EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY S PRODUCENTY (ÚVOD DO BLOKU PŘEDNÁŠEK)

Blahoslav Maršálek

RECETOX, Kamenice 126/3, 625 00 Brno *a* Botanický ústav AVČR, Květná 8, 603 65 Brno, Marsalek@brno.cas.cz

Terminologická poznámka: v hektické době překladů odporných termitů překladatelskými společnostmi ze světové literatury do češtiny se lze v současné době setkat s různým způsobem používanými termíny fytotoxicita a fytotoxiny. Ekotoxikologické biotesty využívající producenty (fotoautotrofní organismy) lze označit také jako testy fytotoxicity. Fytotoxiny v původním významu tohoto termínu nejsou látky toxické proti fotoautotrofním organismům (podstatně lepší termín v tomto případě je označení látky herbicidní) ale fytotoxiny jsou toxiny produkované rostlinami (alkaloidy, glykosidy, antibiotika atd.). Tato terminologie je mezinárodně ustálená, takže stejně jsou chápány mykotoxiny (toxiny produkované plísněmi a houbami), cyanotoxiny (toxiny produkované sinicemi) apod.

Přehled základních typů organismů používaných pro ekotoxikologické biotesty s producenty

Mezi tyto testy řadíme všechny biotesty, které používají producenty (fotoautotrofní organismy) . Patří sem zejména:

- **Sinice** (fotosyntetizující gramnegativní eubakterie) koloniální (Microcystis), vláknité (Anabaena, Nostoc) a pikocyanobakteria jednobuněčné (Synechocystis). Dusík fixující sinice jsou velmi citlivé na toxické látky a inhibice nitrogenázy patří mezi vhodné endpointy.
- **Řasy – jednobuněčné, cenobiální, vláknité, sladkovodní, mořské.** Podrobněji viz článek Řasové testy trofie a toxicity v tomto sborníku. Kromě klasických biotestů s jednou řasou, jsou používány tzv. Multispecies algal asays (paralelní kultivace zástupců zelených řas, sinic a rozsivek dle podmínek zkoumané lokality), nebo fyziologické testy (hodnocení fotosyntetické aktivity, enzymatické aktivity, nebo rozmnožovací aktivity) přírodních populací fytoplanktonu. Opomíjené v ČR, ale v zahraničí pro ekotoxikologické studie ceněné jsou biotesty s perifytonem a fytobentickými společenstvy, které lze využít také pro biochemickou ekotoxikologii a pro studium bioakumulace toxikantů.
- **Mechy a lišejníky -** tyto metody jsou přehledně popsány v příspěvku Dr. Petra Anděla v tomto sborníku. Využívány jsou jednak bioindikační postupy s přirozenými společenstvy lišejníků, nebo s tzv. transplantovanými druhy, u kterých známe stáří a historii. Předmětem hodnocení endpointy, viz ANDĚL (2003) v tomto sborníku. V případě mechů nejsou propracovány metodiky ekotoxikologického hodnocení tak podrobně jako v případě lišejníků, ale např. vodní mech *Fontinalis* je využíván jako producent s vysokým potenciálem pro bioakumulaci kovů.
- **Okřehek a submerzní vegetace**- Mezi nově navrhovanými metodikami OECD je v praxi již dlouho používaná metoda OECD 221 *Lemna* sp. Growth Inhibition Test (Draft New Guideline,). V některých laboratořích je také pouřívána *Spirodela polyrhyza,* ale dle našich zkušeností je *Lemna minor* citlivější, než *Spirodela*. Dále je využívána *Elodea canadensis* a *Myriophyllum sp*. Jejich nevýhodou je sezónnost použití, která je omezena na květen až říjen, v zimním období neposkytují použitelné výsledky.

- **Testy s cévnatými rostlinami** – jsou typickými testy pro hodnocení terestrických ekosystémů (orná půda, lesní půdy, hodnocení kompostů, tuhých odpadů, pesticidů apod.). Existuje velké množství testů s cévnatými rostlinami a proto předkládám pro orientaci zjednodušený přehled:
    - Testy s **bylinami** (nejčastěji jednoleté, do 30 dnů po vyklíčení), nebo **dřevinami** (lesní kultury, aktivita mykorhyzy, genetické změny schopnosti syntetizovat kutikulu – obrana před imisemi, genotoxické efekty)
    - Testy s **plevelnými druhy** zde rozlišujeme tzv target species – tedy ty, které mají být např. herbicidy omezeny (oves hluchý, metlice chundelka, svlačec rolní, pýr plazivý apod.) a tzv. non-target species, které mají být nepoškozeny , versus testy s **kulturními plodinami** (kukuřice, pšenice, cukrová řepa, ovocné sady, vinice apod.
    - Testy cílené na **jednoděložné** (např. traviny) a **dvouděložné** – (řepa, konopí, sady, listnaté lesy) – toto kriterium je důležité např. při vývoji herbicidů.
    - Dle zdroje matečného testovacího organismu dělíme testy s cévnatými rostlinami na testy využívající **semena** (nejčastější způsob), dále využívající **cibule a hlízy** (např. ASTM test s *Alium cepa*) a metody využívající **vegetativně množený matečný materiál** (*Lemna, Elodea*).
    - Dle způsobu experimentálního uspořádání dělíme na testy využívající **extrakt** na filtračním papíru v petriho misce (nejméně přirozený, ale často používaný způsob), dále **přímý kontakt** sedimentu, odpadu, nebo zeminy s klíčící rostlinou v petriho misce či květináči v prvních 2-6 týdnech po vyklíčení, a konečně **nádobové pokusy** postihující celý životní cyklus rostliny

Přehled vybraných <u>způsobů vyhodnocování</u> používaných pro ekotoxikologické biotesty s producenty

- Řasy a sinice hodnotíme většinou pomocí změny počtu buněk v čase experimntu ve srovnání s kontrolou. Alternace jsou pomocí koncentrace pigmentů (např. chlorofylu a), fyziologické aktivity (příjmu živin) a metabolické aktivity (fotosyntetické aktivity, enzymatické aktivity)
- Lišejníky hodnotíme dle struktury přirozených společenstev, metabolické aktivity přírodních a exponovaných (transplantovaných) druhů, dle morfologických – fytopatologických změn na stélce, dále dle bioindikačních hodnot (citlivých a toxitolerantních taxonů).
- Okřehek a submerzní vegetace- nejčastěji je počítán počet nových lístků, ale alternativně lze hodnotit hmotnost, defekty tvorby chlorofylu, nepřirozené tvary a celou škálu biochemických paramerů (esterázy, dehydrogenázy, SOD, glutation, RUBISCO, až po metody využívající zobrazování a kinetiku fluorescence chlorofylu pomocí CCD fluorescenční kamery- viz Gavel a Maršálek v tomto sborníku).
- Testy s cévnatými rostlinami mají desítky způsobů vyhodnocení, které se řídí především cílem realizovaného testu.Vyhodnocení probíhá většinou měřením délky kořene, hypokotyle, popřípadě nadzemní části rostliny a plochy listů. Toto měření je však jen jedna z možností a dle našich zkušeností ne ta nejcitlivější. Dále je vhodné měřit hmotnost živé nadzemní biomasy a její sušinu, hmotnost živé biomasy kořene a jeho sušinu, do protokolu je vhodné uvádět defekty chlorofylu, nekrózy a další

pozorované abnormality. Test toxicity na cévnatých rostlinách lze vyhodnocovat také pomocí aktivit dehydrogenáz, fosfatáz, oxidáz nebo peroxidáz, popř. syntézy glutationu. V případě nádobových pokusů hodnotíme také dobu nutnou k dosažení fenologických fází (např. odnožování, sloupkování, metání, kvetení, zrání semen, klíčivost semen , odolnost proti chorobám a škůdcům ve srovnání s kontrolou apod. V případě lesních dřevin hodnotíme přírůstky, odolnost proti chorobám a škůdcům, fotosyntetickou aktivitu, ovlivnění syntézy kutikuly, přítomnost a aktivitu mykorhyzy atd.

Možnosti využití producenů pro různé typy ekotoxikologických testů

- **Stanovení toxických efektů – letalita, inhibice růstu, nebo fyziologických procesů.**
- **Genotoxicita, mutagenita.** Možnost použít řasy a cévnaté rostliny pro detekci chromozomových zlomů, tvorby mikrojadérek, iniciace nádorů na kořenech, poruchy tvorby kutikuly, mutace na úrovni intaktní rostliny, tvorba DNA aduktů atd.
- Hodnocení **detoxifikační aktivity**, přítomnost a aktivita detoxifikačních systémů (PCR, ELFO, LC-MS, formy glutationu, SOD apod.
- Hodnocení **vlivu toxikantů na rezistenci k patogenním organismům**
- Využití fototrofních organismů pro **hodnocení biokumulací a biokoncentrací** toxikantů v přírodním prostředí.
- Hodnocení podílu autotrofních organismů na detoxifikaci/ imobilizaci toxických látek v životním postředí (**bioremediace pomocí cévnatých rostlin, nebo cyanobakterií**)

Závěr

Cílem tohoto úvodního článku nebylo podat ucelený přehled testů toxicity s producenty, ale nastínit možnosti hodnocení toxických účinků na fotoautotrofní organizmy v ekotoxikologických souvislostech.
Především však bylo cílem tohoto přehledu uvést do bloku přednášek, které by měly připomenout, že ekotoxikologické biotesty a producenty dnes již nejsou jen testy na řasách v E-láhvích a klíčení hořčice v petriho miskách, ale že jsou propracovány standardní operační procedury pro celou řadu alternativních testů, které mají určité výhody (jsou citlivější, rychlejší, levnější, relevantnější pro určitý typ vzorků a sledovaných lokalit apod.).