



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Experimentální modely ekotoxicity pro bezobratlé živočichy

Klára Hilscherová
RECETOX- Přírodovědecká fakulta MU Brno



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Bezobratlí živočichové



Bezobratlí živočichové

- Přítomnost a aktivita bezobratlých je naprosto rozhodující pro stav ekosystému.
- Bezobratlé najdeme ve všech ekosystémech.
- Bezobratlí tvoří významnou část celkové biomasy v terestrických i akvatických ekosystémech, mají nepoměrně vyšší druhovou bohatost oproti obratlovcům.
- Hrají významnou roli v potravním řetězci jako destruenti, ale i konzumenti prvního a druhého řádu, s čímž je spojená možná bioakumulace.
- Díky změnám habitatu při metamorfóze mohou zasahovat do více ekosystémů i během jednoho životního cyklu, díky čemuž mohou přijímat široké spektrum polutantů a přenášet je mezi jednotlivými ekosystémy.



Testy ekotoxicity v půdě

hlístice



Půdní testy s bezobratlými

Uspořádání : umělý substrát, vlhčená petriho miska, standardní nebo přírodní půda – různé nádoby...

- zpravidla 14 dní (letalita),
56 dní – reprodukce ...

Organismy

Kroužkovci – žížaly, háďátka, roupice

Hmyz - Chvostokoci (Collembola)

roupice



žížaly



chvostokoci



TERESTRICKÉ PROSTŘEDÍ – konzumenti - bezobratlí

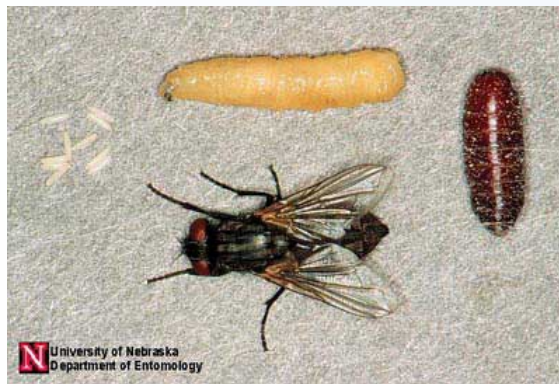
Zejména pro testování biocidů

VČELY

- testování insekticidů
- dávkování v potravě, či na povrch těla



Moucha domácí



Drosophila
(hodnocení genotoxicity)



Testy na včelách

- Stanovení toxicity pesticidů a jiných chemických látek pro včely
- Je-li expozice včel dané chemické látce pravděpodobná
- Cílové organismy se od užitečných příliš neliší
- Snaha minimalizovat škody
- Stupňované programy hodnocení nebezpečnosti pesticidů - postupný přechod od laboratorních zkoušek k semi-polním a polním experimentům
- **Včela medonosná** (*Apis mellifera*) je při studiu problematiky modelem i pro ostatní užitečný hmyz

Čím se může včela otrávit?

- agrochemikálie
- voda
- ovzduší
- omyl
- zlý úmysl

Toxicita:

- orální
- kontaktní
- sekundární



Včely - Chov a krmení

- dobře větrané klícky
- 10 včel ve skupině (náhodně)
- ve tmě při teplotě 25 ± 2 °C
- potrava – vodný cukerný roztok
- po podání zkušebních dávek potrava ad libitum

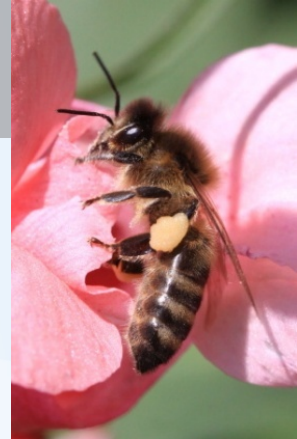


Zkouška akutní orální toxicity

- NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008
- konzumace cukerného roztoku se zkoumanou látkou
- zaznamenání mortality po 4, 24 a 48 h
- pokud mortalita v kontrole nepřekročí 10% – možné prodloužení až na 96 hodin
- pokud na nosičích – emulgátory, organická rozpouštědla apod. (1%) - pro rozpouštědla samostatná kontrolní skupina



Test akutní kontaktní toxicity



- NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008
- dospělé dělnice, klíčka po 10 ks
- zkušební látka - aplikace jako roztok v nosiči, tj. v organickém rozpouštědle (aceton, dimethylformamid, dimethylsulfoxid), nebo ve vodě se smáčedlem.
- samostatné kontrolní skupiny: voda a roztok s rozpouštědlem/nosičem.
- lokální aplikace: objem 1 μ l roztoku se aplikuje mikroaplikátorem na zádovou oblast hrudníku včely.
- pro aplikaci možná mírná narkotizace CO₂ nebo dusíkem.
- délka zkoušky: 48h; Pokud mortalita v kontrole nepřekročí 10%, možno prodloužit na 96 h. - záznamy 4/24/48/96 h



Vyhodnocení testů na včelách

- výpočet příjmu látky jednou včelou
- porovnání s kontrolními skupinami
- vyhodnocení LD₅₀
- Protokol o zkoušce
 - zkoušená látka (fyzikální a chemické vlastnosti)
 - testovací druh (název, plemeno, stáří, zdravotní stav)
 - zkušební podmínky (teplota, vlhkost, velikost a materiál klíček, příprava roztoků, datum)
 - Výsledky: mortalita pro každou koncentraci v každém čase (graf), hodnoty LD₅₀, mortalita v kontrolních skupinách, jiné účinky (neobvyklé chování, rychlost spotřebování potravy..)

Validita zkoušky:

- průměrná mortalita ve všech kontrolních skupinách $\leq 10 \%$
- LD₅₀ pro standard toxicity odpovídá specifikovanému rozsahu



Akutní toxicita pro včely

Absolutní toxicita v klíčkových pokusech je vyjádřena hodnotami LD50 orální a kontaktní dorsální aplikace. Pro další hodnocení používáme vždy nižší ze získaných hodnot.

