

Experimentální modely ekotoxicity pro bezobratlé živočichy

Využití standardních testů

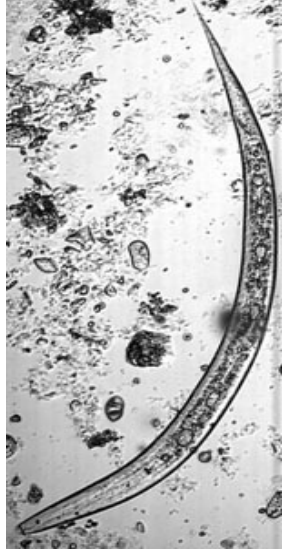
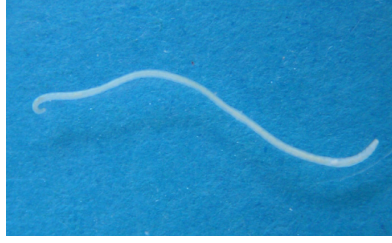
- Hodnocení vlastností nebezpečných pro životní prostředí
 - u chemických látek a přípravků
 - u přípravků na ochranu rostlin (pesticidy)
 - u biocidních přípravků a účinných látek
- Stanovení ekotoxicity odpadů
- Hodnocení léčiv určených do vodního prostředí (pro ryby)
za účelem jejich registrace
- Biologické testování přítokových a odpadních vod
- Biologická zkouška toxicity při haváriích
- Testování látek s potenciálním dopadem na vodní ekosystémy

Bezobratlí živočichové

- Přítomnost a aktivita bezobratlých je naprosto rozhodující pro stav ekosystému.
- Bezobratlé najdeme ve všech ekosystémech.
- Vodní bezobratlí tvoří významnou část celkové biomasy, mají nepoměrně vyšší druhovou bohatost oproti obratlovcům.
- Hrají významnou roli v potravním řetězci jako destruenti, ale i konzumenti prvního a druhého řádu, s čímž je spojená možná bioakumulace.
- Díky změnám habitatu při metamorfóze mohou zasahovat do více ekosystémů i během jednoho životního cyklu, díky čemuž mohou přijímat široké spektrum polutantů a přenášet je mezi jednotlivými ekosystémy.

Testy ekotoxicity v půdě

hlístice



roupice



žížaly



chvostoskoci



TERESTRICKÉ PROSTŘEDÍ

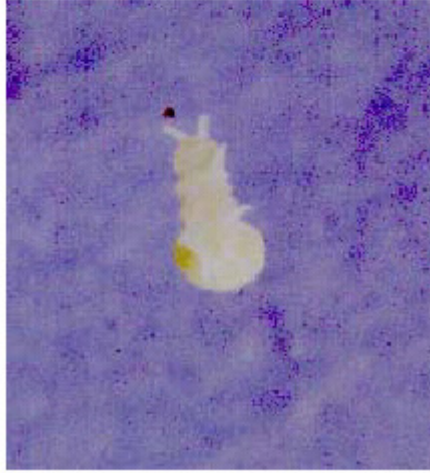
Půdní testy s bezobratlími

Uspořádání : umělý substrát, vlhčená petriho miska, standardní nebo přírodní půda – různé nádoby...
- zpravidla 14 dní (letalita),
56 dní – reprodukce ...



Organismy

Červi (kroužkovci – žížaly, háďátka, roupice)
Chvostokoci (Collembola)



TERESTRICKÉ PROSTŘEDÍ – konzumenti - bezobratlí

Zejména pro testování biocidů

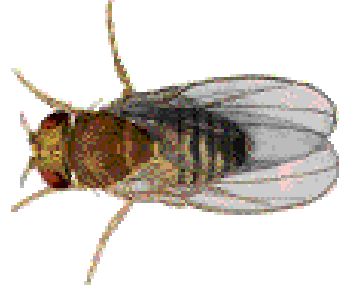
VČELY

- testování insekticidů
- dávkování v potravě



Moucha domácí

Drosophila
(hodnocení genotoxicity)



Testy toxicity na vodních bezobratlích

Normy testů na bezobratlích:

ČSN EN ISO, OECD, ASTM, US EPA, TNV, EEC, AFNOR

Testy na koryších (Crustacea) - planktonní - nejčastější

Daphnia magna, *D. pulex*, *Ceriodaphnia dubia*, *Artemia salina* (mořská),
Thamnocephalus platyurus

Testy na vířnících (Rotifera) - *Brachionus calyciflorus*

Testy na kroužkovech (Annelida) - *Tubifex tubifex*

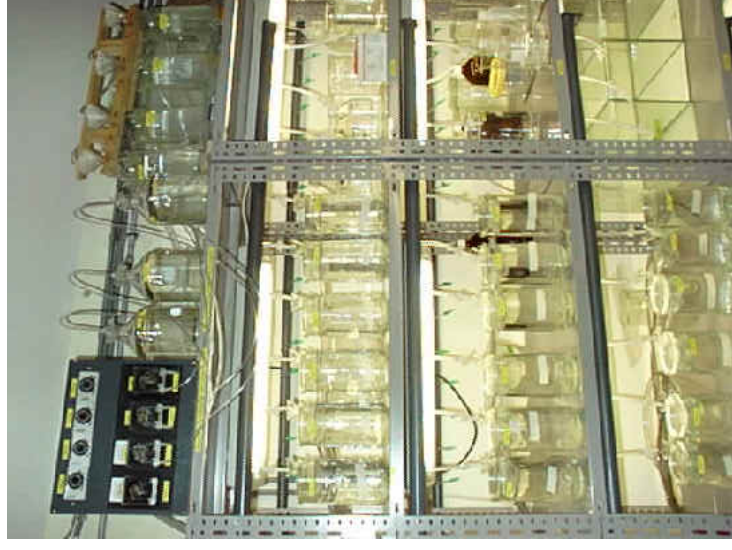
Testy na hmyzu (Insecta) - *Chironomus tentans*

Testy na měkkýchších (Mollusca)

Potamopyrgus antipodarum

Testy na bentických koryších (Crustacea)

Gammarus, *Hyallela azteca*



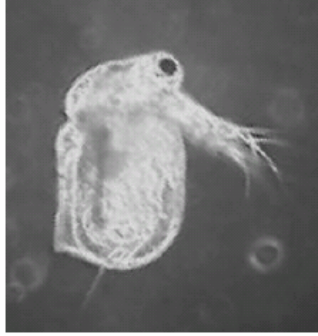
Daphnia magna



Artemia salina



Ceriodaphnia dubia



Gammarus



Chironomus riparius

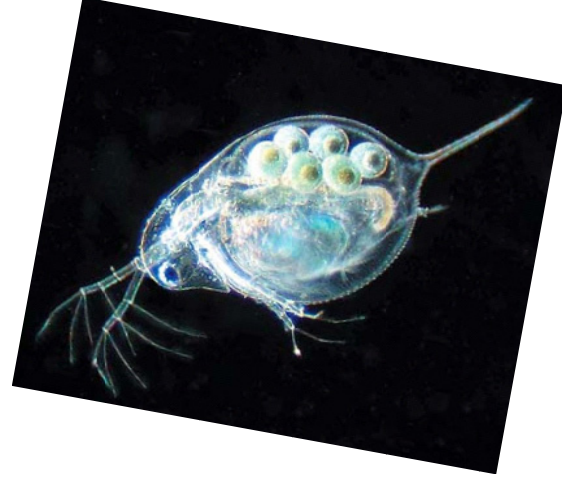


Hrotnatka velká (*Daphnia magna*)

