



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



Testování ekotoxicity - BIOTESTY

Luděk Bláha, PŘF MU

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Proč ekotoxikologické testy ?

CHEMICKÉ ANALÝZY samotné NEDOKÁŽOU postihnout reálné riziko pro živé organismy:

- 1) reálná expozice se liší podle **biodostupnosti** toxických prvků a látek v dané situaci,
- 2) jde vždy o **směs toxikantů**, která působí jinak než jednotlivé toxikanty zvlášť
- 3) Negativní **vlivy matrice** samotné bez ohledu na obsah toxikantů na živé organismy či interakce vlivu matrice s efekty toxikantů
- 4) spektrum analytických metod (tedy i limitních hodnot) je omezené a ve vzorku mohou být přítomny **neanalyzované** významně toxické látky.

PŘEDNOSTI chem. analýz

- Reprodukovatelnost, standardizovanost
- Exaktní číselné výstupy srozumitelné laikům: využití v zákonech



EXPERIMENTÁLNÍ HODNOCENÍ EKOTOXICITY

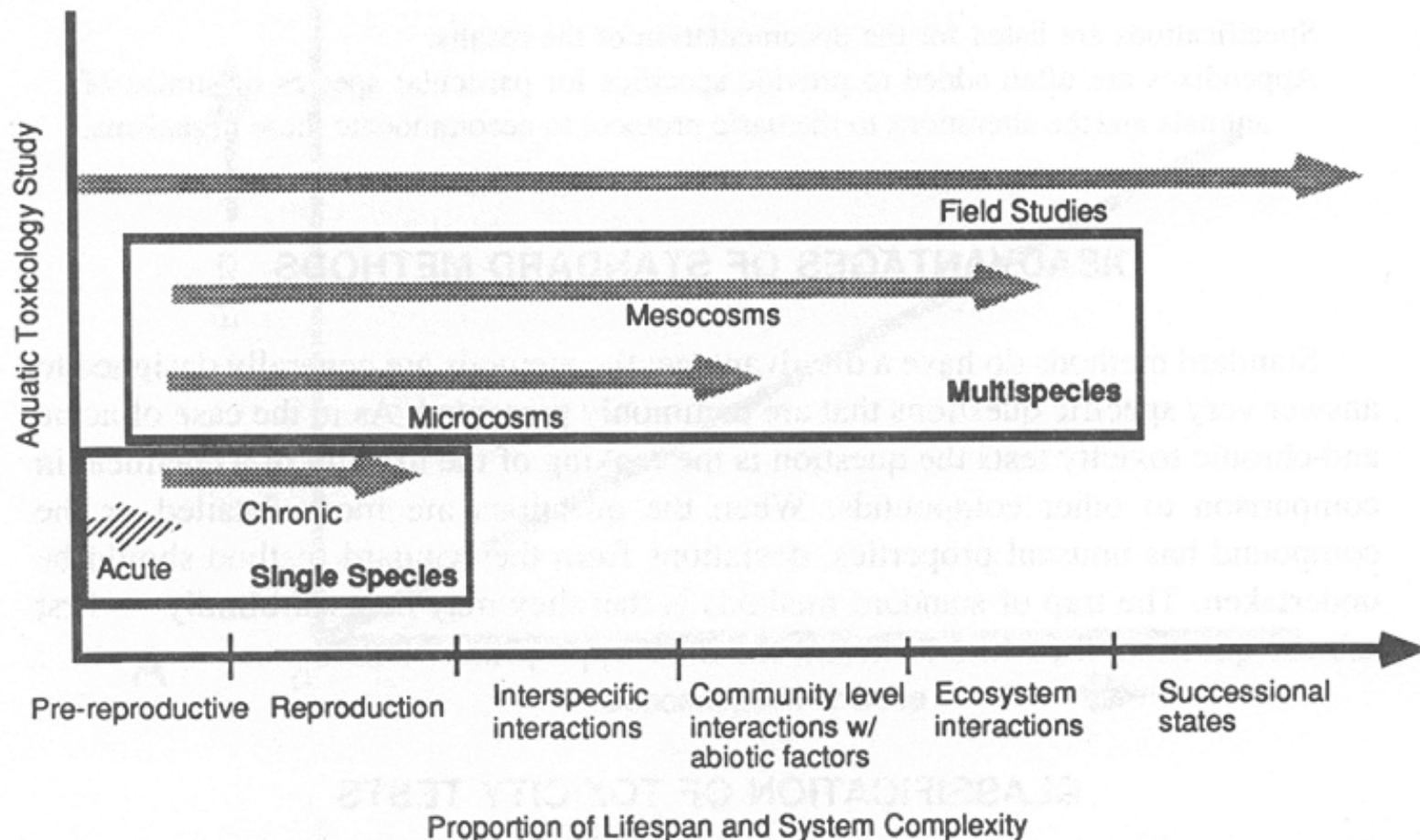
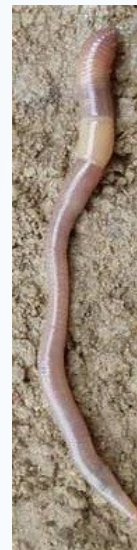
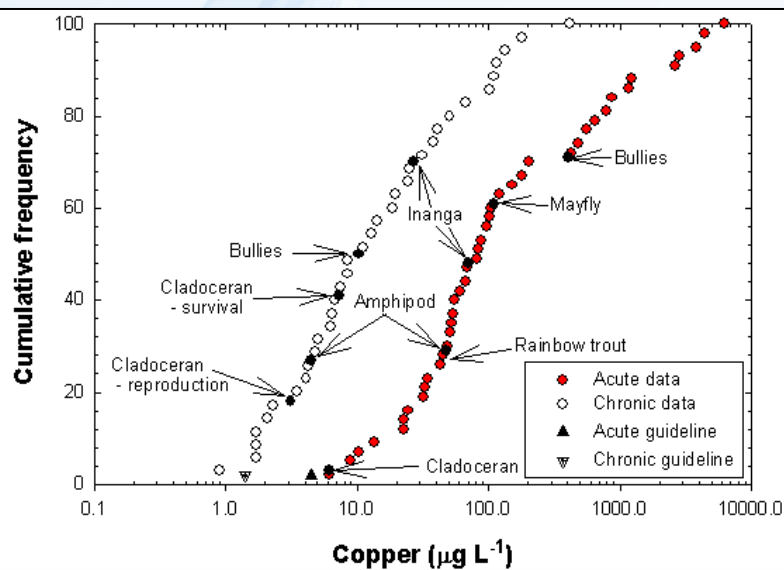


Figure 3.9 Classification of toxicity tests in environmental toxicology. Generally, the two parameters that are involved are the length of the test relative to the test organism and the species composition of the test system.



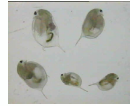
Vývoj biotestů

- Nejstarší biotesty – akutní efekty, ekologicky nerelevantní, většinou pro hodnocení čistých látek, např. pesticidů
- Moderní vývoj směrem k:
 - Subletálním efektům
 - Zvyšování ekologické relevance testů
 - Od chemických látek k environmentálním směsím
 - Zdokonalování testů: časové, miniaturizace
 - Zjednodušování koncovek testů – mikrodestičky, fluorescence ...
 - Komerčně dostupné tzv. „kity“ (např. www.microbiotests.be)



Rozdělení biotestů

- Dle trofické úrovně testovacích organismů:
 - testy s producenty, konzumenty, destruenty
- Podle doby trvání expozice a povahy efektů:
 - akutní, semiakutní (semichronické), sub-akutní, chronické
 - konkrétní délka závisí na generační době organismu (bakterie <<< pstruh), klasifikace není zcela jednotná. Dělení zpravidla na:
 - akutní = 24, 48 až 96 hod, zpravidla hodnocení letality
 - chronické – dny, týdny až měsíce, hodnocení neletálních efektů
- Dle počtu zapojených druhů:
 - jednodruhové (single species), dvoudruhové, vícedruhové (multi-species)
- Dle úrovně biologického systému:
 - enzymy, biosondy, buněčné a tkáňové kultury *in vitro*, intaktní živý organismus, populace, mikro/mezokosmos, terénní experimenty
- Dle generace:
 - testy 1. generace, 2. generace (mikrobiotesty), 3. generace (biosenzory, biosondy ..), 4. generace – online systémy ...



Rozdělení biotestů

- Dle typu vzorku:
 - chemická látka, směs látek, přírodní vzorek z prostředí
- Dle testované matrice:
 - voda, půda, vzduch, sediment, odpad, chemická látka
- Dle úpravy vzorku:
 - výluhové (org. rozpouštědlo, DMSO, voda ...), kontaktní (Solid Phase Tests), přímé (Direct tests, Whole effluent test), TIE – toxicity identification evaluation
- Dle hodnoceného účinku:
 - testy mortality, reprodukční testy, únikové testy, růstové testy, testy teratogenity, karcinogenity, xenoestrogenity apod.
- Dle provádění:
 - *in situ* a *in vitro*
- + biotesty procesů: bioakumulace, biokoncentrace,

Standardizovanost, legislativa ...

- Zákonem předepsané testy
 - Velmi málo, zejména pro nové chemické látky, pesticidy, odpady
 - Velký boom využití biotestů v posledních letech – ekologická kritéria kvality prostředí
- Normované, standardizované
 - Mnoho testů
 - Normovanost \neq povinnost, závaznost
 - Ekonomické důvody – akreditace laboratoří
- Experimentální rovina
 - Řada testů
 - Prostor pro snahy o ekologickou realističnost
 - Uplatnění nových poznatků o mechanismech a efektech
 - Ekologické studie

Normované, standardizované testy

- **Cíl:** snížit mezilaboratorní variabilitu
- časem byly vypracovány standardní postupy pro hodnocení efektů v laboratorních testech až pro metody bioindikací in situ

Výhody:

- zaručení jednotnosti a opakovatelnosti výsledků
- při dodržení postupu srovnatelnost výsledků z různých laboratoří
- validované výsledky vhodné pro rozhodování
- malá nutnost optimalizace

Nevýhody:

- velmi specifická a omezená vypovídací hodnota ("akutní letalita pro korýše *Daphnia*")
- zpravidla vhodné jen pro zařazení (klasifikace) toxicity látek (více – středně – méně toxické ...)
- omezený počet standardizovaných postupů, zpravidla jednoduché (akutní) efekty

Organizace spojené s biotesty

- OECD = Organization for Economic Cooperation Development
- ISO = International Standardization Organization
- US EPA = US Environmental Protection Agency
- SETAC = Society for Environmental Toxicology and Chemistry
- IOBC = International Organisation for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants
- EPPO = European and Mediterranean Plant Protection Organization
- ASTM = American Society of Testing and Materials
- CEN = European Committee for Standardization
- WHO = World Health Organisation
- BBA = Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
- OPPTS = The Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (EPA)
- DIN = German Deutsches Institut für Normung
- ČSN = Česká státní norma

STANDARDY : Globálně nejvýznamnější jsou OECD Guidelines

<http://www.oecd.org>



> A to Z

Search oecd.org



OECD Home

About

Countries ▾

Topics ▾

> Français

[OECD Home](#) > [Chemical safety and biosafety](#) > [Testing of chemicals](#) > OECD Guidelines for the Testing of Chemicals

> Testing of chemicals

> Assessment of chemicals

> Risk management of chemicals

> Chemical accident prevention, preparedness and response

> Pollutant release and transfer register

> Safety of manufactured nanomaterials

> Agricultural pesticides and biocides

> Biosafety - BioTrack

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals

What's new?

The OECD releases 17 new, updated, corrected or deleted Test Guidelines accepted internationally as standard methods for safety testing. These Test Guidelines are regularly updated to reflect scientific and technical progress. They determine physical and chemical properties, effects on human health and wildlife, environmental fate and behaviour, and pesticide residue chemistry.

The release contains:

- > Test Guidelines to address the Safety of Nanomaterials ([TG 412](#), [TG 413](#) and [TG 318](#) - [Read more](#))
- > Test Guidelines to better characterise the effects of chemicals on bees or other pollinators ([TG 245](#), [TG 246](#), [TG 247](#))
- > Test Guidelines that use less animals to determine acute inhalation and acute dermal toxicity ([TG 433](#) and [TG 402](#))
- > A Test Guideline on *in vitro* methods for skin sensitisation, updated with an additional assay ([TG 442E](#))
- > A Test Guideline to measure the toxicity of chemicals to organisms essential to the proper functioning of sewage-treatment plants ([TG 244](#))
- > Corrected Test Guidelines for Eye Hazard Potential to include a new reference to a Guidance Document on integrated Approaches to Testing and Assessment ([TG 405](#), [TG 437](#), [TG 438](#), [TG 460](#), [TG 491](#) and [TG 492](#))
- > The cancellation of [TG 415](#) on the One-Generation Reproductive Toxicity Study (dating from 1983) because it is no longer used and better alternatives are available to address current regulatory needs.

OECD Guidelines – sekce „2“ Effects on biotic systems (= Ekotoxikologické testy) (2013 - celkem 37 standardizovaných návodu v této sekci; další sekce např. humánní toxicita)


Detaily k vybraným (nejčastěji užívaným) testům → viz dále

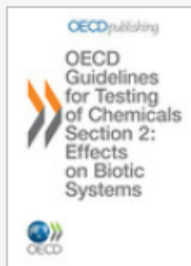
You are here: [Home](#) / [Books](#) / OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2

Effects on Biotic Systems

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals

 [Subscribe to the feed](#)



[Hide](#) / [Show Abstract](#)











The OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals* is a collection of about 100 of the most relevant internationally agreed testing methods used by government, industry and independent laboratories to identify and characterise potential hazards of new and existing chemical substances, chemical preparations and chemical mixtures. They are a set of tools for professionals, used primarily in regulatory safety testing and subsequent chemical and chemical product notification and chemical registration. They can also be used for the selection and ranking of candidate chemicals during the development of new chemicals and products and in toxicology research. This group of tests covers effects on biotic systems.

ISSN : 2074-5761 (online)

DOI : 10.1787/20745761

Also available in: [French](#)

[Hide](#) / [Show](#) all Abstracts

Mark	Date	Title	
<input type="checkbox"/>	26 July 2013	Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test OECD	 PDF  READ
<input type="checkbox"/>	26 July 2013	Test No. 237: Honey Bee (Apis Mellifera) Larval Toxicity Test, Single Exposure OECD	 PDF  READ
<input type="checkbox"/>	26 July 2013	Test No. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test OECD	 PDF  READ
<input type="checkbox"/>	02 Oct 2012	Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test OECD	 PDF  READ
<input type="checkbox"/>	02 Oct 2012	Test No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay	 PDF  READ

Testy s vodními organismy

Test No. 201: Alga, Growth Inhibition Test	11 July 2006
Test No. 221: Lemna sp. Growth Inhibition Test	11 July 2006
Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test	23 Nov 2004
Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test	16 Oct 2008
Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test	17 July 1992
Test No. 204: Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study	04 Apr 1984
Test No. 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test	17 July 1992
Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages	21 Sep 1998
Test No. 215: Fish, Juvenile Growth Test	21 Jan 2000
Test No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay	08 Sep 2009
Test No. 230: 21-day Fish Assay	08 Sep 2009
Test No. 231: Amphibian Metamorphosis Assay	08 Sep 2009
Test No. 209: Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation)	23 July 2010
Test No. 224: Determination of the Inhibition of the Activity of Anaerobic Bacteria	25 Jan 2007



http://www.oecd.org/document/40/0,3746,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html

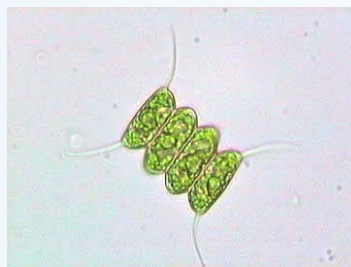
Testy s půdními organismy

Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test	17 Aug 2006
Test No. 227: Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test	17 Aug 2006
Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests	04 Apr 1984
Test No. 220: Enchytraeid Reproduction Test	23 Nov 2004
Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (<i>Eisenia fetida</i> / <i>Eisenia andrei</i>)	23 Nov 2004
Test No. 228: Determination of Developmental Toxicity of a Test Chemical to Dipteran Dung Flies(<i>Scathophaga stercoraria</i> L. (<i>Scathophagidae</i>), <i>Musca autumnalis</i> De Geer (<i>Muscidae</i>))	16 Oct 2008
Test No. 232: Collembolan Reproduction Test in Soil	08 Sep 2009
Test No. 226: Predatory mite (<i>Hypoaspis</i> (<i>Geolaelaps</i>) <i>aculeifer</i>) reproduction test in soil	16 Oct 2008
Test No. 216: Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test	21 Jan 2000
Test No. 217: Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test	21 Jan 2000



Vodní rostliny

ISO 20079:2005	Water quality -- Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (<i>Lemna minor</i>) -- Duckweed growth inhibition test
ISO 8692:2004	Water quality -- Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae
ISO/CD 16191	Water quality - Determination of the toxic effect of sediment and soil on the growth behaviour of <i>Myriophyllum aquaticum</i> - Myriophyllum test
ISO 10253:2006	Water quality -- Marine algal growth inhibition test with <i>Skeletonema costatum</i> and <i>Phaeodactylum tricornutum</i>
ISO 10710:2010	Water quality -- Growth inhibition test with the marine and brackish water macroalga <i>Ceramium tenuicorne</i>
ISO 14442:2006	Water quality -- Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water
ISO/DIS 13308	Water quality -- Toxicity test based on reproduction inhibition of the green macroalga <i>Ulva pertusa</i>
ISO/TR 11044:2008	Water quality -- Scientific and technical aspects of batch algae growth inhibition tests