Dále hodnotíme podle této stupnice, zavedené dr. Atkinsem:

- LD50 < 2 $\mu\text{g}/\text{včela}$ = vysoce toxické
- 2 -11 $\mu\text{g}/\text{včela}$ = mírně toxické
- > 11 $\mu\text{g}/\text{včela}$ = relativně netoxické



Stanovení toxicity pro včely

Polní (stanové) pokusy



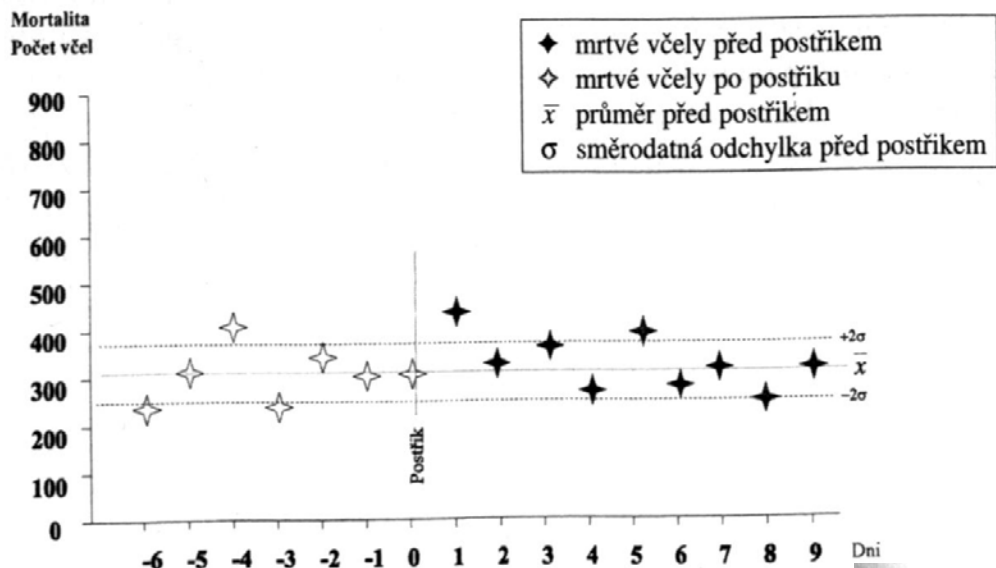
Pokusy v proletové hale



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

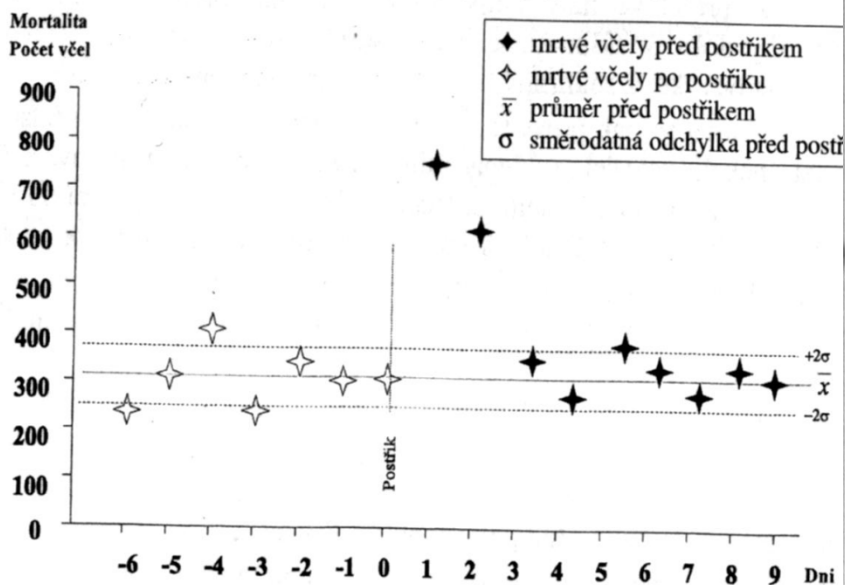
VÚ včelařský Dol,
akreditovaná zkušební laboratoř

Mortalita včel v proletové hale I - látky pro včely relativně neškodné

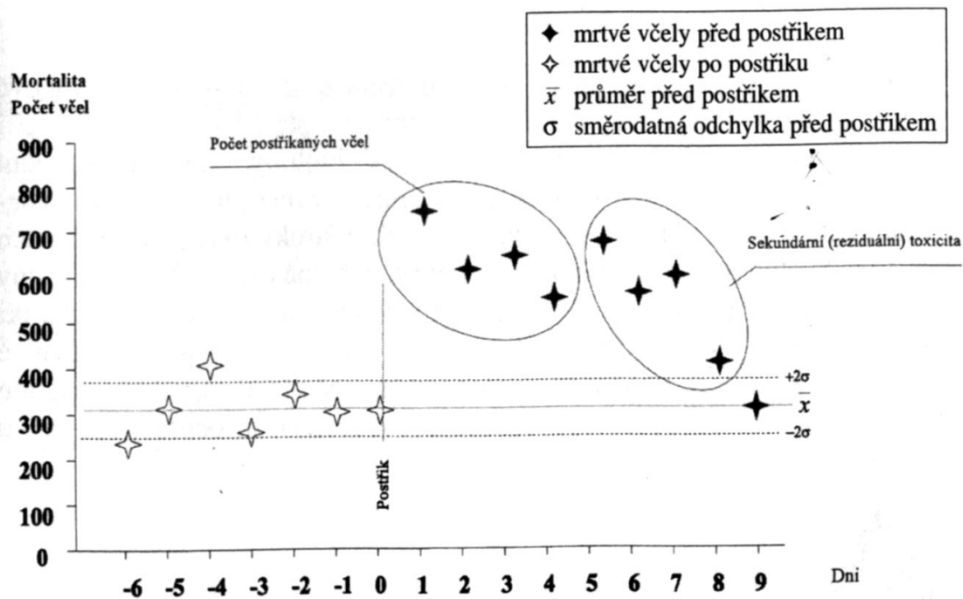


- akutní toxicita
- sekundární toxicita
- toxicita vůči vývojovým stadiím
- subletální účinky (orientace, změna vůně,...)