Řád: Cladocera (perloočky):

Daphnia pulex (hrotnatka obecná), *D. magna* (h. velká)

- zástupce zooplanktonu
- akutní i chronické testy
- běžně používaný modelový organismus (OECD 1984)



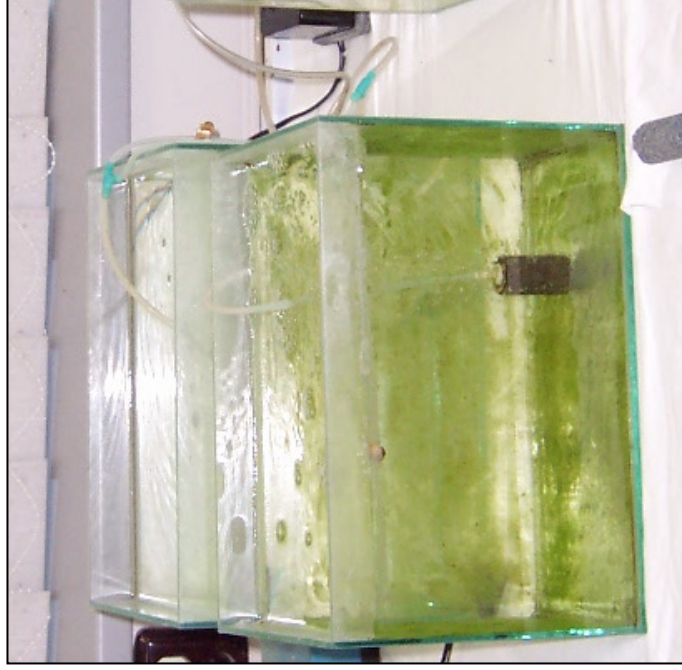
- citlivost k toxikantům
- rychlá reprodukce
- determinované toxikologické parametry
- rychlý životní cyklus
- snadná kultivace
- biochemické markery

Normy testů s *Daphnia magna*

- ČSN ISO 6341 (75 7751) Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Zkouška akutní toxicity
- ČSN ISO 10706 (75 7752) Jakost vod – Stanovení chronické toxicity látek pro *daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)
- ISO 6341/1996 Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test
- ISO 1070/2000 Water quality - Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)
- OECD 202 *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test (Updated Guideline, adopted 4th April 1984)
- OECD 211 *Daphnia magna* Reproduction Test (Original Guideline, adopted 21st September 1998)

Permanentní laboratorní chov

Daphnia magna



- **kultivační místnost**
- **stálá teplota $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$**
- **stálá fotoperioda
16h světla / 8h tmy**
- **stálé pH**
- **kultivační médium M4**
- **pravidelné krmení
směsí řas**

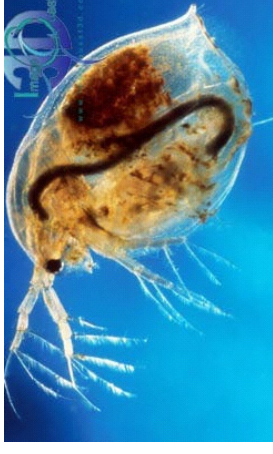


Akutní test na *Daphnia magna*

Podmínky akutního testu:

- 20 ± 2 °C, expozice 24/48 h, bez aerace, bez osvětlení (max 12h 1000lux), bez krmení
- nádobka 1-5ml/ks (30 jamková destička (10 ml))
- 20 ks/ 1koncentrace - (4x5ml/5ks), 5 organismů na jamku
- standardní médium (CaCO_3 , MgSO_4 , NaHCO_3 , KCl)
- organismy mladší 24h
- během testu měříme pH, teplotu, O_2
- sledovaný parametr: imobilizace po 24, 48 hodinách - počítáme mobilní jedince

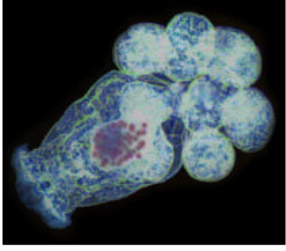
- kritérium imobilizace: jedince, kteří nejsou schopni se rozplavat ani po 15s mírném zamíchání považujeme za imobilizované, i kdyby ještě pohybovaly tykadly



ALTERNATIVNÍ MIKROBIOTESTY ("toxikity") s bezobratlími

www.microbiotests.be

THAMNOTOXKIT FTM MICROBIOTESTS



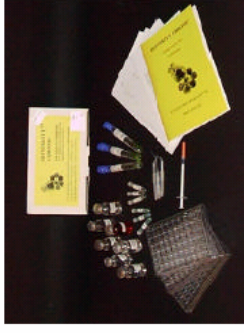
**Test organisms are included in the kits as "dormant eggs (cysts)" which can be hatched "on demand"*



With the
crustacean
*Thamnocephalus
platyurus*

ROTOXKIT F *chronic*

Contains all the materials to
perform three
48h reproduction assays



PROTOXKIT FTM MICROBIOTESTS



With the ciliate
protozoan
*Tetrahymena
thermophila*

MIKROBIOTESTY

<http://www.microbiotests.be/>

- Výhody: miniaturizace, zkrácení doby inkubace a tím i zjednodušení
- Možnost dlouhodobého uchovávání testovacích organizmů ve formě kryptobiotických klidových stádií, v lyofilizovaném nebo imobilizovaném stavu.
- Organismy se před použitím v testech uvedou do aktivního stavu.
- Synchronně vylíhlí jedinci jsou uniformní a pocházejí z geneticky přesně definovaných zásobních kultur.
- V současnosti jsou mikrobiotesty komerčně dostupné v podobě tzv. toxkitů

MIKROBIOTESTY

DAPHTOXKIT FTM magna, DAPHTOXKIT FTM pulex: 24-48h test akutní toxicity pro koryše *Daphnia magna* a *Daphnia pulex* (odpovídá OECD a ISO normám)

CERIODAPHTOXKIT FTM: 24 h test akutní toxicity pro koryše *Ceriodaphnia dubia* (odpovídá USEPA normě)

THAMNOTOXKIT FTM: 24 h test akutní toxicity pro koryše *Thamnocephalus platyurus* (Test s *Thamnocephalem* u nás normován TNO)

OSTRACODTOXKIT FTM: 6 denní chronický test toxicity (mortalita/inhibice růstu) s koryšem *Heterocypris incongruens*. První kontaktní mikrobiotest pro kontaminované sedimenty nebo půdy

ROTOXKIT FTM: 24 h test akutní toxicity pro vířníka *Brachionus calyciflorus* (odpovídá standardní normě ASTM E1440-91).