Standardy biotestů - ISO

Vodní bezobratlí

ISO 6341:1996	Water quality -- Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) -- Acute toxicity test
ISO 10706:2000	Water quality -- Determination of long term toxicity of substances to Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)
ISO/DIS 14380	Water quality -- Determination of the acute toxicity to Thamnocephalus platyurus (Crustacea, Anostraca)
ISO/CD 16303	Water quality -- Determination of toxicity of fresh water sediments using Hyalella azteca
ISO 10872:2010	Water quality -- Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of Caenorhabditis elegans (Nematoda)
ISO 16712:2005	Water quality -- Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediment to amphipods
ISO 20665:2008	Water quality -- Determination of chronic toxicity to Ceriodaphnia dubia
ISO 20666:2008	Water quality -- Determination of the chronic toxicity to Brachionus calyciflorus in 48 h
ISO 14669:1999	Water quality -- Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea)
ISO/DIS 14371	Water quality -- Determination of freshwater-sediment subchronic toxicity to Heterocypris incongruens (Crustacea, Ostracoda)
ISO 16665:2005	Water quality -- Guidelines for quantitative sampling and sample processing of marine soft-bottom macrofauna
ISO 7828:1985	Water quality -- Methods of biological sampling -- Guidance on handnet sampling of aquatic benthic macro-invertebrates
ISO 8265:1988	Water quality -- Design and use of quantitative samplers for benthic macro-invertebrates on stony substrata in shallow freshwaters
ISO 8689-1:2000	Water quality -- Biological classification of rivers -- Part 1: Guidance on the interpretation of biological quality data from surveys of benthic macroinvertebrates
ISO 8689-2:2000	Water quality -- Biological classification of rivers -- Part 2: Guidance on the presentation of biological quality data from surveys of benthic macroinvertebrates
ISO 9391:1993	Water quality -- Sampling in deep waters for macro-invertebrates -- Guidance on the use of colonization, qualitative and quantitative samplers
ISO/DIS 10870	Water quality -- Guidelines for the selection of sampling methods and devices for benthic macroinvertebrates in fresh waters
ISO/WD 16778	Water quality -- Calanoid copepod development test with Acartia tonsa



Suchozemské rostliny

ISO 11269-1:1993	Soil quality -- Determination of the effects of pollutants on soil flora -- Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth
ISO 11269-2:2005	Soil quality -- Determination of the effects of pollutants on soil flora -- Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants
ISO 17126:2005	Soil quality -- Determination of the effects of pollutants on soil flora -- Screening test for emergence of lettuce seedlings (<i>Lactuca sativa</i> L.)
ISO 22030:2005	Soil quality -- Biological methods -- Chronic toxicity in higher plants
ISO/CD 29200	Soil quality -- Assessment of genotoxic effects on higher plants -- Micronucleus test on <i>Vicia faba</i>



Voda

ČSN EN ISO 10253	Jakost vod - Zkouška inhibice růstu mořských řas <i>Skeletonema costatum</i> a <i>Phaeodactylum tricoratum</i>
ČSN EN ISO 11348-2	Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi <i>Vibrio fischeri</i> (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 2: Metoda se sušenými bakteriemi
ČSN EN ISO 11348-3	Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi <i>Vibrio fischeri</i> (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 3: Metoda s lyofilizovanými bakteriemi
ČSN EN ISO 11348-3	Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi <i>Vibrio fischeri</i> (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 3: Metoda s lyofilizovanými bakteriemi
ČSN EN ISO 15088	Jakost vod - Stanovení akutní toxicity odpadních vod pro jikry dania pruhovaného (<i>Danio rerio</i>)
ČSN EN ISO 20079	Jakost vod - Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (<i>Lemna minor</i>) - Zkouška inhibice růstu okřešku
ČSN EN ISO 8692	Jakost vod - Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas
ČSN ISO 20665	Jakost vod - Stanovení chronické toxicity pro <i>Ceriodaphnia dubia</i>
ČSN ISO 20666	Jakost vod - Stanovení chronické toxicity pro <i>Brachionus calyciflorus</i> během 48 h
ČSN ISO 10706	Jakost vod - Stanovení chronické toxicity látek pro <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea)
ČSN ISO 12890	Jakost vod - Stanovení toxicity pro embryonální a larvální stadia sladkovodních ryb - Semistatická metoda
ČSN EN ISO 9509	Jakost vod - Zkouška toxicity pro hodnocení inhibice nitrifikace mikroorganismy aktivovaného kalu
ČSN EN ISO 8192	Jakost vod - Zkouška inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem při oxidaci uhlíkatých látek a amoniakálního dusíku
ČSN EN ISO 16712	Jakost vod - Stanovení akutní toxicity mořských sedimentů nebo sedimentů estuárií pro obojživelníky



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Obecné vlastnosti biotestů

Optimální vlastnosti biotestu

- standardizovatelnost, opakovatelnost, variabilita
- praktická proveditelnost, cena, rychlost
- citlivost
- vypovídací hodnota, použitelnost pro ochranu ŽP
- ekologická relevance:
 - expoziční cesta
 - přirozený výskyt použitého druhu, zastává funkci v ekosystému
 - sledované odpovědi indikovat stav a funkci organismu
 - životní stádium použitého organismu, celý cyklus
 - životní strategie organismu
 - životní forma
 - ekologické nároky daného organismu vs podmínky testu

Design a vlastnosti biotestu

- Biotest má určité parametry, charakteristiky, standardní podmínky
- Na druhou stranu má určité nejistoty, zdroje variability
- Základní parametry biotestů:
 - Komplexnost biologického systému
 - Doba expozice
 - Uspořádání expozice
 - Expoziční scénář
 - Biologický systém – organismus, druh
 - Další specifika biologického systému
 - Hodnocený parametr, endpoint
 - Další abiotické faktory v experimentu



Rozdělení dle uspořádání expozice

- statické (bez výměny roztoků - možné změny koncentrací, kyslíku)
- statické s obměnou média (výměna v definovaných časech, á 24 h)
- recirkulační (recirkulace média, technicky náročnější ...)
- průtočné (kontinuální udržování koncentrací, technicky náročné ...)

Obvykle expozice celých organismů (příjem povrchem těla, dýchacím aparátem, potravou) méně často: jednorázové injekce (ryby, vstup a dávka nejsou ovlivněny prostředím)

Půdní testy - expozice

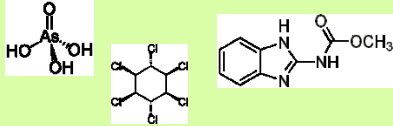
- půda, sedimenty – bakterie, bezobratlí – kontakt celým povrchem (testy přímého kontaktu - **solid phase tests**)
 - Reálná půda/sediment
 - Artificiální půda/sediment
- rostliny – kořeny - kontakt s pevným nebo kapalným médiem, expozice plynným polutantům ze vzduchu
- terestriční živočichové - specifické expoziční scénáře:
 - injekce ("klasická" toxikologie – obratlovci – laboratorní hlodavci, ptáci), i.p. / i.m. / i.v. / s.c.
 - potrava – dávkování v potravě, aplikace gaváží (trubice přímo do žaludku)
 - respirace – kontaminace vzduchu – uzavřené nádoby/cely, inhalace
- často lze reálně předpokládat několik expozičních cest současně

Expozice v pevné matici

- Velké odlišnosti od akvatických testů
- Pevné matrice jsou dosti **heterogenní**
- Obsahuje vždy všechny tři fáze **PEVNOU**, KAPALNOU (pórová voda) a PLYN (vzduch)
- Přítomnost pevné fáze zejména má významný vliv na **OSUD a CHOVÁNÍ** chemické látky
- V závislosti na vlastnostech látky, vlastnostech půdy a čase dojde k **DISTRIBUCI** látky v půdě, případně vzniku **SPECIÍ**
- Stěžejním procesem je **SORPCE** a důsledkem je klíčový faktor půdních testů (eko)toxicity – **BIODOSTUPNOST**
- To vše má fatální důsledky pro **výslednou toxicitu a riziko**
- Důsledkem je i **ztížená extrapolace** mezi půdami, z akvatických testů na půdní a z laboratorních testů na reálnou situaci

Schéma expozice v půdním prostředí

vstup
kontaminantu



OSUD v půdě
funkce vlastností půdy,
vlastností látky a času

kontaminant v půdě
prostorově distribuován,
v různých formách,
různě vázán ...

EXPOZICE organismu
funkce osudu v půdě,
vlastností látky, vlastností
organismu a času

kontaminant v organismu
distribuce, metabolismus,
eliminace, bioakumulace ...

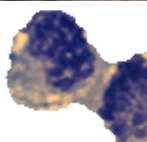
látky, vlastností
organismu a času



molekuly



organely



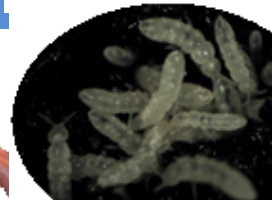
buňky



orgány



organismus



populace



společenstvo



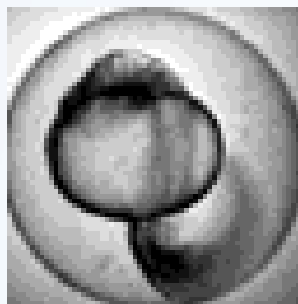
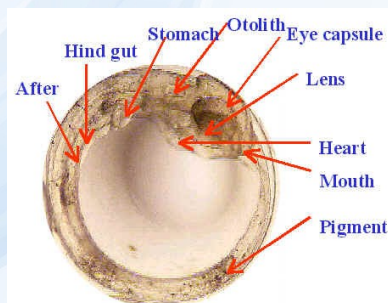
ekosystém

Požadavky

- snadná dostupnost (laboratorní kultury, komerční dostupnost ...)
- snadné uchování a chov v laboratorních podmínkách do dostatečných množství pro experimenty
- biologie druhu a genetika příslušné kultury jsou charakterizovány
- jsou prostudovány relativní citlivosti druhu / kultury k různým třídám toxických látek
- citlivost druhu by měla být dobrým reprezentantem příslušné skupiny organismů (Daphnia – korýši, Paví očko – sladkovodní ryby, kaprovití)

Další specifikace testovacího organismu

- výsledek stanovení toxicity a interpretaci ovlivňuje řada dalších biologických parametrů
 - geneticky podmíněná citlivost příslušné kultury / klonu / variety ...
 - velikost a stáří jedinců
 - pohlaví
 - vývojové stadium (vajíčka, embrya, larvy, dospělci ...)
 - fyziologické podmínky – optimum (choroby, potrava – antioxidanty ...)



Hodnocené parametry - endpointy

■ biotesty akutní toxicity

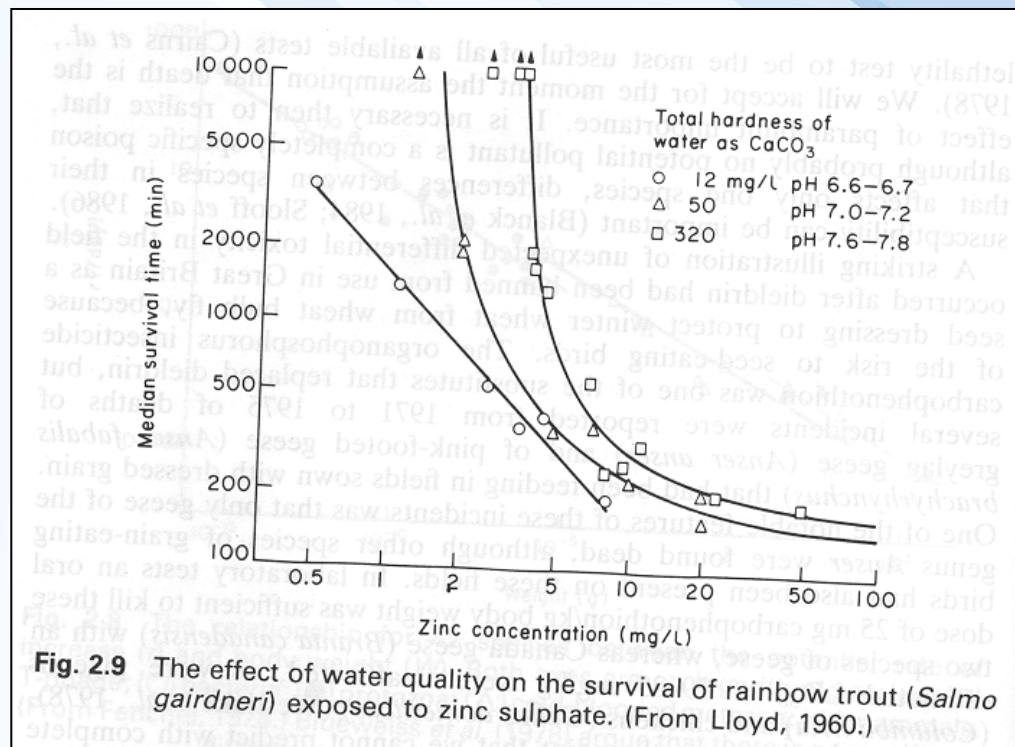
- živočichové - nejčastěji hodnoceným parametrem je letalita, dále imobilizace (Daphnia)
- autotrofové – řasy: růst, dělení, množství chlorofylu (fluorescence); rostliny cévnaté – klíčení, růst
- destruenti – bakterie: růst, metabolická aktivita ...

■ biotesty chronické toxicity

- živočichové – neletální parametry – růst, malformace, reprodukční schopnosti a úspěšnost (testy reprodukce)
- autotrofové –cévnaté rostliny – klíčení, růst, tvorba gamet/semene, rozmnožování ...

Faktory/podmínky biotestu

- Mají významný vliv na výsledky – vliv na modelový organismus, vliv na expozici (ovlivnění biodostupnosti a formy kontaminantů)
- Jejich nadefinování je součástí standardizace testu
 - teplota
 - světlo, světelná perioda
 - obsah a přístup kyslíku
 - pH
 - tvrdost vody (!)
(akvatické experimenty)



Praktická realizace biotestu - obecně

1) Příprava organismu

- kultivační médium, standardní počty, stáří ...

2) Příprava vzorku

- ředění vzorku (mimo nádoby s organismy) – koncentrační řada ředící medium:
 - voda/medium – lze přímo přidávat k organismům
 - organické rozpouštědlo – přísady jen malých koncentrací (0.5%)
 - příprava kontaminované půdy
- negativní kontrola – ředící medium

3) Expozice

- přísady vzorku (kontrolního roztoku) k organismu, expozice (24, 96 h)
- přísady organismu do připravené matrice

4) Vyhodnocení

- stanovení letality / růstu, srovnání vzorek – kontrola, odvození křivky dávka odpověď, statistické srovnání

Praktická realizace biotestu - voda

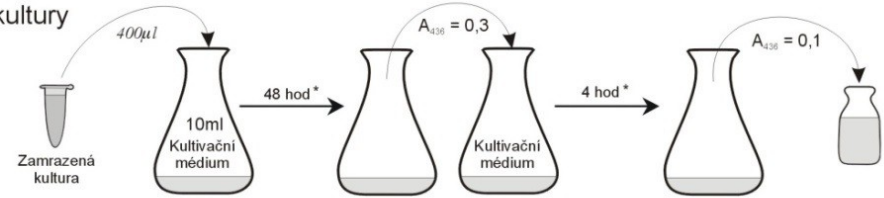
1) Příprava organismu

2) Příprava vzorku

3) Expozice

4) Vyhodnocení

A. Příprava kultury



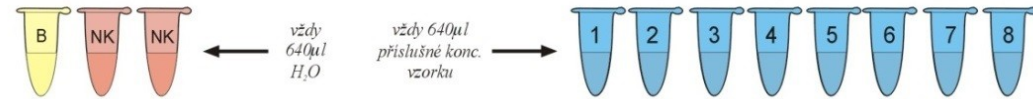
B. Příprava ředících řad

Krok 2

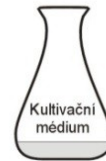


vždy 80µl

Krok 1

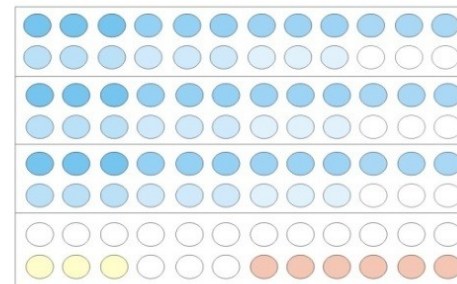


Krok 3



vždy 80µl

C. Testování



Dávkování 200µl do každé jamky (3 opakování)

Inkubace 16 hod*

Měření absorpance při 436 nm

Testy obecně

- **Předběžný test** - hledáme rozmezí používaných koncentrací (ředící faktor 10; např. 0,1 - 1000 mg/kg); mortalita většinou hlavní endpoint hodnocený po 2 týdnech
- **Finální test** - výstupem je funkce závislosti účinků na koncentraci testované substance (jemnější škála; nejlépe s faktorem 2); hodnoceny přežití dospělců po 3 týdnech (mortalita - akutní test) a počty juvenilů po 6 týdnech (reprodukce - reprodukční test)
- **NOEC design** – méně koncentrací, ale více opakování - 5 koncentrací po 4 opakováních a kontrolní varianta (bez chemické látky, na rozpouštědlo apod.)
- **EC/LC design** – více koncentrací, méně opakování – regresní metody



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Výběr baterie testů

Baterie testů

- Odpověď všech organismů na toxikant není stejná
- Vlivy ovlivňující finální efekt se liší – biodostupnost, expoziční cesty, metabolizace toxikantu, citlivost
- V praxi nelze používat pouze jediný biotest
- Většinou je potřeba sestavit podle určité logiky baterii testů
- Čím více testů v baterii, tím menší nejistota při vyhodnocení dopadů na ekosystém (v hodnocení rizik pak nižší faktor nejistoty)
- Základní pravidlo = pokrýt trofické úrovně
- Další důvody (různé expozice, délky testů, typy efektů ...)
- V praxi většinou kompromis mezi „vědeckou“ správností a praktickými potřebami (cena, čas ...)

Baterie biotestů

- Organismus v daném biotestu je reprezentant větší skupiny organismů
- Výběr konkrétního testu a celé baterie závisí na CÍLECH stanovení (ty musí být jasné před zahájením studie):
 - Např. "ochrana hospodářsky významných druhů ryb", "ochrana kvality půdy – aktivity půdních mikroorganismů", "ochrana vody před toxickým odpadem" ...



