

E2240 Účinky stresorů v ekosystémech

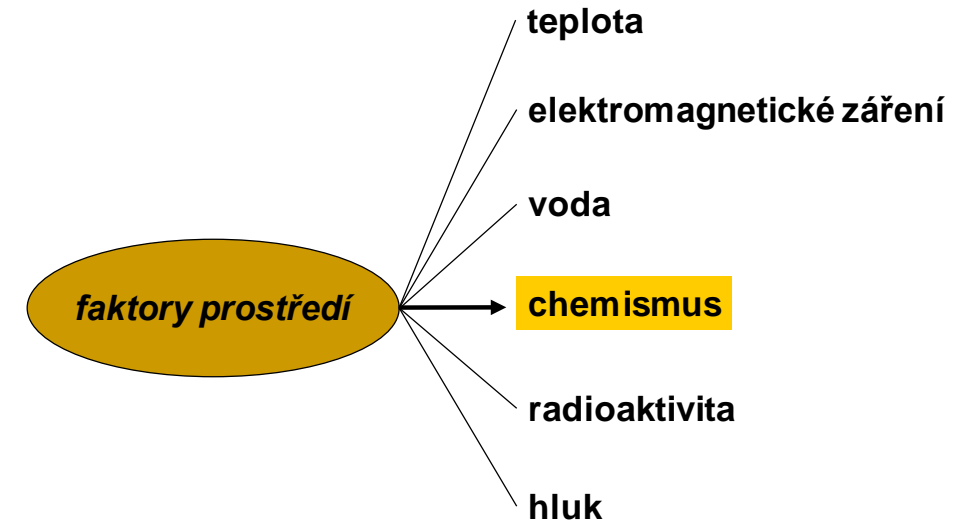
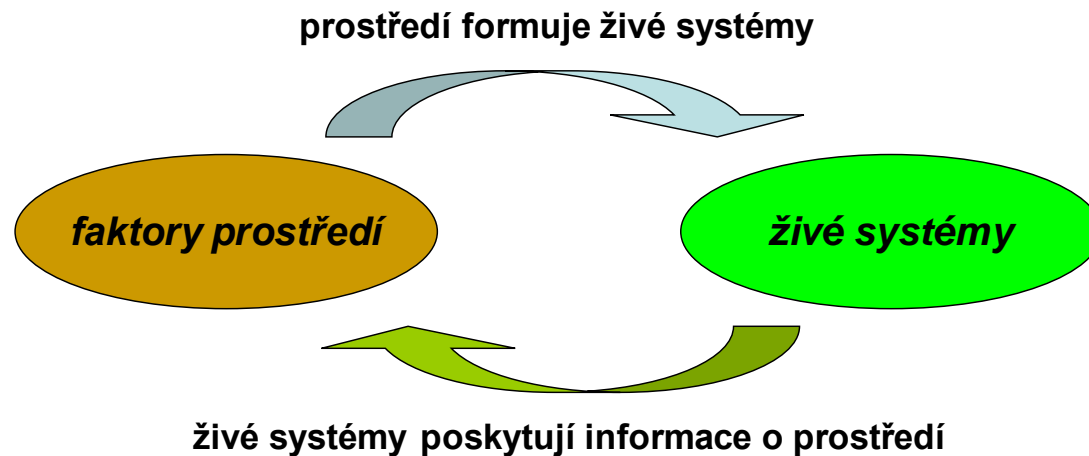
05 Bioindikace v suchozemských ekosystémech

Jakub Hofman

Úvod - připomenutí

Bioindikace

metoda, kdy se na základě vlastností biologických systémů odhadují vlastnosti prostředí



v širším slova smyslu tím označujeme všechny postupy, kde sledujeme reakce organismů (od jedinců po společenstva) přítomných v prostředí na stres

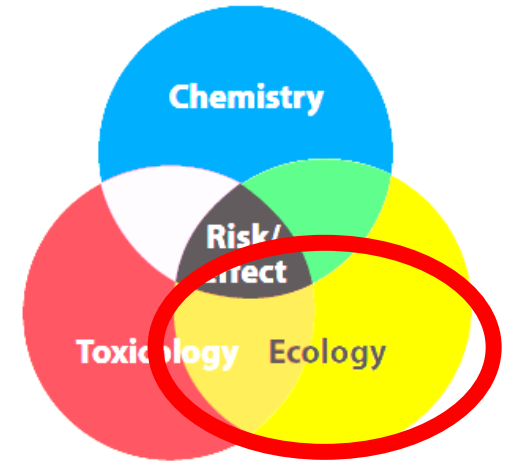
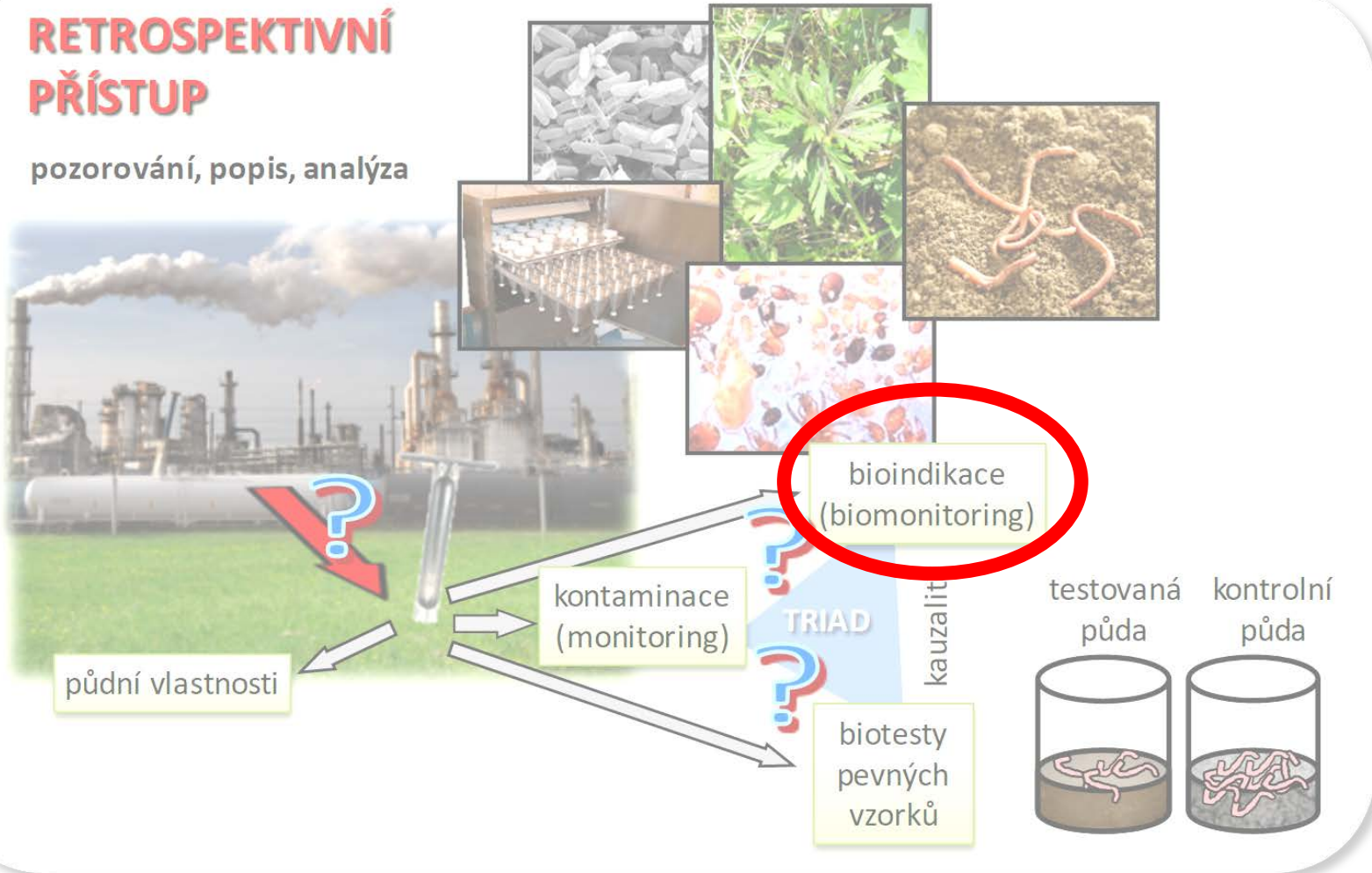
Bioindikace versus biomonitoring

- bio + monitoring
- bioindikace je postup
- biomonitoring je jeho použití v terénních studiích zejména na více lokalitách nebo opakovaně v čase

Bioindikace

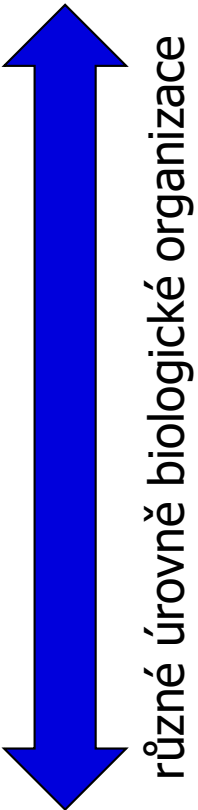
RETROSPEKTIVNÍ PŘÍSTUP

pozorování, popis, analýza



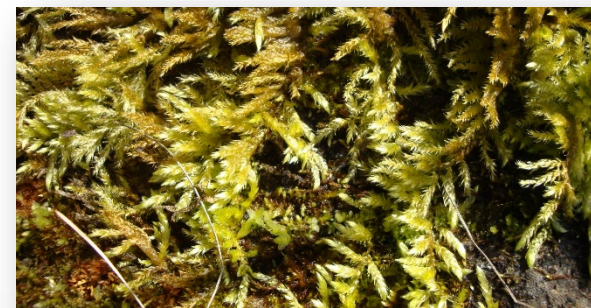
Bioindikace

- sledování chemických látek v odebraných vzorcích bioty
 - v čemkoliv, preferenčně tzv. bioakumulátory či bioindikační druhy/vzorky (jehličí)
- sledování bioty a její odezvy na faktory prostředí
 - biochemické markery
 - účinku (stresové proteiny – HSP – heat shock proteiny, chromozomové aberace ...)
 - expozice (methalothioneiny, EROD - ethoxyresorufin-O-deethylase ...)
 - indikátorové druhy - přítomnost/nepřítomnost indikuje určitou vlastnost ekosystému
 - citlivé druhy (např. pošvatky, horské ploštěnky, lišejníky)
 - oportunní druhy (např. pakomáři, pijavky ...)
 - stav a funkce organismů
 - populace - počty organismů, distribuce, věkové složení ...
 - společenstvo – druhové složení a zastoupení, biodiverzita
 - stav ekosystému, krajiny – struktura, dynamika, funkce

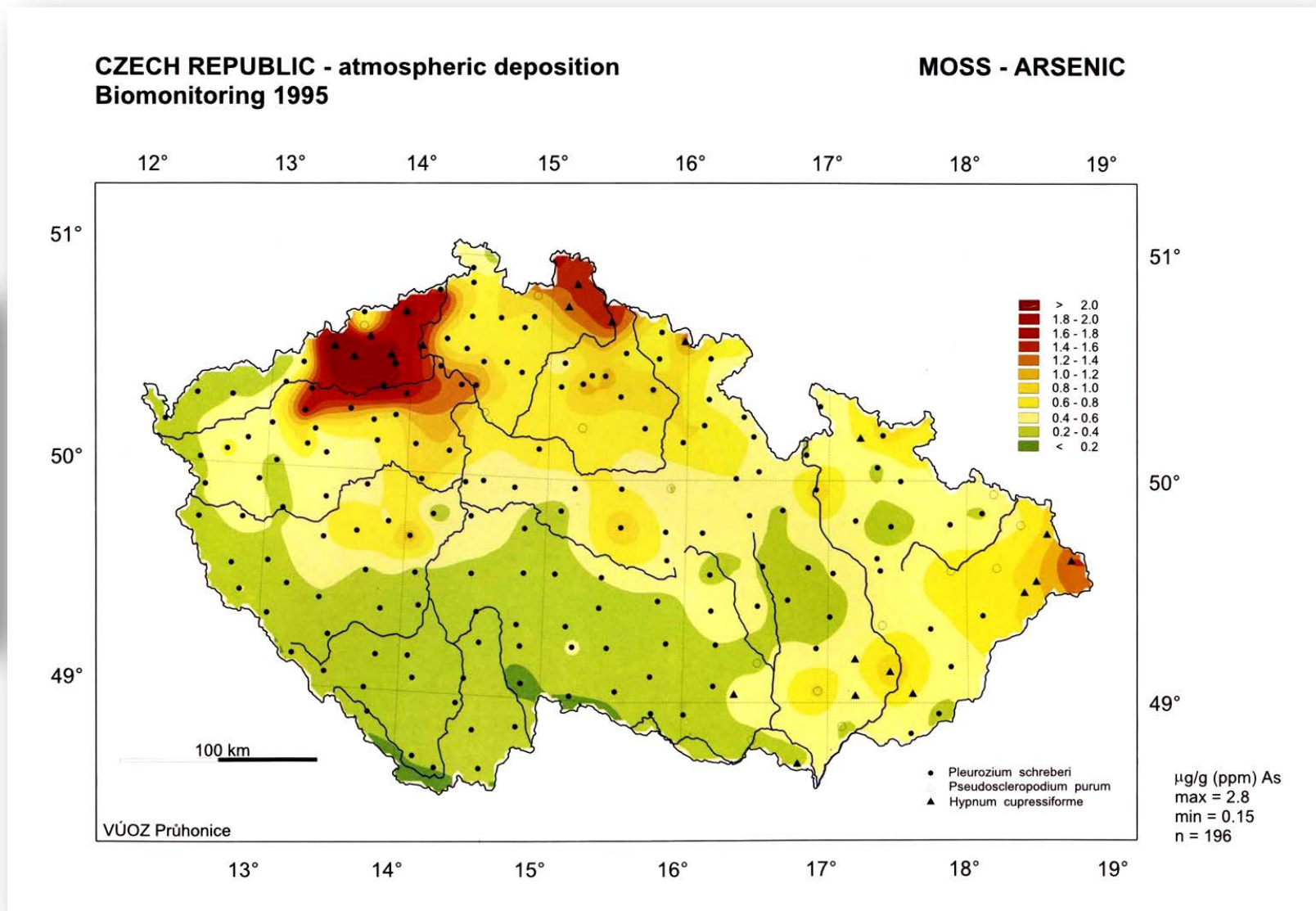


Akumulační bioindikátory

- mechorosty – bryomonitoring
- lišejníky – kumulace těžkých kovů a radionuklidy
- jehličí – smrk, borovice - kumulace těžkých kovů a POPs
- vajíčka ptáků
- žížaly, šneci

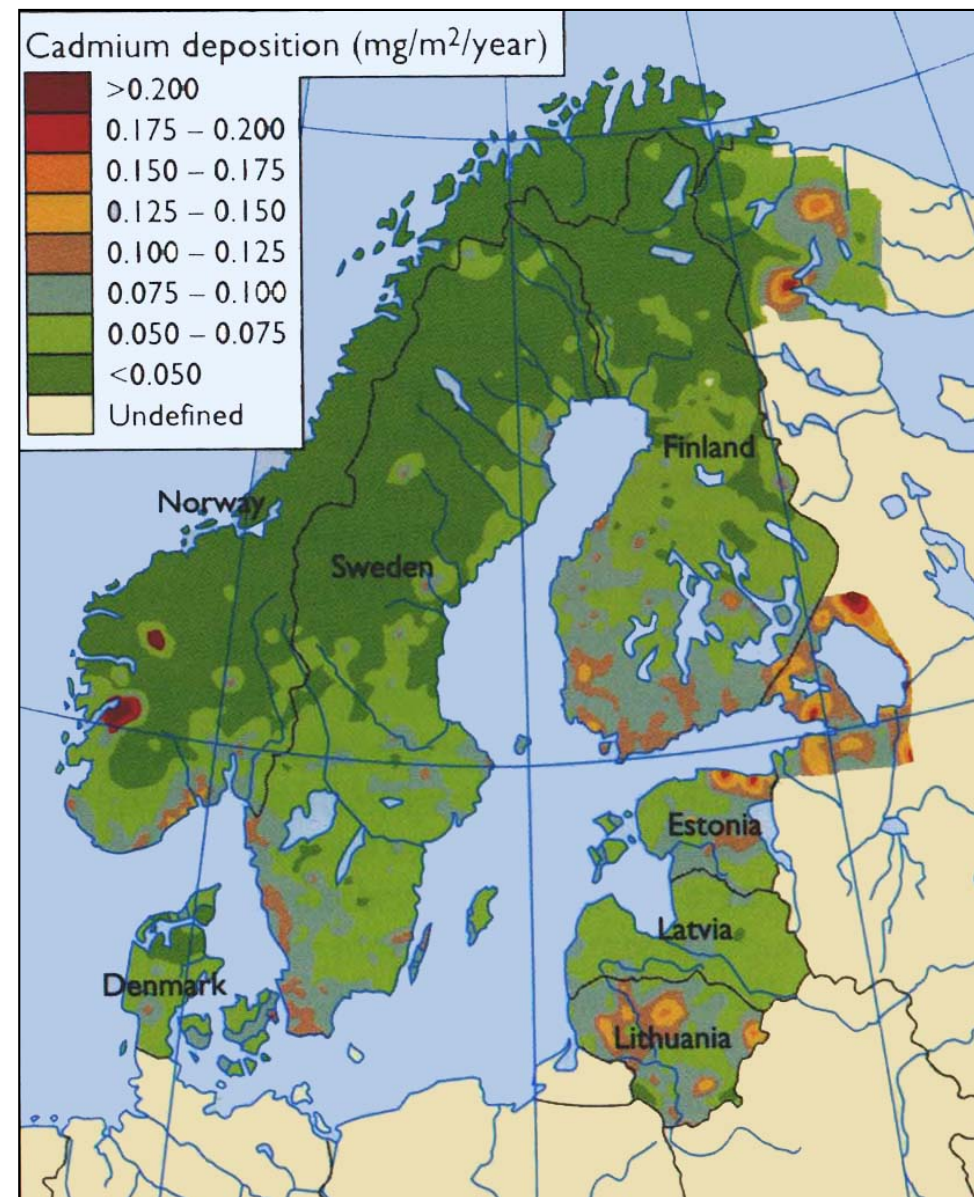


Akumulační bioindikátory - příklad



Akumulační bioindikátory - příklad

Monitoring depozice Cd
na základě analýz mechů
(1990)



Akumulační bioindikátory - příklad

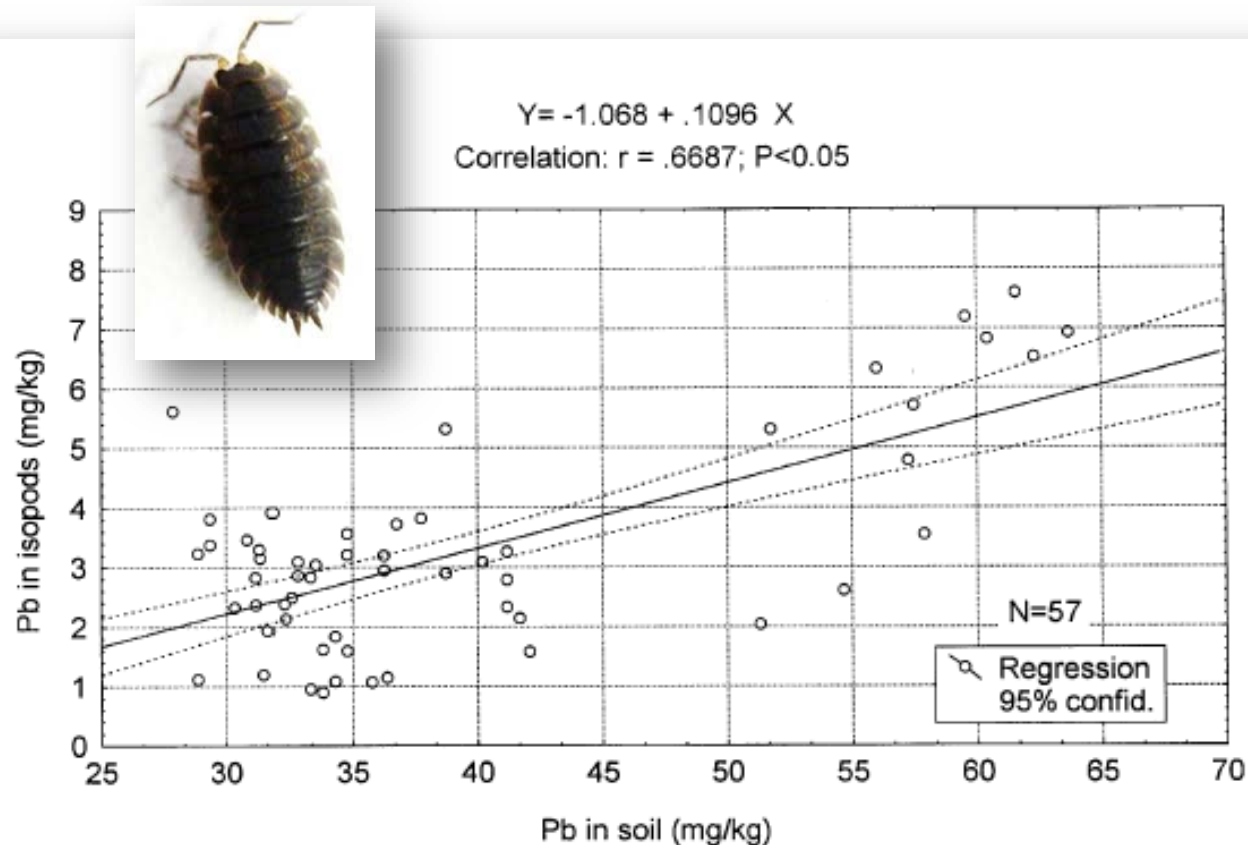


FIG. 1. Correlation of lead in HNO₃-extracted soil and lead in isopods.

The aim of the study was to determine lead and cadmium concentrations in Isopoda woodlice and soil and to estimate their relation in the environment and the possibility of the use of isopods as biological indicators of pollution. Samples of isopods and soil were collected at two locations in Northern Croatia and analyzed for lead and cadmium. One location was in the forest, and another in the meadow near the road. Isopods were dry-ashed and soil was extracted with nitric acid. Elements were analyzed by atomic absorption spectrometry. Results revealed that the two locations were significantly different in lead and cadmium in extracted soil and isopods. Lead concentration in extracted soil was 34.6 mg/kg dry weight in the forest and 43.3 mg/kg dry weight in the meadow near the road. Respective cadmium values were 0.147 and 0.180 mg/kg. Lead concentrations in isopods were 2.40 and 4.22 mg/kg dry weights, and cadmium 0.757 and 0.411 mg/kg dry weight, respectively. Correlation of lead or cadmium between isopods and soil irrespective of location gave significant and linear relations for both elements. © 2002 Elsevier Science (USA)

Bioindikace

- na začátku je nutno si dobře **definovat, jaké organismy/parametry budeme sledovat pro posouzení působení stresu:**
 - vztah k působení stresu
 - hodnocené skupiny:
 - producenti – rostlinná společenstva
 - konzumenti – bezobratlí, plazi, ptáci, savci ...
 - destruenti – půdní mikroorganismy
 - klíčové druhy, bioindikátory, nebo více druhů, společenstvo
 - parametry hodnocení
 - strukturní (taxonomické parametry, biomasa, abundance ...)
 - funkční (produkce/respirace, potravní řetězce ...)

Bioindikace

- **vlastní provedení odběrů a analýz bioty:**
 - návrh a rozložení vzorkovacích míst
 - vzorkování – podle typů organismů
 - charakterizace a stanovení definovaných biotických parametrů
 - techniky botanických, zoologických, mikrobiologických a ekologických disciplin
 - charakterizace a stanovení kontaminace bioty
 - techniky analytické chemie a chemie životního prostředí

Půdní kvalita a její bioindikace

Půdní kvalita – definice

**současná a do budoucna
udržitelná schopnost půdy
fungovat jako živý systém
uvnitř ekosystému
zabezpečující jeho důležité
funkce a služby, podporující
biologickou produktivitu,
odolávající erozi, nesnižující či
zlepšující kvalitu ovzduší,
podzemní a povrchové vody a
podporující zdraví rostlin,
zvířat i lidí**



Indikátory půdní kvality

Musí vyhovovat těmto kritériím:

- korelace s procesy v ekosystémech (modelování)
- musí zahrnovat všechny (většinu) vlastnosti půd a tak být použitelné pro odhad vlastností, které se nedají snadno měřit
- musí být snadno měřitelné v terénu
- musí být citlivé na změny technologií a přírodních poměrů (klíma), avšak necitlivé na krátkodobé změny
- soubor indikátorů musí zahrnovat již sledované charakteristiky

Indikátory půdní kvality

- kvalitativní (např. půda je dobře oživená)
- kvantitativní (např. biomasa mikroorganismů je 1450 $\mu\text{g C}_{\text{bio}}/\text{g}$ půdy)
- v terénu / v laboratoři
- složité analýzy pro vědce vs karty pro farmáře



	Indicator Table		
Indicator	Poor	Medium	Good
<i>Earthworms</i>	0-1 worms in shovelful of top foot of soil. No casts or holes.	2-10 in shovelful. Few casts, holes, or worms.	10+ in top foot of soil. Lots of casts and holes in tilled clods. Birds behind tillage.
<i>Organic Matter Color</i>	Topsoil color similar to subsoil color.	Surface color closer to subsoil color.	Topsoil clearly defined, darker than subsoil.
<i>Organic Matter Roots/Residue</i>	No visible residue or roots	Some residue few roots	Noticeable roots and residue
<i>Subsurface Compaction</i>	Wire breaks or bends when inserting flag.	Have to push hard, need fist to push flag in.	Flag goes in easily with fingers to twice the depth of plow layer.
<i>Soil Tilth Mellowness Friability</i>	Looks dead. Like brick or concrete, cloddy. Either blows apart or hard to pull drill through.	Somewhat cloddy, balls up, rough pulling seedbed.	Soil crumbles well, can slice through, like cutting butter. Spongy when you walk on it.
<i>Erosion</i>	Large gullies over 2 inches deep joined to others, thin or no topsoil, rapid run-off the color of soil.	Few rills or gullies, gullies up to two inches deep. Some swift runoff, colored water.	No gullies or rills, clear or no runoff.
<i>Water Holding Capacity</i>	Plant stress two days after a good rain.	Water runs out after a week or so.	Holds water for a long period of time without puddling.
<i>Drainage, Infiltration</i>	Water lays for a long time, evaporates more than drains, always very wet ground.	Water lays for short period of time, eventually drains.	No ponding, no runoff, water moves through soil steadily. Soil not too wet, not too dry.
<i>Crop Condition (How well it grows)</i>	Problem growing throughout season, poor growth, yellow or purple color.	Fair growth, spots in field different, medium green color.	Normal healthy dark green color, excellent growth all season, across field.
<i>pH</i>	Hard to correct for desired crop.	Easily correctable.	Proper pH for crop.
<i>Nutrient Holding Capacity</i>	Soil tests dropping with more fertilizer applied than crops used.	Little change or slow down trend.	Soil tests trending up in relation to fertilizer applied and crop harvested.

Indikátory půdní kvality

- Příklad souboru vlastností půd využitelných jako indikátory kvality a zdraví půdy a vztah indikátorů k funkcím půdy

skupina indikátorů	indikátor	funkce půdy						komentář vztahu k funkci a stavu půdy
		kvalita ŽP		podpora produkce a kvality		lidské zdraví	odolnost proti erozi	
		kvalita vody	kvalita ovzduší	rostliny	živočichové			
fyzikální	textura	X	X	X			X	transport a zadržení vody a chemikálií
	hloubka půdy, organominerálního horizontu a prokořenění	X		X			X	odhad produktivity a eroze
	infiltrace a objemová hmotnost	X		X			X	potenciál pro vyluhování, produktivitu a erozi
	retenční vodní kapacita	X	X	X	X		X	transport a odolnost vody
chemické	organická hmota (C a N)	X		X		X		definuje půdní úrodnost, stabilitu a rozsah eroze
	pH	X	X	X		X		definuje hranice biologické a chemické aktivity
	elektrická vodivost	X	X	X	X	X		definuje hranice rostlinné a mikrobiální aktivity
	extrahovatelný N, P, K	X		X				dostupnost živin pro rostliny, možnost ztráty N
biologické	mikrobiální biomasa (C a N)	X		X				mikrobiální katalytický potenciál a časné varování při změnách v OM
	mineralizovatelný dusík	X		X				odhad půdní produktivity a potenciální zásobárna N
	respirace půdy	X	X	X				odhad mikrobiální aktivity

Indikátory půdní kvality

- snaha kombinovat více parametrů dohromady
- Index kvality půdy (SQ, soil quality) jako funkci šesti specifických prvků:
- $SQ = f(SQE1, SQE2, SQE3, SQE4, SQE5, SQE6)$
 - SQE1 = produkční funkce (produkce potravin, krmiv a vlákniny)
 - SQE2 = erodovatelnost
 - SQE3 = kvalita podzemních vod
 - SQE4 = kvalita povrchových vod
 - SQE5 = kvalita ovzduší
 - SQE6 = kvalita potravin a krmiv (nutriční hodnota, zdravotní nezávadnost)

Doran (1994); Doran and Parkin (1996)

Indikátory půdní kvality

- snaha propojit s ekosystémovými službami půdy

Ecosystem service	Important ecological parameters
Supply of nutrients	Food web including earthworms Primary production Ratio of bacteria/fungi (De)nitrification
Water regulation	Earthworms Abundance and ratio bacteria/fungi pH, content of soil organic matter, groundwater level
Soil Structure	Earthworms Abundance and ratio of bacteria/fungi pH, content of soil organic matter Nematode Channel Ratio
Supply of clean shallow groundwater	Specific activity of bacteria and fungi Clean soil (concentration of pollutants lower than a maximum concentration) Extent of leaching of nitrogen, phosphate, and halogenated pollutants (EOX) Activity of the nitrogen cycle
Supply of clean deep groundwater	Amount and biodiversity of bacteria and fungi Clean soil Extent of washout of nitrogen and phosphate
Pest control in agriculture	Plant Parasitic Index of nematodes Amount and ratio of bacteria and fungi Mycorrhiza fungi
Changeability of soil use	Diversity of soil organisms Concentration of nitrogen and phosphate in the soil
Resilience and resistance	Diversity (within functional groups)

Jensen & Mesman (2006)

Půdní mikroorganismy

Proč mikroorganismy ?

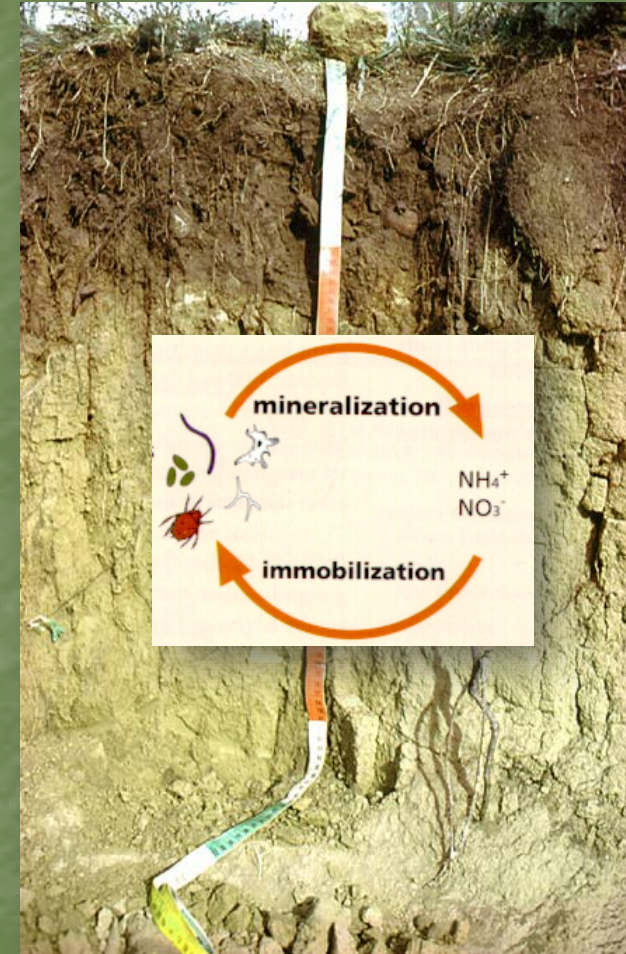
- Mikroorganismy jsou velmi významnou složkou půdy
- Zastávají klíčové role ve fungování půdního ekosystému
- Narušením těchto dějů se narušuje stabilita celého tohoto ekosystému
- Mikroorganismy jsou také schopny některé typy kontaminace snižovat, čehož lze využít při remediacích

Proč mikroorganismy ?

- sledováním stavu půdních mikroorganismů můžeme **nepřímo posuzovat stav celého terestrického ekosystému**
- na stresové faktory můžeme **upozornit velmi brzy**
- vynikající **indikátor biologického potenciálu půd** i v přítomnosti stresových faktorů v půdním prostředí
- dávají odpověď na přítomnost stresujících faktorů v jejich životním prostředí zejména **změnou velikosti společenstva nebo aktivity**
- změny v parametrech mohou časně varovat před hrozícím **snížením produktivity systému** vlivem jakýchkoli stresujících faktorů
- **možnost hodnotit:** efektivitu zemědělské, lesní rekultivace, zemědělského obhospodařování, hnojení, dále vlivů geneticky upravených organismů vpravených do půdy, vlivů eroze, odlesňování, zasolování apod.
- půdní mikrobiální ekotoxikologie může přispět k objektivnímu hodnocení rizik spojených s různými antropogenními zásahy

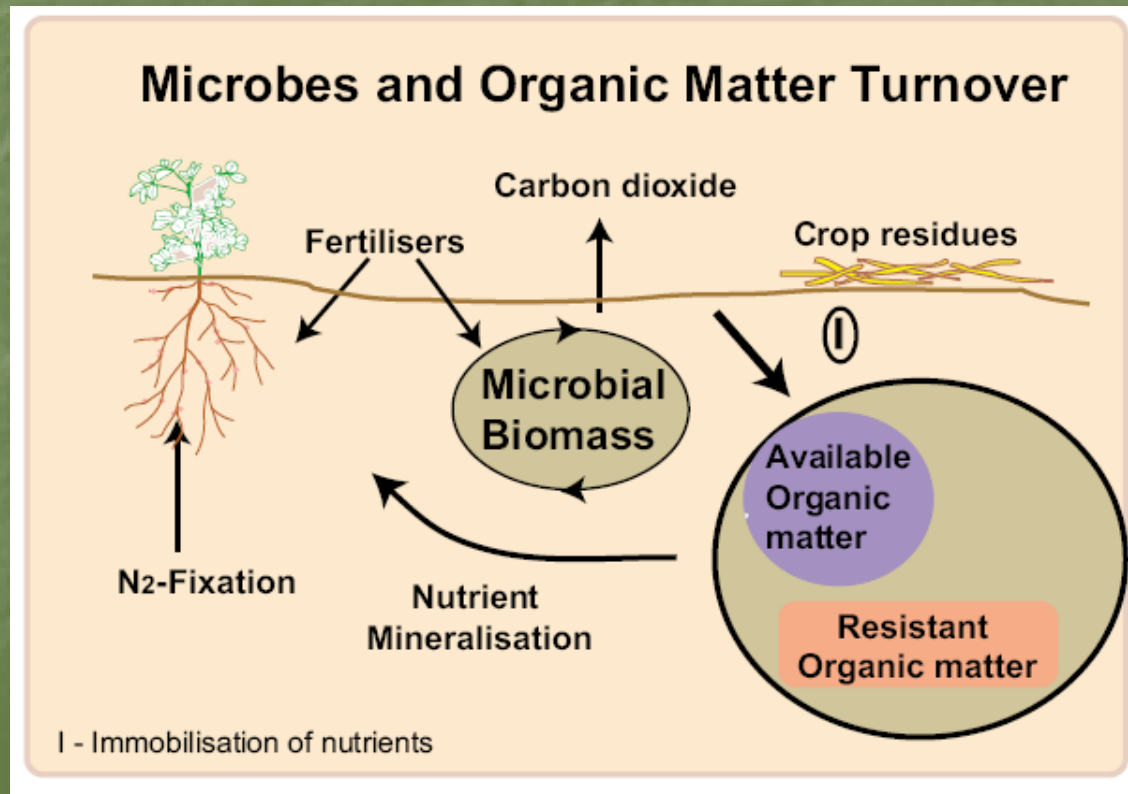
Význam mikroorganismů v půdě

- stěžejní v cyklech živin a energií
- stojí na počátku potravních řetězců
- rozklad organické hmoty (mineralizace)
- syntéza nových sloučenin (immobilizace)
- tvorba humusu
- udržování půdní struktury, stabilita agregátů
- prospěšný vliv na půdní úrodnost a pro růst rostlin
- vliv na vodní a vzdušný režim půdy
- degradace celé řady polutantů



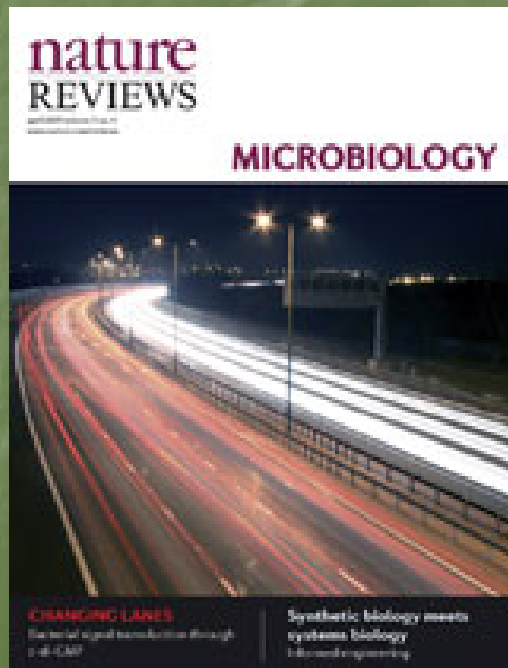
Kolik je v půdě mikroorganismů ?

- 0,05 - 0,5% hmoty půdy jsou mikroorganismy
- 10^5 až 10^9 jedinců v 1 g suché půdy
- toto množství stačí na zabezpečení veškerých procesů mineralizace a imobilizace a dalších procesů



Kolik je v půdě mikroorganismů?

- Biodiverzita mikroorganismů je mnohem větší než jsme se původně domnívali
- **METAGENOMICS**: měří kód pro celé společenstvo určitého prostředí
(např. u půdy se v 1 g odhaduje 10^{12} bp!!)



TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome

Vogel and colleagues invite the microbiology community to participate in an ambitious and extraordinary sequencing project to uncover the soil metagenome.

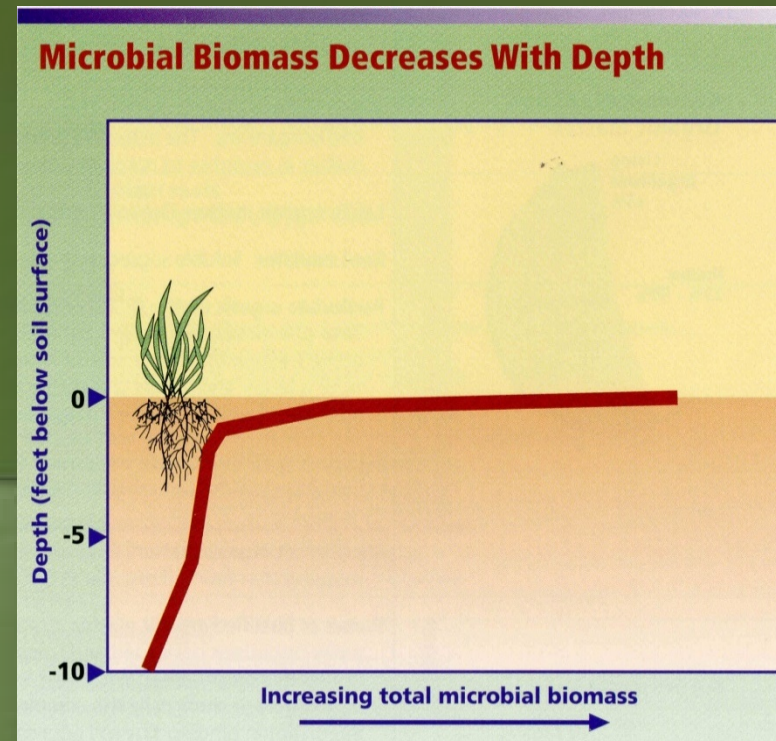
252 | APRIL 2009 | VOLUME 7

<http://www.terragenome.org>

curves. By applying new mathematical treatment of data, the authors generate abundance curves, the most plausible of which suggests that there could be 10^7 distinct prokaryote taxa in 10 grams of pristine (free of chemical contaminants) soil (see the figure). Moreover, rare organ-

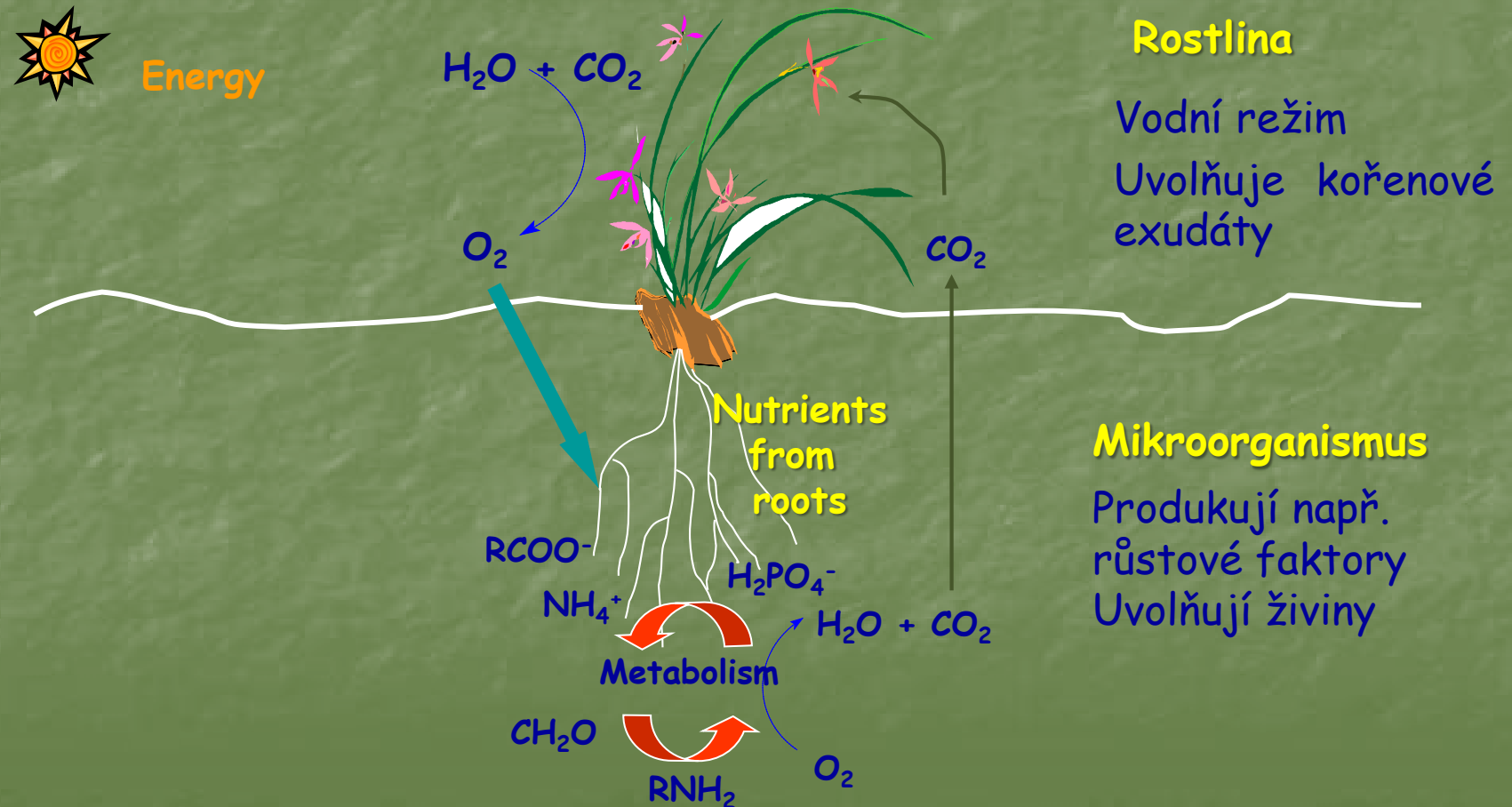
Kde se v půdě MO vyskytují?

- největší biomasa mikroorganismů je v humusovém horizontu, v rizosféře a s hloubkou dochází k poklesu
- fotolitotrofní mikroorganismy jsou samozřejmě vázané pouze na nejvrchnější vrstvičku půdy
- obligátně anaerobní mikroorganismy se nachází spíše ve spodní části horizontů (bez přístupu kyslíku)
- mikroorganismy uzavřené v mikroagregátech jsou dobře chráněné před predací protozoí, ale naopak mohou strádat nedostatkem substrátu



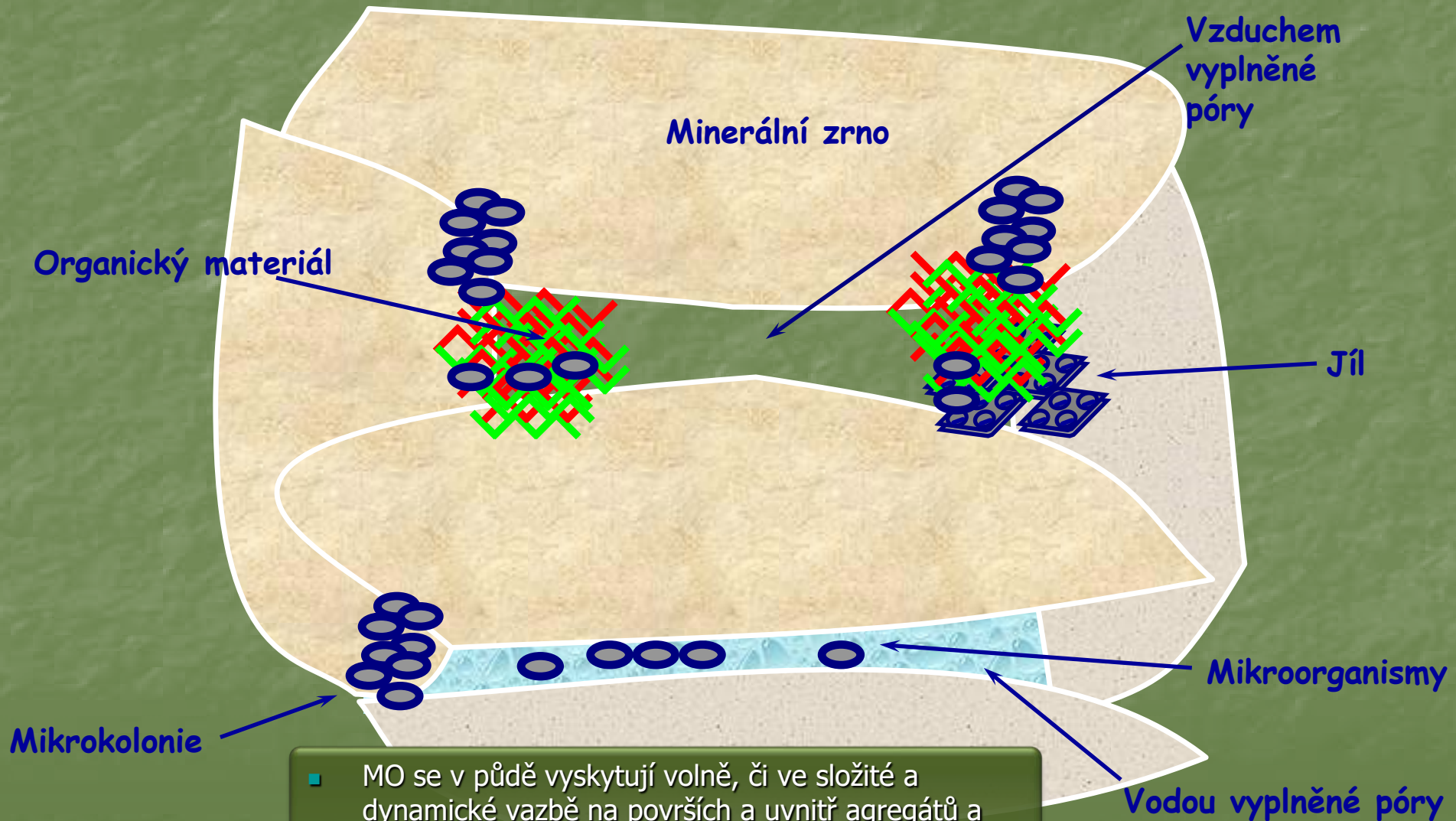
Kde se v půdě MO vyskytují?

- **Rhizosféra**
- Ekologická vazba mikroorganismů na kořeny rostlin
- V okolí kořenů je jiné prostředí než jinde v půdě



Kde se v půdě MO vyskytují?

- Niky pro půdní mikroorganismy (dle K.T.Semple)

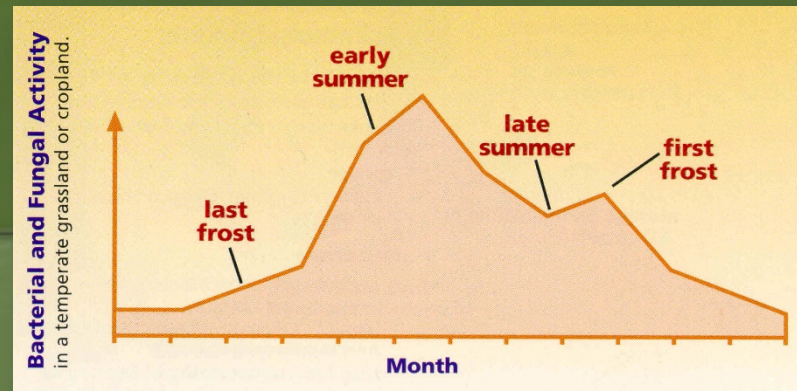


- MO se v půdě vyskytují volně, či ve složité a dynamické vazbě na površích a uvnitř agregátů a částic organominerálního komplexu

Půdní MO jsou ve velmi silné interakci s vlastnostmi půdy

- nutriční vlastnosti půdy (zdroj živin pro mikroorganismy)
- fyzikálně-chemické vlastnosti: teplota, pH, vlhkost, redoxní potenciál, obsah jílu, složení půdního vzduchu, půdního roztoku, kontaminanty atd.
- struktura půdy, sorpční komplex, půdní typ, půdní druh, využití půdy atd.
- půdní roztok
- půdní vzduch (N: 78-80%; O₂: 0,1-20%; CO₂: 0,1-15%)
- sorpce/desorpce; půdní komplex; biodostupnost substrátů a kontaminantů
- mikroorganismy samy sorbují (G⁺ více než G⁻); jíl zvyšuje sorpci
- na povrchích částic se sorbují substráty i extracelulární enzymy (urychlení reakcí a zvýšení stability extracelulárních enzymů)
- vlastnosti působí buď přímo, či nepřímo

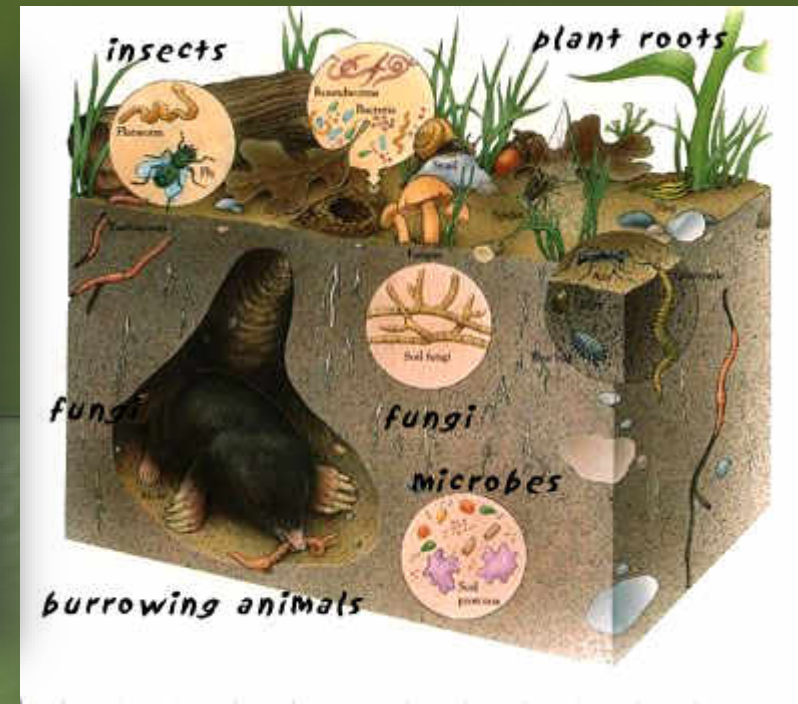
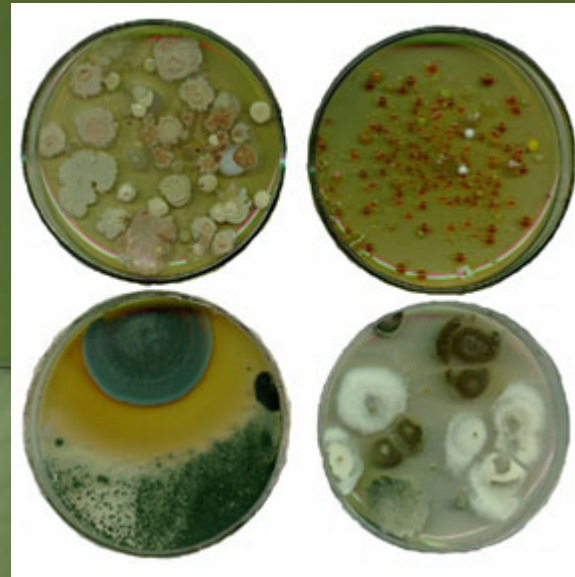
■ sezonalita



Mikrobiální společenstvo půdy

Mikrobiální společenstvo půdy =

- bakterie (řetízky či kolonie)
- aktinomycéty (pseudomycelia)
- houby (hyfy)
- řasy
- prvoci
- kvasinky
- viry



Role půdních mikroorganismů

Význam bakterií

- cykly prvků a látek
- aerobní i anaerobní
- fixace dusíku
- Dekompozice
- Symbiózy
- patogenní

Význam prvoků

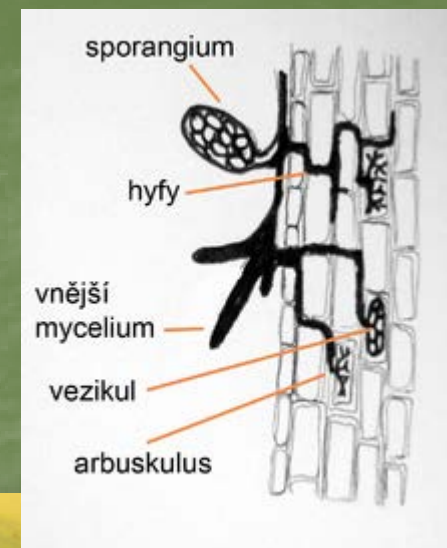
- potravní řetězce (predátoři + konzumenti + destruenti + producenti)
- konzumují bakterie – podporují jejich růst
- dekompozice OM
- fagotrofie a heterotrofie – cykly látek, uvolnění látek z bakteriální biomasy
- autotrofie – řasy - producenti

Význam hub

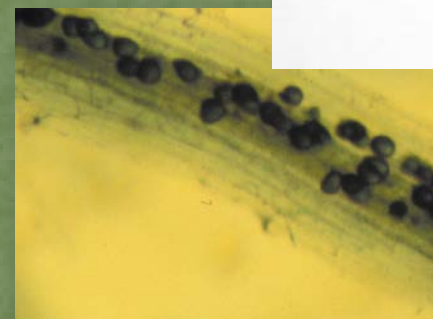
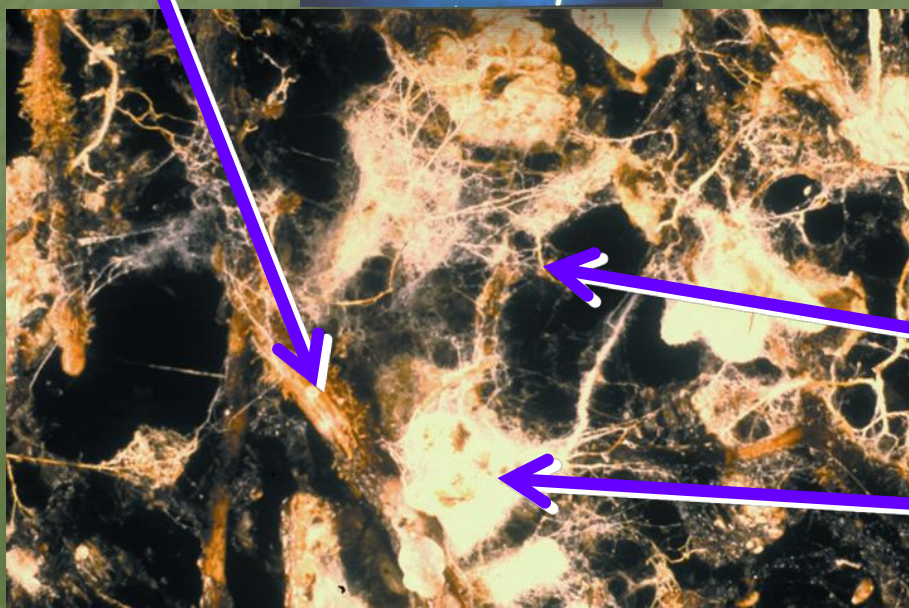
- aerobní
- dekompozice (nabourání komplexů ligninu a humusových látek)
- Symbiotické
- Patogenní
- vyšší tolerance k pH než bakterie (v nižších pH dominují houby)
- bílá hniloba dřeva (white-rot-fungi)
- hnědá hniloba dřeva (brown-rot-fungi)
- významné při biodegradacích (biopulping)
- fungují i díky extracelulárním enzymům

Mykorrhiza

- ectomykorrhiza nebo arbuskulární mykorrhiza
- houba (AM) roste intra- a intercelulárně na kořenech rostliny - několik typů, různé morfologie i fungování
- houba získává z rostliny veškerý organický uhlík (až 10-20% CO₂ asimilovaného rostlinou); oproti tomu rostlina získává minerální živiny (P, N, K, Ca, Mg, Zn a Cu) z houby



Kořen stromu



Vlákno houby

Mykorrhizní struktura



Bioindikace pomocí mikroorganismů

- zachycují skutečnou reakci organismů v přírodních podmínkách
- kontaminaci půd nelze plánovat a tedy **spočívají v popisu dané konkrétní situace**, která je obtížně srovnatelná s jinými případy z důvodu rozdílných koncentrací a typů polutantů, doby kontaminace nebo i půdního typu
- měly by být spíše **dlouhodobými** výzkumy (minimálně jeden rok) vzhledem k výraznému **sezónnímu charakteru** aktivity půdních mikroorganismů
- kontaminace z reálného zdroje zahrnuje zpravidla více druhů polutantů - **environmentální směsi**
- biologická data doplnit chemickým rozbohem a rozbohem půdních vlastností
- problém s nalezením odpovídající **kontrolní lokality**, se kterou by bylo možné srovnávat zjištěné změny v parametrech mikrobiálního společenstva
- je nutno očekávat značné ovlivnění výsledků **parametry prostředí** a dále i **sezónním chováním** mikrobiologických parametrů (**velká časová i prostorová variabilita**)

Metodická východiska ekotoxikologie půdních MO

Výzkumy vedoucí k odhadu druhů, množství a metabolických aktivit biomasy, biodiverzity, stability, funkceschopnosti atd. v půdě zahrnují:

- metody determinace uspořádání a výskytu mikroorganismů v půdě
- izolace a charakterizace podskupin a druhů
- odhadu množství a typů organismů v půdě
- měření biomasy (kvantita a stabilita)
- detekce a měření metabolických procesů (obecných i specifických)
- měření aktivity mikroorganismů (růst, ATP apod.)
- měření diverzity mikrobiálních společenstev
- sledování interakcí (mykorhiza, rhizosféra)

Množství i standardizovaný metod

Standardy půdních mikrobiálních metod - ISO



ISO 10381-6:2009	Soil quality -- Sampling -- Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory
ISO 14240-1:1997	Soil quality -- Determination of soil microbial biomass -- Part 1: Substrate-induced respiration method
ISO 14240-2:1997	Soil quality -- Determination of soil microbial biomass -- Part 2: Fumigation-extraction method
ISO 16072:2002	Soil quality -- Laboratory methods for determination of microbial soil respiration
ISO 17155:2002	Soil quality -- Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curves
ISO 15685:2004	Soil quality -- Determination of potential nitrification and inhibition of nitrification -- Rapid test by ammonium oxidation
ISO 14238:1997	Soil quality -- Biological methods -- Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes
ISO 23753-1:2005	Soil quality -- Determination of dehydrogenase activity in soils -- Part 1: Method using triphenyltetrazolium chloride (TTC)
ISO 23753-2:2005	Soil quality -- Determination of dehydrogenase activity in soils -- Part 2: Method using iodotetrazolium chloride (INT)
ISO/DIS 11063	Soil quality -- Method to directly extract DNA from soil samples
ISO/TS 29843-1:2010	Soil quality -- Determination of soil microbial diversity -- Part 1: Method by phospholipid fatty acid analysis (PLFA) and phospholipid ether lipids (PLEL) analysis
ISO/PRF TS 29843-2	Soil quality -- Determination of soil microbial diversity -- Part 2: Method by phospholipid fatty acid analysis (PLFA) using the simple PLFA extraction method
ISO/TS 10832:2009	Soil quality -- Effects of pollutants on mycorrhizal fungi -- Spore germination test
ISO/TS 22939:2010	Soil quality -- Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using fluorogenic substrates in micro-well plates
ISO 14239:1997	Soil quality -- Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions

Odběry půdních mikroorganismů

Odběry jako první krok ekotoxikologie MO

- díky vlastnostem mikroorganismů je téměř nemožné je sledovat přímo v terénu (*in situ*) - jen výjimky (složitá interpretace)
- je tedy potřeba reprezentativní vzorek, se kterým je nakládáno jako se živým systémem, aby se biologické společenstvo příliš neovlivnilo (např. vysušení vzorků, zmrazení, v ledničce ...)
- i tak je vždy laboratorní vzorek něco jiného než „reálný svět“
- je tedy nutná určitá standardizace hlavních podmínek

Techniky odběrů

- zejména kvantifikace může být odběrem a nakládáním se vzorky silně zkreslena
- také kvalitativní parametry (aktivita, diverzita) jsou ovlivnitelné odběrem, zpracováním a manipulací se vzorky
- **Hlavním cílem je:**
 - 1) získat reprezentativní vzorek
 - 2) minimálně či standardně (víme jak, o kolik) odběrem a manipulací změnit kvantitu
- Existuje mnoho metod a teorie kolem vzorkování pro půdu:

ISO 10381-6:1993 Soil quality - Sampling - Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory

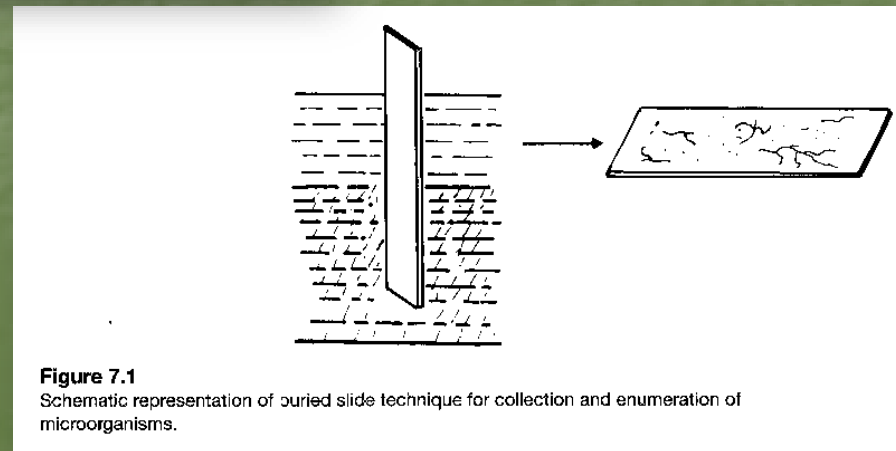
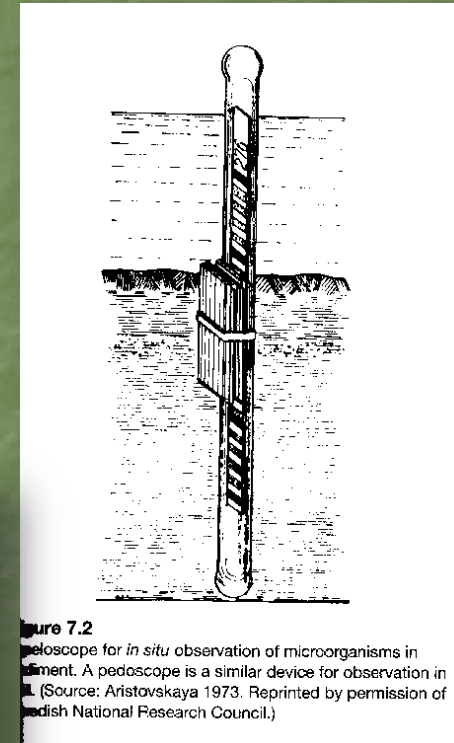
Table 7.1

Comparison of microbial sampling approaches in major natural environments

Environment	Access	Numbers	Sampling devices	Sample processing
Air	Direct	Low	Filters, Andersen samplers	Concentration on filters
Water	Direct or remote	High or low	Nets, containers, filters	Dilution or concentration
Sediment	Remote	High	Grabs, corers	Serial dilution
Soil	Direct	High	Shovels, corers	Serial dilution

Techniky odběrů

- většinou vysoké obsahy mikroorganismů => **stačí aseptické techniky** (rýče, vzorkovací tyče - odeberou směsný vzorek, či celé jádro)
- **další techniky:** zakopaná sklíčka, pedoskop apod.



Kvantifikace půdních mikroorganismů

Přímé mikroskopické počítání bakterií (direct bacterial counts)

- jde vlastně o první ze dvou "počítacích" technik (druhá je tzv. viable / indirect counts, neboli počítání po předchozí izolaci a kultivaci)
- většinou vyšší počty než při viable counts (pouze 10% je kultivovatelných); rozdíl lze zjistit tzv. direct viability counts (DVC) - inkubace s nalidixovou kyselinou - Krogurovou metodou (viz. dále)
- u půdy je potřeba nejdříve dispergace a separace od půdních částic (ty jsou při těchto technikách vážný problém)
- pro zlepšení pozorování se užívá řada barviv (FDA, AO, DAPI, FITC atd.)
- z přímých počtů lze i odvodit biomasu (musíme ale znát např. průměrnou velikost buněk bakterií či délku hyf hub)

TABLE 9.2 Equations for Calculating Biomass

Calculation of bacterial numbers in soil:

$$N_g = N_f \frac{A}{A_m} \frac{V_{sm}}{V_{sa}} D \frac{W_w}{W_d}$$

N_g = number of bacteria per gram dry soil

N_f = bacteria per field

A = area (mm^2) of smear (or filter)

A_m = area (mm^2) of microscope field

V_{sm} = volume (ml) of smear of filter

V_{sa} = volume (ml) of sample

D = dilution

W_w = wet weight soil

W_d = dry weight soil

Bacterial biomass as carbon:

$$C_b = N_g V_b e S_c \frac{\%C}{100} \times 10^{-6}$$

C_b = bacterial biomass carbon ($\mu\text{g/g-soil}$)

N_g = number of bacteria per gram soil

V_b = average volume (μm^3) of bacteria (r^2L ; r = bacterial radius, L = length)

e = density (1.1×10^{-3} in liquid culture)

S_c = solids content (0.2 in liquid culture, 0.3 in soil)

$\%C$ = carbon content (45% dry weight)

Calculation of fungal biomass carbon:

$$C_r = \pi r^2 L S_c \%C \times 10^{10}$$

C_r = fungal carbon ($\mu\text{g carbon/g-soil}$)

r = hyphal radius (often $1.13 \mu\text{m}$)

L = hyphal length (cm/g-soil)

e = density (1.1 in liquid culture, 1.3 in soil)

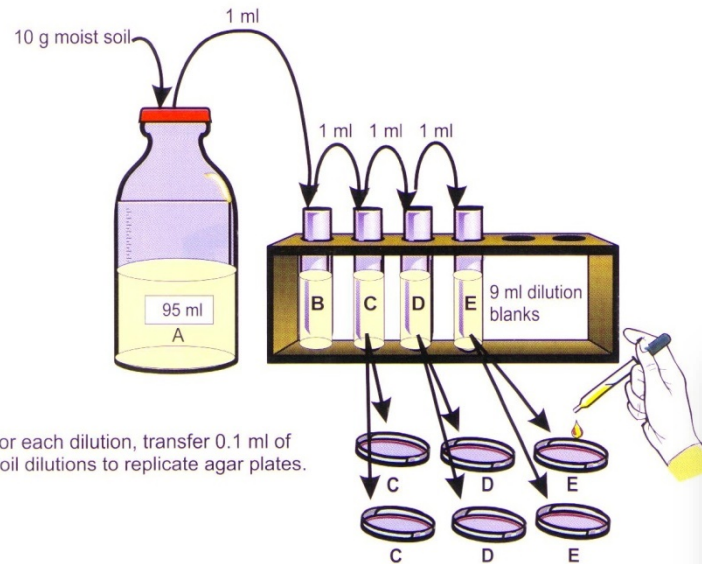
S_c = solids content (0.2 in liquid culture, 0.25–0.35 in soil)

Izolace a kultivace MO z půdy

- potřeba pro různé účely, např. identifikace specifických mikroorganismů, měření diverzity atd.
- počítání mikroorganismů - tzv. viable / indirect counts - použití metod MPN (most probable number) a počítání CFU (colony forming units)
- u půdy vhodná extrakce (např. použití surfaktantu Tween 80 s disperzním činidlem pyrofosfát sodný) následuje násobné ředění (vodou, fyziologickým roztokem či pufrem ...)
- následují obecné kultivační techniky - metoda agarových ploten: **poured a spread plate counts**; Výstupem jsou CFU / hmotnost či objem vzorku

Izolace a kultivace MO z půdy

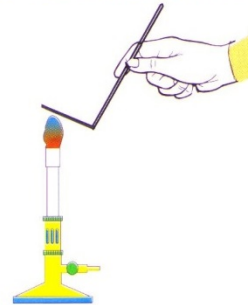
Step 1. Make a 10-fold dilution series.



Step 2. For each dilution, transfer 0.1 ml of soil dilutions to replicate agar plates.

Schéma spread plate counts

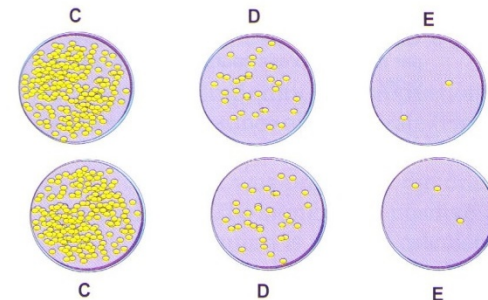
Step 3a. A glass spreading rod is flame sterilized.



Step 3b. Sample is spread on the surface of the agar. This is done by moving the spreader in an arc on the surface of the agar while rotating the plate.

Step 4. Incubate plates under specified conditions.

Step 5. Count dilutions yielding 30-300 colonies per plate. Express counts as CFUs per g dry soil.



From: Maier et al. (2000):
Environmental Microbiology,
Academic Press

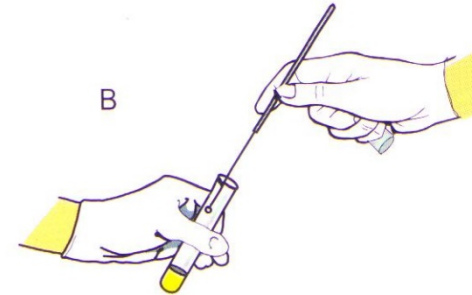
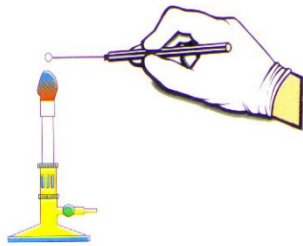
FIGURE 10.1 Dilution and spread plating technique. Here, soil that initially contains billions of microbes is diluted prior to being spread plated to enable discrete colonies to be seen on each plate. Numbers of colonies on each plate can be related to the original soil microbial population. (Adapted from Pepper *et al.*, 1995).

Izolace a kultivace MO z půdy

Izolace jednotlivých druhů půdních MO

- využití při potřebě izolovat jednotlivé mikroorganismy, například při analýze biodiverzity či při identifikacích např. systémem BIOLOG apod.

Step 1 Sterilize inoculating loop

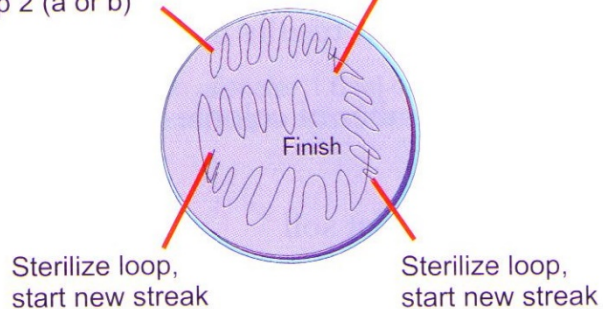


Step 2 Obtain culture from an agar plate (A) or from broth (B).

Step 3 Make successive streaks on an agar plate to isolate single colonies

Start here with inoculation loop full of culture from step 2 (a or b)

Sterilize loop, start new streak



Step 4 Incubate agar plate producing isolated colonies

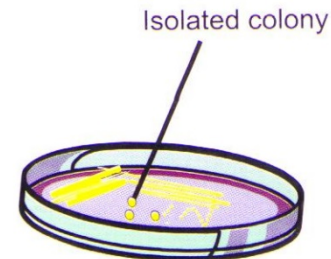


FIGURE 10.3 Isolation of a bacterial colony using the streak plate technique.

From: Maier et al. (2000): Environmental Microbiology, Academic Press

Izolace a kultivace MO z půdy

Dominantní kultivovatelné půdní bakterie

organismus	charakteristika	funkce
Arthrobacter	heterotrofní, aerobní, gramvariabilní. Až 40% kultivovatelných půdních bakterií.	Cykly živin a biodegradace.
Streptomyces	Grampozitivní, heterotrofní, aerobní aktinomyceta. 5-20% kultivovatelných bakterií.	Cykly živin a biodegradace. Produkce antibiotik, např. Streptomyces scabies.
Pseudomonas	Gramnegativní heterotrof. Aerobní nebo fakultativně anaerobní. Vlastní velké množství enzymatických systémů. 10-20% kultivovatelných bakterií.	Cykly živin a biodegradace, včetně těžko rozložitelných organických látek.
Bacillus	Grampozitivní aerobní heterotrof. Vytváří endospory. 2-10% kultivovatelných půdních bakterií.	Cykly živin a biodegradace.

Měření biomasy

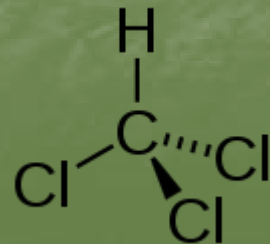
- **BIOMASA** = definována (zejména pro půdu) jako žijící část organické hmoty, jako organismy menší než $10 \mu\text{m}^3$
- nejčastěji se vyjadřuje v jednotkách hmotnosti např. $\mu\text{g } C_{\text{bio}}/\text{g}_{\text{suš.}}$
- tyto parametry mají zastřešující povahu - "overall / general parameters" - tzn. stanovujeme mikrobiální biomasu a nevíme co se děje uvnitř ("black box of microbial biomass")
- nevychází ze separace či izolace mikroorganismů, stanovují se přímo ve vzorcích půdy
- u půdy je C_{bio} cca 1 - 5% C_{org}

Dva hlavní typy využití parametrů:

- 1) stanovení *in situ* mikrobiální biomasy - posouzení biologické kvality půd - bioindikace půdní kvality
- 2) stanovení v kontrolovaném laboratorním pokuse - změny pod vlivem kontrolovaného faktoru (testy toxicity)

Mikrobiální biomasa v půdě

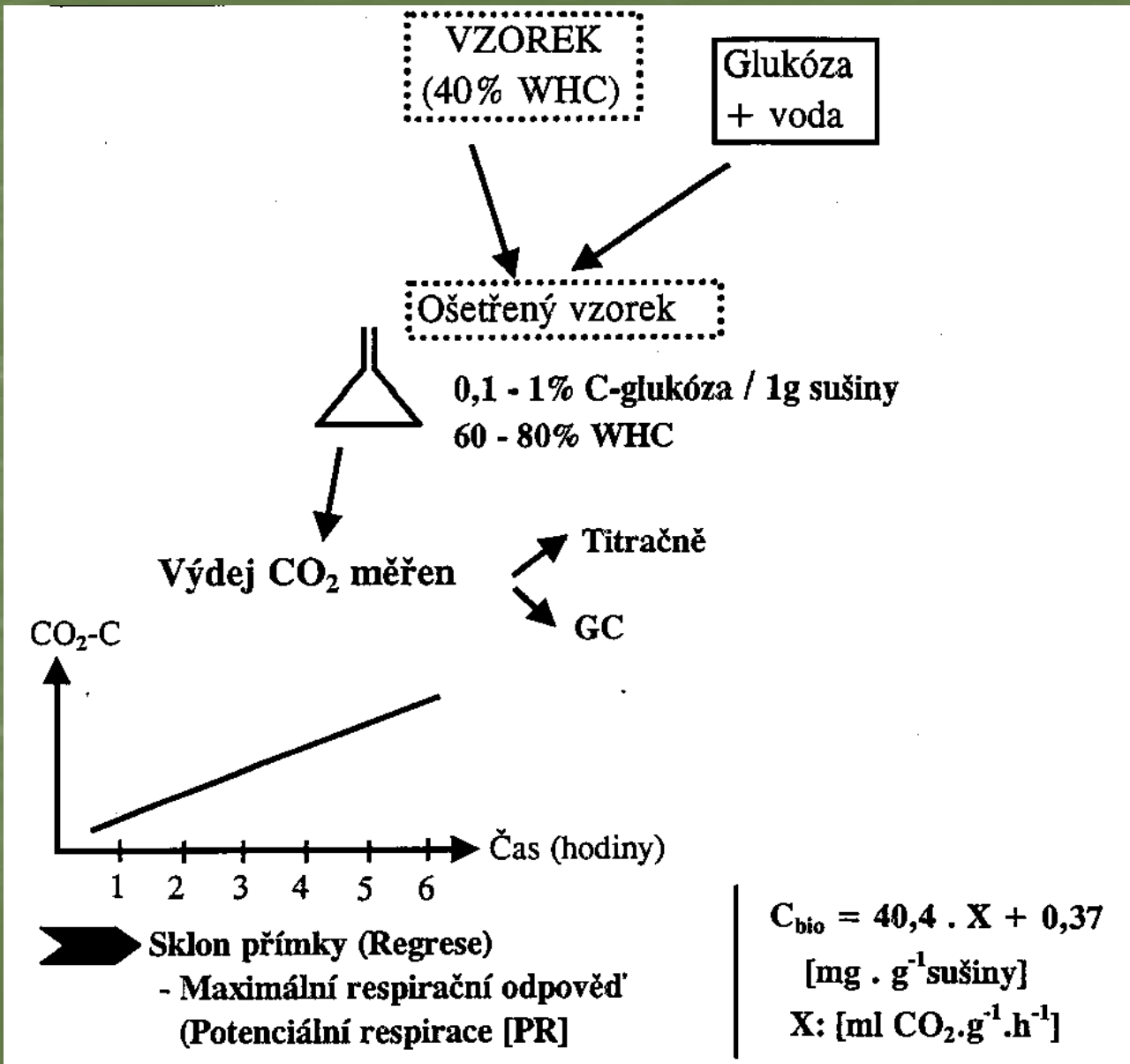
- **Chloroform-fumigační extrakční metoda (FE metoda, CFEM)**
- ISO 14240-2 (1997): Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation-extraction method
- opět probíhá fumigace, ale vzniká extrakt z obou variant (F a NF), který je analyzován na obsah uhlíku; výhodou je, že extrakt může být analyzován prakticky na cokoliv
- pokud je analyzován uhlík, lze to provést:
 - dichromanovou oxidací a následnou titrací či spektrofotometricky
 - oxidací působení $K_2S_2O_8$ (persulfátu) a UV - vznikne CO_2 a ten je měřen IRGA
- výsledek je udáván v $\mu g.g_{suš.}^{-1}$



Mikrobiální biomasa v půdě

- **Metoda substrátem indukované respirace (SIR)**
- ISO 14240-1 (1997): Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrate-induced respiration method.
- založena na empirickém vztahu mezi mikrobiální biomasou a potenciální respirací (respirační rychlost během prvních hodin po přidání maximálně využitelného substrátu - glukózy - v saturující koncentraci)
- někdy využívána jako údaj o aktivní složce mikrobiální biomasy
- rozsah empirického koeficientu ve validačních studiích: 15 - 54!!
- => lépe používat pouze pro měření potenciální respirace – PR (značí se nejčastěji jako SIR)

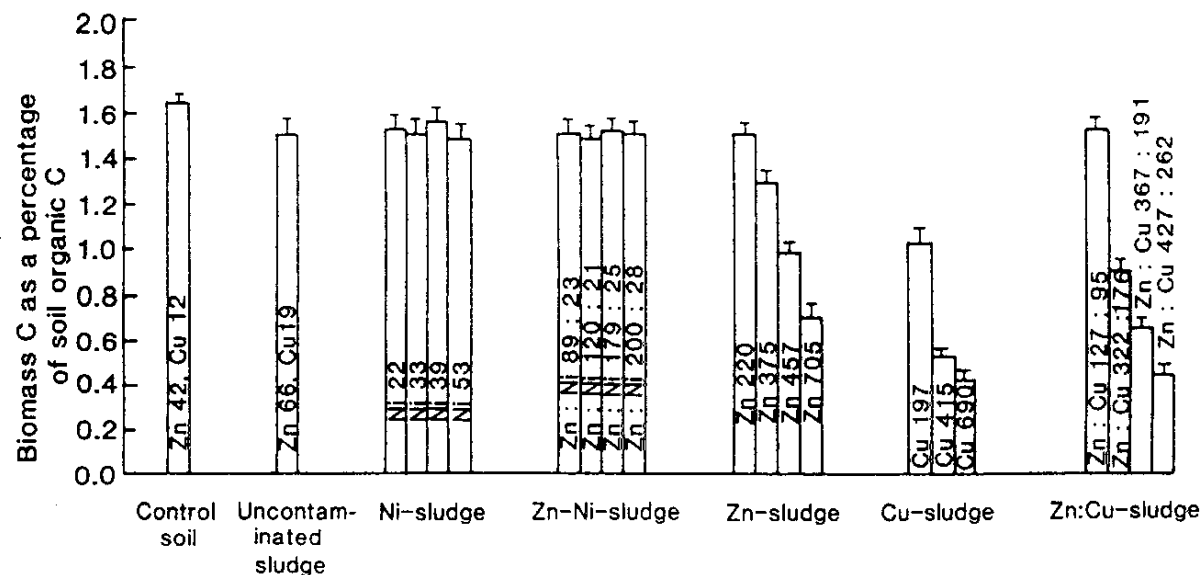
Mikrobiální biomasa v půdě



Mikrobiální biomasa v půdě

- Effects of Zn, Cu, and Ni in sewage sludge on microbial biomass in a sandy loam soil.
- Zejména C_{bio}/C_{org} v půdě je citlivý indikátor dlouhodobých degradací půdní organické hmoty, neboť C_{bio} se snižuje daleko rychleji než celkový organický uhlík
- Toxicita pro C_{bio} v pořadí $Cu > Zn \gg Ni > Cd$

Fig. 4 Microbial biomass C expressed as a percentage of total soil organic C in Gleadthorpe soils (SEM shown). Values given in boxes are the total soil metal concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ soil). From Chander and Brookes (1993). Reproduced by permission of the publisher



Aktivity půdních mikroorganismů

Aktivity mikroorganismů

Mají velmi úzký vztah k jejich funkcím v ekosystému

- jsou smysluplným a zcela nezbytným doplněním údajů o kvantitě mikroorganismů = nestačí jen vysoké množství mikroorganismů, ale hlavně aby byly funkční, tedy aktivní
- co se týká aktivity, je důležitá nejen její úroveň, ale i mnohostranost, diverzita metabolických funkcí
- bohužel, téměř vždy (s výjimkou *in situ* technik) dochází ke zkreslení při přenosu z reálného ekosystému

Příklady často využívaných / měřených mikrobiálních aktivit:

- měření respirace; měření mineralizace dusíku; měření fixace dusíku; měření ATP; produkce tepla; měření nitrifikace, sulfurikace, oxidace železa apod.; měření denitrifikace, desulfurikace; měření enzymových aktivit; atd. atd.

Bazální respirace

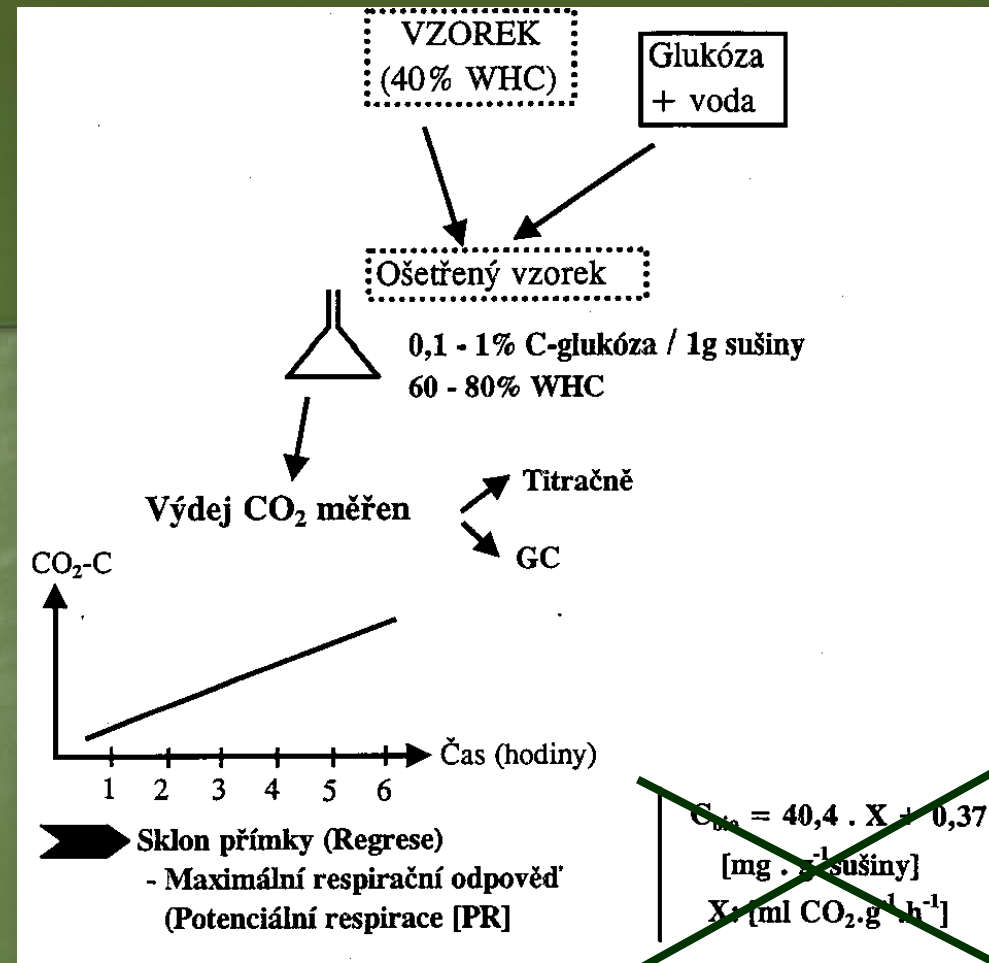
- jako bazální mineralizace (= bez přídavku substrátu) koreluje s obsahem organické hmoty (C_{org})
- ISO 16072 (2002): Soil quality - Laboratory methods for determination of microbial soil respiration
- Důležitý parametr pro biologickou kvalitu půdy – BR (basal respiration)

Limity a nevýhody:

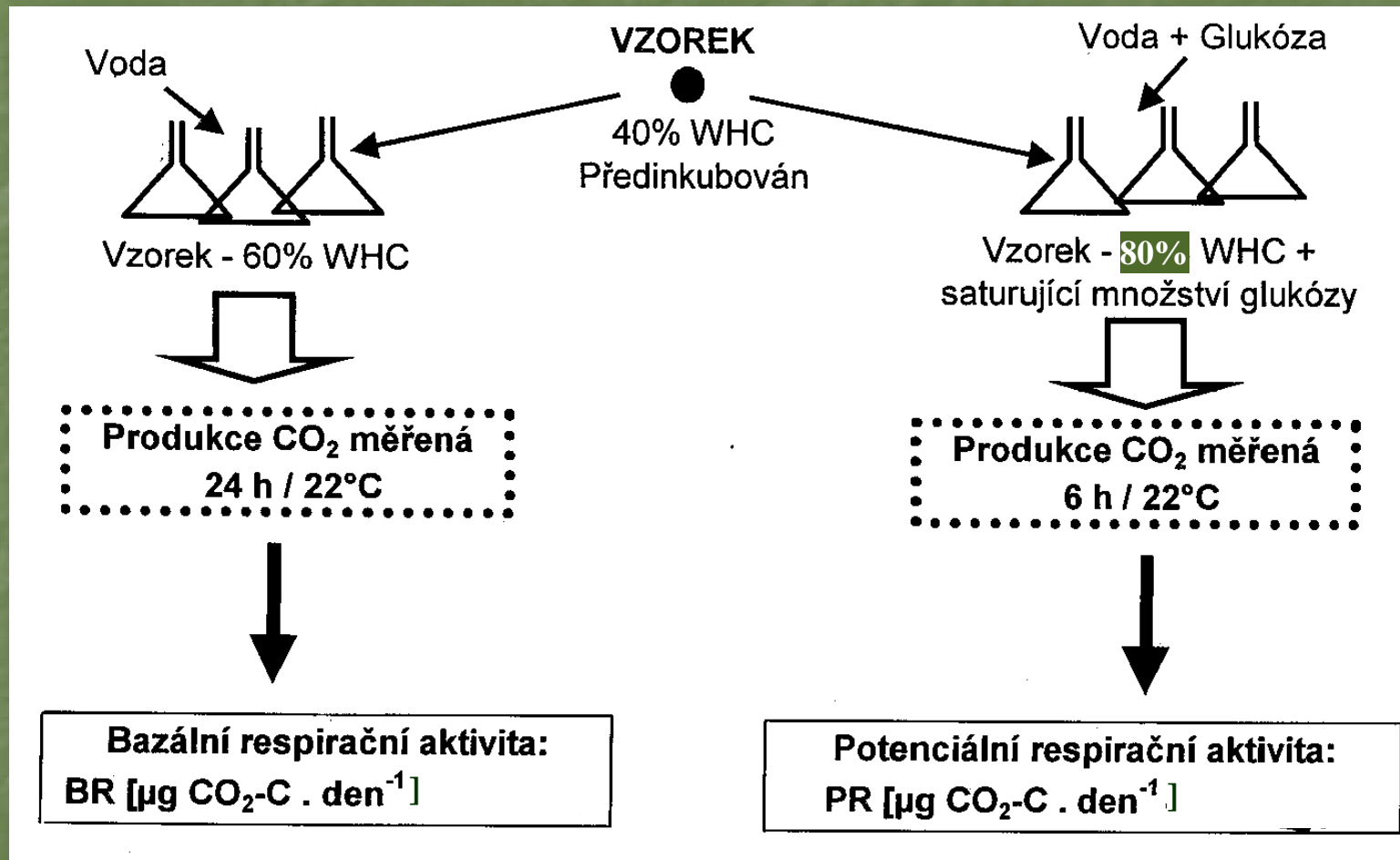
- aktuální přídavek substrátu ovlivňuje podíl aktivních mikroorganismů
- relativní necitlivost k malým dávkám kontaminantů
- nutno kombinovat s jinými parametry (např. mikrobiální biomasa) či potenciální respirace (po přídavku substrátu)
- nutno interpretovat s ohledem na obsah a dostupných organických látek v půdě
- u terénních měření nutno stanovovat opakovaně v čase – silná sezónní závislost

Potenciální respirace

- po přidavku lehce využitelného substrátu není již respirace limitována substrátem a dostáváme obraz potenciální respirace - PR - která odráží skutečné energetické potřeby a mineralizační aktivitu mikrobiálního společenstva
- měření např. jako produkce CO₂ v metodě SIR

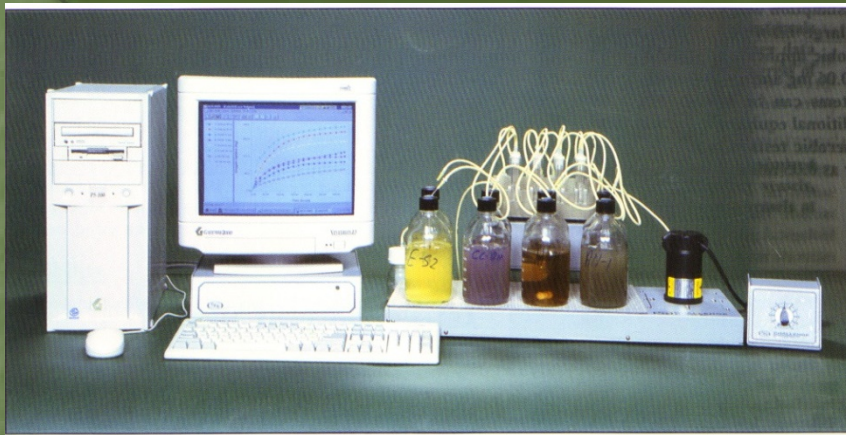


Potenciální vs. bazální respirace

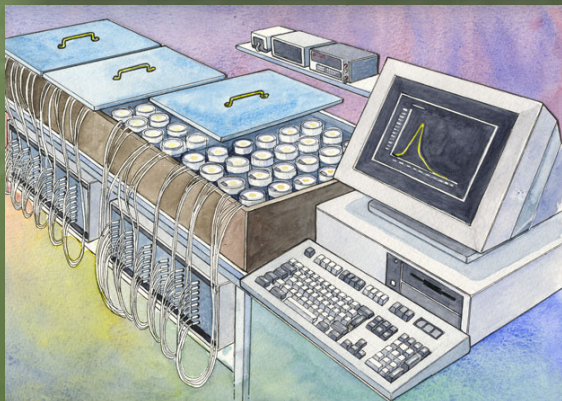


Mineralizace / respirace / využití C substrátů

- **Respirometrie** - systémy kontinuálně měřící respiraci, přesněji spotřebu kyslíku či produkci oxidu uhličitého
- Různé metody detekce, různý design přístrojů
- Využití pro aerobní i anaerobní aplikace, pro studium biodegradací, kinetiku růstu sledovanou pomocí produkce produktu atd.



OxiTOP – měření respirace pomocí změny tlaku



Example of application using OxiTOP... measuring results

Růstové křivky měřené pomocí produkce CO₂

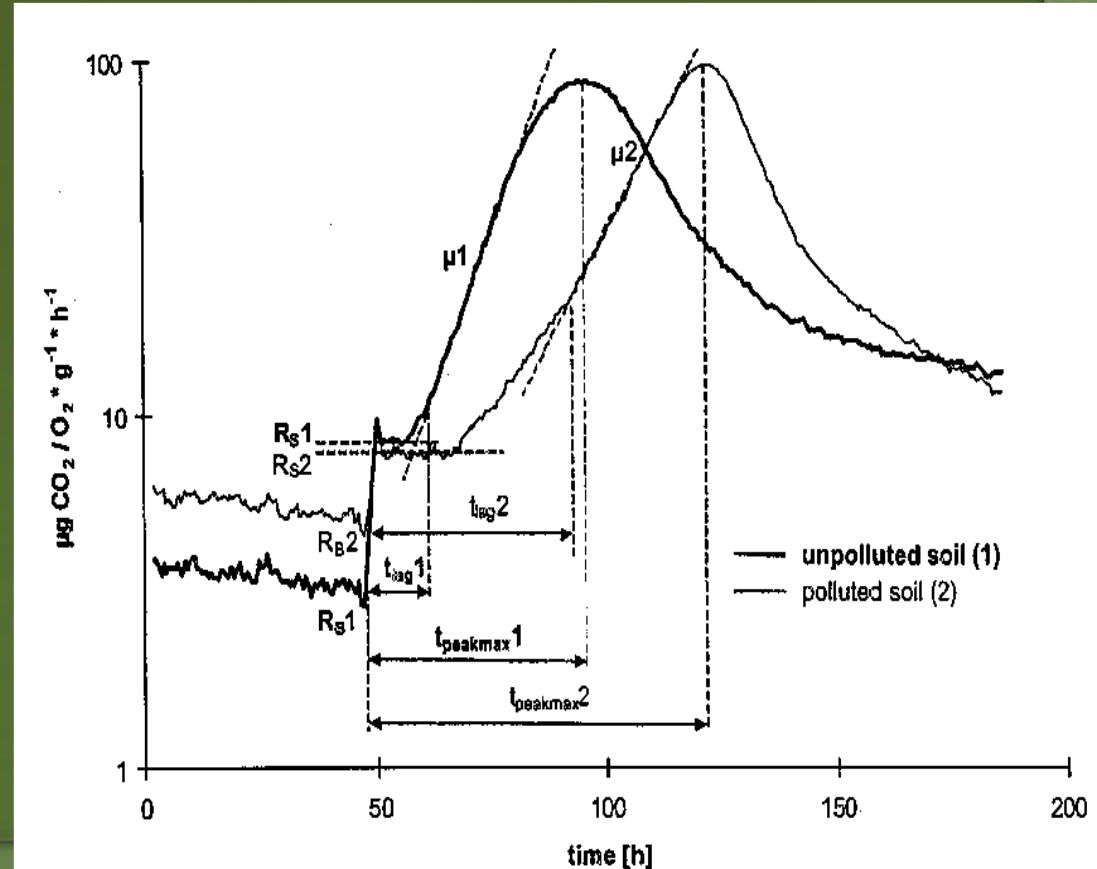
- ISO 17155 (2002): Soil quality - Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curves
- metoda stanovení "kontaminace" půdy (tzv. ecotoxic potential) a efektu kontaminace v laboratorních studiích

Důležité parametry:

- lag time - čas od přidavku substrátu do počátku exponenciálního růstu – reflektuje vitalitu "growers,"
- růstová rychlost μ
- aktivační koeficient respirace:
 $Q_R = R_B/R_S$
- čas k dosažení píku

Znečištěná půda:

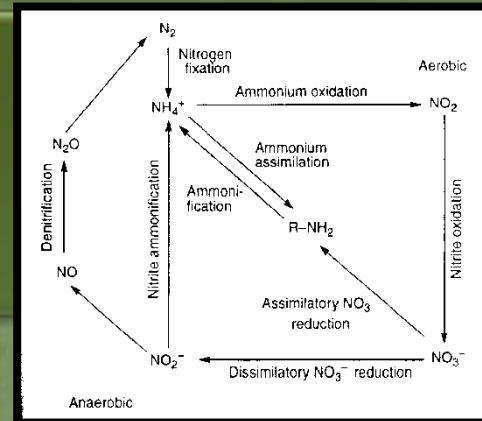
- $Q_R > 0,3$
- lag > 20h
- $t_{peakmax} > 50h$



Aktivity spojené s přeměnami dusíku

Mikroorganismy jsou naprosto stěžejní:

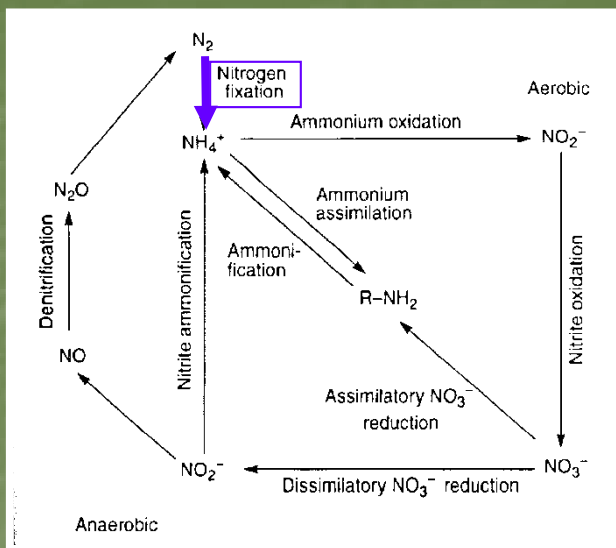
- 1) kromě sinic a symbiotických bakterií nedovedou organismy poutat N_2
- 2) zpětné uvolňování dusíku do atmosféry
- 3) transformace forem dusíkatých sloučenin



AKTÉRIE A PROCESY ZÚČASTNĚNÉ NA KOLOBĚHU DUSÍKU.

Fixace dusíku		Oxidace sloučenin dusíku (tvorba dusitanů a dusičnanů)		Redukce dusičnanů (tvorba amoniaku a denitrifikace)
Nesymbiotické bakterie (volně žijící bakterie)		<i>Nitrobacteraceae</i>		Baktérie způsobující amonifikaci bílkovin a denitrifikaci, využívající NO_2^- a NO_3^- jako akceptory vodíku
Symbiotické bakterie (žijící symbioticky s vlkvovitými rostlinami)		Jiné bakterie oxidující NO_2^- na NO_3^-		
<i>Azotobacteraceae</i>	Jiné bakterie	Oxidace		
		NH_3 na NO_2^-	NO_2^- na NO_3^-	
<i>Azotobacter</i> <i>Azomonas</i> <i>Beijerinckia</i> <i>Derxia</i>	<i>Enterobacter</i> <i>Nocardia</i> <i>Clostridium</i> <i>Rhodospirillales</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Nitrosomonas</i> <i>Nitrosococcus</i> <i>Nitrosolobus</i>	<i>Nitrobacter</i> <i>Nitrospina</i> <i>Nitrococcus</i>
			<i>Nocardia</i> <i>Streptomyces</i>	<i>Thiobacillus denitrificans</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> Některé druhy rodu <i>Bacillus</i> aj.

