



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

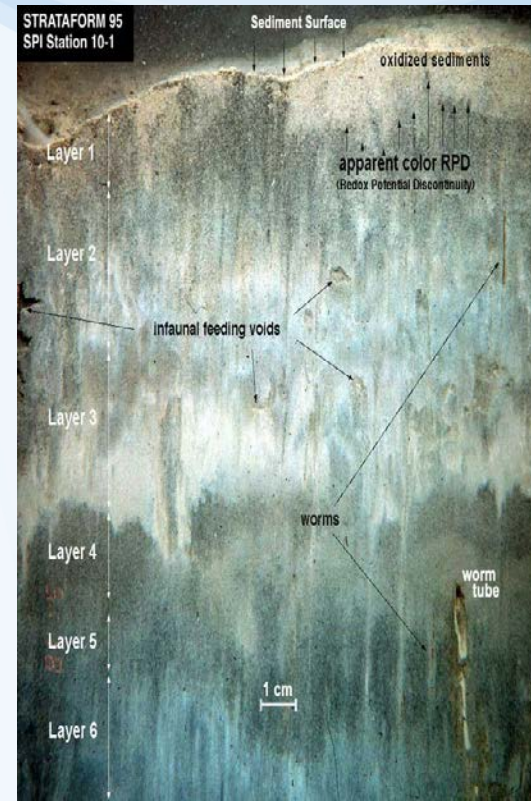
- velmi různorodé složení - polotuhá matrice - pevná fáze (částice) a pórová voda
- v podstatě akvatický ekvivalent půdy
- heterogenní prostředí - směs jílu, písku, minerálů, huminových látek, odumřelých organismů a antropogenních polutantů
- akumulace a inaktivace polutantů  
(např. AVS – kovy, Corg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

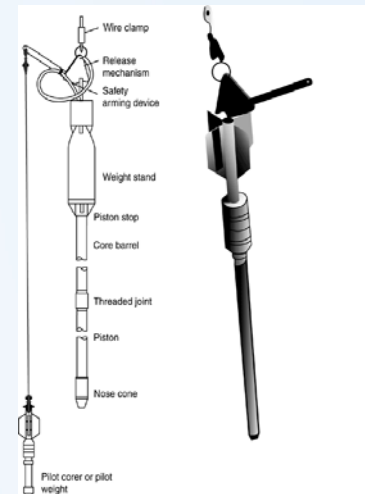
- Voda mezi částicemi sedimentů
- Nepolární polutanty → sedimenty → porová voda → vodní sloupec
- Primární zdroj expozice polutantů pro organismy žijící v sedimentu

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



# 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

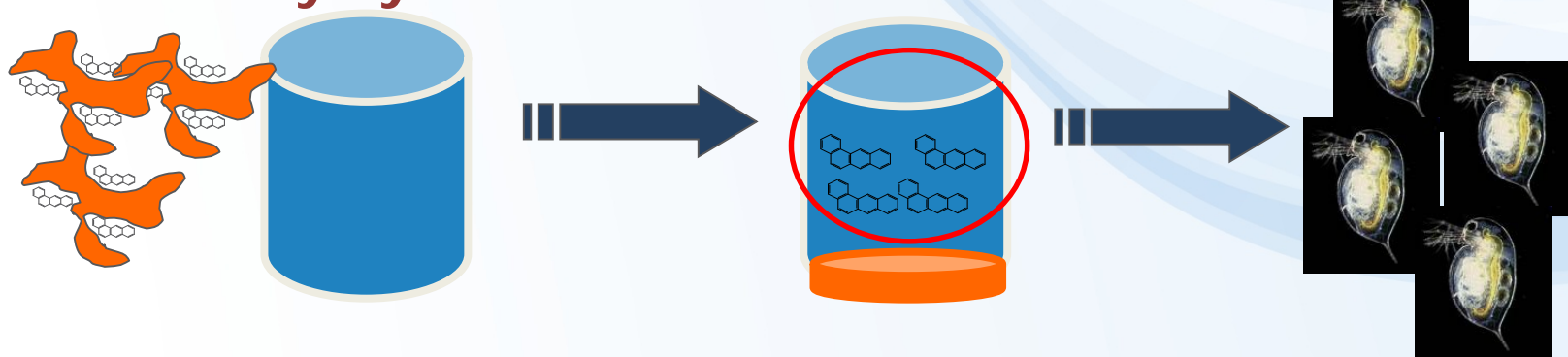


# Jak hodnotit toxicitu sedimentů?

## ■ **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 fischerii*
- 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*<sup>®</sup>, *BioTox*<sup>™</sup>, *LUMISTox* aj.
  - Alternativní – modifikace klasických testů (např. ***BioTox*<sup>™</sup> Flash test**<sup>\*</sup>)



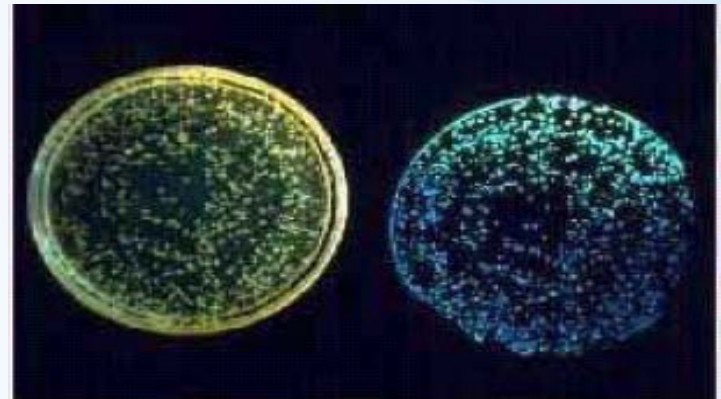
# Microtox

- *Vibrio fischerii*
  - Mořská bakterie schopná bioluminiscence



Design:

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

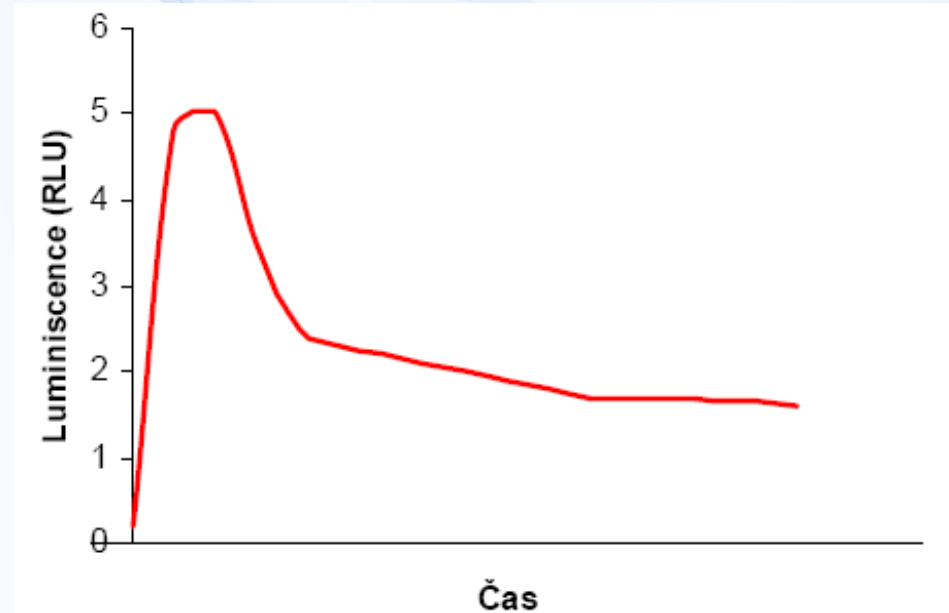


# Flash test

- *Vibrio fischerii*
  - testování zakalených a barevných vzorků, bez potřeby referenčního materiálu

design:

- akutní
- inhibice bioluminiscence
- mikrodestička
- luminometr s dispensorem
- nutné vzorek protřepat (během měření)
- krátká doba měření – Hodnota píku  $S_{max}$  (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> <sup>TM</sup>	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](http://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
<b>Freshwater Pelagic</b>	<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
<b>Marine Pelagic</b>	<i>Atherinops affinis</i>	Fish, topsmelt
	<i>Cyprinodon variegatus</i>	Fish, sheepshead minnow
	<i>Menidia beryllina</i>	Fish, silverside

[www.epa.gov](http://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)

---

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

---



# Testy toxicity sedimentů

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

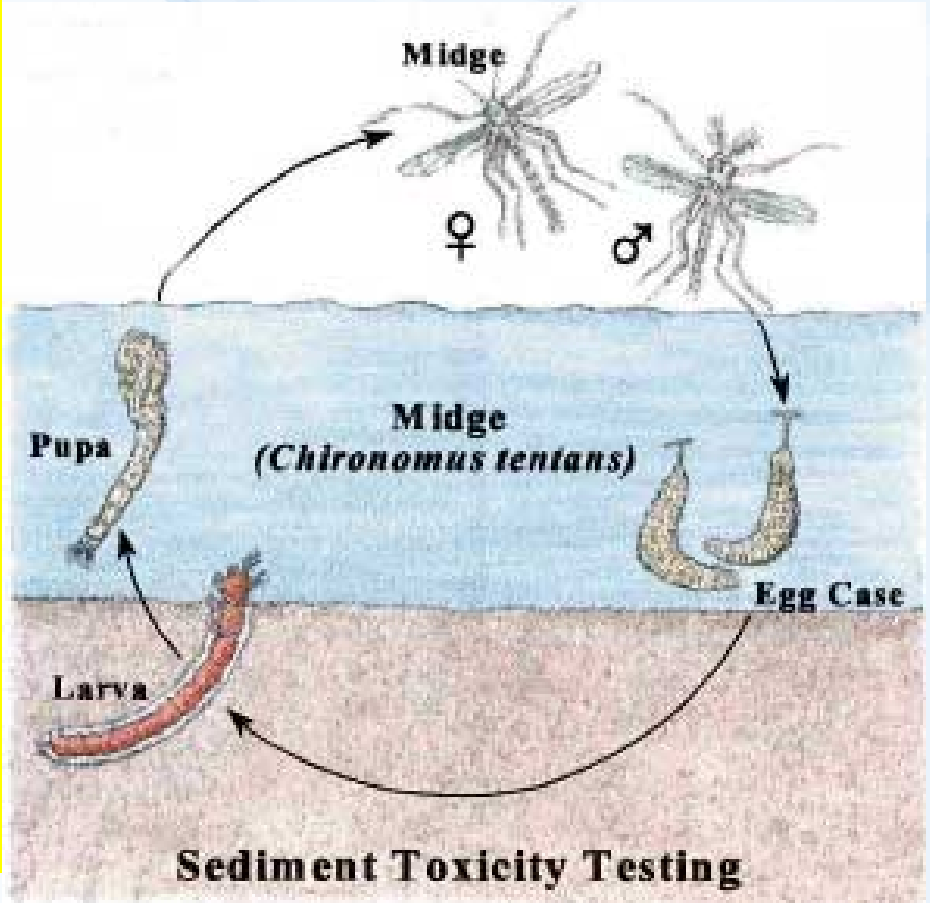
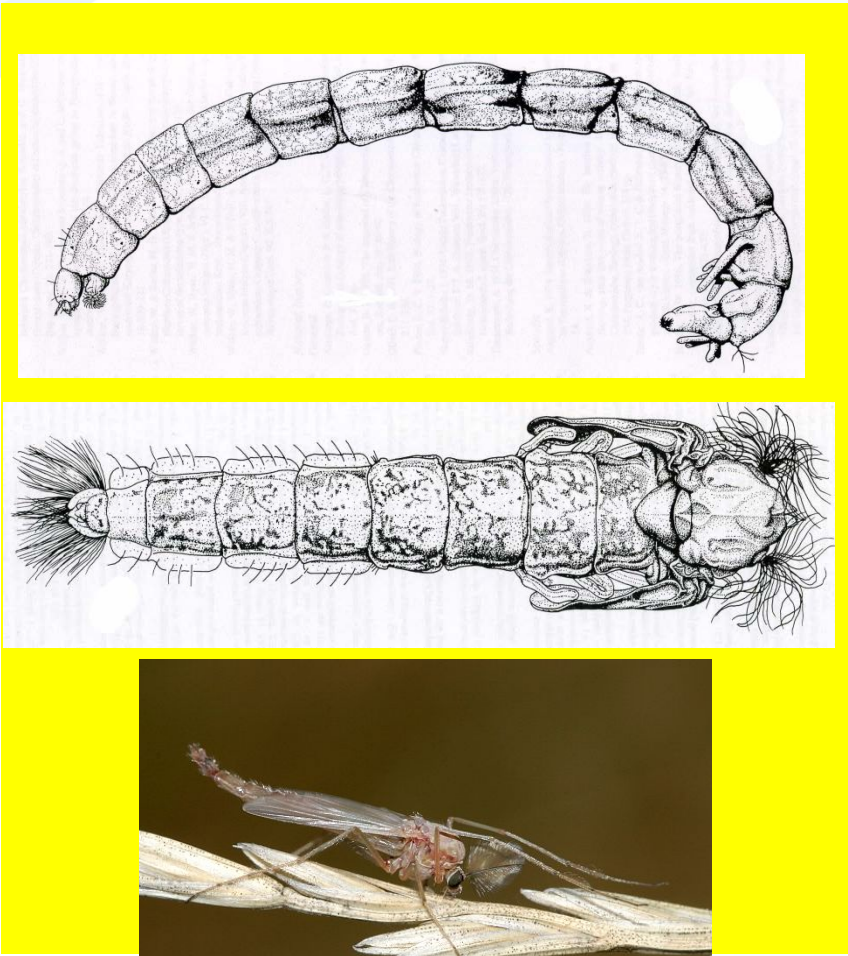


# Testy s larvami pakomárů rodu *Chironomus*

- OECD 218 Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment
- OECD 219 Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water
- OECD 235 *Chironomus* sp., Acute Immobilisation Test (pouze voda – 48 h expozice)
- OECD 233 Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment (v OECD normách preferován *Chironomus riparius*)
- USEPA 2000 Celoživotní (Life-cycle) test pro hodnocení účinků kontaminace sedimentů s pakomárem *Chironomus tentans*

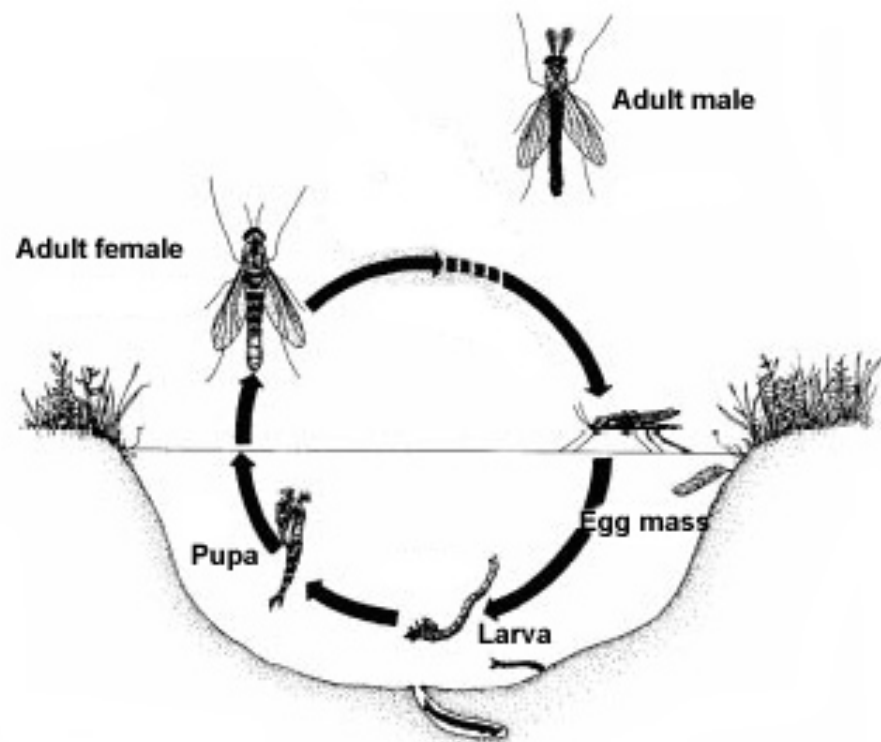


# *Chironomus riparius* Meig. (pakomár)



# 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

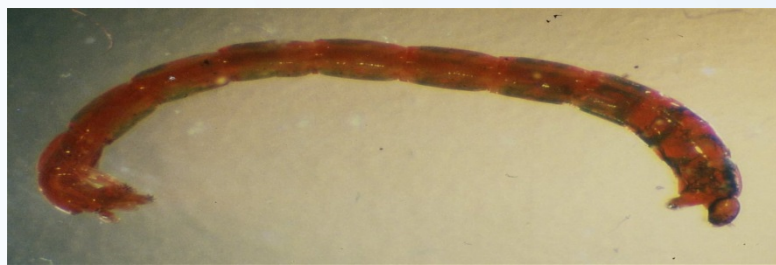
Teplota  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$

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*

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

Ch. riparius 27-28 dní

Ch. tentans: 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

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

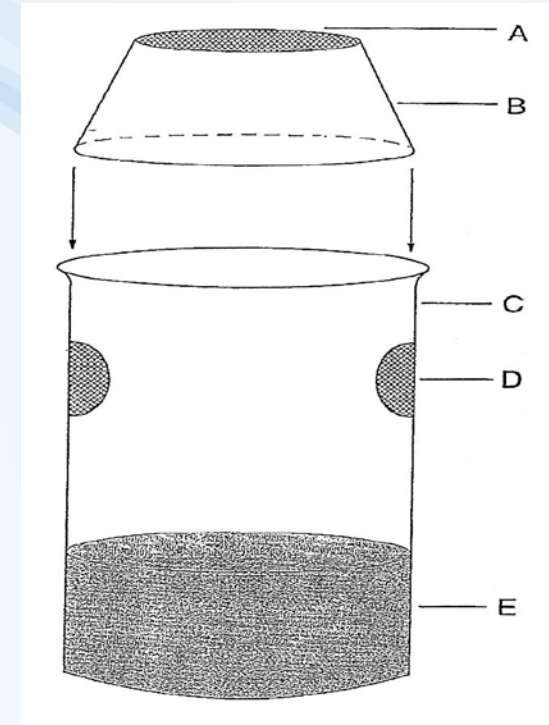
kontaminace: sedimentu

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)

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

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



# Celoživotní test - dle OECD #218/219

## Cílové parametry:

- procento líhnutí dospělců:

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

*ER*: procento líhnutí dospělců (emergence ratio)

*n<sub>a</sub>*: počet jedinců vysazených do kádinky

*n<sub>e</sub>*: počet vylíhlých jedinců celkem (na konci pokusu)

Přijatelnost testu: ER kontroly >0,7

- střední čas vývoje: čas od vysazení do líhnutí



**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)**

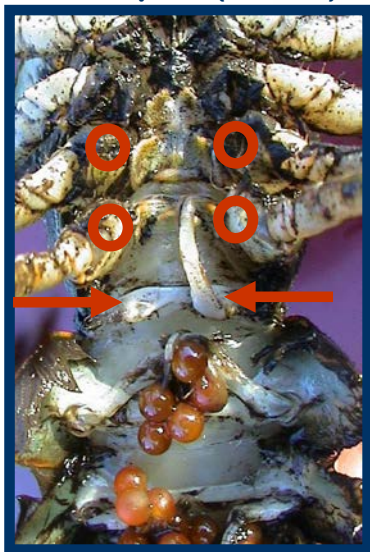
**Poruchy růstu, sexuálního dozrání (maturace)**

**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

OECD 2016 Test No. 242: *Potamopyrgus antipodarum* Reproduction Test (písečník novozélandský, 28 dní expozice, přežití, reprodukce)

OECD 2016 Test No. 243: *Lymnaea stagnalis* Reproduction Test (plovatka bahenní, 28 dní expozice, přežití, snůška – počet vajíček, růst)

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



# Test sedimentů s písečником novozélandským

## *Potamopyrgus antipodarum*

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 **artifciální**  
listová hrabanka + křemitý písek
- o **spajkovaný artifciální sediment**  
vyhodnocení efektů čistých látek

- (1) *spajkování artifciálního sedimentu.*
- (2) *po odpaření solventu je přidáno medium*
- (3) *ustavení rovnováhy mezi sedimentem a vodou, po 4 dnech přidání šneci .*

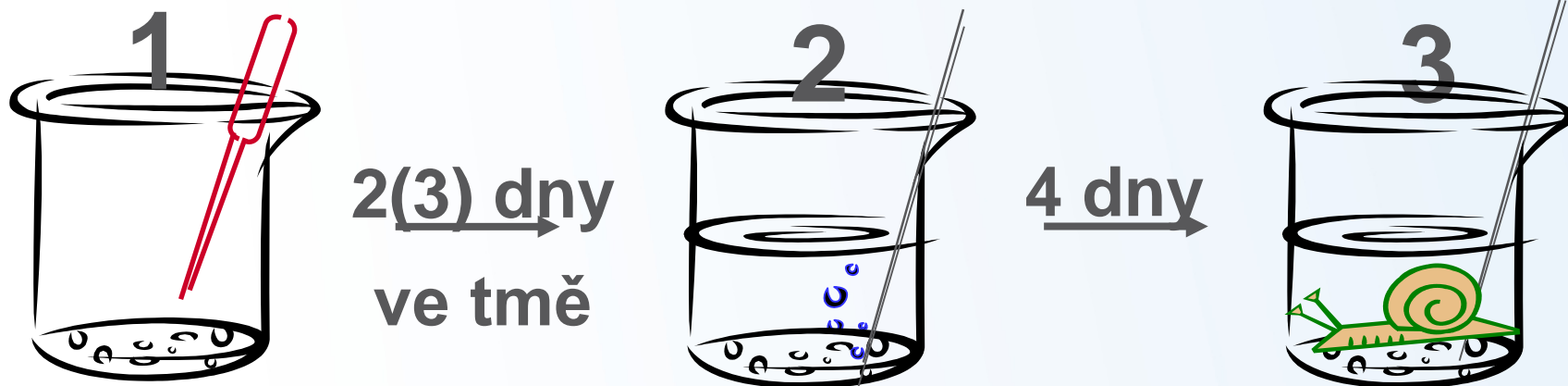


## Médium

- voda s přidavkem  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{CaCO}_3$
- $16^\circ\text{C}$ ,  
 $700\pm 100\mu\text{S/cm}$

**L:D 16:8**

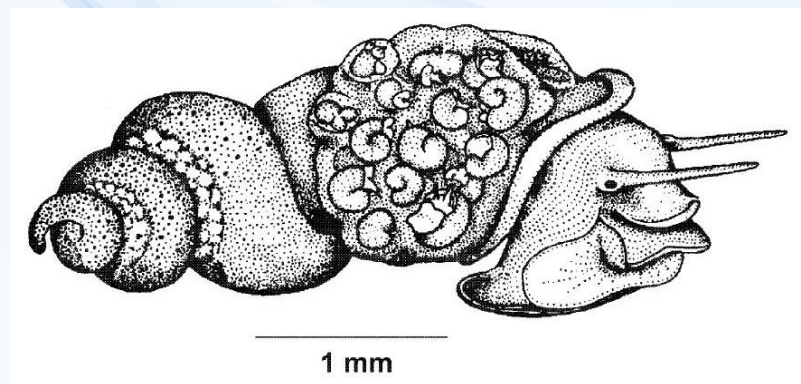
**Komerční řasové pelety**





# 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)

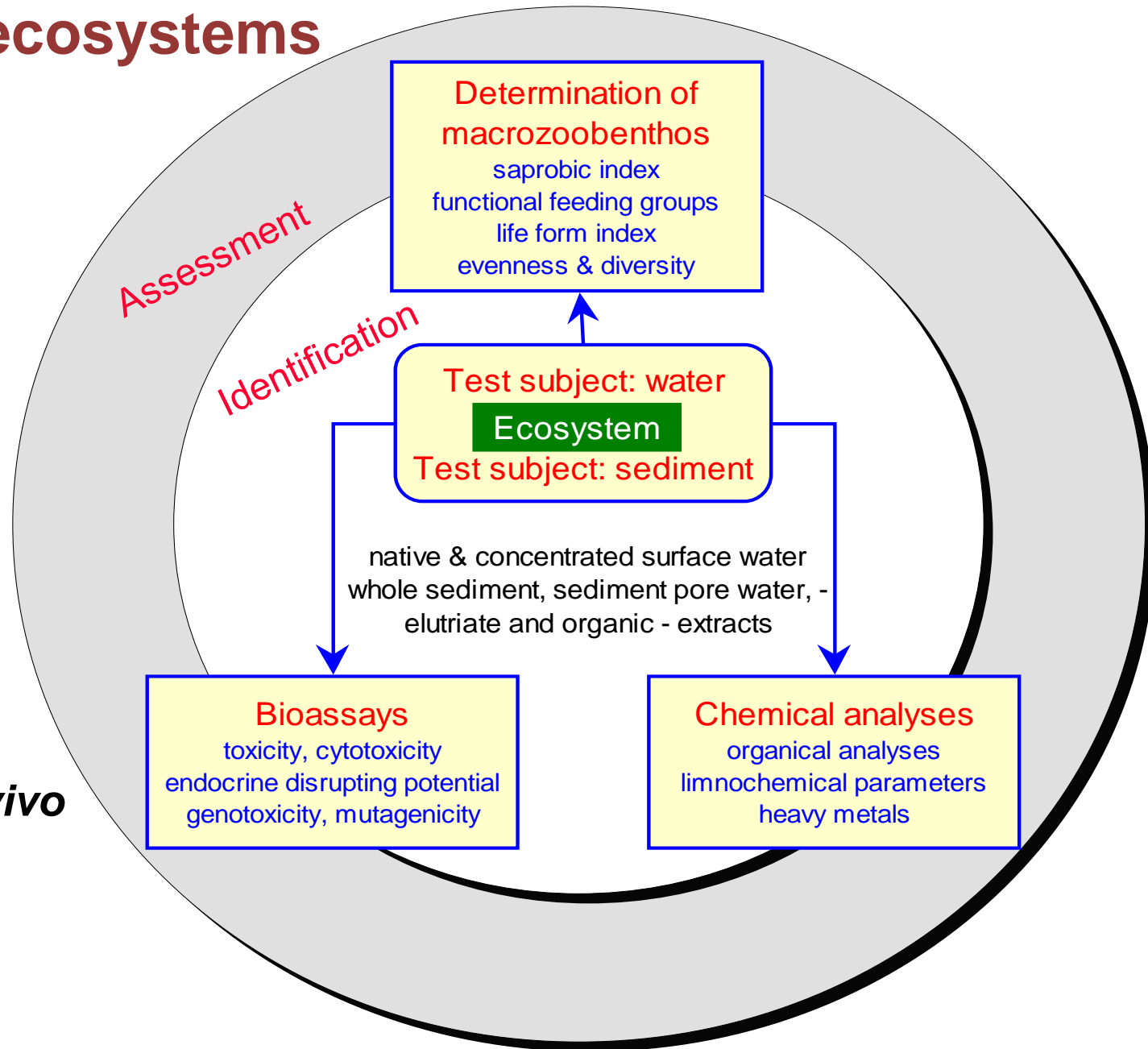


# In situ testy

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

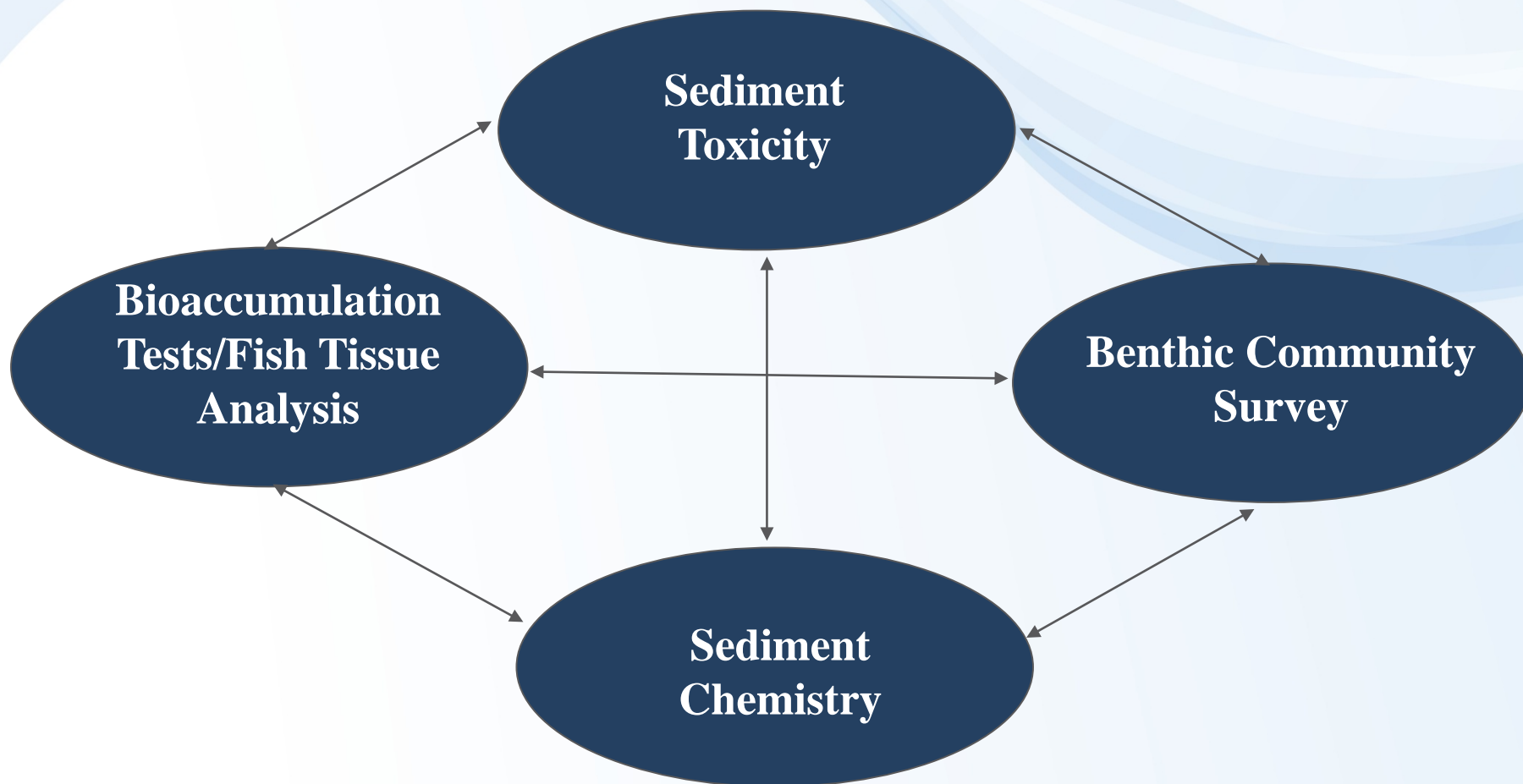


# Integrated assessment of aquatic ecosystems



... *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