Mortalita včel v proletové hale II - látky pro včely škodlivé



Mortalita včel v proletové hale III - látky pro včely jedovaté



Testy toxicity na vodních bezobratlých

Stanovení akutní či prolongované toxicity: chemických látek, výluhů z pevných matric, průmyslových či komunálních odpadních vod, povrchových nebo podzemních vod

Normy testů na bezobratlých:

ČSN EN ISO, OECD, ASTM, US EPA, TNV, EEC, AFNOR

Testy na korýších (Crustacea) - planktonní - nejčastější

Daphnia magna, D. pulex, Ceriodaphnia dubia, Artemia salina (mořská)
Thamnocephalus platyurus

Testy na vířnících (Rotifera) - *Brachionus calyciflorus*

Testy na kroužkocích (Annelida) - *Tubifex tubifex*

Testy na hmyzu (Insecta) - *Chironomus tentans*

Testy na měkkýších (Mollusca)

Potamopyrgus antipodarum

Testy na bentických korýších (Crustacea)

Gammarus, Hyallela azteca



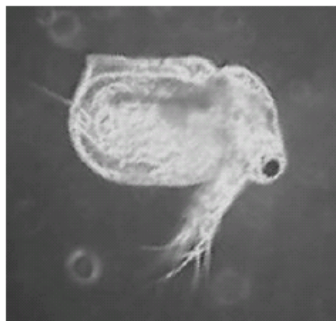
Daphnia magna



Artemia salina



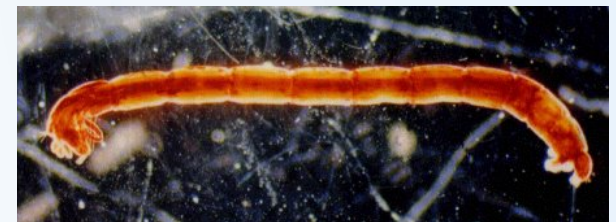
Ceriodaphnia dubia



Gammarus



Chironomus riparius



Hrotnatka velká (*Daphnia magna*)

Říše *Animalia* (živočichové) – kmen *Arthropoda* (členovci) –
podkmen *Crustacea* (korýši) - třída *Branchiopoda* (lupenonožci) – řád
Cladocera (perloočky) – čeleď *Daphniidae* (hrotnatkovití) – rod
Daphnia (hrotnatka)

Daphnia pulex (hrotnatka obecná), ***D. magna*** (h. velká)

- zástupce zooplanktonu
- akutní i chronické testy
- běžně používaný modelový organismus

(OECD 1984)

- citlivost k toxikantům
- rychlá reprodukce
- determinované toxikologické parametry
- rychlý životní cyklus
- snadná kultivace
- biochemické markery

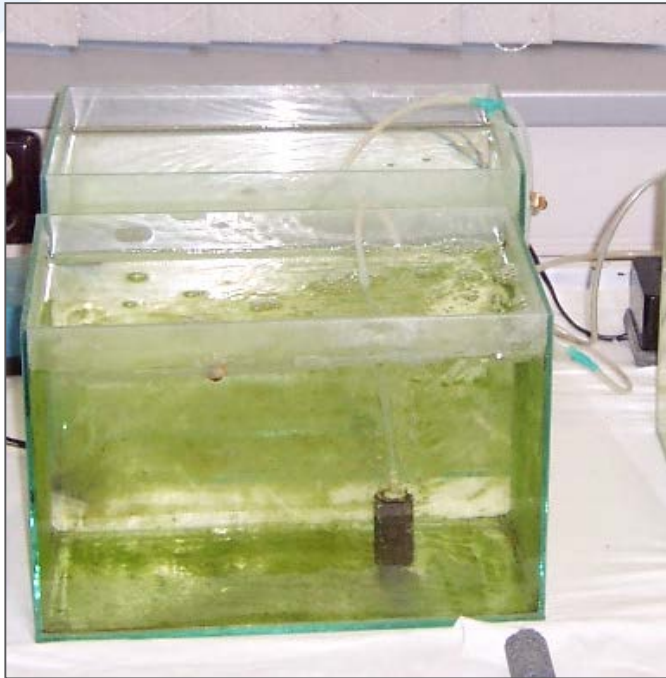


Normy testů s *Daphnia magna*

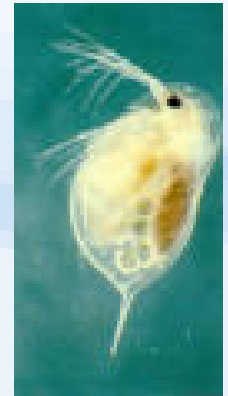
- ČSN ISO 6341 (75 7751) Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Zkouška akutní toxicity
- ČSN ISO 10706 (75 7752) Jakost vod – Stanovení chronické toxicity látek pro *daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)
- ISO 6341/1996 Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test
- ISO 1070/2000 Water quality - Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)
- OECD 202 *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test (Updated Guideline, adopted 4th April 1984)
- OECD 211 *Daphnia magna* Reproduction Test (Original Guideline, adopted 21st September 1998)



Permanentní laboratorní chov *Daphnia magna*



- **kultivační místnost**
- **stálá teplota $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$**
- **stálá fotoperioda
16h světla / 8h tmy**
- **stálé pH**
- **kultivační médium M4**
- **pravidelné krmení
směsí řas**



3 – 5 mm dlouhý, převážně planktonický sladkovodní živočich dospívají během 6 - 10 dní, množí se partenogeneticky, životnost až 56 dní při 20°C



Akutní test na *Daphnia magna*

Cíl: určení počáteční koncentrace, která v testu imobilizuje 50% jedinců *Daphnia magna*

Podmínky akutního testu:

- jedinci mladší 24 hodin, získaní partenogenezí
- expozice 24/48 h, bez aerace, bez krmení, bez úpravy pH
- standardní médium (CaCO_3 , MgSO_4 , NaHCO_3 , KCl)
- bez osvětlení nebo 16 h světla / 8 h tmy, teplota $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$
- pH 6 - 9 (změna během testu $\text{max.} \pm 1,5$)
- během testu měříme pH, teplotu, O_2
- rozpuštěný kyslík $\geq 2\text{mg/l}$ / $\geq 3\text{mg/l}$
- referenční látka: dichroman draselný

Zpracování a příprava vzorků vody

- Láhve se naplní vzorkem, aby se zamezilo přístupu vzduchu.
- Zkouška toxicity se provede co nejdříve po odběru, nejpozději do 6 hod. Pokud není možné tento interval dodržet, vzorek se na místě odběru zchladí na $+4^\circ\text{C}$ [nebo zmrazí na -20°C]. V tomto případě musí být vzorek zpracován do 48 hod.



Vlastní zkouška:

Nejméně: 20 jedinců na koncentraci (4x5ml/5ks),
5 organismů na jamku či nádobku

- nádobka 5-10ml/ks (30 jamková destička (10 ml)) - 2 ml testovaného roztoku na jedince



Zkoušené roztoky:
min. 5 koncentrací +
kontrola (testovaná látka
+ ředící médium)



Sledovaný parametr: imobilizace po 24, 48 hodinách - počítáme mobilní jedince
- kritérium imobilizace: jedince, kteří nejsou schopni se rozplavat ani po 15s
mírném zamíchání považujeme za imobilizované, i kdyby ještě pohybovali
tykadly

Platnost výsledků = validita testu

Koncentrace rozpuštěného kyslíku na konci zkoušky je větší anebo se rovná 2 mg.l^{-1}
Procento imobilizace kontrolních vzorků je menší než nebo se rovná 10%
24h-EC50i pro dichroman draselný je v rozsahu od 0,6 do $1,7 \text{ mg.l}^{-1}$

Vyjadřování výsledků

Hodnocení:

Počet imobilních jedinců

počáteční inhibiční koncentrace - hodnoty EC50 (pro 24h a 48h)

popř. nejnižší c pro 100% imobilizaci a nejvyšší c pro 0% imobilizaci

Hodnoty 24h-EC50i, 48h-EC50i a limity odpovídající 0% a 100% imobilizace se vyjadřují:

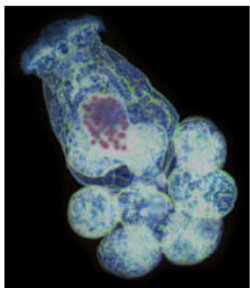
U odpadních vod v procentech ředění

U chemických látek v miligramech na litr



ALTERNATIVNÍ MIKROBIOTESTY ("toxikity") s bezobratlými

www.microbiotests.be



**Test organisms are included in the kits as "dormant eggs (cysts)" which can be hatched "on demand"*

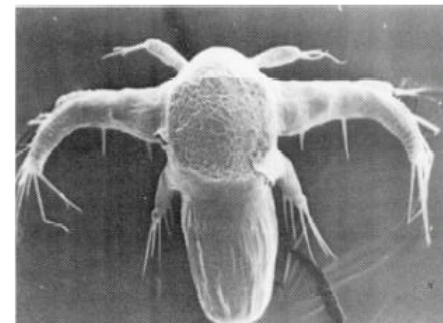
ROTOXKIT F *chronic*

Contains all the materials to perform three 48h reproduction assays



THAMNOTOXKIT F™ *MICROBIOTESTS*

With the crustacean
Thamnocephalus platyurus



PROTOXKIT F™ *MICROBIOTESTS*

With the ciliate
protozoan
Tetrahymena thermophila



MIKROBIOTESTY

<http://www.microbiotests.be/>

- Výhody: miniaturizace, zkrácení doby inkubace a tím i zjednodušení
- Možnost dlouhodobého uchovávání testovacích organismů ve formě kryptobiotických klidových stádií, v lyofilizovaném nebo imobilizovaném stavu.
- Organizmy se před použitím v testech uvedou do aktivního stavu.
- Synchronně vylíhlí jedinci jsou uniformní a pocházejí z geneticky přesně definovaných zásobních kultur.
- V současnosti jsou mikrobiotesty komerčně dostupné v podobě tzv. toxkitů



Mikrobiotesty

DAPHTOXKIT FTM magna, DAPHTOXKIT FTM pulex: 24-48h test akutní toxicity pro korýše *Daphnia magna* a *Daphnia pulex* (odpovídá OECD a ISO normám)

CERIODAPHTOXKIT FTM: 24 h test akutní toxicity pro korýše *Ceriodaphnia dubia* (odpovídá USEPA normě)

THAMNOTOXKIT FTM: 24 h test akutní toxicity pro korýše *Thamnocephalus platyurus* (Test s *Thamnocephalem* u nás normován TNO)

OSTRACODTOXKIT FTM: 6 denní chronický test toxicity (mortalita/inhibice růstu) s korýšem *Heterocypris incongruens*. První kontaktní mikrobiotest pro kontaminované sedimenty nebo půdy

ROTOXKIT FTM: 24 h test akutní toxicity pro vířníka *Brachionus calyciflorus* (odpovídá standardní normě ASTM E1440-91).

ROTOXKIT FTMshort –chronic: 48h krátký-chronický (reprodukční) test s vířníkem *Brachionus calyciflorus* (odpovídá francouzské normě AFNOR)

PROTOXKIT FTM: 24h chronický (inhibice růstu) test toxicity pro prvoka *Tetrahymena thermophila*. Metodika pro odpovídající test je vyvíjena v OECD.

RAPIDTOXKIT (tm): Hodinový test toxicity s larvami korýše *Thamnocephalus platyurus* pro rychlou detekci kontaminace vody.



Mikrobiotesty

Thamnotoxkit

- Testovací organismus *Thamnocephalus platyurus*
- Uchovávání: klidová stádia
- Doba líhnutí: 20 hod., 4000 lx, 20°C
- Inkubace: 24 hod., 4000 lx, 20°C
- Vyhodnocení: mortalita, 24 LC₅₀

Výhody: 20 h líhnutí, větší, citlivý organismus, expozice 24-48 h, srovnatelné výsledky s dafnií (+ citlivější) i zakalené/zabarvené vzorky, je v TNV

Obdobně CERIODAPHTOX
Ceriodaphnia dubia



ODVĚTVOVÁ TECHNICKÁ NORMA VODNÍHO HOSPODÁŘSTVÍ

MZe ČR

MIKROMETODA STANOVENÍ AKUTNÍ TOXICITY NA KORÝŠI *THAMNOCEPHALUS PLATYURUS*

TNV 75 7754

	Obsah	Strana
1.	Předmluva.....	1
2.	Předmět normy.....	2
3.	Termíny, definice a zkratky.....	2
4.	Podstata zkoušky.....	3
5.	Materiály a chemikálie.....	3
6.	Přístroje a pomůcky.....	4
7.	Příprava vzorků zkoušené vody.....	4
8.	Postup zkoušky.....	5
9.	Vyjadřování výsledků.....	7
10.	Protokol o zkoušce.....	7
11.	Příloha A (informativní) - Korýš <i>Thamnocephalus platyurus</i>	8
12.	Přílohy B (informativní) - Limitní hodnoty pro <i>Thamnocephalus platyurus</i>	9
13.	Příloha C (informativní) - Literatura.....	10



