

Tomáš Erban a kol.

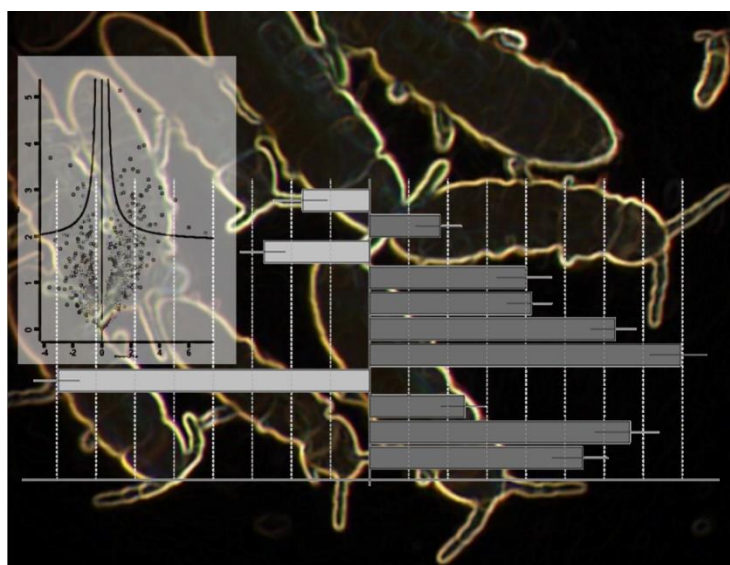
Metodika pro hodnocení vlivu subletálních dávek pesticidů na půdní živočichy s využitím OMICs přístupu – model *Folsomia candida*

CERTIFIKOVANÁ METODIKA



© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

2022





Metodika pro hodnocení vlivu subletálních dávek pesticidů na půdní živočichy s využitím OMICs přístupu – model *Folsomia candida*

Tomáš Erban a kolektiv

Autorský tým:

Tomáš Erban¹, 

Pavla Pabišková^{1,2}

Bruno Sopko¹

Elena Shcherbachenko^{1,2}

Martin Markovič¹

Pavel Talacko³


Tat'ána Halešová⁴

¹Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Drnovská 507/73, 161 06 Praha 6 – Ruzyně

²Ústav pro životní prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Benátská 433/2, 128 01 Praha 2

³Proteomická servisní laboratoř, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, BIOCEV, Průmyslová 595,
252 42 Vestec

⁴ALS Czech Republic, s. r. o., Na Harfě 336/9, 190 00 Praha 9 – Vysočany

 RNDr. Tomáš Erban, Ph.D., ORCID: 0000-0003-1730-779X

arachnid@centrum.cz; erban@vurv.cz

Oponenti:

Mgr. Hana Kubátová-Hiršová, Ph.D. – specialista POR, Sekce zemědělských vstupů, Odbor přípravků na ochranu rostlin, Oddělení rizik a účinnosti POR, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský,
Zemědělská 1752/1a, 61300 Brno

Doc. Mgr. Martin Šlachta, Ph.D. – Ústav výzkumu globální změny AV ČR, v. v. i., Lipová 1789/9, 370 05
České Budějovice

Vydal: © Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha, 2022 ISBN 978-80-7427-374-2



Obsah

1. Financování, certifikace, prohlášení, poděkování.....	- 1 -
2. Název a anotace česky	- 2 -
3. Název a anotace anglicky.....	- 3 -
4. Úvod.....	- 4 -
5. Cíl metodiky.....	- 5 -
6. Význam <i>Folsomia candida</i> a jeho pozice v hodnocení rizik pesticidů	- 5 -
7. Vlastní popis metodiky	- 7 -
7.1. Výběr pesticidu pro hodnocení	- 7 -
7.2. Materiál pro experimenty.....	- 9 -
7.2.1. Zkušební organismus.....	- 9 -
7.2.2. Půda	- 10 -
7.2.3. Experimentální nádoby, stojany a klimaboxy	- 10 -
7.3. Provedení experimentu	- 11 -
7.3.1. Návrh expozice testovanému POR a účinné látce	- 11 -
7.3.2. Aplikace POR nebo účinné látky do půdy.....	- 12 -
7.3.3. Začátek expozice – umístění živočichů do kádinek	- 13 -
7.3.4. Ukončení experimentu.....	- 13 -
7.3.5. Opakování experimentu pro průkaz opakovatelnosti	- 14 -
7.3.6. Statistické vyhodnocení biotestu	- 14 -
7.3.7. Zařazení OMICs analýzy do hodnocení rizik.....	- 14 -
7.4. Schématické znázornění metodického postupu	- 16 -
8. Příklady provedení metodiky.....	- 17 -
8.1. Vliv POR (Biscaya 240 OD, Tilmor, Atonik) a jejich mixu	- 17 -
8.2. Hodnocení vlivu acetamipridu na <i>F. candida</i> s využitím OMICs	- 24 -
8.2.1 Primární zjištění negativního vlivu acetamipridu při porovnání se sulfoxaflowem	- 24 -
8.2.2 Potvrzení negativního vlivu acetamipridu na <i>F. candida</i> s využitím OMICs.....	- 28 -
9. Srovnání novosti metodiky	- 35 -
10. Uplatnění metodiky.....	- 35 -
11. Ekonomické přínosy metodiky	- 36 -
12. Publikace, které předcházely metodice	- 37 -
13. Přílohy.....	- 38 -
14. Seznam literatury	- 41 -



1. Financování, certifikace, prohlášení, poděkování

Financování:

Tato certifikovaná metodika je výsledkem projektu TA ČR č. TH03030178 s názvem „*Nové metody hodnocení rizik přípravků na ochranu rostlin vůči necílovým půdním organismům: Hodnocení rizik zatížení půdního prostředí xenobiotiky na diverzitu*“ řešeného v období 2018–2021.



Certifikace:

Metodice bylo uděleno osvědčení Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) UKZUZ 157505/2022.

O uplatnění metodiky je uzavřena smlouva mezi účastníky projektu a Agenturou ochrany přírody a krajiny České republiky (AOPK ČR) TH03030178/NmetNMap, podle ustanovení § 1746 odst. 2 zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku.

Oponentní posudky vypracovali: Mgr. Hana Kubátová-Hiršová, Ph.D., a Doc. Mgr. Martin Šlachta, Ph.D.

Prohlášení:

Předkladatel metodiky prohlašuje, že zpracovaná metodika nezasahuje do práv jiných osob z průmyslového nebo jiného duševního vlastnictví.

Poděkování:

Autorský tým děkuje recenzentům metodiky za podnětné a cenné připomínky. Autoři děkují *alumni* studentům Alžbětě Mikulové, Kateřině Bártové a Jay Darryl Ermiovi za technickou pomoc.



2. Název a anotace česky

Název: Metodika pro hodnocení vlivu subletálních dávek pesticidů na půdní živočichy s využitím OMICs přístupu – model *Folsomia candida*

Anotace: Půdní živočichové jsou v prostředí vystaveni působení řadě cizorodých látek. Za nejdůležitější skupinu rizikových látek jsou považovány pesticidy, zejména ze skupiny prostředky na ochranu rostlin (POR). Před uvedením na trh procházejí POR důkladným hodnocením, jehož cílem je minimalizovat negativní vlivy na prostředí a necílové organismy. Hodnocení v Evropské unii (EU) vychází z nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009. Podstatnou součástí hodnocení představuje vyloučení markantního vlivu na relevantní organismy, které by mohly být používáním POR zasaženy. Dle nařízení Evropské komise (EK) č. 546/2011 má při posuzování velmi podstatný význam toxicita pro nejcitlivější relevantní testovaný organismus. Je nutno brát v úvahu, že každý živočich má jinou genetickou výbavu a může tedy reagovat na různé látky odlišným způsobem. V posledních letech získalo na významu hodnocení chronického vlivu na necílové organismy. Navíc je na vzestupu kromě tradičních metod založených většinou na biotestech využívání moderních vysokokapacitních technologií, které umožňují sledování mnoha markerů v jedné analýze. Tato metodika obsahuje inovativní aspekty pro biologické experimenty s půdními živočichy. Metodika navíc počítá s využitím vysokokapacitních OMICs technologií pro identifikaci případného mechanismu účinku. Jako klíčový modelový druh byl vybrán chvostoskok *Folsomia candida*, který je běžně využíván jako model při posuzování ekotoxikologických rizik. Metodika je s jistými modifikacemi aplikovatelná i na jiné druhy chvostoskoků a další půdní „bezobratlé“. Potenciální uplatnění metodiky je v oblastech státní správy, v soukromých laboratořích i ve výzkumné činnosti při hodnocení environmentálních rizik pesticidů na půdní prostředí. Metodický postup může potvrdit nebo vyloučit environmentální rizika při registraci nových přípravků nebo reevaluaci stávajících POR.



3. Název a anotace anglicky

Title: Methodology for assessing the effect of sublethal doses of pesticides on soil animals employing the OMICs approach – model *Folsomia candida*

Soil animals are exposed to array of foreign substances in the environment. Pesticides are considered to be the most important group of hazardous substances, especially from the group of plant protection products (PPPs). Prior to placing on the market, PPPs undergo a thorough evaluation to minimize negative effects on the environment and non-target organisms. The evaluation in the European Union (EU) is based on Regulation (EC) No. 1107/2009 of the European Parliament and of the Council. An essential part of the evaluation is the elimination of significant effects on relevant organisms that could be affected by PPPs. According to EC Regulation No. 546/2011, toxicity to the most sensitive relevant test organism is very important in the assessment. It must be considered that each animal has a different genetic make-up and can therefore response to different substances differently. In recent years, the evaluation of chronic effects on non-target organisms has gained in importance. In addition to conventional methods based mostly on bioassays, the use of state-of-the-art high-throughput technologies, which allow the monitoring of many markers in a single analysis, is on the rise. This methodology contains innovative aspects for biological experiments with soil animals. In addition, the methodology envisages the use of high-throughput OMICs technologies to identify a possible mechanism of action. *Folsomia candida*, which is commonly used as a model in ecotoxicological risk assessment, was selected as a key model species. With some modifications, the methodology is also applicable to other species of springtails and different soil invertebrates. The potential application of the methodology is in the areas of state administration, in private laboratories and research for the environmental risk assessment of pesticides in the soil. The methodological procedure can confirm or exclude environmental risks when registering new products or re-evaluating currently used PPPs.



4. Úvod

Půdní živočichové tvoří nezastupitelnou a početnou součást ekosystémů po celém světě. Druhy půdních živočichů jsou důležité samy o sobě, ale interagují také se svým okolím. Správná funkce půdního ekosystému je dána správnou rovnováhou mezi různými organismy a aktuálním stavem prostředí. Kromě různých živočichů najdeme v půdě různé archea, bakterie, houby, protista a „bezobratlé“ živočichy. Jedná se o živočichy různé velikosti od mikrofauny přes mezofaunu až po makrofaunu. Narušení normální existence jakéhokoliv organismu patřícího do skládanky půdního ekosystému může vést k systémovému kolapsu, který se projeví jeho špatnou funkčností. Ovlivnění může být přes celou plejádu cizorodých látek, které vznikají činností člověka. Nejčastěji jsou skloňovány pesticidy, jejichž hlavní skupina přípravky na ochranu rostlin (POR) je používána profesionálními zemědělci i zahrádkáři. Než se každý POR dostane na trh, prochází v zemích Evropské unie (EU) a tedy i v Česku velmi důkladným hodnocením, které je dáno legislativou a má zaručit minimální negativní vliv na relevantní necílové organismy a prostředí. Pod pojmem „relevantní necílové organismy“ si můžeme představit všechny organismy, se kterými se POR a jeho jednotlivé komponenty mohou po aplikaci setkat a ovlivnit je.

Půdní živočichové bývají pro účinky pesticidů zejména v očích veřejnosti upozaděni. V současné době si můžeme všimnout nejmarkantnějšího rozdílu zejména ve srovnání s opylovači, přičemž nejčastěji zdůrazňované jsou včely medonosné. Je tomu tak nejen v očích veřejnosti, ale i ve vědecké komunitě, o čemž svědčí intenzita výzkumu a publikovaných prací. Příčina tohoto stavu je vcelku prostá. Ačkoliv je řada půdních živočichů okem viditelných, často unikají pozornosti pro jejich utajený život pod povrchem půdy. Legislativa EU však na půdní organismy nezapomíná a přisuzuje v principu stejnou důležitost všem živočichům. Dle nařízení EK č. 546/2011 [1], kterým se provádí nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 [2], se totiž bere při hodnocení v úvahu především toxicita pro nejcitlivější relevantní testovaný organismus. Při hodnocení je potřeba brát v úvahu také aktuální vědecké poznatky a pokroky v analytických metodách. V této souvislosti lze zvýraznit v posledních letech narůstající význam vysokokapacitních OMICs technologií, které se etablovaly ve vědecké sféře. Tyto metody totiž mohou poskytnout důležitá data obsahující porovnání i tisíců markerů v jedné analýze. Takové komplexní výsledky mohou lépe potvrdit nebo i vyvrátit obavy z rizik pesticidů vůči necílovým organismům.



