

	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd	Vydání	1
	31320.1 – Stanovení účinků hnojiv a agrochemikálií na reprodukci žížaly <i>Eisenia andrei</i>	Revize	0

STANOVENÍ ÚČINKŮ HNOJIV A AGROCHEMIKÁLIÍ NA REPRODUKCI ŽÍŽALY *EISENIA ANDREI*

1 Účel a rozsah

Metoda je určena k detekci potenciálního vlivu hnojiv a agrochemikálií na schopnost reprodukce žížaly *Eisenia andrei* po jednorázové aplikaci testovaného přípravku. Tento chronický test je použitelný pro půdy a materiály neznámé kvality (např. kontaminované půdy, odpadní materiály). Účinky přípravku se hodnotí za použití definovaného umělého půdního substrátu (artificiální půdy). Tato metoda není určena k testování volatilních látek a nebere v úvahu stálost látky v průběhu testu.

2 Princip

Test probíhá minimálně při 6 koncentracích daného přípravku. Koncentrační řada vychází z maximální dávky doporučené pro aplikaci na půdu, která je přibližně uprostřed sledované koncentrační řady. Součástí testu je i kontrolní varianta neošetřená testovaným přípravkem. Test trvá 56 dní. Po 28 dnech se odeberou dospělí jedinci a vyhodnotí se jejich mortalita (popřípadě nárůst či úbytek biomasy žížal). Na konci testu po dalších 28 dnech inkubace se vyhodnotí vliv na reprodukci žížal spočítáním juvenilů.

3 Chemikálie

- Artificiální půda ("bílá" vrchní rašelina – velikost částic $2\text{ mm} \pm 1\text{ mm}$, křemenný písek – více než 50 % hmotnosti písku v rozmezí velikosti zrněk 0,05 mm – 0,2 mm, kaolín – např. Sigma, CaCO_3 – úprava pH).
- Chlorid draselný (KCl), roztok KCl, $c = 1\text{ mol/l}$.
Příprava: 74,6 g KCl se rozpustí v destilované vodě a doplní na 1000 ml.
- Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná) na ovlhčení.
- Granulovaný kravský hnůj.
- Testovaný přípravek.

4 Přístroje a pomůcky

- Skleněné testovací nádoby s perforovanými víčky, (1 – 2) l.
- Nádoba na míchání artifciální půdy (AP).
- Šrotovací zařízení na rozsekání rašeliny.
- Míchačka na artifciální půdu.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd 31320.1 – Stanovení účinků hnojiv a agrochemikálií na reprodukci žížaly <i>Eisenia andrei</i>	Vydání	1
		Revize	0

- 5 Síta o jmenovité délce ok 2 mm.
- 6 Mrazák -20 °C (-80 °C).
- 7 pH metr.
- 8 Klimatizovaná místnost či růstová komora vytemperovaná na (20 ± 2) °C.
- 9 Světelný zdroj (např. bílé zářivky) schopný dodávat konstantní intenzitu světla (400 – 800) lux při řízeném cyklu světlo : tma (16 : 8) hodin nebo (12 : 12) hodin.
- 10 Luxmetr.
- 11 Předvážky, přesnost 1 g, váživost do 5000 g.
- 12 Předvážky, přesnost 0,01 g, váživost do 200 g.
- 13 Nastavitelné automatické pipety (0,2 – 1) ml a (1 – 5) ml.
- 14 Vodní lázeň, (50 – 60) °C.
- 15 Plastový tác.
- 16 Počítadlo.
- 17 Dřevěná špejle nebo mikrobiologická klička.
- 18 Skleněná tyčinka.

5 Testovaný organismus

- 1 Zásobní kultura žížal *Eisenia andrei*.