Fixace dusíku



- N_2 je fixován do NH_3 : $N_2 + 6e^- \rightarrow 2NH_3$ (+630 kJ/mol)

- sinice (hlavně ve vodách - *Aphanizomenon*, *Nostoc*, *Anabaena*); symbiotické bakterie (*Rhizobacteriaceae* - luštěniny); kolem 100 druhů volně žijících bakterií aerobních i anaerobních (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Clostridium*)

- systemy se liší v množství poutaného dusíku; nejvíce fixují symbiotické asociace, neboť v okolí kořenů je přísun živin

- jde o proces spotřebovávající energii; probíhá jen v dobrých podmínkách; je tedy citlivý endpoint ke stresu

- inhibující vliv má obecně amoniak a pro volně žijící fixátory vysoké koncentrace kyslíku; některé ale mají systém chránící nitrogenázu před působením kyslíku

Organism groups ^a	kg N fixed ha ⁻¹ year ⁻¹
Free-living heterotrophic bacteria	1 – 2
Cyanobacteria	5 – 30
Symbiotic associations (e.g., <i>Rhizobium</i> -clover)	100 – 200

Pozn.: organismy kterým stačí N_2 jako jediný zdroj dusíku se nazývají diazotrofní

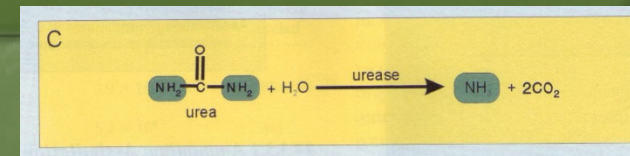
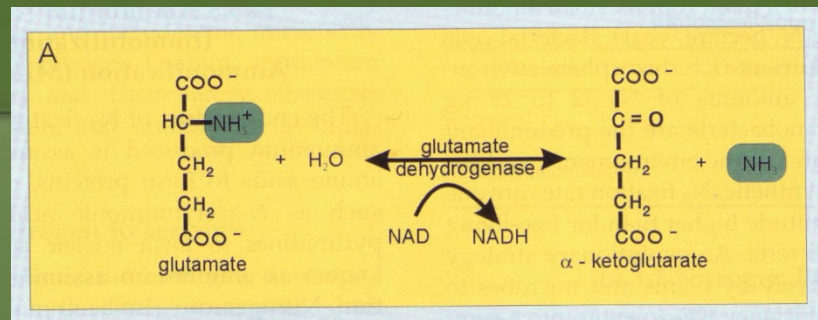
Fixace dusíku

Měření: Acetylene reduction assay (ARA)

- využívá větší afinity nitrogenázy pro acetylen
 - systém s půdou, případně i s rostlinami, je vzduchotěsný
 - prostor nad půdou se z 10% nasytí acetylénem či směsí acetylen-kyslík a po několika hodinách se měří ethylen
 - redukovaný ethylen se stanovuje GC s FID detektorem
 - užívá se faktor 3 molů ethylenu na 1 mol fixovaného N_2
-
- je velmi citlivou, levnou a jednoduchou metodou
 - alternativou je měření fixace ^{15}N - nutná drahá instrumentace (IRMS)
 - může se také sledovat rychlost růstu organismů na médiu bez dusíku
 - často se sleduje také přítomnost hlízek u cílových rostlin

Amonifikace

- proces kdy se NH_3 uvolňuje z glutamátu (uvnitř buněk)
- či proces kdy enzymem ureázou se štěpí močovina
- nebo extracelulární degradace proteázami, lysozomy, nukleázami
- Závislost na množství N v prostředí:
 - při poměru C:N < 20 převládá amonifikace
 - při C:N > 20 asimilace
- Metodicky lze rozlišit amonifikaci jako bazální úroveň mineralizace N - obdoba bazální respirace v cyklu C; a potenciální amonifikaci po přidavku substrátu (argininu) - obdoba potenciální respirace



Mineralizace dusíku

- AMONIFIKACE JE SOUČÁSTÍ ŠIRŠÍHO POJMU: MINERALIZACE DUSÍKU
- NEBOŤ ČÁST NH_3 SE DÁLE OXIDUJE PŘI NITRIFIKACI
- metodicky nelze obě fáze příliš dobře oddělit!!!
- pokud chceme znát skutečnou (ne potenciální) amonifikaci je jedinou možností měření se značeným dusíkem $^{15}\text{NH}_4^+$ či vytvořit anaerobní prostředí zatopením vzorků

Amonifikace

Měření: Amonifikace - AMO (postup UKZUZ)

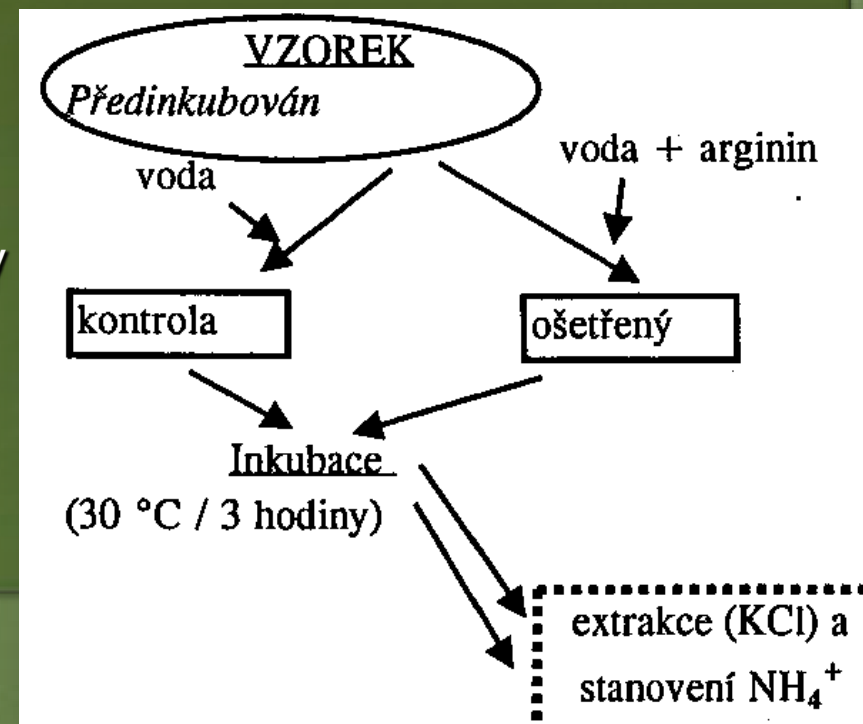
- vzorek zatopený vodou je inkubován týden při 40°C
- stanovení amonných iontů se provádí po extrakci 1M KCl (1:5) spektrofotometricky (ISO 14256): při 630 nm se sleduje zabarvení vzniklé reakcí s NaOCl a phenolátem sodným (salicylanem sodným), katalýza nitroprusidem sodným (Berthelotova reakce)
- jinou možností je stanovení iontově selektivní plynovou elektrodou (ISE): amonné ionty se převedou na amoniak při pH 11-13 přidávkem 10M NaOH; potenciál se měří elektrodou, přičemž ke kalibraci se užije roztoků síranu amonného
- vyjadřuje se jako $\mu\text{g NH}_4^{+}\text{-N} \cdot \text{g}_{\text{suš.}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$
- Alternativou je měření se značeným dusíkem $^{15}\text{NH}_4^{+}$

Amonifikace - potenciální

Měření: Potenciální amonifikace (PAMO) - test s argininem

- přidavek substrátu (argininu) a stanovení amonných kationtů po 3h inkubace půdy při 30°C
- stanovení amonných iontů se provádí po extrakci 2M KCl (1:4) spektrofotometricky (ISO 14256): při 630 nm se sleduje zabarvení vzniklé reakcí s NaOCl a phenolátem sodným (salicylanem sodným), katalýza nitroprusidem sodným (Berthelotova reakce)
- jinou možností je stanovení iontově selektivní plynovou elektrodou (ISE): amonné ionty se převedou na amoniak při pH 11-13 přidavkem 10M NaOH; potenciál se měří elektrodou, přičemž ke kalibraci se užije roztoků síranu amonného

- Metoda dává falešné výsledky v kyselých půdách a v půdách po aktuálním přidavku organické hmoty
- PAMO není selektivně inhibována cycloheximidem či streptomycinem a proto nelze odděleně měřit amonifikaci bakterií a hub



Nitrifikace

- významný proces, umožňuje mobilitu dusíku v půdě

Dva kroky:

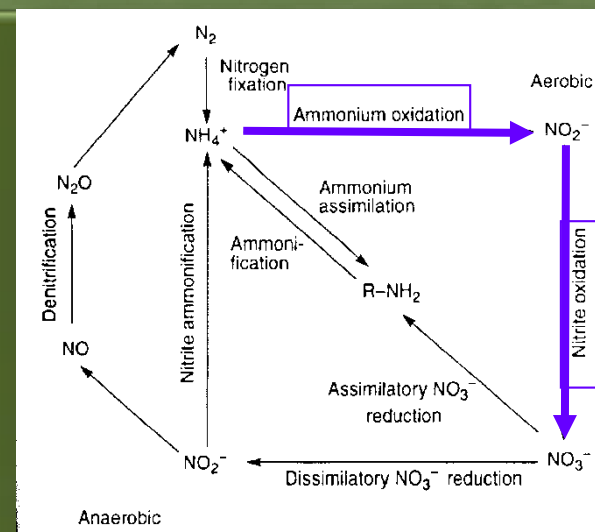


$$\Delta G = -66 \text{ kcal}$$



$$\Delta G = -18 \text{ kcal}$$

- oba kroky jsou **striktně aerobní**
- zastává jej jen několik rodů, v půdě první krok např. rod *Nitrosomonas*, *Nitrococcus* a druhý krok např. rod *Nitrobacter*
- zdrojem uhlíku je pak CO₂
- enzym pro první krok je amoniak monooxygenáza (AMO), která má širokou substrátovou specifitu a může kometabolicky oxidovat i některé polutanty např. TCE či alkany až do C₈
 - **využití při bioremediacích !!!**



Genus	Species
Ammonium oxidizers	
<i>Nitrosomonas</i>	<i>europaea</i> <i>eutroplus</i> <i>marina</i>
<i>Nitrosococcus</i>	<i>nitrosus</i> <i>mobilis</i> <i>oceanus</i>
<i>Nitrospira</i>	<i>briensis</i>
<i>Nitrosolobus</i>	<i>multiformis</i>
<i>Nitrososphaera</i>	<i>tenuis</i>
Nitrite oxidizers	
<i>Nitrobacter</i>	<i>winogradskyi</i> <i>hamburgensis</i> <i>vulgaris</i>
<i>Nitrospina</i>	<i>gracilis</i>
<i>Nitrococcus</i>	<i>mobilis</i>
<i>Nitrospira</i>	<i>marina</i>

Nitrifikace

Velmi dobrý indikátor stresu, je silně inhibována polutanty - důvody:

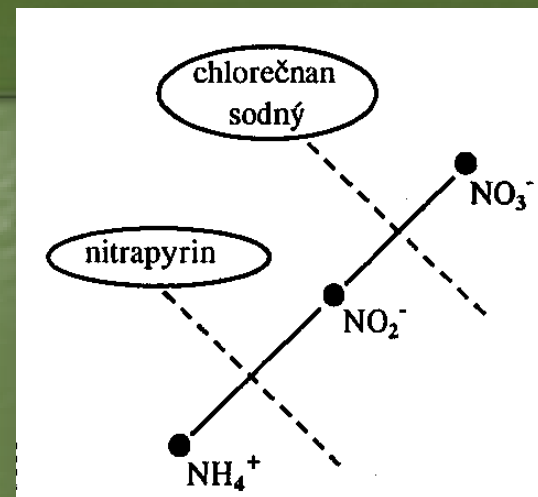
- 1) celý systém zisku energie je velmi náročný: 1. krok potřebuje oxidaci 34 molů amoniaku k fixaci jednoho molu CO_2 , druhý krok dokonce oxidaci 100 molů NO_2^- !!
- 2) dva kroky s přičiněním různých populací, druhý krok je méně energeticky výtěžný (jen 70 kJ/mol!) - pokud kroky navazují, nedochází k negativní kumulaci dusitanů (snižuje pH prostředí, toxický ..) dusitany inhibují první krok !!!
- 3) obecně už tak dost citlivý proces k environmentálním podmínkám: pH optimum je 6,6 - 8,0; při pH < 4,5 se zastaví

Pozn: existují i mikroorganismy heterotrofní, které provádí nitrifikaci a není známo proč; představují minoritní význam ve srovnání s autotrofní nitrifikací

Nitrifikace

Potenciální nitrifikace (SNA) (NEA - nitrifier enzyme activity) (potential ammonium oxidation - PAO)

- ISO 15685 (2004): Soil quality - Determination of potential nitrification - Rapid test by ammonium oxidation
- půda je inkubována v pufované suspenzi s roztokem chlorečnanu sodného (inhibuje oxidaci dusitanů na dusičnany) s přídatkem saturujícího množství síranu amonného (substrát pro oxidaci amoniaku na dusitany)
- po 6 hod či déle, eventuálně každé 2 hodiny se měří koncentrace NO_2^-
- koncentrace dusitanů se měří po extrakci KCl spektrofotometricky reakcí s sulfanilamid a Griess-Ilosvay činidlem = N-(1-naftyl)ethylen-diamin dihydrochlorid
- jako referenční látku lze užít nitrapyrin



Nitrifikace

Měření: Nitrifikace (LNA)

- Delší inkubace se příliš nedoporučují, neboť mohou probíhat změny společenstva.
- ISO 14238 - Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes
- půda inkubována po přidavku 1% síranu amonného; po 1-3 týdnech stanovení zbylého NH_4^+ či vzniklého NO_3^-
- jak pro stanovení jako parametru kvality půdy
- tak pro testování toxicity látek na N mineralizaci

Test toxicity:

- půda pro test toxicity musí být s Corg 0,5 - 1,5% a nízkým obsahem jílu
- přidává se organický zdroj dusíku - vojtěška (C:N = 16)
- testovaná látka se přidá v cca 5 koncentracích a po 28 denní inkubaci se měří NO_3^-
- výsledkem je procentuální inhibice

N mineralizační potenciál

- Při stanovení mineralizace dusíku se často spojují oba procesy (amonifikace a nitrifikace) v tzv. N mineralization potential
- je to vyprodukovaná suma $\text{NH}_4^+ + (\text{NO}_2^-) + \text{NO}_3^-$ v půdě na konci inkubace (extrakce roztokem KCl)
- pokud testujeme vliv chemické látky, dostáváme klasický vztah dávka odpověď s IDs
- Stanovení koncentrace dusičnanových a dusitanových aniontů v půdách:

Dusitany

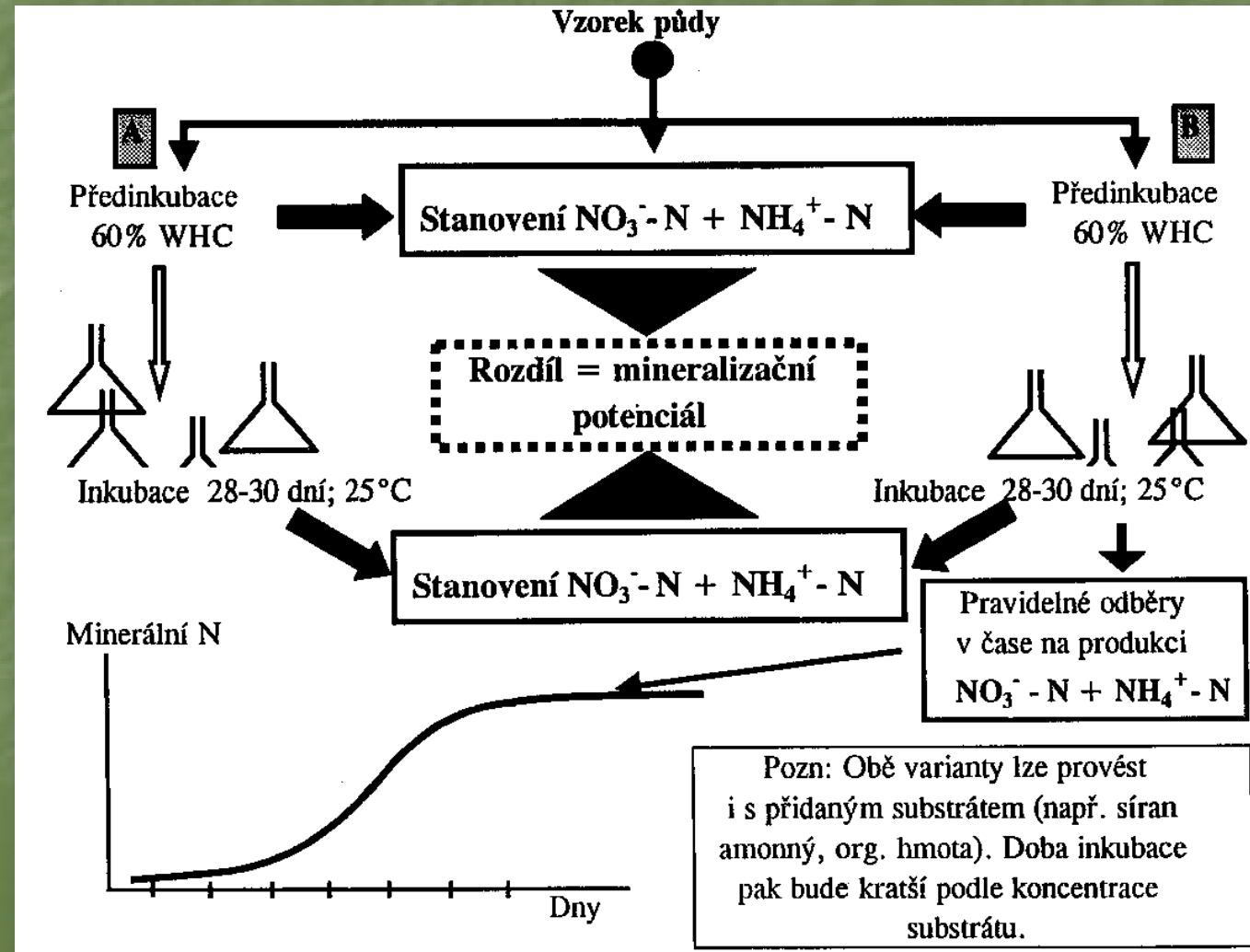
- dle ISO 14256 spektrofotometricky - reakcí s Griess-Ilosvayovým činidlem (sulfanilamid a N-1-naftyl etylendiamin chlorid) tvoří azobarvivo (543 nm)

Dusičnany

- nejprve nutno redukovat na dusitany (reduktor z kadmia – Devardova slitina) a pak stejné stanovení
- nebo UV spektrofotometrií při 210 nm
- nebo iontově selektivní elektrodou ISE
- v dnešní době existují automatické analyzátory: FIA - flow injection analyzer

N mineralizační potenciál

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



Denitrifikace

- v anaerobních podmínkách
- dusitany a dusičnany slouží jako TEA
- N₂O – skleníkový plyn !!!
- Měření: kolorimetrickými technikami, iontově selektivními elektrodami, metodou "acetylene block" (zablokuje N₂O reductázu a N₂O je měřen GC)

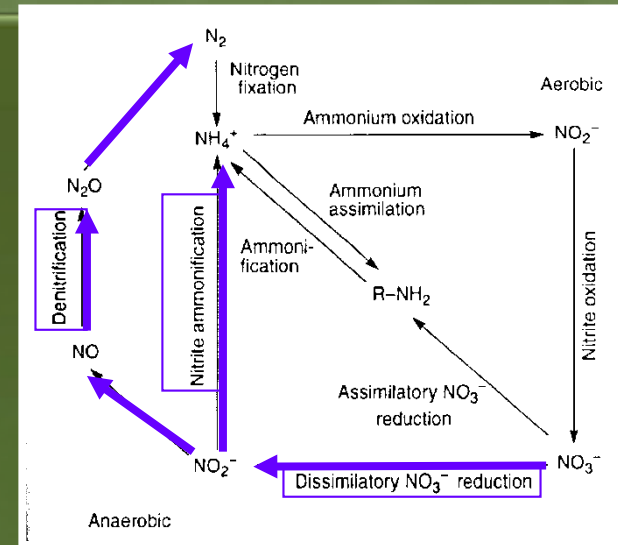
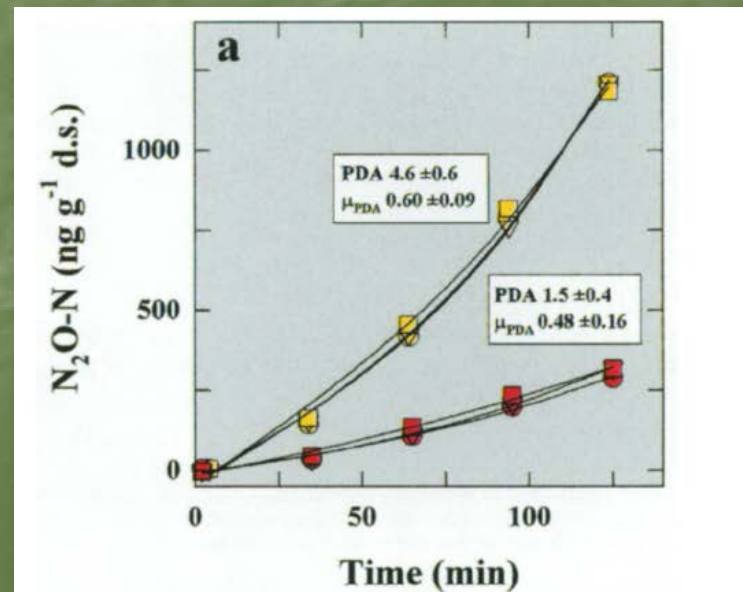


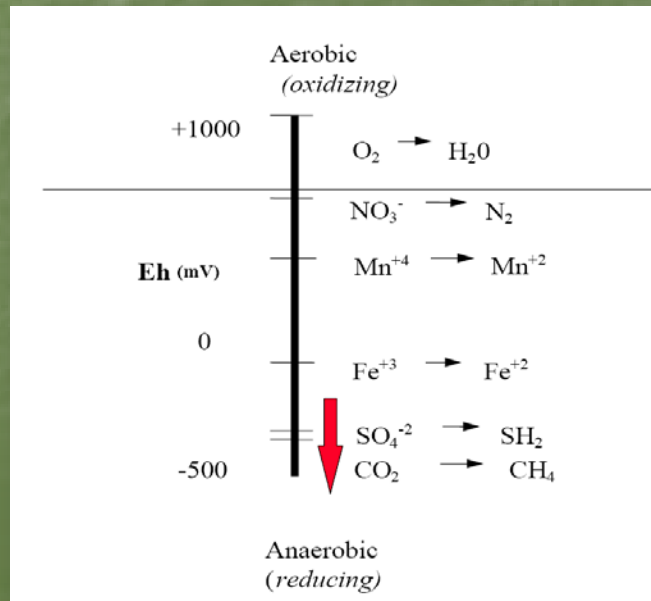
Figure 1. Examples of (a) potential denitrification activity (PDA); and (b) potential ammonium oxidation activity (PAO) patterns in soil without (yellow symbols) and with (red symbols) the addition of 100 μg loxynil per gram dry soil. The different symbols (\bullet , \blacksquare , \blacktriangle) are three replicates of the same test. (Units given for PDA are $\text{ng N}_2\text{O-N g}^{-1}$ dry soil (d.s.) min^{-1} and for μ_{PDA} hr^{-1} , and units for PAO are $\text{ng NO}_2^{-}\text{-N g}^{-1}$ d.s. min^{-1} .)



Respirace - typy

„Anaerobní respirace“

Typ respirace	Redukční reakce Akceptor elektronů \Rightarrow produkt	Oxidační reakce Donor elektronů \Rightarrow produkt
Aerobic	$O_2 \Rightarrow H_2O$	$CH_2O \Rightarrow CO_2$
Denitrifikace	$NO_3^- \Rightarrow N_2$	$CH_2O \Rightarrow CO_2$
Redukce Mn	$Mn^{4+} \Rightarrow Mn^{2+}$	$CH_2O \Rightarrow CO_2$
Redukce dusičnanů	$NO_3^- \Rightarrow NH_4^+$	$CH_2O \Rightarrow CO_2$
Redukce síranů	$SO_4^{2-} \Rightarrow HS^-, H_2S$	$CH_2O \Rightarrow CO_2$
Methanogeneze	$CO_2 \Rightarrow CH_4$	$CH_2O \Rightarrow CO_2$



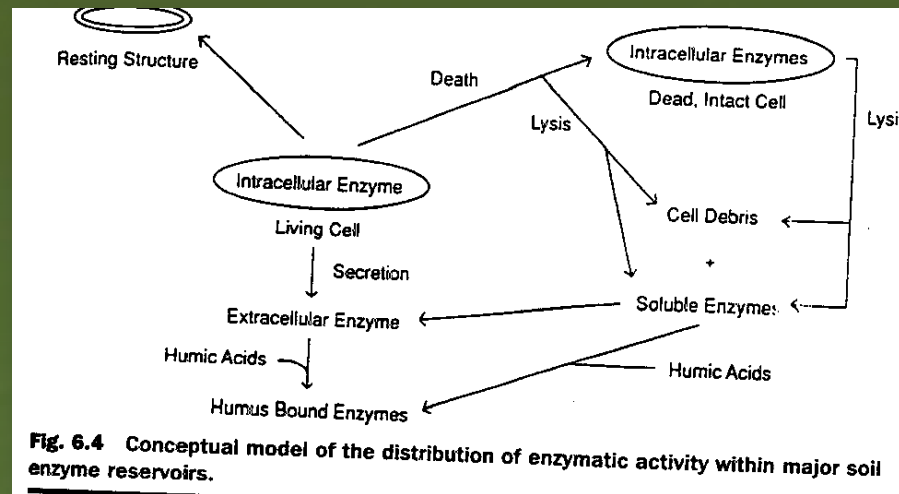
Enzymatické aktivity

Sledování enzymatických aktivit - enzymy v půdě

- obecný princip spočívá v přidavku nadbytku substrátu a sledování jeho úbytku či produkce produktu za současné inhibice růstu mikroorganismů
- měří se enzymatický potenciál či kinetické parametry V_{max}

Nejčastěji sledovány:

- dehydrogenázy
- proteázy - inkubace s kaseinátem sodným
- ureázy - inkubace s močovinou
- amidázy
- fosfatázy
- celulázy
- β - galaktozidázy



Dehydrogenázová aktivita

- enzym, který z ekotoxikologického hlediska vysoce převažuje všechny ostatní
- dehydrogenázová aktivita je tedy **mírou celkové mikrobiální aktivity**

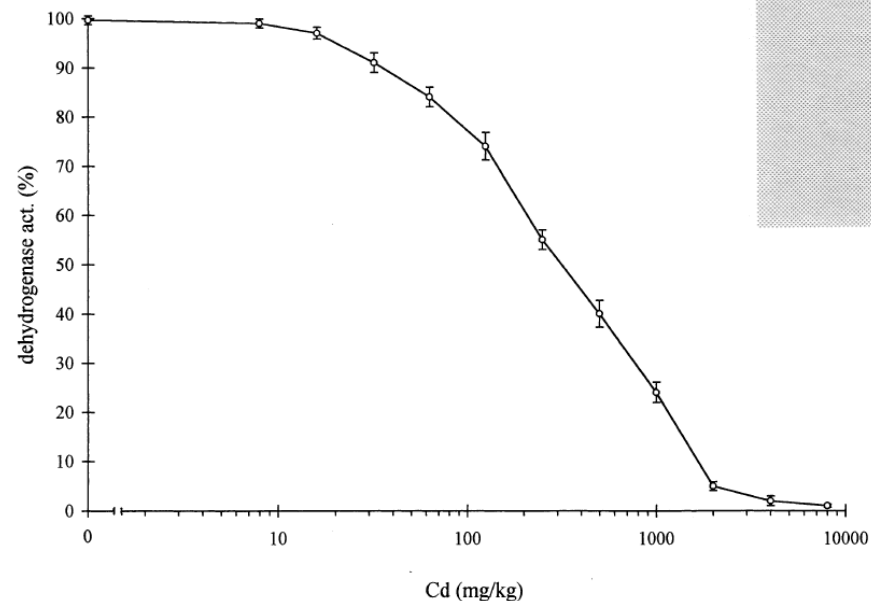
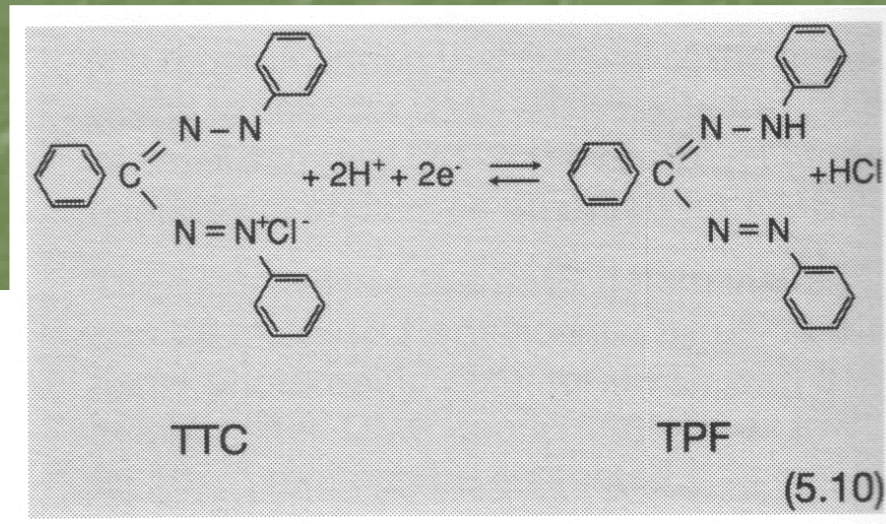
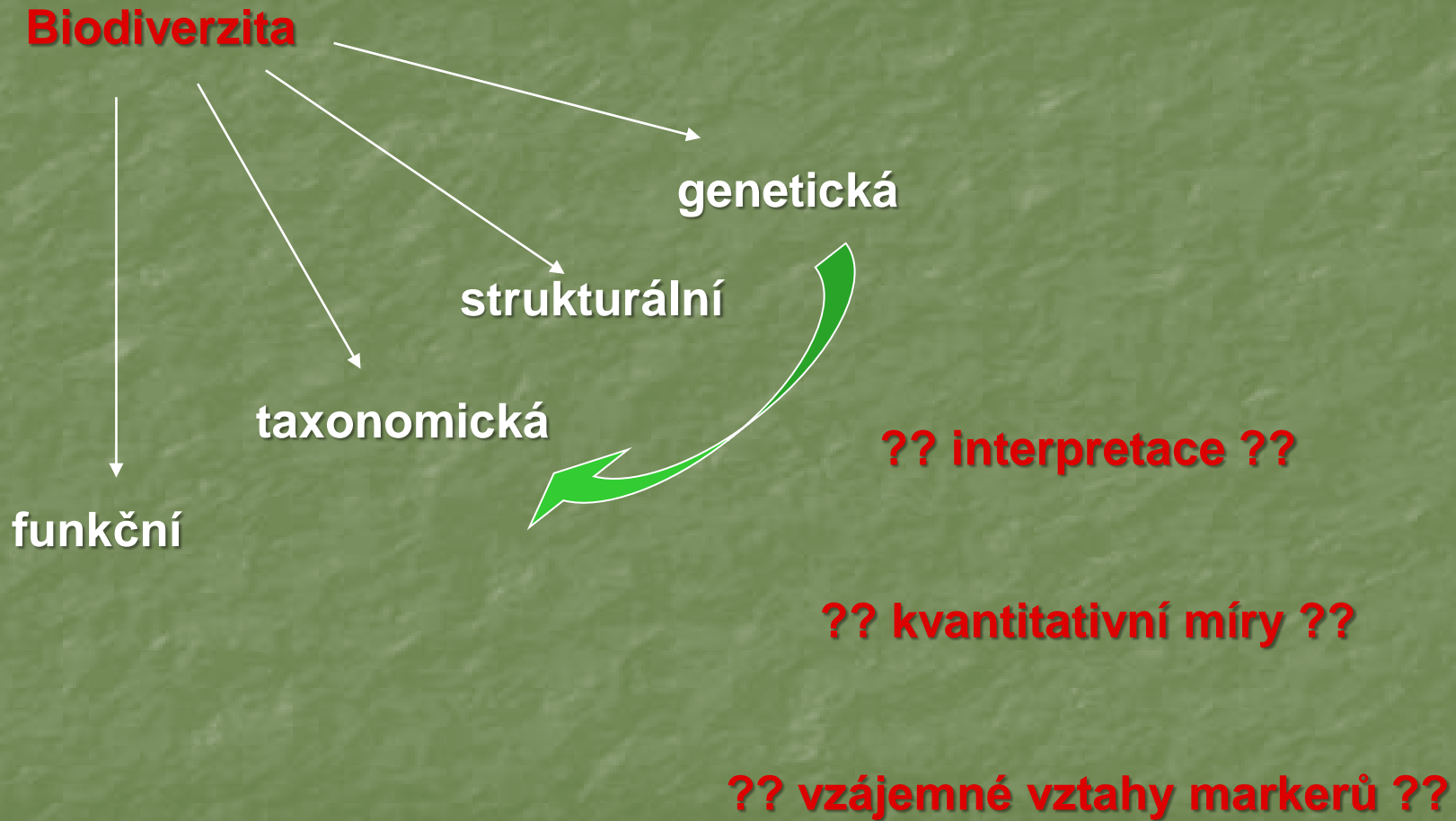


FIG. 1. Dose-response curve for Cd (as $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) and soil samples from the surface horizon of a Calcaric Regosol (dehydrogenase test; mean responses marked with 95% confidence limits).



Diverzita půdních mikroorganismů

Biodiverzita půdních mikroorganismů



Analýza lipidů

- PLFA jako biomarkery
- informují o složení mikrobiálního společenstva:

větvené PLFA	typicky bakteriálního původu
PUFA, zejména 18:2	charakteristické pro Eukaryota
suma relativní abundance iso a anteiso izomerů 15:0 větvených PLFA	reprezentují bakterie
poměr mezi iso(anteiso) 15:0 větvenými PLFA a 16:0 větvenými PLFA	= relativní zastoupení bakterií
18:2 ω FA	= houby

- poskytují ale i další informace:

poměr cis a trans izomerů MUFA	pokud vyšší než 1 může značit strádání či env. stres
poměr nasycených / nenasycených	indikace stresu
poměr cyklopropyl FA / jejich monoenoic prekursorů	
poměr iso 15:0 / anteiso 15:0 a iso 17:0 / anteiso 17:0	

Funkční diverzita – systém Biolog

	C1 Tween 40	C2 l-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine
	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
	E1 α -Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3	E4 L-Threonine
	F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid
	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α -Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl-amine
	H1	H2	H3	H4

Table 1

Carbon substrates in Biolog ECO microplates. Assignment to biochemical categories follows that of Insam (1997)

Polymers

- α -cyclodextrin
- glycogen
- Tween 40
- Tween 80

Carbohydrates

- D-cellobiose^a
- i-erythritol
- D-galactonic acid γ -lactone
- N-acetyl-D-glucosamine
- glucose-1-phosphate
- β -methyl-D-glucoside
- D,L- α -glycerol phosphate
- α -D-lactose
- D-mannitol
- D-xylose^a

Carboxylic acids

- γ -hydroxybutyric acid
- α -ketobutyric acid
- D-galacturonic acid
- D-glucosaminic acid
- itaconic acid
- D-malic acid^a
- pyruvic acid methyl ester

Amino acids

- L-arginine^a
- L-asparagine
- glycyl-L-glutamic acid
- L-phenylalanine
- L-serine
- L-threonine

Amines

- phenyl ethylamine
- putrescine

Phenolic compounds

- 2-hydroxybenzoic acid^a
- 4-hydroxybenzoic acid^a

^a Indicates substrates not present in GN plates.

Genetická diverzita MO

Nejčastější metody pro získání „genetického fingerprintu společenstva“

- ARDRA - amplifikovaná ribosomální DNA restrikční analýza
- RFLP - restrikční analýza mnohotvárnosti délky fragmentů
- T-RFLP - koncová restrikční analýza mnohotvárnosti délky fragmentů
- DGGE - denaturující gradientová gelová elektroforéza
- TGGE - teplotní gradientová gelová elektroforéza
- ARISA - automated ribosomal intergenic spacer analysis - různorodost délek mezi geny malé a velké ribozomální podjednotky
- Microarrays - mikročipy
- SIP (stable isotope probing) – značení stabilními izotopy

Kombinace přístupů

Kombinace přístupů

Grouping of the Soil Microflora According to Possibilities to Study Populations and Activities at Different Functional Levels

Functional level	Examples of observations
Organisms	Genetic changes Enzyme activities
Populations	Physiological changes, e.g., growth Biomass (bacterial, fungal, total) Number of populations, e.g., actinomycetes, bacteria, fungi Specific organisms, e.g., ammonifiers, cellulose degraders, cyanobacteria, denitrifiers, ligninolytic organisms, mycorrhiza (ecto, arbuscular), nitrifiers (ammonium oxidizers, nitrite oxidizers), proteolytic organisms, <i>Rhizobium</i> spp.
Activities	ATP-measurement, CO ₂ production, heat production, O ₂ consumption Ammonification, cellulose decomposition, denitrification, litter decomposition, nitrogen fixation (<i>Rhizobium</i> , heterotrophs, cyanobacteria), straw decomposition, sulfur oxidation
Interactions	Combination of activity and biomass data, giving specific activities Mycorrhiza (ecto, arbuscular), pathogens, physiological changes, <i>Rhizobium</i> , rhizosphere organisms (associate nitrogen-fixers, producers of growth stimulating or inhibiting substances) Soil aggregate stabilization (bacteria, fungi)

Kombinace přístupů

Soil ecosystem parameter		Microbial indicator
Function	C-cycling	Soil respiration
		Metabolic quotient (qCO_2)
		Decomposition of organic matter
		Soil enzyme activity
Function	N-cycling	N-mineralization
		Nitrification
		Denitrification
		N-fixation
Function	General activities	Bacterial DNA synthesis
		RNA measurements
		Bacterial protein synthesis
		Community growth physiology
Function	Root-activity	Mycorrhiza
Biodiversity	General biomass	Microbial biomass: direct methods
		Microbial biomass: indirect methods
		Microbial quotient
		Fungi
Biodiversity	Biodiversity	Fungi-bacteria ratio
		Protozoa
		Structural diversity
		Functional diversity
Biodiversity	Bioavailability of contaminants	Marker lipids
		Suppressiveness to pathogens
		Biosensor bacteria
		Plasmid-containing bacteria
Biodiversity	Bioavailability of contaminants	Biomarker species
		Incidence and expression of catabolic genes

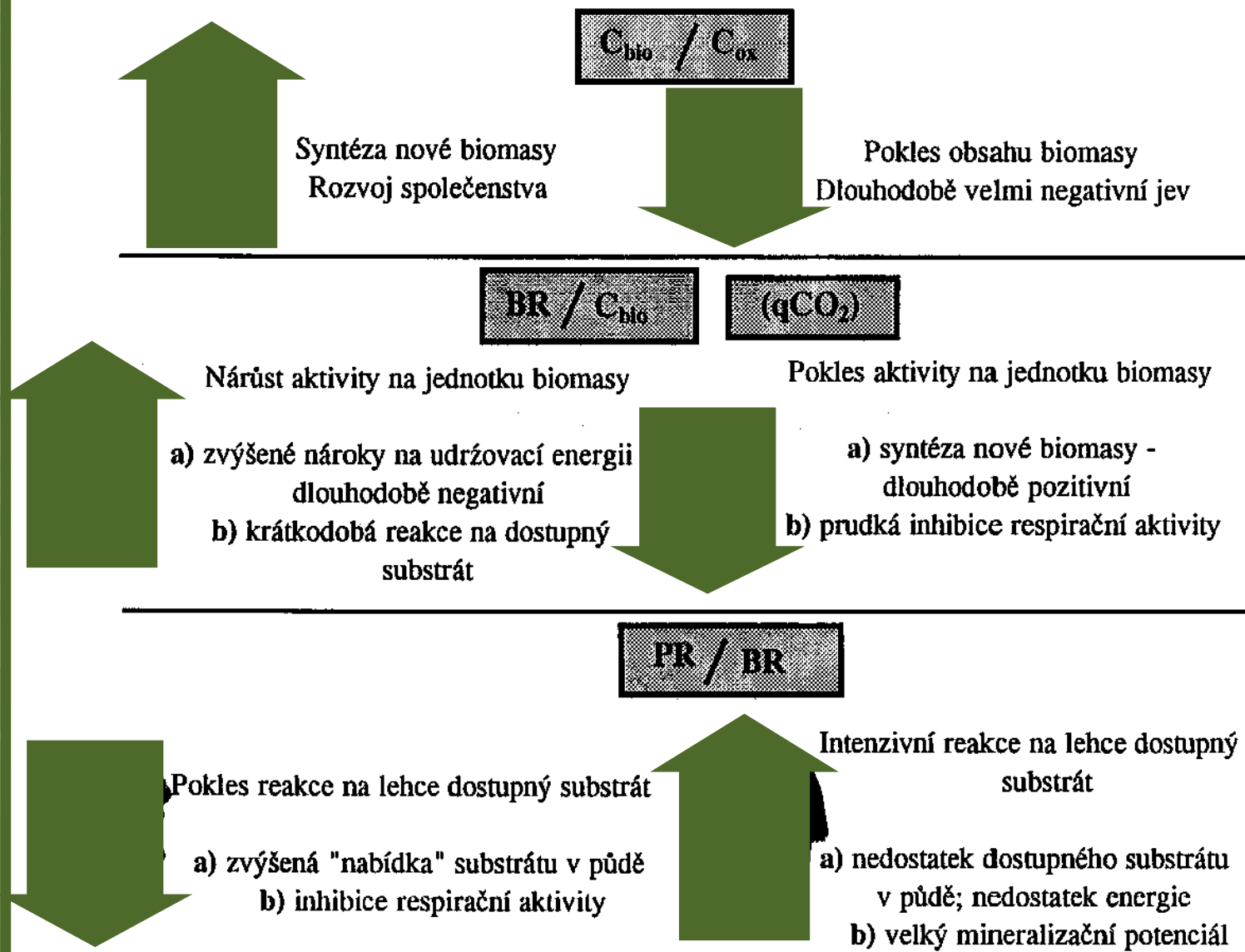
Doelman & Eijsackers (2004)

Kombinace přístupů

	Ecological relevance	Integration of soil properties	Sensitivity to change	Documentation	Reproducibility	Economy/practicality
ate	High	High	Intermediate	High	High	Good (10-day tion)
	Intermediate-high	High	Intermediate	High	High	Good (10-day tion)
1	Intermediate-high	High	Intermediate	High	Intermediate	Intermediate
	Intermediate-high	High	High	Intermediate	Intermediate	Good (10-day tion)
aliza-	High	High	Intermediate	Intermediate	High	Good (10-day tion)
	High	Intermediate	Very high	Low- intermediate	High	Good
ration	High	High	High	Intermediate	High	Intermediate
	Intermediate-high	High	High	High	Intermediate- high	Poor-interme

Kombinace přístupů

Obsah mikrobiální biomasy a respirační testy - reálná interpretace



Půdní bezobratlí

Bioidikace pomocí půdních bezobratlých - příklady

Indicator system	Principle	Application	Reference
Nematode maturity index	Nematodes classified on a "colonizer" - "persister" scale	Can be applied to all soils; measures general response to stress (metals, acidification, eutrophication)	Bongers (1990), Yeates and Bongers (1999)
Predatory mite maturity index	Mesostigmatid mites classified according to an r-K score	Mostly limited to forest soils; measures soil properties related to mul/mor humus	Ruf (1998)
Earthworm life-history strategies	Earthworms classified according to position in the soil profile and burrowing behaviour	Can be applied to all soils with sufficient number of species; measures aspects of humus type, pH and cultivation (ploughing)	Bouché (1977), Paoletti (1999a)
REAL model for earthworms	Integrated data base of various aspects related to the ecological and agronomical role of earthworms	Very wide application	Bouché (1996)
Enchytraeid Reaktionszahl	Scores related to responses to acidity and humidity assigned to enchytraeids	Applicable to situations where effects on soil pH are manifested, for example cement factories	Graefe (1993), Beylich et al. (1995)
SIVPACS	Pollution responses of earthworms, isopods and spiders, comparable to RIVPACS	Data base on species-specific responses not yet operational; at the moment only applied to heavy metal pollution	Spurgeon et al. (1996)
Woodlice life-forms	Classification of woodlice according to body shape and movement pattern	Composition of isopod fauna indicates effects of soil cultivation in agricultural landscapes	Paoletti and Hassell (1999)

Bioidikace pomocí půdních bezobratlých - příklady

Indicator system	Principle	Application	Reference
Macro invertebrate biodiversity	Enumeration of species richness of earthworms, beetles, isopods, spiders, ants, millipedes, centipedes, etc.	Applied in orchards and other agricultural ecosystems to indicate land use and copper pollution	Paoletti and Somaggio (1996), Paoletti (1999b)
Ant functional groups	Classification of ants according to groups reflecting susceptibility to stress	Wide application; used in evaluation of nature restoration and effects of mining	Andersen (1995)
Diptera feeding groups	Classification of dipteran larvae in five feeding groups	Reflects type of organic materials in soil; applicable to organic soils	Frouz (1999)
Arthropod acidity index	Classification of arthropods (Collembola, oribatids, isopods) according to pH preference	Allows quantitative estimation of soil pH from invertebrate community structure	Van Straalen and Verhoef (1997), Van Straalen (1998)
Oribatid mite life-history strategies	Classification of mites according to reproductive and dispersal strategies	Indicates intensity of anthropogenic influence and successional stage of forests and grassland ecosystems	Siepel (1994), Siepel (1996)
Life-forms of Collembola	Classification of Collembola according to morphological types reflecting position in the soil profile	Indicates profile build-up and ecological processes stratified according to the profile; mostly applicable to forest soils	Van Straalen et al. (1985), Faber (1991)
Dominance distribution of micro arthropods	Lognormal distribution of numbers over species	General impression of disturbance; applied to effects of heavy metals and acid rain in forest and grassland soils	Hågvar (1994)
Biological Index of Soil Quality (BSQ)	System of scores assigned to groups of soil micro arthropods	Provides indication of biodiversity; wide applicability	Parisi (2001), Gardi et al. (2002)

Doelman & Eijsackers (2004)

Bioidikace pomocí půdních bezobratlých - příklady

Doelman & Eijsackers (2004)

Pollutant group	Vulnerable animal groups	Remarks
Polycyclic aromatic hydrocarbons, azaarenes and derivates	Isopods, Collembola	Little knowledge available. Large inter-species differences in metabolism. Metabolizers expected to be more sensitive than accumulators.
Persistent organochlorines (PCBs, dioxins)	Vertebrates (Rodentia and Insectivora)	Low toxicity to invertebrates. Effects appear higher up in the food-chain Earthworms are important in transfer.
Chlorinated ethylenes, phenoles and benzenes	Earthworms	Toxicity due to general narcotic effects, probably small inter-species differences.
Oil, BTEX	Earthworms	Toxicity partly due to changes in soil structure.
Alkyl benzene sulfonates and other detergents	Enchytraeids, nematodes, earthworms	Field data scanty. Laboratory data suggest highest toxicity to pore water-dependent species.
Veterinary drugs, antibiotics, hormones	No data available	Interactions in decomposer-micro-organism interactions expected, but not documented.
Copper	Earthworms, slugs, snails, oribatid mites	Copper toxicity to earthworms well documented.
Zinc	Enchytraeids, nematodes, earthworms, isopods, soft-bodied springtails	Toxicity of zinc does not follow the main taxonomic groups of soil invertebrates. Many groups contain sensitive as well as tolerant species.
Cadmium	Oribatid mites, spiders, some springtails, vertebrates (shrews, mole)	Cadmium seems to be most toxic to invertebrates that take up the metal with the food. Due to food-chain accumulation effects appear in predators and vertebrates.
Lead	Oribatid mites, shrews, mole	Differences between invertebrate species relatively small. Main hazard of lead is higher up in the food chain.
Herbicides	No group in particular	Low toxicity of modern herbicides to animals. Effects are mostly secondary (avoidance of sprayed leaves, loss of food, increase of litter cover).
Fungicides	Earthworms, enchytraeids, isopods	Benzimidazoles, carbamates and organotins are known for their considerable side-effects on animals

Pollutant group	Vulnerable animal groups	Remarks
Insecticides	Many arthropod groups, in particular beetles, spiders, mesostigmatid mites and springtails	Animals with high surface activity are particularly vulnerable. Large differences between species due to species-specific exposures and metabolic capacities. Many secondary effects among detritivores due to suppression of predators.
Acidic precipitation	Snails, dipteran larvae, earthworms, some oribatid mites, some Collembola, some isopods	Large differences between species within each group. Earthworms generally avoid acid soils. Many Collembola and mites are acid tolerant, but some are very alkalophilic and suffer from acid precipitation.
Radiation	Earthworms, oribatid mites	Species-specific vulnerability due to exposure, rather than inherent differences in sensitivity. Permanent soil dwellers and soil ingesters receive high doses.

Note: this table only describes the general trends and ignores the many species-specific sensitivities related to metabolism, microhabitat choice and life-cycle

Techniky vzorkování

- různé dle typů a zejména velikosti organismů
- ruční třídění, vybírání
- zemní pasti
- vypuzovací metody
- extrakční metody: Tulgrenova extrakce, O'connorova extrace ...



Techniky vzorkování

- Kvantitativní metody absolutní
 - odběr vzorků, extrakce a separace
 - extrakce – Tullgren, Baerman, O'Connor, Berlese, chemická extrakce, elektřina
 - separace – ruční vybírání, wet sieving, flotace
- Kvalitativní relativní počty
 - různé metody nejčastěji zemní pasti padací - formalín, detergent – velikost, počet, rozmístění, hloubka
 - závislost na chování zvířat – selektivní – větší se chytají lépe než menší – mají větší akční rádius
 - individuální sběr + různé pomůcky – prosévání, návnady

Techniky vzorkování - kvantitativní

- Sondy – odběry – vyndáme jádro – vzorek
 - jak velký vzorek? kolik vzorků na jakou plochu?, jak mají být vzorky rozmístěny?
 - lze udělat optimalizační studii: například sledovat jak s počtem vzorků klesá množství zachycených druhů; nebo odhadnout jak jsou zastoupeny podtypy na dané lokalitě – z více abundantních vzít více vzorků a z méně abun. ploch méně; nebo udělat směsné vzorky
 - hloubka: většina fauny žije v horních 10 cm, ale nemusí to být vždy – stratifikace
- Extrakce
 - extrakční – vypudit z půdy, nelze klidový stádia
 - elektrika apod, WORM EXPEL – tyče – proud
 - nejčastější princip světla a tepla
 - mechanická separace – poškození materiálu
 - nejpoužívanější flotace – suspense p 1,12 – půda klesá, organismy plavou
 - vaří ve vakuu – vysaje se vzduch z detritu
 - flotace – voda/glycerin, voda/glukóza, voda/soli – odvodní organismy a ty pak taky padají

Jsou na to ISO normy

ISO 23611-1:2006	Soil quality -- Sampling of soil invertebrates – Part 1: Hand-sorting and formalin extraction of earthworms
ISO 23611-2:2006	Soil quality -- Sampling of soil invertebrates – Part 2: Sampling and extraction of micro-arthropods (Collembola and Acarina)
ISO 23611-3:2007	Soil quality -- Sampling of soil invertebrates – Part 3: Sampling and soil extraction of enchytraeids
ISO 23611-4:2007	Soil quality -- Sampling of soil invertebrates – Part 4: Sampling, extraction and identification of soil-inhabiting nematodes
ISO/DIS 23611-5	Soil quality -- Sampling of soil invertebrates – Part 5: Sampling and extraction of soil macro-invertebrates
ISO/DIS 23611-6	Soil quality -- Sampling of soil invertebrates – Part 6: Guidance for the design of sampling programmes with soil invertebrates

Žížaly

Proč žížaly jako ekotoxikologický endpoint ?

- celý jejich vývojový cyklus probíhá v půdě (**typický geobiont**)
- konzumují 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**)
- vysoce a dlouho standardizované postupy
- propracované začlenění do systému hodnocení ekologických rizik

Proč žížaly jako ekotoxikologický endpoint ?

