



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Testy toxicity sedimentů

K.Hilscherová



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Sedimenty

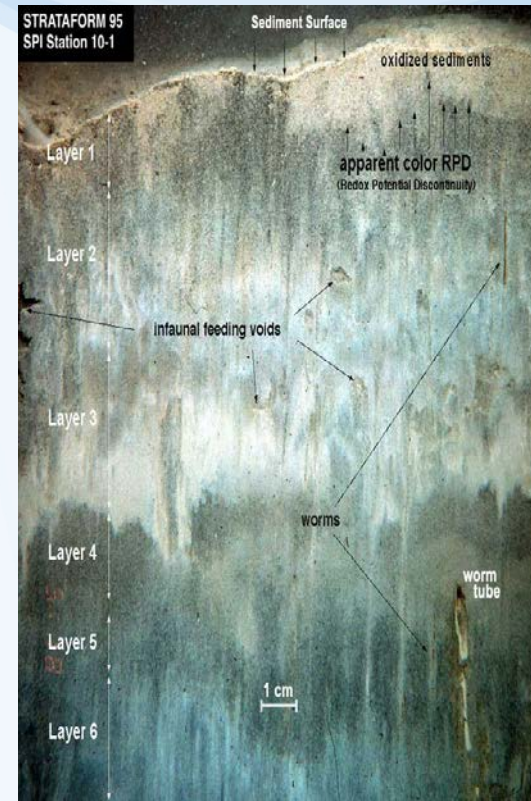
- velmi různorodé složení - polotuhá matrice - pevná fáze (částice) a pórová voda
- v podstatě akvatický ekvivalent půdy
- heterogenní prostředí - směs jílu, písku, minerálů, huminových látek, odumřelých organismů a antropogenních polutantů
- akumulace a inaktivace polutantů
(např. AVS – kovy, Corg – 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 K_{ow} = 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



Transport a resuspendace sedimentů

Proudy, povodně, vítr, vlny

- Způsobují pohyby sedimentů v závislosti na jejich velikosti

Porová voda

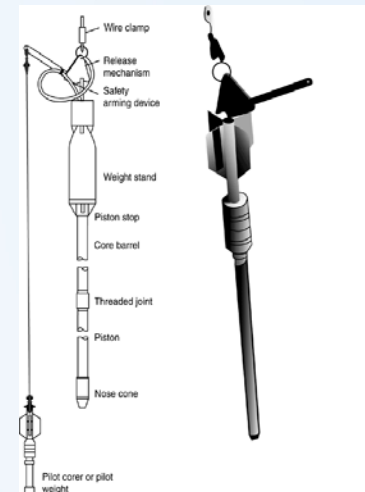
- Voda mezi částicemi sedimentů
- Nepochybně polutantů → sedimenty → porová voda → vodní sloupec
- Primární zdroj expozice polutantů pro organismy žijící v sedimentu

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



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**



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



Testy se sedimenty

- Organismy v sedimentu vystaveni látkám zachyceným v pevné i kapalně 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

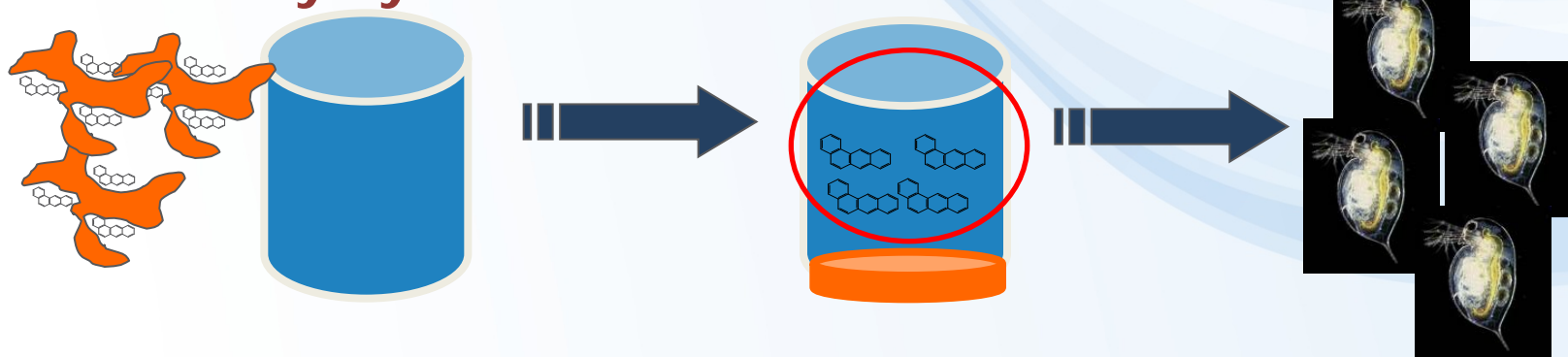


Jak hodnotit toxicitu sedimentů?

- **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 vodného výluhu. Je mezistupněm ke kontaktním zkouškám ekotoxicity

Testy genotoxicity s výluhy:

- SOS chromotest
- umuC test
- GFP test atd.



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**^{*})



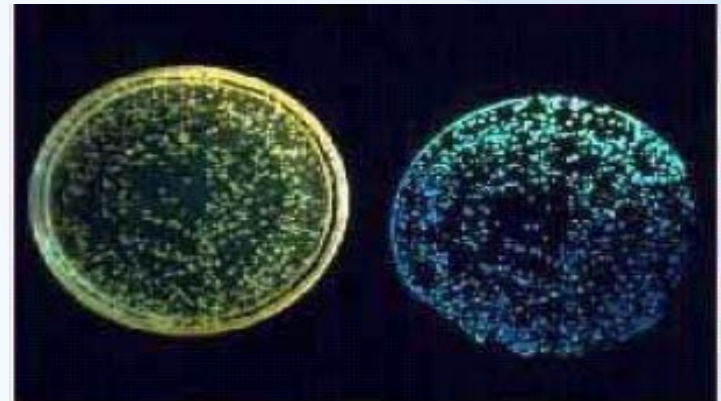
Microtox

- *Vibrio fischerii*
 - Mořská bakterie schopná bioluminiscence



Design:

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

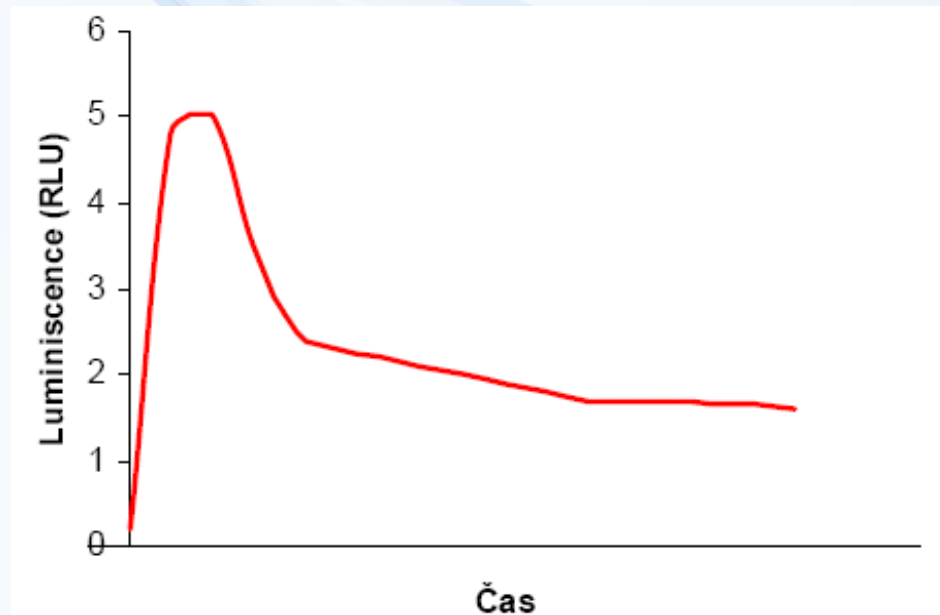


Flash test

- *Vibrio fischeri*
 - 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_{max} (0-2s) v porovnání s píkem S_{30s} (po 30s měření)



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



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

- korýš *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* a *Ceriodaphnia dubia*, *Hexagenia* spp.,

Chronický test s *Tubifex tubifex* (28 dní) – přežívání, růst, reprodukce

Chronický test s *H. azteca*

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
	<i>Diporeia sp</i>	Amphipod, Great Lakes
Marine Benthic	<i>Americamysis bahia</i> TM	Mysid shrimp
	<i>Ampelisca abdita</i>	Amphipod (Atlantic)
	<i>Eohaustorius estuarius</i>	Amphipod (Pacific)
	<i>Leptocheirus plumulosus</i>	Amphipod (Atlantic)
	<i>Rhepoxynius abronius</i>	Amphipod (Pacific)
	<i>Grandidierella japonica</i>	Amphipod

www.epa.gov



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Ekotoxikologické biotesty se sedimenty – přehled EPA

	<i>Psammechinus 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



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Testy toxicity sedimentů ASTM

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

Species:	<ol style="list-style-type: none">1. Amphipod (<i>Hyaella azteca</i>)2. Midges: <i>Chironomus tentans</i>, <i>Chironomus riparius</i>3. <i>Daphnia magna</i> and <i>Ceriodaphnia dubia</i>4. Mayflies (<i>Hexagenia</i> spp.)
Endpoints:	<ol style="list-style-type: none">1. Number of young; survival, growth & development; reproductive capacity2. Larval survival and growth, adult emergence3. Survival and reproduction4. Mortality, growth, burrowing behaviour, moulting frequency
Duration:	10–30 days for tests 1 and 2; 2–7 days for test 3; 7–21 days for test 4
Temperature (°C):	20–25 for test 1; 20–23 for test 2; 25 for test 3; 17–22 for test 4
Conditions:	Static for all tests; flow-through for tests 1 and 2; recirculating for test 4
Level of effort:	Medium for all tests



Testy toxicity sedimentů ASTM

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

Species:	<ol style="list-style-type: none">1. Amphipods2. Fish, crustaceans, zooplankton, or bivalves3. Infaunal amphipods, burrowing polychaetes, mollusks, crustaceans, or fish
Material:	<ol style="list-style-type: none">1. Whole sediment2. Dredged material (elutriate)3. Dredged material (whole sediment)
Endpoints:	<ol style="list-style-type: none">1. Mortality, emergence, renurial2. Mortality3. Survival
Duration:	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
Temperature (°C):	20–25 for test 1; 20–23 for test 2; 25 for test 3; 17–22 for test 4
Conditions:	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, mlži, korýši, kroužkovci - *Hyallela*, *Lumbriculus*

Tubifex tubifex - Nitěnka obecná

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 ředící vodě. Expozice je 48 h. Možno i prolongovaný 10-14 denní test

Hodnocené parametry: přežívání, aktivita, bioakumulace

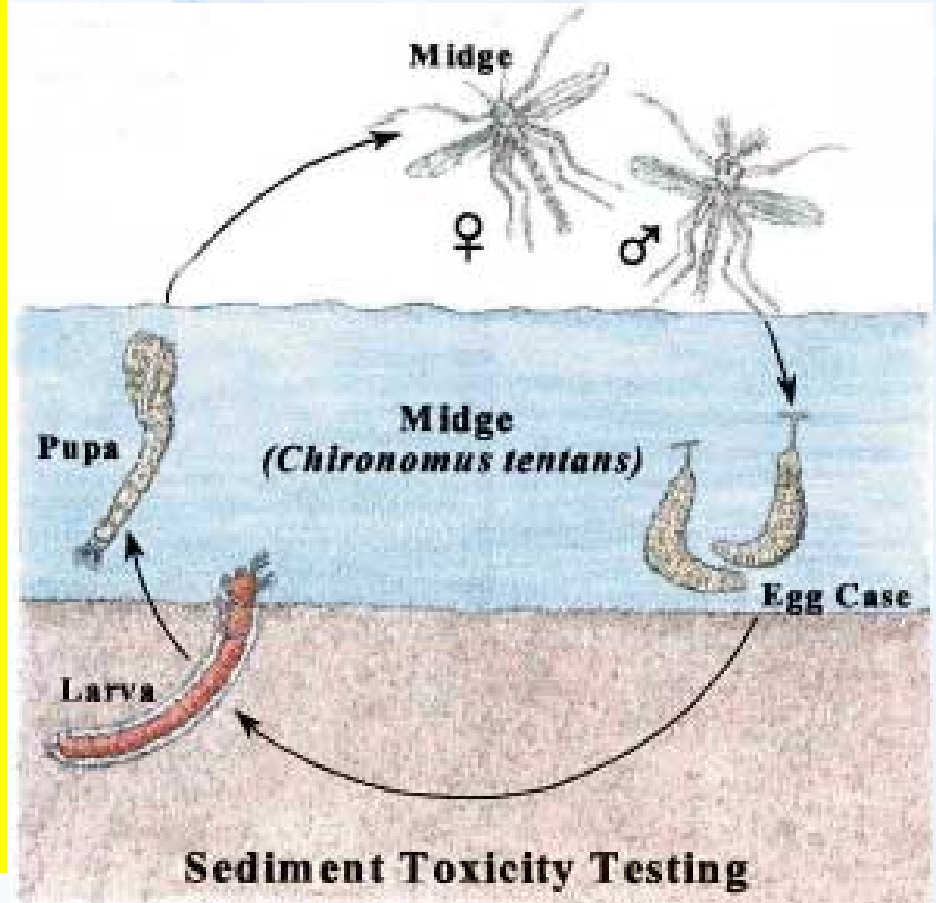
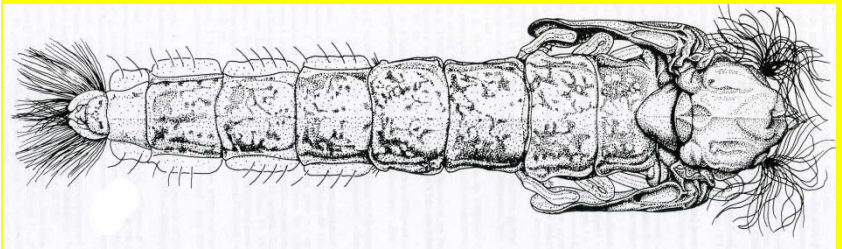
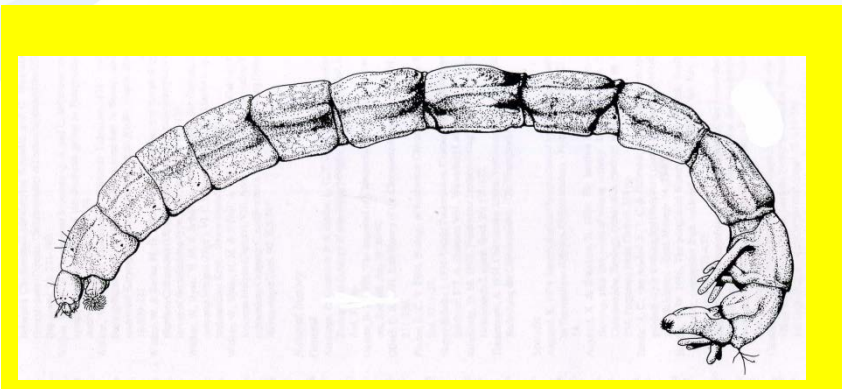


Testy s larvami pakomárů rodu *Chironomus*

- 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*

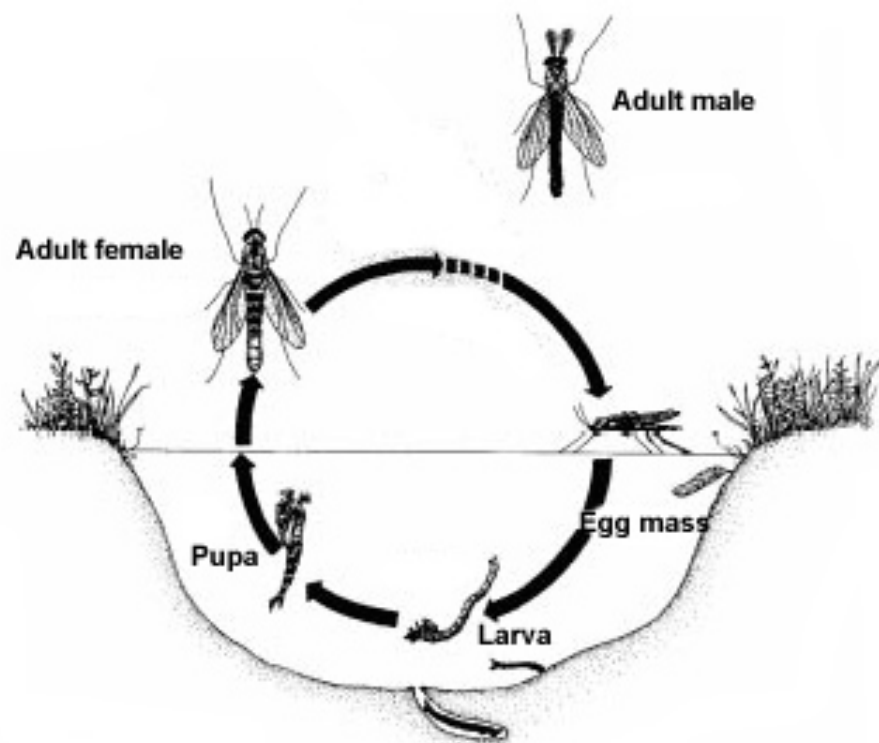


Chironomus riparius Meig. (pakomár)



Charakteristika modelového druhu

- rod *Chironomus* - řád dvoukřídí (*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
 - živí se řasami, rozsivkami, detritem



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 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$

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



Nasazovány larvy mladší jak 24 h

12 jedinců/kádinku

100 ml sedimentu/175 ml vody

Teplota $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$

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 artificiální nebo přírodní
- voda - studniční, povrchová, provozní, uměle připravená
- sediment : voda 1:4
- 20 ±2°C, 500 – 1000 lux, 16L : 8D

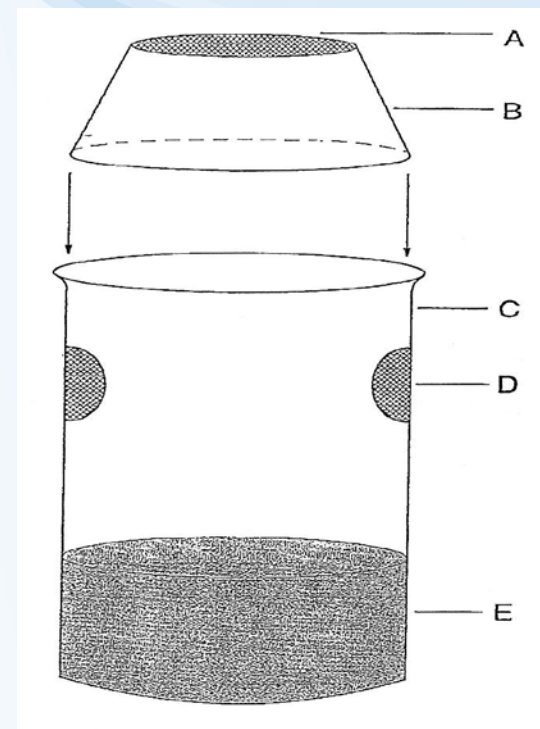
kontaminace: sedimentu

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)

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



Celoživotní test - dle OECD #218/219

- 1-4 dny staré larvy vysazujeme do sedimentu
- 20 jedinců/kádinka
- počet opakování: 3 - EC_x; 4 - NOEC, LOEC
- krmení– tetrafin^R, 0,25-0,5 mg/larva/den
- délka trvání – 28d (*C. riparius*)



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 vylíhlých jedinců celkem (na konci pokusu)

Přijatelnost testu: ER kontroly >0,7

- střední čas vývoje: čas od vysazení do líhnutí



- střední rychlost vývoje:

$$\bar{x} = \sum_{i=0}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

$$x_i \equiv \frac{1}{den_i - l_i / 2}$$

x : střední rychlost vývoje v kádince

i : index intervalu mezi pozorováními

m : počet všech intervalů mezi pozorováními

f_i : počet vylíhnutých jedinců během daného intervalu

n_e : počet vylíhlných jedinců celkem (na konci pokusu)

x_i : rychlost vývoje larev vylíhlných v intervalu i

den_i : den pozorování (od začátku)

l_i : 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-Haentz 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 behaviorálních funkce

Projevy u bezobratlých:

Narušení reprodukce, rodivosti (fekundita)

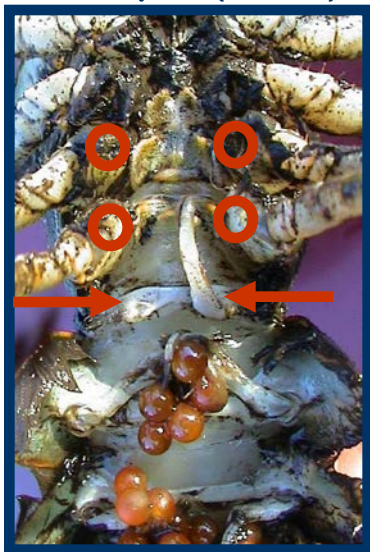
Poruchy růstu, sexuálního dozrání (maturace)

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*



Barki et al. (2003)



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



SUBLETÁLNÍ TOXICITA U VODNÍCH MĚKKÝŠŮ

- vodní měkkýši využíváni 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



Parametry „*Potamopyrgus* sediment testu“

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

- o přírodní
- o umělé
- o **spojovaný umělý sediment**
vhodnocení efektů čistých látek

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



Médium

- voda s přísadou NaHCO_3 , CaCO_3
- 16°C ,
 $700 \pm 100 \mu\text{S/cm}$

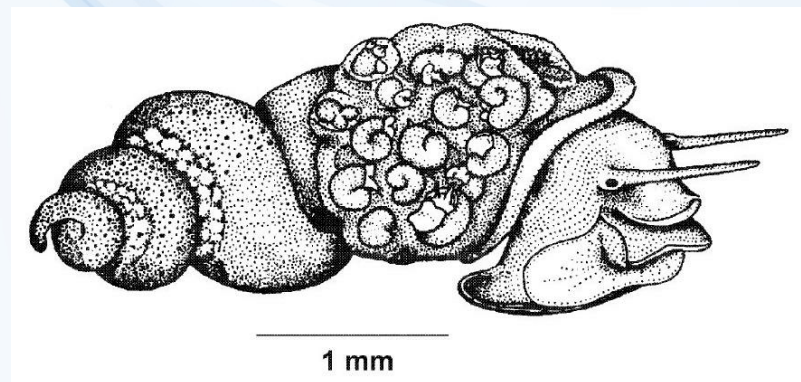
L:D 16:8

**Komerční řasové
pelety**



Expozice, vyhodnocení

Parametry: mortalita a počet plně vyvinutých a nezralých embryí



(Xeno)estrogenní účinek

ethinylestradiol, bisfenol A, octylfenol, nonylfenol

Xenoandrogenní účinek

tributylcín, trifenylcín

Biomonitoring dnových sedimentů (Nisa, Odra)



Kontaktní Testy Toxicity – ovlivňující faktory

Faktory mimo kontaminace

- zrnitost sedimentů
- obsah a typ jílu
- obsah a charakter organického uhlíku
- struktura a vlastnosti huminových látek/organického materiálu
- pH
- obsah kyslíku
- toxicita amoniaku /sulfidů
- aktuální stav testovací populace
- výživa

Změny toxicity sedimentů díky vzorkování a experimentálnímu postupu

- promíchání více kontaminovaných sedimentů s tenkou vrstvou na rozhraní vody-sedimentů
- oxidace a precipitace redukováných kovů díky provzdušňování požadovanému v testu toxicity



Testy bioakumulace

- Kontaktní testy – celý sediment
- 28-56 dní expozice
- In-situ a/nebo Ex-situ testy pro zhodnocení příjmu kontaminantů organismy
- Používány zejména na lokalitách kontaminovaných bioakumulativními látkami (PAHs, PCBs, rtuť, PCDDs/PCDFs, ...)
- Výsledky porovnávají s referenčními lokalitami a/nebo povolenými limity
- Druhy: různonožec (*Hyalella azteca*), máloštětinatci (*Lumbriculus variegatus*, nitěnka obecná)

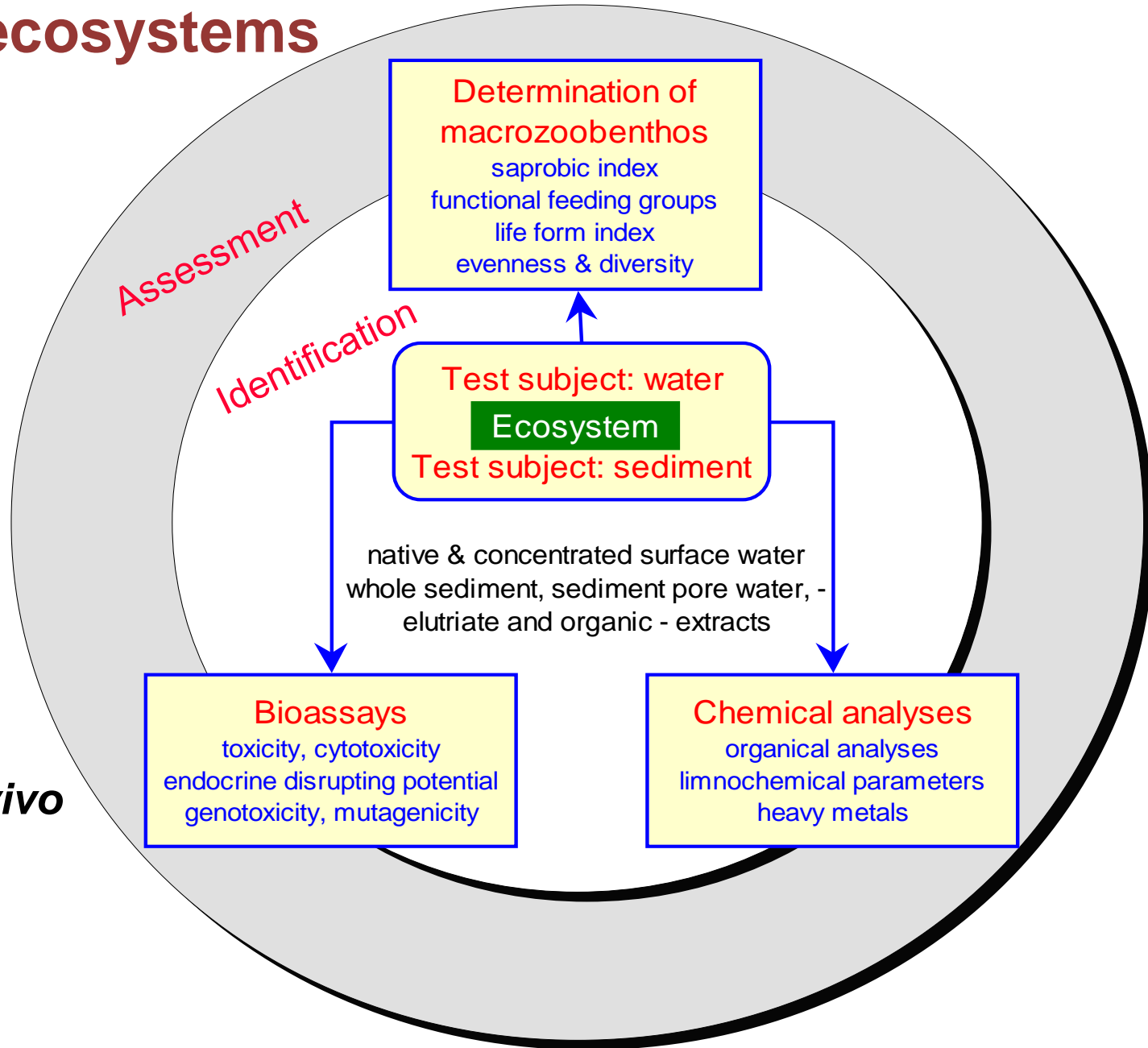


In situ testy

- Klecování – měkkýši, ryby, další bezobratlí,
- Mortalita, zdravotní stav, příp. reprodukce a specifické biomarkery v exponovaných organismech
- Subletální biomarkery, histologie



Integrated assessment of aquatic ecosystems



Assessment

Identification

Determination of macrozoobenthos

saprobic index
functional feeding groups
life form index
evenness & diversity

Test subject: water

Ecosystem

Test subject: sediment

native & concentrated surface water
whole sediment, sediment pore water, -
elutriate and organic - extracts

Bioassays

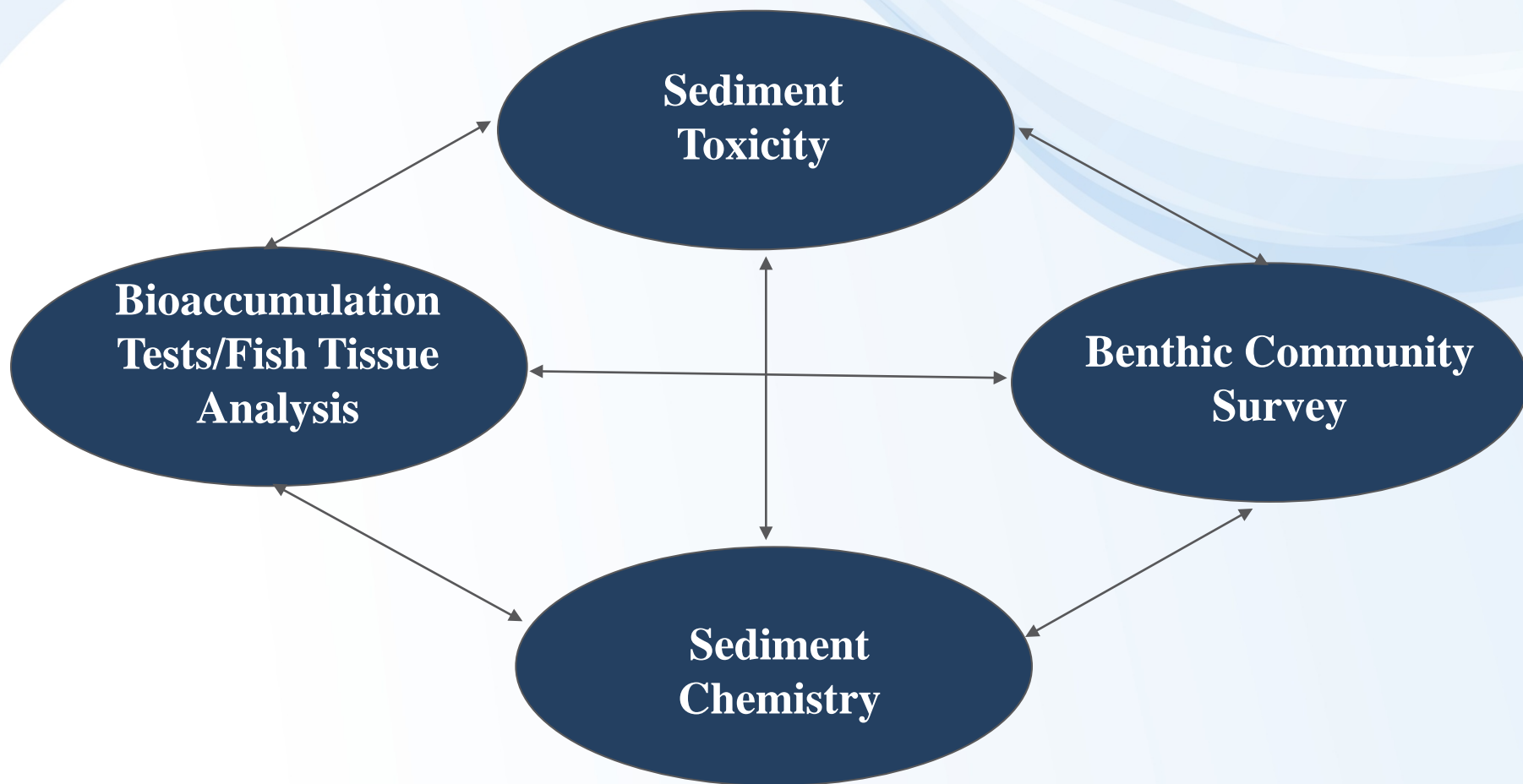
toxicity, cytotoxicity
endocrine disrupting potential
genotoxicity, mutagenicity

Chemical analyses

organical analyses
limnochemical parameters
heavy metals

... *in vitro* and *in vivo*
bioassays

THE SEDIMENT QUALITY “QUADRAD”





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí