NOVÁ METODA PRO STANOVENÍ EKOTOXICITY V PŮDNÍM PROSTŘEDÍ – LABORATORNÍ VÍCEDRUHOVÝ MIKROKOSMOS

KLÁRA KOBETIČOVÁ, VERONIKA PEJČOCHOVÁ a VLADIMÍR KOČÍ

Ústav chemie ochrany prostředí, Fakulta technologie ochrany prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 168 22 Praha 6
Klara.Kob@seznam.cz

Došlo 27.7.15, přijato 18.8.15.
Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Klíčová slova: ekotoxicita, půda, vícedruhový test

Úvod

Testy ekotoxicity

Testy toxicity, které slouží k poskytování informací o účincích látek na životní prostředí, jsou prováděny přibližně od druhé poloviny 20. století. V 80. letech bylo zveřejněno množství konkrétních jednodruhových testů, určených ke zkoumání toxicity látek ve vodním i půdním prostředí. Jejich cílem bylo odhadnout účinek na celý ekosystém[1].

Použití jednodruhových testů toxicity s sebou však přináší určité nevýhody. Biosféra se skládá ze 4 až 5 miliónů organismů, a není proto v žádném případě možné provést testy toxicity na všech jednotlivých druzích. Navíc se v přírodě vyskytují organismy na různých trofických úrovních (destruenti, producenti, konzumenti), které se navzájem ovlivňují a cílem ekotoxikologie není určovat toxicitu pouze pro jednotlivé organismy, ale zkoumat vliv chemických látek pro celá společenstva a systémy. Je proto žádoucí používat baterii testů s mikroorganismy, rostlinami a půdními bezobratlými, kteří mezi sebou interagují a jsou společně vystaveni působení zkoumané látky. Vícedruhový test poskytuje výsledky s lepší výpovědní hodnotou pro daný ekosystém než test jednodruhový[2].

Použití vícedruhových testů ekotoxicity v půdním prostředí

Vícedruhové testy toxicity se vyznačují společnou přítomností několika druhů organismů, nejlépe na různých trofických úrovních. Tyto organismy nejsou nezávislé, ale navzájem se ovlivňují. Vícedruhové testy toxicity tak poskytují relevantnější výsledky než testy jednodruhové, přičemž také umožňují dobrou kontrolu podmínek, a lze tak dobře určit vztah mezi příčinou a následkem. Přesné uspořádání pokusů, volba testovaných organismů apod. jsou v současné době předmětem odborných diskusí. Vícedruhové testy se dělí na mezokosmy a mikrokosmy, které představují zjednodušení nákladných a těžko proveditelných polních experimentů[2–4].

Mikrokosmos je určen k testování půdních systémů a vlivu látek užívaných v půdním hospodářství na organismy žijící v zemi. Tento systém se řadí mezi kombinované metody, jelikož se používá vzorek půdy odebraný v přírodě, který je v laboratoři kultivován. Mezi užívané organismy se řadí rostliny i bezobratlí. Ze zeminy je vatou odebírána voda, která se dále zkoumá. Podmínky jsou dobře kontrolovatelné a test trvá dvanáct i více týdnů[2].

V posledních letech bylo publikováno vícero studií, zabývajících se vlivem různých polutantů na půdní ekosystém. Z metodického hlediska jsou používané vícedruhové testy velmi různorodé, jedná se však vždy o samostatné půdní jednotky, které zahrnují několik organismů na různých trofických úrovních (rostliny, živočichy a mikroorganismy)[5–17]. Test může být prováděn pomocí připravené proseté půdy, nebo pomocí neporušeného půdního jádra odebraného z terénu. Půda může obsahovat nově vložené organismy, stejně tak ale i organismy původní, již v půdě přítomné. Toxická látka bývá nejčastěji do půdy vmíchána ještě před vložením organismů. Celý test musí být koncipován tak, aby měl co nejvyšší vypovídací hodnotu a odpovídal běžnému přírodnímu půdnímu prostředí. Roli hrají i metody použité k určení změn v systému. Délka trvání testů se pohybuje v řádu několika týdnů[18,19].

Cíle práce

Tato práce byla zaměřena na zavedení a vyzkoušení vícedruhového testu s půdními organismy – mikroorganismy, rostlinami a bezobratlými. Rozdíl v uspořádání vícedruhového testu, který byl použit v této studii, spočívá oproti zavedeným vícedruhovým testům v menším počtu druhů testovacích organismů, kratší délce experimentu a tím pádem snížení pracnosti při vyhodnocení testu, což může být výhodné pro používání této metodiky v praxi při testování chemických látek pro průmysl. Dalším cílem bylo porovnání toxického účinku referenční látky pro půdní organismy (kyselina boritá) pomocí popisovaného vícedruhového testu a adekvátních standardních jednodruhových testů ekotoxicity kvůli ověření, zda nově navržená vícedruhová varianta testu poskytuje dostatečné a relevantní výsledky.

Experimentální část

Použitý substrát

Pro testování byl připraven 1 kg artificiální půdy, přičemž do každé testovací nádoby bylo odváženo po 30 g

artificiální půdy. Ta se skládá z 695 g písku (Hornbach, s.r.o.), 200 g kaolinu, 100 g rašeliny (AGRO, s.r.o.) a 5 g uhličitanu vápenatého ($CaCO_3$) od firmy Lachema a.s. Rašelina obsahuje velké množství organických kyselin, má nízké pH a její obsah by nežádoucím způsobem snižoval pH výsledné půdy. Proto bylo přidáno cca 0,5 % uhličitanu vápenatého, který pH půdy odpovídajícím způsobem zvýšil. Půda se po navážení všech komponent promísila a nechala několik dní odstát k ustálení pH. Acidita půdy byla změřena na začátku i na konci testu. Změřené hodnoty pH se pohybovaly v rozmezí 5,5–6,5 (cit.[20]).

Standardní testy ekotoxicity zahrnuté do vícedruhového testu

Ve vícedruhovém testu toxicity byly dohromady sloučeny tři standardní metodiky pro testování ekotoxicity chemických látek či pevných substrátů:

- reprodukční test s roupicemi[20],
- test inhibice růstu kořene vyšších rostlin[21],
- test stanovení dehydrogenázové aktivity půd[22].

Modelové organismy

Jako zástupce půdních bezobratlých byla použita roupice druhu *Enchytraeus crypticus*. Na pracovišti VŠCHT jsou roupice permanentně chovány při 20 °C v artificiální půdě, v plastových nádobách s proděravělými víčky. Roupice jsou krmeny 3× týdně mletými autoklávovanými vločkami. Zdrojem chovu roupic na pracovišti VŠCHT je Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, Masarykova Univerzita, Brno. Jako zástupce rostlin byla vybrána locika setá (*Lactuca Sativa*) – varieta *capitata*, zakoupená od firmy Oseva, s.r.o. Testovací substrát je osídlen přírodním mikrobiálním společenstvem, jehož rozvoj a vitalita je vyhodnocována testem dehydrogenasové aktivity.

Modelová látka

Modelovou látkou byla zvolena kyselina trihydrogenboritá (H_3BO_3), která byla přímo navržená jako referenční látka pro testy s půdními organismy. Kyselina boritá (Penta, s.r.o.) byla použita v koncentraci 400 mg kg^{-1} artificiální půdy. Tato koncentrace byla vybrána na základě dat publikovaných v literatuře, kdy byl při testování této koncentrace zaznamenán negativní vliv na rostliny i roupice[23].

Provedení vícedruhového testu a odpovídajících standardních jednodruhových testů ekotoxicity

Pro tento experiment bylo použito celkem 30 testovacích nádob, do každé bylo odváženo 30 g připravené artificiální půdy a polovina sklenic byla ovlhčena 8,6 ml destilované vody a druhá polovina 8,6 ml vodného roztoku kyseliny trihydrogen borité o koncentraci 400 mg kg^{-1} půdy. Toto ovlhčení odpovídá 60 % maximální vodní kapacity[24].

Sada testovacích nádob zahrnovala:

- 2 opakování pro vícedruhový test – kontrolu (bez H_3BO_3), určená ke zjištění dehydrogenasové aktivity ($VÍKO_{DHA1,2}$),
- 2 opakování pro vícedruhový test H_3BO_3, určená ke zjištění dehydrogenasové aktivity ($VÍH_3BO_{3DHA1,2}$),
- 3 opakování pro vícedruhový test – kontrolu (obr. 2). Z těchto nádob byly stanoveny počty roupic a stav salátu ($VÍKO_{SARO1,2,3}$),
- 3 opakování pro vícedruhový test – H_3BO_3, k určení roupic a salátu ($VÍH_3BO_{3SARO1,2,3}$),
- 2 opakování pro jednodruhový test – kontrolu (bez H_3BO_3), bez salátu a roupic, určená ke zjištění dehydrogenasové aktivity ($JEKO_{DHA1,2}$),
- 2 opakování pro jednodruhový test – H_3BO_3, bez salátu a roupic, určená ke zjištění dehydrogenasové aktivity ($JEH_3BO_{3DHA1,2}$),
- 5 opakování pro jednodruhový test – kontrolu, bez roupic. Z těchto nádob byl stanoven stav salátu ($JEKO_{SA1,2,3,4,5}$),
- 5 opakování pro jednodruhový test – H_3BO_3, bez roupic, k určení salátu ($JEH_3BO_{3SA1,2,3,4,5}$),
- 3 opakování pro jednodruhový test – kontrolu, bez salátu. Z těchto nádob byly stanoveny počty roupic ($JEKO_{RO1,2,3}$),
- 3 opakování pro jednodruhový test – H_3BO_3, bez salátu, k určení roupic ($JEH_3BO_{3RO1,2,3}$).

1. den testu:

Do všech nádob, ve kterých byly introdukovány roupice ($VÍKO_{DHA1,2}$, $VÍH_3BO_{3DHA1,2}$, $VÍKO_{SARO1,2,3}$, $VÍH_3BO_{3SARO1,2,3}$, $JEKO_{RO1,2,3}$ a $JEH_3BO_{3RO1,2,3}$), bylo naváženo 100 mg mletých autoklávovaných vloček. Ty byly po nasypání do sklenic lehce překryty zeminou.

Zároveň bylo do těchto nádob nasazeno vždy po pěti roupicích. Do všech vícedruhových testů a do jednodruhových testů $JEKO_{SA1,2,3,4,5}$ a $JEH_3BO_{3SA1,2,3,4,5}$ byla do každé ze sklenic zasazena vždy 3 semena salátu. Všechny sklenice byly zváženy a hmotnosti zaznamenány.

8., 15. a 22. den testu:

Testovací nádoby byly zkontrolovány, zváženy a byla do nich doplněna vlhkost (tak, aby nádoby vážily stejně jako v 1. den testu).

29. a 30. den testu:

Z nádob byly pinzetou vytaženy jednotlivé rostliny, byl popsán jejich vzhled a pravítkem byla změřena délka jejich kořenů.

Populace roupic v testovacích nádobách byly usmrceny přídavkem ethanolu a poté obarveny bengálskou červení (1% roztok v ethanolu). Nádoby byly protřepány a přes noc umístěny do lednice. Přesný počet roupic v jednotlivých sklenicích byl stanoven tak, že se malá množství zeminy rozplavila ve vodě a dobře viditelné obarvené roupice se pomocí plastového kapátka vybraly a spočítaly.

Z každé testovací nádoby bylo do skleněných zkuma-

vek naváženo přibližně po 2 g půdy, přesné navážky byly zapsány a zkumavky označeny. Vždy do jedné ze dvou zkumavek od každé varianty byl přidán 1 ml trifenyltetraazolium chloridu (TTC) a tyto byly označeny jako SUBSTRÁT. Do druhé poloviny zkumavek (označených BLANK) byl přidán 1 ml roztoku pufru (absorbance slepých roztoků (blanků) se po změření odečte kvůli korekci). Zkumavky byly zazátkovány, obsah byl dobře protřepán a zkumavky umístěny do inkubátoru, kde byly ve tmě inkubovány při teplotě 25±1 °C po dobu 24 hodin. Během této doby z TTC vznikl hydrolytickou reakcí formazan. Ten se extrahoval do 10 ml methanolu a extrakt byl centrifugován při 4 °C a 4500 ot./min po dobu 10 min. Absorbance takto připravených vzorků byla změřena při vlnové délce 482 nm spolu s kalibračními roztoky (roztoky formazanu) o koncentracích 0 mg l^{-1}; 1,25 mg l^{-1}; 2,5 mg l^{-1}; 5 mg l^{-1}; 10 mg l^{-1} a 20 mg l^{-1}. Byla vypočtena mikrobiální aktivita inhibice DHA (vzorků s kyselinou boritou oproti vzorkům bez přídavku toxické látky) v jednotlivých nádobách.

Statistické vyhodnocení dat

Pro statistické vyhodnocení dat byl použit program GraphPad Instat, verze 3. Pro porovnání výsledků mezi vícedruhovým a všemi jednodruhovými variantami testu byla použita ANOVA, Tukey-Kramerův test[25].

Výsledky a diskuse

DHA

Množství vzniklého formazanu v jednotlivých vzorcích bylo vypočítáno na základě kalibrační křivky dle vztahu $y = 0{,}586x + 0{,}0675$, kde y je naměřená absorbance vzorků při vlnové délce 472 nm a x vyjadřuje množství formazanu (μg ml^{-1}). Přídavek kyseliny borité nemá na mikroorganismy negativní vliv. Naopak se jak v jednodruhovém, tak ve vícedruhovém testu dařilo mikroorganismům lépe ve variantách s H_3BO_3. V případě jednodruhového testu bylo mikroorganismů v nádobách s toxickou látkou v průměru o 42 % více než v kontrolách a v případě vícedruhového testu to bylo dokonce v průměru o 76 % více. Mikroorganismům se lépe dařilo ve vícedruhovém testu. V nádobách jednodruhového testu s H_3BO_3 jich bylo o 61,6 % méně než v nádobách vícedruhových testů s H_3BO_3 a v kontrolách jich bylo v jednodruhovém testu méně o 52,4 % než v testech vícedruhových (tab. I).

Roupice

Z obr. 1 je patrné, že roupicím se více dařilo ve vícedruhovém testu. V kontrolách jednodruhového testu jich je o 49,6 % méně než v kontrolách vícedruhových testů a v nádobách s H_3BO_3 tvoří rozdíl 30 %. Přídavek kyseliny trihydrogenborité způsobil, že v nádobách vícedruhového testu s H_3BO_3 je o 91,6 % méně roupic než v kontrolách a v nádobách jednodruhového testu s H_3BO_3 je to o 88,3 % méně než v kontrolách. Všechny tyto rozdíly byly potvrzeny statisticky[25].

Rostliny

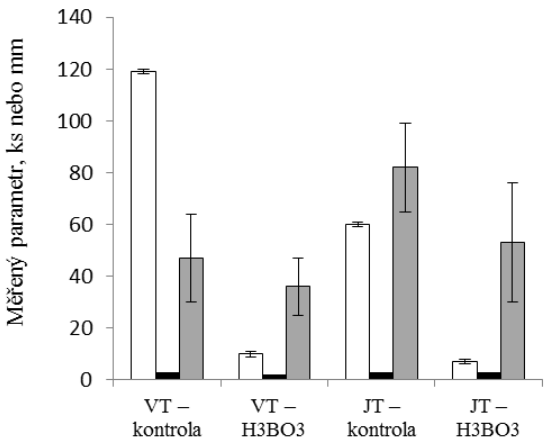
Z obr. 1 je patrné, že délky kořenů salátů jsou pro vícedruhový test s toxickou látkou o 23,4 % kratší než v kontrole a pro jednodruhový test je to o 35,4 %. Při porovnání vícedruhového testu s jednodruhovým se ukazuje, že v kontrolách vícedruhového testu jsou kořeny kratší o 42,7 % než v kontrolách jednodruhového testu. Pro nádoby s H_3BO_3 je rozdíl 32,1 % ve prospěch jednodruhového testu. Účinky H_3BO_3 jsou z výsledků jasně patrné. Dále se ukazuje, že rostlinám se více daří samostatně v jednodruhových testech, a to jak v kontrolách, tak v nádobách s H_3BO_3.

Tento experiment byl proveden pro potvrzení, že test s vícedruhovým uspořádáním může nahradit adekvátní testy jednodruhové, a že může z ekotoxikologického hlediska poskytnout podobné nebo více relevantní výsledky než ty samé standardní testy ekotoxicity. Z tohoto důvodu

Tabulka I
Vícedruhový test při koncentraci H_3BO_3 400 mg kg^{-1}. Jsou uvedeny průměrné hodnoty ± směrodatné odchylky a inhibice DHA (%) v porovnání s příslušnou kontrolou

Organismus	Mikroorganismy	
Vzorek	DHA [μg $g^{-1}h^{-1}$]	*I* [%]
VT – kontrola [a]	0,68 ± 0,25	–
VT – H_3BO_3 [b]	1,19 ± 0,43	–76
JT – kontrola [c]	0,32 ± 0,02	–
JT – H_3BO_3 [d]	0,46 ± 0,15	–42

[a] VT – kontrola = vícedruhový test – kontrola; [b] VT – H_3BO_3 = vícedruhový test – půda kontaminovaná H_3BO_3; [c] JT – kontrola = jednodruhový test – kontrola; [d] JT – H_3BO_3 = jednodruhový test – půda kontaminovaná H_3BO_3



Obr. 1. **Vícedruhový test při při koncentraci H_3BO_3 400 mg kg^{-1}.** V grafu jsou uvedeny průměrné hodnoty ± směrodatné odchylky pro počet narozených roupic (ks), počet vzešlých rostlin (ks) a délku kořenů (mm) v porovnání s příslušnou kontrolou; □ počet roupic (ks), ■ počet vzešlých rostlin (ks), ■ délka kořenů (mm)

byla vybrána jedna zkušební koncentrace (400 mg kg^{-1}) a byly provedeny oba druhy testů (vícedruhový i jednodruhové) současně. Tato koncentrace byla vybrána dle našich předchozích prokázaných účinků pro všechny studované parametry[26], a na základě údajů z literatury[23]. Použili jsme pouze jednu koncentraci, protože provedení více koncentrací v testu vícedruhovém spolu s testování stejného množství koncentrací ve všech třech jednotlivých testech by bylo časově velmi obtížné vyhodnotit.

Získané hodnoty z testů s jednodruhovým i vícedruhovým uspořádáním (varianty VT-H_3BO_3 versus JT-H_3BO_3) byly statisticky porovnány mezi sebou (tab. I; obr. 1). Byla nalezena statisticky významný rozdíl pro počet narozených roupic (*** P<0,001, ANOVA, Tukey-Kramerova metoda) a počet vzešlých rostlin (* P <0,001, ANOVA, Tukey-Kramerova metoda). Na druhou stranu nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl pro parametr prodloužení kořene rostlin a pro DHA mezi jednodruhovými a vícedruhovým testem[25].

Překvapivě nebyl zjištěn negativní vliv na mikrobiální komunitu, přestože H_3BO_3 je baktericid. Becker a spol.[23] nenalezli účinek na mikrobiální aktivitu ani při koncentraci 2400 mg kg^{-1}. Naopak, byl zjištěn pozitivní účinek až 159 % v porovnání s kontrolou[23]. Nicméně nejsme prozatím na základě vlastních údajů i diskuse z literatury schopni vysvětlit, jakým způsobem mohla H_3BO_3 ovlivnit pozitivně mikroorganismy v naší studii. Ke stejnému závěru prozatím dospěli i jiní autoři[23].

V každém případě, všechny organismy více profitovaly ve vícedruhovém uspořádání testu, než v jednodruhových testech (viz tab. I a obr. 1). Naše výsledky ukazují, že druh *Enchytraeus crypticus* je vhodný bezobratlý modelový organismus do vícedruhových testů. Můžeme také doporučit růst semen jako zajímavé parametry pro tyto studie. Druh *Lactuca sativa* lze považovat za vhodného zástupce rostlinných druhů díky svému kořenovému uspořádání (jednoduchý, nerozvětvený kořen). Na druhou stranu, mikrobiální aktivita je velmi závislá na aktuálním stavu mikroorganismů ve vzorku. Další mikrobiální parametry jako je množství dusíku, uhlíku nebo např. respirační aktivita mikroorganismů by tak raději ještě měly být zahrnuty navíc do vícedruhových experimentů v budoucnosti. V každém případě se podařilo vyvinout novou testovací metodu, kterou lze využít pro testování chemických látek či jejich směsí, stejně tak jako k testování různých pevných matric včetně odpadů[27,28].

Obr. 2. **Vícedruhový test ekotoxicity – kontrolní varianta (3 testovací nádoby) po 28 dnech expozice**

Tabulka II
Vícedruhový test při koncentraci H_3BO_3 400 mg kg^{-1}, procentuální vyjádření inhibice (I) počtu roupic a vzešlých rostlin v půdě kontaminované H_3BO_3 v porovnání s kontrolou

Organismus	I [%]			
	VT – kontrola [a]	VT – H_3BO_3 [b]	JT – kontrola [c]	JT – H_3BO_3 [d]
Roupice	–	92	–	88
Salát	–	23	–	35

[a] VT – kontrola = vícedruhový test – kontrola; [b] VT – H_3BO_3 = vícedruhový test – půda kontaminovaná H_3BO_3; [c] JT – kontrola = jednodruhový test – kontrola; [d] JT – H_3BO_3 = jednodruhový test – půda kontaminovaná H_3BO_3

LITERATURA

1. Ministerstvo životního prostředí: Definice, význam a funkce půdy. www.mzp.cz:80/cz/definice_pudy, staženo 15. března 2013.
2. Kočí V.: Chem. Listy *100*, 882 (2006).
3. Kočí V., Mocová K.: *Ekotoxikologie pro chemiky*. Vydavatelství VŠCHT, Praha 2009.
4. Komínková D.: *Ekotoxikologie*, České vysoké učení technické, Praha 2008.
5. A'Bear A. D., Boddy L., Kandeler L., Ruess L., Jones T. H.: Soil Biol. Biochem. *77*, 112 (2014).
6. Alonso E., Fernandéz C., Carbonell G., Tarazona J. V.: Soil Sediment Contam. *15*, 327 (2006).
7. Beare M. H., Coleman D. C., Crossley Jr. D. A., Hendrix P. F., Odum E. P., v knize: *The Significance and Regulation of Soil Biodiversity* (Collins H. P., Robertson G. P., Klug M. J., ed.), sv. V. Kluwer Academic, Dordrecht 1995.
8. Fernández C., Alonso C., Babin M. M., Carbonell G., Tarazona J. V.: Sci. Total Environ. *323*, 63 (2004).
9. Fernández C., Cagigal E., Vega M. M., Tarazona J. V.: Ecotoxicol. Environ. Saf. *62*, 174 (2005).
10. Gyedu-Ababio T. K., Baird D.: Ecotoxicol. Environ. Saf. *63*, 443 (2006).
11. Knacker T., Schallnaß H. J., Marcinkowski A., Förster B., Vincena R.: *Einsetzbarkeit seminaturlicher (terrestrischer) Systeme fur die Bewertung der Umweltgefahrlichkeit nach dem Chem G. R & D Project, No. 10603 069*, Umweltbundesamt (UBA), Berlin 1990.
12. Knacker T., Römbke J., Förster B., Marcinkowski A., Schallnaß H. J.: *Die Wirkung von Pestiziden auf die Mesofauna und den CO_2-Gasaustausch eines Terrestrischen Okosystems. R & D Project, No. 106 03 069/01*, Umweltbundesamt (UBA), Berlin 1991.
13. Lee S., Brown M. T.: Ecolog. Eng. *37*, 1747 (2011).
14. Lewis G. A., Mathieu D., Phan-Tan-Luu R.: *Pharmaceutical Experimental Design.* M. Dekker M., New York 1999.
15. Martikainen E., Haimi J., Ahtiainen J.: Appl. Soil Ecol. *9*, 381 (1998).
16. Moser T., van Gestel C. A. M., Jones S. E., Koolhaas J. E., Rodrigues J. M. L., Römbke J.: Ecotoxicol. *13*, 89 (2004).
17. Scott-Fordsmand J. J., Maraldo K., van den Brink P. J.: Environ. Int. *34*, 524 (2008).
18. Burrows L. A., Clive E. A.: Eur. J. Soil Biol. *38*, 245 (2002).
19. Weyers A., Sokull-Klüttgen B., Knacker T., Martin S., Van Gestel C. A. M.: Ecotoxicol. *13*, 163 (2004).
20. OECD *Guideline for Testing of Chemicals* (Paris) *2004*, 220.
21. ISO Standard 208: *Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants.*
22. ČSN EN ISO 23753-1: *Kvalita půdy – Stanovení aktivity dehydrogenázy v půdě – Část 1: Metoda používající trifenyltetrazolium chlorid* (2012).
23. Becker L., Scheffczyk A., Förster B., Oehlmann J., Princz J., Römbke J., Moser T.: J. Soils Sediments *11*, 238 (2011).
24. ISO Standard 11465: *Soil quality - Determination of dry matter and water content on a mass basis - Gravimetric method.*
25. GraphPad Prism, *verze 3*, 2007.
26. Pejčochová V.: *Bakalářská práce*. VŠCHT Praha, Praha 2013.
27. Pejčochová V. Kobetičová K.: *12th Central European Workshop on Soil Zoology: Soil Multi-species Microtest, České Budějovice, 8 April – 11 April 2013*, Book of Abstracts (Tajovský, K., ed.), str. 38.
28. Pejčochová V.: *Diplomová práce*. VŠCHT Praha, Praha 2015.

K. Kobetičová, V. Pejčochová, and V. Kočí *(Department of Environmental Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague):* **A New Method for Ecotoxicity Evaluation in Soil Environment – A Laboratory Multispecies Microcosm**

Ecotoxicity is usually assessed using a number of tests on single species. But this does not include the simultaneous interactions of different organisms and chemicals. The present article is focused on introducing multispecies tests with soil organisms – microorganisms, plants and invertebrates. Another objective is to compare the effects of toxic reference substance (boric acid) when performing the multispecies test and adequate standard ecotoxicological tests to verify whether the proposed multispecies variation provides sufficient and relevant values. The results indicate the applicability of the multispecies microcosm concept developed for testing of chemicals.