6 Postup

6.1 Příprava umělé půdy (AP)

Umělá půda se skládá z křemenného písku, kaolínu, přesáté rašeliny a CaCO₃, který slouží k úpravě pH umělé půdy na 6 ± 0,5. Pro test se žížalami používáme světlou rašelinu. Přesátá rašelina se defaunizuje hlubokým zamražením na -80 °C nebo se nechá 3 × zmrznout při -20 °C a při laboratorní teplotě se nechá opakovaně rozmraznout. Křemenný písek, kaolín a rašelina se smíchají v poměru 69 : 20 : 10. Umělá půda se nechá den odležet v laboratorních podmínkách a změří se její pH. Pokud je potřeba, pH se upraví uhličitánem vápenatým na hodnotu 6 ± 0,5. Nechá se další 3 dny odležet a pak se znovu ověří hodnota pH (viz JPP ÚKZÚZ, postup č. 30042.1). V AP se změří také maximální vodní kapacita (WHC, viz JPP ÚKZÚZ, postup č. 31180.1) a sušina (viz JPP ÚKZÚZ, postup č. 30020.1).

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd	Vydání	1
	31320.1 – Stanovení účinků hnojiv a agrochemikálií na reprodukci žížaly <i>Eisenia andrei</i>	Revize	0

6.2 Experimentální uspořádání

Předběžný test: Předběžný test je volitelný a je vhodné ho zvolit v případě, kdy toxicita testované látky není známa. Předběžný test slouží k zjištění rozsahu koncentrací testované látky ovlivňující žížaly, např. 0 mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg, 100 mg/kg a 1000 mg/kg. Předběžný test se provádí bez opakování. Pokud nejsou pozorovány žádné účinky ani při koncentraci 1000 mg/kg, lze definitivní test navrhnout jako test limitní.

Definitivní test: Slouží ke zjištění mortality jedinců a vlivu na reprodukci. Při přípravě koncentrační řady se nedoporučuje volit ředící krok vyšší než 2.

Možná uspořádání definitivního testu:

- 1 Pro NOEC (No Observed Effect Concentration – koncentrace, při které není pozorován nežádoucí účinek) přístup se použije alespoň 5 koncentrací v geometrických sériích po 4 opakováních + 8 kontrol.
- 2 Pro EC_x (Effect Concentration – účinná koncentrace, při které se projeví účinek u x % sledované populace) přístup se použije až 12 koncentrací po 2 opakováních + 6 kontrol. Ředící krok může být proměnlivý: menší v nízkých koncentracích a větší ve vysokých koncentracích.
- 3 Pro smíšený přístup se použije 6 až 8 koncentrací v geometrických řadách po 4 opakováních + 8 kontrol.

Limitní test: Pro případ rychlého zhodnocení testované látky lze zvolit limitní test, který se skládá z kontrolní varianty a doporučené dávky testovaného přípravku v 4 opakováních. Limitní test může být dostačující, pokud v předběžném testu nebyly pozorovány žádné toxické účinky.

Spotřeba AP se vypočte podle zvoleného designu. Na každé opakování je třeba 500 g suché AP. Dále je potřeba přičíst minimálně 2 × 20 g suché půdy na kontrolu pH a aktuální vlhkosti.

6.3 Aplikace testované látky a rozdělení AP do testovacích nádob

Jeden až tři dny před začátkem testu se do celkového množství AP od každé testované koncentrace aplikuje testovaná látka a zároveň se AP ovlhčí na 50 % WHC.

Množství testovaného přípravku pro aplikaci na AP se přepočítá podle reálného modelu, kdy se předpokládá standardní hloubka při zapravování hnojiv do půdy (obvykle se pohybuje kolem 30 cm). V laboratorních podmínkách se počítá s hloubkou zapravení 10 cm do půdy (možný horší scénář). Poté se přepočítá odpovídající dávka na mg/g suché půdy a připraví se koncentrační řada testovaného přípravku. Při výpočtech aplikačních dávek se počítá s hodnotou hustoty půdy 1,5 g/cm³.

Ze zásobního roztoku testované látky (= nejvyšší koncentrace) se ředící řadou získají nižší koncentrace testované látky. Podle rozpustnosti testovaných látek se musí lišit jejich aplikace na AP:

- 1 Ve vodě rozpustné látky se rozpustí ve vodě (3). Množství roztoku se spočítá tak, aby se dosáhlo požadované koncentrace a výsledné vlhkosti půdy (dovlhčení na 50 % WHC).

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd	Vydání	1
	31320.1 – Stanovení účinků hnojiv a agrochemikálií na reprodukci žížaly <i>Eisenia andrei</i>	Revize	0

- 2 Pro látky nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v organických rozpouštědlech, se použije těkavé rozpouštědlo (dichlormetan, cyklohexan, aceton, hexan). Množství testované látky potřebné k dosažení požadované koncentrace se rozpustí v rozpouštědle a smíchá se s částí křemenného písku. Po odpaření rozpouštědla v digestoři (nejlépe přes noc) se kontaminovaný písek důkladně promíchá se zbytkem standardní půdy a dovlhčí se na 50 % WHC. V každém opakování musí být stejné množství rozpouštědla, aby nedošlo k ovlivnění výsledků. Je také nutné založit kontrolní sadu na použité rozpouštědlo, aby se zjistilo, zda samo rozpouštědlo není pro žížaly toxické.
- 3 Pro látky nerozpustné ve vodě, ani v organických rozpouštědlech, se látka pečlivě vmíchá přímo do testované půdy, nebo se použije směs 10 g jemně mletého industriálního křemenného písku (nebo 10 g suchého půdního substrátu) a množství testované látky potřebné k získání požadované koncentrace. Pečlivě se vše promíchá. Dovlhčí se na 50 % WHC.

Uzavřené nádoby s připravenou kontrolní půdou a půdou s přídavkem testované látky se umístí do místnosti (růstové komory) vytemperované na $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ do začátku testu. V den zahájení pokusu se nádoby převážejí a doplní se případný úbytek vody. Připravená AP se rozvažuje po 500 g suché hmotnosti do skleněných testovacích nádob. Půda v testovacích nádobách by neměla být udusaná kvůli volnému pohybu žížal.

6.4 Vlastní postup testu

Do každé testovací nádoby je na povrch půdy aplikováno 10 žížal. Žížaly do testu by měla tvořit, pokud možno homogenní populace z hlediska věku, velikosti a hmotnosti. Do testu je vhodné použít dospělé žížaly 2 měsíce až 1 rok staré, stejné velikosti a s dobře vyvinutým opaskem. Doporučovaná hmotnost na jednu žížalu je (250 – 600) mg. Doporučuje se žížaly před vlastním testem aklimatizovat 1 až 7 dní v umělé půdě s přídavkem ovlhčeného granulovaného kravského hnoje.

Před aplikací do nádoby se žížaly po 10 jedincích opatrně opláchnou v kohoutkové vodě, osuší papírovou utěrkou a zvážejí. Po aplikaci žížal se testovací nádoby uzavřou perforovanými víčky, aby byl zajištěn dostatečný přísun vzduchu, zvážejí se a umístí do místnosti (růstové komory) vytemperované na $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Intenzita osvětlení je nastavena na (400 – 800) lux při řízeném cyklu světlo : tma (16 : 8) hodin.

Potrava se do testovacích nádob přidává 1 den po založení testu. Jako potrava slouží žížalám granulovaný kravský hnůj. Granulovaný hnůj je potřeba před aplikací do nádob ovlhčit vodou (3) a nechat asi hodinu odstát. Na ovlhčení 5 g suchého hnoje připadá 6 ml vody (3). Na začátku testu se aplikuje 11 g vlhkého hnoje na testovací nádobu. Hnůj se pomocí skleněné tyčinky opatrně zahrabe asi 1 cm pod povrch testovací matrice.

Po aplikaci žížal a potravy do testovacích nádob se nádoby uzavřou a zvážejí.

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd	Vydání	1
	31320.1 – Stanovení účinků hnojiv a agrochemikálií na reprodukci žížaly <i>Eisenia andrei</i>	Revize	0

6.5 Kontrola vlhkosti a krmení

Každý týden se kontroluje vlhkost zvážení nádob. Případný úbytek hmotnosti se doplní vodou (3). Na povrch půdy se nejprve rovnoměrně nakape množství chybějící vody, až poté se pod povrch půdy aplikuje potrava (11 g vlhkého hnoje na opakování). Naposledy se potrava do testovacích nádob přidává 28. den inkubace po vyjmutí dospělých žížal. Současně s doplňováním vody a krmením dochází k provětrání testovacích nádob.

