



# Ekotoxikologické biotesty

---

**Půdní biotesty**  
**Jakub Hofman**  
**10.3.2008**

# Půdní biotesty

- Testy s půdními organismy
- Matrice je půda (solid phase)
- **Cíl:** chránit půdu a půdní biotu před účinky chemických látek a dalšími stresory
- **Proč?** Půda je nepostradatelná složka přírody, základna pro růst rostlin, zásobárna živin, počátek a konec potravních řetězců a cyklů prvků, filtrační a dekontaminační zóna





# Důsledky expozice v pevné matici

---

- Velké odlišnosti od akvatických testů
- Obsahuje vždy všechny tři fáze PEVNOU, KAPALNOU (pórová voda) a PLYN (vzduch)
- Přítomnost pevné fáze má významný vliv na OSUD a CHOVÁNÍ chemické látky
- V závislosti na vlastnostech látky, vlastnostech půdy a na čase dojde k distribuci látky v půdě
- Stěžejním procesem je SORPCE a důsledkem je klíčový faktor půdních testů - BIODOSTUPNOST

# Které vlastnosti matrice jsou kritické

- Obsah organické hmoty – OM, TOC
- Obsah jílovitých částic ( $\varnothing < 10 \mu\text{m}$ )
- Kationtová výměnná kapacita
- pH
- Vlhkost
- Struktura půdy
- Čas





# Legislativa vs půdní biotesty

---

= **PROČ** mají půdní biotesty své místo na slunci



- Chemické látky – nové a existující
- Biocidy – pesticidy, přípravky na ochranu rostlin
- Odpady – kaly ČOV, sedimenty, popílký, dřevoštěpka apod.
- Kontaminované lokality – remediace, sanace
- Hnojiva a další materiály vstupující do půdy



# Legislativa vs půdní biotesty - ČR



## 1) CHEMICKÉ LÁTKY

- Zákon č. 356/2003 Sb., O chemických látkách a chemických přípravcích a jeho prováděcí vyhláška č. 222/2004 Sb., kterou se u chemických látek a chemických přípravků stanoví základní metody pro zkoušení fyzikálně-chemických vlastností, výbušných vlastností a vlastností nebezpečných pro životní prostředí (ve znění ve znění vyhlášky č. 389/2005 Sb.)
- Jako povinné ekotoxikologické testy jsou uvedeny (včetně metodiky):
  - akutní test se žížalou *E. fetida*
  - testy efektů na aktivitu půdních mikroorganismů při transformaci dusíku a uhlíku
  - test efektů na aerobní a anaerobní transformace v půdě
- Jde v podstatě o přeložené metodiky OECD testů



# Legislativa vs půdní biotesty - ČR



## 2) PESTICIDY

- Zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a jeho prováděcí vyhláška č. 329/2004 Sb., o přípravcích a dalších prostředcích na ochranu rostlin
  - Příloha 1: Seznam studií, které musí žadatel dodat pro hodnocení přípravku
  - Příloha 2: seznam studií, které musí žadatel dodat pro hodnocení účinné látky
- S půdními biotesty souvisí požadavek na zhodnocení vlivů na:
  - necílové suchozemské členovce (dle metodiky SETAC/ESCORT)
  - žížaly (akutní, reprodukce a pokud potřeba i polní test)
  - mikroorganismy (dle metodiky SETAC)
- Vyhláška č. 327/2004 Sb., ochrana včel, zvěře, vodních organismů před přípravky na ochranu rostlin
  - Definuje skupinu prospěšných, necílových členovců = beneficial, non-target arthropods
  - Definuje skupinu půdních organismů
  - Neobsahuje doporučení konkrétních testů



# Legislativa vs půdní biotesty - ČR



## 3) ODPADY, HNOJIVA A DALŠÍ ...

- Zákon 185/2001 Sb., o odpadech a jeho prováděcí vyhláška č. 376/2001 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů (stejně jako EU pod kódem H14 je zde ekotoxicita)
  - Definuje hodnocení účinků na vyšší rostliny
  - Test inhibice růstu kořene hořčice bílé výluhem odpadu (Metodika v Metodickém pokynu MŽP ke stanovení ekotoxicity odpadů - Zpravodaj MŽP 12/1998)
- **Kontaktní testování odpadů** je opomíjeno, ač má pro pevné odpady nesrovnatelně vyšší vypovídací schopnost, zejména v případě kalů a sedimentů, jež mají být aplikovány do zemědělských půd
- Hnojiva – pouze obecně definováno, že nesmí mít negativní vliv





# Legislative vs půdní biotesty - EU

- Council Directive 2001/59/EC adapting to technical progress for the 28th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of **dangerous substances**
  - Příloha V obsahuje metody včetně ekotoxikologických biotestů s žížalami a půdními mikroorganismy dle směrnic OECD
- Council Regulation (EEC) 793/93 on the evaluation and **control of the risks of existing substances**
- Regulation (EC) 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the **Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH)**
- **Technical Guidance Document on Risk Assessment.** Part II: Environmental Risk Assessment. European Chemical Bureau, Luxembourg (2003) = **TGD**



# Legislative vs půdní biotesty - EU

- COUNCIL DIRECTIVE 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of **plant protection products** on the market
  - Příloha 1 - seznam účinných látek hodnocených na evropské úrovni, které byly seznány, že rizika jsou přijatelná a není třeba je dále hodnotit na národní úrovni
  - Příloha 2 - seznam studií, které musí žadatel dodat pro hodnocení účinné látky
  - Příloha 3 - seznam studií, které musí žadatel dodat pro hodnocení přípravku
  - Příloha 6<sup>1</sup> - podle čeho a jak se hodnotí na základě EC<sup>2</sup> a SETAC<sup>3</sup> metodik.  
Povinnými testovacími druhy necílových členovců jsou *Typhlodromus pyri* (dravý roztoč), *Aphidius rhapalosiphi* (lumčík), *Chrysoperla carnea* (zlatoočka), *Coccinella septempunctata* (slunéčko), *Aleochara bilineata*, *Poecilus cupreus* (střevlík), *Orius laevigatus* (klopuška), *Hypoaspis aculeifer*
    1. Guidance document on Terrestrial Ecotoxicology in the context of Directive 91/414/EEC (SANCO/10329/2002)
    2. Council Directive 97/57/EC of 22 September 1997 establishing Annex VI to Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market
    3. Guidance Document on Regulatory Testing and Risk Assessment Procedures for Plant Protection Products with Non-Target Arthropods. From the ESCORT 2 Workshop (European Standard Characteristics of Non-Target Arthropod Regulatory Testing). Ed: MP Candolfi, KL Barrett, PJ Campbell, R Forster, N Grandy, M-C Huet, G Lewis, PA Oomen, R Schmuck, H Vogt. SETAC-Europe



# Legislative vs půdní biotesty - EU

- Směrnice 91/689/EEC o **nebezpečném odpadu** a seznamu odpadů (rozhodnutí 2000/532/EC)
- Rozhodující je 14 kritérií, která jsou odvozena z legislativy o nebezpečných látkách.
- **Kritérium H14 značí „ekotoxické vlastnosti“** - odpady, které představují nebo mohou představovat akutní nebo pozdní nebezpečí pro jednu nebo více složek životního prostředí.
- Zatím není definován odkaz k žádné metodě a ani v seznamu odpadů nejsou ekotoxické vlastnosti blíže specifikovány pro rozhodnutí, zda se jedná či nejedná o nebezpečný odpad.
- Příloha III direktivy 91/689/EEC pouze uvádí, že testovací metody by měly korespondovat s metodami legislativy pro chemické látky a dalšími doporučeními OECD.
- **Standard EN 14735** definuje přípravu a nakládání se vzorky odpadů pro ekotoxikologické testy. V příloze B je obsažen i **seznam použitelných ekotoxikologických testů**. Z půdních jsou zde rousnice, žížaly, chvostoskoci a rostliny

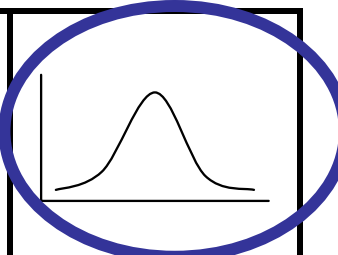
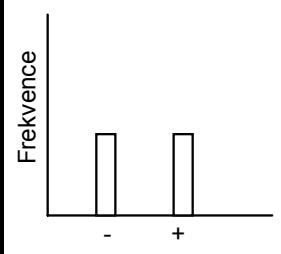
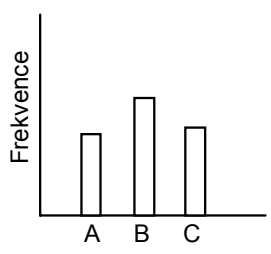
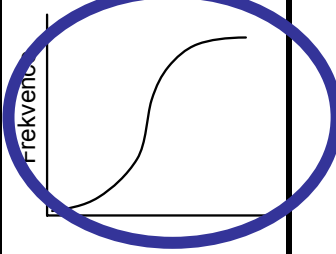
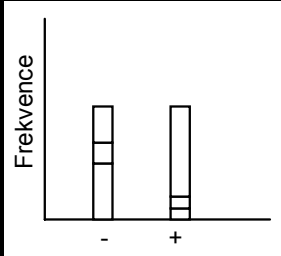
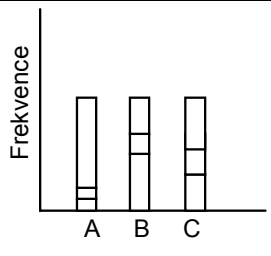
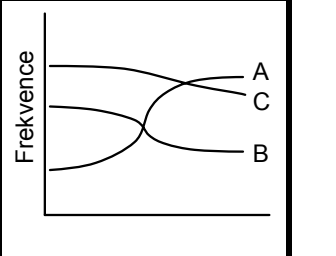
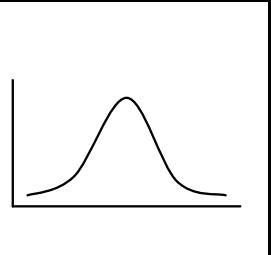
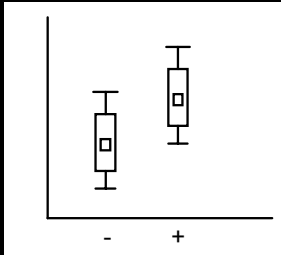
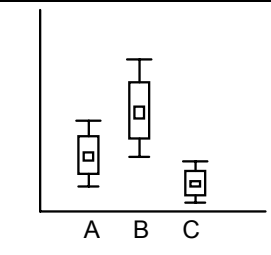
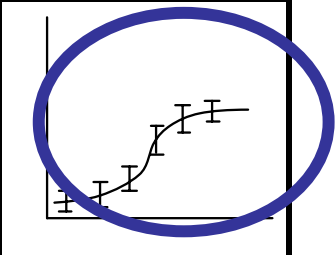


# Organizace spojené s půdními testy

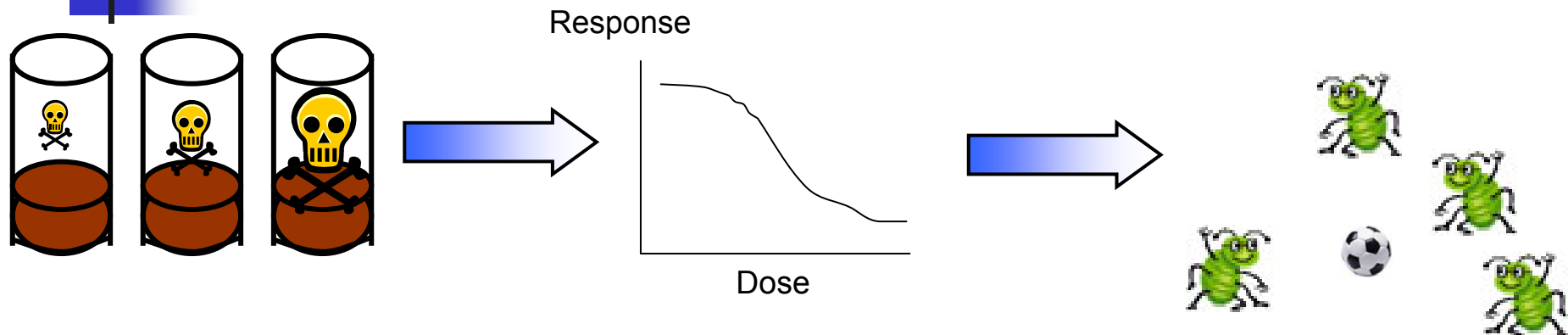
---

- OECD = Organization for Economic Cooperation Development
- ISO = International Standardization Organization
- US EPA = US Environmental Protection Agency
- SETAC = Society for Environmental Toxicology and Chemistry
- IOBC = International Organisation for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants
- EPPO = European and Mediterranean Plant Protection Organization
- ASTM = American Society of Testing and Materials
- ANSI = American National Standards Institute
- CEN = European Committee for Standardization
- AFNOR = Association Francaise de Normalisation
- EEC = European Economic Community
- WHO = World Health Organisation
- BBA = Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
- OPPTS = The Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (EPA)

# Koncepce půdních biotestů

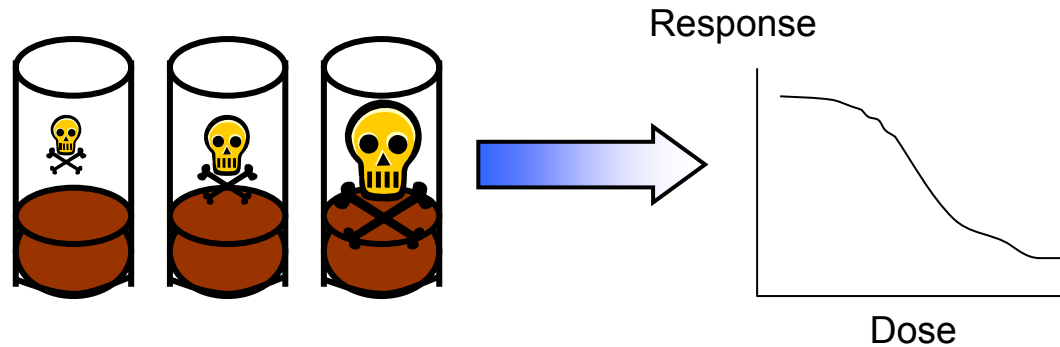
<b>Stresor</b> <b>Odpořď</b>	<b>+/-</b>	<b>A B C</b>	
<b>+/-</b>			
<b>A B C</b>			
			

# Půdní biotesty - koncepce



- Jde o prospektivní přístup k HODNOCENÍ EKOLOGICKÝCH RIZIK
- **CÍL:** Určit, jaká koncentrace chemické látky v půdě je bezpečná
- K tomu slouží soubor půdních ekotoxikologických testů a následně metodika hodnocení ekologických rizik

# Půdní biotesty - koncepce



1. Testuje se chemická látka → koncentrační řada, např. 1, 10, 100, 1000 mg Cd / kg<sub>suché</sub> půdy
2. Testuje se materiál typu kontaminovaná půda, sediment, kal ČOV apod. → koncentrační řada vzniká „ředěním“ s referenční půdou, např. 10, 20, 40, 80, 100 % kalu s čistou půdou

# Testování toxicity tuhé matrice







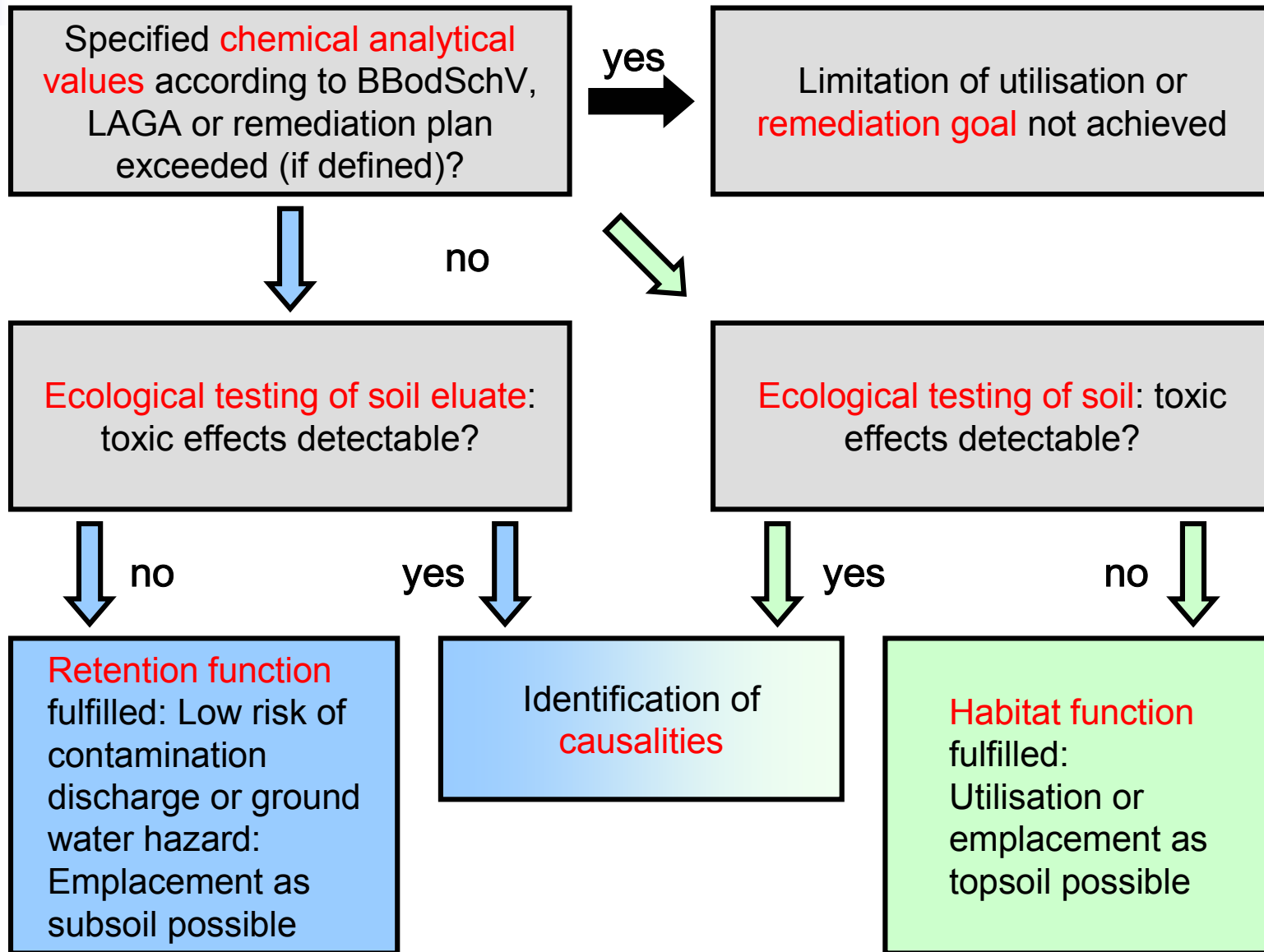
# Biotesty jako nástroj hodnocení kvality tuhé matrice

---

## **Existují ISO normy určující výběr testů**

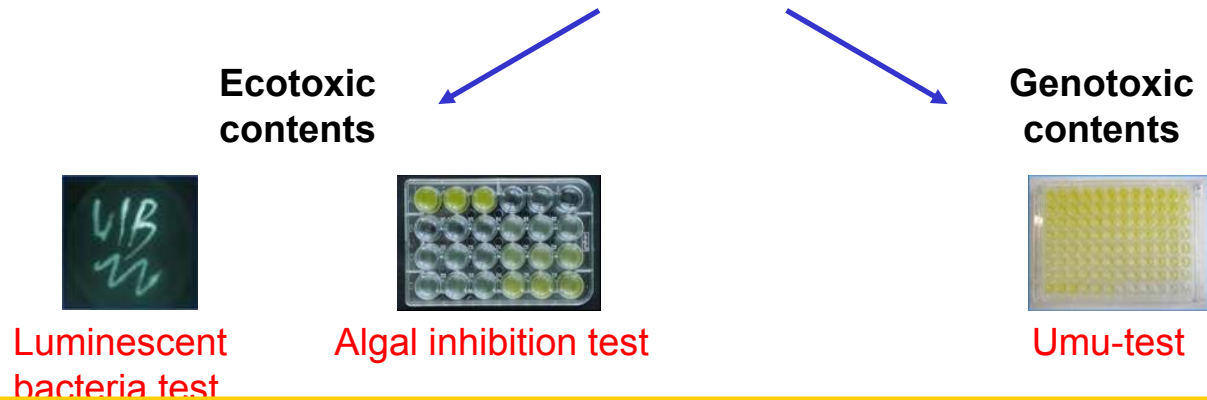
- ISO 15799 (2003): Guidance on the ecotoxicological characterization of soils and soil materials
- ISO 17616 (2008): Guidance on the choice and evaluation of bioassays for ecotoxicological characterization of soils and soil materials

# Existují ISO normy určující výběr testů

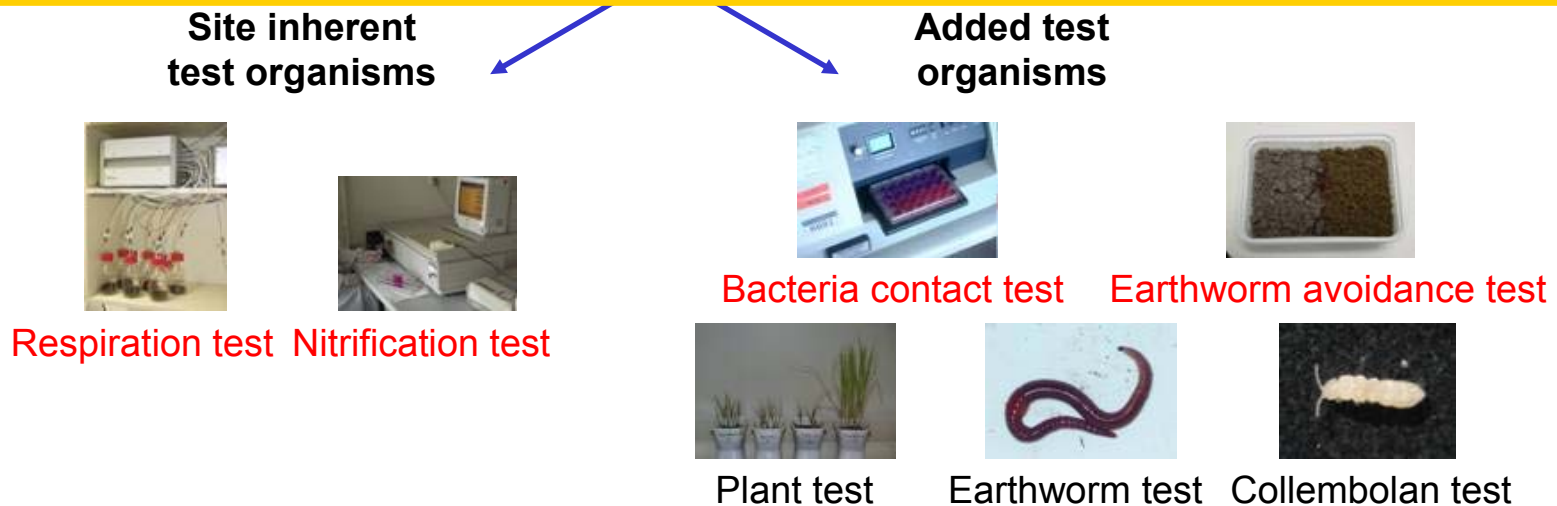


# Biotesty jako nástroj hodnocení kvality tuhé matrice

## Retention function – Biotests with eluates



## Habitat function - Biotests with solids



# Expoziční systémy

- **Chemikálie smíchána s půdou**
  - **Artificiální půda (OECD, ISO)**
  - **Reálná půda (LUFA 2.2 či jakákoliv jiná)**
- Aplikace na povrch těla
- Injekce
- Aplikace na přijímanou potravu
- .....



# Expoziční cesty v pevném vzorku



## Ingesce a orální vstup

- potrava a půdní částice - organismy konzumují minerální a organickou hmotu - významná expoziční cesta pro sorbované chemikálie; kontaminanty se mohou bioobohacovat - např. v houbách, které konzumují chvostoskoci; **významná cesta pro členovce**

## Dermální vstup

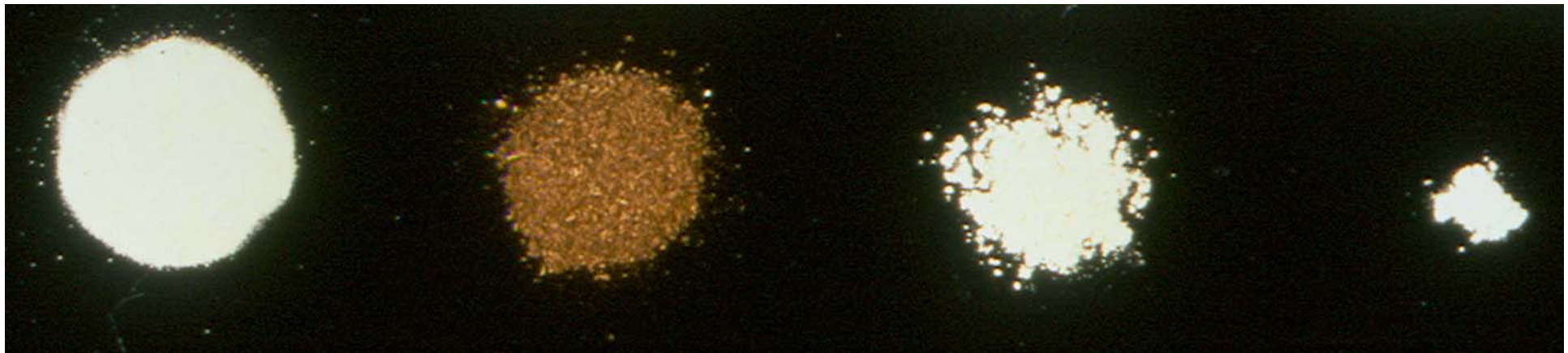
- z půdy, z půdního roztoku - zejména organismy vrtající v půdě (**žížaly a roupice**), které mají **tenkou kutikulu** a jsou v kontaktu s půdou a pórovou vodou; lze modelovat výsledky i z testů v akvatickém prostředí při doplnění modelu distribuce látky mezi půdní roztok a sorpci na částice = **tzv. Equilibrium partitioning theory (EqP)**

## Dýcháním

- nejsou téměř žádná data

# Artifciální pŮda

- 10% Suchá a jemně namletá rašelina
- 20% Kaolinitový jíl obsahující minimálně 30% kolinitu
- 70% Křemenný pŮsek jemný obsahující minimálně 50% zrn o velikosti 0,05 – 0,2 mm
- 0,3 – 1% Uhličitánu vápenatého, který je přidán tak, aby výsledné pH bylo  $6 \pm 0,5$



# Artificiální vs reálná půda:



# Složení artificiální půdy je předmětem výzkumu





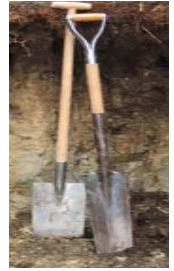


# LUFA standardní půdy [\(http://lufa-speyer.de/\)](http://lufa-speyer.de/)

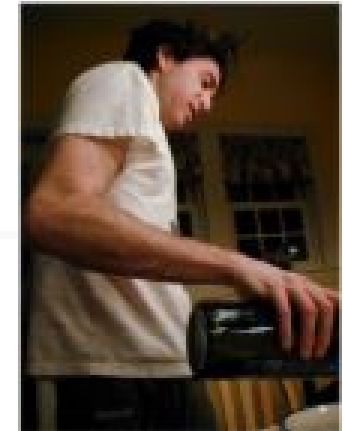
- Landwirtschaftliche Untersuchungs und Forschungsanstalt Speyer
- přírodní půdy je potřeba před testy ošetřit: defaunace, úprava vlastností
- Cena: 4 EUR za 1 kg + doprava

	LUFA 2.1	LUFA 2.2	LUFA 2.3	LUFA 5M	LUFA 6S
organic carbon (%)	0.81 ± 0.21	2.16 ± 0.40	0.98 ± 0.05	1.29 ± 0.20	1.75 ± 0.11
particles < 0.02 mm (%)	8.2 ± 0.9	13.9 ± 1.1	22.7 ± 1.1	25.3 ± 1.8	65.1 ± 2.7
pH (0.01M CaCl <sub>2</sub> )	5.1 ± 0.4	5.4 ± 0.1	6.4 ± 0.6	7.2 ± 0.1	7.2 ± 0.1
cation exchange capacity (meq/100g)	4 ± 1	10 ± 1	8 ± 2	15 ± 3	22 ± 6
water holding capacity (g/100g)	33.2 ± 1	48.2 ± 5	34.4 ± 2	42.1 ± 4	40.7 ± 5
weight per volume (g/1000ml)	1404 ± 46	1197 ± 60	1291 ± 30	1212 ± 56	1264 ± 90
<b>Particle size (mm) distribution according to German DIN (in %):</b>					
<0.002	3.0 ± 0.9	6.4 ± 0.9	9.4 ± 0.9	10.8 ± 1.3	42.1 ± 1.8
0.002 - 0.006	2.2 ± 0.7	3.5 ± 0.7	4.2 ± 0.8	5.4 ± 0.3	10.8 ± 0.7
0.006 - 0.02	2.9 ± 0.7	3.8 ± 0.7	9.1 ± 0.5	9.1 ± 0.5	12.1 ± 1.3
0.02 - 0.063	5.3 ± 1.8	5.4 ± 1.2	18.6 ± 2.3	19.5 ± 1.3	14.1 ± 2.5
0.063 - 0.2	27.0 ± 3.1	35.4 ± 2.3	29.3 ± 3.4	38.9 ± 1.0	8.7 ± 0.9
0.2 - 0.63	57.2 ± 4.3	44.8 ± 2.7	26.9 ± 0.7	14.9 ± 1.0	9.0 ± 0.3
0.63 - 2.0	2.4 ± 0.6	0.7 ± 0.1	2.5 ± 0.8	1.4 ± 0.1	3.2 ± 0.7
soil type	sand (S)	loamy sand (IS)	loamy sand (IS)	silty sand (uS)	clayey loam (tL)
<b>Particle size (mm) distribution according to USDA (in %)</b>					
<0.002	3.0 ± 0.9	6.4 ± 0.9	9.4 ± 0.9	10.8 ± 1.3	42.1 ± 1.8
0.002 - 0.05	8.8 ± 1.8	12.2 ± 0.6	29.8 ± 3.0	27.5 ± 2.2	36.0 ± 2.3
0.05 - 2.0	88.2 ± 1.2	81.4 ± 1.2	60.8 ± 2.6	61.7 ± 3.2	21.9 ± 1.6
soil type	sand	loamy sand	sandy loam	sandy loam	clay

# European reference soil set (IRMM-443-**EUROSOILS**)



# Dávkování látek do půdy



- cílem je HOMOGENITA expozice testovanou látkou

## **ve vodě rozpustné**

- pro přídavek využita destilovaná voda, kterou současně adjustujeme potřebné ovlhčení půdy, přičemž by jejich koncentrace v přidávané vodě neměla přesahovat 50% saturační koncentrace

## **nerozpustné ve vodě**

1. suspendovány ve vodním roztoku pomocí nosiče, který není toxický, je rozpustný ve vodě (aceton, etanol, arabská guma) a je volatilní
2. rozpuštěny v organickém rozpouštědle, které není toxické a rychle se odpaří

V předchozích případech lze aplikovat:

1. do malého množství (1-10%) jemného křemenného písku; po odpaření rozpouštědla je tato směs přidána do půdy a promíchána
2. přímo do vzorku půdy (suchý či vlhký) s následným odparem a promícháním

Ve všech případech je nutno zařadit kontrolu na nosič respektive na rozpouštědlo

## **nerozpustné ve vodě ani ve vhodném rozpouštědle**

- lze smíchat přímo s křemenným pískem (2,5g písku na 20g půdy) 27



## Výběr testů do procesů hodnocení rizik

---

- **Optimální vlastnosti půdního testu jsou:**

- standardizovatelnost, opakovatelnost, variabilita
- praktická proveditelnost, cena, rychlost
- citlivost
- vypovídací hodnota, použitelnost pro ochranu ŽP
- ekologická relevance

(samozřejmě platí vlastně i pro všechny další biotesty)



# Ekologická relevance testů

---

- test má respektovat ekologii organismu
- testované druhy by měly reprezentovat relevantní funkční skupinu
- sledované odpovědi by měly být ekologicky relevantní a indikovat stav a funkci organismu (přežití, růst, reprodukce, přijímání potravy a mobilita)
- při sledování reprodukce by měla expozice pokrývat většinu životního cyklu
- abiotické a biotické faktory by měly v testu být podobné jako v habitatu
- expoziční cesty by měly napodobovat reálné expozice
- biodostupnost kontaminantu by měly být podobná jako v reálu
- koncentrace by měly být environmentálně reálné (u půdy obecně pro všechny látky lze jako maximum dát 1 g/kg půdy)

# Ekologická relevance organismů

- hrají klíčovou roli ve fungování půdního ekosystému
- vyskytují se v řadě ekosystémů ve vyšší abundanci
- lehce použitelné v polních i laboratorních podmínkách
- dostávají se do kontaktu s polutanty
- jsou dostatečně citlivé na stres



## Problém ekotoxikologie obecně:

- v testech použijí organismy A (z celé řady důvodů), ale cílové organismy v systému jsou B → jaký je vztah výsledků pro A a B ?
- Příklad: *Eisenia fetida* – nejznámější půdní test

# Druhy žížal



*Dendrobaena octaedra*



*Lumbricus rubellus*



*Eisenia fetida* – **žije v kompostu !!**

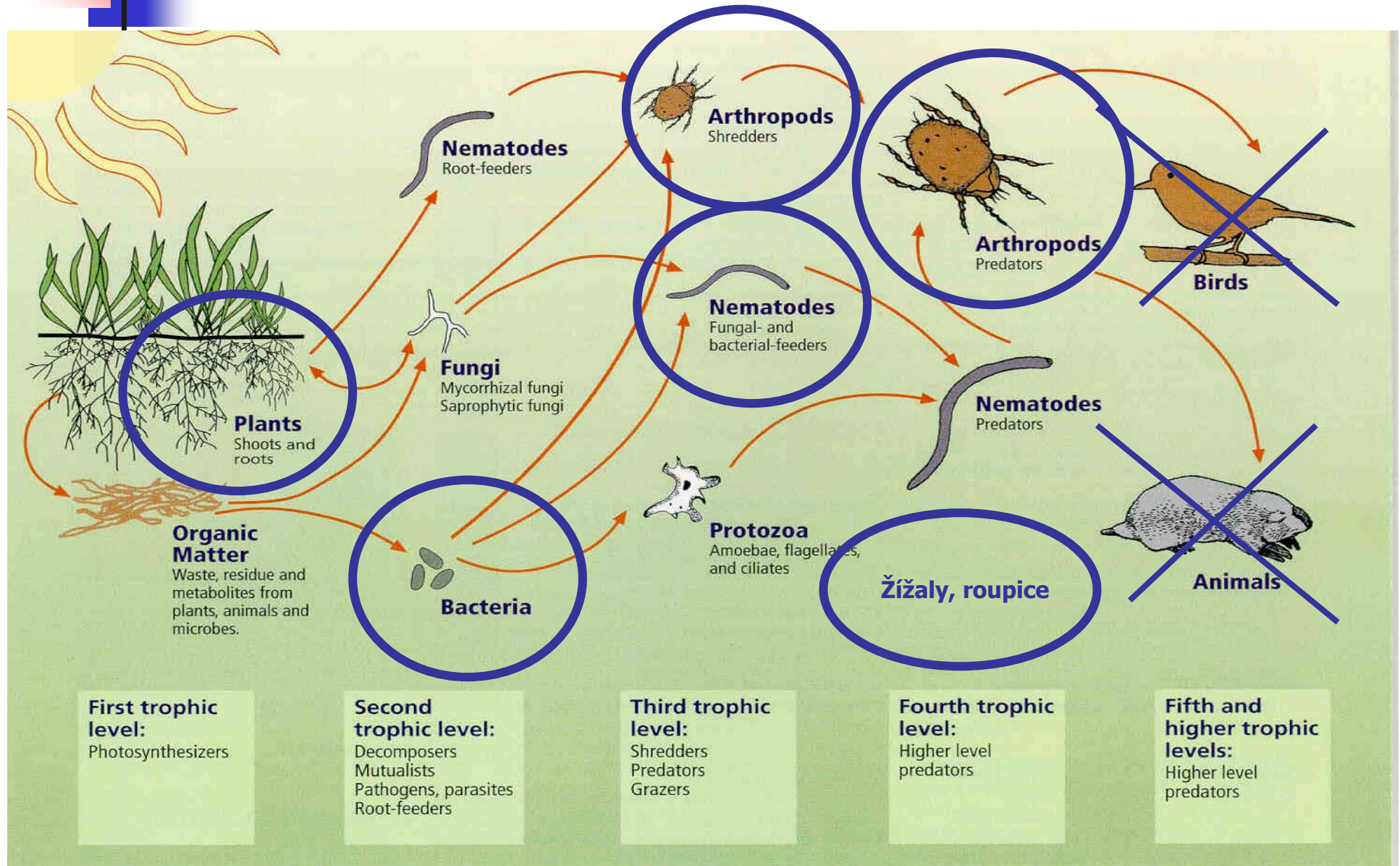


*Lumbricus terrestris*



*Aporectodea caliginosa*

# Půdní potravní síť vs biotesty







# Stupeň standardizace půdních biotestů

---

1. Mezinárodní standard
2. Draft mezinárodního standardu
3. Národní standard
4. Draft národního standardu
5. Standardní operační procedura v rámci řešení mezinárodního projektu
6. Popis v literatuře vědecky oponované
7. Popis v literatuře kompletní
8. Popis v literatuře nekompletní



# Standardizovanost půdních testů

Skupina	Druh	Stupeň standardizovanosti
Mikroorganismy	společenstvo	1
Hlístice	<i>Caenorhabditis elegans</i>	3
	<i>Panagrellus redivivus</i>	6
	<i>Plectus acuminatus</i>	5
Roupice	<i>Enchytraeus crypticus</i>	1
	<i>Enchytraeus albidus</i>	1
	<i>Cognettia sphagnetorum</i>	5
Žížaly	<i>Eisenia fetida</i>	1
	<i>Aporrectodea caliginosa</i>	5
Šneci	<i>Helix aspersa</i>	2
	<i>Arion ater</i>	7
Chvostoscoci	<i>Folsomia candida</i>	1
	<i>Folsomia fimetaria</i>	5
	<i>Isotoma viridis</i>	5
Roztoči	<i>Hypoaspis aculeifer</i>	2
Korýši	<i>Porcelio scaber</i>	5



# Standardy půdních biotestů - OECD

## Schválené standardy

207 Earthworm, Acute Toxicity Tests (4th April 1984)

208 Terrestrial Plants, Growth Test (19th July 2006)

216 Soil Microorganisms, Nitrogen Transformation Test (21st January 2000)

217 Soil Microorganisms, Carbon Transformation Test (21st January 2000)

220 Enchytraeid Reproduction Test (13th April 2004)

222 Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*) (13th April 2004)

227 Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test (19th July 2006)

## Drafty

Predatory Mite Reproduction Test in Soil (*Hypoaspis (Geolaelaps) Aculeifer*)

Determination of Developmental Toxicity of a Test Chemical to Dipteran Dung Flies (*Scathophaga stercoraria* L. (*Scathophagidae*), *Musca autumnalis* De Geer (*Muscidae*))

V přípravě jsou v této chvíli: *Folsomia* sp. test a bioakumulační test



# Standardy půdních biotestů - ISO

ISO 15799	2003	Guidance on the ecotoxicological characterization of soils and soil materials
ISO 11268-1	1993	Effects of pollutants on earthworms ( <i>Eisenia fetida</i> ) - Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate
ISO 11268-2	1998	Effects of pollutants on earthworms ( <i>Eisenia fetida</i> ) - Part 2: Determination of effects on reproduction
ISO 11267	1999	Inhibition of reproduction of <i>Collembola</i> ( <i>Folsomia candida</i> ) by soil pollutants
ISO 16387	2004	Effects of pollutants on <i>Enchytraeidae</i> ( <i>Enchytraeus</i> sp.) - Determination of effects on reproduction and survival
ISO 20963	2005	Effects of pollutants on insect larvae ( <i>Oxythyrea funesta</i> ) - Determination of acute toxicity
ISO 15952	2006	Effects of pollutants on juvenile land snails ( <i>Helicidae</i> ) - Determination of the effects on growth by soil contamination
ISO/DIS 17512-1		Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour - Part 1: Test with earthworms ( <i>Eisenia fetida</i> and <i>Eisenia andrei</i> )
ISO 11269-1	1993	Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth
ISO 11269-2	2005	Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants
ISO 22030	2005	Chronic toxicity in higher plants
ISO 14238	1997	Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes
ISO 14240-1	1997	Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrate-induced respiration method
ISO 14240-2	1997	Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation-extraction method
ISO 16072	2002	Laboratory methods for determination of microbial soil respiration
ISO 17155	2002	Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curves
ISO 15685	2004	Determination of potential nitrification and inhibition of nitrification - Rapid test by ammonium oxidation
ISO 23753-1	2005	Determination of dehydrogenase activity in soils - Part 1: Method using triphenyltetrazolium chloride (TTC)



# Standardy v ČR

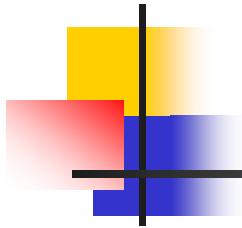
---

- V ČR neexistuje ani jedna ČSN zaměřená na půdní organismy !!!!!
- Zákony odkazují na testy OECD



## Standardy půdních biotestů – US EPA

850.2450 Terrestrial (soil-core) microcosm test
850.4000 Background-Nontarget plant testing
850.4100 Terrestrial plant toxicity, Tier I (seedling emergence)
850.4150 Terrestrial plant toxicity, Tier I (vegetative vigor)
850.4200 Seed germination/root elongation toxicity test
850.4225 Seedling emergence, Tier II
850.4230 Early seedling growth toxicity test
850.4250 Vegetative vigor, Tier II
850.4300 Terrestrial plants field study, Tier III
850.4600 Rhizobium-legume toxicity
850.4800 Plant uptake and translocation test
850.5100 Soil microbial community toxicity test
850.6200 Earthworm subchronic toxicity test



Přirození nepřátelé škůdců z řad členovců, kteří jsou standardizováni ve směrnících IOBC, BART, EPPO (Samsøe-Petersen, 1990)

Crop	Type of natural enemies	Examples <sup>1</sup>	
Cereals	Polyphagous predators	<i>Pterostichus cupreus</i> <sup>++</sup>	
		<i>Bembidion lampros</i> <sup>+</sup>	
			<i>Tachyporus hypnorum</i>
			<i>Aleochara bilineata</i> <sup>+</sup>
			Linyphiid spiders <sup>+</sup>
			Lycosid spiders <sup>+</sup>
			<i>Chrysoperla carnea</i> <sup>+</sup>
		Aphid-specific predators	<i>Coccinella septempunctata</i> <sup>+</sup>
			<i>Episyrphus balteatus</i>
			<i>Eupeodes corollae</i> <sup>+</sup>
	Aphid parasitoids	<i>Aphidius</i> spp. <sup>+.*</sup>	
Vegetables	Polyphagous predators	As for cereals	
	Aphid parasitoids	<i>Aphidius</i> spp. <sup>+</sup>	
		<i>Diaeretiella rapae</i> <sup>+</sup>	
	Lepidopteran parasitoids	<i>Trichogramma cacoeciae</i> <sup>+°</sup>	
Orchards	Predatory mites	<i>Typhlodromus pyri</i> <sup>+.*</sup>	
		<i>Amblyseius potentillae</i> <sup>+</sup>	
	Aphid-specific predators	As for cereals	
	Lepidopteran parasitoids	As for vegetables	
	Polyphagous predators	<i>Anthocoris</i> spp. <sup>+</sup>	
		<i>Orius</i> sp. <sup>*</sup>	
Glasshouses	Predatory mites	<i>Phytoseiulus persimilis</i> <sup>°</sup>	
	Whitefly parasitoids	<i>Encarsia formosa</i> <sup>°</sup>	
	Aphid-specific predators	As for cereals (except syrphids)	
		<i>Aphidoletes</i> sp.	
	Aphid parasitoids	As for vegetables	
	Leaf miner parasitoids	<i>Dacnusa</i> , <i>Diglyphus</i>	
		<i>Opius</i> <sup>+</sup>	



# Testy obecně

---

- Mladí ale dospělí jedinci (většinou 10) jsou exponováni chemikálii (či kontaminované zemině) smíchané s umělé půdou v nádobkách ze skla či inertního materiálu
- **Předběžný test** - hledáme rozmezí používaných koncentrací (ředící faktor 10; 0,1 - 1000 mg/kg); mortalita hlavní endpoint hodnocený po 2 týdnech
- **Finální test** - výstupem je funkce závislosti účinků na koncentraci testované substance (jemnější škála; nejlépe s faktorem 2); hodnoceny přežití dospělců po 3 týdnech (mortalita - akutní test) a počty juvenilů po 6 týdnech (reprodukce - reprodukční test)
- **NOEC design** – méně koncentrací, ale více opakování - 5 koncentrací po 4 opakováních a kontrolní varianta (bez chemické látky, na rozpouštědlo apod.)
- **EC/LC design** – více koncentrací, méně opakování – regresní metody

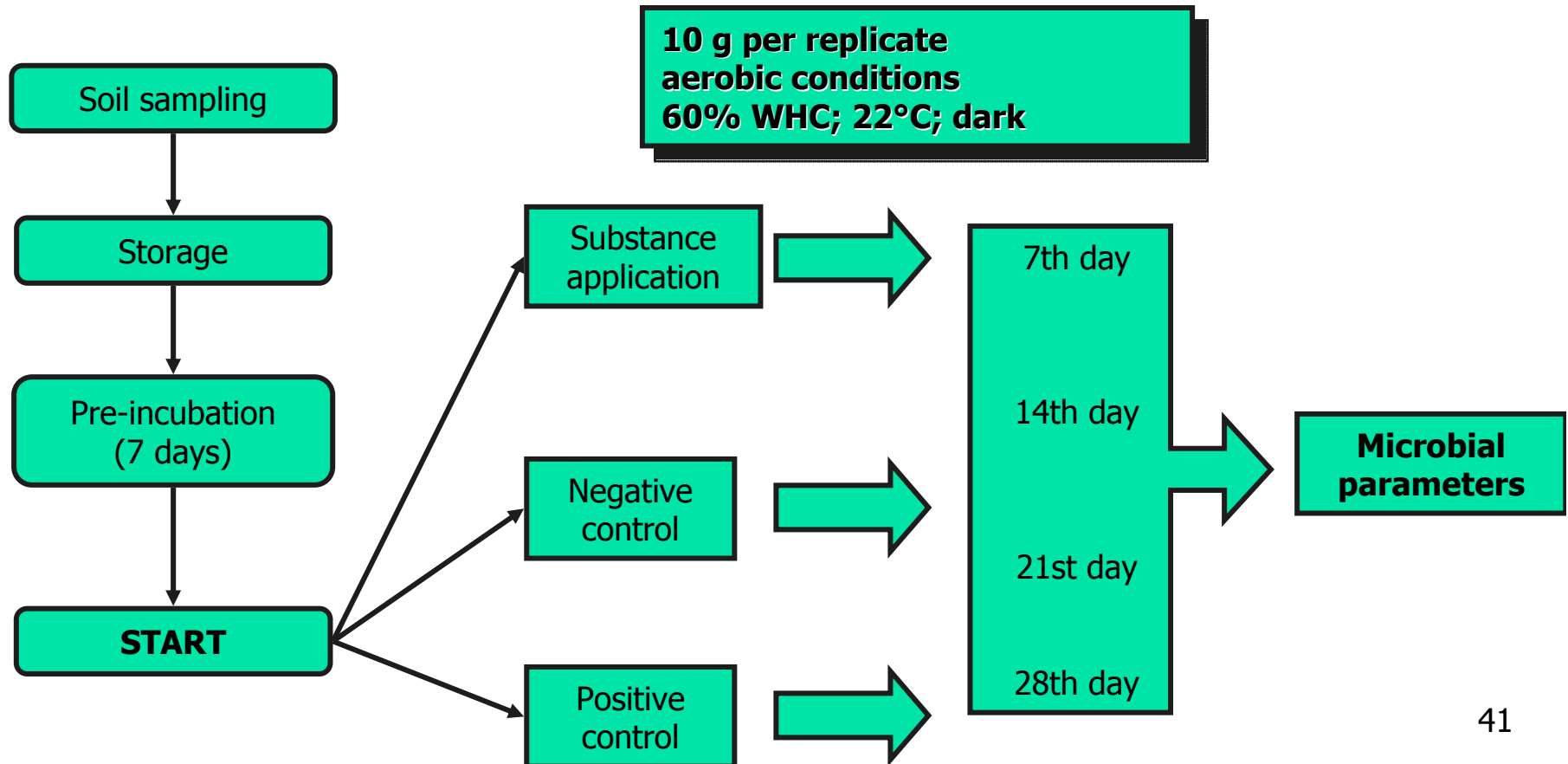


# Testy s půdními mikroorganismy

OECD 216 (2000) Soil Microorganisms, Nitrogen Transformation Test

OECD 217 (2000) Soil Microorganisms, Carbon Transformation Test

ISO 14238 (1997) Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes





# Požadavky na půdu

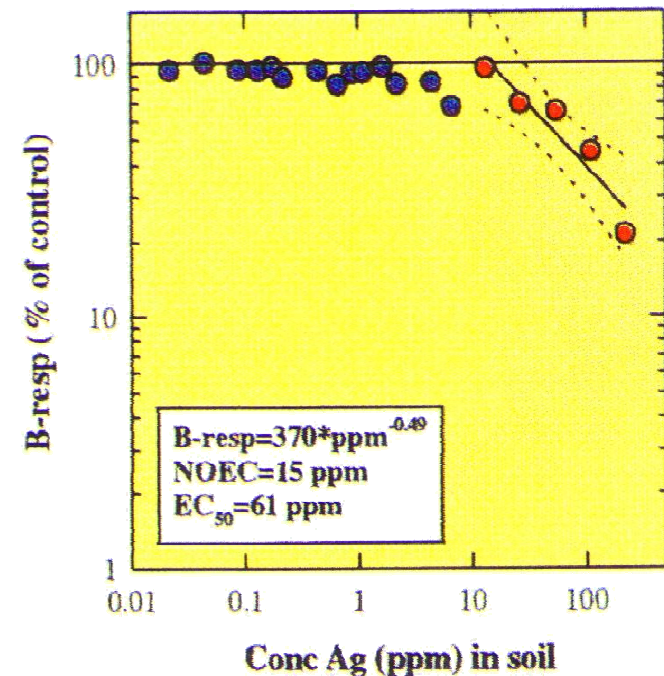
- přirozená půda, která je vybrána tak, aby byla citlivá vůči kontaminaci a splňovala tzv. "nejhorší scénář", tj. maximální expozici mikroorganismů polutantu v této půdě:
  - více než 70% písku
  - pH 5,5 - 7,0
  - Corg 0,5 - 1,5%
  - Cbio/Corg více než 1% (dostatečné oživení)
  - kationtová výměnná kapacita vyšší než 70 mmol/kg
- v historicky známé době nekontaminovaná (adaptace společenstva)

## Alternativy:

- vzhledem k možnosti přítomnosti resistantních mikroorganismů v reálném společenstvu existují postupy, kdy je do sterilizované přirozené půdy inokulována specifická kultura mikroorganismů (*Pseudomonas putida*, *Bacillus cereus*) → plynulý přechod k "**solid phase testům (SPT)**" toxicity s prokaryoty

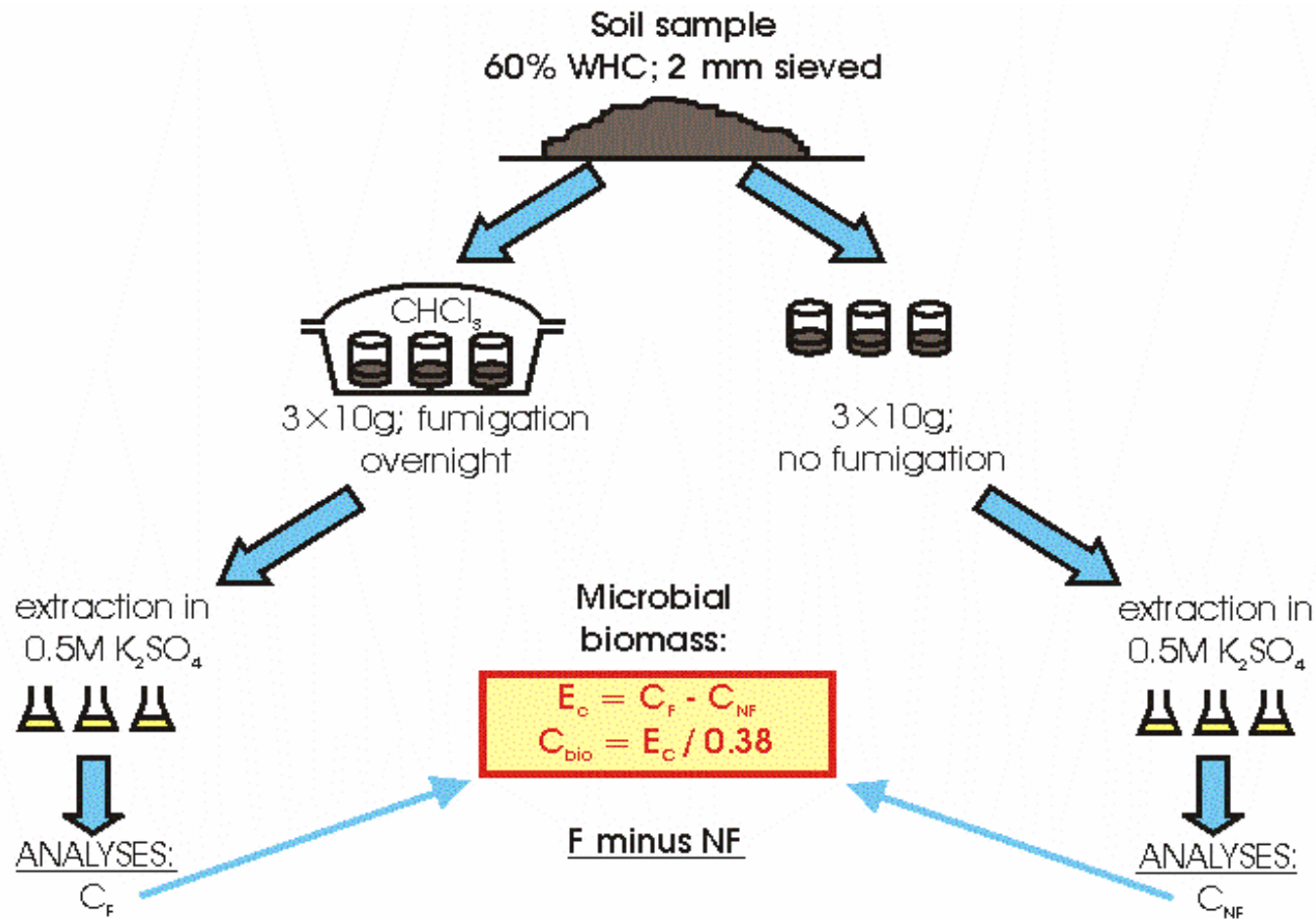
# Endpointy v mikrobiálním testu

- Standardně pouze mineralizace dusíku a uhlíku jako produkci  $\text{CO}_2$  a sumy minerálních forem dusíku ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ )
- Lze ale stanovit i další parametry:
  - Mikrobiální biomasu
  - Substrátem indukovanou respiraci
  - Enzymatické aktivity
  - Kinetiku mineralizace C a N
  - Amonifikaci, nitrifikaci
  - Diverzitu
- **Výstupy:** NOEC, LOEC, LC50, EC50, IC50 ...

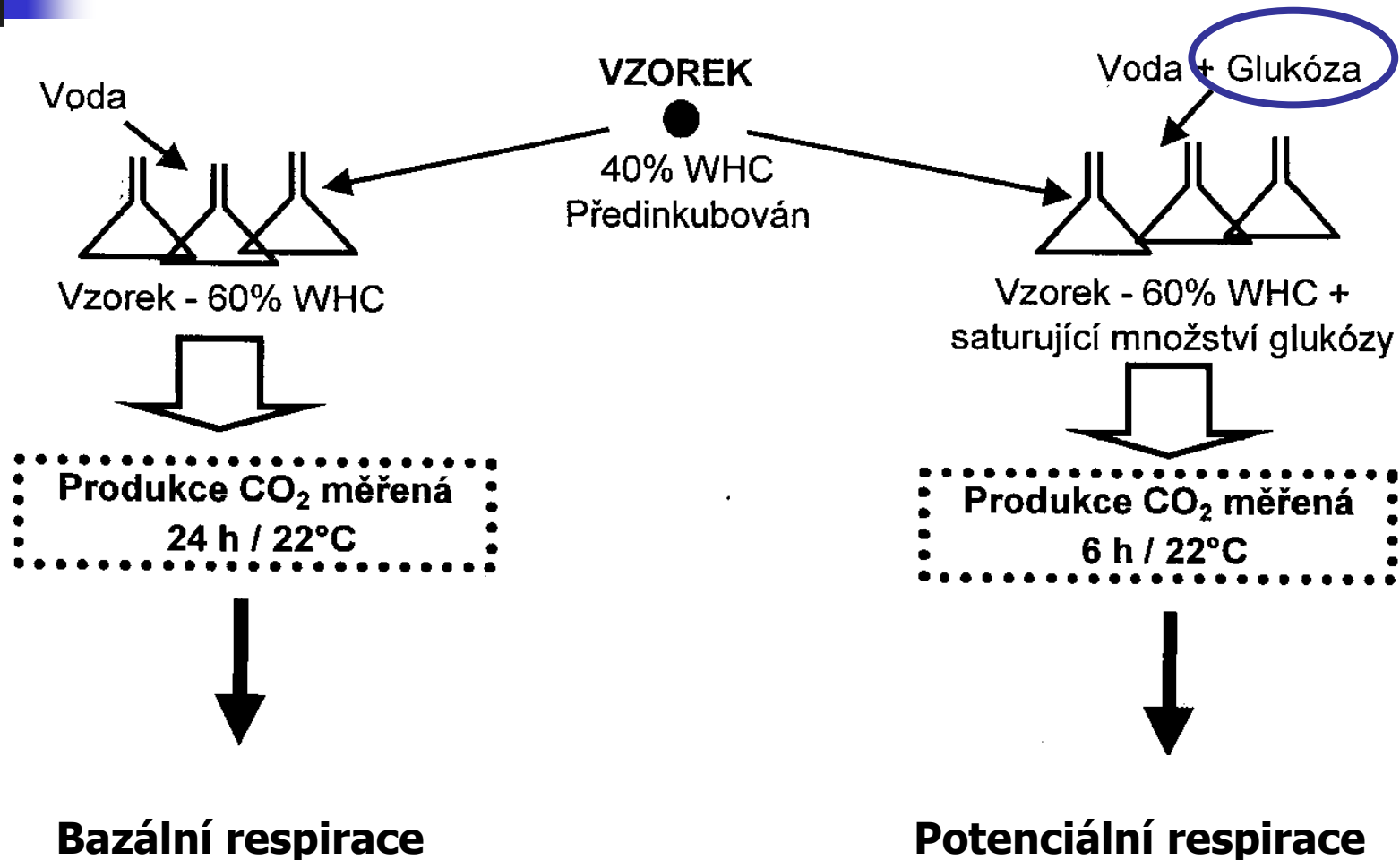


# Stanovení mikrobiální biomasy

## Fumigačně-extrakční metoda

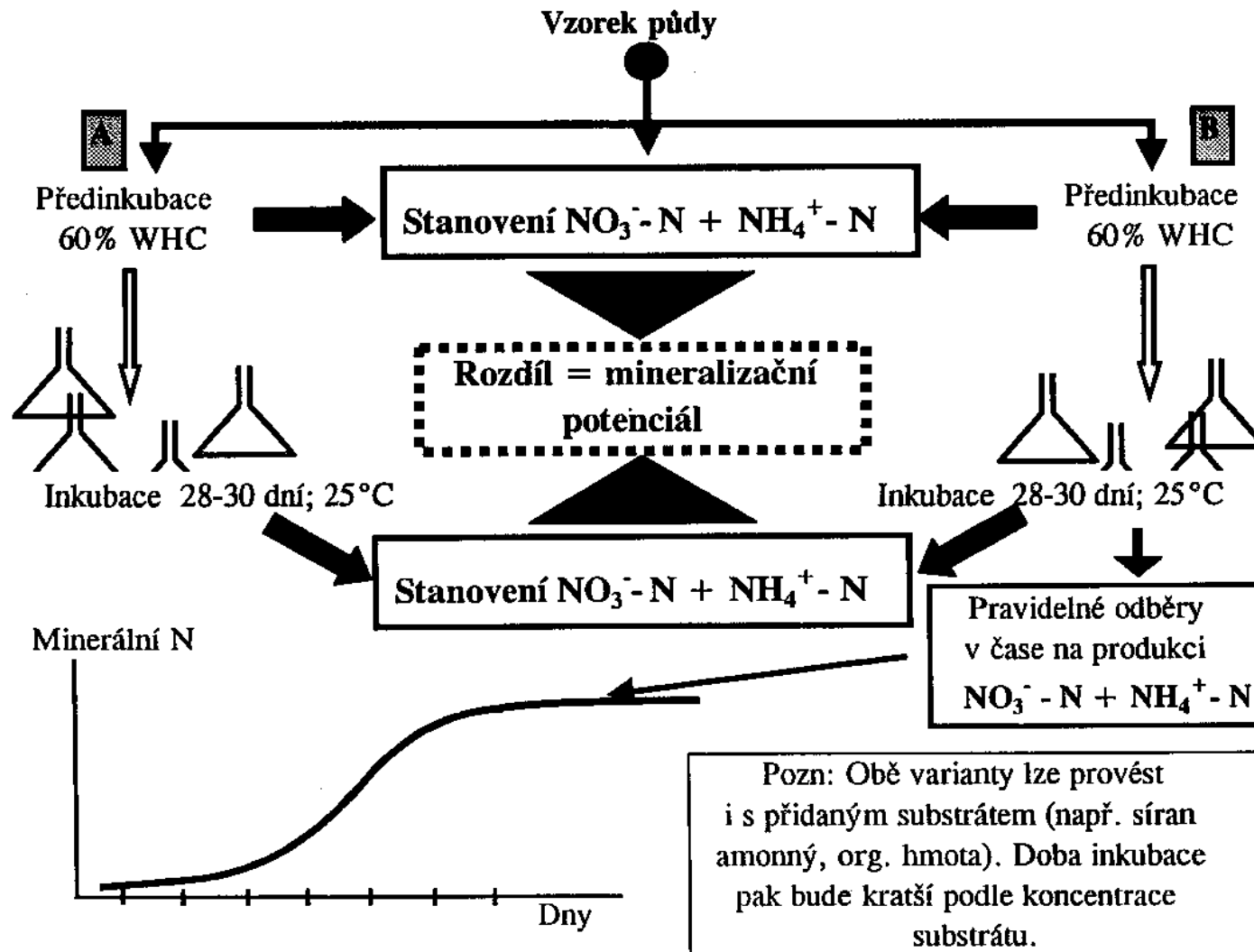


# Bazální a potenciální respirace



ISO 14240-1	1997	Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrate-induced respiration method
ISO 16072	2002	Laboratory methods for determination of microbial soil respiration

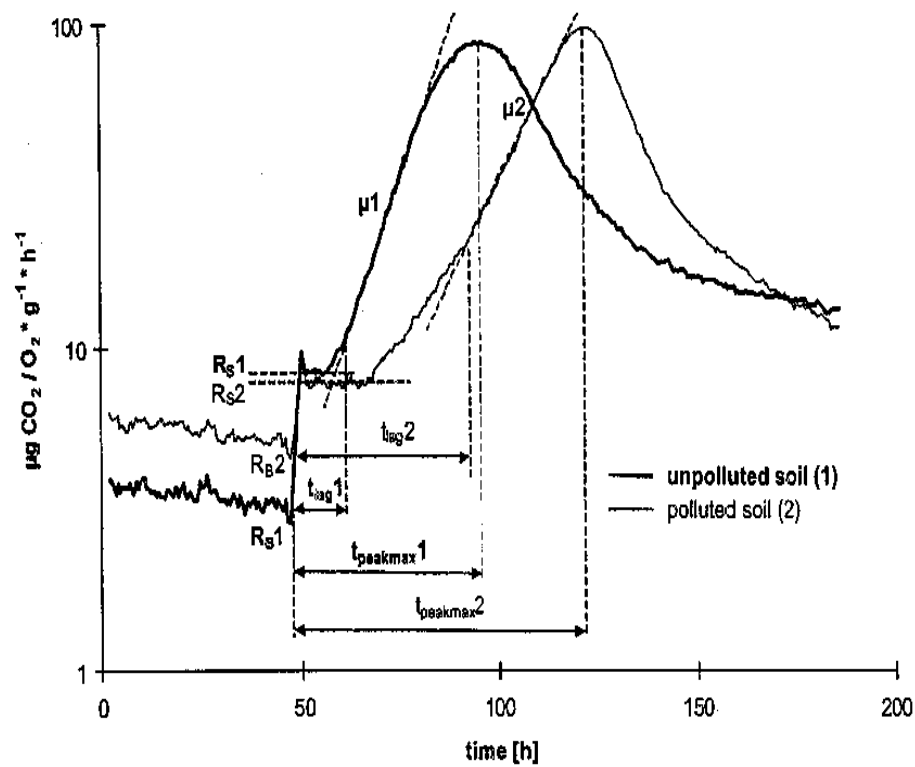
# Hodnocení mineralizace dusíku



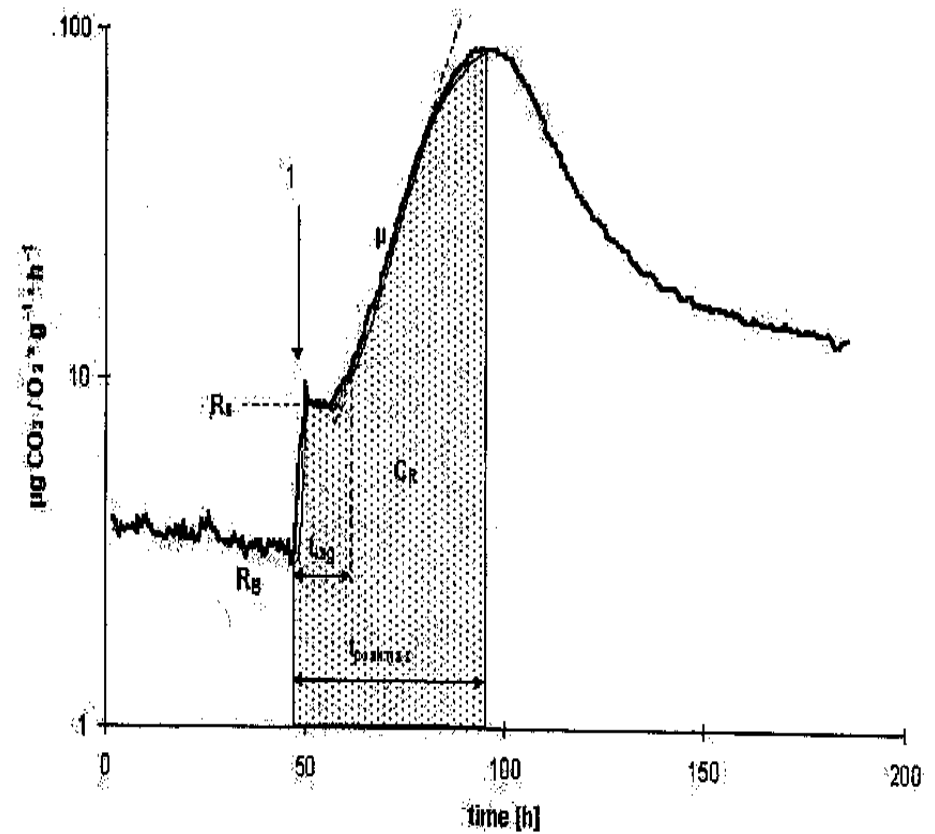
ISO 14238	1997	Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes
-----------	------	---

# Krátké testy toxicity s půdními mikroorganismy – SIR kinetika

## A) Testování kontaminovaných půd



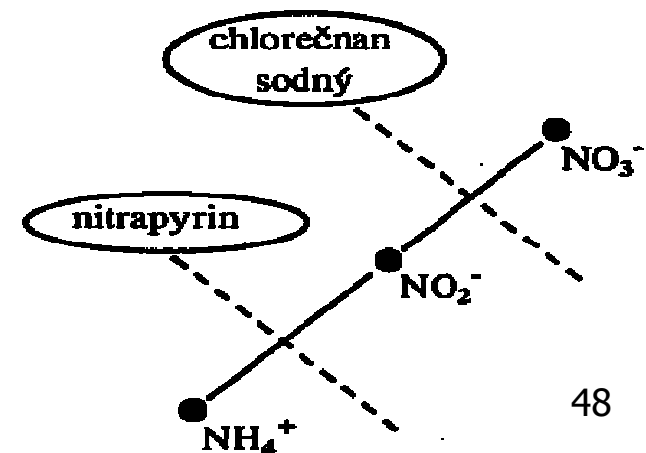
## B) Testování chemikálií



# Krátké testy toxicity s půdními mikroorganismy – Oxidace amoniaku

ISO 15685	2004	Determination of potential nitrification and inhibition of nitrification - Rapid test by ammonium oxidation
-----------	------	---

- Jde o míru nitrifikace = první krok nitrifikace
  - SNA = short term nitrification assay
  - PAO = potential ammonium oxidation
- 
- půda inkubována v roztoku síranu amonného
  - chlorečnan sodný inhibuje oxidaci dusitanu
  - po 5 či 24 hod stanovení  $\text{NO}_2^-$







# Žížaly v ekotoxikologii

- žížaly jsou asi nevíce a nejdéle ekotoxikologicky užívaný představitel půdní fauny

## **Výhody a důvody:**

- celý vývojový cyklus probíhá v půdě - **typický geobiont**
- zkonzumují velká množství půdy (**vysoká expozice potravou a akumulace kontaminantů**)
- mají velmi úzký fyzikální kontakt s půdou (**expozice pokožkou**)
- mají **výrazné bioakumulační a biokoncentrační charaktery** (jejich analýzou posuzujeme vliv delšího časového období) = patří mezi tzv. **makrokoncentrátory**
- vysoký a významný podíl na **tvorbě půdy, dekompozičních procesech, půdní úrodnosti**
- klíčové postavení v **přenosu polutantů v potravních řetězcích**
- výskyt téměř **ve všech půdách** ve vysokých počtech i váhách
- osvědčené, zavedené v laboratorních testech (**nenáročný chov**)
- snadno se identifikují v reálných vzorcích (díky **velikosti**)



# V různých testech byly pozorovány různé endpointy

---

- Mortalita
- Reprodukce
- Behaviorální změny
- Malformace
- Fyziologické změny
- Snížení imunity
- Aktivity enzymů
- Biochemické markery
- Genotoxicita
- ....



# Testy se žížalami

---

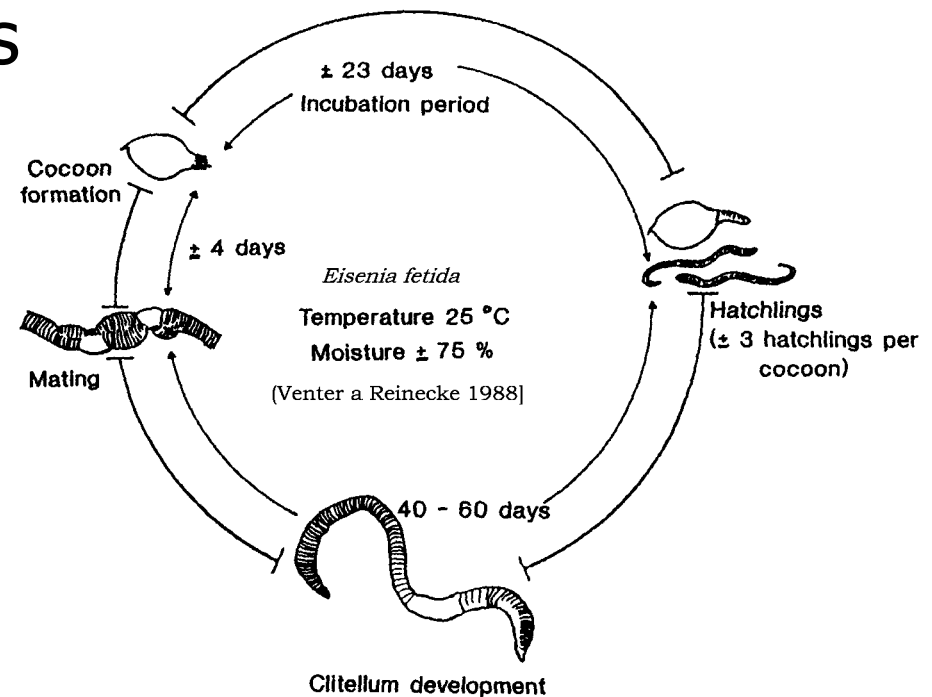
## Užívané druhy

- epigeická je *Eisenia fetida* (žížala hnojní)
- aneická je *Lumbricus terrestris* (žížala obecná)
- endogeická je *Aporredoctea caliginosa*
  
- *E.fetida* se v přírodě vyskytuje jen ve velmi organicky bohatých stanovištích (komposty), což je nevýhoda
  
- *A. caliginosa* je rozšířená na pastvinách i na polích, hraje klíčovou roli v půdních ekosystémech
  
- Používá se také *Lumbricus rubellus* či *Dendrobaena octaedra*
  
- ALE reálně půdní žížaly jsou nevhodné díky dlouhé generační době a díky velkým objemům půdy, které vyžadují v laboratoři

# *Eisenia fetida*

## Výhody

- Standardní druh
- Snadná kultivace velkých počtů
- Krátký životní cyklus





# Chov žížal

---

**Nevýhoda** těchto jinak perfektních testů: nároky na prostor, čas

- boxy 50×50×15 cm s těsnícími víky
  - médium 1:1 směs kravího či koňského hnoje a rašeliny
  - pH cca 7
  - nekontaminovaná amoniakem či močí
  - pokud vše jde dobře za 6 týdnů až 1000 žížal (na 20 kg směsi):  
týdně 2-5 kokonů s cca 4 juvenily na kokon
  - v optimálních podmínkách je dospělá za 2-3 měsíce
- 
- kulturu lze také získat ve vermikompostovacích firmách

## **Synchronizace kultury:**

- začne se s kokony, za 3-4 týdny se vylíhnou, za 7-8 týdnů dospějí (20°C)



# Akutní toxicita pro *E. fetida* na filtračním papíře

---

- 48 expozice na navlhčeném filtračním papíře ve zkumavkách, 20°C, tma, 10 opakování na jednu koncentraci, do jedné zkumavky 1 žížala
- před finálním testem provádíme test hledající rozmezí koncentrací
- aplikace je ve vodném rozroku či volatilním rozpouštědle + odpaření + ovlhčení
- kontaminace se udává v mg/cm<sup>2</sup>; doporučené koncentrace jsou 1, 0.1, ... 0.0001
- mortalita po 24 a 48 h (= nereagují na jemný mechanický stimul) se převede na LC50
- **expozice pouze přes pokožku**
- téměř nemožná extrapolace na reálnou expozici; **velmi umělý test**
- jen slabé korelace tohoto testu a testu s půdou



## *E. fetida* akutní test v půdě

- dospělci *E.f.* jsou chováni 14 dní v umělé půdě obsahující kontaminant (500 g půdy)
- před finálním testem provádíme test hledající rozmezí koncentrací
- kontaminace se udává v mg/kg; doporučené koncentrace jsou 0.1, 1, 10, 100, 1000
- dávkování (rozpuštěné × nerozpuštěné × pevné ... klasika)
- vyšší koncentrace než 1000 mg/kg nejsou environmentálně relevantní a nemá smysl je testovat
- na 1 koncentraci 1 nádoba v předběžném testu a 4 nádoby ve finálním testu
- nádoba má 10 jedinců (dospělci: clitellum, váha 300 - 600mg, věk 2-12 měsíců, rozdíly ve věku by neměly být větší než 4 týdny)
- kontinuální osvětlení (400-800lx) zajišťuje setrvání jedinců celou dobu v půdě
- mortalita a váha po 7 a 14 dnech (nereagují na jemný mechanický stimul) se převede na LC50
- doporučuje se užití referenční látky - chloracetamid (LC50 mezi 20 a 80mg/kg)
- kontrola - mortalita méně než 10% a úbytek váhy menší než 20%



## *E. fetida* reprodukční test

- v nádobách 1-2L s povrchem 200cm<sup>2</sup>, vrstvička asi 5-6cm (500-600g) AS
- **potrava** 0,5g hnoje na jedince a na týden
- do nádoby 10 dospělců
- 1 týden předinkubace; předběžný test; finální test
- aplikace jako postřik na povrch půdy pro pesticidy (!! až cca 30min po introdukci zířal) a pro chemikálie vmíchání do půdy (před introdukcí)
- 2 koncentrace: doporučená dávka pro užívání přípravku a 5× větší
- 20°C; 16:8 400-800lx; krmení 5g sušeného hnoje týdně
- po cca 4 týdnech mortalita, zvážení, spočítají se kokony + juvenilové; oddělají se dospělci
- kokony se inkubují další čtyři týdny - extrakce juvenilů ručním tříděním
- výsledky jsou váha dospělců a počet juvenilů na dospělé
- KONTROLA musí mít cca 30 juvenilů/dospělce; koeficient variance pro reprodukci <30% a mortalita dospělců po 4 týdnech by neměla být větší než 10%
- REFERENČNÍ LÁTKA je doporučován carbendazim; má mít statisticky významný efekt v koncentraci 1-5 mg/kg (250-500g/ha)<sup>56</sup>



# *Eisenia fetida* reprodukční test - začátek



Příprava půd



Měření WHC půd



Ovlhčená AS  
rozvážena do  
testovacích nádob



Přídavek 10 adultů do  
nádob na test



Zvážení jedinců

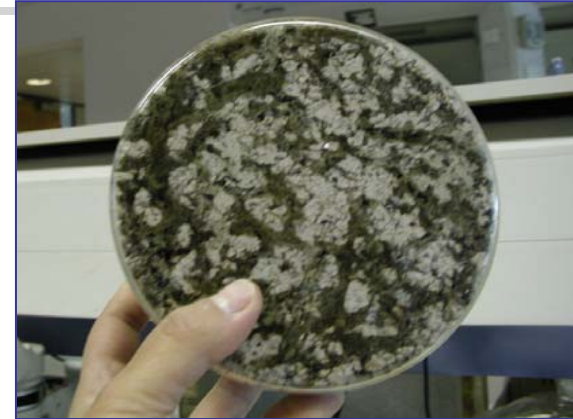


Výběr 10  
reprezentativních  
adultů z chovu a  
jejich omytí dH<sub>2</sub>O

# *E. fetida* test – po 28 dnech



Nádoby během testu v kontrolované místnosti



Prohlídka nádob (známky aktivity)



Zvážení žížal



Zhodnocení mortality

# *E. fetida* – po 8 týdnech



Po cca 20 min  
juvenilové na  
povrchu



Sbírání a  
počítání

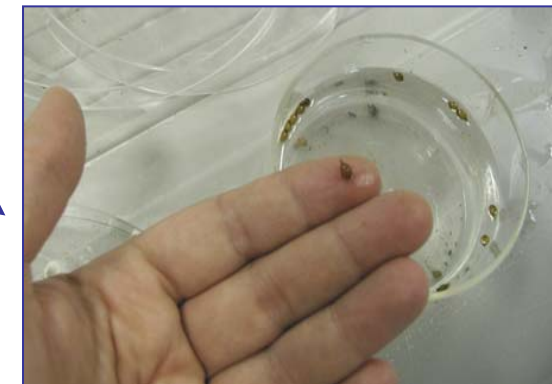
Vodní lázeň s narůstající teplotou  
40°C až 60°C



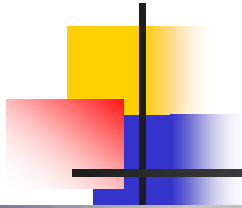
Přesátí půdy



Ruční třídění kokonů



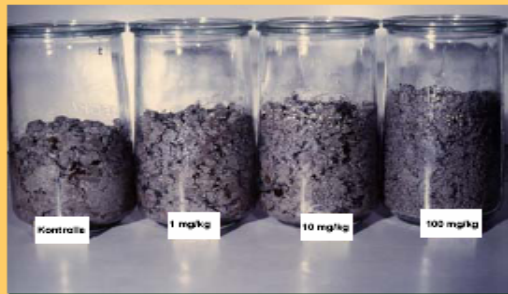
Počítání



# Příklad hodnocení pesticidů



## Prüfung der Auswirkungen auf Regenwürmer



Labortest mit Kompostwurm



Kokons des Kompostwurms



einheimische Regenwurmart

### 1. Akute Toxizität (2 Wochen)

Bewertung: Mortalität, Körpergewicht  
$$TER = \frac{LC50}{PEC} < 10$$

### 2. Einfluss auf die Fortpflanzung (8 Wochen)

Bewertung: Anzahl der Jungtiere, Körpergewicht  
$$TER = \frac{NOEC}{PEC} < 5$$

### 3. Auswirkungen im Freiland (1 Jahr)

Bewertung: Individuenzahlen, Risiken für Populationen und Lebensgemeinschaften

# Earthworm Avoidance Test

<b>Guideline:</b>	ISO/DIS 17512 (draft)
<b>Species:</b>	<i>E. fetida</i> / <i>E. andrei</i>
<b>Substrate:</b>	LUFA St. 2.2 standard soil
<b>Duration:</b>	1 - 2 days
<b>Parameter:</b>	Behaviour of the worms
<b>Test vessels:</b>	Dual chamber





# Testy s roupicemi

---

- význam při srovnání s prostorovými, časovými a finančními náklady testů na žížalách (mají asi poloviční generační dobu - 4-6 týdnů oproti 8 týdnům u žížal, v testu je potřeba jen asi 20g půdy oproti 1/2 kg u žížal)
- NAVÍC roupice zastávají podobné funkce jako žížaly a v některých systémech je nahrazují
- DŮLEŽITÁ je také expozice roupic polutantům (horní vrstvička půdy)
- v terénu představují velmi dobrý INDIKÁTOROVÝ ORGANISMUS, i když žížaly jsou asi ekologicky důležitější
- jako laboratorní testovací roupice se používají *Enchytraeus albidus*, *Cognettia sphagnetorum*, *E. crypticus*, *E. buchholzi*, *E. minutus*

# Chovy roupic







# Chov roupic

- ve směsi artificiální půdy a zahradní zeminy (1:1) či ve směsi rašeliny a standardní přirozené půdy LUFA 2.2, či prostě jen v zahradním substrátu < 2mm
- použitá půda musí být zbavena fauny (např. opakované silné zmrazení a roztátí) a zejména by neměla obsahovat polutanty
- pro vhodnost substrátu lze provést i předběžný test (cca 2 týdny), kde jsou indikátory nevhodného substrátu behaviorální změny (roupice pohybující se pouze po povrchu půdy či snažící se uniknout z nádoby), nevyskytující se juvenilní jedinci a částičky zeminy ulpívající na roupicích
- V optimálních podmínkách vytváří pohlavně se rozmnožující roupice po rozmnožování (optimální teplota do 25 °C) kokon obsahující průměrně 5 - 15 vajíček. Po dvou až třech týdnech se vylíhnou cca 1 mm (15 - 20 segmentů) velcí juvenilní jedinci, kteří dospívají v závislosti na podmínkách po 10 až 20 týdnech (důležitá teplota jejíž optimum leží mezi 5 - 25 °C). Nově vylíhlé roupice mají 15 - 20 segmentů a jejich počet přibývá s věkem. Za dospělé lze považovat tehdy, vyvinul-li se zcela rozmnožovací systém.



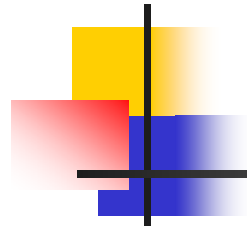
# Test na reprodukci roupic – 1. část

- Je možno provádět se dvěma druhy *E. albidus* a *E. crypticus*
- Inertní nádobky a v každé 20g půdy pro E.a. a 10 g pro E.c.
- **Podmínky testu:** optimální teplota (max 20 °C), vlhkost (40 - 60% WHC), osvětlení (perioda 16:8, 400-800 lux)
- 10 dospělých jedinců (opasek s tečkami vajíček) do každé nádobky
- Každý týden s výjimkou prvního týdne po odstranění dospělců je přidávána potrava (cca 1,2 mg ovesných vloček na g půdy).
- **Mortalita** – po 2 týdnech (E.c.) či 3 týdnech (E.a.) se spočítají dospělci a odstraní se z půdy
- Pozorování **morfologických změn** lze provádět na petriho miskách:
  - Jedinci jsou asi 12 hodin necháni na miskách v chladu, čímž dojde k vyčištění trávicí soustavy.
  - Jedinec je přemístěn do kapky vody na podložní sklíčko a přikryt krycím sklíčkem.
  - Pozorování začíná na 100× zvětšení a detailní studium externích a interních struktur provádíme při 400× zvětšení.



## Test na reprodukci roupic – 2. část

- Po odstranění adultů se inkubuje pouze půda s kokony – bez potravy
- Po dalších 2 týdnech (E.c.) či 3 týdnech (E.a.) se hodnotí reprodukce - fekundita, pro extrakci juvenilních jedinců
- Metoda mokré extrakce (fixace etanolem a barvení 1% bengalskou červení po 12 hodinách)
- **Kontrola v testu** (bez aplikace chemikálie i nosiče) má vykazovat následující parametry:
  - mortalita dospělců méně než 20% na konci testu
  - rozmnožení nejméně 25 juvenilních jedinců na 10 dospělců (pro E.c. je zo 300 až 500)
  - koeficient variance pro počet juvenilů méně než 50%.
- **Pozitivní kontrola** - referenční látka - carbendazim (1,2±0,8mg/kg by mělo vyvolat EC50)



# Timetable

Period	Range-finding test	Definitive test
Day - 7	Preparation of artificial soil (Mixing of dry constituents)	Preparation of artificial soil (Mixing of dry constituents)
Day - 5	Check of pH of prepared AS Measurement WHCmax	Check of pH of prepared AS Measurement WHCmax
Day -3 to -1	Sorting out of worms for acclimatisation	Sorting out of worms for acclimatisation
Day -1	Premoistening of AS and division into batches	Premoistening of AS and division into batches
Day 0	1 Preparation of stock solution 2 Application of test substance 3 Weighing of test substrate into the test vessels 4 Mixing of food into the soil 5 Introduction of worms 6 Measurement of pH and moisture	1 Preparation of stock solution 2 Application of test substance 3 Weighing of test substrate into the test vessels 4 Mixing food into the soil 5 Introduction of worms 6 Measurement of pH and moisture
Day 7	Check of moisture	Check of moisture; feeding
Day 14	Determination of mortality Estimation of number of juveniles Measurement of pH and moisture	Check of moisture; feeding
Day 21		1 Removal of adults 2 Check of behaviour 3 Determination of mortality 4 Check of moisture; feeding
Day 28		Check of moisture
Day 35		Check of moisture; feeding
Day 42		Counting of juvenile worms Measurement of pH and moisture

# ERT je citlivý zejména na pH

Soil parameter	Number of juveniles per worm and week	
	<i>E. albidus</i>	<i>E. crypticus</i>
Water content		
35 %	0,36 ± 0,32	3,80 ± 0,65
55 %	1,82 ± 0,89	2,65 ± 0,69
65 %	1,62 ± 0,58	1,43 ± 0,28
90 %	1,38 ± 0,67	2,11 ± 0,60
pH value		
3,2	0,01 ± 0,01	0,64 ± 0,53
3,6	0,01 ± 0,02	3,27 ± 0,51
4,0	0,30 ± 0,42	5,49 ± 2,35
5,3	2,79 ± 1,19	4,78 ± 2,15
6,8	5,75 ± 2,11	9,54 ± 1,55
7,0	7,63 ± 1,14	8,25 ± 0,98
Org. matter (%)		
5	6,4 ± 1,7	4,4 ± 0,6
10	8,8 ± 2,2	4,0 ± 1,1
20	8,2 ± 2,4	4,1 ± 1,4

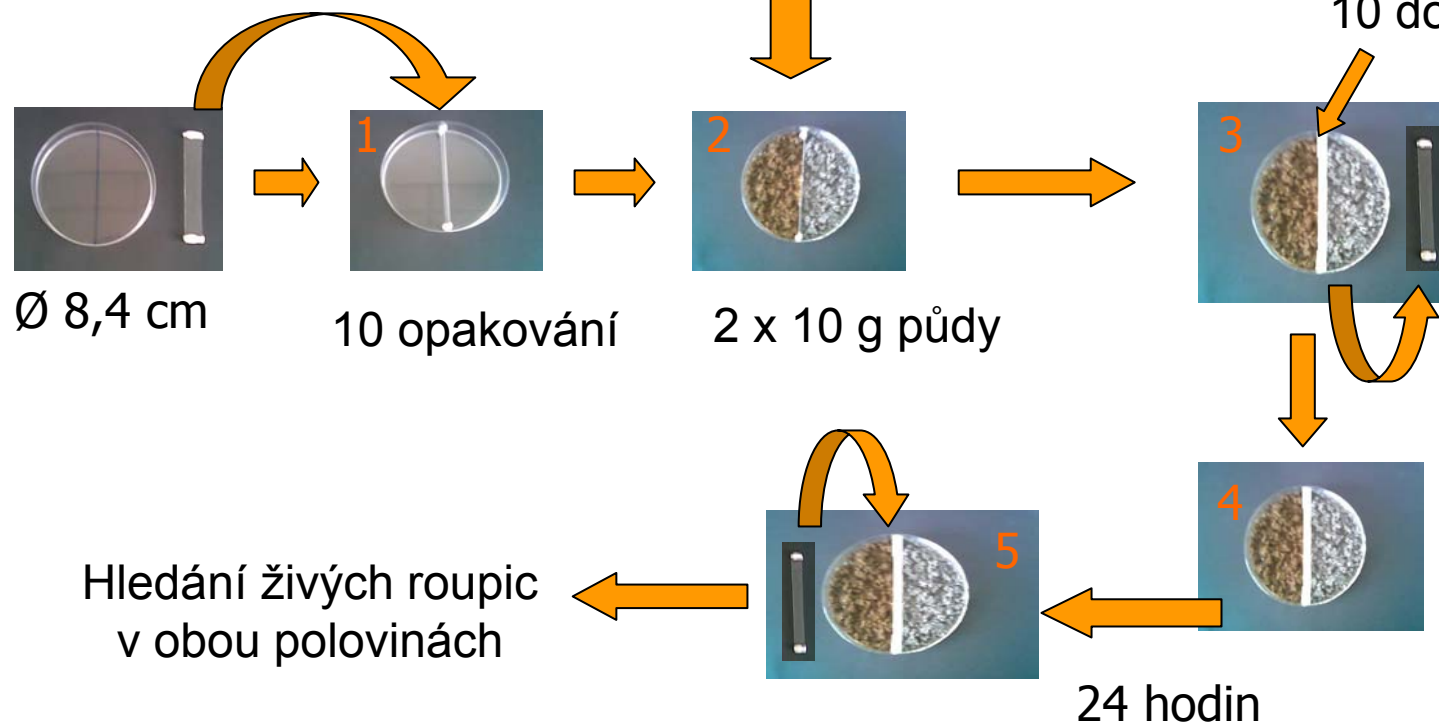
# Avoidance test s *E. albidus*

## Např. testování odpadů

odpad      umělé půdy



10 dospělců





## Bioakumulační test s máloštetinací

Parameter	
Test organism	<i>Eisenia fetida/andrei</i> , or <i>Enchytraeus albidus</i> , adult worms of similar size
Test substrate	spiked artificial soil based on OECD guideline No. 207 (OECD 1984)
Control substrate	uncontaminated artificial soil based on OECD guideline No. 207 (OECD 1984)
Biological parameters	concentration of test item in worms during uptake and elimination period
Endpoints	bioaccumulation factor, uptake rate coefficient, elimination rate constant
Test duration	uptake period: until steady state or 28 d; plus 10 day elimination period
Temperature	20 ± 2°C
Light regime & light intensity	constant light; 400 to 800 lx
Test chambers	e.g. 250 mL/50 mL glass tubes; additional chambers of appropriate size for chemical analyses
Feeding during exposure	food added to soil directly after spiking; additional feeding once per week during exposure
Water	periodic addition of deionised water
Equilibration	4 days; spiked soil under test conditions
Test item	<sup>14</sup> C-labelled/metal
Spiking of soil	if possible, test item dissolved in water mixed with dry soil; optional: coating of sand
Analysis of test item	in worms and soil
Number of test concentrations	1 plus control(s)
Test concentrations	to be fixed (expressed in Bq or mg kg <sup>-1</sup> soil dry weight)
Number of replicates per test concentration/sampling date	at least 3 per sampling date
Number of organisms per test chamber	<i>Eisenia</i> : 1; <i>Enchytraeus</i> : 20
Determination of soil dry weight and organic carbon content in soil	4 samples after soil preparation
Determination of lipid content in biota	4 samples at end of uptake phase*
Validity of test	mortality during test period ≤ 10% (earthworms), ≤ 20% (enchytraeids)
Evaluation	Use of appropriate methods (e.g. nonlinear regression analysis, ANOVA, Dunnett's t-test)

# Testy s chvostoskoky

- ekotoxikologicky dlouho využívané organismy - první test na filtračním papíře byl již v roce 1956 s DDT

## Výhody:

- dobře prostudovaná skupina půdních bezobratlých
  - ekologická relevance
  - široce rozšířené, abundantní v půdách
  - lehce vzorkovatelní
  - lze je chovat v laboratoři
  - relativně rychlý životní cyklus s vysokou reprodukcí
- nejčastěji užívaným druhem je *Folsomia candida*
- omnivor (řasy, bakterie, prvoci, detritus)
  - lehká kultura
  - partenogenetická povaha neposkytuje příliš ekologicky relevantní obrázek
- i další druhy: *Folsomia fimetaria*, *Isotoma viridis*, *Onychiurus armatus*, *O. quadricellatus*, *Orchesella cincta*, *Tullbergia granulata* 72





# Reprodukční test s *F. candida*

- Guideline:** ISO 11267 (1999)
- Species:** *Folsomia candida*
- Substrate:** Artificial soil or field soils, e.g. LUFA
- Duration:** 28 days
- Parameter:** Mortality, number of juveniles
- Design:** NOEC, ECx (30 vessels)
- Experience:** Wide range of contaminated soils (plus a ring-test), few tests with waste





# Postup testu s *F. candida*

## **Kultivace**

- na petriho miskách či jiných nádobách, kde je na dně štuková sádra (pH 6,4) a aktivní uhlí (pH 6-7) smíchané v poměru 8 až 10 ku 1, 100g směsi + 60-100g vody = dostatečná vlhkost; uhlí pohlcuje exkrekty
- tmavé pozadí umožňuje pozorování
- 20-22°C; 70-80% rel. vlhkost vzduchu; 400-800lx
- potravou jsou kvasnice párkrát týdně
- po 8 týdnech je nutné přemístit do nové misky (tím se spouští ovipozice)

## **Synchronizace**

- shluk vajíček se přemístí do nové nádoby; po 48h. odstranit zbylá vajíčka a krmí se juvenilové
- nebo čerstvě vylíhlí jedinci se dají do nové nádoby a po naklazení vajíček se odstraní dospělci
- manipulace pomocí exhaustoru dechového či automatického



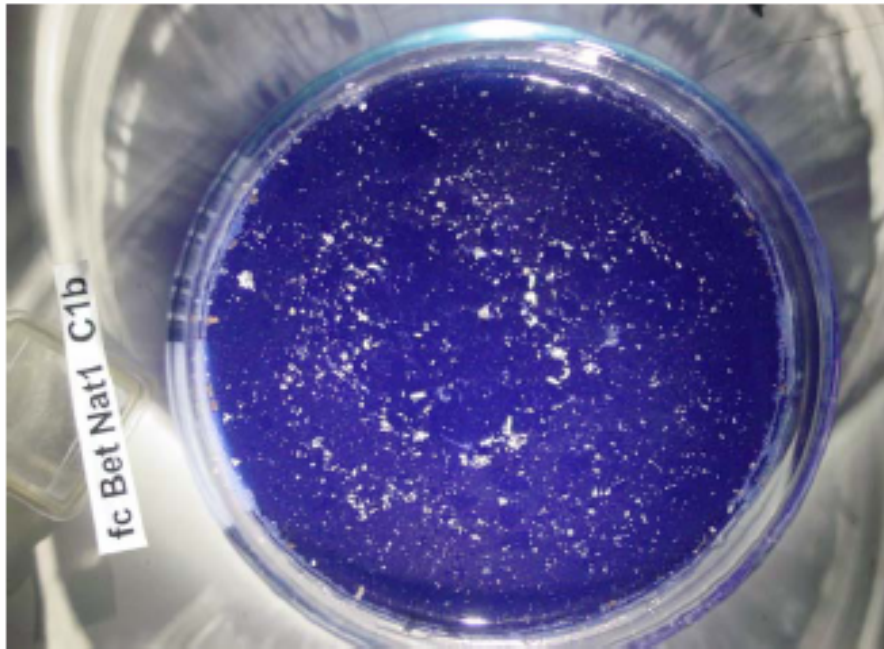
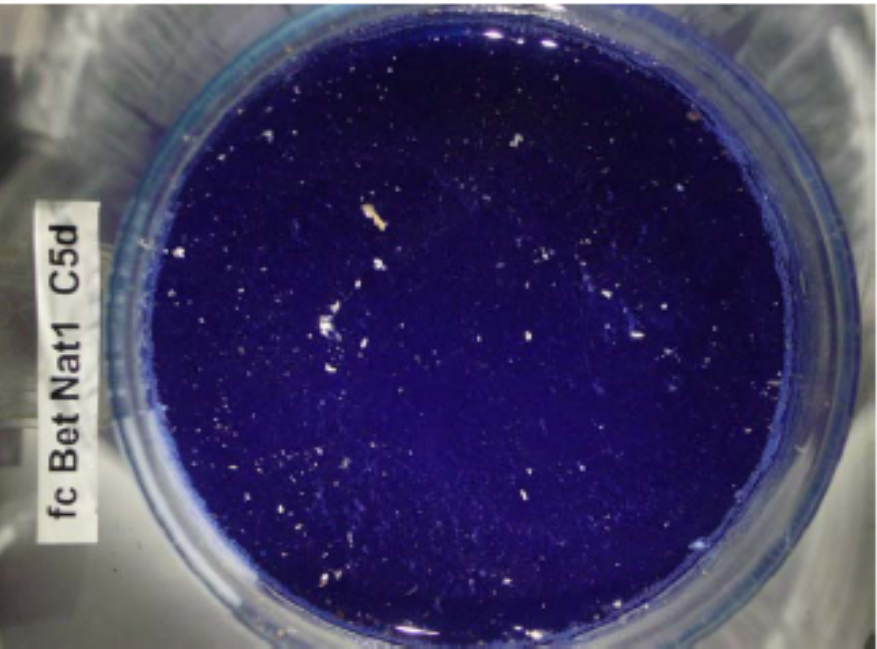
## Test s *F. candida*

---

- 30g AS + na počátku 2mg sušených kvasnic + 10 jedinců *F.c.* (10-12 dní staré) a těsně zavřít nádoby
- po 28 dnech (případně po době, než se vylíhnou potomci z vajíček nakladených dospělci) se sleduje přežití a potomstvo (F1)
- flotační metoda na konci pokusu
- endpointy jsou reprodukce (produkce vajíček), růst, změny v chování, přežití
- REFERENČNÍ LÁTKA: Betanal plus (160g/L Phenmedipham) či E605 forte (507,5g/L Parathion) efekt na reprodukci 100-200mg první látky a 0,1-0,18mg druhé
- VALIDITA TESTU: v kontrole ne více než 20% mortalita a minimum 100 juvenilů na jednu testovací nádobu

# Flotační metoda

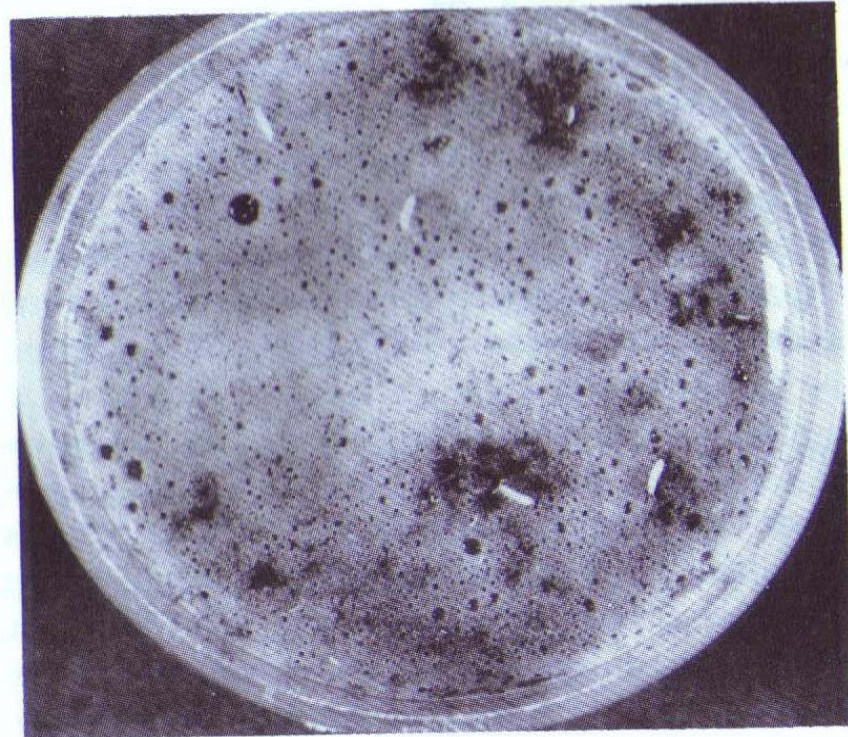


 <p>fc Bet Nat1 C1b</p>	 <p>fc Bet Nat1 C5d</p>
<p><b>Control: Some adults and many juveniles</b></p>	<p><b>Betanal (a.i. Phenmedipharm): 10 mg/kg: few adults and nearly no juveniles</b></p>

# Flotační metoda



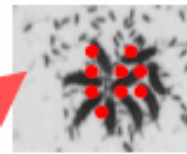
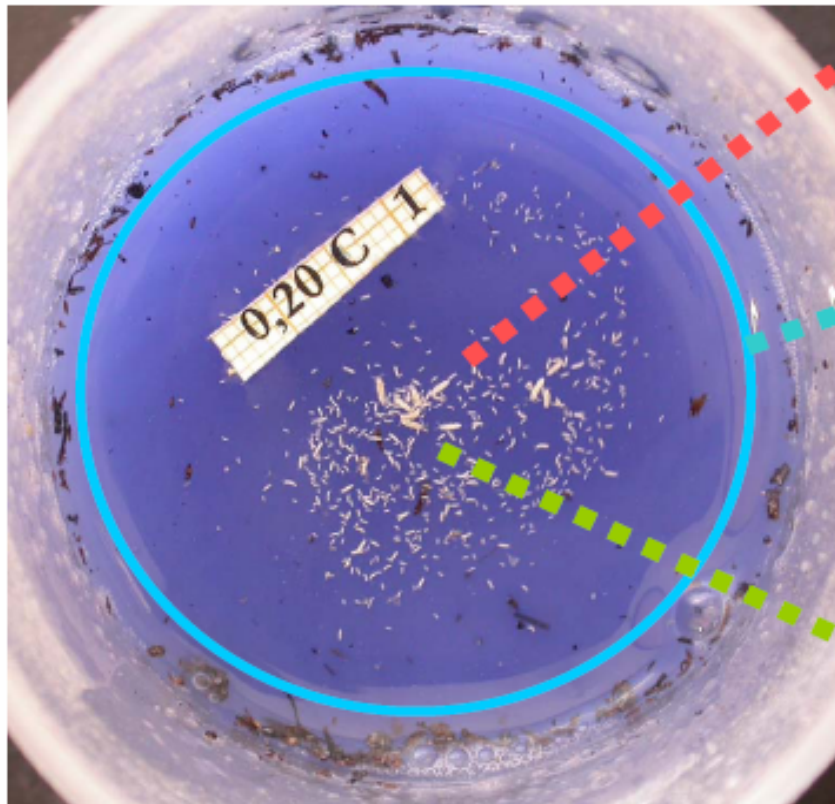
**Kontrola: 8 adultů a 235 juvenilů**



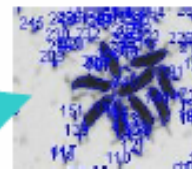
**100 mg/kg kadmium: 4 adulti a 5 juvenilů**

# Analýza obrazu

## Assessed endpoints



% SURVIVAL



% REPRODUCTION

% FECUNDITY



% BODY LENGTH

% ENERGY ALLOCATION RATE

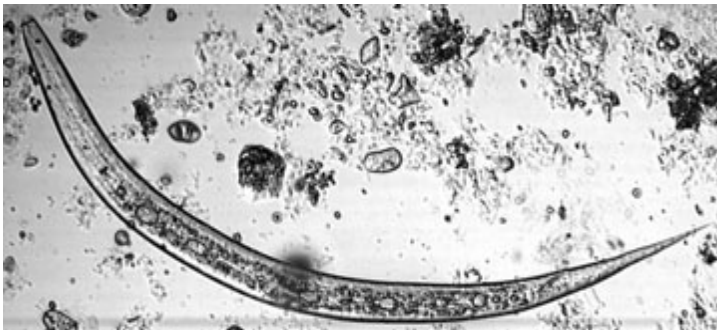


# Testy s hlísticemi

---

- ☹️ Hlístice jsou de facto vodní organismy – žijí v pórové vodě
  - ☹️ Nesnadná extrapolace na reálné podmínky
  - 😊 Velmi rychlé testy – krátký životní cyklus
  - 😊 Hlístice jsou nejpočetnější půdní bezobratlí
  - 😊 Existují varianty s půdou jako matricí
- 
- *Caenorhabditis elegans, Panagrellus redivivus, Plectus acuminatis*

# *Caenorhabditis elegans* chov a test



**ASTM: E2172-01 Standard  
Guide for Conducting  
Laboratory Soil Toxicity  
Tests with the Nematode  
*Caenorhabditis elegans***

- *C. elegans* se chová na agarových plotnách s nárůstem *E. coli*
- Nutné jsou aseptické techniky a opatrné zacházení
- Několik medií – NGM – Nematode Growth Medium, LB – agar, K – roztok apod.
- Po 1-2 měsících se přesazuje na nové plotny
- Při nedostatku potravy se vyvinou tzv. Dauerovy larvy





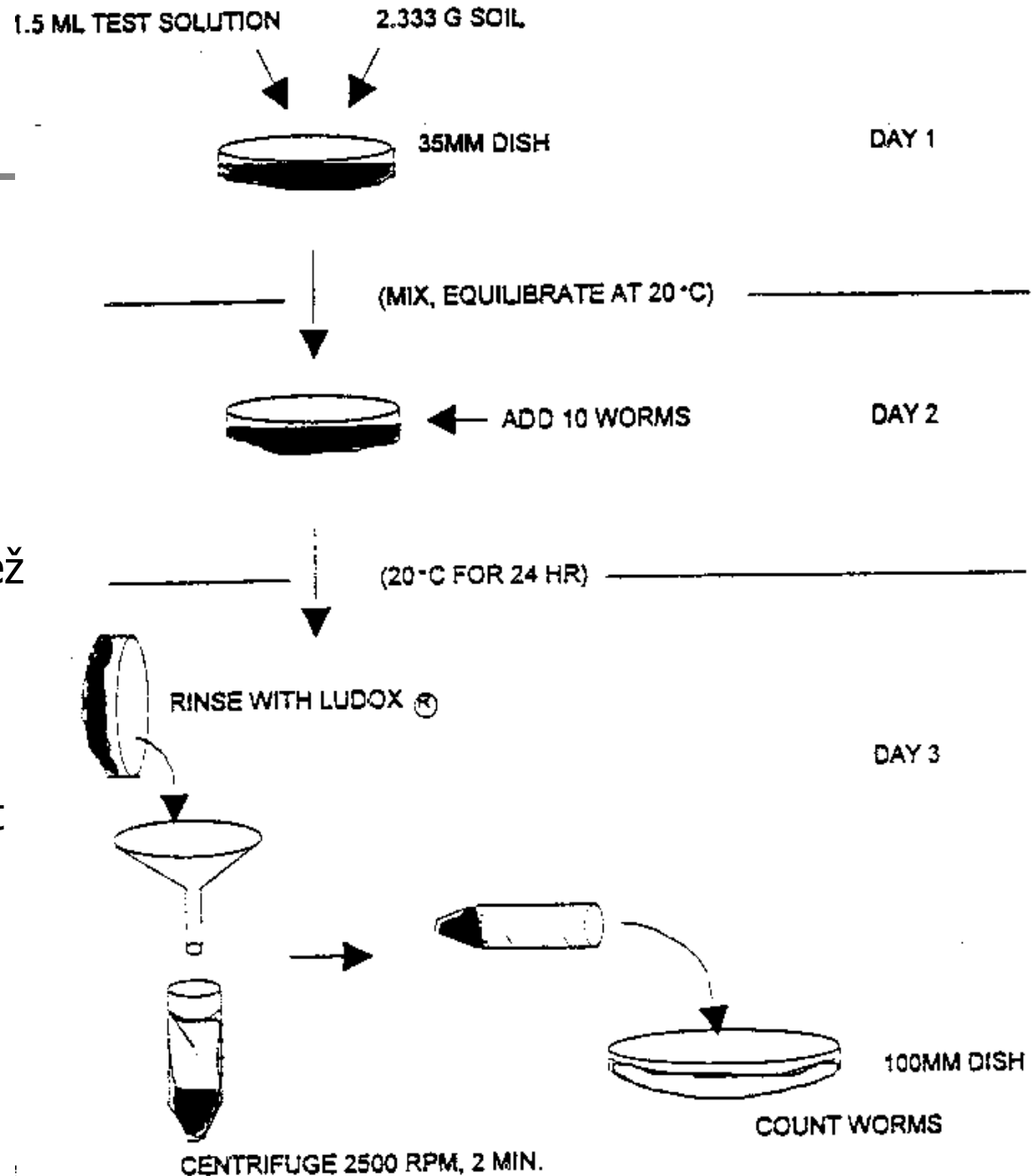
## *C. Elegans* test

---

- Protože testovací organismy by měly být stejné věkové a váhové kategorie, použije se synchronizovaná kultura nematod: ošetření kultury roztokem chlornanu a hydroxidu sodného (SAVO) - vajíčka rezistentní, dospělce usmrtí; pak cca 3-4 dny staré hlístice
- připraví se varianty půd ve větších objemech; poté na petriho miskách (Ø 3,5) menší navážky + testovací organismy (10 jedinců)
- po 24h. pokusu (20°C ve tmě) se provede speciální extrakce (Ludox® - koloidní suspenze) + centrifugace; nematoda jsou na povrchu supernatantu - přemístíme je na petriho misku s médiem a počítají se mrtví jedinci (bez pohybu při dráždění); spočítá se LC50
- kontrola pro validitu měření by měla mít 80% výtěžnost nematod z půdy a v kontrole 90% přežívání
- pokud je test delší než 24h. musíme zajistit potravu - inokulum *E.coli*

# Postup

- Kontaminovanou půdu lze připravit předem
  - Nutný je kvalitní mikroskop
  - Tento test je méně ekologicky relevantní než ostatní půdní testy:
    - hodně vodné fáze
    - krátké trvání
- = rychlý screeningový test



# Šneci v půdní ekotoxikologii

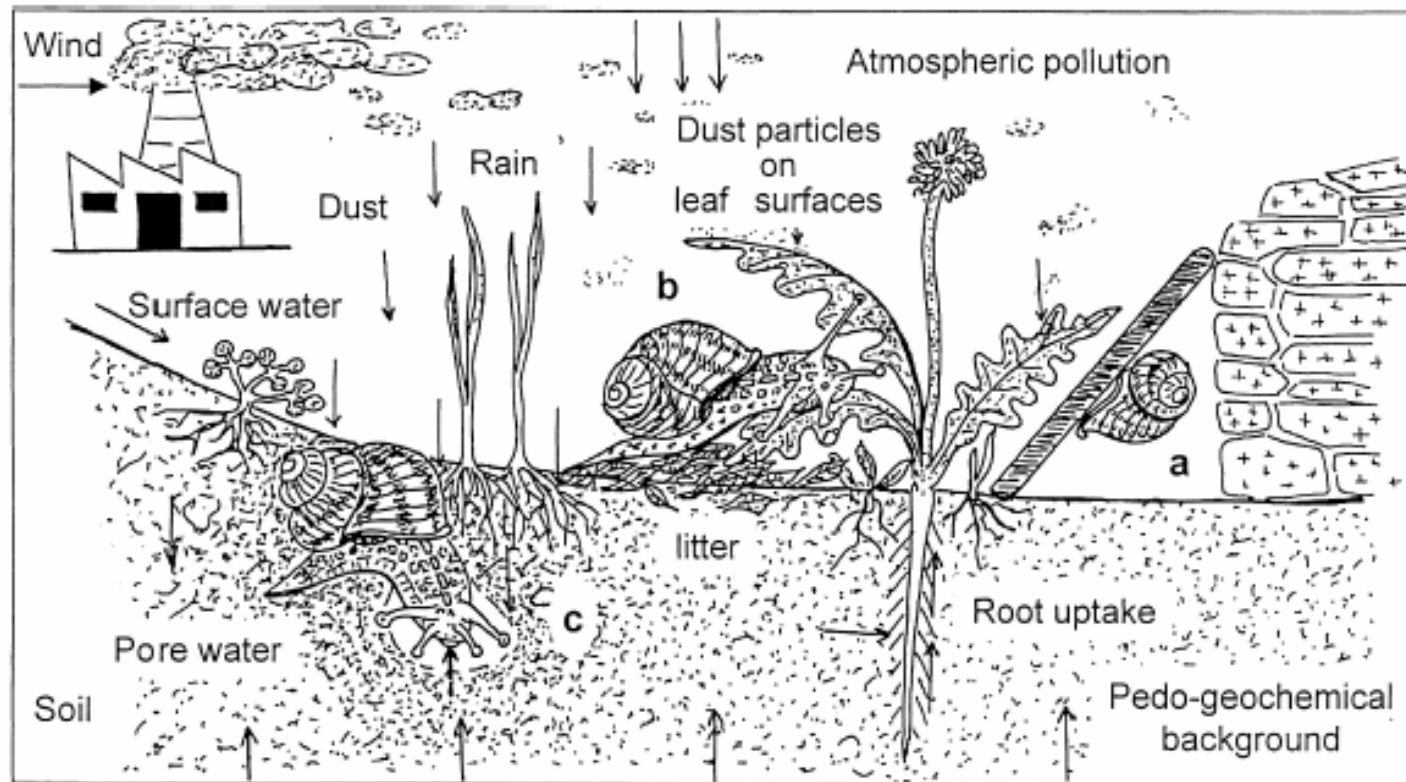
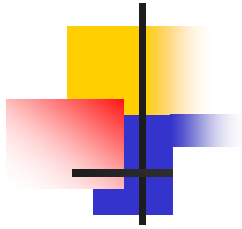


Fig. 6. Possible routes of direct and indirect exposure of land snails to contaminants: (a) contamination by breathing air; (b) contamination at soil surface by eating plants, soil contact, breathing air, rain and surface water contact; (c) contamination in the soil by swallowing soil particles, soil contact and interstitial air and pore water.

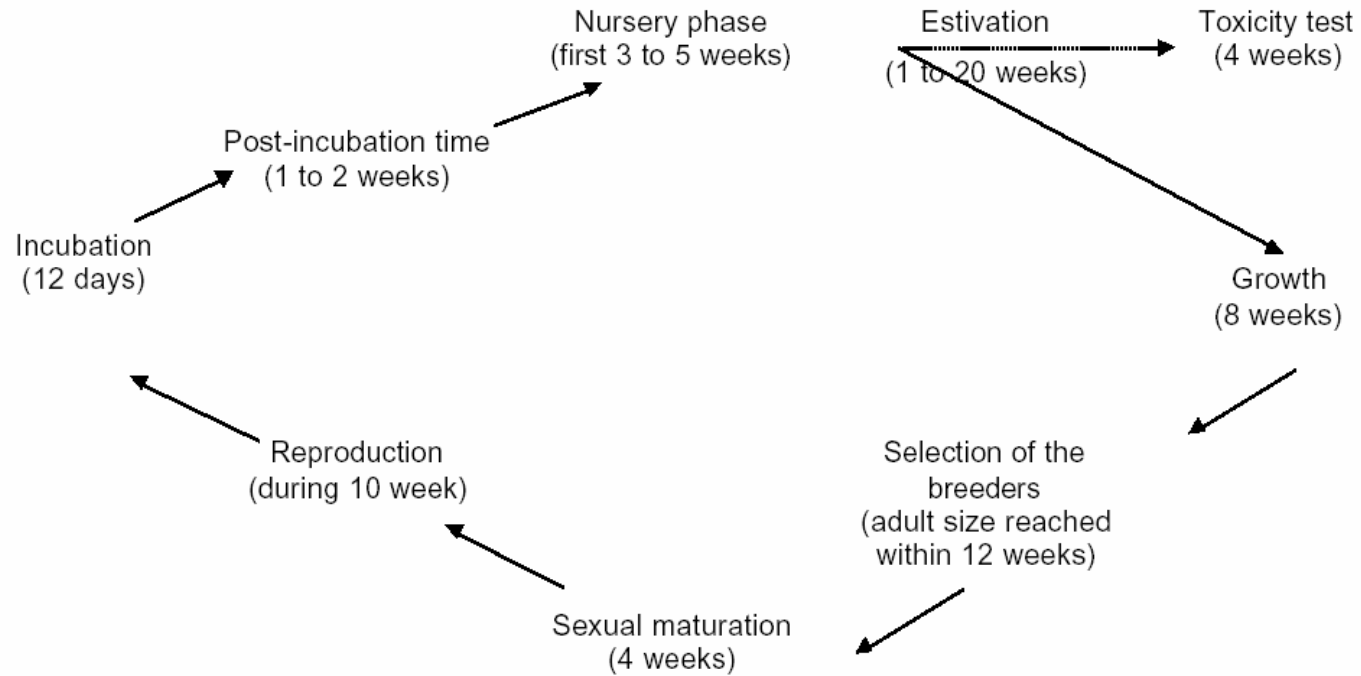
# *Helix aspersa* test

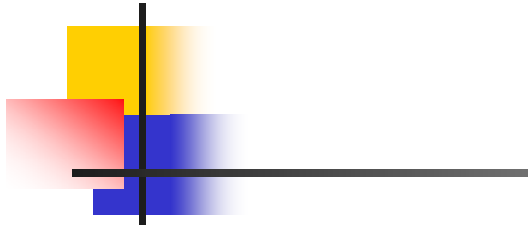


- juvenilní *H. aspersa* (3-5 týdnů staří jedinci;  $1 \pm 0,3\text{g}$ ;  $15,5 \pm 1\text{mm}$  schránka; ze synchronní kultury) po estivaci = 1-20 týdnů v dřevěných krabičkách v suchu; pár dní před testem postřík vodou, krmení
- pak je 5 jedinců exponováno 28dní testovacímu substrátu (AS či přírodní čistá půda) obsahujícímu testovanou látku nebo kontaminované půdě; v boxech s 1cm vrstvou cca 140g půdy
- po sedmi dnech se přendávají do nového substrátu
- 20°C, 16:8 fotoperioda 50-100lx
- během testu se přidává potrava (např. Helixal) v misce na dno testovací nádoby
- každých 7 dní se jako parametr růstu měří hmotnost a velikost schránky a sleduje se mortalita
- referenční látka je Cd: pro hmotnost by EC50 mělo být mez 350-650mg/kg a pro schránku mezi 500-800mg/kg
- VALIDITA: menší mortalita než 10%; koeficient variance pro růst < 40%; cca 4× zvětšení hmotnosti; cca 1,5× zvětšení ulity



# *H. aspersa* – náročný chov

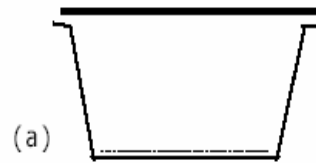




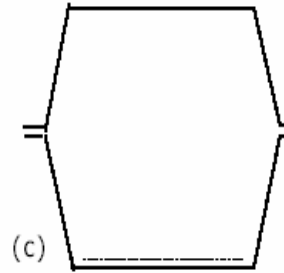
# Chov a test

(a, b) A transparent plexiglass cover held in place by two rubber bands (weeks 1 and 2 of the test): volume 1.6 dm<sup>3</sup>.

(c, d) The flat cover replaced by another box up-side down (weeks 3 and 4 of the test): volume 3.2 dm<sup>3</sup>.



(a)

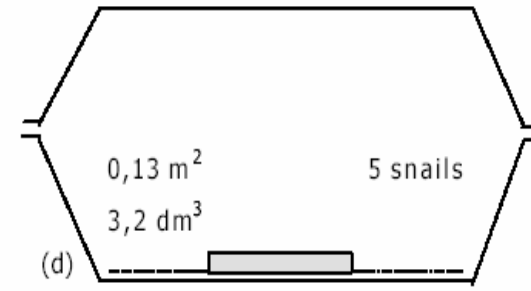


(c)

a, c: Front view



(b)



(d)

soil or wet absorbent paper Petri dish with feed

b,d: Side-face view

**Weeks 1 to 2 (a,b)**

**Weeks 3 to 4 (c,d)**





# Testy s roztoči

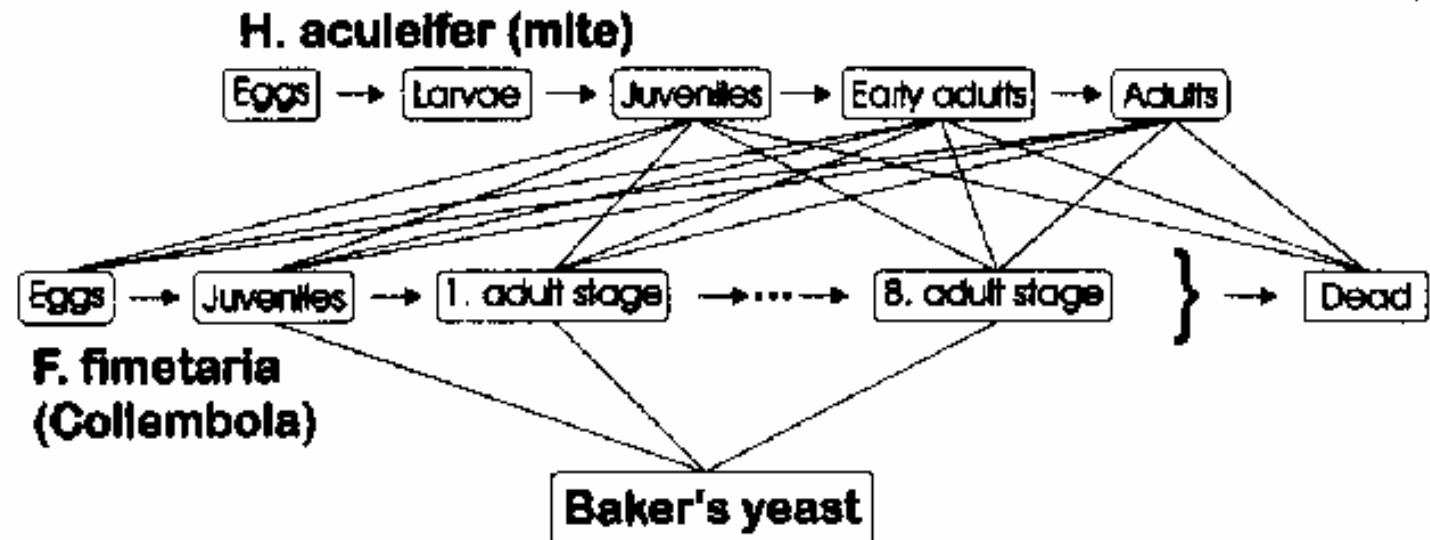
---

- vhodné testovací organismy, zastávají řadu potravních typů – herbivoři, fungivoři, detrivoři a carnivoři
- ***Hypoaspis aculeifer*** (*gamasida*) – predátor lovcí roupice, chvostoskoky, roztoče; cca 0,8mm; sexuální rozmnožování
- ekologická úloha spočívá v biokontrolě škůdců rostlin (hlístic, larev hmyzu, roztočů) a patří mezi prospěšné členovce
- testovací systém zahrnuje vztah predátor – oběť – vysoká citlivost

# *Hypoaspis aculeifer* test

## Kultura

- roztoče lze chovat v plastových nádobkách na sádře ve 20°C při 12:12h fotoperiodě
- krmí se *Folsomií fimetaria* jednou týdně
- pro vyprodukování vajíček se umístí na nový substrát 150 samic a 20 samečků; je potřeba udělat jehlou malé dírky do sádry
- za cca 10 dní jsou juvenilové, kteří se krmí juvenilními *Folsomiemi*







## *H. Aculeifer* test

---

- 10 samiček a 5 samečků H.a. a 100 F.c. či F.f. se přidá do 60g půdy AS či LUFA (kontrola + kontaminované varianty)
- po třech týdnech se sleduje přežití, růst a reprodukce
- na začátku a po 14 dnech se přidají kvasnice jako potrava pro chvostoskoky
- testovací nádobky obsahují naspod síťku pro pozdější extrakci v McFaydenově vysocegradientovém extraktoru
- referenční látka může být dimethoát
- Validita: reprodukce roztočů cca 20 juvenilů na miskou a přežití samiček více než 90%



# Testy s prospěšnými členovci

- existuje pojem "užiteční členovci", spojen s ochranou před účinkem pesticidů na necílové organismy, například na pavouky, hmyz a roztoče které jsou přímo prospěšné, neboť v ekosystémech fungují proti škůdcům (predátoři a parazité škůdců)
- existuje skupina IOBC (International Organisation for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants) - připravila cca 30 testů v 3 stupňovém schématu hodnocení rizik (vychází z testů BBA a spolupracuje s BART)
- cca 6 testů na blanokřídlých
- 4 testy na broucích
- 2 testy na dvoukřídlých
- jeden na síťokřídlých
- jeden na plošticích
- 3 na roztočích
- jeden na pavoucích
- jeden na patogenní houbě

# Organismy? Většinou dravci



*Lithobius mutabilis*



*Philonthus cognatus*



*Poecilus cupreus*



*Linyphiidae*



# BBA testy

---

## Order

Family

Species

Details of test/publication

---

## Acari

Phytoseiidae

*Amblyseius*  
*finlandicus*

Cherry foliage with  $>0.5$  mites/leaf sprayed to run-off. Exposure via direct spraying and residual uptake. Mite density/100 leaves assessed at 4, 7 and 14 days after treatment (DAT). % depletion of population placed within IOBC effects classification  
{Sterk in Hassan, 1988}

*Amblyseius*  
*potentillae* and  
*Typhlodromus*  
*pyri*

1–4-day-old protonymphs exposed to fresh spray deposits ( $2 \text{ mg/cm}^2$ ) on glass plate. 20/replicate/4 reps. Percentage mortality assessed at 7 days and egg production of survivors recorded after 14 days on untreated surface. Overmeer & van Zon (1982) {OvZ} formula used to class effect  
{Overmeer in Hassan, 1988}

*Phytoseiulus*  
*persimilis*

{a} Initial toxicity: bean leaf sprayed at  $1-2 \text{ mg/cm}^2$ . 1–2-day-old juveniles exposed 8 days: 15/leaf/4 reps. Mortality assessed Days 1 and 4 when prey added. Males added Day 4 to ensure mating: egg laying assessed Days 6 and 8. If OvZ index  $<30\%$ , harmless; if  $31-98\%$ , go to {b}; if  $>99\%$ , reject as harmful.  
{b} Persistence: identical to {a}, but mites exposed to leaves after deposit has aged 3 days in the field.  $>30\%$  effect rejected as harmful;  $<30\%$  progress to field test (protocol for field test given but not a current requirement)  
{Oomen in Hassan, 1988}



# BBA testy

---

## Araneae

### Linyphiidae

*Lepthyphantes  
tenuis*

Field-collected adults exposed singly (21/treatment) to treated glass in a chamber for 48 h. Mortality assessed at 48 h if <50%, fly pupae added and predation assessed at 48 h. Mortality classified using IOBC system if >50%; feeding used if mortality <50% (Inglesfield in Hassan, 1985)

## Coleoptera

### Carabidae

*Bembidion  
lambros*

Field-collected adults exposed singly (40/treatment) to direct spray (6 mg/cm<sup>2</sup>) and residual uptake within a sand arena for 6 days. Mortality assessed at 1, 6 and 24 h then daily for 5 days. Food supplied Day 1. Mortality classified with IOBC system (Chiverton in Hassan, 1988)

### *Poecilus*

(= *Pterostichus*)  
*cupreus* -

1–6-week-old adults exposed in groups of 6 (5 reps) to direct spraying (4 mg/cm<sup>2</sup>) and residual uptake within sand arena for 14–28 days. Toxic standard may be included for comparison. Sublethal effects assessed at 2, 4 and 6 h; mortality at 1, 2, 4, 7, 11 and 14 days. Predation of fly pupae monitored. Toxicity assessment extended from 21 to 28 days if >2 bodies are recovered between Days 7 and 14. Classified using mortality/time progress curve and predation effects (BBA draft guideline, December, 1990)

### Coccinellidae

*Coccinella  
septempunctata*

3-day-old adults and/or 3-day-old larvae exposed to residual uptake on a glass plate sprayed at 4 mg/cm<sup>2</sup>. Mortality recorded for 14 days (adult) or till pupation (larva). Emergence and egg laying assessed for surviving adults. OvZ formula used for classification of effects (BBA guideline VI, 23–2.1.5)



# BBA testy

---

## Staphylinidae

*Aleochara  
bilineata*

1–2-week-old adult, mated females exposed to sprayed sand (6 mg/cm<sup>2</sup>) in a Petri dish for 5 days. Food supplied daily. Survival and fecundity assessed at 5 days; eggs removed by sieving and larval emergence assessed for 7–10 days. OvZ formula used to classify effect (Samsoc-Peterson in Hassan, 1988, 1992)

## Diptera

### Syrphidae

*Syrphus  
corollae*

2-day-old larvae exposed (in groups of 5/5reps) till pupation to sprayed lid and base (1.5 mg/cm<sup>2</sup>) of glass Petri dish. Aphids added daily till pupation; pre-imaginal mortality calculated. Emerging adult fertility assessed at 3 weeks from product of egg production and viability. OvZ formula used to classify effects (Rieckman in Hassan, 1988, and official BBA Guideline 23.2.17, 1989)

## Tachinidae

*Drino  
inconspicua*

10–11-day-old adults exposed in groups of 10 (3 reps) to glass and fibreglass walls of test chamber for 7 days. Parasitism of 10 sawfly larvae per day (exposed for 30 min) evaluated Days 1–7. % depletion of parasitism calculated and classified using IOBC system (Huang, in Hassan, 1985)

## Hemiptera

### Anthocoridae

*Anthocoris  
nemorum*

2nd instar nymphs exposed in groups of 8/4 reps to residue (1–1.5 mg/cm<sup>2</sup>) on glass plate for 15 days. Mortality assessed Days 1, 5, 8 and 12 giving supplementary food on each occasion. Adult fecundity assessed by counting eggs layed in leaves from 26 to 43 days after treatment (leaves replaced every 3–4 days). Corrected nymphal mortality during exposure and fecundity data evaluated via OvZ formula and IOBC system (Staubli & Pasquier in Hassan, 1988)



# BBA testy

---

## Hymenoptera

### Aphelinidae

#### *Encarsia formosa*

{a} Initial toxicity; 12–24-h-old adults exposed in groups of 15 (3 reps) to sprayed glass surface (1 mg/cm<sup>2</sup>) in chamber for 7 days. % mortality recorded at 2, 4 and 7 days and % reduction in parasitism of whitefly scales introduced for 4 h on each assessment date. <50% reduction in parasitism, harmless; >50% reduction, go to stages {b} and {c}

{b} Toxicity to insensitive stage: parasitized whitefly scales, 2–3 days pre-emergence exposed in groups of 40 (3 reps) to direct spraying (4 mg/cm<sup>2</sup>) for 10–14 days. % mortality assessed at 10–14 days: >50% rejected as harmful; <50%, progress to stage {c}

{c} Persistence against adults: 12–24-h-old adults exposed to weathered deposits on leaves treated to run-off, 3 days earlier. Exposure for 7 days in groups of 20 (3 reps). % mortality assessed at 7 days: >50% rejected as harmful; <50% field test required (field test not current German requirement)

[Oomen in Hassan, 1988]

### Aphidiidae

#### *Diaretiella rapae*

<24-h-old adults exposed to residual deposits (1–2 mg/cm<sup>2</sup>) for 24 h in a glass chamber. % reduction in aphid parasitism of survivors recorded and expressed within IOBC classification system

[Kuhner in Hassan, 1985]



# BBA testy

---

## Ichneumonidae

*Coccigomimus  
turionellae*

18–25-day-old adults exposed for 7 days to glass surface in test chamber (3 reps). Days 1–9, parasitic performance recorded; 10–18, insects adapt to test cage; 18–25, exposure period. Mean eggs laid per female corrected for laying rate in pre-exposure period. % reduction classified within IOBC system  
(Bogenschutz in Hassan, 1988)

*Phygadeuon  
trichops*

3-day-old adults exposed in groups of 20 (3 reps) to residue in glass chamber for 3.5 weeks. Host puparia added on Days 4, 6, 7, 8, 11, 13, 18, 20 and 22 and left until next occasion. % reduction in parasitism evaluated within IOBC classification  
(Nator in Hassan, 1988, and BBA Test Guideline No. 23.2.12, 1988)

## Trichogrammatidae

*Trichogramma  
cacoeciae*

(a) Initial toxicity: 400–500, 24-h-old adults (3 reps) exposed to residual deposit (1–1.5 mg/cm<sup>2</sup>) in glass chamber for 7 days. % reduction in parasitism of eggs laid 2, 3 and 5 days after treatment recorded. If 100% mortality at 24 h, rejected as harmful; if >80% go to stage (b); other levels of effect interpreted within IOBC classification system  
(b) Toxicity to insensitive stage: 400–500 parasitized eggs treated directly at 1–1.5 mg/cm<sup>2</sup> (3 reps). Surviving adult parasitism recorded as in (a). Assessment as in (a); if % reduction 80–99%, go to stage (c)  
(c) Persistence against adults: technique as above but insects exposed to treated vine leaves, with parasitism assay commencing at 3, 10, 17, 24 and 31 days after treatment (Hassan in Hassan, 1992)

## Neuroptera

### Chrysopidae

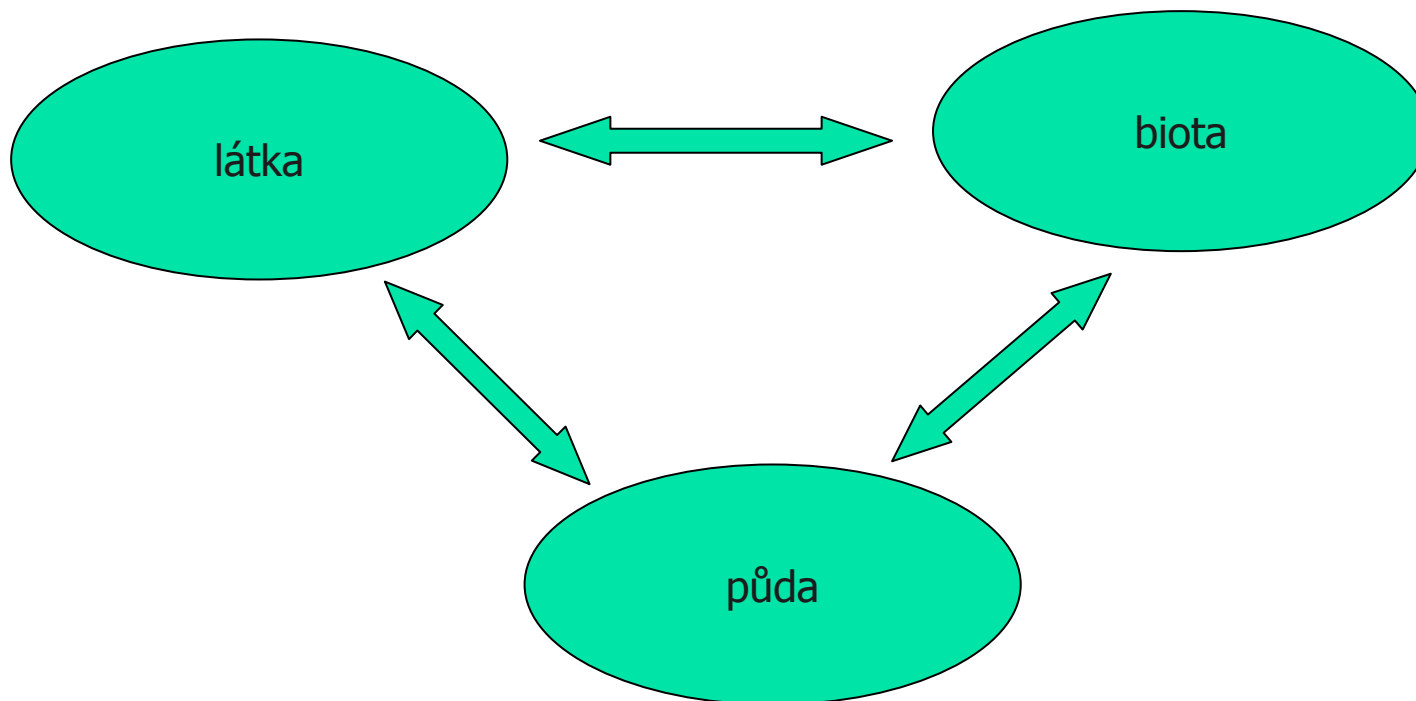
*Chrysoperla  
carnea*

48–36-h-old larvae exposed singly (30 reps) to treated glass surface (2 mg/cm<sup>2</sup>) until pupation. Mortality recorded daily; pupal mortality assessed after last adult has emerged; egg laying by survivors monitored in untreated cage 7–10 days after emergence for 4 weeks (including record of egg viability. OvZ formula used within IOBC classification  
(Overmeer in Hassan, 1988)



# Půdní ekotoxikologie vs biotesty

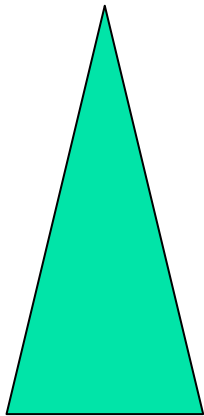
- Není soubor půdních ekotoxikologických biotestů
- Pomáhá POROZUMĚT složitým vztahům mezi chemickými látkami, půdou a půdními organismy



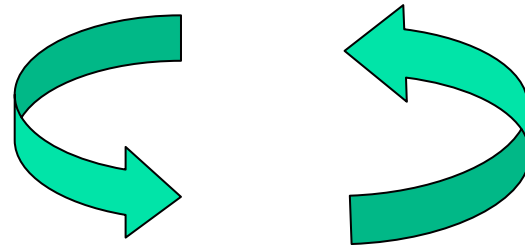


# Půdní ekotoxikologie vs biotesty

- Chceme určit, jaká koncentrace chemické látky v půdě je bezpečná



Funkční biotesty pro proveditelné hodnocení rizik



Porozumění komplexní problematice

- Chceme určit, jaké efekty a proč mají chemické látky a jejich směsi v půdách určitých vlastností v určitých podmínkách a jaké to bude mít důsledky a proč.