

Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití.

Doc. Ing. Blahoslav Maršálek, CSc.,

Oddělení experimentální fykologie a ekotoxikologie, Botanický ústav
AVČR,

Květná 8, 603 65 Brno, , Tel/Fax 05 43241911

a RECETOX – Výzkumné centrum pro chemii životního prostředí a
ekotoxikologii, Masarykova univerzita Kamenice 3, 618 00 Brno,

Definice biotestu

- **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.

Rozdělení ekotoxikologických biotestů (základní přehled těch nejčastějších)

- Dle doby expozice dělíme ekotoxikologické biotesty na
- akutní
- semiakutní (semichronické)
- chronické

Dle testovacího uspořádání“

- Statické
- Semi-statické
- Průtočné

Dle pokročilosti designu testovacího systému (Také 4 generace biotestů)

- 1. generace -klasické (standardní)
- 2. generace -mikrobiotesty
- 3. generace -biosenzory, biosondy a biomárkry
- 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.)**
- **TIE (C-18, AC, pH.....)**

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

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

- 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, korýších, obojživelnících, ptácích, hraboších apod.
- Detekce spec. mechanismů (endokrinní disruptory, TCDD apod.)

Biotesty procesů

- Biokoncentrace
- biokumulace
- testy pro hodnocení biodegradability

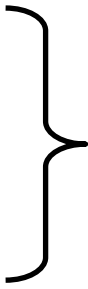
Ekotoxikologické biotesty

Stanovení ekotoxicity - souhrn

- 1) Standardní biotesty
- 2) Alternativní biotesty
- 3) Další biotesty (*specifické mechanismy, in vitro testy*)
- 4) Testy procesů (*biodegradabilita, bioakumulace ...*)
- 5) *Testy orgánové toxicity s laboratorními zvířaty*
– *obratlovci, savci "humánní toxikologie"*
- 6) **Experimentální mikro a mezokosmy**
- 7) **Polní studie**



**Laboratorní
ekotoxikologické
biotesty**



**In situ
hodnocení
efektů**

STANDARDNÍ (*standardizované*) EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY

- **Standardizace**
 - maximální standardizace kroků experimentálního postupu s cílem omezit faktory "intra-laboratorní" variability
- **Výhody standardních biotestů**
 - zaručení jednotnosti a opakovatelnosti výsledků
 - při dodržení postupu - srovnatelnost výsledků z různých laboratoří
 - validované výsledky (*viz dále*) jsou vhodné pro ROZHODOVÁNÍ (*sanace, pokuty ...*)
 - malá nutnost optimalizace ...
- **Nevýhody standardních biotestů**
 - velmi specifická a omezená vypovídací hodnota ("*akutní letalita pro korýše Daphnia*"), zpravidla vhodné jen pro zařazení (klasifikace) toxicity látek (více – středně – méně toxické ...)
 - omezený počet standardizovaných postupů, zpravidla jednoduché (akutní) efekty

EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY

Každý biotest (jednodruhové, vícedruhové, mikrokosmy ...)
je pouze zjednodušením = modelem ekosystému

- cílem ekotoxikologických studií je pochopení, charakterizace a ev. předpověď účinků v celých populacích, společenstvech, ekosystémech
- z experimentálních výsledků je nutno provádět **EXTRAPOLACE**
 - *? jsou laboratorní druhy relevantní pro přírodní organismy*
 - *? je laboratorní expozice (voda) relevantní pro přírodní podmínky (sediment)*
 - *? jsou výsledky na jednom druhu relevantní pro populaci, společenstvo*
 - *? jsou výsledky in vitro testu (stanovení dioxinové toxicity) relevantní pro efekt na celém organismu*
 - pro vyjádření nejistot plynoucích z extrapolací jsou často používány tzv. extrapolační faktory nebo faktory nejistoty
 - (UF – uncertainty factors, UF = 1, 5, 10 - 1000)
 - aplikace = násobení (dělení) získaných výsledků

Interpretační potenciál ekotoxikologických biotestů

- Dobře definují toxický potenciál čistých látek
- Biotesty počátečního skrínungu (tzv. toxicity presence/absence tests).
- Propojení s chemickými analýzami, aby determinovaly a prioritizovaly vysoké hladiny, nebo biodostupnost kontaminant v přírodě.
- Upozorní na interakce mezi přítomnými polutanty, které z chemických rozborů nevyplývají.
- Pozor na přímé interpretace lab. testů pro přírodní podmínky!!!!

EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY

Experimentální design

- které parametry charakterizují biotest, které je nutno evidovat ?
- Zdroje variability
 - *Komplexnost biologického systému*
 - *Doba expozice*
 - *Uspořádání expozice*
 - *Expoziční scénář*
 - *Biologický systém – organismus, druh*
 - *Další specifika biologického systému*
 - *Hodnocený parametr, endpoint*
 - *Další abiotické faktory v experimentu*

In situ & In vitro

- ***in situ* (terénní) +** dlouhodobá expozice
- integrace toxických vlivů
-
- - mnoho neznámých faktorů, problematická interpretace dat

- ***in vitro* (laboratorní) +** faktory pod kontrolou, standardizované, srovnatelné, jsou v legislativě

- - některé biotesty jsou vzdáleny přírodě - pozor při interpretaci!

Současné trendy v ekotoxikologických biotestech

- Miniaturizace
- zkrácení doby inkubace při zachování citlivosti testu
- zjednodušení a možnost alternací při vyhodnocování testu (fluorescenční metody, molekulární sondy, průtoková cytometrie atd.)
- bezpodmínečná nutnost zapojení biotestů reprezentujících různé trofické úrovně v ekosystému - **kombinace- viz text!**
- využití nových vědeckých poznatků (nové Drafty norem)
- Co nejvíce se přibližovat při testování reálné situaci v terénu
- Stále častěji také sada biotestů zaměřených na mutagenitu, genotoxicitu, teratogenitu a biochemické márkry, enzymatické aktivity, či buněčné kultury, zaměřené na konkrétní typ látky, nebo účinku.
- **Dálkový přenos dat z on-line systémů**

Mikrobiotesty II. generace

Mezi biotesty II generace, tzv. mikrobiotesty patří ty které:

- využívají klidová. stadia testovacích organismů - nevyžadují udržování a kultivaci matečných kultur (MetPad, SOS chromotest, Chromotoxkit, Sediment Chromotest, Microtox Thamnotoxkit, Rotoxkit, Daphtoxkit, Ceriotoxkit, Protoxkit, Algatoxkit..)
- nahrazují používání zvířat pro testy toxicity (in vitro tkáně ryb, baterie Thamno-Roto-Chromo,)
- šetří laboratorní a kultivační prostor, vyžadují jen malé objemy vzorků, lze najednou zpracovat

Mikrobiotesty II. generace

Možnosti využití mikrobiotestů

- čistírny odpadních vod (odpadní vody, čistírenské kaly, ověření účinnosti čistírenského procesu)
- testování reziduí pesticidů a kontaminace zemědělských půd
- monitoring úniků cizorodých látek ze skládek různých typů odpadů
- sledování dopadů a rozšíření ekologických havárií, monitoring procesu dekontaminace po havárii
- monitoring kontaminace podzemních vod
- sledování biodegradability látek v modelových a přírodních podmínkách
- rychlé screeningové testování nových látek a chemikálií
- nasazení všude tam, kde se používají standardní ekotoxikologické biotesty, ale je zapotřebí zpracovat například více vzorků (miniaturizované, levnější)

Srovnání citlivosti standardních organismů používaných pro EB

(dvojchroman draselný – mg/l)