- vysoce a dlouho standardizované postupy
- propracované začlenění do systému hodnocení ekologických rizik
- řada terénních studií a pokusy vytvoření standardního polního testu (Dánsko) - byl vytvořen ekotoxikologický systém pro predikci nechtěných účinků (side-effects) pesticidů a chemikálií v reálném ekosystému
- predikce na základě standardních laboratorních testů se validuje polním testováním, **tzv. tiered approach**

Žížaly – biologie, ekologie

Kmen: kroužkovci (*Annelida*)

Podkmen: opaskovci (*Clitellata*)

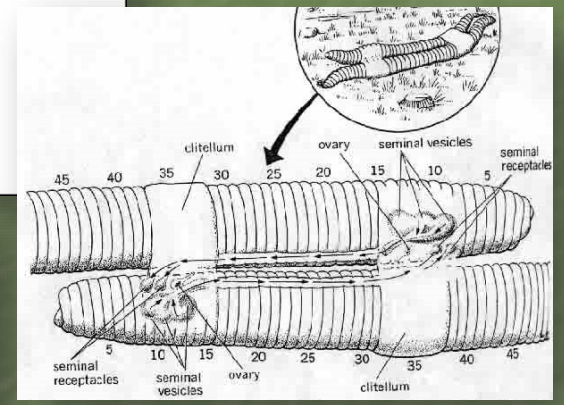
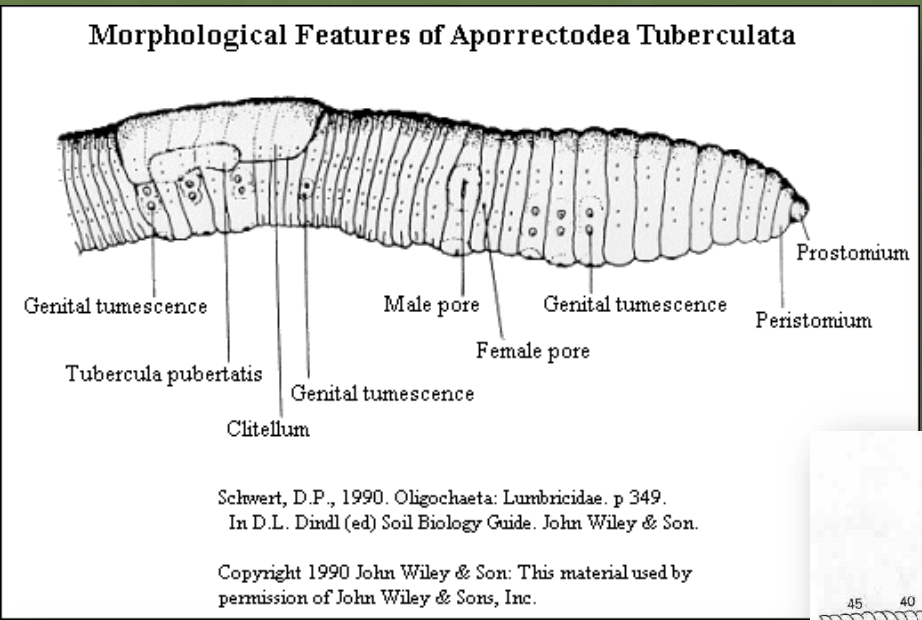
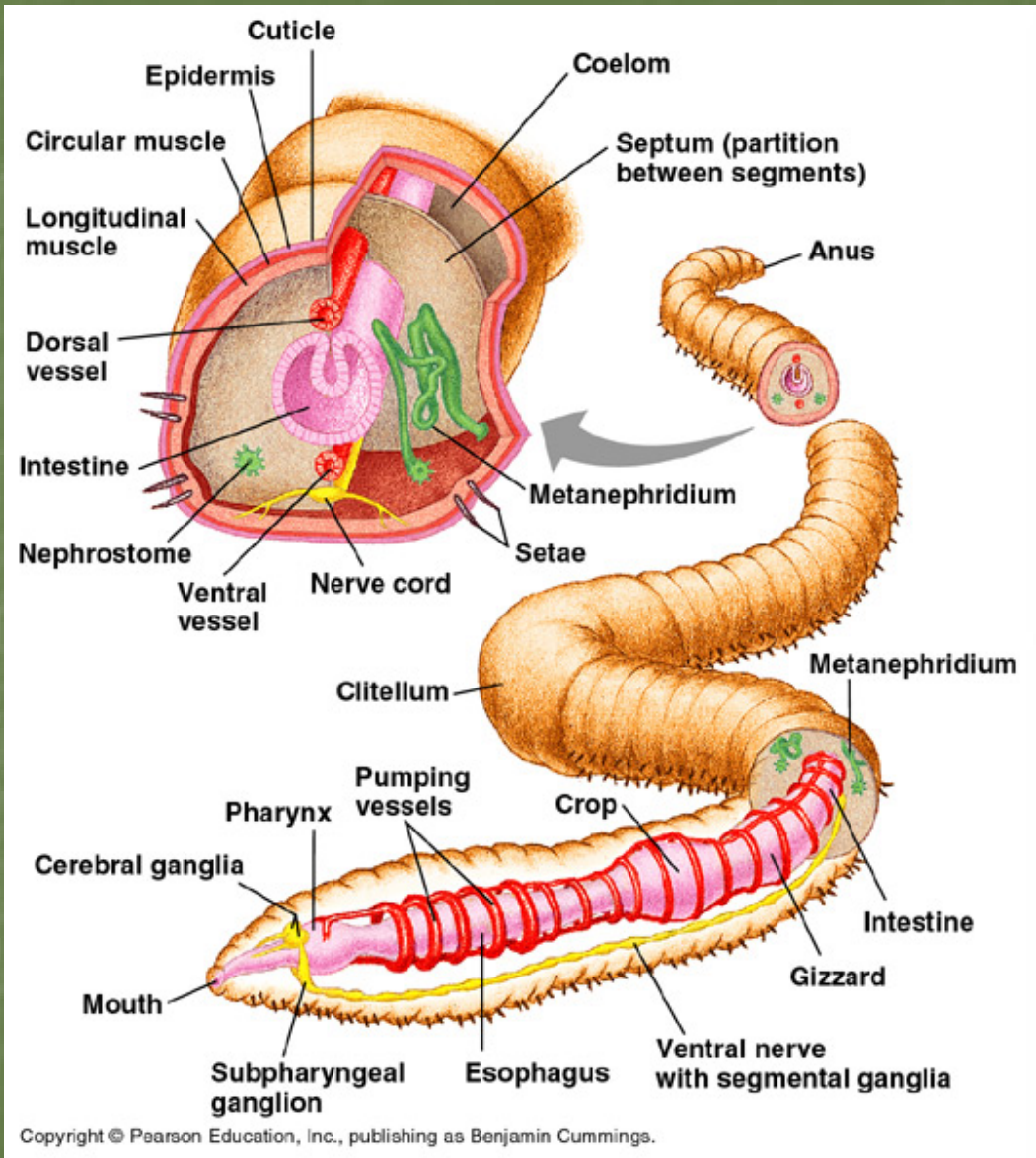
Třída: máloštětinatci (*Oligochaeta*)

Řád: Haplotaxida / *Opisthopora*

Podřád: žížaly (*Lumbricina*)

- zkoumány již od 1881
- pigmentované tělo cca 3 - 30 cm dlouhé, povrch pokryt hlenem
- pohlavní rozmnožování, hermafrodité, spermie dozrávají dříve než vajíčka
- opasek (clitellum) – sekret + výměna pohlavních buněk, tvorba kokonu
- dýchají celým povrchem těla, uzavřená oběhová soustava, žebříčková nervová soustava, vylučování - metanefridia

Žížaly – biologie, ekologie

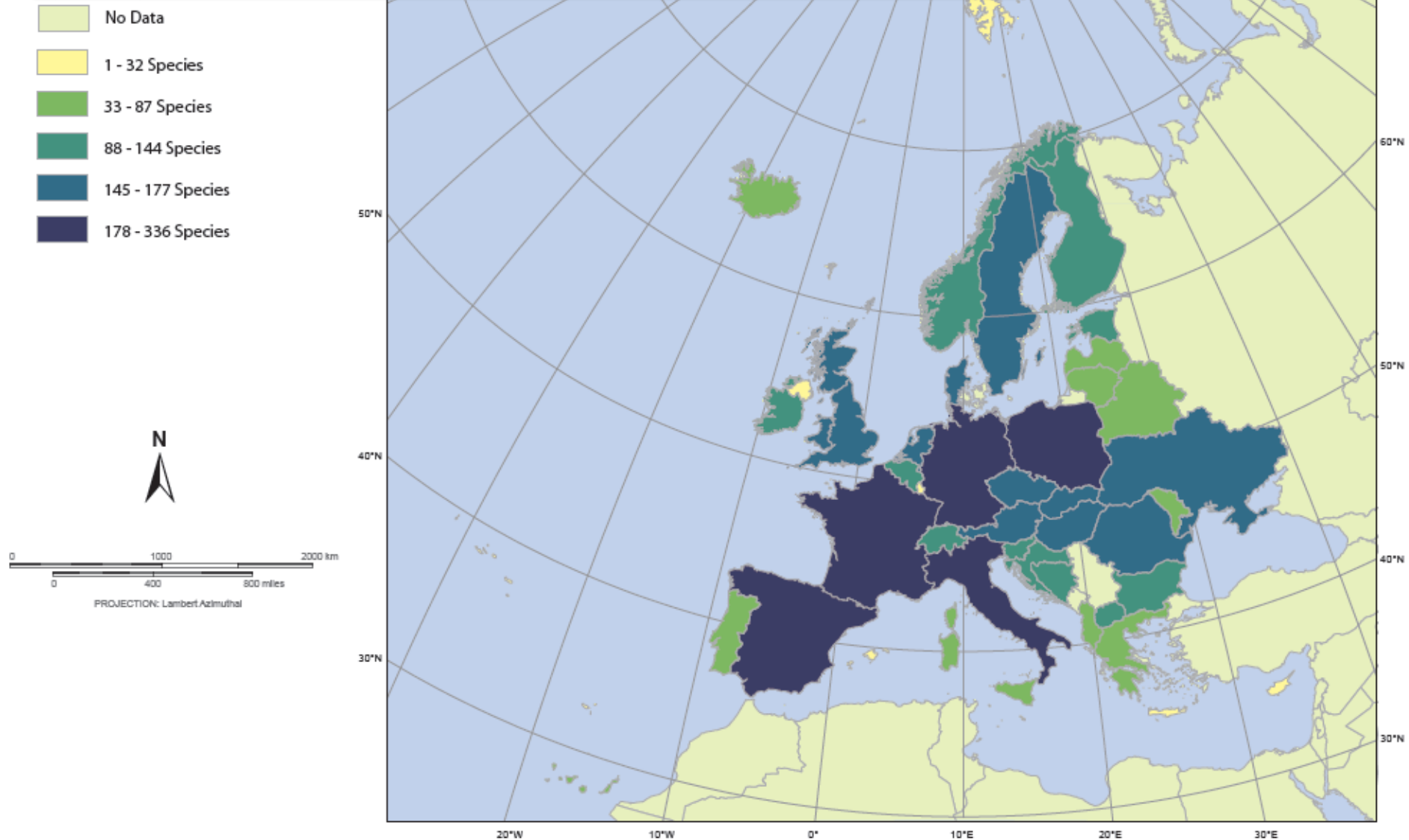


Žížaly – biologie, ekologie

- v půdách jsou desítky (lesy) až stovky (travní porosty) žížal (10-200g) a až kilogramy žížalinců na 1 m²
- za rok přemístí až 80 tun na ha materiálu
- celosvětově kolem 500 druhů, v ČR kolem 30 druhů
- prokousávají se půdou, takže stravují kromě zeminy, organických reziduí rostlin i přítomný mikroedafon, houby, plísně, hlístice a mikroorganismy
- většina žížal dobře stravují listnatý opad, ale hůře jehličí a bukové a dubové listí, pokud nebylo předtím mikrobiálně změkčeno
- součást potravního řetězce: ptáci, krtci, ježci apod.
- většina preferuje pH kolem 7, ale jsou i v pH 5,2-5,4 (*L. terrestris*), *E. fetida* i pH 8, dokáží neutralizovat potravu v trávicím traktu
- optimální teploty 10 °C, kolem 30-40 °C letalita
- citlivé na vlhkost, 12-30 % vlhkost půdy je optimum

Žížaly – biologie, ekologie

počty druhů kroužkovců v půdách Evropy (*Annelida*)



Žížaly – biologie, ekologie

- druhy v ČR: *Allolobophora caliginosa*, *A. rosea*, *Lumbricus terrestris*, *A. longa*, *Aporrectodea caliginosa*, *Lumbricus rubellus*, *Octolasion cyaneum*, *Dendrobaena octaedra*



Žížaly – biologie, ekologie

epigeické - žijí na povrchu půdy, v opadu, na rozhraní půdy a humusu či v humusu, živí se opadem – rychlý průchod střevem, sytě zbarvené, menší, 10 – 50 mm, krátký cyklus, rychlý vývoj, vysoká reprodukce, nepříznivé období v kokonech, *Dendrobaena octoedra*, *Dendrobilus rubelus*

Eisenia foetida a *E.andrei* jsou původem hnojní a kompostní druhy



endogeické - žijí v půdě, bez pigmentu, cca 15 cm, hlouběji v minerální půdě, nepříznivé období přečkají quiescencí = hybernace, ale ne v snížené teplotě ale za sucha = letní diapauza, *Octolasion lacteum*, *Aporrectodea caliginosa*



aneické - vytváří a žijí ve vertikálních chodbičkách; v celém profilu až 6 metrů hluboko, zatahují residua dolů, 10 – 100 cm, pomalý vývoj, v minerální půdě, v černozemích – přísun letních přísušků, diapauza nebo v klidu, *Lumbricus terrestris*, *L. rubellus*, *Allobophora longa*



Žížaly – biologie, ekologie

TABLE 4.11. Ecological Categories, Habitat, Feeding, and Morphological Characteristics of Earthworms

Category	Subcategory	Habitat	Food	Size and pigmentation
Epigeic	Epigeic	Litter	Leaf litter, microbes	<10 cm, highly pigmented
	Epi-endogeic /Epi-anecic	Surface soil	Leaf litter, microbes	10–15 cm, partially pigmented
Endogeic	Polyhumic	Surface soil or root zone	Soil with high organic content	<15 cm, filiform unpigmented
	Mesohumic	Upper 0–20 cm soil	Soil from 0–10 cm strata	10–20 cm, unpigmented
	Endo-anecic	0–50 cm soil, some make burrows	Soil from 0–10 cm strata	>20 cm, unpigmented
	Oligohumic	15–80 cm soil	Soil from 20–40 cm strata	>20 cm, unpigmented
Anecic	Anecic	Lives in burrows in soil	Litter and soil	>15 cm, anterodorsal pigmentation

Modified from Barois *et al.*, 1999.

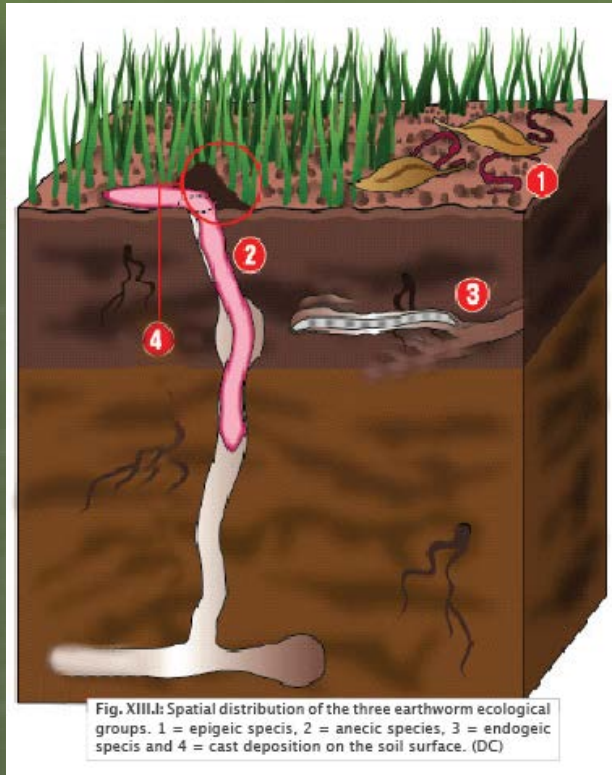


Fig. XIII.1: Spatial distribution of the three earthworm ecological groups. 1 = epigeic species, 2 = anecic species, 3 = endogeic species and 4 = cast deposition on the soil surface. (DC)

Žižaly – biologie, ekologie

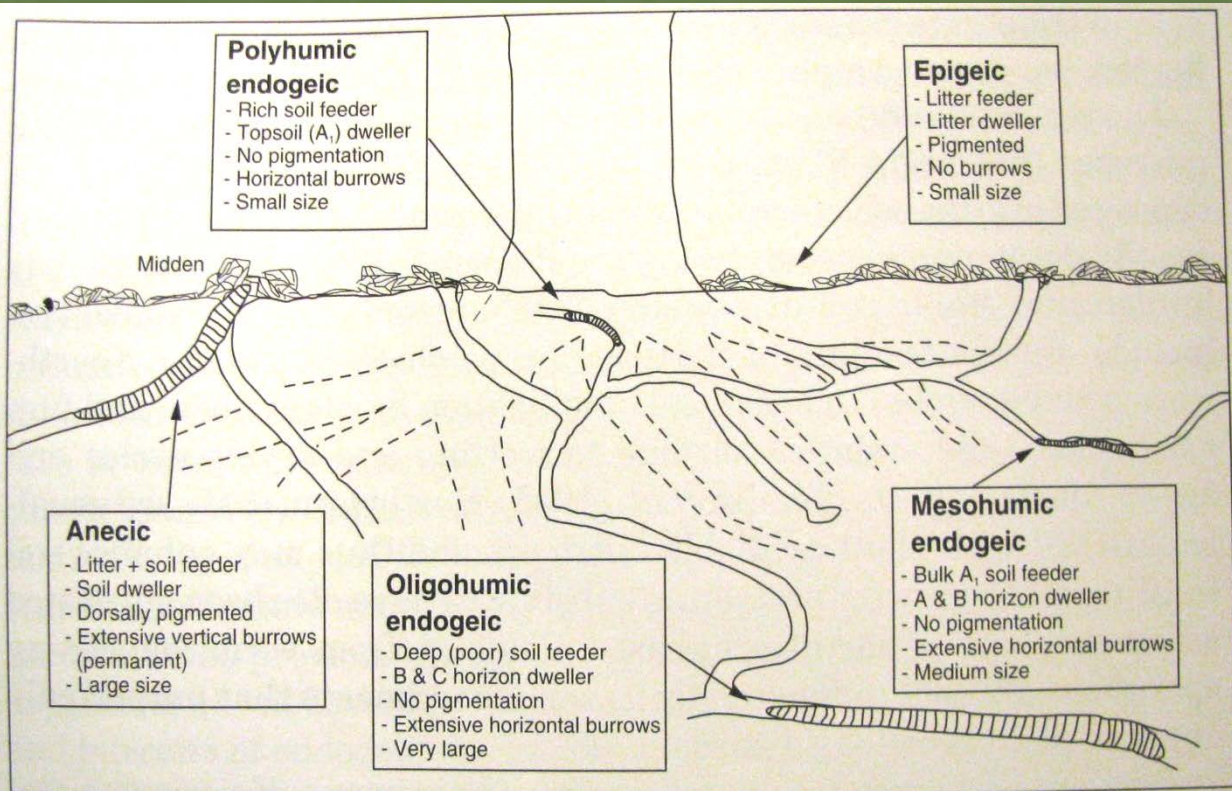
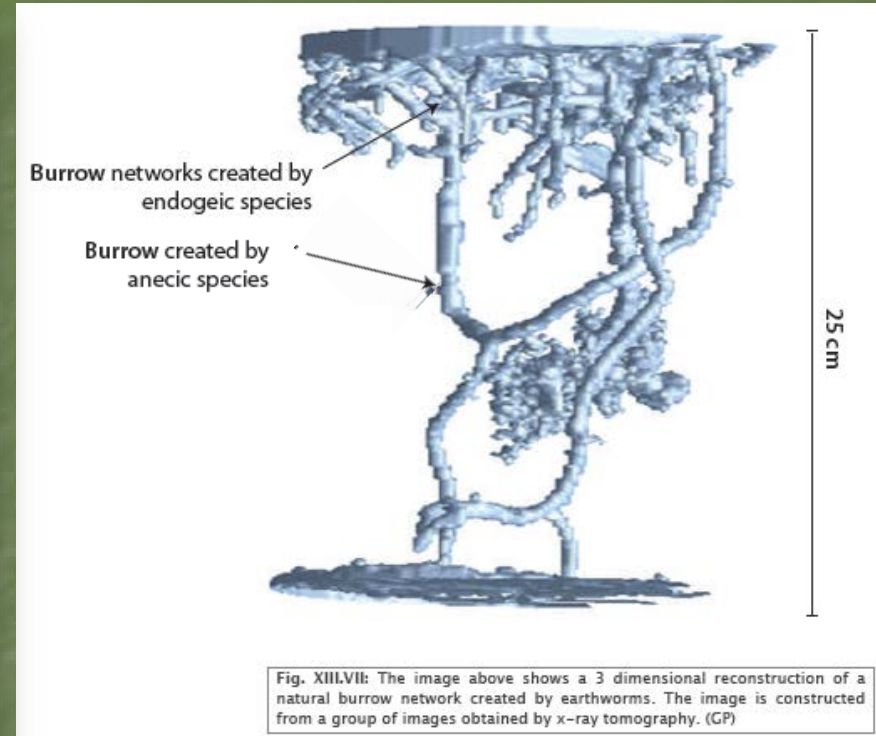


FIGURE 4.64. Pictorial representation of some of the characteristics of earthworm ecological strategies (categories) as proposed by Bouché (1977), Lavelle (1981), and Lavelle *et al.* (1989) (from Brown *et al.*, 1995).



Žížaly – biologie, ekologie

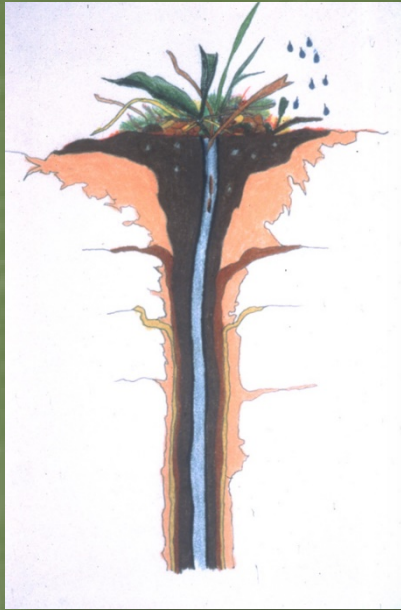


Fig. XIII.II: The photo to the left shows *Allolobophora eiseni*, an epigeic species which lives in the leaf litter and mulch layer and only sometimes moves down into the top few centimetres of the soil. The photo on the right shows *Aporrectodea giardi*, an anecic earthworm of a different genus. Photos: left (MBo) and right (DC)



Fig. XIII.III: Above are three different species of endogeic earthworms (Left - *Aporrectodea icterica*; middle - *Octolasion cyaneum*; and right - *Allolobophora c. chlorotica albanica*). While all three species fall into the same ecological group, clear morphological differences can be seen in both the pigmentation, size, shape and position of the clitellum (saddle). (DC)

Žížaly – biologie, ekologie



Žížaly – význam

- pro půdu mají **velmi velký význam**
- chodbičky, kterými proniká voda i vzduch, rostou kořeny
- spoluvytváří stálý humus, enzymatický rozklad půdní organické hmoty
- zdrobňují rostlinná rezidua, zatahují je do hlubších vrstev půdy, promíchávání organických residuí s minerální složkou půdy
- přes trávící trakt mísí organickou hmotu s minerální, mění organickou hmotu i chemicky → **výměty žížal (žížalince)** - důležitá složka půdní struktury, koncentrují dusík, vápník, draslík, fosfor, zakoncentrování mikroorganismů
- obohacení půdy dusíkem výměšky a těly žížal až 100 kg/ha/rok, snižují poměr C:N v půdě



Žížaly – význam

TABLE 2.1

The Seven Main Mechanisms by Which Earthworms Affect Plant (Mostly Root) Growth either Directly or Indirectly through Physicochemical or Biological Changes to the Soil Environment

Mechanism Mode	Mechanism Category (Type)		
	Biological	Physical	Chemical
Indirect (mediated through changes in the rooting environment, or via interactions with organisms that affect root growth and production)	<p>1. Dispersal or changes in populations and activity of beneficial microorganisms (plant growth promoting rhizobacteria, N₂ fixing root symbionts, saprophytic and mycorrhizal fungi, microbial biocontrol agents, microbivorous and entomopathogenic nematodes, protozoa)</p> <p>2. Effects of earthworms on populations of plant pests, parasites, and pathogens (increase or decrease in populations and incidence of plant-parasitic nematodes, phytopathogenic fungi and bacteria, plant viruses?, shoot- and root-feeding insects)</p> <p>3. Production of plant growth promoting/regulating substances (hormones, vitamins, humic matter, auxins, cytokinins, gibberellins, ethylene, microbially induced and/or excreted by earthworms.</p>	<p>6. Changes in soil structure caused by earthworms (pore and aggregate size distribution and associated processes, including aeration, water retention, hydraulic conductivity, infiltration, erosion, runoff, aggregate and crust formation and breakdown, compaction/soil slumping and decompaction/soil loosening)</p>	<p>7. Changes in nutrient spatiotemporal availability caused by earthworms (release or immobilization of different plant nutrients, leaching, denitrification, volatilization, OM mineralization, protection and/or humification, chelation of metals, pH changes)</p>
Direct (earthworm activities that influence root growth/production in a direct manner)	<p>4. Root abbrasion and ingestion of living plant parts by earthworms (feeding and/or ingestion by earthworms of living roots or plant shoots, and direct damage to growing roots)</p> <p>5. Interactions between earthworms and seeds (ingestion, digestion, burial, dispersal, changes in germination rates and potential)</p>		



FIGURE 2.4 Stimulation of *Eugenia stipitata* (arazá) growth and root mycorrhizal colonization 120 days after inoculating tree nursery bags (filled with 2 parts soil and 1 part composted sawdust) with five (0.35 g total wet weight) or ten (0.7 g) individuals of the pantropical geophagous endogeic earthworm species *P. corethrurus*. (Ydrago 1994; Photograph P. Lavelle.)

Žížaly – význam

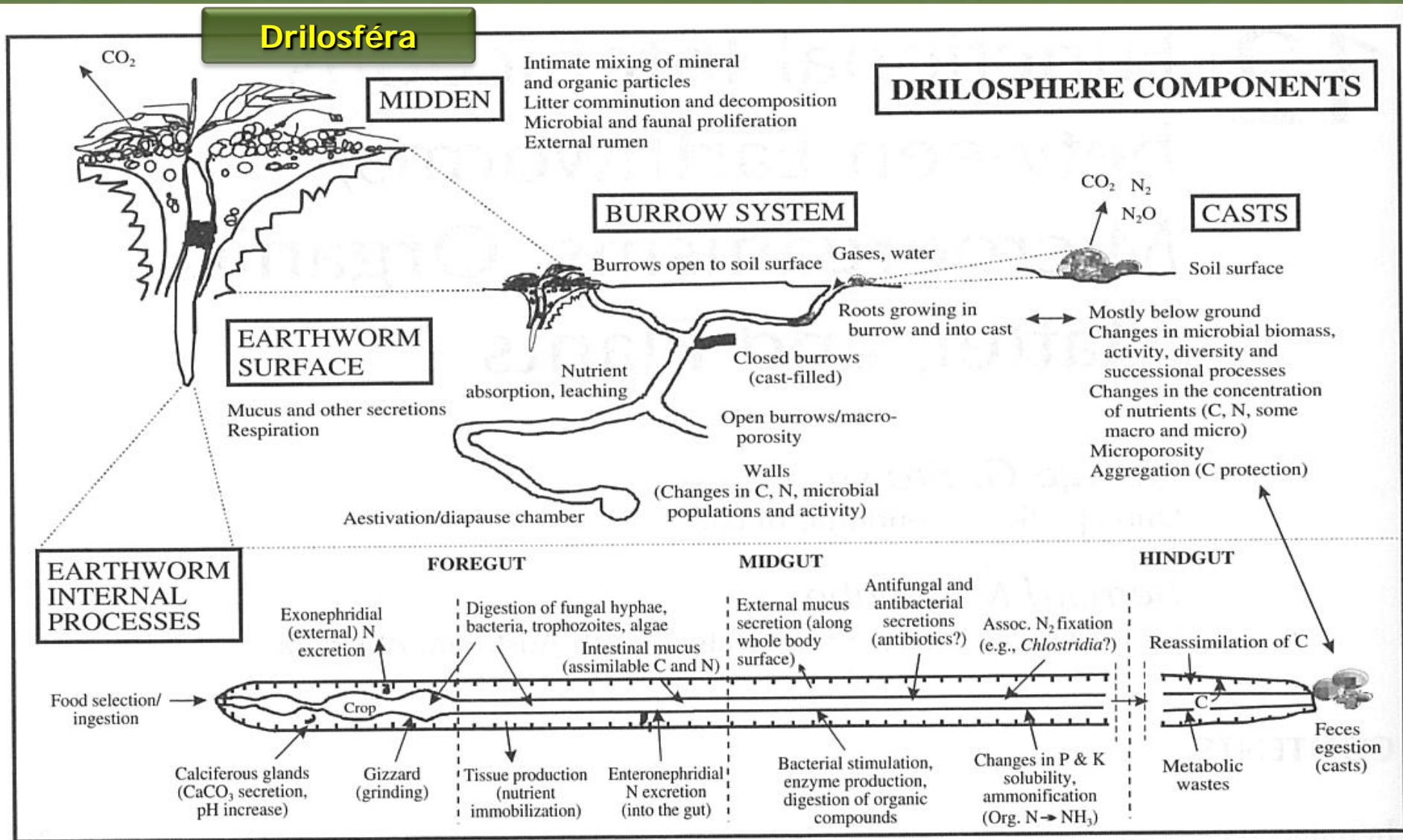


Figure 12.1 Schematic representation of the drilosphere components and their relationships with the external and internal earthworm environment, microorganisms, and organic matter. (Modified from Brown et al. 2000.)

Metody vzorkování žížal v terénu

Metody vzorkování žížal

1. fyzikální (žížaly jsou mechanicky vyndány z půdy)
2. behaviorální (stimulace k pohybu z půdy a pak sesbírání)
3. nepřímé (abundance jsou určeny na základě odchytů do pastí, či evidencí přítomnosti žížal)

Nejčastěji jde o:

- ruční třídění
 - promývání a přesávání
 - chemické a elektrické podněty
 - pasti
-
- ve všech případech je nutný PROMYŠLENÝ DESIGN VZORKOVÁNÍ v terénu počty vzorků (např. 30×30×30cm) jdou do desítek až stovek v závislosti na velikosti lokality (cca 2-12 na 10×10m)

Metody vzorkování žížal v terénu

ISO 23611-1:2006 : Soil quality -- Sampling of soil invertebrates -- Part 1: Hand-sorting and formalin extraction of earthworms

Ruční vzorkování

- vzorkovačem či rýčem se odebere půda cca 0,05 - 0,25m², hloubka 0,1-0,3m
- většinou se rozdělí na vrstvy cca po 10cm
- na bílém podkladu se vybírají červi
- pokud je žížala přetržená, většinou se jen hlavová část počítá jako jedinec

Promývání a prosévání

- může navazovat na ruční třídění
- předošetření vzorku 2% hexametafosfátem sodným a 4% formaldehydem
- dojde k usmrcení a k fixaci žížal
- existují mechanické bubny se síty vyvinuté v 70. letech
- přesátý materiál obsahuje kromě jiného žížaly a kokony

Metody vzorkování žížal v terénu

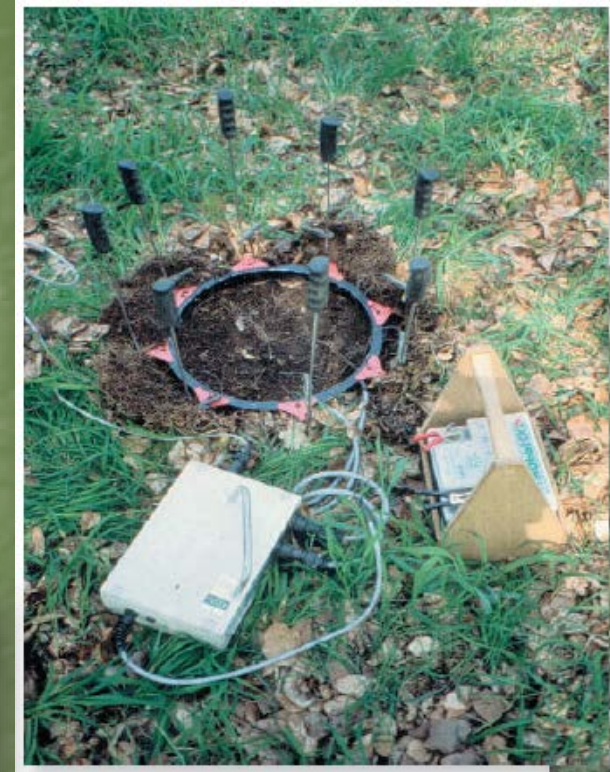
Chemické repelanty (doporučuje je ISO)

- aplikace látek, které nutí žížaly unikat z půdy, na půdu in situ či na odebraný vzorek
- používají se chlorid rtuťnatý, permanganistan draselný a formaldehyd, extrakt z hořčice
- 0,22% formaldehyd (= 0,55% formalin)
- na dané plošce 0,25m² se udělají hranice z plechu výšky cca 10cm, ostříhá se vegetace, aplikuje se roztok z konve postříkem cca 13-18L/m² a cca po 10-25min se sbírají žížaly (rukavice!)
- metoda dobrá zejména pro druhy aneické, které mají chodbičky ústící na povrch (Lumbricidae)
- horizontálně norující (Aporrectodea) jsou zasaženy ale nedostanou se na povrch - může však být použita pro jejich migraci blíže k povrchu, kdy pak mohou být aplikovány předchozí metody
- účinnost extrakce se liší v závislosti na půdním typu, teplotě, vlhkosti

Elektrická extrakce (doporučuje ISO)

- do půdy se zastrčí elektrody s napětím cca 30-60V
- po cca 30min se sbírají červi
- mnoho faktorů ovlivňuje: vlhkost, elektrolytické vlastnosti půdního roztoku, teplota

Metody vzorkování žížal v terénu



Metody vzorkování žížal v terénu

Characterisation of hand-sorting: Size of sampling plot: 50 x 50 cm (= 0.25 m²); Depth of sampling plot: 10 – 20 cm; Number of samples depends on soil properties and worm abundance (Fig. 8.8).

Advantages: no use of toxic chemicals, no need of water.

Disadvantages: strong disturbance of soil, labour and time intensive.

Work procedure: Removal of soil by means of a spade or shovel followed by spreading out of soil on a piece of plastic (in the field or a room) and cautiously, searching for the earthworms (by hand or forceps).

Characterisation of Formalin extraction: Use of the same sampling plot as for hand-sorting (= 0.25 m²); Concentration: 0.5% = diluting 25 mL formalin (37%) in 5 L water.

The formalin extraction works particularly well with anecic earthworms which have burrows connected to the soil surface. When water in the case of rain, or formalin in the case of this extraction methodology enters the burrow, the earthworm detects it through its skin. In the case of water the earthworm moves to the surface as it would drown if its burrow became water logged. In the case of formalin, the earthworm tries to move away and it does this by leaving its burrow by going to the surface, when it arrives at the surface it can then be collected by hand

Work procedure: Application of the formalin solution to the sampling plot. This is repeated until 20 litres are added (the amount can be adapted depending on soil properties) followed by observation of the plot and collection of all worms appearing. End of sampling 30 min after application of the last watering (Fig. 8.8).

Advantages: high efficiency especially for anecic species.

Disadvantages: use of chemicals and the need for a large amount of water.

Handling of the worms after collection: Immediate fixation in 70% ethanol e.g. in 250/500 ml plastic pots, for at least half an hour but not longer than 24 hours. Worms can then be kept in 4% Formalin for at least 4 days (better: 1 or 2 weeks). Afterwards worms can be stored for an unlimited time in 70% Ethanol.

Tropical Soil Biology and Fertility (TSBF)-Method (modification for tropical soils): Hand-sorting of soil monoliths (25 x 25 x 15 cm) for soil macrofauna (body length > 2 mm) at the end of the rainy season. The litter layer is treated separately. All worms (> 10 cm) found in a 20 cm trench are included. The monolith is divided into three layers (each 10 cm high) and each is sprayed with formalin (0.2%) repeatedly at 10 minutes intervals. Worms are preserved in 4% Formaldehyde.

Advantages: high efficiency.

Disadvantages: high number of replicates (time consuming) and efficiency depending on clay content.

Electrical extraction: Eight electrodes (52 cm diameter) are placed in the soil. They generate an electrical field by which the worms are driven out of the soil (Fig. 8.8).

Advantages: no use of toxic chemicals, no need of water.

Disadvantages: expensive equipment, variable results, difficult to use in stony soils, efficiency dependent on soil moisture.

Metody vzorkování žížal v terénu

How Do You Catch Giant Earthworms?

The standard method on earthworm sampling is suitable almost globally, but in some cases it simply does not work. For example, what do you do when the worms to be caught are two to three times larger than the hole what is used for hand-sorting? While in temperate regions earthworms do usually not grow larger than 50 cm in length, in tropical regions of South America and Africa and also Australia, species occur which can be more than 1.5 m long (See Section 3.4). Obviously, in these circumstances, the standard method does not work – but two options are left: Digging big holes, which is very labour-consuming and rarely efficient since it is difficult to know where these worms can be found. Or alternatively, a technique successfully used in the tropical Amazonian rainforest (Brazil), is performed as follows: Firstly, an area of at least 2 x 2 m is cleared of litter particles. Secondly, a formalin solution is sprayed on the surface of the mineral soil (preferably, several times) and within the next 30 minutes, these giant worms come to the surface. Finally,

they are caught by hand. This must be done carefully since several species are able to shed their tails in case of danger. In France – worms can be up to 1 metre, in Chile – worms can be up to 3 metres long!



Metody vzorkování žížal v terénu

Pasti

- pastí s návnadou (hnůj) či bez
- nádoba skleněná či plast se stříškou, s malými otvůrkou ve dně pro únik vody
- rozmístí se a denně či týdně se kontrolují a vybírají

Skladování vzorků

- ve 4% formaldehydu či v 70-80% ethanolu

Identifikace žížal

- externí charakteristiky pomocí lupy či binokuláru
- identifikace juvenilů je mnohem problematičtější než dospělců
- často je identifikačním znakem oblast kolem clitellum, setae, seminální vāčky spermatotéky apod.
- dnes i na CD-ROM či na webu



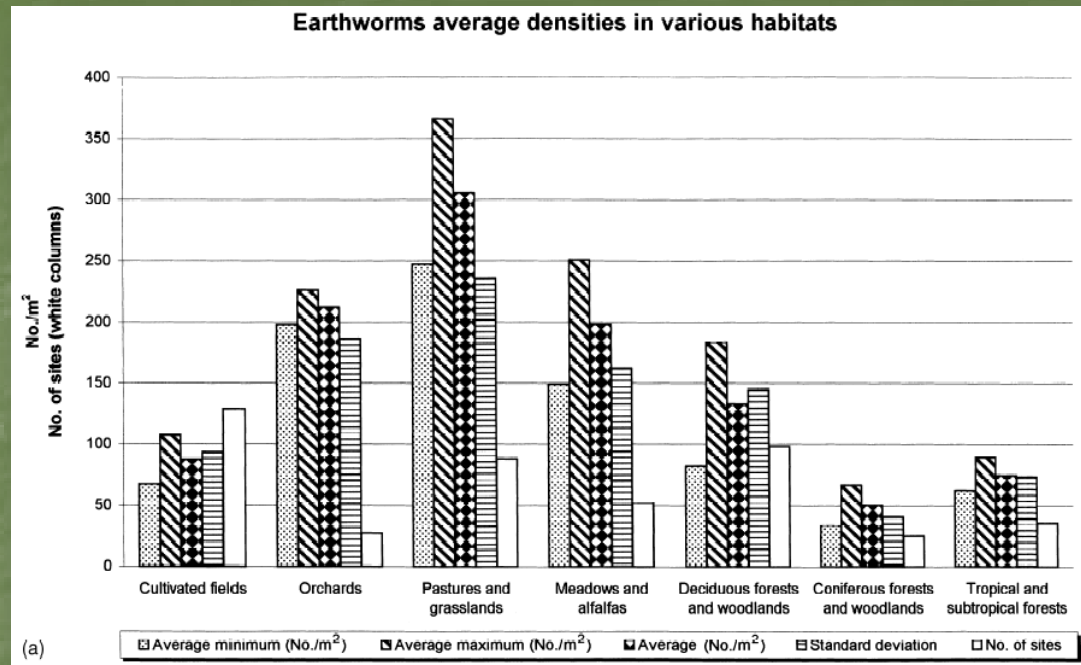
Metody vzorkování žížal v terénu

Method	Description	Advantages	Disadvantages
Passive			
Hand sorting	Known volume of soil cut with spade or corer, broken and worms removed by hand	Simple, reliable in the field; low cost	Laborious; may not collect deep burrowing species, small earthworms and cocoons
Washing and sieving	Known volume of soil cut with spade or corer, soaked in dispersant/preservative, and washed through sieve(s) by hand or mechanical device	Higher recovery of cocoons and small individuals	Laborious; may not collect deep burrowing species
Flotation	Material from hand sorting or washing/sieving floated in high-density solution (e.g., $MgSO_4$)	Separates earthworms from soil and plant debris; cocoons and small individuals collected	Laborious; may not collect deep burrowing species
Behavioral			
Chemical extraction	Soil saturated with chemical irritant (e.g., 0.2% formalin) causing earthworms to emerge onto soil surface	Simple; effective on deep burrowing anecic species	Not effective on all species, all soils or under all conditions.
Heat extraction	Soil blocks or cores suspended under heat lamps in water into which earthworms migrate	Effective on dense root mats	Not effective on all species; inconvenient for field use
Electrical extraction	Metal rods inserted into soil and connected to AC electrical source	Useful for selective or comparative sampling	Highly variable; not convenient in the field; dangerous
Mechanical vibration	Stake or rod inserted into soil and vibrated with bow or flat iron	Simple; useful for selective or comparative sampling	Not effective on all species
Trapping	Pitfall or baited traps placed in soil and sampled at desired intervals	Simple; useful for selective or comparative sampling	Not effective on all species
Mark-recapture	Individuals tagged, released, and population sampled at intervals	Useful for estimating population density, dispersal and mortality	Laborious
Indirect			
Cast counting	Surface castings enumerated and identified	Simple	Not a quantitative estimate of population density

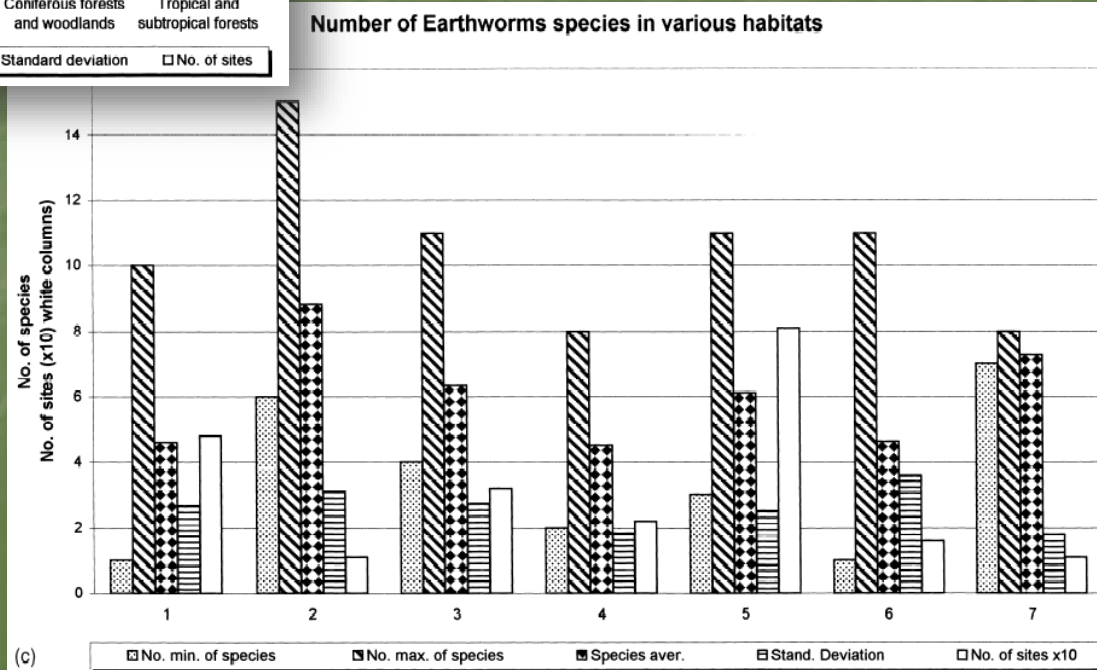
Metody vzorkování žížal v terénu

- ilustrativní videa vzorkování žížal:
<https://worms.educ.ualberta.ca/fieldguide-sampling.html>
- další skvělá videa o vzorkování a hodnocení žížal:
 - <https://www.youtube.com/watch?v=kyCLLYlhMys>
 - <https://www.youtube.com/watch?v=aquWu08wbo4>
 - atd

Žížaly jako indikátor půdní biologické kvality



- ekotoxikologie v širším slova smyslu (stresem není jen kontaminace)
- přirozené rozdíly v abundancích a biomase žížal
- rozdíly v druhovém složení jsou méně patrné



Žížaly jako indikátor půdní biologické kvality

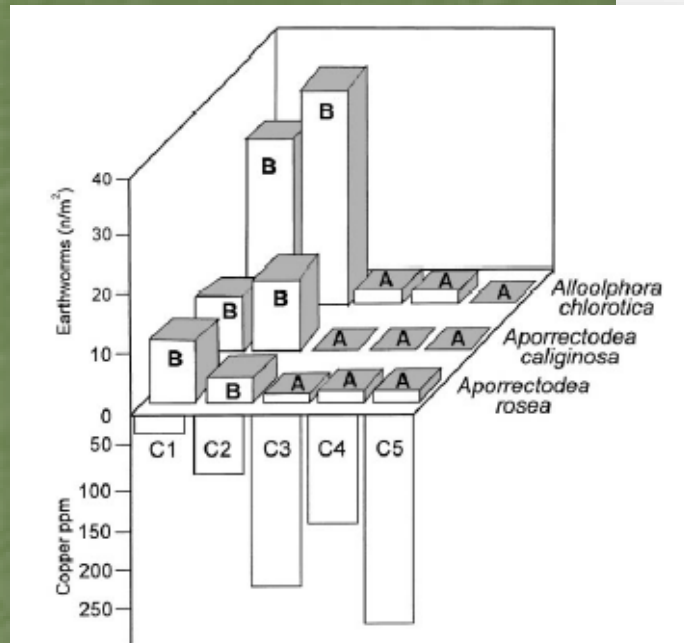


Fig. 6. Earthworm loss in a lowland agroecosystem (Pegolotte di Cona, Venezia, Italy) under different copper inputs (related to application of Bordeaux mixture) in five fields that were either uncultivated or supported vineyards. The copper concentration in the soils (C1–C5) was inversely related to earthworm numbers. Note that the endogeic species *A. rosea* was present in the very Cu-contaminated plot C5, albeit in low numbers (from Paoletti et al., 1995b).

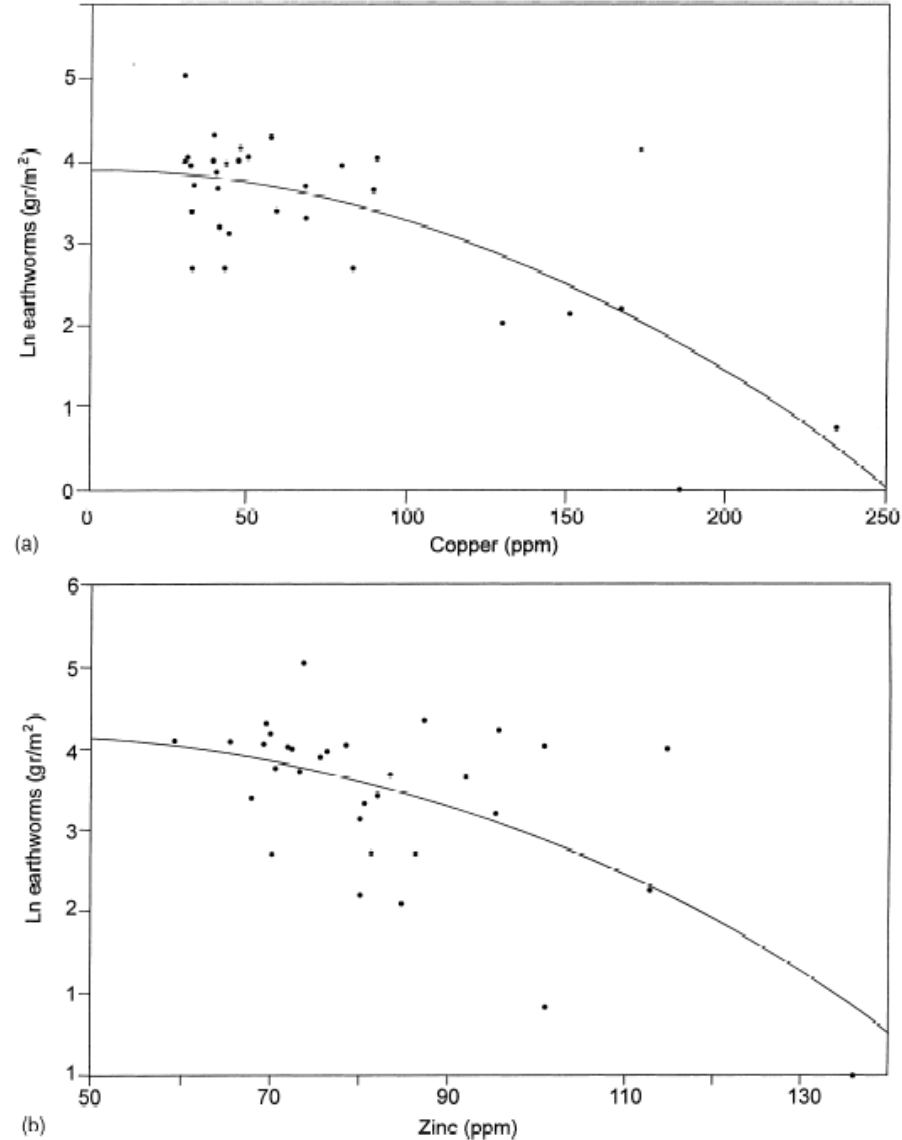


Fig. 5. Relationship between content of copper (a) and zinc (b) in soil and earthworm abundance in 72 orchards in Emilia Romagna, Italy under different practices and fruit crops (kiwi, apple, peach, grape). Copper is a residue from bordeaux mixture, applied as fungicide, and zinc is a residue linked to more recent use of carbamate fungicides such as ziram (from Paoletti et al., 1998).

Roupice

Proč roupice v ekotoxikologii ?

RELEVANCE

- modelový organismus půdních destruentů
- **NAVÍC** roupice zastávají podobné funkce jako žížaly a v některých systémech je nahrazují
- **DŮLEŽITÁ** je také expozice roupic polutantům (horní vrstvička půdy)

PRAKTICKÉ VÝHODY TESTŮ

- laboratorní testy **mají svůj 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

INDIKÁTOROVÝ ORGANISMUS

- v terénu představují velmi dobrý indikátor, i když žížaly jsou asi ekologicky důležitější
- *Enchytraeidae* umožňují lepší srovnání výsledků z polních a laboratorních studií, neboť jsou na obou úrovních použity více stejné druhy → u žížal jsou jiné rody použity pro laboratorní testy a jiné pro bioindikaci a v polních studiích

Roupice – biologie, ekologie

Kmen: kroužkovci (*Annelida*)

Podkmen: opaskovci (*Clitellata*)

Třída: máloštětinatci (*Oligochaeta*)

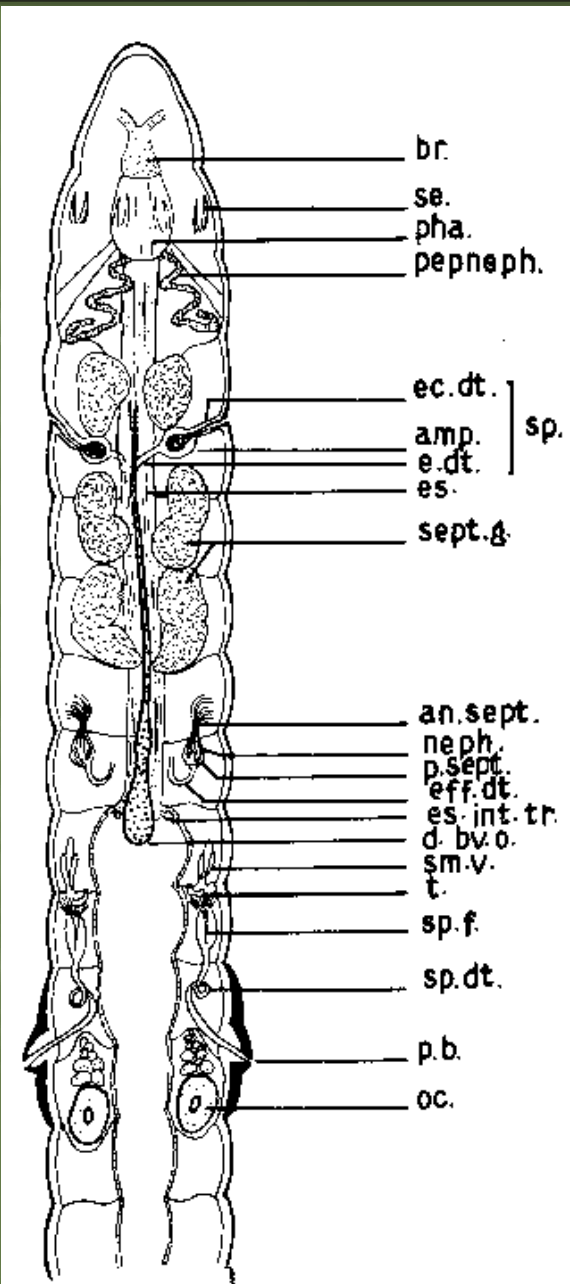
Řád: nítěnkovci (*Plesiopora*)

Čeleď: roupicovití (*Enchytraeidae*)



- malí (10 – 20 mm), nevýrazně zbarvení červi, od bledé a šedé přes žlutou až po hnědou barvu
- „potworms“, „microdrile“
- kratší životní cyklus než žížaly - doba dospění – 65 – 120 dní
- podobné ekologické funkce v jiných ekosystémech

Roupice – biologie, ekologie



- anatomicky podobné žížalám
- tělo se skládá ze segmentů, jejichž počet se od vylíhnutí (15-20 segmentů) rovnoměrně zvyšuje s věkem
- u všech roupic kromě rodu *Achaeta* se v hlavové části vyskytují **štetiny – důležité pro identifikaci**
- významnými orgány jsou **chemoreceptory a hmatové receptory** na hlavě (konec prostomia)
- **opasek** zakrývá většinou segmenty XII-XIII obsahující vývody samčích a samičích pohlavních žláz
- **rozmnožování** jako žížaly + fragmentace
- **trávicí soustava** sestává z ústní dutiny, hltanu, jícnu a střeva, mohou se vyskytnout slinné žlázy
- **vylučovacími orgány** jsou nefridia v každém segmentu

Fig. 10.1. Typical morphological characters of an enchytraeid worm. *amp.*, ampulla; *an. sept.*, ante-septal; *br.*, brain; *d. bv. o.*, dorsal blood vessel origin; *ec. g.*, ectal gland; *eff. dt.*, efferent duct; *e. op.*, ental opening; *es.*, esophagus; *es. int. tr.*, esophageal intestinal transition; *m. pha.*, muscular pharynx; *neph.*, nephridia; *oc.*, oocyte; *pha.*, pharynx; *p. b.*, penial bulb; *pepneph.*, peptonephridia; *p. sept.*, postseptal; *se.*, setae; *sept. g.*, septal gland; *sm. v.*, seminal vesicle; *sp.*, spermatheca; *sp. dt.*, sperm duct; *sp. f.*, sperm funnel; *t.*, testes.

Roupice – biologie, ekologie

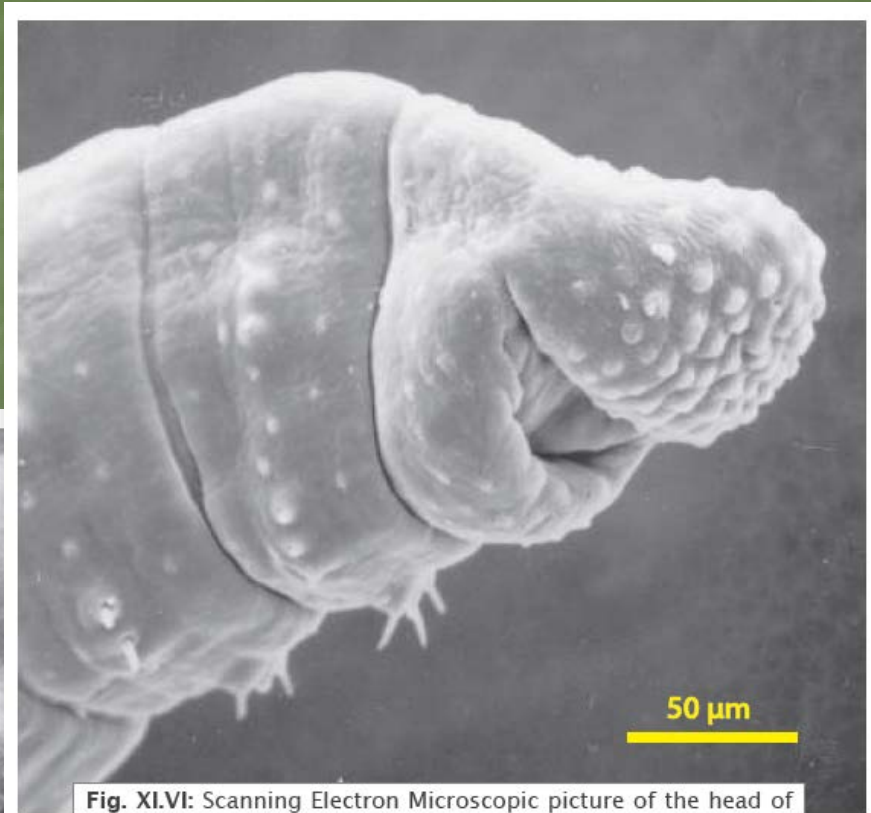
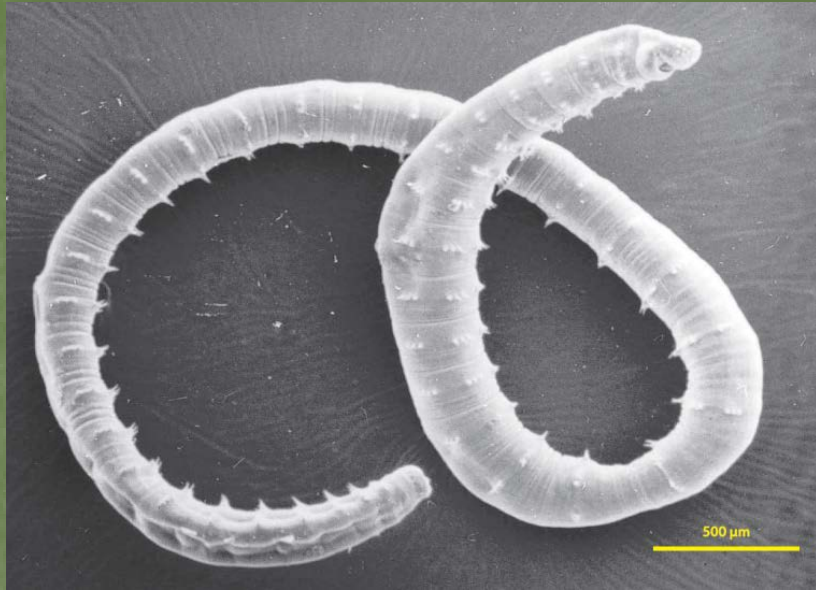


Fig. XLVI: Scanning Electron Microscopic picture of the head of the species *Cagnettia sphagnetorum* showing a high number of chemo and tactile receptors, especially around the mouth. (JR)

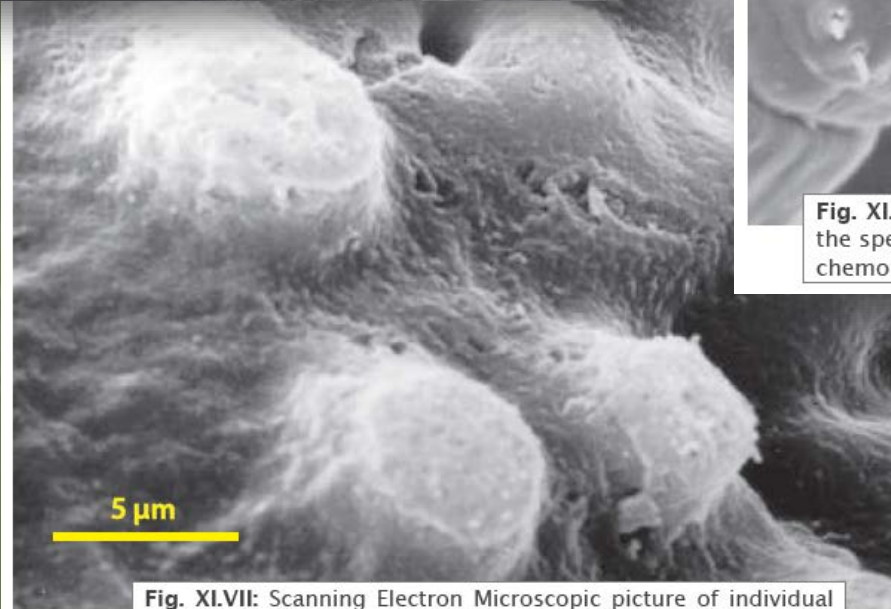


Fig. XLVII: Scanning Electron Microscopic picture of individual chemo and tactile receptors located on the head of the species *Cagnettia sphagnetorum*. (JR)

Roupage – biologie, ekologie

Table 2.18 Reproductive strategies in enchytraeids [After Dószá-Farkas, 1996]

Reproduction	Description	Genera/species
Only sexually, all during the year possible	irregular reproduction periods, specimens with eggs can be found any time of the year	many <i>Fridericia</i> sp., most <i>Enchytraeus</i> sp., <i>Henlea</i> species, <i>Enchytronia</i> sp., <i>Marionina</i> sp., <i>Achaeta</i> sp.
Only sexually, become mature once a year	thereafter they regress and stay in rejuvenile state till the next reproduction period	<i>Mesenchytraeus</i> species <i>Stercutus niveaus</i>
Parthenogenesis	egg development without fertilization	<i>Lumbricillus</i> sp. and <i>Fridericia</i> sp.
Fragmentation		<i>Buchholzia</i> sp. and <i>Cognettia</i> sp.
Self-fertilization		<i>Enchytraeus buchholzi</i> , <i>E. bulbosis</i>

Roupice – biologie, ekologie

- využívají různé zdroje potravy, požívají rozložené rostlinné zbytky (saprofágové) a také velké množství houbového mycelia, mohou se živit řasami a bakteriemi (mikrobivorní)
- **hrají významnou roli** při rozkladu organického materiálu a účastní se **tvorby půdy**
- stejně jako u žížal je důležitou součástí procesu **průchod organických residuí trávicími systémy**, neboť vyloučené zbytky jsou pak lépe přístupné dalším dekompozitorům



Fig. XI.III: Casts of a geophagous enchytraeid (*Fridericia* sp.) deposited at the soil surface. (OE)

Roupice – biologie, ekologie

- roupic je známo asi 28 rodů s 600 druhy
- 19 rodů žije v půdě: *Achaeta*, *Bryodrilus*, *Buchholzia*, *Cognettia*, *Enchytraeus*, *Fridericia*, *Henlea*, *Lumbricillus*, *Mesenchytraeus* atd.
- většinou je v přirozených populacích dominantní druh *Cognettia sphagnetorum*, který může být, na rozdíl od ostatní půdní mikrofauny, ve své funkci nenahraditelný jinými druhy
- na laboratorní testy se užívá jen několik druhů (*Enchytraeus albidus*, *Cognettia sphagnetorum*, *E. crypticus*, *E. buchholzi*, *E. minutus*)

Roupice – biologie, ekologie



Fig. XI.I: The thin, white organism on the left of the photograph is an enchytraeid (*Mesenchytraeus* sp. :) laying alongside a small earthworm (*Dendrobaena attemsi*: on the centre/right). The image clearly demonstrates the differences in size and appearance between both related groups. (HCF)

Roupice versus žížaly

- Roupice jsou rozšířené zejména na **stanovištích nevhodných pro žížaly** (lesní morovité půdy, které jsou kyselé a s velmi vysokým obsahem organické hmoty), kde zastávají podobnou úlohu
- Na rozdíl od žížal se nachází ve svrchní několikacentimetrové vrstvičce půdy a jsou exponovány jiným životním podmínkám a tím i jiné kontaminaci než žížaly
- I když v reálném ekosystému jsou žížaly pravděpodobně důležitější, roupice představují také velmi dobrý bioindikátor
- Navíc jsou ideálními modelovými (laboratorními) organismy pro testování účinků chemických látek, neboť jsou malé a lehce kultivovatelné

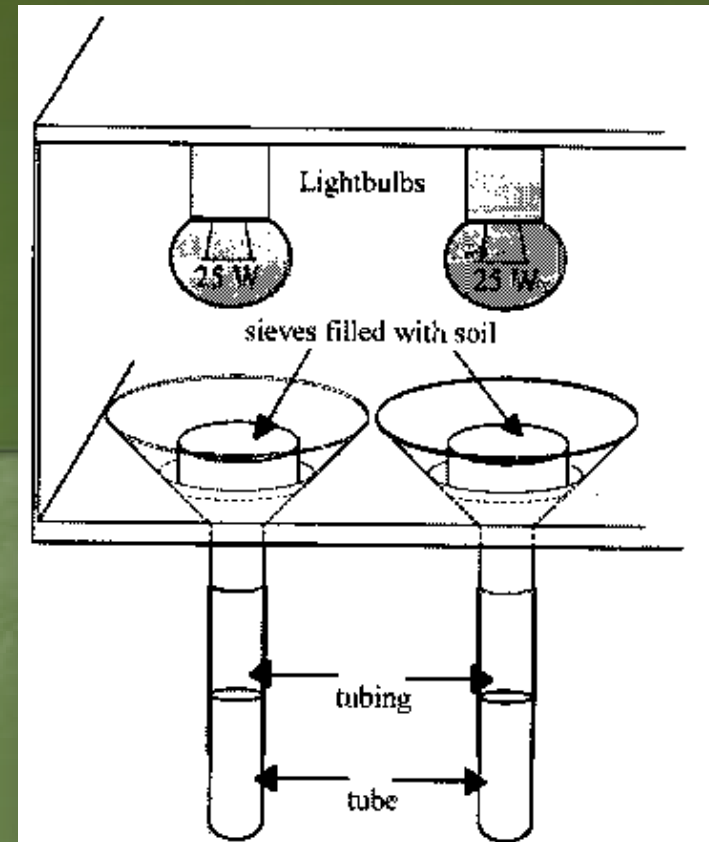
Terénní studie společenstev rouspic

Vzorkování probíhá vzorkovacím jádrem (5 - 7,5cm průměr)

Ruční třídění je téměř nemožné, rouspice jsou polepené půdními částicemi a nejsou vidět.

Používá se tzv. **O'connorova extrakční technika "wet funnels"**:

- půda (3cm vrstva) na síto v nálevce naplněné vodou, svrchu se postupně přidává světlo a teplo po 3 hodinách, až povrch vzorků dosáhne teploty 45°C a rouspice se přemístily dolů
- červi jsou pak na petriho miskách ponechání k defekaci
- pod zvětšením 100 - 400× lze pak identifikovat klíčové morfologické struktury



Terénní studie společenstev roupic

- do hry se zapojuje variabilita prostředí v kombinaci s behaviorálními odpověďmi (například bylo dokázáno, že *C. sphagnetorum* se vyhýbaly místům silně kontaminovaným PCPs)
- vesměs převládají studie, kdy se kvantifikuje jeden druh v polních, či polopolních (mikrokosmových podmínkách)
- identifikace druhů lze na základě klíčů Nielsen and Christensen či Dash v knize Dindal: Soil biology guide

Table 2.17 Enchytraeid genera and their occurrence in soil [Nielsen and Christensen, 1959; Römbke, 1992; Römbke and Dószá-Farkas, 1996; Dószá-Farkas, pers. com.]

Genera occurring in soil	Other genera	Environment
Achaeta	Aspidodrilus	epizoic on earthworms
Bryodrilus	Barbidrilus	freshwater
Buchholzia	Enchylea	only found in Enchytraeid culture
Cernosvitoviella	Enchytraeina	marine
Cognettia	Grania	marine
Enchytraeus	Pelmatodrilus	epizoic on earthworms
Enchytronia	Propappus	freshwater
Fridericia	Randidrilus	marine
Guaranidrilus	Stephensoniella	marine
Hemienchytraeus		
Hemifridericia		
Henlea		
Isosetosa		
Lumbricillus		
Marionina		
Mesenchytraeus		
Oconnorella		
Stercutus		
Tupidrilus		

Terénní studie společenstev roupic

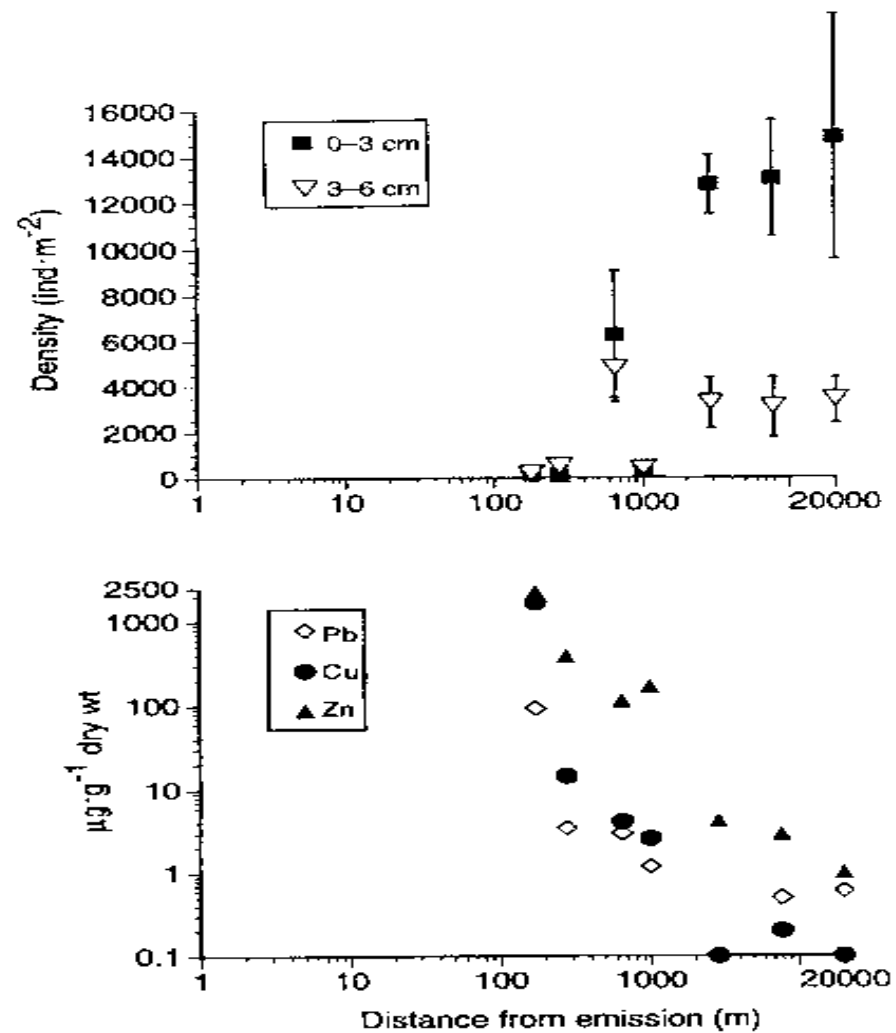


Figure 6.1 Vertical distribution of enchytraeids sampled in coniferous forest soils polluted by metal emission from a brass mill. Total densities are low, when metal concentrations are high in the uppermost soil layers. The control site at a distance of approximately 20 km shows the typical pattern of the vertical distribution of enchytraeids in forest soils. (Redrawn from Bengtsson and Rundgren 1982.)

KYSELÁ DEPOZICE JAKO STRES NA SPOLEČENSTVO ROUPIC V REÁLNÉM LESNÍM EKOSYSTÉMU??

- byly studovány struktury společenstva roupic, abundance, populační dynamika a vertikální distribuce na lokalitách zatížených kyselou depozicí (pH CaCl₂ 3,01 - 3,36)
- bylo nalezeno 7 druhů
- z ekotoxikologického hlediska by se studii dalo vytknout, že není kontrolní lokalita

Table 2

Species composition, mean annual density (\pm standard error of the mean) and biomass (dry mass) of Enchytraeidae in three spruce forest plots at the Lange Bramke (Harz, Germany, November 1989–October 1990; species recorded only in 1991 indicated by +)

Plot	North-facing slope		South-facing slope		Plateau	
	Density (ind. m ⁻²) \pm S.E.	Biomass (mg m ⁻²)	Density (ind. m ⁻²) \pm S.E.	Biomass (mg m ⁻²)	Density (ind. m ⁻²) \pm S.E.	Biomass (mg m ⁻²)
<i>Marionina clavata</i> (Nielsen and Christensen, 1961)	23 668 \pm 8 238	151.2	18 434 \pm 6 169	123.6	30 388 \pm 10 297	208.7
<i>Cognettia sphagnetorum</i> (Vejdovský, 1877)	9 436 \pm 4 180	301.5	9 861 \pm 5 164	316.7	22 183 \pm 9 342	754.5
<i>Achaeta camerani</i> (Cognetti, 1899)	7 079 \pm 2 882	28.2	9 153 \pm 7 015	36.6	5 984 \pm 3 337	23.9
<i>Achaeta affinis</i> (Nielsen and Christensen, 1959)	608 \pm 1 387	7.9	71 \pm 113	0.9	0	0
<i>Mesenchytraeus pelicensis</i> (Issel, 1905)	57 \pm 109	8.5	0	0	113 \pm 166	16.9
<i>Fridericia</i> sp. (Michaelsen, 1889)	0	0	85 \pm 208	18.5	0	0
<i>Enchytraeus norvegicus</i> (Abrahamsen, 1969)	0	0	+	0	0	0
Enchytraeidae (total)	40 814 \pm 11 921	497.3	37 603 \pm 11 789	496.3	58 668 \pm 16 953	1 004.00

DESIGN MONITORINGU REÁLNÉHO PROSTŘEDÍ??

- ve většině studií vlivu kontaminace na reálná společenstva půdní fauny se srovnávají vzorky z různých vzdáleností od zdroje a předpokládá se, že např. kovy jsou víceméně pravidelně distribuovány v rámci každé lokality
- bohužel to tak většinou NENÍ a jak kovy, tak půdní organismy jsou rozptýlené spíše nehomogenně; navíc je pravděpodobná migrace červů do nekontaminovaných míst

PROTO PŘI STUDIÍCH TOHOTO TYPU JE VHODNÉ BRÁT V ÚVAHU TUTO HETEROGENITU

- tato studie kolem hutě Cu-Zn ve Finsku
- užito tzv. hierarchický design vzorkování:
- předpoklad: pokud jsou parametry heterogenně distribuovány, tak větší vzdálenost mezi podvzorky
→ větší variabilita

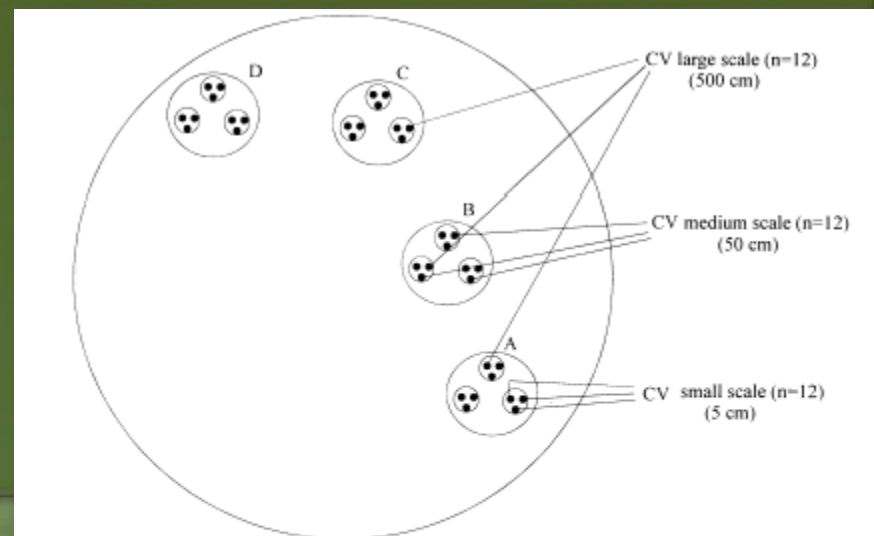


Fig. 1. A scheme of the sampling design (note hierarchical relationship of the samples) and how coefficients of variation (CV) were calculated for samples taken from certain distance between them. Black dots are individual soil samples 1–9 taken within plots A, B, C and D in the polluted area. 5, 50 and 500 cm are the distances between samples.

NEPŘÍMÝ EFEKT Zn NA MIKROORGANISMY PŘES ROUPICE??

- je známo, že roupace zlepšují dekompoziční procesy působením na půdní mikroorganismy různými způsoby
- 1. spásání mikroorganismů zmlazuje mikr. populace a vede k vyšším metabolickým aktivitám
- 2. uvolňují látky v dostupnější formě a inhibují růst hyf hub
- 3. zlepšují možnosti inokulace nových mikrohabitátů změnami půdní struktury
- 4. rozšiřují v půdě spory a propagule mikroorganismů (přes trávící trakt)
- v této studii byl použit mikrokosmos (13 cm × 4cm) kontaminovaný zinkem; 20 g půdy + 0 - 125 roupic a 25 mikrokosmů bylo bez roupic jako kontrola
- použitá půda byla zahřáta na 60°C - zabije faunu, ale nechá mikroorganismy
- vliv kontaminace na C.s. se projevil změnami mikrobiálních parametrů

Terénní studie společenstev roupic

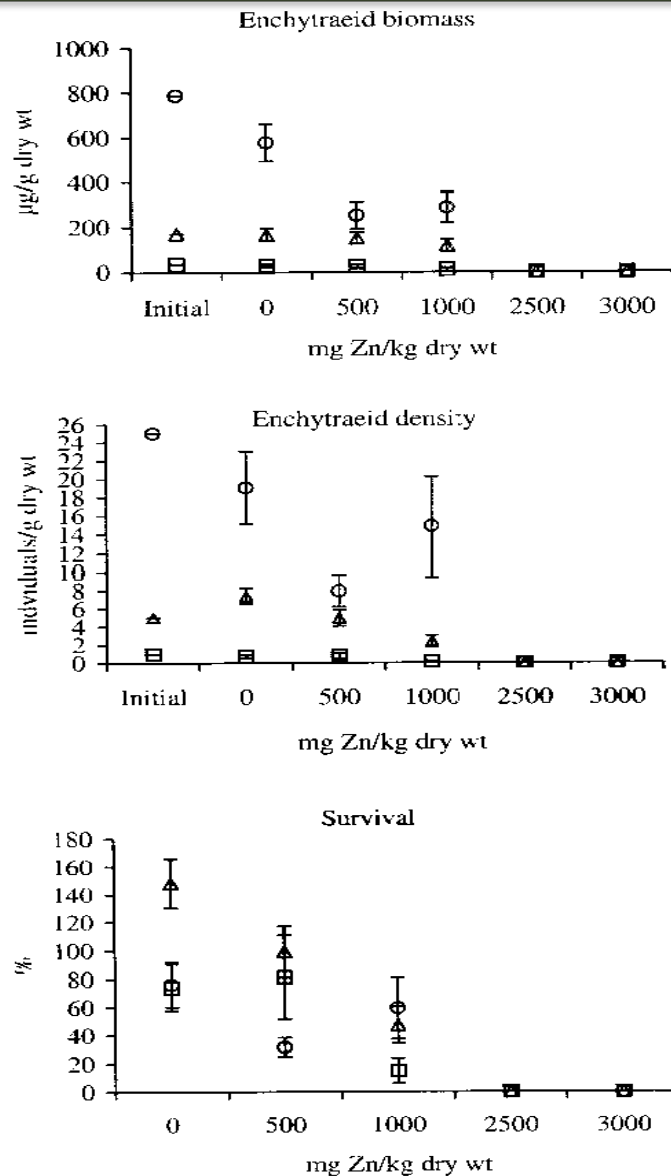


Fig. 1. Biomass, final density, and survival percentage of *Cognettiaagnatorum* (mean \pm standard error; $n = 5$) after four weeks of incubation in soil microcosms treated with various Zn concentrations and at different initial enchytraeid densities: 1 (\square), 5 (Δ), and 25 (\circ) individuals/g dry soil.

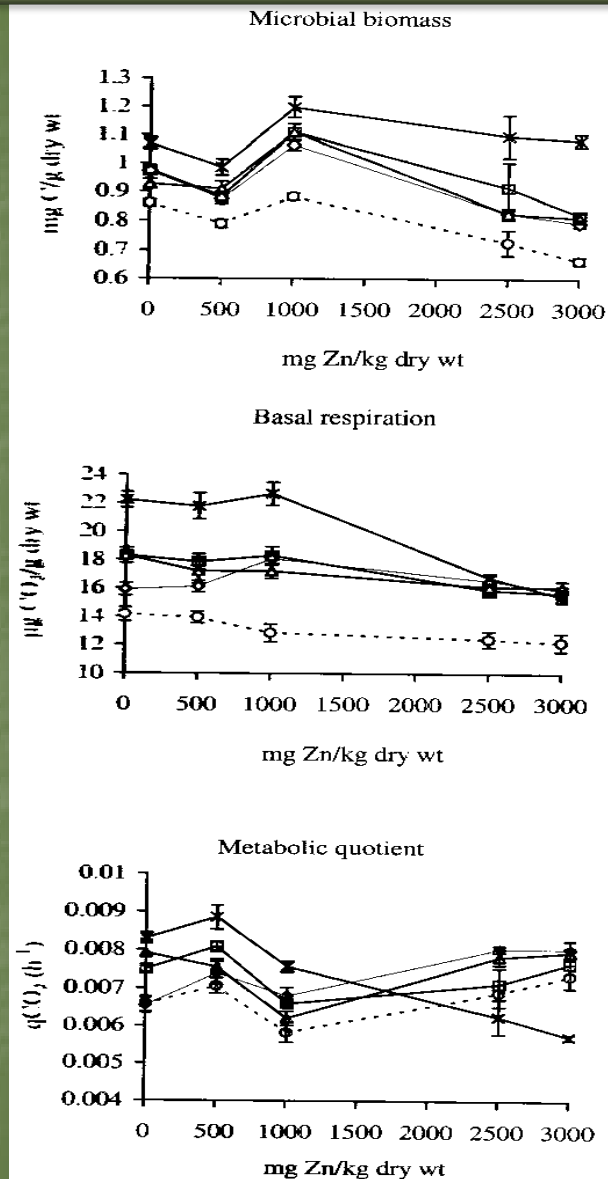


Fig. 2. Microbial biomass, activity (basal respiration), and metabolic quotient (respiration to biomass ratio) (mean \pm standard error; $n = 5$) after four weeks of incubation in soil microcosms at various Zn concentrations and with different initial enchytraeid densities: 0 (\diamond), 1 (\square), 5 (Δ), and 25 (\times) individuals/g dry soil. The initial situation (\circ) is measured after two weeks of incubation without enchytraeids.

Mikročlenovci

Co jsou mikročlenovci ?

- mikročlenovci = zejména chvostoskoci a roztoči (mikroedafon)

Chvostokoci – biologie, ekologie

Kmen: členovci (*Arthropoda*)

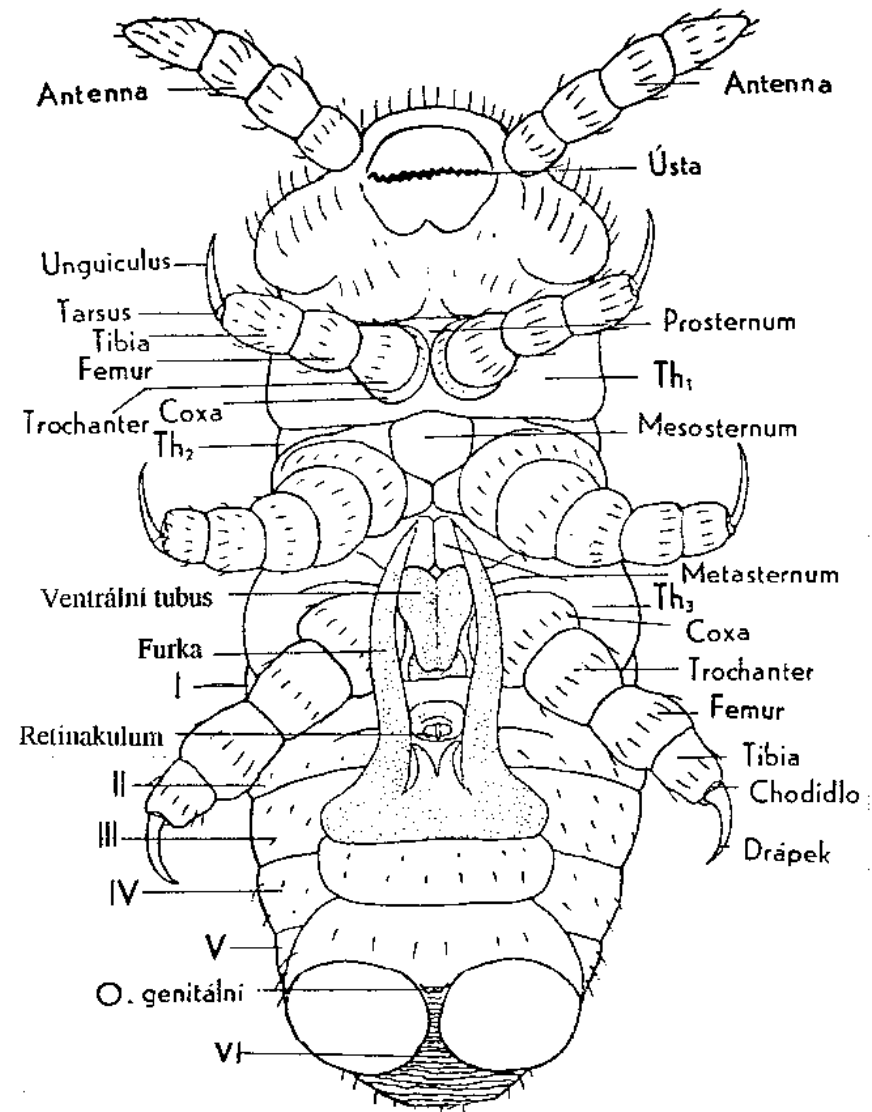
Podkmen: vzdušnicovci (*Tracheata*)

Nadtřída: *Hexapoda*

Třída: skrytočelistní (*Entognatha*)

Řád: chvostokoci (*Collembola*)

- malí bezkřídlí členovci se žvýkacím nebo bodavě-sacím ústrojím úst
- velikost cca 0,5 až několik mm
- Tělo: hlava, tříčlánková hrud' s 3 páry končetin, zadeček s 6 články, 4-6 článků tykadla
- slepí, většinou bez pigmentu
- mají tzv. furku, vymršťovací vidlici, která je součástí skákacího aparátu



Chvostoskoci – biologie, ekologie

- atmobionti – žijí na rostlinách a dřevě, v zemědělské půdě jen náhodně
- edafobionti – žijí v půdě a na jejím povrchu
 - epigeonti – porch, opad, kameny a dřevo na půdě
 - hemiedafobionti – vrchní horizonty a povrch
 - euedafobionti – výlučně v půdě

velmi důležití jako půdotvorný činitel:

- pomáhají zpracovat půdní organickou hmotu
- převážně rostlinná strava (opad polorozložený, řasy, houby, pyl, amorfní organické zbytky)
- obývají i lesní půdy se silným rozvojem hub
- spolupodílí se svými aktivitami na tvorbě půdní struktury

Chvostokoci – biologie, ekologie

- desítky tisíc jedinců na 1 m² půdy, jen v ČR asi 400 druhů
- typičtí zástupci: *Mesaphorura*, *Isotoma*, *Pseudosinella*
- lesní půdy: *Onychiurus*, *Hypogastrula*, *Tetradontophora*, *Entomobrya*



Proč chvostoskoci v ekotoxikologii ?

- ekotoxikologicky dlouho využívané organismy testy od 70' let, i když první test na filtračním papíře byl již v roce 1956 s DDT
- jsou dobře prostudovanou skupinou půdních bezobratlých;
důvody:
 1. ekologická relevance
 2. široce rozšířené, abundantní v půdách
 3. lehce vzorkovatelní
 4. lze je chovat v laboratoři
 5. relativně rychlý životní cyklus s vysokou reprodukcí
- jejich ekotoxikologie zejména stojí oddělena od ostatních půdních členovců (skupiny Isopoda+Diplopoda a skupiny prospěšných členovců), i když zejména v terénních studiích jsou hodnoceni spolu tzv. **mikročlenovci**, což vyplývá z extrakčních technik

Roztoči

Kmen: členovci (*Arthropoda*)

Podkmen: klepítkatci (*Chelicerata*)

Třída: pavoukovci (*Arachnida*)

Řád: roztoči (*Acarina*)



- v půdě 3 podřády:
- *Parasitiformes* – tlející listí, mech, traviny, parazité – *Ixodus*, *Eugamasus*, *Zercon*, **draví – *Gamasida* (čmelíkovci)**
- *Trombidiformes* – mech, opad, humus, saprofágní, *Trombidium* - sametka
- *Sarcoptiformes* :
 - nadčeleď *Acaridia* – měkké, bělavé tělo, opadanka – *Rhizoglyphus echinopus*
 - **nadčeleď *Oribatei* – pancířníci**, chitinový pancíř, povrchové vrstvy půdy, *Carabodes*, *Belba*, *Liacarus*, *Pelops*

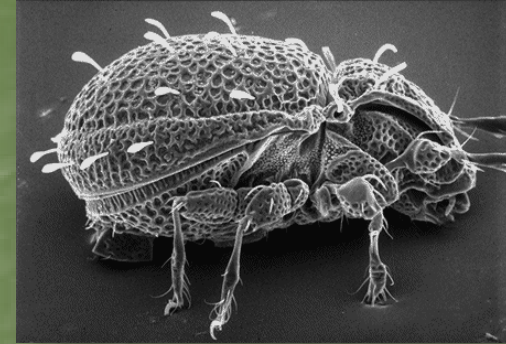
Roztoči



Trombidium



Rhizoglyphus



Carabodes,



Belba



Liacarus



Roztoči

- drobní pavoukovci, kde všechny části těla splývají v jeden celek
- velikost cca 0,1 - 2 mm
- volně žijící druhy jsou buď dravé, nebo se podílí na dekompozici OM, konzumují rostlinný materiál, organický detrit (zejména *Oribatida* - pancířníci)
- průchodem přes střevo roztočů velice pokročí rozklad reziduí
- v půdě velmi početní a rozmanití, až stovky tisíc na 1 m² půdy

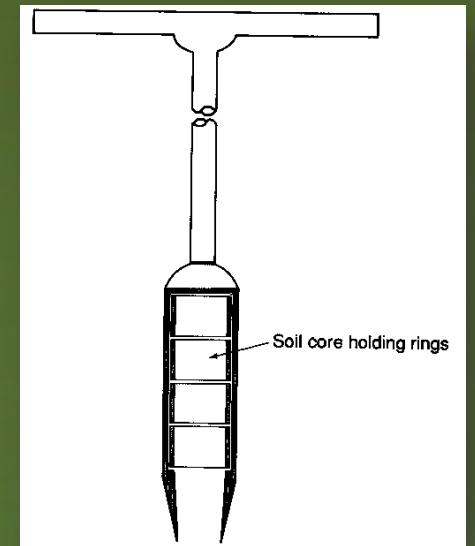
Proč roztoči v ekotoxikologii ?

- vhodné testovací organismy, zastávají řadu potravních typů – herbivoři, fungivoři, detritivoři a carnivoroři
- donedávna byli roztoči používáni jen v několika laboratorních studiích, kdy byly užity různé druhy, látky byly aplikovány topicky či v potravě (zelené řasy), nyní 2 testy SECOFASE a 1 test OECD
- ekotoxikologicky nejvíce využívané druhy jsou: *Platynothrus peltifer* a *Hypoaspis aculeifer*



Terénní studie

- jejich studie jsou často spojeny do studií půdních mikročlenovců (zejména pohromadě s roztoči + protura, diplura, pauropoda, symphyla) - velikosti max 2×10mm
- existuje i ISO pro vzorkování:
ISO 23611-2 Soil quality – Sampling of soil invertebrates Part 2: Sampling and extraction of mesofauna (Collembola and Acarida)
- i vzorkování by mělo být specifické → užití vzorkovače, aby se nepoškodili členovci
- válečky se zabalí a skladují v chladu (5-10°C)
- extrakční techniky jsou **založeny buď na chování zvířat (aktivní)**, či na jejich velikosti, hmotnosti, hydrofobicitě, hustotě apod. (=pasivní)
- <https://www.youtube.com/watch?v=ccOALkRwtHQ>



Terénní studie

- vysokogradentová dynamická extrakce, vychází z **Tullgrenova extraktoru** - teplotní, světelný a vlhkostní gradient - chvostokoci se přemístí do kontrolovaného média - výhodou je získání živých organismů
- pro fixaci se nádobka dole naplní 70% ethanolem a 5% glycerinem, či polyethylenglykolem pro pozorování živých jen vodou
- doba extrakce 12-48 hod.
- <https://www.youtube.com/watch?v=yWFyA2H9jos>

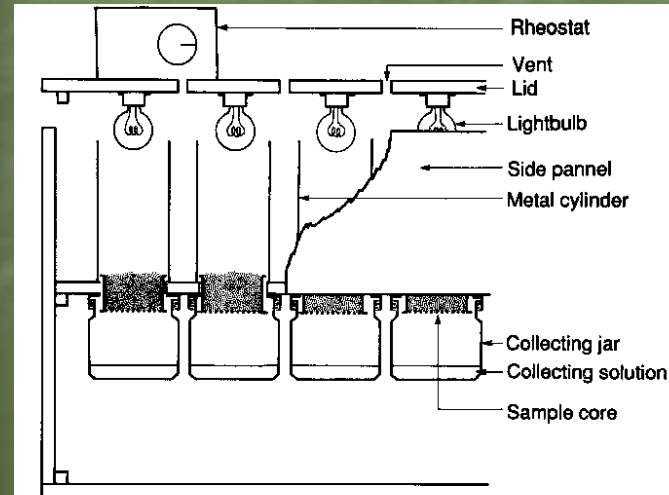
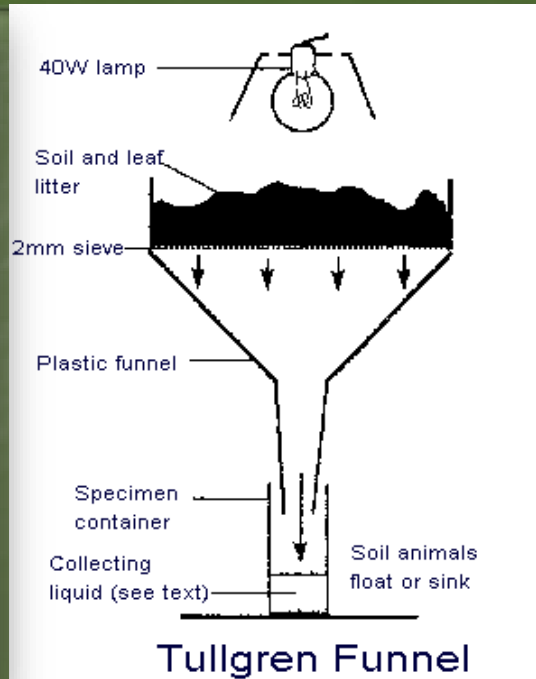


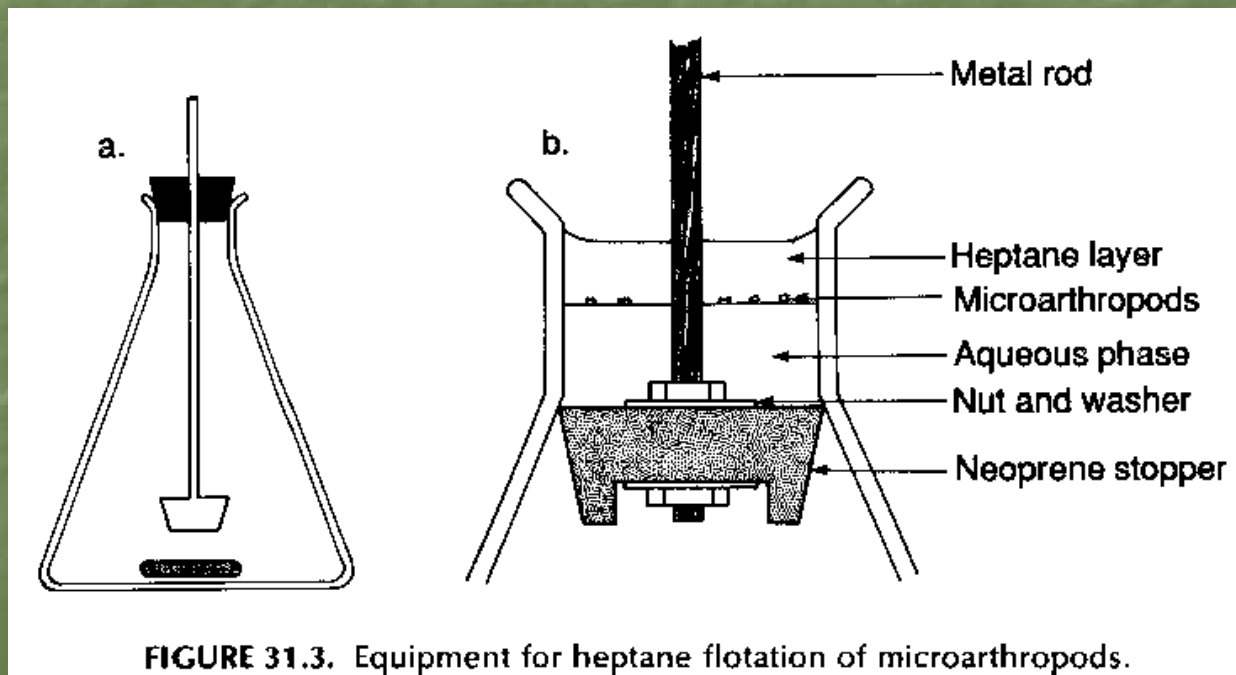
FIGURE 31.2. The front view of a high-gradient extractor for microarthropods.



Terénní studie

pasivní metody: zejména flotační

- vzorky nejprve v 80% ethanolu, pak vlastní extrakce
- extrakční medium (heptan-voda ... směs olej-voda, tetrachlormethan, roztoky solí NaCl, CaCl₂, K₂CO₃ ...,)



Terénní studie

Identifikace:

- bylo by možno zaměnit s roztoči (ale zpravidla neemají tykadla), diplopoda v prvním instaru (na hlavě mají viditelná kusadla), pauropoda v prvním instaru (mají větvená tykadla)
- rozlišují se výrazné ekologické skupiny či taxonomické skupiny:
- **ONLINE KLÍČE:**
- <http://webhost.ua.ac.be/collembola/doc/fsetgen.htm>

Terénní studie

- populace se mění po zásahu pesticidů
- poté po vymizení chemikálií se obnovuje celková abundance
- ale jednotlivé druhy, tj. struktura společenstva se stále odlišuje od kontroly
- → nutnost sledovat celé společenstvo

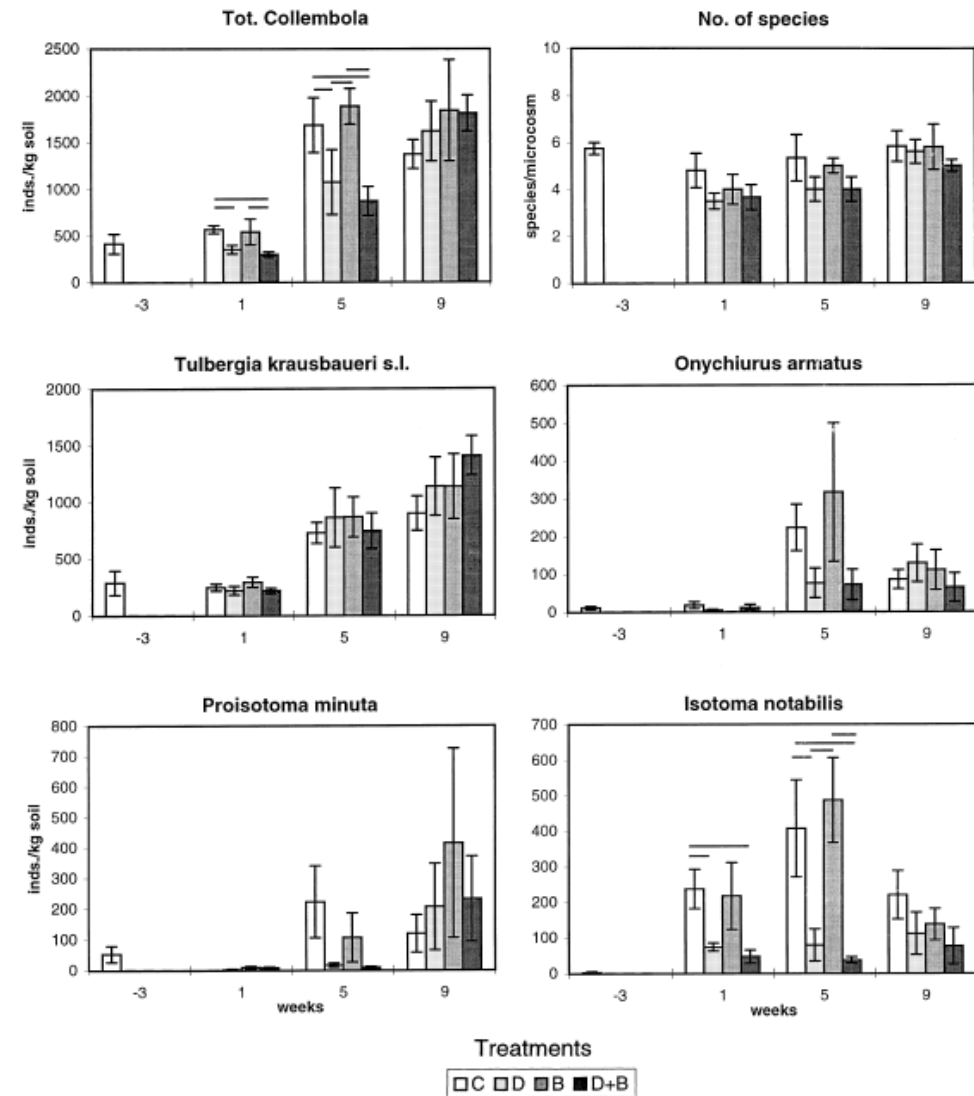


Fig. 1. Numbers of the most numerous collembolan species and total collembolans in the microcosms before and after the pesticide application. Data for the upper and lower soil layers are combined. For treatments see Table 1. Means of 4-6 replicates with S.E. Horizontal bars indicate significant differences between treatment means (Mann-Whitney U -test, $p < 0.05$).

- polní pokus s herbicidy v dávce 2× a 6× doporučené dávky
- dávka 2× neměla výrazný efekt na abundance, ale dávka 6× redukovala abundance mikročlenovců
- zejména v horní vrstvičce půdy 0-7,5 cm

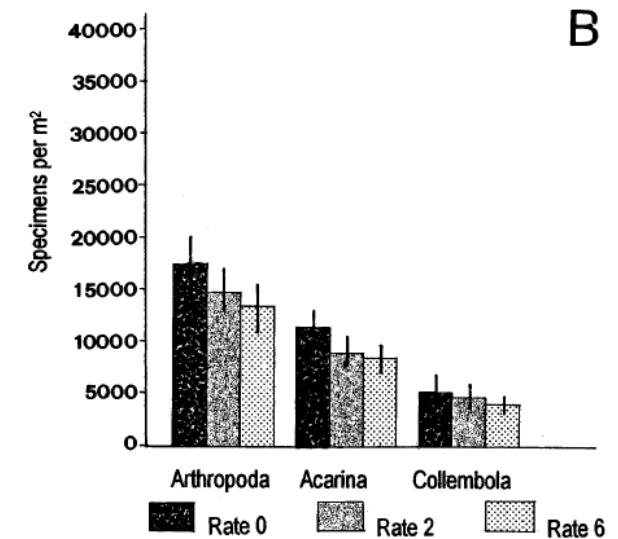
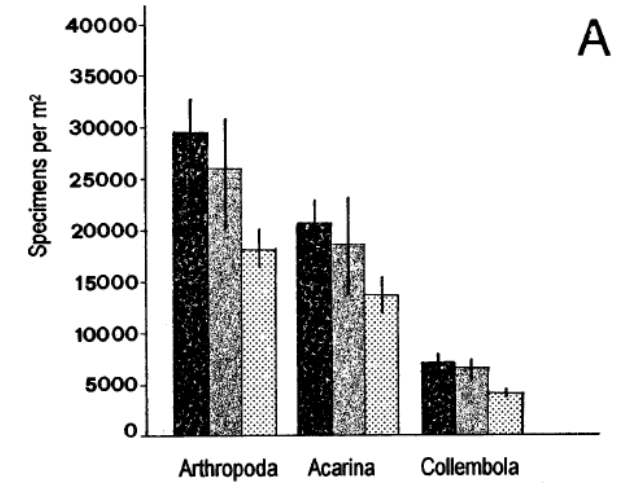


Fig. 2 Abundance of different animal groups in the surface layer (**A**) and deep layer (**B**) of a control plot (*rate 0*) and of two plots treated with *rate 2* and 45 g a.i. ha⁻¹ (*rate 6*) of triasulfuron at Carpi. Mean and SE of the mean are given for untransformed data. For other abbreviations, see Fig. 1

Terénní studie

Table 1 List of Collembola species and relative presence (+) or absence (-) in the two experimental fields exposed to triasulfuron. *a.i.* Active ingredient

Species	Carpi			Ozzano	
	0 g a.i. ha ⁻¹	15 g a.i. ha ⁻¹	45 g a.i. ha ⁻¹	0 g a.i. ha ⁻¹	15 g a.i. ha ⁻¹
<i>Willemia budenbrocki</i> Hüther 1959	+	+	+	+	-
<i>Willemia anophtalma</i> Börner 1901				+	-
<i>Brachystomella parvula</i> (Schäffer 1896)				-	+
<i>Mesaphorura krausbaueri</i> Börner 1901	+	+	+	+	+
<i>Isotomiella minor</i> (Schäffer 1896)	+	+	+	+	+
<i>Folsomides parvulus</i> Stach 1922	+	+	+	+	+
<i>Cryptopygus thermophilus</i> (Axelson 1900)	+	+	-	+	+
<i>Cryptopygus ponticus</i> (Stach 1947)	+	+	+	+	-
<i>Isotoma notabilis</i> Schäffer 1896	+	+	+	+	+
<i>Isotoma olivacea</i> Tullberg 1871	+	-	-		
<i>Isotomodes sexsetosus</i> Gama 1963				+	-
<i>Isotomurus palustris</i> (Müller 1776)	+	-	+	+	+
<i>Entomobrya multifasciata</i> (Tullberg 1871)	+	+	+		
<i>Heteromurus major</i> (Moniez 1889)	+	+	+		
<i>Heteromurus nitidus</i> (Templeton 1835)				-	+
<i>Pseudosinella albida</i> (Stach 1930)	+	+	+	+	+
<i>Pseudosinella octopunctata</i> Börner 1901	+	+	-	+	+
<i>Pseudosinella imparipunctata</i> Gisin 1953	+	+	+	+	+
<i>Pseudosinella sexoculata</i> Schött 1902	+	+	+		
<i>Lepidocyrtus violaceus</i> Lubbock 1873	+	-	-		
<i>Oncopodura crassicornis</i> Shoebbotham 1911	+	+	+	+	+
<i>Megalothorax minimus</i> Willem 1900	+	+	+	+	+
<i>Sminthurides schoetti</i> (Axelson 1903)	+	-	-	+	+
<i>Sphaeridia pumilis</i> (Krausbauer 1898)	+	-	+		
<i>Arrhopalites sericus</i> Gisin 1947				+	+
<i>Sminthurinus</i> sp.	+	+	+		
<i>Sminthurus</i> sp.				+	-

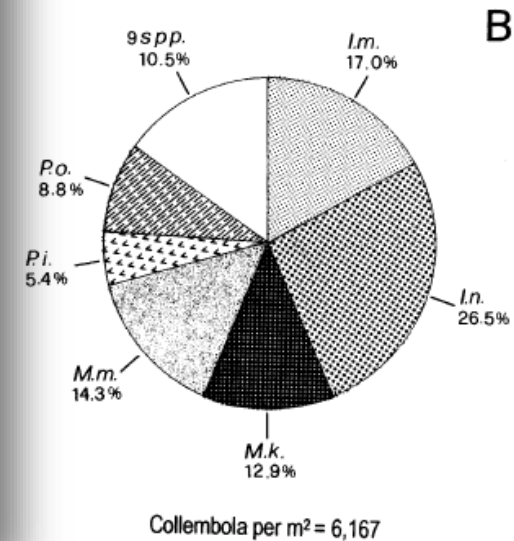
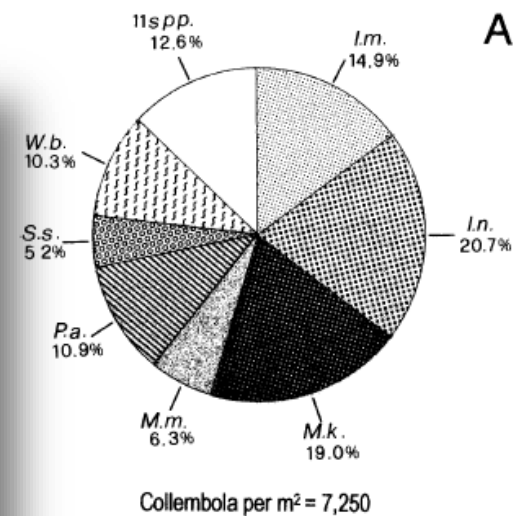
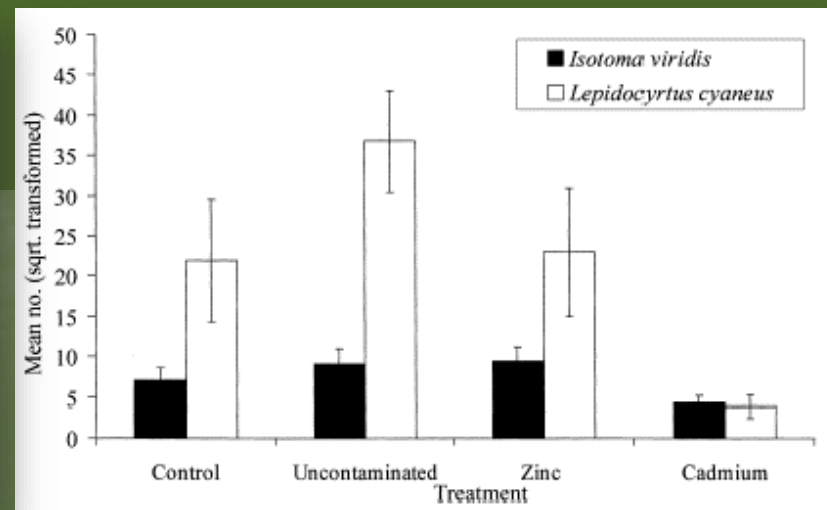
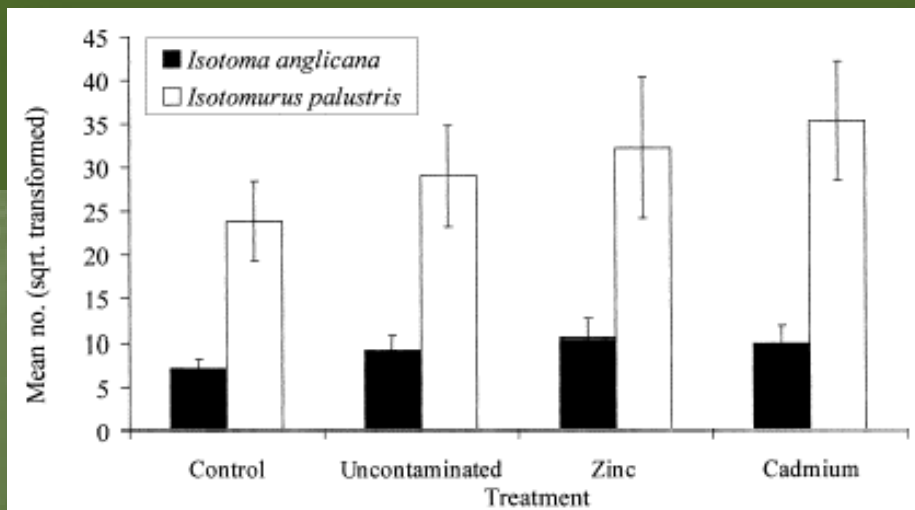


Fig. 3 Dominance and relative distribution of main collembolan species in a plot at Ozzano immediately before (A) and 5 days after treatment with rate 2 of triasulfuron (B). The species with densities less than <5% are represented by spp. *I.m.* *Isotomiella minor*, *I.n.* *Isotoma notabilis*, *M.k.* *Mesaphorura krausbaueri*, *M.m.* *Megalothorax minimus*, *Pa.* *Pseudosinella albida*, *S.s.* *Sminthurides schoetti*, *W.b.* *Willemia budenbrocki*, *P.i.* *Pseudosinella imparipunctata*, *P.o.* *Pseudosinella octopunctata*

chvostokoci byli identifikováni do druhů
 efekty se lišily u různých druhů

Using Collembola to assess the risks of applying metal-rich sewage sludge to agricultural land in western Scotland

- The environmental impact of applying metal-rich sewage sludge to agricultural land was assessed using Collembola.
- A combination of pitfall trapping and suction sampling was used to monitor epigeal/hemiedaphic Collembola on a small plot field trial in the west of Scotland.
- Four sludge treatments were investigated: cadmium-rich sludge, zinc-rich sludge, uncontaminated sludge and a no-sludge control.
- It was found that the abundance of *Lepidocyrtus cyaneus* and *Isotoma viridis* was significantly lower in plots receiving cadmium-rich sludge than those receiving uncontaminated sludge.
- *Isotoma anglicana* was not influenced by the presence of metals in sludge and *Isotomurus palustris* was actually favoured by the application of metal-rich sludge.

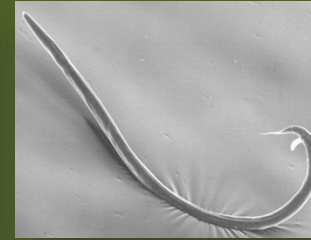


Hlístice

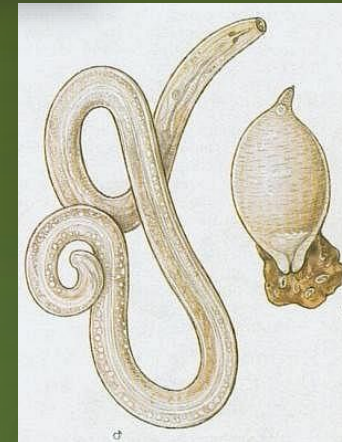
Hlístice – biologie, ekologie, význam

Kmen: hlísti (*Nemathelminthes*)

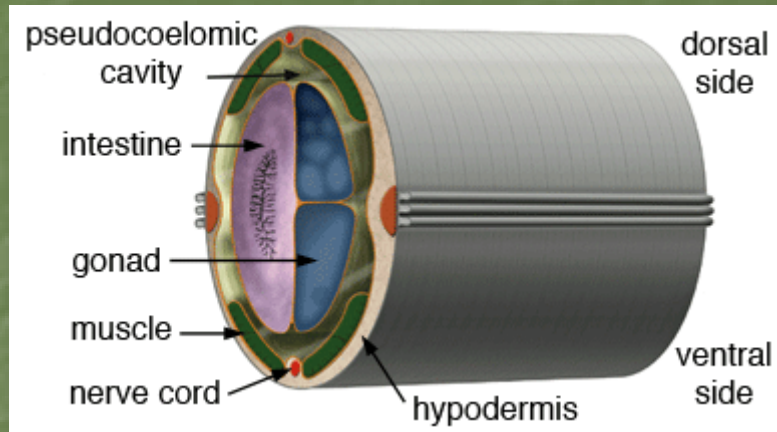
Třída: hlístice (*Nematoda*)



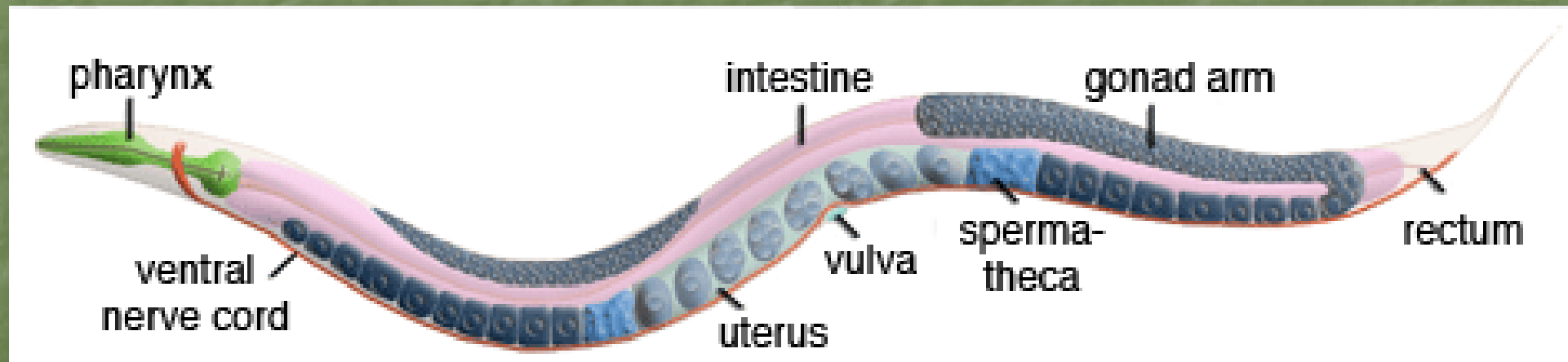
- válcoví červi bez článkovitého těla, neobrvení
0,5 - 2 mm délky
- v půdách nejpočetnější zastoupení z mnohobuněčných
(1g lesního humusu - až 2000 jedinců); 10^7 na 1 m^2
- biomasa až 0,2 t / ha
- řád háďátka (*Tylenchida*) - háďátko řepné
(*Heterodera schachtii*), r. *Plectus*, *Bunodema*, *Tylenchus*
- řád háďata (*Rhabditida*) – *Panagrellus redivivus*, r. *Rhabditis*



Hlístice



4 svaly = esovitý pohyb



Hlístice



Figure 3: Fungal-feeding nematodes have small, narrow stylets, or spears, in their stoma (mouth) which they use to puncture the cell walls of fungal hyphae and withdraw the cell fluid. This interaction releases plant-available nitrogen from fungal biomass.

Credit: Elaine R. Ingham, Oregon State University, Corvallis



Figure 4: This bacterial-feeding nematode, *Elaphonema*, has ornate lip structures that distinguish it from other nematodes. Bacterial-feeders release plant-available nitrogen when they consume bacteria.

Credit: Elaine R. Ingham, Oregon State University, Corvallis



Figure 5: The *Pratylenchus*, or lesion nematode, has a shorter, thicker stylet in its mouth than the root feeder in Figure 6.

Credit: Kathy Merrifield, Oregon State University, Corvallis

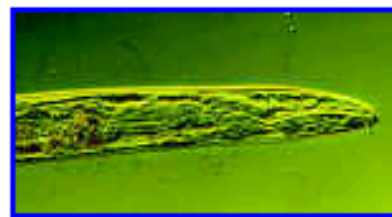


Figure 6: Root-feeding nematodes use their stylets to puncture the thick cell wall of plant root cells and siphon off the internal contents of the plant cell. This usually causes economically significant damage to crops. The curved stylet seen inside this nematode is characteristic of the genus *Trichodorus*.

Credit: Elaine R. Ingham, Oregon State University, Corvallis

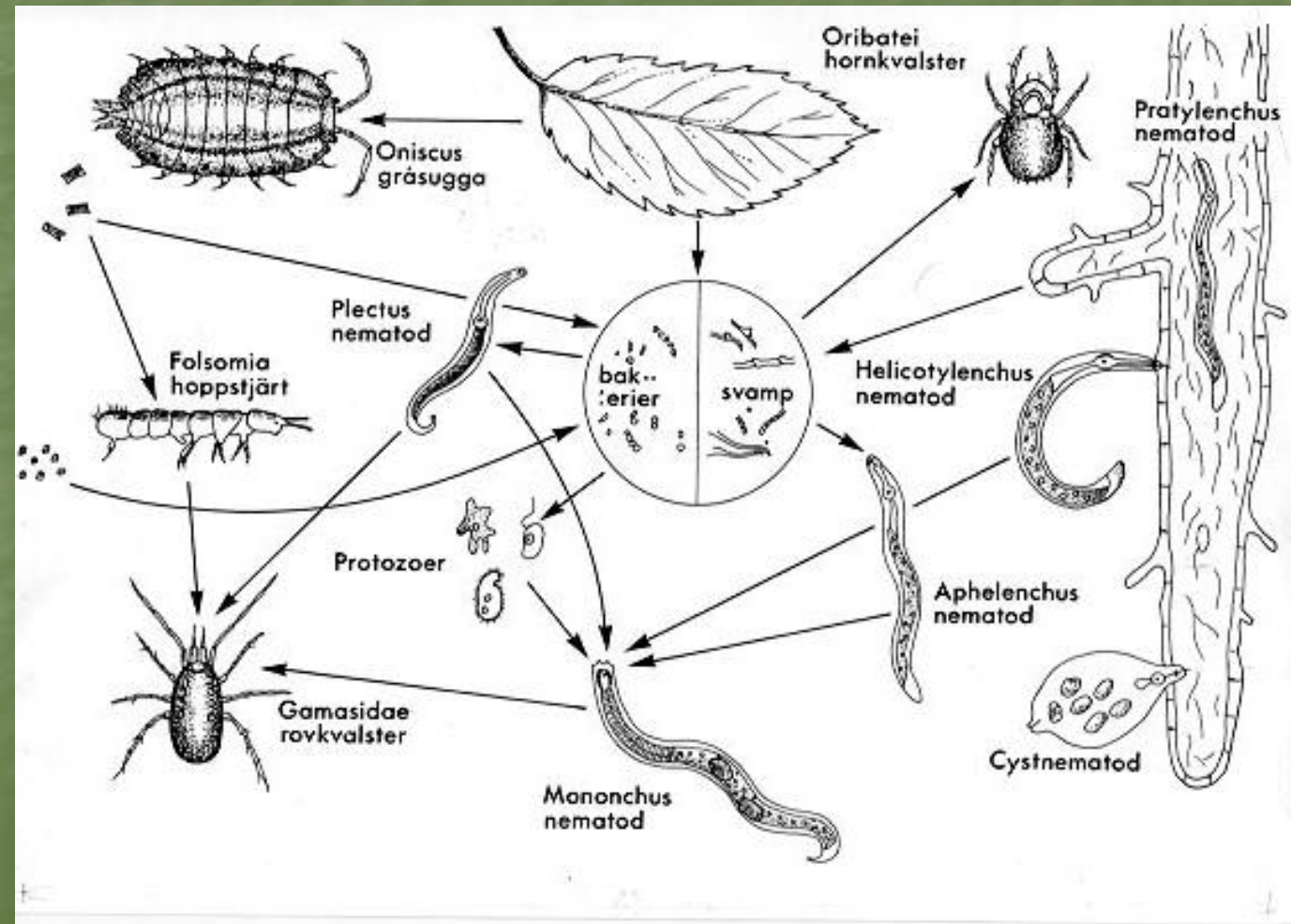
Hlístice

- jsou velmi významné při rozkladu organických látek v půdách, tím, že konzumují primární dekompozitory; stimulují mineralizaci organických látek, zejména **dusíku**; částečně i mechanicky kypří půdu
- většinou saprofágové, poloparazité, méně parazité: živí se bakteriemi, rostlinami, houbami, i predátoři
- rozdělení na fytofágy (endoparazitní a ektoparazitní), mikrobivory, fungivory, omnivory a predátory - toto rozdělení je důležité a identifikačním znakem bývá **podoba ústního ústrojí**
- suché období dovedou přežít v podobě cyst



Společenstva nematod reálných půd

- ISO 23611-4 (2007): Soil quality -- Sampling of soil invertebrates -- Part 4: Sampling, extraction and identification of soil-inhabiting nematodes



Společenstva nematod reálných půd - 2

Příklad

1-2 týdny působení těžkých kovů

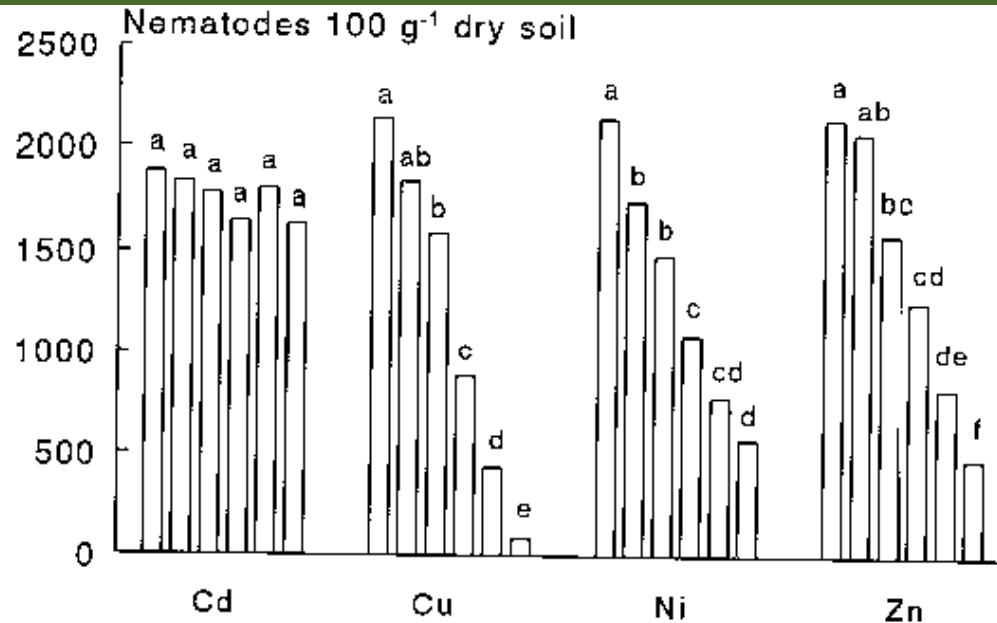


Figure 2. Effects of Cd (0, 10, 20, 40, 80 and 160 mg kg⁻¹) and Cu, Ni and Zn (0, 100, 200, 400, 800 and 1600 mg kg⁻¹) on total nematode abundance after 1-2 weeks exposure. Different letters indicate significant differences between treatments with one metal (HSD test, $P < 0.05$).

- byly prováděny studie sledující **celkové abundance nematod** pod vlivem stresových faktorů
- parametry složení společenstva se ukázaly více citlivé

Společenstva nematod reálných půd - 3

- kromě analýz druhové diverzity se rozlišují skupiny
- hlavní skupiny, které se rozlišují jsou:
 1. bakterivoři, mikrobivoři - konzumují půdní bakterie
 2. fungivoři - konzumují hyfy a mycelia hub
 3. herbivoři, fytofágové - jsou parazité rostlin
 4. omnivoři - různé zdroje potravy, houby řasy, bakterie, malí bezobratlí
 5. carnivoři, pradátoři - loví nematody a malé brzobratlé

Pozn.: skupina *Tylenchidae* se někdy nazývá "plant associated nematoda"

Table 2.8 Feeding habits of nematode orders found in soil ecosystems

Order	Bacterivores	Fungivores	Herbivores	Omnivores	Predators	Other
<i>Class Adenophorea</i>						
Aracolaimida	All soil forms					
Chromadorida	Few					Mostly algivores
Desmodorida	Some?					
Dorylaimida		Some	Some	Some	Some	
Enoplida	Some			Few	Some	
Monhysterida	Most soil forms					
Mononchida	Few				Most	
<i>Class Secernentea</i>						
Aphelenchida		Many	Some		Few	Many insect associates
Rhabditida	Most				Some	Some insect parasites
Tylenchida		Some	Most			Some plant associates, some insect parasites

Společenstva nematod reálných půd - 4



Figure 3: Fungal-feeding nematodes have small, narrow stylets, or spears, in their stoma (mouth) which they use to puncture the cell walls of fungal hyphae and withdraw the cell fluid. This interaction releases plant-available nitrogen from fungal biomass.

Credit: Elaine R. Ingham, Oregon State University, Corvallis



Figure 4: This bacterial-feeding nematode, *Elaphonema*, has ornate lip structures that distinguish it from other nematodes. Bacterial-feeders release plant-available nitrogen when they consume bacteria.

Credit: Elaine R. Ingham, Oregon State University, Corvallis



Figure 5: The *Pratylenchus*, or lesion nematode, has a shorter, thicker stylet in its mouth than the root feeder in Figure 6.

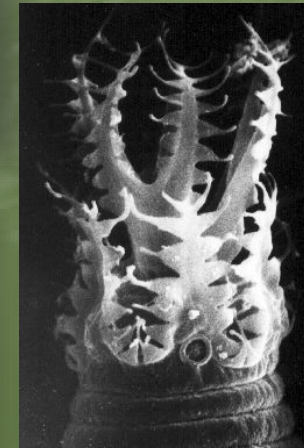
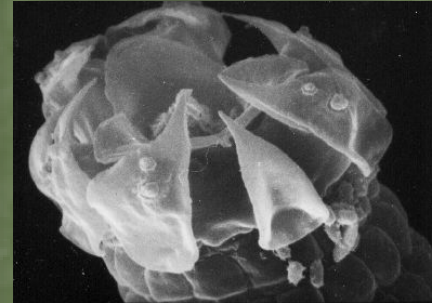
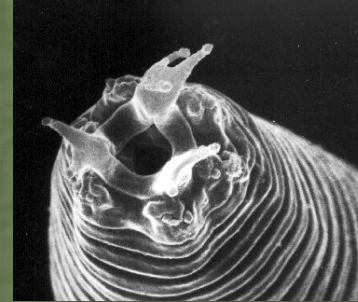
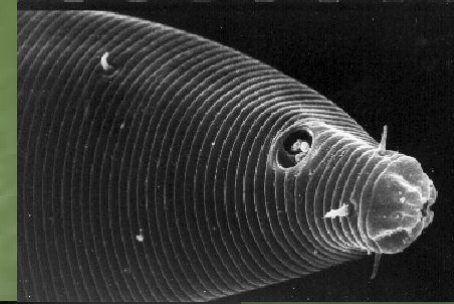
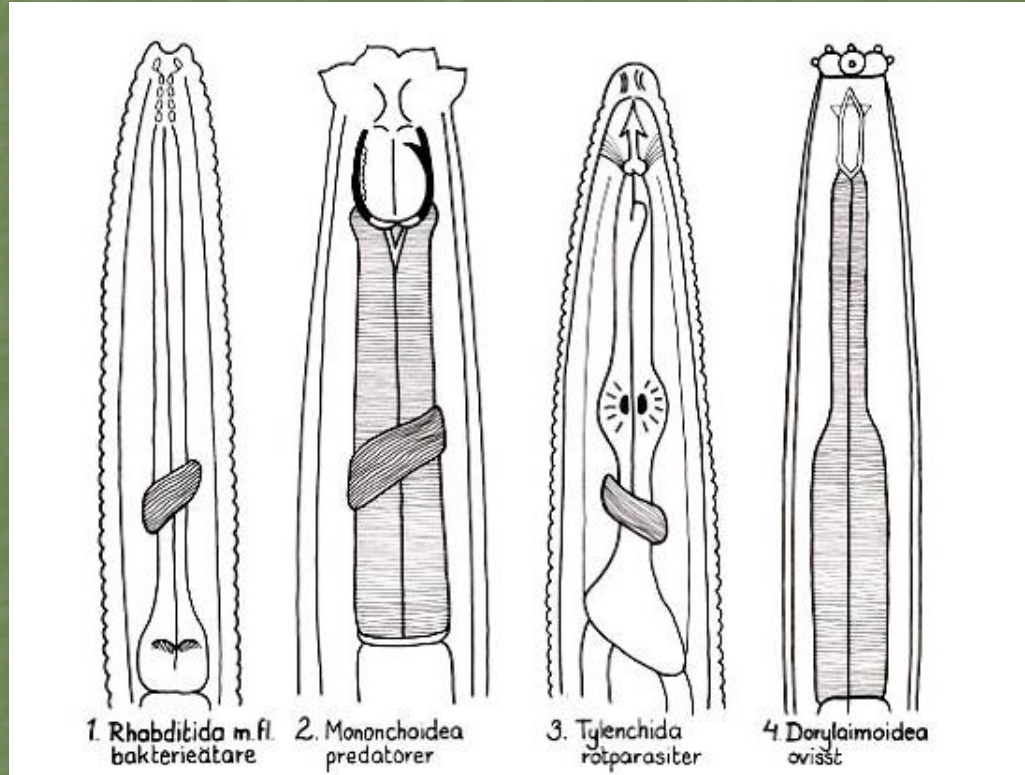
Credit: Kathy Merrifield, Oregon State University, Corvallis



Figure 6: Root-feeding nematodes use their stylets to puncture the thick cell wall of plant root cells and siphon off the internal contents of the plant cell. This usually causes economically significant damage to crops. The curved stylet seen inside this nematode is characteristic of the genus *Trichodorus*.

Credit: Elaine R. Ingham, Oregon State University, Corvallis

Společenstva nematod reálných půd - 5



Společenstva nematod reálných půd - 6

- odběry půd pro identifikaci nematod jsou buď jako půdní jádra (výhoda, že známe objem, povrch a lze přepočítat na m²), či vrchních 15 - 30cm půdy

Metody extrakce:

- aktivní - založené na mobilitě nematod

Baermannova metoda a její modifikace: půda zabalená v látce či papíru; ponoření do vody, nematoda vyplavou do vody během cca 14 dnů vysoká výtěžnost

- pasivní - nezávisí na pohybu nematod

centrifugační, cedící a floatační metody; půda se zředí vodou; použijí se různá síta

- extrakce cyst

cysty obsahují vzduch a plavou na povrchu suspenze; opět se užijí různá síta - výtěžnost až 70% cyst



Vyhodnocení

- nematody se počítají a identifikují (např. dle Bongerse, 1988) fixovány ve 4% formalinu při zvětšení 400 - 1000× (nejméně 150 nematod)

<https://www.youtube.com/watch?v=MWvCB9JIC88>

https://www.youtube.com/watch?v=pXq_9L2EzqU

https://www.youtube.com/watch?v=x_X08MdV5qk

Společenstva nematod reálných půd - 7

Vyhodnocení jako diverzita půdních nematod

- někdy se vyhodnocují indexy (Shannon) a specifické parametry např. procento omnivorů, procento tzv. "Dauer larvae" u rhabditid ...

$$\text{diversity } H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_e p_i$$

$$\text{evenness } J' = \frac{H'}{H'_{\max}} \quad \text{where } H'_{\max} \text{ is } \log_e S$$

$$\text{richness } SR = \frac{S - 1}{\log_e N}$$

$$\text{dominance } \lambda = \sum p_i^2$$

$$\text{diversity } H_2 = -\log_e \lambda$$

kde N je množství individuí identifikovaných, S je množství taxonů, p je proporce jedinců určitého taxonu

- diverzita taxonomická je silně ovlivňována texturou, sezóními fluktuacemi, vegetačním typem, zemědělským managementem, predátory

Společenstva nematod reálných půd - 8

Maturity index (MI):

$$MI = \sum_{i=1}^n v(i).f(i)$$

kde $v(i)$ je c-p (coloniser-persister hodnota) hodnota taxonu i a $f(i)$ je frekvence se kterou se taxon vyskytuje; nezahrnují se rostinně-parazitické rody; v půdách pod stresem těžkých kovů se nezahrnují c-p=1 (enrichment opportunists), neboť se silně liší mikrobiální aktivita půd

- je ekologickou mírou stavu sukcese
- jak je vidět ze vzorečku je váženým průměrem c-p hodnot
- c-p hodnoty reflektují pozici taxonu na škále r-K strategie

Společenstva nematod reálných půd - 9

Table 2

Nematode families with the $c-p$ values which are used in calculating the maturity index (MI) and related values (PPI, Σ MI). Includes changes proposed by Bongers et al. (1995)

Family	$c-p$ value
Alaimidae	4
Aphelenchidae	2
Aphelenchoididae	2
Anguinidae	2 ^a
Aporcelaimidae	5
Bastianiidae	3
Belondiridae	5
Bunonematidae	1
Cephalobidae	2
Chromadoridae	3
Criconematidae	3 ^a
Diphtherophoridae	3
Diplogasteridae	1
Dolichodoridae	3 ^a
Hemicycliophoridae	3 ^a
Hoplolaimidae	3 ^a
Leptonchidae	4
Longidoridae	5 ^a
Monhysteridae	2
Mononchidae	4
Nordiidae	4
Panagrolaimidae	1
Paratylenchidae	2 ^a
Plectidae	2
Pratylenchidae	3 ^a
Prismatolaimidae	3
Qudsianematidae	4
Rhabditidae	1
Teratocephalidae	3
Thornemematidae	5
Tobrilidae	3
Trichodoridae	4 ^a
Tripylidae	3
Tylenchidae	2 ^a

^a Values for families which should be included in the PPI rather than the MI.

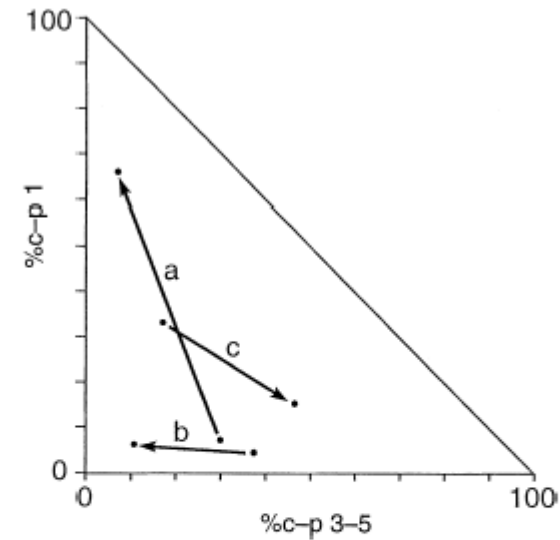


Fig. 2. $c-p$ triangle showing shifts during (a) eutrophication, initial situation and 2 weeks after adding powdered cow-dung (Ettema and Bongers, 1993); (b) artificial acidification of coniferous forest soil (Hyvönen and Persson, 1990) and c) recovery, 33 and 44 weeks after organic manuring (Ettema and Bongers, 1993). (After Bongers et al., 1995).

Společenstva nematod reálných půd - 10

Plant parasitic index (PPI)

- počítá se stejně jako MI, ale jen pro rody krmící se (parazitující) rostlinami (zejména rody *Tylenchus*, *Cephalenchus*, *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Helicotylenchus*, *Pratylenchus* a *Paratylenchus*)
- dříve se tyto rody počítaly do MI a tím se snižovala jeho citlivost, neboť byly prokázány inverzní vztahy mezi MI a PPI
- existuje poměr MI/PPI, který se tím pádem stává ještě citlivější na hodnocení vlivů na společenstva nematod

Společenstva nematod reálných půd - 11

Příklad

- 10 let působení mědi na lokalitách s různým pH půdy
- u obou přístupů jednoznačná souvislost mezi ekotoxickým účinkem mědi a pH: ve variantách s nižším pH byla vyšší extrahovatelnost Cu chloridem vápenatým, tudíž i očekávaná vyšší koncentrace v půdním roztoku → **vyšší biodostupnost**

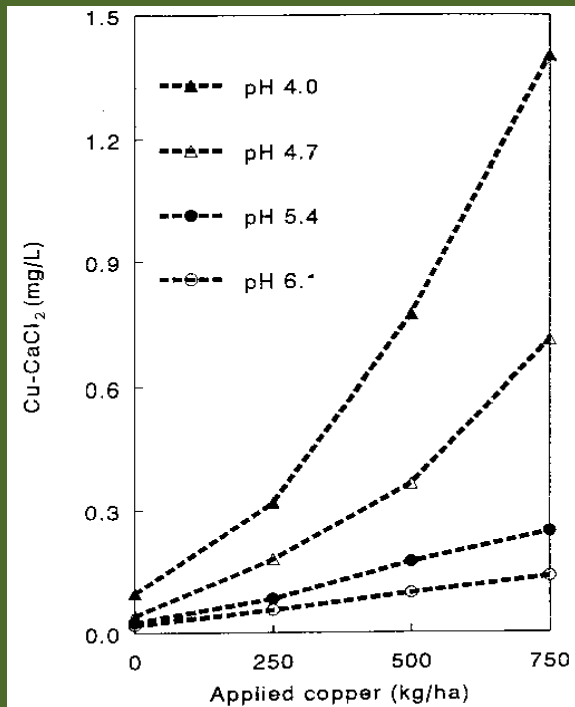


Fig. 2. Mean Cu-CaCl₂ concentrations ($n = 8$) 10 years after copper and pH treatments in 1982.

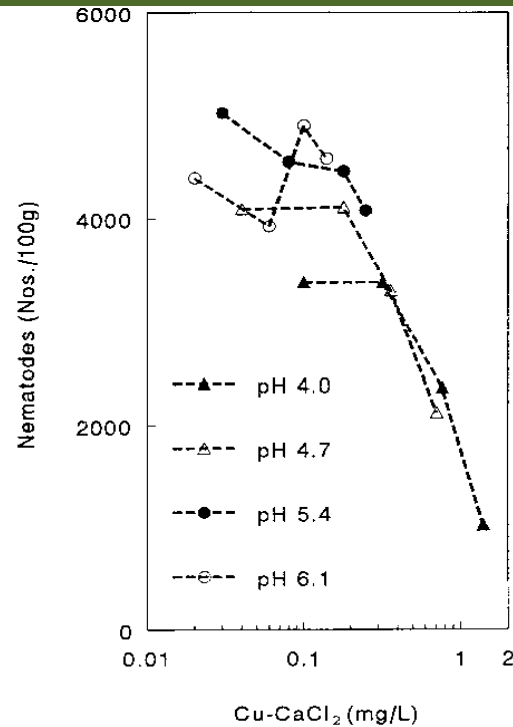


Fig. 3. Mean total number of nematodes ($n = 8$; 1992) found for each treatment combination.

Společenstva nematod reálných půd - 12

Příklad

- prokázána vyšší citlivost parametrů složení společenstva než celkové abundance
- Na kombinace pH a kontaminace mědí různě reagovaly bakterivorní a fungivorní nematody
- jako citlivé se ukázaly predátoři a omnivorní (díky tomu, že jsou to většinou K strategové)

Table 3. Abundance^a of trophic groups (N/100 g) in 1992

Treatment pH-KCl	4.0				4.7			
	0	250	500	750	0	250	500	
Bacterial-feeding	1,503 bcdef	1,381 bcde	1,110 ab	506 a	1,587 bcdef	1,489 bcdef	1,212 abcd	1,12
Hyphal-feeding	684 abc	739 abc	836 abc	394 abc	477 abc	394 abc	564 abc	58
Plant-feeding	1,180	1,252	420	127	1,978	2,216	1,500	40
Omnivores	10 ab	6 ab	0 a	0 a	33 bc	2 ab	13 ab	.
Carnivores	3	2	0	0	19	13	9	8

^aAverage abundances ($n = 8$) within one row followed by different letters differed significantly ($p < 0.05$).
^bAsterisks indicate significant treatment effects: * $0.05 > p \geq 0.01$, ** $0.01 > p \geq 0.001$, *** $p < 0.001$.

Table 3. Extended

0	5.4			6.1				Main effect ^a		
	250	500	750	0	250	500	750	Cu	pH	Inter-action
2,197 f	1,860 cdef	1,833 bcdef	1,889 def	1,739 bcdef	1,522 bcdef	2,004 ef	2,211 f	*	***	***
477 abc	641 abc	908 c	877 bc	351 a	366 ab	631 abc	602 abc	**	**	*
2,348	2,031	1,708	1,304	2,202	1,963	2,242	1,754	***	***	
16 abc	11 ab	11 abc	0 a	100 c	39 bc	14 abc	10 ab		**	
14	12	8	0	9	34	7	8			

Společenstva nematod reálných půd - 13

Příklad

- sledován efekt depozice amoniaku unikajícího z farmy drůbeže na společenstvo nematod v půdě borovicového lesa
- correlation between NH_3 deposition and plant-feeding nematods and insect associated Dauer larvae
- decreasing proportions of bacterial-feeding nematodes and fungal-feeding and omnivorous nematodes
- increase in PPI and decrease in MI

Table 16

Relation between ammonia deposition gradient in a *Pinus sylvestris* plantation and composition of the nematode fauna (after Tamis, 1986)

	Distance from source (m)		
	75	150	400
Total nitrogen deposition (kg N ha^{-1} per year)	68.0	52.5	47.9
Soil nitrogen ($\mu\text{g g}^{-1}$)	27	15	3
Stem flow ($\text{mg NH}_4^+ \text{ l}^{-1}$)	45	30	15
Soil pH	4.9	5.2	5.3
Total nematodes (thousands m^{-2} in litter and 0–20 cm soil)	1302	1023	916
% bacterial-feeding	26.9	23.4	47.0
% fungal-feeding	11.5	18.8	21.9
% plant-feeding	54.2	53.9	22.2
% omnivores	0.3	0.4	7.1
% insect associates	7.1	3.5	1.8
Maturity index (MI)	2.03	2.37	2.46
Plant parasite index (PPI)	2.96	2.80	2.27
Simpson diversity	0.87	0.88	0.93

Společenstva nematod reálných půd - 14

Příklad

- Popovici (1994) studied the effect of exhaust fumes and fine powder discharged from a metallurgical plant on the soil nematode communities in forest agroecosystems
- As lead and copper pollution increased, nematode abundance decreased; diversity (H') and maturity index (MI) also decreased.
- The percentage of r-strategists (bacterivores) increased from 50 to 72%, while plant-feeding nematodes were reduced and both omnivores and predators disappeared.
- Similarly, in the vicinity of a zinc smelter in The Netherlands, Popovici and Korthals (1995) found pollution-associated decreases in total nematodes, plant-feeding nematodes and the maturity index; bacterial-feeders again increased.

Table 17

Comparison of 12 sites near a zinc smelter in The Netherlands with five control sites (after Popovici and Korthals, 1995)

	Control	Polluted
Vegetation	<i>Calluna, Betula</i>	<i>Calluna, Agrostis</i>
<i>Nematodes</i>		
Total m ⁻² in 0–10 cm soil	2,520,000	1,970,000
% plant-feeding	30	17
% bacterial-feeding	42	58
% fungal-feeding	26	24
Maturity Index	2.14–2.45	1.86–2.07

Společenstva nematod reálných půd - 15

Příklad

In general terms the rate of decomposition of organic matter increases following effluent (sewage sludge → high contamination but also high organic matter content) application and can be related to an increase in the abundance of bacterial-feeding nematodes and a decrease in fungal-feeding nematodes.

Table 18
Percentage contribution of feeding groups to the nematode faunae of two New Zealand agroecosystems with and without application of effluent (from Yeates, 1978, 1995)

Ecosystem Soil texture	Pasture Silt loam		<i>Pinus</i> forest Sand	
	Control	Effluent	Control	Effluent
Bacterial feeders	29.7	37.2	43.2	65.6
Fungal feeders	8.8	4.2	23.2	4.8
Predators	1.2	0.8	1.1	6.2
Plant-feeding	14.0	14.5	2.0	8.3
Plant associated	32.0	29.1	8.0	2.1
Omnivores	14.3	14.2	22.5	12.9

Společenstva nematod reálných půd - 16

Příklad

In a German cropping soil, addition of slightly contaminated sludge led to a decrease in the proportion of plant-feeding nematodes. When additional heavy metals were added the principal change was a five-fold increase in the proportion of what Weiss and Larink (1991) termed predacious nematodes (we would regard the Diplogasteridae identified to be bacterial-feeding); the omnivores (mainly Dorylaimida) became undetectable. A New Zealand pasture showed broadly similar trends, with increases in bacterial-feeders and predators and a decrease in omnivores

Table 19

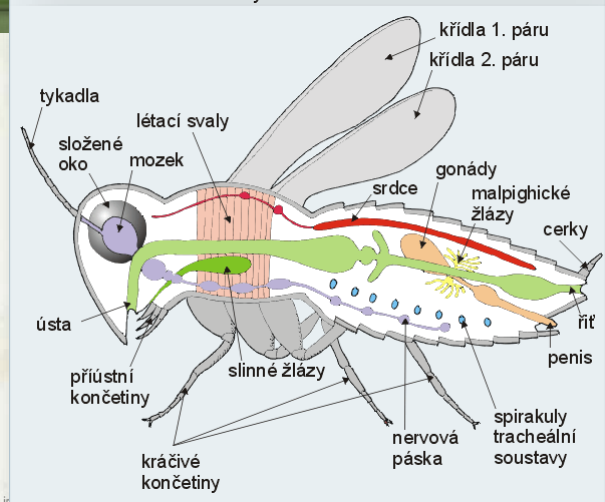
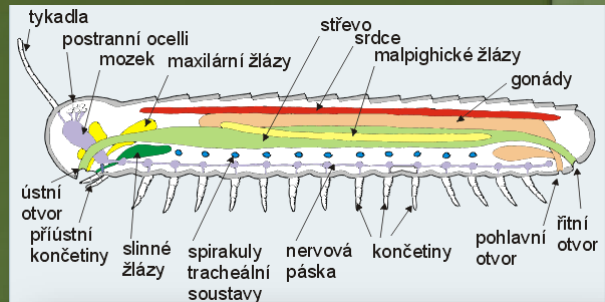
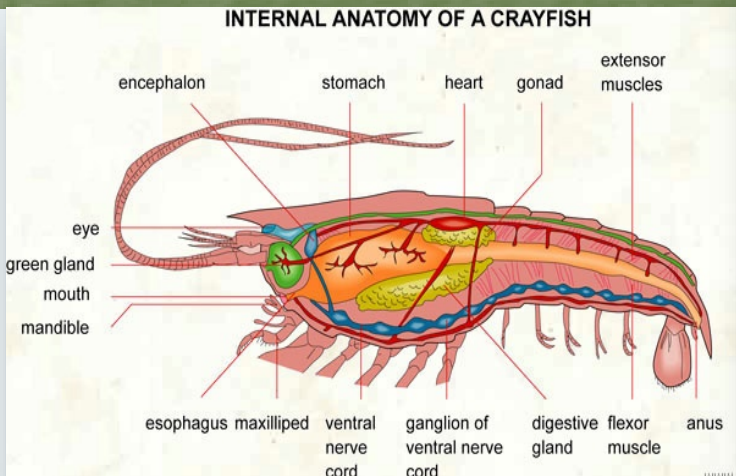
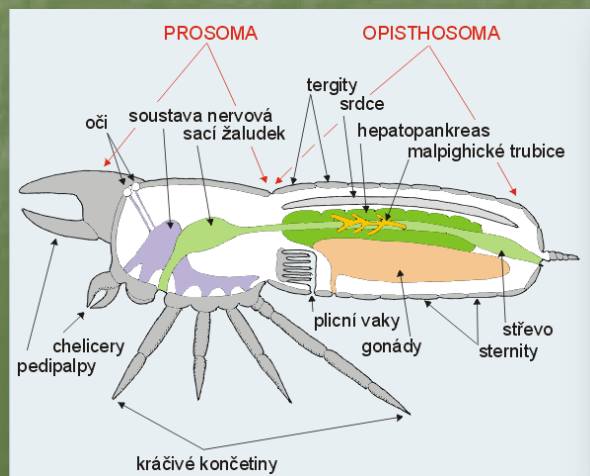
Percentage contribution of feeding groups to the nematode faunae of two agroecosystems with addition of sludge and heavy metals, and contaminated to differing degrees with copper, chromium, arsenic (CCA) timber preservative (from Weiss and Larink, 1991; Yeates et al., 1994)

Agroecosystem Soil texture	Cropping (Germany) Loamy sand			Pasture (New Zealand) Silt loam (stony)			
	Control	Sludge	Sludge+ heavy metals	Control	Low CCA	Medium CCA	High CCA
Bacterial feeders	18	40	42	18.1	29.4	62.3	48.3
Fungal feeders	33	30	31	1.5	3.0	2.4	0.5
Predators	0	2	10	0.9	1.3	7.6	10.6
Plant-feeding	43	27	18	36.8	27.4	11.2	28.4
Plant associated	in above	in above	in above	13.6	20.4	8.8	10.2
Omnivores	5	1	0	29.0	18.4	7.7	2.0

Ostatní bezobratlí v půdě a na půdě

Další členovci

- kromě chvostoskoků, roztočů a stejnonožců, kteří jsou nejvíce využíváni v ekotoxikologii, se používají i **další skupiny členovců**
- v půdě jsou významní zástupci všech tří podkmenů *Arthropoda*:
 - **klepítkaci (*Chelicerata*)** – zejména roztoči, pavouci, štírci, sekáči
 - **korýši (*Crustacea*)** – jen stejnonožci (Isopoda)
 - **vzdušnicovci (*Tracheata*)**
 - velice zásadní skupina velická pestrost
 - dnes dva podkmeny:
 - **šestinozí (*Hexapoda*)** a **stonožkovci (*Myriapoda*)**



Typy členovců

- Shredders (okusovači)



- Predators (dravci)



- Herbivores (hebivoři)



- Fungal-feeders (fungivoři)



Pavouci, sekáči

Kmen: členovci (*Arthropoda*)

Podkmen: klepítkatci (*Chelicerata*)

Třída: pavoukovci (*Arachnida*)

Řády: sekáči (*Opilionida*), pavouci (*Aranae*), štírci (*Pseudoscorpiones*)

Pavouci

- draví – hmyz, drobní živočichové
- až 100 ks / m²
- sklípkánci (*Atypidae*) hloubí svislé nory v půdě až 15 cm, nory také rod
- slídáci (čeleď *Lycosidae*) – doupata v půdě – r. *Lycosa*, *Trochosa*, nebo žijí v opadance r. *Pardosa*
- plachetkovití, r. *Linyphiidae*



Sekáči

- většinou také predátoři, často ale i rostlinná strava
- hlavně rody *Opilio*, *Oligolophus*, *Phalangium*, *Platybunus*, *Trogulus*



Stonožkovci - *Myriapoda*

Kmen: členovci (*Arthropoda*)

Podkmen: Vzdušnicovci (*Tracheata*)

Nadtřída: stonožkovci (*Myriapoda*)

- je známo, že extrémně akumulují těžké kovy, a letální účinky se projevují až při plném nasycení akumulací kapacity – **makrokoncentrátoři** – vhodné pro indikaci znečištěného prostředí

Stonožky

Kmen: členovci (*Arthropoda*)

Podkmen: Vzdušnicovci (*Tracheata*)

Nadtřída: stonožkovci (*Myriapoda*)

Třída: stonožky (*Chilopoda*)

- jsou **dravé**, loví žížaly, isopoda, larvy hmyzu
- na každém článku pár nohou, první pár nohou uchopovací s jedovými žlázami
- *Lithobius*, *Geophilus*, *Scolopendra*



Mnohonožky

Kmen: členovci (*Arthropoda*)

Podkmen: Vzdušnicovci (*Tracheata*)

Nadtřída: stonožkovci (*Myriapoda*)

Třída: mnohonožky (*Diplopoda*)

- saprofágní, konzumují rostlinné zbytky a drobí je tím na menší kousky, čím jsou velmi významní
- obývají horní vrstvy půdy - výrazná expozice látkám
- *Julidae*, *Glomeridae*, *Polydesmidae*, *Polyzonidae*



The 70 kD heat shock protein (hsp 70) in soil invertebrates: a possible tool for monitoring environmental toxicants

- The expression of hsp 70 after heat shock or exposure to heavy metals/molluscicides was investigated by fluorography or immunoblot in three **diplopods** (**Glomeris marginata**, **Cylindroiulus punctatus**, **Tachypodoiulus niger**), two slugs (*Deroceras reticulatum*, *Arion ater*), and one **isopod** (**Oniscus asellus**).
- In *O. asellus*, hsp 70 expression occurred after heat shock and also after lead treatment, whereby a solution of 100 mg/kg Pb²⁺ was sufficient.
- Animals of the same species taken from a heavy metal polluted site in the vicinity of a lead/zinc smelter also showed the presence of hsp 70.
- The comparison of laboratory and field experiments demonstrated the suitability of *O. asellus* for monitoring tests.
- In contrast, the blot pattern after contamination with 1,000 mg/kg Pb²⁺ (in the mentioned diplopods) or different concentrations of the molluscicide Cloethocarb (BASF, FRG) (slugs) showed no differences compared to the respective control group.

Hexapoda - šestinozí

Kmen: členovci (*Arthropoda*)

Podkmen: šestinozí (*Hexapoda*)

- *Hexapoda* mají zřejmě největší význam z celé půdní fauny – konzumují OM, drobí rezidua, kypří půdu, trusem přispívá k tvorbě kvalitní půdní OM a půdní struktury
- *Hexapoda* zahrnují také třídu **entognatha (skrytočelistní)**: řády **vidličnatky** a **hmyzenky**, které mají pro půdu malý význam, a řád **chvostoskoci (*Collembola*)**, kteří mají pro půdu veliký význam
- **Třída: jevnočelistní, hmyz (*Ectognatha, Insecta*)**
- pro půdu zásadní **zejména jejich larvy**
- zejména **podtřída: křídlatí (*Pterygota*)** a její řády

Insecta – hmyz významný v půdě

řád dvoukřídlí (*Diptera*)

- jejich larvy významná saprofágní funkce, dekompozice OM, zejména
 - čeleď tiplicovití (*Tipulidae*) – larvy se živí rostlinným materiálem, r. *Tipulida*, *Pales*
 - čeleď muchnicovití (*Bibionidae*) - kladou vajíčka do půd, živí se tlejícím listím a kořínky rostlin, r. *Bibio*

řád blanokřídlí (*Hymenoptera*)

- čeleď mravenci (*Formicoidea*) – ovlivňují fyzikální i chemické vlastnosti půd, budování chodeb, provzdušnění půdy, u mravenišť a v okolí zakoncentrované mikroorganismy a kationty, r. *Formica*, *Tetramorium*, *Lasius*, *Campognotus*



Insecta – hmyz významný v půdě

řád brouci (*Coleoptera*)

- draví i saprofágní + larvy žijící v půdě; asi 400 tis druhů, 6000 v ČR

masožraví:

- čeleď *Carabidae* (střevlíci) – v noci chytají hmyz a larvy, r. *Carabus*, *Calosoma*, *Pterostichus*
- čeleď *Cicindilidae* (svižníci) – larvy mají pod zemí chodby, kam tahají polapenou kořist, r. *Cicindela*

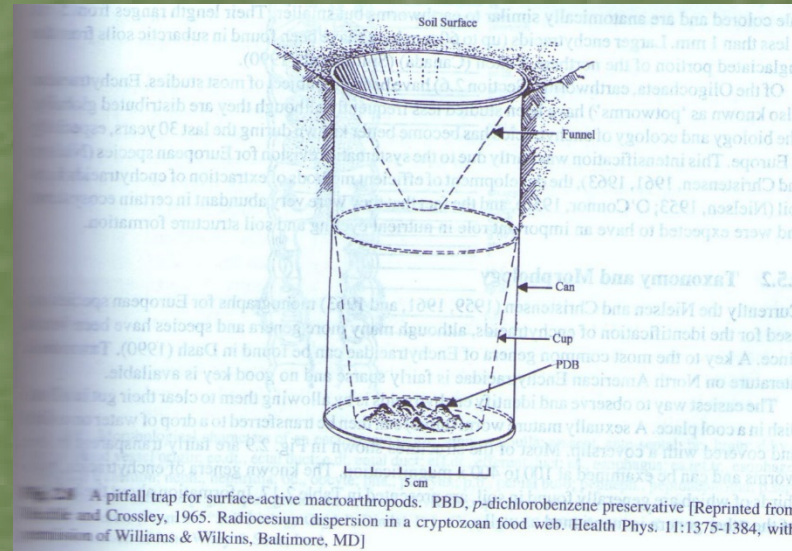
všežraví:

- čeleď *Silphidae* (mrchožroutovití) – rozkládají a požírají mršiny, larvy hrobaříků, r. *Necrophorus*
- čeleď *Staphylinidae* (drabčící) – horní vrstvy půdy, hrabanka – většinou masožraví, r. *Oxyporus*, *Paederus*, *Staphylinus*
- čeleď *Elateridae* (kovaříkovití) – tenké larvy – drátovci, ožírají kořínky, masožravé, či trouchnivějící dřevo, r. *Adelocera*, *Corymbites*
- čeleď *Scarabaeidae* (vrubounovití) – do půdy vtahuje trus, r. *Geotrupes*



Polní studie

- jsou dostatečně velcí, na rozdíl od mikročlenovců (roztoci, chvostoskoci), aby šli extrahovat jako jednotlivci
- i rozdíl mezi těmito skupinami je spíše v tom, co získáme extrakcí, než nějaké taxonomické hranice
- získání sítí či manuálním vybíráním, Tullgrenova extrakce či **zemní pasti**



<https://www.youtube.com/watch?v=4k7I4cdKnMI>
https://www.youtube.com/watch?v=GGgdIMMK1_4
<https://www.youtube.com/watch?v=UVXtPOf9Za0>

Polní studie



Vliv pesticidu Delthamethrin na pavouky z čeledi Linyphiidae (plachetnatkovití z nadčeledi křížáků)

- odchyt pomocí zemních pastí
- zabývali se zejména vlivem pohybové aktivity pavouků na jejich expozici
- bylo totiž zjištěno, že ihned po expozici se aktivita zvýší jako tendence úniku - snižuje expozici



Polní studie



- Non-specific carboxylesterase and glutathione S-transferase activity was measured in the ground beetle, *Pterosthicus oblongopunctatus* (Coleoptera: Carabidae), from five sites along a gradient of heavy metal pollution.

Table 1
Mean concentrations of four heavy metals (\pm S.D.) detected in the humus layer along the heavy metal gradient

Site	Zn (mg kg^{-1})	Cd (mg kg^{-1})	Cu (mg kg^{-1})	Pb (mg kg^{-1})
OLK2	10454 (2618)	81.9 (17.2)	46.9 (4.6)	2635 (120.4)
OLK3	5104 (729)	51.1 (19.3)	37.6 (3.7)	1832 (215)
OLK4	1522 (135)	18.1 (2.6)	25.6 (2.16)	870 (36.3)
OLK6	244 (78)	3.3 (1)	15.4 (2.7)	355 (30.9)
OLK7	151 (35)	0.84 (0.4)	10.7 (1)	136 (8.8)

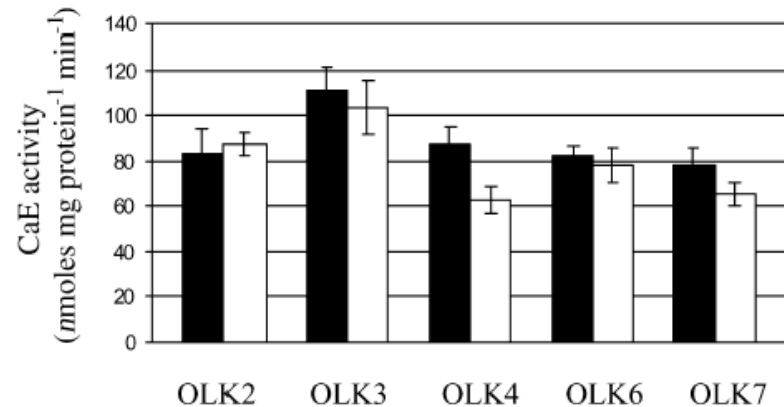
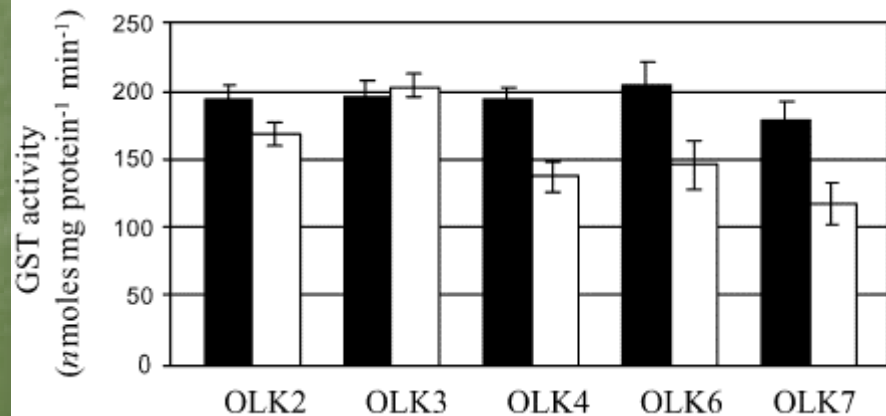


Table 1

Carabidae collected in pitfall traps at eight field crop sites in Saskatchewan (1994–1996)

Species	Total numbers
<i>Agonum</i>	
<i>A. cupreum</i> Dejean	49
<i>A. placidum</i> (Say)	219
<i>Amara</i>	
<i>A. apricaria</i> (Paykull)	27
<i>A. carinata</i> (LeConte)	84
<i>A. confusa</i> (LeConte)	9
<i>A. convexa</i> (LeConte)	1
<i>A. cupreolata</i> (Putzeys)	1
<i>A. fœrcta</i> (LeConte)	27
<i>A. lacustris</i> (LeConte)	18
<i>A. latior</i> (Kirby)	16
<i>A. littoralis</i> (Mannerheim)	166
<i>A. obesa</i> (Say)	49
<i>A. torrida</i> (Panzer)	3
<i>A. quenseli</i> (Schonherr)	66
Unidentified species	1
<i>Bembidion</i>	
<i>B. bimaculatum</i> (Kirby)	6
<i>B. canadianum</i> (Casey)	1
<i>B. nigripes</i> (Kirby)	1
<i>B. mutatum</i> (Gemminger)	4
<i>B. nitidum</i> (Kirby)	160
<i>B. nudipenne</i> (Lindroth)	4
<i>B. obscurellum</i> (Motschulsky)	280
<i>B. quadrimaculatum</i> (LeConte)	452
<i>B. rapidum</i> (LeConte)	5
<i>B. timidum</i> (LeConte)	13
<i>B. versicolor</i> (LeConte)	68
Unidentified species	10
<i>Bradycellus congener</i> (LeConte)	3
<i>Calosoma</i>	
<i>C. calidum</i> (Fabricius)	11
<i>C. lepidum</i> (LeConte)	7
<i>C. obsoletum</i> (Say)	7
<i>Calathus ingratus</i> (Dejean)	5
<i>Diplocheila striatopunctata</i> (LeConte)	1
<i>Dyschirius</i>	
<i>D. globulosus</i> (Say)	1
Unidentified species	1
<i>Euryderus grossus</i> (Say)	2
<i>Harpalus</i>	
<i>H. reversus</i> (Casey)	70
<i>H. opacipennis</i> (Haldeman)	4
<i>H. amputatus</i> (Say)	86
<i>H. herbivagus</i> (Say)	78
<i>H. fuscipalpis</i> (Sturm)	19

Table 1 (Continued)

Species	Total numbers
<i>Microlestes linearis</i> (LeConte)	13
<i>Patrobus longicornis</i> (Say)	1
<i>Poecilus</i>	
<i>P. corvus</i> (LeConte)	71
<i>P. l. lucublandus</i> (Say)	84
<i>P. scintulus</i> (LeConte)	1
<i>Pterostichus</i>	
<i>P. femoralis</i> (Kirby)	7
<i>P. adstrictus</i> (Eschscholtz)	7
Unidentified species	1
<i>Syntomus americanus</i> (Dejean)	21

Polní studie



Commercial farms were examined in western Canada to assess the impact of two cropping systems (annual-grain and diversified grain-forage) and two input systems (high level and organic) on carabid beetles. Pitfall traps were used to sample beetles over 3 years (1994–1996).

Polní studie



Field trials were simultaneously conducted in Algeria, Nigeria, Tanzania, Uganda and Zambia between 1992 and 1995 in order to determine the effects of organochlorine pesticides lindane (all countries) and endosulfan (two countries) on non-target arthropods in African maize agroecosystems.

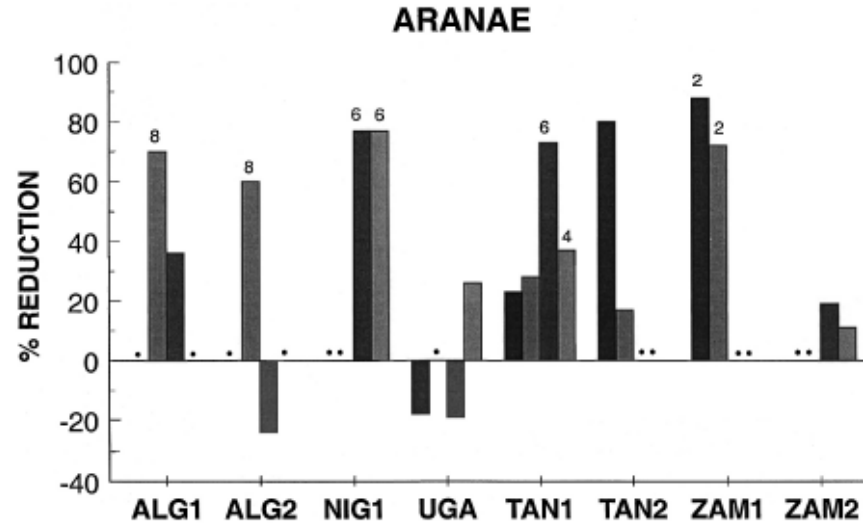


Fig. 4. Reduction in the number of Aranae between treated and untreated plots over the growing period for four subsequent years (● - no data). The figure on top of bar indicates the duration (in weeks) of significant effect. Bars without figures indicate no significant effect. For country codes see Table 1.

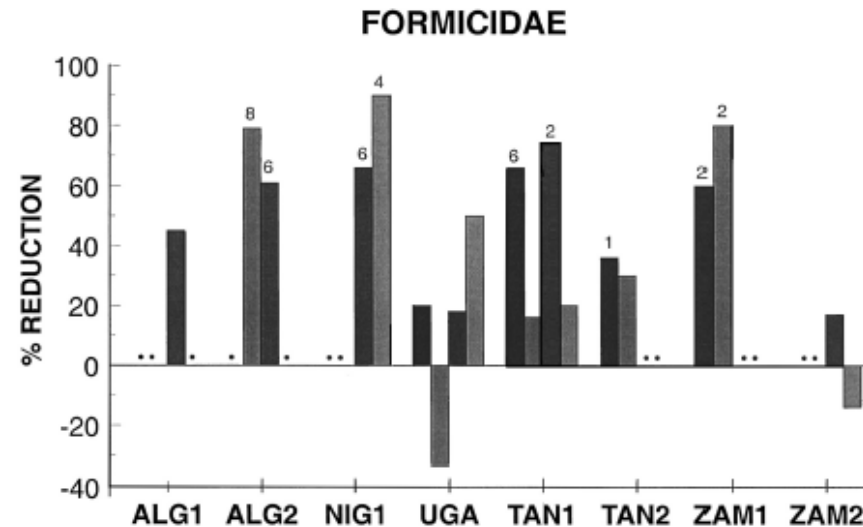


Fig. 5. Reduction in the number of Formicidae between treated and untreated plots over the growing period for four subsequent years (● - no data). The figure on top of bar indicates the duration (in weeks) of significant effect. Bars without figures indicate no significant effect. For country codes see Table 1.

Plži

Kmen: měkkýši (*Molusca*)

Třída: plži (*Gastropoda*)

Podtřída: plicnatí (*Pulmonata*)

Řád: Stylommatophora (stopkoocí)

- Žijí ve svrchní vrstvě půdy a rostlinném opadu
- Daří se jim na vápnatých půdách než kyselých (stavba ulity), preferují teplejší a vlhčí klima
- Živí se tlejícími rostlinami, lišejníky, řasami, někteří karnivorové – čeleď *Zonitidae*, *Vitrinidae*
- čeledi *Helicidae* (hlemýžďovití), *Arionidae* (plzákovití), *Limacidae* (slimákovití)
- významné rody *Cepaea*, *Pomatia*
- Lesy: rody *Discus*, *Ena*, *Faustina*
- TTP: *Helicella*, *Pupilla*, *Cepea*
- Kyselé mokřiny: *Succinea*, *Vertigo*



Měkkýši v půdní ekotoxikologii - 2

PROČ?

- hlemýždi integrují v reálných terestrických ekosystémech vliv kontaminantů:
 1. kontaktem - půda, výluhy, opadanka
 2. příjmem potravy (půda, rostliny)
 3. dýcháním

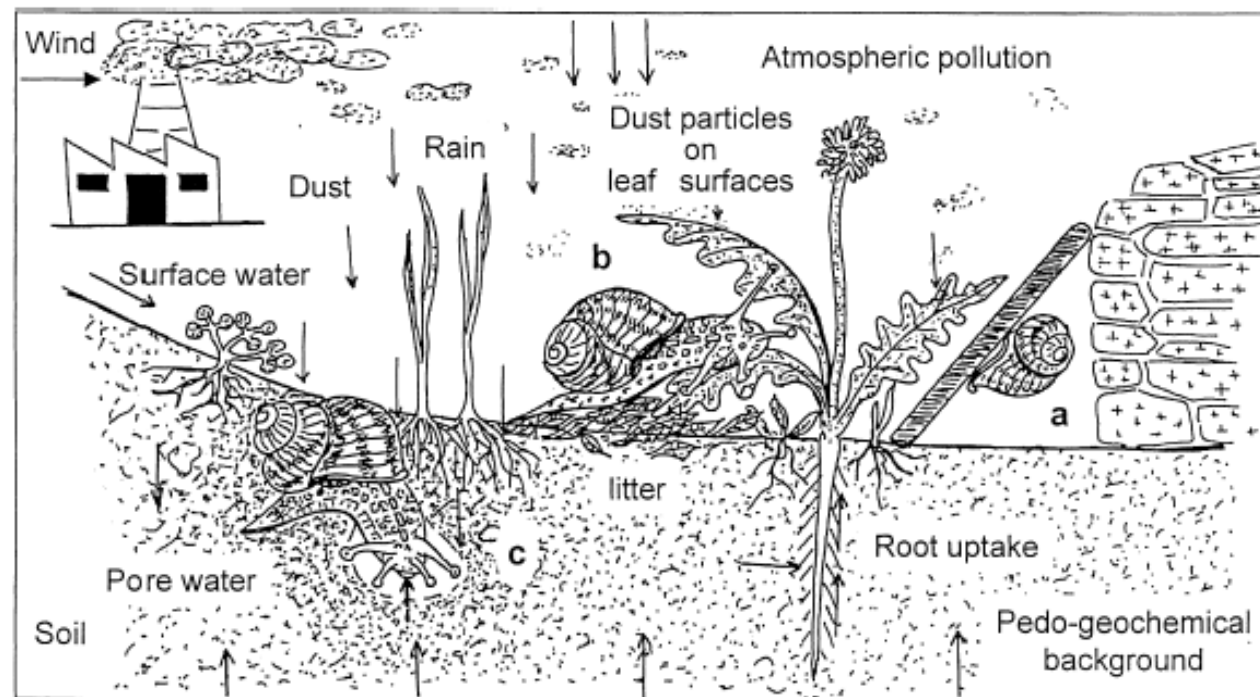


Fig. 6. Possible routes of direct and indirect exposure of land snails to contaminants: (a) contamination by breathing air; (b) contamination at soil surface by eating plants, soil contact, breathing air, rain and surface water contact; (c) contamination in the soil by swallowing soil particles, soil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

Měkkýši v půdní ekotoxikologii - 4

PROČ?

- hlemýždi - ekologický indikátor určující míru půdní kvality
- saprofágové a fytofágové
- velká část životního cyklu je v zemi: kladení vajíček, líhnutí, počáteční stádia, hibernace ...), ale i během ostatní části života jsou v kontaktu s půdou
- vyhovují po všech stránkách kritériím pro dobré biologické indikátory:
 1. jednoduše se vzorkují a identifikují
 2. jsou široce rozšířeni
 3. akumulují polutanty
 4. jejich ekologie je dobře známá
 5. dobře se chovají v kontrolovaných podmínkách
 6. jsou citliví na kontaminaci

Bioakumulace v měkkýších - 1

- mnoho studií, protože je známo, že přežívají i na lokalitách kontaminovaných těžkými kovy
- pravděpodobně dokážou uchovávat inaktivní kovy různými mechanismy:
 1. uvnitř buněk v kompartmentech (granule, váčky ...) + exkrece
 2. vazba na proteiny, methanotioneiny
- mohou sloužit jako model přenosu polutantů do vyšších stupňů potravních řetězců, protože jsou potravou mnoha savců
- organismy dle bioakumulačních schopností rozdělujeme na mikrokoncentrátory, dekoncentrátory a makrokoncentrátory; **makrokoncentrátoři jsou nejlepším indikátorem environmentální kontaminace**
- **hlemýždi jsou makrokoncentrátory spoly s isopodami, žížalami**
- jsou proto významným **indikátorem bioakumulace**

Bioakumulace v měkkýších - 2

- studie mají většinou design chovu (18°C; v plastových krabicích; potrava salát), kdy je podáván např. agar s kontaminanty
- po cca 30 dnech se provede pitva a jednotlivé části - noha, hepatopankreas (kde je známá vysoká akumulace látek). trávicí trakt - se měří
- tkáň se homogenizuje, centrifuguje; pak se užívají gelové chromatografie, iontově výměnná chromatografie pro analýzy proteinů (methalothioneinu) a AAS pro analýzy kovů

Table 1. Concentrations (Mean \pm SD) and Percentage Distributions (%) of Cadmium (A) and Zinc (B) in Different Organs of *Helix pomatia*

A Cadmium	WB		F/M		H		I		R	
	$\mu\text{mol/g}$	$\mu\text{mol/g}$	$\mu\text{mol/g}$	%	$\mu\text{mol/g}$	%	$\mu\text{mol/g}$	%	$\mu\text{mol/g}$	%
Controls	0.05 \pm 0.02	0.01 \pm 0.006	0.01 \pm 0.006	10	0.34 \pm 0.15	75	0.23 \pm 0.13	11	0.01 \pm 0.006	4
FE1	0.40 \pm 0.11*	0.07 \pm 0.02*	0.07 \pm 0.02*	6	2.65 \pm 1.01*	72	3.31 \pm 0.57*	20*	0.10 \pm 0.07*	4
FE3	0.38 \pm 0.08*	0.07 \pm 0.01*	0.07 \pm 0.01*	6	2.13 \pm 0.13*	73	1.77 \pm 0.53*	19	0.04 \pm 0.01*	3
B Zinc	WB		F/M		H		I		R	
	$\mu\text{mol/g}$	$\mu\text{mol/g}$	$\mu\text{mol/g}$	%	$\mu\text{mol/g}$	%	$\mu\text{mol/g}$	%	$\mu\text{mol/g}$	%
Controls	1.5 \pm 0.4	1.1 \pm 0.4	1.1 \pm 0.4	29	6.5 \pm 1.4	58	1.4 \pm 0.2	3	0.9 \pm 0.2	11
FE2	4.4 \pm 0.9*	0.9 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	14*	15.9 \pm 4.2*	79*	1.6 \pm 0.3	2*	0.8 \pm 0.3	5*
FE3	3.8 \pm 0.4*	0.9 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	9**	22.5 \pm 1.0*	83*	2.3 \pm 0.7*	3	0.8 \pm 0.2	5*

Note: A: Cadmium concentrations of controls and of snails from feeding experiments 1 and 3 (FE1, FE3). B: Zinc levels of controls and of animals from feeding experiments 2 and 3 (FE2, FE3). An asterisk (*) indicates a significant difference in metal concentrations or percentage distributions between controls and metal-fed snails. A dagger (†) indicates a significant difference between the metal-feeding experiments (Student's *t*-test, $p < 0.01$). Abbreviations: WB = whole body, F/M = combined foot and mantle tissues, H = hepatopankreas, I = intestine, R = rest.

Bioakumulace v měkkýších - 3

Table II. Pulmonated land gastropods as contamination indicators.

Reference	Pollutant	Contamination source	Species	Test duration	Parameters
[129]	Fe, Pb, Zn		<i>Helix pomatia</i>	4 weeks (Aug.–Sept. 1971)	Temperature effect on Fe, Pb, Zn in different organs
[29]	Cd, Cu, Pb, Zn	Contaminated and uncontaminated sites	<i>H. aspersa</i>	Natural snails (Sept. 1975)	Metal concentration in organs
[206]	Cd, Pb, Zn	Roadsides	<i>Cepaea hortensis</i>	(Jul.–Sept. 1975)	
[37]	Cd, Cu, Pb, Zn	Contaminated food (lettuce)	<i>H. pomatia</i>	30–35 d (March 1981)	Bioaccumulation, cellular and molecular distribution of metals
[6]	Pb	Agar gelose +Pb or +Pb and Ca	<i>H. aspersa</i>	4 weeks	Bioaccumulation; Pb assimilation and excretion
[76]	Ca, Cd, Cu, Pb, Zn	Abandoned mine Pb/Zn	Six slug species	Natural slugs (Sept. 1986)	Metal concentration in tissues
[36]	diverse	Diverse	Gastropods and land invertebrates	Variable	Contamination, cellular compartment, detoxification
[38]	Cd, Zn	Agar plates with Cd et Zn	<i>H. pomatia</i>	30 d	Subcellular distribution in digestive glands
[8]	Cd, Cu, Pb, Zn	Urban areas	<i>Arianta arbustorum</i> between species comparison	Seasonal sampling	Metal concentration in tissues (+ influence of individual size)
[138]	Cu, Zn	Natural and through food	<i>H. aspersa aspersa</i> and <i>H. aspersa maxima</i> <i>H. pomatia</i>	Natural and raised adult snails	Metal concentration in tissues. Bioaccumulation and pollution factors
[139]	Pb	Contaminated sites and breeding	<i>H. aspersa, H. pomatia</i>	Natural and raised adult snails	Pb concentration in foot and viscera
[73]	Cd, Pb, Zn	Food and substrate	<i>Deroceras reticulatum</i>	3 weeks	Metal concentrations in the body
[71]	Cu, Zn	Food	<i>H. aspersa aspersa</i> and <i>H. aspersa maxima</i>	10 weeks	Bioaccumulation

Terénní testy s hlemýžďi - 1

Příklad

- terénní studie s expozicí hlemýžďů na lokalitách pro posouzení úspěšnosti remediací



PLATE 2. Experimental support for active biomonitoring. (a) Plastic cage where the snails are exposed to the contamination for 1 month; (b) Placing the snails in the cage.

Terénní testy s hlemýžďi - 2

Příklad



Fig. 1. Cage with sentinel snails transplanted to a natural control site (Gy forest). We placed a plastic fence around the cage to prevent penetration of predators (rodents, etc.).



Fig. 2. Cage placed on grass in Besançon Botanical Gardens a few feet away from the device used to monitor the atmospheric lead concentration by the side of a busy road.

Terénní testy s hlemýžďi - 3

Příklad - pokr.



Fig. 3. Cage placed at the industrial waste disposal dump (Technical Hiding Center : THC) at Vaivre which was in operation from 1990 to 1992 with waste of classes I and II.



Fig. 4. Close-up of the inside of the cage (THC-b) showing how the cage was held down with four wooden pegs, two pieces of terra-cotta roof tile act as shelters, vegetation is the natural spontaneous ground cover.

Terénní testy s hlemýždi - 3

Příklad - pokr.

Table 1

Average total body, shell, foot and viscera weight of 'sentinel' snails in the four tested biotopes. The controls (Lab 3) were grown in the laboratory during the same period of four weeks. Significant difference in comparison with the snails of Gy forest

Group	Total fresh weight (g)	Shell weight (g)	Shell/total (%)	Foot			Viscera		
				Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Water (%)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Water (%)
Controls:	10.64	1.25	11.76	3.373	0.550	85.01	4.603	1.128	75.62
Lab 3	±1.31	±0.16	±0.93	±0.958	±0.103	±1.89	±0.455	±0.234	±3.52
Trans Gy	7.27	0.67	9.14	2.402	0.243	89.90	3.586	0.354	89.92
	± 0.78	±0.15	±1.49	±0.421	±0.047	±0.46	±0.741	±0.053	±1.74
Trans Lecl.	5.65	0.56	9.95	1.710	0.176	89.64	2.723	0.242	91.02
	±0.69*	±0.13	±2.11	±0.267**	±0.022*	±0.89	±0.838**	±0.068*	±0.74
Trans THC-a	5.27	0.45	8.68	1.859	0.167	90.93	1.982	0.185	90.63
	±0.37*	±0.06*	±1.55	±0.259**	±0.010*	±0.89	±0.162*	±0.008*	±0.51
Trans THC-b	5.54	0.47	8.47	2.095	0.183	91.15	2.000	0.196	90.19
	±0.19*	±0.03*	±0.84	±0.276	±0.013*	±1.17**	±0.111*	±0.013*	±0.69

* $P < 0.01$.

** $P < 0.05$.

Terestrická biota – hmyz

Prospěšní členovci

- tzv. beneficial arthropods
- všichni členovci, kteří nejsou škůdci
 - dravci (dravý hmyz a pavoukovci) – „natural enemies“
 - opylovači
- je tedy cílem, aby byly v ekosystémech zachovány
- žel insekticidy často negativně postihnou i tyto organismy

Opylovači

- u žádné skupiny hmyzu není tak úzká vazba ke kvetoucím rostlinám
- vztah se vyvíjel po dlouhou dobu evoluce – příklad koevoluce
- ztráta včel jako opylovačů
= nedozírné následky v ekosystému



Opylovači

Table 2. Summary of bee poisoning incidents in the UK, 1994–2003

Pesticide	Number of poisoning incidents	Minimum number of colonies affected	Typical uses involved in poisoning incidents
bendiocarb	38	125	Feral bee control
dimethoate	19	212 ^a	Spray applications to oilseed rape, oat, bean and bulb crops
pirimiphos-methyl	8	46	Spray application to coniferous plantation and intentional abuse
gamma-HCH	7	14	Spray applications to oil seed rape and wood treatment recorded
chlorpyrifos	6	36	Spray application to fruit crops, apple and raspberry
fenitrothion	6	72	Spray applications to raspberry crops
paraquat	5	26	To destroy possible GM-contaminated oilseed rape crops
permethrin	5	26	Spray applications to forestry, aircraft insecticidal procedures and intentional abuse
carbaryl	4	8	Feral bee control and intentional abuse
triazophos	4	24	Spray applications to oilseed rape and bean crops
alpha-cypermethrin	3	3 ^a	Spray applications to oilseed rape crops
cypermethrin	4	15	Spray applications to oilseed rape crops and intentional abuse
lambda-cyhalothrin	3	7 ^a	Spray application to bean crop
dichlorvos	2	5	Beekeeper treatment for wax moth
malathion	2	9	Intentional abuse
dieldrin	1	1	Wood treatment
demeton-S-methyl	1	5	Unknown
propoxur	1	queens	Aircraft insecticidal procedures
sodium cyanide	1	1	Feral bee control
1,4-dichlorobenzene	1	1	Beekeeper treatment for wax moth
bifenthrin	1	0	Intentional abuse
deltamethrin	1	12	Spray application to bean crop
tetramethrin	1	4	Intentional abuse
Total^b	124 (117)	652 (609)	

^a One incident involved bumblebees.

^b Numbers in brackets are the actual total numbers of incidents or colonies affected, as five incidents involved two pesticides and one incident involved three pesticides.

Opylovači

- včely jsou velmi citlivé na insekticidy
- látky, které jsou pro včely zvláště nebezpečné, musí být označeny
- toxicita pro včely je povinným údajem při klasifikaci chemikálií
- ALE - veškeré testy a znalosti se ale vztahují pouze k včele medonosné
- **jaká je toxicita pro ostatní tisíce druhů včel a další opylovače?**
- akutní toxicita – hromadný úhyn včel, zvláště ve vazbě na chemické postřiky v zemědělství
- chronická toxicita – základní faktor = snížení imunity (varoáza atd.)

Opylovači

- čmeláci = velice významní opylovači
- specifická biologie oproti včelám = kolonie s velmi malým počtem jedinců
- současné aplikace různých pesticidů na sousedních polích
- v praxi není koordinace mezi farmáři: koexpozice

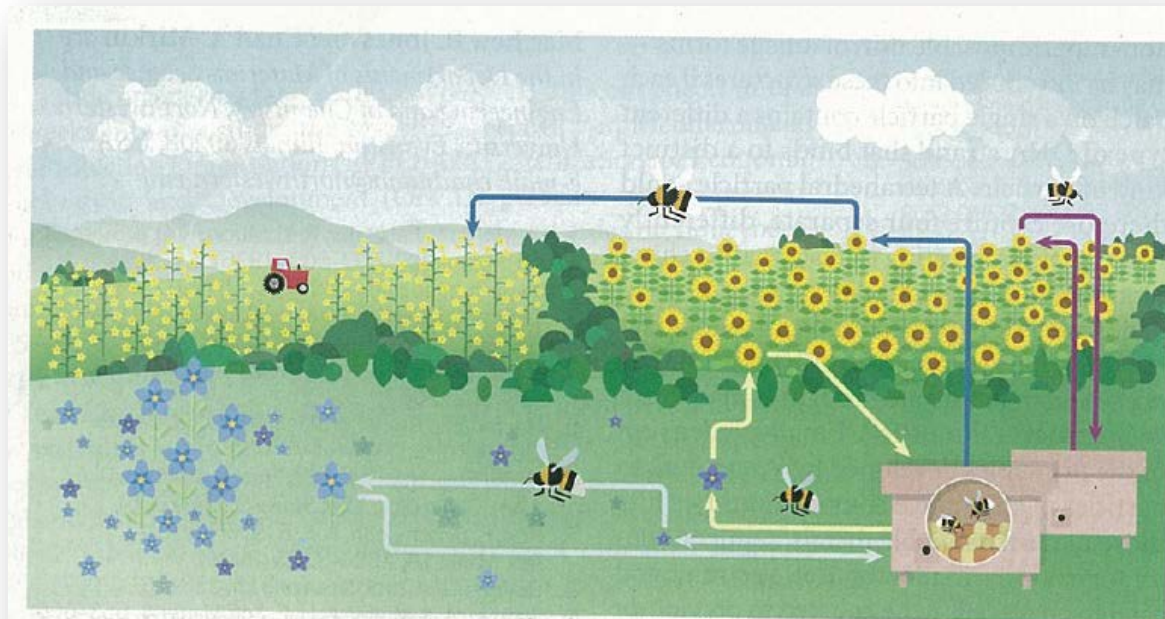


Figure 1 | A complex exposure landscape. In a typical agricultural setting, different crops may be sprayed with different pesticides at different times and doses. Bees will obtain food both from these crops and from wild plants, which makes it difficult to estimate their overall exposure to chemicals. Furthermore, bees returning to the colony after foraging may pass on the pesticides as they feed larvae. In an attempt to partially mimic this exposure complexity, Gill *et al.*¹⁰ placed pesticide-laden feeders and filter paper (not shown) at the entrance to boxed colonies of bumblebees, which could also access flowers on crops and wild plants in the wider landscape. The researchers measured the effect of these added pesticides at both the individual-bee and colony level.

Příklad – čmeláci a pesticidy

- polní studie: aplikovány povolené dávky
 - 2 individuální látky „I“ a „LC“
 - současná expozice „M“ (mixed)

Gill et al (2012)

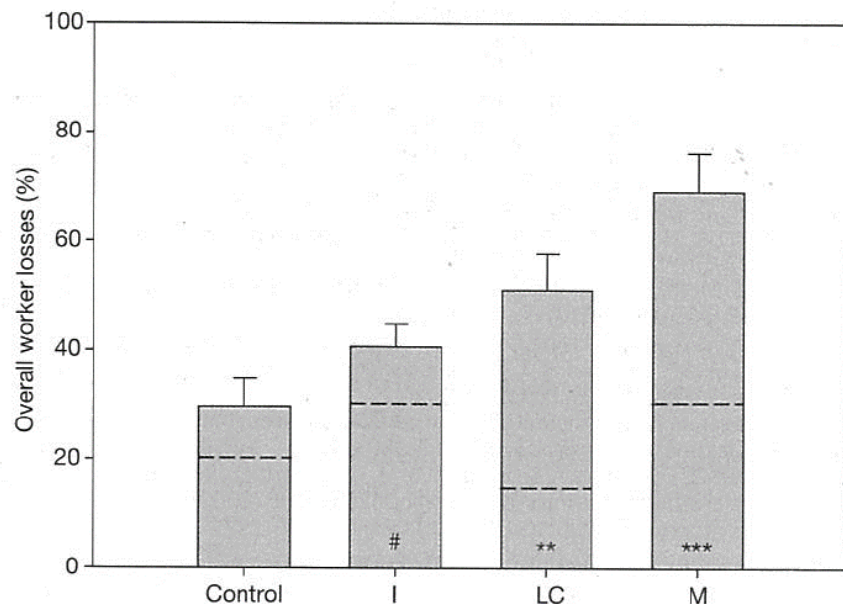


Figure 3 | Overall worker losses. Mean (\pm s.e.m.) overall percentage of workers lost per colony, including workers lost outside (below the dashed line) and worker mortality (dead workers found in nest box; above the dashed line), during the 4-week experiment. $n = 40$ colonies. # $P \leq 0.1$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ (comparison with control).

Table 1 | Summary of observed pesticide effects for each treatment group (I, LC or M) in comparison to the control group

Effect level	Effect type	I	LC	M
Effects on individual behaviour	Number of foragers	+	ND	+
	Foraging bout frequency	ND	ND	-
	Amount of pollen collected	-	ND	-
	Duration of pollen foraging bouts	+	ND	+
Effects at colony level	Worker production	-	ND	-
	Brood number	-	ND	-
	Nest structure mass	ND	ND	ND
	Worker mortality	ND	+	+
	Worker loss	+	-	+
	Worker mortality & loss	ND	+	+
	Colony failure (n failed/ n survived)	0/10	0/10	2/8

Significant decrease (-), significant increase (+) and no detected effect (ND) at the 5% significance level.

Terestrická biota – obratlovci - wildlife

Metody

- metody přímé

- pozorování (zejména optické) – zejména u velkých obratlovců
- vzorkování – odchyt reprezentativní části populace

- pasti

mrtvochytné (živočicha usmrtí) - sklapovací, oka, s vodou a jiné pasti; kladou se určitým systémem

kvadrátová metoda – síť tvořící čtverec/čtverce (maximální velikost, ale aby podával reprezentativní vzorek)

liniová metoda

metoda Y – pasti v linii tvořící tvar Y, plůtky směřují živočichy

živolovné – chodbičky, zapadávací dvířka ... značkování, pustění a opětovný odchyt (CMR – catch, mark, release)

- odstřel



Metody

- příklad z reálu – kvadrátová metoda pro malé savce


- v každém bodě 2 pastě - např. sčítanací či jiná metoda + kontrola
- je důl. délka expozice, - minimum lanových pastomací 1000 (10 mací a 100 pastí) minimum je 3 mací (\Rightarrow 300 pastí)
- pastě se vykládají každé většiny 2x denně
- kvadrát by měl být v homogenním biotopu a 40 m na všechny strany by měl být kam. biotop
- půlka tráva a cívka a tráva - říjen \Rightarrow dva odchyty většiny 3 \Rightarrow neměly by být na stejném místě
- pastě dostávají se pravidelně 45 x 45 m pastě jsou 6 x 6 odchyty pastí, bez přednastomání
- to platí pro leon. chas.
- na poli je to 1 ha; 11 x 11 odchyty pastí, - každá past je lehce selektivní - např. mišice lépe sčítá sčítaných, - selektivní je i návnada
- úmrtí se brát napuštěným láhanou látkou např. karkel sádlo s manganem + karmena karmena \Rightarrow může být pravidelně třeba týden

Metody

- metody nepřímé
 - dle stop organismů
 - výkaly
 - hlasové projevy – zpěv ptáků
 - okus stromů

Metody

▪ příklad – studium netopýrů

- sledování netopýrů na trávništích, metoda sledování a jejich praktické využití, - praktické řízení
- podstatná metoda a technická řešení
- výhoda je to že každá skupina žije ve širokém okolí
- letání aktivně, odbyt - ne schůzka; japonské národní síť - jasně, jak, aby síť nezapadla do lokálního systému - tímto se implementuje
- známé měření se používají pomocí družic - dávají se na kružnici ne na náhodě jak u ptáků
- a mají povrch, aby se nepouklo letací plána 
- používají svou aparaturu - mohou jít a AL
- letí přesně tímto směrem více času
- + výhled detekce - výhledem žije netopýři - po ústí krásně → křehkost
- používají - vedle své funkce, vpravo čas - první setkání. signály se analyzují a používají → křehkost a čas
- telemetrie - občas se misiláží a anténou se sleduje
- kvalitní traktát (obdobně a těch o dlouhou traktát)

Různé typy indikátorových druhů

Table 4

Categories of focal species

Indicator species are species whose status is indicative of the status of a larger functional group of species, reflects the status of key habitats, or acts as an early warning to the action of an anticipated stressor (e.g. white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) populations that signify the availability of forest-grassland margins).

Keystone species have much greater effects on one or more ecological processes than would be predicted from their abundance or biomass alone (Power et al., 1996) (e.g. the red-cockaded woodpecker (*Picoides borealis*) creates cavities in living trees that provide shelter for 23 other species (Dennis, 1971)).

Ecological engineers alter the habitat to their own needs and by doing so affect the fates and opportunities of other species (e.g. Jones et al., 1994; Naiman and Rogers, 1997) (such as the gopher tortoise (*G. polyphemus*) that digs burrows used by many other species or the beaver (*Castor canadensis*) whose dams create wetlands).

Umbrella species have either large area requirements or use multiple habitats that encompass the habitat requirements of many other species (e.g. the northern spotted owl (*Strix occidentalis caurina*) that occupy old growth forest in the Pacific Northwest).

Link species play critical roles in the transfer of matter and energy across trophic levels or provide a critical link for energy transfer within complex food webs. For example, prairie dogs (*Cynomys* spp.) in grassland ecosystems convert primary plant productivity into animal biomass. Prairie dog biomass, in turn, supports a diverse predator community.

Special interest species include threatened and endangered species, game species, charismatic species and those that are vulnerable due to their rarity.

Dale & Beyeler (2001)

Příklad - sýček

příklad současného působení více ekologických faktorů

- trávení hlodavců antikoagulačními rodenticidy
 - hlodavci přežívají několik dní se sníženou vitalitou
 - jsou snadnou kořistí – přenos jedu na predátora
 - oslabení nebo hynutí sýčků
- nárůst početnosti kuny skalní
- mizení nízkostébelných trávníků z krajiny

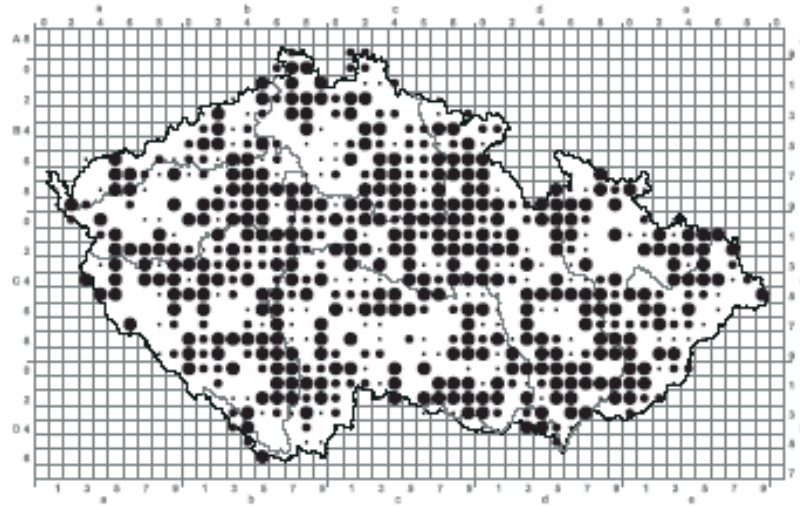
Důsledek:

- snížení celkové vitality a početnosti populace
- vymizení z ekologicky méně příznivých oblastí (horské oblasti – sníh – nedostatek potravy)

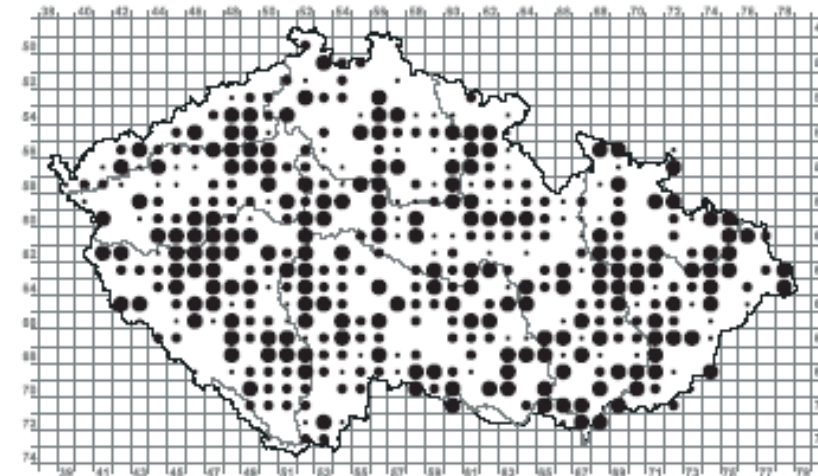


Příklad - sýček

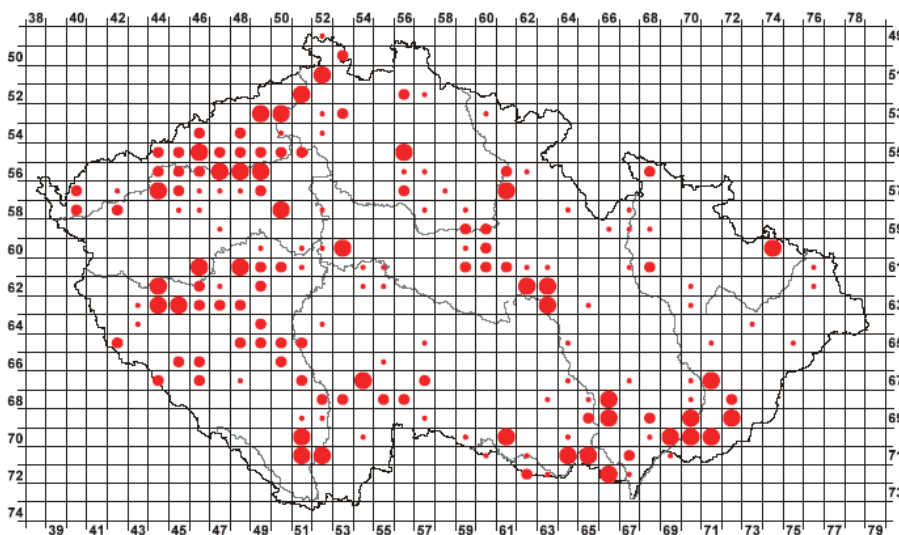
1973-1977



1985-1989



2001 - 2003



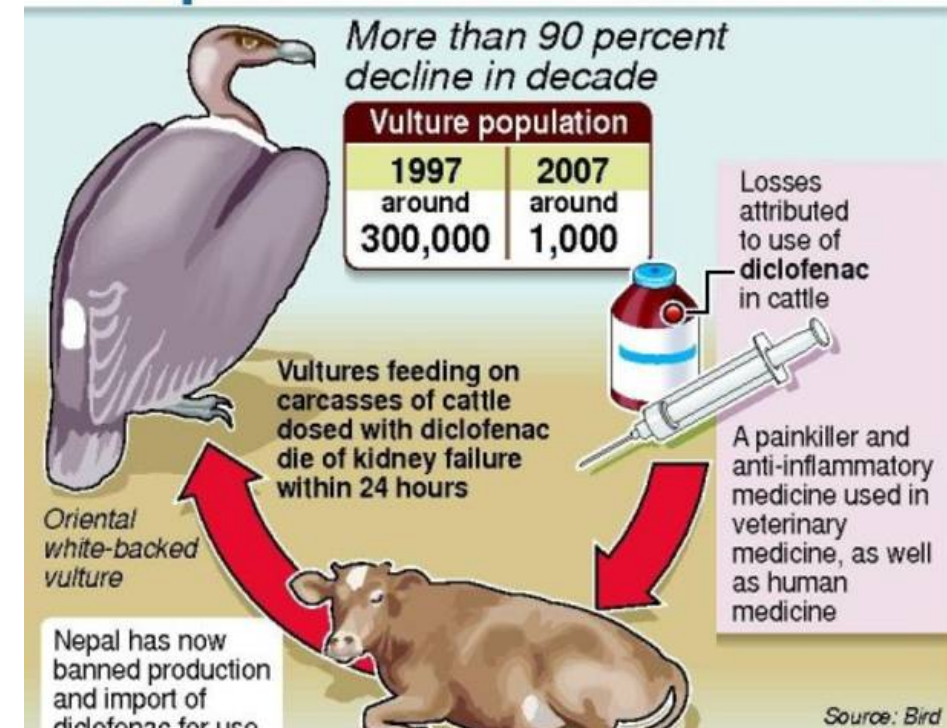
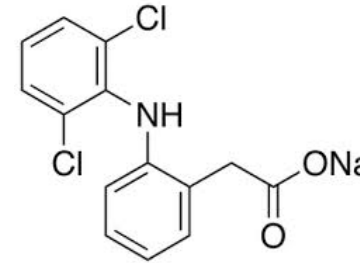
Počet osídlených čtverců (%):

1973 - 77	72
1985 - 89	68
2001 - 03	23

Šťastný, Bejček a kol.: Atlas hnízdního rozšíření ptáků v České republice 2001 - 2003. Aventinum 2006

Příklad - diclofenac

- zástupce ze skupiny NSAD (nonsteroidal antiinflammatory drugs)
- podobné účinky (tlumí projevy zánětu) jako ibuprofen, paralen
- používání ve veterinární medicíně
- neočekávané akumulace v domácích zvířatech
- velká toxicita pro dravce (mrchožrouty)
- neočekávaná NEFROTOXICITA - akutní mortalita
- velký problém v Indii a Pakistánu, ale i v Evropě (Řecko, Španělsko, Itálie, Kypr)



Příklad – Potápka obrovská

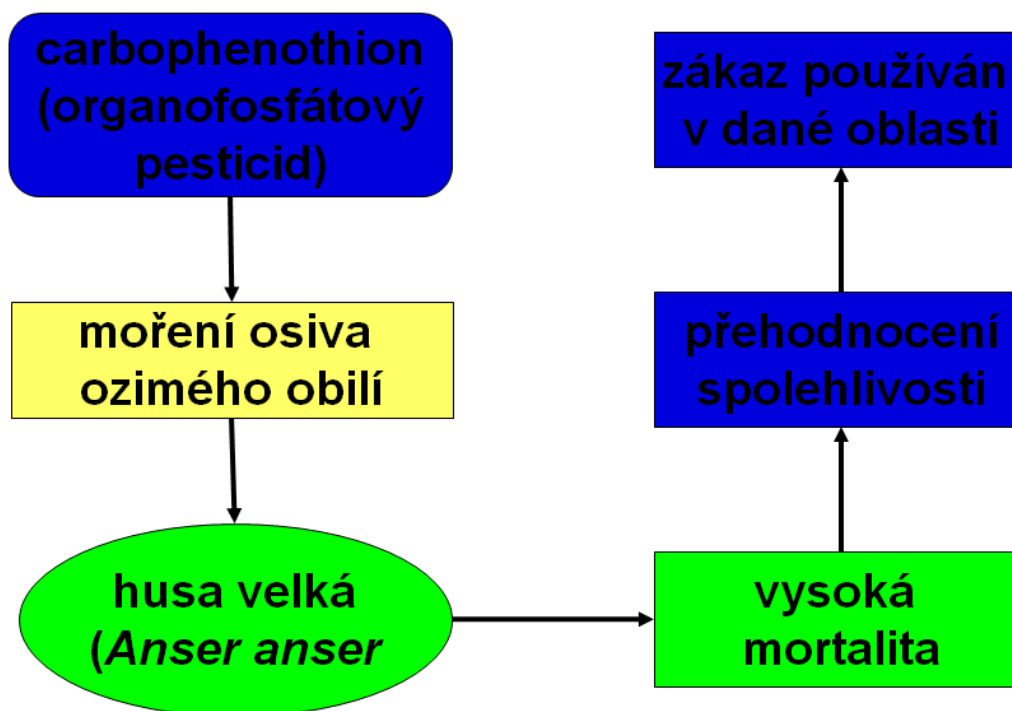
- **několik faktorů:** nekontrolovaná těžba rákosu, lov, zastavění pobřeží, eutrofizace
- umělé vysazení velkých okounů (r. *Micropterus*), dorůstají až 12 kg = vyhubení 13 z 19 původních druhů ryb, vyhubení většiny krabů, okouni lovili i mláďata potápek
- prudký pokles stavu:

1929	400 ks
1960	100 ks
1965	80 ks
1986	poslední pozorování
- **poučení** = vysoká citlivost stenoekních druhů ke změně prostředí



Příklad – Husa velká

- Skotsko, centrální a východní část, zima 1971 - 72
- přezimování cca 60 000 jedinců husy divoké, tj. cca 2/3 britské populace
- vysoká úmrtnost ve stovkách jedinců
- hledání příčiny:



Příklad – Husa velká

- Berneška velká – neovlivněna
- nižší citlivost vůči carbophenothionu než husa velká

Závěry

- mezidruhové rozdíly v citlivosti
 - berneška velká - méně citlivá než husa velká
 - nutno respektovat při testech chemikálií
- velká místní koncentrace populace je rizikem
- prostorová distribuce – faktor při hodnocení
-

Terestrická flora

Terestrická flora

- = PRODUCENTI = zásadní význam pro ekosystém
- hlavní zdroj energie a organické hmoty v ekosystémech
- zdroj kyslíku pro ostatní organismy
- ekonomicky významné organismy
- potraviny, zdroje surovin (dřevo)
- esteticky významné organismy

→ ekotoxicita pro producenty má zásadní význam pro celý ekosystém

Bioindikace pomocí rostlin

- složení rostlinných společenstev – fytocenologie
- funkce a stav rostlin
 - měření fotosyntézy (produkce kyslíku, fluorescence fotosyntetických pigmentů)
 - biochemické markery
 - genotoxicita (mikrojádra, chromozomové aberace)
 - fungování fixace dusíku, mykorrhizy
- listová pokryvnost
- sledování výskytu indikátorových organismů
 - mykorhitické houby
 - lišejníky
 - nemoci (svraštělka javorová)
- polutanty v rostlinách



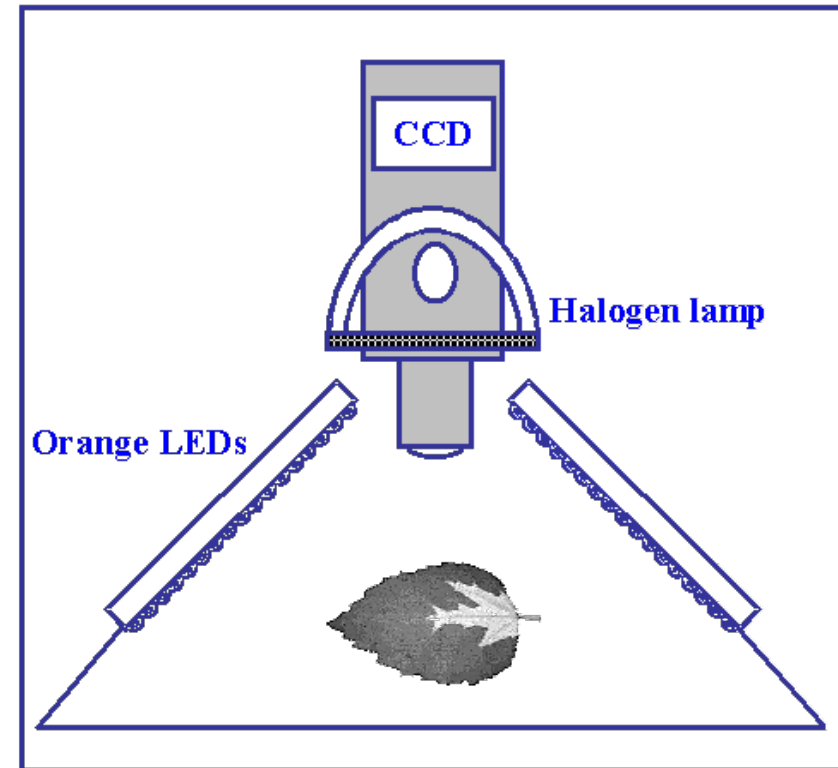
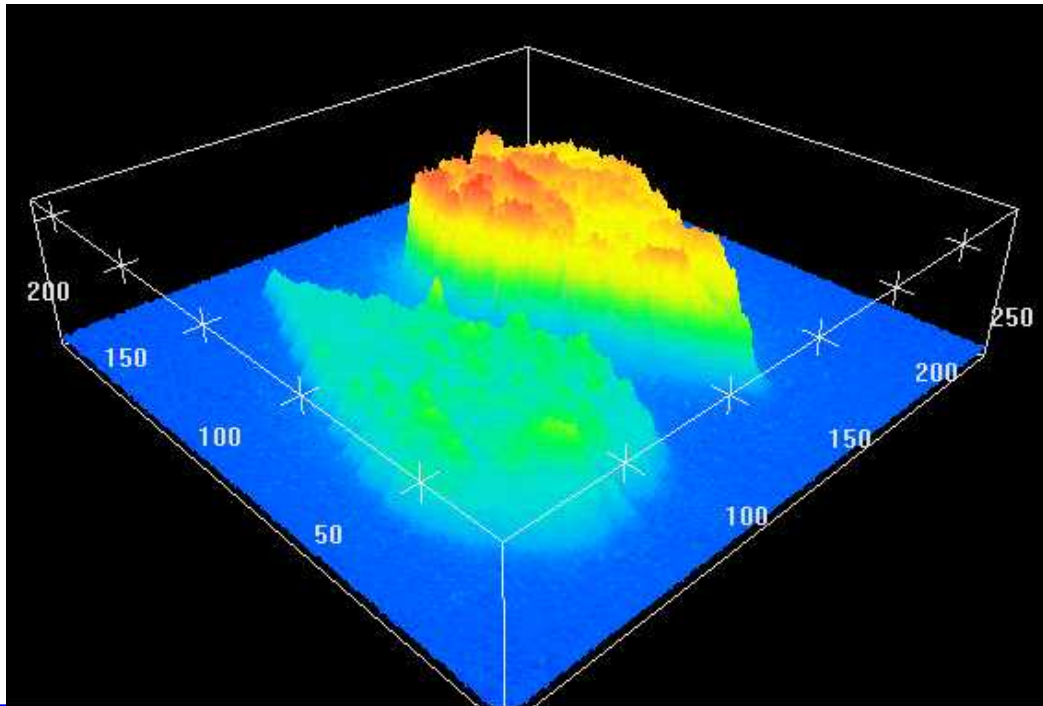
Sledování fotosyntézy

- gazometrie (IR) - měření spotřeby CO₂, produkce O₂



Sledování fotosyntézy

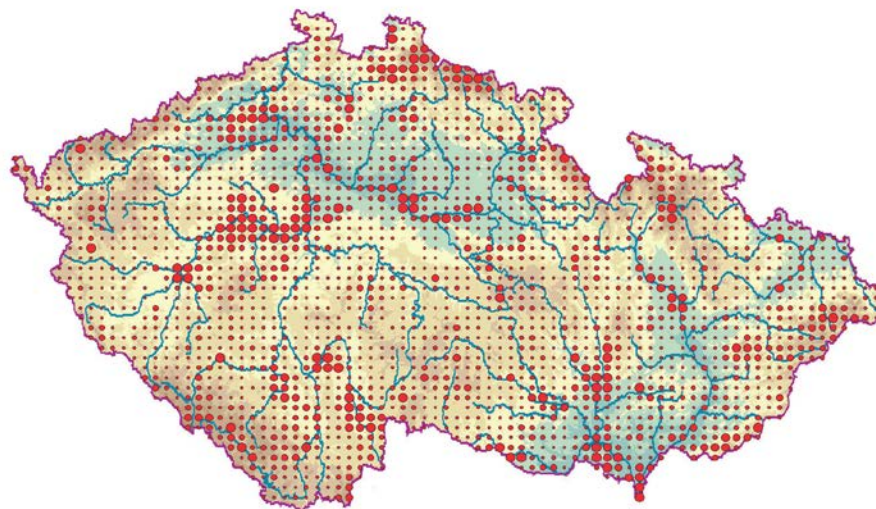
- Sledování fluorescence
- impuls světla → absorpce chlorofylem → emise světla (červené)
- u poškozených rostlin změny v intenzitě a kinetice fluorescence



Fytocenologický snímek

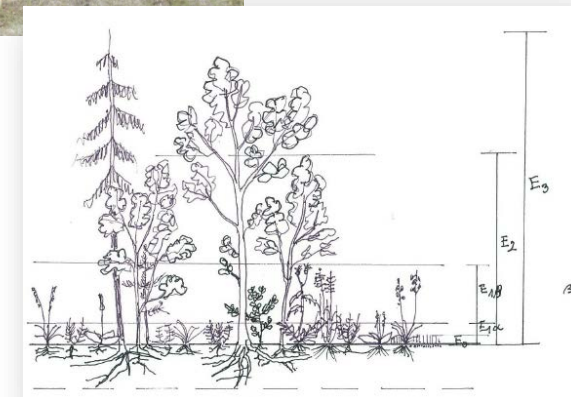
- studium rostlin na úrovni rostlinných společenstev
- slouží k dosažení jednoho ze základních cílů fytoecologie = klasifikace vegetace:
 - určité skupiny rostlin - rostlinná společenstva mají typickou kombinaci druhů, fyziognomii (např. les nebo trávník) a ekologii
 - skupina má vlastní latinský název, jehož základ tvoří většinou dominantní nebo charakteristický druh a latinská koncovka podle toho, na jaké hierarchické úrovni skupina v systému stojí (třída, řád, svaz, asociace)
 - <https://www.sci.muni.cz/botany/vegsci/vegetace.php?lang=cz>
- pomocí fytoecologických snímků lze ale odpovědět i na řadu ekologických otázek: vliv podmínek, chování a šíření invazních druhů atd.

Fytoecologické snímky v různých územích České republiky podle České národní fytoecologické databáze. Velikost symbolů je proporcionální k počtu snímků.



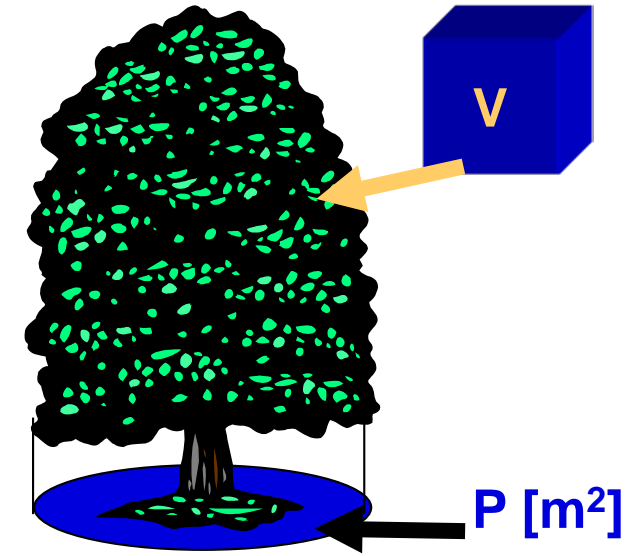
Fytocenologický snímek

- vymezení plochy, čtverec nebo obdélník, jednotky - stovky m²
- rostliny se rozdělí dle výšky do několika vegetačních pater:
 - mechorosty a lišejníky
 - byliny, semenáčky dřevin
 - keře a stromy s případnými liánami a epifyty
- odhadne se pokryvnost jednotlivých pater
- v každém patře se zaznamenají všechny druhy včetně odhadu plochy, kterou pokrývají (v procentech nebo speciální stupnice – sedmičlenná Braun-Blanquetova nebo jedenáctičlenná Dominova)
- zaznamenávají se i jiné informace, samozřejmě přesná poloha a datum, ale i sklon svahu a jeho orientace ke světovým stranám
- mohou se také odebrat vzorky půdy na pozdější analýzy (např. pH a další chemické analýzy)



LAI – index listové pokrývnosti

- množství listoví - **základní ekologický indikátor**
- defoliace jako bioindikátor stresu
- porosty kulturních rostlin 4-8
- středně husté smrkové porosty 3-5
- borovice lesní 20 let – bez přihnojování 2,8 - 4,4
- borovice lesní 20 let – s přihnojováním 5,5 - 9,4



LA – celková listová plocha [m²]

LAI – index listové plochy = LA : P

LAD – hustota listoví = LA : V

LAI – index listové pokrývnosti

- hustota vegetace ovlivňuje depozici povrchu např. při atmosférické depozici nebo při aplikaci pesticidů
- samozřejmě, že se toto mění i během roku

**insekticidy
(dimethoate, cypermethrin)**

x

**půdní brouci
na ječmenném poli**

$$P_s = P_a \exp(k \cdot LAI)$$

kde je:

P_s množství pesticidu, které dosáhne povrch půdy (g/ha)

P_a množství pesticidu aplikované na pozemek (g/ha)

k koeficient zachytu pesticidu

(v dané případě $k = -0,479$)

LAI listový plošný index ($m^2 \cdot m^{-2}$)

Lišejníky - příklad

Stav lišejníků reaguje citlivě na kvalitu ovzduší

Proč lišejníky?

- Zvýšený přístup imisí
- Anatomická stavba stélky
- Vodní režim
- Intenzita metabolismu
- Symbiotická podstata lišejníků
- Integrace imisní zátěže (látková, koncentrační a časová)



Lišejníky - příklad

Hlavní metodické přístupy

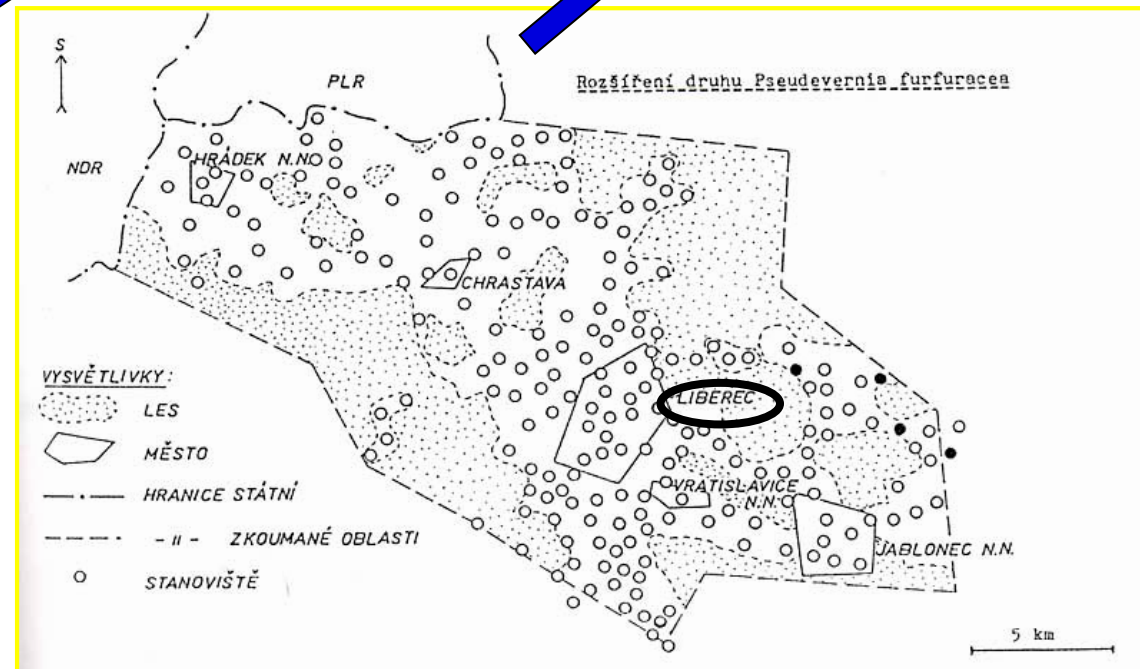
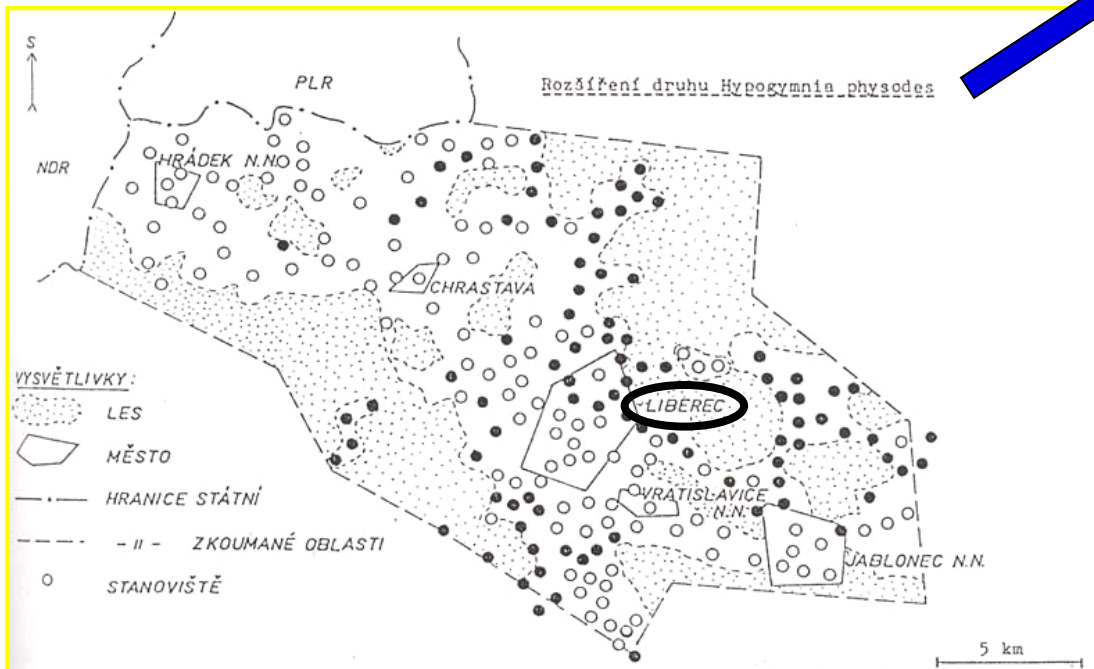
- metody fyziologické (pokles intenzity fotosyntézy, dýchání a čisté produkce, snížení obsahu chlorofylu a přítomnost feofytinu, stanovení pH a vodivosti lišejníkové stélky, redukce fosfatázové aktivity, metabolismus aminokyselin)
- metody morfologicko – anatomické (stupnice 1 až 0: stélky normálně vyvinuté, stélky zakrnělé, případně mírně poškozené, stélky s výraznými stopami poškození, stélky z velké části odumřelé, stélky zcela odumřelé ...)

Lišejníky - příklad

Hlavní metodické přístupy

- metody floristické – chorologické (mapování rozšíření indikačních druhů, stupnice citlivosti indikačních druhů)

Skupina	Citlivost k imisím	Druh
I	silně toxikolerantní	Lecanora conizaeoides
		Lepraria sp.
II	málo citlivé	Bacidia chlorococca
		Lecidea scalaris
		Hypogymnia physodes
III	středně citlivé	Lecanora subfusca sp. agg.
		Parmelia sulcata
		Parmelia saxatilis
		Parmeliopsis ambigua
		Parmelia exasperatula
		Platismatia glauca
IV	velmi citlivé	Parmeliopsis hyperopta
		Cetraria chlorophylla
		Lecanora varia
		Pseudoevernina furfuracea
		Evernia prunastri
		Ramalina farinacea



Lišejníky - příklad

Hlavní metodické přístupy

- metody fytoocenologické

- index IAP (Index of Atmospheric Purity)

- n - celkový počet nalezených druhů lišejníků na daném stromě
- Q - ekologický index každého druhu lišejníku, udávající průměrný počet doprovodných druhů na všech stanovištích, kde se nacházel
- f - hodnota abundance nebo frekvence podle odhadové stupnice

$$IAP = \frac{\sum_1^n (Q \cdot f)}{10}$$

- index L

- m - počet indikačních druhů nalezených na daném stromě
- q - ekologický index citlivosti druhu k imisím (vyšší q = vyšší citlivost)
- f - kvantitativní zastoupení druhu podle odhadové stupnice
- v - vitalita druhu podle odhadové stupnice

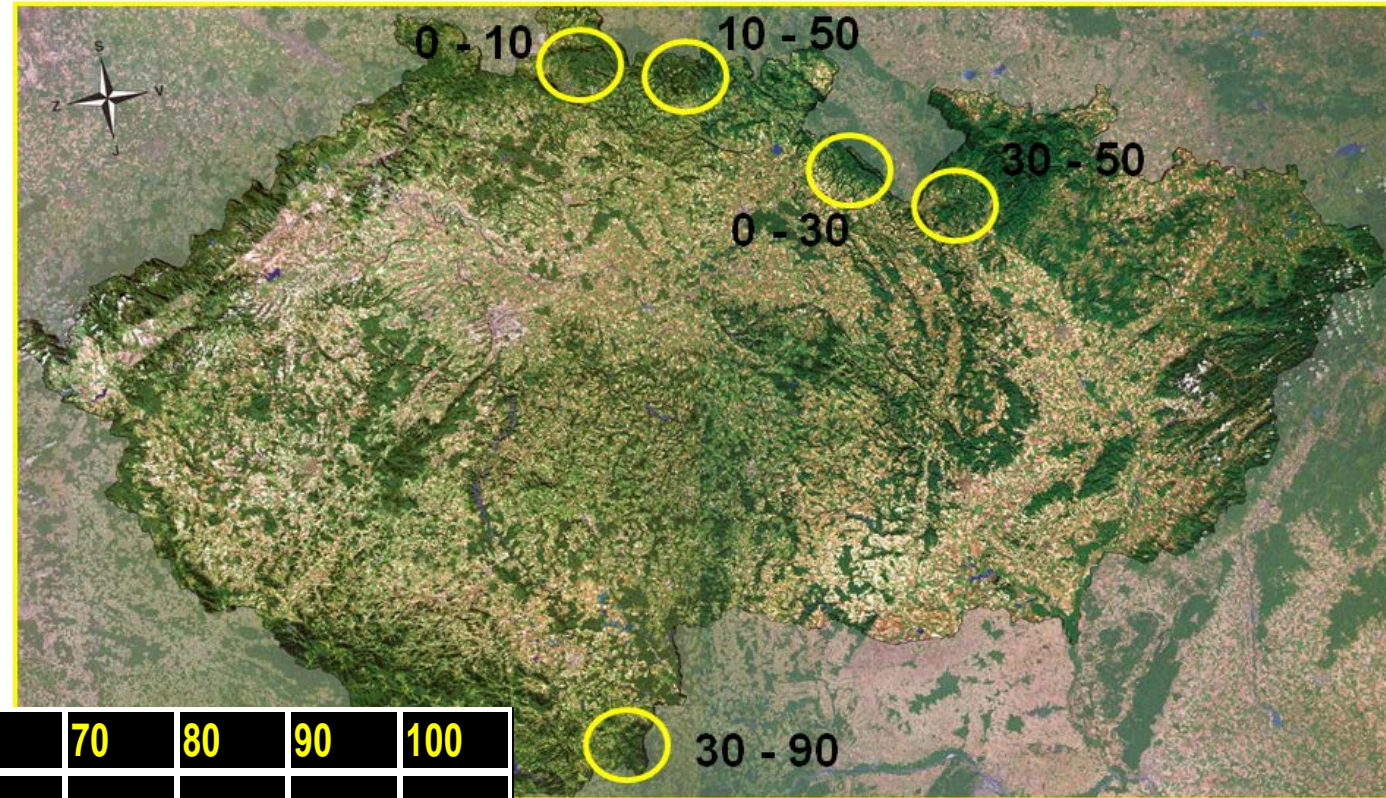
$$\sum_1^m q \cdot f \cdot v$$



Lišejníky - příklad

Hlavní metodické přístupy

- metody fytoocenologické
 - index L
 - Rozsah indexu L v horských smrčínách v našich pohraničních pohořích v 80. letech 20. století



	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Jizerské hory	■									
Krkonoše		■	■	■						
Orlické hory	■	■	■							
Kralický Sněžník			■	■						
Novohradské hory			■	■	■	■	■	■		

Lišejníky - příklad

Hlavní metodické přístupy

- metody fytocenologické
 - indikační kapacity - ústup lišejníků - etapy ústupu:
 - snižování vitality (= v z L indexu)
 - snižování abundance (= f z L indexu)
 - snižování počtu druhů (= q z L indexu)



Indikační kapacita	zastoupení druhů (m,q)	abundance	vitalita	charakteristika
		(f)	(v)	
CI	modelové	modelové	modelové	„původní stav bez imisí“, stav bez dlouhodobých vlivů
CJ	reálné	modelové	modelové	stav bez krátko- a střednědobých vlivů
CK	reálné	reálné	modelové	stav bez krátkodobých vlivů
CL	reálné	reálné	reálné	současný stav, CL je totožná s indexem L

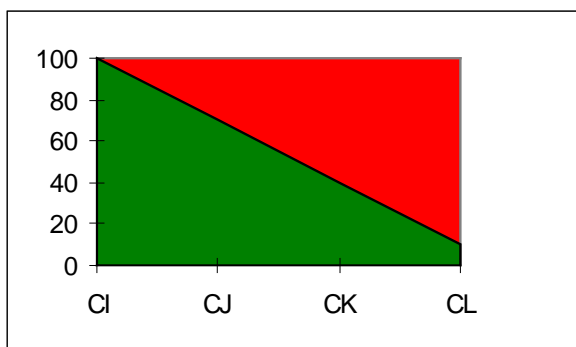
Lišejníky - příklad

Hlavní metodické přístupy

- metody fytoocenologické
 - indikační kapacity - ústup lišejníků - etapy ústupu
 - modelové příklady dynamiky ústupu lišejníků

rovnoměrný ústup

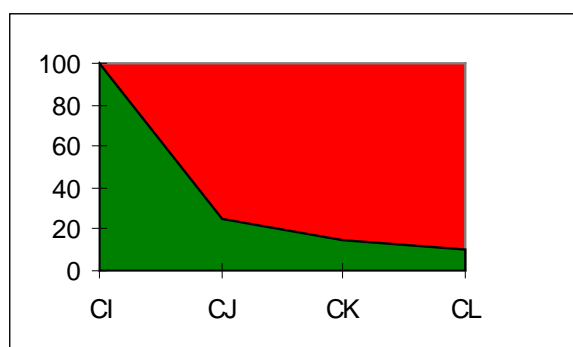
*současný ústup na úrovni druhů, abundance i vitality



dlouhodobý ústup

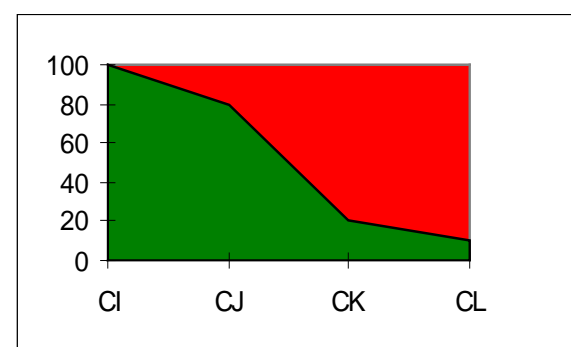
*převažuje ústup na úrovni druhů

*předpoklad dlouhodobého působení imisí



střednědobý ústup

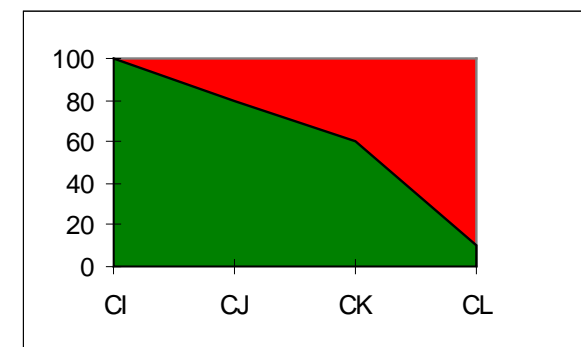
*převažuje ústup na úrovni abundance



krátkodobý ústup

*převažuje ústup na úrovni vitality

*předpoklad náhlého zvýšení imisní zátěže v nedávné době



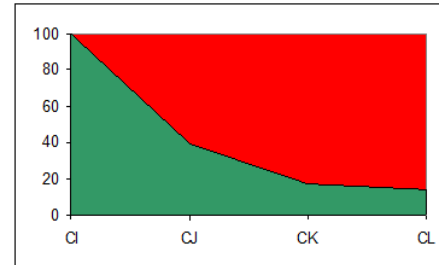
Lišejníky - příklad

Hlavní metodické přístupy

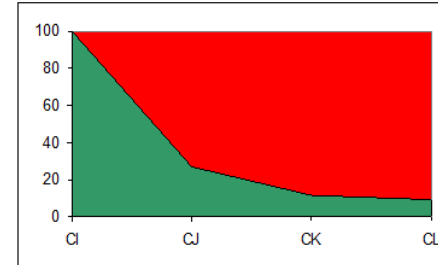
- metody fytoocenologické
 - indikační kapacity - ústup lišejníků - etapy ústupu
 - KRNAP



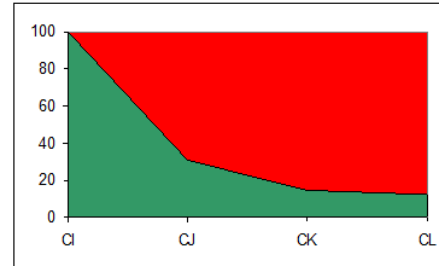
1982



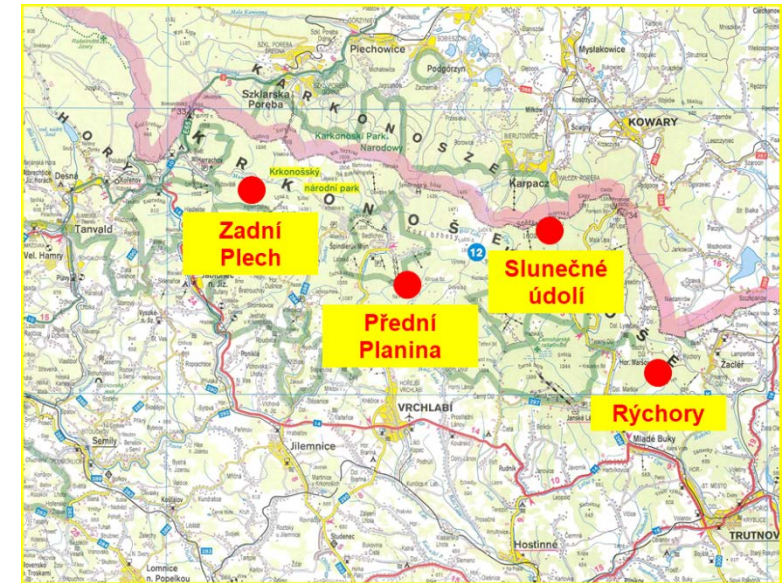
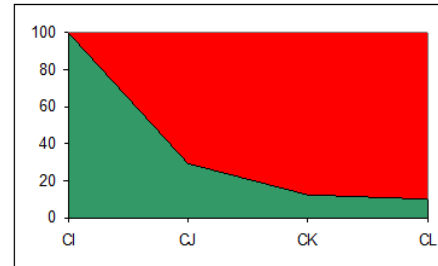
1993



1987



1997



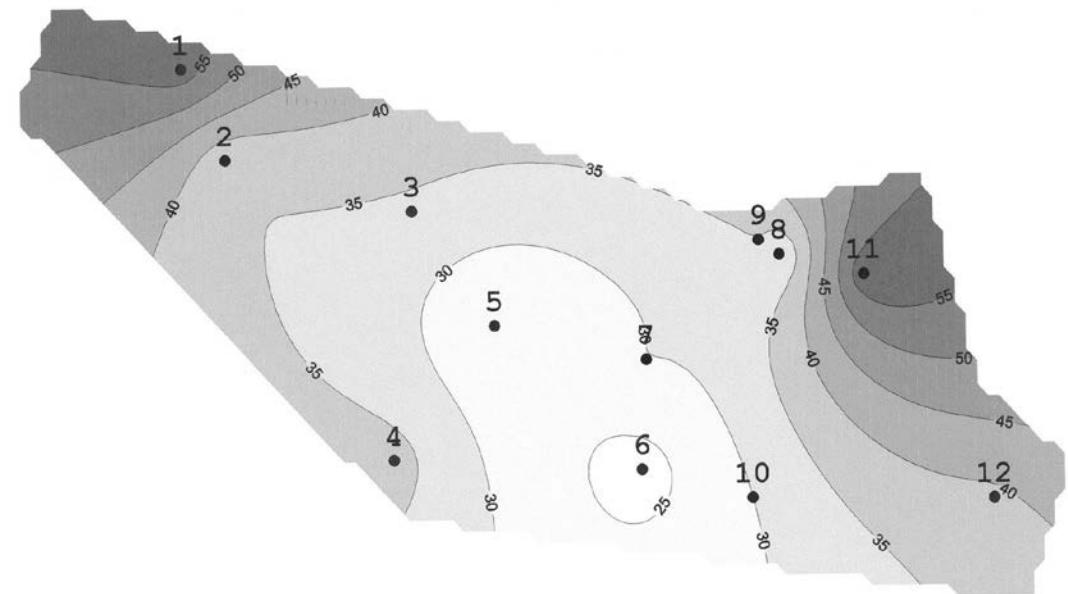
Lišejníky - příklad

Hlavní metodické přístupy

- metody chemicko-analytické - lišejníky jako materiál pro chemickou analýzu



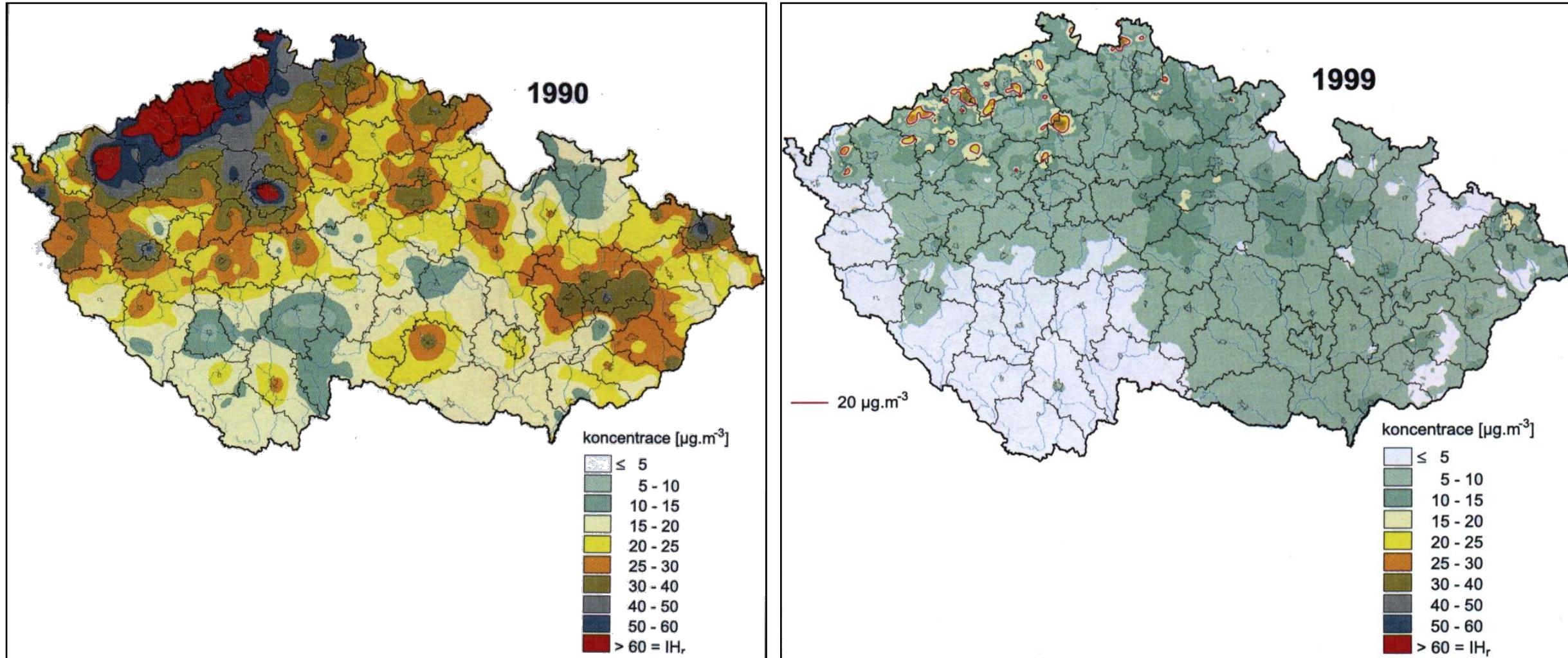
Koncentrace Pb (mg/kg suš.) v lišejníku *Hypogymnia physodes*



Příklad - rozpad smrkových porostů v ČR

- příklad komplexního působení několika faktorů
- horské oblasti ČR, 2. polovina 20. století
- první příčina – smrkové monokultury v nevhodných oblastech (mělký kořenový systém – malá odolnost vůči větru, šíření škůdců)
- druhá příčina – kyselé deště v důsledku spalování hnědého uhlí s vysokým obsahem síry
 - okyselování půdy (poškození kořenových systémů, vliv na příjem živin, uvolnění toxického Al ...)
 - přímý vliv na nadzemní části rostlin (květy a mladé výhonky – nejzranitelnější, poškození epikutilárního vosku)
 - přímý úhyn stromů či oslabení – podlehnutí dalším stresorům (sníh, škůdci – kůrovcové kalamity)

Příklad - rozpad smrkových porostů v ČR



SO₂ v ovzduší v 90. letech

Příklad - rozpad smrkových porostů v ČR



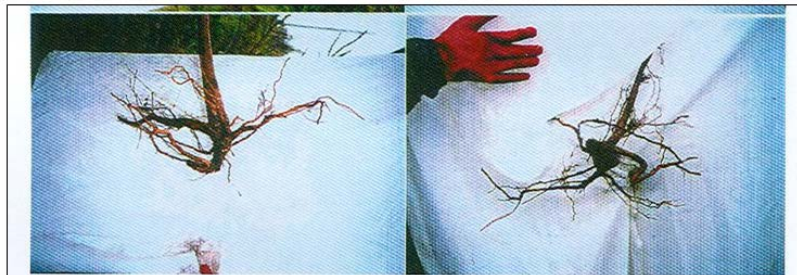
Příklad - rozpad smrkových porostů v ČR



nepoškozený



poškozený



Příklad - rozpad smrkových porostů v ČR

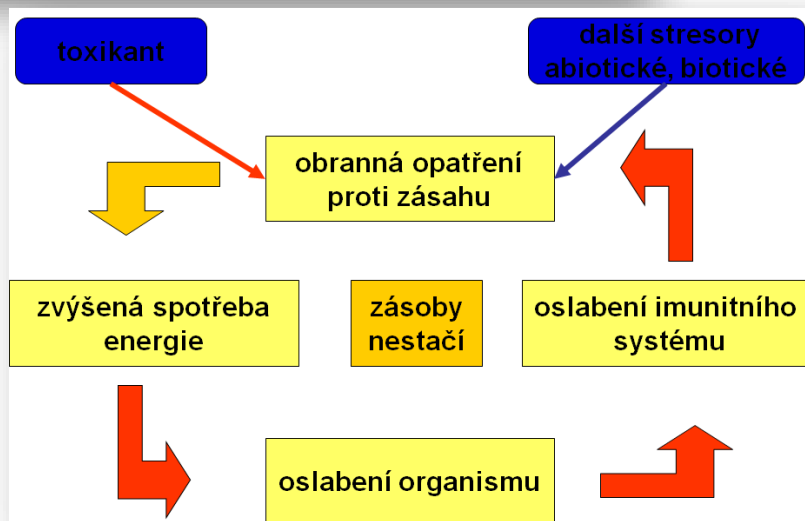
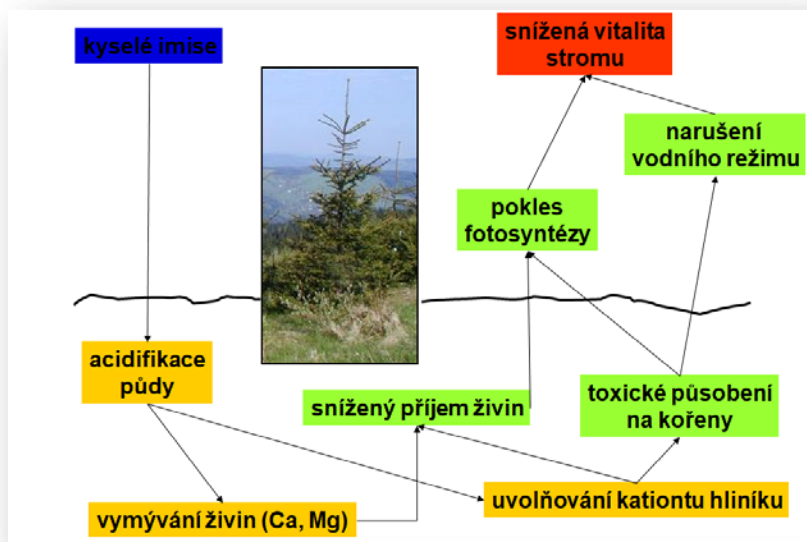
komplexního působení faktorů

- vymývání živin
 - toxické působení hliníkových iontů
 - nedostatek Mg – pokles fotosyntézy
 - vynakládání energie na obnovu kořenů
 - únik kořenů k povrchu – vývraty, mráz
 - akutní působení imisí na jehličí
 - přebytek dusíku
- ↓
- celkové snížení vitality stromu
 - nedostatečná odolnost k: abiotickým faktorům (sucho, mráz, vítr)
biotickým faktorům (houby, hmyz)
- ↓
- výsledek – úhyn stromu



Příklad - rozpad smrkových porostů v ČR

komplexního působení faktorů



Symptom: předčasné opadávání jehličí. Možné příčiny:

komplexně působící příčiny (vítr, mráz, sucho, imise)

nedostatek Mg

nedostatek K

rez zlatoslizka smrková (*Chrysomyxa abietis*)

houba *Rhizosphaera kalkhoffii*

mšice smrková (*Liosomaphis abietina*)

houba (*Lophodermium macrosporum*)

mrazivé sucho, mráz (větší náchylnost při nedostatku K)

působení posypových solí

houba (*Sirococcus strobilinus*)

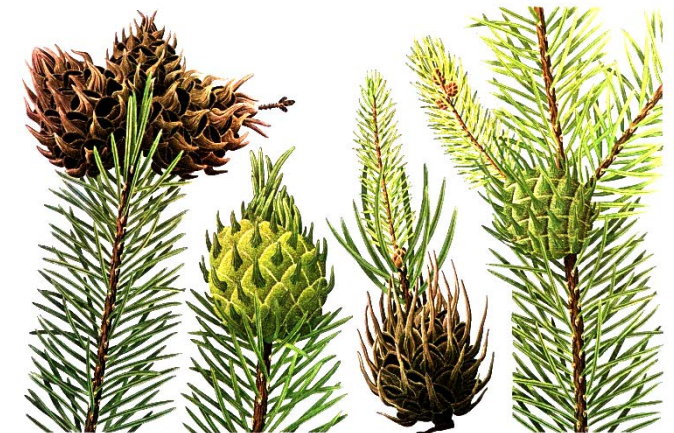
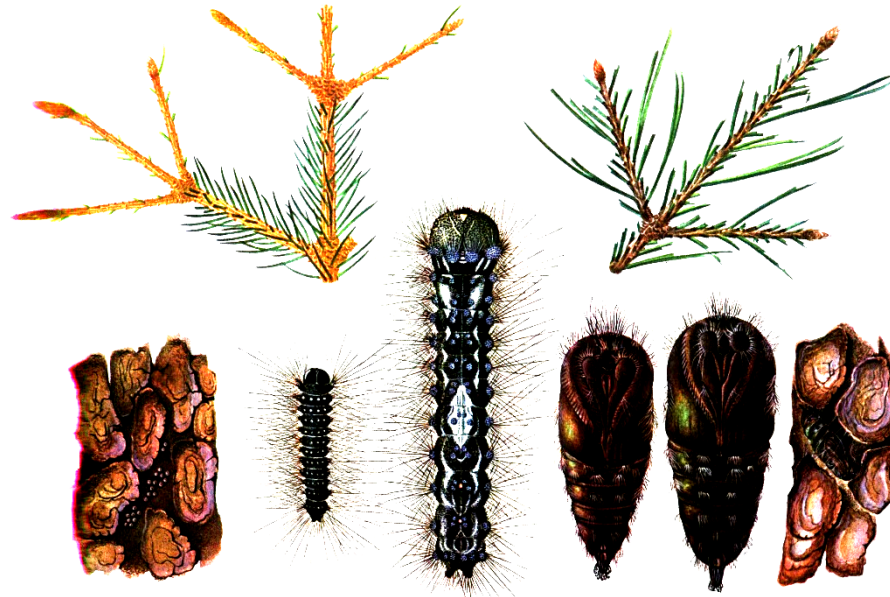
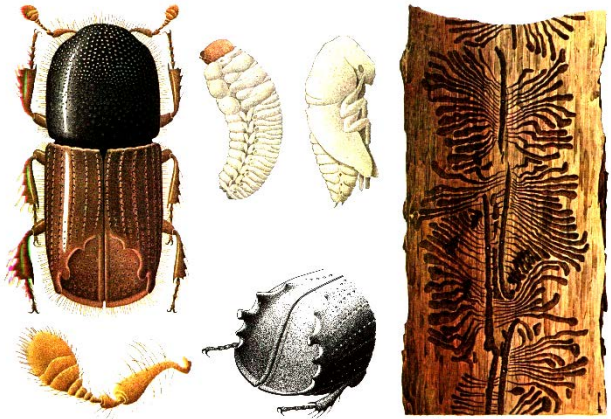
ploskohřbetka smrková (*Cephalcia abietis*)

pilatka smrková (*Pristiphora abietina*)

houba (*Ascocalyx abietina*)

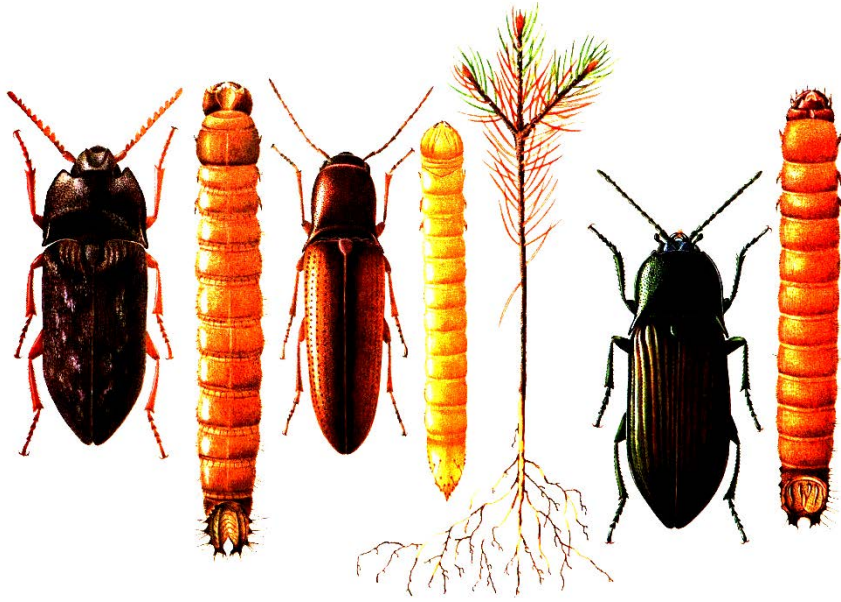
Příklad - rozpad smrkových porostů v ČR

- škůdci – kůrovec, bekyně, korovnice



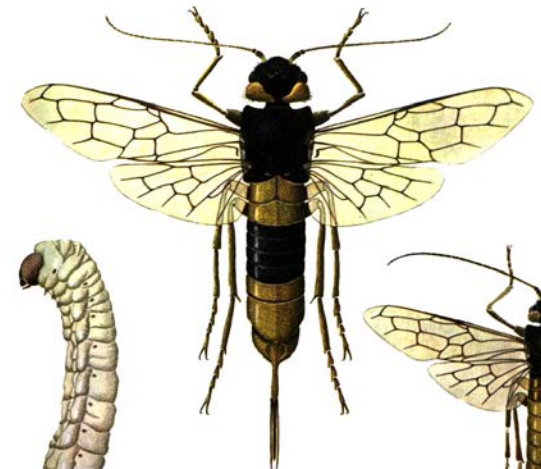
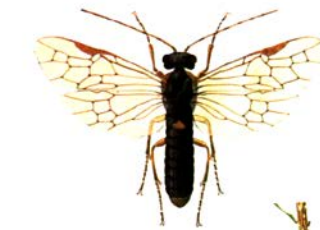
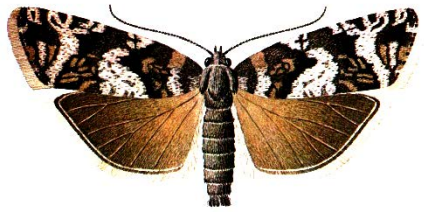
Příklad - rozpad smrkových porostů v ČR

- škůdci – kovaříci, kozlíček, lýkohub



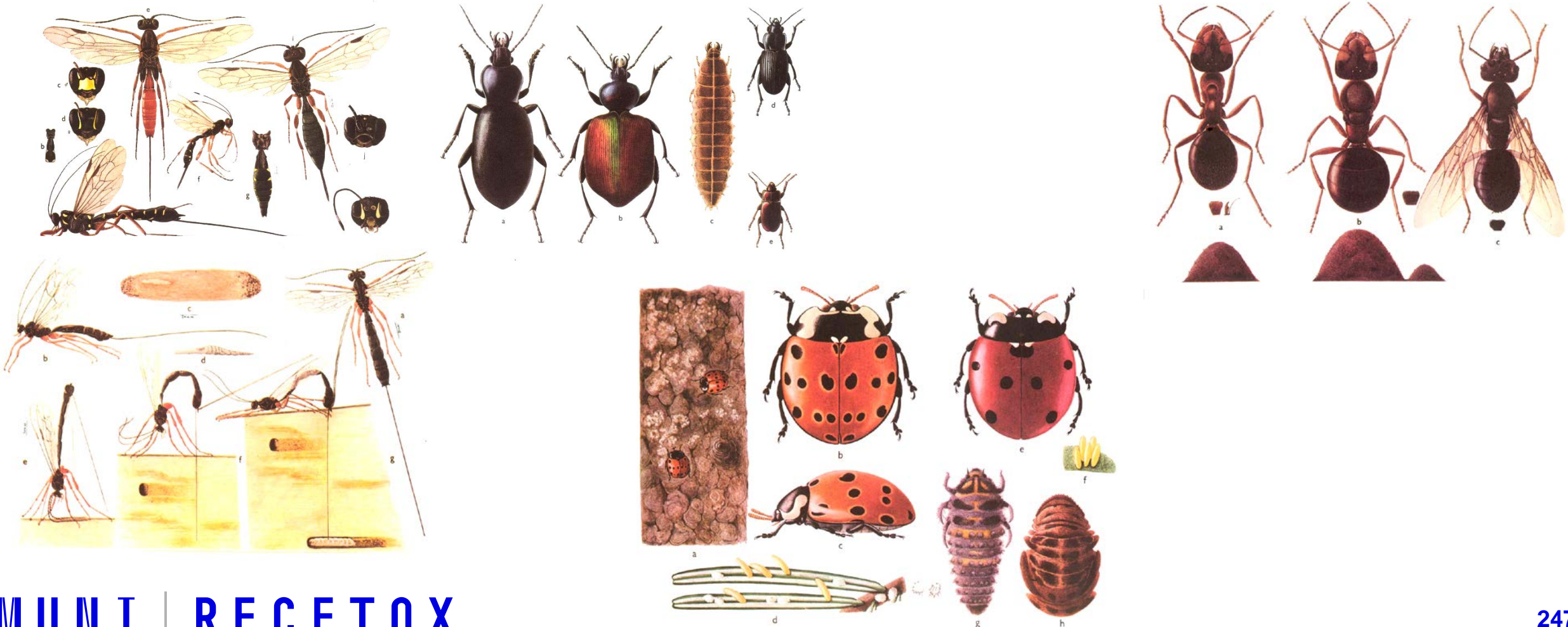
Příklad - rozpad smrkových porostů v ČR

- škůdci – obaleč modřínový, pilatka, pilořitka



Příklad - rozpad smrkových porostů v ČR

- nepřátelé škůdců – lumci, střevlíci, slunéčka, mravenci atd.



Příklad - rozpad smrkových porostů v ČR

další stresor: aplikace insekticidů

- velkoplošná aplikace insekticidů: 1978 – 1983
- použité přípravky: Actellic 50 EC (pirimiphosmethyl – organofosfát, krátké přetrvávání v přírodě) a Ambush 25 EC (permetrin - pyrethroid, nebezpečný i pro studenokrevné živočichy)
- účinnost zásahu: housenky opadávaly ze stromů hodinu po zásahu, průměrná účinnost 81%, celkově zásah zachránil asi 50% jehlic

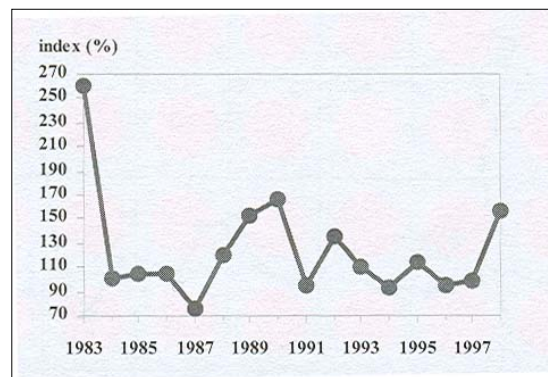


Příklad - rozpad smrkových porostů v ČR

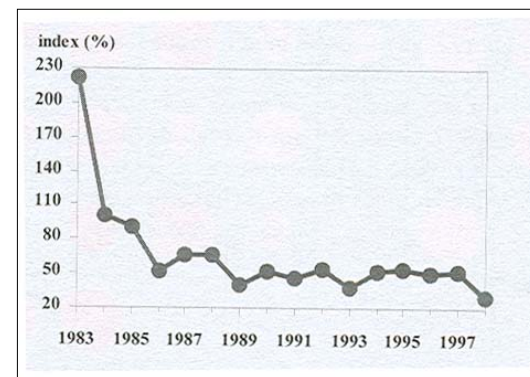
další stresor: aplikace insekticidů - vedlejší vlivy:

- výsledky sledování - na 1 m² pod korunami
 - 230 – 250 housenek obaleče
 - 70 – 230 jedinců dalšího hmyzu
- u hmyzu létajícího nad povrchem půdy – klesl počet jedinců na 40%, později na 20-30% proti kontrole – zvyšování stavů po 14 dnech
- velmi negativní, až drastický vliv na faunu potoků – larvy vodního hmyzu zasaženy a unášeny proudem: 10 – 30 x více proti normálu – nejcitlivější pošvatky
- dlouhodobý vliv na populace hmyzožravých ptáků

Králíček obecný (*Regulus regulus*)



Drozd zpěvný (*Turdus philomelos*)



Literatura

Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (1997): Biological indicators of soil health. CAB International, Wallingford. ISBN 0851991580.

Doran, J. W., Parkin, T. B. (1994): Defining and assessing soil quality. In: Defining soil quality for a sustainable environment. SSSA special publication number 35. SSSA, Inc., American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, USA, 1994, pp. 3 – 21.

Sáňka, M., Materna, J. (2004): Indikátory kvality zemědělských a lesních půd ČR. Edice Planeta. Odborný časopis pro životní prostředí. Ročník XII, číslo 11/2004, ISSN 1213-3393.

Jensen J. & Mesman M. (2006). Ecological risk assessment of contaminated land. Decision support for site specific investigations. Report 711701047. RIVM, Netherlands

Doelman P. & Eijsackers H.J.P. (2004): Vital Soil - Function, Value and Properties. Elsevier. 358 p. ISBN: 0-444-51772-3

Maier, R.N., Pepper, I.L, Gerba, C.P. (2000): Environmental Microbiology. Academic Press, ISBN: 0124975704, 608 pp.

Atlas, R.M., Bartha, R. (1997): Microbial Ecology: Fundamentals and Applications (4th Edition). Addison-Wesley Pub Co, ISBN: 0805306552, 306 pp.

Paul, E.A., Clark, F.E. (1996): Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, ISBN: 0125468067, 340 pp.

Tate, R.L. (2000): Soil Microbiology (2nd Edition). John Wiley & Sons, ISBN: 0471317918, 536 pp.

Alef, K., Nannipieri, P. (1995): Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, ISBN: 0125138407, 576 pp.

Burlage, R.S., Atlas, R., Stahl, D. (1998): Techniques in Microbial Ecology. Oxford University Press, ISBN: 0195092236.

Hurst, C.J., Crawford, R.L., Knudsen, G.R. (2002): Manual of Environmental Microbiology. Amer Society for Microbiology, ISBN: 155581199X, 1138 pp.

Pepper, I., Gerba, C. (2005): Environmental Microbiology: A Laboratory Manual. Academic Press.

Gill, R., Ramos-Rodriguez, O. & Raine, N. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. Nature 491, 105–108 (2012). <https://doi.org/10.1038/nature11585>