Výběr biotestů dle organismu

- dle ekologické funkce organismu (producenti, saprofágové, destruenti, konzumenti, predátoři ...)
- dle typu organismu (červi vs. členovci, mikroorganismy vs. bezobratlí ...)
- dle trofické příslušnosti organismu (herbi -, omni -, bakteri -, fungi -, carni-voři)
- dle expoziční povahy organismu (epi -, endo-geické)
- dle životní historie organismu (délka života)
- dle ekologické strategie organismu (r a K strategie)

Příklad – baterie testů pro odpady

Existují ISO normy určující výběr testů

- ISO 15799 (2003): Guidance on the ecotoxicological characterization of soils and soil materials
- ISO 17616 (2008): Guidance on the choice and evaluation of bioassays for ecotoxicological characterization of soils and soil materials



Příklad baterie biotestů: EU ringtest 2006-2007

Cíle:

- zhodnotit standard EN 14735
- vyhodnotit aplikovatelnost baterie testů



13 zemí
59 laboratoří
5 základních testů
9 přídavných testů
půl tuny odpadů (3 vzorky)

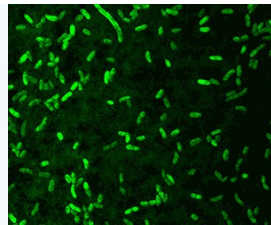


Výstupy:

- Kniha, report a zejména příprava nového EN standardu: WI 292050: Characterisation of waste – Guidance on the use of ecotoxicity tests applied to waste

EU - Základní sada testů

Testy pevného odpadu					
Organismus	Typ testu	Endpointy	Doba trvání	Výsledek	Norma
žížala <i>Eisenia fetida</i>	akutní	mortalita	14 dní	LC50	ISO 11268-1 [15]
rostlina <i>Avena sativa, Brassica rapa</i>	akutní	vyklíčení inhibice růstu	cca 14 dní	EC50	ISO 11269-2 [16]
Testy vodného výluhu odpadu					
Organismus	Typ testu	Endpointy	Doba trvání	Výsledek	Norma
bakterie <i>Vibrio fischeri</i>	akutní	inhibice luminiscence	30 min	EC50	ISO 11348 [17]
koryš <i>Daphnia magna</i>	akutní/chronický	inhibice mobility	48 hod	EC50	ISO 6341 [18]
řasa <i>Desmodesmus subcapitatus</i> <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	chronický	růst	EC20	3 dny	ISO 8692 [19]



EU - Rozšířená sada testů

Testy pevného odpadu

Organismus	Typ testu	Endpointy	Doba trvání	Výsledek	Norma
žížala <i>Eisenia fetida</i>	chronický	reprodukce biomasa	56 dní	EC50	ISO 11268-2 [20]
žížala <i>Eisenia fetida</i>	chronický	únikové chování	2 dny		ISO/DIS 17512-1 [21]
roupice <i>Enchytraeus albidus</i> <i>Enchytraeus crypticus</i>	akutní / chronický	mortalita reprodukce	4 týdny 6 týdnů	LC/EC50	ISO 16387 [22]
chvostoskok <i>Folsomia candida</i>	chronický	mortalita reprodukce	28 dní	LC/EC50	ISO 11267 [23]

Testy vodného výluhu odpadu

Organismus	Typ testu	Endpointy	Doba trvání	Výsledek	Norma
okřehek <i>Lemna minor</i>	chronický	růst	7 dní	EC50	ISO 20079 [24]
umu <i>Salmonella typhimurium</i>		genotoxicita - aktivace genů	4 hod		ISO 13829 [25]
bakterie <i>Pseudomans putida</i>	chronický	růst	16 hod		ISO 10712 [26]



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Akvatické testy ekotoxicity

Spektrum testů akvatické ekotoxikologie

- Je obrovské – akvatická ekotoxikologie byla dlouhou dobu „jedinou ekotoxikologií“
- Testy (i standardizované) dnes pokrývají celou škálu úrovní:
 - 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 ...
 - populační efekty
 - laboratorní testy - dlouhodobější experimenty – celoživotní testy toxicity, testy s časnými vývojovými stadiemi, rostliny – rozmnožování, klíčení ..., bezobratlí – obratlovci – testy reprodukční toxicity

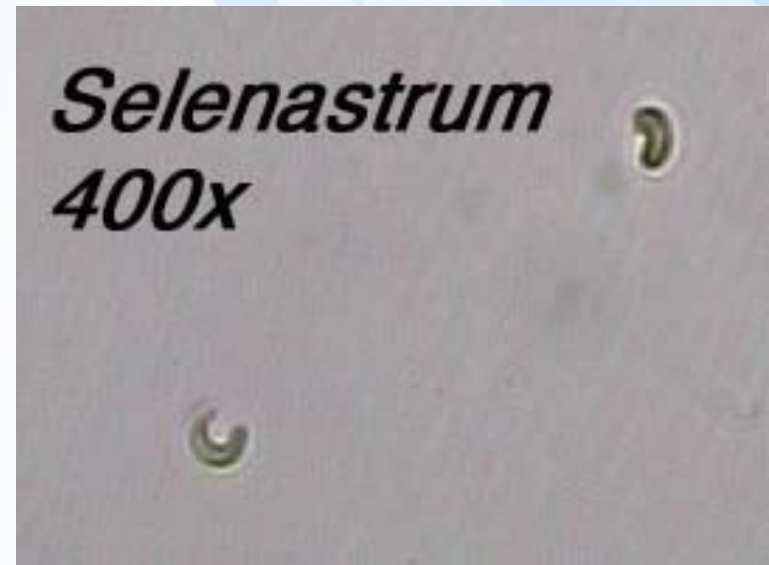
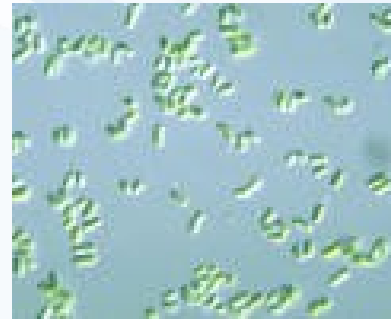
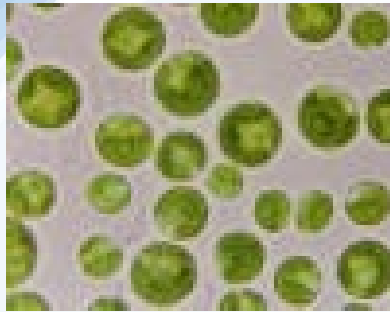
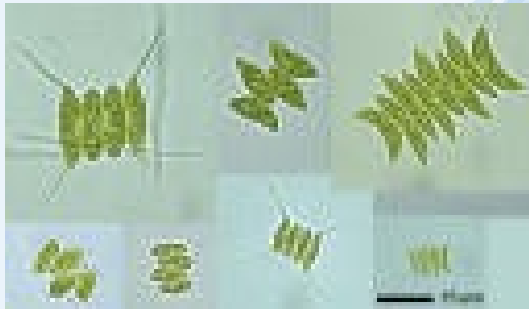
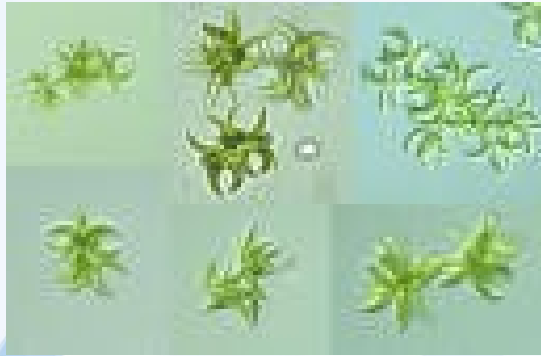
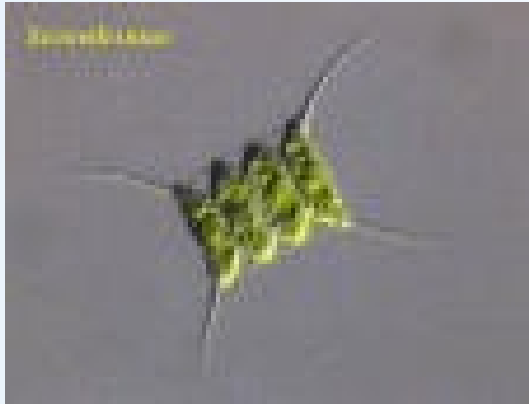
EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY - PŘÍKLADY – PRODUCENTI -



Producenti – řasy a sinice

- **Sinice** (fotosyntetizující gramnegativní eubakterie) koloniální (*Microcystis*), vláknité (*Anabaena*, *Nostoc*) a pikocyanobakteria jednobuněčné (*Synechocystis*)
 - dusík fixující sinice jsou velmi citlivé na toxické látky a inhibice nitrogenázy patří mezi vhodné endpointy
- **Řasy** - jednobuněčné, cenobiální, vláknité, sladkovodní, mořské
- Kromě klasických biotestů s jednou řasou, jsou používány tzv. Multispecies algal assays (paralelní kultivace zástupců zelených řas, sinic a rozsivek dle podmínek zkoumané lokality)
- Fyziologické testy (hodnocení fotosyntetické aktivity, enzymatické aktivity)
- Kompetice a reprodukce přírodních populací fytoplanktonu a fytobentosu
- **Řasy a sinice hodnotíme většinou pomocí změny počtu buněk v čase experimentu ve srovnání s kontrolou, případně pomocí koncentrace pigmentů (např. chlorofylu a), metabolické aktivity (fotosyntetické aktivity, enzymatické aktivity)**

Producenti – řasy a sinice



Řasové testy toxicity

- standardní uspořádání:
 - 96 hod, Erlenmayerovy lahve, třepání
 - sledování růstu, počtů buněk, biomasy – kvantifikace chlorofylu (fluorescence)
- miniaturizace
 - Mikrodestičky (96 jamek)
- Řasy (výběr)
 - *Selenastrum capricornutum*
 - *Scenedesmus subcapitatus*
 - *Sc. quadricauda*
 - *Chlorella vulgaris*
- Sinice
 - *Microcystis aeruginosa*



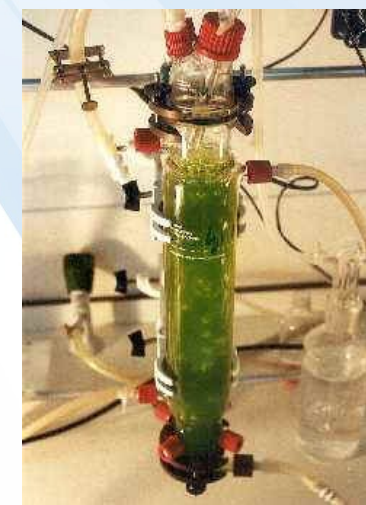
Producenti - řasy

Table 4.4 Summary of Test Conditions for Conducting Static 96-h Toxicity Tests with Microalgae

Test type	Static
Organisms	Freshwater species: <i>Selenastrum capricornutum</i> , <i>Scenedesmus subspicatus</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Anabaena flos-aquae</i> , <i>Navicula pelliculosa</i> ; Saltwater species: <i>Skeletonema costatum</i> , <i>Thalassiosira pseudonana</i> , and <i>Dunaliella tertiolecta</i>
Number of organisms per chamber ($\pm 10\%$)	<i>Selenastrum capricornutum</i> and other freshwater green algae 2×10^4 cells/ml <i>Navicula pelliculosa</i> 2×10^4 cells/ml <i>Microcystis aeruginosa</i> 5×10^4 cells/ml <i>Anabaena flos-aquae</i> 2×10^4 cells/ml Saltwater species 2×10^4 cells/ml
Experimental design	
Test vessel type and size	Sterile Erlenmeyer flasks of borosilicate glass, any size
Test solution volume	Not to exceed 50% of the flask volume for tests conducted on a shaker, and not more than 20% of the flask volume for tests not conducted on a shaker
Number of replicate chambers per sample	2 or more
Test duration	96 h
Physical and chemical parameters	
Water temperature	$24 \pm 2^\circ\text{C}$ for freshwater green and blue-green algae $20 \pm 2^\circ\text{C}$ for <i>Navicula pelliculosa</i> and other saltwater algae
Light quality	Continuous "cool-white" fluorescent
Light intensity	Should not vary by more than $\pm 15\%$: $60 \mu\text{E m}^{-2}/\text{s}^{-1}$ (4300 lm/m^2) for freshwater diatoms and green algae $30 \mu\text{E m}^{-2}/\text{s}^{-1}$ (2150 lm/m^2) for freshwater blue-green algae $82\text{--}90 \mu\text{E m}^{-2}/\text{s}^{-1}$ (5900 to 6500 lm/m^2) for <i>Thalassiosira</i> $60 \mu\text{E m}^{-2}/\text{s}^{-1}$ (4300 lm/m^2) for <i>Skeletonema</i>
Photoperiod	14 h light/10 h dark for <i>Skeletonema</i>
Test solution pH	7.5 ± 0.1 for freshwater 8.0 ± 0.1 for saltwater
Endpoint	Biomass, cell number, area underneath the growth curve



Producenti - řasy



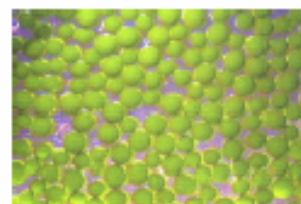
Producenti - řasy

Příklad Miniaturizace Řasové testy toxicity

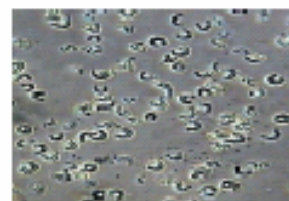
- ALGALTOXKIT (TM)
 - *Selenastrum capricornutum*
 - Alternativní mikrobiotest
 - miniaturizace
 - rychlá dostupnost živých řas (alginátové kuličky)

ALGALTOXKIT F™ MICROBIOTESTS

Cost-effective, culture/maintenance free* bioassays with the micro-algae *Selenastrum capricornutum* (renamed *Raphidocoeilis subcapitata*/*Pseudokirchentella subcapitata*)



Algal beads (2 mm)
> 1 million algal cells per bead



Algal cells

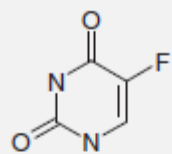
The micro-algae are included in the kits in “algal beads” from which they can be set free “on demand”

Each Algaltoxit contains all the materials to perform two 72h growth inhibition tests

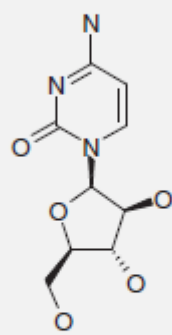


Příklad – ekotoxicitá cytostatik (Zounková et al. 2010 Chemosphere 81:253-260)

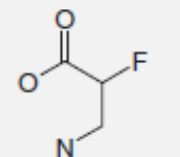
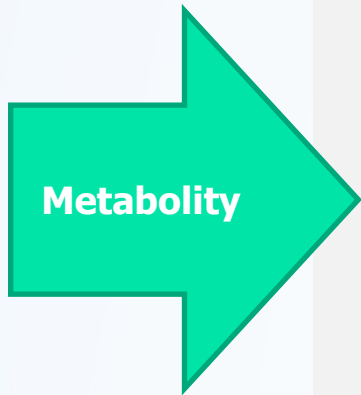
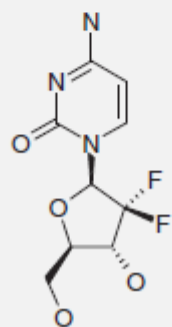
5-Fluorouracil



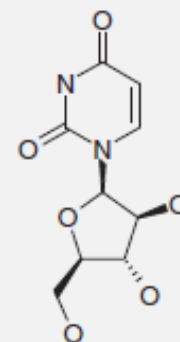
Cytarabin



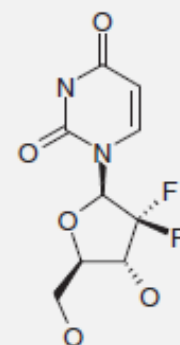
Gemcitabin



Metabolite of 5-fluorouracil



Metabolite of cytarabine



Metabolite of gemcitabine

Inhibice růstu řas – cytostatika (Zounková et al. 2010 Chemosphere 81:253-260)

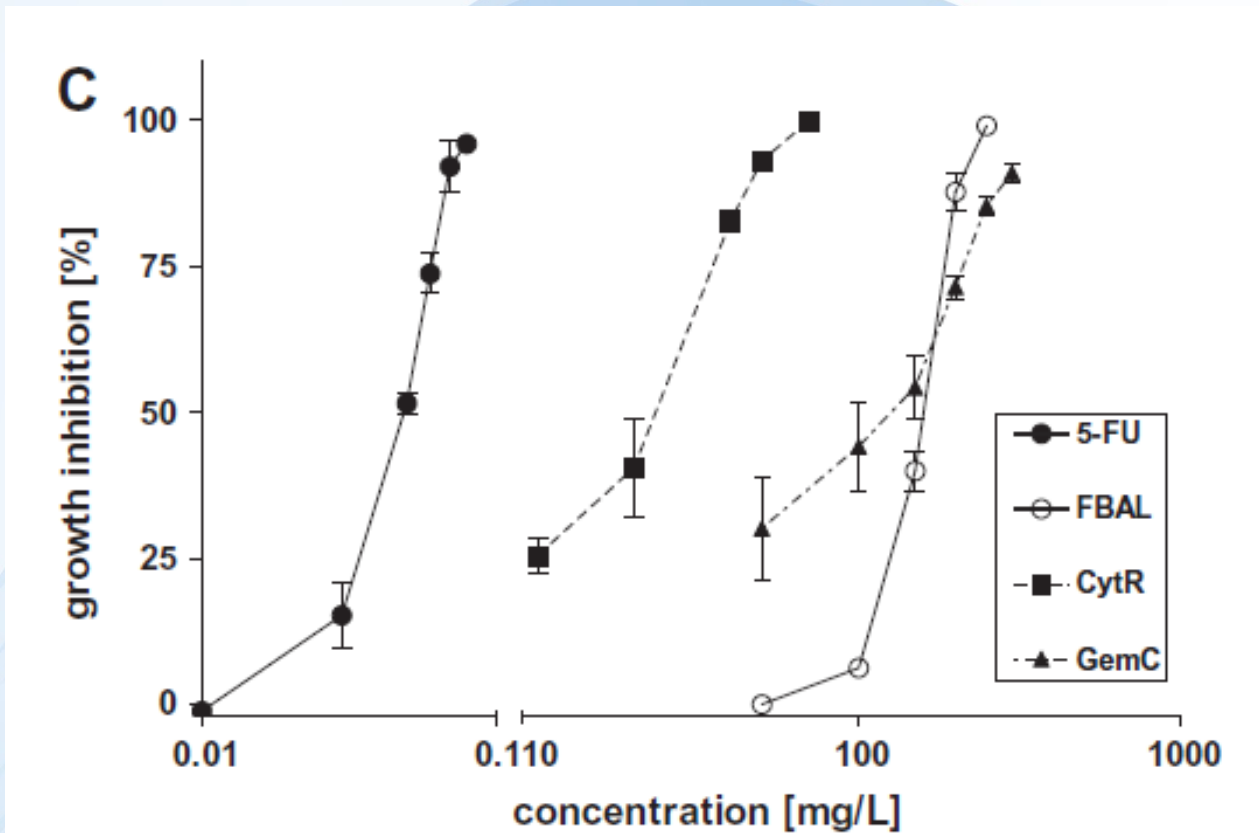


Fig. 1. Ecotoxicity (concentration–response curves) of the studied cytostatic drugs and their metabolites. (A) *Daphnia magna* acute immobilization test. (B) Growth-inhibition test with *Desmodesmus subspicatus*. (C) Growth-inhibition test with *Pseudomonas putida*. 5-FU: 5-fluorouracil, CytR: cytarabine, GemC: gemcitabine, FBAL: α -fluoro- β -alanine, dFdU: 2',2'-difluorodeoxyuridine. Compounds, which did not induce significant toxicity are not presented in respective plots.

Producenti vodní – vyšší rostliny

Test s okřehkem (ISO 20079; OECD 221)

- *Lemna minor (Lemna gibba)*, 2-5 lístků
- standardní uspořádání:
 - 96 hod – 1 týden, 24 °C, 6-10 tis lx, pH 6,5
 - kádinky 150 ml
 - 10 lístků/kádinku
 - vyhodnocení růstu, biomasy, počtu lístků – srovnání s kontrolou
- lze využít analýzy obrazu
- validace:
 - průměrný počet lístků v kontrole vzrostl 8x
 - pH se nezměnilo po dobu testu více než o 1,5
 - IC₅₀ pro K₂Cr₂O₇ je 10-60 mg/L



EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY

- PŘÍKLADY -

- KONZUMENTI – BEZOBRATLÍ -



Konzumenti - Bezobratlí

- jsou velmi běžné, někdy je ekotoxikologie zaměřována s "Daphniovými biotesty,"
- standardní uspořádání
 - kádinky, akutní testy 48 h, prolongované testy (reprodukce) 21 d
 - hodnocení letality (mobilita), počet potomků
 - krátkodobé - zpravidla statické
- Akvatičtí planktonní korýši - nejčastější
 - *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Artemia salina* (mořská)
- Další bezobratlí
 - bentičtí – *Gammarus*, *Hyallela azteca*
 - máloštětinatci – *Tubifex*, *Lumbriculus*
 - plži - písečník
 - hmyz – Pakomáři (*Chironomus*), jepice ...



Konzumenti - Bezobratlí

Daphnia magna



Artemia salina



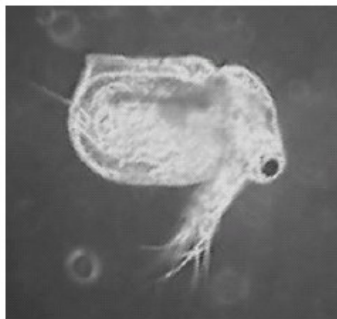
Chironomus riparius



Potamopyrgus antipodarum
Písečník novozélandský



Ceriodaphnia dubia



Lumbricus variegatus



Tubifex tubifex
Nítěnka obecná



Gammarus

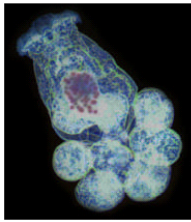


Konzumenti - Bezobratlí

Příklady komerčních testů:

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"

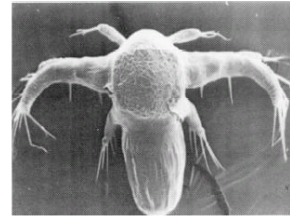
ROTOXKIT F chronic

Contains all the materials to perform three 48h reproduction assays

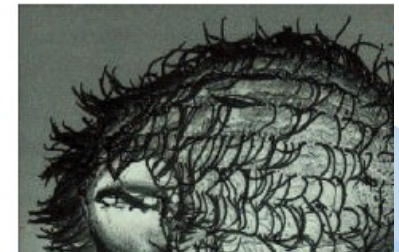


THAMNOTOXKIT F™ MICROBIOTESTS

With the crustacean *Thamnocephalus platyurus*



te
in
la
la



OSTRACODTOXKIT F™ MICROBIOTESTS FOR SEDIMENT TOXICITY TESTING

With the benthic crustacean *Heterocypris incongruens*



**Daphtoxkit -
obsahuje tzv. efipia
což jsou zvláštní
chitinová pouzdra
uzavírající zimní
vajíčka (dormantní
stádia perlepek)**

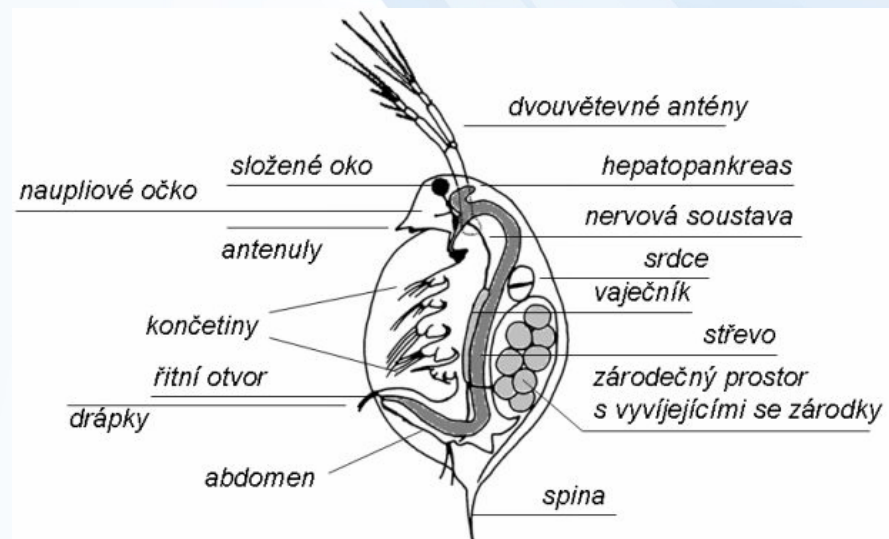
Daphnia magna test (ISO 6341)

■ Podstata testu

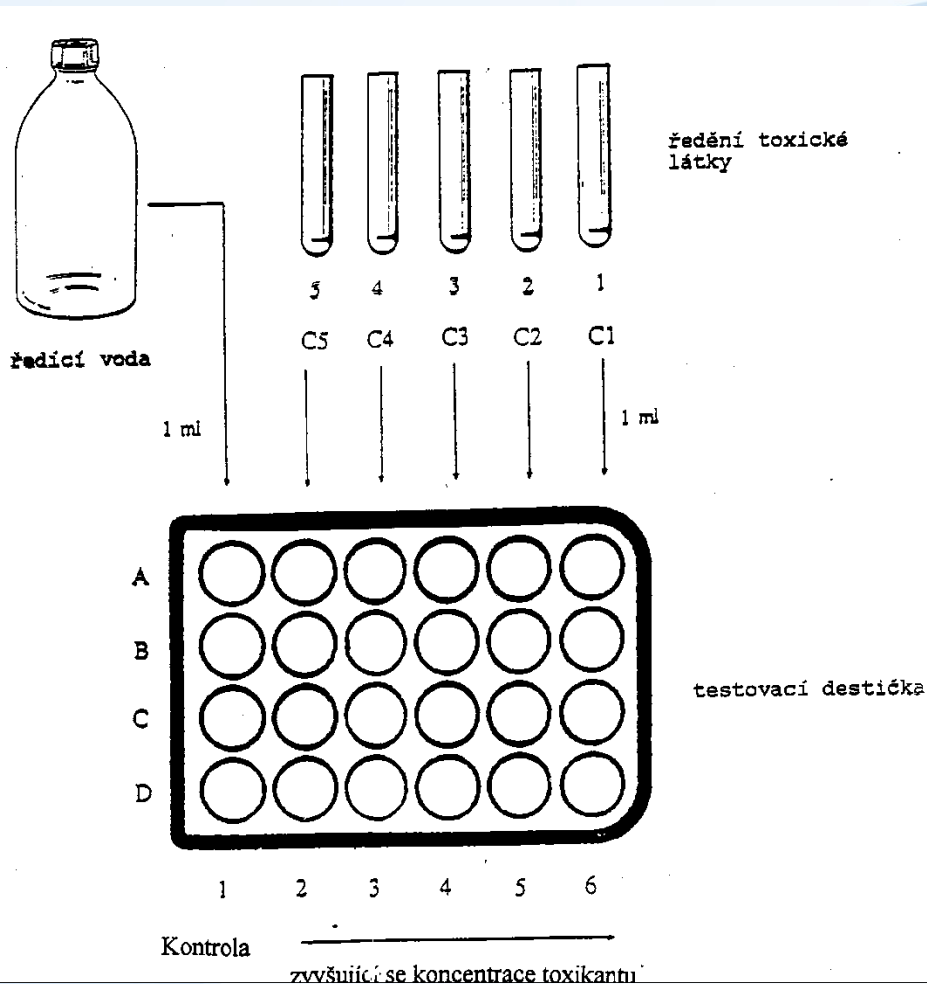
- Zjišťuje se počáteční **koncentrace účinné látky, která za 24/48 hodin imobilizuje 50% testovaných jedinců**
 - 24h -> 24h EC50
 - 48h -> 48h EC50

■ Podmínky zkoušky

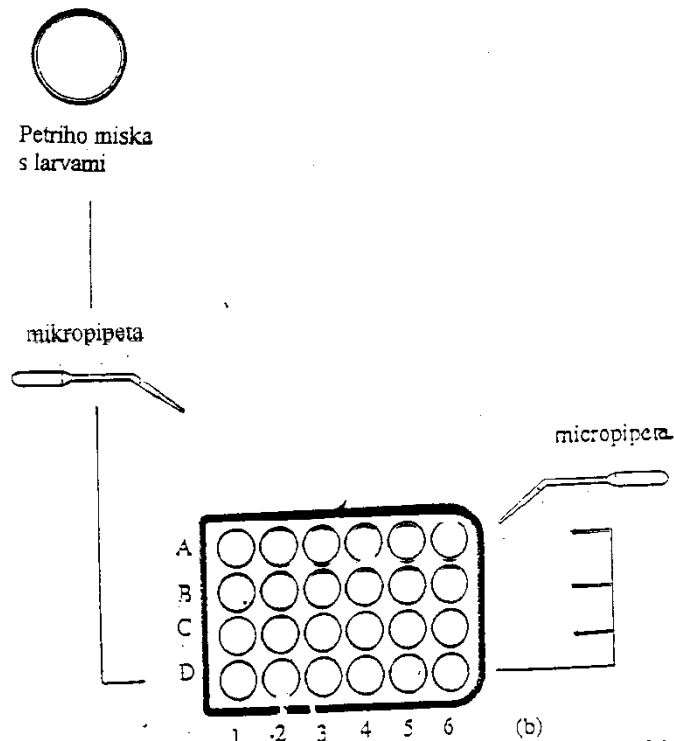
- Tma nebo fotoperioda 16h světlo/8h tma
- Látky podléhající rozkladu na světle testovat ve tmě
- Teplota $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Bez toxických výparů či prachu ovlivňujících průběh testu
- **Bez krmení**



Daphnia magna test (ISO 6341)



Larvy (Instar II - III)
připravené pro test toxicity



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 ± 2 C
- pH 6-9 (± 1,5)
- rozpuštěný O₂ > 3mg/l
- fotoperioda 16 h světla / 8 h tmy
- **krmení směs řas**
- Jednou týdně: O₂, teplota, tvrdost a pH v médiu, kontrolních nádobách a u nejvyšší zkušební koncentrace.



Daphnia magna akutní vs chronický test

Table 4.2 Comparison of the *D. magna* 48-h Acute Toxicity Test with the Common *D. magna* Chronic Toxicity or Partial Life Cycle Test.

Test type	Chronic (partial life cycle)	Acute 48 h
Organisms	<i>D. magna</i>	<i>D. magna</i>
Age of test organisms	24-h old	24-h old
Number of organisms per chamber	10	10 (minimum)
Experimental design		
Test vessel type and size	100 ml beakers	250 ml
Test solution volume	80 ml	200 ml
Number of replicates per sample	2 (minimum)	3 (minimum)
Feeding regime	Various combinations of trout chow, yeast, alfalfa, green algae, and diatoms given in excess	Do not feed
Test duration	21 days	48 hr
Physical and chemical parameters		
Water temperature	20°C	20 ± 2°C
Light quality	Ambient laboratory levels	Ambient laboratory levels
Light intensity	Up to 600 lux	540 to 1080 lux
Photoperiod	16 h light and 8 h dark (with 15- to 30-min transition)	16 h light and 8 h dark
pH range	7.0–8.6	7.0–8.6
DO concentration	40–100%	60–100%
Aeration	Not necessary	none
Endpoint	Survival, growth, and reproduction	Immobilization



Příklady výsledků – *D. magna*

Zouňkova, R., Z. Kliemesova, L. Nepejchalova, K. Hilscherova and L. Blaha (2011). "Complex Evaluation of Ecotoxicity and Genotoxicity of Antimicrobials Oxytetracycline and Flumequine Used in Aquaculture." *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(5): 1184-1189.

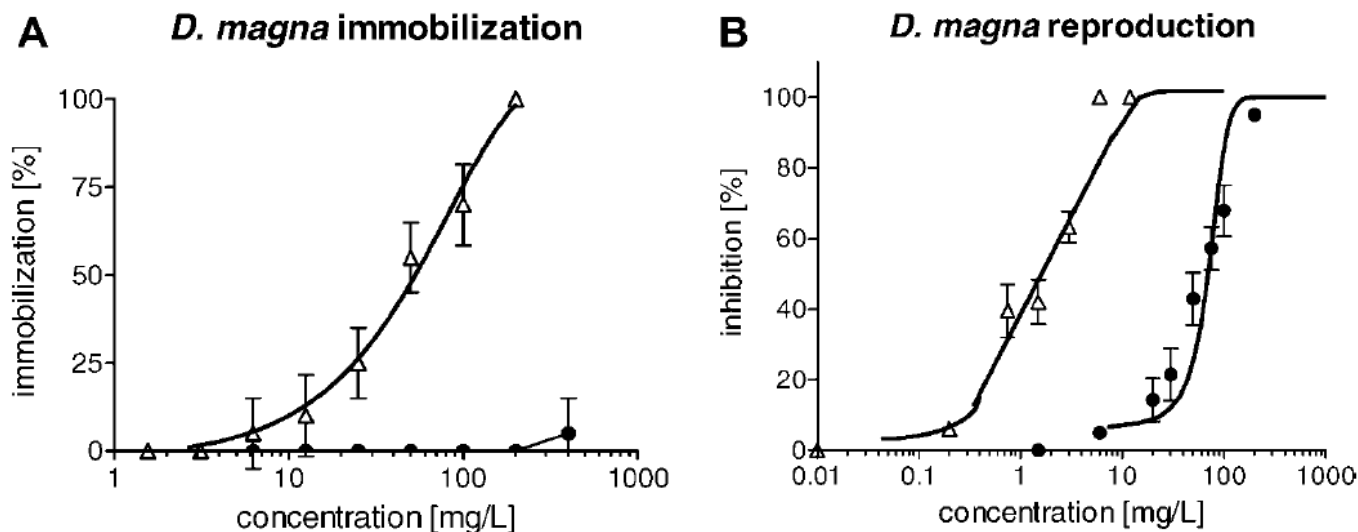


Fig. 2. Comparison of toxicity of the studied antimicrobial drugs in the acute and reproduction test with *Daphnia magna*. (A) Acute immobilization test with *D. magna*. (B) Reproduction test with *D. magna*. OTC = oxytetracycline hydrochloride (black circles), FLU = flumequine (white triangles).



Příklady výsledků – D. magna

Cytostatika – toxicita pro D. magna (Zounková et al. 2010 Chemosphere 81:253-260)

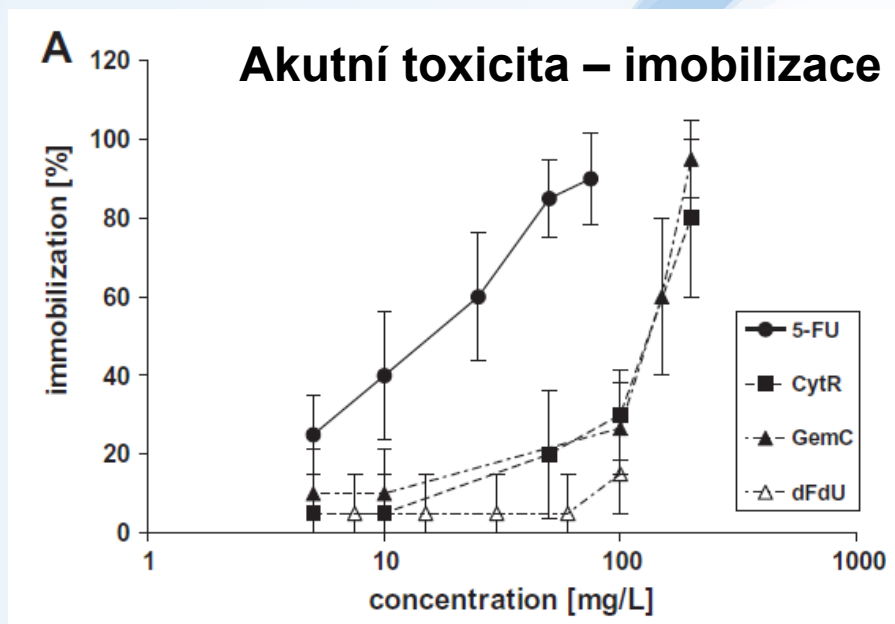


Fig. 1. Ecotoxicity (concentration–response curves) of the studied cytostatic drugs and their metabolites. (A) *Daphnia magna* acute immobilization test.

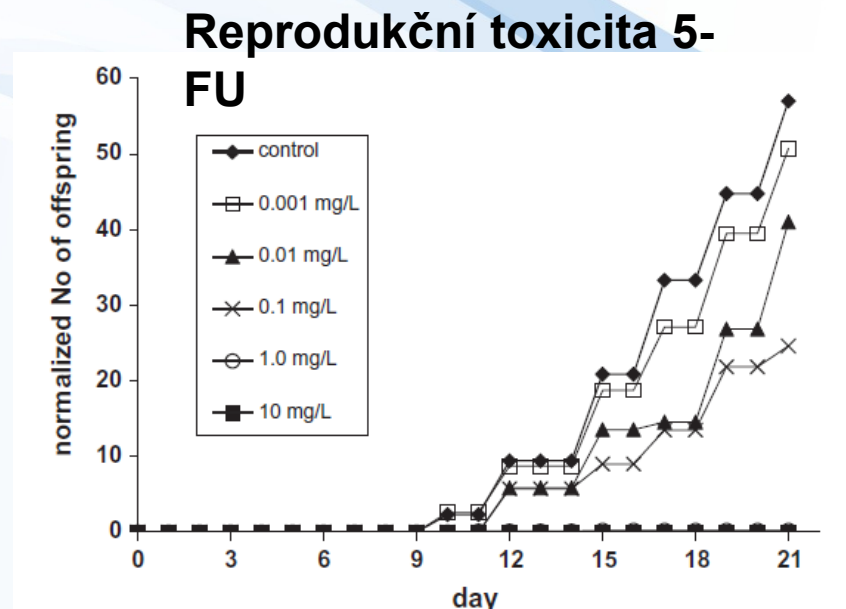


Fig. 2. Effects of 5-fluorouracil (5-FU) on the reproduction of *Daphnia magna* (numbers of offsprings) in the 21-d chronic test.

EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY

- PŘÍKLADY -

- BEZOBRTLÍ – SEDIMENTY –

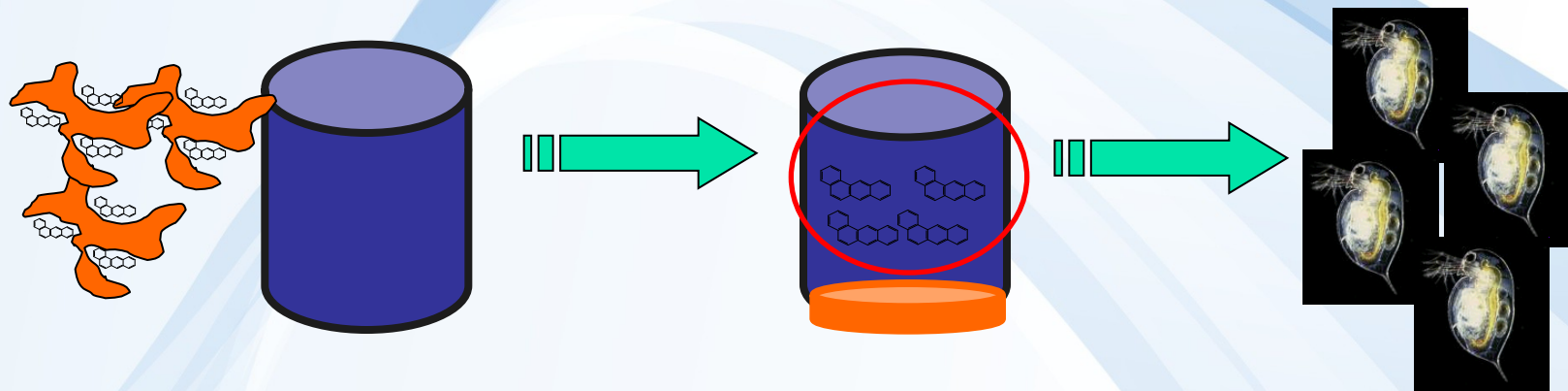
Jak hodnotit toxicitu sedimentů?

■ Toxicita porové vody/výluhů (několik ISO / OECD norem)

100 g d.w./L vody, 24h pomalé třepání, filtrace, test

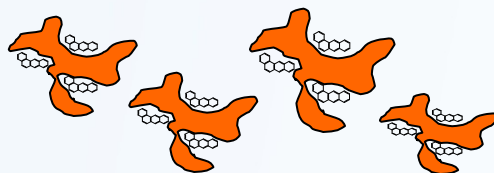
V. fisheri (30 min), řasy, bezobratlí - *D. magna* (2 dny)

? Vodný výluh vs. Sediment



■ Kontaktní toxicita (jen málo norem ...)

: sedimenty+organismy & hodnocení účinků – červi, hmyz, plži: **dny - týdny**



Chironomus test (OECD 218)

- Modelový organismus: Pakomár Chironomus sp. (samec k rozeznání dle ochmýřených tykadel)

Chironomus riparius



Chironomus tentans



Chironomus yoshimatsui



Chironomus **akutní test**

- 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**



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



Potamopyrgus sediment test

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

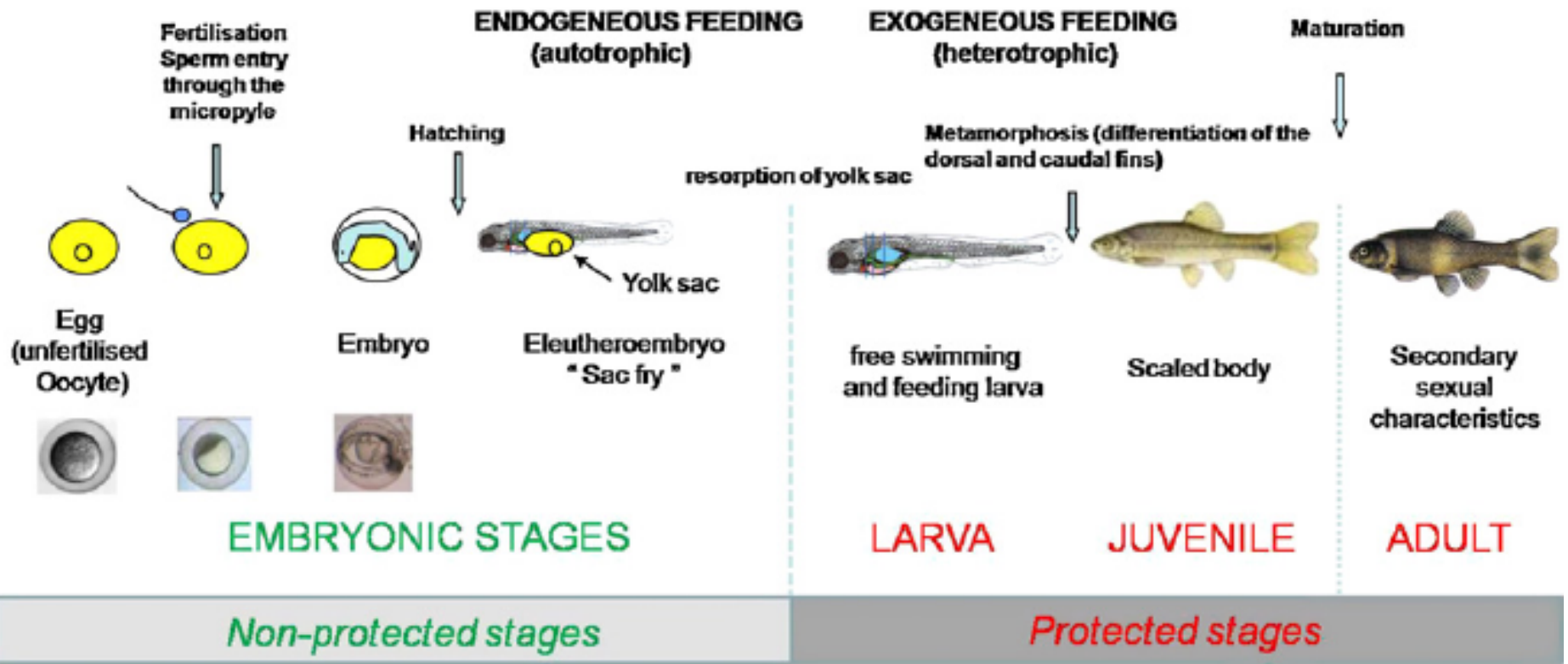
EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY - PŘÍKLADY -

- KONZUMENTI – OBRATLOVCI –



Rybí biotesty

- standardní 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)
 - Halančík rýžovištní – Japanese medaka



FET OECD 236 →

OECD 215
→

OECD 203
→

OECD 212 – short term embryo & sac fry →

OECD 229, 230
F x M →

OECD 210 – Chronic early life stage →

OECD 240 F x M

OECD 234 guideline – Fish Sexual Development Test →

→ → →

Často používané druhy ryb

Brachydanio rerio*, *Danio rerio
(danio pruhovaný, zebříčka pruhovaná)



Poecilia reticulata (živorodka duhová, paví oko)



Pimephales promelas (střevle potoční)



Cyprinus carpio (kapr obecný)



Oncorhynchus mykiss (pstruh duhový)



Akutní testy

ČSN EN ISO 7346-1 (75 7761) Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae) – Část 1: Statická metoda

ČSN EN ISO 7346-2 (75 7761) Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae) – Část 2: Obnovovací metoda

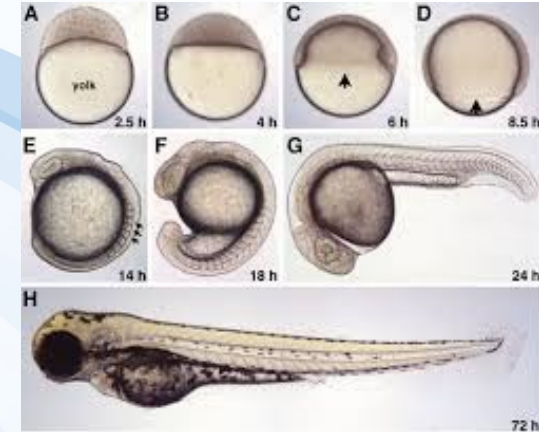
ČSN EN ISO 7346-3 (75 7761) Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae) – Část 3: Průtočná metoda

OECD 203: Test akutní toxicity na rybách – výsledkem je koncentrace, která vyvolá 50% úhyn ryb (96h LC50)

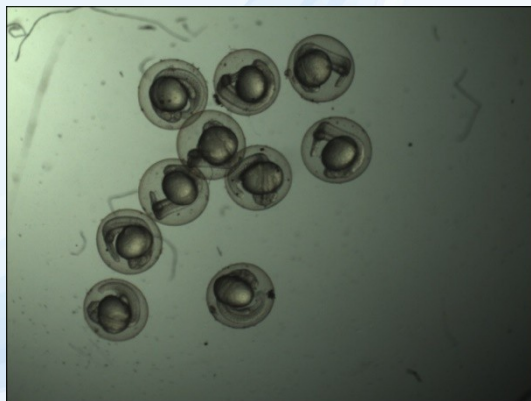
Testy s rybami – nahrazování dospělců: využití embryí (embrya nejsou z hlediska zákona považována za „obratlovce“)

Embryonální test s *Danio rerio* (OECD 236)

- Expozice - od vajíčka (1-3 h po oplodnění) do max 4-5 dní
(spotřebovává žloutek a nepřijímá externí potravu)
- Realizace (dle OECD) v 24-jamkových deskách
 - 20 vajíček individuálně v jamkách á 2 mL média
- Vyhodnocení – mortalita, pohyby, délka, morfologické změny

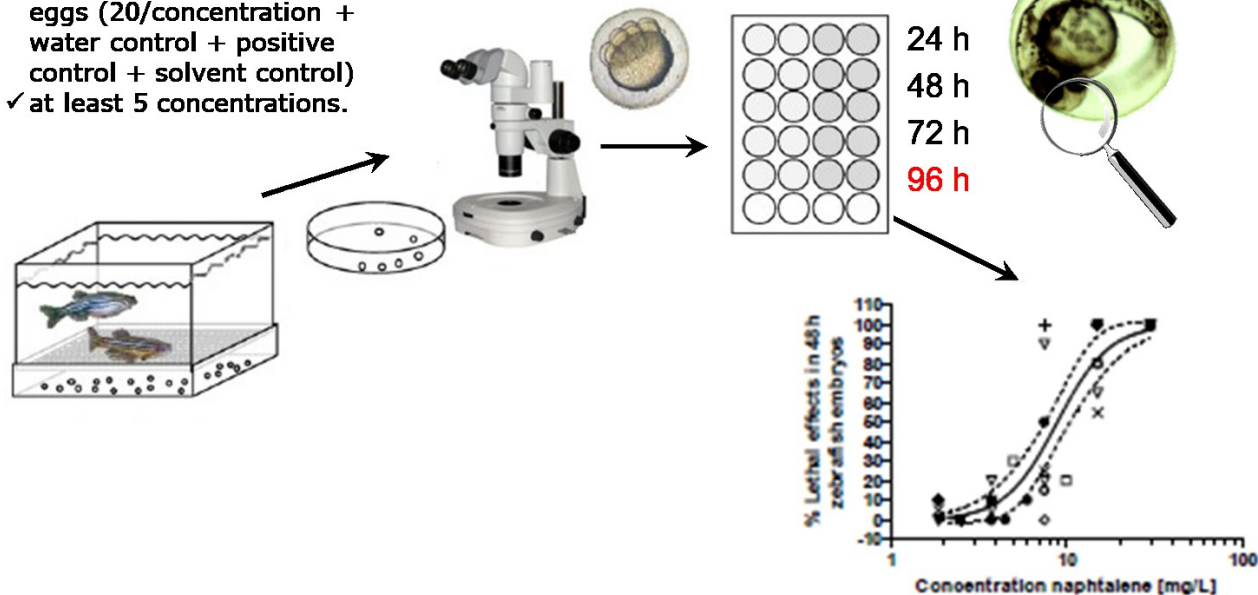


Viz: výukové video a další materiály
→ IS.MUNI.CZ

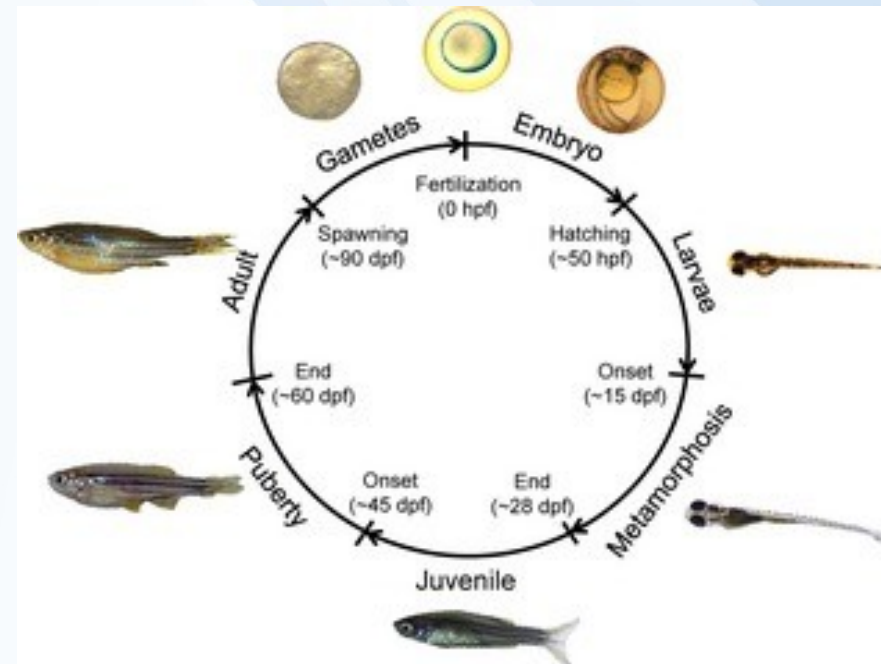


The new OECD TG 236 was adopted in July 2013:

- ✓ newly fertilised zebrafish eggs (20/concentration + water control + positive control + solvent control)
- ✓ at least 5 concentrations.



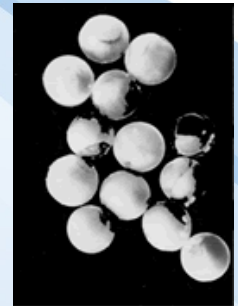
- 28 July 2015 - Test No. 240: **Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)**
 - From F0 (3 weeks)
 - via F1 (15 weeks)
 - F2 (2-weeks posthatching)
 - survival, gross development, growth and reproduction (fecundity)
 - mechanistic information - **vitellogenin**, secondary sex characteristics, histopathology



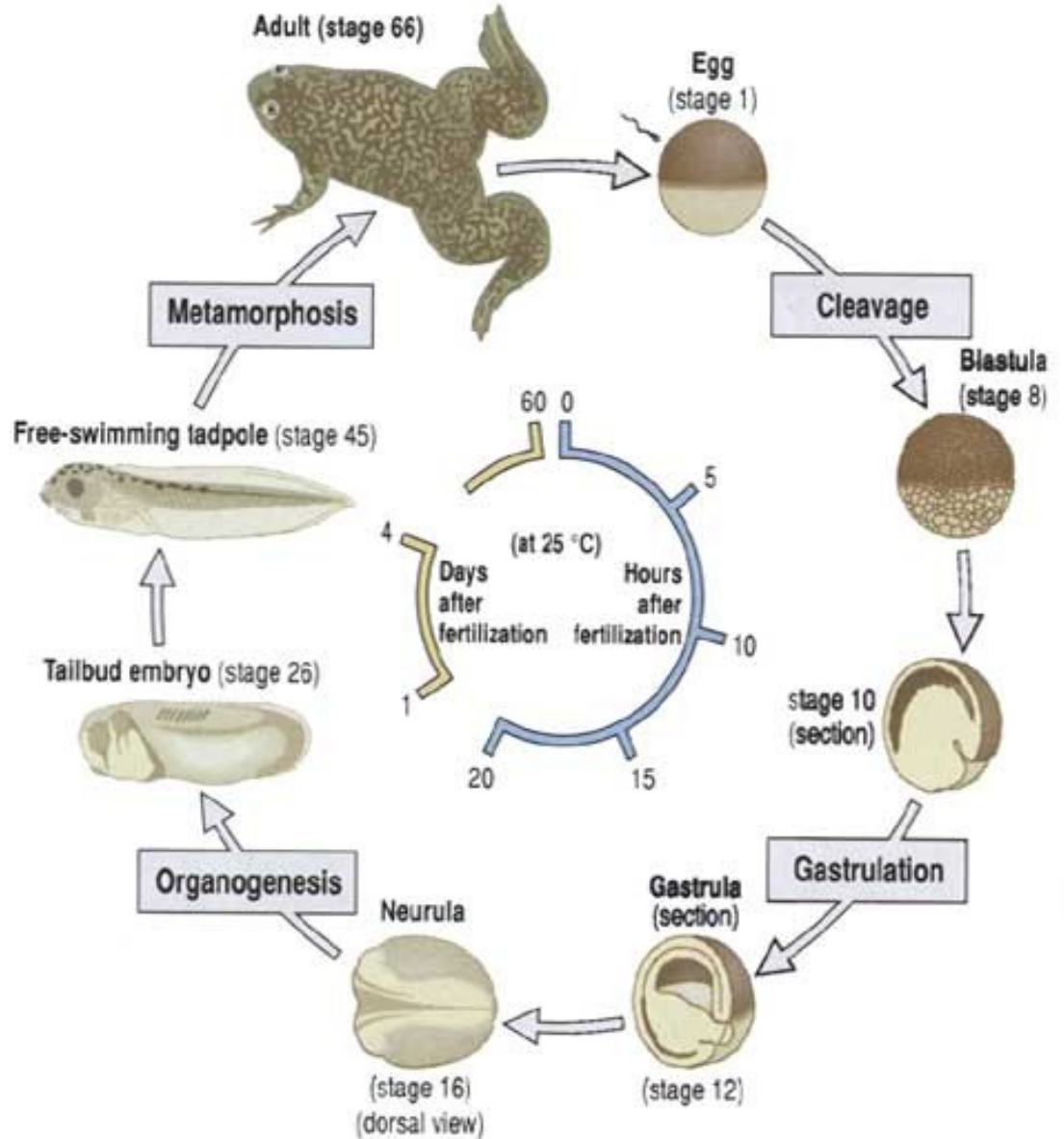
Obratlovci - obojživelníci

FETAX – Frog Embryo Teratogenicity Assay Xenopus

- Drápatka (*Xenopus laevis*), <http://drapatka.ic.cz/>
- Uspořádání:
 - toxikologie – experimenty s vajíčky, embryi a larvami - petriho misky
 - 96 h (dosažení stadia larvy bez žloutk. vaku)
- Význam:
 - Test teratogenity
 - Není nutné povolení na testy s obratlovci
 - **extrapolace výsledků na jiné organismy včetně savců**



Xenopus life cycle



Dvořáková, D., K.
 Dvořáková, L. Bláha, B.
 Maršálek and Z. Knotková
 (2002). "Effects of
 cyanobacterial biomass
 and purified microcystins
 on malformations in
Xenopus laevis:
 teratogenesis assay
 (FETAX)." Environmental
 Toxicology 17(6): 547-555.

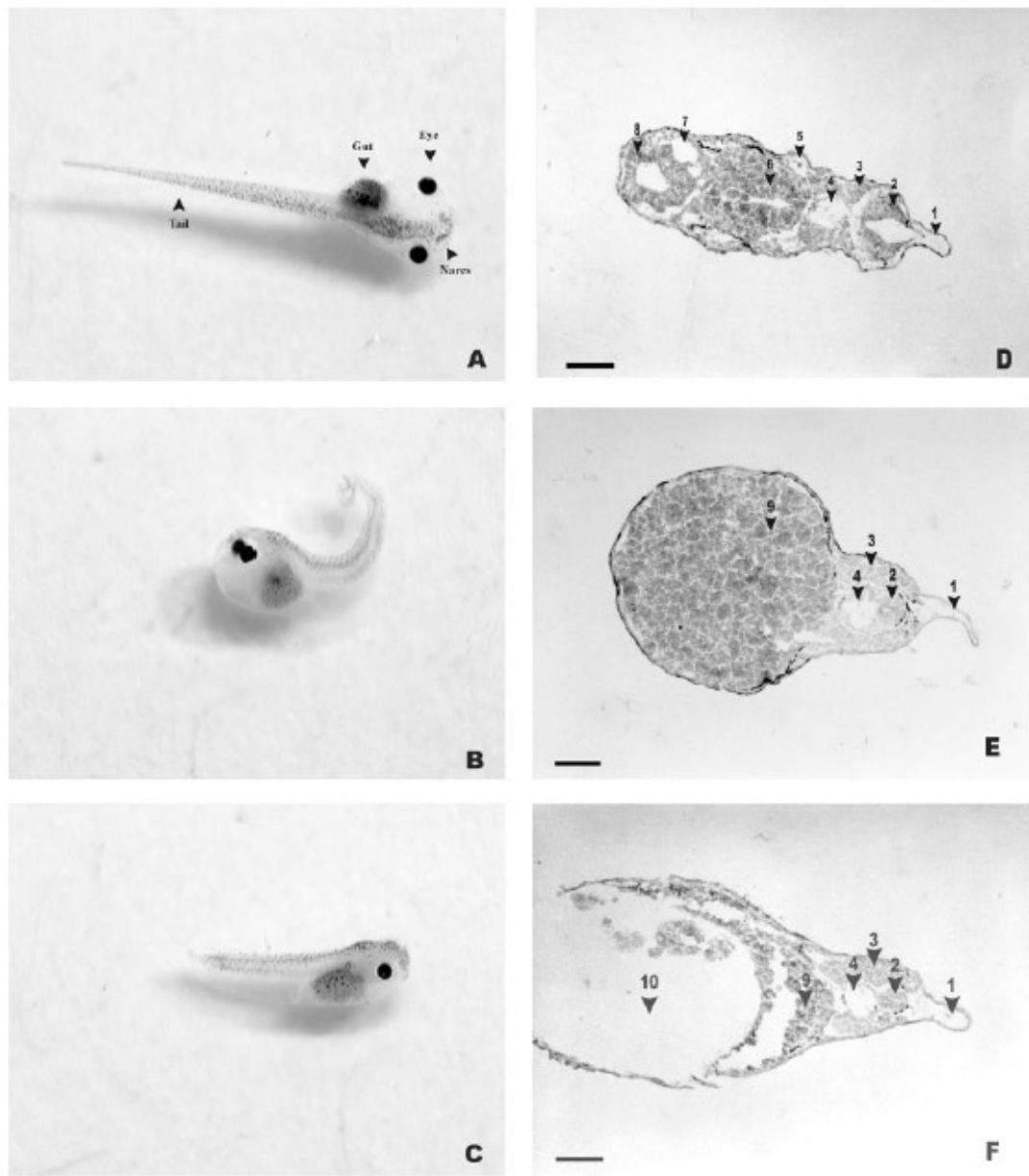


Fig. 2. Macroscopic (A, B, C) and microscopic (D, E, F) examination of *Xenopus laevis* embryos. (A) and (D) are controls; (B) and (E) are strongly malformed embryos exposed to 100 µg microcystin-LR/L for 96; (C) and (F) are malformed embryos after exposure to cyanobacterial biomass of *Microcystis aeruginosa* (300 mg d.w./L containing 250 µg MLR/L) for 96 h. (1) dorsal fin; (2) nerve cord or brain; (3) somite; (4) notochord; (5) pronephros; (6) midgut with yolk particles; (7) pericardium; (8) heart; (9) remaining yolk particles, characteristic of slow development; and (10) abdominal edema. Bar = 200 µm.

Fig. 1. Mortality in the 96-h FETAX test after exposure to purified microcystin-LR (MLR) and the biomass of cyanobacterial water blooms:

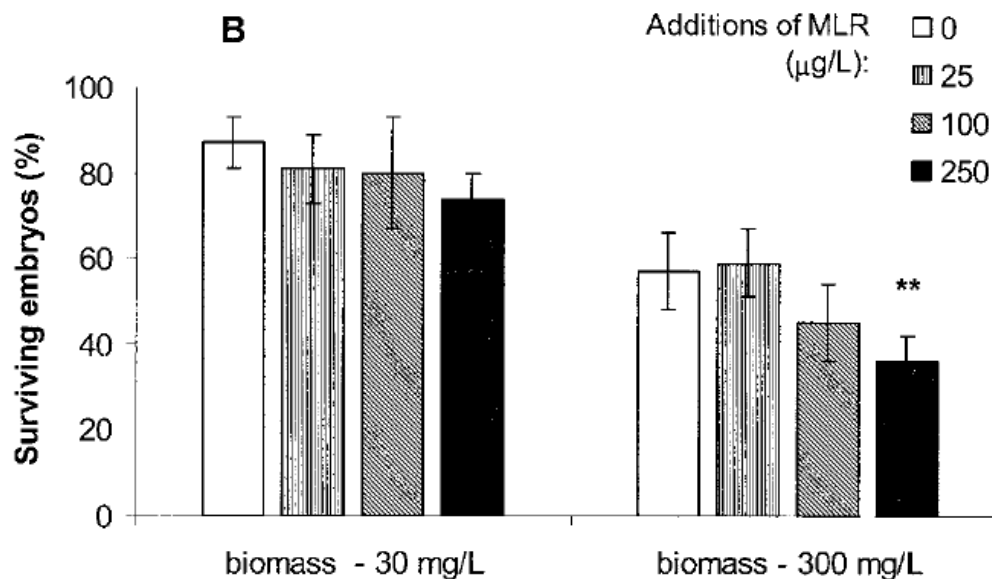
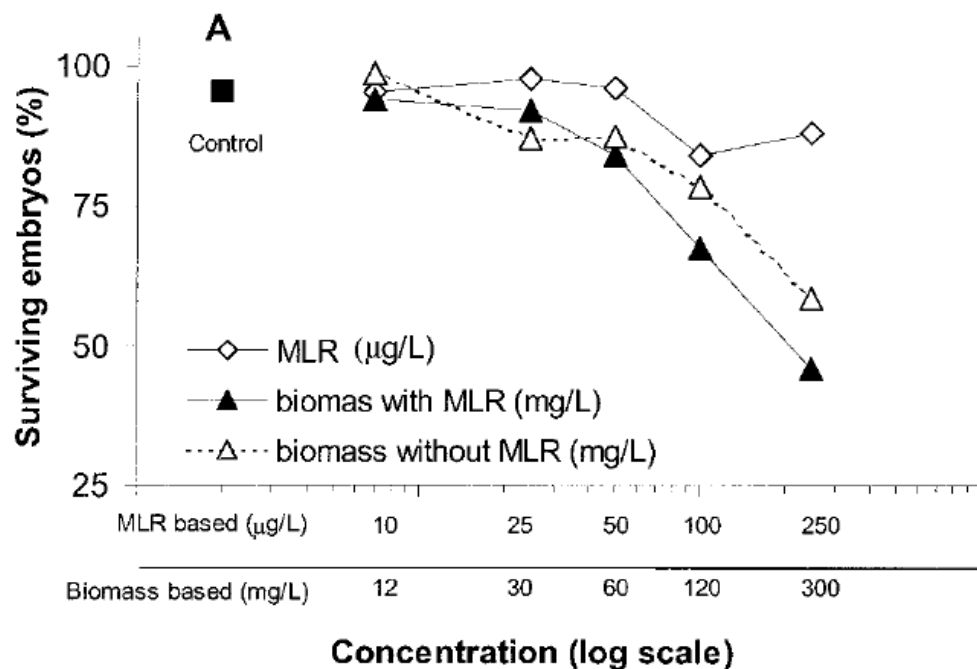
(A) Dose–response curves of purified MLR (scale in g/L on X axis), biomass containing natural microcystins (bloom dominated by *Microcystis aeruginosa*), and biomass with no detectable microcystins (bloom dominated by *M. wesenbergii*; scale milligrams of biomass d.w. per liter on X axis).

Concentrations of purified MLR and the *M. aeruginosa* biomass are proportional (e.g., 12 mg of the biomass d.w. contained 10 g of MLR).

(B) Toxic effects of externally added MLR (25–250 g/L) to the cyanobacterial biomass with no natural microcystins.

Asterisks

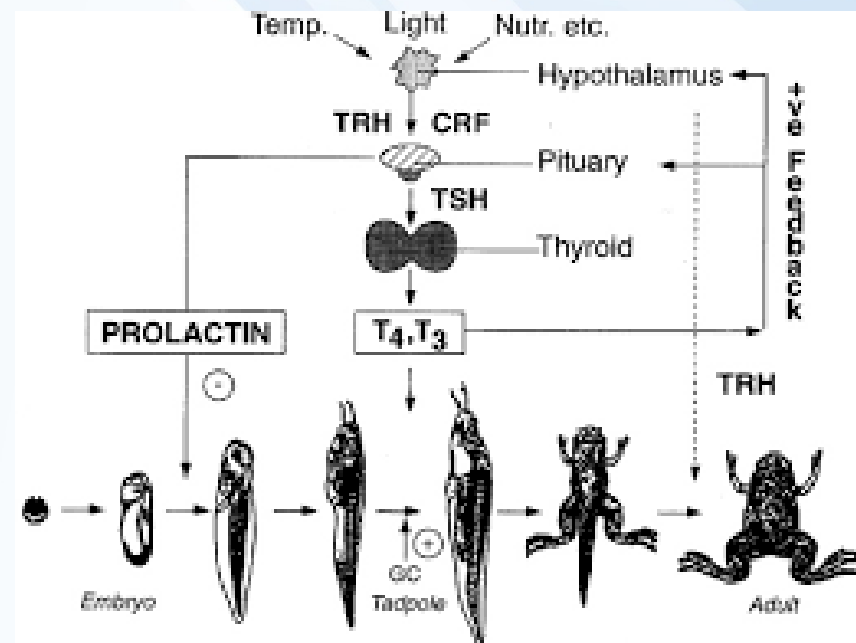
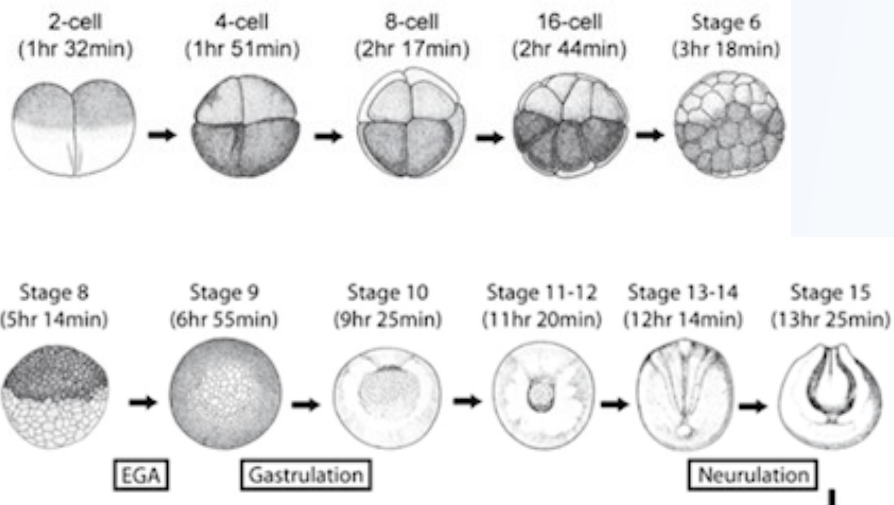
(**) indicate statistically significant difference from the effect of the biomass (300 g/L) with no MLR addition (Pearson's chi-square, $p < 0.01$). Bars represent means standard error of the mean of two independent experiments each performed in two parallels.



OECD testing guidelines - AMPHIBIANS

<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/seriesontestingandassessmentecotoxicitytesting.htm>

- 28 July 2015 - Test No. 241: The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)
 - *Xenopus laevis*, starts with tadpole stages 8-10
 - 16 weeks
 - growth, development, metamorphosis, sex maturation



EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY - PŘÍKLADY -

-MIKROBIÁLNÍ TESTY TOXICITY -



DIRTLAND



WATERWORLD



MICROBIAL ZOO



Mikrobiální ekotoxikologické biotesty

(1) TEST AKUTNÍ TOXICITY - MICROTOX

- mořská luminiscenční bakteri *Vibrio fischeri*
 - krátkodobá expozice testované látky (5-30 min)
 - sledování změn přirozené luminiscence – odpovídá toxicitě
- uspořádání:
kyvety (zkumavky), stanovení v luminometru



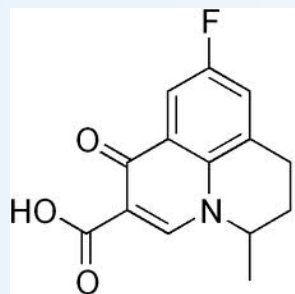
Mikrobiální ekotoxikologické biotesty

(2) Růstové testy toxicity s bakteriemi

- stanovení efektu toxické látky v médiu na růst bakterie
- *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* ...
- **expozice 16 hodin (přes noc)**
- kultivace bakterií (Erlenmayerovy nádoby, miniaturizace – mikrodestičky)
- vyhodnocení – nárůst biomasy (zákal)

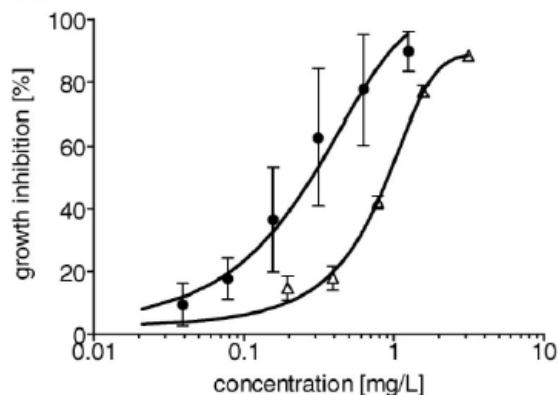


Zounekova, R., Z. Klimesova, L. Nepejchalova, K. Hilscherova and L. Blaha (2011). "Complex Evaluation of Ecotoxicity and Genotoxicity of Antimicrobials Oxytetracycline and Flumequine Used in Aquaculture." *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(5): 1184-1189.0

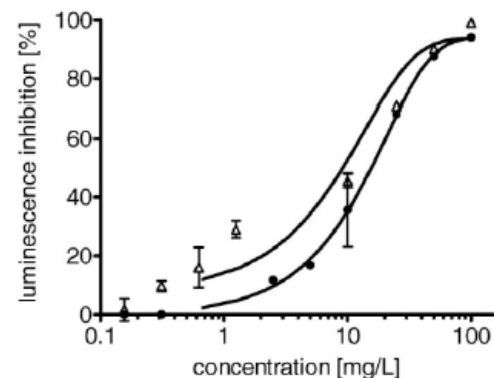


Flumequine

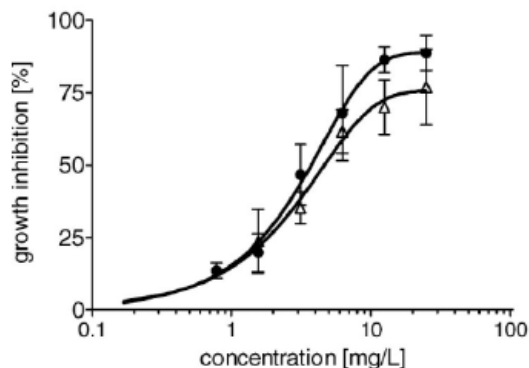
A *P. putida* growth inhibition



B *V. fischeri* luminescence inhibition



C *P. subcapitata* growth inhibition



D *L. minor* growth inhibition

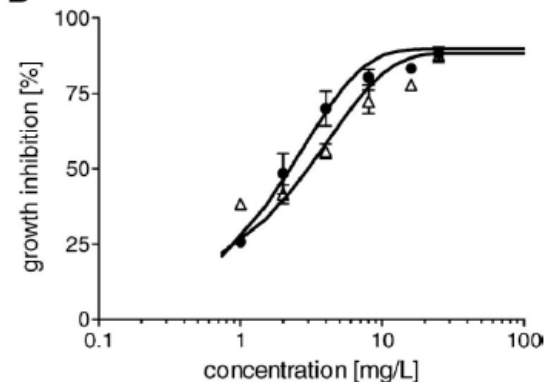
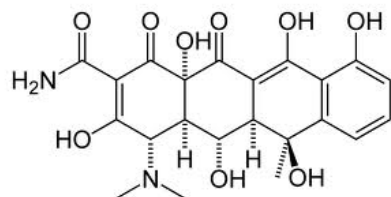


Fig. 1. Ecotoxicity (concentration–response curves) of the studied antimicrobial drugs. (A) *Pseudomonas putida* growth inhibition test. (B) Inhibition of luminescence of *Vibrio fischeri*. (C) Growth inhibition test with *Pseudokirchneriella subcapitata*. (D) Growth inhibition test with *Lemna minor*. OTC = oxytetracycline hydrochloride (black circles), FLU = flumequine (white triangles). The symbols represent mean and standard deviations of three independent experiments.



OTC

Mikrobiální ekotoxikologické biotesty

(3) Bakteriální testy **GENOTOXICITY**

- často užívané biotesty hodnocení genotoxicity čistých látek i směsí
- horší extrapolace pro člověka -> nemají metabolizační enzymy:
bioaktivace (*modifikace – externí přídavky S9 frakcí*)

-3.1 Amesův test – (různé kmeny *Salmonella typhimurium*)

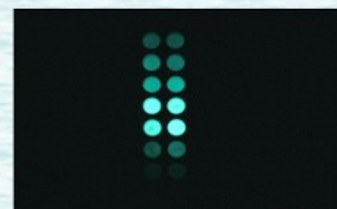
- mutanti neschopní žít v minimálním mediu (chybějící enzym pro syntézu His) : genotoxin vyvolá reverzní mutace → bakterie přežívají
- hodnocení – počítání kolonií revertantů na Petriho miskách



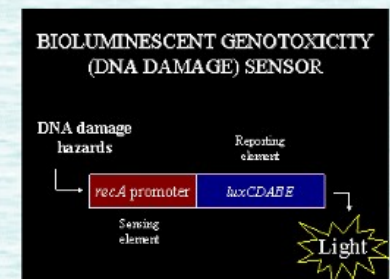
-3.2 Další specifické testy

- specifické transgenní bakterie s reporterovým genem pod kontrolou reparační DNA

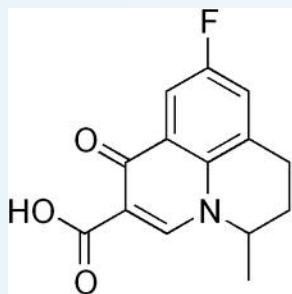
Mutace → reparační DNA (reparační proteiny jsou indukovány spolu s „reportérem“ – nejčastěji luciferáza: luminescence)



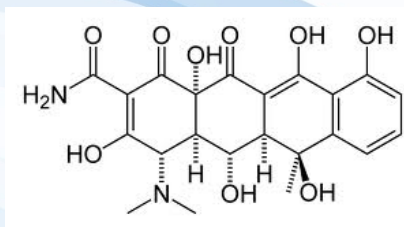
Luminescent response to a dilution series of a genotoxicant on a microtiter plate, photographed only by the light emitted by the bacteria



Zounkova, R., Z. Klimesova, L. Nepejchalova, K. Hilscherova and L. Blaha (2011). "Complex Evaluation of Ecotoxicity and Genotoxicity of Antimicrobials Oxytetracycline and Flumequine Used in Aquaculture." *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(5): 1184-1189.0



Flumequine



OTC

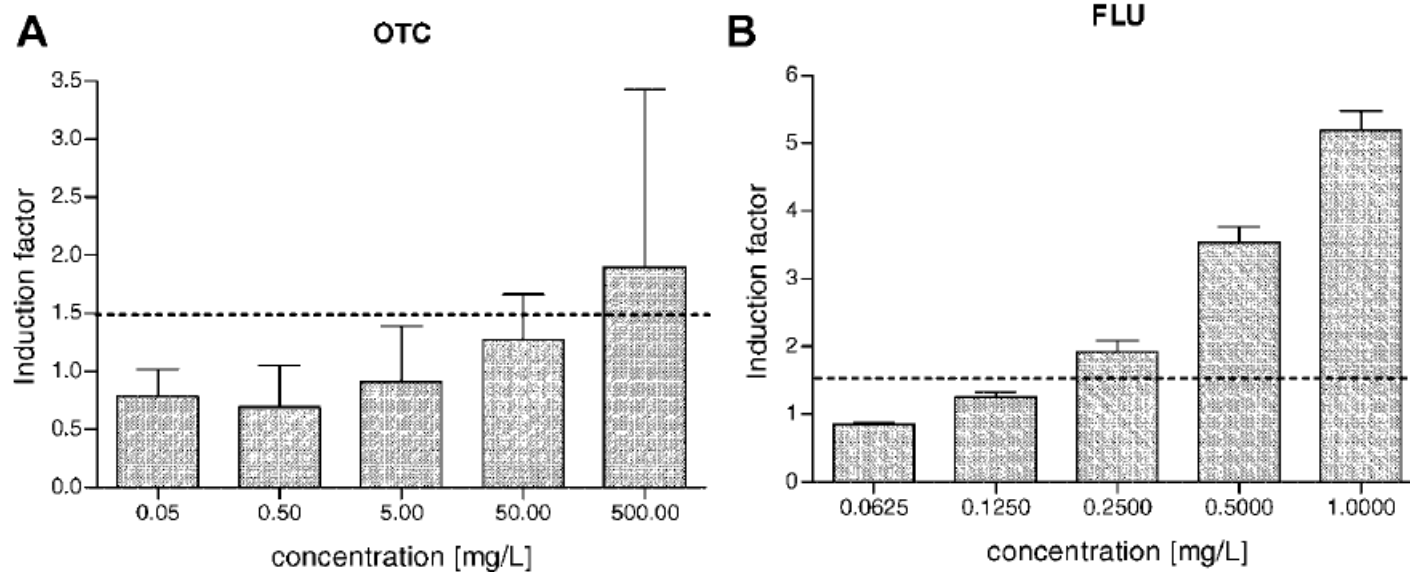


Fig. 3. Comparison of genotoxicity of the studied antimicrobial drugs in the SOS-chromotest. OTC = oxytetracycline hydrochloride, FLU = flumequine.



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Půdní biotesty



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Půdní biotesty s mikroorganismy

Endpoints v mikrobiálním testu

- Standarně **mineralizace dusíku a uhlíku jako produkci CO₂ a sumy minerálních forem dusíku (NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻)**
- Lze ale stanovit i další parametry:
 - Mikrobiální biomasu
 - Substrátem indukovanou respiraci
 - Enzymatické aktivity
 - Kinetiku mineralizace C a N
 - Amonifikaci, nitrifikaci
 - Diverzitu
- **Výstupy:** NOEC, LOEC, LC50, EC50, IC50 ...

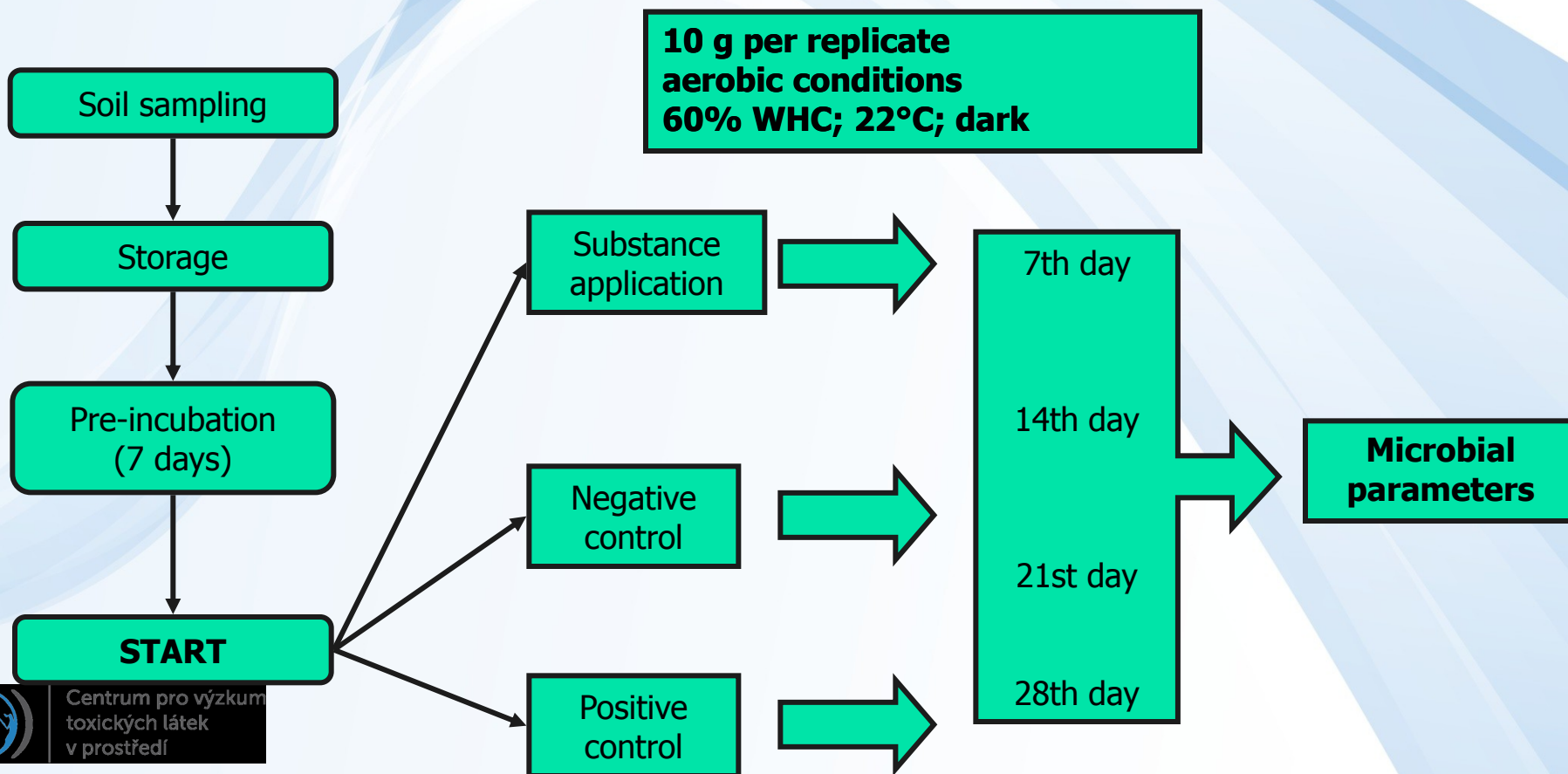


Testy s půdními mikroorganismy

OECD 216 (2000) Soil Microorganisms, Nitrogen Transformation Test

OECD 217 (2000) Soil Microorganisms, Carbon Transformation Test

ISO 14238 (1997) Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes





Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Půdní biotesty s bezobratlými

Žížaly v ekotoxikologii

- **žížaly jsou asi nevíce a nejdéle ekotoxikologicky užívaný představitel půdní fauny**

Výhody a důvody:

- celý vývojový cyklus probíhá v půdě - **typický geobiont**
- zkonzumují velká množství půdy (**vysoká expozice potravou a akumulace kontaminantů**)
- mají velmi úzký fyzikální kontakt s půdou (**expozice pokožkou**)
- mají **výrazné bioakumulační a biokoncentrační charaktery** (jejich analýzou posuzujeme vliv delšího časového období) = patří mezi tzv. **makrokoncentrátoři**
- vysoký a významný podíl na **tvorbě půdy, dekompozičních procesech, půdní úrodnosti**
- klíčové postavení v **přenosu polutantů v potravních řetězcích**
- výskyt téměř **ve všech půdách** ve vysokých počtech i váhách
- osvědčené, zavedené v laboratorních testech (**nenáročný chov**)
- snadno se identifikují v reálných vzorcích (díky **velikosti**)



V různých testech různé endpointy

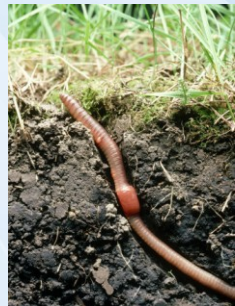
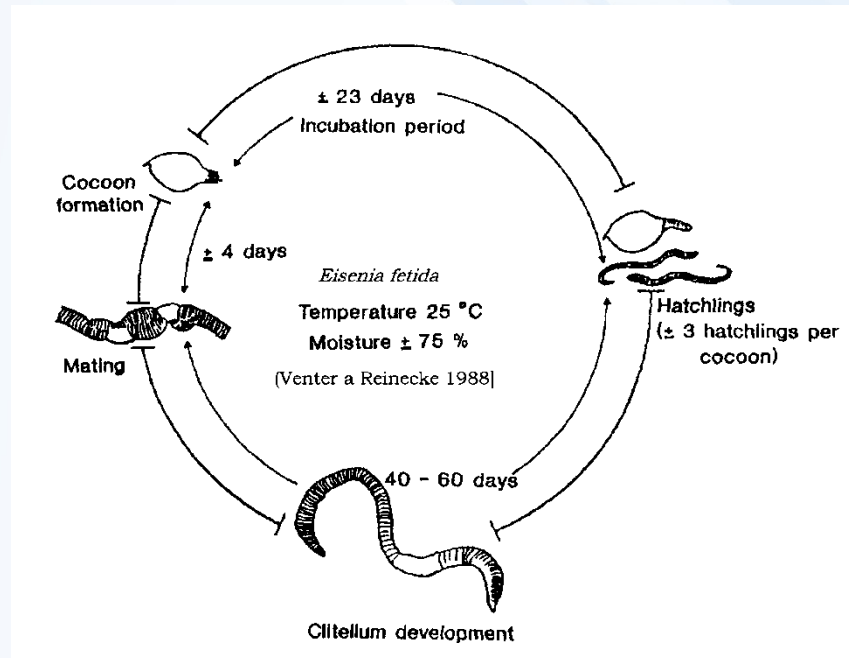
- **Mortalita**
- **Reprodukce**
- **Změny váhy**
- **Behaviorální změny**
- Malformace
- Fyziologické změny
- Snížení imunity
- Aktivity enzymů
- Biochemické markery
- Genotoxicita
-



Eisenia fetida

Výhody

- Standardní druh
- Snadná kultivace velkých počtů
- Krátký životní cyklus



Eisenia fetida reprodukční test - začátek



Příprava půd



Měření vlhkosti (WHC)
půd



Ovlhčená půda
rozvážena do
testovacích nádob



Přidavek 10 adultů do
nádobky na test



Zvážení jedinců

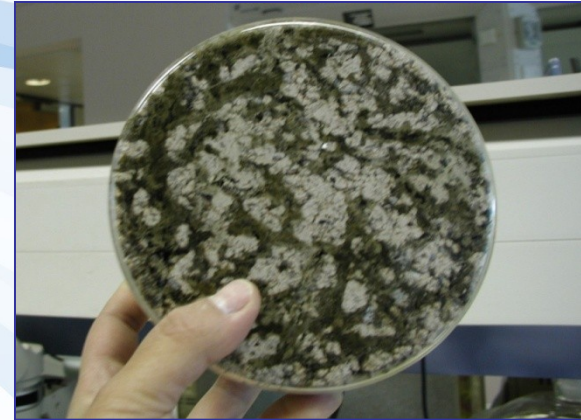


Výběr 10
reprezentativních
adultů z chovu a
jejich omytí dH₂O

E. fetida test – po 28 dnech



Nádoby během testu v kontrolované místnosti



Prohlídka nádob (známky aktivity)



Zvážení žížal



Zhodnocení mortality

E. fetida – po 8 týdnech



Po cca 20 min
juvenilové na
povrchu



Sbírání a
počítání

Vodní lázeň s narůstající teplotou
40°C až 60°C



Přesátí půdy



Ruční třídění kokonů



Počítání

Další modelové organismy – půdní bezobratlí

Roupice (např. *Enchytraeus crypticus*)



Chvostokoci (např. *Enchytraeus crypticus*)



Hlístice (*Caenorhabditis elegans*)



Prospěšní členovci (testy pesticidů)



Poecilus cupreus



Linyphiidae

Plži, např.