Zvláštní uplatnění OMICs přístupu je při studiu mechanismu vlivu pesticidu na organismus a zejména pro situace, kdy se jedná o subletální efekt. Biotesty s organismy však mají také svou důležitost a vědecké pokroky použitelné pro hodnocení na základě biotestů jsou důležité obdobně, jako je tomu u analytických metod. Spojení precizních biotestů s nejmodernějšími vědeckými metodami může poskytnout klíčová data pro správné hodnocení rizik pesticidů na prostředí. Takový komplexní přístup je v souladu s nařízeními EU č. 283/2013 (dříve: 544/2011) [3] a 284/2013 (dříve: 545/2011) [4], kterými se provádí nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 [2], pokud jde o požadavky na údaje o účinných látkách a POR. Za zásadní lze pro tuto metodiku z těchto nařízení považovat, že pro účinné látky respektive POR je „třeba uvést všechny potenciálně nepříznivé účinky zjištěné při základních ekotoxikologických zkoumáních a provést a uvést doplňkové studie, které mohou být nezbytné pro zkoumání mechanismů těchto účinků a pro posouzení významnosti těchto účinků“. Doplňkové studie mohou představovat např. opakování experimentů, sledování vlivu expozice při jiné dávce a času nebo také zmíněné studium vlivu pesticidu na organismus na molekulární úrovni některou z OMICs metod nebo dokonce jejich kombinací.

5. Cíl metodiky

Cílem této metodiky je poskytnout nové postupy využitelné pro hodnocení rizik pesticidů na necílové organismy. Zaměření je na hodnocení chronického působení pesticidů na půdní živočichy v jejich přirozeném půdním prostředí a se zohledněním reálného používání pesticidů. Cílem bylo vyvinout nové postupy pro hodnocení rizik pesticidů na modelu chvostoskoka *Folsomia candida*, ale s možným využitím těchto postupů i pro jiné půdní živočichy. Cílem metodiky je poskytnout nový způsob pro provedení opakovatelných biotestů a jejich doplnění o OMICs přístup, který je využitelný pro odhalení nebo prokázání mechanismu působení pesticidů.

6. Význam *Folsomia candida* a jeho pozice v hodnocení rizik pesticidů

Folsomia candida je zástupcem početného řádu členovců chvostoskoci (lat. Collembola). Chvostoskoci patří k nejpočetnějším půdním živočichům. Dosud bylo popsáno přibližně 9300



druhů chvostoskoků z celého světa [5]. Jsou to většinou drobní živočichové, přičemž *F. candida* je v dospělosti velký 1,5 až 3 mm [6]. Nejčastěji je nalezneme v půdě nebo na povrchu půdy, v humusu či opadu a také na vodní hladině. Preferují vlhké prostředí. Většinou se živí pozůstatky listů, půdními houbami a plísněmi. Přispívají k fragmentaci mrtvého organického materiálu a tím stimulují cyklus živin a degradaci dalšími mikroorganismy [5, 7]. Dekompoziční aktivita půdních živočichů jako je *F. candida* je významně závislá na funkčních interakcích s půdními i střevními mikroby [8]. Tento druh chvostoskoka je navíc partenogenetický a za důvod výhradního výskytu samic v jeho populacích je považována symbiotická intracelulární bakterie *Wolbachia*, která je neoddělitelnou součástí všech jedinců tohoto druhu [9]. *Wolbachia* tedy ovlivňuje zásadním způsobem biologii, fyziologii i chování tohoto chvostoskoka. Z hlediska hodnocení rizik pesticidů lze přisuzovat značný význam nejen celkovému mikrobiomu chvostoskoka *F. candida*, ale také v potenciálnímu vlivu skrze jeho symbiotickou intracelulární bakterii *Wolbachia* [8].

Folsomia candida je standardním modelovým laboratorním organismem již více než padesát let. Je považován za necílový organismus, který je citlivý na znečištění prostředí. Také z tohoto důvodu je častým modelem pro hodnocení rizik znečištění prostředí, které zahrnuje také pesticidy [10, 11]. Nelze opomenout, že tento druh chvostoskoka je využíván v ekotoxikologických testech dle ISO norem [10]. Konkrétně se jedná o normu evropskou/českou EN/ČSN ISO 11267:2014 [12] a odpovídající test OECD č. 232 [13]. Podstatou zkoušky je sledování účinků na reprodukci 9 až 12 dnů starých chvostoskoků *F. candida*, kteří jsou vystaveni vlivu zkoušené půdy v porovnání s účinky v kontrolní půdě. V testu jsou nastaveny určité podmínky a rozsahy. Průměrná teplota by měla být 20 ± 1 °C a teplotní rozsah 20 ± 2 °C. Je používána fotoperioda 16 hodin světlo a 8 hodin tma. Norma obsahuje také další parametry jako složení umělé půdy. Mortalita jedinců a jejich reprodukce je sledována po 28 dnech. Půda může být různého charakteru a z různých lokalit [12, 13].

V současných ISO metodikách se dle dostupných informací nepočítá s hodnocením založeném na OMICs přístupu, který mimo jiné zahrnuje tato metodika. Naše metodika s touto možností počítá a obsahuje také odlišnosti pro biologické experimenty a odlišný je také celkový design.



7. Vlastní popis metodiky

Vlastní metodika je založena na inovativním přístupu, jehož aplikací v praxi je možné získat podklady pro hodnocení realistických rizik POR a jejich složek, které mohou být aktivní v půdním prostředí. Získání takových dat je nezbytné pro prokázání nebo vyvrácení negativních účinků pesticidních látek nebo přípravků na necílové půdní živočichy. Při vývoji metodiky jsme se zaměřovali na soulad s nařízeními, která se vztahují k registracím pesticidů, tj. nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 [2] a souvisejících nařízení Komise (EU) č. 283/2013 [3], 284/2013 [4] a 546/2011 [1], kterými se toto nařízení o uvádění POR na trh provádí. Zaměření bylo na optimalizaci experimentálního uspořádání biotestu pro hodnocení rizika aplikací pesticidů tak, aby odpovídaly reálným dávkám na zemědělskou půdu. Důraz byl kladen také na snadnost provedení experimentů a jejich opakovatelnost v čase. Také bylo potřeba synchronizovat odebrání reprezentativního biologického materiálu pro studium mechanismu případného negativního účinku látky, přípravku nebo dokonce tank-mixů.

Níže uvedený standardní metodický postup může být dle potřeby modifikován. Změny se mohou týkat zejména modelového druhu. Může být použit jiný kmen *F. candida*, jiný druh chvostoskoka nebo i jiný půdní živočich. Kritickým faktorem, který může ovlivnit zde uvedené standardní provedení, je testovaná účinná látka nebo přípravek. Při návrhu biologického experimentu je nutno brát v úvahu zejména doporučenou aplikaci POR a z ní odvozenou relevantní přítomnost účinné látky v experimentu. Na druhou stranu je možné provedení experimentu uspořádat pro dose-response design, ve kterém by bylo provedeno testování více koncentrací v ředící řadě najednou.

7.1. Výběr pesticidu pro hodnocení

Při výběru vhodné účinné látky nebo POR pro hodnocení rizik můžeme vycházet z aktuálních potřeb odpovědných orgánů a celospolečenského významu. Každá účinná látka a konkrétní formulace – POR musí v členských zemích EU projít schvalovacím procesem v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 [2]. Nařízení bere v úvahu také dobu



platnosti povolení. Navíc musí být umožněn přezkum, na základě kterého může členský stát nebo EU po posouzení povolení odejmout, změnit nebo rozhodnout o neobnovení registrace. Právě při přezkumu mohou být brány v potaz zejména nové poznatky, které mohou být založeny na nových metodách a možnostech ve výzkumu.

Z minulosti víme, že některé i dlouhodobě velmi populární látky a POR se najednou staly obávanými pro jejich suspektní negativní vliv na necílové organismy. Asi nejvýraznějším případem posledních let je kauza „neonikotinoidy“. POR obsahující jako účinnou látku některý z neonikotinoidů se v druhém desetiletí 21. století staly předmětem řady výzkumů, jejichž výsledky byly použity k přehodnocení a následnému zákazu většiny z nich v zemích EU. Původně bylo v EU povoleno pět neonikotinoidů, ale v současnosti je povolen již pouze acetamiprid, který má platnou registraci až do 28. února 2033 [14].

Přísný přístup k regulaci pesticidů v EU však nemá obdobu mimo EU. Řada pesticidů zakázaných v EU je tedy mimo EU dále používána. To se týká také v EU zakázaných neonikotinoidů, které byly a stále jsou globálně velmi diskutovanou skupinou pesticidů. Významné je obecné zjištění, že Spojené státy (USA) jsou ve srovnání se státy EU, ale dokonce i jinými státy ve světě, pozadu v zakazování škodlivých pesticidů [15]. Ve Spojených státech totiž probíhají, podobně jako v EU, pečlivá hodnocení rizik pesticidů, která mají chránit nejen spotřebitele, ale také necílové organismy a ekosystémy.

Pokud je tedy některý z pesticidů zakázaný v EU, neznamená to, že bychom jej měli kategoricky vyloučit z evaluací ekotoxicity. Některé zakázané pesticidy jsou totiž jinak globálně používané mimo EU, a navíc je v některých případech umožněno používání v členských zemích v rámci výjimek anebo jejich zákaz není úplný a má charakter určitých omezení z důvodu rizik pro konkrétní prostředí. Navíc nelze kategoricky vyloučit, že zakázané pesticidy mohou být znovu povoleny, a to vzhledem k novým poznatkům. Jakkoli není tato možnost příliš pravděpodobná, je správné o ní také uvažovat. Na místě je také zmínit, že každý zakázaný pesticid je potřeba nahradit jiným. Je nutno také zvažovat pro a proti, která přinesl zákaz konkrétních pesticidů. Zákaz některých vysoce účinných pesticidů totiž s sebou přináší změny v pěstování některých plodin a potřebu změny integrované ochrany. Ve své podstatě můžou alternativní ochrany k zakázaným pesticidům vést k vyššímu zatížení prostředí z důvodu používání méně účinných pesticidů ve větších množstvích [16–18]. Z uvedených důvodů je potřeba vždy velmi pečlivě zvážit povolení,



ale i zákazy pesticidů. Navíc nejsou povolení ani zákazy konkrétních pesticidů z legislativního hlediska principiálně trvalé. Ke správným legislativním rozhodnutím mají napomáhat detailní analýzy rizik založené nejen na biotestech, ale navíc pokud možno s ověřením mechanismu účinku.

7.2. Materiál pro experimenty

7.2.1. Zkušební organismus

- Základním zkušebním organismem je chvostoskok *Folsomia candida* Willem, 1902. Chvostoskoky chováme v plastových nádobách na černém dřevěném uhlí, které je spařené a vymyté vařící vodou. Jako potrava se použijí sušené pekařské kvasnice, které se přidávají týdně po špetkách nebo dle potřeby. Chovy jsou umístěny v klimaboxech s nucenou cirkulací, bez přístupu světla, při konstantní teplotě 18 °C (přesnost $\pm 0,2$ °C, homogenita $\pm 0,8$ °C) a každý týden jsou kontrolovány.

Pozn. V provedení metodiky využíváme oproti EN/ČSN ISO 11267:2014 [12] a testu OECD č. 232 [13] nižší teploty a chvostoskoky držíme v temnu. Chvostoskokům se totiž daří lépe v temnu a při nižší teplotě. Prosvětlování relativně slabé vrstvy testované zeminy nedává z praktického hlediska smysl. Chvostoskokci světlo navíc nevyhledávají a jsou plně přizpůsobeni životu v temnu. Proto jsou naše podmínky pro chov a pak i pro experimenty z praktického hlediska vhodnější.

Pozn. Může být použit i jiný modelový živočich. Může se jednat o jiný druh chvostoskoka, ale i o jiného půdního živočicha, jehož rozměry a biologie umožňují provedení expozice v obdobných podmínkách. Pokud by se jednalo o endemický druh, mohly by být teplotní podmínky odvozeny od konkrétního prostředí.

- V testech pro hodnocení rizik pesticidu se použijí jedinci z chovu jednoho kmenu pro zachování stejné genetické výbavy při posuzování.

Pozn. Pokud by byly použity různé kmény téhož druhu v různých opakováních experimentu, mohlo by docházet k odchylkám vlivem fenotypových rozdílů, které by odpovídaly adaptacím získaným z konkrétního prostředí s danými specifiky. Tyto rozdíly mohou být využity pro případ, když by bylo záměrem zkoumat, zda existuje vliv kmenu na expozici stejným látkám a prostředí.

- Použijeme dospělé jedince. V případě *F. candida* jsou dospělci velicí přibližně v rozmezí 1,5 až 3 mm. Největší a zároveň nejstarší dospělé nepoužíváme. Vždy vybíráme stejně velké jedince do maximální velikosti 2 mm.

Pozn. Ve srovnání s OECD č. 232 [13] se v testu použijí dospělci, na jejichž přežívání je zaměřen. Postup zjednodušuje experimentální provedení. Z chovu lze prakticky kdykoliv vybírat pro založení pokusu dostatečný počet stejných jedinců najednou. Je však možné vybírat konkrétní instary nebo jedince určitého stáří (od vylíhnutí z vajíčka). V tom případě je potřeba synchronizovat chov od vajíček – viz EN/ČSN ISO 11267:2014 [12].