Poecilia reticulata	180 (120- 240)
Lemna minor	30 (10-60)
Sinapis alba	25 (10-40)
Microtox	3,8 (2,1-5,5)
Daphnia magna	1,4 (0,8-1,8)
Pseudokirchneriella subcapitata	0,5 (0,24-0,78)
Thamnocephalus platyurus	0,1 (0,08-0,25)

Citlivost k toxikantům je „species- dependent“

	DAPHNIA MAGNA 24 hr	STREPTOKIT F 24 hr (*)	THAMNOTOXKIT F 24 hr (**)	ROTOXKIT F 24 hr	MICROTOX 30'
SO ₄ ²⁻ (Na ₂ SO ₄)	5600	5600	3900*	3700	17000 (5') ^L
1.3 OTHER INORGANIC COMPOUNDS mg/l					
NaNO ₂		4.12	6.49		
Free NH ₃	190 ^L		13	4.6 ^L	2 (5') ^L
NH ₄ Cl		320	120 (pH 7.8) / 160		
2. ORGANIC COMPOUNDS					
2.1 HALOGENATED ALKANES mg/l					
Carbon tetrachloride	97				33.7 (15') ^L
Chloroform	79 ^L		> 1000	2.0 ^L	670 ^L
Dichloromethane	900		> 1000		2800 (5') ^L
1,1,1-Trichloroethane	11.2 (48hr) / 910		> 100		8.04 (15') ^L
2.2 ALCOHOLS mg/l					
Ethanol		19000 / 28000	39000	30000 / 39000	35000
Ethylene glycol		60000	39000	130000	621
Isopropanol		12000	24000	29000	4200 (5') ^L

Proto jsou nutné baterie testů!!!

	DAPHNIA MAGNA 24 hr	STREPTOXKIT F 24 hr (*)	THAMNOTOXKIT F 24 hr (**)	ROTOXKIT F 24 hr	MICROTOX 30'
Methanol		33000	39000	36000	320000
2.3 CARBOXYLIC ACIDS (mg/l)					
Trichloroacetic acid		1.46	20.6		
Sodium oxalate		410	210	64.2	
2,4-Dichloro- phenoxy-acetic acid		190		150 117	
Acetylsalicylic acid		180	130	140	
2.4 AMINES (mg/l)					
Aniline	0.9 ^L	3.12	0.85		432 (15) ^L
3,4-Dichloroaniline	0.2 ^L - 6 ^L		0.11	62 ^L	
2.5 PHENOLS (mg/l)					
Phenol	7.8 / 21 ^L	10.9	33	1200	36 ^L
2.6 DETERGENTS (mg/l)					
Sodium Dodecyl Sulfate (SLS)	17.4 ^L	29.1	10.6	1.4 ^L	1.1 ^L
2.7 AROMATIC HYDROCARBONS (mg/l)					
Benzene	510	> 100	> 50	> 1000 ^L	100 ^L

(*) = Presently replaced by the THAMNOTOXKIT F

(**) = Has replaced the STREPTOXKIT F

(L) = Value based on literature study

Složené z různých organismů!!!

