



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Ekotoxikologie vodních ekosystémů

Testování



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Table 3.3 Summary of the Toxicity Test Requirements by Regulatory Guideline (Continued)

Regulatory Guideline		Type of Testing Required
OECD	EEC	European Community Aquatic Testing Requirements
Aquatic Effects Testing		
201		Algal growth inhibition test
202-1		<i>Daphnia magna</i> acute immobilization test
202-2		<i>Daphnia magna</i> reproduction test
C2		Acute toxicity in <i>Daphnia magna</i>
203 C1		Fish, acute toxicity test
204		Fish, prolonged toxicity test
305A		Sequential static fish test
305B		Semi-static fish test
305C		Degree of biodegradation in fish: bioaccumulation
305D		Static fish test
305E		Flow-through fish test
PARCOM		European Community: Paris Commission
Offshore Chemical Notification/Evaluation		
	— ^a	Algal growth inhibition test (<i>Skeletonema costatum</i> or <i>Phaeodactylum tricomutum</i>)
	— ^a	Invertebrate acute toxicity test (<i>Acartia tonsa</i> , <i>Mysidopsis</i> sp., <i>Tisbe</i> sp.)
	— ^a	Fish acute toxicity test (<i>Scophthalmus</i> sp.)

^a—No guideline number available at this time.



Experimentální stanovení ekotoxicity

Poznání efektů, které působí přítomnost stresorů na organismy v prostředí

- suborganismální úroveň
 - **laboratorní experimenty**
studium mechanismů toxicity látek, in vitro biomarkery, odhady míry subletální toxicity specifických typů (dioxinová toxicita, xenoestrogenita ...)
- jednotlivé druhy organismů, jednotlivci
 - **laboratorní experimenty**
 - *tradiční ekotoxikologické biotesty s jednotlivými druhy organismů, porovnání citlivosti různých druhů ...*
 - **- polní manipulované studie (in situ)**
studie s jednotlivými druhy - pěstování rostlin na kontaminovaných a kontrolních plochách, klecové experimenty v akvatickém prostředí (měkkýši, ryby)



Experimentální stanovení ekotoxicity

Poznání efektů, které působí přítomnost stresorů na organismy v prostředí

- populační efekty
 - **laboratorní testy**
 - *dlouhodobější experimenty – celoživotní testy toxicity, testy s časnými vývojovými stadiemi, rostliny – rozmnožování, klíčení ..., bezobratlí – obratlovci – testy reprodukční toxicity*

- efekty ve společenstvech
 - **laboratorní mikrokosmy**
uměle ustavená společenstva organismů různých druhů za definovaných podmínek (producenti – konzumenti – destruenti)
 - **terénní vícedruhové manipulované studie in situ**
 - *polní studie, akvatické mezokosmy (tekoucí, stojaté, litorální – příbřežní)*

- ekosystémové efekty
- **terénní pozorování** – hodnocení efektů v populacích a společenstvech v reálné přírodní situaci



Experimentální hodnocení ekotoxicity

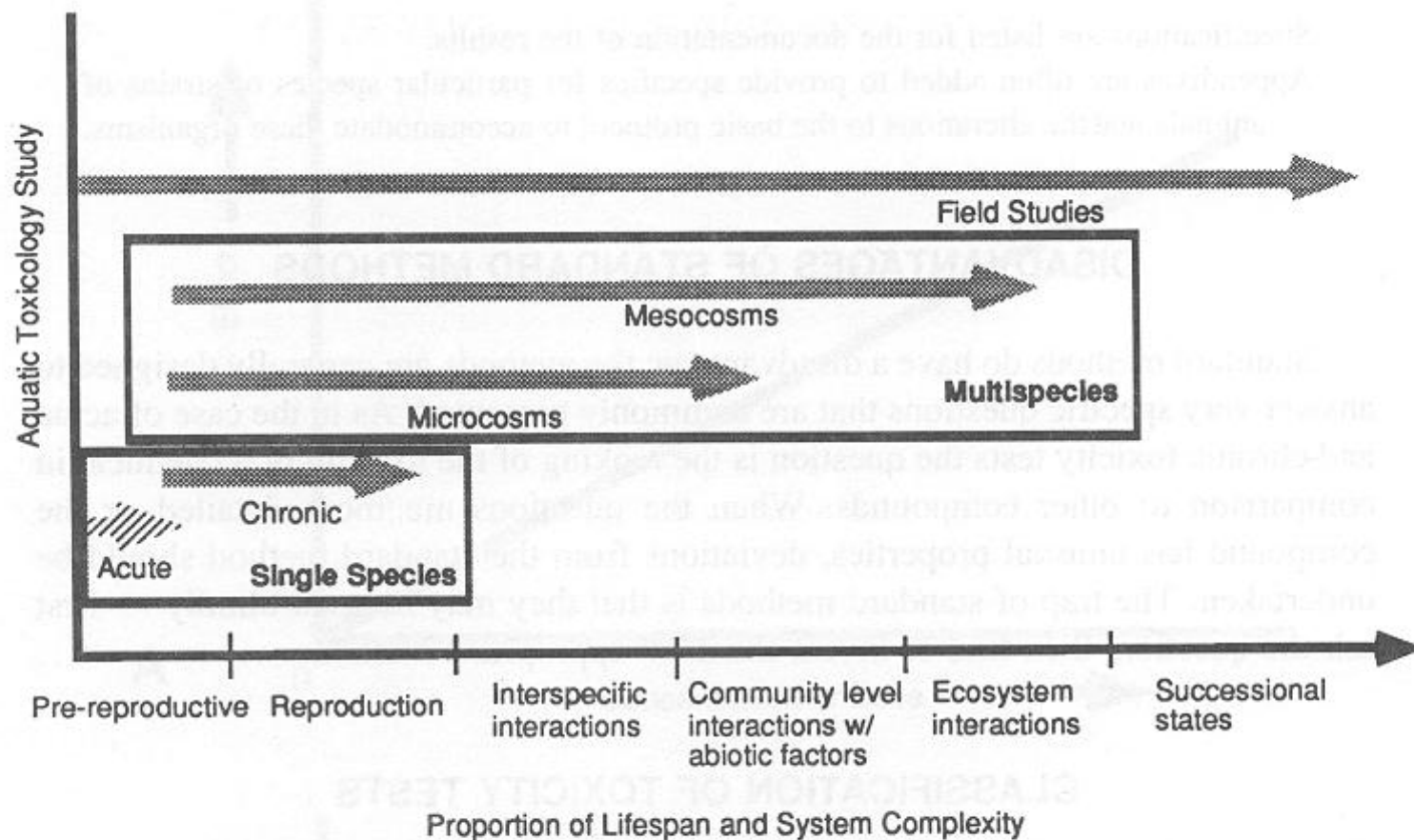
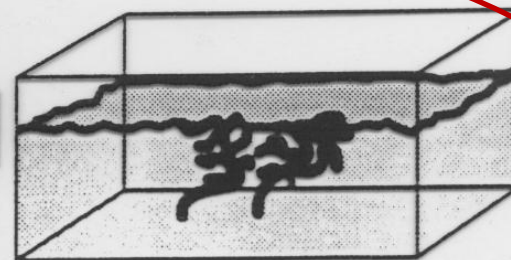
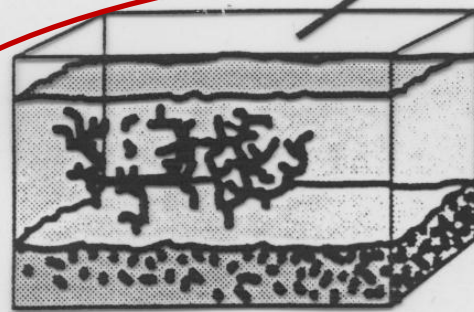
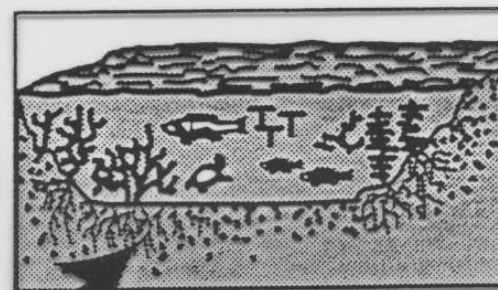
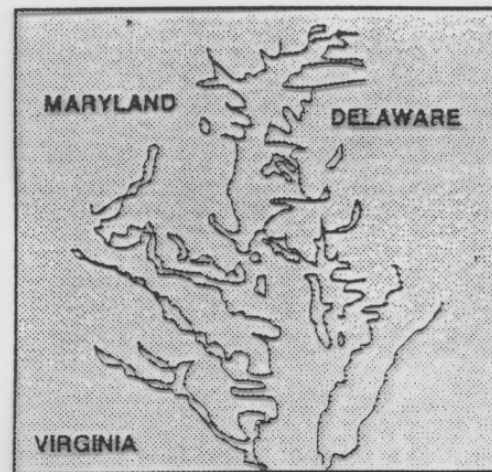


Figure 3.9 Classification of toxicity tests in environmental toxicology. Generally, the two parameters that are involved are the length of the test relative to the test organism and the species composition of the test system.