7.2.2. Půda

- Vzorek standardní experimentální půdy je volen tak, aby neobsahoval cizorodé látky, které by mohly ovlivňovat experiment. Volíme takovou půdu, na které alespoň pět let neprobíhala zemědělská činnost s využitím POR a pro kterou je záruka, že nebyla v minulosti kontaminovaná jinými polutanty.

Pozn. Pokud bychom porovnávali vliv zeminy kontaminované POR na *F. candida* nebo jiný půdní organismus, odebereme zeminu z příslušné lokality a při porovnávání využijeme kontrolní zeminu bez obsahu pesticidů.

- Vzorek zeminy je vhodné ověřit na obsah pesticidů a případných relevantních metabolitů pomocí multiresiduální analýzy na pesticidy.
- Půdu kátrujeme, tj. prosíváme přes velké kovové síto (obr. S1). Doporučení je kátrovat půdu několikrát. V prvním kroku můžeme použít síto s většími oky a pak přejít na menší.
- Půdu umístíme do velkoobjemového kontejneru a necháme přirozeně vyschnout.
- V suché půdě se provede hodnocení kvality (zejména: pH H₂O; pH KCl; uhličitany; sorpční vlastnosti a výměnné kationty; Cox – obsah humusu; Ntot – celkový obsah dusíku; stanovení přístupných živin: Ca, Mg, K, P, Cu, Fe, Mn, Zn; zrnitost půdy), čímž získáme informace o charakteristikách půdy.

Pozn. Charakteristiku půdy je důležité archivovat pro interpretaci výsledků a jejich budoucí srovnání. Pokud ta samá nebo i jiná laboratoř použije půdu s výrazně odlišnými charakteristikami a případně z jiné lokality, je možné, že výsledky budou signifikantně odlišné.

7.2.3. Experimentální nádoby, stojany a klimaboxy

- Experimenty se zakládají ve skleněných kádinkách o objemu 100 ml.
- Kádinky jsou umístěny do experimentálního stojanu (obr. S2). Ten slouží jednak jako stojan při zakládání experimentu, ale také pomáhá při celkové organizaci experimentu. Použití stojanu usnadňuje orientaci ve vzorcích, eliminuje rozsypaní při manipulaci. Stojan je konstruován tak, aby byly experimentální nádoby (kádinky) od sebe s dostatečným odstupem, aby byla zajištěna plynulá cirkulace vzduchu, která udržuje teplotu.



- Kádinky, ve kterých je zemina a experimentální živočichové, jsou přikryty alobalem, aby bylo eliminováno odpařování a křížová kontaminace (obr. S3).
- Pro kultivaci se použijí klimaboxy s nucenou cirkulací a s precizně mikroprocesorem řízenou kontrolou teploty (obr. S4). Klimabox by měl být dostatečně velký, aby se do něj vešel celý experiment založený v kádinkách umístěných ve stojanech. Použijeme klimabox s přesností řízení vnitřní teploty alespoň $\pm 0,2$ °C a homogenitou $\pm 0,8$ °C. Důležitou součástí klimaboxu je také alarm, který upozorní (a zaznamená) na neočekávané výkyvy teplot, které by mohly ovlivnit výsledky experimentu.

Pozn. Pro živočichy, kteří žijí v zemině a nevyhledávají světlo, není potřeba osvětlení, osvětlení dokonce ani není vhodné.

7.3. Provedení experimentu

Provedení experimentu se řídí obecným principem, který je uveden níže a je přehledně znázorněn na obr. 1 (viz kapitolu 7.4). Experiment je možné dle potřeby a cíle zkoušky modifikovat, ať už se jedná o druh/kmen živočicha nebo podmínky.

7.3.1. Návrh expozice testovanému POR a účinné látce

- Před návrhem designu experimentu posoudíme relevantnost testovaného pesticidu a modelového půdního organismu.
- Pokud se nejedná o zcela nový pesticid (dosud neregistrovaný), provedeme rešerši, při které se zaměříme na existenci publikací, v nichž byla hodnocena rizika relevantních POR a v něm obsažených účinných látek na necílové organismy.

Pozn. Neomezujeme se pouze na půdní „bezobratlé“ živočichy, i když je metodika zaměřena právě na ně.

- Zjistíme informace o konkrétním POR a účinné látce.

Pozn. Pokud se zaměřujeme na konkrétní účinnou látku, prověříme více POR, ve kterých je nebo byla používána. Je potřeba počítat s možností, že existuje více POR se stejnou účinnou látkou, přičemž doporučené dávkování je obvykle odlišné. Při použití různých POR tak může docházet k různé expozici danou účinnou látkou.



- Na základě doporučeného dávkování POR (uvedeno na etiketě a v příbalovém letáku) odvodíme maximální realistickou dávku POR resp. účinné látky na plochu experimentální nádoby, který odpovídá vnitřnímu průměru kádinky (viz kapitolu 7.2.3). Při kalkulaci maximální expoziční dávky počítáme s případem, že by byla provedena aplikace POR přímo na zeminu. V experimentu pak použijeme pro dávkování tuto hodnotu a případně nižší hodnoty, zejména pokud využijeme ředící řady.

7.3.2. Aplikace POR nebo účinné látky do půdy

- Před aplikací POR nebo účinné látky do půdy ověříme zbytkovou vlhkost modelové půdy. Do flakonů odvážíme v opakovaných půdu, kterou pak lyofilizujeme. Rozdíl hmotností před a po lyofilizaci indikuje zbytkovou vlhkost, kterou zahrneme do kalkulací.

Pozn. Suchá půda mívá zbytkovou vlhkost obvykle v řádu jednotek procent. I tato korekce je důležitá pro přesnost a eliminaci odchylek.

- Podle navrženého experimentálního designu označíme kádinky a také alobal, kterým budou kádinky přikryty.

- Kádinky umístíme do stojanu.

- Do kádinek navážíme přesně kalkulovanou suchou půdu se zahrnutím korekce zbytkové vlhkosti stanovené lyofilizací.

Pozn. Kdybychom použili lyofilizovanou půdu, nebyla by potřeba započítat korekci zbytkové vlhkosti.

- Připravíme zásobní roztok pesticidu. Při přípravě použijeme deionizovanou (nano) vodu.

- Zásobní roztok pesticidu naředíme tak, abychom po aplikaci do půdy docílili přesně 50% (případně jiné zvolené) vlhkosti.

- Do půdy aplikujeme objem přesně kalkulovaného vodního roztoku s pesticidem. V kontrolních expozičních aplikujeme pouze deionizovanou (nano) vodu opět na konečnou vlhkost 50 %.

Pozn. Při přípravě roztoku aplikovaného do půdy se pokud možno vyhneme použití organických rozpouštědel. Pokud pracujeme s účinnou látkou, volíme přednostně analytické standardy v pevném stavu. Ověříme rozpustnost látky ve vodě, zejména vzhledem k objemu zásobního roztoku pro plánovaný experiment. Látku rozpouštíme za



kontinuálního míchání v temnu. Doporučení je rozpouštět za stálého mírného míchání přes noc, den před aplikací do půdy.

- Kádinky s připravenou půdou pro experimenty s živočichy umístíme do klimaboxu. Experiment zahájíme o 24 h později přidáním živočichů do kádinek.

7.3.3. Začátek expozice – umístění živočichů do kádinek

- Na navlhčenou půdu v kádinkách umístíme dospělé chvostoskoky stejné velikosti.
- Chvostoskoky vybíráme štětečkem. Vybírání chvostoskoků si usnadníme přemístěním většího počtu z chovu na vodní hladinu se studenou vodou (4 °C).
- Do každé kádinky umístíme 10 jedinců. Typicky zakládáme 10 opakování pro každou variantu, nejméně 8.
- Kádinky překryjeme připraveným výstrižkem označeného alobalu a založený experiment ve stojanu umístíme do klimaboxu.
- Průběh experimentu kontrolujeme vizuálně alespoň 1x týdně. Při kontrole na krátkou dobu odklopíme alobal, čímž se kádinky zároveň provzdušní.

7.3.4. Ukončení experimentu

- Experiment standardně ukončujeme po 28 dnech od jeho zahájení.

Pozn. Protože provádíme pravidelnou kontrolu průběhu experimentu, můžeme vysledovat, že dochází ke zvýšené mortalitě již dříve, než po 28 dnech. Na základě průběžného sledování se tedy můžeme rozhodnout ukončit pokus dříve, např. po 14 dnech.

- Po čtyřech týdnech (28 dnech) od vložení chvostoskoků do zkušební a kontrolní půdy určíme počet přítomných přeživších jedinců. Do kádinky se přidá voda, čímž dojde k vyplavení jedinců na hladinu. Experimentální kádinku můžeme umístit do větší kádinky nebo jiné nádoby a pak chvostoskoky vyplavíme a počítáme je na hladině. Zaznameneáme počet přeživších dospělých chvostoskoků. Sledujeme případný výskyt nových jedinců (juvenilů) a pozorování zaznameneáme.



7.3.5. Opakování experimentu pro průkaz opakovatelnosti

- Experiment opakujeme v nezávislých opakováních a ve stejném experimentálním designu alespoň třikrát. Opakováními v čase získáme informace o opakovatelnosti zkoušky a také vliv ročního období na výsledek.

Pozn. Dle našich zjištění se přežívání chvostoskoků při zachování stejných podmínek a dávek liší v průběhu roku, přičemž ze statistického hlediska jsou proporce mortality vůči kontrolám odpovídající [19, 20].

7.3.6. Statistické vyhodnocení biotestu

- Výsledek vyhodnotíme statisticky. Jako základní parametr pro signifikantní výsledky volíme hladinu významnosti $\alpha = 0,05$ ($p \leq 0,05$).
- Při statistickém vyhodnocení porovnáváme různé expoziční varianty oproti kontrole a mezi sebou pomocí analýzy rozptylu (ANOVA).
- Pro komplexnější statistické vyhodnocení dat použijeme bayesiánskou metodu [21–24] relativní pravděpodobnosti. Při hodnocení zvažujeme nejen různé testované expoziční varianty, ale také faktor času, protože experiment opakujeme alespoň třikrát v čase.

7.3.7. Zařazení OMICs analýzy do hodnocení rizik

- Na základě výsledků biotestů se rozhodneme pro zařazení studia mechanismu vlivu dané expozice na necílového živočicha.
- OMICs přístup aplikujeme v případech, ve kterých je k tomu pádný důvod. Pokud by byla mortalita jedinců po 28denní expozici velká (např. větší než 30–50 %), má větší smysl provést studium mechanismu po kratším expozičním čase, např. 14 dní, kdy nemusí být ještě patrný signifikantní rozdíl expozičních dávek oproti kontrole.
- Pro OMICs analýzu použijeme jedince sbírané při ukončování experimentu z kádinek. Můžeme použít jedince *F. candida* přímo z biologických testů. Případně na základě výsledků biotestů



provedeme experiment znovu se záměrem přípravy biologického materiálu pro analýzy. Zároveň však získáme další výsledky z opakování biotestu. Vzorčky chvostoskoků sbíráme po jejich vyplavení na vodní hladinu a tyto jedince přeneseme na hladinu čisté vody, čímž se opláchnou. Poté je zamrazíme na suchém ledu a do použití materiál skladujeme v hluboko mrazicím boxu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

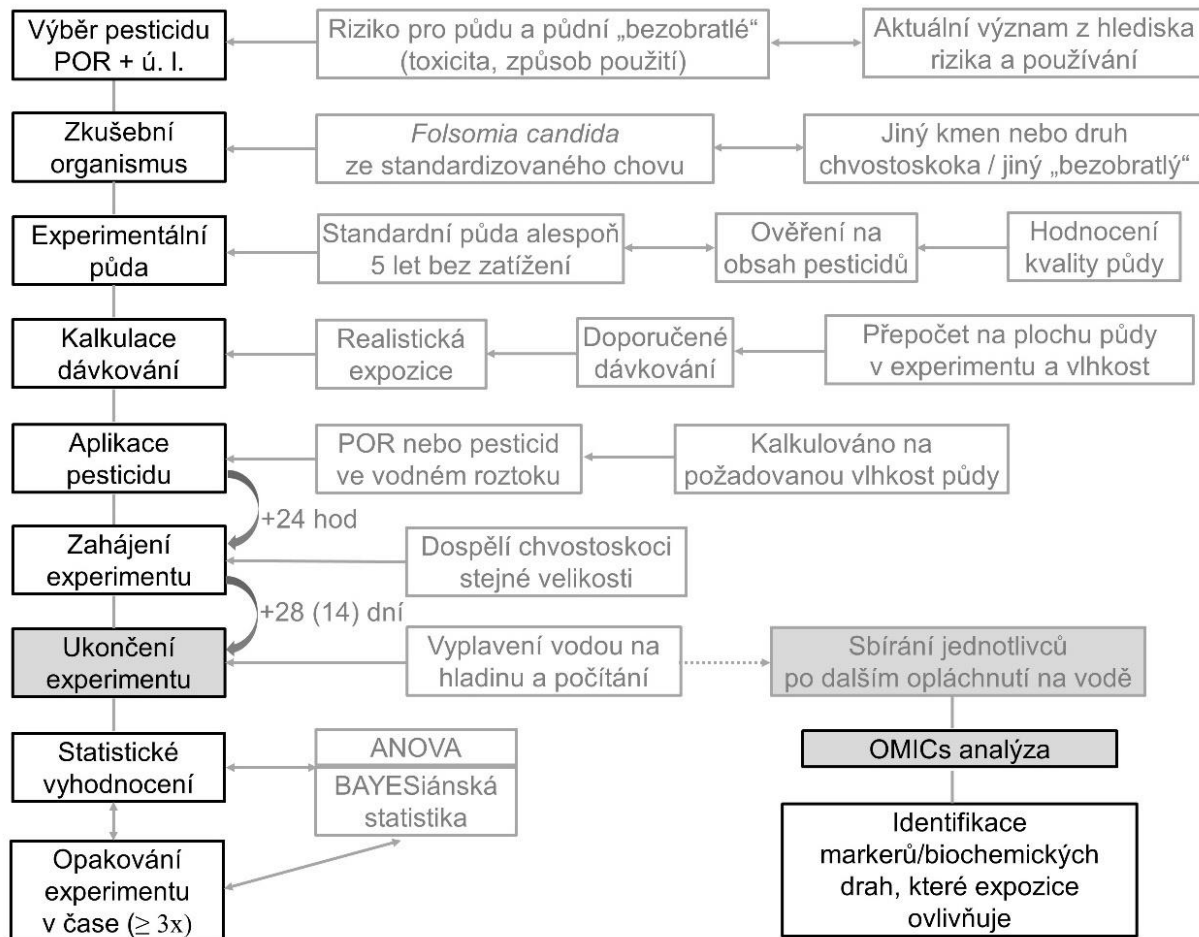
Pozn. Při sběru vzorků eliminujeme fluktuace teplot mimo experimentální teplotu. „Oplachovací“ voda je tedy temperovaná na experimentální teplotu, která byla nastavena v klimaboxech.

- Experimentální design můžeme pro OMICs analýzy modifikovat a provést expozici *F. candida* také na vodě. V tomto případě provedeme kratší, např. třídní expozici, přičemž dávku pesticidu kalkulujeme na koncentraci vody.

Pozn. Při sběru vzorků eliminujeme fluktuace teplot mimo experimentální teplotu. „Oplachovací“ voda je tedy temperovaná na experimentální teplotu, která byla nastavena v klimaboxech.

7.4. Schématické znázornění metodického postupu

Obrázek 1. Zjednodušené schématické znázornění metodického postupu.





8. Příklady provedení metodiky

8.1. Vliv POR (Biscaya 240 OD, Tilmor, Atonik) a jejich mixu

Cíl zkoušky: Cílem bylo zjistit vliv insekticidního přípravku Biscaya 240 OD, fungicidního přípravku Tilmor, růstového regulátoru Atonik a tank-mixu těchto tří přípravků na úmrtnost chvostoskoků v půdním prostředí.

Materiál:

- POR pro profesionální použití:
Biscaya 240 OD (účinná látka: thiakloprid; výrobce: Bayer CropScience)
Tilmor (účinné látky: tebukonazol a prothiokonazol; výrobce: Bayer CropScience)
Atonik (účinné látky: natrium-5-nitroguajakolát, natrium-2-nitrofenolát a natrium-4-nitrofenolát; výrobce: Asahi Chemical Co. Ltd.)
- Standardní skleněné kádinky 100 ml.
- Půda ze starého sadu ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v. v. i., v Praze 6 – Ruzyni (VÚRV). Ve „starém sadu“ se dlouhodobě nepoužívají pesticidy. Modelová půda byla charakterizovaná formou služby ve Výzkumném ústavu meliorací a ochrany půdy, v. v. i. (VÚMOP) (tabulka S1). Pro zjištění kvality byly odebrány čtyři reprezentativní vzorky. Protože jeden výsledek ze čtyř opakování vykazoval výrazně odlehlou hodnotu pro obsah humusu, byl vyřazen z prezentace. Půda byla testovaná na rezidua pesticidů pomocí LC-MS/MS, čímž byl ověřen minimální vliv kontaminace jinými pesticidy.
- Chvostoskoci *Folsomia candida* ze standardizovaného chovu. Tato populace *F. candida* byla získána v roce 2016 z Českých Budějovic od RNDr. Vladimíra Šustru, CSc., a od té doby je součástí chovů v týmu Biologicky aktivní látky v ochraně plodin ve VÚRV. Populace je dlouhodobě udržovaná v klimaboxu při 18 °C a v temnu. Je chována v plastových nádobách na černém dřevěném uhlí a vodě (obr. S5). Jako potrava se používají sušené kvasnice, které se přidávají podle potřeby, většinou jednou týdně. Stav chovů je každý týden kontrolován a v případě potřeby obnovován přemístěním zvířat do čistého prostředí chovných boxů.
- Klimabox ST 1200 COMF (Pol-Eko Aparatura, Wodzisław Śląski, Polsko).



- Pipety (100 μ l, 1 ml, 10 ml), špičky.
- Analytická váha (Kern & Sohn, Balingen, Německo).
- Nano (deionizovaná) voda (Barnstead, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).
- Statistický software.

Postup:

Do každé kádinky byla navážena suchá půda, jejíž navážka se zbytkovou vlhkostí odpovídala 20,6 g. Při kalkulacích je počítáno s plochou v kádinkách 19,6 cm². Při navážce byla korigována vlhkost v půdě, která byla stanovena lyofilizací půdy použité v experimentu. Zásobní roztoky POR byly připraveny rozpuštěním 250 μ l přípravku Biscaya v 0,5 l nano H₂O, 1,25 ml přípravku Tilmor v 0,5 l nano H₂O a 1 ml přípravku Atonik v 0,5 l nano H₂O důkladným promícháním. Tank-mix těchto přípravků vznikl napipetováním předchozího množství přípravků a následným důkladným mícháním. Tímto způsobem byly připraveny čtyři zásobní roztoky (přesněji emulze/suspenze) POR, které byly následně použity v aplikaci na půdu do kádinek. Zásobní roztoky byly dále před aplikací ředěny dle kalkulace. Dávka jednotlivých POR ze zásobních roztoků na kádinku byla následující: i) 79,2 μ l připraveného zásobního roztoku Biscaya OD 240; 52,8 μ l připraveného zásobního roztoku přípravku Tilmor; iii) 39,6 μ l připraveného zásobního roztoku Atonik; iv) tank-mix s celkovým objemem 171,6 μ l (součet objemů i+ii+iii) připraveného zásobního roztoku. Do kádinek byly aplikovány POR a jejich tank-mix zředěné v H₂O, aby bylo docíleno výsledné 50% vlhkosti.

Po 24 h bylo do každé z kádinek pomocí štětečku přeneseno deset dospělých chvostoskoků druhu *F. candida* stejné velikosti. Kádinky byly přikryty alobalem a umístěny do klimaboxu s přednastavenou konstantní teplotou 18 °C a bez přístupu světla. Po 28 dnech od aplikace chvostoskoků byli po vyplavení vodou na hladinu spočítáni živí jedinci.

Celý experiment byl opakován třikrát v čase, v různých měsících. V tomto případě se jednalo o červenec, srpen a září.

Byly spočítány průměry a směrodatné odchylky. Data byla hodnocena statistickými nástroji (ANOVA a bayesiánská statistika).

**Výsledky:**

Tabulka č. 1: Výsledky experimentu provedeného v červnu. Počet živých chvostoskoků 28 dní po aplikaci přípravků Biscaya 240 OD, Tilmor, Atonik a jejich tank-mixu do půdy.

Kádinka	Počet před pokusem	Kontrola	Biscaya	Tilmor	Atonik	Mix
1	10	7	2	3	3	2
2	10	4	3	1	6	2
3	10	5	1	0	7	2
4	10	4	1	1	2	3
5	10	6	1	4	3	0
6	10	4	1	5	4	2
7	10	8	2	4	6	3
8	10	6	4	3	5	3
9	10	5	6	4	6	1
10	10	-	4	5	5	1
Průměr	10	5,4	2,5	3,0	4,7	1,9

-*každá aplikace měla 10 opakování, pouze v případě kontroly bylo zakládáno 9 opakování.

Tabulka č. 2: Výsledky experimentu provedeného v srpnu. Počet živých chvostoskoků 28 dní po aplikaci přípravků Biscaya 240 OD, Tilmor, Atonik a jejich tank-mixu do půdy.

Kádinka	Počet před pokusem	Kontrola	Biscaya	Tilmor	Atonik	Mix
1	10	6	6	8	4	3
2	10	9	4	2	4	3
3	10	5	4	1	2	6
4	10	7	6	3	1	4
5	10	6	2	5	5	3
6	10	5	6	5	2	4
7	10	6	7	5	2	6
8	10	7	5	2	7	4
9	10	5	5	9	4	3
10	10	-	8	5	4	3
Průměr	10	6,2	5,3	4,5	3,4	3,6

-*každá aplikace měla 10 opakování, pouze v případě kontroly bylo zakládáno 9 opakování.



Tabulka č. 3: Výsledky experimentu provedeného v září. Počet živých chvostoskoků 28 dní po aplikaci přípravků Biscaya 240 OD, Tilmor, Atonik a jejich tank-mixu do půdy.

Kádinka	Počet před pokusem	Kontrola	Biscaya	Tilmor	Atonik	Mix
1	10	7	6	2	2	2
2	10	10	7	6	7	6
3	10	8	6	4	5	2
4	10	7	7	6	7	3
5	10	8	2	6	6	5
6	10	9	5	3	9	0
7	10	10	3	1	5	1
8	10	10	2	3	8	3
9	10	5	3	6	3	2
10	10	-*	5	5	2	4
Průměr	10	8,2	4,6	4,2	5,8	2,0

-*každá aplikace měla 10 opakování, pouze v případě kontroly bylo zakládáno 9 opakování.

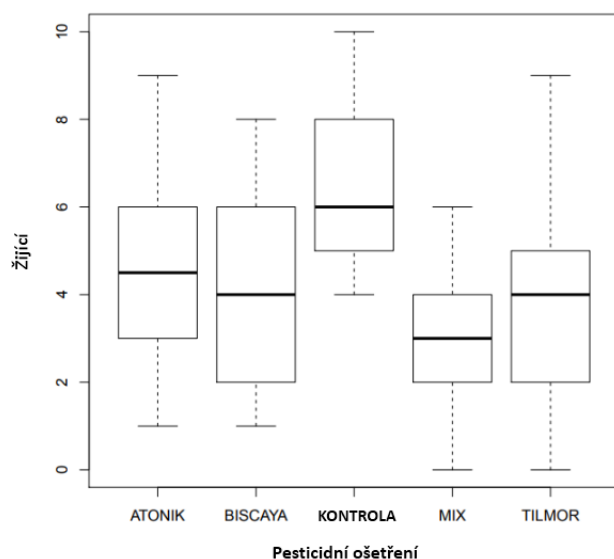
Tabulka č. 4: Statistické vyhodnocení pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) pro zjištění vlivu jednotlivých POR a jejich tank-mixu (Biscaya 240 OD, Tilmor, Atonik) na přežívání chvostoskoků v půdě po 28denní expozici. Hodnoceny byly také rozdíly v opakováních v čase (červenec, srpen, září).

	F hodnota	p
Ošetření	16,922	3,19 10⁻¹¹
Datum	9,751	1,12 10⁻⁴
Ošetření/datum	2,706	8,63 10⁻³

Hladina významnosti $\alpha = 0,05$; signifikantní hodnoty zvýrazněné tučně.



Graf č. 1: Boxplot znázorňující vliv jednotlivých POR (Biscaya 240 OD, Tilmor, Atonik) a jejich tank-mixu na přežívání *F.candida* (zahrnuta byla data ze všech tří opakování experimentu v čase).



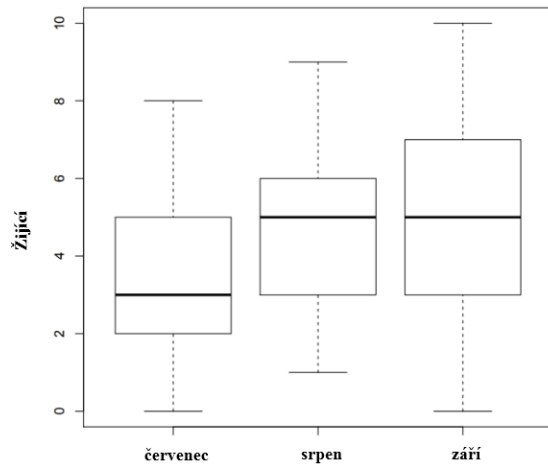
Tabulka č. 5: Statistické porovnání vlivu jednotlivých expozicí pesticidy (Biscaya 240 OD, Tilmor, Atonik a jejich mix) a kontroly mezi sebou po 28denním biotestu (zahrnuta byla data ze všech tří opakování experimentu v čase).

Dvojice expozicí	p adj
Biscaya-Atonik	0,9338502
Kontrola-Atonik	0,0008913
Mix-Atonik	0,0111985
Tilmor-Atonik	0,7237925
Kontrola-Biscaya	0,0000415
Mix-Biscaya	0,0977353
Tilmor-Biscaya	0,9907412
Mix-Kontrola	0,0000000
Tilmor-Kontrola	0,0000058
Tilmor-Mix	0,2549670

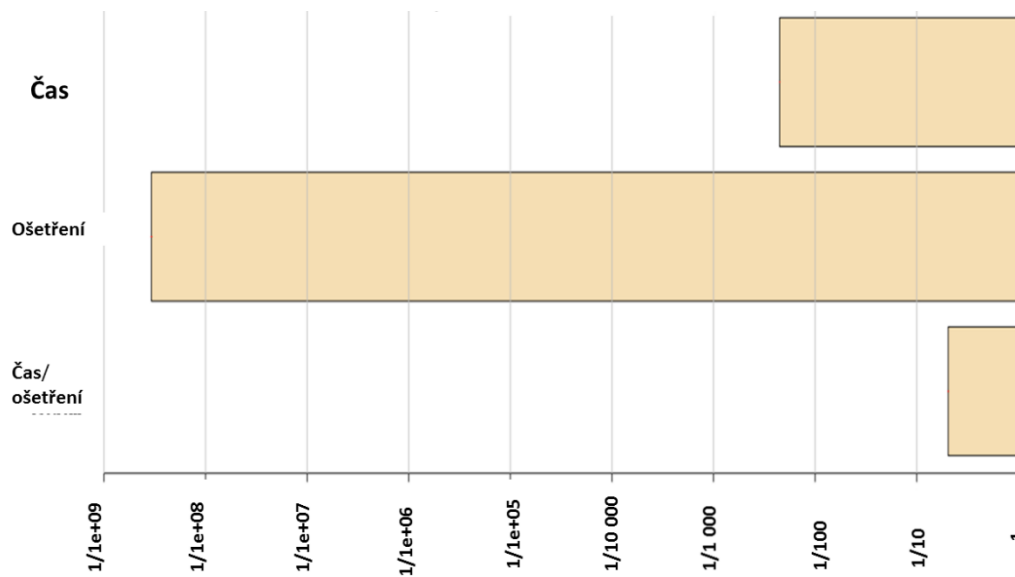
Hladina významnosti $\alpha = 0,05$; Data vyhodnocena pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA); signifikantní hodnoty zvýrazněné tučně.



Graf č. 2: Boxplot – průměrný vliv pesticidů v čase (zahrnuta byla data ze všech tří opakování experimentu v čase).



Graf č. 3: Bayesiánská analýza relativní pravděpodobnosti vlivu ošetření v čase (zahrnuta byla data ze všech tří opakování experimentu v čase).





Závěr:

Tabulky č. 1, 2 a 3 znázorňují počty přeživších chvostoskoků v jednotlivých opakováních experimentu v čase. Podle statistického vyhodnocení dat (viz tabulku č. 4) pomocí dvoufaktorové ANOVA lze vyvodit, že aplikace jednotlivých POR, ale také jejich mixu po 28denní expozici má signifikantní vliv ($p \leq 0,05$) na úmrtnost chvostoskoků ve srovnání s kontrolou. Statistické vyhodnocení navíc indikuje, že opakování v čase má signifikantní vliv na výsledek biotestu.

Z grafu č. 1 vyplývá, že nejvíce chvostoskoků bylo nalezeno v kontrole. Toto grafické znázornění indikuje, že všechny expozice POR měly vliv na přežívání chvostoskoků, přičemž největší úmrtnost *F. candida* byla při použití pesticidů v tank-mixu. Klíčové je však statistické vyhodnocení dat jednofaktorové ANOVA, které ukazuje tabulka č. 5. Podle tohoto vyhodnocení byl signifikantní efekt pozorován pro všechny varianty POR ve srovnání s kontrolou. Navíc byl vyhodnocen jako signifikantní rozdíl mezi tank-mixem a Atonikem. Porovnání ostatních dvojic POR expozic mezi sebou nebyly signifikantní. Atonik vykazoval oproti ostatním POR expozicím nejmenší negativní vliv na přežívání chvostoskoků, ačkoliv byl indikován statisticky signifikantní rozdíl oproti kontrole.

Boxplot vizualizace v grafu č. 2 indikuje rozdíly ve výsledcích biotestů provedených v různých časech. Tento rozdíl indikuje také vyhodnocení pomocí dvoufaktorové ANOVA v tabulce č. 4.

Zásadní obraz o vlivu typu expozice POR a jednotlivých opakování v čase ukazuje výsledek bayesiánské analýzy relativní pravděpodobnosti. Výsledek analýzy znázorněný v grafu č. 3 jednoznačně ukazuje, že největší vliv na výsledek biotestu měl typ ošetření, tedy použití POR. Nelze opomenout, že značný i menší význam měl však také čas, tedy jednotlivá opakování experimentu. Expozice POR v různých časech (opakováních biotestů) je však ovlivněna relativně málo, zejména ve srovnání s ošetřením. To znamená, že poměr jednotlivých expozičních variant mezi jednotlivými biotesty provedenými v různých časech je statisticky relativně stálý.



8.2. Hodnocení vlivu acetamipridu na *F. candida* s využitím OMICs

8.2.1 Primární zjištění negativního vlivu acetamipridu při porovnání se sulfoxaflorem

Cíl zkoušky: Cílem bylo zjistit vliv účinných látek vybraných pesticidů, které jsou aktuálně významné z praktického hlediska. Jednalo se o acetamiprid a sulfoxaflor. Acetamiprid je posledním neonikotinoidem bez restrikcí v zemích EU. Acetamiprid má platnou registraci do 27. února 2033 [14]. Sulfoxaflor je sulfoximinový insekticid, který je považován za alternativu k zakázaným neonikotinoidům v EU [25].

Materiál:

- Analytické standardy:
Acetamiprid – (33674, CAS: 160430-64-8, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Sulfoxaflor – (DRE-C17015000, CAS: 946578-00-3, LGC Labor GmbH, Augsburg, Německo
- *Ostatní materiál byl stejný, jako je uvedeno v kapitole 8.1.*

Postup:

Postup byl obdobný, jako je uvedeno v kapitole 8.1. Rozdíl však činily aplikované látky. Ve srovnávacím biotestu byly totiž použity účinné látky v čistotě analytických standardů.

Aplikační dávky sulfoxafloru a acetamipridu byly odvozeny od POR, ve kterých jsou jako účinné látky. V případě sulfoxafloru byla aplikační dávka odvozována zejména od přípravku TRANSFORM (účinná látka 500g/kg; použití 0,048 kg/ha), zatímco v případě acetamipridu byla aplikační dávka odvozena zejména od přípravku APIS (ú. l. 200 g/l; použití 0,25 l/ha).

**Výsledky:**

Tabulka č. 6: Počet živých chvostoskoků po aplikaci účinných látek acetamipridu a sulfoxafloru.

První opakování.

Kádinka	Počet před pokusem	Kontrola	Acetamiprid	Sulfoxaflor
1	10	6	2	9
2	10	2	0	5
3	10	6	1	5
4	10	4	2	3
5	10	4	1	4
6	10	4	3	9
7	10	7	0	2
8	10	3	1	7
Průměr	10	4,5	1,3	5,5

Tabulka č. 7: Počet živých chvostoskoků po aplikaci účinných látek acetamipridu a sulfoxafloru.

Druhé opakování.

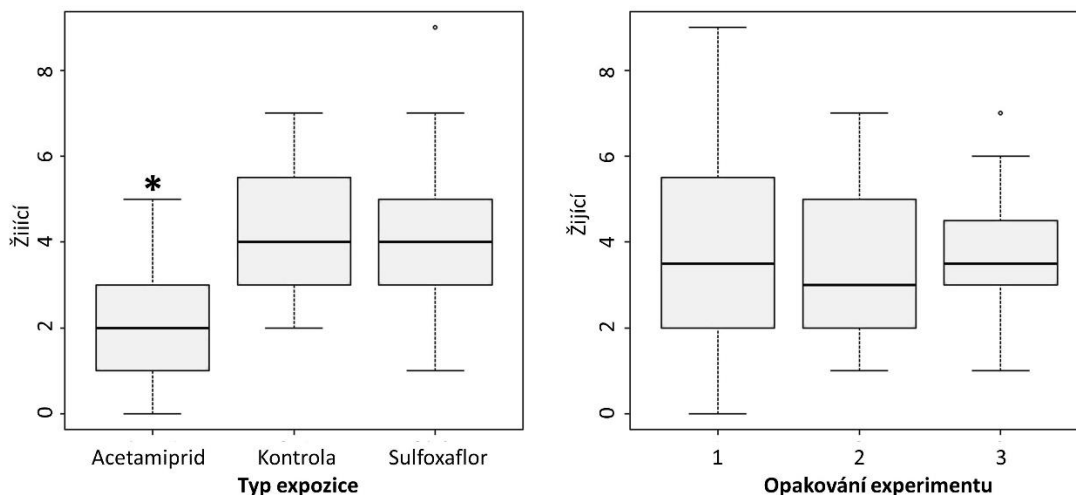
Kádinka	Počet před pokusem	Kontrola	Acetamiprid	Sulfoxaflor
1	10	3	2	3
2	10	6	1	2
3	10	4	2	3
4	10	5	4	5
5	10	3	1	1
6	10	5	3	4
7	10	4	1	7
8	10	5	1	5
Průměr	10	4,4	1,9	3,8



Tabulka č. 8: Počet živých chvostoskoků po aplikaci účinných látek acetamipridu a sulfoxafloru. Třetí opakování.

Kádinka	Počet před pokusem	Kontrola	Acetamiprid	Sulfoxaflor
1	10	4	3	5
2	10	2	3	3
3	10	6	3	5
4	10	4	1	3
5	10	2	2	3
6	10	3	5	4
7	10	4	1	4
8	10	7	4	6
Průměr	10	4,0	2,8	4,1

Graf č. 4: Boxploty znázorňující průměrný vliv acetamipridu a sulfoxafloru na přežívání *F. candida* v čase (zahrnuta byla tři různá opakování v čase) a efekt opakování experimentu v čase.



* indikuje signifikantní rozdíl $p < 0,05$; vyhodnocení byla provedena jednocestnou ANOVA, Tukeyho test

Tabulka č. 9: Statistické vyhodnocení pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) vlivu účinných látek na přežívání chvostoskoků v půdě po 28denní expozici. Hodnoceny byly také rozdíly v opakováních v čase.

	F hodnota	p
Pesticid	18,221	5,7 10⁻⁷
Datum	0,426	0,6547
Pesticid/datum	2,094	0,0921

Hladina významnosti $\alpha = 0,05$; signifikantní hodnoty zvýrazněné tučně.



Tabulka č. 10: Statistické porovnání vlivu jednotlivých dvojic expozičních mezi sebou po 28denním biotestu (zahrnuta byla data ze všech tří opakování experimentu v čase).

Dvojice expozičních	p adj
Kontrola-Acetamiprid	0,0000164
Sulfoxaflor-Acetamiprid	0,0000043
Sulfoxaflor-Kontrola	0,9341341

Hladina významnosti $\alpha = 0,05$; Data vyhodnocena pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA); signifikantní hodnoty jsou zvýrazněné tučně.

Závěr:

Tabulky č. 6, 7 a 8 znázorňují počty přeživších chvostoskoků v jednotlivých experimentech a jejich opakováních v čase. Podle statistického vyhodnocení dat (viz tabulku č. 9) pomocí dvoufaktorové ANOVA lze vyvodit, že expozice chvostoskoků pesticidu po 28denní expozici má signifikantní vliv ($p \leq 0,05$) na úmrtnost chvostoskoků ve srovnání s kontrolou. Statistické vyhodnocení však indikuje, že v tomto případě opakování experimentu v čase nemá signifikantní vliv na výsledek biotestu.

Z boxplotu v grafu č. 4 vyplývá, že nejvíce chvostoskoků bylo nalezeno v kontrole a podobný výsledek byl v případě sulfoxafloru. Nejmenší počet přeživších chvostoskoků byl na konci biotestu po 28denní expozici byl v případě acetamipridu. Ze statistického vyhodnocení v tabulce 10 jasně vyplývá, že acetamiprid měl signifikantní vliv na přežívání *F. candida*, a to ve srovnání s kontrolou a také sulfoxaflorem. Porovnání výsledků pro acetamiprid a sulfoxaflor bylo ze statistického hlediska podobné a nesignifikantní.

Vzhledem k výsledkům těchto experimentů má smysl se dále zabývat vlivem acetamipridu na *F. candida*. Je totiž zjevné, že expozice acetamipridu v půdě má subletální efekt na přežívání *F. candida*. Sulfoxaflor se na základě výsledků jeví jako málo rizikový pro *F. candida*.



8.2.2 Potvrzení negativního vlivu acetamipridu na *F. candida* s využitím OMICs

Cíl zkoušky: Na základě zjištění, že acetamiprid v realistické dávce ovlivňuje přežívání chvostoskoků (viz kapitolu 8.2.1), jsme přistoupili k důkladnému prověření tohoto efektu. Vliv acetamipridu byl v prvotním testu výrazně signifikantní. Proto jsme navrhli design, který zahrnoval provedení více opakování. Pro každou expozici bylo založeno 12 kádinek a navíc jsme kromě 28denní expozice zvolili i kratší 14denní expozici. Cílem bylo ještě důkladnějším biotestem potvrdit výsledky prvotní zkoušky a navíc zjistit, zda je negativní efekt acetamipridu pozorovatelný při poloviční délce standardní expozice. Cílem bylo provést také ověření mechanismu vlivu acetamipridu na *F. candida*, přičemž vzorky byly konkretizovány na základě výsledků rozšířených ověřovacích biotestů.

