THE AVOIDANCE TEST WITH SPRINGTAILS

TEST ÚNIKOVÉHO CHOVÁNÍ S CHVOSTOSKOKEM

Ondřej Pařízek, Renata Dolejšová, Klára Kobetičová
Institute of Chemical Technology Prague, Faculty of Environmental Technology, Technická 5, 166 28 Praha 6, Czech Republic,e-mail: parizeko@vscht.cz

Abstract:
Recently the avoidance tests are rapidly developing additional tests in the soil ecotoxicology. One of the biggest advantages of these tests is the shorter test period than at conventional reproductive tests. Test runs during 48 - hours, and in some cases can be used 24 - hour tests. Another great advantage of these tests is their high sensitivity. The avoidance response is often more sensitive parameter than the mortality of organisms. In this work, the avoidance behavior in tests evaluated the impact of varied pollutants on soil representatives of mesofauna collembolans species *Folsomia candida*. The influence of the age of the organisms on the test results was also evaluated. The test results were compared with conventional reproduction test conducted on collembolans. For this research was prepared soil according to the OECD guideline. This soil was contaminated with selected kinds of heavy metals (zinc, chromium, cadmium and copper) and standard substance used in soil ecotoxicology the boric acid. The age of used organisms ranged from 10 to 12 days or from 20 to 22 days. Tests lasted for 48 ± 0.5 hours. Any effect of the age of the test organism was demonstrated in tests. The differential sensitivity of the avoidance behavior and reproduction was assessed using the EC_{50} values measured or found in the literature. These data indicates that the test avoidance behavior is significantly more sensitive especially for chromium, cadmium and copper. The reproduction test has a higher sensitivity for zinc and boric acid. The results syndicated that the avoidance test can be a suitable addition to reproduction test and can quickly confirm toxicity, but it cannot be its adequate substitute.

Keywords:
Collembolans, *Folsomia candida*, avoidance test, reproduction test, heavy metals, boric acid

Abstrakt:
Testy únikového chování jsou v poslední době rychle se rozvíjející doplňkové testy v půdní ekotoxikologii. Mezi největší výhody těchto testů patří jejich menší časová náročnost oproti klasickým reprodukčním testům. Test probíhá během 48 hodin, v některých případech mohou být použity i testy 24hodinové. Další značnou výhodou těchto testů je i jejich vysoká citlivost. Úniková reakce často bývá citlivějším parametrem než samotná úmrtnost organismů. V této práci byl v testech únikového chování hodnocen vliv různých kontaminantů na zástupce půdní mezofauny – chvostoskoky druhu *Folsomia candida*. Dále bylo hodnoceno, jaký vliv má stáří použitých organismů na výsledky testu. Výsledky testu byly dále porovnány s klasickým reprodukčním testem prováděným na chvostoskocích. V této práci byla připravena půda dle normy OECD. Tato půda byla kontaminována vybranými druhy těžkých kovů (zinkem, chromem, kadmiem a mědí) a standardní látkou používanou v půdní ekotoxikologii – kyselinou boritou. Únikové testy byly prováděny s chvostoskoky o stáří 10 – 12 nebo 20 – 22 dní. Testy probíhaly po dobu 48 ± 0,5 hodin. Vliv stáří testovacího organismu nebyl v testech prokázán. Rozdílná citlivost testu únikového chování a reprodukčního testu byla hodnocena pomocí hodnot EC_{50} naměřených nebo nalezených v literatuře. Z těchto údajů vyplývá, že test únikového chování je významně citlivější především pro chrom, kadmium a měď. Reprodukční test vykazuje vyšší citlivost pro zinek a kyselinu boritou. Z těchto výsledků plyne, že únikové testy jsou vhodným doplňkem k reprodukčním testům, protože mohou toxicitu velmi rychle potvrdit, ale na rozdíl od reprodukčních testů ji nemohou vyvrátit.

Klíčová slova:
Chvostoskok, *Folsomia candida*, únikový test, reprodukční test, těžké kovy, kyselina boritá

Úvod

Přítomnost toxikantu (např. chemické látky) v půdě na určitém místě ovlivňuje výskyt půdní fauny (Natal-da-Luz et al. 2008). Proto únikové chování půdních organismů slouží jako specifický ukazatel stresových podmínek panujících v půdě (Natal-da-Luz et al. 2008; Smith et al. 2010). Testy únikového chování s reprezentativními druhy půdních organismů mohou být použity jako prvotní screeningové testy pro hodnocení rizik kontaminovaných lokalit. Testy únikového chování s půdními bezobratlými se vyznačují především citlivostí, rychlostí a nenáročností provedení (Van Gestel et al. 2003; Natal-da-Luz et al. 2008). Únikový test na žížalách druhu *Eisenia fetida* a *Eisenia andrei* (ISO 17512-1) byl doplněn o test prováděný na chvostoskoku druhu *Folsomia candida* (ISO 17512-2) který bude použit v této práci.

Cílem studie bude zavedení testu v laboratořích ekotoxikologie a LCA na VŠCHT v Praze. V rámci optimalizace metody bude provedena sada testů na jedné ze základních látek používané v ekotoxikologii na kyselině borité a několika těžkých kovech, přímo na zinku, chromu, mědi a kadmiu. Veškeré testy byly provedeny na standardní půdě připravené v laboratoři podle směrnice OEDC (OECD 2004). Dále budou porovnány citlivosti únikového testu pro jednotlivé kontaminanty ve srovnání s dlouhodobým reprodukčním testem podle hodnot nalezených v literatuře. Rovněž byl testován vliv stáří organismu na výsledky testu uvedených v normě (ISO 17512-2).

Metody a materiál

Testovací organismus

Tetovacím organismem byl chvostoskok druhu *Folsomi candida*. Jeho kultury byly v laboratorních podmínkách chovány v inertních plastových nádobách při teplotě (20 ± 2) °C, při fotoperiodě 16:8 h světlo/tma. Pro testy byly použity synchronizované kultury chvostoskoků ve věku 10 – 12 a 20 – 22 dní. Tyto kultury byly chovány na vrstvě sádry smíchané s práškovým uhlím. Chov byl krmen rozdrceným pangaminem, vlhčen a větrán dvakrát za týden.

Půda

Pro testy byla použita artificiální půda připravená v laboratoři podle směrnice OECD (OECD 2004) obsahující hmotnostní podíly 70 % písku, 20 % kaolínového jílu a 10 % rašeliny. Jednotlivé složky byly prosety sítem o velikosti ok 2x2 mm. Následovala důkladná homogenizace půdy a úprava pH půdy přídavkem uhličitanu vápenatého na požadovanou hodnotu pH 6 ± 0,5.

Testované látky

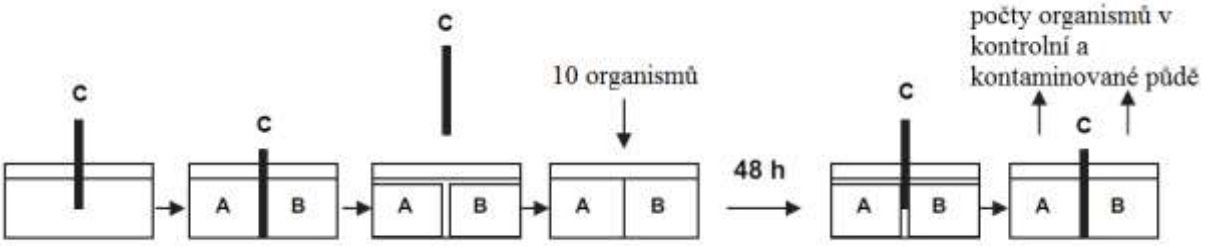
Testovanými látkami byly čtyři zástupci těžkých kovů. Jednalo se o: zinek ($ZnSO_4.7H_2O$, Lachema), chrom ($K_2Cr_2O_7$, Lachema), měď ($CuSO_4.5H_2O$, Lachema) a kadmium ($CdCl_2.2,5H_2O$, Sigma). Další testovanou látkou byla standardně v půdní ekotoxikologii používaná kyselina boritá (H_3BO_3, PENTA). Jednotlivé kovy byly voleny s ohledem na dostupnost a jejich použití v dalších testech. Kontaminanty byly do půdy vpravovány jako vodné roztoky. Tyto roztoky rovněž sloužily k úpravě vlhkosti půdy na hodnotu 60 % WHC. V případě kontroly se použila pouze destilovaná voda. Jednotlivé koncentrace testovaných látek (viz tab. 1) byly voleny na základě pilotních testů prováděných na artificiální půdě a předchozí literární rešerši.