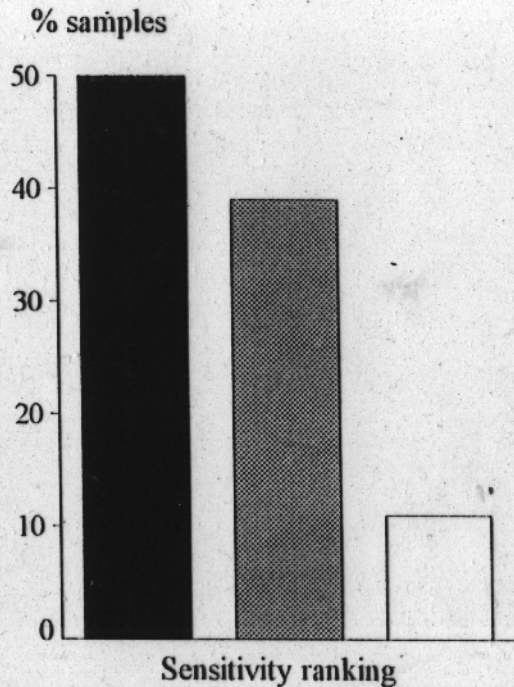
	DAPHNIA MAGNA 24 hr	STREPTOKKIT F 24 hr (*)	THAMNOTOKKIT F 24 hr (**)	ROTOXKIT F 24 hr	MICROTOX 30'
Mn ²⁺ (MnSO ₄ ·H ₂ O)	10	81.6	23.3	34.6	13.7 (15) ^L
Na ⁺ (NaCl)	400 / 2200	2700	1800	1500	20000(5) ^L
Ni ²⁺ (Ni(Acet) ₂)	21 ^L			4 ^L	
(NiCl ₂ ·2H ₂ O)	10.9			4.23	20 ^L
(NiSO ₄ ·6H ₂ O)	8.55	3.79	2.21	5.83	
Pb ²⁺ (PbCl ₂)	0.335 ^L		1.63	9.98	
(Pb(NO ₃) ₂)					0.4 ^L
Sb ³⁺ (SbCl ₃)		2.99	5.27		11.2 ^L
Tl ⁺ (Tl ₂ SO ₄)	3.38	0.27	0.32	6.18 / 3.7	920 ^L
Zn ²⁺ (ZnSO ₄)	2.1/1.2	0.66	0.69	2.42	2 ^L
(ZnCl ₂)		0.81	0.23	4.8	1.1 ^L
1.2 ANIONS mg/l					
Cl ⁻ (NaCl)	620	4200	2500 / 2900	2200	20000 (5) ^L
CN ⁻ (KCN)	0.39 / 6.1(48hr) ^L	2.12	0.13	62.3	2.5 ^L
F ⁻ (NaF)	290 / 350 ^L	70	1.65 / 2.54	180	12000 (5) ^L
NO ₃ ⁻ (NaNO ₃)		6300	3800 / 4400	3600	

(*) = Presently replaced by the THAMNOTOKKIT F

(**) = Has replaced the STREPTOKKIT F

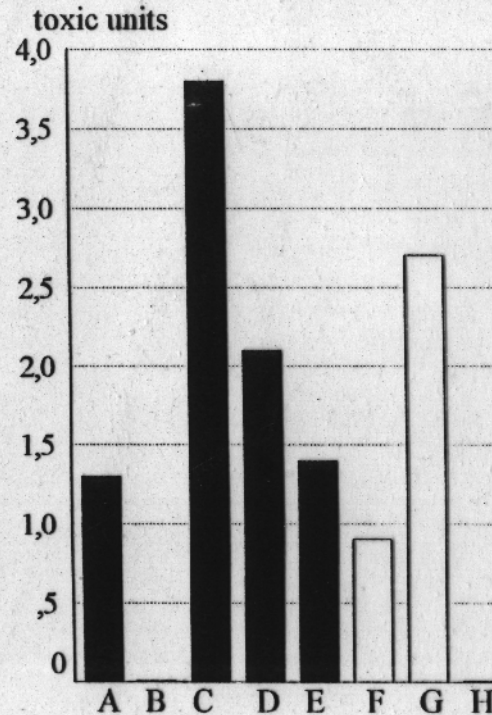
(L) = Value based on literature study

Fig.3: Sensitivity evaluation of the microbiotests versus conventional tests applied on the toxic sediments, waste waters and deep well



- Microbiotests more sensitive than conventional tests
- ▣ Microbiotests equally sensitive as conventional tests
- Microbiotests less sensitive than conventional tests

Fig.2: Acute toxicity detection potential of the individual bioassays for a deep well sample



- | | | | |
|---|-----------------|---|---------------------------------|
| A | Thamnotoxkit | E | Microtox |
| B | Rotoxkit | F | <i>Daphnia magna</i> |
| C | Ceriodaphtoxkit | G | <i>Raphidocelis subcapitata</i> |
| D | Protoxkit | H | <i>Poecilia reticulata</i> |

Obrázek 1

Posouzení citlivosti 17 biotestů k obsahu cyanotoxinů v biomase sinic
Výsledek shlukové analýzy I

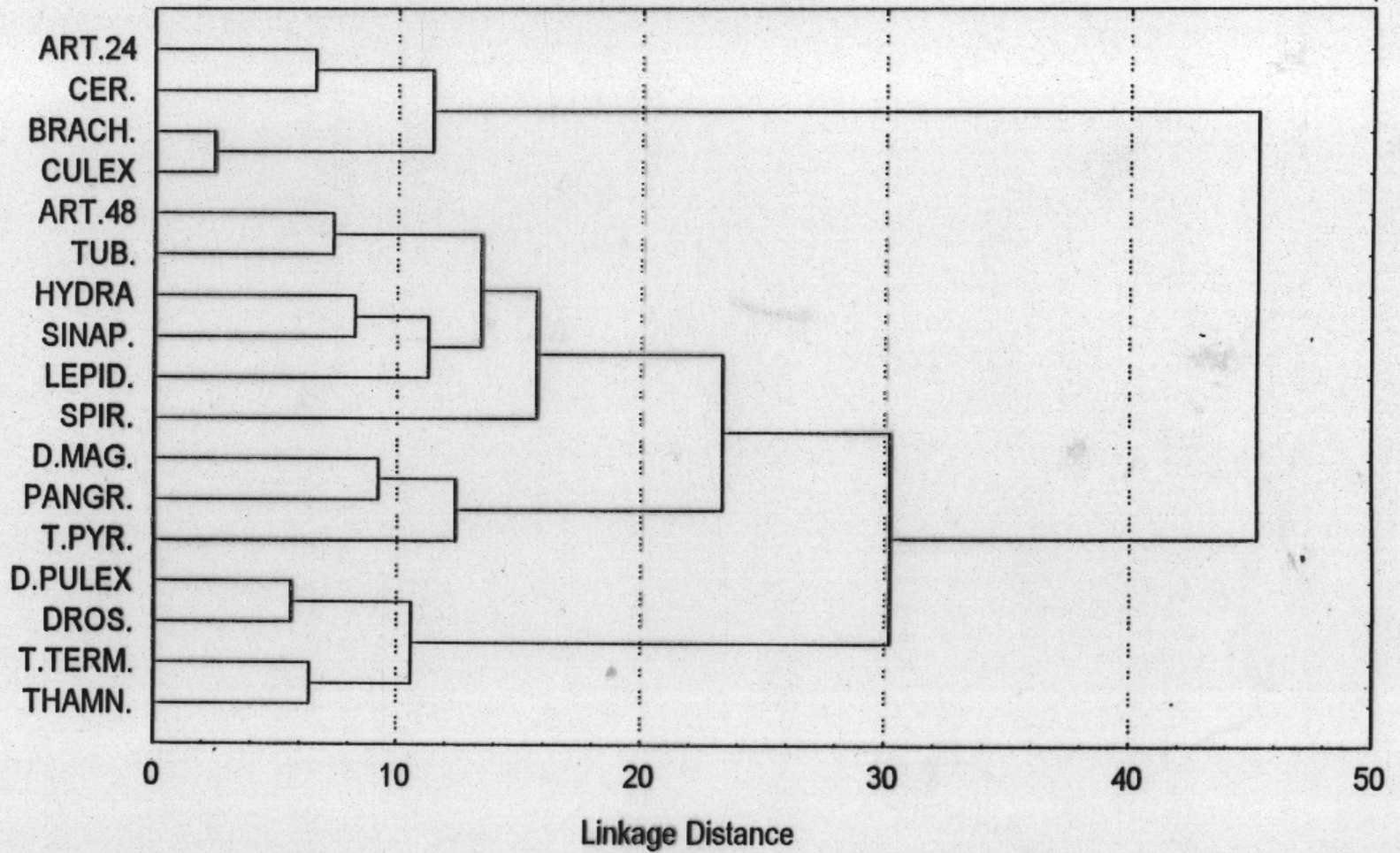
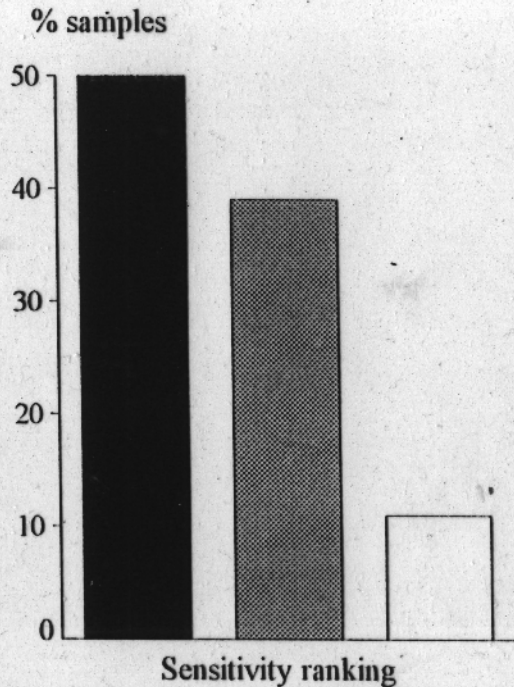


Table 1.

The influence of selected compounds on the growth of *Chlorella kessleri* in different medium. 96 h EC 50 values in $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (95% confidence interval) and coefficient of determination respectively. *values in $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

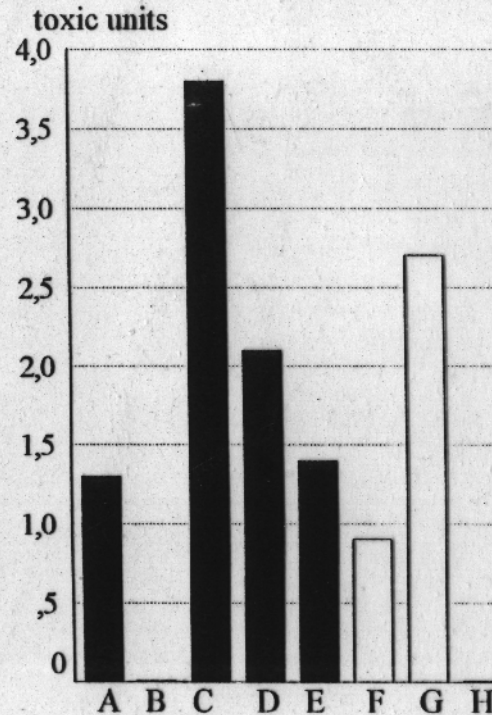
STANDARD BOTTLE ASSAY				
	OECD medium		BBM medium	
CdCl ₂	37.3	/26.5-48.5/ 0.73	78.1	/69.4-86.8/ 0.68
CuCl ₂	56.3	/50.5-62.1/ 0.82	83.7	/74.7-92.8/ 0.76
ZnCl ₂	54.1	/49.0-59.2/ 0.89	73.0	/67.1-78.9/ 0.86
bentazon	37.2	/33.2-41.2/ 0.92	44.6	/41.0-48.2/ 0.94
*imidazolin	78.7	/72.2-85.2/ 0.85	97.1	/88.4-105.8/ 0.84
*gluphosinate ammonium	11.3	/8.6-14.0/ 0.86	15.7	/11.5-19.9/ 0.91
MICROPLATE ASSAY				
	OECD medium		BBM medium	
CdCl ₂	40.1	/30.9-49.1/ 0.89	79.6	/74.4-84.8/ 0.96
CuCl ₂	53.5	/48.3-58.7/ 0.85	78.2	/71.6-84.6/ 0.94
ZnCl ₂	54.1	/49.0-59.2/ 0.89	66.5	/61.9-71.1/ 0.94
bentazon	31.7	/28.6-34.8/ 0.97	37.8	/33.6-42.0/ 0.94
*imidazolin	81.2	/75.4-87.0/ 0.96	89.6	/86.5-92.7/ 0.94
*gluphosinate ammonium	9.2	/ 6.5-11.9/ 0.98	13.6	/12.5-14.7/ 0.99
CHLOROPHYLL FLUORESCENCE ASSAY				
	OECD medium		BBM medium	
CdCl ₂	47.1	/37.5-56.5/ 0.88	48.3	/42.4-54.2/ 0.86
CuCl ₂	59.0	/54.4-63.6/ 0.90	56.6	/52.0-61.2/ 0.97
ZnCl ₂	72.3	/68.0-76.6/ 0.95	70.1	/66.5-73.7/ 0.96
bentazon	13.2	/10.1-16.6/ 0.98	14.0	/11.3-16.7/ 0.98
*imidazolin	94.7	/90.5-98.9/ 0.98	96.2	/93.1-99.3/ 0.94
*gluphosinate ammonium	10.1	/ 7.4-12.8/ 0.96	9.6	/ 8.5-10.7/ 0.98

Fig.3: Sensitivity evaluation of the microbiotests versus conventional tests applied on the toxic sediments, waste waters and deep well



- Microbiotests more sensitive than conventional tests
- ▣ Microbiotests equally sensitive as conventional tests
- Microbiotests less sensitive than conventional tests

Fig.2: Acute toxicity detection potential of the individual bioassays for a deep well sample



- | | | | |
|---|-----------------|---|---------------------------------|
| A | Thamnotoxkit | E | Microtox |
| B | Rotoxkit | F | <i>Daphnia magna</i> |
| C | Ceriodaphtoxkit | G | <i>Raphidocelis subcapitata</i> |
| D | Protoxkit | H | <i>Poecilia reticulata</i> |

Ekotoxikologické biotesty – ceník

FIRMA	CENA (Kč)				
	perloočky	ryby	řasy	hořčice	Mikrotox
Ekos Hradec Králové	3 150	2 280	2 970	2 100	1 950
Ekotest Hradec Králové	3 000	3 812	3 896	1 870	-
KHS České Budějovice	-	3 500	-	3 500	-
KHS Brno	4 000	4 000	4 000	4 000	-
KHS Ostrava	1 840	3 770	2 310	1 130	2 240
VURH Vodňany	4 000	16 -18000 12 - 13 000 kapr, pstruh	6 - 8 000	2 - 3000	-
o 47 laboratoří EC-ECU(Kč)	24h 200-1 700 (6-69 000)	96h 300-1 500 (9 - 45 000)	72h 300-1 500 (9-45 000)		

TEST	CENA (Kč)
Toxi-Chromopad-sediment	518 (3 opakování)
Toxi Chromotest	512 (6 opakování)
Thamnotoxkit	915 (5 ředění, 3 opakování)
Rotoxkit	915 (5 ředění, 6 opakování)

Používané & použitelné

- Přehled uvedený v textu = 1. Generace EB
- Národní legislativy mají již i normy na 2. generaci (mikrobiotesty) – ČR také!!!
- Úpravy a modifikace musí být popsány a zdůvodněny
- Pro speciální případové studie lze využít speciální (opakovatelné a validované) testy

Agentury a ekotoxikologické biotesty

- 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

Situace v ČR

- ČSN
- ČSN-EN-ISO.
- Aby to nebylo jednoduché, jsou současně platné například také tzv. oborové normy pro jednotlivé resorty, či odvětví. Příkladem mohou být Oborové normy pro vodní hospodářství, které mají označení **TNV**.

Závěr

- 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 v normovaných testů, ale také jejich alternativ a nových publikací oboru.