6.6 Vyhodnocení testu a počítání juvenilů

Po 28 dnech inkubace se vyhodnotí mortalita dospělých žížal. Testovací nádoby se převáží kvůli doplnění úbytku vody. Obsah testovací nádoby se opatrně vysype na plastový táč. Dospělé žížaly se opatrně vyberou z půdy a spočítají se, umyjí se v kohoutkové vodě, osuší a následně zváží. Do půdy se nakape úbytek vody a půda se po krátkém promíchání vrátí zpět do testovací nádoby. Pod povrch půdy se zahrabe 11 g ovlhčeného hnoje, nádoby se uzavrou perforovanými víčky, převáží a ponechají se inkubovat dalších 28 dní. Každý týden se kontroluje vlhkost a větrá se, ale potrava se již nepřidává.

Po 56 dnech inkubace se hodnotí počet vylíhnutých juvenilních žížal. Juvenilní žížaly je možné z půdy vybrat ručně a spočítat, ale tento proces je časově velmi náročný. Proto je pro extrakci žížal z půdy doporučena tepelná extrakce. Tepelnou extrakci je možné provádět ponořením testovací nádoby do vodní lázně o teplotě (50 – 60) °C. Po přibližně (20 – 30) min se juvenilní žížaly objeví na povrchu půdy a je možné je opatrně rukou odebrat společně s vrchní vrstvičkou půdy a spočítat. Následně je třeba zkontrolovat vnitřní stěny nádoby a prohrábnout vrstvu půdy pod odebranými žížalami a případné nalezené žížaly započítat.

Po vyhodnocení testu je nutné všechny žížaly vystavené testované látce usmrtit. Žížaly se usmrtí zmražením při -20 °C (-80 °C).

6.7 Vyhodnocení dat

Pro každou koncentraci zkoušeného vzorku a kontrolu se vypočte procentuální mortalita dospělých žížal, aritmetický průměr počtu juvenilních žížal, směrodatná odchylka (SD) a variační koeficient (CV).

Kritéria validity

Výsledky se považují za platné, pokud v kontrole platí následující podmínky:

- 1 Mortalita dospělých jedinců po čtvrtém týdnu by neměla v průměru přesáhnout 10 %.
- 2 Za předpokladu, že na počátku testu bylo zavedeno 10 dospělých jedinců na jednu nádobu, na konci testu by měl být průměrný počet juvenilů na jednu nádobu vyšší nebo roven 30.
- 3 Na konci testu by variační koeficient pro reprodukční data neměl převyšovat 30 %.

Pokud nejsou splněny podmínky validity testu, test se opakuje.

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd	Vydání	1
	31320.1 – Stanovení účinků hnojiv a agrochemikálií na reprodukci žížaly <i>Eisenia andrei</i>	Revize	0

Parametry NOEC, LOEC (Lowest observed effect concentration – nejnižší koncentrace, při níž je pozorován nežádoucí účinek) a EC_x se vypočítají dle níže uvedeného schématu (1):

Pro testování normality rozdělení dat se použije Shapirův-Wilkův test a pro testování homogenity rozptylů Levenův test.

Stanovení NOEC a LOEC, seřazeno sestupně podle síly testu:

- 1 Data mají normální rozdělení a homogenní rozptyl: silnější Williamsův test trendu při splnění podmínky monotónnosti dat, jinak jednostranný Dunnettův test.
- 2 Data mají normální rozdělení a nehomogenní rozptyl: jednostranný Welchův t-test s Bonferroniho-Holmovou korekcí, která je ovšem velmi konzervativní.
- 3 Data nemají normální rozdělení a splňují podmínky homogenity variancí: při splnění podmínky monotónnosti dat se použije Jonkheere-Terpstrův test trendu, jinak jednostranný U-test s Bonferroniho-Holmovou korekcí.

Stanovení EC_x:

- 1 Jako první se provede výpočet pomocí 2-, 3- nebo 4- parametrické nelineární regrese s kumulativní distribuční funkcí založenou na normálním, logit nebo Weibullovu rozdělení. V případě splnění podmínek pro více modelů se zvolí model s nejnižším počtem parametrů dávající uspokojivé výsledky (parsimonní model).
- 2 V případě, že se nepodaří vytvořit model pomocí nelineární regrese, pro výpočet se použije lineární regrese založená na logit, probit nebo Weibullovu rozdělení.

Poznámky

- 1 Pro hodnocení ekotoxikologických dat je vhodné použít komerční software ToxRat (ToxRat Solutions GmbH, Asdorf).

6.8 Referenční látka

Jednou ročně se žížaly testují na referenční látku, zda laboratorní podmínky neovlivnily citlivost testovaných organismů. Doporučenou referenční látkou je kyselina boritá (H₃BO₃). EC₅₀ (reprodukce) kyseliny borité by se měla pohybovat přibližně v rozmezí 400 mg a 600 mg H₃BO₃ na kilogram suché půdy.

7 Laboratorní chov žížaly *Eisenia andrei*

7.1 Příprava chovného substrátu

Chovný substrát tvoří směs hnoje, zahradního substrátu a rašeliny v poměru 40 : 50 : 10. Zahradní substrát a rašelina se defaunizují hlubokým zamražením na -80 °C nebo se nechají 3 × zmraznout při -20 °C a při laboratorní teplotě se nechají opakovaně rozmraznout. Chovný substrát je stabilně ovhččen na (60 – 80) % WHC. Dostatečnou vlhkost substrátu je možné

	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd	Vydání	1
	31320.1 – Stanovení účinků hnojiv a agrochemikálií na reprodukci žížaly <i>Eisenia andrei</i>	Revize	0

jednoduše zjistit tak, že pokud se připravený substrát zmáčkne, měly by se mezi prsty sevřené ruky objevit kapičky vody. pH substrátu by se mělo pohybovat v rozmezí 6 až 7 a upravuje se přidávkou uhličitanu vápenatého.

7.2 Podmínky chovu

Chovný substrát se umístí do neprůhledných plastových nádob (objem 10 l až 50 l) společně se žížalami a zakryje se filtračním papírem nebo prodyšným víkem. Vrstva chovného substrátu by měla mít výšku asi 20 cm. Optimální teplota pro chov je $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Každý týden se substrát provzdušní, ovlhčí a na povrch se nanese krmná směs kravského hnoje či kukuřičného šrotu. Vždy po asi 3 měsících je nutné přemístit žížaly do nového substrátu. Vyčerpání substrátu je indikováno tím, že se žížaly pohybují velmi pomalu a mají žlutý zadní konec. V tomto případě se doporučuje přesun na čerstvý substrát a snížení počtu žížal na chovnou nádobu.

Pokud jsou podmínky pro chov žížal vyhovující:

- 1 Žížaly nemají tendenci opustit chovný substrát.
- 2 Jsou viditelná různá vývojová stadia.
- 3 Žížaly se rychle pohybují v celém objemu substrátu.
- 4 Žížaly se neshlukují.

7.3 Synchronizace chovu

Chov se synchronizuje odebráním dostatečného množství kokonů (jeden kokon obsahuje 2 až 5 žížal) a jejich umístěním do nového chovného substrátu. Synchronizaci je možné provádět také přemístěním dospělých jedinců s vyvinutými opasky do nového substrátu, kde jsou ponechány přibližně 14 až 28 dní a následně se přemístí do jiné nádoby. V původní nádobě pak zůstanou pouze kokony, ze kterých se získá synchronizovaná kultura.

8 Literatura

- 1 ISO 11268-2 (2012). Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 2: Determination of effects on reproduction of *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*. International Standardization Organization, Geneva.
- 2 OECD 222 (2016). Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.