Rotoxkit F



- Testovací organismus:
Brachionus calycifloris (vodní vířník)
- Uchování: klidová stádia, cysty
- Doba líhnutí: 18 hod., 20°C, 4000lx
- Design: 6 opakování, 6 koncentrací v jedné destičce, jamka á 0,3 ml
- Inkubace: 24 hod., 20°C, 4000lx
- Vyhodnocení: mortalita, 24 LC₅₀

Výhody: Domácí běžný druh, přídatná informace

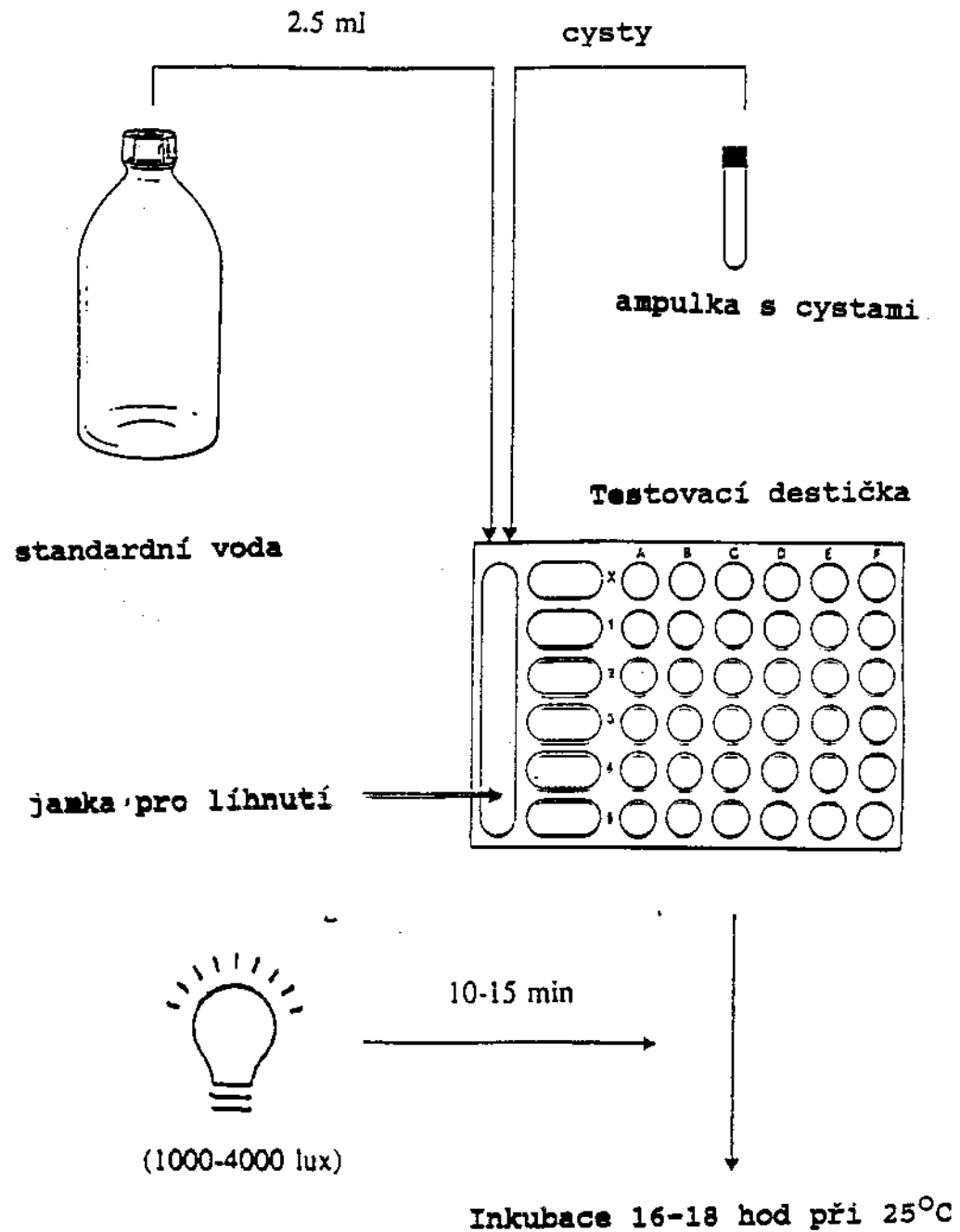
Nevýhody: Malý, většinou méně citlivý

Závěr: zajímavý doplněk testů toxicity, není nutný, je-li v baterii korýš

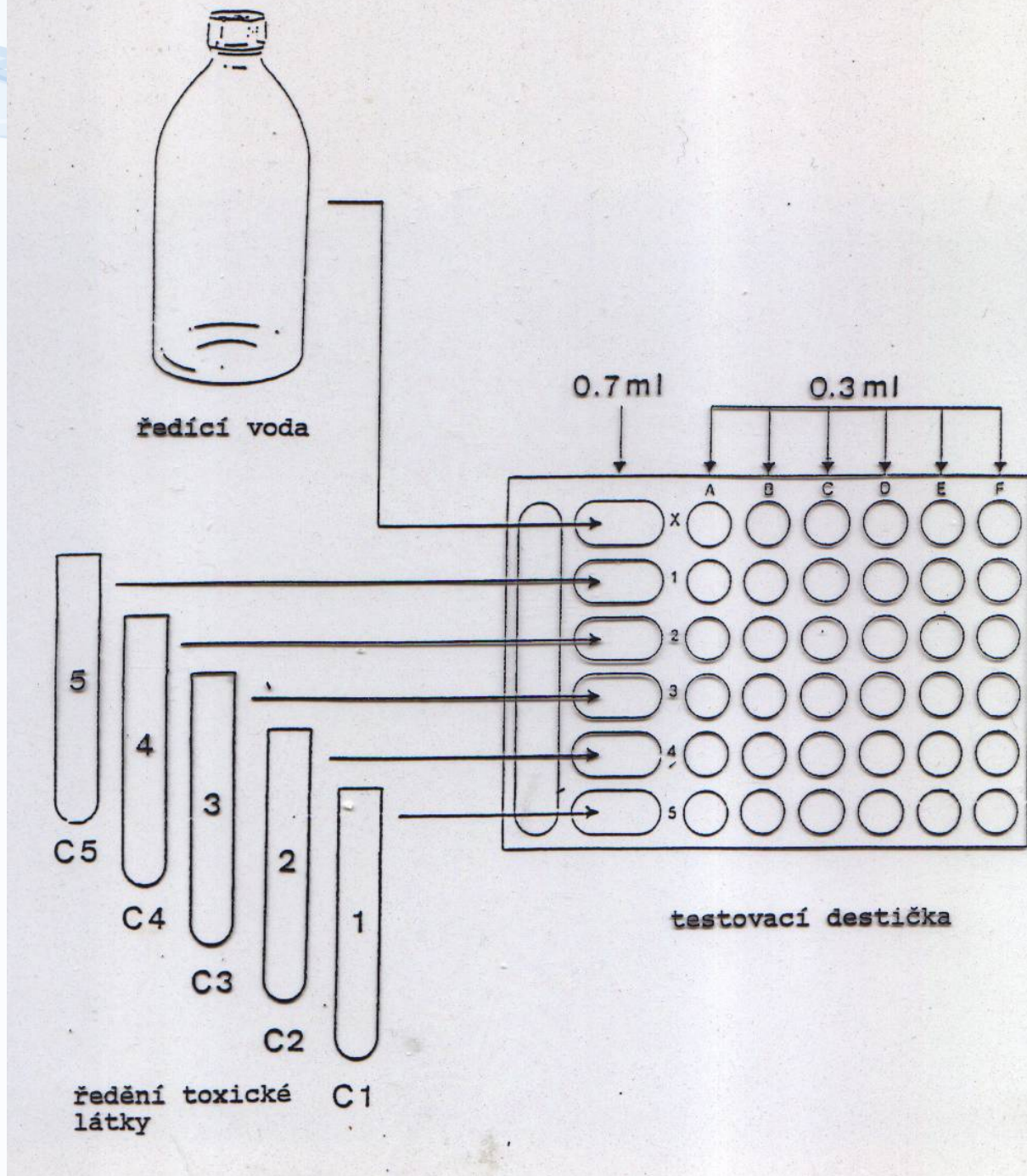
Obdobně Protoxkit s prvokem *Tetrahymena thermophila*



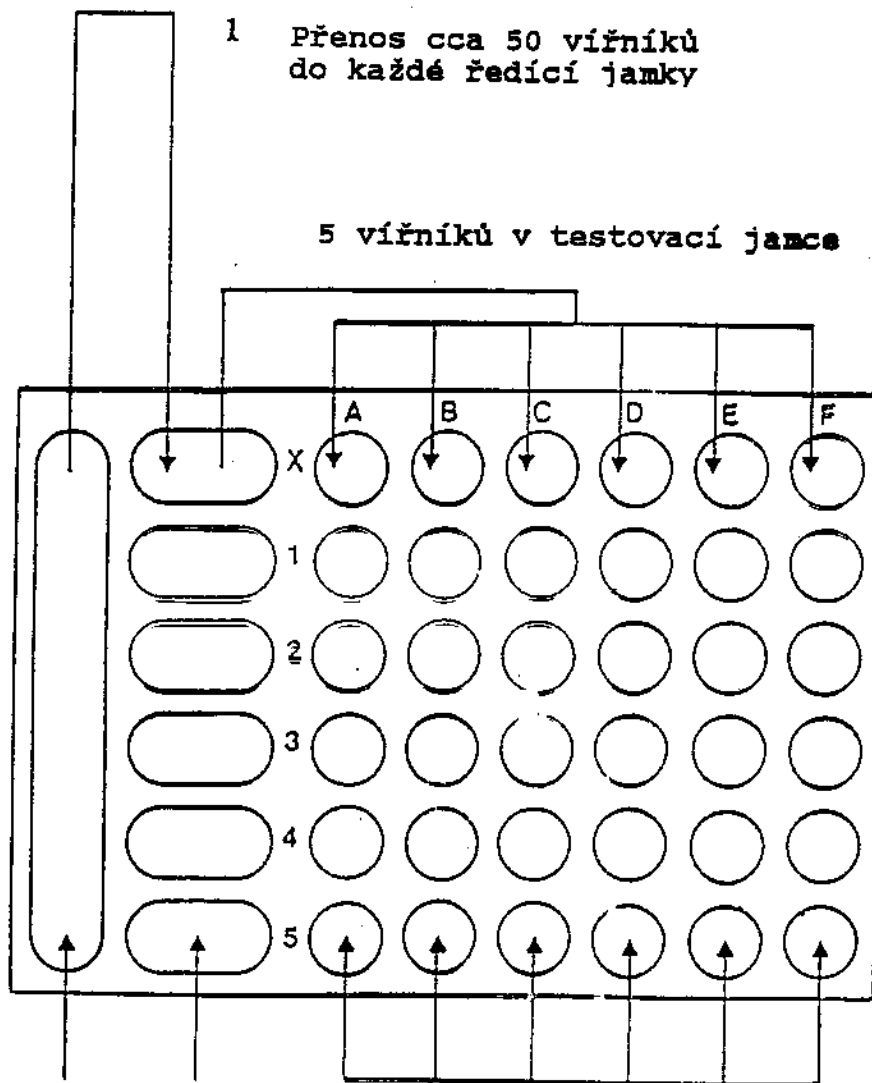
Líhnutí cyst vířníků



Plnění testovací destičky



Přenos vířníků do testovacích jamek



jamka pro ředící
líhnutí jamka

jamky pro test



Daphtoxkit pulex

Výhody

- Jako ISO, OECD
- Z klidových stádií

Nevýhody

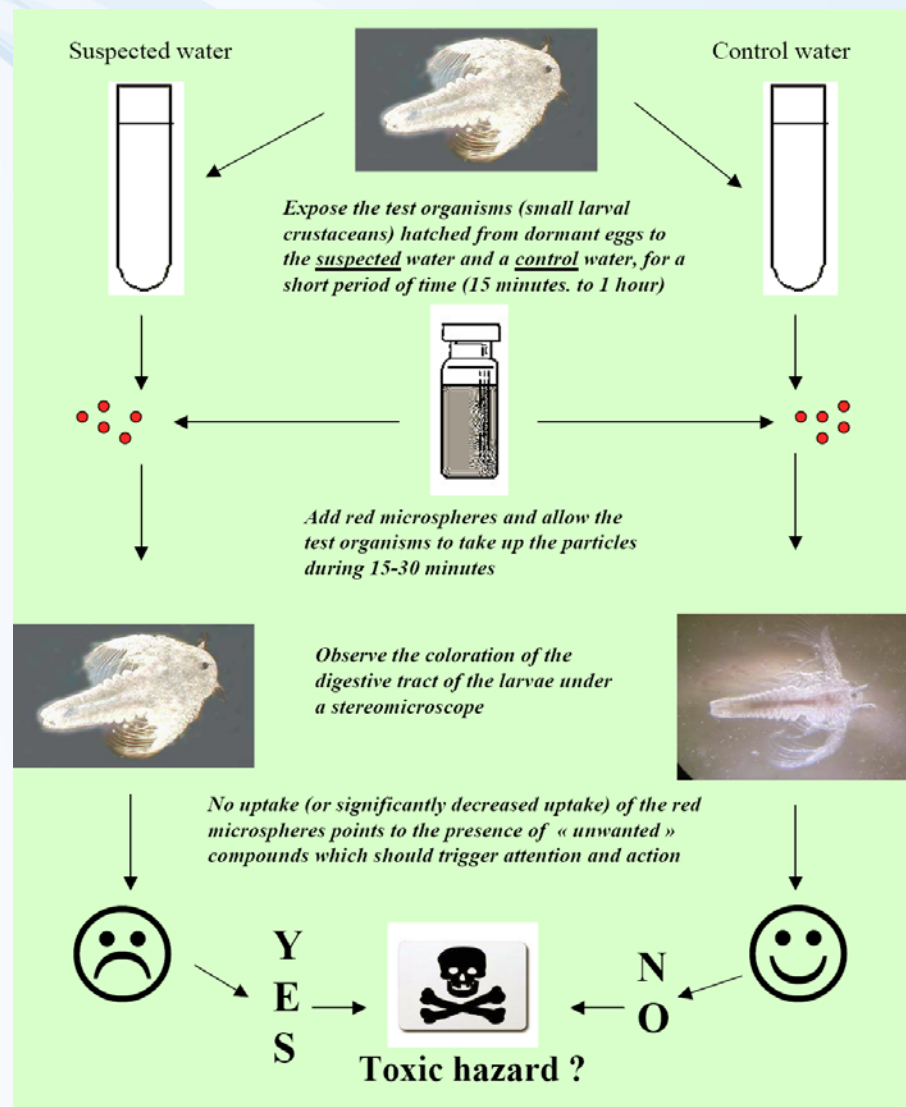
- 3 dny líhnutí
- Nevyrovnané líhnutí
- Problémy se skladováním
- Povrchové tenze - neplavou

Závěr: zatím není zcela vyladěný



RAPIDTOXKIT

- Test s nejrychlejší odpovědí
- „jídelní test“ – sledováno ovlivnění příjmu potravy stresem (toxickou látkou)
- Testovací organismus: *Thamnocephalus platyurus*
- Uchování: klidová stádia, cysty
- Doba líhnutí: 30-45 hod., 25°C, 4000lx
- Inkubace: 15-60min, 25°C, 4000lx
- Pak přidány červeně obarvené mikrospory (potrava), inkubace 15-30 min
- Vyhodnocení: pod mikroskopem zhodnocen příjem potravy v jednotlivých expozičních variantách – hodnocena inhibice příjmu mikrospor v porovnání s kontrolou



Testy toxicity na korýších/vířnících

VALIDITA:

Výsledky testu jsou považovány za platné, když

- Koncentrace rozp. kyslíku neklesla pod 60% nasycení
- Koncentrace testované látky neklesla pod 80%
- Mortalita kontrolního vzorku nepřesáhla 10%
- Zjištěná koncentrace LC_{50} je v souladu se standardy



PŮDA + SEDIMENTY

Mikrobiotest - **OSTRACODTOXKIT FTM:**

6 denní chronický test toxicity (mortalita/inhibice růstu) s korýšem *Heterocypris incongruens*.

Kontaktní test v mikrodiskách 3x2 jamky (objem 1 ml).

10 jedinců na jamku,

Uchování: klidová stádia, cysty

Doba líhnutí: 52 hod., 25°C, 4000lx

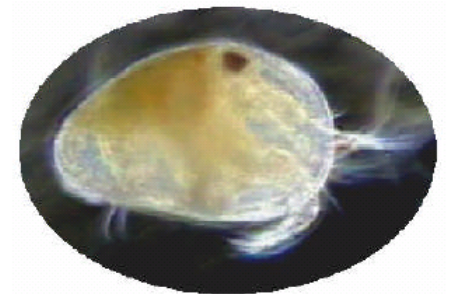
Inkubace: 6 dní, 25°C, 4000lx

Vyhodnocení: mortalita, 24 LC50, růst

OSTRACODTOXKIT F™
MICROBIOTESTS

FOR SEDIMENT TOXICITY TESTING

With the
benthic crustacean
*Heterocypris
incongruens*



Testy toxicity s bezobratlými

Ekonomické hodnocení

(orientační ceny bez cla a dopravy)

- Rotoxkit, Thamnoto..... 1000Kč
- Daphtoxkit 1300Kč
- Algaltoxkit4300Kč
- ECHA Biocide monitor 200Kč
- MetPad 500Kč
- Toxichromotest (SedimentChromoPad),
Toxichromotest1000Kč



Chronické testy s vodními bezobratlými živočichy

Akvatické testy

- Reprodukční test s hrotnatkou *Daphnia* spp. (ISO 1070/2000)
- Test přežívání a reprodukce s břichatkou *Ceriodaphnia dubia* (USEPA, 1989)
- Chronické biotesty s vidlonožci (*Mysidacea* – řád korýšů z podtřídy rakovců) – mořští, pronikají i do brakických a sladkých vod

Sedimentové testy

10-denní test přežívání a růstu s různonožcem *Hyalella azteca* (USEPA, 2000)

42-denní test přežívání, růstu a reprodukce s různonožcem *Hyalella azteca* (USEPA, 2000)

10-denní test přežívání a růstu s pakomárem *Chironomus tentans* (USEPA, 2000)

Celoživotní (Life-cycle) test pro hodnocení účinků kontaminace sedimentů s pakomárem *Chironomus tentans* (USEPA, 2000)



Chronický test na *Daphnia magna*



ČSN ISO 10706 Jakost vod - Stanovení chronické toxicity látek pro *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)

- organismy mladší 24h
- 10 organismů na koncentraci
- individuálně v 50ml media M4/kádinku
- médium výměna 3x týdně
- expozice 21 dní
- teplota $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- pH 6-9 ($\pm 1,5$)
- rozpuštěný $\text{O}_2 > 3\text{mg/l}$
- fotoperioda 16 h světla / 8 h tmy
- krmení směs řas

Jednou týdně: O_2 , teplota, tvrdost a pH v médiu, kontrolních nádobách a u nejvyšší zkušební koncentrace.

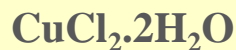
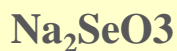
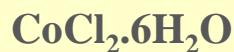
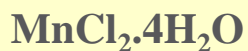
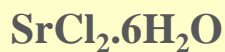


Příprava média Elendt M4

Zásobní roztoky



Roztok I
(stopové prvky)

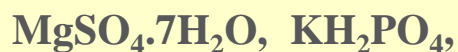


Thiamin
hydrochlorid,
Biotin,
Cyanocobalamin



Roztok II.

(makroživiny
vitamíny)



Zkušební roztok a zkušební koncentrace

Zkušební koncentrace se připravuje alespoň v pěti variantách s faktorem $< 3,2$ (geometr. řada)

$$c_n = c_0 * q^n \quad n = 1, 2, 3, \dots$$

Rozptyl koncentrací se nastavuje podle cíle testu:

- LOEC/NOEC
- EC_x

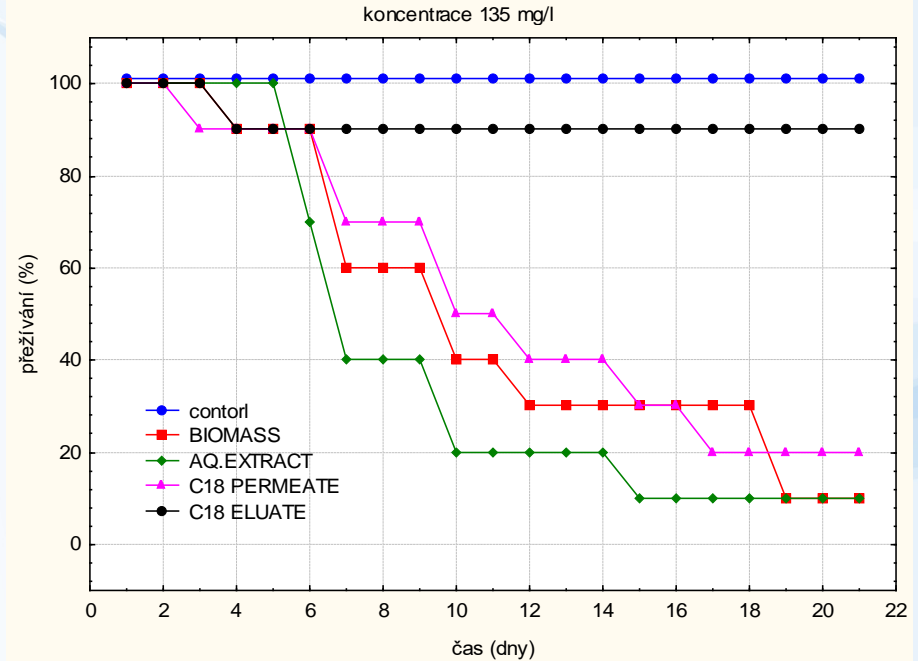
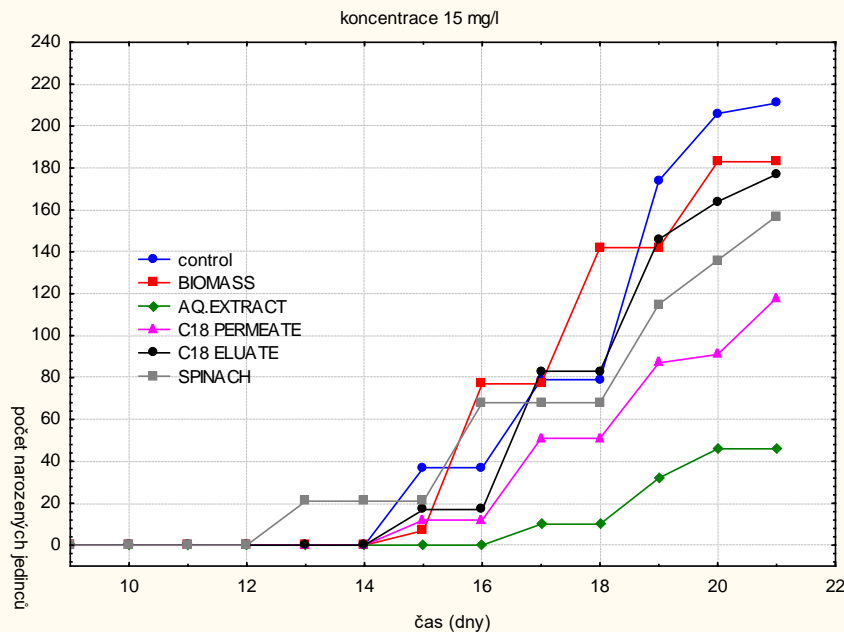
Nepoužívá se koncentrace se statisticky významným účinkem na přežití dospělců -> toxicita pro reprodukci a mortalitu

Rozpouštědla a dispersanty do 0,1 ml/l, lépe je nepoužívat



Sledované parametry

- Mortalita, přežívání
- Reprodukce
- Počet narozených juvenilů
- Den první reprodukce
- Chování - způsob pohybu



- další parametry (zbarvení, tukové kapénky, velikost gonád)
- měření délky matečných organismů na konci zk.
 - velikost a počet potomků jednoho organismu
 - počet potracených plůdků,...



Testy toxicity s bezobratlými

Závěr

- pro konkrétní případ, vzorek a problém může zkušený ekotoxikolog vybrat vhodnou kompozici detekčního systému
- akutní testy toxicity jsou jednou z několika součástí systému hodnocení
 - chemické analýzy
 - struktura zoocenoz a fytocenoz
 - biokumulace a biokoncentrace
 - QSAR
 - biomarkery
 - atd...





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí