

## Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití.

Doc. Ing. Blahoslav Maršálek, CSc.,

Oddělení experimentální fykologie a ekotoxikologie, Botanický ústav AVČR,

Květná 8, 603 65 Brno, [Marsalek@brno.cas.cz](mailto:Marsalek@brno.cas.cz) , Tel/Fax 05 43241911

a RECETOX – Výzkumné centrum pro chemii životního prostředí a ekotoxikologii,

Masarykova univerzita Kamenice 3, 618 00 Brno, [Marsalek@recetox.muni.cz](mailto:Marsalek@recetox.muni.cz)

### Úvod

Biotest nazývaný také jako bioassay je definován jako „zkouška“ využívající biologický systém, který zahrnuje expozici organismu testovaným materiálem a stanovuje odpověď organismu. Chapman (1995a) rozlišuje dva druhy biotestů: test toxicity, který měří efekt (např. akutní, subletální, chronickou toxicitu) a bioakumulační test, který měří jev. Biotest je starý snad několik tisíc let. Již faraoni používali "služeb" ochutnávače aby se uchránili před traviči. Ve středověku se podezřelý pokrm zkoušel na psovi či vězni. Dnes je jako testovací organismy používá široká škála organismů (bakterie, sinice, řasy, vyšší rostliny, vodní a půdní organismy, mechy a lišejníky, ale také teplokrevní obratlovci, především hlodavci, ptáci, volně žijící zvěř a ve zdůvodněných případech i primáti.

Ekotoxikologie je relativně nový pojem integrující ekologické a toxikologické disciplíny. Původně byly testy toxicity, jejich metodické postupy, testovací organismy a endpointy vybírány na základě neekologických faktorů, protože ekologické byly obecně nevýznamné. První environmentální problémy, které se objevily, byly akutní a viditelné, zahrnovaly např. hynutí organismů např. vlivem nedostatku kyslíku a vedly k aplikaci převážně rybích druhů při testování vody.

Původní problémy byly relativně jednoduché, zahrnovaly polutanty typu organické hmoty, kovů a pesticidů. V průběhu století se však znečištění stalo komplexnějším a nyní zahrnuje směsi chemikálií ve více environmentálních složkách (voda, půda, tkáň, atd.). Efekty znečištění se již netýkají pouze mortality, ale do popředí se dostávají dlouhodobější a obtížněji detekovatelné vlivy jako mutagenicita, karcinogenita, vlivy na růst, reprodukci, atd. To vede i k mohutnému rozvoji různých metod stanovujících příčiny a efekty znečištění a ke změně regulačních opatření z nápravy škod způsobených na ekosystému k prevenci a ochraně zdraví ekosystému (Chapman 1995b). V současné době jsou známy desítky milionů organických sloučenin. Spolu s dalšími přírodními sloučeninami produkovanými a modifikovanými organismy a anorganickými látkami tvoří směsi, jejichž toxicitu nelze predikovat, ani efektivně monitorovat sofistikovanými instrumentálními metodami analytické a environmentální chemie, které jsou povětšinou cíleny na určitou látku.

**Proto má biotest jako nespecifický, relativně levný, screeningový test (toxicity, úživnosti, biodegradace, biokumulace apod.) v ekotoxikologii své důležité místo.**

Původní problémy byly relativně jednoduché, zahrnovaly polutanty typu organické hmoty, kovů a pesticidů. V průběhu století se však znečištění stalo komplexnějším a nyní zahrnuje směsi chemikálií ve více environmentálních složkách (voda, půda, tkáň, atd.). Efekty znečištění se již netýkají pouze mortality, ale do popředí se dostávají dlouhodobější a obtížněji detekovatelné vlivy jako mutagenicita, karcinogenita, vlivy na růst, reprodukci, atd. To vede i k mohutnému rozvoji různých

metod stanovujících příčiny a efekty znečištění a ke změně regulačních opatření z nápravy škod způsobených na ekosystému k prevenci a ochraně zdraví ekosystému (Chapman 1995b).

Hodnocení zdraví ekosystému probíhá na třech základních úrovních biologické organizace: individuální, populační a na úrovni společenstva. Testy toxicity, které zaujímají individuální úroveň, se zaměřují letální, nebo subletální na biochemické a fyziologické odpovědi organismu k environmentálnímu znečištění. Jejich výhodou je, že jsou standardizované, mohou indikovat „včasné varování“, na druhé straně jim chybí dlouhodobá ekologická významnost a jejich interpretace může být irelevantní přírodním podmínkám (Wong a Dixon 1995).

### **Definice a popis biotestu.**

Principem biotestu je kontakt (akutní, chronický apod.) testované látky, směsného, či přírodního vzorku za určitých, předem definovaných a kontrolovatelných podmínek s detekčním systémem (zkušebním organismem, tkání, populací, společenstvem apod.). Z jeho reakce potom usuzujeme, zda testovaná látka je toxická, zda vzorek vody obsahuje využitelné živiny, zda je za těchto podmínek sledovaná substance rozložitelná atd.

Biotest většinou nemůže podat informaci která látka a v jakém množství je v příslušném vzorku, to je vyhrazeno až chemické analýze, může však velmi jednoduše a rychle říci, zda je či není ve vzorku biologicky aktivní, či sledovaný jev ovlivňující látka/látky.

**Biotest lze definovat jako** proces, při němž je testovací systém (tkáň, organismus, populace apod.) exponován v přesně definovaných podmínkách různými koncentracemi zkoumané chemické látky nebo směsného či přírodního vzorku.

**Ekotoxikologické biotesty jsou** takové biotesty, které pro stanovení sledovaného jevu využívají detekční systémy (organismy, tkáň apod.), které jsou relevantní (umožňují interpretaci, mají dostatečnou výpovědní hodnotu apod.) pro sledované ekosystémy či matrice (vodní, půdní ekosystémy, chemické látky, odpady apod.). Z tohoto popisu je zřejmé, že například nebezpečné vlastnosti odpadů popisované v Zákoně o odpadech jako akutní toxicita, nebo tzv. pozdní účinek (embryotoxicita, mutagenita, teratogenita apod.) je cílena na ve vztahu k člověku, nikoliv k životnímu prostředí a nelze je uvádět mezi ekotoxikologické biotesty. Proto je v zákonech a normách ekotoxicita uváděna zvlášť a vždy by měla sledovat a definovat účinky testované substance na úrovni producentů, konzumentů a destruentů, protože ekosystém si lze představit jako řetěz: praskne-li jeden jediný článek (je jedno který), řetěz není funkční (a ekosystém je poškozený). Kdybychom například testovali insekticid pomocí jediného testu, např. na bakteriích, nebo řasách, pravděpodobně nestanovíme toxické účinky. Je však zřejmé, že závěr: vzorek je netoxický je nesprávný, protože byla opomenuta skupina konzumentů. Zdá se to jasné. Přesto dnes stále existují firmy a laboratoře, které výsledky jednoho trstu (např. Mikrotox) vydávají za výsledky ekotoxikologického testování.

Současným trendem je vyvíjet takové metodiky ekotoxikologických biotestů, které jsou miniaturizované, plně validovatelné a umožňují tedy sledovat nepříznivý vliv látek na živé organismy za standardních, reprodukovatelných podmínek. Metody

musí umožnit srovnání účinků různých látek či různých organismů mezi sebou a především srovnání odpovídajících výsledků z různých laboratoří. Vysoký stupeň standardizace ekotoxikologických biotestů je samozřejmostí, která je však často interpretována zároveň jako nevýhoda, protože laboratorní podmínky jsou často vzdáleny přírodním podmínkám, což je nutno brát v úvahu při interpretaci výsledků testů. Ekotoxikologické biotesty pak poskytují podklady pro ekotoxikologické studie, hodnocení rizik apod.

## **Rozdělení ekotoxikologických biotestů**

V recentních mezinárodních monografiích zabývajících se touto problematikou najdeme nejrůznější a značně nejednotné dělení ekotoxikologických biotestů. Zde uvádím **základní přehled** těch nejčastějších:

**Dle doby expozice dělíme** ekotoxikologické biotesty na akutní, semiakutní (semichronické) a chronické

**Dle pokročilosti designu testovacího systému (Také 4 generace biotestů)**

- 1. generace -klasické (standardní)
- 2. generace -mikrobiotesty
- 3. generace -biosenzory, biosondy a biomarkry
- 4. generace – on-line systémy s dálkovým přenosem dat

**Dle trofické úrovně testovacích organismů** producenti, konzumenti, destruenti

**Dle testované matrice:** voda, půda, vzduch, sediment, odpad, chemická látka

**Dle spektra testovacích organismů:**Jednodruhové (Single Species), Vícedruhové (Multi Species s přírodními populacemi i laboratorní směsí kultur)

**Dle typu testovaného vzorku:** čisté chemické látky (hydrofilní, hydrofobní, těkavé), směs látek (známých i neznámých), přírodní vzorky (většinou neznámé, směsné, s neznámými interakcemi - nejsložitější interpretace)

**Dle způsobu přípravy vzorku:** definované koncentrace chemických látek, testování výluhů přírodních vzorků (extrakce org. rozpouštědly, DMSO, vodou, různé pH, teplota atd.) , semipermeabilní membrány, přímé testy (Direct Tests, Solid Phase Tests, Whole Effluent etc.)

**Dle stupně komplexnosti detekčního systému**

Od nejjednodušších k nejsložitějším: enzymy, biosondy, buněčné a tkáňové kultury *in vitro* , intaktní živý organismus, populace, micro/mezo kosmos, terénní experimenty. Zde vývoj chápání ekotoxikologických biotestů pokročil - původní definice uznávala pouze vliv látek na živé organismy, dnes s pronikáním 3. generace ekotoxikologických biotestů jsou uznávány pro hodnocení rizik také biotesty na úrovni suborganismální.

**Dle způsobu vyhodnocování:** letální efekty (mortalita, imobilizace), subletální efekty (chování organismů – např. rychlost a směr pohybu), hodnocení fyziologické aktivity (fotosyntetické asimilace, enzymatická aktivita, efekty na membránách, přírůstky – délka kořene, počet buněk v populaci, nebo hmotnost organismu, náchylnost k napadení chorobami, škůdci či parazity apod.), reprodukční aktivita, malformace a teratogenita atd.

### **Speciální testy pro hodnocení rizik v životním prostředí**

V určitých, jasně definovaných případech, kdy je pro konkrétní interpretaci nutno stanovit jiné, než běžné (toxické, letální) efekty na testovací organismus, máme k dispozici řadu speciálních biotestů pro stanovení např. těchto parametrů: trofie, mutagenita/genotoxicita nejen na bakteriích, ale také na rostlinách, volně žijících zvířatech a rybách, teratogenita, například na obojživelnících - *Xenopus laevis*, embryotoxicita a reprodukční testy na rybách, koryšících, obojživelnících, ptácích apod.

**Další biotesty:** Tento přehled je směřován na ekotoxikologické biotesty.

Biokoncentrace/ biokumulace a testy pro hodnocení biodegradability nepatří mezi ekotoxikologické biotesty ve smyslu stanovování toxických a letálních efektů v původním významu, takže ač se jim v tomto příspěvku nebudu podrobněji věnovat je dobré vědět, že patří mezi biotesty ekotoxikologického hodnocení chemických látek i přírodních a odpadních vzorků.

### **Přehled ekotoxikologických biotestů tak, jak je uvádí některé mezinárodní agentury**

Většina vyspělých států má své agentury, které vydávají a aktualizují normy a metodiky také v oblasti ekotoxikologických biotestů. V USA je to U.S. EPA, a ASTM, v Kanadě je to například Environment Canada, ve Francii AFNOR, v Německu DIN apod. Česká republika patří jednoznačně mezi státy, které jsou pokročilé i v této oblasti, ale současná situace může být pro nezasvěcené uživatele nejasná.

V současné době jsou v platnosti ČSN (Česká státní norma), ale současně jsou platné nově přijímané normy, které v procesu harmonizace předpisů s EU přijímáme a také jsou platné normy, které jsme přejali jako členové OECD. Jak je z níže uvedeného přehledu patrné, běžně se lze setkat s normou, která má označení ČSN-EN-ISO. Jde o nové normy přejímané z ISO a platné pro EU. Aby to nebylo jednoduché, jsou současně platné například také tzv. oborové normy pro jednotlivé rezorty, či odvětví. Příkladem mohou být Oborové normy pro vodní hospodářství, které mají označení TNV.

V následujícím přehledu jsou staženy z internetu seznamy norem vybraných agentur, které se touto problematikou zabývají. Již z přehledu je patrné, že se agentury v jednotlivých normách nejen překrývají, ale především se liší v detailech způsobu provedení, složení medií i době expozice.

Všimněte si prosím, že kromě ekotoxikologických biotestů, které jsou běžné v ČR (dafnie, řasy, klíčení semen, ryba) jsou například u OECD již od roku 1984 platné normy pro stanovení toxicity na včely, žížaly, volně žijící ptáky apod. Tyto testy se v ČR také používají, povědomí odborné veřejnosti o těchto testech však není takové, jako je tomu u testů pro stestování vodních ekosystémů. Z předložených

přehledů je také patrný trend ve vývoji ekotoxikologických biotestů v posledních cca 10 letech: stále větší důraz je kladen na testy prolongované, chronické a subchronické, při hodnocení efektů se stále více klade důraz na subletální efekty a vlivu sledovaných substancí na reprodukci.

**Zdroj:**

<http://www.oecd.org/EN/document/0,,EN-document-524-14-no-21-6717-524,00.html>

**Sekce 2: Effects on Biotic Systems**, další lze najít v serií Testing and Assessment Guidance Monographs

- 201 Alga, Growth Inhibition Test (Updated Guideline, adopted 7th June 1984)
- 202 Daphnia sp. Acute Immobilisation Test and Reproduction Test (Updated Guideline, adopted 4th April 1984)
- 203 Fish, Acute Toxicity Test (Updated Guideline, adopted 17th July 1992)
- 204 Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study (Original Guideline, adopted 4th April 1984)
- 205 Avian Dietary Toxicity Test (Original Guideline, adopted 4th April 1984)
- 206 Avian Reproduction Test (Original Guideline, adopted 4th April 1984)
- 207 Earthworm, Acute Toxicity Tests (Original Guideline, adopted 4th April 1984)
- 208 Terrestrial Plants, Growth Test (Original Guideline, adopted 4th April 1984)
- 209 Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Original Guideline, adopted 4th April 1984)
- 210 Fish, Early-Life Stage Toxicity Test (Original Guideline, adopted 17th July 1992)
- 211 Daphnia magna Reproduction Test (Original Guideline, adopted 21st September 1998)
- 212 Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages (Original Guideline, adopted 21st September 1998)
- 213 Honeybees, Acute Oral Toxicity Test (Original Guideline, adopted 21st September 1998)
- 214 Honeybees, Acute Contact Toxicity Test (Original Guideline, adopted 21st September 1998)
- 215 Fish, Juvenile Growth Test (Original Guideline, adopted 21st January 2000)
- 216 Soil Microorganisms, Nitrogen Transformation Test (Original Guideline, adopted 21st January 2000)
- 217 Soil Microorganisms, Carbon Transformation Test (Original Guideline, adopted 21st January 2000)

**OECD normy , které jsou v současnosti ve schvalovacím řízení**

202 Daphnia sp., Acute Immobilisation Test (Updated Guideline, October 2000)  
Daphnia Compilation Document

- 208 Terrestrial (Non target) - Plant Test: s plevelnými druhy rostlin
- 208A: Seedling Emergence and Seedling and Seedling Growth
- 208B: Vegetative Vigour Test" (Draft Updated Guideline, July 2000)
- \* Supporting Background Document: A Comparative Review of Terrestrial NTP Test Methods
- 218 Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment (Draft New Guideline, February 2001)
- 219 Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water (Draft New Guideline, February 2001) PDF
- 220 Enchytraeidae Reproduction Test (Draft New Guideline, March 2000)
- 221 Lemna sp. Growth Inhibition Test (Draft New Guideline, October 2000) Lemna Compilation Document
- 222 Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/andrei) (Draft New Guideline, January 2000)

**ISO (International Standardization Organization )** nabízí standardizované metodiky a normy pro nejrůznější činnosti spojené s ekotoxikologickými biotesty (od vzorkování, přeprava vzorku, konzervace a uchovávání vzorků, metody extrakce a přípravy, zpracování biotestů pro vodní ekosystémy, půdu, odpady apod.). Plný přehled je nad rámec nejen tohoto článku, ale také celého sborníku. Proto doporučuji čerpat vždy čerstvé informace z níže uvedených internetových stránek. Zde pro představu uvádím část norem spojených s ekotoxikologickými biotesty pro vodní ekosystémy.

Zdroj: [www.iso.org/iso/en](http://www.iso.org/iso/en)

<u>ISO 6341:1996</u>	Water quality -- Determination of the inhibition of the mobility of <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea) -- Acute toxicity test
<u>ISO 7346-1:1996</u>	Water quality -- Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [ <i>Brachydanio rerio</i> Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] -- Part 1: Static method
<u>ISO 7346-2:1996</u>	Water quality -- Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [ <i>Brachydanio rerio</i> Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] -- Part 2: Semi-static method
<u>ISO 7346-3:1996</u>	Water quality -- Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [ <i>Brachydanio rerio</i> Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] -- Part 3: Flow-through method
<u>ISO 7827:1994</u>	Water quality -- Evaluation in an aqueous medium of the "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds -- Method by analysis of dissolved organic carbon (DOC)
<u>ISO 8192:1986</u>	Water quality -- Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge
<u>ISO 8692:1989</u>	Water quality -- Fresh water algal growth inhibition test with <i>Scenedesmus subspicatus</i> and <i>Selenastrum capricornutum</i>
<u>ISO 9408:1999</u>	Water quality -- Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium by determination of oxygen demand in a closed respirometer
<u>ISO 9439:1999</u>	Water quality -- Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium -- Carbon dioxide evolution test
<u>ISO 9509:1989</u>	Water quality -- Method for assessing the inhibition of nitrification of activated sludge micro-organisms by chemicals and waste waters
<u>ISO 9887:1992</u>	Water quality -- Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in an

- aqueous medium -- Semi-continuous activated sludge method (SCAS)
- ISO 9888:1999 Water quality -- Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium -- Static test (Zahn-Wellens method)
- ISO 10229:1994 Water quality -- Determination of the prolonged toxicity of substances to freshwater fish -- Method for evaluating the effects of substances on the growth rate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Teleostei, Salmonidae))
- ISO 10253:1995 Water quality -- Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricorutum*
- ISO 10634:1995 Water quality -- Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium
- ISO 10706:2000 Water quality -- Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)
- ISO 10707:1994 Water quality -- Evaluation in an aqueous medium of the "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds -- Method by analysis of biochemical oxygen demand (closed bottle test)
- ISO 10708:1997 Water quality -- Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic biodegradability of organic compounds -- Determination of biochemical oxygen demand in a two-phase closed bottle test
- ISO 10712:1995 Water quality -- *Pseudomonas putida* growth inhibition test (*Pseudomonas* cell multiplication inhibition test)
- ISO 11348-1:1998 Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) -- Part 1: Method using freshly prepared bacteria
- ISO 11348-2:1998 Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) -- Part 2: Method using liquid-dried bacteria
- ISO 11348-3:1998 Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) -- Part 3: Method using freeze-dried bacteria
- ISO 11733:1995 Water quality -- Evaluation of the elimination and biodegradability of organic compounds in an aqueous medium -- Activated sludge simulation test
- ISO 11734:1995 Water quality -- Evaluation of the "ultimate" anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge -- Method by measurement of the

	biogas production
<u>ISO 12890:1999</u>	Water quality -- Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish -- Semi-static method
<u>ISO 13829:2000</u>	Water quality -- Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test
<u>ISO 14442:1999</u>	Water quality -- Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water
<u>ISO 14593:1999</u>	Water quality -- Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium -- Method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (CO <sub>2</sub> headspace test)
<u>ISO 14669:1999</u>	Water quality -- Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea)
<u>ISO/TR 15462:1997</u>	Water quality -- Selection of tests for biodegradability
<u>ISO 15522:1999</u>	Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water constituents on the growth of activated sludge microorganisms
<u>ISO 16221:2001</u>	Water quality -- Guidance for determination of biodegradability in the marine environment

**Evropská unie** má Společné výzkumné centrum , které se zabývá (mimo jiné) touto problematikou v Itálii, v Itálii. V následujícím přehledu je uvedena část, která se týká metod pro stanovení toxicity a ekotoxicity. Protože má text z tohoto sborníku sloužit také jako studijní materiál pro studenty univerzit a vysokých škol, záměrně nechávám vedle sebe metody pro stanovení toxicity a ekotoxicity, aby bylo možno tyto metody srovnat a hlavně odlišit, což se při zkoušení ne vždy studentům daří. Odborníci trivialitu prominou... a podrobnosti k níže uvedeným testům načerpají na níže uvedené adrese.

Zdroj:

<http://ecb.jrc.it/testing-methods/ANNEX5/>

Annex V to Directive 67/548/EEC

Poslední změny této verze: 18 March 2002

## **PART B: METHODS FOR THE DETERMINATION OF TOXICITY**

### GENERAL INTRODUCTION

B.1bis ACUTE TOXICITY (ORAL) FIXED DOSE METHOD

B.1tris ACUTE TOXICITY (ORAL) – ACUTE TOXIC CLASS METHOD

B.2 B.2 ACUTE TOXICITY (INHALATION)

B.3 ACUTE TOXICITY (DERMAL)

B.4 ACUTE TOXICITY (SKIN IRRITATION)

B.5 ACUTE TOXICITY (EYE IRRITATION)



- B.6 SKIN SENSITIZATION
- B.7 REPEATED DOSE (28 DAYS) TOXICITY (ORAL)
- B.8 REPEATED DOSE (28 DAYS) TOXICITY (INHALATION)
- B.9 REPEATED DOSE (28 DAYS) TOXICITY (DERMAL)
- B.10 MUTAGENICITY - IN VITRO MAMMALIAN CHROMOSOME ABERRATION TEST)
- B.11 MUTAGENICITY - IN VIVO MAMMALIAN BONE-MARROW CHROMOSOME ABERRATION TEST
- B.12 MUTAGENICITY MAMMALIAN ERYTHROCYTE MICRONUCLEUS TEST
- B.13/14 MUTAGENICITY - REVERSE MUTATION TEST USING BACTERIA
- B.15 GENE MUTATION - SACCHAROMYCES CEREVISAE
- B.16 MITOTIC RECOMBINATION - SACCHAROMYCES CEREVISAE
- B.17 MUTAGENICITY - IN VITRO MAMMALIAN CELL GENE MUTATION TEST
- B.18 DNA DAMAGE AND REPAIR - UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS - MAMMALIAN CELLS IN VITRO
- B.19 SISTER CHROMATID EXCHANGE ASSAY IN VITRO
- B.20 SEX-LINKED RECESSIVE LETHAL TEST IN DROSOPHILA MELANOGASTER
- B.21 IN VITRO MAMMALIAN CELL TRANSFORMATION TEST
- B.22 RODENT DOMINANT LETHAL TEST
- B.23 MAMMALIAN SPERMATOGONIAL CHROMOSOME ABERRATION TEST
- B.24 MOUSE SPOT TEST
- B.25 MOUSE HERITABLE TRANSLOCATION
- B.26 SUB-CHRONIC ORAL TOXICITY TEST. REPEATED DOSE 90 - DAY TOXICITY STUDY IN RODENTS
- B.27 SUB-CHRONIC ORAL TOXICITY TEST: REPEATED DOSE 90 - DAY TOXICITY STUDY IN NON-RODENTS
- B.28 SUB-CHRONIC DERMAL TOXICITY TEST: 90-DAY REPEATED DERMAL DOSE STUDY USING RODENT SPECIES
- B.29 SUB-CHRONIC INHALATION TOXICITY TEST: 90-DAY REPEATED INHALATION DOSE STUDY USING RODENT SPECIES
- B.30 CHRONIC TOXICITY TEST
- B.31 TERATOGENICITY TEST – RODENT AND NON-RODENT
- B.32 CARCINOGENICITY TEST
- B.33 COMBINED CHRONIC TOXICITY/CARCINOGENICITY TEST
- B.34 ONE-GENERATION REPRODUCTION TOXICITY TEST
- B.35 TWO GENERATION REPRODUCTION TOXICITY TEST
- B.36 TOXICOKINETICS
- B.37 DELAYED NEUROTOXICITY OF ORGANOPHOSPHORUS SUBSTANCES FOLLOWING ACUTE EXPOSURE
- B.38 DELAYED NEUROTOXICITY OF ORGANOPHOSPHORUS SUBSTANCES 28 DAY REPEATED DOSE STUDY
- B.39 UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS (UDS) TEST WITH MAMMALIAN LIVER CELLS IN VIVO
- B.40 SKIN CORROSION
- B.41 PHOTOTOXICITY - IN VITRO 3T3 NRU PHOTOTOXICITY TEST

## **PART C: METHODS FOR THE DETERMINATION OF ECOTOXICITY**

- GENERAL INTRODUCTION
- C.1 ACUTE TOXICITY FOR FISH
- C.2 ACUTE TOXICITY FOR DAPHNIA
- C.3 ALGAL INHIBITION TEST
- C.4 BIODEGRADATION: DETERMINATION OF THE "READY" BIODEGRADABILITY
- C.4-A DISSOLVED ORGANIC CARBON (DOC) DIE-AWAY TEST
- C.4-B MODIFIED OECD SCREENING TEST
- C.4-C CARBON DIOXIDE EVOLUTION TEST

