



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## Testy toxicity sedimentů

K.Hilscherová



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

## Sedimenty

- velmi různorodé složení - polotuhá matrice - pevná fáze (částice) a pórová voda
- v podstatě akvatický ekvivalent půdy
- heterogenní prostředí - směs jílu, písku, minerálů, huminových látek, odumřelých organismů a antropogenních polutantů
- akumulace a inaktivace polutantů (např. AVS – kovy, Corg – PAHs)
- primární úložiště biotického i abiotického materiálu (včetně polutantů) v akvatickém prostředí
- akumulace polutantů v sedimentech může způsobit:
  1. Změny ve struktuře bentických společenstev
  2. Zvýšené zatížení organismů polutanty
  3. Toxicitu



## Klasifikace sedimentů

1. Obsah organického uhlíku – ovlivňuje sorpci neutrálních organických látek → zvýšené Kow = zvýšená sorpce
  2. Distribuce zrnitostních frakcí – větší částice mají tendenci sorbovat méně polutantů
  3. Obsah a typ jílu
  4. Kationtová výměnná kapacita (KVK) – ovlivňuje sorpci kationtů
1. pH – ovlivňuje speciaci kovů, sorpci

Další fyzikálně chemické parametry  
– DO, salinita, amoniak



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## Transport a resuspendace sedimentů

Proudy, povodně, vítr, vlny

- Způsobují pohyby sedimentů v závislosti na jejich velikosti

Porová voda

- Voda mezi částicemi sedimentů
- Nepolární polutanty → sedimenty → porová voda → vodní sloupec
- Primární zdroj expozice polutantů pro organismy žijící v sedimentu

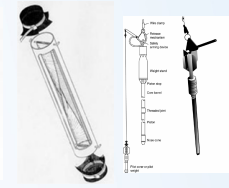
Sedimenty mohou vázat polutanty, pak být překryty další vrstvou sedimentů → redukce biodostupnosti



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## Odběry vzorků sedimentů

- tyčové vzorkovače (vertikální profil, historie sedimentace)
  - pasivní vzorkovače – sedimentové pasti (plaveniny)
  - drapákové vzorkovače (směsné vzorky)
  - SPMDs – odběr určitých typů polutantů (zejm. pórová voda)
- ⊕ **Narušení fyzikálně chemických parametrů sedimentů**



v prostředí

## Manipulace se vzorky

- Uskladnění:  
změny toxicity vzorků v závislosti na teplotě (chlazení (4°C) vs. mražení (<-20°C)), době uskladnění a stupni kontaminace sedimentů
- Úpravy vzorků:
  - 1.) úpravy pH (6-9) – vliv na toxicitu a biodostupnost kovů (Zn, Ni, Pb, Cu, Cd), amoniaku a sirovodíku
  - 2.) lyofilizace vs. zmražení
  - 3.) amoniak – odstranění amoniaku ze vzorku probubláváním nebo přidáním zeolitu
  - 4.) homogenizace
  - 5.) kovy – odstranění kovů přidáním EDTA nebo sulfidů
  - 6.) výluhy (vodné/organické) vs. SPTs – změny toxicity eluátů v závislosti na volbě rozpouštědla (voda, methanol, DCM) vs. toxicita biodostupné frakce kontaminantů
  - 7.) pórová voda vs. SPTs



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## Testy se sedimenty

- Organismy v sedimentu vystaveni látkám zachyceným v pevné i kapalné složce matrice
- Pro bentické organismy - biodostupnost chemických stresorů v sedimentech.
- Sediment = potenciální dlouhodobý zásobník/zdroj kontaminantů uvolněných do vody
- Může být nezbytné remediovat kontaminované lokality bagrováním nebo odstraněním sedimentů
- odstranění sedimentu, jeho transport a uložení mohou být velmi nákladné; studie toxicity umožní identifikovat nebezpečně kontaminované lokality – kde je třeba odstranění, kde možno ponechat bez významného rizika.
- Zejména EPA a ASTM metodiky



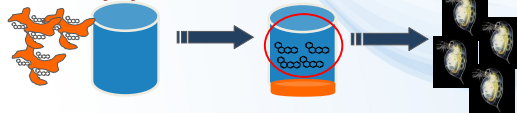
Centrum pro výzkum  
kvality vody  
a prostředí

## Jak hodnotit toxicitu sedimentů?

### ■ Toxicita porové vody/výluhů (několik ISO / OECD norem)

: 100 g d.w./L vody, 24h pomalé třepání, filtrace, test  
V. fisheri (30 min), řasy, bezobratlí - D. magna (2 dny)

### ? Vodný výluh vs. Sediment



### ■ Kontaktní toxicita (jen málo norem ...)

: sedimenty+organismy & hodnocení účinků – červi, hmyz, šneci ... dny - týdny



- Doporučeny nejméně 2 různé druhy (např. Hyalella, Chironomus, Daphnia, ...) a dva různé sledované parametry (např. růst, přežití, reprodukce...)

## Skríningové testy toxicity/genotoxicity

### Bakteriální modely

Testy s výluhy sedimentů:

- *Vibrio fischerii* (Microtox) – 0,5 h
- *Escherichia coli* (Toxichromotest) – 2 h

Kontaktní verze testu

- Flash test s *Vibrio fischerii* – kinetický test - stanovení inhibičního účinku vzorků na světelnou emisi *Vibrio fisheri*
- srovnatelné se statickou zkouškou s luminiscenčními bakteriemi podle ČSN EN ISO 11348
- Flash verze - eliminace vlivu zákalu a zbarvení vzorku, umožňuje provedení testu se suspenzí vzorku bez přípravy vodního výluhu. Je mezistupněm ke kontaktním zkouškám ekotoxicity

Testy genotoxicity s výluhy:

- SOS chromotest
- umuC test
- GFP test atd.



Centrum pro výzkum  
kvality vody  
a prostředí

## Nástroje pro hodnocení

- Základní požadavky
  - Měření zakalených (barevných) materiálů
  - Schopnost rozlišení TOXICKÝ - NETOXICKÝ
  - Rychlost
- Bakteriální bioluminiscenční testy toxicity
  - Klasické – *Microtox*®, *BioTox*™, *LUMISTox* aj.
  - Alternativní – modifikace klasických testů (např. *BioTox*™ Flash test\*)



\* Lappalainen, J. et al. (1999): Chemosphere, 38(5), pp. 1069-1083.

## Microtox

### • *Vibrio fischerii*

- Mořská bakterie schopná bioluminiscence



Design:

- Akutní
- mikrodestička
- Endpoint: inhibice bioluminiscence
- Luminometr – t = 0, 15, 30 minut
- Testování vodního výluhu



Centrum pro výzkum  
kvality vody  
a prostředí

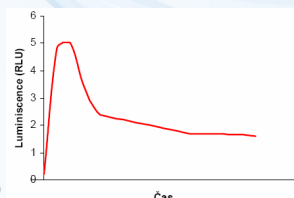
## Flash test

### • *Vibrio fischerii*

- testování zakalených a barevných vzorků, bez potřeby referenčního materiálu

design:

- akutní
- inhibice bioluminiscence
- mikrodestička
- luminometr s dispensorem
- nutné vzorek protřepat (během měření)
- krátká doba měření – Hodnota píku S<sub>max</sub> (0-2s) v porovnání s píkem S<sub>30s</sub> (po 30s měření)



$$\text{INH} = 1 - \frac{S_{30s}}{KF \cdot S_{\text{max}}}$$



Centrum pro výzkum  
kvality vody  
a prostředí

### Akutní testy toxicity I.

- Porová voda
- Eluát ze sedimentu
- 48-96 h expozice
- Příprava eluátu: 24h třepání, 100 g sedimentu/1L vody
- Druhy: *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia dubia*, střevle potoční (*Pimephales Promelas*), pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*)
- Sledované parametry: přežívání, imobilizace



### Akutní testy toxicity II.

- Kontaktní testy - Celý sediment
- 96h – 10 dní expozice
- Druhy: různonožec (*Hyalella azteca*), jepice (*Hexagenia limbata*), pakomár (*C.tentans/riparius*)
- 10-denní test s *Hyalella azteca* a *Chironomus tentans*
- Sledované parametry: přežívání



### Chronické testy toxicity I.

- Porová voda
- Eluát ze sedimentu
- 7-35 dní expozice
- Druhy: *Ceriodaphnia dubia*, střevle potoční (*Pimephales Promelas*), pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*)
- Sledované parametry: přežívání, imobilizace, růst, reprodukce, doba první reprodukce, doba úhynu, přežívání mladých



### Chronické testy toxicity II.

- Kontaktní testy - Celý sediment
- Zpravidla 28 dní expozice
- Druhy: různonožec (*Hyalella azteca*), pakomár (*C.tentans/riparius*)
- Sledované parametry: přežívání, imobilizace, růst, reprodukce, doba první reprodukce, doba úhynu, přežívání mladých
- 28- a 42-denní testy s *H. azteca*
- Sub-chronické a celoživotní testy s *Chironomus tentans*
- 10-denní krátkodobý chronický test s larvami obojživelníků



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

- koryš *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



### Ekotoxikologické biotesty se sedimenty – přehled EPA

Test Medium	Species	Common Name
Freshwater benthic	<i>Chironomus dilutus</i>	Chironomid, midge larvae
	<i>Chironomus riparius</i>	Chironomid, midge larvae
	<i>Hyalella azteca</i>	Amphipod, scud
	<i>Lumbriculus variegatus</i>	Oligochaete, "worm"
	<i>Gammarus pulex</i>	Amphipod
	<i>Hexagenia limbata</i>	Ephemeroptera, mayfly
	<i>Tubifex tubifex</i>	Oligochaete
Marine Benthic	<i>Diporeia sp</i>	Amphipod, Great Lakes
	<i>Americamysis bahia</i> <sup>1</sup>	Mysid shrimp
	<i>Ampelisca abdita</i>	Amphipod (Atlantic)
	<i>Eohaustorius estuarius</i>	Amphipod (Pacific)
	<i>Leptocheirus plumulosus</i>	Amphipod (Atlantic)
	<i>Rhepoxynus abronius</i>	Amphipod (Pacific)
	<i>Granditerella japonica</i>	Amphipod

www.epa.gov



## Ekotoxikologické biotesty se sedimenty – přehled EPA

	<i>Psammochinus miliaris</i>	Shore urchin
	<i>Mercenaria mercenaria</i>	Hard shell clam
	<i>Mulinia lateralis</i>	Dwarf surf clam
	Microtox ( <i>Vibrio fischeri</i> )	Bacteria
Freshwater Pelagic	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Cladoceran, water flea
	<i>Daphnia magna</i>	Cladoceran, water flea
	<i>Daphnia pulex</i>	Cladoceran, water flea
	<i>Pimephales promelas</i>	Fish, fathead minnow
	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Fish, brook trout
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Fish, rainbow trout
Marine Pelagic	<i>Atherinops affinis</i>	Fish, topsmelt
	<i>Cyprinodon variegatus</i>	Fish, sheepshead minnow
	<i>Menidia beryllina</i>	Fish, silverside

www.epa.gov



## Testy toxicity sedimentů ASTM

**Table 3.6. Some freshwater sediment toxicity tests (ASTM E1383, 1993)**

<b>Species:</b>	1. Amphipod ( <i>Hyalella azteca</i> ) 2. Midge: <i>Chironomus tentans</i> , <i>Chironomus riparius</i> 3. <i>Daphnia magna</i> and <i>Ceriodaphnia dubia</i> 4. Mayflies ( <i>Hexagenia</i> spp.)
<b>Endpoints:</b>	1. Number of young; survival, growth & development; reproductive capacity 2. Larval survival and growth, adult emergence 3. Survival and reproduction 4. Mortality, growth, burrowing behaviour, moulting frequency
<b>Duration:</b>	10–30 days for tests 1 and 2; 2–7 days for test 3; 7–21 days for test 4
<b>Temperature (°C):</b>	20–25 for test 1; 20–23 for test 2; 25 for test 3; 17–22 for test 4
<b>Conditions:</b>	Static for all tests; flow-through for tests 1 and 2; recirculating for test 4
<b>Level of effort:</b>	Medium for all tests



## Testy toxicity sedimentů ASTM

**Table 3.7. Some marine and estuarine sediment toxicity tests (ASTM E1383, 1993)**

<b>Species:</b>	1. Amphipods 2. Fish, crustaceans, zooplanktons, or bivalves 3. Infaunal amphipods, burrowing polychaetes, mollusks, crustaceans, or fish
<b>Material:</b>	1. Whole sediment 2. Dredged material (elutriate) 3. Dredged material (whole sediment)
<b>Endpoints:</b>	1. Mortality, emergence, renurial 2. Mortality 3. Survival
<b>Duration:</b>	10 days for tests 1 and 3; 2 days for zooplankton and fish larvae in test 2 and 4 days for bivalves and crustaceans in test 2
<b>Temperature (°C):</b>	20–25 for test 1; 20–23 for test 2; 25 for test 3; 17–22 for test 4
<b>Conditions:</b>	Static for all tests; flow-through for tests 1 and 2; recirculating for test 4



## Testy toxicity sedimentů

Spíše chroničtější expozice – viz. Chronické testy  
– pakomáři, mži, koryši, kroužkovci - *Hyalella*, *Lumbriculus*

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 ředicí vodě. Expozice je 48 h. Možno i prolougování 10-14 denní test  
Hodnocené parametry: přežívání, aktivita, bioakumulace

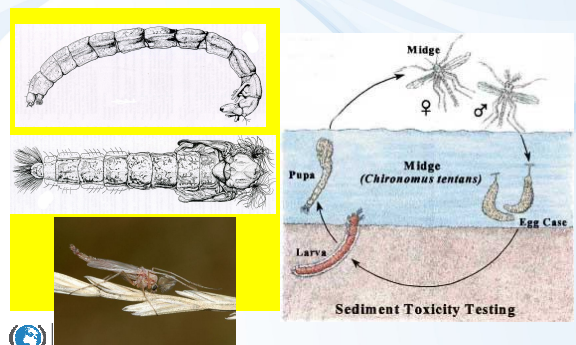


## Testy s larvami pakomárů rodu *Chironomus*

- 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*

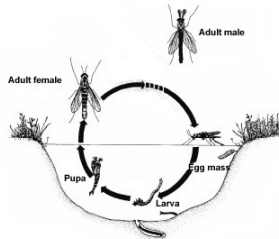


## *Chironomus riparius* Meig. (pakomár)



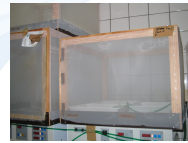
### Charakteristika modelového druhu

- rod *Chironomus* - řád dvoukřídlí (*Diptera*) = hmyz s proměnou dokonalou
- vajíčko-larva(4 instary)-kukla-imago
- dominantní konzumenti 1. řádu v rámci sladkovodních akvatických ekosystémů
- značná abundance
- kosmopolitní rozšíření
- larvy - všežravci  
- žijí se řasami, rozsivkami, detritem



Centrum pro výzkum  
kontaminace  
v prostředí

### 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 ± 2°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



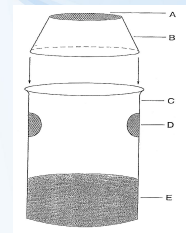
Centrum pro výzkum  
kontaminace  
v prostředí

- Nasazovány larvy mladší jak 24 h
- 12 jedinců/kádinku
- 100 ml sedimentu/175 ml vody
- Teplota 20 ± 2°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 samiček a samečků – poměr pohlaví, doba vylétávání, počet nakladených vajíček, přežívání dospělců

### Celoživotní test - dle OECD #218/219

- provádí se v 600ml kádinkách
- sediment uměle připravený nebo přírodní
- voda - studniční, povrchová, provozní, uměle připravená
- sediment : voda 1:4
- 20 ± 2°C, 500 – 1000 lux, 16L : 8D

- A. nylonová síťka
- B. plastový kryt
- C. kádinka bez zobáčku
- D. otvory na výměnu vody
- E. sediment



Centrum pro výzkum  
kontaminace  
v prostředí

kontaminace: sedimentu  
vody nad sedimentem  
koncentrační řada: aspoň 5 koncentrací  
 $f \leq 2$   
kvalita vody - pH 6-9, rozpuštěný kyslík – aspoň 60% ASV, změřit tvrdost a amoniak  
vzdušnění – Pasteurovou pipetou (jemně)

### Celoživotní test - dle OECD #218/219

- 1-4 dny staré larvy vysazujeme do sedimentu
- 20 jedinců/kádinku
- počet opakování: 3 - ECx; 4 - NOEC, LOEC
- krmení– tetrafin<sup>®</sup>, 0,25-0,5 mg/larva/den
- délka trvání – 28d (*C. riparius*)



Centrum pro výzkum  
kontaminace  
v prostředí

### Celoživotní test - dle OECD #218/219

#### Cílové parametry:

- procento líhnutí dospělců:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

ER: procento líhnutí dospělců (emergence ratio)

$n_a$ : počet jedinců vysazených do kádinky

$n_e$ : počet vylíhnutých jedinců celkem (na konci pokusu)

Přijatelnost testu: ER kontroly >0,7

- střední čas vývoje: čas od vysazení do líhnutí



Centrum pro výzkum  
kontaminace  
v prostředí

• střední rychlost vývoje:

$$\bar{x} = \sum_{i=0}^m \frac{f_i x_i}{n_e} \quad x_i = \frac{1}{den_i - l_i / 2}$$

*x*: střední rychlost vývoje v kádince  
*i*: index intervalu mezi pozorováními  
*m*: počet všech intervalů mezi pozorováními  
*f<sub>i</sub>*: počet vylíhnutých jedinců během daného intervalu  
*n<sub>e</sub>*: počet vylíhnutých jedinců celkem (na konci pokusu)  
*x<sub>i</sub>*: rychlost vývoje larev vylíhnutých v intervalu *i*  
*den<sub>i</sub>*: den pozorování (od začátku)  
*l<sub>i</sub>*: délka intervalu mezi pozorováními (obvykle 1 den)

ECx	Regresní analýza
NOEC, LOEC	ANOVA
Závislost citlivosti na pohlaví	Chi-square
Procento vylíhnutých jedinců	Cochran-Armitage test, Fisher's exact test, Mantel-Haentzel test s Bonferroni-Holm úpravou p-hodnot, ANOVA (+arsin transformace)

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

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

Barki et al. (2003)

**SUBLETÁLNÍ TOXICITA U VODNÍCH MĚKKÝŠŮ**

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

**Test sedimentů s písečником novozélandským *Potamopyrgus antipodarum***

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

Členství mezi výzkumnými institucemi v prostředí

**Parametry „Potamopyrgus sedimentu“**

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
- uměle vytvořený
- spajkový uměle vytvořený sediment

vyhodnocení efektů čistých látek

- (1) spajkování uměle vytvořeného sedimentu.
- (2) po odpaření solventu je přidáno médium
- (3) ustavení rovnováhy mezi sedimentem a vodou, po 4 dnech přidání šnečí.

**Médium**  
 - voda s přísadkami NaHCO<sub>3</sub>, CaCO<sub>3</sub>  
 - 16°C,  
 - 700±100µS/cm

**L:D 16:8**  
**Komerční řasové pelety**

1 2(3) dny ve tmě 3 4 dny

Členství mezi výzkumnými institucemi v prostředí

**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)

Členství mezi výzkumnými institucemi v prostředí