ROTOXKIT FTMshort –chronic: 48h krátký-chronický (reprodukční) test s vířníkem *Brachionus calyciflorus* (odpovídá francouzské normě AFNOR)

PROTOXKIT FTM: 24h chronický (inhibice růstu) test toxicity pro prvoka *Tetrahymena thermophila*. Metodika pro odpovídající test je vyvíjena v OECD.

RAPIDTOXKIT (tm): Hodinový test toxicity s larvami koryše *Thamnocephalus platyurus* pro rychlou detekci kontaminace vody.

Mikrobiotesty

Thamnotoxkit

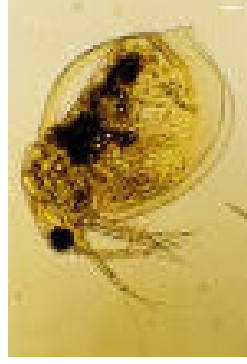
- Testovací organismus *Thamnocephalus platyurus*
- Uchovávání: klidová stádia
- Doba líhnutí: 20 hod., 4000 lx, 20°C
- Inkubace: 24 hod., 4000 lx, 20°C
- Vyhodnocení: mortalita, 24 LC₅₀

Výhody: 20 h líhnutí, větší, citlivý organismus, expozice 24-48 h, srovnatelné výsledky s dafnií (+ citlivější) i zakalené/zabarvené vzorky, je v TNV



Obdobně CERIODAPHTOX

Ceriodaphnia dubia



ODVĚTVOVÁ TECHNICKÁ NORMA VODNÍHO HOSPODÁŘSTVÍ

MZe ČR

MIKROMETODA STANOVENÍ AKUTNÍ TOXICITY NA KORÝŠI *THAMNOCEPHALUS PLATYURUS*

TNV 75 7754

Obsah	Strana
1. Předmluva.....	1
2. Předmět normy.....	2
3. Termíny, definice a zkratky.....	2
4. Podstata zkoušky.....	3
5. Materiály a chemikálie.....	3
6. Přístroje a pomůcky.....	4
7. Příprava vzorků zkoušené vody.....	4
8. Postup zkoušky.....	5
9. Vyjadřování výsledků.....	7
10. Protokol o zkoušce.....	7
11. Příloha A (informativní) - Korýš <i>Thamnocephalus platyurus</i>	8
12. Přílohy B (informativní) - Limitní hodnoty pro <i>Thamnocephalus platyurus</i>	9
13. Příloha C (informativní) - Literatura.....	10

Rotoxkit F

- Testovací organismus:
Brachionus calycifloris (vodní vířník)
- Uchování: klidová stádia, cysty
- Doba líhnutí: 18 hod., 20°C, 4000lx
- Design: 6 opakování, 6 koncentrací v jedné destičce, jamka á 0,3 ml
- Inkubace: 24 hod., 20°C, 4000lx
- Vyhodnocení: mortalita, 24 LC₅₀

Výhody: Domácí běžný druh, přídavná informace

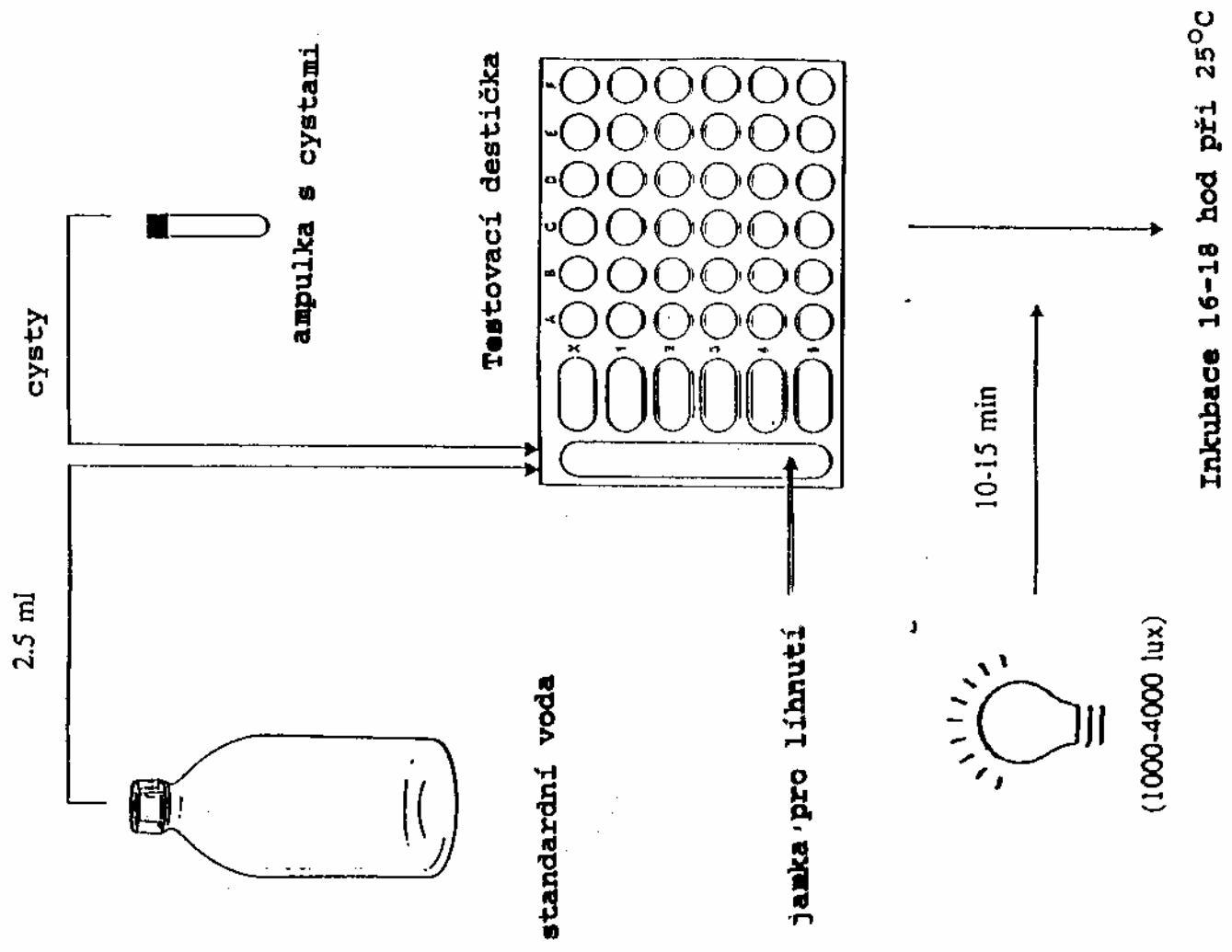
Nevýhody: Malý, většinou méně citlivý

Závěr: zajímavý doplněk testů toxicity, není nutný, je-li v baterii koryš

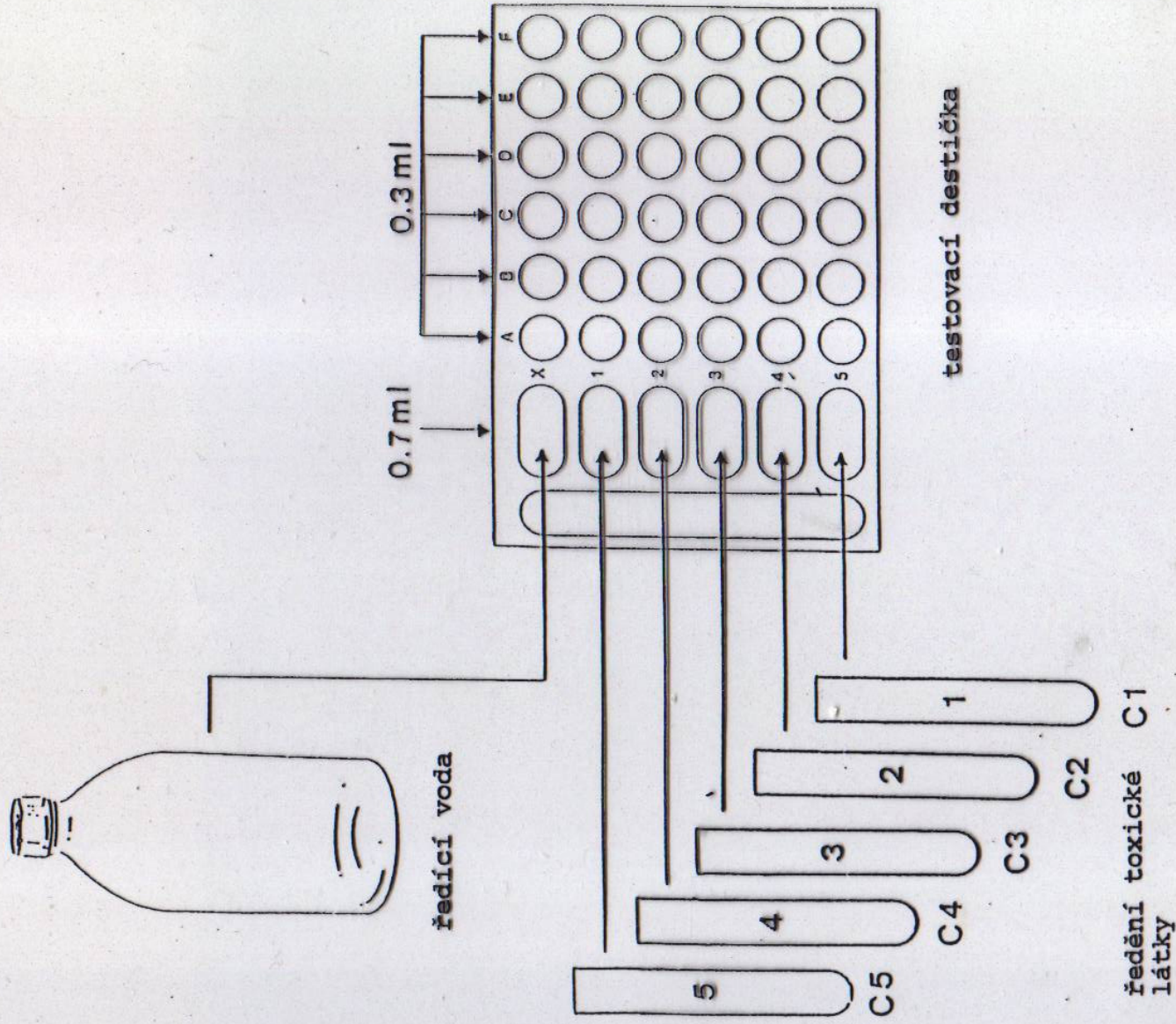
Obdobně Protoxkit s prvokem *Tetrahymena thermophila*



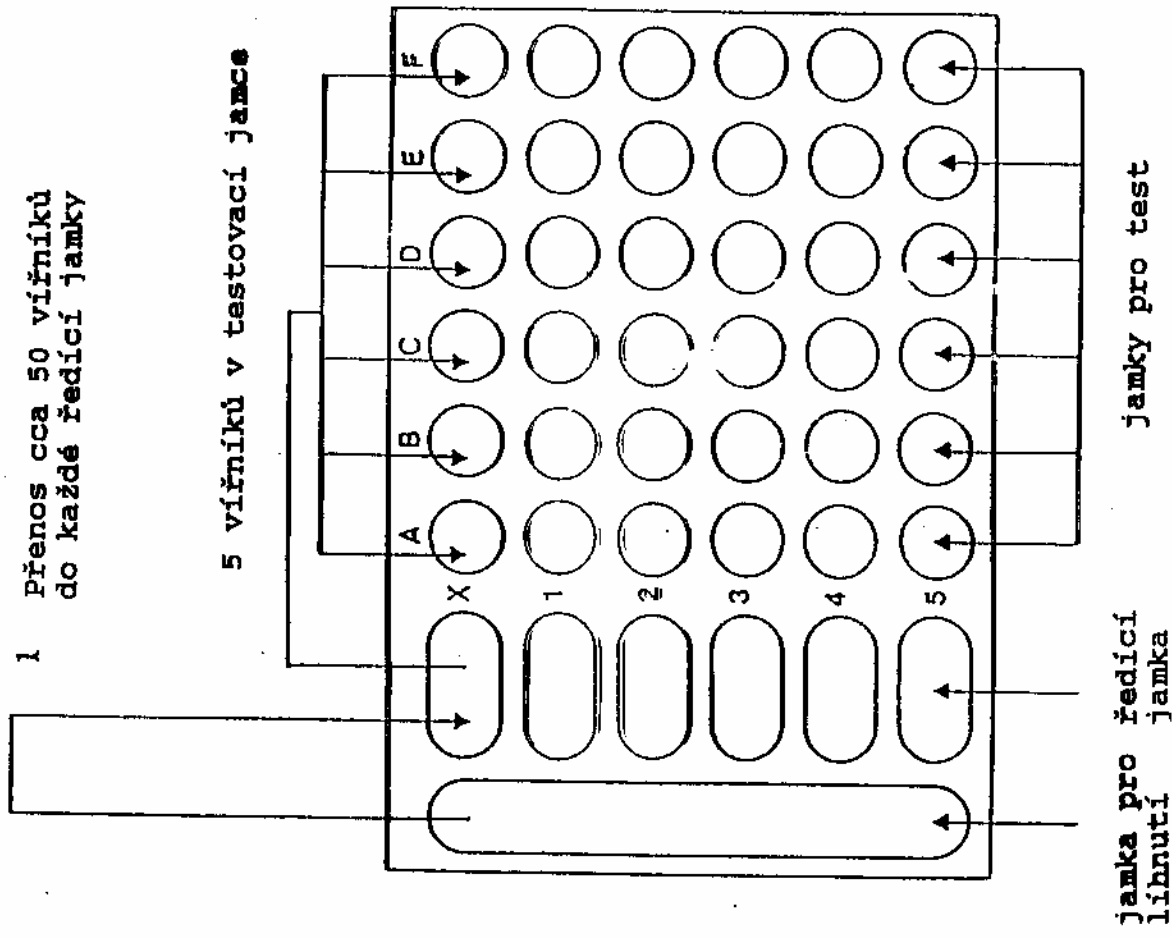
Líhnutí cyst vířníků



Plnění testovací destičky



Přenos vířníků do testovacích jamek



Daphtoxkit pulex

Výhody

- Jako ISO, OECD
- Z klidových stádií

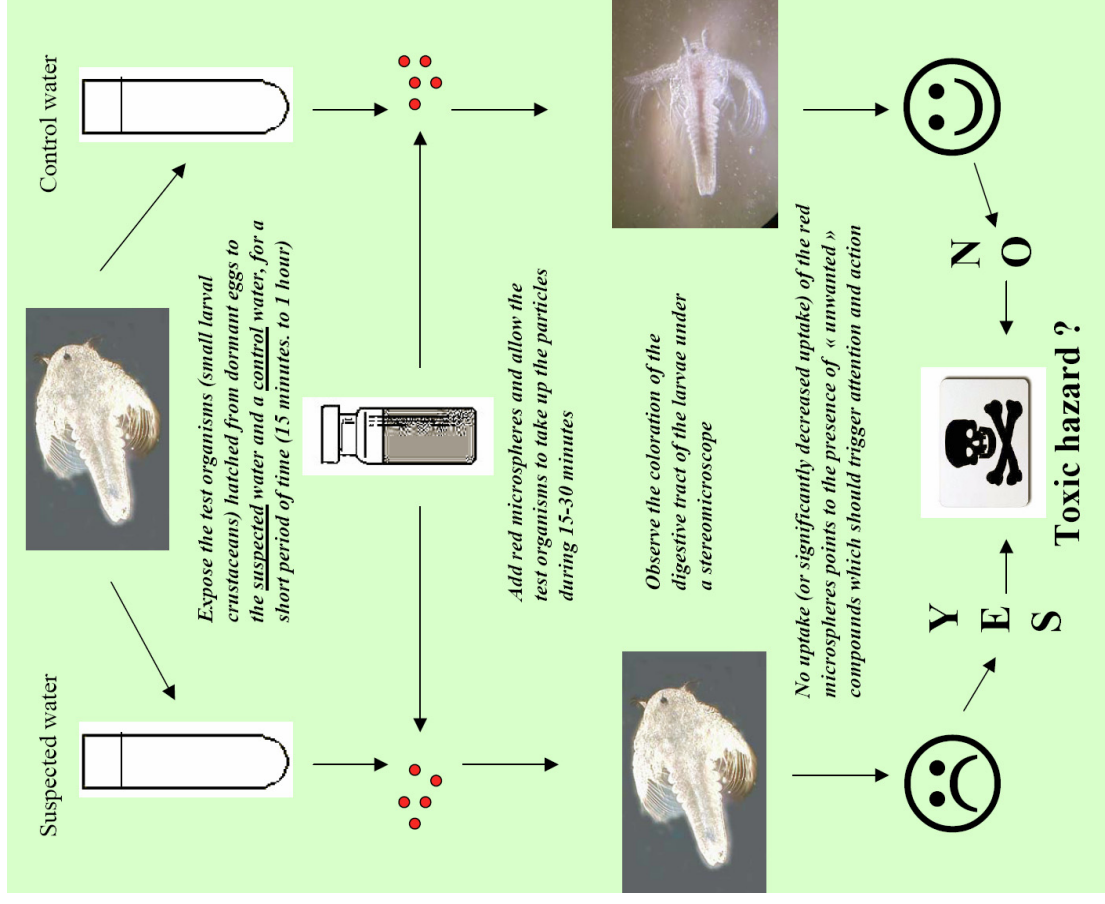
Nevýhody

- 3 dny líhnutí
- Nevyrovnané líhnutí
- Problémy se skladováním
- Povrchové tenze - neplavou

Závěr: zatím není zcela vyladěný

RAPIDTOXKIT

- Test s nejrychlejší odpovědí
- „jídelní test“ – sledováno ovlivnění příjmu potravy stresem (toxickou látkou)
- Testovací organismus: *Thamnocephalus platyurus*
- Uchování: klidová stádia, cysty
- Doba líhnutí: 30-45 hod., 25°C, 4000lx
- Inkubace: 15-60min, 25°C, 4000lx
- Pak přidány červeně obarvené mikrospory (potrava), inkubace 15-30 min
- Vyhodnocení: pod mikroskopem
zhodnocen příjem potravy v jednotlivých expozičních variantách – hodnocena inhibice příjmu mikrospor v porovnání s kontrolou



Testy toxicity na koryšších/vířnících

VALIDITA:

Výsledky testu jsou považovány za platné, když

- Koncentrace rozp. kyslíku neklesla pod 60% nasycení
- Koncentrace testované látky neklesla pod 80%
- Mortalita kontrolního vzorku nepřesáhla 10%
- Zjištěná koncentrace LC_{50} je v souladu se standardy

PŮDA + SEDIMENTY

Mikrobiotest - OSTRACODTOXKIT FTM:

6 denní chronický test toxicity (mortalita/inhibice růstu) s korýšem *Heterocypris incongruens*.

Kontaktní test v mikrodiskách 3x2 jamky (objem 1 ml).
10 jedinců na jamku,

Uchování: klidová stádia, cysty

Doba líhnutí: 52 hod., 25°C, 4000lx

Inkubace: 6 dní, 25°C, 4000lx

Vyhodnocení: mortalita, 24 LC50, růst

OSTRACODTOXKIT F™
MICROBIOTESTS

FOR SEDIMENT TOXICITY TESTING



With the
benthic crustacean
*Heterocypris
incongruens*

Testy toxicity s bezobratlými

Ekonomické hodnocení

(orientační ceny bez cla a dopravy)

- Rotoxkit, Thamnoto..... 1000Kč
- Daphtoxkit 1300Kč
- Algaltoxkit4300Kč
- ECHA Biocide monitor 200Kč
- MetPad 500Kč
- Toxicromotest (SedimentChromoPad),
Toxicromotest1000Kč

Testy toxicity sedimentů

Spíše chroničtější expozice – viz. Chronické testy

– pakomáři, mlži, korýši, kroužkovci - *Hyallela*, *Lumbriculus*

Tubifex tubifex - Nitěnka obecná

kmen: KROUŽKOVCI

třída: opaskovci

podtřída: máloštětinatci

- Součást makrozoobentosu
- Relevantní organismus pro sediment
- Inhibice pohybu a letální koncentrace

Akutní test

Účel: Test je určen k hodnocení akutní toxicity látek na nitěnky. Nitěnky patří mezi nejčastěji a nejdéle používané testovací organismy.

Princip: Test spočívá ve sledování chování a přežívání nitěnek v odstupňovaných koncentracích látky ve srovnání s kontrolou v ředící vodě. Expozice je 48 h. Možno i prologovaný 10-14 denní test

Hodnocené parametry: přežívání, aktivita, bioakumulace



Chronické testy s vodními bezobratlými živočichy

Akvatické testy

- Reprodukční test s hrotnatkou *Daphnia* spp. (ISO 1070/2000)
- Test přežívání a reprodukce s břichatkou *Ceriodaphnia dubia* (USEPA, 1989)

Sedimentové testy

- 10-denní test přežívání a růstu s různonožcem *Hyalella azteca* (USEPA, 2000)
- 42-denní test přežívání, růstu a reprodukce s různonožcem *Hyalella azteca* (USEPA, 2000)
- 10-denní test přežívání a růstu s pakomárem *Chironomus tentans* (USEPA, 2000)

Celoživotní (Life-cycle) test pro hodnocení účinků kontaminace sedimentů s pakomárem *Chironomus tentans* (USEPA, 2000)

Test bioakumulace s máloštětinatcem *Lumbriculus variegatus*

ASTM E 1706 (2005) Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates

- korýš *Hyalella azteca* (*H. azteca*)
- pakomár *Chironomus tentans*
- 10 denní test, 300-mL kádinky, 100 mL sedimentu, 175 mL vody organismy krmeny
- Parametry: přežívání, růst

Další testy sedimentů:

Chironomus riparius, *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*, *Hexagenia* spp.,

Chronický test s *Tubifex tubifex* (28 dní) – přežívání, růst, reprodukce

Chronický test s *H. azteca*

Diporeia spp.

Chironomus dilutus - přežívání, růst, vylétávání, reprodukce

Chronický test na *Daphnia magna*



ČSN ISO 10706 Jakost vod - Stanovení chronické toxicity
látek pro *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)

- organismy mladší 24h
- 10 organismů na koncentraci
- individuálně v 50ml media M4/kádinku
- médium výměna 3x týdně
- expozice 21 dní
- teplota $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- pH 6-9 ($\pm 1,5$)
- fotoperioda 16 h světla / 8 h tmy
- krmení směs řas



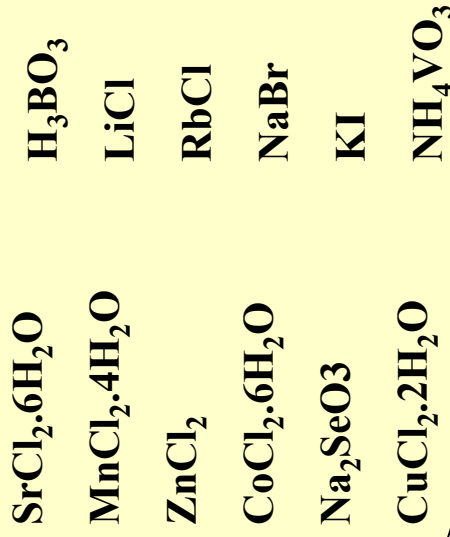
Příprava média Elendt M4

Zásobní roztoky



Roztok I

(stopové prvky)

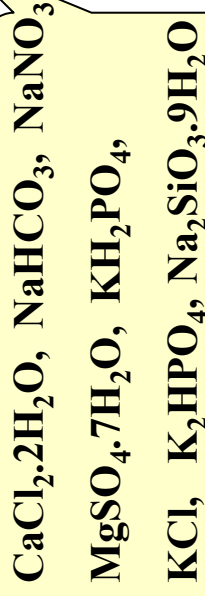


Thiamin
hydrochlorid,
Biotin,
Cyanocobalamin



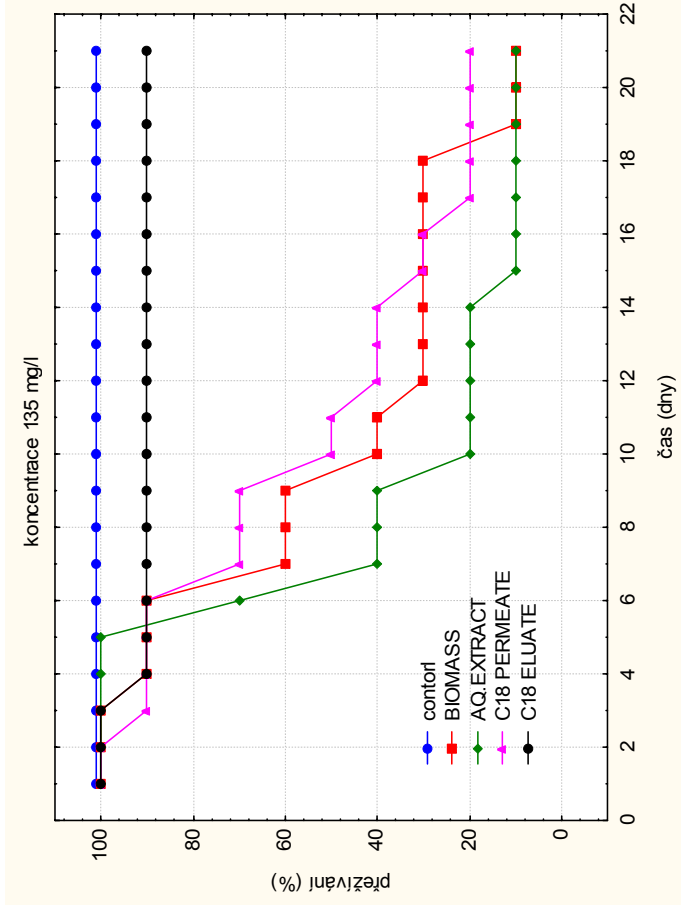
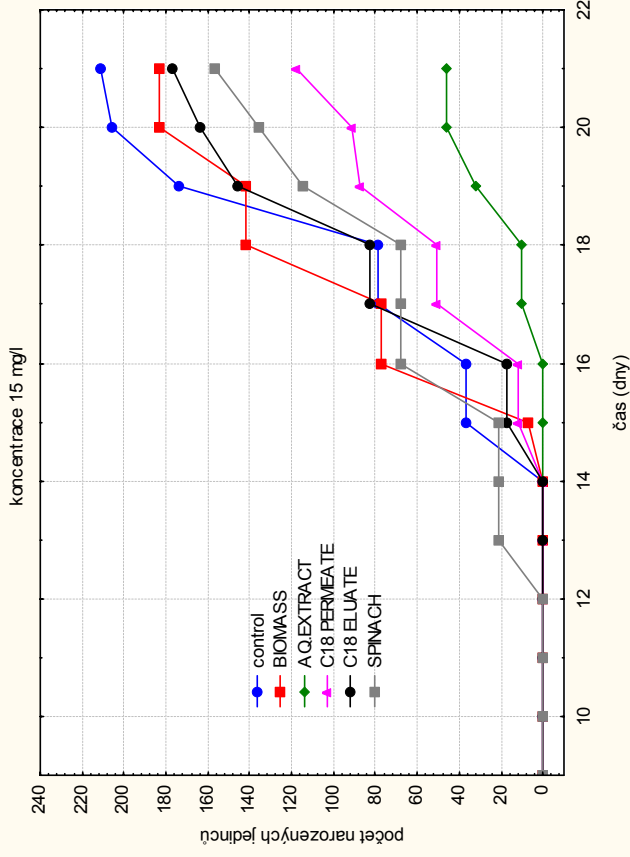
Roztok II.

(makroživiny
vitamíny)



Sledované parametry

- Mortalita, přežívání
- Reprodukce
- Počet narozených juvenilů
- Den první reprodukce
- Chování - způsob pohybu



další efekty (zbarvení, tukové kapénky, velikost gonád)

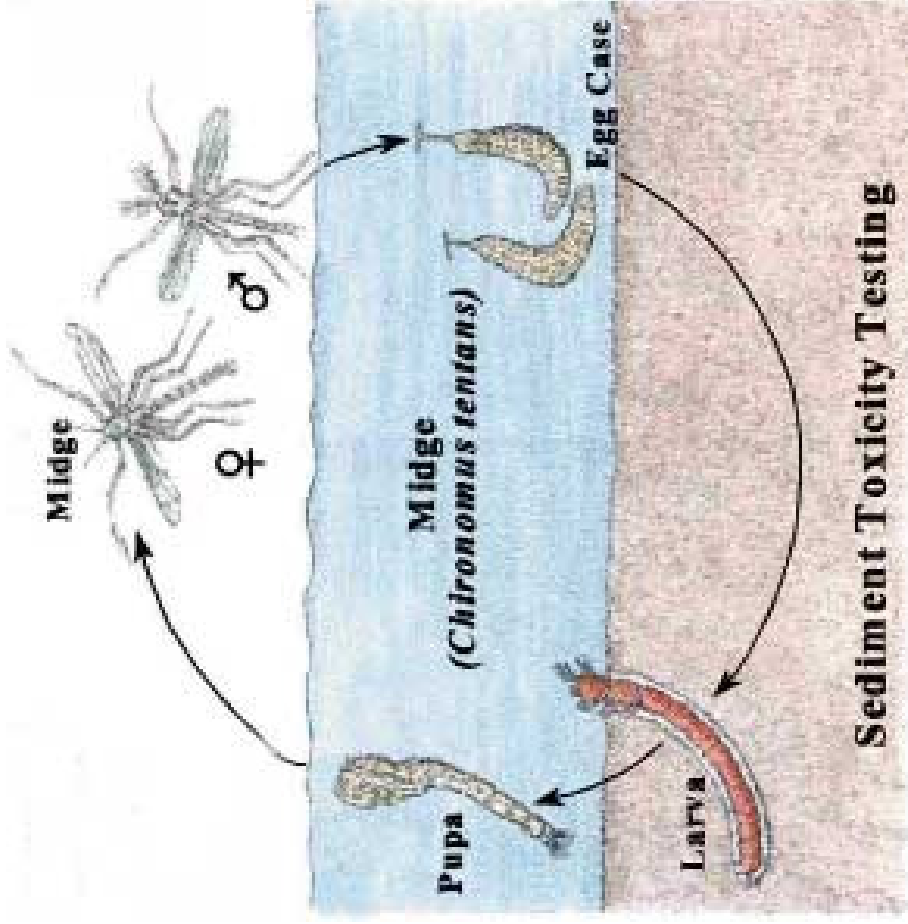
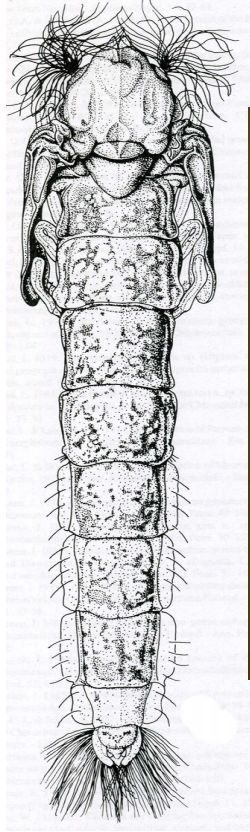
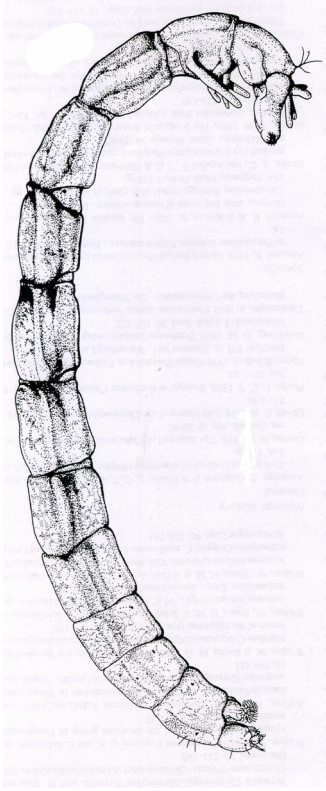
Testy s larvami pakomárů rodu

Chironomus

- OECD 218 Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment
- OECD 219 Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water
- USEPA 2000 Celoživotní (Life-cycle) test pro hodnocení účinků kontaminace sedimentů s pakomárem *Chironomus tentans*



Chironomus riparius Meig. (pakomár)



10-denní test s larvami pakomárů rodu *Chironomus*



Nasazovány larvy ve stadiu 2-3 instaru
(cca 10 d staré)

10 jedinců/kádinku

100 ml sedimentu/175 ml vody

Teplota $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$

Pravidelné krmení, vzduchování

Fotoperioda 16 h světla / 8 h tmy

Sledováno pH, kyslík, vodivost

Po 10 dnech hodnoceno přežívání a růst



Celoživotní (Life-cycle) test pro hodnocení účinků kontaminace sedimentů s pakomárem

Chironomus tentans

Podobné uspořádání jako v 10-denním testu

Nasazovány larvy mladší jak 24 h

12 jedinců/kádinku

100 ml sedimentu/175 ml vody

Teplota $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$

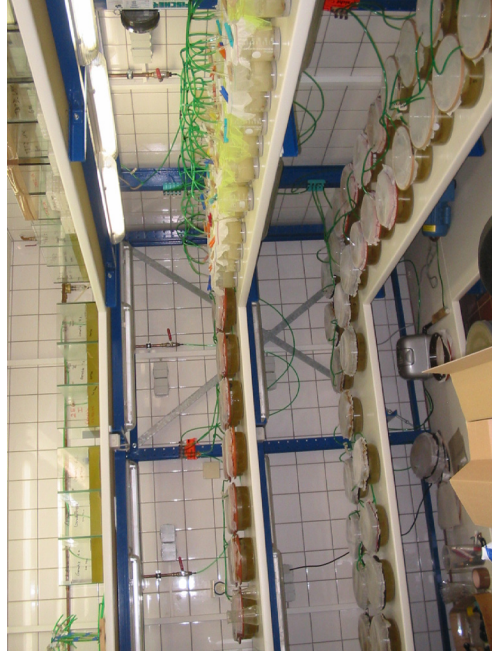
Pravidelné krmení, vzduchování

Fotoperioda 16 h světla / 8 h tmy

Sledováno pH, kyslík, vodivost

Doba expozice 50-60 d (ukončeno 7 dní po posledním vylétnutí)

Hodnocené parametry: 20-denní přežívání a váha (růst), vylétávání samic a samečků – poměr pohlaví, doba vylétávání, počet nakladených vajíček, přežívání dospělců



Endokrinní disrupce (ED) = narušení hormonální rovnováhy organismů s potenciálními negativními následky pro celkovou homeostázu, reprodukční, vývojové a behaviorálních funkce

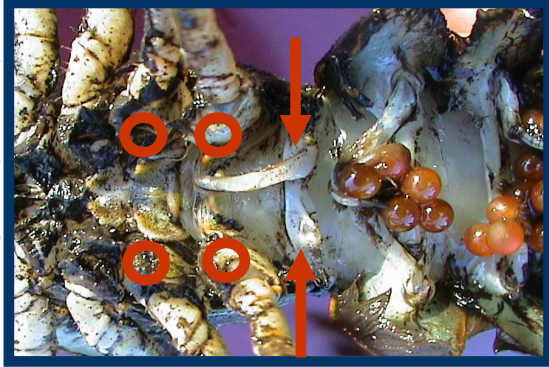
Projevy u bezobratlých:

Narušení reprodukce, rodivosti (fekundita)

Poruchy růstu, sexuálního dozrávání (maturace)

Narušení sexuálního dimorfismu, Intersex, Imposex
další procesy řízené hormony: pigmentace,
regenerace končetin, diapauza

Sagi et al. (2003) – *Cherax quadricarinatus*
Rudolphi (1999) – *Samastacus spiniformis*



Suzuki (1999)
– *Armadillidium vulgare*



Barki et al. (2003)



Jungmann et al. (2004)
– *Gammarus fossarum*



SUBLETÁLNÍ TOXICITA U VODNÍCH MĚKKÝŠŮ

- vodní měkkýši využíváni jako testovací organismy pro vyhodnocení účinků endokrinních disruptorů ve vodním prostředí

Test sedimentů s písečníkem novozélandským *Potamopyrgus antipodarum*

- vhodný a efektivní nástroj pro testování přírodních sedimentů a čistých látek
- finančně atraktivní varianta oproti chemickým analýzám sedimentů



Parametry

„*Potamopyrgus sediment* testu“

trvání 4 týdny (popř. 8 týdnů)

nádoba objem 1 l

médium 800 ml vody

expozice statická, 50 g sedimentu

odběry 20 jedinců po 4 (8) týdnech

parametry mortalita; změny v morfologii pohl. orgánů; počet embryí, poměr embryí bez ulity a s ulitou



✦ nízké nároky na kultivace

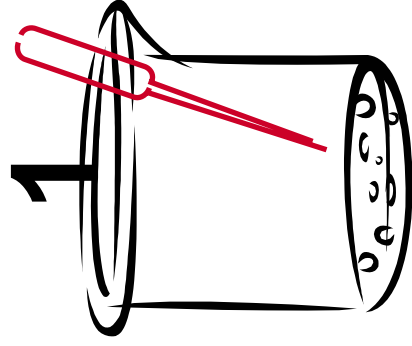
✦ nedostatečná velikost pro biochemické analýzy

Příprava

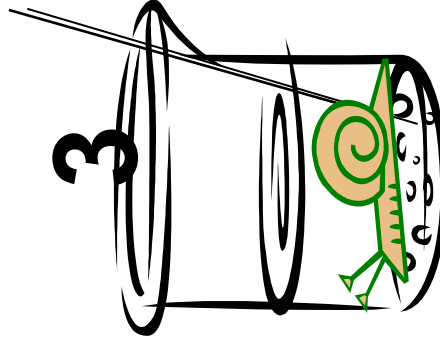
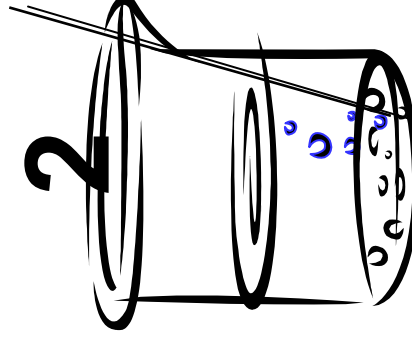
Typy sedimentů

- přírodní
- **artifiální**
 - listová hrabanka + křemitý písek
- **spajkový artifiální sediment**
 - vyhodnocení efektů čistých látek

(1) *spajkování artifiálního sedimentu.* (2) *Po odpaření solventu je přidáno medium* (3) *ustavení rovnováhy mezi sedimentem a vodou, po 4 dnech přidání šneci.*



1
2(3) dny
ve tmě



4 dny

Médium

- voda s přísávkem NaHCO_3 , CaCO_3
- 16°C , $700 \pm 100 \mu\text{S/cm}$

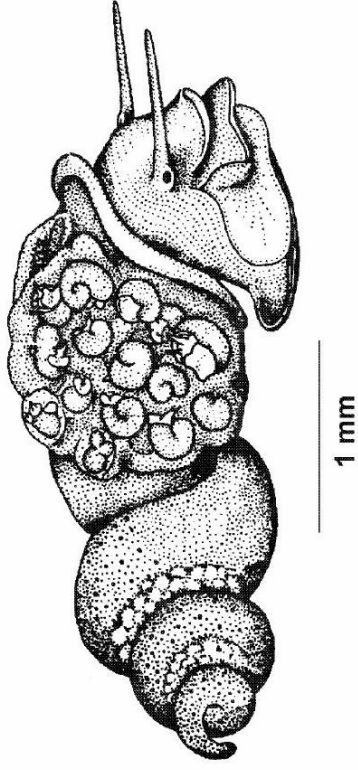
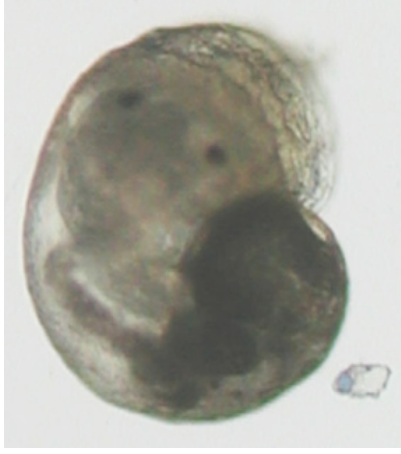
L:D 16:8

**Komerční řasové
pelety**



Expozice, vyhodnocení

Parametry: mortalita a počet plně vyvinutých a nezralých embryí



(Xeno)estrogenní účinek

ethinylestradiol, bisfenol A, octylfenol, nonylfenol

Xenoandrogenní účinek

tributylcín, trifenylycín

Biomonitoring dnových sedimentů (Nisa, Odra)

Testy toxicity s bezobratlými

Závěr

- pro konkrétní případ, vzorek a problém může zkušený ekotoxikolog vybrat vhodnou kompozici detekčního systému
- akutní testy toxicity jsou jednou z několika součástí systému hodnocení
 - chemické analýzy
 - struktura zoocenoz a fytocenoz
 - biokumulace a biokoncentrace
 - QSAR
 - biomarkery
 - atd...