Scaling the Aquatic Environment



laboratoř



Metody hodnocení efektů

Hlavním požadavkem ekotoxikologické studie je průkaz KAUZALITY mezi expozicí a efektem

- Praktické stanovení ekotoxicity
 - Laboratorní jednodruhové biotesty
 - Laboratorní mikrokosmy
 - Manipulované a kontrolované mezokosmy
 - Polní studie
 - Reálné ekosystémy



**obtížnost průkazu
KAUZALITY**



Vztahy Dávka - Odpověď

Pro srovnání toxicity různých látek (vzorků) se užívají odvozené parametry

1) hodnoty odvozené pro 50% efekt

- odhady v oblasti 50% efektů zatíženy nejmenší chybou,

nejčastější:

- LC50 – koncentrace (C) způsobující 50% letalitu (L)
- LD50 – dávka (Dose)
- EC50 – koncentrace způsobující 50% efekt (E)
- IC50 – koncentrace způsobující 50% inhibici (I)



Vztahy Dávka - Odpověď

Křivka dávka - odpověď

2) další odvozené parametry

- EC_x (x=1,5,10,25,75,90,99 ...)
- LOEC/L Lowest Observable Effect Concentration/L
- NOEC/L No Observable Effect Concentration/Level
- NOAEC/L No Observable Adverse Effect Concentration/Level
- MTC Minimum threshold concentration
- MATC Maximum Acceptable/Allowable Toxicant Concentration
= geometrický průměr NOEC a LOEC



Vztahy Dávka - Odpověď

Srovnání toxicity látek

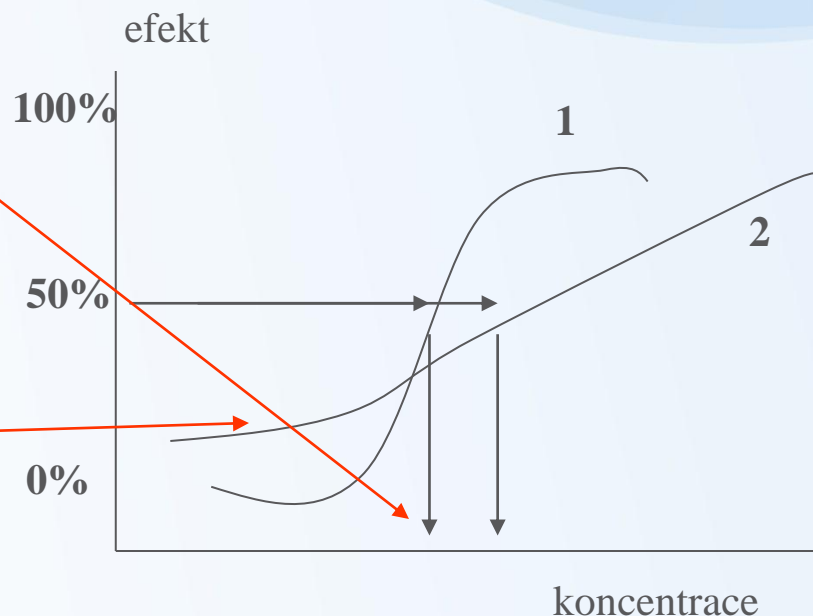
Problém - různé směrnice křivky Dávka-Odpověď
Pro dobrou interpretaci – uchování celé křivky

Příklad:

Na základě EC50 je toxičtější látka 1

ALE

látka 2 vykazuje efekty ve významně nižších koncentracích



Vyjádření KONCENTRACÍ při hodnocení TOXICITY

(1) čisté látky a definované směsi látek
(*barvy, produkty chemické výroby ...*)

KONCENTRACE – mg/L, mmol/L (=mM)

(2) extrakty vzorků z prostředí

- KONCENTRACE EXTRAKTU (% ředění ...)

- KONCENTRACE původní matrice

př. sediment

– *extrakce organickými rozpouštědly*

- Extrahovatelný Organický Materiál,

koncentrace v testu toxicity – mg EOM / mL



Vyjádření KONCENTRACÍ při hodnocení TOXICITY

(2) vzorky z prostředí - přírodní matrice

voda, odpadní vody

- koncentrace : % ředění
- ev. jen srovnání efektu odpadní voda vs. kontrola

pevné matrice – sedimenty

- % ředění – existují postupy míchání/ředění
- nejčastěji srovnání efektů s negativní kontrolou
(+ / -)



Vzorky v prostředí – KOMPLEXNÍ SMĚSI

- Látky ve směsích mají ve srovnání s čistými – izolovanými – látkami odlišné biologické vlastnosti (vč. toxicity)

ADITIVITA / SYNERGISMUS / ANTAGONISMUS

(1) ADITIVITA

- princip kumulativní toxicity
- základní ADITIVNÍ MODEL
- nejčastější u látek s "nespecifickým" mechanismem toxicity (*polární narkoza*)

Př. látka 1 vyvolá v koncentraci c_1 , efekt 25%
látka 2 vyvolá v koncentraci c_2 , efekt 30%
směsný roztok L1 a L2 v koncentracích c_1 a c_2
vyvolá efekt 55% (25 + 30)



Vzorky v prostředí – KOMPLEXNÍ SMĚSI

(2) ANTAGONISMUS

- látky ve směsi vzájemně inhibují toxický efekt
- efekt po působení směsi je menší než podle předpovědi aditivního modelu
- u látek se specifickými biologickými-toxikologickými vlastnostmi

Příklad

Současné působení neurotoxinů s různým mechanismem
(*princip "protijedů"*)

- Veratridin (*otevření membránových kanálů pro Na⁺/K⁺*)
- Saxitoxin (*inhibice kanálů*)



Vzorky v prostředí – KOMPLEXNÍ SMĚSI

(3) SYNERGISMUS

- látky ve směsi se vzájemně potencují
- efekt po působení směsi je vyšší než podle předpovědi aditivního modelu
- u látek se specifickými biologickými-toxikologickými vlastnostmi

Příklad

Toxicita pro Ryby:

současné působení detergentu (snížení povrchového napětí na membránách žaber) a polární látky - inhibitoru mitochondriální respirace (samotný jen obtížně vstupuje do buňky ALE v přítomnosti detergentu → rychlý vstup, významný toxický efekt)



AKVATICKÉ PROSTŘEDÍ

Akvatické testy s bezobratlími jsou velmi běžné, někdy je ekotoxikologie zaměřována s "Daphniovými biotesty"

uspořádání

kádinky, akutní testy 48 h,
prolongované testy 21 d,
hodnocení letality, růstu ...
krátkodobé - zpravidla statické

Akvatičtí planktonní korýši - nejčastější

Daphnia magna, *Ceriodaphnia dubia*
Artemia salina (mořská)

Další bezobratlí

bentičtí – Gammarus, Hyallela azteca
hmyz – Pakomáři (Chironomus), jepice ...



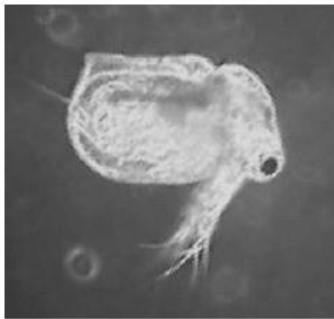
Daphnia magna



Artemia salina



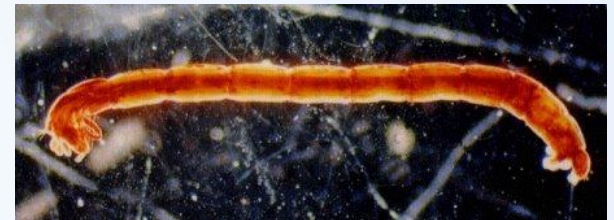
Ceriodaphnia dubia



Gammarus



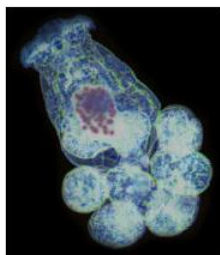
Chironomus riparius



AKVATICKÉ PROSTŘEDÍ

ALTERNATIVNÍ MIKROBIOTESTY ("toxikity") s bezobratlími

www.microbiotests.be



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

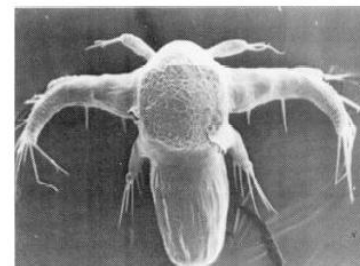
ROTOXKIT F *chronic*

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



Ekotoxikologické biotesty – konzumenti - bezobratlí

PŮDA + SEDIMENTY

Alternativní mikrobiotest TOXKIT (www.microbiotest.be)

OSTRACODTOXKIT FTM ***MICROBIOTESTS***

FOR SEDIMENT TOXICITY TESTING

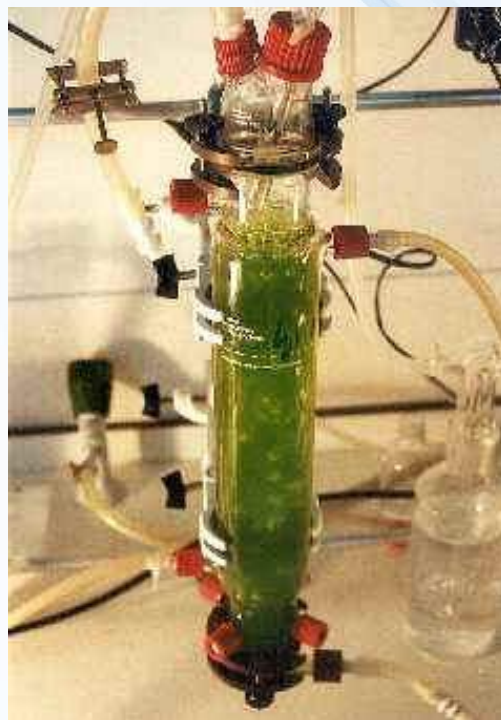
With the
benthic crustacean
Heterocypris
incongruens



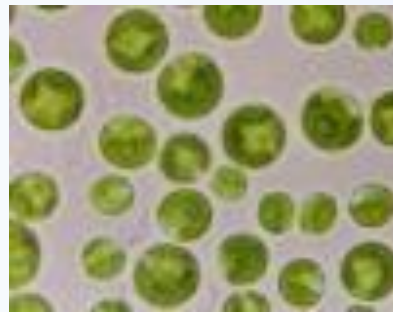
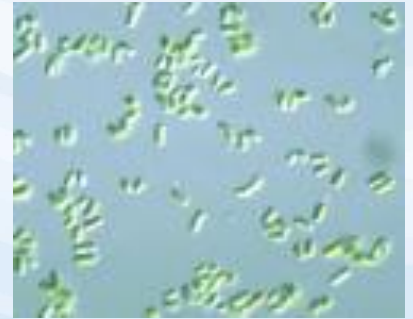
Sbírky a kultivace řas



Sbírky a kultivace řas



Řasy a sinice jako testovací organismy



Ekotoxikologické biotesty - PŘÍKLADY

Konzumenti - obratlovci



Ekotoxikologické biotesty - obratlovci

AKVATICKÉ PROSTŘEDÍ - RYBÍ biotesty

-uspořádání

-akvária

- akutní testy 96 h,

- prolongované a embryolarvální testy
dny až měsíce

- hodnocení letality, růstu, rozmnožování,
testy karcinogenity (*nádory*),
testy xenoestrogenity (*vývoj oboupohlavníků*)

- různá uspořádání (statické, průtočné ...)

Rybí druhy

Pstruh duhový, Živorodka duhová (paví očko),

Karas, Kapr, Střevle (Pimephales promelas)

Specifické testy (endokrinní disrupce, karcinogenita)

Halamčík rýžovištní – Japanese medaka



Vícedruhové hodnocení ekotoxicity

Byly vypracovány postupy pro hodnocení ekotoxicity ve složitějších – vícedruhových uspořádáních

- simulace přírodních podmínek
- model ekologických vztahů mezi organismy (*potravní řetězce*)
- hodnocení nepřímých efektů (*likvidace producentů -> další efekty v celém ekosystému*)

Experimentální uspořádání

- podle velikosti (*nezcela jednoznačné limity*)

: mikrokosmy

voda - do 1 m³ stojaté, nebo 1 m tekoucí

: mezokosmy

- podle umístění – laboratorní kontrolované podmínky vs. přírodní



Table 4.12 Listing of Current Multispecies Toxicity Tests

Aquatic microcosms

Benthic-pelagic microcosm

Compartmentalized lake

Mixed flask culture microcosm

Pond microcosm

Sediment core microcosm

Ecocore microcosm

Ecocore II microcosm

Standard aquatic microcosm

Stream microcosm

Waste treatment microcosm

Terrestrial microcosms

Root microcosm system

Soil core microcosm

Soil in a jar

Terrestrial microcosm chamber

Terrestrial microcosm system

Versacore



Vícedruhové hodnocení ekotoxicity

Praktická realizace (principy stejné s biotesty)

(1) Biologický systém

- Příprava, osazení, aklimatizace
- Kontrolní varianta
- Jedna nebo více (více koncentrací) exponovaných variant
- Definovaný počet opakování (*replicates*)
 - *nutné – složitější systémy – větší variabilita (! i u kontrol)*

(2) Expozice

- Dávkování
- přímo do vodní fáze (*vodní mikrokosmy*), postřikem na povrch (*simulace přirozené aplikace pesticidů*), řada dalších možností, jednorázové opakované ...
- Doba expozice – podle typu mikro/mezokosmu – týdny až roky

(3) Hodnocení parametrů, srovnání kontroly vs. expozice



Příklad – laboratorní akvatický mikrokosmos

Table 5.2 Some organisms used in the standardized aquatic microcosms.

Algae

Anabaena cylindrica
Ankistrodesmus sp.
Chlamydomonas reinhardi 90
Chlorella vulgaris
Lyngbya sp.
Nitzschia kutzigiana (Diatom 216)
Scenedesmus obliquus

Animals

Daphnia magna
Hyadella azteca (amphipod)
Cypridopsis sp. or *Cyprinotus* sp. (ostracod)
Hypotrachs (protozoa)

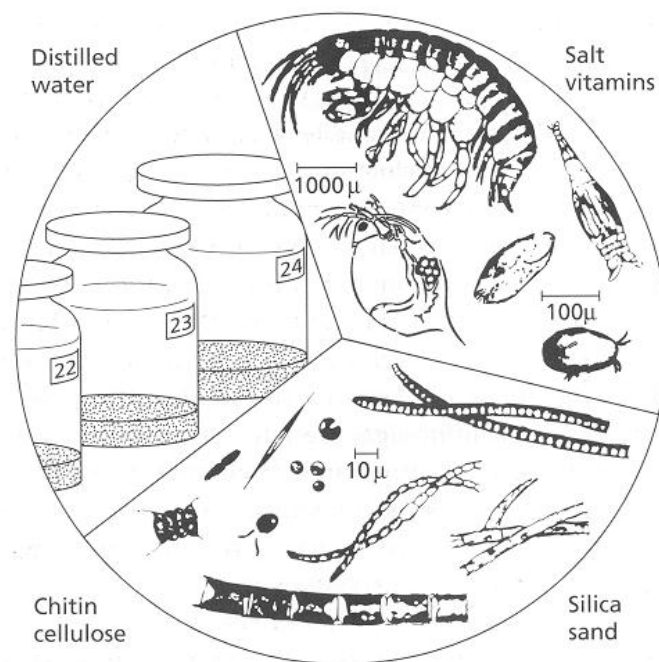


Fig. 5.2 Components of a standardized aquatic microcosm.



Příklad – laboratorní akvatický mikrokosmos



Příklad

- požadavky
na laboratorní
mikrokosmos

- model stojatého
(lenitického) ekosystému

Table 4.13 Summary of Test Conditions for Standardized Aquatic Microcosms: Freshwater

Test type	Multispecies
Organisms Type and number of test organisms per chamber	Algae (added on day 0 at initial concentration of 10^3 cells for each algae species): <i>Anabaena cylindrica</i> , <i>Ankistrodesmus</i> sp., <i>Chlamydomonas reinhardi</i> 90, <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Lyngbya</i> sp., <i>Nitzschia kutzigiana</i> (Diatom 216), <i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Selenastrum capricornutum</i> , <i>Stigeoclonium</i> sp., and <i>Ulothrix</i> sp. Animals (added on day 4 at the initial numbers indicated in parentheses): <i>Daphnia magna</i> (16/microcosm), <i>Hyalella azteca</i> (12/microcosm), <i>Cypridopsis</i> sp. or <i>Cyprinotus</i> sp. (ostracod) (6/microcosm), Hypotrichs [protozoa] (0.1/ml) (optional), and <i>Philodina</i> sp. (rotifer) (0.03/ml)
Experimental design Test vessel type and size	1-gal (3.8-l) glass jars are recommended; soft glass is satisfactory if new containers are used; measurements should be 16.0 cm wide at the shoulder, 25 cm tall with 10.6-cm openings
Medium volume	500 ml added to each container
Number of replicates	6
Number of concentrations	4
Reinoculation	Once per week add one drop (ca 0.05 ml) to each microcosm from a mix of the ten species; 5×10^2 cells of each alga added per microcosm
Addition of test materials	Add material on day 7; test material may be added biweekly or weekly after sampling
Sampling frequency	2 times each week until end of test
Test duration	63 days
Physical and chemical parameters Temperature	Incubator or temperature controlled room is required providing an environment 20 to 25°C with minimal dimensions of $2.6 \times 0.85 \times 0.8$ m high.
Work surface	Table at least 2.6×0.85 m and having a white or light colored top or covering
Light quality	Warm white light
Light intensity	$80 \mu\text{E m}^{-2}$ photosynthetically active radiation s^{-1} (850–1000 fc)
Photoperiod	12 h light/12 h dark
Microcosm medium	Medium T82MV
Sediment	Composed of silica sand (200 g), ground, crude chitin (0.5g), and cellulose powder (0.5 g) added to each container.
pH level	Adjust to pH 7
Endpoint	Population dynamics, chemistry, etc.



Příklad

jednoduchý laboratorní akvatický mikrokosmos

- simulace tekoucích vod

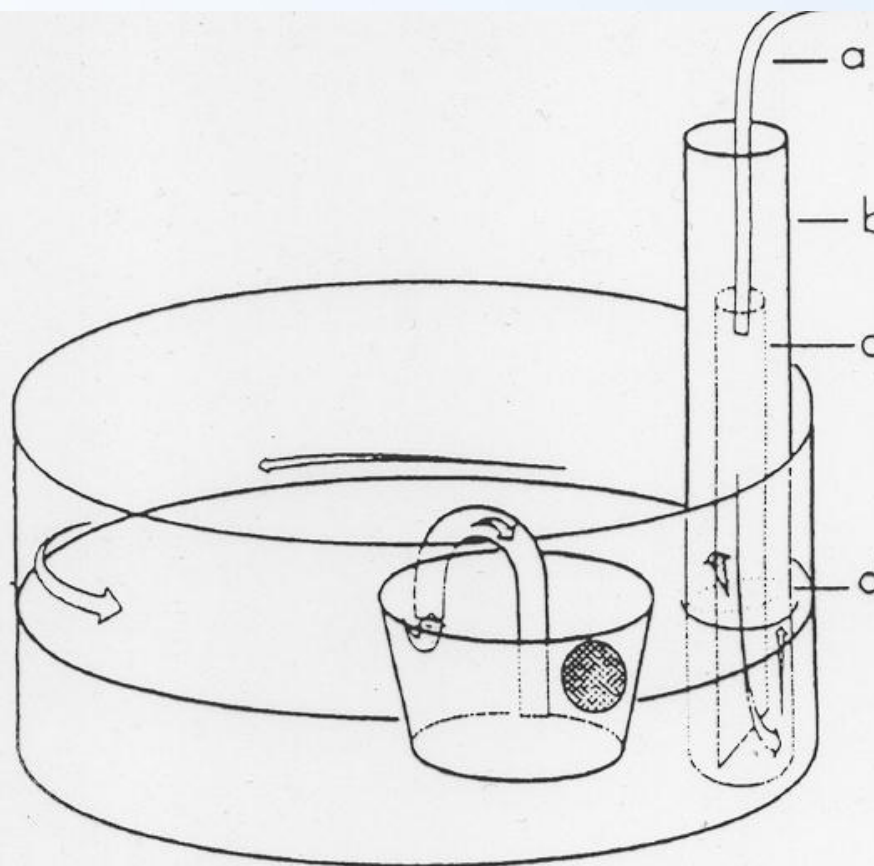
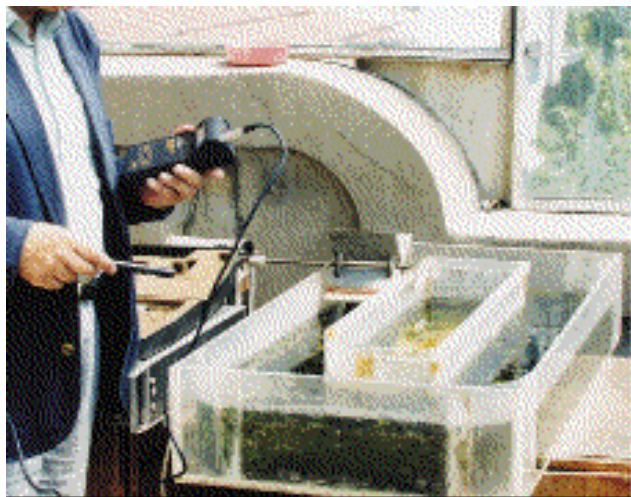


Figure 7. Flow-through exposure chamber for flow-through tests with polychaetes. The exposure chamber is a glass crystallizing dish with an inflow of water over the sediment surface. Arrows show flow of water into the test tube (b) through silicone tubing (a), which has a piece of glass tubing (c) attached at the bottom, then through an elliptical opening (d) cut in the side of the test tube and into the dish just above the sediment surface. Water circulates around the dish and leaves through a siphon and catch cup. (Reprinted with permission from Pesch, C. E., Munns, W. R. Jr., Gutjahr-Gobell, R.: Effects of a contaminated sediment on life history traits and population growth rate of *Neanthes arenaceodentata* (Polychaeta: Nereidae) in the laboratory. Environmental Toxicology and Chemistry 10(6):805–815. Copyright 1991, SETAC.)



Příklad – akvatický mikrokosmos s makrofyty

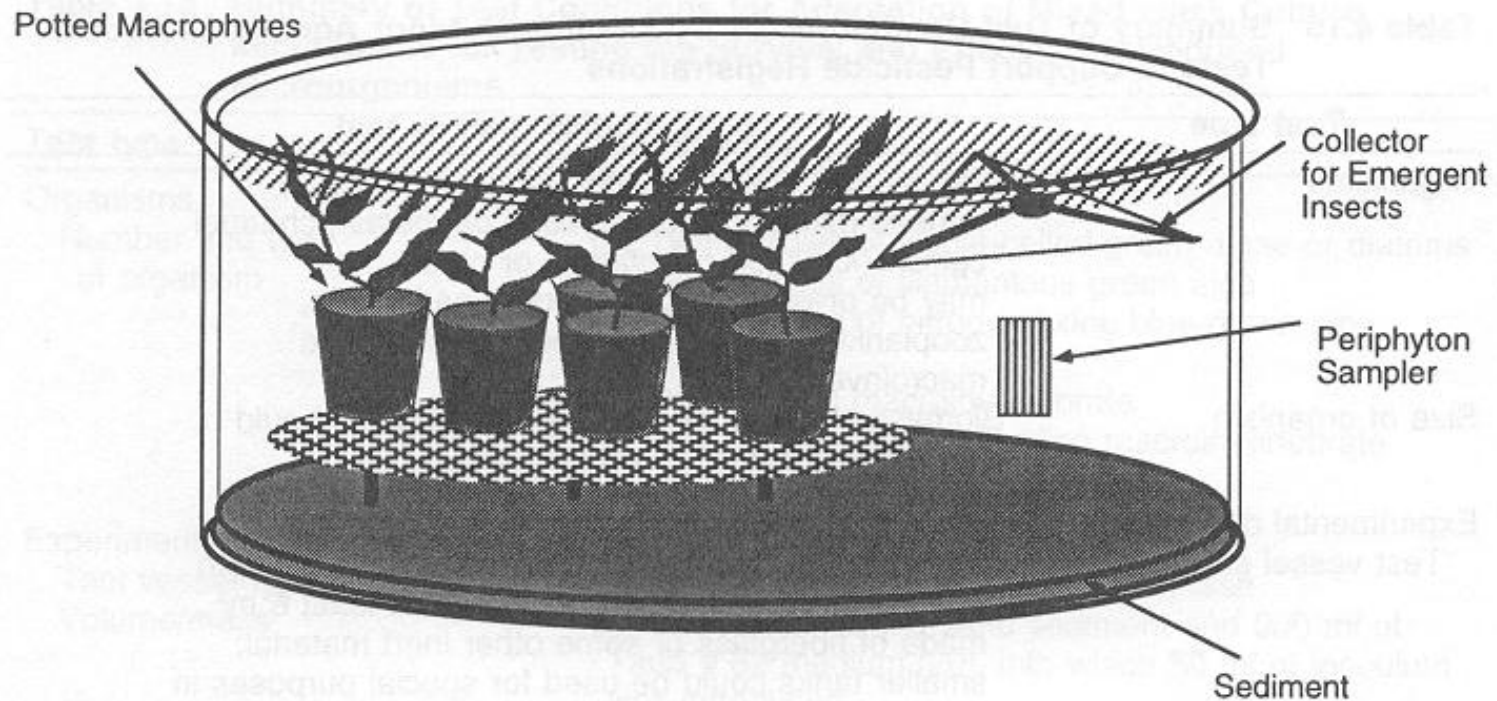


Figure 4.2 FIFRA microcosm experimental unit. An example of a microcosm experimental unit designed to test the effects of a herbicide on an aquatic environment. This particular setup does not include fish since the predatory effects would tend to hide lower trophic level effects upon the invertebrate populations. Typically, a FIFRA microcosm experiment includes fish species, particularly when acetylcholinesterase inhibitors or other toxicants particularly effective against animal species are tested.



Příklady – venkovní mikrokosmy

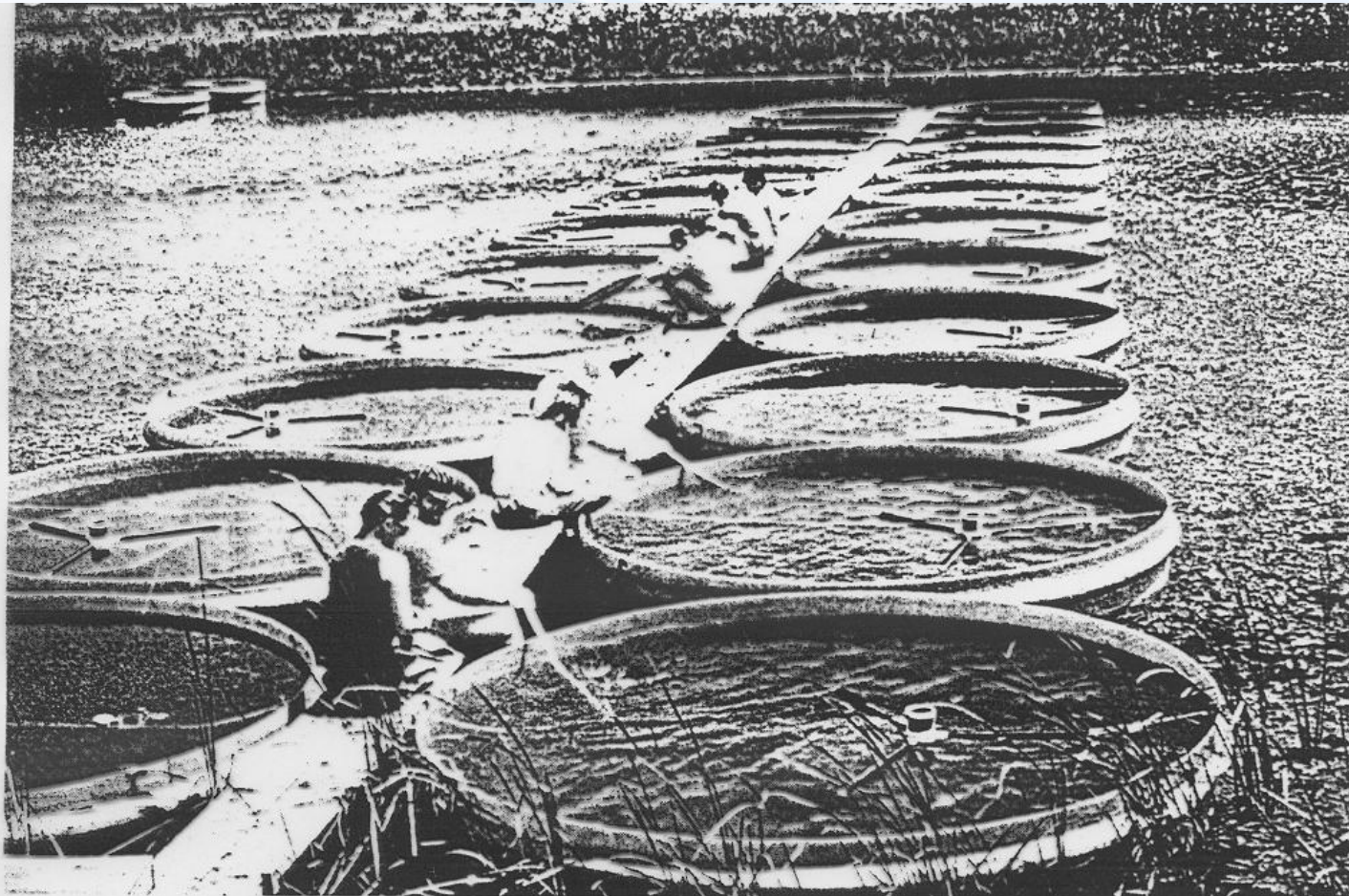


Figure 6. Photograph of outdoor microcosm test systems (10,000-L tanks) located at the University of Kansas. These fiberglass tanks have been used by Springborn Laboratories, Wareham, MA. to evaluate the impact of pesticides on aquatic communities.



Příklady – litorální mezookosmos

Příklady – venkovní plovoucí mikrokosmy

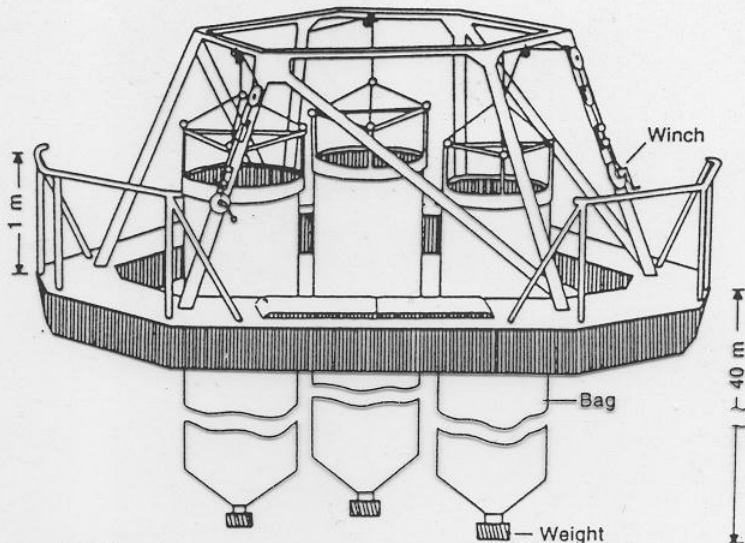


Figure 7. Schematic of Hamburg enclosure. (From Grice and Reeve, 1982. Reprinted with permission from Springer-Verlag, New York, Inc.)

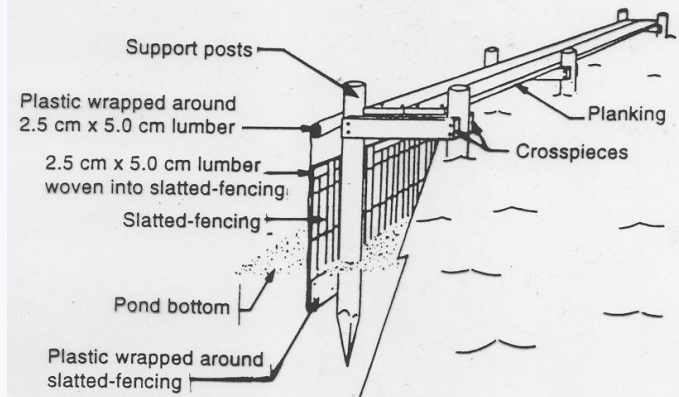
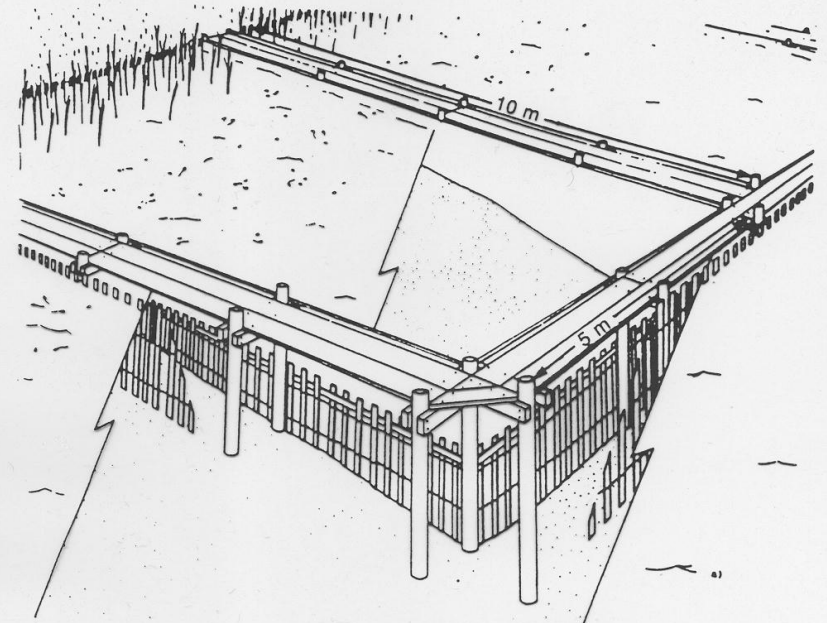


Figure 11. Schematic diagram of a littoral enclosure (Reprinted with permission from *Environmental Toxicology and Chemistry* 8(12): 1209–1216, Brazner, J. C., Heinis, L. J., Jensen, D. A. A littoral enclosure for replicated field experiments, Copyright 1989 SETAC.)



Mezokosmy pro ekotoxikologické testování přípravků proti sinicím



Microcosm experiments - 250 I

Tested substances:
Natural compounds
Floculants
Fe-chelators
Enzymatic
ROS producers



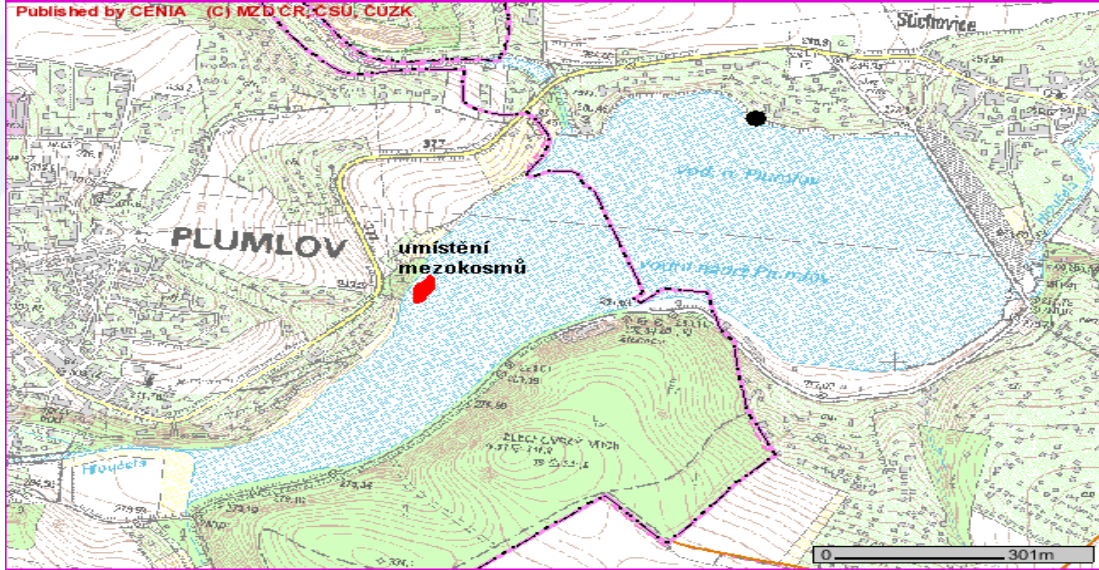
Mezokosmy s přírodními sedimenty v přírodních podmínkách – 17.000 l



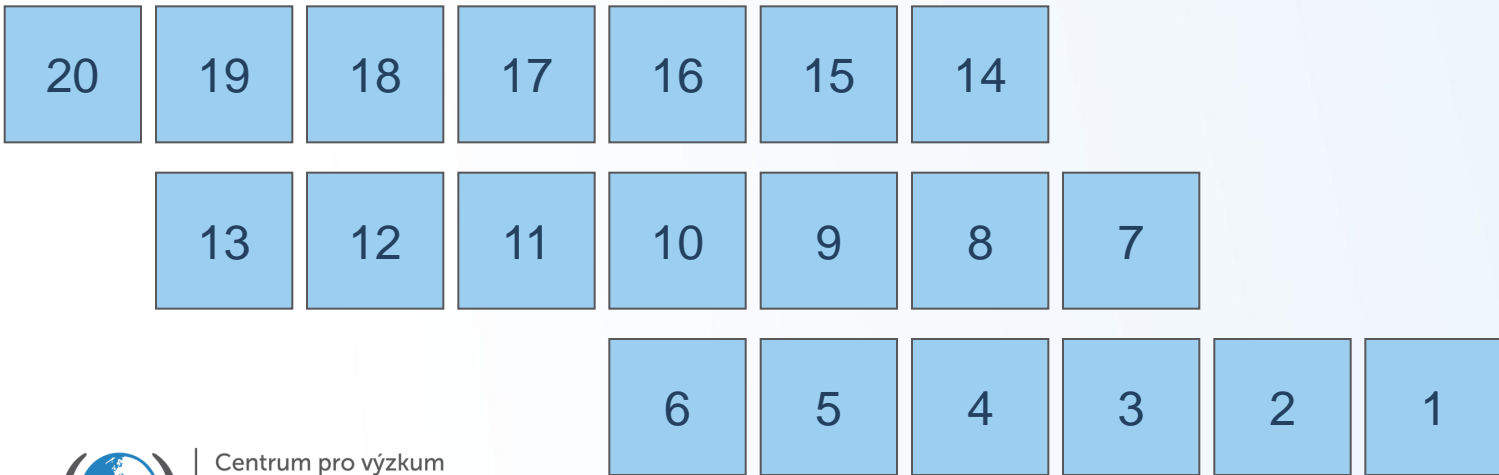
- fotodokumentace



Positions of mezocosms



..with natural reinvasion of *Microcystis* colonies from sediments



Příklady – venkovní mezokosmy – tekoucí voda

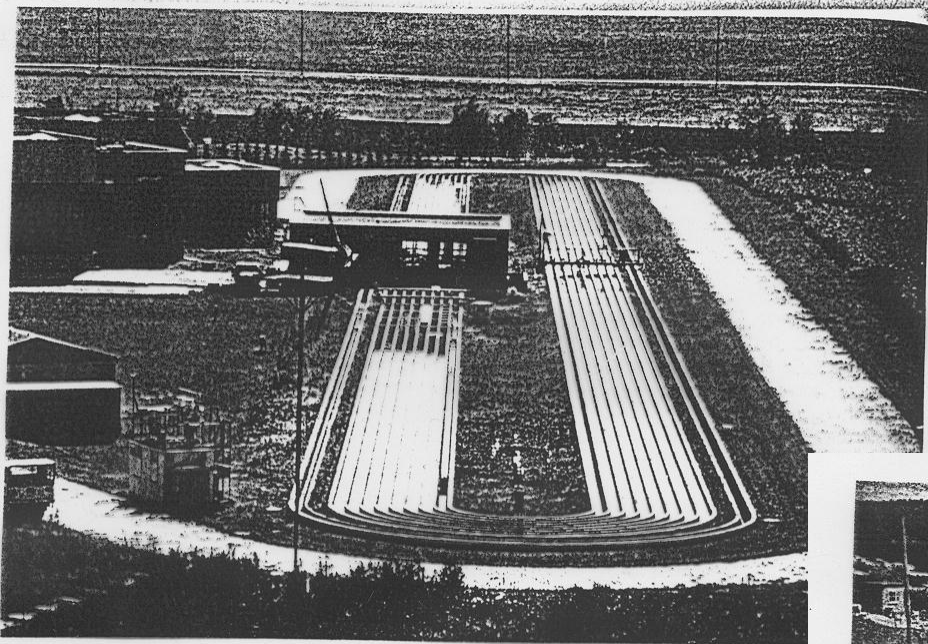


Figure 13. Artificial stream system of the Water, Soil and Air Hygiene Office, Marienfelde, Germany. Facility to study the effects of sewage, nutrients, and detergents on stream ecosystem. Large building in the center is treatment plant which contains automated sampling equipment. (Photo by P. D. Hansen.)

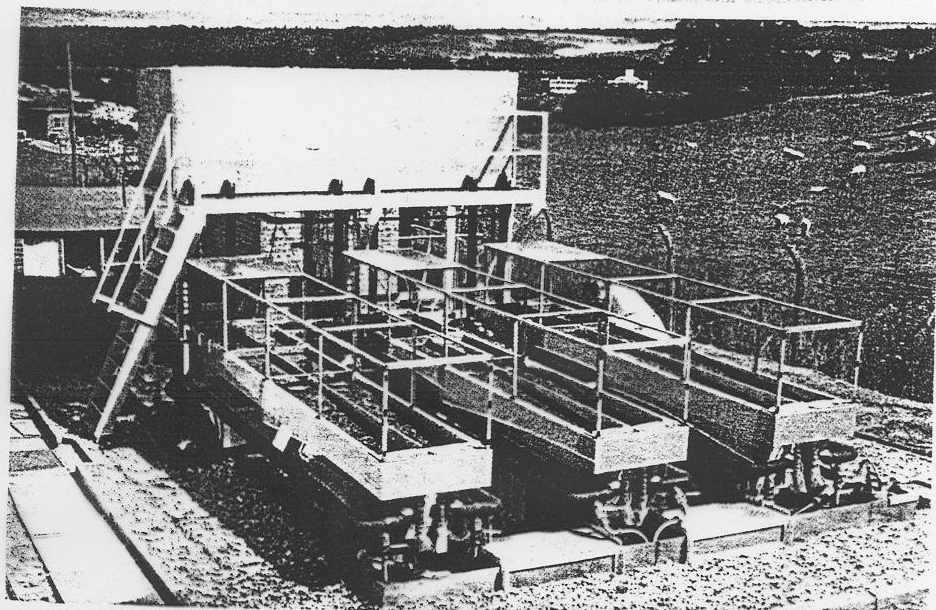


Figure 14. Photograph of recirculating artificial stream system developed by Shell Research (England).



Příklady – venkovní mezokosmy lenitické

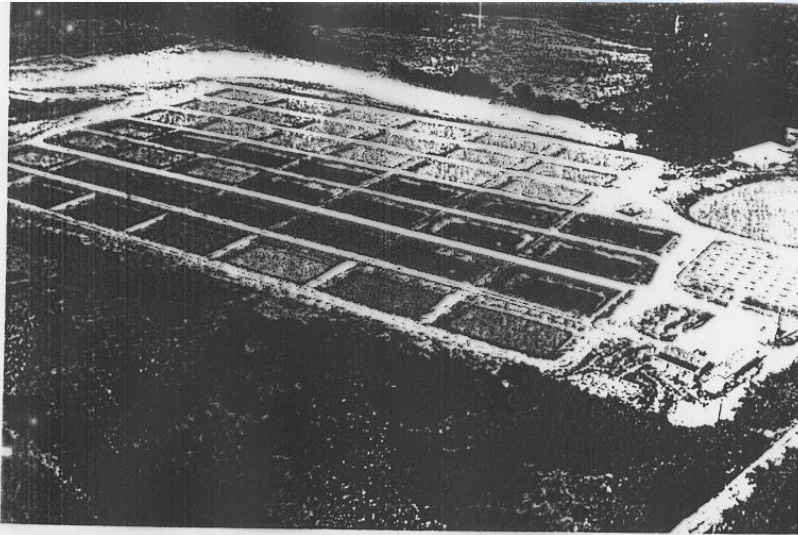


Figure 2. Aerial photograph of lentic mesocosm ponds at the Water Research Field Station of the University of North Texas, Denton.

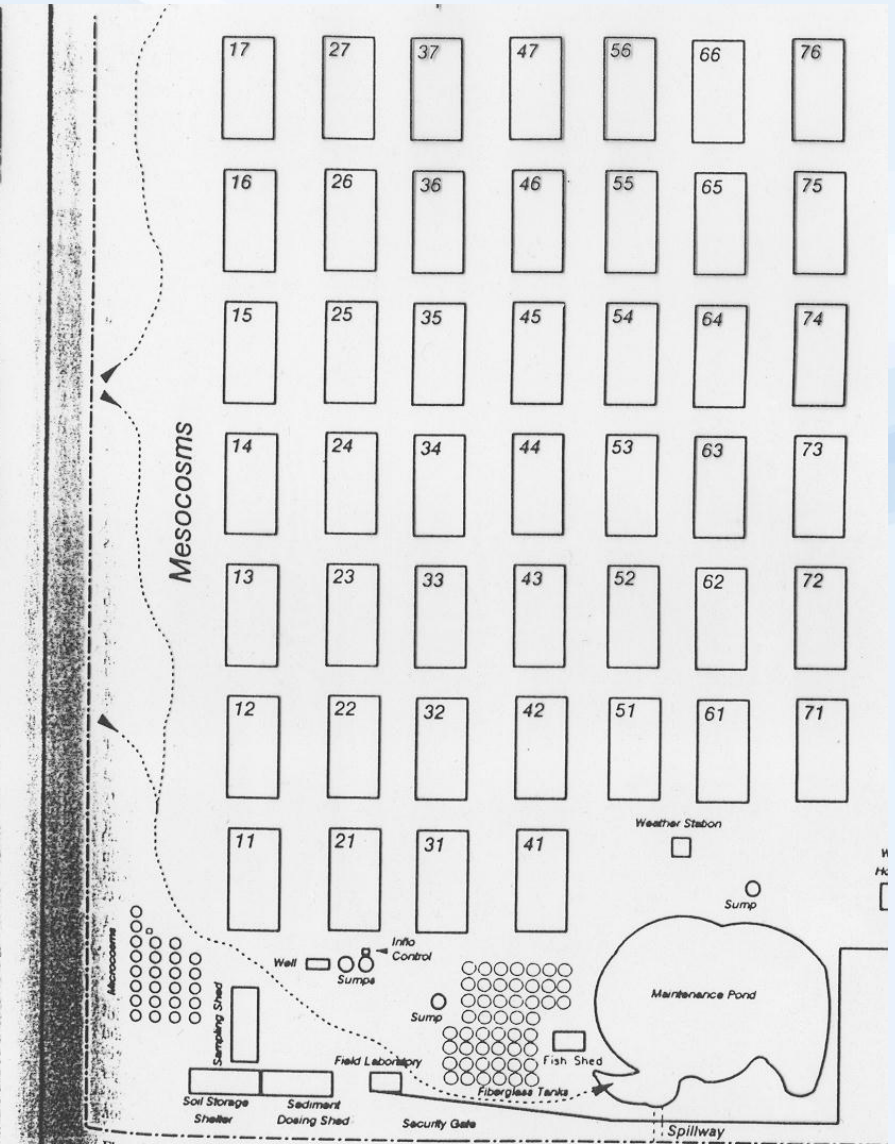


Figure 3. Schematic diagram of the lentic mesocosm ponds at the Water Research Field Station of the University of North Texas. Smaller circles represent the location of fiberglass microcosm test systems.

Polní studie, biomonitoring

vzorkování – odběry abiotických vzorků

Voda



Sediment



Eckmanův
drapák



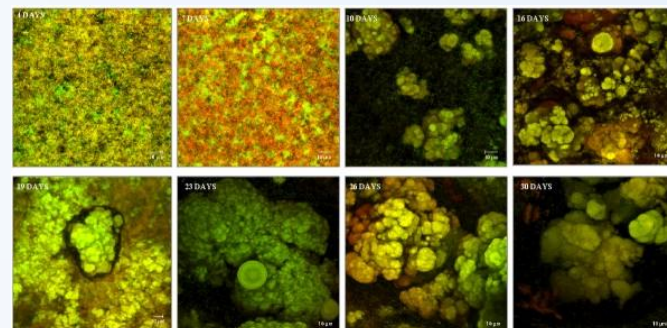
Polní studie, biomonitring

AKVATICKÉ PROSTŘEDÍ odběry biotických vzorků

Planktonní síťky



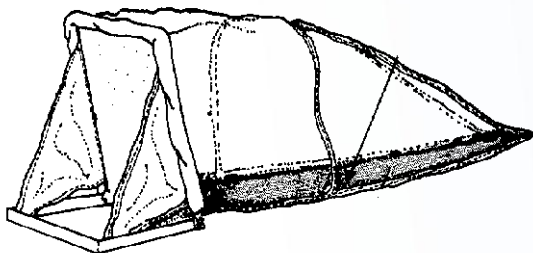
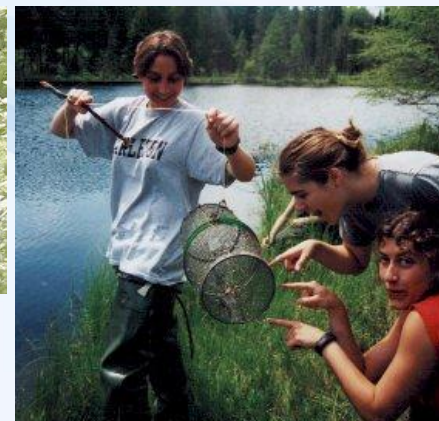
Periphyton – nárosty, biofilmy



Polní studie, biomonitring

AKVATICKÉ PROSTŘEDÍ odběry biotických vzorků

Bentičtí bezobratlí



Phytoplankton Bioassays

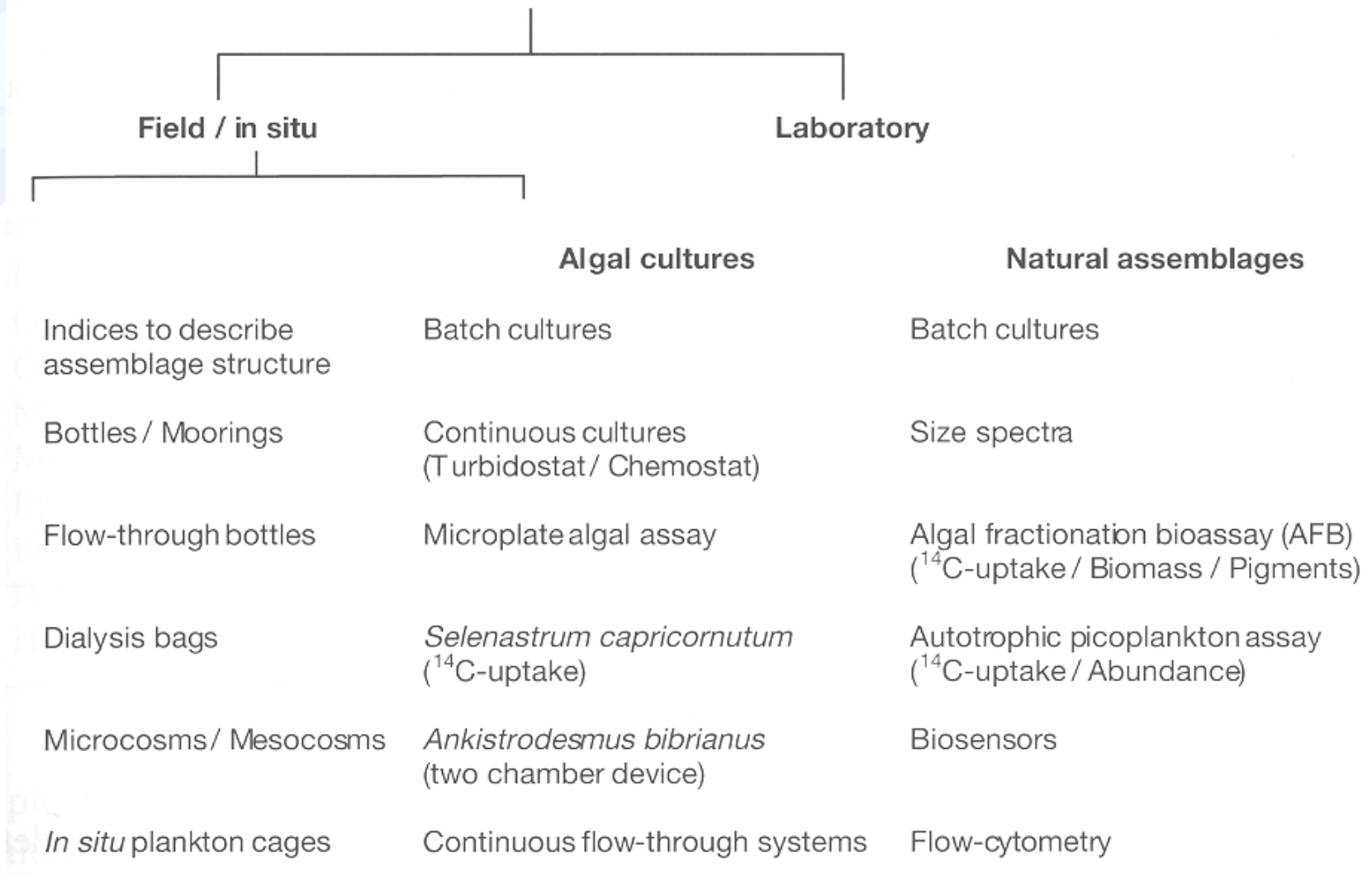
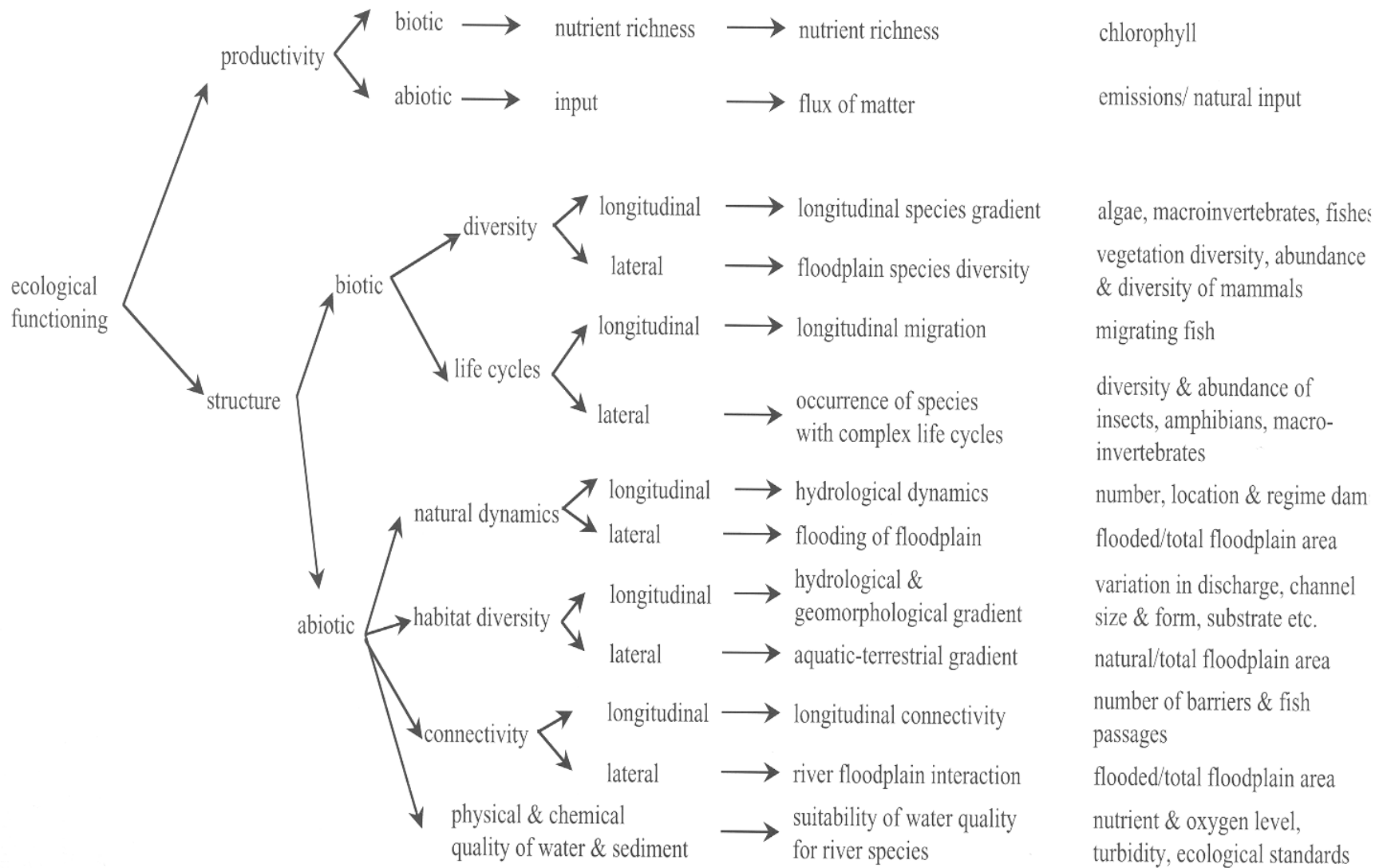


Figure 1. Phytoplankton bioassays commonly employed in laboratory and field/in situ situations (modified from Munawar et al., 1989).



Overview of elements of environmental quality and the proposed indicators and variables for the river Rhine.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí