



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí



# Ekotoxikologie

ekotoxicita ve vodách  
molekulární toxikologie

Klára Hilscherová, Luděk Bláha a kol.

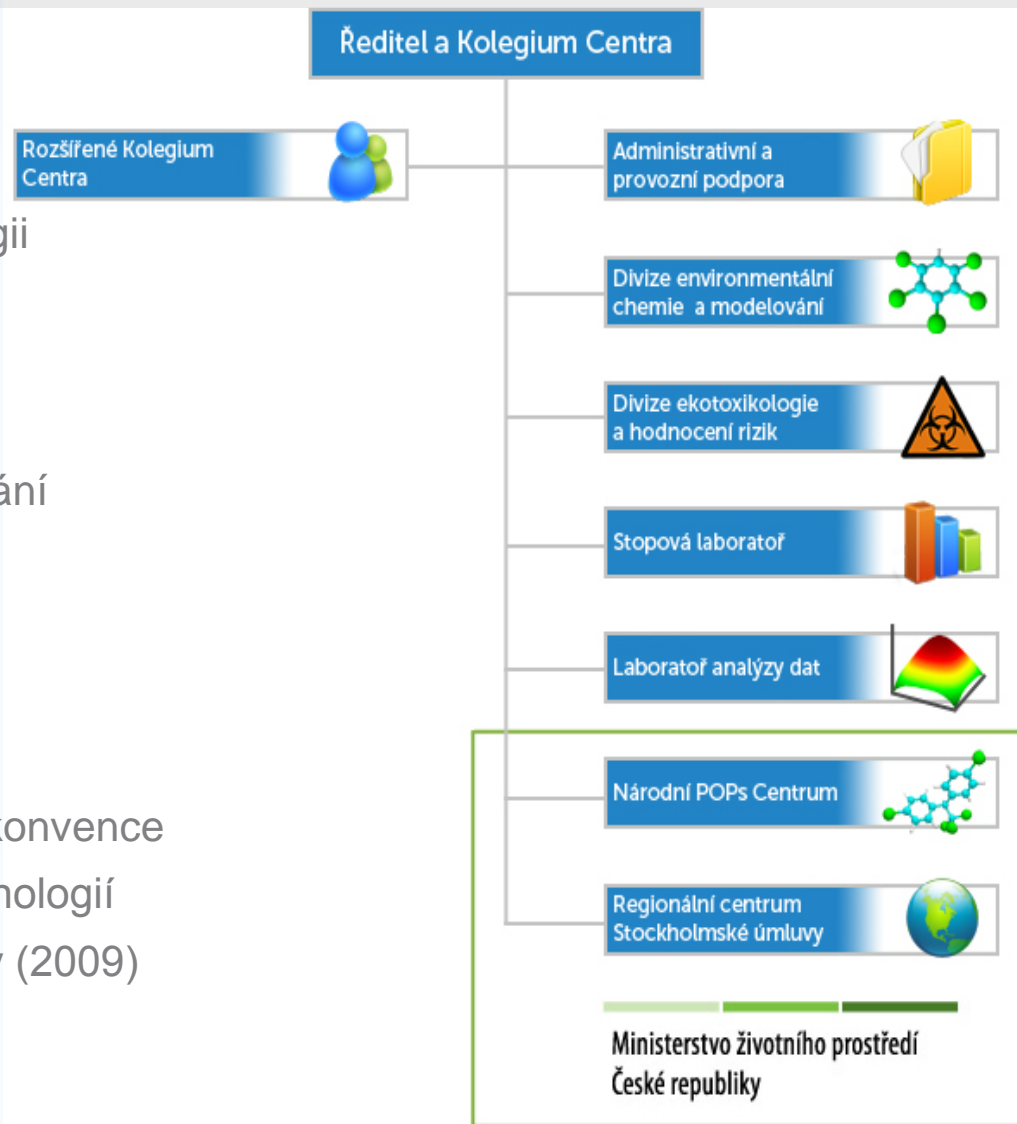
RECETOX PŘF MU Brno  
[www.recetox.cz](http://www.recetox.cz)

# Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

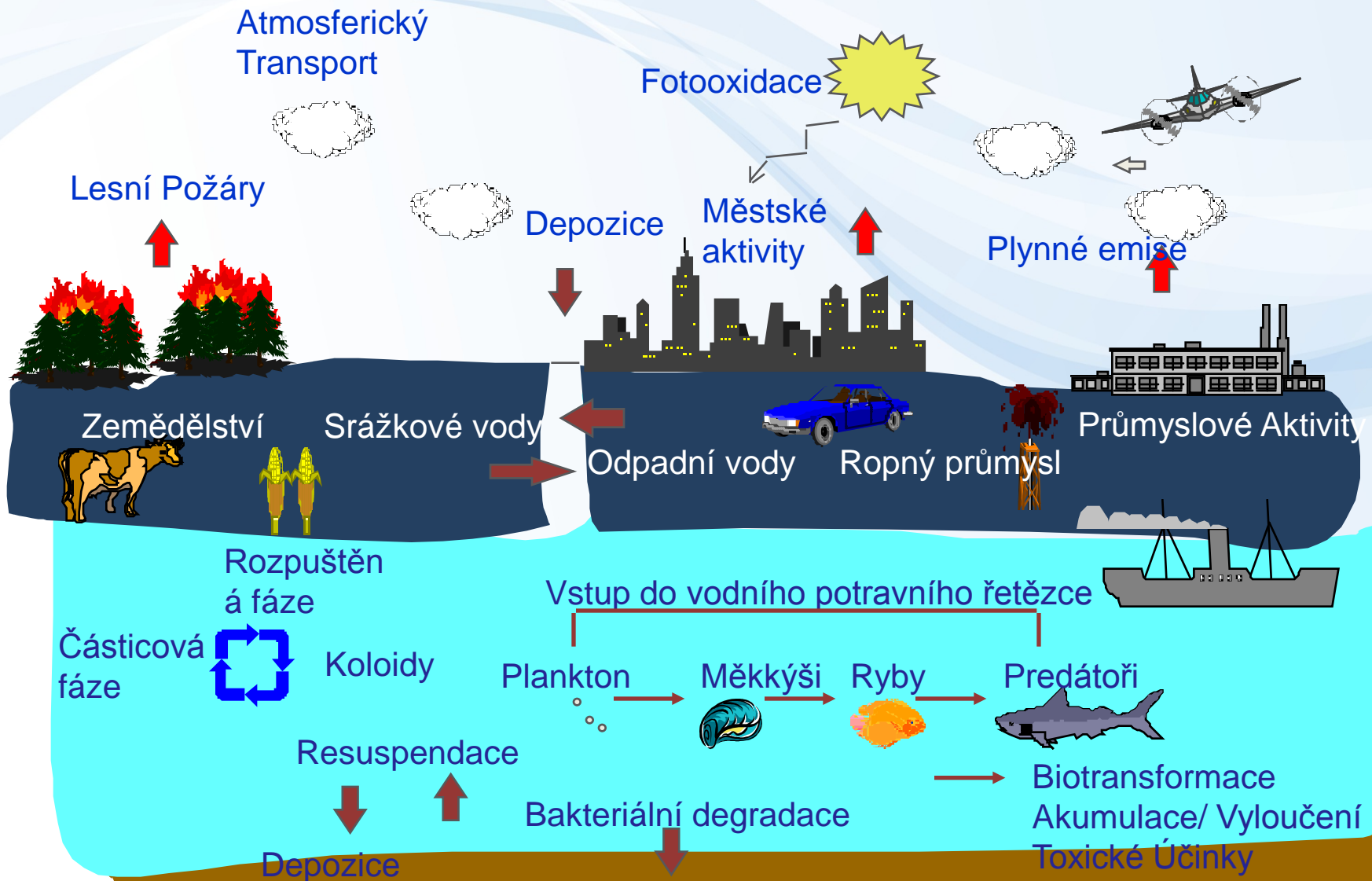
## RECETOX

(REsearch CEntre for TOXic compounds in the environment)

- > 25 let zkušeností a expertízy (1983)
- původně Výzkumné centrum pro chemii životního prostředí a ekotoxikologii (založeno 1996 projekt PHARE)
- současnost – 6 divizí:
  - Environmentální chemie a modelování
  - **Ekotoxikologie a hodnocení rizik**
  - Stopová analytická laboratoř
  - Laboratoř analýzy dat
  - Národní POPs centrum (2006)
  - Regionální centrum Stockholmské konvence pro budování kapacit a přenos technologií v regionu střední a východní Evropy (2009)



# Environmentální osud a účinky polutantů





Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## Ekotoxikologie na PřF MU

= hodnocení biologického vlivu stresorů od molekulární a buněčné úrovně až po úroveň systémovou

- Odběry vzorků, terénní studie, laboratorní studie
- Hodnocení toxicity vzorků, jejich kontaminace
- Studium mechanismů toxicity i neletálních účinků na různých trofických úrovních
- Celá řada ekotoxikologických modelů

➤ Biochemická, molekulární a buněčná ekotoxikologie

➤ Ekotoxikologie vodního prostředí

➤ Ekotoxikologie půdního prostředí

➤ Hodnocení environmentálních rizik, analýzy dat





Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

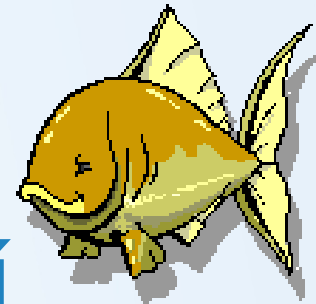
# Ekotoxikologie vodního prostředí



## AQUATOX

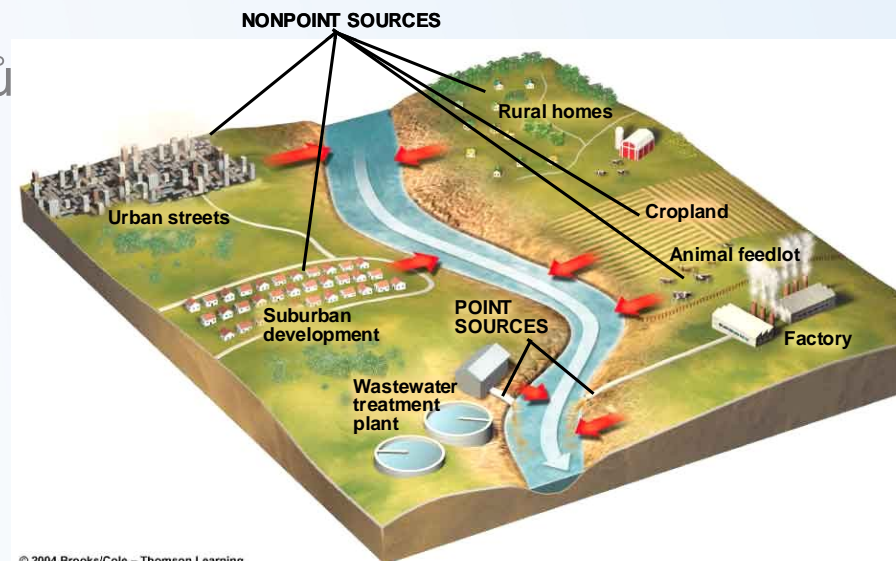


# Voda = základní podmínka života

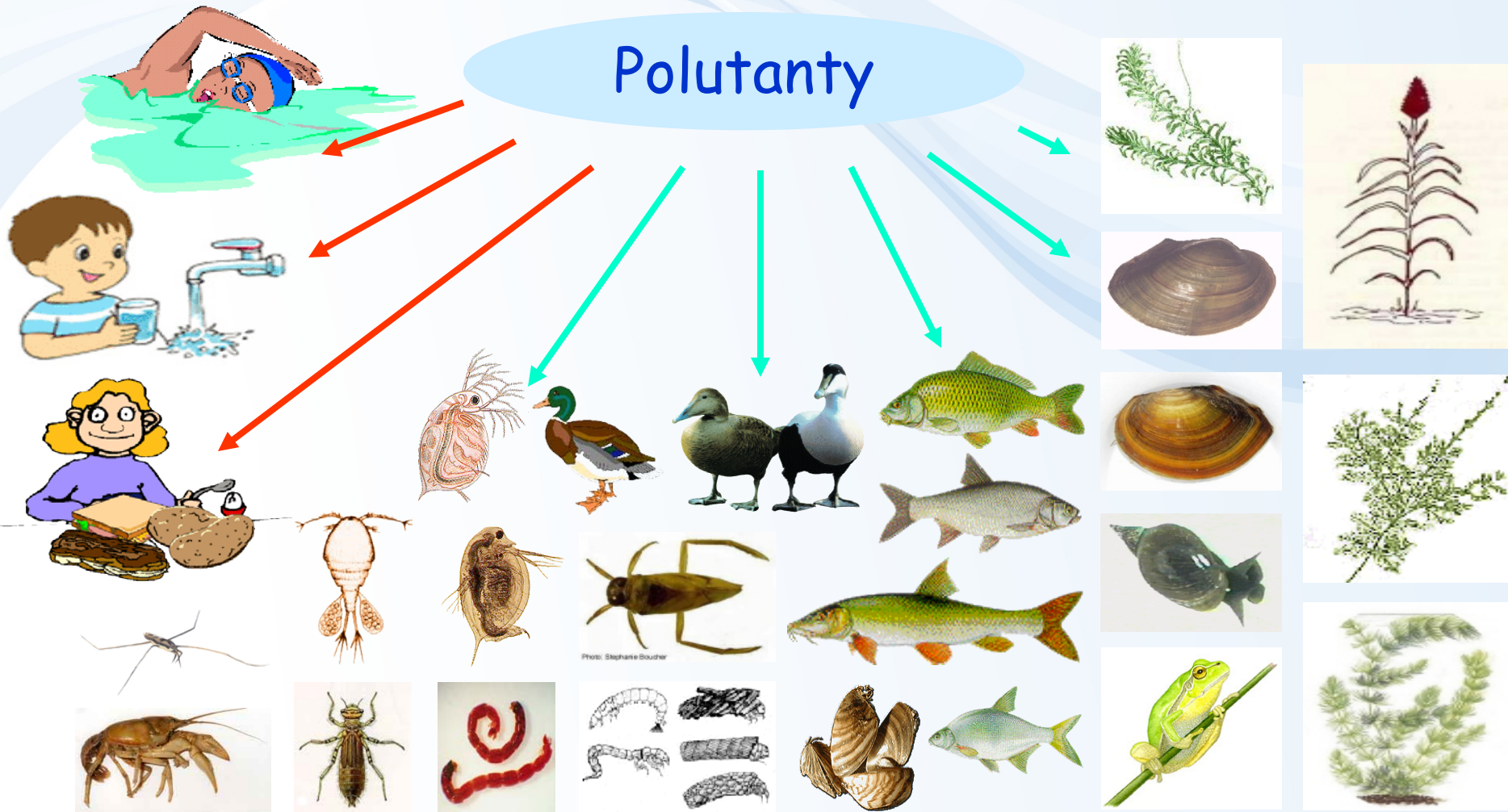


## Ekotoxikologie vodního prostředí

- Studium vlivu kontaminace vodního prostředí (vody, suspendovaných částic, sedimentů) na organismy
- Serie biologických modelů - akutní i chronické účinky u zástupců producentů, konzumentů a destruentů
- Kromě in vivo účinků (letalita, reprodukční toxicita, embryotoxicita apod.) - biochemické odpovědi organismů jako časné známky toxických projevů
- Studium toxických účinků u jednotlivců i ekotoxikologie populací a společenstev

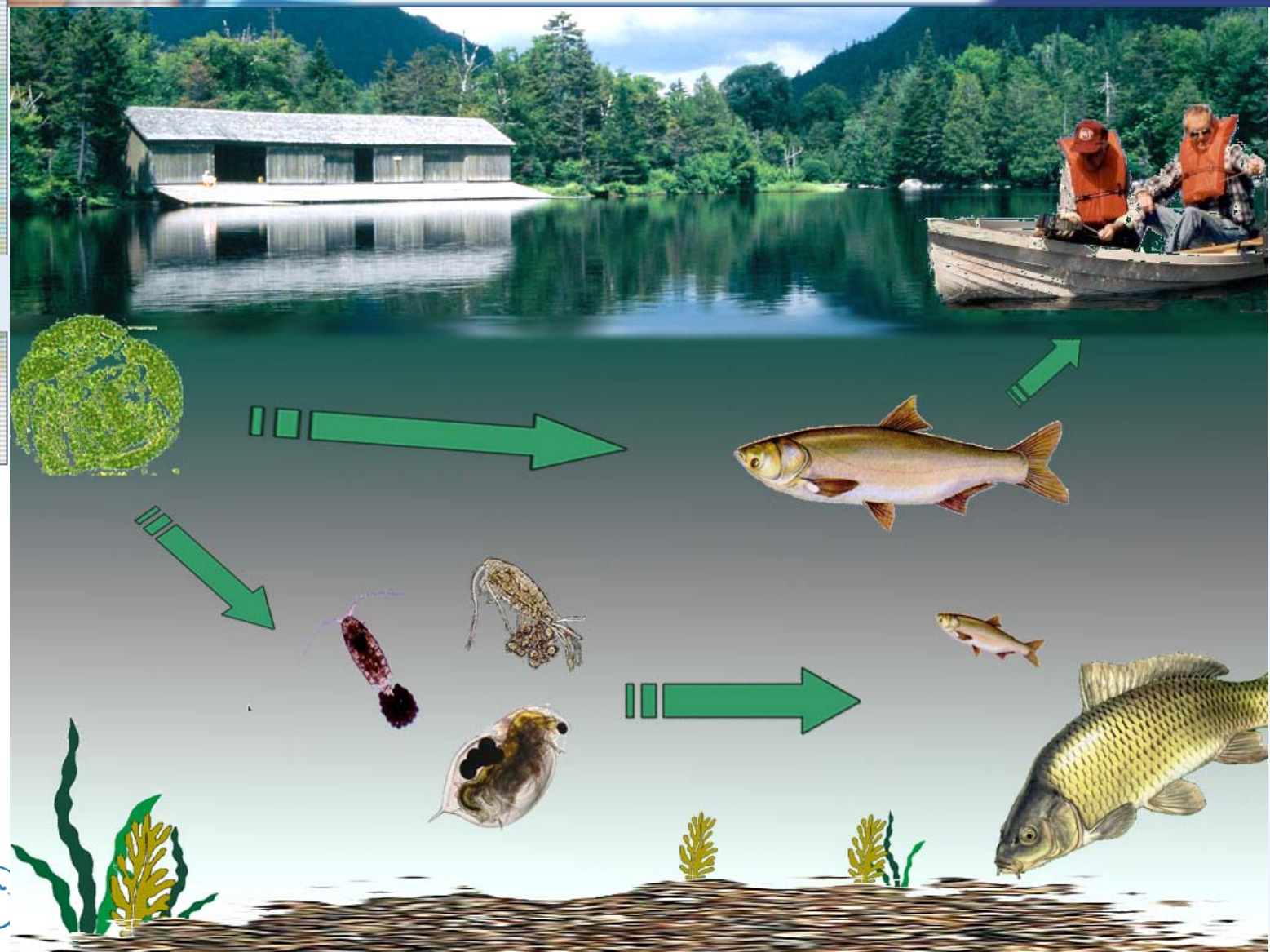
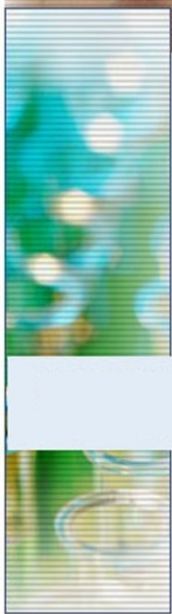


# Znečištění – zdravotní a ekologická rizika ?





# Bioakumulace



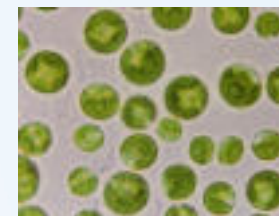
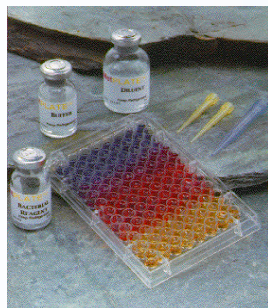
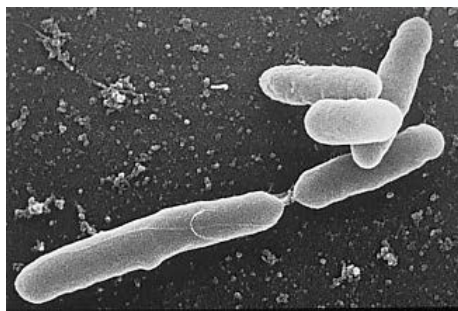


# Akvatická ekotoxikologie

## Organismy používané pro ekotoxikologické biotesty

### Modely na všech úrovních potravního řetězce

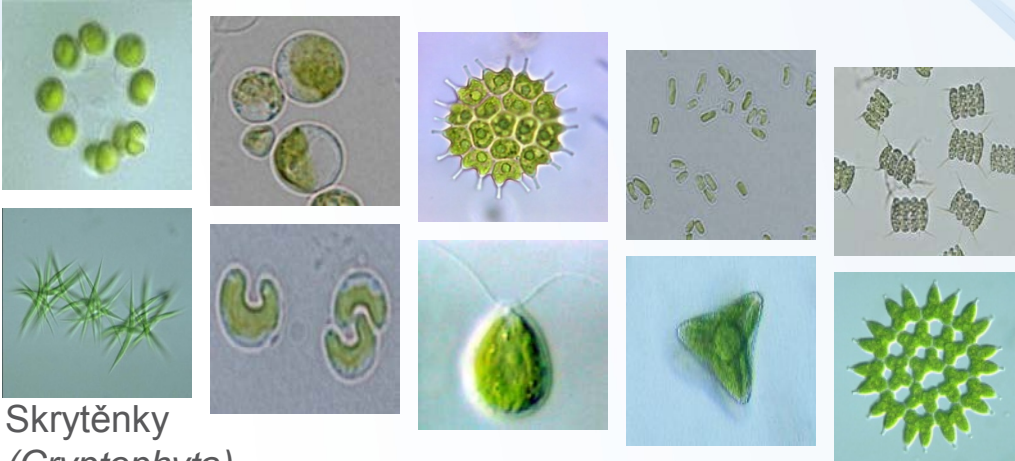
- producenti - fotoautotrofní organismy, řasy, sinice, vyšší rostliny
- konzumenti – vodní bezobratlí obojživelníci ryby, ptáci
- destruenti – bakterie, kvasinky



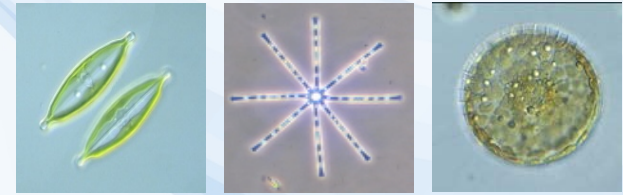
# Účinky na fotoautotrofní organismy

- studium interakcí s cizorodými látkami, citlivosti druhů

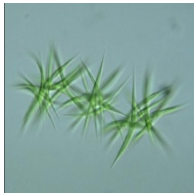
Zelené řasy (*Chlorophyta*)



Rozsivky (*Chromophyta*)



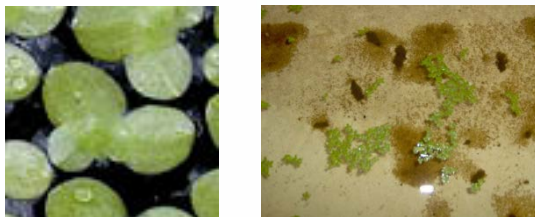
Skrytěnky (*Cryptophyta*)



Sinice (*Cyanophyta*)



Vyšší rostliny



# Organismy používané pro ekotoxikologické biotesty - konzumenti



*Daphnia magna* – Hrotnatka velká



*Potamopyrgus antipodarum* – Písečník novozélandský



Pakomáři rodu *Chironomus*



Embrya obojživelníků (drápatky)



Embrya ryb (zebřička)

Spolupráce s VFU a MZLU – vliv environmentálních stresorů na ryby

Spolupráce s VFU - vliv environmentálních stresorů na ptáky



- Akutní, subchronické a chronické studie
- Standardní testy (normy ISO, ČSN, USEPA)
- Optimalizace/vývoj nových testů
- Studium mechanismů toxicity i neletálních účinků

Testování čistých látek (environmentální polutanty)

Testování modelových směsí

Testování komplexních environmentálních extraktů

***Moderní přístupy studia biochemických a buněčných mechanismů.***



# Kvalitní přístrojové vybavení



# Terénní studie

## Odběry vzorků vodního prostředí

- Průzkum znečištění zájmových lokalit
- Odběry vod, sedimentů, bioty, bentosu, sinicové biomasy



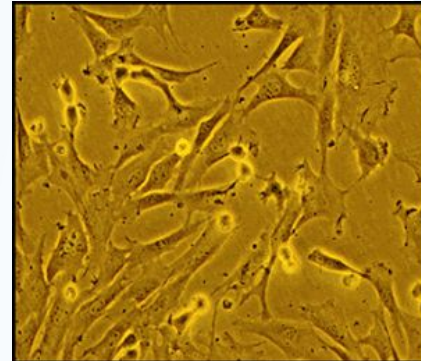
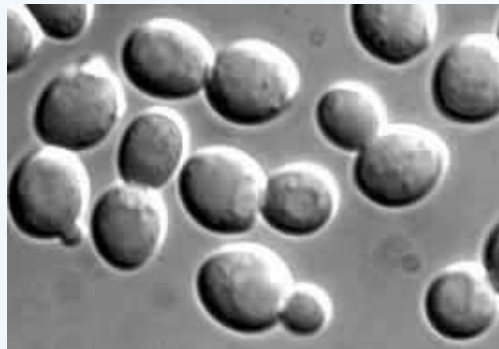
## Zpracování vzorků

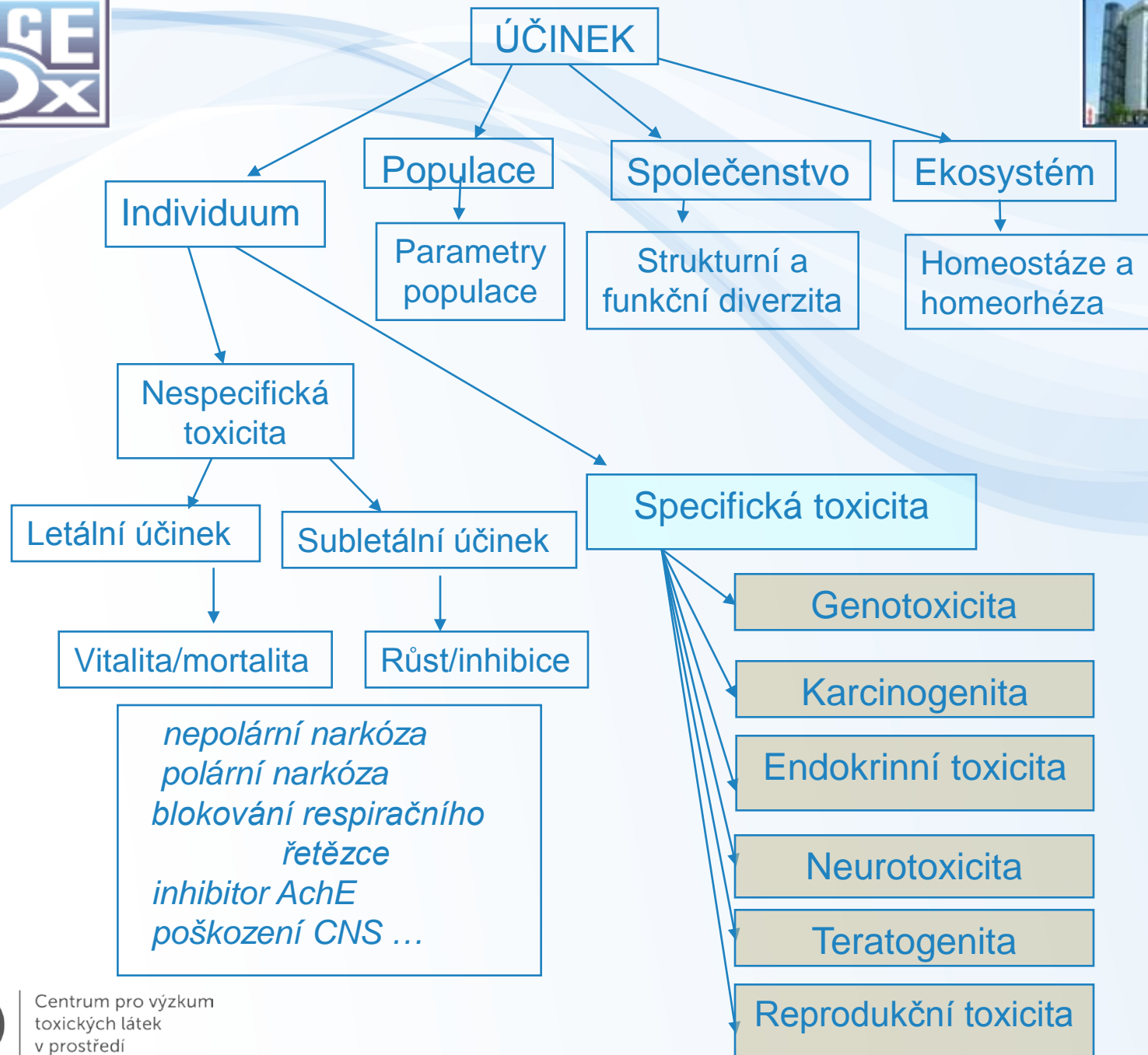




Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

# Biochemická, molekulární a buněčná ekotoxikologie a genotoxikologie







# Biochemická, molekulární a buněčná ekotoxikologie a genotoxikologie

- studium buněčných a biochemických mechanismů působení toxických látek
- studium mechanismů ekotoxicity i specifických neletálních účinků environmentálních polutantů, chronických typů toxicity
- využití *in vitro* testů specifických mechanismů toxicity a genotoxicity
- mechanismy působení persistentních organických polutantů (POPs) a cyanotoxinů produkovaných sinicemi při rozvoji vodního květu
- *In vivo* biochemická ekotoxikologie
- *In vitro* toxikologie



# Speciální ekotoxikologické biotesty – *in vitro*

- standardní testy (normy ISO, ČSN, USEPA)
- optimalizace/vývoj nových testů
  
- Toxicita
- Specifické mechanismy neletálních účinků
  - Genotoxicita
  - Dioxinová aktivita
  - Mechanismy endokrinní disrupce – estrogenita, androgenita
  - Immunotoxicita
  - Biochemická ekotoxicita
  
- Testování čistých látek (environmentální polutanty)  
modelových směsí  
komplexních environmentálních extraktů  
(voda, sedimenty, půda, vzduch,  
prachové částice, ...)



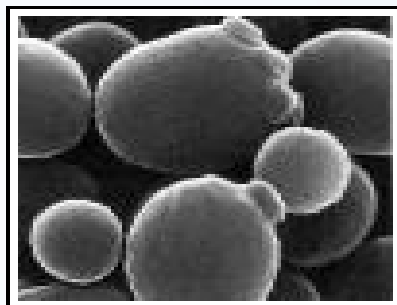
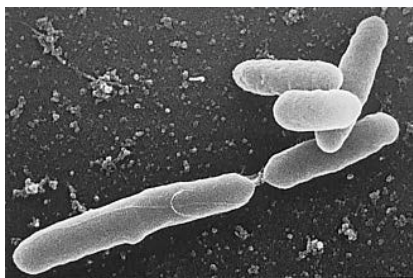


## *In vitro* toxikologie

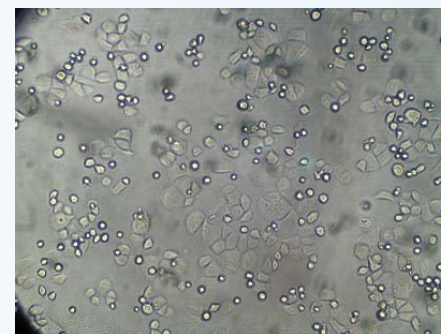
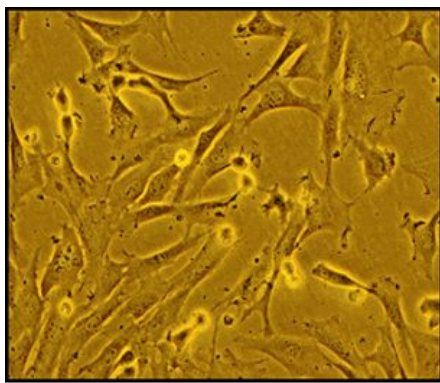
*In vitro* testy pro hodnocení toxicity, genotoxicity i specifických mechanismů neletálních účinků polutantů a jejich směsí

Testy na původních či geneticky modifikovaných prokaryotických či eukaryotických buňkách

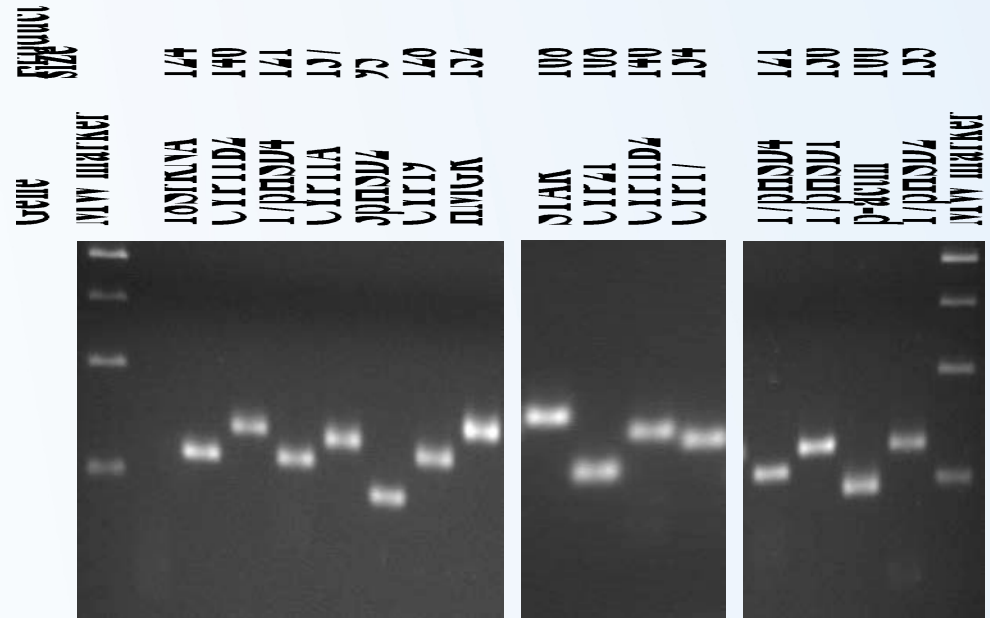
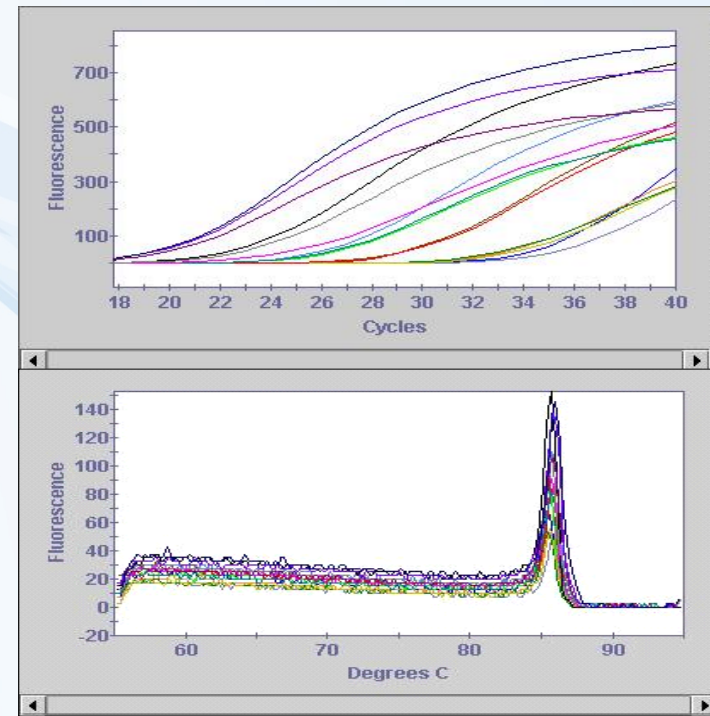
### BAKTERIÁLNÍ TESTY, KVASINKOVÉ TESTY



### TESTY NA TKÁŇOVÝCH KULTURÁCH (Laboratoř tkáňových kultur)



# Metody proteomiky, molekulární biologie



# Moderní přístupy studia biochemických a buněčných mechanismů – využití metod:

- Biochemie
- Imunologie
- Molekulární biologie
- Mikrobiologie
- Analytické chemie

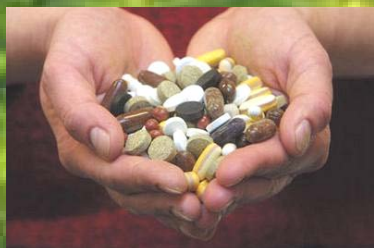


**!!! Možnost zajímavých bakalářských,  
diplomových a doktorských projektů i  
pro absolventy bakalářského či  
magisterského studia jiných  
biologických či chemických oborů**



# Farmaka ve vodách

v povrchových vodách se vyskytují farmaceutické přípravky i další látky, které člověk využívá v prostředcích denní spotřeby.



reálné riziko pro vodní ekosystém v podobě působení těchto **aktivních látek** na organismy



# Farmaka ve vodách



- účinnost odstraňování farmak na ČOV není 100%
  - ČOV ve Frankfurtu 7-96%
    - porovnání koncentrace ve vtoku a výtoku z čistírny
  - nedostatečné technologie čištění zvyšují přítomnost farmak ve vodách
  - koncentrace pod ČOV klesají pro každý typ látky různě
- nejvíce sledované skupiny léčiv:
  - humánní** – analgetika a protizánětlivé látky, antibiotika, orální kontraceptiva, cytostatika, antiepileptika, betablokátory, hypolipidemika, RTG-kontrastní média, hormony a různé sloučeniny a metabolity
  - veterinární** – antibiotika, antiektoparazitika, desinficiencia
- vlastnosti léčiv - **biologicky aktivní**

látky environmentálně zajímavé  
potenciálně nebezpečné



# Farmaka ve vodách

- Účinky farmak a jejich metabolitů jsou v podstatě stejné jako účinky dalších xenobiotik v prostředí

## PŘÍKLADY VLIVU NA NECÍLOVÉ ORGANISMY

- antibiotika – likvidace důležitých mikroorganismů v ekosystému  
– vznik rezistencí patogenních bakterií vůči ATB!!!!
- antiepileptika – neurodegenerace mozku vodních organismů při vývoji
- antidepresiva – neurotoxicita
- cytostatika – genotoxicita a další efekty
- steroidní farmaka včetně antikoncepce

⇒ endokrinní disrupce





# Hormonálně aktivní látky v prostředí

## Endokrinní disrupce

- narušení hormonální rovnováhy organismů - potenciální negativní následky pro celkovou homeostázu, reprodukční, vývojové funkce a chování
- **endokrinní systém** - společně s CNS hlavní systém řízení organismu
  - udržování homeostázy organismu
  - podpora růstu buněk
  - koordinace vývoje
  - reprodukce
  - zprostředkování odpovědi na vnější impulsy (chování)

### Mezi endokrinní disruptory patří

Pesticidy (herbicidy, insecticidy, ...)

Změkčovače plastů

Rostlinné metabolity

Farmaceutika (antikoncepce, léky,...)

Detergenty

Chemikálie z vaření & hoření

Antibiotika

Kovy



# Působení endokrinních disruptorů

- přímo - vazba na receptor x blokování receptoru
- nepřímo – ovlivnění syntézy, metabolismu a dostupnosti přirozených hormonů



- **následky endokrinní disrupce u vodních organismů**

- narušení růstu a vývoje (a nižší přežívání mláďat); embryonální malformace
- potlačení gametogeneze (ovogeneze i spermatogeneze)
- vznik hermafroditů, maskulinizace samic a feminizace samců
- neplodnost a poruchy chování
- poruchy svlékání a růstu; poruchy imunitního systému
- promoce karcinogeneze



vymizení populací



ovlivnění populací



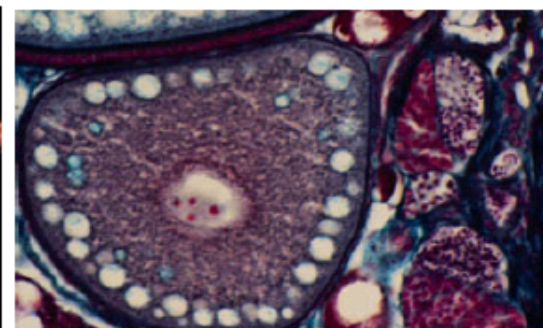
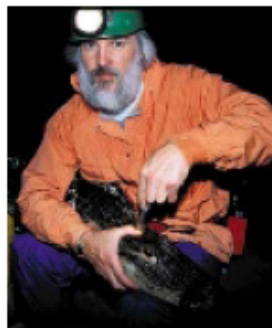
ovlivnění ekosystému !!!



# Projevy u vodních obratlovců

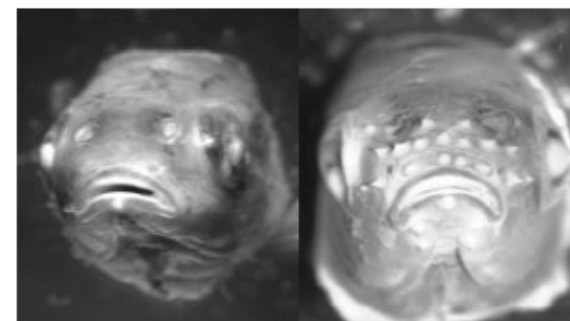
Malformace-změny v pohlavních orgánech. Příklady:

- Hemi- a minipenis u aligátorů na Floridě, Jezero Apopka – způsobeno únikem DDT



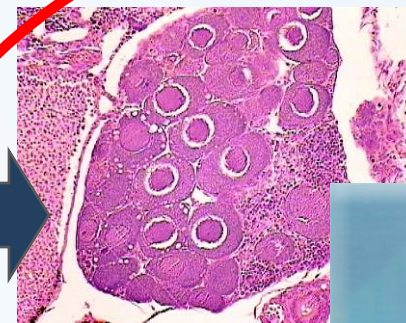
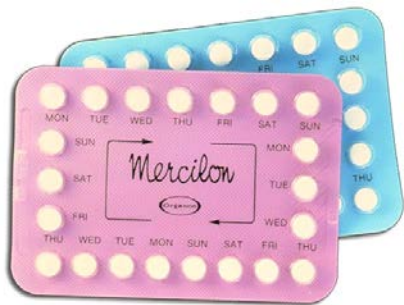
- Feminizace samců ryb (ovotestes) v povrchových vodách znečištěných odpadními vodami v severní Americe a v Evropě

- Maskulinizace samic kapra



- Maskulinizace samic střevle potoční v tocích pod farmami živočišné výroby

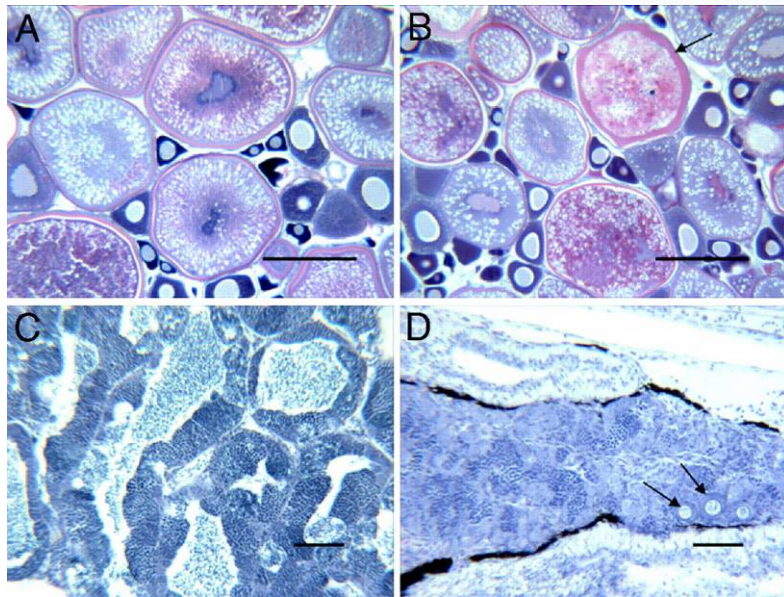
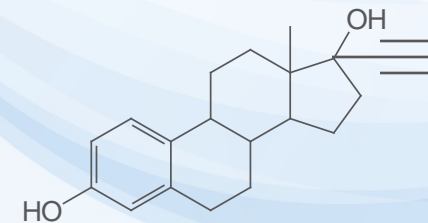
# Lidské hormony: estrogeny v antikoncepčních přípravcích



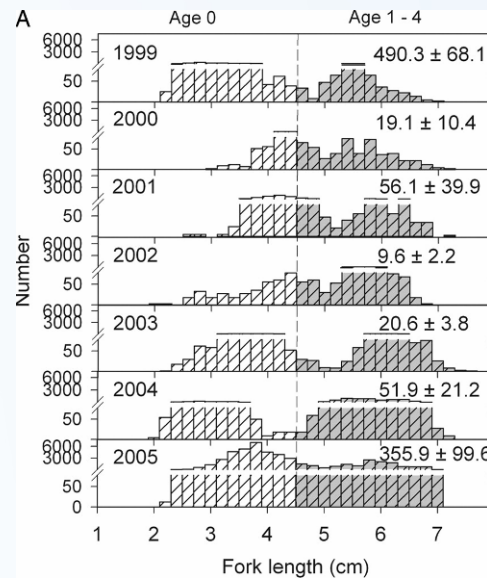
Kidd, K.A. et al. 2007. **Collapse of a fish population** following exposure to **a synthetic estrogen**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(21): 8897-8901



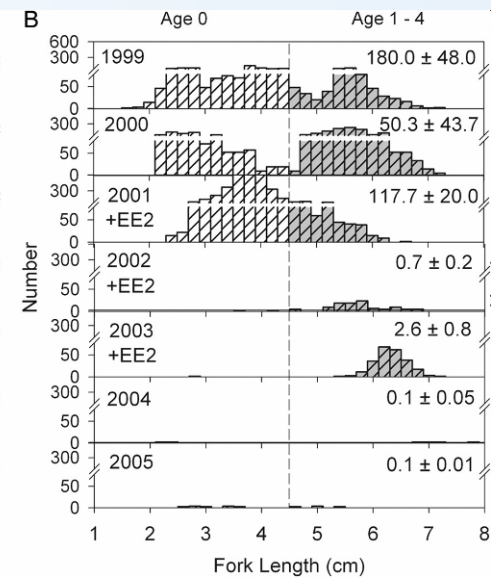
5 ng/L (!)  
7 years



### Controls

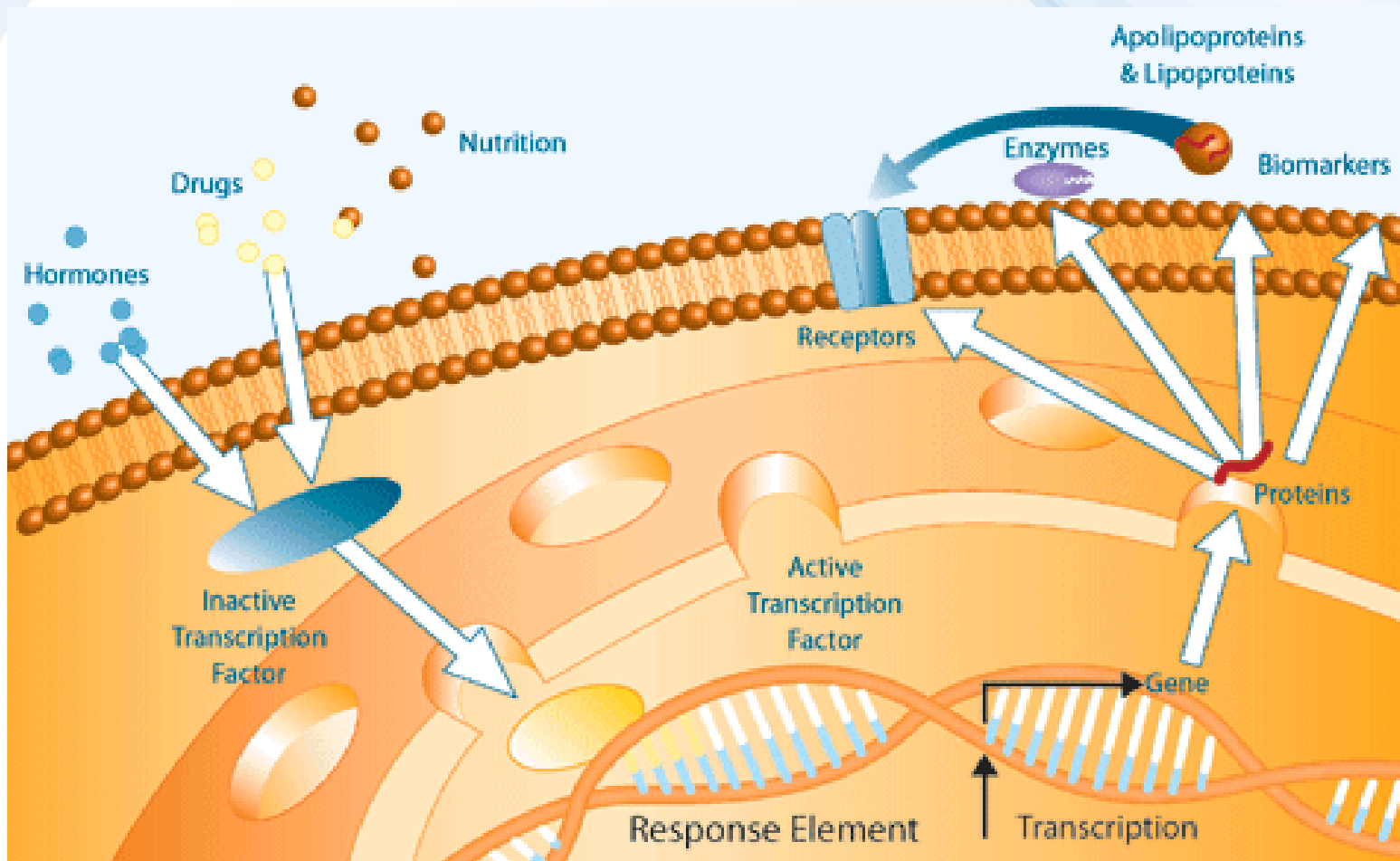


### + Ethinylestradiol



# Jak EDC fungují ?

**Mechanismů je mnoho (známé / neznámé)**  
co známe: působení na tzv. „jaderné receptory“



# „Přirozené“ ligandy jaderných receptorů

## ➤ STEROIDNÍ HORMONY (ER, AR, GR..)

➤ **Estrogeny**, androgeny

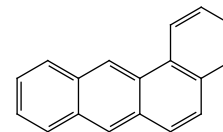
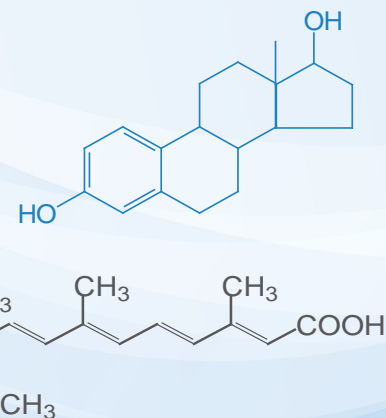
➤ Glukokortikoidy, mineralokortikoidy

## ➤ THYROIDNÍ HORMONY (ThR)

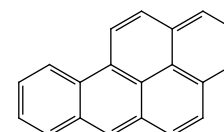
➤ Řízení růstu

## ➤ RETINOIDY (RAR/RXR)

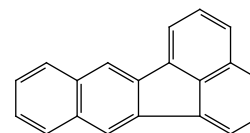
➤ Vývoj, embryogeneze, vidění ...



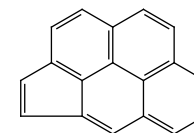
Benz[a]anthracen



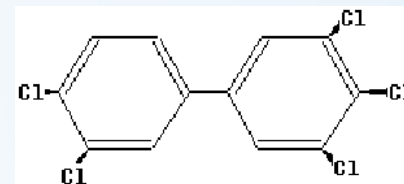
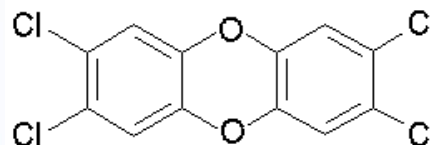
Benzo[a]pyren



Benzo[k]fluoranthen

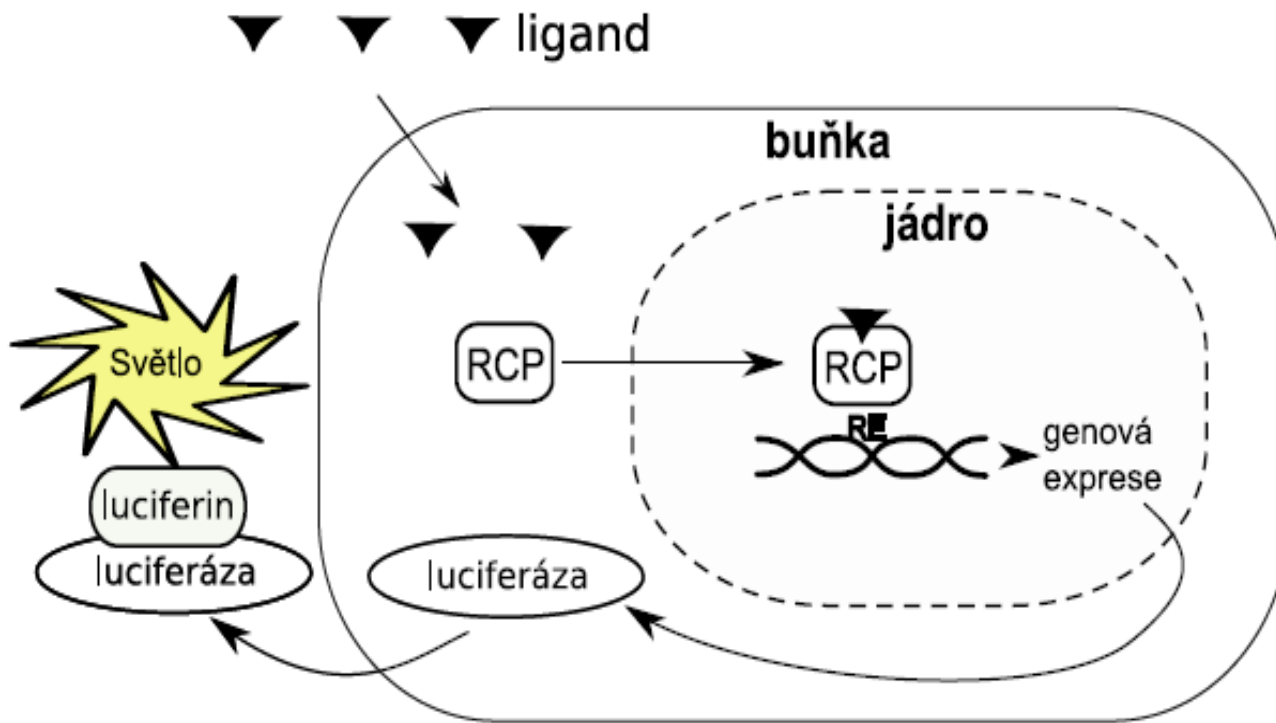


Cyclopenta[cd]pyren



# Nástroje pro sledování endokrinní disrupce - mechanismus přes jaderné receptory -

Reporterové testy s luciferázou  
*savčí buňky, kvasinky, umělé in vitro systémy*



Estrogenita

Androgenita

Toxicita závislá na  
retinoidech





# Využití biologických nástrojů – příklady



# Příkladová studie – Specifické účinky látek v ovzduší

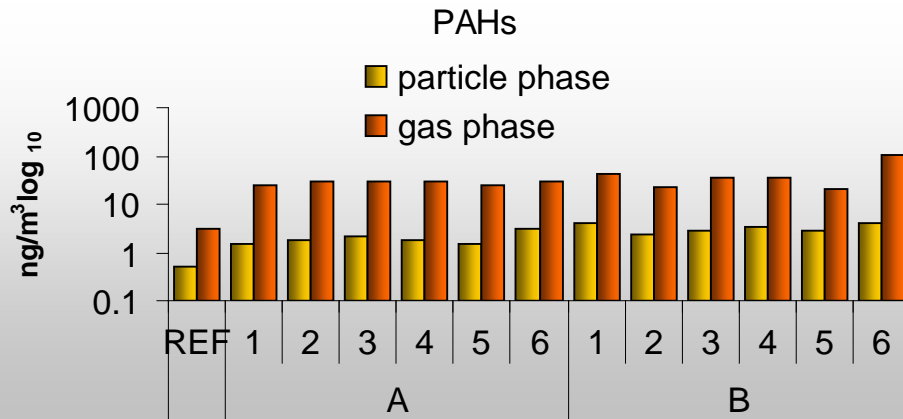
## Aktivní vzorkování (léto) částice vs. plynná fáze

- **Referenční lokalita** – zemědělská oblast (observatoř Košetice)
- **Region A** – chemický průmysl (OCPs, Středočeský kraj)
- **Region B** – výroba barev, zemědělství, doprava (Uherskohradištsko)

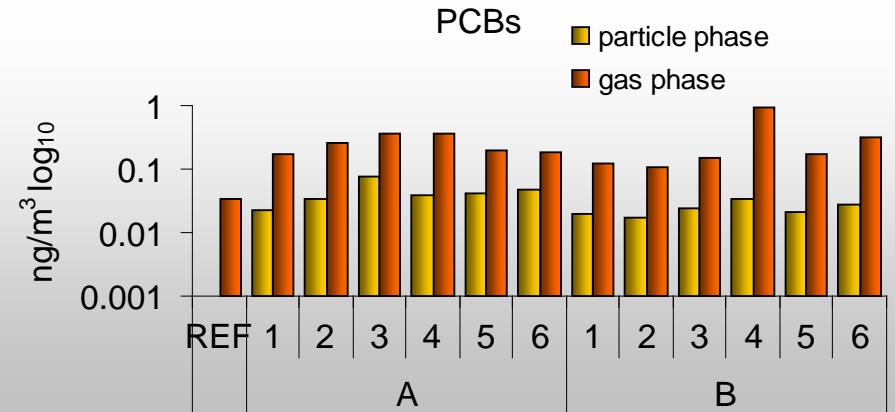
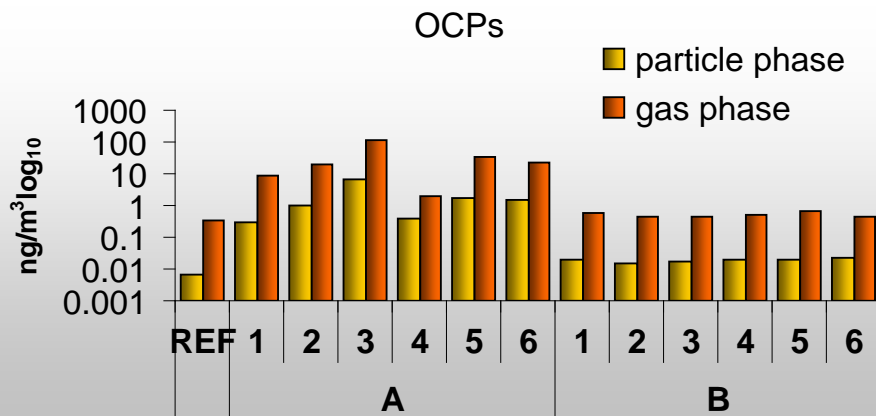
Novák et al. (2009) Environment International



# Chemické látky vs. ED-toxicita ve vzduchu

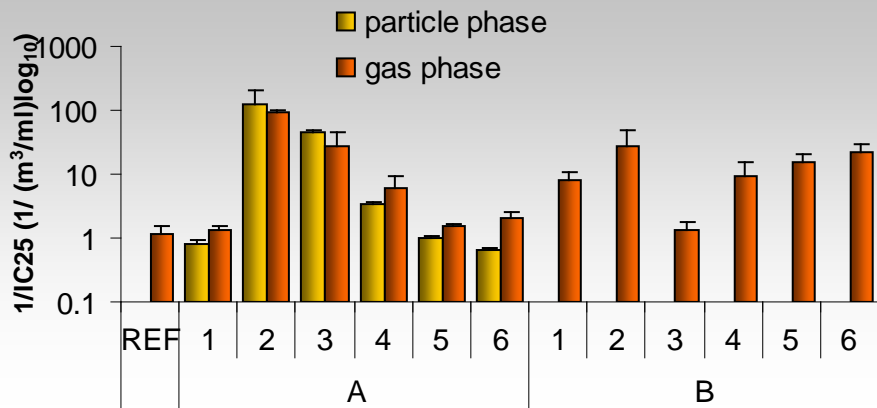


Chemické analýzy:  
+/- žádné trendy, žádné velké rozdíly mezi oblastmi,

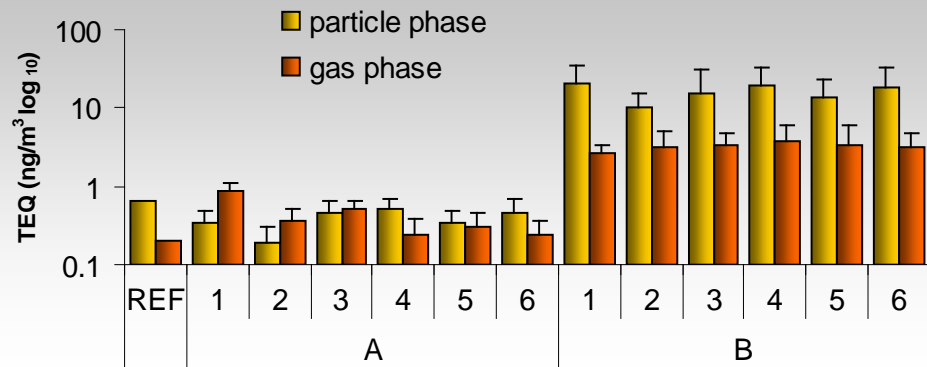


# BIOTESTY ...velké rozdíly v EFEKTECH !

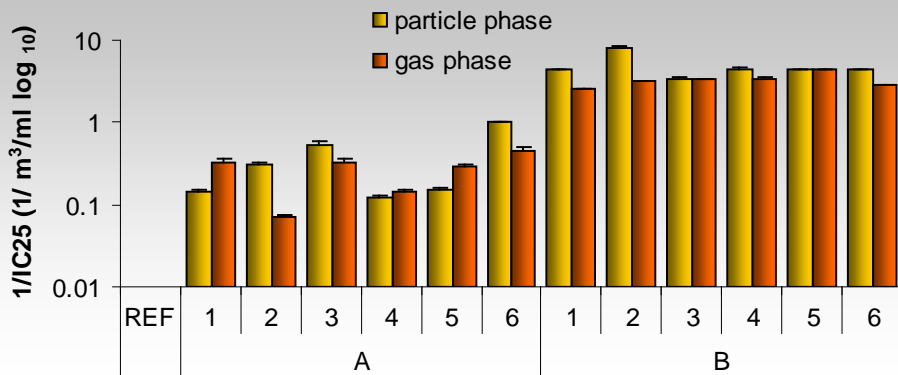
## antiandrogenicity



## dioxin-like toxicity



## antiestrogenicity



# Příkladová studie – ČOV Brno

## Čistírna odpadních vod Brno - Modřice

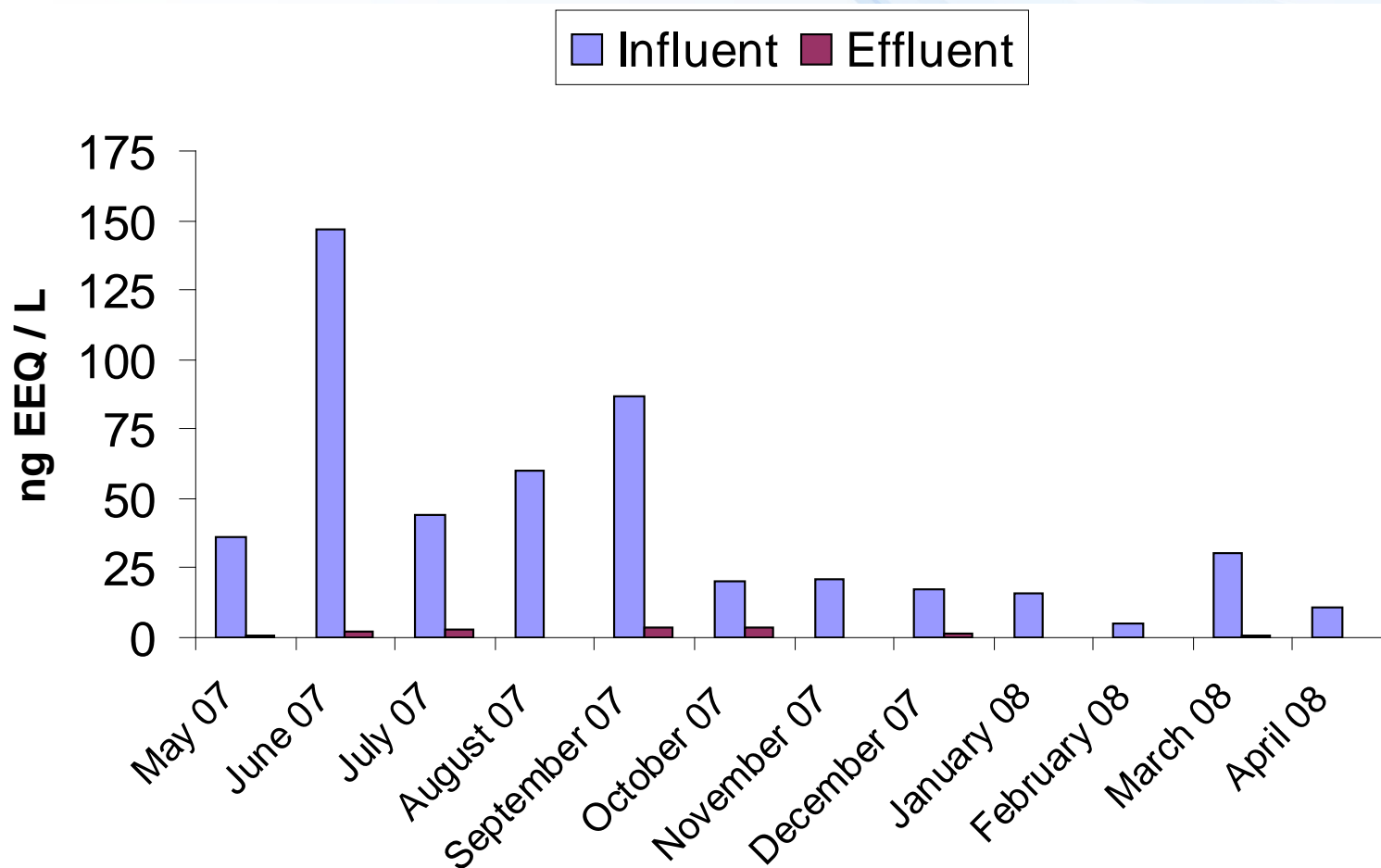
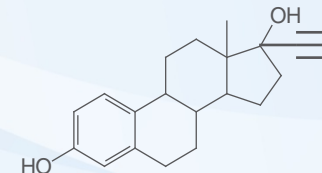
- roční studie (vstup/výstup; May 2007 – April 2008)
- kompozitní vzorky (24h), každý měsíc - 12 období
- příprava pro testování (SPE a analýza účinků)



# Příkladová studie – ČOV Brno

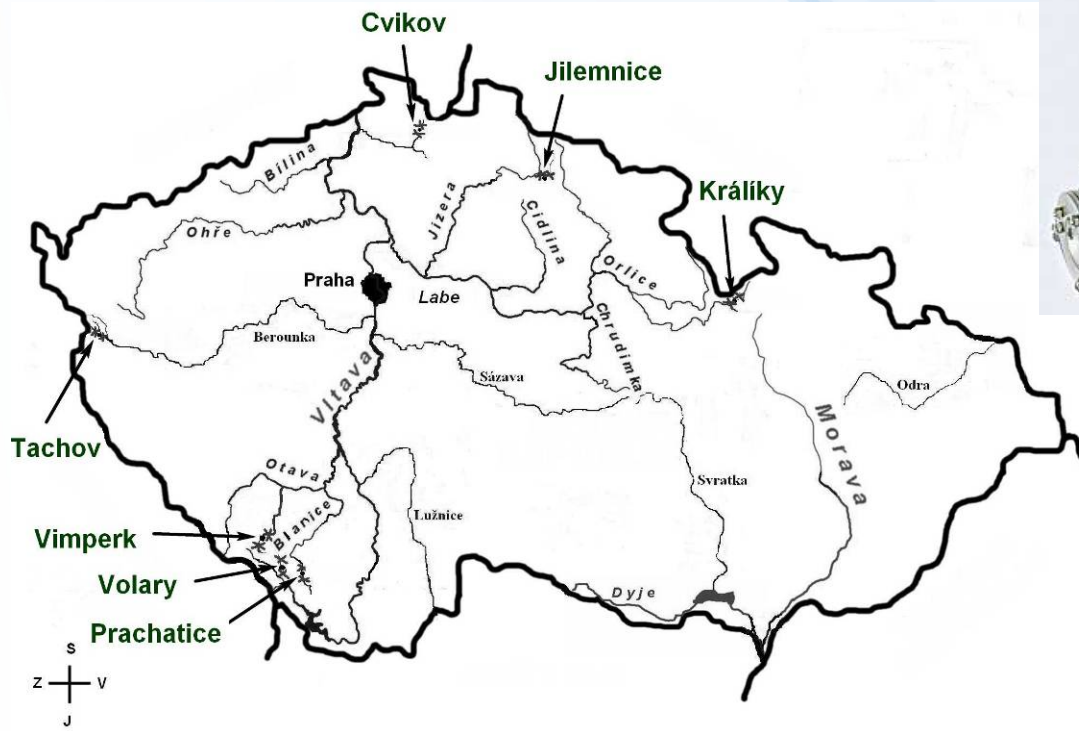
## Příklad estrogenita

- Účinnost odstraňování 81 až >98%
- ČOV vstup : 5 to 147 ng EEQ/L (equivalenty E2)  
výstup 0.1 - 4 ng EEQ/L



# Příkladová studie 2 – Malá sídla / ČOV

- Říční voda nad a pod ČOV (obce 4000 až 13000 obyvatel)
- Menší vodní toky nezatížené dalšími většími zdroji znečištění
- Vzorkování – pasivní vzorkovače POCIS (21 dní)



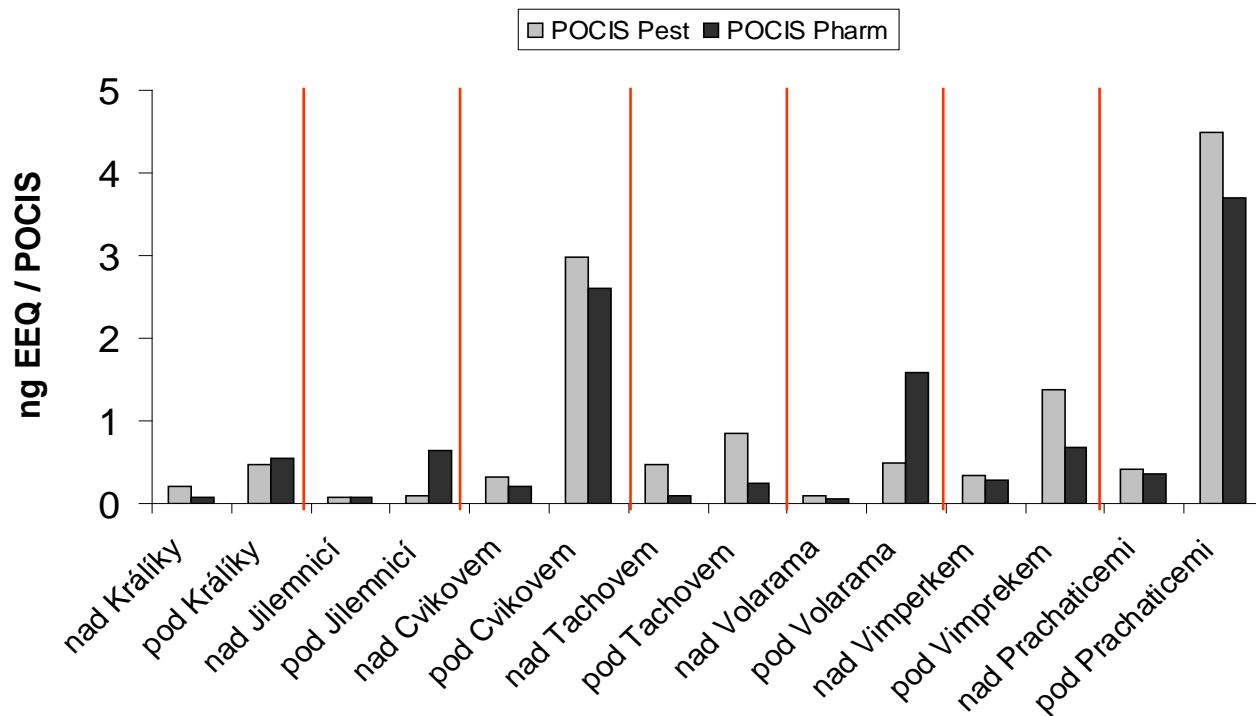
# Příkladová studie 2 – Malá sídla / ČOV

➤ Detekce estrogenity  
0,06 ng až 4,50 ng  
EEQ/POCIS

➤ V řekách pod ČOV  
více estrogenní vzorky  
ve všech případech

➤ Cvikov a Prachatice  
nejvyšší estrogenní  
potenciál

## ESTROGENITA





# Reálný problém EDCs v ČR

## Nádrž Pilňok

- Region Ostrava-Karviná



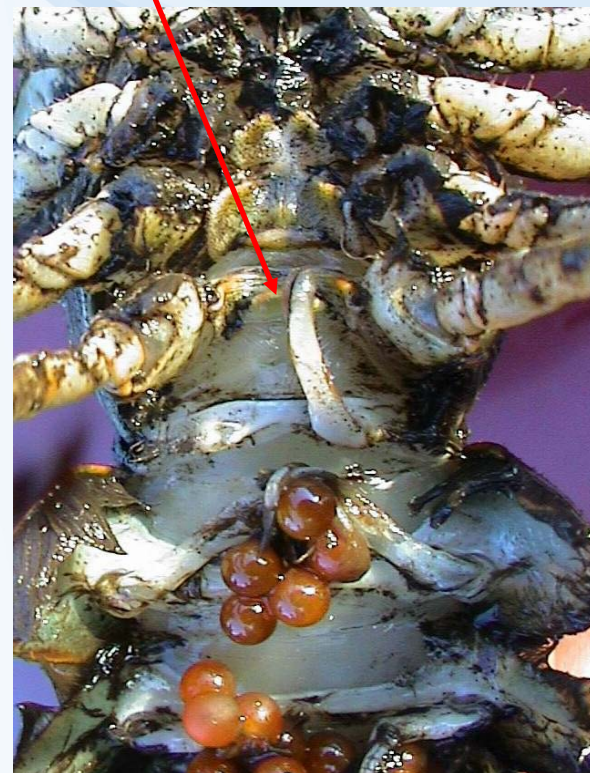
## Rak bahenní

*Pontastacus leptodactylus*

## INTERSEX

Samice s mužskými gonopody?

Samec s vajíčky?



# Integrované hodnocení



## Sedimenty

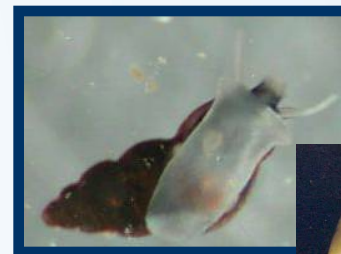
- Pilňok
- Referenční lokality  
*Karviná, Steinlach (Německo)*

## Extrakce

Chemické  
analýzy

*In vitro*  
účinky

*In vivo* účinky



# Toxické sinice



Upper Saranac River, USA

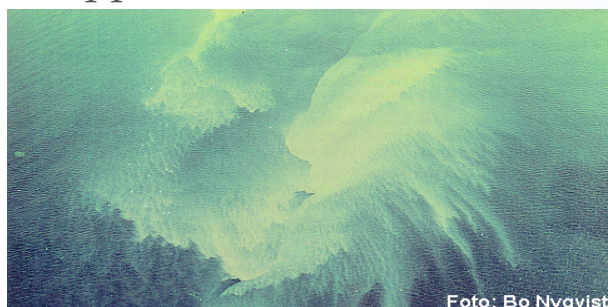


Bedetti Lake, Argentina



ASM MicrobeLibrary.org © Paerl

Neuse River, USA



Baltské moře, Evropa



Nové Mlýny, Česko



Žluté moře, Čína



Lake Mokoan, Austrálie



Jihoafrická republika

**Masový rozvoj sinic – globální problém**

# SINICE (CYANOBAKTERIE)

- masový rozvoj sinic = **závažný problém**:
  - negativní vliv na chemismus vody (kyslík, pH, )
  - produkce **pachů, pachutí**
  - produkce **CYANOTOXINŮ** – látky toxické či jinak biologicky aktivní



- komplikace při využívání nádrží (vodárenství, rekreace, chov ryb)
- nebezpečí pro ostatní živé organismy



Foto: Kerstin Bohm



# CYANOTOXINY

**! LIDSKÉ AKTIVITY !**

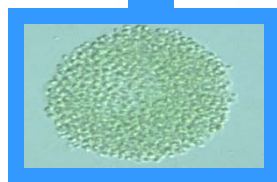
nárůst koncentrace CO<sub>2</sub>  
v atmosféře, nárůst UV  
radiace

spalování

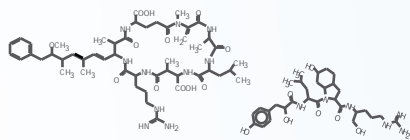
sinice  
(cyanobaktérie)

eutrofizace vodních  
ekosystémů

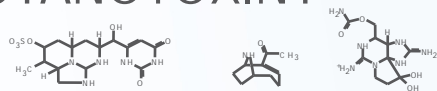
zemědělství,  
odpadní vody



masový rozvoj sinic  
(vodní květy)

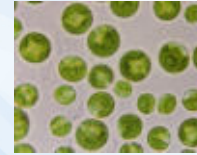


**CYANOTOXINY**



# Výzkum toxických účinků cyanobakterií a jejich frakcí na:

- ❖ Vodní fotoautotrofní organismy



- ❖ Vodní bezobratlé - korýše – hrotnatka velká  
*Daphnia magna* - akutní a chronické účinky



- ❖ Larvy obojživelníků a ryb – testy embryotoxicity a teratogeneze s embryi obojživelníků a ryb – drápatka vodní, zebřička pruhovaná



- ❖ Ryby, ptáky – spolupráce s Veterinární a farmaceutickou universitou v Brně



- ❖ In vitro testy – buněčné linie – produkce bioaktivních metabolitů



# Bakalářky a diplomky



- **Endokrinní disruptory a další polární látky (léčiva, vonné látky, pesticidy) v prostředí**
  - hladiny a efekty (kde jsou?, jak moc?)
  - možnosti praktického sledování (estrogenita, senzory, kity pro praxi...)
  - účinky na vodní organismy
  - možnosti odstraňování
- **Sinice a jejich toxiny**
  - Proč sinice produkují peptidové microcystiny ?
  - Jaký je význam těchto látek ?
  - Nové a neznámé látky ?
  - Neznámé účinky ?
  - Akumulace toxinů v rybách a jejich účinky (vč. biochemických)
- **Hodnocení kontaminace a toxických účinků ovzduší**
- **Studium působení huminových látek, interakce s polutanty, ovlivnění jejich osudu a toxicity**
- **Studium zatížení říčních sedimentů, dynamika znečištění**
- **Toxické indexy dle výskytu bioindikačních druhů v bentických společenstvech**





# Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

**Kamenice 126/3, Brno – Bohunice**

Tel: 549 49 4267, 775 140 071

Fax: 549 492 840

E-mail: [hilscherova@recetox.muni.cz](mailto:hilscherova@recetox.muni.cz)

Zástupce pro výuku:

Jakub Hofman - [hofman@recetox.muni.cz](mailto:hofman@recetox.muni.cz)

Den otevřených dveří....



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

**[www.recetox.muni.cz](http://www.recetox.muni.cz)**