



Ekotoxikologické biotesty

Půdní biotesty

RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

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





Proč ekotoxikologické testy ?

CHEMICKÉ ANALÝZY samotné NEDOKÁŽOU postihnout reálné riziko pro živé organismy:

- 1) reálná expozice se liší podle **biodostupnosti** toxických prvků a látek v dané situaci,
- 2) jde vždy o **směs toxikantů**, která působí jinak než jednotlivé toxikanty zvlášť
- 3) Negativní **vlivy matrice** samotné bez ohledu na obsah toxikantů na živé organismy či interakce vlivu matrice s efekty toxikantů
- 4) spektrum analytických metod (tedy i limitních hodnot) je omezené a ve vzorku mohou být přítomny **neanalyzované** významně toxické látky.



Proč testy kontaktní (půdní) ?

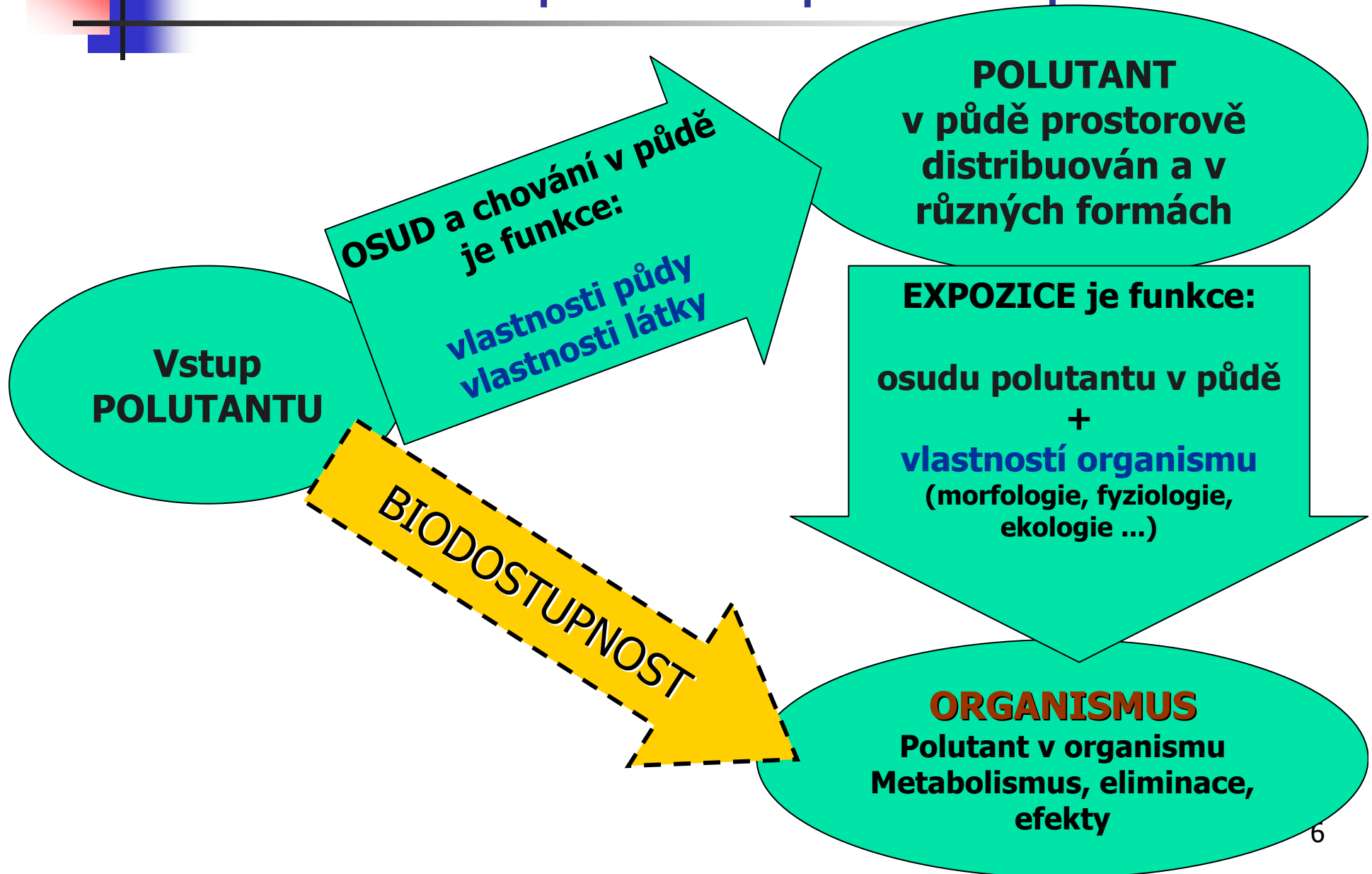
- Účinky na půdní organismy exponované v pevné matici **nelze zcela extrapolovat** z testů akvatických
- Do hry vstupuje významně **osud kontaminantu** v půdním prostředí, vliv na reálnou **biodostupnost** pro půdní organismy
- Nezanedbatelné **vlivy samotné matrice** (např. nevhodné fyz.- chem. vlastnosti, kombinace s toxicitou)



Důsledky expozice v pevné matici

- Pevné matrice jsou dosti **heterogenní**
- Obsahuje vždy všechny tři fáze **PEVNOU**, KAPALNOU (pórová voda) a PLYN (vzduch)
- Přítomnost pevné fáze zejména má významný vliv na **OSUD a CHOVÁNÍ** chemické látky
- V závislosti na vlastnostech látky, vlastnostech půdy a čase dojde k **DISTRIBUCI** látky v půdě, případně vzniku **SPECIÍ**
- Stěžejním procesem je **SORPCE** a důsledkem je klíčový faktor půdních testů (eko)toxicity – **BIODOSTUPNOST**
- To vše má fatální důsledky pro **výslednou toxicitu a riziko**
- Důsledkem je i **ztížená extrapolace** mezi půdami, z akvatických testů na půdní a z laboratorních testů na reálnou situaci

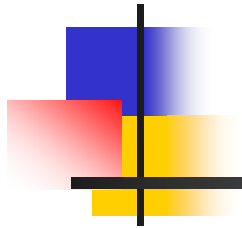
Schéma expozice v půdním prostředí



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





Využití půdních biotestů v ochraně půd



Využití půdních biotestů při ochraně půd

- Zakotvení v legislativě = **PROČ** mají půdní biotesty své místo na slunci
- Do teď zejména **při hodnocení nebezpečnosti chemických látek a pesticidních přípravků**
- Silný nárůst zájmu o využití biotestů **při hodnocení komplexních směsí** jako jsou odpady, kal ČOV, sedimenty, komposty, hnojiva apod.
- Velký potenciál biotestů **při hodnocení kvality půd** např. před a po remediaci, při inventuře kontaminovaných ploch apod.



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** bylo dosud opomíjeno, ač má pro pevné odpady nesrovnatelně vyšší vypovídací schopnost, zejména v případě kalů, sedimentů, stavebních odpadů apod.
- Hnojiva – pouze obecně definováno, že nesmí mít negativní vliv
- Vyhláška č. 257/2009 Sb., O používání sedimentů na zemědělské půdě: **chvostoskok, roupice, rostlina a mikroorganismy**



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 směrnice 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 6¹ - podle čeho a jak se hodnotí na základě EC² a SETAC³ 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, chvostokoci a rostliny



EU ringtest 2006-2007

Cíle:

- zhodnotit standard EN 14735
- vyhodnotit aplikovatelnost baterie testů

Umwelt
Bundes
Amt
Für Mensch und Umwelt



13 zemí
59 laboratoří
5 základních testů
9 přídatných testů
půl tuny odpadů (3 vzorky)

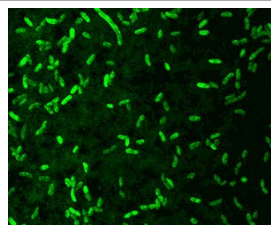


Výstupy:

- Kniha, report a zejména příprava nového EN standardu: WI 292050: Characterisation of waste – Guidance on the use of ecotoxicity tests applied to waste

EU - Základní sada testů

Testy pevného odpadu					
Organismus	Typ testu	Endpointy	Doba trvání	Výsledek	Norma
žížala <i>Eisenia fetida</i>	akutní	mortalita	14 dní	LC50	ISO 11268-1 [15]
rostlina <i>Avena sativa, Brassica rapa</i>	akutní	vyklíčení inhibice růstu	cca 14 dní	EC50	ISO 11269-2 [16]
Testy vodného výluhu odpadu					
Organismus	Typ testu	Endpointy	Doba trvání	Výsledek	Norma
bakterie <i>Vibrio fisheri</i>	akutní	inhibice luminiscence	30 min	EC50	ISO 11348 [17]
korýš <i>Daphnia magna</i>	akutní/chronický	inhibice mobility	48 hod	EC50	ISO 6341 [18]
řasa <i>Desmodesmus subcapitatus</i> <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	chronický	růst	EC20	3 dny	ISO 8692 [19]



EU - Rozšířená sada testů

Testy pevného odpadu					
Organismus	Typ testu	Endpointy	Doba trvání	Výsledek	Norma
žížala <i>Eisenia fetida</i>	chronický	reprodukce biomasa	56 dní	EC50	ISO 11268-2 [20]
žížala <i>Eisenia fetida</i>	chronický	únikové chování	2 dny		ISO/DIS 17512-1 [21]
roupice <i>Enchytraeus albidus</i> <i>Enchytraeus crypticus</i>	akutní / chronický	mortalita reprodukce	4 týdny 6 týdnů	LC/EC50	ISO 16387 [22]
chvostoskok <i>Folsomia candida</i>	chronický	mortalita reprodukce	28 dní	LC/EC50	ISO 11267 [23]
Testy vodného výluhu odpadu					
Organismus	Typ testu	Endpointy	Doba trvání	Výsledek	Norma
okřehek <i>Lemna minor</i>	chronický	růst	7 dní	EC50	ISO 20079 [24]
umu <i>Salmonella typhimurium</i>		genotoxicita - aktivace genů	4 hod		ISO 13829 [25]
bakterie <i>Pseudomans putida</i>	chronický	růst	16 hod		ISO 10712 [26]



Příprava nové legislativy v ČR

VÚV T.G.M., v.v.i. - CeHO
Centrum pro hospodaření s odpady

■ Aktivity CeHO

MZP0002071102 - Výzkum pro hospodaření s odpady v rámci ochrany životního prostředí a udržitelného rozvoje

■ Porovnání 18 testů na 18 odpadech

■ Vybraná sada testů:

- Test toxicity na perloočkách: ČSN EN ISO 6341
- Test toxicity na řasách: ČSN EN ISO 8692
- Test zhášení bioluminiscence bakterií: ČSN EN ISO 11348-1-3
- Test reprodukční toxicity na chvostoskocích: ISO 11267
- Test reprodukční toxicity na roupicích: ISO 16387
- Test inhibice růstu kořenů suchozemských rostlin: ISO 11269-1



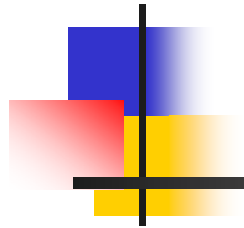
ISO 16387 (2004)



ISO 11267 (1999)

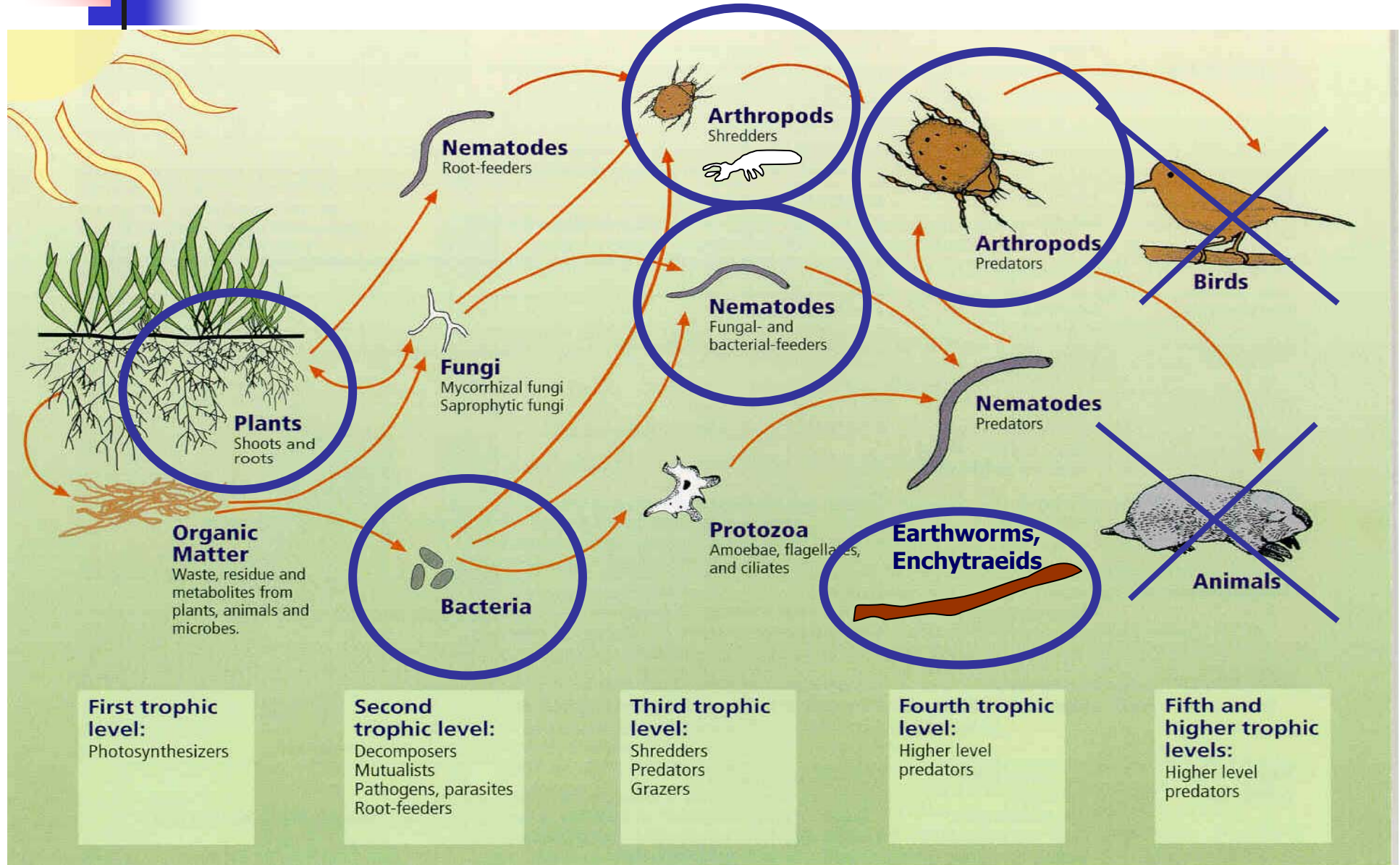


ISO 11269-1 (1993)



Dostupné standardní postupy půdních biotestů

Půdní potravní síť vs dostupné biotesty



Standardy půdních biotestů - OECD

Accepted standards

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)

Drafts

Predatory Mite Reproduction Test in Soil (*Hypoaspis (Geolaelaps) Aculeifer*) 2009

Determination of Developmental Toxicity of a Test Chemical to Dipteran Dung Flies (*Scathophaga stercoraria* L. (*Scathophagidae*), *Musca autumnalis* De Geer (*Muscidae*)) 2009

Collembola reproduction test with *Folsomia candida* and *F. fimetaria* 2009

Bioaccumulation test with *Eisenia fetida* 2009



Standardy půdních biotestů - ISO

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
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 11268-3	1999	Effects of pollutants on earthworms - Part 3: Guidance on the determination of effects in field situations
ISO 11267	1999	Inhibition of reproduction of <i>Collembola (Folsomia candida)</i> by soil pollutants
ISO 16387	2004	Effects of pollutants on <i>Enchytraeidae (Enchytraeus sp.)</i> - 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 23611 (1-6)	2006 - 2010	Sampling of soil invertebrates - Part 1 - 6 (earthworms, microarthropods, enchytraeids, nematodes, macrofauna, design of field studies)
ISO 17512-1	2008	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/DIS 17512-2		Soil quality -- Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour -- Part 2: Test with collembolans (<i>Folsomia candida</i>)
ISO/FDIS 10872		Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of <i>Caenorhabditis elegans (Nematoda)</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/AWI 29200		Soil quality -- Assessment of genotoxic effects on higher plants -- Micronucleus test on <i>Vicia</i>

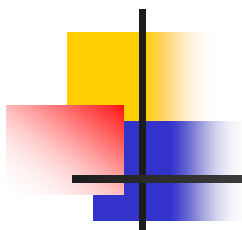
Standardy půdních biotestů - ISO

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)
ISO 23753-2	2005	Determination of dehydrogenase activity in soils - Part 2: Method using iodotetrazolium chloride (INT)
ISO/TS 22939	2010	Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using fluorogenic substrates in micro-well plates
ISO/CD 11063		Method to directly extract DNA from soil samples
ISO/TS 10832	2009	Effects of pollutants on mycorrhizal fungi -- Spore germination test
ISO/DTS 29843-1		Determination of soil microbial diversity - Part 1: Method by phospholipid fatty acid analysis (PLFA) and phospholipid ether lipids (PLEL) analysis
ISO/DTS 29843-2		Determination of soil microbial diversity - Part 2: Method by phospholipid fatty acid analysis (PLFA) using the "simple PLFA extraction method"



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



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)
- BART = Beneficial Arthropod Regulatory Testing



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)

Příklad: sada testů z Vyhlášky 257/2009 Sb.

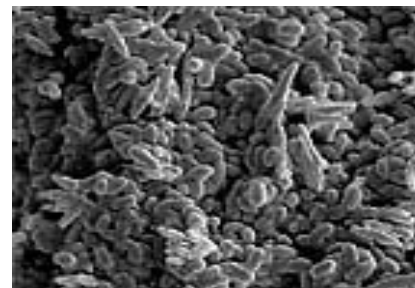
- Před testy s rouspicemi a vyššími rostlinami jsou reprezentativní vzorek sedimentu i reprezentativní vzorek referenční půdy (půda, na kterou má být sediment použit) vysušeny při laboratorní teplotě, zhomogenizovány a přesáty přes síto 2 či 4 mm.
- Pro testy inhibice nitrifikace je referenční půdou nekontaminovaná půda splňující požadavky ISO 15685 (2004) a jak sediment tak referenční půda jsou vzorkovány, zpracovány a skladovány v souladu s ISO 10381-6 (2009): v přirozené vlhkosti, přes 2 mm síto, uchování v 4 °C maximálně dva týdny.
- Před testováním se hodnocený sediment smíchá s půdou v objemovém poměru 1:3, který vychází z maximálního povoleného poměru výšky použitého sedimentu a orničního profilu v vyhlášce.



ISO 16387 (2004)



11269-1 (1993)



ISO 15685 (2004)



ISO 11267 (1999) 29



Ekologická relevance testů

- testované druhy by měly reprezentovat relevantní funkční skupinu
- test má respektovat ekologii organismu
- 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



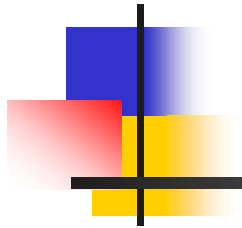
Eisenia fetida – **žije v kompostu !!**



Lumbricus terrestris

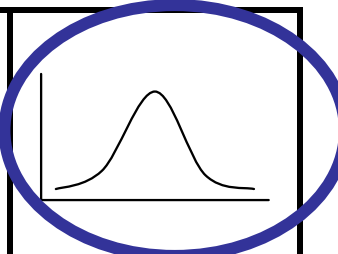
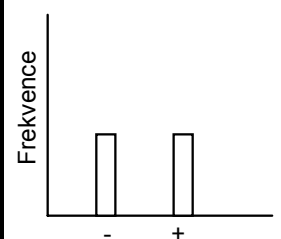
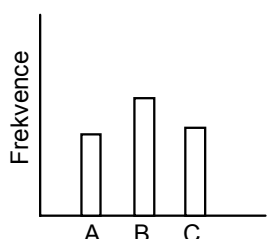
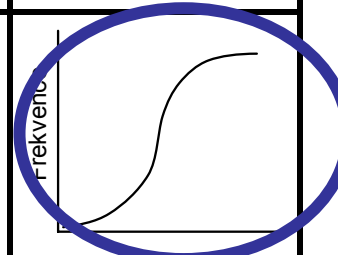
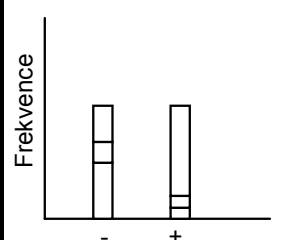
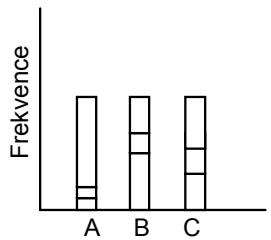
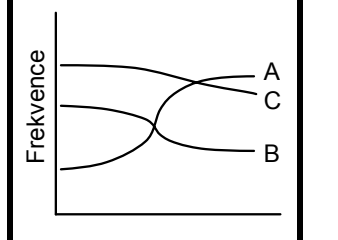
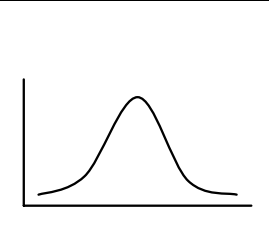
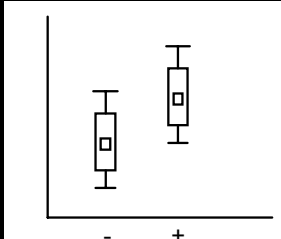
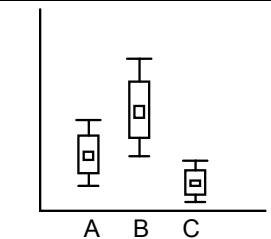
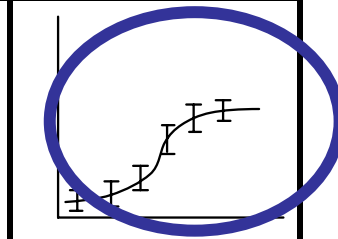


Aporectodea caliginosa

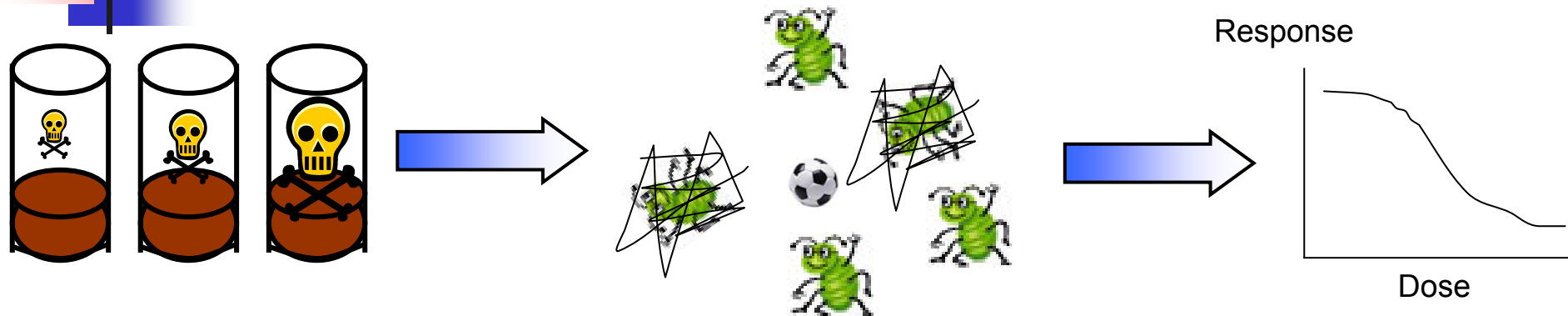


Základní koncepce půdních biotestů

Koncepce půdních biotestů

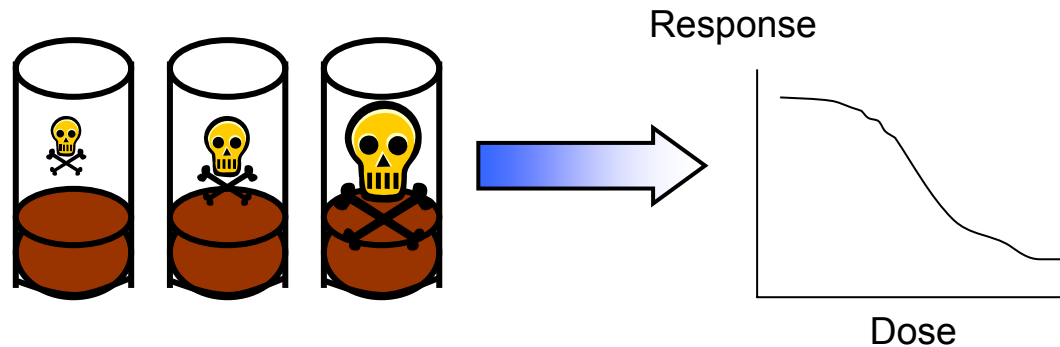
<p>Stresor</p> <p>Odpořď</p>	<p>+/-</p>	<p>A B C</p>	
<p>+/-</p>	<p>Frekvence</p> 	<p>Frekvence</p> 	
<p>A B C</p>	<p>Frekvence</p> 	<p>Frekvence</p> 	<p>Frekvence</p> 
			

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_{suché} 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

Proč testy kontaktní ?



výluh 1:10



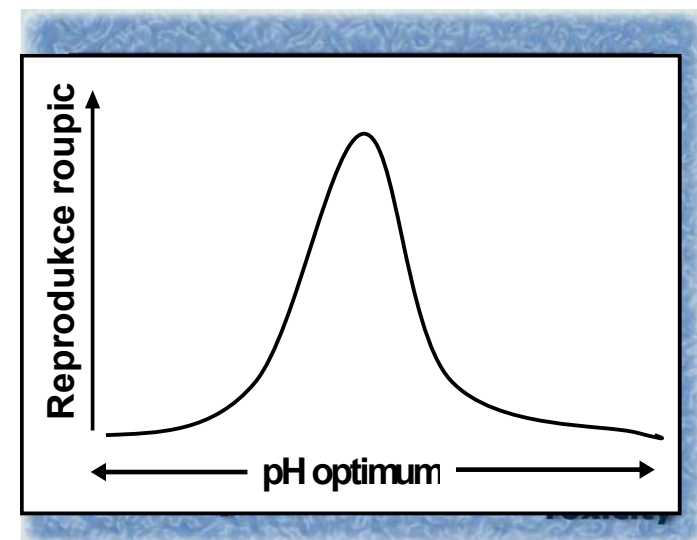
smíchání v
různých
poměrech



testy výluhů nelze simulovat toxicitu pevných vzorků

PROČ ?

- reálná **BIODOSTUPNOST**
- integrován **EFEKT MATRICE**



Testování toxicity tuhé matrice





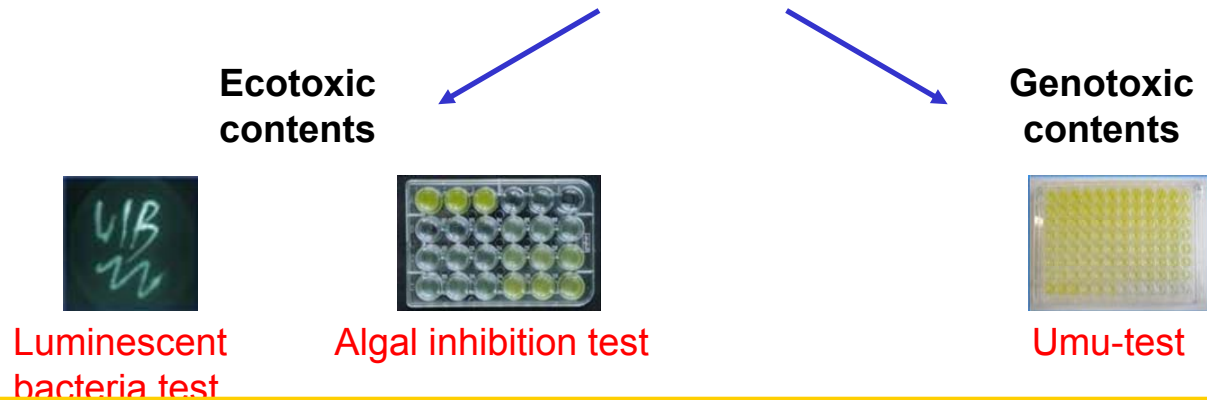
Biotesty jako nástroj hodnocení kvality tuhé matrice

Existují ISO normy určující výběr testů

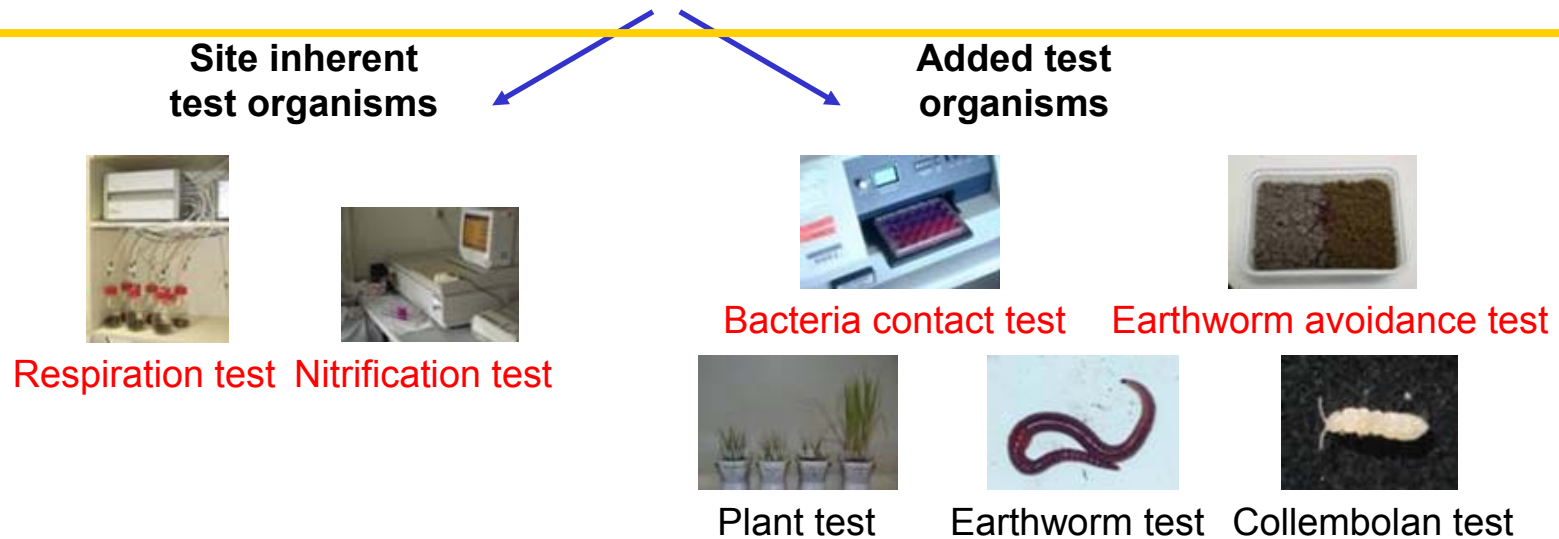
- ISO 15799 (2003): Guidance on the ecotoxicological characterization of soils and soil materials
- ISO 17616 (2008): Guidance on the choice and evaluation of bioassays for ecotoxicological characterization of soils and soil materials

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)**

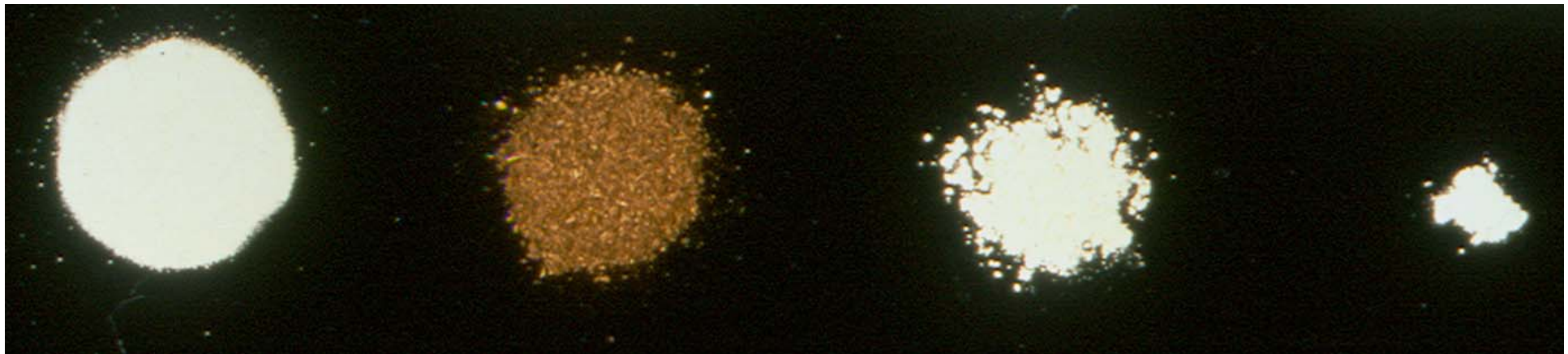


Dýcháním

- nejsou téměř žádná data

Artifciální půda

- 10% Suchá a jemně namletá rašelina
- 20% Kaolinitový jíl obsahující minimálně 30% kolinitu
- 70% Křemenný písek jemný obsahující minimálně 50% zrn o velikosti 0,05 – 0,2 mm
- 0,3 – 1% Uhličitanu 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/)

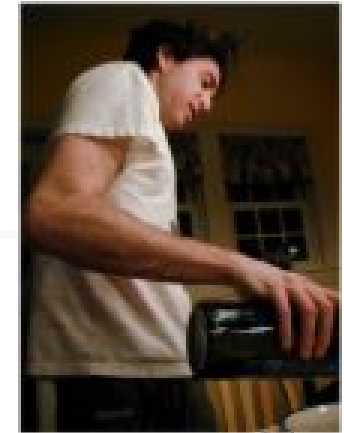
- Landwirtschaftliche Untersuchungs und Forschungsanstalt Speyer
- přírodní půdy je potřeba před testy ošetřit: defaunace, úprava vlastností
- Cena: 4 EUR za 1 kg + doprava

	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 ₂)	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
Particle size (mm) distribution according to German DIN (in %):					
<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)
Particle size (mm) distribution according to USDA (in %)					
<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

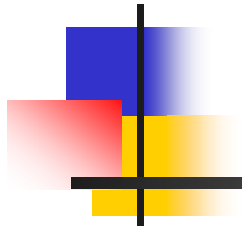
nerozpustné ve vodě ani ve vhodném rozpouštědle

- lze smíchat přímo s křemenným pískem (2,5g písku na 20g půdy) 48



Testovací design obecně

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



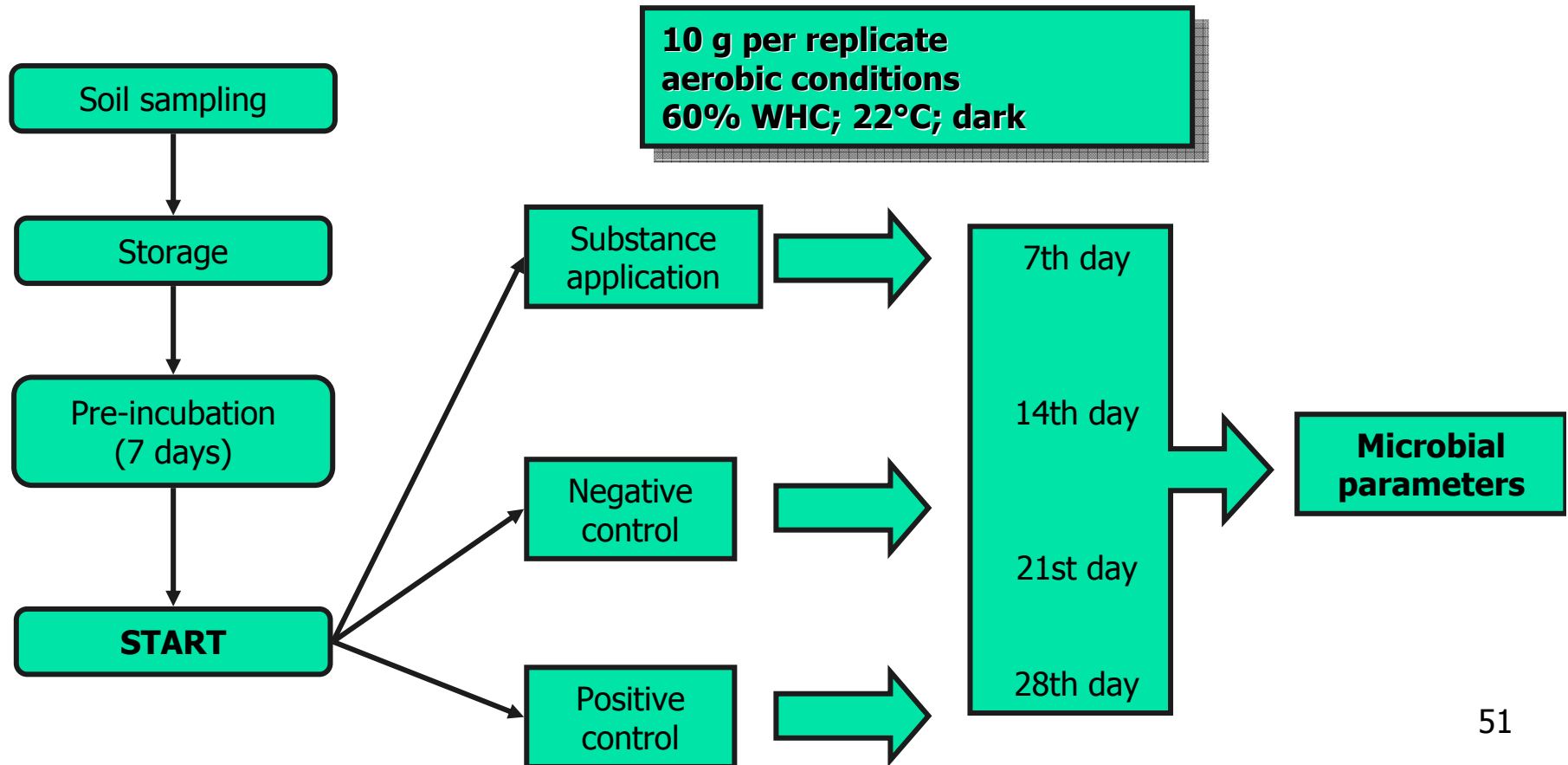
Půdní biotesty s mikroorganismy

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

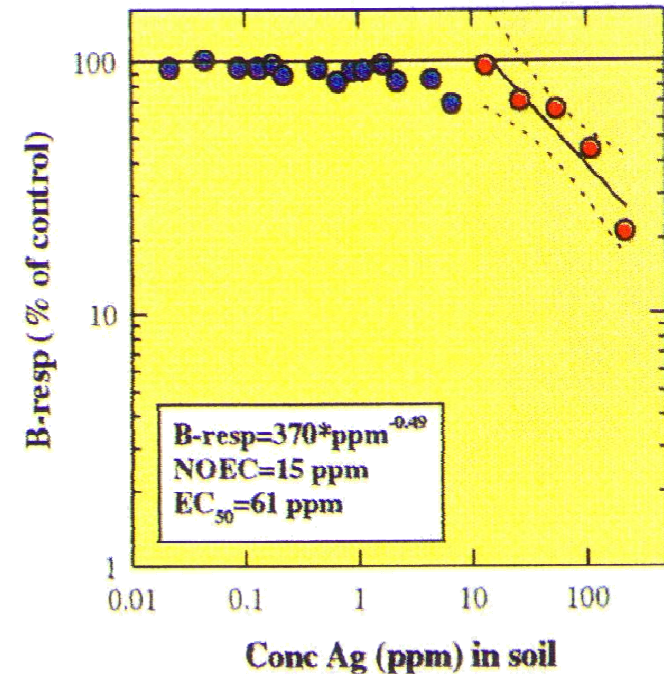
- přirozená půda, která je vybrána tak, aby byla citlivá vůči kontaminaci a splňovala tzv. "nejhorší scénář", tj. maximální expozici mikroorganismů polutantu v této půdě:
 - více než 70% písku
 - pH 5,5 - 7,0
 - Corg 0,5 - 1,5%
 - Cbio/Corg více než 1% (dostatečné oživení)
 - kationtová výměnná kapacita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

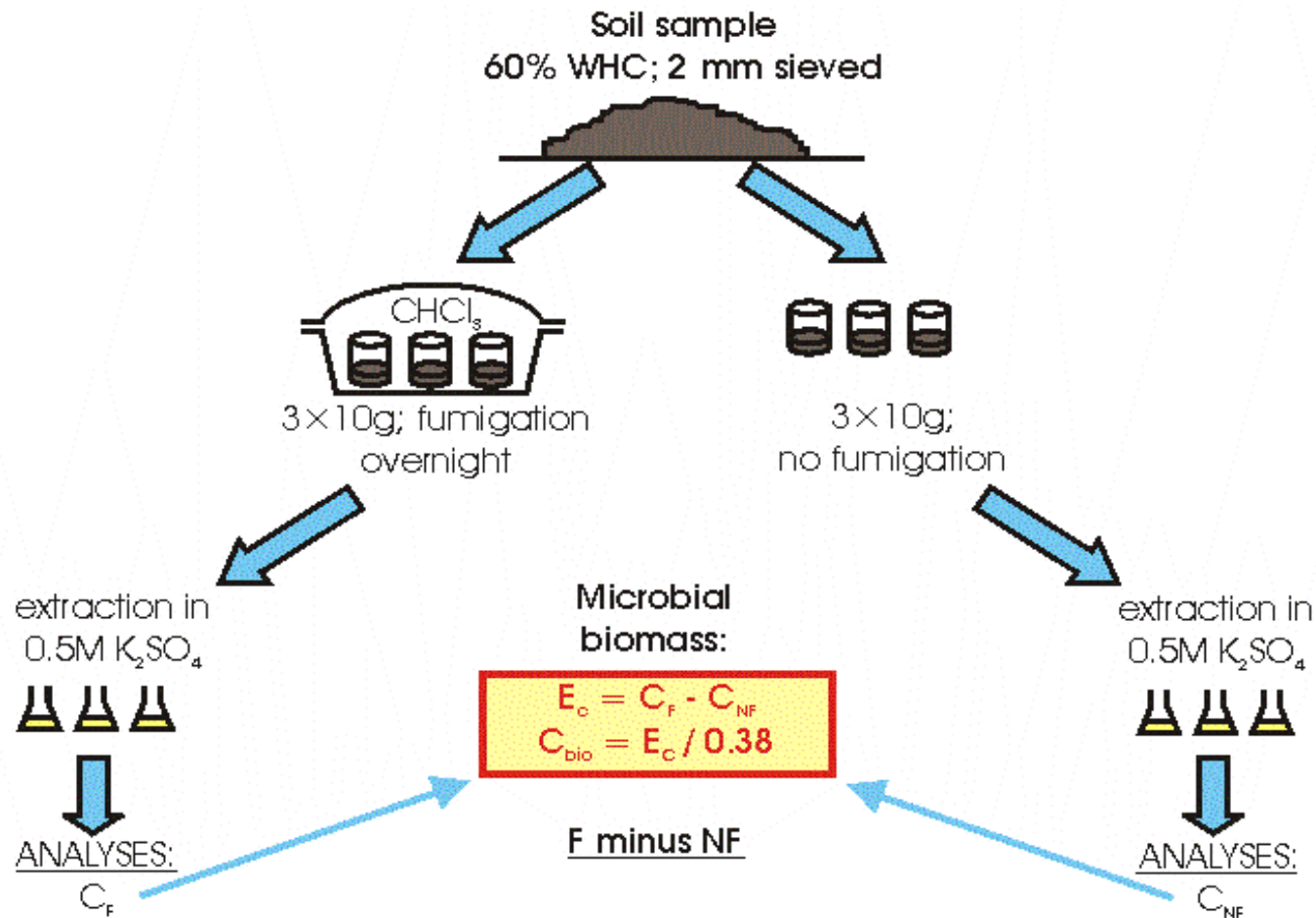
Endpointy v mikrobiálním testu

- Standardně pouze mineralizace dusíku a uhlíku jako produkci CO_2 a sumy minerálních forem dusíku (NH_4^+ , NO_2^- , 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 ...

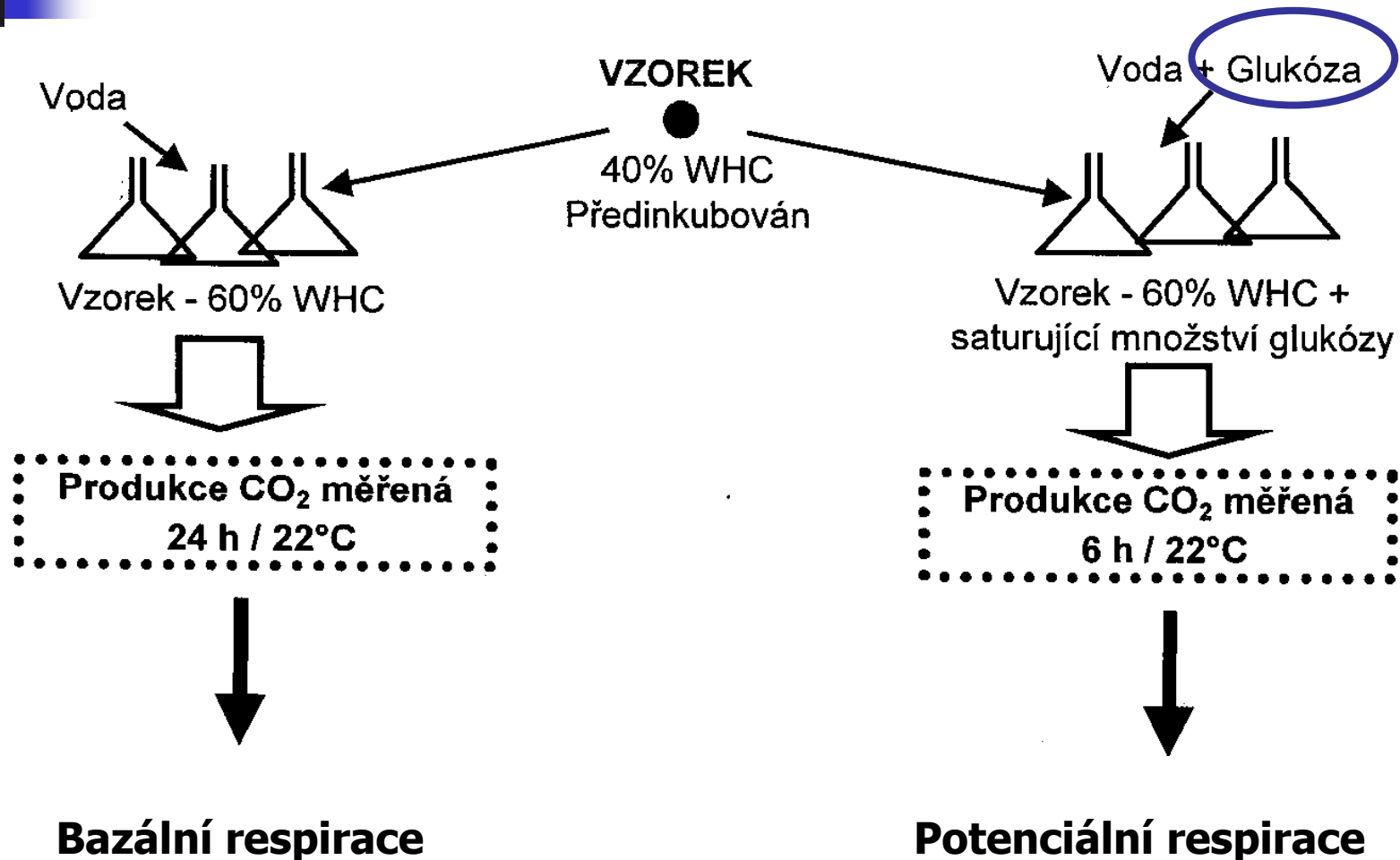


Stanovení mikrobiální biomasy

Fumigačně-extrakční metoda

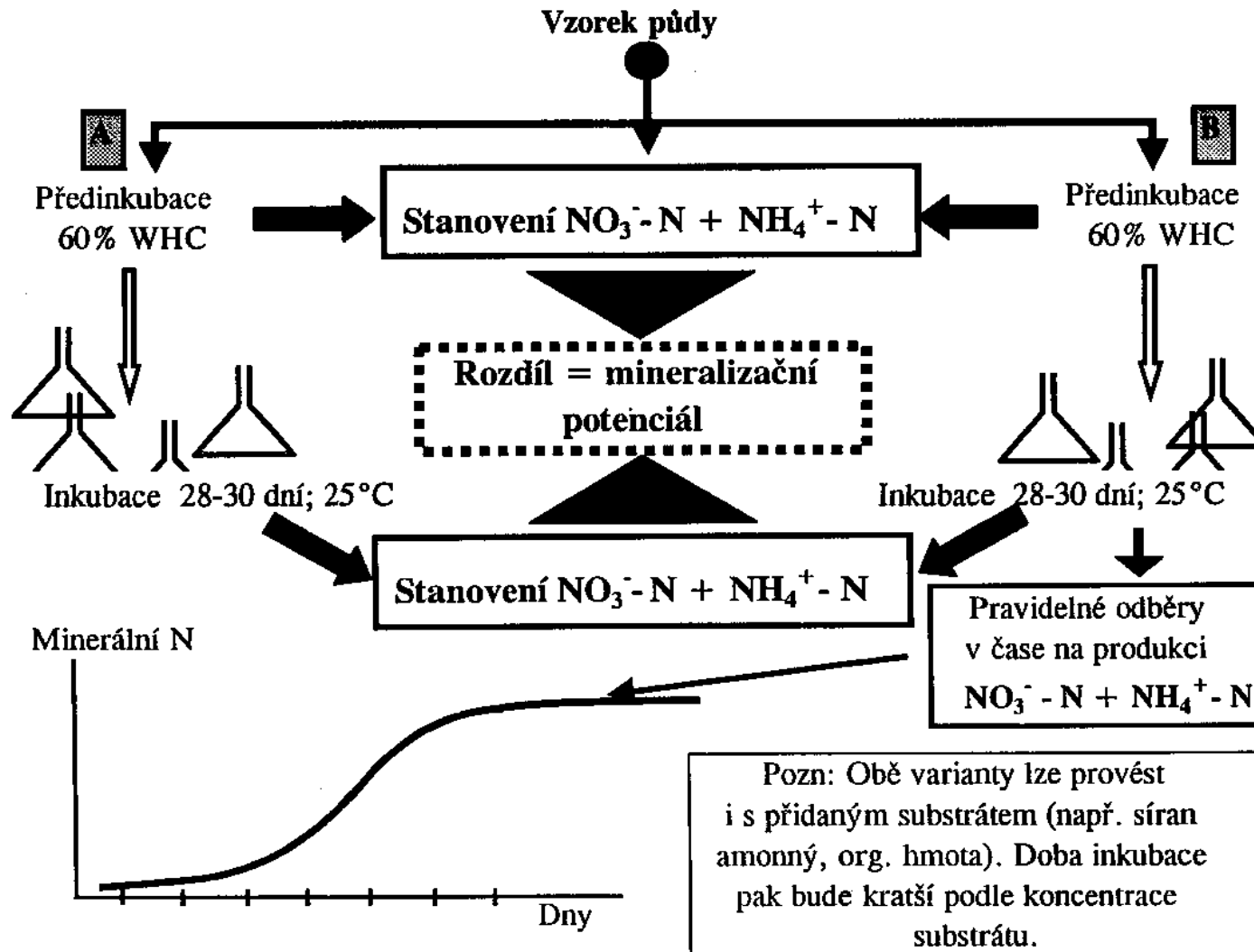


Bazální a potenciální respirace



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

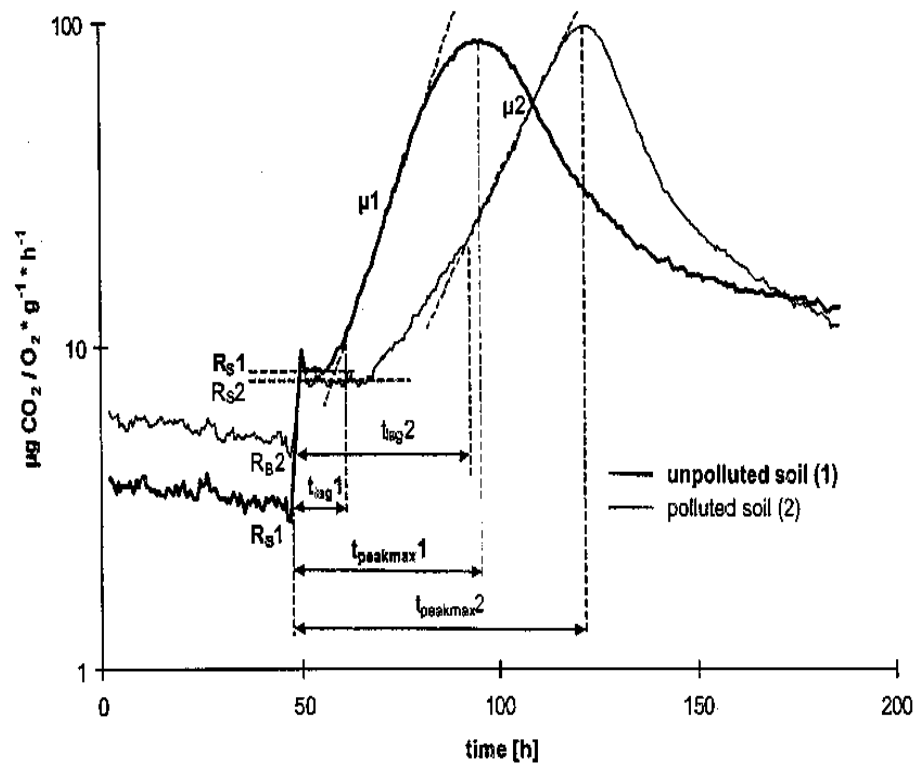
Hodnocení mineralizace dusíku



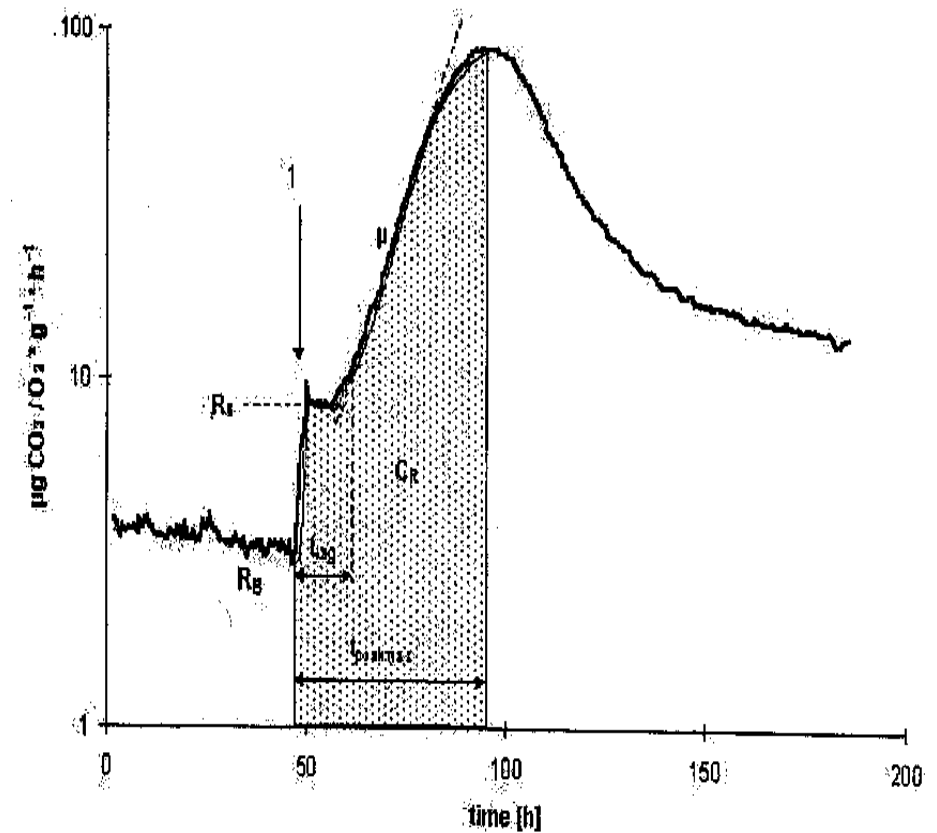
ISO 14238	1997	Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes
-----------	------	---

Krátké testy toxicity s půdními mikroorganismy – SIR kinetika

A) Testování kontaminovaných půd



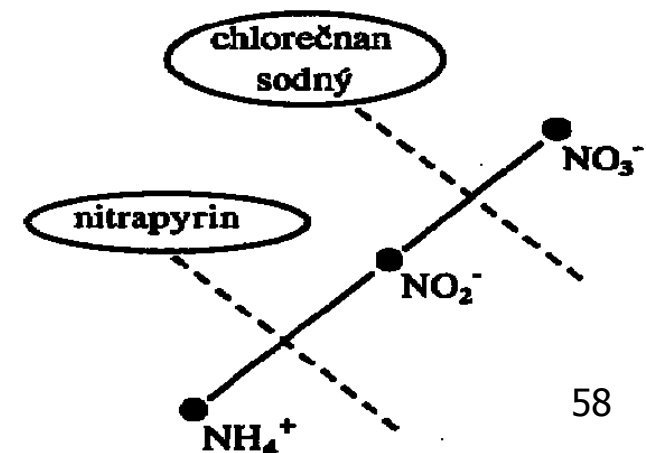
B) Testování chemikálií

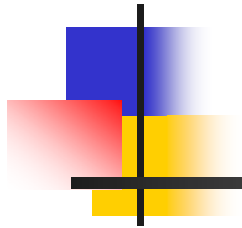


Krátké testy toxicity s půdními mikroorganismy – Oxidace amoniaku

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 6 hod stanovení NO_2^-





Půdní biotesty s bezobratlými



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**)



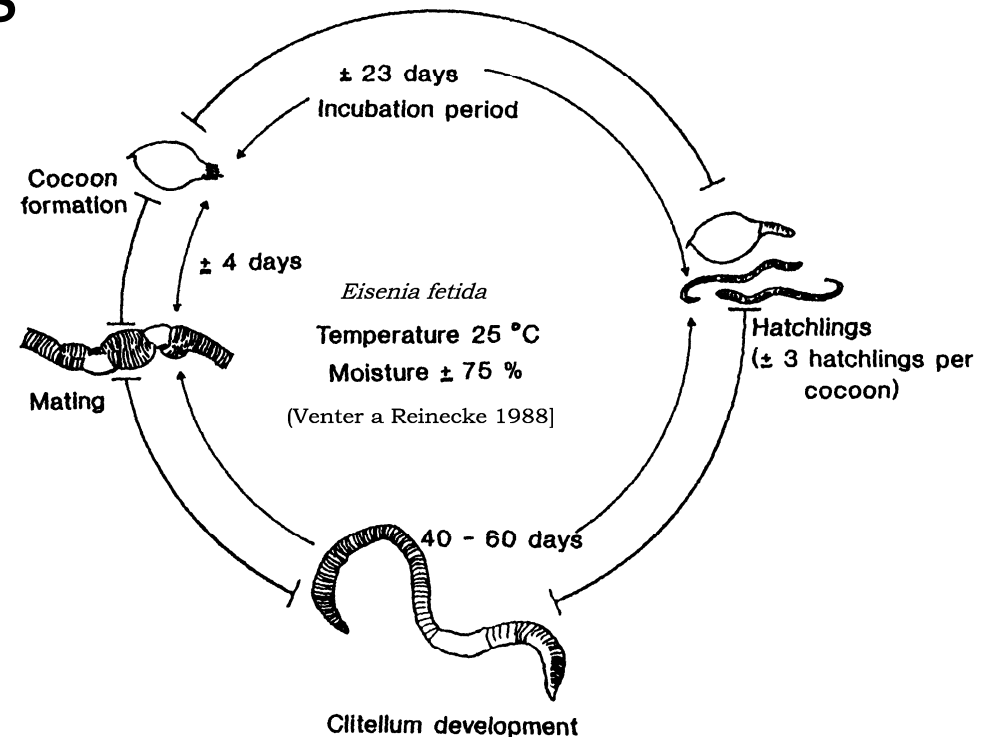
V různých testech různé endpointy

- **Mortalita**
- **Reprodukce**
- **Změny váhy**
- **Behaviorální změny**
- Malformace
- Fyziologické změny
- Snížení imunity
- Aktivity enzymů
- Biochemické markery
- Genotoxicita
-

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)



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 200cm², 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
- 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

Eisenia fetida reprodukční test - začátek



Příprava půd



Měření WHC půd



Ovlhčená AS
rozvážená do
testovacích nádob



Přídavek 10 adultů do
nádobý na test



Zvážení jedinců

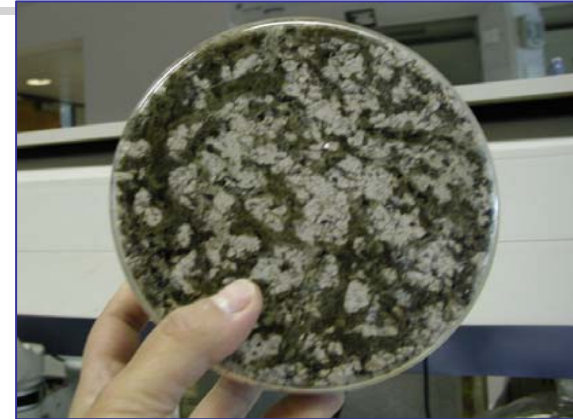


Výběr 10
reprezentativních
adultů z chovu a
jejich omytí dH₂O

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



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



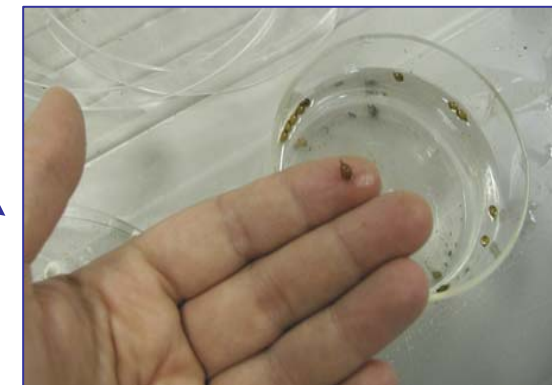
Sbírání a
počítání



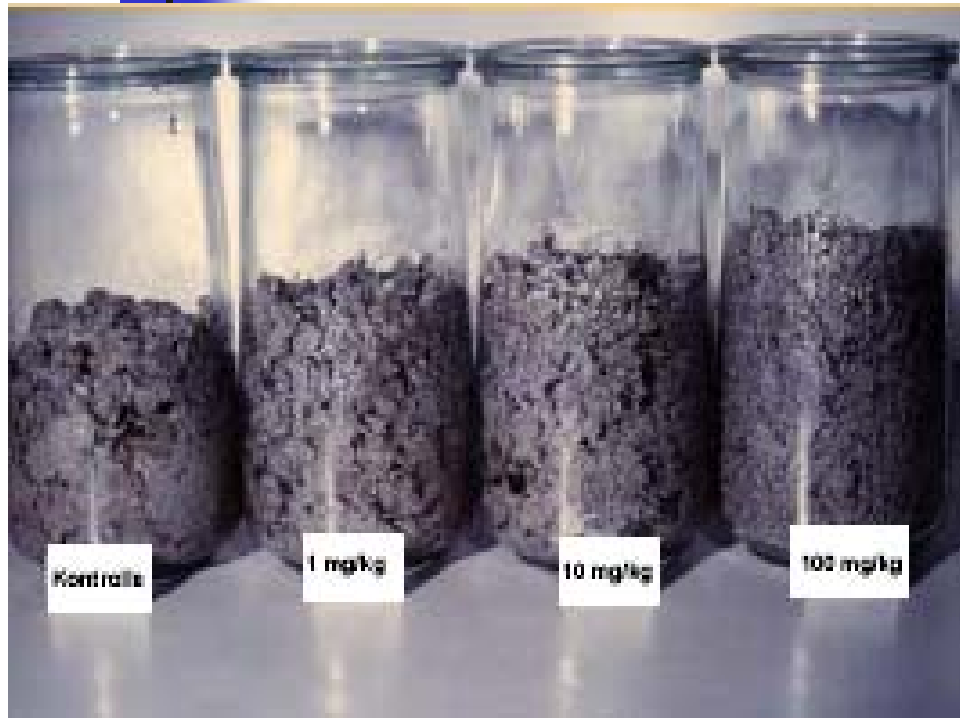
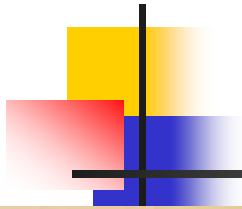
Přesátí půdy



Ruční třídění kokonů



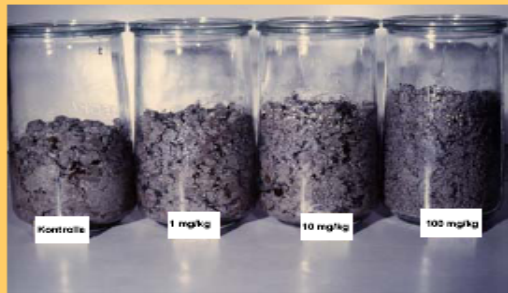
Počítání



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

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





Testy s roupicemi

- **Relevance:**

- Modelový organismus půdních destruentů
- Roupice zastávají podobné funkce jako žížaly a v některých systémech je nahrazují
- Realistická expozice – obývají horní vrstvičku půdy

- **Praktické výhody** testů při srovnání s prostorovými, časovými a finančními náklady testů na žížalách:

- 4-6 týdnů oproti 8 týdnům
- 20g půdy oproti 1/2 kg
- Malé ale dobře manipulovatelné
- Malý a snadný chov (není potřeba hnůj)



Enchytraeus albidus vs crypticus

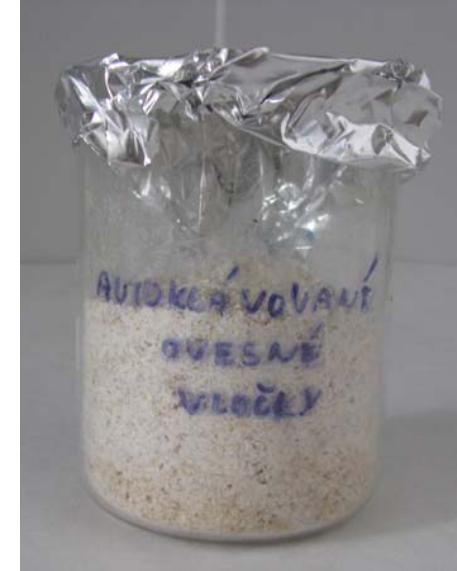
- *E. albidus*: 15 – 40 mm
- *E. crypticus* je mnohem menší (5 - 10 mm)
- praktické problémy - potřeba barvení
- ALE dá se bez problémů kultivovat ve velkém na agaru
- vzhledem ke kratší generační době ho získáme velké počty v krátké době (E.a. 33 dnů × E.c. 8 dnů)



Chovy roupic

- V půdě (*E. albidus*, *E. crypticus*) či na agaru (*E. crypticus*)
- Substrát může být uměle vytvořená půda, přírodní půda, či zahradní zemina, či směs např. 1:1
- Substrát musí být defaunizován (opakované zmražení a roztání), nesmí obsahovat polutanty a mít vhodné vlastnosti (zejména **pH**) a přesátý přes 2 mm
- **Krmení** – autoklávované mleté ovesné vločky
- V chovu musí být přístup vzduchu a **optimální vlhkost**
- Indikátory nevhodného substrátu: roupice pohybující se pouze po povrchu, či snažící se **uniknout** z nádoby, nevyskytující se juvenilní jedinci apod.
- **Cyklus (18 °C)**: kokon obsahuje průměrně 5 - 15 vajíček; po 1-3 týdnech se vylíhnou juvenilní jedinci, kteří dospívají cca po 3 až 6 týdnech
- **2 x týdně** kontrola vlhkosti a krmení

Chovy roupic





Test na reprodukci roupic – 1. část

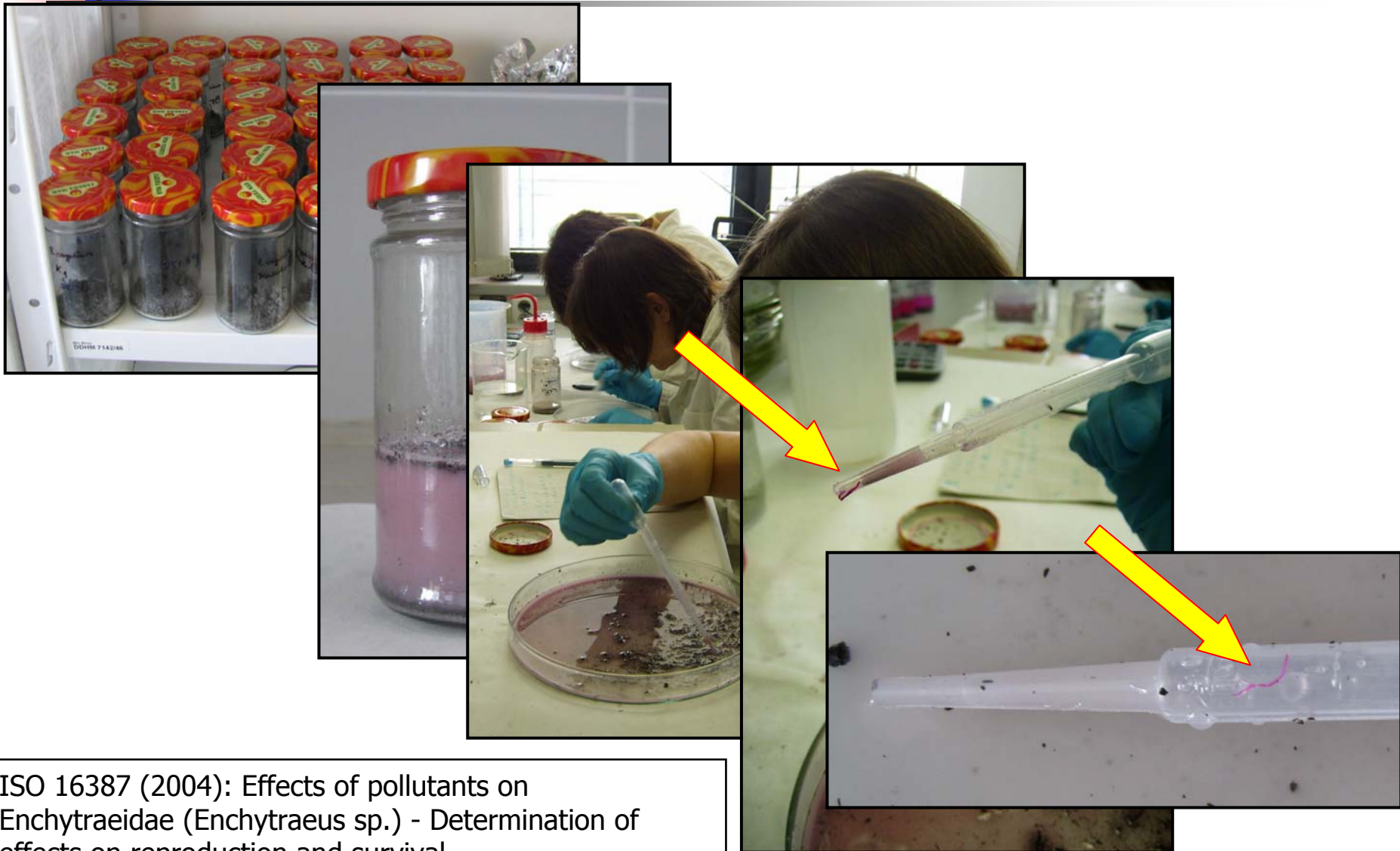
- Je možno provádět se dvěma druhy *E. albidus* a *E. crypticus*
- Inertní nádobky a v každé 20g půdy pro E.a. a 10 g pro E.c.
- **Podmínky testu:** optimální teplota (max 20 °C), vlhkost (40 - 60% WHC), osvětlení (perioda 16:8, 400-800 lux)
- 10 dospělých jedinců (opasek s tečkami vajíček) do každé 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
 - 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 ($1,2 \pm 0,8$ mg/kg by mělo vyvolat EC50)

Postup testu s *E. albidus*



ISO 16387 (2004): Effects of pollutants on
Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) - Determination of
effects on reproduction and survival
OECD test 220 (2004): Enchytraeid Reproduction Test

Timetable

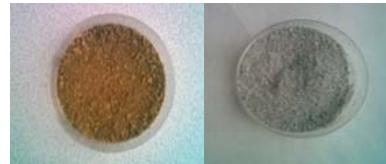


Period	Range-finding test	Definitive test
Day - 7	Preparation of artificial soil (Mixing of dry constituents)	Preparation of artificial soil (Mixing of dry constituents)
Day - 5	Check of pH of prepared AS Measurement WHCmax	Check of pH of prepared AS Measurement WHCmax
Day -3 to -1	Sorting out of worms 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

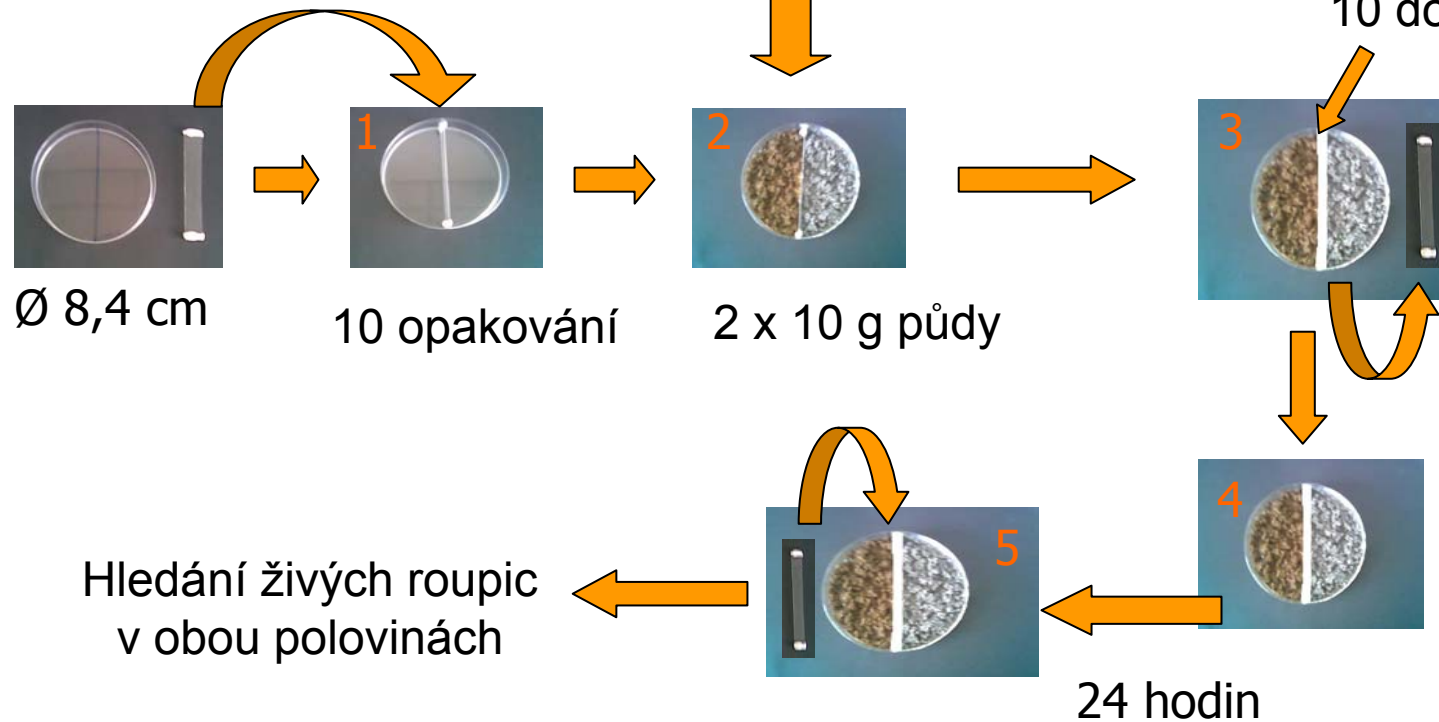
Avoidance test s *E. albidus*

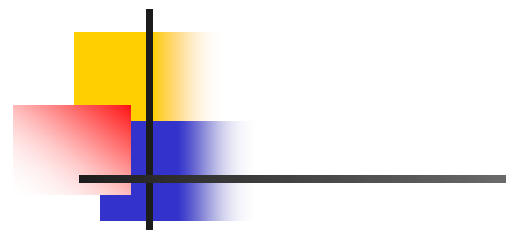
Např. testování odpadů

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	¹⁴ 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 ⁻¹ 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* 82





Postup testu s *F. candida*

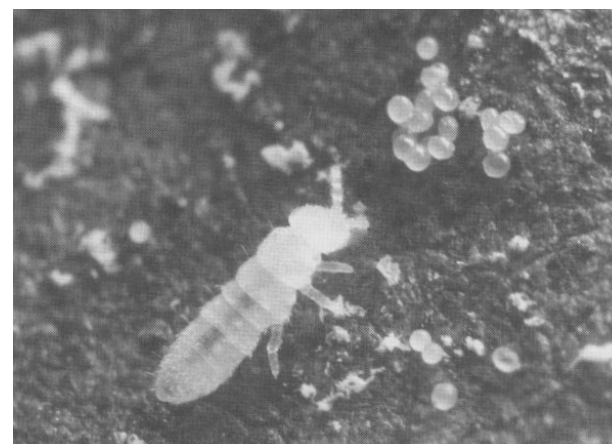
Kultivace

- 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 exkrety
- 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

Folsomia candida





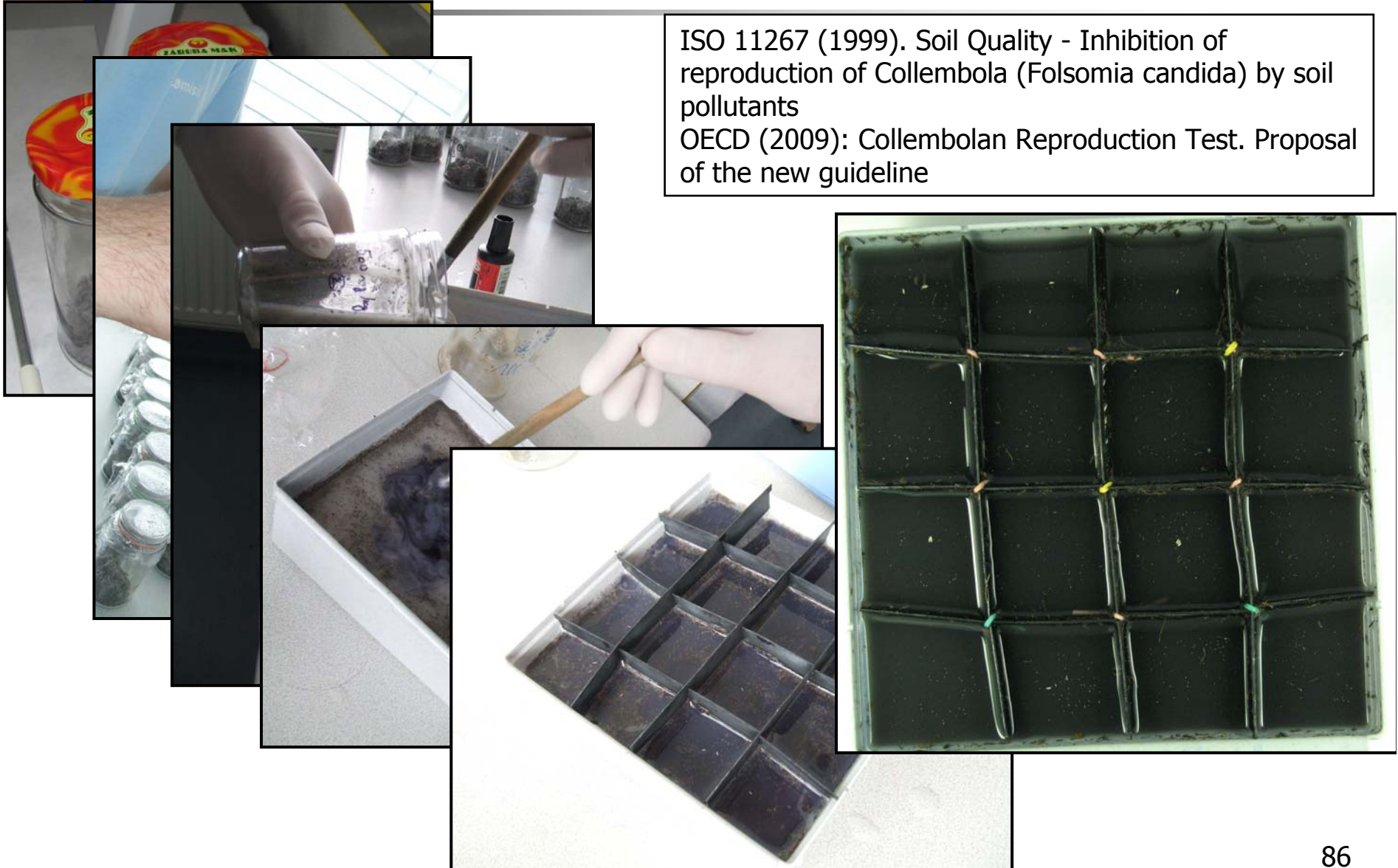
Test s *F. candida*

- 30g AS + na počátku 2mg sušených kvasnic + 10 jedinců *F.c.* (10-12 dní staré) a těsně zavřít nádobky
- 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

Folsomia candida

ISO 11267 (1999). Soil Quality - Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants

OECD (2009): Collembolan Reproduction Test. Proposal of the new guideline

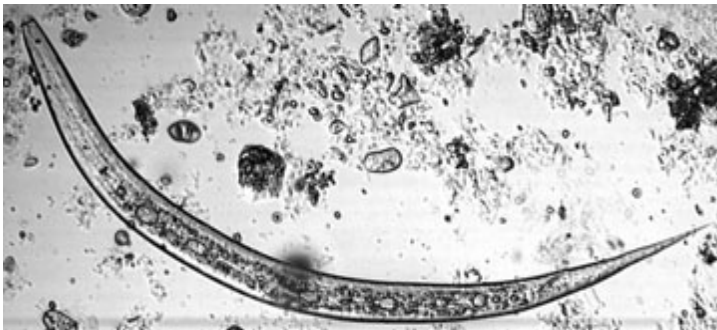




Testy s hlísticemi

- ☹️ 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

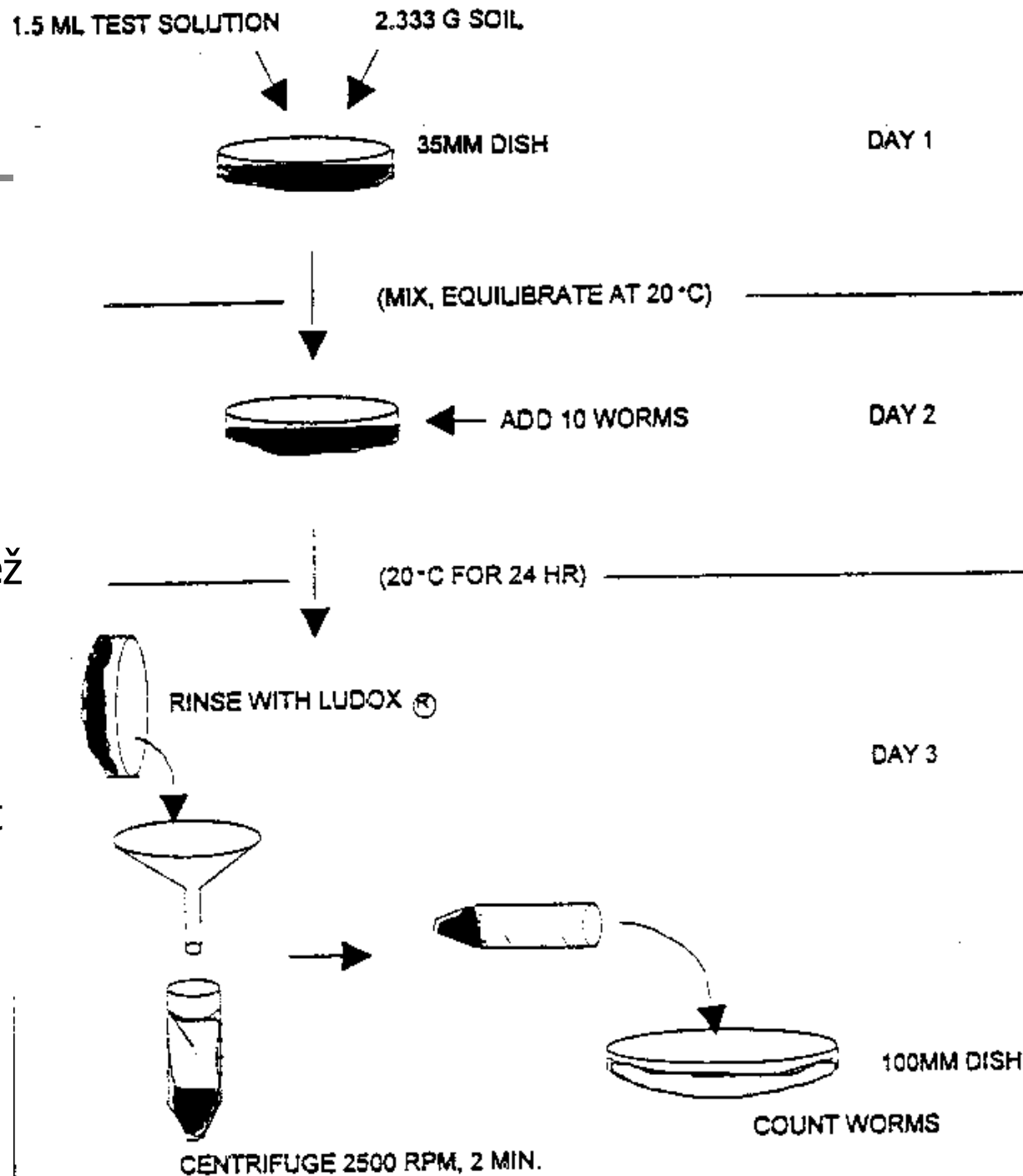


C. Elegans test

- 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

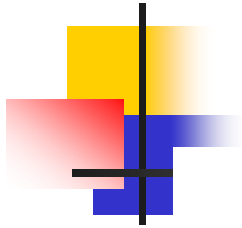
- Kontaminovanou půdu lze připravit předem
 - Nutný je kvalitní mikroskop
 - Tento test je méně ekologicky relevantní než ostatní půdní testy:
 - hodně vodné fáze
 - krátké trvání
- = rychlý screeningový test



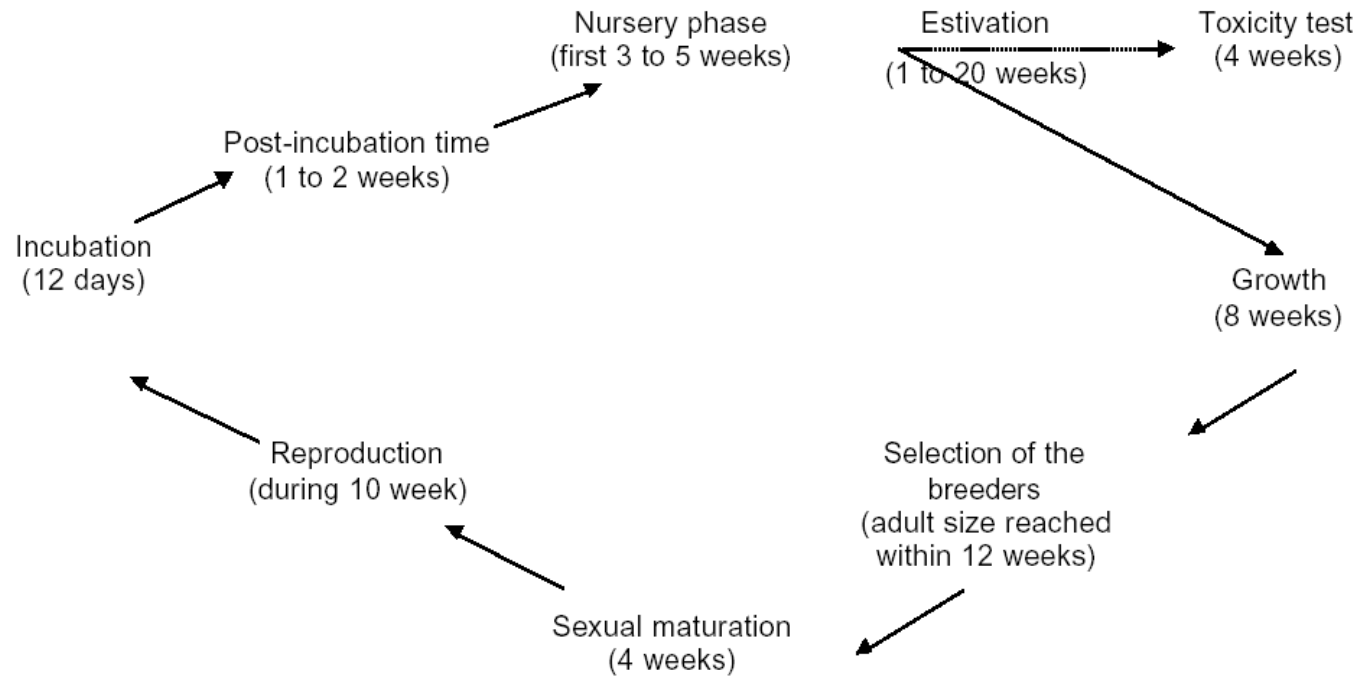
Helix aspersa test

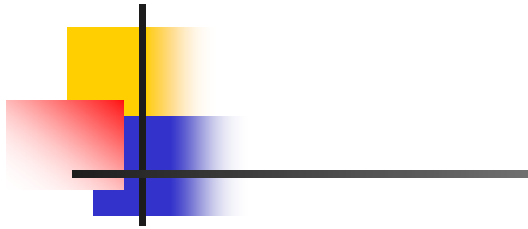


- juvenilní *H. aspersa* (3-5 týdnů staří jedinci; $1 \pm 0,3\text{g}$; $15,5 \pm 1\text{mm}$ schránka; ze synchronní kultury) po estivaci = 1-20 týdnů v dřevěných krabičkách v suchu; pár dní před testem postřík vodou, krmení
- pak je 5 jedinců exponováno 28dní testovacímu substrátu (AS či přírodní čistá 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





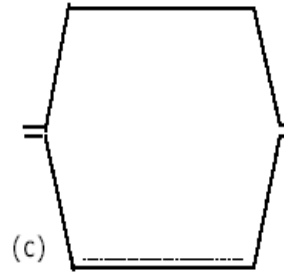
Chov a test

(a, b) A transparent plexiglass cover held in place by two rubber bands (weeks 1 and 2 of the test): volume 1.6 dm³.

(c, d) The flat cover replaced by another box up-side down (weeks 3 and 4 of the test): volume 3.2 dm³.

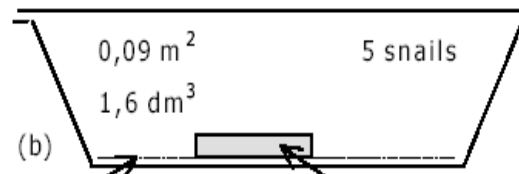


(a)

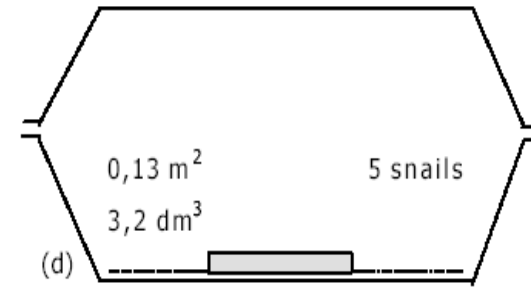


(c)

a, c: Front view



(b)



(d)

b,d: Side-face view

soil or wet absorbent paper Petri dish with feed

Weeks 1 to 2 (a,b)

Weeks 3 to 4 (c,d)





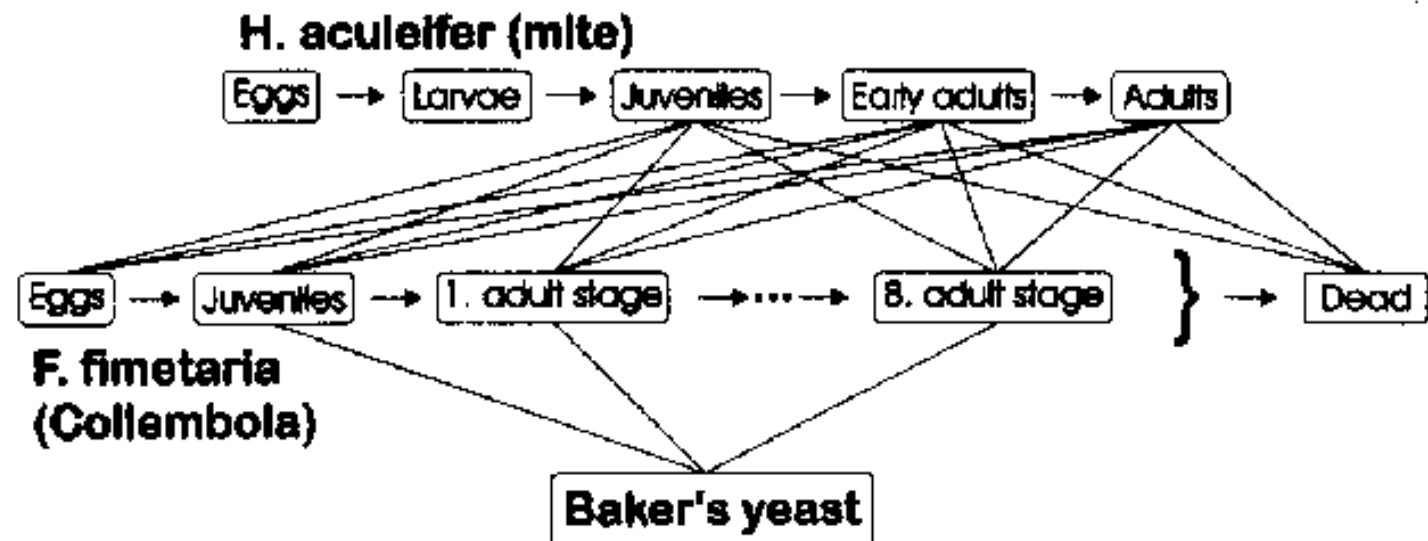
Testy s roztoči

- 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



Lithobius mutabilis



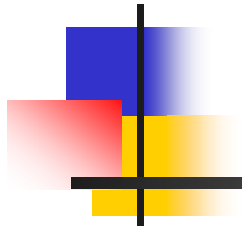
Philonthus cognatus



Poecilus cupreus



Linyphiidae



Půdní biotesty s vyššími rostlinami



Testy s vyššími rostlinami

- velké množství – obtížná přehlednost
- dřívější testy zaměřené na klíčivost semen a elongaci kořene jsou označovány jako poměrně necitlivé a málo relevantní pro ekologii
- pro relevantnější interpretace byly vyvinuty testy vícegenerační s možností studia subletálních účinků

Nejpoužívanější endpointy

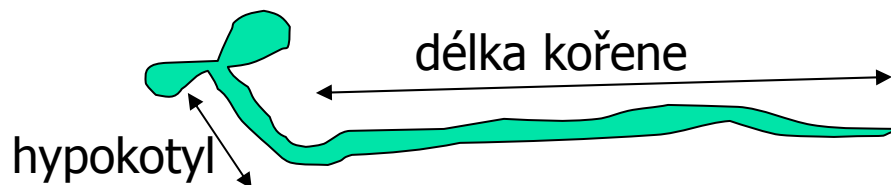
1. Klíčivost semen (půdní roztok) - nerelevantní
2. Elongace kořene (půdní roztok či půda)
3. Růst sazenic
4. Produkce biomasy
5. Životní cyklus (změny hmotnosti, počet květů, semen ..)
6. Enzymatický test
7. Fyziologické testy (fotosyntéza, respirace)

Testy klíčivosti a elongace kořene

- semena jsou exponována v substrátu (křemenný písek), půdě toxické látky či přímo v kontaminované půdě z terénu a po 5 dnech se sleduje klíčivost - direct test
- relativně necitlivý: semeno má bariéry pro vstup látky a energeticky je soběstačné, látka ho nemůže stresovat
- postupy se v detailech liší, někdy bývá přímo spojen (US EPA) se sledováním délky kořene
- jindy se ale vliv na délku kořene sleduje jako nepřímá expozice v roztoku

Test inhibice růstu kořene *Sinapsis alba*

- 72 hodin jsou semena vystavena roztoku látky (+kontrola)
- 20°C; 5ml roztoku na petriho misku; 30 semen na misku; tma
- stanoví se délka kořene a počet vyklíčených semen





Test růstu kořene

- ISO 11269-1(1993): Soil quality -Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part1: Method for the measurement of inhibition of root growth
- rozšířená se salátem *Lactuca sativa*
- **PRINCIP:** Měří se délka kořenů předklíčeného salátu v kontrole a zkoušeném vzorku po 5 dnech inkubace. Ekotoxicita vzorku je stanovena jako statisticky významný rozdíl v délce kořenů zkoušeného vzorku ve srovnání s kontrolou, popř. se stanoví hodnota EC50 z koncentrační (ředící) řady.



Podmínky zkoušky

- Teplota: **24°C ± 2°C**
- pH: **6,0 – 8,0**
- doba expozice: **120h ± 2h**
- množství vzorku: **200 až 300 g vlhkého vzorku** na zkušební nádobu
- počet zkoušených semen – **15 předklíčených semen** v jedné zkušební nádobě
- počet paralelních stanovení: **3 až 5**
- ostatní podmínky - **bez osvětlení**

Postup - detaily

- **Předklíčení semen** - na vrstvě filtračního papíru zvlhčené demineralizovanou vodou po dobu **36h až 48h**, při laboratorní teplotě bez regulace osvětlení. Pro zkoušku se vybírají naklíčená semena **s kořínkem, který je kratší než 2 mm.**





Postup - detaily

- Do nádoby se naváží **200 až 300 g** zkoušeného vzorku nebo kontroly se známou sušinou, zvlhčeného na hodnotu **70% ± 5 % WHC**
- pravoúhlá síť např. 5 x 3 bodů
- do jamek asi 1 cm hlubokých se pinzetou rovnoměrně rozmístí po 15 naklíčených semenech kořínkem směrem dolu
- semena se k zemině přitlačí, zeminou se nezakrývají a takto připravené nádoby uzavřené víčkem se umístí do termostatu s teplotou $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ bez přístupu světla
- po 5 dnech se salát šetrně oddělí od vzorku a změří se a zaznamenává délka kořenů ve zkoušeném vzorku a v kontrole s přesností na 1 mm

Postup salát setý



Vyšší rostliny



ISO 22030 (2005): Chronic toxicity in higher plants

Využití při registraci pesticidů



Auswirkungen auf andere Pflanzen



**Verschiedene
Konzentrationsstufen im:**

Auflauftest



Wachstumstest *Lein*



Erbse

Prüfpflanzen: 6 Pflanzenarten aus unterschiedlichen Familien

1. Stufe: Prüfungen im Gewächshaus

- **Auflauftest:** Auswirkungen auf Keimung und Auflauf
- **Wachstumstest:** Auswirkungen auf den Biomassezuwachs

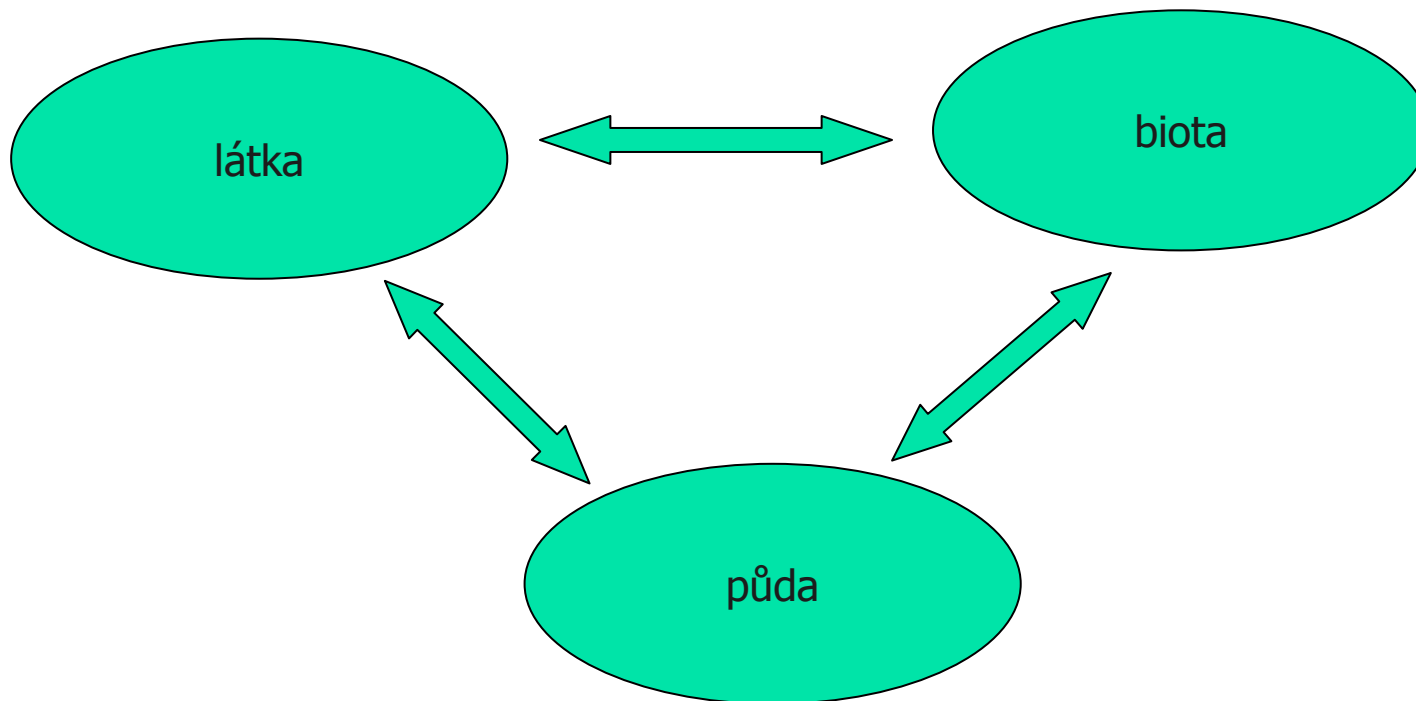
TER < 10 ↙

2. Stufe: Weiterführende Versuche

- Verlängerte Gewächshausversuche
- Mehr Arten
- Freilandversuche

Půdní ekotoxikologie vs biotesty

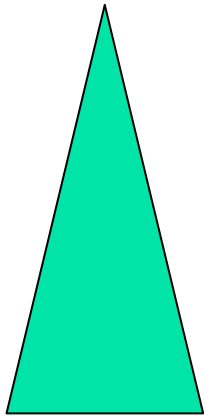
- Není soubor půdních ekotoxikologických biotestů
- Pomáhá POROZUMĚT složitým vztahům mezi chemickými látkami, půdou a půdními organismy



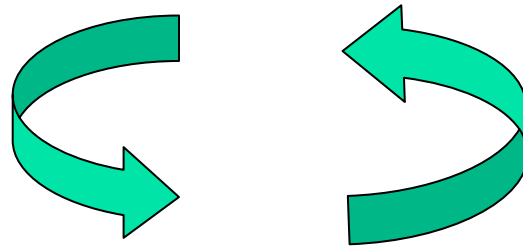


Půdní ekotoxikologie vs biotesty

- 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.