



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Experimentální modely ekotoxicity pro bezobratlé živočichy

Klára Hilscherová
RECETOX- Přírodovědecká fakulta MU Brno



Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Bezobratlí živočichové

- Přítomnost a aktivita bezobratlých je naprosto rozhodující pro stav ekosystému.
- Bezobratlé najdeme ve všech ekosystémech.
- Bezobratlí tvoří významnou část celkové biomasy v terestrických i akvatických ekosystémech, 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.



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Testy ekotoxicity v půdě

hlístice



Půdní testy s bezobratlými

Uspořádání : umělé substrát, vlhčená petriho miska, standardní nebo přírodní půda – různé nádoby...

- zpravidla 14 dní (letalita),
- 56 dní – reprodukce ...

Organismy

Kroužkovci – žížaly, hádátka, roupice

Hmyz - Chvostokoci (*Collembola*)

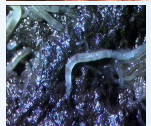
roupice



žížaly



chvostokoci



TERESTRICKÉ PROSTŘEDÍ – konzumenti - bezobratlí

Zejména pro testování biocidů

VČELY

- testování insekticidů
- dávkování v potravě



Moucha domácí



Drosophila

(hodnocení genotoxicity)



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Testy s vodními bezobratlými

Stanovení akutní či prolongované toxicity: chemických látek, výluhů z pevných matic průmyslových či komunálních odpadních vod povrchových nebo podzemních vod

Table 1. Common and scientific names of invertebrates used for acute toxicity testing.*

Order, genus, and species	Common name
Anostraca	Fairy shrimps
<i>Streptocephalus seali</i>	
Claodocera	Daphnids
<i>Simocephalus serrulatus</i>	
<i>Daphnia magna</i>	
<i>Daphnia pulex</i>	
Ostracoda	Seed shrimps
<i>Cypridopsis vidua</i>	
Isopoda	Sowbugs
<i>Asellus bresicaudus</i>	
Amphipoda	Scuds
<i>Gammarus pseudolimnoides</i>	
<i>Gammarus locustinus</i>	
<i>Gammarus fasciatus</i>	
Decapoda	Crayfish
<i>Cricotides naus</i>	
<i>Procambarus</i> sp.	Crayfish
<i>Palaemonetes kodiakensis</i>	Glass shrimp

Plecoptera	Stoneflies
<i>Plecoptera haddii</i>	
<i>Plecoptera valdicensis</i>	
<i>Acroneuria</i> sp.	
<i>Classenia subulosa</i>	
<i>Isoperla</i> sp.	
<i>Siphonura</i> sp.	
Ephemeroptera	Mayflies
<i>Hexagenia bilineata</i>	
<i>Baetis</i> sp.	
Odonata	
<i>Macromia</i> sp.	Dragonflies
<i>Ischnura ventralis</i>	Damselfly
<i>Zygoptera</i>	Damselfly
<i>Trichoptera</i>	Caddisflies
<i>Hydropsyche</i> sp.	
<i>Limnephilus</i> sp.	
Diptera	
<i>Tipula</i> sp.	Cane flies
<i>Chironomus</i> sp.	Fraxion midges
<i>Pentaneurus</i> sp.	Midges
<i>Chironomus plumosus</i>	Midge
<i>Atherix variegata</i>	Stipe fly

*The following life stages of invertebrates were tested: daphnids—first instar; crayfish—early instar; stonefly—first year class (1–20 mm long); second year class (30–40 mm long); and midge—fourth instar. All other invertebrates were designated as naiaid, juvenile, or mature.

Testy toxicity na vodních bezobratlých

Normy testů na bezobratlých:

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 vířnicích (Rotifera) - *Brachionus calyciflorus*

Testy na kroužkovicích (Annelida) - *Tubifex tubifex*

Testy na hmyzu (Insecta) - *Chironomus tentans*

Testy na měkkýších (Mollusca)

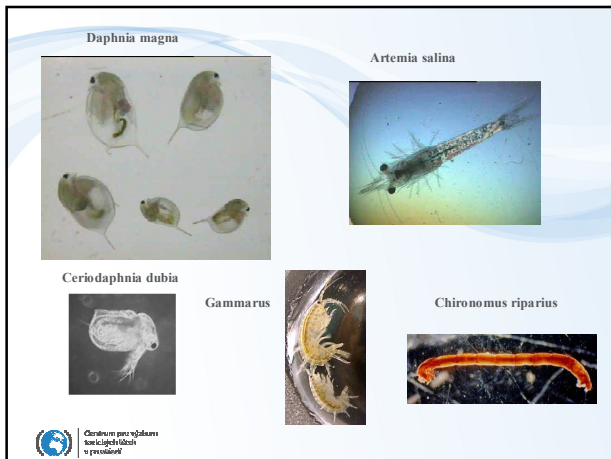
Potamopyrgus antipodarum

Testy na benthických koryších (Crustacea)

Gammarus, *Hyalalea azteca*



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



Hrotnatka velká (*Daphnia magna*)

Říše *Animalia* (živočichové) – kmen *Arthropoda* (členovci) –
podkmen *Crustacea* (korýši) - třída *Branchiopoda* (lupenonožci) – řád
Cladocera (perloočky) – čeleď *Daphniidae* (hrotnatkovití) – rod
Daphnia (hrotnatka)

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

Členění pro vzdělání
v zemědělství
a přirodě

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)

Členění pro vzdělání
v zemědělství
a přirodě

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

3 – 5 mm dlouhý, převážně planktonický sladkovodní živočich dospívají během 6 - 10 dní, množí se partenogeneticky, životnost až 56 dní při 20°C

Členění pro vzdělání
v zemědělství
a přirodě

Akutní test na *Daphnia magna*

Cíl: určení počáteční koncentrace, která v testu imobilizuje 50% jedinců *Daphnia magna*

Podmínky akutního testu:

- jedinci mladší 24 hodin, získání partenogenezí
- expozice 24/48 h, bez aerace, bez krmení, bez úpravy pH
- standardní médium (CaCO_3 , MgSO_4 , NaHCO_3 , KCl)
- bez osvětlení nebo 16 h světla / 8 h tmy, teplota $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$
- pH 6 - 9 (změna během testu $\text{max} \pm 1,5$)
- během testu měříme pH, teplotu, O_2
- rozpuštěný kyslík $\geq 2\text{mg/l}$ / $\geq 3\text{mg/l}$
- referenční látka: dichroman draselný

Zpracování a příprava vzorků vody

- Láhev se naplní vzorkem, aby se zamezilo přístupu vzduchu.
- Zkouška toxicity se provede co nejdříve po odběru, nejpozději do 6 hod. Pokud není možné tento interval dodržet, vzorek se na místě odběru zchladí na $+4^\circ\text{C}$ [nebo zmrazí na -20°C]. V tomto případě musí být vzorek zpracován do 48 hod.

Členění pro vzdělání
v zemědělství
a přirodě

Vlastní zkouška:

Nejméně: 20 jedinců na koncentraci (4x5ml/5ks),
5 organismů na jamku či nádobku

- nádobka 5-10ml/ks (30 jamková destička (10 ml)) - 2 ml testovaného roztoku na jedince

po 5 jedincích do každé jamky

	1	2	3	4
nejméně 20 jedinců	1	2	3	4
	5	6	7	8
	9	10	11	12
	13	14	15	16
	17	18	19	20

ředící jamka testovací jamky

Zkoušené roztoky:
min. 5 koncentrací + kontrola (testovaná látka + ředící médium)

Členění pro vzdělání
v zemědělství
a přirodě

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 pohybovali tykadly



Platnost výsledků = validita testu

Koncentrace rozpuštěného kyslíku na konci zkoušky je větší nebo se rovná 2 mg.l⁻¹
Procento imobilizace kontrolních vzorků je menší než nebo se rovná 10%
24h-EC50i pro dichroman draselný je v rozsahu od 0,6 do 1,7 mg.l⁻¹

Vyjadřování výsledků

Hodnocení:
Počet imobilních jedinců
počáteční inhibiční koncentrace - hodnoty EC50 (pro 24h a 48h)
popř. nejnižší c pro 100% imobilizaci a nejvyšší c pro 0% imobilizaci

Hodnoty 24h-EC50i, 48h-EC50i a limity odpovídající 0% a 100% imobilizace se vyjadřují:
U odpadních vod v procentech ředění
U chemických látek v miligramech na litr

ALTERNATIVNÍ MIKROBIOTESTY ("toxikity") s bezobratlými

www.microbiotests.be

**THAMNOTOXKIT F™
MICROBIOTESTS**

With the crustacean *Thamnocephalus platyurus*

**ROTOXKIT F
chronic**
Contains all the materials to perform three 48h reproduction assays

**PROTOXKIT F™
MICROBIOTESTS**

With the ciliate protozoan *Tetrahymena thermophila*

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






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

- Výhody: miniaturizace, zkrácení doby inkubace a tím i zjednodušení
- Možnost dlouhodobého uchování testovacích organizmů ve formě kryptobiotických klidových stádií, v lyofilizovaném nebo imobilizovaném stavu.
- Organizmy 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 F™ magna, DAPHTOXKIT F™ pulex: 24-48h test akutní toxicity pro koryše *Daphnia magna* a *Daphnia pulex* (odpovídá OECD a ISO normám)

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

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


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

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

ROTOXKIT F™short –chronic: 48h krátký-chronický (reprodukční) test s viřníkem *Brachionus calyciflorus* (odpovídá francouzské normě AFNOR)

PROTOXKIT F™: 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*
- Uchování: 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 KORYŠI 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) - Koryš <i>Thamnocephalus platyurus</i>	8
12. Příloha 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

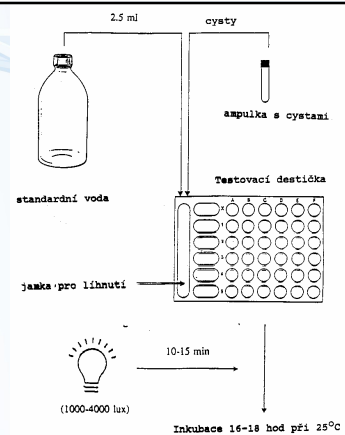
Závěr: zajímavý doplněk testů toxicity, není nutný, je-li v baterii korýš

Obdobně Protoxkit s prvokem *Tetrahymena thermophila*



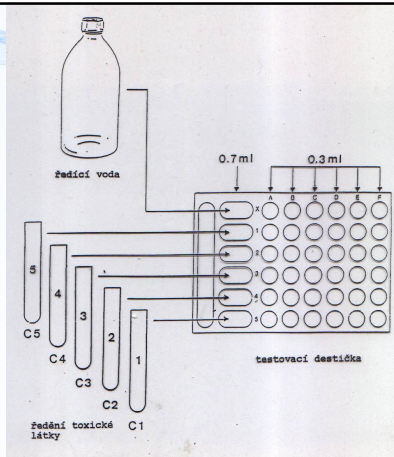
Česká republika
Ministerstvo životního prostředí
ČHMÚL
ČGÚ

Líhnutí cyst vířníků



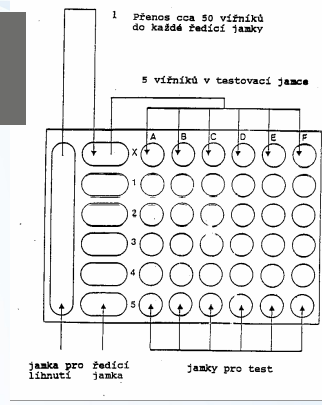
Česká republika
Ministerstvo životního prostředí
ČHMÚL
ČGÚ

Plnění testovací destičky



Česká republika
Ministerstvo životního prostředí
ČHMÚL
ČGÚ

Přenos vířníků do testovacích jamek



Česká republika
Ministerstvo životního prostředí
ČHMÚL
ČGÚ

Daphtoxkit pulex

Výhody

- Jako ISO, OECD
- Z klidových stádií

Nevýhody

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

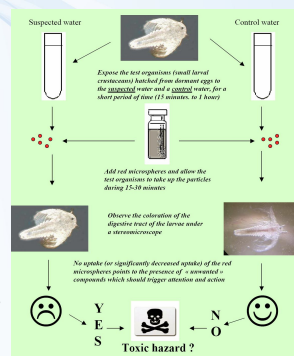
Závěr: zatím není zcela vyladěný



Česká republika
Ministerstvo životního prostředí
ČHMÚL
ČGÚ

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



Česká republika
Ministerstvo životního prostředí
ČHMÚL
ČGÚ

Testy toxicity na korýších/vířnicích

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 LC₅₀** 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,

OSTRACODTOXKIT FTM
MICROBIOTESTS
FOR SEDIMENT TOXICITY TESTING

With the
benthic crustacean
*Heterocypris
incongruens*



Uchování: klidová stádia, cysty
Doba líhnutí: 52 hod., 25°C, 4000lx
Inkubace: 6 dní, 25°C, 4000lx
Vyhodnocení: mortalita, 24 LC50, růst



Testy toxicity s bezobratlými

Ekonomické hodnocení

(orientační ceny bez cla a dopravy)

- Rotokit, Thamnoto..... 1000Kč
- Daphtokit 1300Kč
- Algaltokit 4300Kč
- ECHA Biocide monitor 200Kč
- MetPad 500Kč
- Toxichromotest (SedimentChromoPad),
Toxichromotest 1000Kč



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)
- Chronické biotesty s vidlonožci (*Mysidacea* – řád korýšů z podtřídy rakovců) – mošňi, pronikají i do brakických a sladkých vod

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)



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 média M4/kádinku
 - médium výměna 3x týdně
 - expozice 21 dní
 - teplota 20 ± 2°C
 - pH 6-9 (±1,5)
 - rozpuštěný O₂ > 3mg/l
 - fotoperioda 16 h světla / 8 h tmy
 - krmení směs řas
- Jednou týdně: O₂, teplota, tvrdost a pH v médiu, kontrolních nádobách a u nejvyšší zkušební koncentrace.



Příprava média Elendt M4

Zásobní roztoky

SrCl₂·6H₂O H₃BO₃
MnCl₂·4H₂O LiCl
ZnCl₂ RbCl
CoCl₂·6H₂O NaBr
Na₂SeO₃ KI
CuCl₂·2H₂O NH₄VO₃

Roztok I
(stopové prvky)

Thiamin
hydrochlorid,
Biotin,
Cyanocobalamin

Roztok II.
(makroživiny
vitamíny)

CaCl₂·2H₂O, NaHCO₃, NaNO₃
MgSO₄·7H₂O, KH₂PO₄,
KCl, K₂HPO₄, Na₂SiO₃·9H₂O



Zkušební roztok a zkušební koncentrace

Zkušební koncentrace se připravuje alespoň v pěti variantách s faktorem $3,2$ (geometr. řada)

$$c_n = c_0 * q^n \quad n = 1, 2, 3, \dots$$

Rozptyl koncentrací se nastavuje podle cíle testu:

- LOEC/NOEC
- EC_x

Nepoužívá se koncentrace se statisticky významným účinkem na přežití dospělců -> toxicita pro reprodukci a mortalitu

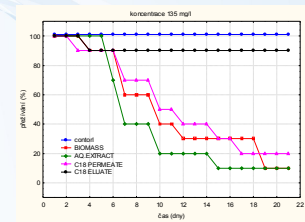
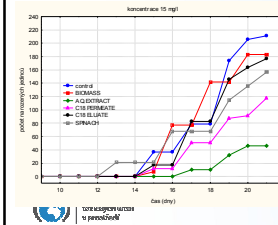
Rozpouštědla a dispersanty do 0,1 ml/l, lépe je nepoužívat



Centrum pro výzkum
ekotoxicologických
a reprodukčních
procesů

Sledované parametry

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



další parametry (zbarvení, tukové kapénky, velikost gonád)
- měření délky matečných organismů na konci zk.
- velikost a počet potomků jednoho organismu
- počet potracených plůdků,...

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 fytoocenoz
 - biokumulace a biokoncentrace
 - QSAR
 - biomarkery
 - atd...



Centrum pro výzkum
ekotoxicologických
a reprodukčních
procesů



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována
Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem
České republiky



Centrum pro výzkum
ekotoxicologických
a reprodukčních
procesů