP

3.2.1 Zavedení testování na *P. scaber*

Úspěšně byl zaveden chov pozemních stejnonožců a také byla provedena potřebná příprava, která je nutná před testováním tohoto organismu.

Nejprve byly na podzim opatřeny listy lísky obecné na nekontaminovaném území Chráněné krajinné oblasti Žďárské vrchy. Vždy se musí jednat o listy spadlé, které byly na půdě ponechány minimální dobu 14 dní, aby byly již částečně natrávené půdními mikroorganismy (Obr. 10). Tyto listy se ponechají na tmavém suchém místě volně oschnout a následně se uchovávají do doby testování. Před testem se listy ponechají namočené v nádobě s destilovanou vodou; stačí 1 hodina. Dále se listy narovnají a nechají vylisovat a uschnout mezi listy papíru. Listy se následně upraví pro test tak, že z každého listu je obvykle vystřižnuto jeden až dva kousky o hmotnosti v rozmezí 90 až 110 mg, nejlépe však je, když listy dosahují stejné hmotnosti cca 100 mg. Na takto připravený list se aplikuje testovaná substance ve vodném roztoku – 100 µl. Rozetře se za použití štětečku po celé spodní části listu, přičemž je však nutné se vyhnout drobným žilkám, které jsou pro tento organismus nestavitelné a kde by testovaná substance nebyla pro organismus dostupná. Takto připravený list se ponechá uschnout cca 24 hodin na vzduchu za laboratorní teploty a zaznamená se jeho přesná hmotnost.



Obr. 10: Zobrazení přípravy listů pro testování s *P. scaber*.

Dalším krokem bylo nachystat si chov stejnonožců v našich laboratorních podmínkách. Organismy byly sesbírány na jaře v oblasti Jižní Moravy ve staré zemědělské usedlosti. Do laboratoře byly přemístěny v menší plastové nádobě, kde na dno bylo umístěno cca 2 cm

LUFA 2.2 půdy, nad kterou byla vrstva opadanky. V laboratoři bylo nachystáno průhledné plastové terárium (popř. skleněné) s horním víkem perforovaným malými otvory sloužícími pro výměnu vzduchu. Na dno nádoby byla umístěna opět LUFA 2.2 půda ve vrstvě cca 5 cm. Na ní potom vrstva opadanky obsahující samozřejmě i listy lísky obecné, dále pak listy olše lepkavé (*Alnus glutinosa*), břízy bělokoré (*Betula pendula*) a javoru babyky (*Acer campestre*). Další vrstvu tvořily potom kameny, kůra a klacky, pod které se tyto stín a vlhko vyhledávající jedinci mohou schovat (Obr. 11).

Organismy se nechají po minimální dobu dva týdny aklimatizovat vůči novým podmínkám a zkontroluje se jejich úmrtnost. Ta by měla být nízká, neměla by překročit 10 %. Potom se již organismy mohou použít do testu toxicity.



Obr. 11: Založení chovu *P. scaber*.

3.2.2 Zavedení testu toxicity 14 dní

Byl zaveden test toxicity a u něho byla dodržena metodika detailně popsaná v teoretické části. Stručně však je v následujícím textu uvedeno shrnutí přípravy, průběhu a vyhodnocení testu. Před testem byl každý jedinec zvážen; jeho hmotnost by měla být v rozpětí 40 až 60 mg. Zkontroluje se jeho fyzický stav, především pak, jestli se nejedná o jedince, kteří se začínají svlékat nebo oplodněné samice. Pokud se přesto tyto jedinci v testech objeví, například se začnou svlékat v průběhu expozice, jsou výsledky pomocí nich získané z toxikologické studie vyloučeny. Dále se určí jejich pohlaví a spolu s hmotností se tyto údaje zaznamenají.

Test probíhá v Petriho miskách; do každé řádně označené misky je vložen jeden list s testovanou substancí, popř. pouze s destilovanou vodou (kontrolní skupina) a jeden testovací organismus. Pro testovanou látku, v našem případě je standardní látkou chlorid kademnatý, byla připravena koncentrační řada o třech koncentracích, 1000, 2000 a 5000 $\mu\text{g/ml}$. Každá koncentrace měla 15 opakování a test obsahoval kontrolu rovněž o 15 opakováních.

Všechny horní víčka Petriho misek byla pro zachování dostatečně vlhkého prostředí před testem lehce ovlhčena destilovanou vodou. Následně pak byly všechny misky umístěny do plastového terária.

V průběhu testu bylo každý druhý den ovlhčeno horní víčko Petriho misky a zaznamenán počet přeživších jedinců. Jednou v průběhu testu, a to sedmý den, byly odstraněny fekální peletky do předem zvážených zkumavek Eppendorf o objemu 2 ml. Po skončení expoziční doby (14 dnů) byly testovací organismy zváženy. Dále byly opět sesbírány fekální peletky a společně s listy byly nechány 24 hodin uschnout na vzduchu, poté byly listy i peletky zváženy a hmotnosti byly zaznamenány. Všechny odečtené hodnoty byly použity při výpočtech tzv. Feeding parameters, tj. stravovacích parametrů. Byla také určena mortalita a vliv na hmotnost jedince v průběhu testu. Bylo prokázáno, že chlorid kademnatý má toxický vliv na testovací organismus a jeho účinky jsou koncentračně závislé.

3.2.3 Zavedení únikového testu v půdě

Tento test byl zaveden jako rychlý 48 hodinový screeningový test ukazující prvotní reakce organismu při stykem s testovanou látkou obsaženou v různých koncentracích v půdě.

Tento test byl realizován ve dvou polypropylenových plastových nádobkách o objemu cca 100 ml propojených polypropylenovou plastovou trubičkou o délce 4 cm a šířce 1,3 cm, která slouží k přemísťování organismu z jedné nádoby do druhé a zpět. V každé nádobce je na dně umístěno 20 gramů půdy LUFA 2.2. (Obr. 12). V jedné nádobce je pouze kontrolní ovlhčená půda a ve druhé půda kontaminovaná testovanou substancí, aplikovanou ve vodném roztoku. I v tomto případě se jednalo o prvotní test s chloridem kademnatým, jako standardní látkou pro testování pozemních stejnonožců.

Do testu byli rovněž použiti jedinci, a to alespoň po dvou týdenní aklimatizaci na laboratorní podmínky. Byli vybráni jedinci o hmotnosti v rozmezí 40 – 60 mg, bez stop svlékání vnějšího skeletu a bez známek pregnancy. Do každé testovací soustavy nádob byl umístěn jeden jedinec; opakování pro kontrolu a pro každou koncentraci bylo 15. Byly testovány koncentrace 1000, 2000 a 5000 mg soli/kg půdy, tj. 1, 2 a 5 g soli/kg půdy.

V průběhu testu bylo provedeno 10 kontrol pozice organismů. Tyto pozice byly zaznamenány a byla vyhodnocena únikovost vůči kontaminované půdě.



Obr. 12: Schéma únikového testu v půdě.

3.2.4 Zavedení únikového testu vůči potravě

Tento test je 14 denní test toxicity studující preferenci ve volbě potravy testovacích organismů. Každý organismus má po celou dobu testu možnost konzumace kontrolního listu lísky obecné, tj. listu pouze po aplikaci destilované vody a také listu kontaminovaného testovanou látkou v dané koncentraci.

Do každé Petriho misky byly umístěny dvě kousky (každý 50 mg) jednoho listu. Na první část byla aplikována pouze destilovaná voda (50 μ l), na druhou část potom testovaná látka, tj. chlorid kademnatý (50 μ l) ve třech koncentracích; 1000, 2000 a 5000 μ g/ml. Obě části byly rozeznány na základě jejich tvaru; kontrola byla vždy čtverec a kontaminovaná část měla nepravidelný, spíše kulovitý tvar.

Test probíhal podobně jako test toxicity, trval 14 dní; na začátku a potom každý druhý den bylo ovhčována horní víčko Petriho misky. Po sedmi dnech a na konci testu byly přesunuty peletky do zkumavek Eppendorf. Zaznamenávána byla v průběhu i případná mortalita. Na konci testu byly organismy vyjmuty a zváženy. Peletky a zbytky listů byly nechány 24 hodin schnout při laboratorní teplotě a poté byly zváženy a odečtené hodnoty sloužily jako podklad pro vyhodnocení únikovosti vůči potravě.

3.3 Testy toxicity v laboratořích Bionanoteamu

3.3.1 Testy toxicity zlatých nanočástic

3.3.1.1 Test toxicity 14 dní

Tento test byl proveden přesně podle výše popsané metodiky.

Nejprve byly připraveny roztoky zlatých nanočástic a chloridu zlatitého o koncentracích 10 a 60 $\mu\text{g Au/ml}$ v deionizované vodě (Milli Q, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA [pH=5,7, $\rho=18,5 \text{ MOhm}\cdot\text{cm}$]) za použití vortexu (20 s, 2000 otáček za minutu). Žádné stabilizátory nebyly použity, a roztoky byly čerstvě připraveny pro každý experiment, přičemž 100 μl připravených roztoků bylo aplikováno na 100 mg listu, vždy na jeho spodní stranu. Výsledkem byla konečná koncentrace 10 a 60 $\mu\text{g Au/g}$ suché listu. Na kontrolní listy byla aplikována pouze deionizovaná voda. Listy byly ponechány schnout po dobu 24 hodin při pokojové teplotě a po uplynutí této doby byly suché listy zváženy.

Pro každou koncentraci bylo uskutečněno 15 opakování. Celý experiment byl rozdělen na dva pokusy, nejprve byla testována toxicita nanočástic zlata, potom chloridu zlatitého; oba pokusy zahrnovaly kontrolní skupinu.

Po 14 denní expozici organismů testované substanci následovala tzv. eliminační fáze v čistém prostředí (jeden den), během které byli jedinci přemístěni do Petriho misky s listem lisky obecné cca 30 mg a zde byli ponecháni z důvodu eliminace zbytků kontaminované stravy ze střev. Zaznamenán byl počet uhynulých jedinců. Potom byli přeživší jedinci zváženi a následovala jejich pitva a analýza jednotlivých částí těla. Také byla zaznamenána hmotnost fekálních peletek a zbytků listů z testu (vše bylo ponecháno uschnout před vážením při pokojové teplotě po dobu 24 hodin).

Experiment byl považován za platný, protože úmrtnost v kontrolní skupině nepřekročila 20 %. Přeživší organismy po testu byly postupně pitvány. Nejprve jim byla odstraněna hlava pinzetou a následně pak mohly být vyndány z jejich těla trávicí žlázy a střevo. Během pitvy byl u trávicích žláz a střev zaznamenán jejich přesný popis, především pak veškeré abnormality zjištěné u jejich barvy a tvaru. Okamžitě po vyjmutí těchto vnitřností následovalo jejich rozdělení pro další analýzy. Jedna trávicí žláza byla okamžitě převedena do Carnoy-B fixačního roztoku pro histologické stanovení, druhá trávicí žláza byla použita v testu stability buněčné membrány, třetí společně se střevem a "zbytek" těla (tvoří odtržená hlava a krunýř) byly použity pro měření bioakumulace zlata. Čtvrtá žláza byla ponechána jako rezervní v případě nejasnosti výsledku, nebo v případě potřeby opakování jakéhokoliv stanovení.

Integrita buněčné membrány v trávicích žlázách

Pro stanovení integrity buněčné membrány byla použita zkouška označována jako AO/EB test, kde trávicí žláza je vystavena ve zkumavce po dobu 5 minut působení směsi fluorescenčního barviva - akridinová oranž a ethidium bromid – a následně pak byla přemístěna na podložní sklíčko a fotografována Axioimager Z1 fluorescenčním mikroskopem (Zeiss Carl, Jena, Německo). U tohoto mikroskopu byly použity dvě různé sady filtrů. Nejprve byl aplikován excitační filtr s rozsahem vlnových délek 450 až 490 nm a emisní filtr o vlnové délce 515 nm, které byly použity pro vizualizaci částí žlázy obarvených pomocí akridinové oranže. Pro vizualizaci částí obarvených ethidium bromidem byl použit excitační filtr o vlnové délce 365 nm a emisní filtr o vlnové délce 397 nm.

Integrita buněčné membrány byla hodnocena na základě zkoumání mikroskopických snímků vizuálně a jednotlivé snímky byly klasifikovány od 1 do 10 stupně poškození podle předem dané stupnice.

Stanovení bioakumulace zlata

Trávicí žláza, střevo a „zbytek“ těla z každého organismu byly umístěny do jedné zkumavky Eppendorf o objemu 1,5 ml. Potom následoval jejich mikrovlnný rozklad v koncentrované kyselině dusičné (65% HNO₃, Merck, Darmstadt, Německo) v Milestone Ethos E (Bergamo, Itálie), vybaveným SK-10 vysokotlakým segmentovaným rotorem a 3 ml křemennými mikrozkuvkami. Digesce byla provedena při teplotě 180 °C a energii 600 W, s krokem 1 (ohřev) trvající 15 min, krok 2 (konstantní teplota) v trvání 10 minut a následném 45 minutovém chlazením na 60 °C. Celková koncentrace Au byla měřena pomocí plamenové AAS (Perkin-Elmer AAnalyst 100, Waltham, Massachusetts, USA).

Plamenovou AAS byla rovněž měřena koncentrace zlata na listech a to tak, že po testu bylo odváženo cca 25 mg listu, rozloženo opět v koncentrované kyselině dusičné mikrovlnným rozkladem ve stejném programu; potom následovalo změření obsahu zlata pomocí plamenové AAS, které bylo přepočteno na celkovou hmotnost listů a byla stanovena i skutečná koncentrace, které byly jednotlivé organismy vystaveny Tab. 2.

Tab. 2: Nominální a skutečné koncentrace zlatých nanočástic (Au NPs) a chloridu zlatitého.

Testovaná látka	Nominální koncentrace μg Au/g	Koncentrace na listech μg Au/g
Test toxicity		
Au NPs	10	8,6
	60	54,8
AuCl ₃	10	9,7
	60	59,0
Test únikového chování		
Au NPs	10	8,9
	60	55,6
AuCl ₃	10	9,4
	60	57,9

Příprava histologických sekcí trávicích žláz

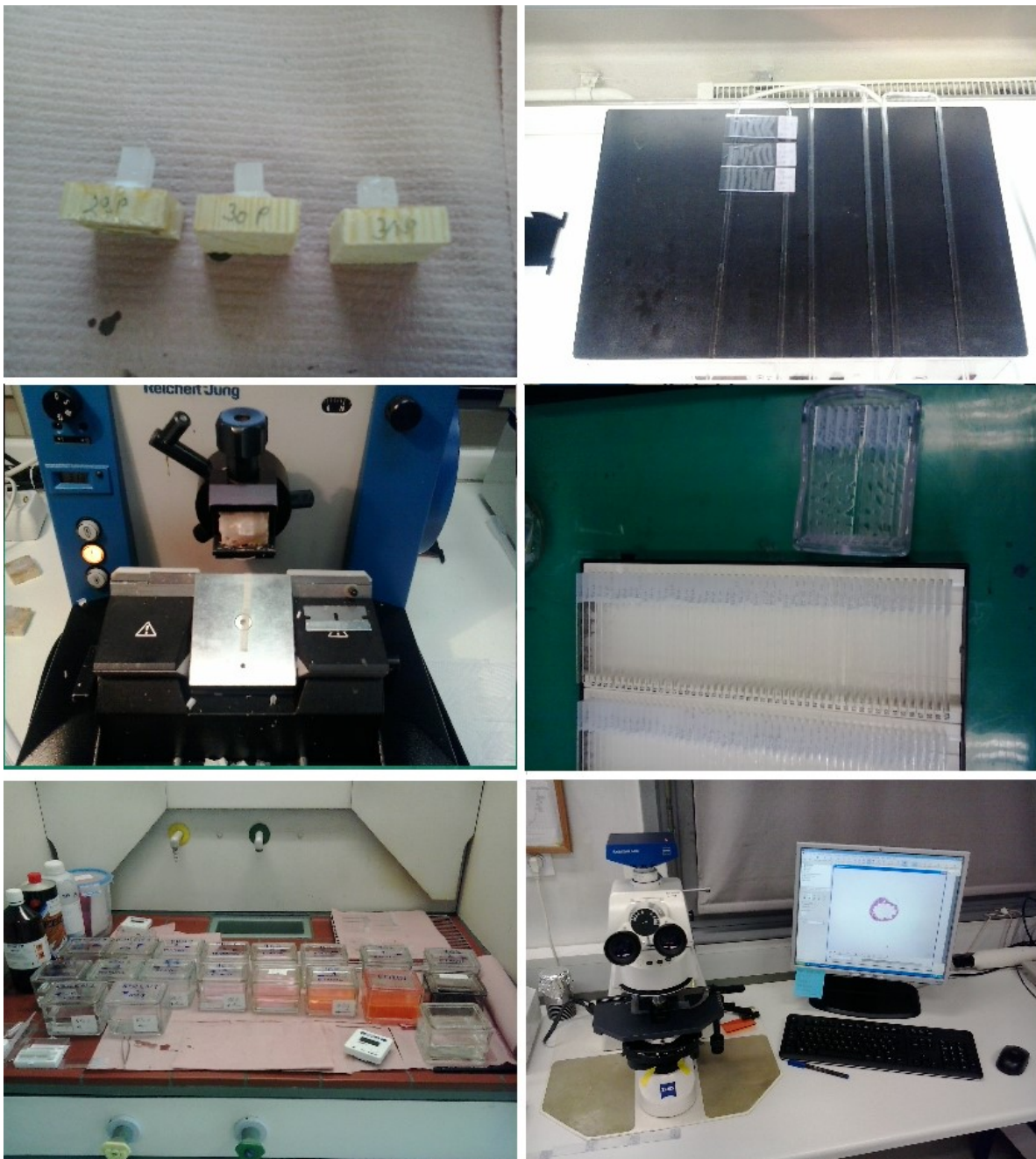
Jedna trávicí žláza z každého testovaného organismu byla ihned po pitvě vložena do Carnoy-B roztoku a byla zde ponechána po dobu 24 hodin při pokojové teplotě. Následně byly jednotlivé trávicí žlázy dehydratovány postupně v 70% alkoholu, 80% alkoholu, 96% alkoholu a v absolutním alkoholu (vždy po dobu cca 30 minut); potom byly žlázy přeneseny do xylenu (cca 20 minut) a následně vloženy do aluminiového boxu o rozměrech 1x1x1 cm a naplněny Paraplast Plus® voskem o teplotě 56 °C, umístěny do termostatického inkubátoru, kde byly také ponechány přes noc.

Následující den byly žlázy v hliníkových nádobkách zalité voskem vyjmuty a nechány při laboratorní teplotě ztuhnout. Potom byly z každé žlázy nařezány mikrotomy o šířce 8 μm (Reichert-Jung 2.040 rotační mikrotom, Leica Microsystems, Wetzlar, Německo). Takto připravené řezy - mikrotomy byly šetrně přemístěny na mikroskopické sklíčko. Následovalo odstranění vosku (řadou alkoholů a xylenu), obarvení eozinem a hematoxylinem, zafixování barviva kanadským balzámem a zhotovení snímků pod světelným mikroskopem (Axioskop 2 MOT, Carl Zeiss, Jena, Německo). Analyzováno bylo vždy celkem 7 histologických řezů

z každé trávicí žlázy a tyto snímky pak sloužily jako podklady pro zhodnocení fyziologického stavu testovaných jedinců (Obr. 13).

Posouzení fyziologického stavu stejnonožců

Fyziologický stav testovaných jedinců byl hodnocen na základě kombinace dvou parametrů; jednalo se o tloušťku epitelu trávicích žláz (ve stupních) a četnost výskytu lipidových kapének v B buňkách (třídy). Tyto parametry trávicích žláz byly sledovány u 39 jedinců; oba pak byly zjišťovány v trávicí žláze téhož zvířete. Hodnocení odezvy na testované nanočástice zlata a na chlorid zlatitý potom vycházelo z poznatků o sledovaných parametrech prezentovaných v publikaci [66], kde jsou tyto fyziologické parametry uvedeny pro organismy bez stresu, např. odebraných přímo z chovu a potom jsou porovnány s kontrolní skupinou v testu toxicity.



Obr. 13: Příprava histologických sekcí trávicích žláz organismu *P. scaber*.

3.3.1.2 *Test únikového chování vůči potravě*

Tento test byl proveden v souladu s již publikovaným protokolem uveřejněným v literatuře [54]. Příprava testovaných látek, jejich aplikace na listy a výběr testovacích organismů byl proveden stejným způsobem jako v testech toxicity. Každý testovací organismus byl umístěn do plastové Petriho misky, ve které byly umístěny dva kousky o hmotnosti 50 mg stejného listu lísky obecné. První část listu, cca 50 mg, je nekontaminovaná (aplikováno pouze 50 µl destilované vody), druhá část listu lísky obecné, opět cca 50 mg, je kontaminovaná (aplikováno 50 µl testované suspenze). Listy jsou rozlišeny tvarem, čtverec – kontrola, trojúhelník – testovaná látka. Testovány byly rovněž nanočástice zlata, chlorid zlatitý (v koncentracích 10 a 60 µg Au/g suchého listu) a jako pozitivní kontrola byl použit chlorid kobaltnatý (koncentrace 2000 µg Co/g suchého listu). Bylo testováno celkem šest kombinací: "0 (kontrola) vs. 0 (kontrola)", "pozitivní kontrola CoCl₂ vs. 0", "Au NPs 10 vs. 0", "Au NPs 60 vs. 0", "AuCl₃ 10 vs. 0" a "AuCl₃ 60 vs. 0". Tento test byl proveden s 15 testovacími organismy pro každou kombinaci; doba expozice byla 14 dní. Experimentální podmínky byly stejné jako v testu toxicity, kromě toho, že na konci testu zvířata nebyla podrobena eliminační fázi ani pitvě. Byla vypočtena celková konzumace stravy (z obou zdrojů nabízené stravy) a následně pak procentuální zastoupení stravy kontaminované vs. kontrolní. Skutečné koncentrace zlata v připravených suspenzích a taktéž na listech byly zjišťovány pomocí plamenové AAS; postupováno bylo stejně jako v předchozím testu a výsledné koncentrace jsou uvedeny v tabulce Tab. 2.

3.3.2 Testy toxicity anorganických solí

3.3.2.1 *Test toxicity 14 dní*

Tento test byl proveden přesně podle výše popsané metodiky; po 14 denní expozici organismů testované substanci, v tomto případě chloridu draselného a sodného, dusičnanu draselného a sodného, byla stanovena mortalita, vliv na svlékání exoskeletu (Moulting), vliv na konzumaci stravy (Feeding Rate) a účinnost růstu (Growth Efficiency). Tyto parametry byly vybrány pro zhodnocení toxicity.

Byly testovány koncentrace 1, 2 a 5 g soli/kg suchého listu, které jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 3), společně s koncentracemi jednotlivých iontů. Pro každou koncentraci bylo použito 15 testovacích organismů a pro kontrolu potom 30 testovacích organismů. Test byl validní, mortalita v kontrolní skupině nepřekročila 20 %.

3.3.2.2 *Test únikového chování v půdě*

Byla použita nesterilní standardní přírodní půda Lufa 2.2 (LUF A Speyer, Speyer, Německo). Její vlastnosti jsou následující: 1,77 ± 0,2% organické hmoty, 7,2 ± 1,2 % jílu, pH 5,5 ± 0,2 (0,01 M CaCl₂), kationtová výměnná kapacita (Cation Exchange Capacity) je 10,1 ± 0,5 meq/100 g a kapacita pro zadržení vody (Water Holding Capacity) je 41,8 ± 3,0 g H₂O/100 g suché půdy.

Před testem se stejnonožci byly definovány další vlastnosti půdy, jako je její vodivost a pH bez a s obsahem solí. Byl použit pH/konduktivity metr (Thermo Scientific Orion Star A215 Benchtop pH/Conductivity Meter); pH půdy bylo měřeno podle normy ISO DIN 10390:1994 a elektrická konduktivita byla měřena ve vodném extraktu (1:5) s dvakrát deionizovanou vodou. Stručně: pět gramů testované půdy bylo smícháno s dvakrát deionizovanou vodou, vzniklá suspenze byla důkladně třepána a následně nechána odstát 2 hodiny při laboratorní teplotě. Následně byly změřeny a zaznamenány hodnoty pH a konduktivity ve vodné fázi suspenze [15,135].

Půda do testu byla připravena dle normy OECD č. 222. Každá sůl byla rozpuštěna ve vodě v objemu potřebném pro dosažení 40 % WHC a pro získání finálních koncentrací 1, 2 a 5 g soli/kg suché půdy v separátních nádobách; půda byla následně přemístěna do testovacích nádobek. Kontrolní půda byla ovlhčena pouze deionizovanou vodou [136].

Test byl proveden podle výše popsané metodiky, tj. dvě propojené plastové nádoby spojené trubičkou určenou k migraci organismů. V každém testovacím schématu byla část kontrolní a část kontaminovaná; 0–0, 0–1, 0–2 a 0–5 g soli/kg suché půdy. Pro každou koncentraci bylo provedeno 12 opakování po jednom testovacím organismu. Testy probíhaly v inkubační komoře, teplota byla 22 ± 1 °C, relativní vlhkost 80 % a denní světelný režim 16/8 hodin světla/tmy. V průběhu testu proběhlo zaznamenání polohy organismu 10krát. Tyto pozice sloužily následně k vyhodnocení selektivní únikovosti.

Tab. 3. Hmotnostní koncentrace testovaných solí (NaCl, NaNO₃, KCl, and KNO₃) a iontů použitých v testu toxicity a v únikovém testu.

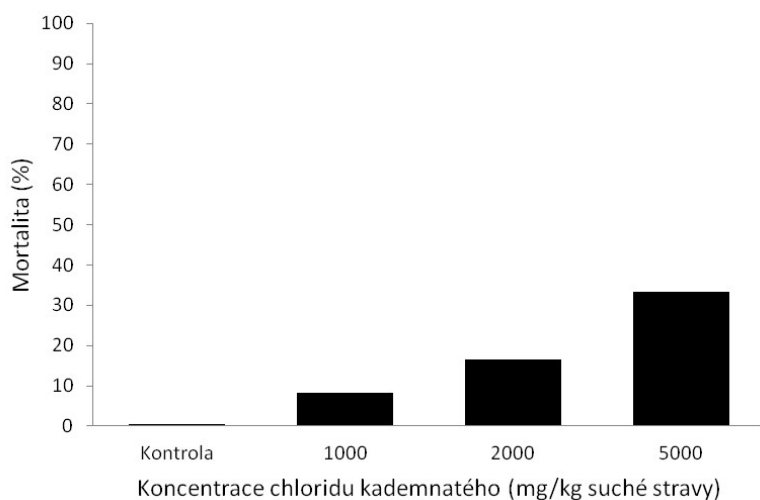
Testovaná sůl	Iont	Molární hmotnost [g/mol]	Hmotnostní koncentrace [g/kg]		
NaCl		58.4428	1	2	5
	Na ⁺	22.9898	0.393	0.787	1.967
	Cl ⁻	35.4530	0.607	1.213	3.033
NaNO ₃		84.9947	1	2	5
	Na ⁺	22.9898	0.270	0.541	1.352
	NO ₃ ⁻	62.0049	0.730	1.459	3.648
KCl		74.5513	1	2	5
	K ⁺	39.0983	0.525	1.049	2.622
	Cl ⁻	35.4530	0.476	0.951	2.378
KNO ₃		101.1032	1	2	5
	K ⁺	39.0983	0.387	0.773	1.934
	NO ₃ ⁻	62.0049	0.613	1.227	3.066

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

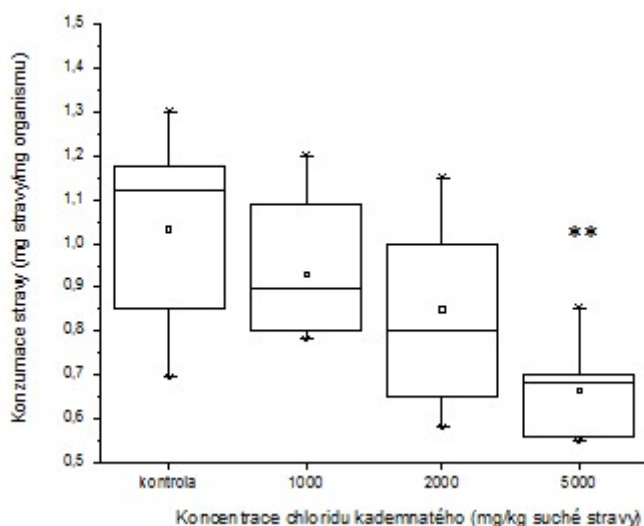
4.1 Testy toxicity v laboratořích CHTOŽP

4.1.1 Zavedení testu toxicity

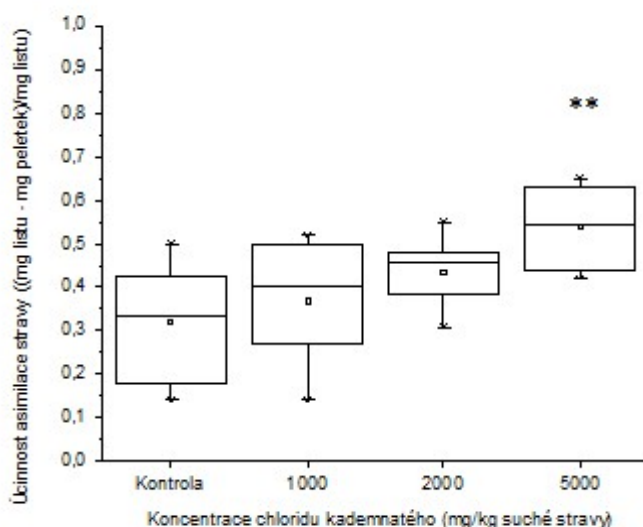
Na konci čtrnácti denní expozice byly zaznamenány údaje o mortalitě jedinců a hmotnosti listů, fekálních peletek a organismů; tyto údaje dále sloužily pro výpočet stravovacích parametrů. Bylo prokázáno, že mortalita byla ovlivněna ve všech testovacích koncentracích a byla závislá na koncentraci (Obr. 14). Na konci tohoto testu byl pozorován statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolou ve stravovacích parametrech, a to u nejvyšší zvolené koncentrace 5000 mg testované látky/kg suché stravy. Na následujících grafech (Obr. 15 a Obr. 16) jsou znázorněny výsledky dvou stravovacích parametrů, a to konzumace stravy a účinnost asimilace sravy (Mann-Whitney U -test, $p < 0.01$).



Obr. 14: Mortalita u stejnonožců *P. scaber* ve 14 denním testu toxicity, které je vyjádřeno v procentech z celkového množství organismů (100 % = 15 organismů).



Obr. 15: Zobrazení konzumace stravy testovacích jedinců *P. scaber* v testu toxicity. Symboly (\perp) představují maximální a minimální hodnoty, symbol (\square) střední hodnoty, statisticky významný rozdíl je označen hvězdami: $p < 0,01$ (**).



Obr. 16: Zobrazení účinnosti asimilace stravy testovacích jedinců *P. scaber* v testu toxicity. Symboly (⊥) představují maximální a minimální hodnoty, symbol (◻) střední hodnoty, statisticky významný rozdíl je označen hvězdami: $p < 0,01$ (**).

4.1.2 Zavedení únikového testu v půdě

Výsledky testu únikového chování v půdě mohou být prezentovány dvěma odlišnými způsoby, jedná se:

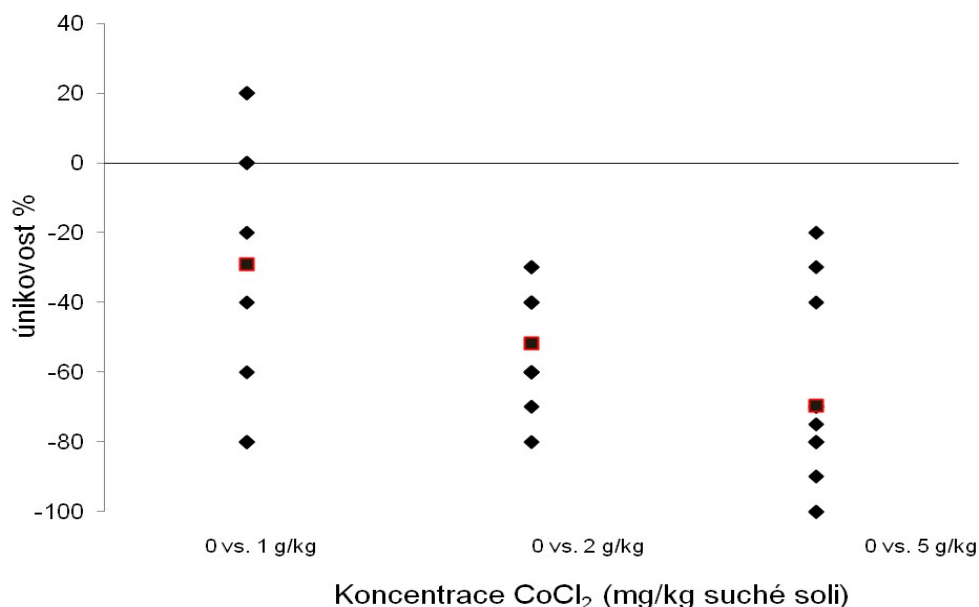
a) z celkového počtu kontrol (10) jsou vypočteny preference kontrolní anebo kontaminované strany v procentech

b) jako únikovost jednotlivých zvířat, která je vyhodnocena podle ISO 2008 kritérií [143].

Oba způsoby vyhodnocení jsou uvedeny pro testování anorganických solí (Kapitola 6.2.2.2.).

Ve vyhodnocení zavedení tohoto testu na chloridu kobaltnatém byl použit pouze způsob druhý, tj. únikovost jednotlivých organismů, která je vyhodnocena dle ISO 2008 (Obr. 17).

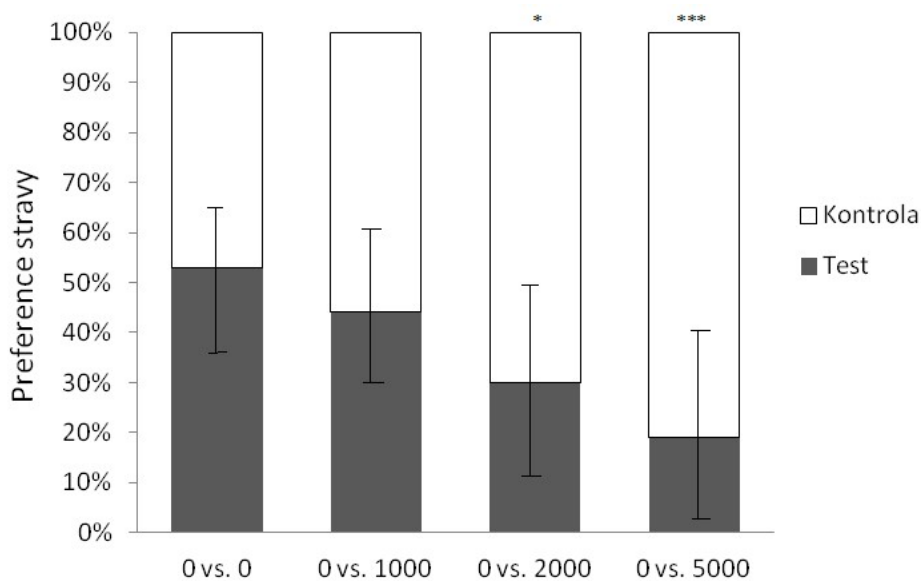
P. scaber je schopný si vybrat mezi kontrolní a kontaminovanou částí, a to podle toho, jak mu vybraný kontaminant vadí a v jaké je koncentraci. Jak vyplývá z výsledků testu s chloridem kobaltnatým, tato sůl mu vadí ve všech testovaných koncentracích, a pokud může, snaží se trávit čas na půdě nekontaminované. Při koncentraci 5000 mg/kg suché půdy stráví v nekontaminované části téměř 70 % času.



Obr. 17: Výsledky únikového testu v půdě pro *P. scaber*. Znázorněny dle normy ISO 2008. (osa x – koncentrace solí v g/kg, vs. – versus, černá barva – individuální hodnota, červená – průměr).

4.1.3 Zavedení únikového testu vůči potravě

Výsledky tohoto testu jsou zobrazeny v následujícím grafu (Obr. 18), kde je u každé ze čtyř expozičních kombinací znázorněno procentuální zastoupení kontaminované a kontrolní stravy z celkového zkonzumovaného množství v procentech. Hmotnost zkonzumovaných listů se statisticky významně nelišila (Mann-Whitney U-test, $p > 0,01$) u expozičních kombinací: "0 (kontrola) vs. 0 (kontrola)", "0 vs 1000". Statisticky významný rozdíl byl pozorován pouze u "0 vs 2000" (Mann-Whitney U-test, $p < 0,05$) a u "0 vs 5000" (Mann-Whitney U-test, $p < 0,001$).



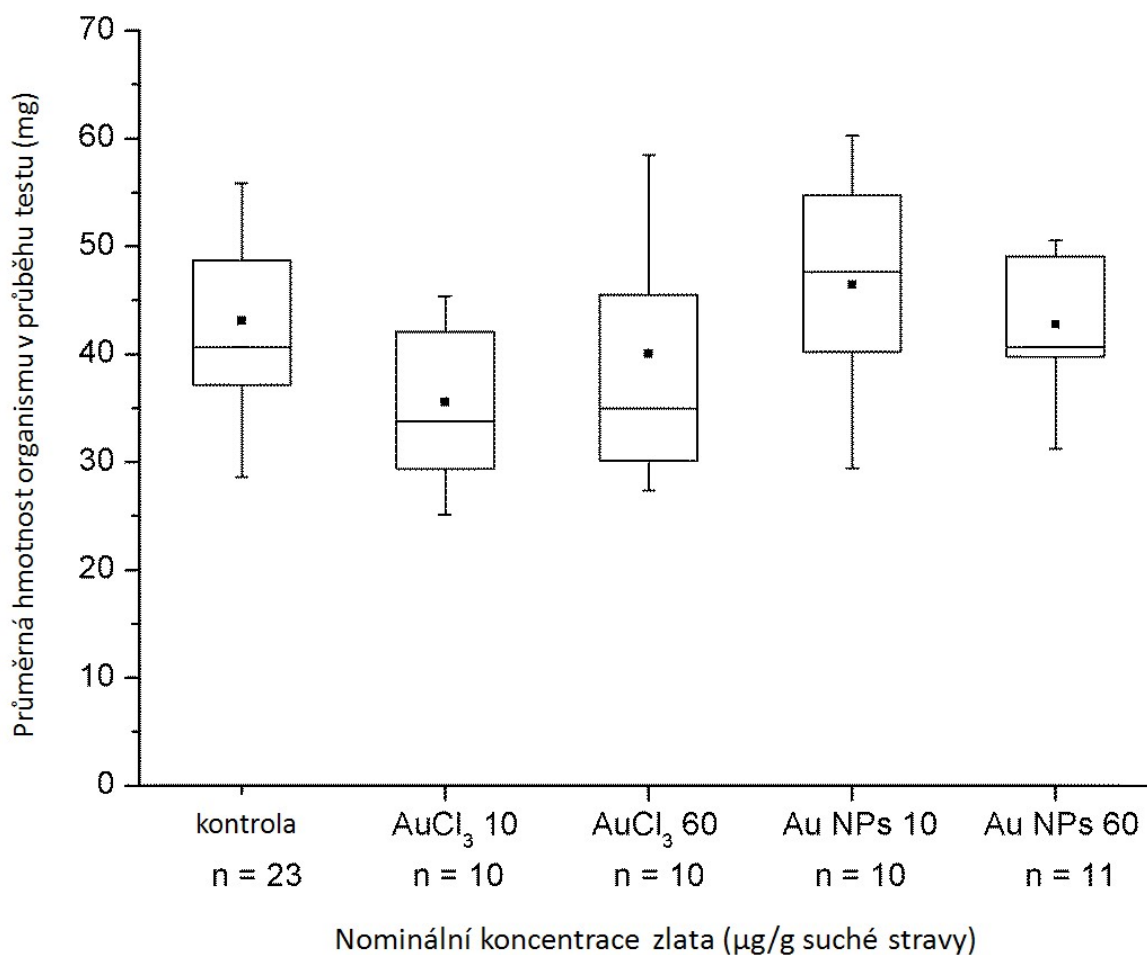
Obr. 18: Zobrazení konzumace kontrolní vs. kontaminované stravy v procentech u *P. scaber* v testu únikového chování vůči potravě. Nominální koncentrace chloridu kobaltnatého (mg/kg suché stravy) jsou uvedeny na ose x, statisticky významný rozdíl je označen hvězdami: $p < 0,05$ (*); $p < 0,001$ (***)

4.2 Testy toxicity v laboratořích Bionanoteamu

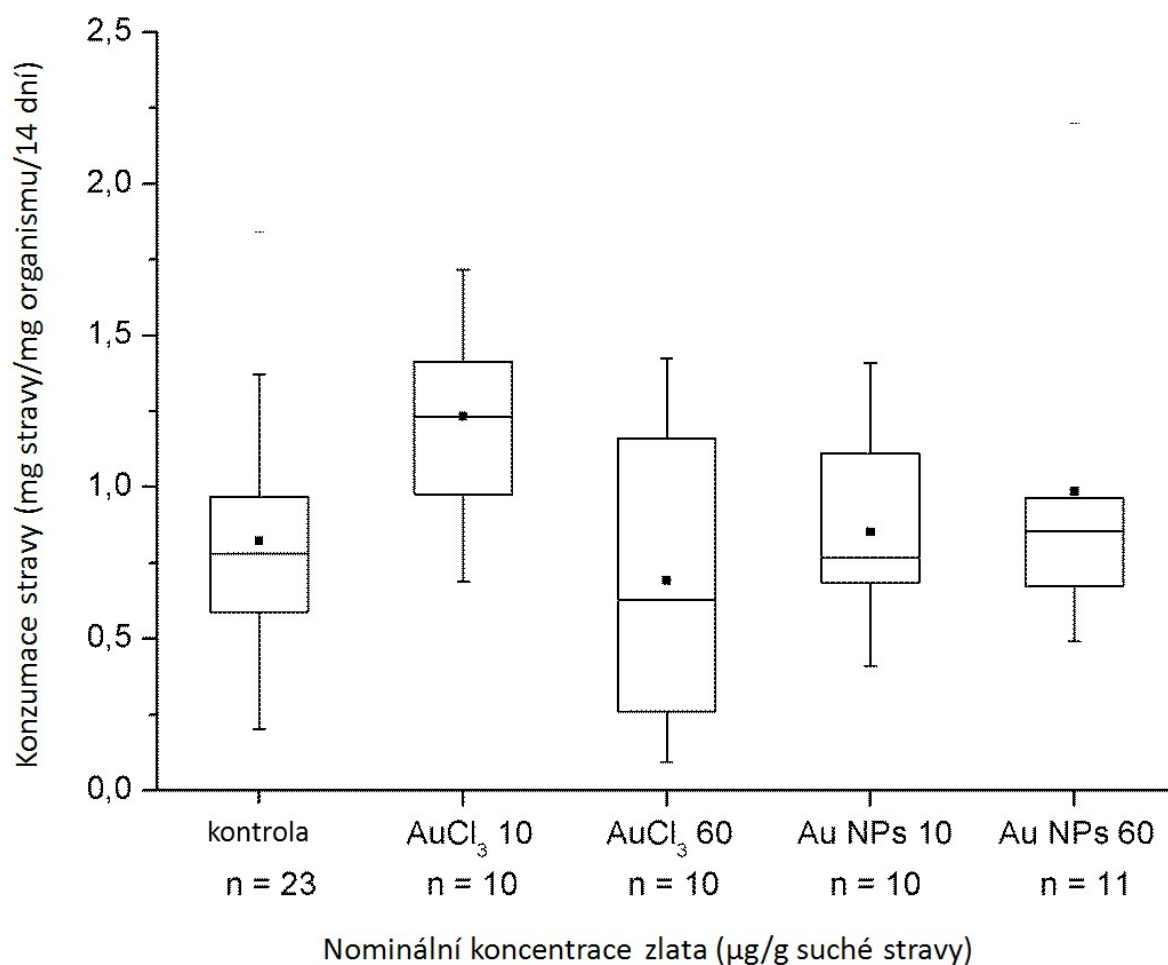
4.2.1 Testy toxicity zlatých nanočástic

4.2.1.1 Test toxicity 14 dní

Na konci čtrnácti denní expozice testu toxicity a následné eliminační fázi trvající jeden den, byl test ukončen a zaznamenané hmotnosti listů, fekálních peletek a organismů byly použity pro výpočty vlivu testovaných látek na stravovací parametry. Kromě toho byly použity záznamy o mortalitě jedinců v průběhu testu; tento parametr nebyl ovlivněn ani v kontrolní skupině. Výsledky dvou kontrolních skupin byly sloučeny. Na konci tohoto testu nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolou v end-pointech mortalita, změna hmotnosti testovacích organismů v testu (Obr. 19) a konzumace stravy (Obr. 20), (Mann-Whitney U -test, $p > 0.05$).



Obr. X19: Zobrazení průměrné hmotnosti testovacích jedinců *P. scaber* v testu toxicity. Hodnoty kontroly z prvního i druhého experimentu byly sloučeny; symboly (\perp) představují maximální a minimální hodnoty, symbol (■) střední hodnoty a n je počet jedinců v každé testované skupině.

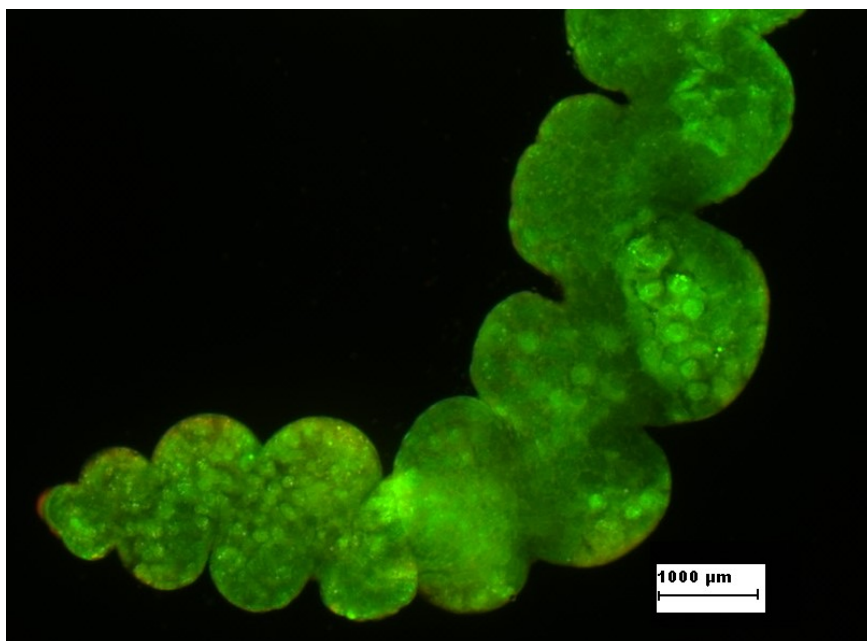


Obr. 20: Zobrazení konzumace stravy testovacích jedinců *P. scaber* v testu toxicity. Hodnoty kontroly z prvního i druhého experimentu byly sloučeny; symboly (\perp) představují maximální a minimální hodnoty, symbol (\blacksquare) střední hodnoty, symbol (-) odlehlé hodnoty a n je počet jedinců v každé testované skupině.

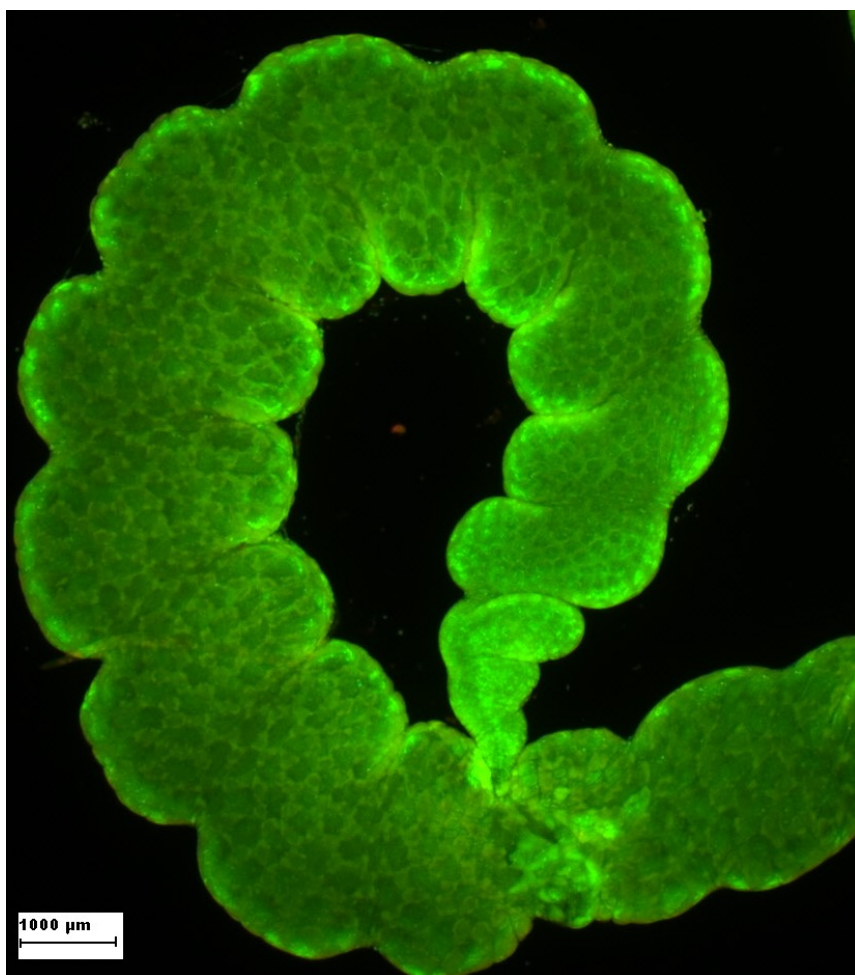
Integrita buněčné membrány v trávicích žlázách

Integrita buněčné membrány byla hodnocena na základě posouzení mikroskopických snímků vizuálně. Jednotlivé snímky byly klasifikovány od 1 do 10 stupně poškození, a to podle předem dané stupnice. V kontrolní skupině bylo méně než 10 % buněčných jader obarvených ethidium bromidem klasifikováno stupněm 1 až 2. Organismy po expozici zlatých nanočástic nebo chloridu zlatitého vykazovaly také méně než 10 % buněčných jader obarvených ethidium bromidem; také byly klasifikovány stupněm 1 až 2 stejně jako kontrolní skupina.

Čím vyšší je hodnota stupně poškození, tím více je membrána destabilizována a buněčné membrány jsou považovány za zcela zničené, pokud jsou hodnoceny stupněm 10. V rámci této studie se u organismů z chovu, z kontrolních skupin a dokonce ani z testovaných skupin neprokázalo poškození, stupeň nebyl nikdy vyšší než dva. Na následujícím obrázku (Obr. 21) je prezentován příklad obarvené trávicí žlázy z organismu z kontrolní skupiny a za ním na následujícím obrázku (Obr. 22) je příklad obarvené trávicí žlázy z organismu ze skupiny vystavené působení zlatých nanočástic.



Obr. 21: Trávicí žlázy z organismu z kontrolní skupiny po testu AO/EB.



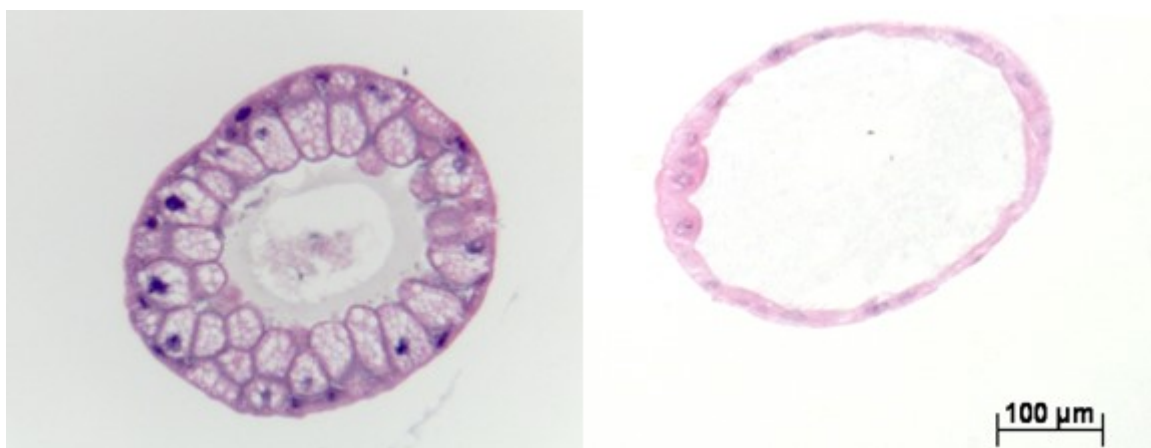
Obr. 22: Trávicí žlázy z organismu ze skupiny testované zlatými nanočásticemi po testu AO/EB.

Bioakumulace zlata

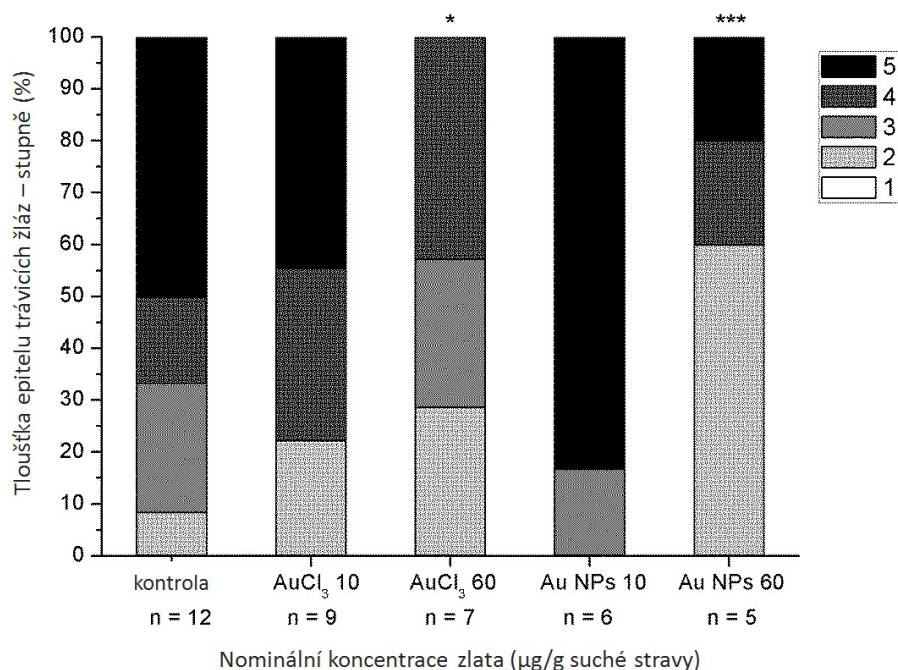
Obsah zlata u jednotlivých organismů byl měřen po jejich mikrovlnném rozkladu plamenovou AAS. Zlato nebylo detekováno v žádném organismu, bez ohledu na jeho formu (chlorid nebo nanočástice). Velmi důležité je však zmínit limit detekce zlata, který je pro tento přístroj $5 \mu\text{g/L}$. Pokud obsahovaly jednotlivé organismy méně jak $7 \mu\text{g Au/g}$, jeho obsah nemohl být detekován.

Vliv na fyziologický stav

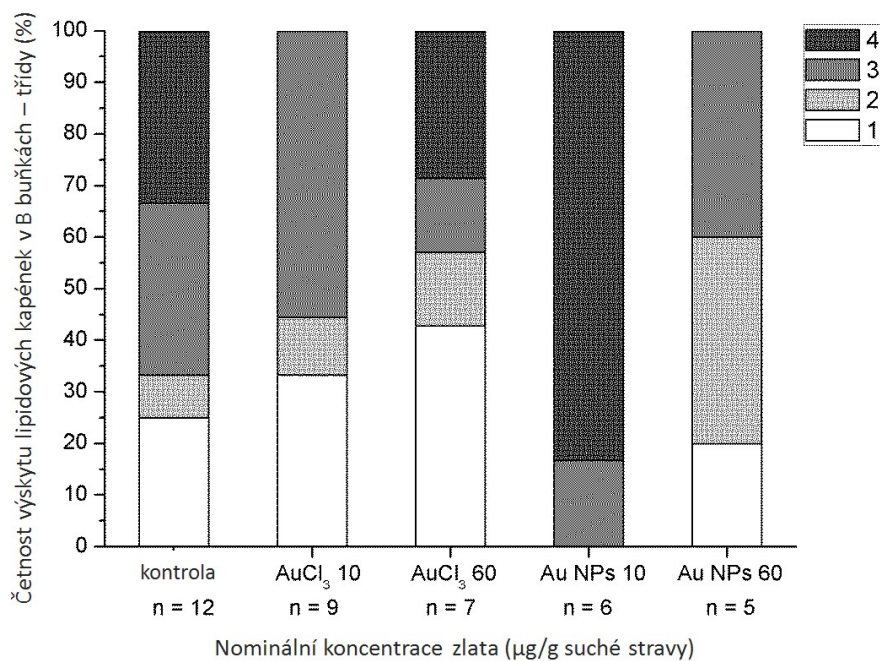
U koncentrace $10 \mu\text{g Au/g}$ suchého listu zlatých nanočástic i chloridu zlatitého nebyl pozorován statisticky významný rozdíl mezi kontrolní a testovací skupinou organismů u parametrů ztenčování tloušťky epitelu u trávicích žláz nebo četnosti výskytu lipidových kapének v B buňkách, tj. ani na fyziologický stav jedinců (Obr. 24 až 26) (Mann-Whitney *U*-test, $p > 0,05$). Nicméně, u koncentrace $60 \mu\text{g Au/g}$ suchého listu zlatých nanočástic i chloridu zlatitého byl zaznamenán vliv na ztenčování tloušťky epitelu u trávicích žláz v porovnání s kontrolní skupinou (Obr. 23,24) (Mann-Whitney *U*-test, $p < 0,05$ a $p < 0,001$, respektive); četnost výskytu lipidových kapének v B buňkách se u těchto dvou expozičních skupin statisticky významně nelišila od kontroly (Obr. 23,25) (Mann-Whitney *U*-test, $p > 0,05$). Potom byly tyto dva parametry zkombinovány do výsledného vlivu na fyziologický stav jedinců a pouze testovací skupina byla vystavená působení zlatých nanočástic o koncentraci $60 \mu\text{g Au/g}$ suchého listu - jevila známky stresu (Obr. 23, 26) (Mann-Whitney *U*-test, $p < 0,001$).



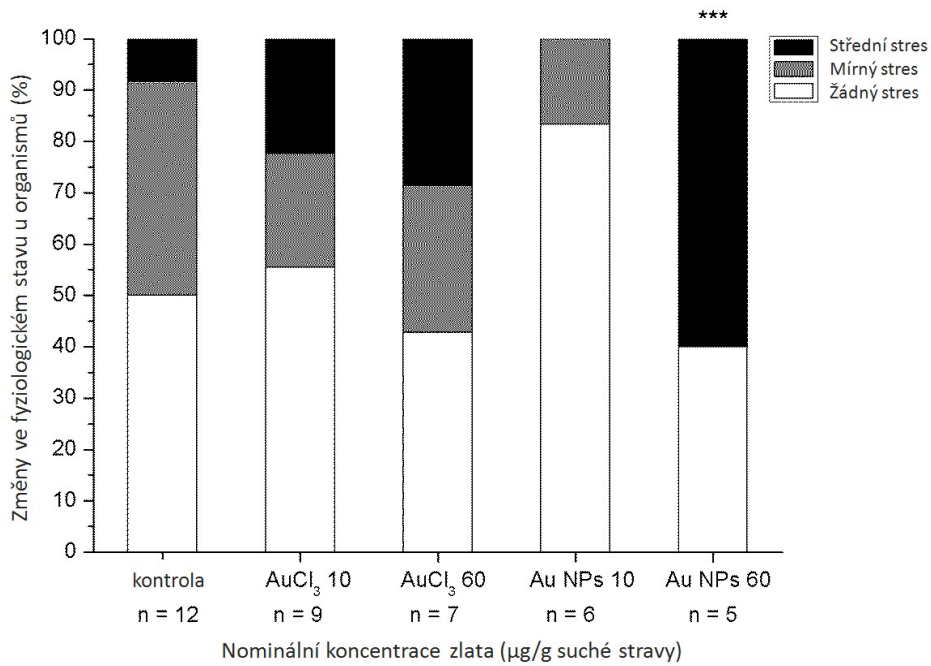
Obr. 23: Histopatologické řezy trávicí žlázy organismu *P. scaber*. Žláza z kontrolní skupiny organismu vs. žláza ze skupiny organismů vystavené koncentraci $60 \mu\text{g Au/g}$ suchého listu zlatých nanočástic.



Obr. 24: Zobrazení tloušťky epitelu trávicích žláz *P. scaber* v testu toxicity. Podle histologického vzhladu (tvar a velikost) B buněk trávicích žláz se organismy rozdělí do pěti stupňů poškození. Stupeň 1 značí největší poškození, přičemž stupeň 5 žádný. Hodnoty kontroly z prvního i druhého experimentu byly sloučeny; n je počet jedinců v každé testovací skupině, nominální koncentrace zlata jsou uvedeny na ose x, statisticky významný rozdíl je označen hvězdami: $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***)



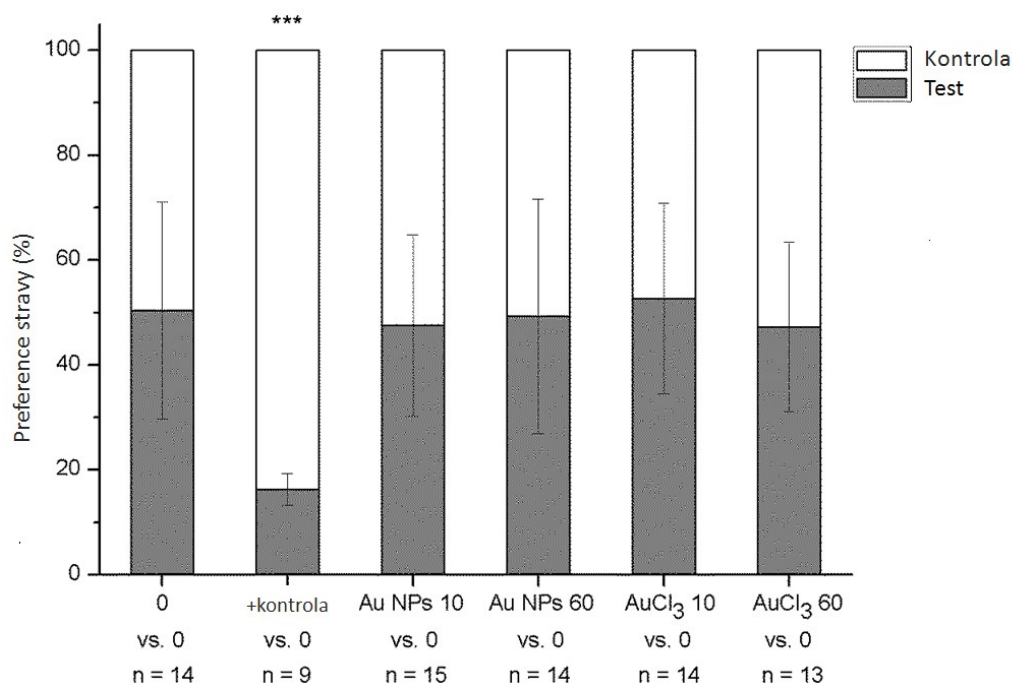
Obr. 25: Zobrazení četnosti výskytu lipidových kapének v B buňkách, trávicích žláz *P. scaber* v testu toxicity. Tato četnost je klasifikována podle čtyř tříd: a) řídká, b) nízká, c) střední, d) vysoká. Hodnoty kontroly z prvního i druhého experimentu byly sloučeny; n je počet jedinců v každé testovací skupině, nominální koncentrace zlata jsou uvedeny na ose x.



Obr. 26: Zobrazení fyziologického stavu *P. scaber* v testu toxicity v procentech. Hodnoty kontroly z prvního i druhého experimentu byly sloučeny; n je počet jedinců v každé testovací skupině, nominální koncentrace zlata jsou uvedeny na ose x, statisticky významný rozdíl je označen hvězdami: $p < 0,001$ (***).

4.2.1.2 Test únikového chování vůči potravě

Výsledky tohoto testu jsou zobrazeny v následujícím grafu (Obr. 27), kde je u každé z šesti expozičních kombinací znázorněno procentuální zastoupení kontaminované a kontrolní stravy, a to z celkového zkonzumovaného množství v procentech. Hmotnost zkonzumovaných listů se statisticky významně nelišila (Mann-Whitney U-test, $p > 0,05$) u pěti expozičních kombinací: "0 (kontrola) vs. 0 (kontrola)", "Au NPs 10 vs. 0", "Au NPs 60 vs. 0", "AuCl₃ 10 vs. 0" a u "AuCl₃ 60 vs. 0". Statisticky významný rozdíl byl pozorován pouze u pozitivní kontroly – chloridu kobaltnatého (Obr. 27) (Mann-Whitney U-test, $p < 0,001$).



Obr. 27: Zobrazení konzumace kontrolní vs. kontaminované stravy v procentech u *P. scaber* v testu únikového chování vůči potravě. Nominální koncentrace zlata jsou uvedeny na ose x, n je počet jedinců v každé testovací skupině, statisticky významný rozdíl je označen hvězdami: $p < 0,001$ (***)

4.2.2 Diskuze výsledků testů toxicity zlatých nanočástic

V předcházející části jsou shrnuty výsledky působení zlatých nanočástic a chloridu zlatitého získané pomocí dvou testů toxicity, tj. 14 denního testu toxicity a 14 denního únikového testu toxicity. U testu toxicity jsou nepříznivé biologické účinky testovaných látek detekovatelné jak běžnými toxikologickými parametry (změna tělesné hmotnosti, konzumace stravy a mortalita), tak také pomocí morfometrických charakteristik hepatopankreatického epitelu. Kromě toho byl použit test integrity buněčné membrány, v rámci kterého byl zjišťován případný potenciál sloučenin zlata pro destabilizaci buněčných membrán, což by patrně mohlo vést k přímému vstupu zlatých nanočástic do hepatopankreatických buněk. Spojením tohoto testu s měření na AAS došlo k ověření možné internalizace zlata nebo asimilace zlatých iontů do tkání. V následujícím testu bylo potom pozorováno chování suchozemských stejnonožců, a to v případě možnosti výběru kontrolní nebo kontaminované stravy.

Výsledky těchto testů byly porovnány s již publikovanými daty, např. vliv nanočástic zlata na mortalitu byl pozorován u organismů *D. melanogaster* a *C. elegans*, avšak vliv na úmrtí organismů *E. fetida* pozorován nebyl [124,125,127,137,138]. U organismu *D. melanogaster* byl pozorován vliv stravy kontaminované 15 nm nanočásticemi zlata povrchově modifikovaných solemi kyseliny citrónové v koncentracích 3 až 27 $\mu\text{g Au NPs/g}$ stravy na snížení přeživších organismů za den, a to v porovnání s kontrolou o 24 a 41 % respektive [137]. Ve stejném experimentálním uspořádání a se stejnými nanočásticemi byla délka života snížena na 62 %, jestliže byly *D. melanogaster* vystaveny 12 $\mu\text{g Au NPs/g}$ stravy za den [127].

Pokud bychom výsledky této studie porovnali s již publikovanými výsledky naší předcházející studie, ve které byla testována toxicita stříbrných nanočástic pro stejné organismy při velice podobném experimentálním uspořádání [62], dojdeme ke shodným výsledkům. Přesedevším bylo prokázáno, že ani úmrtnost nebo růst jedinců v testu nebyl ovlivněn při srovnatelných expozičních koncentracích. Jinými slovy řečeno, výsledky zcela zřetelně prokázaly, že Au NPs a AuCl₃ nemají vliv na end-pointy na úrovni organismu v reálných expozičních koncentracích.

Destabilizace buněčné membrány může být způsobena různými druhy nanočástic (např. oxid titaničitý a nanotyčinky oxidů wolframu), které mohou procházet ze střeva do hepatopankreatu během trávení a následně destabilizovat buněčnou membránu [80,111]. Avšak ani Au NPs ani AuCl₃ nezpůsobily sníženou integritu buněčné membrány. Výsledky testu integrity buněčné membrány odpovídají výsledkům měření bioakumulace. Tzn., že ani jedna z částí těla ze všech testovacích organismů neobsahovala zlato. Na podkladě tohoto poznatku můžeme konstatovat, že Au NPs nebyly internalizovány do tkání a Au³⁺ ionty nebyly asimilovány do buněk trávicích žláz. V tomto ohledu se Au NPs a Au³⁺ ionty značně liší od Ag NPs, u kterých byly zjištěno, že se rozpustí uvnitř zažívacího traktu a Ag⁺ ionty mohou být asimilovány do trávicích žláz při srovnatelných expozičních koncentracích ve stejném testu toxicity [62]. Celkově však platí, že nemůžeme vyloučit možnost, že *P. scaber* disponuje asimilační kapacitou pro Au³⁺ ionty, protože zlato má afinitu k síře nesoucí ligandy [139], které jsou přítomny v granulích typu B v hepatopankreatických S buňkách [21] a umožňují asimilaci jiných kovů s afinitou k síře, jako je např. kadmium, měď, olovo, rtuť, stříbro a kobalt [21,62,80].

Ze získaných výsledků je patrné, že potenciál trávicích žláz pro asimilaci zlata u *P. scaber* je velice nízký. Naše výsledky se tak liší od těch, pro *E. fetida* [124], a *D. melanogaster* [127], kde Au NPs podávané společně se stravou v testu toxicity byly nalezeny v tkáních

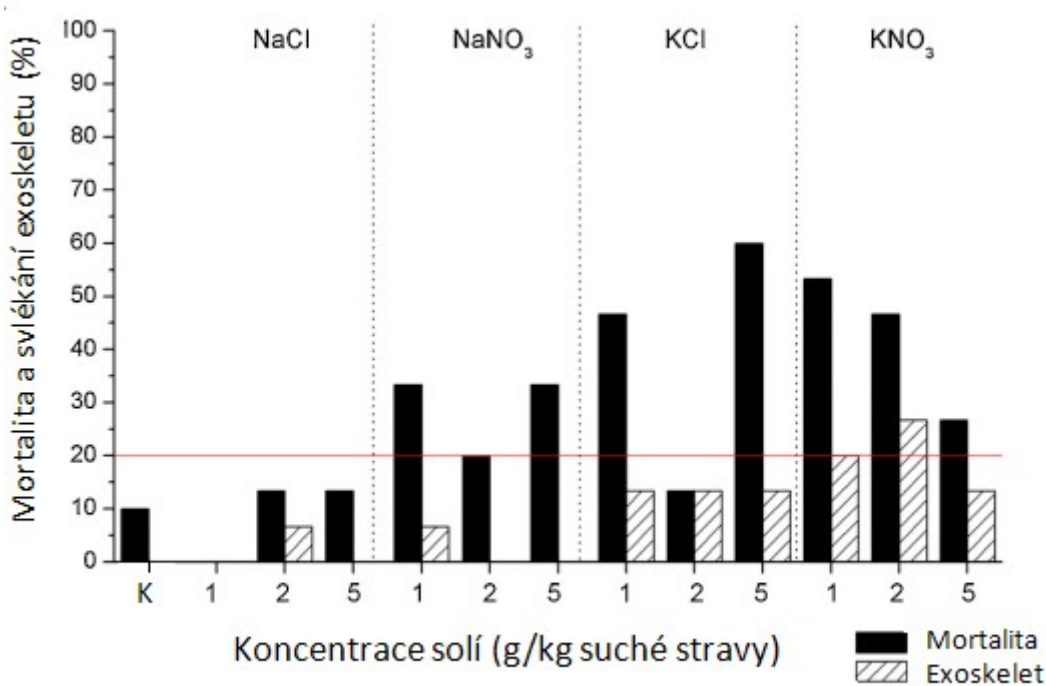
obklopujících gastrointestinální trakt (včetně epitelu trávicího traktu v *E. fetida*), stejně jako u reprodukčních orgánů v *D. melanogaster*. Přítomnost a lokalizace zlata byla potvrzena transmisní elektronovou mikroskopií (TEM), spojenou s energetickou disperzní spektroskopií (EDS) [124] nebo synchrotronní X-ray fluorescencenční mikrosondou (μ XRF) [126,142]. Žádný důkaz o rozpuštění Au NPs ve tkáních testovacích organismů nebyl pozorován v žádné z citovaných studií [124,126,127].

Histopatologické změny jsou základní ukazatele účinku na fyziologické a biochemické systémy v organismech vystavených přírodnímu nebo antropogennímu stresu [140]. U stejnonožců byla tloušťka epitelu v trávicích žlázách prokázána jako míra účinků testovaných látek rozličného chemického složení, nejvíce dosud publikovaných studií však bylo zaměřeno na kovy, pesticidy a nanočástice [41,43,59,85,141]. Nicméně, ztenčení epitelu trávicí žláz bylo pozorováno rovněž u organismů po jejich přenosu do laboratorního chovu, případně v kontrolní skupině testu toxicity. Nejspíše to bylo způsobeno stresem organismů z neznámého prostředí a z jejich izolace od ostatních jedinců [66,141]. Tato skutečnost může vysvětlit, proč některé kontrolní organismy v testu měly ztenčen epitel v trávicích žlázách. Nicméně, statisticky významné ztenčení epitelu ve srovnání s kontrolní skupinou bylo prokázáno, a to u organismů vystavených působení AuCl_3 , tak také u Au NPs, avšak pouze při nominální koncentraci 60 $\mu\text{g Au/g}$ suché potraviny. To znamená, že AuCl_3 a Au NPs mohou mít biologický účinek při velmi nízkých expozičních koncentracích. Ztenčování epitelu trávicích žláz je obvykle spojeno se sníženým obsahem zásobních lipidů, což může být odpověď na různé nutriční stresory, např. hladovění nebo konzumace stravy kontaminované kovy nebo pesticidy. Lipidy z hepatopankreatu slouží jako hlavní zdroj energie u *P. scaber* během hladovění nebo pod stresem [66,141]. V této studii nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl u snížení počtu lipidových kapének u žádné z testovaných skupin organismů v porovnání s kontrolní skupinou. Avšak při kombinaci abundance čili výskytu lipidových kapének s tloušťkou epitelu trávicích žláz do jediného endpointu – vliv na fyziologický stav organismů v testu, byl pozorován statisticky významný rozdíl, a to v porovnání s kontrolní skupinou u organismů vystavených expoziční koncentraci Au NPs 60 $\mu\text{g Au/g}$ suché stravy. Závěrem lze proto konstatovat, že jak chlorid zlatitý, tak také zlaté nanočástice mají velice nízký, avšak detekovatelný toxický potenciál u testovaných expozičních koncentracích.

4.2.3 Testy toxicity anorganických solí

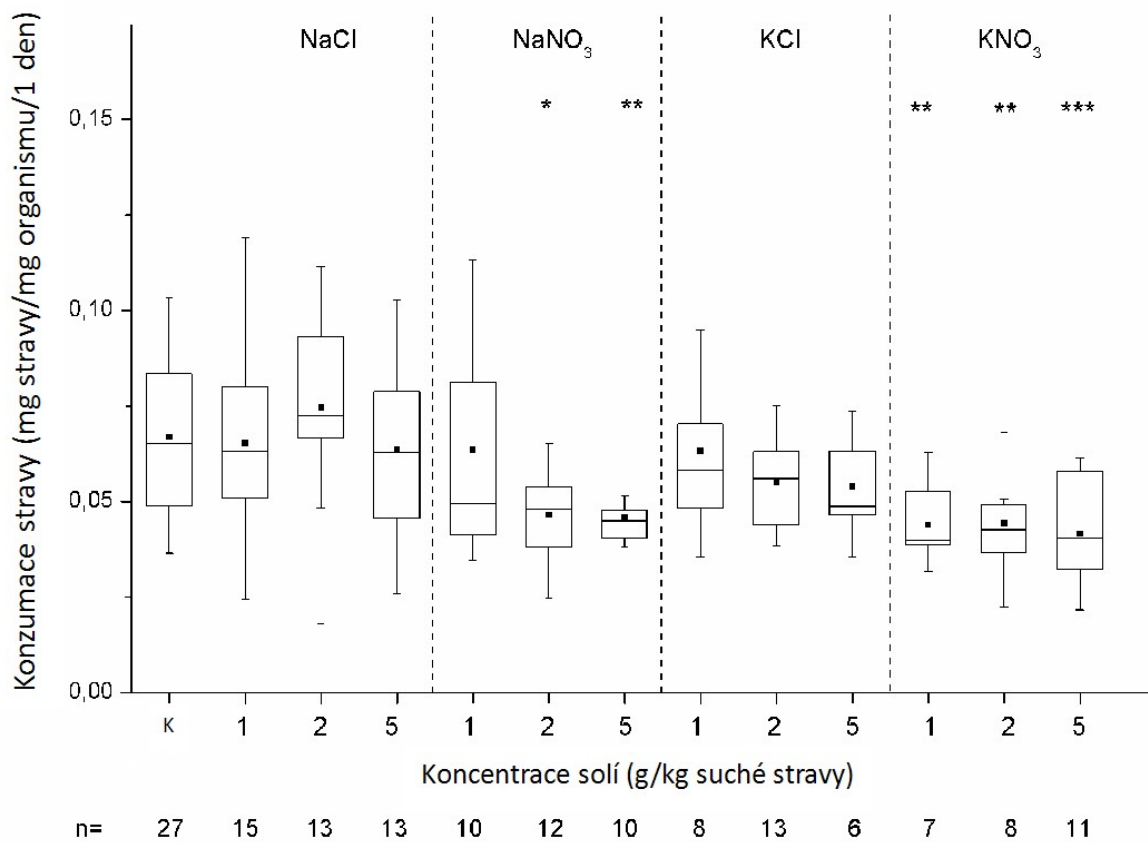
4.2.3.1 Test toxicity 14 dní

Test toxicity byl validní, splňoval podmínku mortality nižší v kontrolní skupině než je 20 %. Na následujícím grafu (Obr. 28) je znázorněna mortalita, NaNO₃ (k 33 %), KNO₃ (k 42 %) KCl (k 53 %), u NaCl nižší než 20 %. Jak je patrné z následujícího grafu, hodnota mortality není závislá na dávce. Také byly zaznamenány hodnoty svlékání exoskeletu. U solí KNO₃ a KCl byl pozorován narůstající trend, zatímco v kontrolní skupině a sodných solích nebyl tento trend pozorován vůbec.

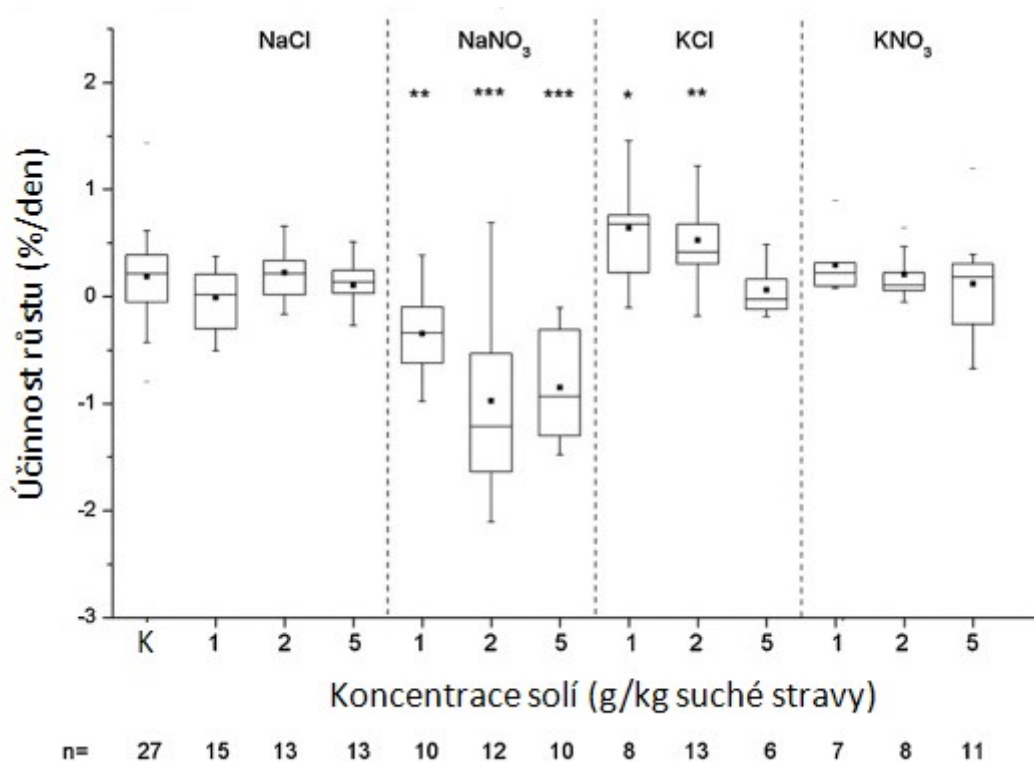


Obr. 28: Mortalita a svlékání exoskeletu u stejnonožců *P. scaber* ve 14 denním testu toxicity, které je vyjádřeno v procentech z celkového množství organismů (100 % = 15 organismů). K – kontrolní skupina, červená přímková čára označuje maximální možnou mortalitu v kontrolní skupině (20 %).

Ze stravovacích parametrů byly vybrány pro monitorování tohoto testu a jako vhodné pro následnou publikaci dva parametry, tzv. Feeding rate – konzumace stravy (Obr. 29) a Growth efficiency – účinnost růstu (Obr. 30). V případě chloridu sodného a draselného nebyl pozorován žádný vliv na konzumaci stravy ani při nejvyšší koncentraci. Zatímco v případě dusičnanů byl tento efekt markantní, zejména pak v případě dusičnanu draselného, kdy byl pozorován statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolou již od nejnižší testované koncentrace 1 a 2 g/kg (** $p < 0.01$), u nejvyšší testované koncentrace dosáhl až 5 g/kg (** $p < 0.001$). Stravovací parametr účinnost růstu byl ovlivněn zcela jinak, v případě chloridu sodného a dusičnanu draselného nedošlo k žádným změnám, u dusičnanu sodného došlo ke snížení toho parametru a to ve všech koncentracích na statisticky významných rozdílech 1 g/kg (** $p < 0.01$) a u koncentrací 2 a 5 g/kg (** $p < 0.001$). Ke zvýšení potom došlo u chloridu draselného, a to u koncentrací 1 /kg (* $p < 0.05$) a 2 g/kg (** $p < 0.01$).



Obr. 29: Konzumace stravy u stejnonožců *P. scaber* ve 14 denním testu toxicity. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolní skupinou (C) jsou označeny hvězdami (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$); n = počet organismů, u kterých byl tento parametr vypočten.



Obr. 30: Účinnost růstu u stejnonožců *P. scaber* ve 14 denním testu toxicity. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolní skupinou (C) jsou označeny hvězdami (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$); n = počet organismů, u kterých byl tento parametr vypočten.

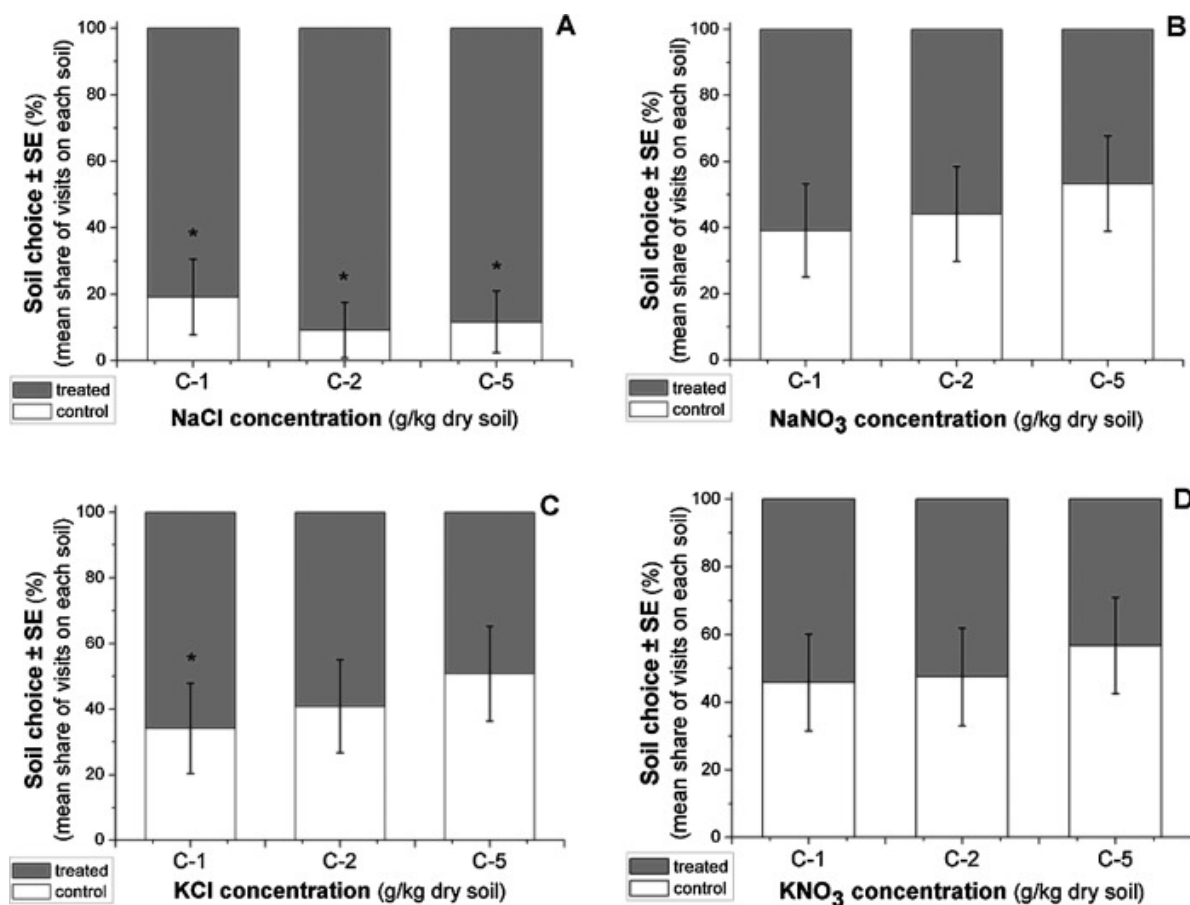
4.2.3.2 Test únikového chování v půdě

Výsledky testu únikového chování v půdě mohou být prezentovány dvěma odlišnými způsoby, a to:

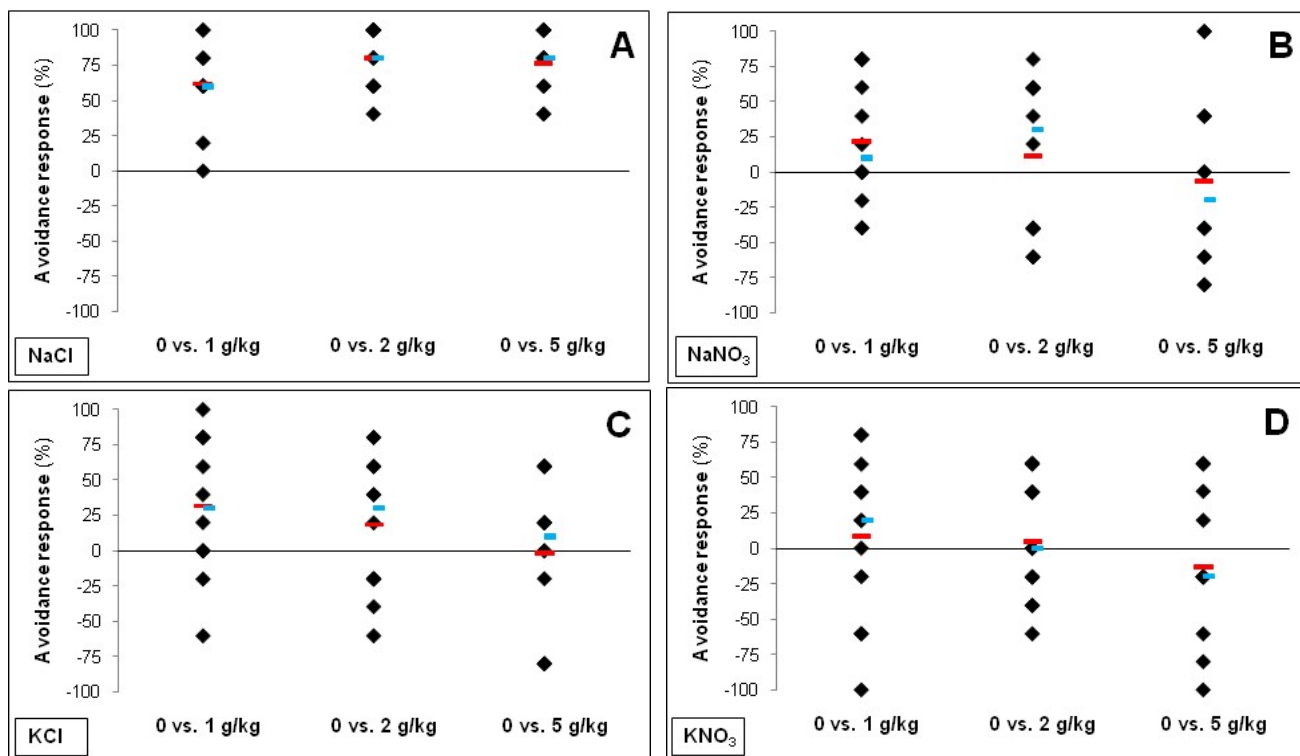
a) z celkového počtu kontrol (10) jsou vypočteny preference kontrolní anebo kontaminované strany v procentech (Obr. 31)

b) jako únikovost jednotlivých zvířat, která je vyhodnocena podle ISO 2008 kritérií (Obr. 32) [143].

Z obou vybraných způsobů vyhodnocení a prezentace výsledků jsou patrné stejné závěry tohoto testu, takže je pouze na nás, jaký způsob prezentace zvolíme. *P. scaber* je schopný vybrat si mezi kontrolní a kontaminovanou částí, a to podle toho jak mu vybraný kontaminant vadí a v jaké koncentraci. Jak je patrné z výsledků testu s chloridem sodným, tato sůl mu vůbec nevadí, dokonce ji preferuje před kontrolní půdou a to až do maximální testované koncentrace 5 g/kg. Tento trend byl obdržen také u nejnižší koncentrace 1 g/kg chloridu draselného, přičemž ve vyšších koncentracích už tyto preference nebyly pozorovány. U dusičnanu sodného a draselného nebyly získány žádné preference kontaminované nebo kontrolní strany; čas, který v průběhu expozice organismy strávily v obou částech byl téměř totožný, okolo 50 %, a proto žádný statisticky významný rozdíl nebyl pozorován.



Obr. 31: Výsledky únikového testu v půdě pro *P. scaber*. Organismy byly vystaveny nekontaminované LUFA 2.2 půdě a této půdě kontaminované čtyřmi individuálními solemi ((A) NaCl, (B) NaNO₃, (C) KCl, a (D) KNO₃). Nominální koncentrace solí a kontroly byly 0–0, 0–1, 0–2, and 0–5 g soli/kg suché půdy. Data jsou prezentována jako průměrná hodnota v procentech pro čas strávený na jednotlivých stranách testu a nejistota měření je vyjádřena jako směrodatná odchylka (SE); kontrola je zobrazena bílou barvou.



Obr. 32: Výsledky únikového testu v půdě pro *P. scaber*. Znáznorněny dle normy ISO 2008. (osa x – koncentrace solí v g/kg, vs. – versus, černá barva – individuální hodnota, červená – průměr, modrá – medián).

4.2.3.3 Měření pH a vodivosti půdy s obsahem solí

V následující tabulce (Tab. 5) jsou prezentovány hodnoty molárních koncentrací, elektrické vodivosti (EC) a pH jednotlivých půd s obsahem solí. Jak z tabulky vyplývá, nejsou patrné žádné rozdíly v hodnotách pH u jednotlivých druhů solí. Hodnoty elektrické vodivosti pro NaCl a KCl byly srovnatelné; v rozmezí od 0,46 do 1,87 dS/m a 0,43 až 1,67 dS/m. Také elektrická vodivost pro KNO₃ a NaNO₃ byly v podobném rozsahu; 0,32-1,18 dS/m a 0,35-1,25 dS/m, respektive.

Tab. 5: Hodnoty molárních koncentrací, elektrické vodivosti a pH pro jednotlivé půdy s obsahem solí.

Testované látky	Hmotnostní koncentrace [mg/kg]	Molární koncentrace [mM]	EC ± SD [dS/m]	pH ± SD
Kontrola - Kontrola	0	0	0,10 ± 0,00	6,18 ± 0,10
Kontrola – NaCl	1000	17,11	0,46 ± 0,00	5,86 ± 0,00
	2000	34,22	0,81 ± 0,03	5,77 ± 0,02
	5000	85,55	1,87 ± 0,05	5,71 ± 0,01
Kontrola – NaNO ₃	1000	11,77	0,35 ± 0,01	5,95 ± 0,07
	2000	23,53	0,60 ± 0,01	5,78 ± 0,01
	5000	58,83	1,25 ± 0,03	5,73 ± 0,01
Kontrola – KCl	1000	13,41	0,43 ± 0,01	5,79 ± 0,03
	2000	26,83	0,74 ± 0,01	5,71 ± 0,01
	5000	67,07	1,67 ± 0,08	5,64 ± 0,01
Kontrola – KNO ₃	1000	9,89	0,32 ± 0,01	5,80 ± 0,01
	2000	19,78	0,55 ± 0,02	5,72 ± 0,03
	5000	49,45	1,18 ± 0,04	5,69 ± 0,01

4.2.4 Diskuze výsledků toxicity anorganických solí

V předcházející části jsou shrnuty výsledky působení čtyř solí (NaCl, KCl, NaNO₃ a KNO₃), a to ve dvou testech toxicity (14 denní a 48 hodinový únikový).

Z prvního testu je patrný vliv KNO₃ a NaNO₃ na konzumaci stravy v průběhu testu, která však není závislá na koncentraci testované substance (velikosti dávky). Tento trend však nebyl pozorován u solí NaCl a KCl. Vliv na účinnost růstu byla pozorována především u NaNO₃. Na základě těchto výsledků, kdy nebyl pozorován žádný vliv solí NaCl a KCl, ani u jednoho sledovaného stravovacího parametru bylo posouzeno, že testované koncentrace Cl⁻, K⁺ a Na⁺ iontů (až do 3,0; 2,6 a 1,995 g soli/kg suchého listu, respektive) nemají žádný vliv na stravovací chování a na mortalitu a svlékání exoskeletu u *P. scaber*. U solí KNO₃ a NaNO₃, koncentrace K⁺ a Na⁺ iontů (až do 1,934 a 1,352 g soli/kg suchého listu, respektive) jsou dokonce nižší než u solí KCl a NaCl (až do 2,622 a 1,967 g soli/kg suchého listu, respektive), a proto lze konstatovat, že vliv testu toxicity u KNO₃ a NaNO₃ může být pouze následkem působení dusičnanů. Dusičnany obsažené v kontaminované stravě mohou mít za následek ovlivnění stravovacího chování, avšak mechanismus tohoto působení není dosud jednoznačně znám. V literatuře byl dohledán a jako nejvíce pravděpodobný se jeví toxický způsob působení dusičnanů na pigmenty, které jsou sice schopny nést kyslík (např. methemokyanin, hemokyanin) do formy, která však není schopná jeho přenosu (např. methemoglobin) [144]. Podrobné zkoumání tohoto jevu je však nad rámec této práce, která se zabývá jinými end-pointy testu toxicity.

Ve studii [15] byl podobně jako v této práci zkoumán vliv solí, a to v 28 denním testu toxicity na žížalách (*E. fetida*); u solí NaCl (EC₅₀=5,318 g/kg půdy), u KCl (EC₅₀=5,890 g/kg půdy) a u NaNO₃ (EC₅₀=4,845 g/kg půdy) byl zjištěn vliv na konzumaci stravy (pokles hmotnosti testovaných jedinců po skončení expozice). Tento jev mohl být podle autora studie způsoben únikovým chování žížal vůči kontaminované potravě, protože toto chování bylo pozorováno v jeho předchozí práci [9], kde byly sledovány čistě únikové reakce u dvou druhů žížal *A. caliginosa* a *E. fetida* u půdy kontaminované NaCl (EC₅₀=0,667 g NaCl/kg půdy a 1,164 g NaCl/kg půdy, respektive).

Výsledky druhého testu ukazují preference pobytu *P. scaber* při možnosti volby kontaminované versus čisté půdy. U solí NaCl (všechny testované koncentrace) a u KCl (nejnižší testovaná koncentrace) preferoval *P. scaber* pobyt v půdách, které byly těmito solemi kontaminovány. U zbylých dvou koncentrací KCl a u všech testovaných koncentrací KNO₃ a NaNO₃ nebyly pozorovány žádné preference. Tyto výsledky ukazují na to, že výběr organismů zcela nezávisí na pH a elektrické vodivosti půdy, která byla u všech půd změřena. Jako příklad lze uvést, že u půdy obsahující NaCl, jsou hodnoty elektrické vodivosti v rozmezí 0,46 – 1,87 dS/m a u půdy obsahující KCl jsou hodnoty elektrické vodivosti v rozmezí 0,74 – 1,67 dS/m. Na základě těchto poznatků můžeme konstatovat, že je nanejvýš pravděpodobné, že výběr půdy se řídí dle obsahu solí.

U solí KNO₃ a KCl se v průběhu testu vyskytoval větší výskyt jedinců svlékajících exoskelet v porovnání s kontrolní skupinou a s organismy vystavenými působení NaNO₃ a NaCl. Na základě výsledků uvedených v práci [145], bylo zjištěno, že koncentrace kationtů K⁺ a Na⁺ v hemolymfě a v tzv. moulting fluid (tekutině vyskytující se v průběhu výměny exoskeletu) se mění v průběhu svlékání exoskeletu. V tzv. moulting fluid se mění kationtové složení, které ovlivňuje ukládání vápníku. Také v následující práci [146], podobně jako u jiných stejnožců (*Ligia oceanica*) bylo prokázáno, že osmotický tlak v hemolymfě se mění během cyklu výměny exoskeletu. Z tohoto důvodu je možné, že změny osmotického tlaku, které jsou

vyvolané působením soli (v tomto případě K^+), mohou měnit cyklus výměny exoskeletu. Nicméně, pro takové závěry je však nutné provést další experimenty, a to za účelem zjištění potenciálních mechanismů těchto změn způsobených solemi, zvláště pak K^+ iontem.

Výsledky mortality ukazují její zvýšení u solí $NaNO_3$, KNO_3 a KCl a současně žádné zvýšení u soli $NaCl$. V rámci této studie jsme schopni porovnat pozorovanou mortalitu pro vybraný kationt/aniont pár. Z výsledků je patrné, že mortalita je závislá na působení konkrétního kationt/aniont páru. Toto zjištění je ve shodě s dosud publikovanými výsledky, které poukázaly na to, že nelze toxicitu vyhodnocovat jakou součet toxicity pro kationt a aniont, z nichž se sůl skládá [15]. Ale vždy je nezbytné ji posuzovat jako individuální toxicitu dané soli, kde působení kationtu a aniontu může být aditivní, synergické nebo antagonické [133].

Naše výsledky dále ukazují na to, že stejnonožci jsou schopni tolerovat vysoké koncentrace $NaCl$ (5 g soli/g suchého listí či suché půdy), a to v porovnání s ostatními suchozemskými bezobratlými živočichy, jako jsou např. žížaly [15]. Toto zjištění je v souladu s údaji již dříve publikovanými; stejnonožci *P. scaber* jsou euryhalinní organismy, tj. organismy schopni snášet velké změny v koncentracích solí a mající extrémní schopnost osmoregulace [147]. Schopnost osmoregulace úzce souvisí s akumulací Na^+ iontů (a pravděpodobně i chloridů) ve střevě a hepatopankreatu [147]. Stejnonožci byli zavlečeni a následně byli schopni přežít v některých z nejvíce extrémních oblastí životního prostředí, včetně pouště v Izraeli a v severní Africe a zasolených oblastí v Austrálii [148]. Ve skutečnosti však výsledky z analýzy jejich distribuce u 19 druhů suchozemských stejnonožců v tuniských mokřadech ukázaly, že stejnonožci jsou přítomni v půdě s obsahem solí v rozmezí 0,9 až 35,4 g/kg. Zejména stejnonožci z rodiny Porcellionidae (*Porcellio variabilis*, *P. laevis* a *P. pruinosus*) jsou schopni tolerovat širokou škálu zasolení, a to až do obsahu solí 35,4 g/kg půdy [149]. Podobně i vodní stejnonožci jako je např. beruška vodní (*Asellus aquaticu*) mají přirozený rozsah výskytu ve velmi velkém rozpětí slanosti, protože byly nalezeny v místech od 0,0035 až do 2,358 g Na/l vody až do extrémních koncentrací 6,896 g Na/l vody [150]. V další publikované studii [151] se uvádí, že z 27 různých sladkovodních vodních bezobratlých pocházejících z různých taxonomických skupin (ploštěnky, máloštětinaté, pijavice, měkkýše, korýše a larev hmyzu) byli korýši *A. aquaticus* a *Gmelinoides fasciatus* nejvíce tolerantními jak ke snížení, tak ke zvýšení obsahu solí ve vodě, a to v rozsahu od 0,02 do 8,10 g/l.

Na závěr této diskuze lze konstatovat, že 14 denní expozici *P. scaber* soli $NaCl$ (do 5 g/kg list) neovlivnilo stravování, růst a přežití tohoto organismu. Ostatní soli, tj. KCl , $NaNO_3$ a KNO_3 měly na tento organismus negativní dopad. Společně tyto výsledky, a to spolu s již publikovanými údaji o toxicitě na žížalách [15] poukazují na to, že i jiné soli, kromě běžně testovaného chloridu sodného, by měly být testovány, a to pro stanovení odpovědí na potencionální nebezpečí zasolení půdy pro suchozemské organismy.

5 ZÁVĚR

Účelem této práce bylo získání několika dílčích poznatků a cílů z oblasti terestrické ekotoxikologie.

Prvotním cílem bylo zavést chov a provést tři testy toxicity s organismem *P. scaber*. Toto testování bylo prováděno na ústavu CHTOŽP. Chov byl úspěšně zaveden a testování na tomto organismu může nyní doplnit baterii ekotoxikologických testů zde prováděných. Jedná se především o vhodný test pro doplnění testování na větších terestrických organismech, jako jsou např. žížaly (*E. fetida* nebo *E. andrei*) nebo šneci (*Helix aspersa*), jejichž testování je více časově i prostorově náročné. Rovněž bylo prokázáno, že díky schopnosti velké bioakumulace kovů u *P. scaber* se výsledky mohou značně lišit a můžeme tak dosáhnout objektivnějšího zhodnocení kontaminantů vstupujících do životního prostředí a poukázat na důležitost rozmanitosti zvolených testovacích organismů.

Dalším mezikrokem bylo potom testování vybraných zlatých nanočástic. Tento druh nanočástic byl zvolen z několika důvodů; jedním z nich je jejich zvýšená produkce a použití v průběhu posledních několika let a s tím související také zvýšené riziko vstupu do životního prostředí, a to jak do akvatického, tak také do terestrického ekosystému. Z dostupné literatury bylo zřejmé, že testy v terestrickém prostředí, a to na všech třech úrovních živé hmoty (organismus, tkáň, buňka), jsou ve velice omezeném množství používány, na rozdíl od testů s vodními organismy. Na základě toho byly zvoleny jako nejvýše vhodné do této dizertační práce. Dalším důvodem bylo celkově omezené množství studií toxicity zlatých nanočástic v porovnání s více používanými nanočásticemi, jakými jsou například oxidy rozličných kovů nebo stříbrné nanočástice. Důležitým krokem v této práci bylo data, která byla získaná v testech toxicity, správně statisticky vyhodnotit, protože naměřená data vesměs spadají do oblasti neparametrického rozdělení, Proto byla rovněž důležitá správná interpretace získaných výsledků a jejich následná publikace. Výsledky vlivu nanočástic v testech ekotoxicity na zvoleném organismu a následně pak jejich porovnání s již publikovanými a dostupnými daty jsou prezentovány v diskuzi.

Další část této práce se zabývá možnou toxicitou vybraných anorganických solí pro *P. scaber*. Vychází z myšlenky salinizace terestrického ekosystému nadměrným používáním solí jak při úpravě komunikací v zimě, tak také nadměrným používáním hnojiv nebo nesprávným zavlažováním. Tyto soli, především chlorid sodný, ale nejen ten, se pak nacházejí v nadměrných koncentracích a mohou tak ohrožovat především organismy žijící v takto zasolené půdě a konzumující stravu s nadměrným obsahem solí. Do testu byly vybrány, jak již bylo zmíněno čtyři soli, avšak v současné literatuře byly dostupné informace především týkající se toxicity chloridu sodného. Bylo tak nanejvýš vhodné, že jsme mohli spíše kusé informace o toxicitě zbývajících sloučenin doplnit našimi výsledky, které byly ve velice krátké době úspěšně opublikovány. Souhrnné výsledky testů a jejich následná diskuze, a to společně s porovnáním vlivu solí na ostatních terestrických organismech, je uvedena v předchozí kapitole.

6 REFERENCE

1. WHITE, Robert E. Principles and practice of soil science, the soil as a natural resource. John Wiley & Sons, 2013.
2. ŠIMEK, M. Základy nauky o půdě. 1. Neživé složky půdy. BF JU, České Budějovice, 2003.
3. MUCHMORE, W. B. *Terrestrial Isopoda*. In, Dindal DL, Soil biology guide. John Wiley & Sons. 1990, s. 805-809.
4. FREEMARK, Kathryn, BOUTIN, Celine. Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes, a review with special reference to North America. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 1995, 52.2, 67-91.
5. VAN BRUMMELEN, Timco C., et al. Long-term toxicity of five polycyclic aromatic hydrocarbons for the terrestrial isopods *Oniscus Asellus* and *P. scaber*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1996, 15.7, 1199-1210.
6. NAVARRO, Enrique, et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*. 2008, 17.5, 372-386.
7. OBERDÖRSTER, Eva. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environmental health perspectives*. 2004, 112.10, 1058.
8. RÖMER, Isabella, et al. Aggregation and dispersion of silver nanoparticles in exposure media for aquatic toxicity tests. *Journal of Chromatography A*. 2011, 1218.27, 4226-4233.
9. OWOJORI, Olugbenga J., REINECKE, Adriaan J. Avoidance behaviour of two ecophysiologicaly different earthworms (*Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*) in natural and artificial saline soils. *Chemosphere*. 2009, 75.3, 279-283.
10. RAMOLIYA, P. J., et al. Effect of salinisation of soil on growth and macro-and micro-nutrient accumulation in seedlings of *Acacia catechu* (Mimosaceae). *Annals of applied Biology*. 2004, 144.3, 321-332.
11. KADUKOVA, Jana, KALOGERAKIS, Nicolas. Lead accumulation from non-saline and saline environment by *Tamarix smyrnensis* Bunge. *European journal of soil biology*. 2007, 43.4, 216-223.
12. LIPPI, D., et al. Effect of salinity on growth and starvation-survival of a tropical *Rhizobium* strain. *Biology and fertility of soils*. 2000, 30.4, 276-283.
13. YUAN, Bing-Cheng, et al. Microbial biomass and activity in salt affected soils under arid conditions. *Applied Soil Ecology*. 2007, 35.2, 319-328.

14. OWOJORI, Olugbenga J., et al. Comparative study of the effects of salinity on life-cycle parameters of four soil-dwelling species (*Folsomia candida*, *Enchytraeus doerjesi*, *Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*). *Pedobiologia*. 2009, 52.6, 351-360.
15. OWOJORI, Olugbenga J., REINECKE, Adriaan J. Differences in ionic properties of salts affect saline toxicity to the earthworm *Eisenia fetida*. *Applied Soil Ecology*. 2014, 83, 247-252.
16. KOČÍ, V. *Postavení testů toxicity v monitoringu životního prostředí*. In KOČÍ, V., HALOUSKOVÁ, O. *Ekotoxikologické biotesty 1*, 18. - 19. října 2002. Seč, 2002. s. 8.
17. HOFFMAN, D. J., et al. *Handbook of ecotoxicology*, CRC Press, 1995, s. 755.
18. ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Encyklopedie hydrobiologie*. VŠCHT Praha, 2007. Dostupné z WWW, <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/>.
19. MARŠÁLEK, Blahoslav. *Ekotoxikologické biotesty, rozdělení, přehled, použití*. In KOČÍ, V., HALOUSKOVÁ, O. *Ekotoxikologické biotesty 1*, 18 - 19. října 2002. Seč, 2002. s. 16.
20. HOFMAN, Jan. *Půdní ekotoxikologie*. In KOČÍ, V., MARŠÁLEK, B., HALOUSKOVÁ, O. *Ekotoxikologické biotesty 3*, 22 - 23. října 2003. Brno, 2003. s. 27.
21. HOPKIN, Stephen P., et al. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Elsevier Applied Science Publishers, 1989.
22. WARBURG, Michael R. The role of water in the life of terrestrial isopods. *Monografia. Monitore zoologico italiano*. 1989, 4, 285-304.
23. EDNEY, E. B. Transition from water to land in isopod crustaceans. *American Zoologist*. 1968, 8.3, 309-326.
24. PONT, Benoît, NENTWIG, Wolfgang. Quantification of Bt-protein digestion and excretion by the primary decomposer *P. scaber*, fed with two Bt-corn varieties. *Biocontrol Science and technology*. 2005, 15.4, 341-352
25. SOUTY-GROSSET, C., et al. Investigations on the potential of woodlice as bioindicators of grassland habitat quality. *European journal of soil biology*. 2005, 41.3, 109-116.
26. WELSH, John H. Diurnal rhythms. *The Quarterly Review of Biology*. 1938, 13.2, 123-139.
27. HOESE, Berndt. Morphologie und funktion des wasserleitungssystems der terrestrischen Isopoden (Crustacea, Isopoda, Oniscoidea). *Zoomorphology*. 1981, 98.2, 135-167.

28. VILLANI, M. G., et al. Adaptive strategies of edaphic arthropods. *Annual review of entomology*. 1999, 44.1, 233-256.
29. VILISICS, Ferenc, et al. Measuring fluctuating asymmetry of the terrestrial isopod *Trachelipus rathkii* (Crustacea, Isopoda, Oniscidea). *European Journal of Soil Biology*. 2005, 41.3, 85-90.
30. TUF, Ivan H., JEŘÁBKOVÁ, Eva. Diurnal epigeic activity of terrestrial isopods (Isopoda, Oniscidea). In, *Proceedings of the International Symposium on Terrestrial Isopod Biology*. 2008. p. 167-172.
31. HOPKIN, S. P., et al. Terrestrial isopods as biological indicators of zinc pollution in the Reading area, south east England. *Monografia. Monitore zoologico italiano*. 1989, 4, 477-488.
32. HAMES, C. A. C., HOPKIN, S. P. A daily cycle of apocrine secretion by the B cells in the hepatopancreas of terrestrial isopods. *Canadian journal of zoology*. 1991, 69.7, 1931-1937.
33. WÄGELE, J. W. Isopoda. *Microscopic anatomy of invertebrates*. 1992, 9, 529-617.
34. HOPKIN, S. P., MARTIN, M. H. The distribution of zinc, cadmium, lead and copper within the hepatopancreas of a woodlouse. *Tissue and Cell*. 1982, 14.4, 703-715.
35. VOGT, G. Histologie und cytologie der mitteldarmdrüse von *Penaeus monodon* (Decapoda). *Zoologischer Anzeiger*. 1985, 215.1-2, 61-80.
36. ICELY, J. D., NOTT, J. A. Digestion and absorption, digestive system and associated organs. *Microscopic anatomy of invertebrates*. 1992, 10, 147-201.
37. STORCH, Volker. Der Einfluß der Ernährung auf die Ultrastruktur der großen Zellen in den Mitteldarmdrüsen terrestrischer Isopoda (*Armadillidium vulgare*, *P. scaber*). *Zoomorphology*. 1982, 100.2, 131-142.
38. ŠTRUS, Jasna, et al.. The ultrastructure of the midgut glands in *Ligia italica* (Isopoda) under different nutritional conditions. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*. 1985, 39.4, 367-374.
39. SZYFTER, Z. The correlation of moulting and changes occurring in the hepatopancreas of *P. scaber* Latr. (Crustacea, Isopoda). *Bulletin de la Société des amis des sciences et des lettres*. 1966, 7, 95-114.
40. STRUS, Jasna. The effects of starvation on the structure and function of the hepatopancreas in the isopod *Ligia italica*. *Investigacion Pesquera (Spain)*. 1987.
41. DROBNE, Damjana, ŠTRUS, Jasna. The effect of Zn on the digestive gland epithelium of *P. scaber* (Isopoda, Crustacea). *Pflügers Archiv*. 1996, 431.6, R247-R248.

42. KÖHLER, Heinz-R., et al. Cellular hepatopancreatic reactions in *P. scaber* (Isopoda) as biomarkers for the evaluation of heavy metal toxicity in soils. *Applied Soil Ecology*, 1996, 3.1, 1-15.
43. ODENDAAL, J. P., REINECKE, A. J. Quantifying histopathological alterations in the hepatopancreas of the woodlouse *Porcellio laevis* (Isopoda) as a biomarker of cadmium exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2003, 56.2, 319-325.
44. ŠTRUS, Jasna, BLEJEC, Andrej. Microscopic anatomy of the integument and digestive system during the molt cycle in *Ligia italica* (Oniscidea). *Isopod systematics and evolution*. AA Balkema, Brookfield, 2001, 343-352.
45. ALIKHAN, M. A. Changes in the hepatopancreas metabolic reserves of *Porcellio laevis* Latreille during starvation and the moult-cycle. *American Midland Naturalist*, 1972, 503-514.
46. STORCH, V., LEHNERTMORITZ, K. The effects of starvation on the hepatopancreas of the isopod *Ligia Oceanica*. *Zoologischer Anzeiger*, 1980, 204.3-4, 137-146.
47. STORCH, Volker. The influence of nutritional stress on the ultrastructure of the hepatopancreas of terrestrial isopods. In, *Symposia of the Zoological Society of London*. Cambridge University Press, 1984. p. 167-184.
48. MORGAN, A. John, GREGORY, Zara D. E, WINTERS, Carole. Responses of the hepatopancreatic 'B' cells of a terrestrial isopod, *Oniscus asellus*, to metals accumulated from a contaminated habitat, a morphometric analysis. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 1990, 44.3, 363-368.
49. KÖHLER, Heinz-R., et al. Cellular hepatopancreatic reactions in *P. scaber* (Isopoda) as biomarkers for the evaluation of heavy metal toxicity in soils. *Applied Soil Ecology*, 1996, 3.1, 1-15.
50. RIBEIRO, Sónia, et al. Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2001, 49.2, 131-138.
51. ŽNIDARŠIČ, Nada, et al. Ultrastructural alterations of the hepatopancreas in *P. scaber* under stress. *Environmental toxicology and pharmacology*, 2003, 13.3, 161-174.
52. DROBNE, Damjana, HOPKIN, S. P. The toxicity of zinc to terrestrial isopods in a "standard" laboratory test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1995, 31.1, 1-6.
53. JEREB, Vesna, et al. Transformations of mercury in the terrestrial isopod *P. scaber* (Crustacea). *Science of the total environment*, 2003, 304.1, 269-284.
54. ZIDAR, Primož, et al. Behavioral response in the terrestrial isopod *P. scaber* (Crustacea) offered a choice of uncontaminated and cadmium-contaminated food. *Ecotoxicology*, 2005, 14.5, 493-502.

55. STAAK, Andreas, et al. Ecotoxicological studies on the impact of the herbicide trifluralin on *P. scaber* (Isopoda). *Applied Soil Ecology*, 1998, 9.1, 405-409.
56. STANEK, Katja, et al. Linkage of biomarkers along levels of biological complexity in juvenile and adult diazinon fed terrestrial isopod (*P. scaber*, Isopoda, Crustacea). *Chemosphere*, 2006, 64.10, 1745-1752.
57. KOLAR, Lucija, et al. Toxicity of abamectin to the terrestrial isopod *P. scaber* (Isopoda, Crustacea). *Ecotoxicology*, 2010, 19.5, 917-927.
58. ŽIŽEK, Suzana, et al. Does monensin in chicken manure from poultry farms pose a threat to soil invertebrates?. *Chemosphere*, 2011, 83.4, 517-523.
59. DROBNE, Damjana, et al. Toxicity of imidacloprid to the terrestrial isopod *P. scaber* (Isopoda, Crustacea). *Chemosphere*, 2008, 71.7, 1326-1334.
60. JEMEC, Anita, et al. Effects of ingested nano-sized titanium dioxide on terrestrial isopods (*P. scaber*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, 27.9, 1904-1914.
61. PIPAN-TKALEC, Živa, et al. Zinc bioaccumulation in a terrestrial invertebrate fed a diet treated with particulate ZnO or ZnCl₂ solution. *Toxicology*, 2010, 269.2, 198-203.
62. PIPAN-TKALEC, Živa, et al. Micro-PIXE study of Ag in digestive glands of a nano-Ag fed arthropod (*P. scaber*, Isopoda, Crustacea). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B, Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2011, 269.20, 2286-2291.
63. DROBNE, Damjana. Terrestrial isopods - a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1997, 16.6, 1159-1164.
64. HASSALL, Mark, et al. Questions and possible new directions for research into the biology of terrestrial isopods. *European journal of soil biology*, 2005, 41.3, 57-61.
65. VALANT, Janez, et al. Hazardous potential of manufactured nanoparticles identified by in vivo assay. *Journal of hazardous materials*, 2009, 171.1, 160-165.
66. LEŠER, Vladka, et al. Epithelial thickness and lipid droplets in the hepatopancreas of *P. scaber* (Crustacea, Isopoda) in different physiological conditions. *Zoology*, 2008, 111.6, 419-432.
67. DROBNE, Damjana, et al. In vivo screening to determine hazards of nanoparticles, nanosized TiO₂. *Environmental Pollution*, 2009, 157.4, 1157-1164.
68. ZIDAR, Primož, et al. Determination of moult stages of *P. scaber* (Isopoda) for routine use. *Crustaceana*, 1998, 71.6, 646-654.

69. MCGAHON, Anne J., et al. The end of the (cell) line, methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods in cell biology*, 1995, 46, 153-185.
70. VALANT, Janez, et al. Effect of ingested titanium dioxide nanoparticles on the digestive gland cell membrane of terrestrial isopods. *Chemosphere*, 2012, 87.1, 19-25.
71. DROBNE, Damjana. Zinc toxicity to terrestrial isopods (Isopoda, Crustacean). Ph.D. Thesis. University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia 1996.
72. DONKER, M. H., et al. Early reproduction and increased reproductive allocation in metal-adapted populations of the terrestrial isopod *P. scaber*. *Oecologia*, 1993, 96.3, 316-323.
73. ALIKHAN, M. A., STORCH, V. Copper and nickel uptake and accumulation, and their effects on redox and electrical potentials of hepatopancreatic cells of *Oniscus asellus* Linnaeus (Porcellionidae, Isopoda). *Canadian journal of zoology*, 1990, 68.4, 651-655.
74. BERCOVITZ, Klara, ALIKHAN, M. A. Effect of forced fasting on magnesium and manganese regulation in a terrestrial isopod, *Porcellio spinicornis* say (Porcellionidae, Isopoda, Crustacea). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 1989, 43.1, 151-158.
75. HAMES, Christopher AC. *The digestive system and metals in terrestrial isopods*. 1989. PhD Thesis. University of Reading.
76. JOOSSE, Els NG, et al. Effects of zinc, iron and manganese on soil arthropods associated with decomposition processes. *Heavy Metals in the Environment*, 1983, 1, 467-470.
77. CAPELLEVEEN, Hendrik Elias van. *Ecotoxicity of heavy metals for terrestrial isopods*. Vrije Universiteit te Amsterdam, 1987.
78. DROBNE, D., et al. Could proposed bio-monitoring organisms select differently contaminated food. In, *Proceedings of the Sixth International Symposium on Metal Compounds in Environment and Life*. Jülich, Germany. 1995. p. 35.
79. GOLOBIC, Miha, et al. Upon exposure to Cu nanoparticles, accumulation of copper in the isopod *P. scaber* is due to the dissolved Cu ions inside the digestive tract. *Environmental science & technology*, 2012, 46.21, 12112-12119.
80. NOVAK, Sara, et al. Cellular internalization of dissolved cobalt ions from ingested CoFe_2O_4 nanoparticles, in vivo experimental evidence. *Environmental science & technology*, 2013, 47.10, 5400-5408.
81. PAPIS, Elena, et al. Engineered cobalt oxide nanoparticles readily enter cells. *Toxicology letters*, 2009, 189.3, 253-259.

82. HOREV-AZARIA, Limor, et al. Predictive toxicology of cobalt nanoparticles and ions, comparative in vitro study of different cellular models using methods of knowledge discovery from data. *Toxicological Sciences*, 2011, 122.2, 489-501.
83. ZOOK, Justin M., et al. Measuring silver nanoparticle dissolution in complex biological and environmental matrices using UV–visible absorbance. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2011, 401.6, 1993-2002.
84. JEMEC, Anita, et al. The link between antioxidant enzymes catalase and glutathione S-transferase and physiological condition of a control population of terrestrial isopod (*P. scaber*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 2012, 79, 42-47.
85. SRPČIČ, Anja Menard, et al. Altered physiological conditions of the terrestrial isopod *P. scaber* as a measure of subchronic TiO₂ effects. *Protoplasma*, 2014, 1-8.
86. ODENDAAL, J. P., REINECKE, A. J. Short-term toxicological effects of cadmium on the woodlouse, *Porcellio laevis* (Crustacea, Isopoda). *Ecotoxicology and environmental safety*, 1999, 43.1, 30-34.
87. LOUREIRO, Susana, et al. Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. *Environmental pollution*, 2005, 138.1, 121-131.
88. LOUREIRO, Susana, et al. Assessing joint toxicity of chemicals in *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae) and *Porcellionides pruinosus* (Isopoda) using avoidance behaviour as an endpoint. *Environmental Pollution*, 2009, 157.2, 625-636.
89. SANTOS, Miguel JG, et al. Joint effects of three plant protection products to the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus* and the collembolan *Folsomia candida*. *Chemosphere*, 2010, 80.9, 1021-1030.
90. ŽIŽEK, Suzana, ZIDAR, Primož. Toxicity of the ionophore antibiotic lasalocid to soil-dwelling invertebrates, Avoidance tests in comparison to classic sublethal tests. *Chemosphere*, 2013, 92.5, 570-575.
91. HUND-RINKE, Kerstin, et al. Avoidance test with *Eisenia fetida* as indicator for the habitat function of soils, Results of a laboratory comparison test. *Journal of soils and Sediments*, 2003, 3.1, 7-12.
92. BHUSHAN, Bharat. *Springer handbook of nanotechnology*. Springer Science & Business Media, 2010.
93. INVERNIZZI, Noela. Nanotechnology between the lab and the shop floor, what are the effects on labor?. *Journal of Nanoparticle Research*, 2011, 13.6, 2249-2268.
94. ROCO, Mihail C., et al. Nanotechnology research directions for societal needs in 2020, retrospective and outlook. Springer Science & Business Media, 2011.

95. SIMKÓ, Mattsson, MATTSSON, Mats-Olof. Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects, a critical review. *Part Fibre Toxicol*, 2010, 7.42, 1-8.
96. VERMA, Shalini, et al. Nanomaterials for regenerative medicine. *Nanomedicine*, 2011, 6.1, 157-181.
97. BOSSELMANN, Stephanie, WILLIAMS III, Robert O. Has nanotechnology led to improved therapeutic outcomes?. *Drug development and industrial pharmacy*, 2012, 38.2, 158-170.
98. DUNCAN, Timothy V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety, barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of colloid and interface science*, 2011, 363.1, 1-24.
99. KVASNIČKOVÁ, Alexandra. Aplikace nanotechnologie v potravinářství. Informační centrum bezpečnosti potravin, 2008 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z WWW, http://www.agronavigator.cz/UserFiles/File/Agronavigator/Kvasnickova_2/Nanotechnologie_web-final.pdf.
100. KIMLING, J., et al. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110.32, 15700-15707.
101. KOBAYASHI, Yoshio, TOMITA, Akira. Preparation of aqueous gold colloid by vapor deposition method. *Journal of colloid and interface science*, 1997, 185.1, 285-286.
102. WANG, Zhenxin, MA, Lina. Gold nanoparticle probes. *Coordination Chemistry Reviews*, 2009, 253.11, 1607-1618.
103. ZHAO, Weian, et al. Design of gold nanoparticle-based colorimetric biosensing assays. *ChemBioChem*, 2008, 9.15, 2363-2371.
104. FILIPOVÁ, Zuzana, et al. *Rizika nanomateriálů*. Univerzita Palackého, 2012.
105. ZHAO, Yuliang, NALWA, Hari Singh. *Nanotoxicology, Interactions of nanomaterials with biological systems*. American Scientific Publishers, 2007.
106. ABBOTT, Linda C., MAYNARD, Andrew D. Exposure assessment approaches for engineered nanomaterials. *Risk Analysis*, 2010, 30.11, 1634-1644.
107. CATTANEO, Anna Giulia, et al. Ecotoxicology of nanomaterials, the role of invertebrate testing. *Invertebrate Survival Journal*, 2009, 6, 78-97.
108. GARNER, Kendra L., KELLER, Arturo A. Emerging patterns for engineered nanomaterials in the environment, a review of fate and toxicity studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 2014, 16.8, 1-28.
109. MAURER-JONES, Melissa A., et al. Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. *Analytical chemistry*, 2013, 85.6, 3036-3049.

110. TOURINHO, Paula S., et al. Metal-based nanoparticles in soil, Fate, behavior, and effects on soil invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2012, 31.8, 1679-1692.
111. NOVAK, Sara, et al. Prolonged feeding of terrestrial isopod (*P. scaber*, Isopoda, Crustacea) on TiO₂ nanoparticles. Absence of toxic effect. *ZooKeys*, 2012, 176, 261.
112. TOURINHO, Paula S., et al. CeO₂ nanoparticles induce no changes in phenanthrene toxicity to the soil organisms *Porcellionides pruinosus* and *Folsomia candida*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2015, 113, 201-206.
113. RENAULT, S., et al. Impacts of gold nanoparticle exposure on two freshwater species, a phytoplanktonic alga (*Scenedesmus subspicatus*) and a benthic bivalve (*Corbicula fluminea*). *Gold bulletin*, 2008, 41.2, 116-126.
114. LOVERN, Sarah B., et al. Electron microscopy of gold nanoparticle intake in the gut of *Daphnia magna*. *Nanotoxicology*, 2008, 2.1, 43-48.
115. LI, Ting, et al. Comparative toxicity study of Ag, Au, and Ag–Au bimetallic nanoparticles on *Daphnia magna*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2010, 398.2, 689-700.
116. HARPER, S., et al. In vivo biodistribution and toxicity depends on nanomaterial composition, size, surface functionalisation and route of exposure. *Journal of Experimental Nanoscience*, 2008, 3.3, 195-206.
117. BAR-ILAN, Ofek, et al. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small*, 2009, 5.16, 1897-1910.
118. BROWNING, Lauren M., et al. Random walk of single gold nanoparticles in zebrafish embryos leading to stochastic toxic effects on embryonic developments. *Nanoscale*, 2009, 1.1, 138-152.
119. GEFFROY, Benjamin, et al. Impact of dietary gold nanoparticles in zebrafish at very low contamination pressure, the role of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology*, 2012, 6.2, 144-160.
120. ASHARANI, P. V., et al. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology*, 2011, 5.1, 43-54.
121. WANG, Shuguang, et al. Toxic effects of gold nanoparticles on *Salmonella typhimurium* bacteria. *Toxicology and industrial health*, 2011, 0748233710393395.
122. GOODMAN, Catherine M., et al. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate chemistry*, 2004, 15.4, 897-900.
123. WANG, Shuguang, et al. Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes. *Chemical physics letters*, 2008, 463.1, 145-149.

124. UNRINE, Jason M., et al. Evidence for bioavailability of Au nanoparticles from soil and biodistribution within earthworms (*Eisenia fetida*). *Environmental science & technology*, 2010, 44.21, 8308-8313.
125. TSYUSKO, Olga V., et al. Toxicogenomic responses of the model organism *Caenorhabditis elegans* to gold nanoparticles. *Environmental science & technology*, 2012, 46.7, 4115-4124.
126. JUDY, Jonathan D., et al. Evidence for biomagnification of gold nanoparticles within a terrestrial food chain. *Environmental science & technology*, 2010, 45.2, 776-781.
127. POMPA, Pier Paolo, et al. In vivo toxicity assessment of gold nanoparticles in *Drosophila melanogaster*. *Nano Research*, 2011, 4.4, 405-413.
128. ROTH, D., WALL, G. Environmental Effects of Highway Deicing Salts. *Groundwater*, 1976, 14.5, 286-289.
129. CHENG, K. C., GUTHRIE, T. F. Liquid road deicing environment impact. 1998.
130. 2000, Environment Canada. Canadian Environmental Protection Act, priority substance list assessment report - road salts. *Environment Canada*, Health Canada. 2000.
131. WEGNER, William, YAGGI, Marc. Environmental impacts of road salt and alternatives in the New York City watershed. *Stormwater*, 2001, 2.5, 24-31.
132. OWOJORI, Olugbenga J., et al. Effects of salinity on partitioning, uptake and toxicity of zinc in the earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40.9, 2385-2393.
133. SIMMONS, Jeffrey A. Toxicity of major cations and anions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , and SO_4^{2-}) to a macrophyte and an alga. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2012, 31.6, 1370-1374.
134. HAGEDORN, Monica, ZIEGLER, Andreas. Analysis of Ca^{2+} uptake into the smooth endoplasmic reticulum of permeabilised sternal epithelial cells during the molting cycle of the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Journal of Experimental Biology*. 2002, 205, 1935-1942.
135. ISO, DIN. 10390, 2005-12. Soil quality-Determination of pH (ISO 10390, 2005) (2005).
136. OECD Test. 222, Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals <http://caliban.sourceoecd.org/vl3447368>.
137. SABELLA, Stefania, et al. Toxicity of citrate-capped AuNPs, an in vitro and in vivo assessment. *Journal of Nanoparticle Research*, 2011, 13.12, 6821-6835.

138. KIM, Shin Woong, et al. Multigenerational Study of Gold Nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*, Transgenerational Effect of Maternal Exposure. *Environmental Science & Technology*. 2013, 47.10, 5393-5399.
139. KOROBUSHKINA, et al. 1983. Biochemistry of gold. *Environmental Biogeochemistry*. 1983, 35, 325-333.
140. WESTER, P.W., et al. Aquatic toxicology, opportunities for enhancement through histopathology. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2002, 11, 289-295.
141. LAPANJE, A., et al. Long-term Hg pollution induced Hg tolerance in terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). *Environmental Pollution*. 2008, 153, 537-547.
142. JUDY, Jonathan D., et al. Bioaccumulation of gold nanomaterials by *Manduca sexta* through dietary uptake of surface contaminated plant tissue. *Environmental Science & Technology*. 2012, 46, 12672-12678.
143. ISO, DIN. 17512-1,2008. *Soil quality-avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour-Part 1, Test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei)* (2008).
144. CAMARGO, Julio A., et al. Nitrate toxicity to aquatic animals, a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*. 2005, 58, 1255-1267.
145. ZIEGLER, Andreas. The cationic composition and pH in the moulting fluid of *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda) during calcium carbonate deposit formation and resorption. *Journal of Comparative Physiology B*. 2008, 178.1, 67-76.
146. PARRY, G. Osmotic and ionic regulation in the isopod crustacean *Ligia oceanica*. *Journal of experimental Biology*. 1953, 30.4, 567-574.
147. WRIGHT, Jonathan C., et al. Haemolymph osmoregulation and the fate of sodium and chloride during dehydration in terrestrial isopods. *Journal of insect physiology*. 1997, 3.9, 795-807.
148. HOPKIN, Stephen P. A key to the woodlice of Britain and Ireland. *Field studies*. 1991, 7.4, 599-650.
149. KHEMAISSIA, H., et al. Impact of soil quality on the distribution of terrestrial isopods in some tunisian wetlands. *Anadolu Journal of Agriculture science*. 2010, 25, 231-136.
150. LOCKWOOD, A. P. M. The osmotic and ionic regulation of *Asellus aquaticus* (L.). *Journal of experimental Biology*. 1959. 36, 546-555.
151. BEREZINA, N. A. Tolerance of freshwater invertebrates to changes in water salinity. *Russian Journal of Ecology*. 2003, 34.4, 261-266.
152. OriginPro 8.0 - software. OriginLab, Northampton, USA.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS	Atomic Absorption Spectroscopy Atomová absorpční spektrometrie
AO	Acridine Orange Akredinová oranž
AR	Assimilation Ratio Asimilační rychlost
DNA	Deoxyribonucleic Acid Deoxyribonukleová kyselina
EB	Ethidium Bromide Ethydium bromid
ET	Epithelial Thickness Epiteliální tloušťka
FAE	Food Assimilation Efficiency Účinnost asimilace stravy
FPR	Fecal Production Rate Produkce fekálních peletek
FR	Feeding Rate Konzumace stravy
GR	Growth Efficiency Účinnost růstu
HA	Hepatopancreas Area Plocha hepatopankreatu
HP	Hepatopancreas Perimetr Vnějšího obvodu hepatopankreatu
HR	Hepatopancreas Radius Poloměr hepatopankreatu
CHTOŽP	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
LA	Lumen Area Plocha lumenu
LC50	Lethal Concentration, the death of 50% of a group of test animals Letální koncentrace, která má efekt na 50 % jedinců v testu
LR	Lumen Radius Poloměr lumenu
LSPR	Laser Surface Plasmon Resonance Povrchová plazmová rezonance
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Polyaromatické uhlovodíky
PCBs	Polychlorinated Biphenyls Polychlorované bifenyly

8 PŘÍLOHY

8.1 PUBLIKACE V IMPAKTOVANÉM ČASOPISE

Applied Soil Ecology 100 (2016) 1–7



Contents lists available at ScienceDirect

Applied Soil Ecology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apsoil



Effects of food salinization on terrestrial crustaceans *Porcellio scaber*



Pavčina Škarková^a, Monika Kos^b, Damjana Drobne^b, Milada Vávrová^a, Anita Jemec^{b,*}

^a Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

^b University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 August 2015

Received in revised form 10 November 2015

Accepted 12 November 2015

Available online 28 December 2015

Keywords:

Terrestrial invertebrates
Salinity
Sodium/potassium chloride
Sodium/potassium nitrate
Growth
Moult

ABSTRACT

Salinization of soil as the main cause for soil degradation is a global issue. Despite this, the data concerning the effects of different salts on terrestrial organisms are still missing. Our aim was to address the effects of four different salts (NaCl, KCl, NaNO₃, and KNO₃) on terrestrial isopods *Porcellio scaber*. Two types of experiments were performed. In the first experiment, the isopods were exposed to 1, 2, and 5 g salt/kg dry leaf for 14 days and afterwards animal mortality, feeding activity, moult and growth were monitored. In the second experiment, a 48-h soil selection tests was done to investigate their preference/avoidance to certain salts. The feeding rate and growth efficiency of isopods decreased in a dose-dependent manner after 14 days exposure to KNO₃ and NaNO₃. We suggest that nitrate (NO₃⁻) may be the predominant reason for these effects, because (i) the effects were only observed in the case of NO₃⁻-salts, and (ii) K⁺ and Na⁺ induced no effects in the case of Cl⁻-salts where the concentrations of these two cations were even higher as in the case of NO₃⁻ salts. 48-h soil selection test showed that isopods were able to choose between NaCl dosed and unamended soil: the isopods preferred to spend time on NaCl spiked soil (up to 5 g salt/kg dry soil). In the case of KNO₃ and NaNO₃ no significant soil selection by isopods was found. In these two exposures isopods spent approximately 50% of their visits on both sides of the soil. The survival of isopods decreased in a dose independent manner when exposed to NaNO₃, KNO₃, and KCl. We conclude that NaNO₃, KCl, and KNO₃ affect the isopods, while no effects were caused by NaCl under the exposure conditions of this study. This study implies that also other salts besides commonly investigated NaCl should be tested when the potential hazard of soil salinization to terrestrial organisms is in question.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Salinization is the process that leads to an excessive increase of water-soluble salts in the soil (Várallyay et al., 2006). Soil salinization is a global problem and has been recognised as one of the major reasons for soil degradation (Tóth et al., 2008; Com., 2012; Environment Canada, 2015; USDA, 2015). This phenomenon is either a result of erosion of parental material and natural processes or is induced by anthropogenic activities, such as the salting of roads during winter in temperate and subarctic regions (Environment Canada, 2015), the use of fertilizers, excessive irrigations, (Tóth et al., 2008) or the use of snow additives for the production of artificial snow for winter tourism (Rixen et al., 2003). Besides sodium chloride (NaCl), the snow additives also contain calcium chloride (CaCl₂), potassium chloride (KCl), urea,

magnesium chloride, sodium acetate, calcium magnesium acetate, ammonium nitrate and ammonium sulfate (Peters, 2006). Potassium and sodium nitrate (KNO₃, and NaNO₃) are common composites of fertilizers (Haifa, 2014).

An excessive amount of salts in the soil has been shown to affect terrestrial organisms, such as earthworms (Owojori and Reinecke, 2009, 2014; Owojori et al., 2008, 2009a,b; Guzyte et al., 2011), enchytraeids (Owojori et al., 2009b), collembolans (Owojori et al., 2009a) and plants (Rixen et al., 2003; Hu and Schmidhalter, 2005). Most of the studies conducted up until now have focused on soil contaminated with NaCl or KCl or natural saline soil (Owojori et al., 2009a). Most commonly observed effects of NaCl on earthworms (*Eisenia fetida*) were decreased survival (28 days LC₅₀ = 5.436 g NaCl/kg soil and 5.623 g NaCl/kg soil), decreased growth (28 days EC₅₀ in range from 2.512–4.985 g NaCl/kg soil) and decreased cocoon production (28 days EC₅₀ in range from 1.00–2.02 g NaCl/kg soil) (Owojori et al., 2008; Guzyte et al., 2011). In a recent study, Owojori and Reinecke (2014) showed that besides NaCl, other salts like NaNO₃, Na₂HPO₄, Na₂SO₄, KCl, CaCl₂, and MgCl₂ can cause saline-induced effects on earthworms. Among these the most toxic

* Corresponding author.

E-mail addresses: xcskarkova@fch.vutbr.cz (P. Škarková), monika.kos@bf.uni-lj.si (M. Kos), damjana.drobne@bf.uni-lj.si (D. Drobne), vavrova@fch.vutbr.cz (M. Vávrová), anita.jemec@bf.uni-lj.si (A. Jemec).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.11.007>
0929-1393/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

to earthworms *E. fetida* was NaNO_3 (28 days LC_{50} 5.354 g/kg soil), while NaCl was among the least toxic (28 days LC_{50} = 6.428 g/kg soil) (Owojori and Reinecke, 2014).

Other relevant terrestrial invertebrates potentially exposed to salt-affected areas are isopods such as the species *Porcellio scaber* Latreille, 1804 (Isopoda, Oniscidea, Porcellionidae), which live predominately in forests and grasslands of temperate climates, but are also very common in urban and agricultural areas (Harding and Sutton, 1985). They have been recognized as a suitable ecotoxicity test organism because their biology and physiology is well-known, it is relatively easy to maintain them as a laboratory culture and handle individual animals in the experiment and, above all, it is possible to obtain individual toxicity data at different levels of biological complexity (Hassall et al., 2005). These organisms have been used successfully in toxicity testing on a variety of organic pollutants (Drobne et al., 2008) and inorganic pollutants, such as metals (Drobne and Hopkin, 1995; Zidar et al., 2003) and nanomaterials (Drobne et al., 2009). Generally, a decreased feeding rate of isopods denote an adverse effect of the test chemical on the isopods (Drobne and Hopkin, 1995). At the moment there is a lack of knowledge regarding the effects of salinity on these organisms.

The aim of the present study was to assess the effects of four commonly used salts in agriculture (NaNO_3 and KNO_3) and in ice-melting compounds (NaCl, KCl) on terrestrial isopods *P. scaber*. NaCl is also the predominant salt in most saline environments (Owojori et al., 2008). Isopod feeding behaviour, moult and mortality were monitored. A 48-h soil selection tests was done to investigate their selection of certain salts. The prime goal was to determine the differences in adverse effects caused by different salts.

2. Materials and methods

2.1. Test chemicals

Four analytical grade salts, namely NaCl, NaNO_3 , KCl, and KNO_3 , were purchased from Sigma–Aldrich (Germany). The concentrations tested in this paper (1, 2 and 5 g salt/kg dry leaf or dry soil) were selected based on previous work done by other researchers in this field (Owojori and Reinecke, 2009). These authors exposed the earthworms to a concentration range 1–4 g NaCl/kg dry soil corresponding to electrical conductivity (EC) in range from 0.12 to

1.31 dS/m. These exposures already induced adverse effects on earthworms. The EC of the soil in our case (soil choice experiments) was in the same range (0.32–1.87 dS/m, Table 1). Furthermore, these EC values are in range of those reported for natural saline soils (0.08–1.62 dS/m) (Owojori and Reinecke, 2010).

2.2. Test species

Isopods *P. scaber* originated from the synchronized laboratory culture at the Department of Biology, University of Ljubljana (Večna pot 111, Ljubljana). Cultures of *P. scaber* were derived from individuals collected from an unpolluted site in Polhov Gradec, Slovenia (46°3'0"N, 14°18'0"E). Animals were kept in a climate chamber at 22 ± 1 °C with a 16/8 h light/dark period (120 and 16 lx, respectively; measured using LI-1000 Data Logger, LI-COR, Nebraska, USA), caged in glass containers with moist loamy sand and peat at the bottom. They were fed fallen leaves from various trees, with periodical additions of potatoes, fresh vegetables, and apples. Only adult animals (30–60 mg fresh body mass) of both sexes were used for the test. Particular attention was paid to include only the specimens with intact antennae. Moulting individuals and gravid females were excluded (Zidar et al., 1998).

2.3. Experimental design for 14-days feeding exposure

2.3.1. Food preparation

Partially decomposed hazel leaves (*Corylus avellana*) were collected in the Karavanke region, Slovenia (46°21'32.29"N, 14°16'36.12"E), for the purpose of the experiment. Leaves were air dried at room temperature (24 ± 1 °C) and stored in a cardboard box until use. Bigger leaves with minimally damaged leaf lamina were straightened and the serrated leaf edge was cut off. Leaf lamina were cut into pieces of 120 ± 20 mg. NaCl, NaNO_3 , KCl, and KNO_3 were individually dissolved in bidionized water (MilliQ, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA [pH 5.7, $\rho = 18.5 \text{ M}\Omega\text{cm}$]), to obtain nominal concentrations of 1, 2, and 5 g salt/kg dry leaf. The nominal mass concentrations were also converted to molarity for a better comparison to previously published data (Supplementary information Table S1). For 100 mg of leaf, 100 μL of deionised water (control) or freshly prepared salt solution was applied to the bottom side of the leaf and spread over the surface as evenly as possible, using a paintbrush. After application, leaves were allowed

Table 1
Electrical conductivity and pH measured in the test soils at the beginning (day 0) of the soil selection test with *Porcellio scaber* (EC, electrical conductivity) (n of independent measurements = 3).

Test groups	Mass concentration (g/kg)	Molar concentration (mM)	Mean EC \pm SD (dS/m)	Mean pH \pm SD
Control	0	0	0.10 \pm 0.00	6.18 \pm 0.10
NaCl	1	17.11	0.46 \pm 0.00	5.86 \pm 0.00
	2	34.22	0.81 \pm 0.03	5.77 \pm 0.02
	5	85.55	1.87 \pm 0.05	5.71 \pm 0.01
KCl	1	13.41	0.43 \pm 0.01	5.79 \pm 0.03
	2	26.83	0.74 \pm 0.01	5.71 \pm 0.01
	5	67.07	1.67 \pm 0.08	5.64 \pm 0.01
NaNO_3	1	11.77	0.35 \pm 0.01	5.95 \pm 0.07
	2	23.53	0.60 \pm 0.01	5.78 \pm 0.01
	5	58.83	1.25 \pm 0.03	5.73 \pm 0.01
KNO_3	1	9.89	0.32 \pm 0.01	5.80 \pm 0.01
	2	19.78	0.55 \pm 0.02	5.72 \pm 0.03
	5	49.45	1.18 \pm 0.04	5.69 \pm 0.01

to dry for 24 h at room temperature. After 24 h, dry pieces of leaves were re-weighed and this data was then used for further calculations.

2.3.2. Feeding assay

The feeding assay was conducted according to the protocol described by Drobne et al. (2009). Briefly, individual animal was placed in a petri dish (Ø 9 cm) along with the prepared leaf with the contaminated side facing up (15 animals per each concentration and 30 animals per control). Humidity in the petri dish was maintained by periodical spraying with deionised water on the internal side of the lid. The experiment was maintained for 14 days in controlled and stable conditions at $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% relative humidity (TFA, Dostmann GmbH & Co., KG, Wertheim, Germany), with a 16/8 h light/dark period (120 and 16 lx, respectively). The experiment was monitored on a daily basis. The food was not replaced during the exposure period, and fecal pellets were collected weekly. At the end of exposure, animal mortality was recorded and the surviving animals were weighed. Uneaten leaves were dried in a laboratory dryer (SP120 Easy, Kambič Laboratory Equipment d.o.o., Semič, Slovenia) at 50°C for 24 h prior to weighing. The experiment was considered valid if the mortality of controls did not exceed 20% (Homung et al., 1998).

2.4. Experimental design for 48-h soil selection behaviour test

2.4.1. Soil preparation

Non-sterile standardised natural soil Lufa 2.2 (LUFASpeyer, Speyer, Germany) was used for the test. It was characterized as a loamy sand with $1.77 \pm 0.2\%$ organic matter, $7.2 \pm 1.2\%$ clay, $\text{pH } 5.5 \pm 0.2$ (0.01 M CaCl_2), Cation Exchange Capacity $10.1 \pm 0.5 \text{ meq/100 g}$, and water holding capacity (WHC) $41.8 \pm 3.0 \text{ g H}_2\text{O/100 g dry soil}$. The pH of the test soil was measured according to ISO DIN 10390:1994 using a pH/conductivity meter (Thermo Scientific Orion Star A215 Benchtop pH/Conductivity Meter). The electrical conductivity (EC) of the tested soil was measured in a soil–water extract (1:5 = w:v) (Owojori and Reinecke, 2014). Shortly, 5 g of test soil was thoroughly mixed (1:5 = w:v) with deionized water. The resulting suspension was left to settle for 2 h at room temperature and the EC of the liquid phase was measured using a pH/conductivity meter (Thermo Scientific Orion Star A215 Benchtop pH/Conductivity Meter).

The soil was prepared in accordance with the OECD test No. 222 (OECD, 2004). Individual salt, NaCl, NaNO_3 , KCl or KNO_3 , was dissolved in a volume of deionized water necessary to reach a final moisture content equivalent with 40% of the WHC of the soil. Individual salt solution was then mixed thoroughly with the soil before introducing it into a test vessel. Control soil was moistened with deionized water only. The final nominal concentrations of selected salts in the Lufa 2.2 soil were 0 (control), 1, 2, and 5 g salt/kg dry soil.

2.4.2. Soil selection behaviour test

The test container comprised two identical polypropylene vessels (0.1 L) connected with a fixed polypropylene tunnel (1.3 cm wide, 4 cm long) to enable animal migration between two qualities of soil and covered with Petri dish covers (Ø 6 cm) (Fig. 1). Vessels were filled with 20–25 g of moist standard soil Lufa 2.2. Animals were exposed to clean Lufa 2.2 soil (0, control) and soil contaminated with individual salt simultaneously for 48 h. The nominal concentrations of pairs used in the test were 0–0, 0–1, 0–2, and 0–5 g salt/kg dry soil. The soil selection test was run with 12 replicates per treatment, each replicate contained 1 animal. Pre-weighed adult (non-depurated) isopods were individually introduced into the test containers randomly to one side or the other. Incubation took place in a climate chamber at $22 \pm 1^\circ\text{C}$, with 80%

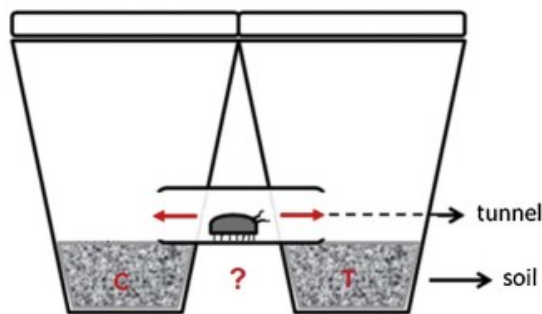


Fig. 1. Scheme of the test set up for 48-h soil selection test with isopods *Porcellio scaber*. The test container comprised two identical polypropylene vessels (0.1 L) connected with a fixed polypropylene tunnel (1.3 cm wide, 4 cm long) to enable animal migration between two qualities of soil and covered with Petri dish covers (Ø 6 cm). Both vessels were filled with 20–25 g of moist standard soil Lufa 2.2: one with clean soil (C) and the other with soil contaminated (T) with individual salt (NaCl, KCl, NaNO_3 , or KNO_3).

relative humidity and a 16/8 h light/dark period cycle (120 and 16 lx, respectively). During the 48-h exposure period, test vessels were monitored 10 times at regular time intervals and the location of individual animal was recorded (control vs. contaminated side) (Warburg, 1993). This data was then used for the calculation of soil selection response. No food was offered to animals during the experiment. Moisture content was checked at the beginning and at the end of the experiment by weighing the test containers.

2.5. Data analysis

The following feeding parameters were calculated for each individual animal: feeding rate (FR), and growth efficiency (GE). Data from dead animals was not included in the calculation of feeding parameters. The calculation of feeding parameters (for an individual animal) was as follows:

$$\text{FR} = \frac{(W_{Ls} - W_{Le})}{W_{isop a}} \div N_d \quad (1)$$

$$\text{GE} = \frac{(W_{isop e} - W_{isop s})}{W_{isop s}} \times 100 \div N_d \quad (2)$$

where, dw—dry weight; fw—fresh weight; W_{Ls} —dry leaf weight on start (mg dw); W_{Le} —dry leaf weight at the end (mg dw); $W_{isop a}$ —average isopod fresh weight (mg fw); $W_{isop s}$ —isopod fresh weight on start (mg fw); $W_{isop e}$ —isopod fresh weight at the end (mg fw); N_d —number of days; FR—feeding rate (mg of consumed food/mg isopod/day); GE—growth efficiency (%/day).

The soil selection was calculated as follows. In each test vessel one individual animal was monitored 10 times during the 48 exposure (only at daylight). The position of the animal on certain side of the soil was recorded. At the end of experiment the percentage of visits on each soil was calculated. Based on 12 replicates for each exposure group, the mean share of visits on each soil was calculated. The uncertainties were expressed as standard errors (SE). The statistical significance of differences between the control and the exposed groups of animals (in both

14 days and 48 h food selection experiment) was assessed by the Mann–Whitney U-test ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$), using OriginPro 8.0 software (OriginLab, Northampton, MA, USA). Non-parametric statistics was used because the data violated the assumption of the parametric test. Data from the soil selection behaviour test was also evaluated according to ISO (2008) criteria (see Supplementary material Fig. S1).

3. Results

3.1. 14-days feeding assay

An increased mortality of isopods in comparison to control was observed in the case of NaNO_3 (up to 33%), KNO_3 (up to 42%), and KCl (up to 53%), however the mortality was not dose-dependent. The survival of control was within acceptable limits ($\leq 20\%$) (Fig. 2). We also recorded the moult of animals during the 14 days of exposure. We found increase in moult in the case of KNO_3 and KCl (Fig. 2).

The feeding rate of isopods decreased in the case of NaNO_3 and KNO_3 exposure, but not in the case of NaCl and KCl up to nominal 5 g/kg dry leaf (Fig. 3). The feeding rate was decreased after 14 days of exposure at 2 and 5 g/kg dry leaf in the case of NaNO_3 and at 1, 2, and 5 g/kg dry leaf in the case of KNO_3 . The growth efficiency was also affected: it decreased after 14 days of exposure at 1, 2, and 5 g/kg in the case of NaNO_3 ; and increased at 1 and 2 g/kg dry leaf in the case of KCl (Fig. 4).

3.2. Soil selection behaviour test

The data on soil selection are presented in two ways: (a) as the mean percentage (%) of isopod visits in each side of the vessel (Fig. 5) and (b) as the avoidance response of individual animals evaluated according to ISO (2008) criteria (Supplementary information Fig. S1). From both data presentations, it is evident that during a 48-h exposure set-up, isopods are able to choose between NaCl dosed and unamended soil: the isopods prefer to spend time on NaCl spiked soil (up to 5 g salt/kg dry soil). This was also observed at the lowest KCl exposure concentration (1 g salt/kg

dry soil), but at higher concentrations this was not evident (Fig. 5). In the case of KNO_3 and NaNO_3 no significant soil selection of isopods was found. In these two exposures isopods spent approximately 50% of their visits on both sides of the soil (Fig. 5).

To elucidate whether the animal selects the soil based on pH and EC of different exposures, we present these data in Table 1. There were no differences in the pH among the soils treated with different salts. The EC values for NaCl and KCl were comparable; in range from 0.46 to 1.87 dS/m and 0.43 to 1.67 dS/m, respectively. Also, the EC for KNO_3 and NaNO_3 were in a similar range: 0.32–1.18 dS/m and 0.35–1.25 dS/m, respectively.

4. Discussion

In the present study, we assessed the effect of four salts NaCl, KCl, NaNO_3 and KNO_3 (up to 5 g/kg dry leaf) on isopods *P. scaber* after 14 days of exposure to contaminated food. Additionally, the isopod selection between the non-spiked soil and salt amended soil was tested in a 48 h soil selection set-up (up to 5 g/kg dry soil).

After 14 days of exposure to KNO_3 and NaNO_3 , the feeding rate of isopods decreased in a dose-dependent manner, but no such changes were found upon NaCl and KCl exposure. The growth of isopods decreased after exposure to NaNO_3 . Since no effect was found in the case of NaCl and KCl, we deduce that the tested concentrations of Cl^- , K^+ and Na^+ (up to 3.0, 2.6 and 1.995 g/kg dry leaf, respectively) do not pose any effect on the feeding behaviour of *P. scaber*. In the case of KNO_3 and NaNO_3 , the concentrations of K^+ and Na^+ (up to 1.934, and 1.352 g/kg dry leaf, respectively) are even lower than in the case of KCl and NaCl (up to 2.622 and 1.967 g/kg dry leaf, respectively) therefore the effects caused by KNO_3 and NaNO_3 may be a result of NO_3^- present in the food. A decreased feeding activity and growth may not have been a result of food selection, because the isopods did not avoid NO_3^- containing soil. This indicates that NO_3^- could have affected the feeding physiology of isopods, but the mechanism of action is unknown. The main suggested NO_3^- toxic action in the literature is the conversion of oxygen-carrying pigments (e.g., methemoglobin, hemocyanin) to forms that are incapable of carrying oxygen (e.g., methemoglobin) (Camargo et al., 2005). However, it remains to be

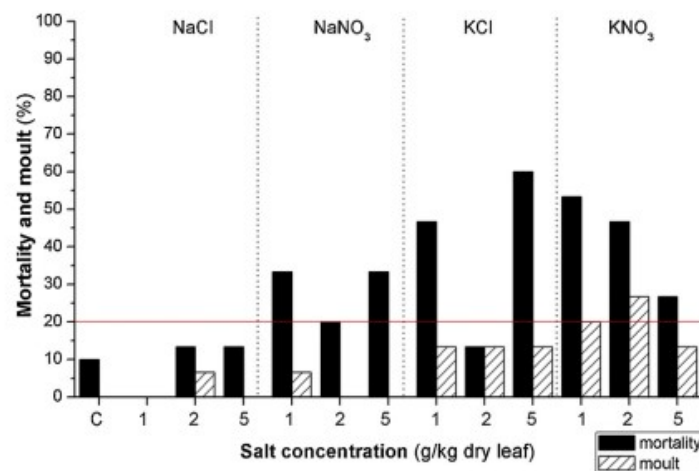


Fig. 2. Mortality and moult of isopods *Porcellio scaber* fed for 14 days with NaCl, KCl, NaNO_3 , or KNO_3 spiked food in controlled laboratory conditions. Mortality and moult were expressed as percentage of animals that died and moulted (in comparison to the total number of exposed animals) within 14 days of exposure (C—control). Red line shows the allowed mortality in controls (Hornung et al., 1998) (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

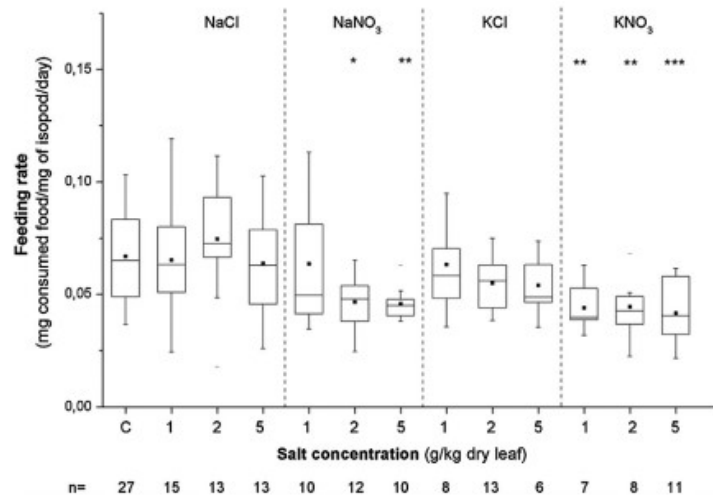


Fig. 3. Feeding rate of isopods *Porcellio scaber* fed for 14 days with NaCl, KCl, NaNO₃, or KNO₃ spiked food in controlled laboratory conditions. Significant differences in comparison to respective control (C—control) are shown as an asterisk (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001). *n* = number of animals per treatment.

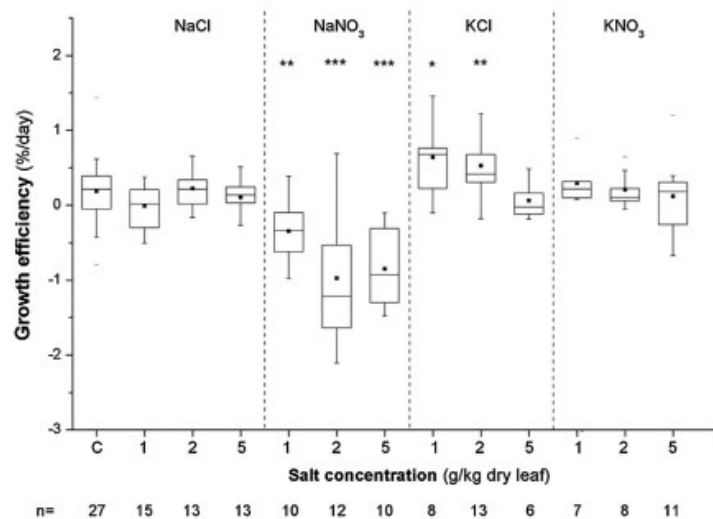


Fig. 4. Growth efficiency of isopods *Porcellio scaber* fed for 14 days with NaCl, KCl, NaNO₃, or KNO₃ spiked food in controlled laboratory conditions. Significant differences in comparison to respective control (C—control) are shown as an asterisk (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001). *n* = number of animals per treatment.

investigated and is beyond the scope of this work, how this is related to the decrease in the feeding and growth of isopods.

Similarly as in this work, a decrease in body weight was also observed in the case of earthworm *E. fetida* 28-day exposure to NaCl (EC₅₀ = 5.318 g/kg soil), KCl (EC₅₀ = 5.890 g/kg soil) and NaNO₃ (EC₅₀ = 4.845 g/kg soil) (Owojori and Reinecke, 2014). However, in this case the authors suggested that the decrease in feeding was due to food avoidance. Namely, earthworms *Aporrectodea caliginosa* and *E. fetida* exhibited clear avoidance behaviour towards NaCl spiked soil (EC₅₀ = 0.667 g NaCl/kg dry soil and 1.164 g NaCl/kg dry soil, respectively) (Owojori and Reinecke, 2009).

Our results show that in comparison to non-spiked soil the isopods prefer to spend time on NaCl spiked soil (1–5 g salt/kg dry soil) and at the lowest KCl exposure concentration (1 g salt/kg dry

soil), but no significant soil selection of isopods was found in other exposures (two higher concentrations of KCl, KNO₃ and NaNO₃). The result showed that the isopods do not select the soil based on pH, because there were no differences in the pH among the soils treated with different salts. The same also holds true for electrical conductivity (EC). For example, the isopods prefer the NaCl amended soil at all concentrations where the EC is in range of 0.46–1.87 dS/m, but they do not show any preference to the two higher KCl exposures, where EC is in a similar range (0.74–1.67 dS/m). Therefore the soil selection is most probably governed by the composition of the salt.

In the case of KNO₃ and KCl exposure the isopods exhibited increased occurrence of moult in comparison to control and both Na-salts. It has previously been reported that the concentrations of

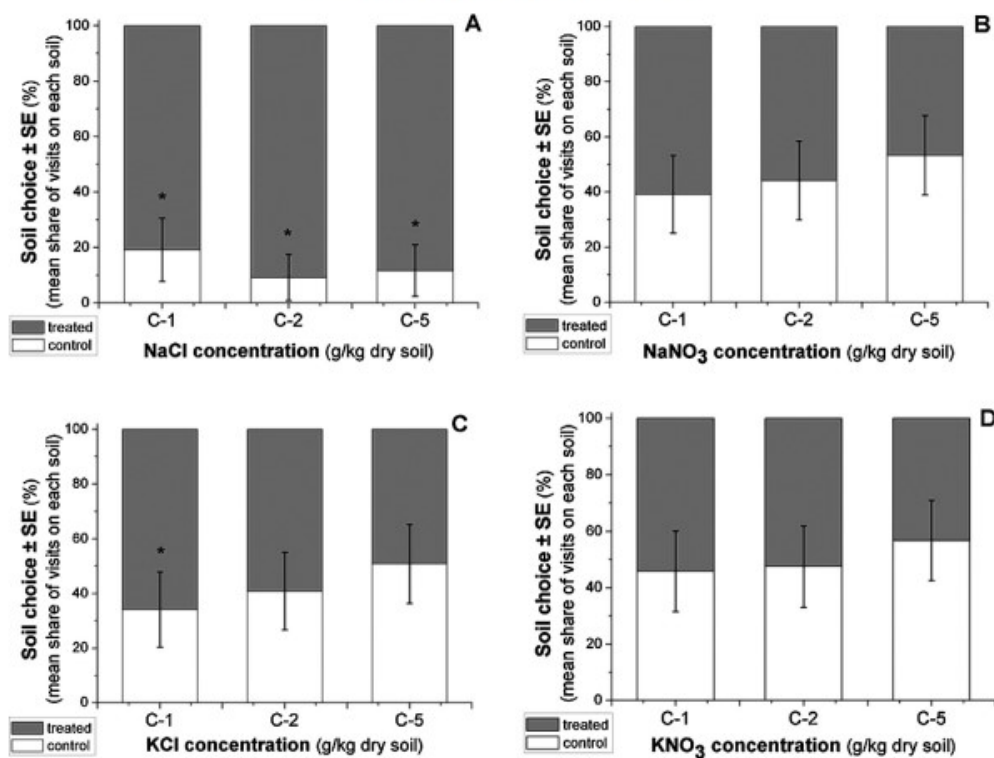


Fig. 5. Soil selection of isopods *Porcellio scaber*. Animals were exposed to clean Lufa 2.2 soil (C) and soil contaminated with individual salt ((A) NaCl, (B) NaNO₃, (C) KCl, or (D) KNO₃) simultaneously for 48 h in controlled laboratory conditions. The nominal concentrations of pairs used in the test were 0–0, 0–1, 0–2, and 0–5 g salt/kg dry soil. The data are presented as the mean percentage of visits on each soil and the uncertainties are expressed as standard error (SE) (control is shown as white colour; test was run with 12 replicates per treatment, each replicate contained 1 animal).

K⁺ and Na⁺ in the moulting fluid and haemolymph of *P. scaber* differ throughout the moulting cycle. The cationic composition of the moulting fluid (within ecdysial space of the anterior sternites) affects the deposition of calcium (Ziegler, 2008). Also, similarly in other isopods (*Ligia oceanica*) it has been shown that osmotic pressure in the haemolymph alters during the moulting cycle (Parry, 1953). Therefore, it is possible that alterations of osmotic pressure induced by salt exposure (in our case K⁺) may alter the moulting cycle. However, further experiments are needed to investigate the potential mechanisms of isopod moulting alteration by salts, in particular K⁺.

The results show that the survival of isopods decreased in a dose independent manner when exposed to NaNO₃, KNO₃ and KCl, but no effect on survival was found in the case of NaCl. We are unable to link the observed mortality to a particular anion/cation. It seems that the effect on mortality at certain concentrations is a result of joint action of a particular cation/anion concentration. This is in line with previous studies, where it has also been pointed out that it may not be considered particular anions/cations as individual constituents, but as a combination of both (Owojori and Reinecke, 2014). The individual toxicity of a cation or anion may be masked or inseparably affected by the associated anion or cation (Simmons, 2012).

This study shows that isopods are able to tolerate high NaCl concentrations (5 g salt/kg dry leaf and dry soil) in comparison to

other terrestrial invertebrates (earthworms) (Owojori and Reinecke, 2014). This is supported by the fact that isopods *P. scaber* are euryhaline species and have extreme osmoregulatory abilities (Wright et al., 1997). Osmoregulation of the haemolymph is associated with the accumulation of sodium (and probably chloride) in the hind gut and hepatopancreas (Wright et al., 1997). Isopods have colonised some of the most extreme environments including deserts in Israel and North Africa and hypersaline pools in Australia (Hopkin, 1991). In fact, a distribution analysis of 19 species of terrestrial isopods in Tunisian wetlands has shown that isopods are present in soil having salinity between 0.9 and 35.4 g/kg. In particular isopods from the family of Porcellionidae (*Porcellio variabilis*, *Porcellio laevis*, and *Porcellionides pruinosus*) are able to tolerate a wide range of salinities up to 35.4 g/kg soil (Khemaissia et al., 2010). Similarly, also aquatic isopods *Asellus aquaticus* have a very large natural salinity range, as they were found in locations from 0.0035–2.358 g Na/L water and even at extreme Na concentrations (6.896 g Na/L water) (Lockwood, 1959). Berezina (2003) reported that out of 27 different freshwater aquatic invertebrates from different taxonomic groups (tubellarians, oligochaetes, leeches, molluscs, crustaceans, and insect larvae) crustaceans *A. aquaticus* and *Gmelinoides fasciatus* were most tolerant to both decrease and increase in salinity (0.02–8.10 g/L water).

Conclusion

This study shows that a 14-day NaCl exposure (up to 5 g/kg leaf) did not affect the isopods feeding, growth and survival, while the other salts KCl, NaNO₃, and KNO₃ affected the terrestrial isopods. Along with the already published data on earthworms (Owojori and Reinecke, 2014), this is another confirmation that also other salts besides commonly investigated NaCl should be tested when the potential hazard of soil salinization to terrestrial organisms is in question.

Acknowledgements

The investigation was supported by the research projects financed by Slovenian Research Agency (J1-4109), the project FCH-S-15_2869 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and the research programme Integrative Zoology and Speleobiology under grant P1-0184 (D). Work of PhD student Monika Kos was supported by Slovenian Research Agency (ARRS) within the framework of young researchers. We thank PhD student Romih Tea for her help with the design of the experiments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.11.007>.

References

- Berezina, N.A., 2003. Tolerance of freshwater invertebrates to changes in water salinity. *Russ. J. Ecol.* 34 (4), 261–266.
- Camargo, J.A., Alonso, A., Salamanca, A., 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58, 1255–1267.
- Com., 2012. 46. Report from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions: the implementation of the Soil Thematic Strategy and ongoing activities.
- Drobne, D., Hopkin, S.P., 1995. The toxicity of zinc to terrestrial isopods in a standard laboratory test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31, 1–6.
- Drobne, D., Blažič, M., Van Gestel, C.A.M., Lešer, V., Zidar, P., Jemec, A., Trebše, P., 2008. Toxicity of imidacloprid to the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). *Chemosphere* 71, 1326–1334.
- Drobne, D., Jemec, A., Pipan-Tkalac, Ž., 2009. In vivo screening to determine hazards of nanoparticles: nanosized TiO₂. *Environ. Pollut.* 157, 1157–1164.
- Environment Canada, 2015. Pollution and waste—road salts. <http://www.ec.gc.ca/sels-salts/> (accessed 4.11.15).
- Guzyte, G., Sujetoviene, G., Zaltauskaite, J., 2011. Effects of salinity on earthworms (*Eisenia fetida*). *Environmental engineering. The 8th International Conference*.
- Haifa, 2014. Plant nutrition: multi-K potassium nitrate fertilizers. http://www.haifa-group.com/products/plant_nutrition/multi_k_potassium_nitrate_fertilizer/ (accessed 4.11.15).
- Harding, P.T., Sutton, S.L., 1985. Woodlice in Britain and Ireland: distribution and habitat. Institute of Terrestrial Ecology, Huntingdon.
- Hassall, M., Zimmer, M., Loureiro, S., 2005. Questions and possible new directions for research into the biology of terrestrial isopods. *Eur. J. Soil Biol.* 41, 57–61.
- S. Hopkin, A key to the woodlice of Britain and Ireland AIDGAP (Aids to the identification of difficult groups of animals and plants) field studies council publication No. 204, 1991.
- Hornung, E., Farkas, S., Fischer, E., 1998. Tests on the isopod *Porcellio scaber*. In: Løkke, H., van Gestel, C.A.M. (Eds.), *Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests. Ecological and Environmental Toxicology Series*. Wiley, Chichester, pp. 207–226.
- Hu, Y., Schmidhalter, U., 2005. Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 168, 541–549.
- ISO, 1994. Soil Quality—determination of pH. ISO 10390:1994. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2008. Soil quality—avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour—Part 1: test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*) ISO 17512-1:2008. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Khemaissia, H., Souty-Grosset, C., Nasri-Ammar, K., 2010. Impact of soil quality on the distribution of terrestrial isopods in some Tunisian wetlands. *Anadolu J. Agric. Sci.* 25 (2), 131–136.
- Lockwood, A.M.P., 1959. The osmotic and ionic regulation of *Asellus aquaticus* (L.). *J. Exp. Biol.* 36, 546–555.
- Oecd, 2004. Test No. 222: Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). In: *Guidelines for the testing of chemicals*.
- Owojori, O.J., Reinecke, A.J., 2009. Avoidance behavior of two ecophysiologicaly different earthworms (*Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*) in natural and artificial soils. *Chemosphere* 75, 279–283.
- Owojori, O.J., Reinecke, A.J., 2014. Differences in ionic properties of salts affect saline toxicity to the earthworm *Eisenia fetida*. *Appl. Soil Ecol.* 83, 245–252.
- Owojori, O.J., Reinecke, A.J., Rozanov, A.B., 2008. Effects of salinity on partitioning, uptake and toxicity of zinc in the earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2385–2393.
- Owojori, O.J., Reinecke, A.J., Rozanov, A.B., 2009a. The combined stress effects of salinity and copper on the earthworm *Eisenia fetida*. *Appl. Soil Ecol.* 41, 277–285.
- Owojori, O.J., Reinecke, A.J., Voua-Otomo, P., Reinecke, S.A., 2009b. Comparative study of the effects of salinity on life-cycle parameters of four soil dwelling species (*Folsomia candida*, *Enchytraeus doerjesi*, *Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*). *Pedobiologia* 52, 351–360.
- Parry, G., 1953. Osmotic and ionic regulation in the isopod crustacean *Ligia oceanica*. *J. Exp. Biol.* 30 (4), 567–574.
- Peters, 2006. Peters Chemical Company, Breaking the ice. <http://www.peterschemical.com/break-the-ice-comparison-of-ice-melting-chemicals/> (accessed 4.11.15).
- Rixen, C., Stoekli, V., Ammann, W., 2003. Does artificial snow production affect soil and vegetation of ski pistes? *Perspect. Plant Ecol.* 5, 219–230.
- Simmons, J.A., 2012. Toxicity of major cations and anions (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻, and SO₄²⁻) to a macrophyte and an alga. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 1370–1374.
- Tóth G., Montanarella L., Rusco E., 2008. Threats to soil quality in Europe. Available online: eusoils.jrc.ec.europa.eu/esdb_archive/eusoils_docs/other/EUR23438.pdf (accessed 4.11.15).
- United States Department of Agriculture, Salinity in agriculture. http://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/national/water/quality/tr/?cid=nrcs143_010914 (accessed 4.11.15).
- Várallyay, G., Tóth, G., Tóth, T., et al., 2006. Identifying Risk Areas for Soil Degradation in Europe by Salinization/sodification. In: Eckelmann, W. (Ed.), *Common Criteria for Risk Area Identification According to Soil Threats*. European Soil Bureau Research Report No. 20, Luxembourg, pp. 43–50.
- Warburg, M.R., 1993. *Evolutionary Biology of Land Isopods*. Springer Verlag, Berlin, pp. 57–69.
- Wright, J.C., O'Donnell, J.M., Sazgar, S., 1997. Haemolymph osmoregulation and the fate of sodium and chloride during dehydration in terrestrial isopods. *J. Insect Physiol.* 43, 795–807.
- Zidar, P., Drobne, D., Štrus, J., 1998. Determination of moult stage of *Porcellio scaber* (Isopoda) for routine use. *Crustaceana* 71, 646–654.
- Zidar, P., Drobne, D., Štrus, J., Blejček, A., 2003. Intake and assimilation of zinc, copper, and cadmium in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* Latr. (Crustacea, Isopoda). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 1028–1035.
- Ziegler, A., 2008. The cationic composition and pH in the moulting fluid of *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda) during calcium carbonate deposit formation and resorption. *J. Comp. Physiol. B* 178, 67–76.

APPLICATION OF STATISTICAL METHODS FOR ECOTOXICOLOGICAL DATA EVALUATION

Pavčina Škarková^{1,*}, Helena Zlámalová Gargošová¹, Jan Holešovsky²,
Milada Vávrová¹, Jaroslav Michálek² and Zuzana Olejníčková¹

¹Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection, Faculty of
Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

²Institute of Mathematics, Faculty of Mechanical Engineering, Brno University of Technology, Technická 2896/2, 61669 Brno, Czech Republic

ABSTRACT

This work aims to evaluate ecotoxicological endpoints for selected pollutants by applying suitable statistical methods and to assess the ecotoxicity of these pollutants. The tested substances were pesticides, pharmaceuticals, synthetic musk compounds and foam extinguishing agents. These pollutants were chosen according to the fact that they can easily enter various parts of environment, both intentionally and non-intentionally. The tests were performed on fresh water invertebrate crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus* and on terrestrial annelid *Eisenia fetida*. On the basis of calculated values of the ecotoxicological endpoints, toxicity and dangerousness of pollutants in relation to the environment were determined.

KEYWORDS:

toxicity; *Daphnia magna*; *Thamnocephalus platyurus*; *Eisenia fetida*; generalized linear regression; binomial test

1. INTRODUCTION

Chemicals are an integral part of everyday life; nevertheless they may affect the environment and human health. Prediction of their impact on the environment, its biotic component above all, is possible thanks to the results of ecotoxicological tests performed on representatives of aquatic and terrestrial ecosystems.

Pesticides are intentionally applied into the environment where they become a part of terrestrial ecosystem and create possible danger for soil organisms. Soil loss and seepage may also cause contamination of the aquatic ecosystem [1, 2]. Pharmaceuticals and synthetic musk compounds become part of sewage waters and of the sludge of treatment plants. As they cannot be fully removed, they may contaminate surface water. They also may enter the environment in the form of applied sewage sludge and effluent used for irrigation [3-7]. Another testing group, fire extinguishing agents based on fire-fighting foams, is often

used for fire suppression. These chemicals can also easily enter terrestrial and consequently aquatic ecosystems [8-10]. Many works confirm that usual disposal processes in sewage treatment plants are not sufficient [11-13].

The effect of the pollutant concentration rate on test organisms is assessed by methods of mathematical statistics. The toxicity tests serve to monitor the dependence of a substance content on the organism mortality. Hence, the main objective is to determine the median lethal concentration value LC50. For this purpose, a proper statistical model should be considered. Especially, due to the boundedness of mortality, attention is paid to the theory of generalized linear regression, often used in practical situations. Commonly used are so-called logit or probit models [14, 15], models based on other S-curves, e.g. Gompertz or Weibull curves are rarely applied [14]. For the analysis of earthworm avoidance behaviour classical statistical procedures based on binomial tests were performed; homogeneity testing of repeatedly conducted trials was done by Fisher's exact test [16, 17].

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Representatives of the tested substances

From the group of foam extinguishing agents, five concentrates foaming agents were selected, i.e. Sthamex F-15, Expyrol F-15 and Finiflam F-15 representing a group of standard synthetic foaming agents, Moussol APS F-15 as a representative of fluorosynthetic foaming agent forming water film and Pyrocool B, which is a multipurpose synthetic foaming agent. For ecotoxicological testing, the individual foam concentrates were mixed with water in the ratio they are most often mixed in standard firefighting practice. Sthamex F-15 was prepared as a 5% solution, Moussol APS F-15, Expyrol F-15, Finiflam F-15 and Pyrocool B are applied as a 3% solution. These solutions represented the basic solutions which were diluted to prepare concentration series for the ecotoxicological effects evaluation.

Diclofenac and ibuprofen were selected from the group of non-steroidal anti-inflammatory pharmaceuticals, and penicillin G and ampicillin from the group of antibacterial

* Corresponding author

agents. Synthetic musk compounds were linear (alicyclic) substances namely linalol, linalool, aroacet and arofloron. Pesticides were represented by Topsin M 500 SC and Perfekthion. The former is a systemic fungicide received by leaves and roots of plants containing 500 g.L^{-1} of the active ingredient thiophanate-methyl. The latter is a systemic insecticidal mixture used for controlling aphids and beetroot flies with the active ingredient dimethoat 400 g.L^{-1} .

2.2 Test organisms

For an assessment of the negative impact of the mentioned substances on organisms of the aquatic ecosystem, two microbiotests were used. Thamnotoxkit FTM and Daphtoxkit FTM are performed on aquatic invertebrates *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, which represent the trophic level of consumers [18, 19]. The organism *Daphnia magna* falls in the subphylum Crustacea, the class Branchiopoda and the order Cladocera. It occurs in large quantities in freshwater habitats as part of the zooplankton together with rotifers and copepods [20].

To evaluate the negative impact on the biota of terrestrial ecosystem, testing organism *Eisenia fetida* (redworm) was selected, belonging to the phylum Annelida, the class Clitellata and the family Lumbricidae. Earthworms have a number of unique functions in the soil. First of all, it is their significant contribution to soil formation, soil profile creation and decomposition activity. It is a typical geobiont, which means that the entire development cycle takes place in the soil. They have significant bioaccumulation and bioconcentration capability and therefore belong among macroconcentrators. The presence of earthworms in soil is indispensable, and therefore it is very important to know that xenobiotics located in the terrestrial ecosystem are not toxic for them [21].

2.3 Ecotoxicological tests

2.3.1 Daphtoxkit FTM

Acute toxicity test uses crustaceans *Daphnia magna* as a test organism and is based on an assessment of immobilization or mortality of these organisms after 48 hours exposure to the tested substance. The number of immobilized or dead organisms is counted after 24 and 48 hours. From obtained data, the degree of immobilization and mortality can be calculated as values 24h EC50, 48h EC50, and 24h LC50, 48h LC50, respectively. This test is very sensitive, feasible and user friendly. It is also supplied in the kit form, which includes material for six complete toxicity tests, including dormant eggs of test organisms in the form of so-called ehippia [18]. This test was used for testing foam extinguishing agents, synthetic musk compounds and pharmaceuticals.

2.3.2 Thamnotoxkit FTM

Thamnotoxkit FTM is a toxicity test with high sensitivity and it is based on the use of test organisms *Thamnocephalus platyurus*. These organisms are characterized by their occurrence in not only pure nature water, but also in extreme habitats, e.g. muddy water with an alkaline re-

action. This bioassay is supplied in the kit form, which includes material for six complete toxicity tests. The set comprises test organisms in the form of dormant eggs (cysts). Their recovery and preparation for the test takes about several tens of hours. During the test, hatched organisms are exposed for 24 hours to the test substance. After this period, mortality in different concentrations of the substance is assessed, and 24hLC50 value is evaluated [19]. This test was used for testing foam extinguishing agents, synthetic musk compounds and pharmaceuticals.

2.3.3 Earthworm, Acute Toxicity Test OECD 207

In this test, acute toxicity is determined after 14 and 28 days of exposure. The test is conducted in an artificial soil, treated with the test substance in the specified concentration. The artificial soil (750 g) is placed into the test containers and pH is adjusted to 6.0 ± 0.5 by using CaCO₃. The soil is moistened to 40 - 60 % WHC (Water Holding Capacity). Earthworms should be adult (at least two months old with clitellum) with an individual weight from 300 to 600 mg. The optimal temperature for the experiment is $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Ten test organisms (*Eisenia fetida*) are placed into each test vessel and two replicates for each treatment are performed. After 14 and 28 days earthworms weight and mortality are determined. The resulting values are used for calculation of the final value LC50 [22]. This test was used for testing pesticides.

2.3.4 Earthworm, Avoidance test ISO 17512-1:2008

Avoidance test determines the quality of soils and the effects of chemicals on behaviour of earthworms. This screening test is rapid, it takes only 48 hours. The principle of this test lies in the fact that adult organisms (usually 10 individuals) are at the same time exposed to the control artificial soil and also the soil contaminated by tested substance. This test is called a two-chamber test, as both soils are placed in one test vessel. The vessel is labeled and closed by a plastic cover after introducing organisms into the soil. Holes in the cover allow sufficient aeration. The migration of organisms can take place smoothly between two tested substrates. At the end of test, the soils are separated and in each test substrate (artificial soil and artificial soil treated by tested substance) the number of individuals is counted. The sensitivity of the organism to the test substance is determined [23]. This test was used for testing foam extinguishing agents.

2.4 Statistical methodology

2.4.1 The mortality-concentration dependence analysis

The dependence of organism (*Thamnocephalus platyurus*, *Daphnia magna*, *Eisenia fetida*) mortality on pollutant concentration was assessed by independent replications of the test for different concentrations corresponding to the appropriate concentration series. Thereby, independent pairs (Z_i, X_i) of mortality-concentration measurements were observed. Here, Z_i denotes the number of dead individuals from a total of n reference organisms and X_i denotes the substance concentration. For a given concen-

tration the variable Z_i is distributed according to a binomial distribution. An appropriate mortality-concentration dependence can be described by generalized linear model [14, 15, 24]. The widely used logistic model [14, 24] was applied in the study.

Let us denote Y the proportion of dead organisms, i.e. $Y = Z/n$. The logistic model is

$$\text{logit}(Y) := \ln\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = \beta_1 + \beta_2 X, \quad (1)$$

where on the left side is a so-called logit link function, and $\beta = (\beta_1, \beta_2)$ is a vector of unknown real regression parameters. The estimates of these parameters, further denoted as $b = (b_1, b_2)$, can be obtained on the basis of maximum likelihood method. Such estimates show usually desired properties, as they are known to follow a normal distribution. Let us denote $V = (V_{ij})_{i,j=1,2}$ the variance matrix of the estimated parameters. The median lethal concentration LC50 corresponds to a substance concentration causing 50% mortality of reference organisms, and can be obtained from the model (1) for the level $Y = 1/2$. Simple derivation leads to the following estimator

$$\widehat{LC50} = -b_1/b_2. \quad (2)$$

In order to assess a precision of estimator (2), the confidence intervals were evaluated. The $100(1-\alpha)\%$ confidence intervals were obtained by the delta method [16, 17], and are of the form

$$\widehat{LC50} \pm u_{1-\alpha/2} \hat{\sigma}, \quad (3)$$

where $u_{1-\alpha/2}$ denotes the $(1 - \alpha/2)$ quantile of standard normal distribution. The standard error $\hat{\sigma}$ was obtained by the variance matrix V as follows

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{1}{b_2^2} (V_{11} + 2 \widehat{LC50} V_{12} + \widehat{LC50}^2 V_{22}). \quad (4)$$

2.4.2 Binomial test

The earthworm avoidance test was independently twice repeated. First, homogeneity of these repetitions was assessed by Fisher's exact test [16, 17] in order to exclude any inter-sample variability. This test is appropriate especially because of low observation frequencies. In case of homogeneity acceptance, the observations may be brought together. As it is further shown in section 3, the homogeneity was rejected in neither cases.

Obviously, the number of earthworms in control soil follows binomial distribution $Bi(n, p)$. The assessment of the influence on the presence of organisms in contaminated soil is performed by the binomial test. Being the effect of substance presence insignificant, the parameter p should be equal to $1/2$. Thus, the null hypothesis to be tested is $H: p = \frac{1}{2}$ with two-sided alternative $A: p \neq \frac{1}{2}$. The binomial test belongs to standard statistical tests, and in detail is it described for example in publications [16, 17].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Acute toxicity test

The mortality-concentration dependence was modelled by logistic regression (1) described in section 2.4.1. The values 24h LC50 and 48h LC50 were estimated independently from the observations of 24-hours and 48-hours mortalities. Similar procedure was applied for the earthworm acute toxicity test with 14 and 28 days exposition. Typical situations of estimated logistic curves are visualized in Figure 1. All evaluations and maximum likelihood estimations were carried out in Matlab 8.1. computational environment.

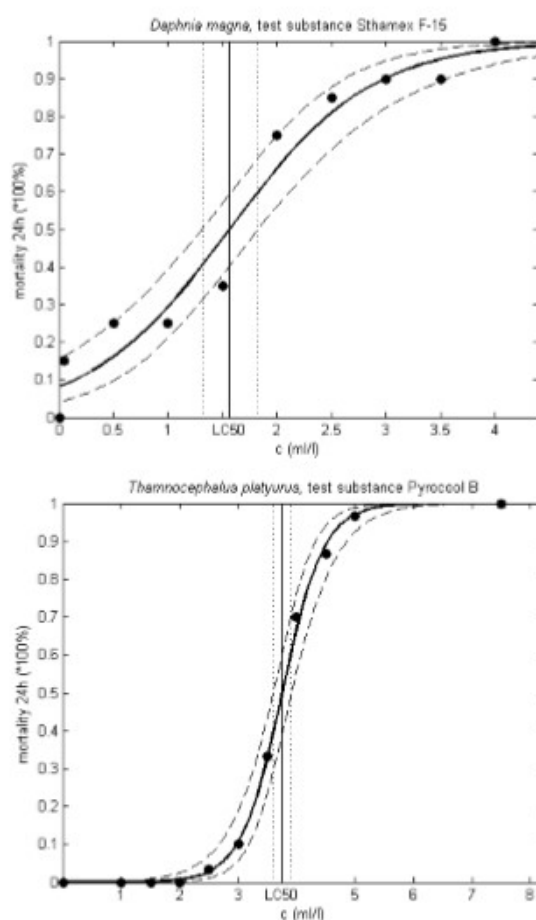


FIGURE 1 - Estimated logistic regression curves with 95% confidence intervals for the curves. Left: *Daphnia magna* and substance Sthamex F-15 at 24 hour test; right: *Thamnocephalus platyurus* and substance Pyrocool B at 24 hour test. Estimated values 24hLC50 and their 95% confidence intervals are visualized with vertical lines.

Results of acute toxicity test Thamnotoxkit FTM (Table 1) indicated that from the tested substances, foam extinguishing agents are the most toxic for the organism *Thamnocephalus platyurus* 24hLC50 values for these foamers ranged from 3.7

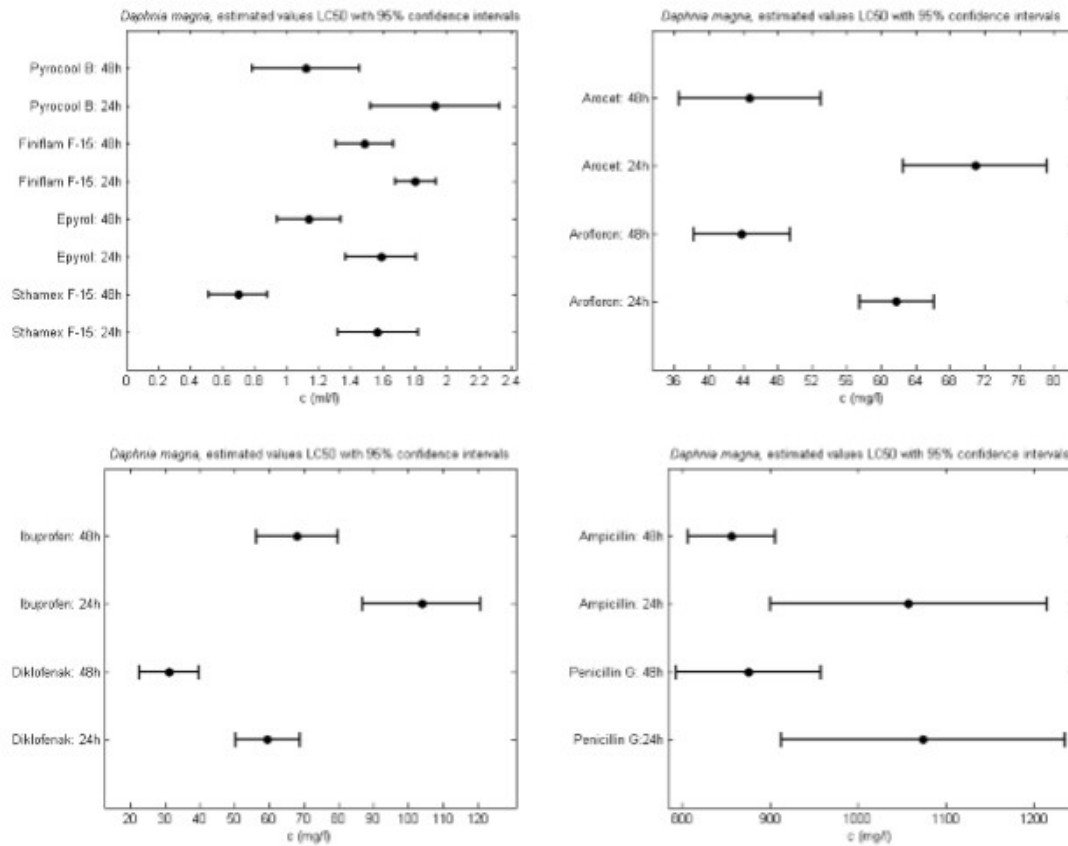


FIGURE 2 - Estimated values 24hLC50 and 48hLC50 with corresponding 95% confidence intervals for organism *Daphnia magna* and selected pollutants from the class of foam extinguishing agents, synthetic musk compounds and pharmaceuticals.

TABLE 1 - Results of Thamnotoxkit FTM a Daphtoxkit FTM test: Estimated values 24hLC50 and 48hLC50 with 95% confidence intervals.

Test substance	Thamnotoxkit F TM			Daphtoxkit F TM					
	24hLC50	95% confidence interval for 24hLC50		24hLC50	95% confidence interval for 24hLC50		48hLC50	95% confidence interval for 48hLC50	
Foam extinguishing agents									
Pyrocool B	3.8	3.6	3.9	1.9	1.5	2.3	1.1	0.8	1.5
Sthamex F-15	3.9	3.6	4.2	1.6	1.3	1.8	0.7	0.5	0.9
Epyrol F-15	3.9	3.6	4.1	1.6	1.4	1.8	1.1	0.9	1.3
Finiflam F-15	4.4	4.1	4.6	1.8	1.7	1.9	1.5	1.3	1.7
Moussol APS F-15	79.2	77.1	81.2	65.9	61.6	70.3	52.8	49.6	56.0
Synthetic musk compounds									
Lilial	13.6	12.3	14.9	6.0	4.9	7.2	2.5	1.6	3.5
Linalool	54.1	42.8	65.4	154.1	140.1	168.1	130.0	115.5	144.6
Arocet	62.9	57.2	68.6	70.9	62.6	79.3	44.8	36.5	53.0
Aroflorone	70.3	66.5	74.0	61.8	57.5	66.1	43.9	38.2	49.5
Pharmaceuticals									
Diklofenak	19.8	16.5	23.0	59.5	50.2	68.8	31.1	22.5	39.8
Ibuprofen	213.2	195.6	230.9	103.8	86.7	120.9	68.0	56.4	79.7
Ampicillin	668.3	594.7	742.0	1057.2	899.8	1214.6	856.0	806.4	905.6
Penicillin G	883.8	842.4	925.2	1073.5	912.1	1234.9	875.7	793.4	958.0

TABLE 2 - Results of acute toxicity test OECD 207 for pesticides: Estimated values 14dLC50 and 28dLC50 with 95% confidence intervals.

Test substance	14dLC50	95% confidence interval for 14dLC50		28dLC50	95% confidence interval for 28dLC50	
Topsin M 500 SC	164.1	112.0	216.2	144.6	79.5	209.7
Perfekthion	145.4	98.5	192.2	47.5	19.3	75.7

to 4.4 mg.L⁻¹. The only exception was represented by Moussol APS F-15, 24h LC50 value was 79.2 mg.L⁻¹. From the group of synthetic musk compounds, lilial exhibited much higher toxicity than the other musks (13.6 mg.L⁻¹), while the lowest effect was observed in arofloron (70.3 mg.L⁻¹). The lowest toxicity among all the tested organic compounds was found in pharmaceuticals. The 24hLC50 value for penicillin G was 883.8 mg.L⁻¹, for ampicillin 668.3 mg.L⁻¹, for ibuprofen 213.2 mg.L⁻¹ and for diclofenac 19.8 mg.L⁻¹. As it is apparent from the results presented, diclofenac exhibited ten times higher toxicity than the other pharmaceuticals.

Daphtoxkit FTM (Table 1) showed higher sensitivity in comparison to the Thamnotoxkit FTM test, particularly among foam extinguishing agents. On the other hand, it showed lower sensitivity for pharmaceuticals. The 24hLC50 values for each test substance were higher than the 48hLC50 values. Therefore, the evaluation shows that the toxicity to organisms increases with increasing exposure time. The 24hLC50 values of the foam extinguishing agents ranged from 1.1 to 1.9 mg.L⁻¹ and 48hLC50 values ranged between 0.7 and 1.5 mg.L⁻¹. As an exception, the Moussol APS F-15 24hLC50 value was 65.9 mg.L⁻¹ and the 48hLC50 value 52.8 mg.L⁻¹. Among the group of synthetic musk compounds, lilial was found to be the most toxic substance; its 24hLC50 value was 6.0 mg.L⁻¹ and its 48hLC50 value was 2.5 mg.L⁻¹. The 24hLC50 values for other synthetic musk compounds, i.e. linalool, arofloron and aroset were 154.1; 61.8 and 70.9 mg.L⁻¹ respectively, and the 48hLC50 values of those were 130.0; 48.9 and 44.8 mg.L⁻¹, respectively. Pharmaceuticals in this case represented the group of substances exhibiting the lowest toxicity to these testing organisms. The only pharmaceutical substance with higher toxicity was diclofenac with the 24hLC50 value of 59.5 mg.L⁻¹ and the 48hLC50 values of 31.1 mg.L⁻¹.

The most toxic to both testing aquatic organisms were foam extinguishing agents, except for Moussol APS F-15. The least toxic were pharmaceuticals (except for diclofenac). The most toxic synthetic musk compound was lilial.

Via the earthworms acute toxicity test, the toxicity of pesticides Topsin M 500 SC and Perfekthion was determined after 14 and 28 days of exposure (Table 2). While the toxicity of Topsin M 500SC increased only slightly during the test (the 14dLC50 value was 164.1 mg.kg⁻¹ dry soil and the 28dLC50 value was 144.6 mg.kg⁻¹ dry soil), the Perfekthion mixture showed a significant increase in toxicity over time (the 14dLC50 value was 145.4 mg.kg⁻¹ dry soil and the 28dLC50 value was 47.5mg.kg⁻¹ dry soil).

During the Daphtoxkit FTM test, both the 24hLC50 values and the 48hLC50 values were observed. Therefore, it is possible to make comparisons of variation for these estimates. As seen from the 95 % confidence intervals (Table 1), the variability of the estimates does not significantly alter with the length of exposure (in most cases it is slightly smaller than that of the 48hLC50 estimated values). However, significant variations were observed, for substances penicillin G and ampicillin, where the determined variability decreases significantly with increasing duration of exposure (Figure 2).

3.2 Earthworm avoidance test

For homogeneity comparison of two avoidance test repetitions was applied Fisher's exact test. The numbers of organisms in chambers with contaminated soil are described by binomial distribution with the same number of trials n , and success probabilities p_1 and p_2 . Thus, the null hypothesis to be tested is $H: p_1 = p_2$ with alternative hypothesis $A: p_1 \neq p_2$. Specific results for particular test substances can be found in Table 3, the values $h = 0$ and $h = 1$ correspond to acceptance and rejection of the null hypothesis at significance level $\alpha = 0.05$, respectively.

TABLE 3 - Results obtained by Fisher's exact test. The value h indicates rejected hypotheses at significance level 0.05.

Test substance	h	p-value
Sthamex F-15	0	≈1
Moussol APS F-15	0	0.3498
Expyrol F-15	0	≈1
Pyrocool	0	0.4737
Finiflam F-15	0	0.4737

TABLE 4 - Results of binomial test for particular substances. The value h indicates rejection of hypotheses at significance level $\alpha = 0.05$.

Test substance	h	p-value
Sthamex F-15	1	1.907e-6
Moussol APS F-15	0	0,263
Expyrol F-15	1	1.907e-6
Pyrocool	1	4.025e-4
Finiflam F-15	1	4.025e-4

Since the homogeneity was rejected in neither cases, particular repetitions of an avoidance test were brought together for all particular test substances. Further, in order to assess an influence of contamination presence on the organism behaviour, two-sided binomial tests were performed. Hereby, the null hypothesis to be rejected is

H: $p_1 = 1/2$. Results in Table 4 show that (with one exception being Moussol APS F-15) there were significant differences between occurrences in contaminated and control soils. Specific results support the negative impact of substance presence on the organisms.

4. CONCLUSION

The aim of this study was to assess the negative impact of selected analytes to the terrestrial and aquatic ecosystem by ecotoxicological tests, based on ecotoxicological parameters calculated by appropriately selected statistical methods. Daphtoxkit FTM and Thamnotoxkit FTM tests were used for testing chosen foam extinguishing agents, pharmaceuticals and synthetic musk compounds. *Daphnia magna* exhibited higher sensitivity to the foam extinguishing agents and lower sensitivity to the pharmaceuticals than the *Thamnocephalus platyurus* testing organism. As a conclusion from the comparison of these two tests results, it is always advisable to use a battery of tests involving more types of testing organisms to avoid incorrect evaluation of the ecotoxicity of studied substances. Every organism has different sensitiveness to the tested substance and therefore the results of the individual tests are not transferable.

Another important parameter is the time of exposure. With the extension of the testing period, we can evaluate the hazards of substances much more objectively. After the extension of the exposure time from 24 hours to 48 hours, an increase in the toxicity of tested substances was observed. It is therefore appropriate to include not only acute toxicity tests, but chronic toxicity tests too. This observation was confirmed by the results of many studies [25-27] and by our results of acute toxicity test on earthworms, where the test period was extended from 14 days to 28 days. Both tested substances showed increased toxicity with prolonged exposure. While the toxicity of the product Topsis M 500 SC was increased only slightly within the exposure time, the increase of toxicity of Perfekthion was much more pronounced.

The foam extinguishing agents were also tested in the avoidance test of earthworms (*Eisenia fetida*), to make a rough estimation of hazards that these substances represent to the terrestrial ecosystem. This test resulted in an uneven incidence of test organisms for all foam extinguishing agents, with the exception of Moussol APS F-15, in the control and the test soil with a preference for control. All the results of the statistical evaluation of the negative impact of extinguishers on the testing organisms were computed at the standard significance level of 0.05.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was conducted in the framework of the inter-faculty projects BUT at the Faculty of Chemistry and

the Faculty of Mechanical Engineering and was funded under the project number FCH/FSI-J-13-2081.

The authors have declared no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Chopra, A.K., Sharma, M.K. and Chamoli, S. (2011) Bioaccumulation of organochlorine pesticides in aquatic system-an overview. *Environmental Monitoring and Assessment* 173, 905-916.
- [2] Matthews, G.A. (2006) *Pesticides: health, safety and the environment*. USA, Wiley.
- [3] Brausch, J.M. and Rand, G.M. (2011) A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental Concentrations and Toxicity. *Chemosphere* 82, 1518-1532.
- [4] Jemba, P.K. (2006) Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 113-130.
- [5] Ternest, T.A., Meisenheimer, M., McDowell, D., Sacher, F., Brauch, H.J., Haist-Gulde, B., Preuss, G., Wilme, U. and Zulei-Seibert, N. (2002) Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environmental Science and Technology* 36, 3855-3863.
- [6] Kosjek, T., Heath, E. and Kompare, B. (2007) Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 1379-1387.
- [7] Ferrari, B., Paxéus, N., Giudice, R.L., Pollio, A. and Garric, J. (2003) Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrate acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55, 359-370.
- [8] Moody, C.H.A. and Field, J.A. (2000) Perfluorinated surfactants and the environmental implications of their use in fire-fighting foams. *Environmental Science and Technology* 34, 3864-3870.
- [9] Adams, R. and Simmons, D. (1999) Ecological effects of fire fighting foams and retardants. *Conference Proceedings. Australian Bush fire Conference*, Albury.
- [10] Britton, L.N. (1998) Surfactants and the environment. *Journal of Surfactants and Detergents* 1, 109-117.
- [11] Köck-Schulmeyer, M., Villagrasa, M., López de Alda, M., Céspedes-Sánchez, R., Ventura, F. and Barceló D. (2013) Occurrence and behavior of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact. *Science of the Total Environment* 458, 466-476.
- [12] Ibáñez, M., Sancho, J., Hernández, F., McMillan, D. and Rao, R. (2008) Rapid non-target screening of organic pollutants in water by ultraperformance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry* 27, 481-489.
- [13] Filho, A.M., dos Santos, F.N., Pereira, P.A.D.P. (2010) Development, validation and application of a method based on DI-SPME and GC-MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and groundwater samples. *Microchemical Journal* 96, 139-145.
- [14] Jorgensen, S.E. (2010) *Ecotoxicology: A Derivative of Encyclopedia of Ecology*. Elsevier/Academic Press, Boston.
- [15] Dobson, A.J. and Barnett, A. (2008) *An introduction to generalised linear models*. Chapman & Hall/CRC Press.

- [16] Larsen, R.J. and Marx, M.L. (2012) An introduction to mathematical statistics and its applications. Prentice Hall, Boston.
- [17] Agresti, A. (2007) An introduction to categorical data analysis. Wiley, Hoboken.
- [18] Daphtoxkit FTM (1996) Crustacean toxicity screening test for freshwater. Standard Operational Procedure. Creasel: Deinze, Belgium
- [19] Thamtoxkit FTM (1995) Crustacean toxicity screening test for freshwater. Standard Operational Procedure. Creasel: Deinze, Belgium.
- [20] Ebert, D. (2005) Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. Zoologisches Institut der Universität Basel, Switzerland.
- [21] Lavelle, P., Decaëns, T., Aubert, M., Barot, S., Blouin, M., Bureau, F., Margerie, P., Mora, P. and Rossi, J.P. (2006) Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology* 42, 3-15.
- [22] ISO Standard 17512-1 (2006) Soil quality: Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour: Test with earthworms (*Eisenia foetida* and *Eisenia andrei*).
- [23] OECD 207 (2006) Guidelines for Testing of Chemicals.
- [24] Faraggi, D., Izikson, P. and Reiser, B. (2003) Confidence intervals for the 50 per cent response dose. *Statistics in Medicine* 22, 1977-1988.
- [25] Zlámalová Gargošová, H., Vávrová, M., Čáslavský, J. and Jozífková, Z. (2012) Ecotoxicological evaluation of unconventional matrices. *Fresenius Environmental Bulletin* 21, 3154-3159.
- [26] Wiench, K., Wohlleben, W., Hisgen, V., Radke, K., Salinas, E., Zok, S. and Landsiedel, R. (2009) Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. *Chemosphere* 76, 1356-1365.
- [27] Kaza, M., Nałęcz-Jawecki, G. and Sawicki, J. (2007) The toxicity of selected pharmaceuticals to the aquatic plant *Lemna minor*. *Fresenius Environmental Bulletin* 16, 524-531.

Received: July 31, 2014

Accepted: September 16, 2014

CORRESPONDING AUTHOR

Pavlna Škarková

Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection

Faculty of Chemistry

Brno University of Technology

Purkynova 118

612 00 Brno

CZECH REPUBLIC

Phone: +420 725 776 185

E-mail: xcskarkova@fch.vutbr.cz

8.2 PUBLIKACE V RECENZOVANÉM ČASOPISE



Gold nanoparticles do not induce adverse effects on terrestrial isopods *Porcellio scaber* after 14-day exposure

Nanodelci zlata nimajo negativnih učinkov na kopenske rake vrste *Porcellio scaber* po 14-dnevni izpostavitvi

Pavčina Škarková^a, Tea Romih^{b,1,*}, Monika Kos^b, Sara Novak^b, Veno Kononenko^b, Anita Jemec^b,
Milada Vávrová^a, Damjana Drobne^b
Pavčina Škarková and Tea Romih equally contributed to this work.

^aBrno University of Technology, Faculty of Chemistry, Purkyňova 118, 612 00 Brno,
Czech Republic

^bUniversity of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology, Večna pot 111,
1000 Ljubljana, Slovenia

*correspondence: tea.romih@seyens.com

Abstract: Despite the anticipated environmental release of anthropogenic gold nanoparticles (AuNPs), there is currently not enough data on their potential impact on terrestrial environment. In the current study, we investigated the effects of considerably low concentrations of AuNPs on terrestrial isopods (*Porcellio scaber*) after 14 days of exposure. The effects on mortality, weight change, feeding rate, avoidance/preference feeding behavior, and cell membrane destabilization of digestive gland cells were followed. In parallel, the accumulation of Au in the digestive glands was measured. Our results show that none of the tested parameters was affected in isopods under given exposure doses (10 and 60 µg Au/g dry leaf) and exposure duration. No Au was assimilated in the digestive glands. Also, the same doses of the reference chemical, AuCl₃, showed no effect. We conclude that these concentrations of AuNPs are safe for terrestrial isopods. We encourage reporting the results showing no adverse effects of nanoparticles to balance the prevailing publication of their adverse effects. This will help to build a realistic public perception of the environmental risk of nanomaterials.

Keywords: nanoparticles, Au³⁺, avoidance behavior, bioaccumulation, safety

Izvleček: Kljub naraščujoči uporabi nanodelcev zlata (ND Au) trenutno še vedno ni dovolj podatkov o njihovih potencialnih negativnih učinkih na kopenske organizme. V tej študiji smo proučevali vpliv relativno nizkih koncentracij ND Au na kopenske rake vrste *Porcellio scaber* po 14-dnevni izpostavitvi. Proučevali smo vpliv na smrtnost, maso živali, stopnjo prehranjevanja, izogibalno vedenje in destabilizacijo membrane celic prebavnih žlez. Izmerili smo tudi asimilacijo Au v prebavnih žlezah. Rezultati so pokazali, da testirane koncentracije ND Au (10 in 60 µg Au/g lista) pri kopenskih rakih

¹ Current address: SEYENS Information Solutions and Education Ltd., Krimška ulica 20, 1000 Ljubljana, Slovenia

niso vplivale na nobenega izmed testiranih parametrov po danem času izpostavitve. V prebavnih žlezah nismo izmerili Au. Enake rezultate smo dobili tudi z referenčno kemikalijo, soljo AuCl₃. Zaključujemo, da so testirane koncentracije ND Au varne za kopenske rake. Naše mnenje je, da se na področju nanotoksikologije trenutno objavlja predvsem rezultate, ki kakorkoli nakazujejo na negativni vpliv nanodelcev na organizme. Zato želimo stimulirati tudi objavo rezultatov, ki kažejo nasprotno. Na ta način bomo pripomogli k bolj uravnoteženemu in realističnemu mnenju javnosti o okoljski varnosti nanomaterialov.

Ključne besede: nanodelci, zlato, izogibalno vedenje, bioakumulacija, varnost

Introduction

Gold is a trace element in lithosphere, hydrosphere, and biosphere. It occurs naturally at concentrations around 4 µg/kg in the Earth's crust, <200 µg/kg in rocks, <2 mg/kg in soils, <1 µg/L in freshwaters and <5 µg/L in marine waters, while waters from auriferous deposits may contain up to 1 mg/L of gold. In living organisms, such as microorganisms from ore fields and marine invertebrates, gold was found at concentrations 30–750 µg/kg (Korobushkina et al. 1983). Gold has no known physiological functions and it is usually considered as inert in the elemental form, Au⁰ (Sadler 1976, Eisler 2004). However, exposure to gold jewelry, gold dental restorations, gold implants, and beverages containing flake gold has been linked to contact allergy in susceptible individuals, mostly in the form of dermatitis. It has been proposed that dark discolorations of skin in contact with gold jewelry and dermatitis are associated with formation of the more reactive Au⁺ and Au³⁺ species due to extra- or intracellular dissolution of Au⁰, e.g. by sweat or in lysosomes (Rapson 1984, Eisler 2004).

Gold nanoparticles (AuNPs) – or the so-called “colloidal gold” – may be of either natural or anthropogenic origin. In the nature, AuNPs are formed by weathering of origin rocks or by microbial precipitation in auriferous soils (Southam et al. 2009). Production of anthropogenic AuNPs has been increasing due to their use in consumer, industrial and medical products. AuNPs are used for numerous applications, ranging from biosensors to catalysts, electronics, cosmetics, and cancer treatment (Unrine et al. 2010). According to the Consumer Products Inventory, there are currently 25 products (out of 1331 in total) listed containing

AuNPs, mostly dietary supplements and cosmetics (Project on Emerging Nanotechnologies, 2015, retrieved on June 21st, 2016). As a result of a variety of uses, environmental release of anthropogenic AuNPs is anticipated and there is a need of further research regarding the impacts of AuNPs on the environment. At the moment, no measured environmental concentration data for AuNPs are available. However, according to Mahapatra et al. (2015), the mean annual predicted environmental concentration of AuNPs in sludge is estimated at 0.120 and 0.150 µg/g for UK and US, respectively, and in sludge-treated soil at 300 and 150 ng/kg yearly for UK and US, respectively. Although yearly concentration is considerably low, it may increase due to continuous application over years.

The bioavailability of AuNPs and their effects on terrestrial invertebrates have been studied in earthworms (*Eisenia fetida*; Unrine et al. 2010, 2012), fruit flies (*Drosophila melanogaster*; Pompa et al. 2011; Sabella et al. 2011, Vecchio et al. 2012a, 2012b) and tobacco hornworms (*Manduca sexta*; Judy et al. 2010, 2012). However, for terrestrial isopod crustaceans, no data on bioavailability or effects of gold ions or AuNPs exists to date. Terrestrial isopods (*Porcellio scaber*) are suitable model terrestrial organisms for testing effects of chemicals, since they enable precise monitoring of the exposure dose together with its consequences on different levels of biological organization (Drobne 1997). Being hyperaccumulators of various metals (Hames and Hopkin 1989), they are especially convenient in studying the biological effects of metal salts and nanoparticles (Pipan-Tkalec et al. 2010, Golobič et al. 2012, Novak et al. 2012).

In isopods, the most sensitive biological endpoints for studying the effects of chemicals are biochemical, histological, and physiological (Drobne 1997). These endpoints can be simultaneously investigated in the digestive glands (hepatopancreas), which are in direct contact with the substances in food. Isopod digestive glands consist of four blind-ending tubes with intestinal, hepatic and pancreatic functions. The digestive gland epithelium is built of two cell types: larger B cells with secretive and absorptive functions, which contain lipid droplets and glycogen, and smaller S cells, which predominantly accumulate metals (Hames and Hopkin 1989). After consumption of metal salt- or NP-spiked food, the digestive gland epithelium can be often found containing elevated concentrations of metal ions accumulated in storage granules (Pipan Tkalec et al. 2010, Golobič et al. 2012). Accumulation of metals in digestive glands in insoluble form is considered as a means of detoxification under exposure to elevated concentrations of metals in food (Hopkin 1990). Destabilization of the digestive gland cell membrane by NPs is a measure of cytotoxicity; however, damaged cell membrane also permits cellular internalization of NPs, which may lead to further cytotoxic effects (Novak et al. 2012). The biological endpoints at the cellular and tissue level can be combined with organism-level endpoints, such as body mass change, mortality, and avoidance behavior (Škarková et al. 2016) to elucidate a broad picture of the effects of the tested NPs on isopods.

The aim of our present study was to investigate the effects of ingested AuNPs and AuCl₃ (10 and 60 µg Au/g dry leaf) on terrestrial isopods as well as potential bioaccumulation of gold into digestive gland cells. AuCl₃ was used as a positive control to account for potential dissolution of AuNPs inside the isopods' digestive tract (Eisler 2004; Golobič et al. 2012) and to differ between the effects of AuNPs and Au³⁺ ions. We related the data on Au bioaccumulation in digestive gland tissue to the data on the effects of Au exposure, such as mortality, weight change, feeding rate, and cell membrane destabilization of digestive gland cells. A 14-day food selection behavior test was also done to investigate their selection of the Au-spiked food.

Materials and methods

Test chemicals

AuNPs were synthesized by the INMETRO (National Institute of Metrology, Quality and Technology; Rio De Janeiro, Brazil) as a part of the EU FP7 NanoValid project under project label NNV-004. The data on particle size, shape, ζ-potential, and metal content was provided by the supplier. Gold (III) chloride (AuCl₃, ≥99.99% trace metals basis, CAS Number 13453-07-1) and gold standard for AAS (1 mg Au/mL, TraceCERT®) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Water used throughout the work (dH₂O) was first deionized and then further purified using Elix 10/Milli-Q Gradient unit (Millipore, Bedford, Massachusetts, USA [pH = 5.7, ρ = 18.5 MΩ·cm]). Physiological solution for *P. scaber* was prepared according to the protocol published in Hagedorn et Ziegler (2002). Tris(hydroxymethyl)amino-methane, NaCl, KCl, MgCl₂, and glucose were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All chemicals were of the reagent grade (EMSURE®). For the hepatopancreatic cell membrane stability assay, acridine orange solution (2% in dH₂O) and ethidium bromide solution for fluorescence (~1% in dH₂O) were used, both from Sigma Aldrich. Microwave acid digestion was performed with the reagent grade 65% HNO₃ (Fischer Scientific, Loughborough, Leicester, UK).

Test organisms

Isopods *P. scaber* originated from the synchronized laboratory culture at the Department of Biology, University of Ljubljana, Slovenia. Cultures of *P. scaber* were derived from individuals collected from an unpolluted site in Polhov Gradec, Slovenia (46° 3' 0" N, 14° 18' 0" E). Animals were kept in a climate chamber at 22 ± 1 °C with a 16/8 h light/dark period (120 and 16 lx, respectively; measured using LI-1000 Data Logger, LI – COR, Nebraska, USA), caged in glass containers with moist loamy sand and peat at the bottom. They were fed with fallen leaves from various trees, with periodical additions of potatoes, fresh vegetables, and apples.

Feeding exposure

Partially decomposed common hazel leaves (*Corylus avellana*) were collected in the Karavanke region, Slovenia (46° 21' 32.29" N, 14° 16' 36.12" E), for the purpose of the experiment. Leaves were air-dried at room temperature (24 ± 1 °C) and stored in a cardboard box until use. Bigger leaves with minimally damaged leaf lamina were straightened and the serrated leaf edge was cut off. Leaf laminae were cut into pieces of 100 ± 10 mg.

The AuNPs or AuCl₃ were suspended in dH₂O using a vortex (20 s, 2000 rpm) to obtain concentrations 10 and 60 µg Au/mL. The higher concentration corresponded to the Au concentration in the original AuNP suspension provided by the supplier (0.006 % w/w), and the lower one was chosen for comparison to the results of our previous studies, e.g. Pipan-Tkalec et al. (2011). No stabilizers were used, and the chemicals were prepared freshly for each experiment. 100 µL of Au NP dispersion or AuCl₃ solution per 100 mg of leaf was applied onto the abaxial surfaces of dry leaves. This resulted in two final concentrations of 10 and 60 µg Au/g dry leaf for both sources of Au. Control leaves were spiked with dH₂O only. Spiked leaves were allowed to dry for 24 hours at room temperature. After 24 hours, dry leaves were re-weighed and this data was then used for further calculations.

Only adult isopods of both sexes, and with 30–60 mg body mass were chosen for the experiments. Moulting animals (Zidar et al. 1998) and gravid females were excluded in order to keep the investigated population as homogenous as possible in terms of its physiological state. Each animal was placed individually in plastic Petri dishes (Æ 9 cm), to which individual pieces of Au-treated dry leaves were added. Two experiments were carried out. The first experiment (**Experiment 1**) consisted of the control group and the groups exposed to AuNPs. The second experiment (**Experiment 2**) consisted of the control group and the groups exposed to AuCl₃. In both experiments, each experimental group comprised 12 animals. The exposure conditions were the same for both experiments. Petri dishes were placed in a large, plastic-covered glass container and their humidity was maintained by periodical spraying of the internal side of the lids with dH₂O. The experi-

ments were maintained for 14 days in controlled and stable conditions at 22 ± 1 °C, 80% relative humidity (TFA, Dostmann GmbH et Co.KG, Wertheim, Germany), with a 16/8 h light/dark period (120 and 16 lx, respectively) and monitored on a daily basis. The food was not replaced during the exposure period, and fecal pellets were collected weekly.

Post-experimental sample preparation and analysis

After the 14-day exposure period, the animals were transferred to new Petri dishes and fed with uncontaminated hazel leaves for 24 h to deplete Au from their digestive system. The leaves and fecal pellets from the experiments were collected and weighed after drying at room temperature for 24 h. On the 15th day, animal mortality was recorded, and the survived animals were weighed. The experiments were considered valid if the mortality of controls did not exceed 20 % (Hornung et al. 1998). The animals were decapitated, and the hepatopancreas and gut were isolated with tweezers. One gland tube was used for the cell membrane stability assay, and other three gland tubes, the gut and the 'rest' of the body were further processed for the measurements with flame AAS.

Hepatopancreatic cell membrane stability assay

Cell membrane stability was tested with a modified method for the assessment of cell membrane stability, previously described by Valant et al. (2009). A single isolated hepatopancreatic tube was incubated for 5 minutes in a mixture of the fluorescent dyes acridine orange and ethidium bromide and then put on a microscope slide. Fresh samples were photographed and examined by the Axioimager.Z1 fluorescent microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) with two different sets of filters. The excitation filter of 450 to 490 nm and the emission filter of 515 nm were used to visualize acridine orange- and ethidium bromide-stained nuclei, and the excitation filter of 365 nm and the emission filter of 397 nm were used to visualize nuclei stained with ethidium bromide only. Cell membrane integrity was assessed by visual examination of micrographs and classified

from 1 to 10 according to a predefined scale. On the basis of preliminary experiments, the control animals showing less than 10 % of nuclei stained by ethidium bromide were classified as 1 or 2. The animals exposed to AuNPs, AuCl₃, but showing less than 10 % of nuclei stained by ethidium bromide, were also classified as 1 or 2 (Valant et al., 2009).

Gold content determination

Each isopod body part was placed on a separate small piece of a filter paper (approximately 4 mm×7 mm size) and stored in a plastic tube. Prior to analysis, samples were acid digested in concentrated HNO₃ in the Milestone Ethos E (Bergamo, Italy) microwave lab station equipped with SK-10 high-pressure segmented rotor and 3 mL quartz microsampling inserts. Digestion was conducted at 180°C and 600 W power, with step 1 (heating) lasting 15 min, step 2 (constant temperature) lasting 10 min, and 45 min cooling to 60°C. Total Au concentrations in the three parts of each animal (one digestive gland, the gut and the 'rest' of the body) were measured by flame AAS (Perkin-Elmer AAnalyst 100, Waltham, Massachusetts, USA). Metal spiking recovery was determined by measuring the Au concentrations on the remnants of leaves after the experiment.

Food selection behavior test

The food selection behavior test (**Experiment 3**) was carried out according to the protocol by Zidar et al. (2004). The preparation of spiked food and the selection of animals were conducted in the same way as in the toxicity endpoint tests. Particular attention was paid to include only the animals with intact antennae. Each of the five experimental groups included 15 animals, which were caged individually in plastic Petri dishes (Æ 9 cm) and offered two hazelnut leaf pieces (approximately 100 mg each) of different shape (square and triangular) for 14 days. The two leaf pieces had been treated differently. The first piece was control (spiked with dH₂O only) and the second one was spiked with a test compound. The tested Au sources and concentrations were the same as in the toxicity endpoint tests, i.e. AuCl₃ and AuNPs at concentrations 10 and 60 µg Au/g dry leaf. As a positive control, CoCl₂×6H₂O with the

nominal exposure concentration 2000 µg Co²⁺/g dry leaf was used. In our previous work (data not published), isopods *P. scaber* significantly avoided Co²⁺ contaminated food at the same nominal exposure concentration, therefore we used only 10 animals in this group for ethical reasons. This collectively resulted in 6 combinations of test compounds: "0 (control) vs. 0", "+control (Co²⁺) vs. 0", "AuNPs 10 vs. 0", "AuNPs 60 vs. 0", "AuCl₃ 10 vs 0" and "AuCl₃ 60 vs. 0". The experimental conditions and post-experimental procedure were the same as in the toxicity endpoint tests, except that animal dissection and tissue processing were not performed. The total food consumption rate was calculated as the amount of food consumed (both leaves offered) during 14 days, per fresh animal weight. The consumption rate of a single leaf was calculated as the percentage of the total food consumption rate. This data was then used for the calculation of food selection response. Dead animals were excluded from the calculations.

Data analysis

In all experiments, 12 or 15 animals per each tested group were exposed, but the number of analyzed animals after the experiments was lower due to mortality caused by moulting and due to development of marsupia in females; all such animals were excluded from further data processing. The numbers of analyzed animals are presented in the Figures as part of the x-axis labels. Data is presented as mean values, and uncertainties are expressed as standard deviations (SD).

Average animal fresh body mass (per individual) during the experiment was calculated as an arithmetic average of fresh body masses recorded before and after the experiment. Feeding rate (per individual) was calculated by dividing the total mass of consumed leaves during the experiment with the average animal fresh body mass. Since the animals collected for **Experiments 1 and 2** belonged to the same population, the corresponding control groups were tested for homogeneity of variances with the Fliegner-Killeen test and their average body masses and feeding rates were compared by the Mann-Whitney *U*-test using R statistical package (R Development Core Team 2015). Because no significant differences were found ($p > 0.05$), the controls were pooled before

further data analysis. Statistical significance of differences between the pooled control and the animals exposed to Au compounds was assessed by the Mann-Whitney *U*-test using OriginPro 8.0 software (OriginLab, Northampton, MA, USA).

Results

Nanoparticle characteristics

Gold NPs were received from the INMETRO as a reddish dispersion in water. As stated by the manufacturer's specifications, the Au NP dispersion contained 0.006 % (w/w) of Au, the nominal average particle size was 15.7 nm, and ζ -potential was -30.4 mV. The shape of nanoparticles was spheroidal (Fig. 1).

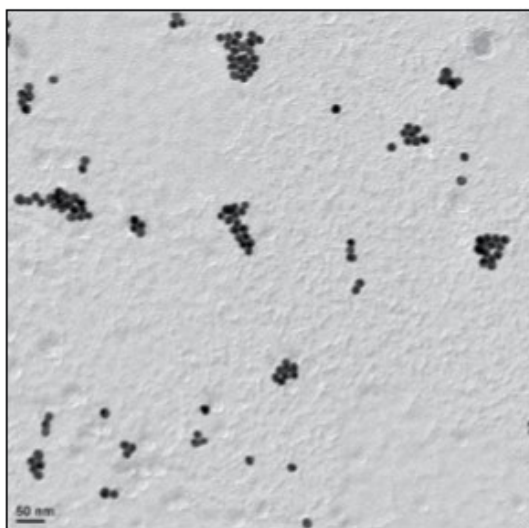


Figure 1. Transmission electron micrograph of Au nanoparticles; the photograph was provided by the INMETRO (National Institute of Metrology, Quality and Technology; Rio de Janeiro, Brazil).

Slika 1. Presevna elektronska mikrofografija nanodelcev Au; slika je posnel INMETRO (Nacionalni inštitut za metrologijo, kakovost in tehnologijo; Rio de Janeiro, Brazilija).

Mortality, body mass change and food consumption of isopods

Fourteen days of exposure to Au compounds had no statistically significant effect on mortality, average body mass (Fig. 2a) or feeding rate (Fig. 2b) of the test animals in comparison to the control in any of the exposure groups (Mann-Whitney *U*-test, $p > 0.05$, not marked on Fig. 2).

Digestive gland cell membrane stability

Valant et al. (2009) demonstrated that the digestive gland cell membrane stability value was rarely higher than 2 in the animals from the stock culture, which are in good physiological condition, and this was taken as a benchmark. The higher the value, the more the membrane is destabilized, and the cell membranes are considered completely destabilized when the value is 10. In the present study, in the animals from the stock culture, in control animals and in those exposed to Au-spiked food, the values were never higher than 2, which indicates that neither AuCl₃ nor AuNPs affected membrane stability of the digestive gland cells (data not shown).

Gold content in food and animal tissues

The measured metal concentrations on spiked leaves were within 10 % of the nominal values for both tested Au sources at both tested concentrations. No Au was found in the hepatopancreas, the gut or the rest of the body of the animals from any of the exposure regimens, regardless of the Au source or concentration (data not shown).

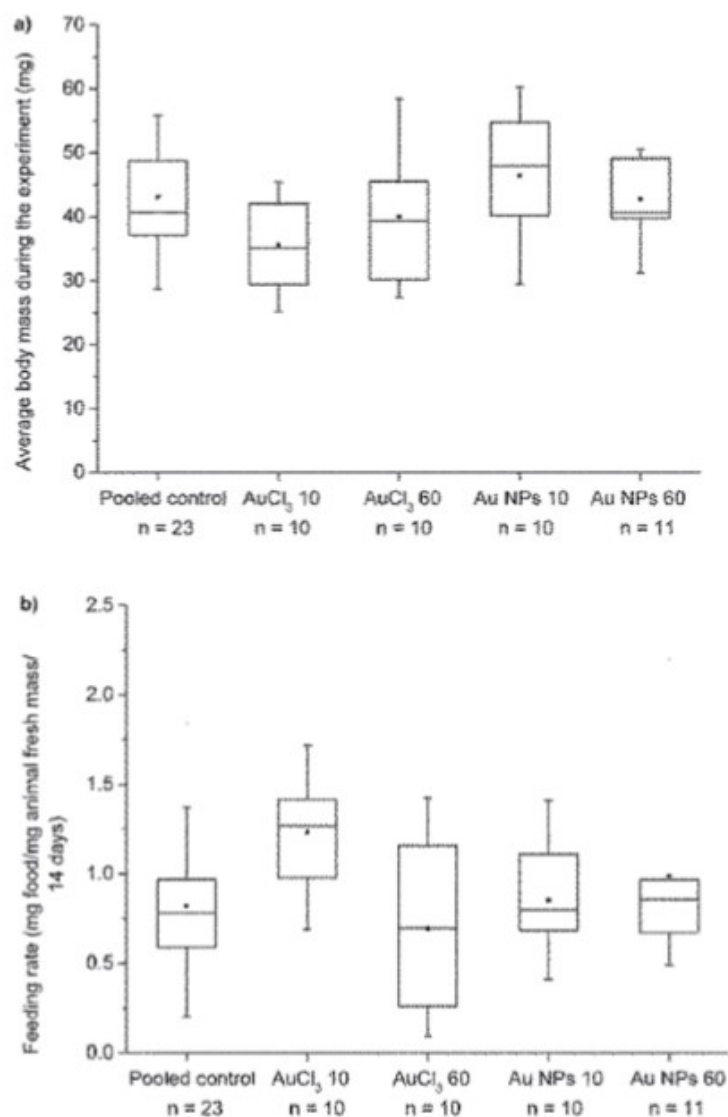


Figure 2. Average body mass (A) and feeding rates (B) of *P. scaber* isopods during 14-day exposure to Au-spiked food. The animals were fed non-spiked food (control) or food that was spiked with AuCl₃ salts (AuCl₃ 10 and AuCl₃ 60, per nominal Au concentrations) or Au nanoparticles (AuNPs 10 and AuNPs 60, per nominal Au concentrations). The controls from Experiment 1 (with AuNPs) and Experiment 2 (with AuCl₃) were pooled because no significant differences between them were found in any of the tested parameters. The nominal exposure concentrations of Au are provided on the x-axis. The symbols on the box plot represent maximum and minimum values (whiskers: ⊥), mean values (■), outliers (○); n = number of specimens in each test group.

Slika 2. Povprečna telesna masa (A) in stopnja prehranjevanja (B) enakonožcev *P. scaber* med 14-dnevno izpostavitvijo hrani, tretirani z Au. Živali smo hranili z netretirano hrano (kontrola) ali hrano, na katero smo nanесли AuCl₃ (AuCl₃ 10 in AuCl₃ 60, za nominalne koncentracije Au) oziroma nanodelce Au (AuNPs 10 in AuNPs 60, za nominalne koncentracije Au). Kontrolni skupini iz poskusa 1 (z nanodelci Au) in poskusa 2 (z AuCl₃) smo združili, saj med njima ni bilo statistično značilnih razlik v nobenem izmed testiranih parametrov. Nominalne izpostavitvene koncentracije Au so navedene na x-osi. Simboli na okvirjih z ročaji predstavljajo minimalne in maksimalne vrednosti distribucije (ročaji: ⊥), povprečja (■) in osamelce (○); n = število osebkov v vsaki testni skupini.

Food selection behavior test

In the **Experiment 3**, avoidance or preference behavior was not demonstrated (Fig. 3). The masses of consumed leaves did not significantly differ (Mann-Whitney *U*-test, $p > 0.05$) between the two leaf pieces (control and Au-spiked) for both tested Au compounds (AuNPs and AuCl₃)

and at both exposure concentrations (10 and 60 µg Au/g dry food). Significant preference for non-spiked over CoCl₂-spiked leaves was found in the positive control group (Fig. 3; Mann-Whitney *U*-test, $p < 0.001$).

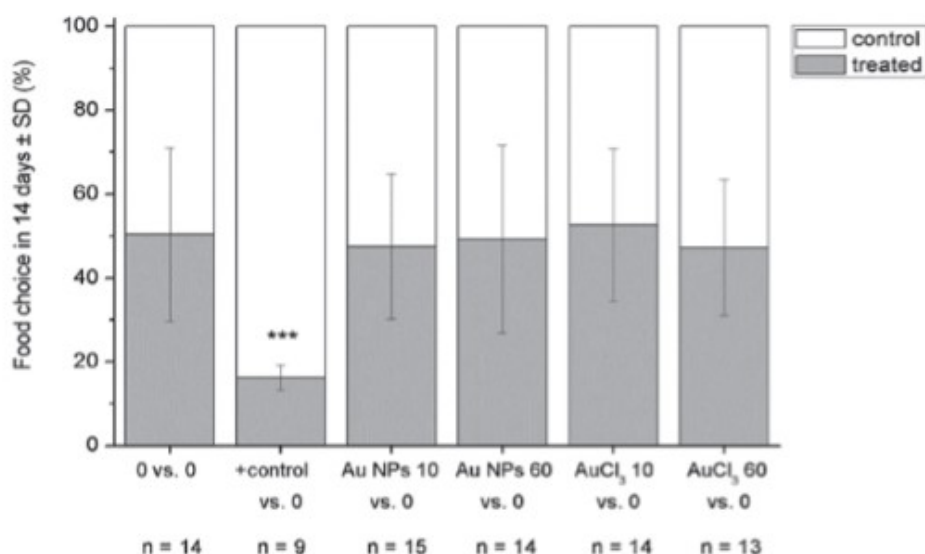


Figure 3. Food selection of *P. scaber* isopods. Animals were exposed to untreated food (0) and food treated with AuNP or AuCl₃ simultaneously for 14 days. The nominal exposure concentrations of Au are provided on the x-axis (in µg Au/g dry leaf). CoCl₂·6H₂O with the nominal exposure concentration 2000 µg Co²⁺/g dry leaf was used as a positive control (+control). The food choice (%) is presented as the ratio between consumption rates of the two offered leaves, expressed as mean percentages of the total food consumption rate for each exposure group. Uncertainties are expressed as standard deviation (SD). Significant differences: $p < 0.001$ (***) ; n = number of specimens in each test group.

Slika 3. Izbira hrane pri *P. scaber*. Živali so bile 14 dni hkrati izpostavljene netretirani hrani (0) and in hrani, na katero smo nanесли AuCl₃ oziroma nanodelce Au. Nominalne izpostavitvene koncentracije Au so navedene na x-osi (v µg Au/g suhe mase lista). Kot pozitivno kontrolo (+control) smo uporabili CoCl₂·6H₂O v nominalni izpostavitveni koncentraciji 2000 µg Co²⁺/g suhe mase lista. Izbira hrane (%) je predstavljena kot razmerje med stopnjama prehranjevanja z dvema ponujenima listoma ter izražena kot povprečna vrednost stopnje prehranjevanja za vsako testno skupino posebej. Negotovost je izražena s standardnimi deviacijami (SD). Statistično značilne razlike: $p < 0.001$ (***) ; n = število osebkov v vsaki testni skupini.

Discussion

In the present study we assessed the influence of AuNPs and AuCl₃ on different biological endpoints in the model organisms, terrestrial isopods *P. scaber*. We tested the adverse biological effects of AuNPs and AuCl₃ as detectable by common toxicological parameters (body mass change, food consumption rate, metal feeding preference/avoidance behavior, and mortality) and cell membrane integrity assay, which provides information on the cell membrane destabilization. In parallel, we assessed the Au³⁺ assimilation in digestive glands.

Our results show that AuNPs did not affect *P. scaber* mortality, body mass (Fig. 2a) or food consumption (Fig 2b) when exposed through food at concentrations 10 and 60 µg Au/g for 14 days. In other words, we showed that AuNPs and AuCl₃ do not affect the organism-level endpoints in *P. scaber* at relatively low exposure concentrations. Our results are in line with previous reports on earthworms (Unrine et al. 2010). In *E. fetida*, exposure to AuNPs (20 and 55 nm, 5 µg Au/g dry mass spheres) in soil for 28 days did not affect their mortality or growth (Unrine et al. 2010). In contrast, feeding with 15 nm citrate-capped AuNPs at concentrations 3 and 27 µg AuNPs/g food per day reduced the lifespan of *D. melanogaster* for 24 and 41 %, respectively, in comparison to control (average control population half-life was 80 days; Sabella et al. 2011). In the same experimental setup and with the same AuNPs, the lifespan was reduced for 62 % when *D. melanogaster* were exposed to 12 µg AuNPs/g food per day (average control population half-life was 37 days; Pompa et al. 2011). However, the exposure doses for *D. melanogaster* (Pompa et al. 2011, Sabella et al. 2011) were higher than in our study (0.7 and 4.3 µg Au/g food per day for nominal exposure concentrations 10 and 60 µg Au/g dry leaf, respectively), which may partially explain why mortality in *P. scaber* in our study was not elevated in comparison to *D. melanogaster*.

In line with this, we also showed that isopods show no preference/avoidance towards Au-spiked hazelnut leaves for both tested Au compounds (AuCl₃ and AuNPs; Fig. 3). This is in agreement with the observation that feeding rate of isopods was unaffected upon Au exposure (Fig. 2b). Avoidance behavior of isopods towards metal-

contaminated food has previously been shown (Zidar et al. 2004; Škarková et al. 2016).

Nanoparticles may pass from the gut into the lumen of the *P. scaber* hepatopancreas during digestion, as it has been demonstrated for TiO₂ NPs (Novak et al. 2012) and WO_x nanotubes (Novak et al. 2013), and cause cell membrane destabilization (Novak et al. 2012, 2013). However, neither AuNPs nor AuCl₃ caused the reduced cell membrane integrity of hepatopancreatic cells in our current study. The results of cell membrane integrity assay match the data on the Au assimilation. Namely, neither of the *P. scaber* body parts contained any gold, which indicates that AuNPs were not internalized into tissues and Au³⁺ ions were not assimilated into the digestive gland cells. In general, we cannot exclude the possibility that *P. scaber* possesses the assimilation capacity for Au³⁺, because Au has the affinity for sulphur-bearing ligands (Korobushkina et al. 1983), which are present in the type B granules of the hepatopancreatic S cells (Hopkin 1990) and enable the assimilation of other metals with affinity for sulphur, such as cadmium, copper, lead and mercury (Hopkin 1990), silver (Pipan-Tkalec et al. 2011) and cobalt (Novak et al. 2013). Nor we can exclude the possibility for the dissolution of AuNPs inside the *P. scaber* digestive tract (Golobič et al. 2012), since the dissolution of gold can be induced by biological macromolecules, most notably amino acids and proteins, as well as bacteria (Sadler 1976, Rapson 1982, Korobushkina et al. 1983). However, under employed exposure conditions, the internalization/assimilation of Au into *P. scaber* digestive glands clearly did not occur.

Our results contrast those for *E. fetida* (Unrine et al. 2010), *M. sexta* caterpillars (Judy et al. 2010, 2012), and *D. melanogaster* (Pompa et al. 2011) where AuNPs, administered *via* food, were found in tissues surrounding the digestive tract (including the digestive tract epithelium in *E. fetida*) as well as in the reproductive organs in *D. melanogaster*. The presence and localization of gold was corroborated by transmission electron microscopy (TEM) coupled to energy dispersive spectroscopy ([EDS] Unrine et al., 2010), X-ray absorption near edge spectroscopy (µXANES) and synchrotron X-ray fluorescence microprobe ([µXRF]; Judy et al. 2010, 2012) or high angle annular dark field scanning transmission electron

microscopy ([HAADF-STEM]; Pompa et al. 2011). No evidence of dissolution of AuNPs was observed in the quoted studies, so NPs were likely assimilated intact (Unrine et al. 2010, Judy et al. 2010, Pompa et al. 2011).

In conclusion, our results denote that concentrations of Au salt and AuNPs tested in this work (10 and 60 $\mu\text{g Au/g}$ dry leaf) do not induce adverse effects on terrestrial isopods after 14 days of exposure. These concentrations are higher than currently predicted environmental levels (Mahapatra et al. 2015), which further confirms the finding that AuNPs are safe for isopods. In general, AuNPs are among NPs with the least toxic potential for test organisms commonly employed in environmental studies. Namely, Bondarenko et al. (2016) have used a set of assays to screen seven NMs using 14 different test species and cell lines. The toxicity decreased in the following order: $\text{Ag} > \text{ZnO} > \text{CuO} > \text{TiO}_2 > \text{MWCNTs} > \text{SiO}_2 > \text{Au}$ (Bondarenko et al. 2016). According to our perception, the majority of authors in nanotoxicity research encourage the publication of those results that show some kind of effects of nanoparticles on organisms. We therefore suggest that also those data with no documented effects should be published in equal proportion to help build a realistic public perception of the nanomaterial environmental risk.

Acknowledgements

The paper is part of the PhD work of Pavlína Škarková, working under the supervision of Professor Milada Vávrová. PŠ received ERASMUS trainee scholarship for 5-month study visit in Slovenia under Grant Number ERA-MOB-2013-25. The investigation was supported by the research programs and projects financed by the Slovenian Research Agency (P1-0184, J1-4109) and within the FP7 EU Project "NANOVALID" (Contract No.

263147). TR acknowledges the grant "Innovative scheme of co-funding doctoral studies for promoting co-operation with the economy and solving of contemporary social challenges" under Grant Number 1291, received from Ministry of Education, Science, and Sports of Republic of Slovenia.

Povzetek

Nanodelci zlata se čedalje pogosteje uporabljajo za različne aplikacije, kot je npr. v kozmetiki, barvah in elektrokemijskih senzorjih ter v detekciji, diagnostiki in zdravljenju tumorjev. Kljub temu še vedno ni dovolj podatkov o njihovih potencialnih negativnih učinkih na kopenske organizme. V tej študiji smo proučevali vpliv okoljsko relevantnih koncentracij ND Au na kopenske rake vrste *Porcellio scaber* po 14-dnevni izpostavitvi. Živali smo izpostavili listom, na katere so bili nanešeni nanodelci zlata. Proučevali smo vpliv na smrtnost, maso živali, hitrost prehranjevanja, izogibalno vedenje in destabilizacijo membrane celic prebavnih žlez. Izmerili smo tudi asimilacijo Au v prebavnih žlezah. Rezultati so pokazali, da nobena izmed testiranih koncentracij ND Au (10 in 60 $\mu\text{g Au/g}$ lista) po 14-dnevnem hranjenju ni imela vpliva na kopenske rake. Prav tako nismo izmerili prisotnosti Au v prebavnih žlezah, kar kaže, da se ND Au niso niti raztapljali v prebavnem soku niti vstopali v celice prebavnih žlez. Enake rezultate smo dobili tudi z referenčno kovino, soljo AuCl_3 . Zaključujemo, da so testirane koncentracije ND Au varne za kopenske rake. Naše mnenje je, da se na področju nanotoksikologije trenutno objavlja predvsem rezultate, ki kakorkoli nakazujejo na negativni vpliv nanodelcev na organizme. Zato želimo stimulirati tudi objavo rezultatov, ki kažejo nasprotno. Na ta način bomo pripomogli k bolj uravnoteženemu ter realističnemu mnenju javnosti o okoljski varnosti nanomaterialov.

References

- Bondarenko, O. M., Heinlaan, M., Sihtmäe, M., Ivask, A., Kurvet, I., Jemec, A., Mannerström, M., Heinonen, T., Rekulapelly, R., Singh, S., Zou, J., Pyykkö, I., Drobne, D., Kahru, A., 2016. *In vitro* (eco)toxicity screening and hazard grouping of seven engineered nanomaterials: FP7 project NANOVALID. Nanotoxicology, in press.
- Drobne, D., 1997. Terrestrial isopods - a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1159–1164.
- Eisler, R., 2004. Mammalian sensitivity to elemental gold (Au⁰). *Biol. Trace Elem. Res.* 100, 1–17.
- Golobič, M., Jemec, A., Drobne, D., Romih, T., Kasemets, K., Kahru, A., 2010. Upon exposure to Cu nanoparticles, accumulation of copper in the Isopod *Porcellio scaber* is due to the dissolved Cu ions inside the digestive tract. *Environ. Sci. Technol.* 46, 12112–12119.
- Hagedorn, M., Ziegler, A., 2002. Analysis of Ca²⁺ uptake into the smooth endoplasmic reticulum of permeabilised sternal epithelial cells during the molting cycle of the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *J. Exp. Biol.* 205, 1935–1942.
- Hames, C.A.C., Hopkin, S.P., 1989. The structure and function of the digestive system of terrestrial isopods. *J. Zool.* 217, 599–627.
- Hopkin, S.P., 1990. Critical concentrations, pathways of detoxification and cellular ecotoxicology of metals in terrestrial arthropods. *Funct. Ecol.* 4, 321–327.
- Hornung E., Farkas, S., Fischer, E., 1998. Tests on the isopod *Porcellio scaber*. In: Løkke, H., van Gestel, C.A.M. (Eds.), *Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests. Ecological and Environmental Toxicology Series.* Wiley, Chichester, pp. 207–226.
- Judy, J.D., Unrine, J.M., Bertsch, P.M., 2010. Evidence for biomagnification of gold nanoparticles within a terrestrial food chain. *Environ. Sci. Technol.* 45, 776–781.
- Judy, J.D., Unrine, J.M., Rao, W., Bertsch, P.M., 2012. Bioaccumulation of gold nanomaterials by *Manduca sexta* through dietary uptake of surface contaminated plant tissue. *Environ. Sci. Technol.* 46, 12672–12678.
- Korobushkina, E.D., Karavaiko, G.I., Korobushkin, I.M., 1983. Biochemistry of gold. *Ecol. Bull.* 35, 325–333.
- Mahapatra I., Sun, T.Y., Clark, J.R., Dobson, P.J., Hungerbuehler, K., Owen, R., Nowack, B., Lead, J., 2015. Probabilistic modelling of prospective environmental concentrations of gold nanoparticles from medical applications as a basis for risk assessment. *J. Nanobiotechnol.* 13: 93.
- Novak, S., Drobne, D., Valant, J., Pipan-Tkalec, Ž., Pelicon, P., Vavpetič, P., Grlj, N., Falnoga, I., Mazej, D., Remškar, M., 2012. Cell membrane integrity and internalization of ingested TiO₂ nanoparticles by digestive gland cells of a terrestrial isopod. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 1083–1090.
- Novak, S., Drobne, D., Vaccari, L., Kiskinova, M., Ferraris, P., Birarda, G., Remškar, M., Hočevar, M., 2013. Effect of Ingested Tungsten Oxide (WO_x) Nanofibers on Digestive Gland Tissue of *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea): Fourier Transform Infrared (FTIR) Imaging. *Environ. Sci. Technol.* 47, 11284–11292.
- Pipan-Tkalec, Ž., Drobne, D., Jemec, A., Romih, T., Zidar, P., Bele, M., 2010. Zinc bioaccumulation in a terrestrial invertebrate fed a diet treated with particulate ZnO or ZnCl₂ solution. *Toxicology* 269, 198–203.
- Pipan-Tkalec, Ž., Drobne, D., Vogel-Mikuš, K., Pongrac, P., Regvar, M., Štrus, J., Pelicon, P., Vavpetič, P., Grlj, N., Remškar, M., 2011. Micro-PIXE study of Ag in digestive glands of a nano-Ag fed arthropod (*Porcellio scaber*, Isopoda, Crustacea). *Nucl. Instrum. Meth. B.* 269, 2286–2291.
- Pompa, P.P., Vecchio, G., Galeone, A., Brunetti, V., Sabella, S., Maiorano, G., Falqui, A., Bertoni, G., Cingolani, R., 2011. In vivo toxicity assessment of gold nanoparticles in *Drosophila melanogaster*. *Nano. Res.* 4, 405–413.
- Project on Emerging Nanotechnologies, 2016. Consumer Products Inventory. Retrieved on June 21st, 2016, from <http://www.nanotechproject.org/cpi/search-products/>.

- R Development Core Team, 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <http://www.R-project.org>.
- Rapson, W.S., 1982. Effects of biological systems on metallic gold. *Gold Bull.* 15: 19–20.
- Rapson, W.S., 1984. Skin contact with gold and gold alloys. *Gold Bull.* 17, 102–108.
- Sabella, S., Brunetti, V., Vecchio, G., Galeone, A., Maiorano, G., Cingolani, R., Pompa, P.P., 2011. Toxicity of citrate-capped AuNPs: an in vitro and in vivo assessment. *J. Nanoparticle Res.* 13, 6821–6835.
- Sadler, P.J., 1976. The biological chemistry of gold. *Gold Bull.* 9: 110–118.
- Southam, G., Lengke, M. F., Fairbrother, L., Reith, F., 2009. The biogeochemistry of gold. *Elements* 5, 303–307.
- Škarková, P., Kos, M., Drobne, D., Vávrová, M., Jemec, A., 2016. Effects of food salinization on terrestrial crustaceans *Porcellio scaber*. *Appl. Soil Ecol.* 100, 1–7.
- Unrine, J.M., Hunyadi, S.E., Tsyusko, O.V., Rao, W., Shoults-Wilson, W.A., Bertsch, P.M., 2010. Evidence for bioavailability of Au nanoparticles from soil and biodistribution within earthworms (*Eisenia fetida*). *Environ. Sci. Technol.* 44, 8308–8313.
- Unrine, J.M., Shoults-Wilson, W.A., Zhurbich, O., Bertsch, P.M., Tsyusko, O.V., 2012. Trophic transfer of Au nanoparticles from soil along a simulated terrestrial food chain. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9753–9760.
- Valant, J., Drobne, D., Sepčić, K., Jemec, A., Kogej, K., Kostanjšek, R., 2009. Hazardous potential of manufactured nanoparticles identified by *in vivo* assay. *J. Hazard. Mater.* 171, 160–165.
- Vecchio, G., Galeone, A., Brunetti, V., Maiorano, G., Rizzello, L., Sabella, S., Cingolani, R., Pompa, P.P., 2012a. Mutagenic effects of gold nanoparticles induce aberrant phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.* 8, 1–7.
- Vecchio, G., Galeone, A., Brunetti, V., Maiorano, G., Sabella, S., Cingolani, R., Pompa P.P., 2012b. Concentration-dependent, size-independent toxicity of citrate capped AuNPs in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 7: e29980.
- Zidar, P., Drobne, D., Štrus, J., 1998. Determination of moult stage of *Porcellio scaber* (Isopoda) for routine use. *Crustaceana* 71, 646–654.
- Zidar P., Drobne, D., Štrus, J., van Gestel, C.A.M., Donker, M., 2004. Food selection as a means of Cu intake reduction in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda). *Appl. Soil Ecol.* 25, 257–265.

9 ŽIVOTOPIS

Osobní informace a kontakt

Jméno	Pavčina Škarková
Adresa	Stamicova 827/11, Brno Kohoutovice 612 00
Místo a datum narození	Nové Město na Moravě, 03.08.1988
Národnost	česká
Pohlaví	žena
Telefonní kontakt	+420 725 776 185
Email	xcskarkova@fch.vutbr.cz

Vzdělání

2012 – doposud

Doktorské studium

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická

Chemie a technologie ochrany životního prostředí

Téma dizertační práce:

Zavedení kontaktních testů ekotoxicity pro zhodnocení kontaminace terestrického ekosystému

2012 – 2013

Doplňující pedagogické studium pro zaměstnance VUT

Vysoké učení technické v Brně, Institut celoživotního vzdělávání

2010 – 2012

Magisterské studium

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická

Chemie a technologie ochrany životního prostředí

Téma diplomové práce:

Využití organismu *Eisenia fetida* v testech ekotoxicity

2007 – 2010

Bakalářské studium

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická

Chemie a technologie ochrany životního prostředí

Téma bakalářské práce:

Význam kontaktních testů ekotoxicity

2003 – 2007

Střední průmyslová škola chemická

Ochrana životního prostředí

Výzkumná činnost

Zahraniční výzkumné pobyty

01.10.2014 – 22.12.2014

MŠMT pracovní stáž na katedře Zoologie (Bionanoteam)

Biotechnická fakulta, Univerzita Ljubljana, Slovinsko

07.10.2013 – 28.02.2014

Erasmus pracovní stáž na katedře Zoologie (Bionanoteam)

Biotechnická fakulta, Univerzita Ljubljana, Slovinsko

Výzkumné projekty

2016

Kontaminace životního prostředí kontaminanty na bázi anorganických a organických sloučenin.

2015

Posouzení vstupu nových kontaminantů do složek životního prostředí.

2014

Studium vlivu čistírenských technologií na eliminaci škodlivin z vodního ekosystému. Hodnocení znečištění životního prostředí metodami environmentální analýzy a ekotoxikologie.

2013

Zatížení ekosystémů prioritními polutanty a možnosti jejich eliminace. Aplikace moderních statistických metod pro hodnocení kontaminace životního.

Publikační činnost

Články s impakt faktorem

ŠKARKOVÁ, P.; KOS, M.; DROBNE, D.; VÁVROVÁ, M.; JEMEC A. Effects of food salinization on terrestrial crustaceans *Porcellio scaber*. *APPLIED SOIL ECOLOGY*, 2016, roč. 100, č. 4, s. 1-7. ISSN: 0929- 1393.

ŠKARKOVÁ, P.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; HOLEŠOVSKÝ, J.; VÁVROVÁ, M.; MICHÁLEK, J.; OLEJNÍČKOVÁ, Z. Application of statistical methods for ecotoxicological data evaluation. *FRESENIUS ENVIRONMENTAL BULLETIN*, 2015, č. 24, s. 1692-1698. ISSN: 1018- 4619.

Recenzované články

ŠKARKOVÁ, P.; ROMIH, T.; KOS, M.; NOVAK, S.; KONONENKO, V; JEMEC, A.; VÁVROVÁ, M.; DROBNE, D. Gold nanoparticles do not induce adverse effects on terrestrial isopods *Porcellio scaber* after 14-day exposure. *ACTA BIOLOGICA SLOVENICA*, 2016, roč. 59, č. 1, s. 33-44. ISSN: 1854-3073.

Posterové prezentace

ŠKARKOVÁ, P.; KOS, M.; DROBNE, D.; VÁVROVÁ, M.; JEMEC, A. Effects of food salinization on terrestrial crustaceans *Porcellio scaber*. IV Lodkie Sympozjum Doktorantow Chemii. Wolczanska 223, 90-924 Lodz, Polsko: Wydawnictwo Politechniki Lodzkiej, 2016. s. 135-135. ISBN: 978-83-7283-741- 7.

ŠKARKOVÁ, P.; VÁVROVÁ, M.; ROMIH, T.; KOS, M.; DROBNE, D. Toxic potential of gold nanoparticles for the terrestrial isopods *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). The 5th Portuguese Young Chemists Meeting (5th PYCheM) and 1st European Young Chemists Meeting (1st EYCheM). Guimaraes, Portugal: 2016. s. 212-212.

ŠKARKOVÁ P., VÁVROVÁ M., ROMIH T., KOS M., DROBNE D. Hazardous potential of gold nanoparticles identified by in vivo assay on Arthropod (*Porcellio scaber*, Isopoda, Crustacea). 18th International Symposium on Environmental Pollution and its Impact on Life in the Mediterranean Region - Book of Abstracts. 2015. s. 242-242.

ŠKARKOVÁ, P.; VÁVROVÁ, M.; JEMEC, A.; KOS, M.; DROBNE, D. Effects of Salinity on Terrestrial Isopods *P. scaber*. Toxcon 2015: Brno: 20. Mezioborová Česko-Slovenská toxikologická konference. 2015. s. 120-120. ISBN: 978-80-263-0933-8.

ŠKARKOVÁ, P.; DROBNE, D.; VÁVROVÁ, M.; ROMIH, T.; KOS, M. Low toxic potential of gold nanoparticles for a terrestrial isopod *P. scaber* (Isopoda, Crustacea). Interdisciplinary Toxicology. Bratislava: Slovenská toxikologická spoločnosť, 2014. s. 75-75. ISSN: 1337-6853.

ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; VÁVROVÁ, M.; ŠKARKOVÁ, P. Environmental problems connected with fire-fighting. In Book of abstracts. Beograd: Serbian Chemical Society, 2013. s. 306-307. ISBN: 978-86-7132-052-8.

ŠKARKOVÁ, P.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; VÁVROVÁ, M. Using of organism *Eisenia fetida* in ecotoxicity tests. Thematic workshop in Toxicology Related Topics: -eco, -nano. Book of abstract. Nova Gorica: University of Nova Gorica, 2013. s. 26-26.

LACINA, P.; DVOŘÁKOVÁ, P.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; OBORNÁ, J.; NEVRLÁ, J.; ŠKARKOVÁ, P.; VÁVROVÁ, M. Study of bioaccumulation of selected pharmaceuticals in terrestrial organism. In 13th European Meeting on Environmental Chemistry. 2012. s. 101-101. ISBN: 978-5-89513-295-1.

Pracovní zkušenosti

2012 – doposud

Výuka Praktikum analytické chemie II a Praktikum z environmentální analýzy
Vysoké učení technické, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno

2014 – doposud

Technický pracovník ve výzkumné skupině: Charakterizace materiálů a pokročilé povlaky
Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické, Technická 3058/10, 616 00 Brno

Letní školy/kurzy

05.08.2015 – 21.08.2015	The 25th Jyväskylä Summer School Advanced Environmental Chemical Analyses Jyväskylä, Finland
01.06.2015 – 03.06.2015	Praktická letní škola projektů ve vědě a výzkumu Brno, Česká republika
06.08.2014 – 22.08.2014	The 24th Jyväskylä Summer School Environmental Fate and Possible Effects of Nanoparticles Jyväskylä, Finland
09.06.2013 – 22.06.2013	International Summer School of Aquatic Toxicology Nova Gorica, Slovenia
13.05.2013 – 15.05.2013	Course of Sampling 2013 Valtice, Czech Republic

Aktivní účast na konferencích

Ústní prezentace

Nové statistické metody pro vyhodnocení ekotoxikologických dat

Zajištění kvality analytických výsledků

24.03.2015 – 26.03.2015, Žermanice, Česká republika

Terrestrial ecotoxicity tests

International Summer School of Aquatic Toxicology

09.06.2013 – 22.06.2013, Nova Gorica, Slovenia

Dovednosti

Řidičský průkaz

Skupina B

Počítačové dovednosti

Uživatel, MS Office (Excel, Word, Power Point), Origin, ChemSketch

Jazyk

English (intermediate)