C.4-D MANOMETRIC RESPIROMETRY TEST  
C.4-E CLOSED BOTTLE TEST  
C.4-F MITI TEST

C.5 DEGRADATION : BIOCHEMICAL OXYGEN DEMAND  
C.6 DEGRADATION: CHEMICAL OXYGEN DEMAND  
C.7 DEGRADATION: ABIOTIC DEGRADATION: HYDROLYSIS AS A FUNCTION OF PH  
C.8 TOXICITY FOR EARTHWORMS : ARTIFICIAL SOIL TEST  
C.9 BIODEGRADATION: ZAHN - WELLENS TEST  
C.10 BIODEGRADATION: ACTIVATED SLUDGE SIMULATION TEST  
C.11 BIODEGRADATION: ACTIVATED SLUDGE RESPIRATION INHIBITION TEST  
C.12 BIODEGRADATION: MODIFIED SCAS TEST  
C.13 BIOCONCENTRATION: FLOW-THROUGH FISH TEST  
C.14 FISH JUVENILE GROWTH TEST  
C.15 FISH, SHORT-TERM TOXICITY TEST ON EMBRYO AND SAC-FRY STAGES  
C.16 HONEYBEES - ACUTE ORAL TOXICITY TEST  
C.17 HONEYBEES - ACUTE CONTACT TOXICITY TEST  
C.18 ADSORPTION/DESORPTION USING A BATCH EQUILIBRIUM METHOD  
C.19 ESTIMATION OF THE ADSORPTION COEFFICIENT (KOC) ON SOIL AND ON SEWAGE SLUDGE USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)  
C.20 DAPHNIA MAGNA REPRODUCTION TEST

### **Ekotoxikologické biotesty v normách ČR**

Situace v oblasti norem a metodik pro ekotoxikologické biotesty se v současné době v ČR intenzivně vyvíjí, takže následující přehled nelze brát jako definitivní a konečný.

**Jako informační zdroje lze doporučit**

Zde uvádím přehled těch základních norem:

ČSN EN 28692 Jakost vod. Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum* (ISO 8692:1989) Vydána: září 1995

ČSN EN ISO 11348-3 Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 3: Metoda s lyofilizovanými bakteriemi. Vydána: leden 2000. Účinnost: 2000.02.01

ČSN EN ISO 10253 : Jakost vod - Zkouška inhibice růstu mořských řas *Skeletonema costatum* a *Phaeodactylum tricorutum* Vydána: únor 1999. Účinnost: 1999.03.01

ČSN EN ISO 5667-16: Jakost vod - Odběr vzorků - Část 16: Pokyny pro biologické zkoušení vzorků Vydána: říjen 1999 Účinnost: 1999.11.01

ČSN EN ISO 10712 : Jakost vod - Zkouška inhibice růstu na *Pseudomonas putida* (zkouška inhibice rozmnožování buněk *Pseudomonas*) Vydána: prosinec 1997. Účinnost: 1998.01.01

ČSN EN ISO 6341: Jakost vod - Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Zkouška akutní toxicity Vydána: prosinec 1997. Účinnost: 1998.01.01

ČSN EN ISO 11348-1 : Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 1: Metoda s čerstvě připravenými bakteriemi Vydána: leden 2000. Účinnost: 2000.02.01

ČSN EN ISO 11348-2 : Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 2: Metoda se sušenými bakteriemi Vydána: leden 2000. Účinnost: 2000.02.01

ČSN EN ISO 11348-3: Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 3: Metoda s lyofilizovanými bakteriemi Vydána: leden 2000. Účinnost: 2000.02.01

ČSN EN ISO 7346-1: Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [Brachydanio rerio Hamilton - Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Část 1: Statická metoda Vydána: únor 1999. Účinnost: 1999.03.01

ČSN EN ISO 7346-2 : Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [Brachydanio rerio Hamilton - Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Část 2: Obnovovací metoda Vydána: únor 1999. Účinnost: 1999.03.01

ČSN EN ISO 7346-3: Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [Brachydanio rerio Hamilton - Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Část 3: Průtočná metoda Vydána: únor 1999. Účinnost: 1999.03.01

ČSN ISO 10229: Jakost vod - Stanovení subchronické toxicity látek pro sladkovodní ryby - Metoda vyhodnocení účinků látek na růstovou rychlost pstruha duhového /Oncorhynchus mykiss Walbaum (Teleostei, Salmonidae)/ Vydána: březen 1997. Účinnost: 1997.04.01

ČSN ISO 10706: Jakost vod - Stanovení chronické toxicity látek pro Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) Vydána: prosinec 2001. Účinnost: 2002.01.01

TNV 757741 Mikrometoda stanovení toxicity a trofického potenciálu řasovým testem. (oborová norma pro Vodní hospodářství, platná od roku 1995)

TNV 757754 Mikrometoda stanovení toxicity na koryši *Thamnocephalus platyurus*. (oborová norma pro Vodní hospodářství, platná od roku 1997).

### **Význam a interpretační potenciál ekotoxikologických biotestů**

Ekotoxikologické biotesty by měly být zaměřeny na stanovení přítomnosti nebo nepřítomnosti environmentálního problému. Biotesty mohou být zahrnuty buďto do počátečního skríningu (tzv. toxicity presence/absence tests), který stanoví a prioritizuje potenciální zdroje znečištění (bodové i nebodové, vody, sedimenty), nebo mohou následovat za chemickými analýzami, aby determinovaly a prioritizovaly vysoké hladiny, nebo biodostupnost kontaminantů.

Informace o ekotoxicitě by měla sloužit jako signál k provedení podrobnějších fyzikálně-chemických analýz nebo alespoň jako jejich doplněk. Indikace toxicity však nemusí vždy korelovat s chemickými a fyzikálními rozborů sledovaného materiálu. Biotesty mohou signalizovat nebezpečí, aniž fyzikálně-chemické analýzy detekují zvýšené hladiny nebezpečných látek ve vzorku, a naopak i přes indikaci toxicity z fyzikálně-chemických rozborů reagují testované organismy negativně. Organismus totiž vypovídá o testovaném materiálu komplexně, záleží např. na biodosažitelnosti toxických složek nebo se mohou projevit interakce mezi přítomnými polutanty, které z chemických rozborů nevyplývají.

Laboratorní data vnášejí jisté nejistoty do interpretace měření ve spojení se sledováním efektů kontaminantů *in situ*. Z těchto metod je dobré zmínit například metody sledující struktury společenstev perifytonu, zoobentosu, či ryb, biomarkry *in situ* - ryby, rostliny, řasy, zooplankton, zoobentos. Avšak v případě, že je testována nejhorší varianta možné kontaminace, fungují biotesty jako včasné varování před potenciálními problémy, které by se mohly stát kritickými. To platí především v případech, kdy přírodní populace díky působení mnoha dalších environmentálních faktorů mohou detekovat negativní efekt teprve tehdy, když se již stává nebezpečným. Specifické hypotézy, které jsou formulovány, se proto testují doplňkovými laboratorními testy nebo studii v přírodním prostředí, nejlepší je však kombinace obou.

	<b>výhody</b>	<b>nevýhody</b>
<b><i>in situ</i> (terénní)</b>	dlouhodobá expozice integrace toxických vlivů	mnoho neznámých faktorů problematická interpretace dat
<b><i>in vitro</i> (laboratorní)</b>	faktory pod kontrolou, standardizované, srovnatelné, jsou v legislativě	některé biotesty jsou vzdáleny přírodě - pozor při interpretaci!

Hlavní rozdíl mezi ekotoxikologickými biotesty a *in situ* metodami je, že biotesty zahrnují experimentální expozice v laboratorním uspořádání, kde jsou všechny proměnné kontrolovány nebo známy a toxický faktor je manipulován. Studie přírodních populací jsou však ovlivněny mnoha variabilními fyzikálními, chemickými a biologickými faktory, které se navíc ve svých účincích na populace různě kombinují, a proto nelze jednoduše oddělit tuto variabilitu od vlivu toxických látek. Nejlepší podmínky pro ověření skutečného nebezpečí toxického efektu nastanou, když může být aplikace příslušného zásahu náhodně opakována, což zaručuje, že pozorovaný negativní efekt byl s největší pravděpodobností důsledkem tohoto zásahu a ne důsledkem velké variability prostředí. Laboratorní verze zákroku je opakovatelná, verze z reálného prostředí však většinou není (Chapman 1995a).

Nezbytnost redukovat přírodní prostředí na o mnoho jednodušší laboratorní situaci může vést k podhodnocení nebo nadhodnocení efektů toxické látky v přírodě. Jak falešně pozitivní výsledky (efekt byl detekován v laboratoři, ale ne *in situ*), tak i falešně negativní (efekt byl indikován v přírodních podmínkách, ale ne v laboratorních) však neznamenají, že laboratorní výsledky jsou neplatné, protože laboratorní testy jsou o mnoho jednodušší a neduplikují studie *in situ* (viz níže). Na druhé straně *in situ* metody jsou příliš komplexní a nedovolují oddělení efektů kontaminant od přírodních změn (Chapman 1995b, Parkhurst 1995).

Pokud biotest indikuje přítomnost toxického faktoru a jestliže se zároveň testovaný druh vyskytuje v oblasti, ale ne v kontaminovaném místě, je zde silná pravděpodobnost, že biotest předpovídá to, co se děje v reálném prostředí. Pokud je však testovaný druh nalezen ve sledované kontaminované oblasti, znamená to, že jeho životní stádia nejsou exponována k toxikantu nebo biotest neindikuje, co se aktuálně děje v životním prostředí tohoto organismu. Protože však může nastat adaptace *in situ*, může biotest naznačovat, že organismy jsou stresovány. Neexistuje však způsob, jak určit rozsah a významnost takového stresu (vykazují druhy toleranci nebo rezistenci?), aniž by byly prováděny rozsáhlé experimentální studie.

Integrativní přístup ke znečištění životního prostředí vyžaduje jak experimentální laboratorní studie, tak pozorování přímo *in situ*, jelikož oba přístupy se doplňují a myšlenka, že laboratorní studie vyžadují ověření *in situ* se postupně stává již dogmatem. Stejně tak výsledek samotného biotestu nebo skupiny biotestů nám sice může indikovat nebezpečí pro ekosystém, ale bez podrobných fyzikálně-chemických analýz většinou nelze příčinu tohoto nebezpečí identifikovat.

### **Složení a tvorba baterií ekotoxikologických biotestů**

Odpověď jednotlivých organismů na přítomnost toxických látek není jednotná, ovlivňuje ji mnoho faktorů jako biologická dosažitelnost toxikantu, způsob přijímání toxikantu organismem, jeho bioakumulace nebo schopnost škodlivou látku odbourávat, atd. Každý organismus reaguje na přítomnost toxického materiálu jiným

způsobem, proto je nezbytné k získání co nejkomplexnější informace o jeho toxickém působení na živé organismy použít k testování vždy více druhů a vždy zástupce všech trofických úrovní. Zapojením většího počtu testovacích organismů roste informace o zkoumaném vzorku a zvyšuje se tak výpovědní hodnota celé metody. Do baterie jsou vybírány individuální testy tak, aby byla schopna detekovat co nejvíce skupin toxikantů s vysokou spolehlivostí.

Výběr biotestů pro ekotoxikologické testování se liší u různých autorů, firem a laboratoří. Obecně neexistuje žádné pravidlo, podle kterého se jednotlivé biotesty do baterií začleňují, ale vždy převládá názor, že by měly představovat různé trofické stupně (de Zwart 1995). V některých zákonech je definováno povinné (minimální) složení baterie testů (i v ČR – např. Zákon o odpadech, Zákon o chemických látkách apod.). Někteří odborníci zdůrazňují ekonomičnost celé baterie a pracují jen s akutními mikrobiotesty, další aplikují ve svých studiích společně s mikrobiotesty i standardní testy toxicity doporučené mezinárodními organizacemi jako ISO, EPA apod. (Costan et al. 1993), jiní upřednostňují právě tyto standardní testy (Thomas et al. 1986) nebo biotesty kombinují podle typu testovaných vzorků (Harkey et al. 1994, Keddy et al. 1995), atd. Do výběru biotestů pro ekotoxikologické baterie se samozřejmě výrazně odráží i soudobý výzkum a vědecké zaměření ekotoxikologických pracovišť (Dutka 1996). Schopnost sestavit takovou baterii ekotoxikologických biotestů, která bude mít co nejreálnější vypovídací hodnotu a jejíž interpretace bude přesně odpovídat na problematiku studované lokality patří k důležitým znalostem každého ekotoxikologa. K tomu je samozřejmě důležité mít přehled o možnostech nejen normovaných testů, ale také jejich alternativ a nových publikací v oboru.

### **Příklad základní a rozšířené sady ekotoxikologických biotestů**

Při hodnocení ekologických rizik (např. ve smyslu zákona o chemických látkách) je nutné použít testy toxicity na organismech minimálně tří trofických úrovní producent, konzument a destruent. Do sady analýz je také nutné vybírat testy, které jsou schopny testovat jak kapalné, tak i pevné vzorky (sedimenty, půda). Testy označené LPT (liquid phase test) jsou schopny otestovat jen kapalný - čirý a mírně zbarvený vzorek, testy SPT (solid phase test) testují pevné vzorky, případně silně zbarvené a zakalené kapaliny. Následující sady testů obsahují analýzy všech těchto typů:

#### **Základní sada**

##### **A. Testy na bakteriích**

###### **1. Microtox - (LPT)**

test na inhibici luminiscence mořské bakterie *Photobacterium phosphoreum*.

Tento test také disponuje verzí **SPT - microtox**. Procedura vyžaduje navíc chlazenou centrifugaci. (**DIN 38 412** part 34 / 1991)

###### **2. Turbidimetrický test (LPT)**

Test měří růstovou rychlost bakteriálních buněk turbidimetricky. Změna intenzity zákalu oproti kontrole vypovídá o inhibičních účincích vzorku. (**ISO 10712:1995** Water quality - *Pseudomonas putida* growth inhibition test - *Pseudomonas* cell multiplication inhibition test).

###### **3. Sediment-chromotest (Toxichromopad) (SPT)**

Test inhibice *de novo* syntézy  $\beta$ -D galaktozidázy *E. coli*. (Kwan 1993, Kwan et al. 1996, Day et al. 1995, Kwan 1995, Ramirez et al. 1996, Dutka et al. 1996).

## **B. Testy s producenty**

### **4. Růstově inhibiční test na řasách (LPT)**

(*Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus subspicatus* nebo *Raphidocelis subcapitata*).

Test založený na měření inhibice růstové rychlosti kultury testované řasy (v době exponenciálního růstu) po 72 - 96 hodinové expozici v testovaném vzorku.

(**OECD 201/1984**, **ISO 8692:1989** Water quality—Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*)

Místo testu SPT na řasách je vhodné použít:

### **5. Test klíčivosti a růstu kořenů vyšších rostlin - 72 hod (SPT)**

- řeřicha setá (*Lepidium sativum*), hořčice setá (*Sinapis alba*), salát hlávkový (*Lactuca sativa*). (**OECD 208/1984** Terrestrial Plants, Growth Test)

## **C. Testy na bezobratlých**

6a. Imobilizační, případně reprodukční test na perloočkách 48 h. (*Daphnia magna*) (LPT) **OECD 202/1984** *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test and Reproduction Test, **ISO 6341:1996** Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* - Acute toxicity test),

### **6b. Thamnotoxkit (LPT)**

Testovací organismus *Thamnocephalus platyurus* je vylíhnut z klidových stádií (cyst, efiipií) během 20-24 hod (stejně stáří).

TNV 757754 **Mikrometoda stanovení toxicity na korýši *Thamnocephalus platyurus*.**)

### **7. Kontaktní test na filtračním papíře - *Eisenia* sp. (LPT)**

Dospělé žížaly *Eisenia* sp. s dobře vyvinutým clitellem (opaskem) jsou 48 hodin exponovány na filtračním papíře navlhčeném roztokem testované látky. Stanovuje se mortalita, která je odečítána po 24 a 48 hodinách. Metoda je snadná, ale nestanovuje hodnoty účinků či dávky chemikálií v půdě.

(**OECD 207/1984** The filter paper contact test)

## **Rozšířená sada**

## **A. Testy na bakteriích**

### **8. Test na inhibici spotřeby kyslíku aktivovaným kalem (LPT)**

**ISO 8192:1986** Water quality - Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge, **OECD 209**: Activated sludge respiration test.

### **9. ATP - test (LPT)**

ATP - test využívá měření bakteriální ATP jako indikátoru růstové inhibice. Základní test pro měření ATP je založen na měření světelné luminiscence, která následuje po reakci luciferinu s ATP za přítomnosti luciferázy a hořčnatých iontů.

(Xu a Dutka 1987, Dutka et al. 1991a,b, 1993, 1995)

### **10. MetPlate (LPT)**

Test enzymové inhibice  $\beta$ -galaktozidázy *E. coli*. - mutant, citlivý na přítomnost již malého množství těžkých kovů.

Tento test má také SPT variantu pro vzorky pevných matric **MetSoil** (SPT). (Bitton et al. 1996, Kong et al. 1995).

## **B. Testy na řasách**

### **11. Test na řasách (LPT)**

**TNV 757741** Mikrometoda stanovení toxicity a trofického potenciálu řasovým testem.

## **C. Testy na bezobratlých**

### **12. Test akutní, chronické toxicity (a genotoxicity) s nematody (LPT)**

*Panagrellus redivivus* je mnohobuněčný organismus, který ve svém vývoji prochází pěti stádii. Na nepříznivé životní podmínky (přítomnost toxikantu) reaguje *Panagrellus* smrtí nebo zástavou růstu. Během 96 hodinového růstového období se tak dají monitorovat jak letální tak subletální efekty. Přeměna z juvenilního stádia do dospělosti vyžaduje velmi intenzivní genovou aktivitu. Tento fakt je využíván jako potenciální indikátor genotoxicity. (Samoiloff 1990, Dutka et al. 1994, Dutka et al. 1995).

**13. Rotoxkit (LPT) Vířník *Brachionus calyciflorus*** představuje testovací organismus. (ASTM - E 1440 - 91, 1992, SOP 1996).

## **Současné trendy v ekotoxikologických biotestech**

Rostoucí potřeba testovat nové chemické látky a vzorky z životního prostředí ve velkých seriích vedla k následujícím trendům ve vývoji biotestů:

- miniaturizaci prostorového uspořádání, objemu testovacích nádob, medií apod.
- zkrácení doby inkubace při zachování citlivosti testu
- zjednodušení a možnost alternací při vyhodnocování testu (fluorescenční metody, molekulární sondy, průtoková cytometrie atd.)
- slevnění biotestů (viz miniaturizace a zkrácení doby inkubace)
- bezpodmínečná nutnost zapojení biotestů reprezentujících různé trofické úrovně v ekosystému
- přehodnocování standardních testů (OECD, ISO, EPA atd.) a tvorba nových Draftů
- využití nových vědeckých poznatků (např. řízení produkce klidových stádií, uchovávání řasových kultur, využívání lyofilizovaných kultur pro biotesty s bakteriemi).
- Co nejvíce se přibližovat při testování reálné situaci v terénu – zapojení nových metod vzorkování (permeabilní membrány), využití kontaktních testů (SPT, Ditrect testy atd.) tedy přímé testování bez nutnosti přípravy výluhu
- Stále častěji je standardní součástí baterie ekotoxikologických biotestů (zaměřených na toxicitu, mortalitu) také sada biotestů zaměřených na mutagenitu, genotoxicitu, teratogenitu a biochemické markery, enzymatické aktivity, či buněčné kultury, zaměřené na konkrétní typ látky, nebo účinku.
- Přenos dat systémy GSM – on-line systémy biotestů.

## **Literatura**

ASTM (1992): Standard guide for acute toxicity test with the rotifer *Brachionus*. ASTM Designation E 1440 - 91. In: Annual book of ASTM standards. Section 11. Water and Environmental Technology. Volume 11.01. Pesticides, resource recovery, hazardous substances and oil spillresponses, waste management, biological effects, , pp.1210-1216.

G. Bitton, K. Rhodes and B. Koopman (1996): Ceriofast<sup>TM</sup>: An acute toxicity test based on Ceriodaphnia dubia feeding behaviour. Environ. Toxicol. Chem. 15, 123-125.

Chapman, P. M. : Bioassay testing for Australia as part of water quality assessment programmes. Austr. J. Ecol. 20, 7-19 (1995a).

P. M. Chapman: Ecotoxicology and pollution - key issues. Mar. Poll. Bull. 31, 167-177 (1995b).

G. Costan, N. Bergmingham, C. Blaise and J.F. Ferard: Potential Ecotoxic Effects Probe (PEEP): a novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents. Envir. Toxic. Wat. Qual. 8, 115-140 (1993).

K.E. Day, B.J. Dutka, K.K. Kwan, N. Batista, T.B. Reynoldson, and J.L. Metcalfe-Smith (1995): Correlations between solid-phase microbial screening assays, whole-sediment toxicity tests with macroinvertebrates and *in situ* benthic community structure. J. Great Lakes Res. 21, 192-206.

B.J. Dutka, K.K. Kwan, S.S. Rao, A. Jurkovic and D. Liu (1991a): River evaluation using ecotoxicological and microbiological procedures. Environmental Monitoring and Assessment 16, 287-313.

B. J. Dutka, K. K. Kwan, S. S. Rao, A. Jurkovic, R. Mclnnis, G. A. Palmateer and B. Hawkins (1991b): Use of bioassays to evaluate river water and sediment quality. Environ. Toxicol. Wat. Qual. 6, 309-327.

B.J. Dutka, D. Liu, A. Jurkovic, and R. Mclnnis (1993): A comparison of four simple water extraction-concentration procedures to be used with the battery of bioassay tests approach. Environ. Toxicol. Wat. Qual. 8, 397-407.

B.J. Dutka, A. Jurkovic, R. Mclnnis, K.K. Kwan and T. Murphy (1994): Battery of tests approach applied to three different types of sediment extracts. J. Environ. Sci. Health A29 (8), 1649-1661.

B. J. Dutka, R. Bourbonniere, R. Mclnnis, K. K. Kwan and A. Jurkovic: Bioassay assessment of impacts of tar sands extraction operations. Environ. Toxicol. Wat. Qual. 10, 107-117 (1995).

B. J. Dutka, R. Mclnnis, A. Jurkovic, D. Liu and G. Castillo (1996): Water and sediment ecotoxicity studies in Temuco and Rapel river basin, Chile. Environ. Toxicol. Wat. Qual. 11, 237-247.

G. A. Harkey, Landrum, P. F. and S. J. Klaine: Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1315-1329 (1994).

C. J. Keddy, J. C. Greene and M. A. Bonnell: Review of whole-sediment bioassays: soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. Ecotox. Environ. Saf. 30, 221-251 (1995).

I.-C. Kong, G. Bitton, B. Koopman and K.-H. Jung (1995): Heavy metal toxicity testing in environmental samples. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 142, 119-147.

K.K. Kwan, 1993: Direct toxicity assessment of solid phase samples using the Toxi-Chromotest Kit. Environmental Toxicology and Water Quality Vol. 8, 223-230.

K.K. Kwan, 1995: Direct sediment toxicity testing procedure using Sediment- Chromotest Kit. Environmental Toxicology and Water Quality Vol. 9, 193-196.

K.K. Kwan, B.J. Dutka, 1996: Development of reference sediment samples for solid phase toxicity screening tests. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 56, 696-702.

B. R. Parkhurst: Are single species toxicity test results valid indicators of effects to aquatic communities? In: J. Cairns, B. R. Niederlehner (Eds.) Ecotoxicological Toxicity Testing: Scale, Complexity, and Relevance, Lewis Publ., USA (1995). pp.105-121.

G. Persoone, C. Blaise, T. Snell, C. Janssen and M. Van Steertegem (1993): Cyst-based toxicity tests: II - Report on an international intercalibration exercise with three cost-effective Toxkits. Jour. Appl. Zool. 79, 17-36.

N.E. Ramirez, Vargas, M.C., Sanchez, F.N., (1996): Use of the „Sediment- Chromotest“ for monitoring stimulated hydrocarbon biodegradation processes. Environmental Toxicology and Water Quality Vol. 11, 223-230.

M. Samoiloff (1990): The nematode toxicity assay using *Panagrellus redivivus*. Tox. Assess. 5, 309-318.

SOP (1996): Standard operational procedure: Rotokit F. Crustacean toxicity screening test for freshwater. Creasel, Belgium

J.M. Thomas, J.R. Skalski, J.F. Cline, M.C. McShane, J.C. Simpson, K.E. Miller, S.A. Peterson, C.A. Callhan and J.C. Greene: Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extent using bioassays. Env. Tox. Chem. 5, 487-501 (1986).

H. Xu and B. J. Dutka (1987): ATP-TOX System - a new, rapid, sensitive bacterial toxicity screening system based on the determination of ATP. Tox. Assess. 2, 149-166.

P. T. S. Wong a D. G. Dixon: Bioassessment of water quality. Environ. Toxicol. Wat. Qual. 10, 9-17 (1995).

D. de Zwart: Monitoring water quality in the future. Vol. 3: Biomonitoring. Ministry of Housing, Zoetermeer, Netherlands (1995).