Tab. 1: Koncentrace testované pro jednotlivé kontaminanty

Test	Kontaminant	Koncentrační řada (mg/kg)
1	Kyselina boritá	0-350-700-1400-2800
2	Zinek	0-62,5-125-250-500-1000
3	Chrom	0-62,5-125-250-500-1000
4	Měď	0-200-800-1600-3200
5	Kadmium	0-62,5-125-250-500-1000

Test únikového chování s chvostoskokem
Test byl prováděn v kádince o objemu 150 ml (viz obr. 1), do které byla umístěna přepážka (C), která testovací nádobku rozdělila na dvě stejné části (A a B). Do jedné části byla vložena kontrolní půda, do druhé části kontaminovaná půda. Takto připravená půda byla v kádince zarovnána do stejné vrstvy. Následovalo vyjmutí přepážky (C) a sklepání půdy, zejména z důvodu odstranění mezery po přepážce, což by mohlo zkomplikovat volnou migraci organismu. Do takto připravené testovací nádoby bylo vloženo 10 chvostoskoků ve věku 10 – 12 dní nebo 20 – 22 dní na rozhraní kontaminované a kontrolní půdy. Testovací nádoby byly překryty parafilmem, aby se zabránilo vysychání nádobky. Následovalo vložení nádob do termoluminostatu, který byl vytemperován na (20 ± 2) °C se světelným režimem 16/8 (světlo/tma). Organismy během testu nebyly krmeny.

Test byl ukončen po 48 ± 05 hodinové expozici a byl určen počet jedinců v kontaminované a kontrolní půdě.



Obr. 1: Schéma dvoukomorového testu (Loureiro et al. 2005), přepážka C, a oddíl A a B

Statistické zhodnocení
Testy byly vyhodnoceny metodou čisté odpovědi. Výpočet čisté odpovědi (dále NR = „net response“), jež je vyjádřena procenty, se počítá dle následující rovnice:

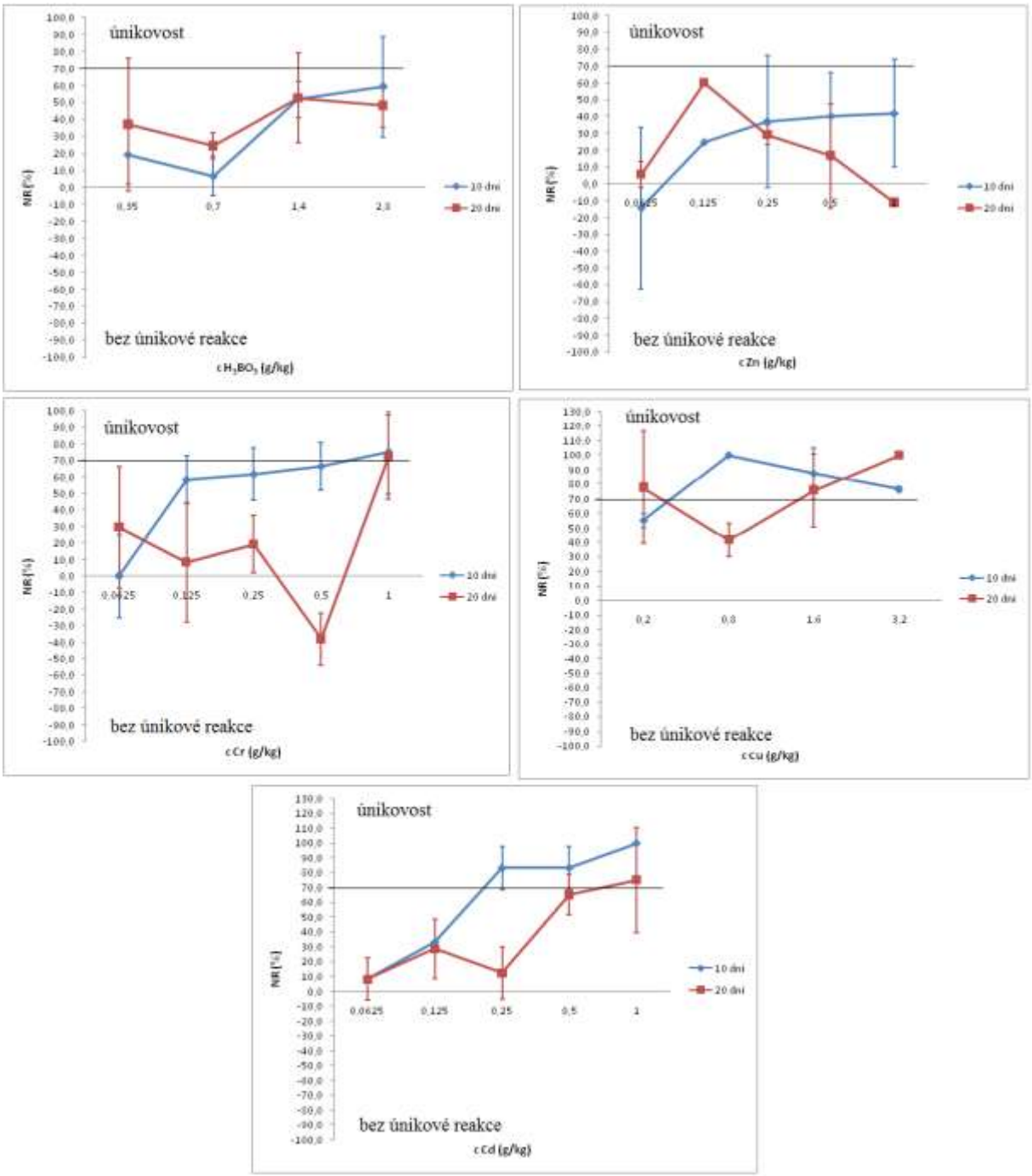
kde C = chvostoskoci nalezení v kontrolní půdě, T = chvostoskoci nalezení v testované půdě a N = celkový počet jedinců. Pozitivní (+) čistá odpověď znamená únikovost a negativní výsledek (-) znamená neúnikovou reakci (testovaná půda je atraktivnější pro organismus nežli půda kontrolní) (Amorim et al. 2008). V případě, že je v některé koncentraci určena hodnota NR větší než 70 %, je tato koncentrace kontaminantu považována za velmi toxickou pro testovací organismus (ISO 17512-2 2008). Dále byla použita jednostranná analýza rozptylu (ANOVA) pro porovnání vlivu stáří organismu pro jednotlivé kontaminanty. Konkrétně jako koncový test byl použit Tukey. Tyto testy patří do souboru statistických programů GraphPad InStat (GraphPad 2007). Rovněž pokud to naměřená data dovolila, byla vypočítána hodnota LC_{50} pomocí programu Probit Analysis program (EPA).

Výsledky
Veškeré testy byly prováděny s půdou připravenou v laboratoři podle směrnice OECD (OECD 2004). Parametry standardní půdy jsou uvedeny v tab. 2.

Průběhy závislosti NR v procentech na koncentraci toxikantu v g/kg pro jednotlivé kontaminanty jsou na obr. 2. V grafu jsou dále zobrazeny směrodatné odchylky pro jednotlivé koncentrace. V případě, že NR přesahovala 70 % (v grafu znázorněno vodorovnou přímkou s osou *x*), byla koncentrace kontaminantu považována za velmi toxickou (viz ISO 17512-2 2008).

Tab. 2: Parametry standardní půdy

Půda	Vodní kapacita půdy (%)	pH	Celkový organický uhlík (%)
Standardní půda	41,0	6,4	6,2



Obr. 2: Graf závislosti únikového chování NR (%) na koncentraci kyseliny borité, zinku, chromu, mědi a kadmia na chvostoskoku druhu *Folsomia candida*

Diskuse

Z výsledků této testovací metody vyplývá, že nejvyšší toxicitu pro chvostoskoky vykazuje kadmium, jehož účinky byly testovány za použití hemypentahydrátu chloridu kademnatého. V testech s 10 dní starými jedinci byla pro tuto látku pozorována únikovost vyšší než 70 % již při koncentraci kadmia 0,25 g/kg suché půdy, v testech s chvostoskoky o stáří 20 dní byla vysoká toxicita pozorována při koncentraci kadmia 1 g/kg suché půdy. Další látkou vykazující vysokou toxicitu v testovaných koncentracích byla měď s testovanou látkou pentahydrátem síranu měďnatého. Měď vykazovala v testech s 10 dní starými chvostoskoky vysokou míru toxicity již při koncentraci mědi 0,8 g/kg suché půdy, při testování 20 dní starých jedinců byla vysoká toxicita pozorována od koncentrace mědi 1,6 g/kg suché půdy. Zvýšený výskyt chvostoskoků na nekontaminované půdě v testech s mědí

o koncentraci mědi 0,2 g/kg suché půdy mohl být způsoben náhodnými vlivy. Vysokou toxicitu vykazoval také chrom, s testovanou látkou dichromanem draselným. Chrom vykazoval únikovost vyšší než 70 % v koncentraci 1 g/kg suché půdy pro 10 i 20 dní staré chvostoskoky. Zinek a kyselina boritá vykazovali nižší toxicitu než ostatní testované látky a hodnoty únikovosti 70 %, která je ukazatelem vysoké toxicity, v dané koncentraci ani jeden z nich nedosáhl.

V testech s kyselinou boritou a 10 dní starými jedinci byla určena hodnota ED_{50} v rozmezí 0,35 – 1,4 g/kg. V reprodukčních testech, které probíhaly 28 dní, byla z naměřených dat určena hodnota EC_{50} 43.7 mg/kg (s nejnižší/nejvyšší mezí: 28,0/64,5 mg/kg). V testech únikového chování prováděných ve stejné laboratoři jako reprodukční byla z naměřených dat určena hodnota EC50 1441 mg/kg (s nejnižší/ nevyšší mezí: 183/478293 mg/kg) (Becker et al. 2009). Výsledky únikových testů prezentovaných v této práci udávají vyšší hodnotu EC_{50} než testy reprodukčního chování a mírně nižší než srovnávané únikové testy. Z tohoto vyplývá, že reprodukční testy vykazují vyšší citlivost na kyselinu boritou než testy únikového chování.

Pro kontaminaci zinkem a 10 dní staré jedince je hodnota EC_{50} vyšší než nejvyšší testované koncentrace, tedy 1 g/kg, a pro 20 dní staré jednice nebylo možno hodnotu EC_{50} stanovit. V reprodukčních testech byla pozorována výrazná inhibice reprodukce až při koncentracích zinku 1,8 a 3,2 g/kg suché půdy (Smit et al. 1997). Pro porovnání výsledků těchto metod by bylo třeba provést únikové testy i při vyšších koncentracích kontaminantů. V dalších reprodukčních testech s kontaminantem zinkem byla určena hodnota EC_{50} = 900 mg/kg (Sandifer et al. 1996), což by vedlo k závěru, že reprodukční test je v tomto případě citlivější než test únikového chování.

Pro testy s chromem a 10 dní starými jedinci byla určena hodnota EC_{50} v rozmezí 0,0625 – 0,125 g/kg pro 20 dní staré jedince nebylo možno určit hodnotu EC_{50}. V reprodukčních testech byly určeny hodnoty NOEC 560 mg/kg a LOEC 1000 mg/kg chromu v suché půdě připravené dle normy OECD (Lock et al. 2002). Z porovnání těchto výsledků vyplývá, že test únikového chování je výrazně citlivější k přítomnosti chromu v půdě.

Pro kontaminaci mědí a 10 dní staré jedince je hodnota EC_{50} nižší než nejnižší testovaná koncentrace kontaminantu, což je 0,2 g/kg suché půdy. Pro testy s 20 dní starými jednici nebylo možné stanovit hodnotu EC_{50}. V reprodukčních testech s mědí byla určena hodnota EC_{50} = 700 mg/kg suché půdy podle normy OECD (Sandifer et al. 1996). Z porovnání těchto výsledků vyplývá, že testy únikového chování jsou pro kontaminant měď citlivější než testy reprodukční. V dalších únikových testech byla určena hodnota EC_{50} = 180 mg/kg (Boiteau et al. 2011), což odpovídá i výsledkům zde prezentovaných testů.

Pro testy s kadmiem a 10 dní starými jedinci byla určena hodnota EC_{50} v rozmezí 0,125 – 0,25 g/kg a pro 20 dní staré jedince je hodnota EC_{50} nižší než 0,5 g/kg. V reprodukčních testech s kontaminantem kadmiem byla určena hodnota EC_{50} 193 mg/kg suché půdy po čtyřech týdnech a mírně se snížila po šesti týdnech na 70,6 mg/kg suché půdy dle normy OECD (Van Gestel et al. 2003). V dalších reprodukčních testech byla určena hodnota EC_{50} = 590 mg/kg (Sandifer et al. 1996). Z těchto výsledků není možné posoudit, zda je test únikového chování citlivější, vzhledem k tomu, že v porovnání s jedním testem je méně citlivý a ve srovnání s druhým je citlivější. Velmi záleží na druhu kontaminantu.

Závěr

Z výsledků práce bylo možno vyvodit následující závěry:

- Byl zaveden a optimalizován test únikového chování na chvostoskoku podle normy ISO 17512-2 v laboratoři ekotoxikologie a LCA na VŠCHT Praha.
- Bylo ověřeno, že stáří testovacích organismů v rozmezí stanoveném normou, nemá zásadní vliv na výsledky testů. Lze tak v testech použít jak 10 – 12 dní, tak 20 – 22 dní staré jedince.
- Byly otestovány účinky kyseliny borité a vybraných těžkých kovů. Pokud to naměřené výsledky umožnily, byla určena hodnota EC_{50}, která se pro testy s kyselinou boritou a 10 dní starými jedinci pohybovala v rozmezí 0,35 – 1,4 g/kg. Pro kontaminaci zinkem a 10 dní staré jedince je hodnota

EC_{50} vyšší než nejvyšší testovaná koncentrace, což je 1 g/kg. Pro testy s chromem a 10 dní starými jedinci byla určena hodnota EC_{50} v rozmezí 0,0625 – 0,125 g/kg. Pro kontaminaci mědí a 10 dní staré jedince je hodnota EC_{50} nižší než nejnižší testovaná koncentrace kontaminantu, což je 0,2 g/kg. Pro testy s kadmiem a 10 dní starými jedinci byla určena hodnota EC_{50} v rozmezí 0,125 – 0,25 g/kg a pro 20 dní staré jedince je hodnota EC_{50} nižší než 0,5 g/kg. V ostatních případech nebylo možné hodnotu EC_{50} určit.

- Do budoucna by bylo vhodné otestovat i organické kontaminanty a například porovnat výsledky únikových testů pro přírodní kontaminovanou půdu před její sanací a po sanaci.

Poděkování
Práce byla vypracovaná v rámci grantu: A2_FTOP_2013_028.

Literatura:

Amorim M. J. B., Novais S., Römbke J., Soares A. M. V. M. 2008. *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): A test organism in a standardised avoidance test? Effects of different chemicals substances. Environment International 34, pp. 363-371.

Becker L., Scheffczyk A., Förster B., Firla-Heb C., Oehlmann J., Römbke J., Moser T. 2009. Evaluation of boric acid on the basis of the results of a terrestrial test battery. Poster, SETAC.

Boiteau G., Lynch D. H., MacKinley P. 2011. Avoidance tests with *Folsomia candida* for the assessment of copper contamination in agricultural siols. Environmental Pollution 159, pp. 903-906.

EPA PROBITANALYSIS PROGRAM USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES Version 1,5, Cincinnati, Ohio.

GraphPad 2007. InStat Biostatistics version 3.0 for Windows. GrafPad Software, Inc., San Diego CA.

International Organization for Standardization (ISO 17512-1) 2008. Soilquality – Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – part 1: Test with Earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*) International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

International Organization for Standardization (ISO 17512-2) 2008. Soilquality – Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – part 2: Test with collembolans (*Folsomia candida*) International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Lock K., Janssen C. R. 2002. Ecotoxicity of Chromium (III) to *Eisenia fetida*, *Enchytraeus albidus* and *Folsomia candida*. Ecotoxicology and Environmental Safety 51, pp. 203-205.

Loureiro S., Soares A. M. V. M., Nogueira A. J. A. 2005. Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. Environmental Pollution 138, pp. 121-131.

Natal-da-Luz T., Amorim M. J. B., Römbke J., Sousa J. P. 2008. Avoidance tests with earthworms and springtails: Defining the minimum exposure time to observe a signifiant response. Ecotoxicology and Environmental Safety 71, pp. 545-551.

Natal-da-luz T., Tidona S., Van Gestel C. A. M., Morais P. V., Sousa J. P. 2009. The use Collembola avoidance tests to characterize sewage sludges as soil amendments. Chemosphere 77, pp. 1526-1533.

Sandifer R. D., Hopkin S. P. 1996. Effects of pH on the toxicity of kadmium, cooper, lead and zinc to *Folsomia canadida* willem, 1902 (*Collembola*) in a standard laboratory test system. Chemospere 33, pp. 2475-2486.

Smit C. E., Van Beelen P., Van Gestel C. A. M. 1997. Development of zinc bioavailability and toxicity for the springtail *Folsomia candida* in an experimentally contaminated field plot. Environmental Pollution 98, pp. 7-80.

Smith B. A., Greenberg B., Szephenson G. L. 2010. Comparison of biological and chemical measure of metal bioavailability in field soil: Test of a novel simulated earthworm gut extraction. Chemosphere 81, pp. 755-766.

Van Gestel C. A. M., Mol S. 2003. The influence of soil characteristics on kadmium toxicity for *Folsomia kandida* (*Collembola: Isotomidae*). Pedobiologia 47, pp. 387-395.