Postup:

Postup byl v podstatě obdobný, jako je uvedeno v kapitole 8.2.1.

Byl však použit pouze analytický standard acetamipridu a kromě 28denní expozice byla provedena i kratší 14denní expozice. Navíc bylo provedeno 12 opakování v rámci každé expozice, což při třech opakováních v čase dává celkem 36 biologických opakování (expozic v kádinkách).

Vzorky chvostoskoků byly také použity na analýzu OMICs přístupem, kterou představovala vysokokapacitní label-free proteomika. Ta byla provedena dle dříve publikovaných postupů na jiných „bezobratlých“ (viz např. [26–29]). Vzorky byly analyzovány v jedné řadě na instrumentaci nanoLC-MS/MS (Orbitrap Fusion, Thermo, Waltham, MA, USA) v centru BIOCEV. Celkem bylo analyzováno 24 vzorků v experimentálním designu 4x6 (4 expozice a každá ve 6 opakováních).

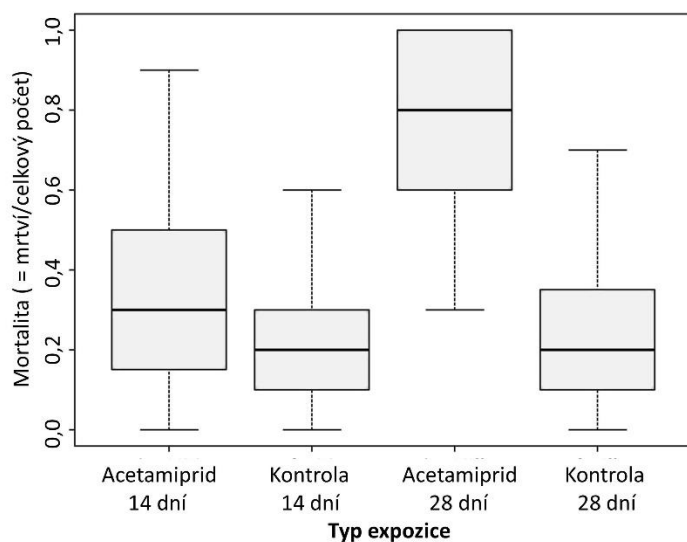
Pozn. *Je samozřejmě možné využít jiných protokolů, případně jiného OMICs přístupu než proteomiky. Nabízí se zejména transkriptomika.*



Výsledky biotestů:

Hrubá data z biotestů pro jejich velký rozsah v tomto případě neuvádíme. (Pozn. hrubá data jsou uvedena z demonstračních důvodů pro předchozí uvedené příklady provedení - viz kapitoly 8.1 a 8.2.1.)

Graf č. 5: Boxplot – průměrný vliv acetamipridu na mortalitu (= mrtví/celkový počet) *F. candida*. V porovnání jsou 14 a 28denní expozice. (Byla zahrnuta všechna tři opakování v čase, přičemž každá expozice v jednom čase zahrnovala 12 opakování v kádinkách.)



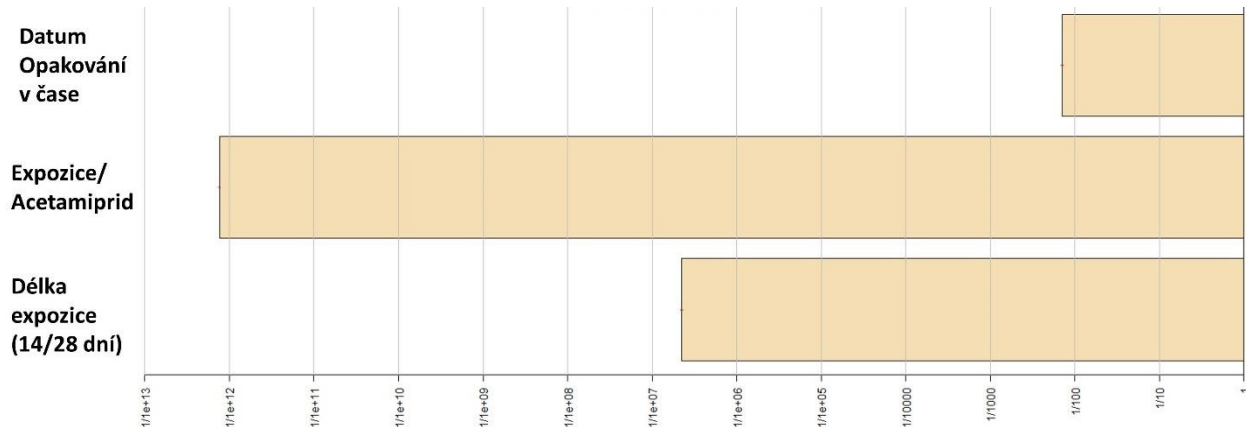
Tabulka č. 11: Statistické vyhodnocení pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) vlivu acetamipridu na přežívání chvostokoků v půdě po 14 a 28denní expozici.

	F hodnota	p
Acetamiprid	88,47	$< 2 \cdot 10^{-16}$
Délka expozice	46,59	$2,4 \cdot 10^{-10}$
Acetamiprid/doba expozice	38,97	$4,81 \cdot 10^{-9}$

Hladina významnosti $\alpha = 0,05$; signifikantní hodnoty zvýrazněné tučně.



Graf č. 6: Bayesiánská analýza relativní pravděpodobnosti vlivu acetamipridu, délky expozice (14/28 dní) a opakování v čase (zahrnuta byla data všechna za tři opakování experimentu v čase, tj. výsledky z 36 kádinek na expozici).



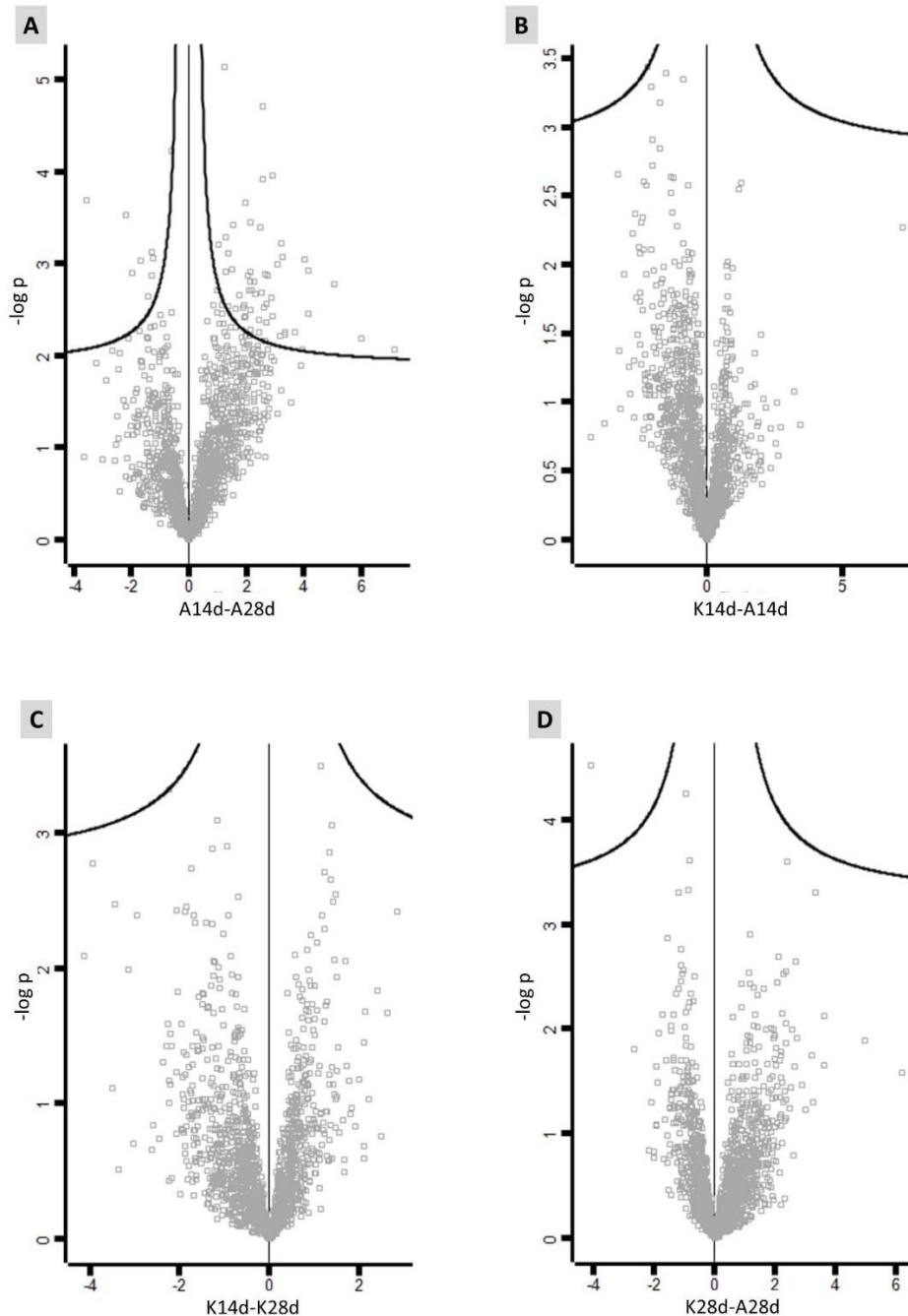
Výsledky vysokokapacitní proteomiky:

Proteomickou analýzou bylo celkově identifikováno a porovnáno 1810 proteinů.

Mezi proteiny přiřazenými *F. candida* byly navíc identifikovány proteiny z *Wolbachia*, intracelulárního symbionta tohoto chvostoskoka.



Graf č. 7: Vizualizace rozdílů v proteomu vzorků *F. candida* vystavených acetamipridu a mezi kontrolními vzorky pomocí volcano plotů (t-test, FDR = 0,05). Porovnány byly všechny čtyři testované varianty. Signifikantní rozdíly byly indikovány v grafu A (63 markerů) a D (1 marker).



Legenda: K14d – kontrola 14 dní; K28d – kontrola 28 dní; A14d – acetamiprid 14 dní; A28d – acetamiprid 28 dní.



Tabulka č. 12: Signifikantně rozdílné proteomické markery mezi A14d a A28d – viz graf č. 7A. Mezi 63 signifikantními proteinovými markery byly identifikovány 3 proteiny, které jsou přiřazeny endosymbiotické bakterii *Wolbachia* (zvýrazněné šedou výplní).

-log p	Rozdíl log ₂ LFQ	Fasta
4.22	-0.59	AAS66295.1 cytochrome c oxidase subunit II, partial (mitochondrion) [<i>Folsomia candida</i>]
3.11	1.39	ANA95851.1 outer surface protein, partial [<i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Folsomia candida</i>]
2.69	2.53	WP_110409605.1 hypothetical protein [<i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Folsomia candida</i>]
2.91	1.30	WP_110410547.1 insulinase family protein [<i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Folsomia candida</i>]
2.99	3.10	XP_021967184.1 UPF0187 protein sll1024 isoform X2 [<i>Folsomia candida</i>]
3.53	-2.20	OXA38899.1 Enolase [<i>Folsomia candida</i>]
2.07	7.17	XP_035714830.1 uncharacterized protein LOC118438503 [<i>Folsomia candida</i>]
3.68	-3.54	XP_021962890.1 alpha-aminoadipic semialdehyde synthase, mitochondrial [<i>Folsomia candida</i>]
2.43	2.92	OXA45701.1 hypothetical protein Fcan01_19792 [<i>Folsomia candida</i>]
3.20	1.03	XP_035712857.1 serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit 2 isoform X4 [<i>Folsomia candida</i>]
2.77	5.08	OXA46659.1 hypothetical protein Fcan01_18831 [<i>Folsomia candida</i>]
3.92	2.55	XP_021960117.1 uncharacterized protein LOC110855986 [<i>Folsomia candida</i>]
2.28	2.15	XP_021959144.1 alpha-galactosidase [<i>Folsomia candida</i>]
2.90	-1.99	XP_021958471.1 glucose-6-phosphate isomerase [<i>Folsomia candida</i>]
3.03	-1.67	XP_021956984.1 ras-related protein Rab-7a [<i>Folsomia candida</i>]
2.80	2.16	XP_021956746.1 T-complex protein 1 subunit epsilon [<i>Folsomia candida</i>]
2.56	2.72	XP_021955667.1 uncharacterized protein LOC110852019 [<i>Folsomia candida</i>]
2.71	2.09	OXA51551.1 hypothetical protein Fcan01_13192 [<i>Folsomia candida</i>]
2.87	2.73	XP_021955593.1 regucalcin [<i>Folsomia candida</i>]
2.94	1.49	OXA51777.1 hypothetical protein Fcan01_13306 [<i>Folsomia candida</i>]
2.25	3.34	OXA52072.1 Peptidoglycan-N-acetylglucosamine deacetylase [<i>Folsomia candida</i>]
2.21	3.18	XP_021956129.1 uncharacterized protein LOC110852377 [<i>Folsomia candida</i>]
2.51	1.63	XP_021953879.1 40S ribosomal protein S3a [<i>Folsomia candida</i>]
2.88	2.65	XP_035706923.1 talin-1 isoform X3 [<i>Folsomia candida</i>]
2.45	4.16	XP_021949134.1 putative ferric-chelate reductase 1 [<i>Folsomia candida</i>]
3.66	1.98	XP_021948951.1 40S ribosomal protein S25 [<i>Folsomia candida</i>]
2.50	2.15	XP_035704845.1 endo-beta-N-acetylglucosaminidase H-like [<i>Folsomia candida</i>]
2.93	4.18	XP_021949780.1 uncharacterized protein LOC110847201 [<i>Folsomia candida</i>]
3.42	1.53	XP_021947654.1 eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C [<i>Folsomia candida</i>]
2.16	2.66	XP_021949979.1 protein obstructor-E [<i>Folsomia candida</i>]
2.43	1.96	XP_021947055.1 enoyl-CoA delta isomerase 2 [<i>Folsomia candida</i>]
3.22	3.21	XP_021944849.1 bacillopeptidase F [<i>Folsomia candida</i>]
2.54	1.37	XP_021944445.1 methylglutaconyl-CoA hydratase, mitochondrial [<i>Folsomia candida</i>]
2.26	3.69	XP_021944324.1 putative pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase [<i>Folsomia candida</i>]
3.06	-1.22	XP_021944657.1 ras-related protein ORAB-1 [<i>Folsomia candida</i>]
2.25	2.45	XP_021945856.1 ecdysteroid-regulated 16 kDa protein [<i>Folsomia candida</i>]
2.39	2.46	XP_021946198.1 glycerol kinase isoform X2 [<i>Folsomia candida</i>]
3.13	-1.29	XP_021943818.1 ras-related protein Rab-2 [<i>Folsomia candida</i>]
2.88	2.07	XP_021943588.1 T-complex protein 1 subunit eta [<i>Folsomia candida</i>]
2.18	5.99	XP_021968731.1 bacillopeptidase F [<i>Folsomia candida</i>]
2.07	3.95	XP_021943356.1 bacillopeptidase F [<i>Folsomia candida</i>]
2.92	2.15	XP_021960631.1 carboxypeptidase A2 [<i>Folsomia candida</i>]
3.39	2.48	XP_021943214.1 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 [<i>Folsomia candida</i>]
5.14	1.23	XP_021956871.1 transcription factor BTF3 homolog 4 [<i>Folsomia candida</i>]
3.96	2.91	XP_021943596.1 endoribonuclease LACTB2 isoform X2 [<i>Folsomia candida</i>]



Tabulka č. 12: Signifikantně rozdílné proteomické markery mezi A14d a A28d – viz graf č. 7D.
(pokračování)

-log p	Rozdíl log ₂ LFQ	Fasta headers
2.81	2.27	XP_021944178.1 eukaryotic translation initiation factor 5 [<i>Folsomia candida</i>]
2.36	2.72	XP_021945337.1 endoglucanase-5 [<i>Folsomia candida</i>]
2.52	2.63	XP_021946257.1 ELKS/Rab6-interacting/CAST family member 1 [<i>Folsomia candida</i>]
2.42	1.94	XP_021946601.1 troponin T, skeletal muscle [<i>Folsomia candida</i>]
2.54	1.94	XP_021947276.1 adenosine kinase 2 [<i>Folsomia candida</i>]
4.72	2.58	XP_021947671.1 protein obstructor-E [<i>Folsomia candida</i>]
2.72	2.20	XP_021948670.1 subtilisin [<i>Folsomia candida</i>]
2.87	-1.28	XP_021949091.1 ADP-ribosylation factor 1 [<i>Folsomia candida</i>]
2.64	-1.41	XP_021951329.1 2-hydroxyacyl-CoA lyase 1 isoform X2 [<i>Folsomia candida</i>]
3.07	3.25	XP_021952859.1 uncharacterized protein LOC110849731 [<i>Folsomia candida</i>]
2.66	2.32	XP_021953864.1 fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2 [<i>Folsomia candida</i>]
2.52	1.89	XP_021954009.1 nucleoside diphosphate kinase [<i>Folsomia candida</i>]
2.23	3.33	XP_021958357.1 uncharacterized protein LOC110854247 isoform X1 [<i>Folsomia candida</i>]
3.45	2.13	XP_035714695.1 high mobility group protein 20A isoform X4 [<i>Folsomia candida</i>]
2.62	2.86	XP_021963230.1 mannosylglucosyl-3-phosphoglycerate phosphatase isoform X1 [<i>Folsomia candida</i>]
3.28	1.30	XP_021963640.1 S-methyl-5-thioadenosine phosphorylase [<i>Folsomia candida</i>]
3.05	4.02	XP_021966161.1 cytochrome c oxidase assembly factor 5 [<i>Folsomia candida</i>]
2.65	1.75	XP_035712144.1 microtubule-actin cross-linking factor 1 isoform X12 [<i>Folsomia candida</i>]

Tabulka č. 13: Signifikantně rozdílný proteomický marker mezi K28d a A28d – viz graf č. 7D.

-log p	Rozdíl log ₂ LFQ	Fasta
4.52	-4.11	XP_021959761.1 acetylcholine receptor subunit alpha-type acr-16 [<i>Folsomia candida</i>]

Závěr:

Výsledky doplňkových biotestů potvrdily, že acetamidrid má významný vliv na přežívání/mortalitu *F. candida*. Efekt acetamidridu je v dané expozici pozorovatelný až po 28 dnech. Důležité je zjištění, že na základě statistické analýzy byly vyhodnoceny jako nesignifikantní kontrolní varianty 14 a 28 dní a expozice acetamidridu po 14 dní (graf č. 5 a tabulka č. 12). Bayesiánská statistika (graf č. 6) potvrdila, že expozice acetamidridu má větší význam než opakování experimentu v čase, i když i to hraje svou důležitost. Větší význam, než opakování experimentu v čase měla také délka expozice (14/28 dní). Výsledky jsou tedy opakovatelné v čase, i když jsou ovlivněny proporcionálními rozdíly.



Graf č. 7A-D znázorňuje rozdíly v proteomu jedinců *F. candida*, kteří byli vystaveni acetamidridu a kontrolními vzorky. Signifikantní rozdíly (t-test, FDR = 0,05) byly identifikovány pouze ve dvou variantách porovnání z celkových čtyř možností.

Nejvíce rozdílů, celkem 63 signifikantních proteinových markerů (graf č. 7A), bylo identifikováno porovnáním expozičních acetamidridu po 14 dnech a 28 dnech. Tento výsledek ukazuje, že nejvýraznější rozdíly jsou způsobené různou délkou expozice acetamidridu. Toto zjištění je významné a v porovnání s ostatními porovnávanými variantami značí, že jde o nejzávažnější vliv. Výsledek lze interpretovat tak, že acetamidrid sám o sobě vyvolá významné změny již po 14 dnech, které však nebyly po vyhodnocení naší proteomické analýzy statisticky významné (graf č. 7B). Po dalších 14 dnech expozice *F. candida* acetamidridu v půdě a celkově tedy po 28 dnech však dochází k zesílení efektu acetamidridu, který se nastartuje již dříve. Značný význam lze přikládat působení acetamidridu na interakci mezi endosymbiotickou bakterií *Wolbachia* a *F. candida*, protože byly identifikovány tři signifikantní markery z této bakterie. Ovlivnění *Wolbachia* může znamenat vliv na reprodukci hostitele *F. candida* [30, 31]. Postupem v metodice sice není hodnocena reprodukce, která je zahrnuta v testu OECD č. 232 [13], ale výsledky indikující ovlivnění exprese proteinů *Wolbachia* mohou indikovat potenciální ovlivnění reprodukce.

Jako velmi zajímavé se jeví také zjištění, že porovnáním expozice acetamidridu po 28 dnech s kontrolou po 28 dnech, byl identifikován pouze jeden signifikantní marker (graf č. 7D, tabulka č. 13). Tento marker má však vcelku velký význam, protože se jedná o podjednotku acetylcholinového receptoru. Acetamidrid totiž patří mezi neurotoxiny a funguje jako agonista acetylcholinových receptorů [32].

Vzhledem k výsledkům četných biotestů a proteomické analýzy lze jednoznačně indikovat, že pokud je populace *F. candida* vystavena působení acetamidridu v testované realistické dávce, existuje riziko negativního vlivu. Efekt se dle biotestu neprojeví po 14 dnech, ale později. Po 28 dnech je evidentní negativní vliv acetamidridu na přežívání/mortalitu dospělců *F. candida*. Proteomická analýza indikovala markery ovlivněné působením acetamidridu. Efekt se zvyšuje s delší expozicí acetamidridu v čase a patrný je vliv na interakci mezi endosymbiotickou bakterií *Wolbachia* a jejím hostem *F. candida*. Celkový test odhalil negativní vliv chronického působení acetamidridu na *F. candida*. Vliv



acetamipridu na experesi genů symbiotické intracelulární bakterie *Wolbachia* může indikovat vliv na reprodukci *F. candida*, která lze prokázat testem dle OECD č. 232 [13].

9. Srovnání novosti metodiky

Metodika přináší inovativní prvky do hodnocení rizik pesticidů na půdní „bezobratlé“ živočichy. Metodika zahrnuje nové optimalizované postupy pro hodnocení rizik pesticidů formou biotestů s využitím modelu chvostokoka *F. candida*. Navržený metodický postup zaručuje opakovatelnost biologických experimentů v čase při relativně snadném a také přehledném provedení. Nově tento postup zahrnuje opakovatelnost biotestů v čase (vhodné je alespoň třikrát po sobě jdoucí provedení experimentů). Průkaz opakovatelnosti v čase odhalí vliv fitness testovaného organismu v průběhu sezóny na výsledek biotestu. Této opakovatelnosti je možné dosáhnout použitím stojanů a zabezpečení homogenních podmínek v klimaboxech s nucenou cirkulací. Jinak by mohla být nežádoucími fluktuacemi teplot výrazně ovlivněna reakce testovaného organismu na pesticid. Novinkou je také využití Bayesiánské statistiky, jejíž výstup dokáže spolehlivě ukázat, zda ve výsledku převládá vliv testovaného pesticidu, nebo další faktory jako opakování v čase (sezónnost) či jiné testované vlivy, např. různý čas expozice. V případě, že je indikován subletální vliv na modelového půdního „bezobratlého“ živočicha, navrhuje nově zařadit do hodnocení rizik ověřovací experimenty a zařazení vysokokapacitních OMICs technologií. Podle metodiky se standardně využije vysokokapacitní necílená shot-gun proteomika, ale je možné využít i transkriptomického, případně metabolomického přístupu. Kombinací různých OMICs přístupů najednou (např. kombinace proteomiky a transkriptomiky), tzv. MULTIOMICs přístupem, může poskytnout ještě přesnější data, co se týká mechanismu působení pesticidu na necílový organismus.

10. Uplatnění metodiky

Metodika je určena zejména pro odborné pracovníky zaměřené na hodnocení rizik pesticidů na necílové organismy a životní prostředí. Metodika se uplatní při posuzování rizik pesticidů na necílové organismy a prostředí. Využití je tedy při registracích pesticidů. Půdní „bezobratlí“ živočichové jako chvostokoci mají kritický význam při půdotvorné činnosti a zachování ekosystémů. Protože se tyto živočichové vyskytují také v chráněných územích včetně podzemních



jeskynních prostor, bude mít metodika uplatnění při ochraně chráněných území. Chvostoskoci byli např. identifikováni po roztočích jako druhá nejpočetnější skupina bezobratlých v jeskynní fauny Ramsarské lokality Podzemní Punkva v CHKO Moravský kras [33].

Potenciálními uživateli v Česku ale i v zahraničí jsou také orgány zabývající se používáním POR a hodnocením rizik spojených s jejich používáním. Potencionálními uživateli mohou být např. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZUZ), Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky (AOPK ČR), Evropská agentura pro životní prostředí (EEA), Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA), Agentura pro ochranu životního prostředí USA (US EPA), Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD). Využití je také ve výuce na univerzitách a ve výzkumu.

Metodika se vztahuje k Národnímu akčnímu plánu k bezpečnému používání pesticidů (NAP) spadajícího do gesce Ministerstva zemědělství ČR (MZe ČR), které jej ve spolupráci s Ministerstvem životního prostředí ČR (MŽP ČR) a Ministerstvem zdravotnictví ČR (MZd ČR) vyhodnocuje a periodicky aktualizuje. Eliminace negativního vlivu POR je velmi důležitou součástí udržitelného zemědělství. Správná definice rizik POR umožní lépe chránit přirozená společenstva a ekosystémy.

11. Ekonomické přínosy metodiky

Správně fungující půdní společenstva jsou kriticky důležitá pro půdotvornou činnost a ochranu půdy. Bez půdních živočichů neboli „edafonu“ by byla půda v podstatě mrtvá a šlo by ji přirovnat ke skládce surového humusu. Ochranou půdních živočichů proti nepříznivým vlivům, jako je rizikové nebo nesprávné používání pesticidů, je velmi důležité a výsledky se pak projeví i z ekonomického hlediska. Správným posuzováním rizik pesticidů se předejde nákladům, které by byly jinak potřeba vynaložit na obnovení živé a funkční půdy. Živá půda, ve které jsou organismy v jisté funkční rovnováze, se odrazí na výnosech a kvalitě plodin, ale i na kvalitě prostředí. Celkové náklady na experimenty v této metodice lze odhadovat se zahrnutím OMICs metod nejméně 10krát až 100krát vyšší než v případě běžných postupů založených na běžných biotestech, které jsou založené na EN/ČSN ISO 11267:2014 [12] či testu OECD č. 232 [13]. Na druhou stranu poskytnou výsledky získané metodickým postupem komplexnější a exaktnější pohled na rizika testovaných látek.



12. Publikace, které předcházely metodice

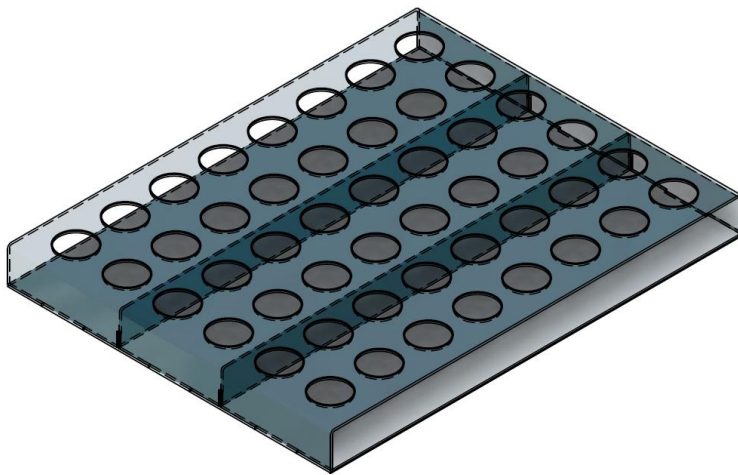
- Erban T. (2021). Stojan na vzorkovnice určený zejména pro testování vlivu xenobiotik a fyzikálních podmínek na půdní organismy: užitiný vzor číslo 34929. Úřad průmyslového vlastnictví, Praha, 5 s.
- Erban T., Stehlik M., Sopko B., Markovic M., Seifrtova M., Halesova T., Kovaricek P. (2018). The different behaviors of glyphosate and AMPA in compost-amended soil. *Chemosphere* 207: 78–83.
- Ermio J. D. L. (2020). Chronic effects of sublethal doses of sulfoxaflor and acetamiprid on bumblebees and springtails: MS thesis. Joint Master's Degree in Plant Health in Sustainable Cropping Systems, Department of Agro-Forestry Ecosystems, Technical University of Valencia, Valencia, 46 s.
- Mikulová A. (2019). Zhodnocení vlivu pesticidů na rostliny a necílové: inženýrská diplomová práce. Katedra ochrany rostlin, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita, Praha, 83 s.
- Pabišková P. (2020). Synergický účinek látek aplikovaných v době květu řepky na škůdce a necílové organismy: inženýrská diplomová práce. Katedra ochrany rostlin, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita, Praha, 148 s.

13. Přílohy

Obrázek S1. Kátrování (přesívání) půdy.



Obrázek S2. Nákres stojanu pro experimenty v kádinkách.



Obrázek S3. Kádinky přikryté alobalem ve stojanech.



Obrázek S4. Klimaboxy s nerezovým vnitřkem, nucenou cirkulací, monitoringem teploty a vlhkosti.



Obrázek S5. Chov chvostoskoků.



Tabulka S1. Výsledky hodnocení kvality půdy.

pH H ₂ O	pH KCl -KPP	uhličitaný %	Ntot %	Cox %	C/ N	humus %
6,93	6,20	<0,1	0,24	2,35	9,83	4,04
6,89	6,24	<0,1	0,24	2,19	9,24	3,77
6,90	6,20	<0,1	0,24	2,16	8,89	3,72

Zrn <0,001 mm %	Zrn < 0,01 mm %	Zrn < 0,05 mm %	Zrn 0,01-0,05 %	Zrn 0,05-0,25 %	Zrn 0,25-2,0 %
19,4	44,5	89,9	45,3	5,9	4,2
22,6	42,6	86,3	43,7	9,7	4,0
23,3	44,5	89,2	44,8	6,5	4,2

Ca-Meh3 - ICP mg/kg	K-Meh3 - ICP mg/kg	Mg-Meh3 - ICP mg/kg	P-Meh3 - ICP mg/kg	Cu-Meh3 - ICP mg/kg	Fe-Meh3 - ICP mg/kg	Mn-Meh3 - ICP mg/kg	Zn-Meh3 - ICP mg/kg
3990	225	261	42	7.20	221	131	11.40
3948	209	260	44	7.94	228	136	11.49
3922	209	259	42	7.76	215	129	11.44



14. Seznam literatury

1. EK. (2018). Konsolidovaný text: Nařízení Komise (EU) č. 546/2011 ze dne 10. června 2011, kterým se provádí nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009, pokud jde o jednotné zásady pro hodnocení a povolování přípravků na ochranu rostlin. Dokument 02011R0546-20180524. 24. 5. 2018. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A02011R0546-20180524>
2. EK. (2021). Konsolidovaný text: Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 ze dne 21. října 2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh a o zrušení směrnic Rady 79/117/EHS a 91/414/EHS. Dokument 02009R1107-20210327. 27. 3. 2021. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A02009R1107-20210327>
3. EK. (2014). Konsolidovaný text: Nařízení Komise (EU) č. 283/2013 ze dne 1. března 2013, kterým se v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh stanoví požadavky na údaje o účinných látkách. Dokument 02013R0283-20141117. 17. 11. 2014. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A02013R0283-20141117>
4. EK. (2015). Konsolidovaný text: Nařízení Komise (EU) č. 284/2013 ze dne 1. března 2013, kterým se v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh stanoví požadavky na údaje o přípravcích na ochranu rostlin. Dokument 02013R0284-20150917. 17. 9. 2015. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A02013R0284-20150917>
5. Bellingier P. F., Christiansen K. A., Janssens F. (1996–2022). Checklist of the Collembola of the World. URL: <http://www.collembola.org>
6. Hopkin S. P. (1997). Biology of the springtails (Insecta: Collembola). Oxford University Press, Oxford, 330 s.
7. Seastedt T. R. (1984). The role of microarthropods in decomposition and mineralization processes. Annu. Rev. Entomol. 29 (1): 25–46.
8. Agamennone V., Jakupović D., Weedon J. T., Suring W. J., van Straalen N. M., Roelofs D., Röling W. F. M. (2015). The microbiome of *Folsomia candida*: an assessment of bacterial diversity in a *Wolbachia*-containing animal. FEMS Microbiol. Ecol. 91 (11): fiv128.
9. Czarnetzki A. B., Tebbe C. C. (2004). Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in Collembola. Environ. Microbiol. 6 (1): 35–44.
10. Crouau Y., Chenon P., Gisclard C. (1999). The use of *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) for the bioassay of xenobiotic substances and soil pollutants. Appl. Soil Ecol. 12 (2): 103–111.
11. Fountain M. T., Hopkin S. P. (2005). *Folsomia candida* (Collembola): a “standard” soil arthropod. Annu. Rev. Entomol. 50 (1): 201–222.
12. ČSN. (2014). ČSN EN ISO 11267 (836451): Kvalita půdy — Inhibice reprodukce chvostoskoků (*Folsomia candida*) látkami znečišťujícími půdu. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví (ÚNMZ), Praha, 23 s.
13. OECD (2016). Test No. 232: Collembolan reproduction test in soil, OECD guidelines for the testing of chemicals, section 2. OECD Publishing, Paris, 22 s.
14. EK. (2018). Prováděcí nařízení Komise (EU) 2018/113 ze dne 24. ledna 2018, kterým se v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh obnovuje schválení účinné látky acetamiprid a kterým se mění příloha prováděcího nařízení Komise (EU) č. 540/2011. Úř. věst. E. U. L 20: 7–10. Dokument 32018R0113, 25. 1. 2018. URL: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2018/113/oj?locale=cs
15. Donley N. (2019). The USA lags behind other agricultural nations in banning harmful pesticides. Environ. Health 18 (1): 44.



16. Dewar A. M. (2017). The adverse impact of the neonicotinoid seed treatment ban on crop protection in oilseed rape in the United Kingdom. *Pest Manag. Sci.* 73 (7): 1305–1309.
17. Kathage J., Castañera P., Alonso-Prados J. L., Gómez-Barbero M., Rodríguez-Cerezo E. (2018). The impact of restrictions on neonicotinoid and fipronil insecticides on pest management in maize, oilseed rape and sunflower in eight European Union regions. *Pest Manag. Sci.* 74 (1): 88–99.
18. Lundin O. (2021). Consequences of the neonicotinoid seed treatment ban on oilseed rape production – what can be learnt from the Swedish experience? *Pest Manag. Sci.* 77 (9): 3815–3819.
19. Ermio J. D. L. (2020). Chronic effects of sublethal doses of sulfoxaflor and acetamiprid on bumblebees and springtails: MS thesis. Joint Master's Degree in Plant Health in Sustainable Cropping Systems, Department of Agro-Forestry Ecosystems, Technical University of Valencia, Valencia, 46 s.
20. Pabišková P. (2020). Synergický účinek látek aplikovaných v době květu řepky na škůdce a necílové organismy: inženýrská diplomová práce. Katedra ochrany rostlin, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita, Praha, 148 s.
21. Etz A. (2015). Using Bayes factors to get the most out of linear regression: a practical guide using R. Winnower. URL: <https://thewinnower.com/papers/278-using-bayes-factors-to-get-the-most-out-of-linear-regression-a-practical-guide-using-r>
22. Morey R. D., Rouder J. N., Jamil T., Urbanek S., Forner K., Ly A. (2021). BayesFactor: computation of Bayes factors for common designs. CRAN - the Comprehensive R Archive Network. URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/BayesFactor/index.html>
23. Puga J. L., Krzywinski M., Altman N. (2015). Bayesian statistics. *Nat. Methods* 12 (5): 377–378.
24. Erban T., Stehlik M., Sopko B., Markovic M., Seifrtova M., Halesova T., Kovaricek P. (2018). The different behaviors of glyphosate and AMPA in compost-amended soil. *Chemosphere* 207: 78–83.
25. Watson G. B., Siebert M. W., Wang N. X., Loso M. R., Sparks T. C. (2021). Sulfoxaflor – a sulfoximine insecticide: review and analysis of mode of action, resistance and cross-resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* 178: 104924.
26. Erban T., Klimov P. B., Harant K., Talacko P., Nesvorna M., Hubert J. (2021). Label-free proteomic analysis reveals differentially expressed *Wolbachia* proteins in *Tyrophagus putrescentiae*: mite allergens and markers reflecting population-related proteome differences. *J. Proteomics* 249: 104356.
27. Kocourek F., Stara J., Sopko B., Talacko P., Harant K., Hovorka T., Erban T. (2021). Proteogenomic insight into the basis of the insecticide tolerance/resistance of the pollen beetle *Brassicogethes (Meligethes) aeneus*. *J. Proteomics* 233: 104086.
28. Erban T., Klimov P., Talacko P., Harant K., Hubert J. (2020). Proteogenomics of the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*: allergen repertoire, accurate allergen identification, isoforms, and sex-biased proteome differences. *J. Proteomics* 210: 103535.
29. Erban T., Sopko B., Kadlikova K., Talacko P., Harant K. (2019). *Varroa destructor* parasitism has a greater effect on proteome changes than the deformed wing virus and activates TGF- β signaling pathways. *Sci. Rep.* 9 (1): 9400.
30. Pike N., Kingcombe R. (2009). Antibiotic treatment leads to the elimination of *Wolbachia* endosymbionts and sterility in the diplodiploid collembolan *Folsomia candida*. *BMC Biol.* 7: 54.
31. Graber L. C., Fallon A. M. (2019). Tetracycline reduces feeding and reproduction of the parthenogenetic springtail, *Folsomia candida*. *Symbiosis* 77 (3): 257–264.
32. Anadón A., Ares I., Martínez M., Martínez-Larrañaga M.-R., Martínez M.-A. (2020). Neurotoxicity of neonicotinoids. In: Aschner M., Costa L. G. (eds.) *Neurotoxicity of pesticides*. Academic Press, Amsterdam, s. 167–207
33. Tajovský K., Bruthans J., Starý J., Čuchta P., Pižl V. (2017). Ekologický stav ramsarské lokality Podzemní Punkva. In: Pithart D., Příkryl I., Melichar V., Křesina J., Vlasáková L. (eds.) *Ekologický stav mokřadů České republiky a trendy jejich vývoje*. Belec, Praha, s. 153–171.

T A

Č R

Technologická
agentura
České republiky



ISBN 978-80-7427-374-2



9 788074 273742

ISBN 978-80-7427-374-2