



ENCHYTRAEIDAE - ROUPICE

ČSN ISO 16387

Úvod



- Vychází z postupů zkoušek doporučených ISO a OECD
- kontaktní test
- Vhodné pro testování vlivu chem. látek přidaných k umělým půdám i přírodní půdy neznámé kvality
- Vhodné pro rozpustné látky (ve vodě či org. rozpouštědlech) i nerozpustné látky
- Nevhodné pro těkavé ($H > 1$) a nestabilní látky

Biologický materiál

- Doporučený druh je *Enchytraeus albidus* – Roupice bělavá (15 – 40mm) z řádu *Oligochaeta*, kmene *Annelida*
- Je možno využít i jiné roupice (kratší doba testu, méně potravy, horší manipulace)
- Používají se dospělci s viditelným opaskem
- Synchronizace není nutná
- Nutná je aklimatizace v artificiální půdě
- Potrava: autoklávované drcené ovesné vločky

Podstata zkoušky

- Dospělí jedinci jsou vystaveni rozsahu koncentrací zkoušené látky, kterou přijímají pokožkou a zažívacím traktem ovlivnění reprodukce, smrt
- Zkouška se dá rozdělit na:
 - 1) Krátkodobá – orientační
 - U látky s neznámou toxicitou
 - Pro správný návrh určovací zkoušky
 - 2) Určovací zkouška
 - Vlastní zkouška, 6 týdnů (u *Enchytraeus albidus*)
 - pro zjištění mortality, reprodukce, NOEC a Ecx

1) Krátkodobá orientační zkouška

- 14 dní
- pro zjištění koncentrací způsobující 100% a 0% mortalitu
- V artificiální půdě přesného složení
- Nádoby po 20g sušiny
- Připraví se koncentrační řada:
 - ▣ 0,1; 1; 10; 100; 1000 mg/kg sušiny
- Pro každou koncentraci se doporučuje jedna zkušební a jedna kontrolní nádoba
- Do každé nádoby přijde 10 dospělých jedinců

1) Krátkodobá orientační zkouška



- Po 2 týdnech se stanoví mortalita, zhruba určí LC50
- Předpoklad: NOEC a EC10 je asi 10x nižší
- Pokud není pozorován vliv ani při 1000mg/kg, navrhne určovací zkoušku jako srovnání 8 kontrol a 8 zkušebních nádob s koncentrací 1000mg/kg

2) Určovací zkouška

- Doporučuje se jedno z následujících provedení:
 - Stanovujeme NOEC:
 - Min 5 koncentrací v geometrické řadě
 - 4 opakování pro každou koncentraci
 - 8 opakování pro kontrolu
 - Stanovujeme ECx:
 - 12 koncentrací v řadě
 - 2 opakování pro každou koncentraci
 - 6 opakování pro kontrolu
 - Stanovujeme NOEC i ECx:
 - 6-8 koncentrací v řadě
 - 4 opakování pro každou koncentraci
 - 8 opakování pro kontrolu

2) Určovací zkouška



- 6 týdnů
- Nádoby po 10 dospělých
- Roupice jsou krmeny každý týden (poprvé 50mg, pak 25mg ovesných vloček)
- Po 21 dnech se pomocí háčku nebo kličky odeberou a spočítají dospělé roupice, zjistí se mortalita
- Po dalších 21 dnech se již např. pomocí barvení spočítají jedinci z druhé generace a určí se ovlivnění reprodukce

Zkušební substrát

- 10% rašeliny, 20% kaolinitového jílu, 69% křemenného písku, do 1% CaCO_3 pro $\text{pH} \pm 6$
- Půda se důkladně promísí a 2 dny nechá odstát pro vyrovnání kyselosti
- Stanoví se max WHC a pH
- Půda se ovlhčí na 40-60% WHC souběžně s aplikací testované látky
- Při správném ovlhčení by se stlačením půdy mezi prsty měly objevit malé kapičky vody

Barvení bengálskou červení

- Pro snadné počítání nedospělých jedinců
- Do každé nádoby se přidá:
 - 5ml ethanolu
 - Voda do výšky 1-2cm
 - Pár kapek bengálské červeně
- Po 12 hodinách jsou roupice zcela obarveny
- Dále je možné využít extrakci vodou (prosít roupice přes síto)
- Flotace: vynesení roupic na hladinu pomocí ludoxu

Na co dát pozor?

- Plíseň:
 - Krmení je potřeba přizpůsobit příjmu
 - Přes vločky je dobré přehrnout vrstvičku půdy
- pH:
 - Změna pH v průběhu testu může významně ovlivnit výsledky
- Vlhkost:
 - Je třeba zabránit odpařování vody nebo ji doblňovat pomocí hmotnostních úbytků
- Jemná manipulace s roupicemi

Validita testu

- Musí být známy ekologické požadavky použitého druhu (musí být v souladu s testovanou látkou)
- Kontrolní půda musí být pedologicky srovnatelná se vzorkem (neznečištěná přírodní, dobře charakterizovaná přírodní, umělá standardní)
- U *E. albidus* mortalita v kontrole max 10% a 25 juvenilů po 3 týdnech
- U *E. crypticus* mortalita v kontrole max 10% a 50 juvenilů po 3 týdnech