Helix pomatia (hlemýžď zahradní),
Arion ater (plzák)



Ekotoxikologické biotesty – konzumenti - bezobratlí

TERESTRICKÉ PROSTŘEDÍ

Další biotesty s terestrickými bezobratlími

VČELY

- testování insekticidů
- dávkování v potravě



Moucha domácí



Drosophila (hodnocení genotoxicity)



Terestrické prostředí



- Akutní **orální toxicita pro včelu medonosnou**
- Metoda C.16 podle přílohy směrnice 2001/59/ES
- Podstata metody:
 - dospělé dělnice včely medonosné (*Apis mellifera*) se exponují řadě dávek zkoušené látky rozptýlené do cukerného roztoku
 - každé zkušební skupině včel se podá 100-200 μ l 50% vodného cukerného roztoku obsahujícího zkoušenou látku
 - po spotřebování potravy (3-4 hod) se odebere krmící zařízení a nahradí se zařízením obsahujícím pouze cukerný roztok, který mohou přijímat dle libosti
 - mortalita se zaznamenává denně během alespoň 48 hodin a porovnává se s kontrolními hodnotami





Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Půdní biotesty s vyššími rostlinami

Testy s vyššími rostlinami

- velké množství testů
- dřívější testy zaměřené na klíčivost semen a elongaci kořene jsou méně citlivé a méně relevantní pro ekologii
- pro relevantnější interpretace byly vyvinuty testy vícegenerační s možností studia subletálních účinků
- **Nejběžnější druhy – z různých fyziologických skupin (C3, C4)**
 - **Salát, Hořčice – Bob, Vikev - Ječmen**

Nejpoužívanější endpointy

1. Klíčivost semen (půdní roztok)
2. Elongace kořene (půdní roztok či půda)
3. Růst sazenic
4. Produkce biomasy
5. Životní cyklus (změny hmotnosti, počet květů, semen ..)
6. Enzymatický test
7. Fyziologické testy (fotosyntéza, respirace)



Testy klíčivosti a elongace kořene

- semena jsou exponována v substrátu (křemenný písek), půdě toxické látky či přímo v kontaminované půdě z terénu a po 5 dnech se sleduje klíčivost - direct test
- relativně necitlivý: semeno má bariéry pro vstup látky a energeticky je soběstačné, látka ho nemůže stresovat
- postupy se v detailech liší, někdy bývá přímo spojen (US EPA) se sledováním délky kořene
- jindy se ale vliv na délku kořene sleduje jako nepřímá expozice v roztoku

Test inhibice růstu kořene *Sinapsis alba*

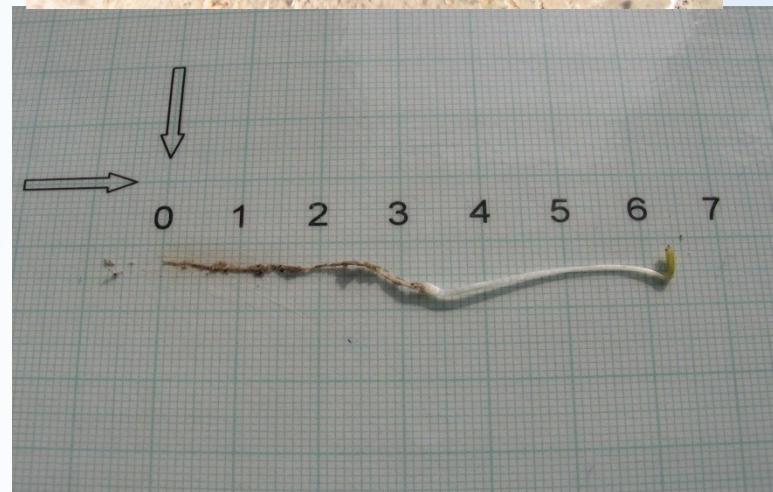
- 72 hodin jsou semena vystavena roztoku látky (+kontrola)
- 20°C; 5ml roztoku na petriho misku; 30 semen na misku; tma
- stanoví se délka kořene a počet vyklíčených semen



Postup salát setý

ISO 11269-1

Germination tests with plants – testing toxicity in the aquatic media (*Sinapis alba*) or in soil (*Lactuca sativa*)



Vyšší rostliny



ISO 22030 (2005): Chronic toxicity in plants



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

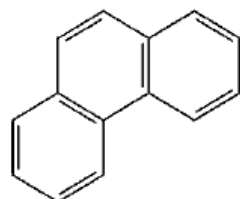


14-d Shoot Length
IC50 = 29.7 mg/g

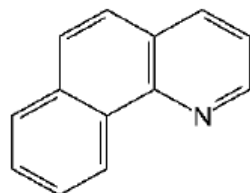


Toxicita PAHs a jejich N-derivátů pro rostliny

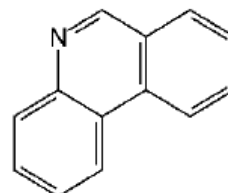
(Pašková et al. 2006 Environmental Chemistry and Ecotoxicology 25:3238–3245)



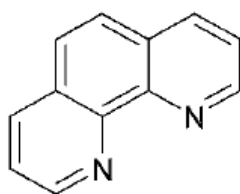
phenanthrene



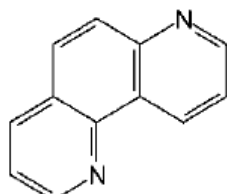
benzo[h]quinoline



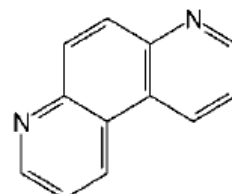
phenanthridine



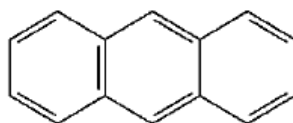
1,10-phenanthroline



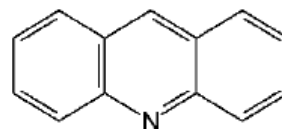
1,7-phenanthroline



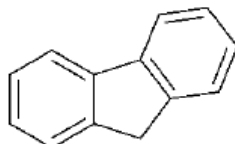
4,7-phenanthroline



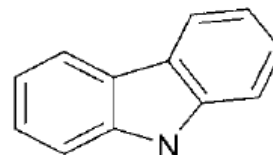
anthracene



acridine



fluorene



carbazole

Fig. 1. Chemical structures of tested compounds.



Toxicita PAHs a jejich N-derivátů pro rostliny

(Pašková et al. 2006 Environmental Chemistry and Ecotoxicology 25:3238–3245)

Table 1. Summary of the effects of N-heterocyclic polyaromatic hydrocarbons and their unsubstituted analogues on morphological parameters in plants (— no effect; + statistically significant difference from control at >2 μM, ++ at 0.2–2 μM, +++ at 0.02 μM; *p* < 0.05)

Plant	Root length	Hypocotyl length	Root weight	Hypocotyl weight	Total length	Total weight	Germinability
Phenanthrene	<i>Triticum aestivum</i>	—	—	—	—	—	—
	<i>Sinapis alba</i>	—	—	—	—	—	—
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	—	—	—	—	—	—
1,10-Phenanthroline	<i>T. aestivum</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>S. alba</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>P. vulgaris</i>	+	—	+++	—	+	—
4,7-Phenanthroline	<i>T. aestivum</i>	+	++	+++	+++	+	+++
	<i>S. alba</i>	+	—	—	—	+	—
	<i>P. vulgaris</i>	+	—	—	—	—	—
1,7-Phenanthroline	<i>T. aestivum</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	<i>S. alba</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	<i>P. vulgaris</i>	++	++	++	++	++	++
Benzo[<i>h</i>]quinoline	<i>T. aestivum</i>	—	—	+++	+	—	+++
	<i>S. alba</i>	+++	—	—	+	++	+
	<i>P. vulgaris</i>	—	++	++	++	++	++
Phenanthridine	<i>T. aestivum</i>	—	+	+	+	+	+
	<i>S. alba</i>	+	—	++	+	+	++
	<i>P. vulgaris</i>	—	—	—	—	—	—
Anthracene	<i>T. aestivum</i>	—	—	—	—	—	—
	<i>S. alba</i>	—	—	—	—	—	—
	<i>P. vulgaris</i>	++	—	++	++	—	++
Acridine	<i>T. aestivum</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>S. alba</i>	+	+	+++	+++	+	+++
	<i>P. vulgaris</i>	—	—	+++	—	—	—
Fluorene	<i>T. aestivum</i>	—	—	—	—	—	—
	<i>S. alba</i>	—	—	—	—	—	—
	<i>P. vulgaris</i>	—	—	—	—	—	—
Carbazole	<i>T. aestivum</i>	—	—	—	—	—	—
	<i>S. alba</i>	+	+	—	—	+	—
	<i>P. vulgaris</i>	+	+	—	—	—	—

Toxicita PAHs a jejich N-derivátů pro rostliny

(Pašková et al. 2006 Environmental Chemistry and Ecotoxicology 25:3238–3245)

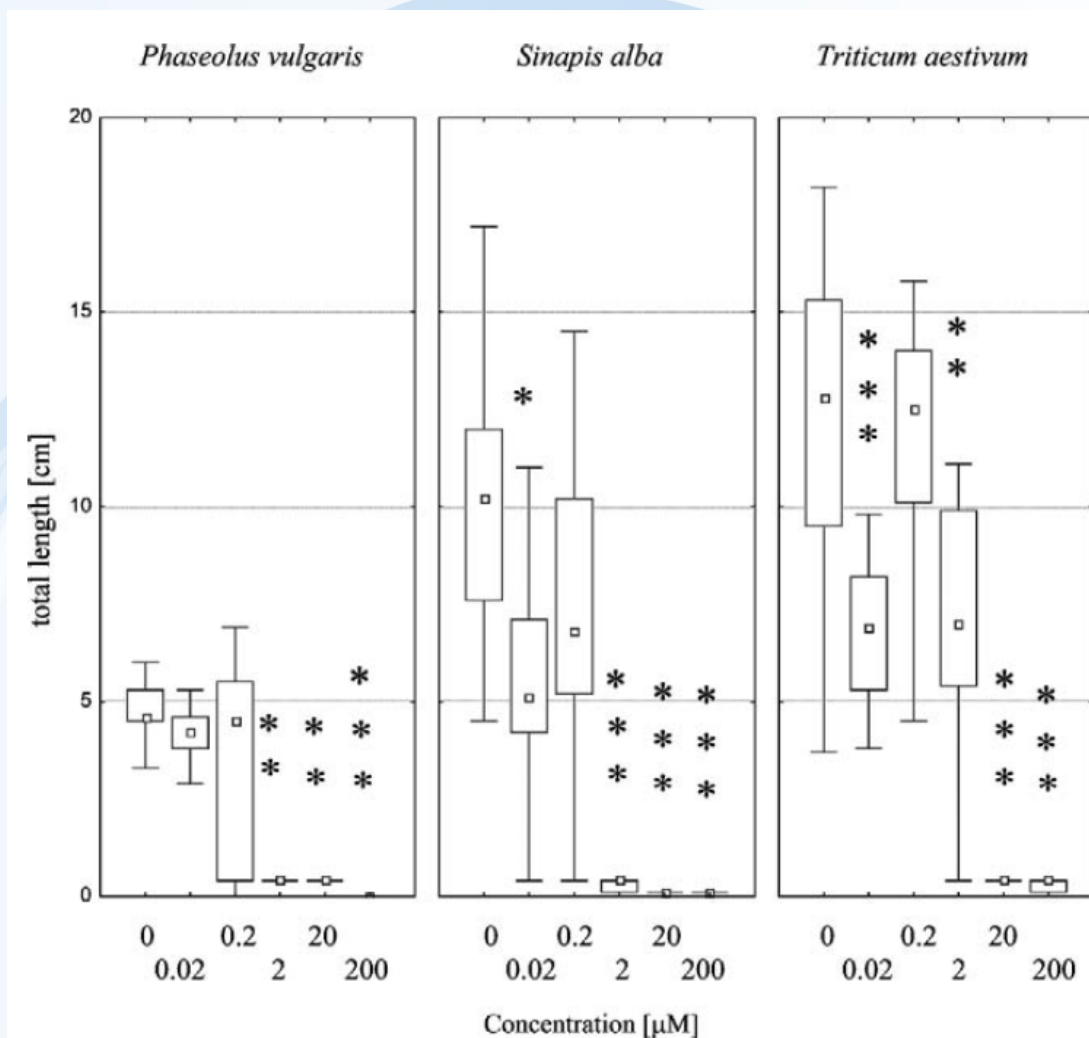


Fig. 3. Effect of 1,7-phenanthroline on total length of three different plant species after 96 h of exposure. Box plot parameters as in Figure 2. [* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$].

Ekotoxikologické biotesty - producenti

Hodnocení GENOTOXICITY s využitím rostlin

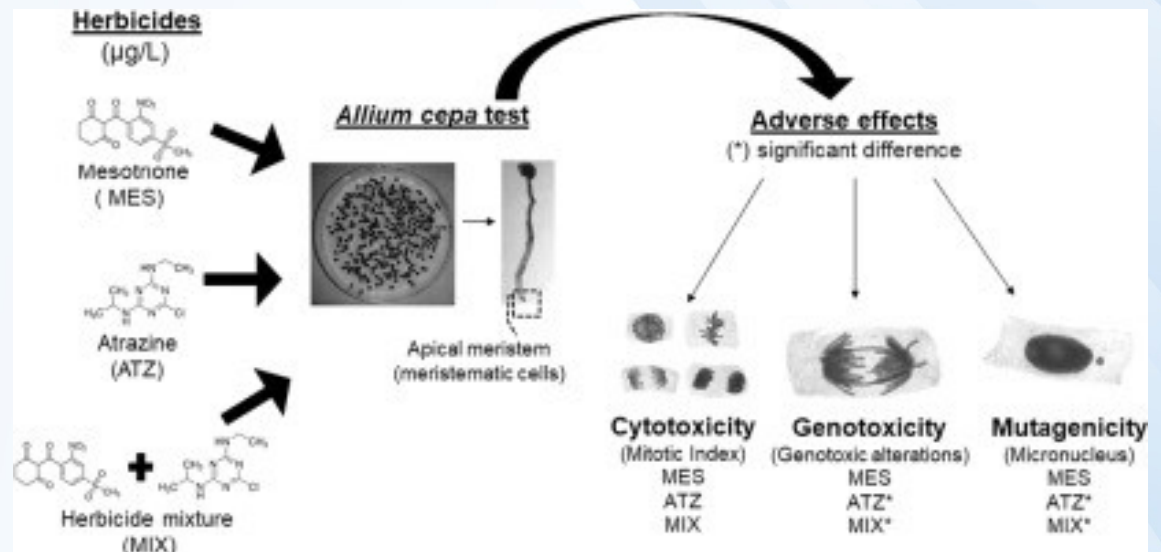
-uspořádání

- mikroskopické hodnocení chromozomových aberací v rychle rostoucích buňkách (kořenová špička)
- bob setý, cibule (*Allium cepa*)

- expozice kořenů do vodných roztoků (extraktů), nebo půdních vzorků



Figure 3: The length of the roots of the test plants of *Allium cepa* L. treated





Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Terestrické prostředí - obratlovci

Ekotoxikologické biotesty - obratlovci

TERESTRICKÉ PROSTŘEDÍ

Ekotoxikologické testy s ptáky

-uspořádání

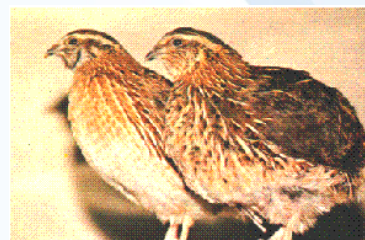
- **dietární testy toxicity**
- dávkování v potravě
- krátkodobé (5 dní expozice + 3 dny)
- reprodukční testy – dlouhodobé (týdny)

Hrabaví ptáci, křepelky

Křepelka virginská (1)
(Northern bobwhite, *Collinus virginianus*)

Křepelka japonská (2)
(Japanese quail, *Coturnis japonica*)

bažant, kur domácí, kachny ...



Effects of cyanobacterial biomass on avian reproduction: a Japanese quail model

Veronika DAMKOVA¹, Jana SEDLACKOVA¹, Hana BANDOUCHOVA¹, Lucie PECKOVA¹, Frantisek VITULA¹, Klara HILSCEROVA², Veronika PASKOVA², Jiri KOHOUTEK², Miroslav POHANKA³, Jiri PIKULA¹

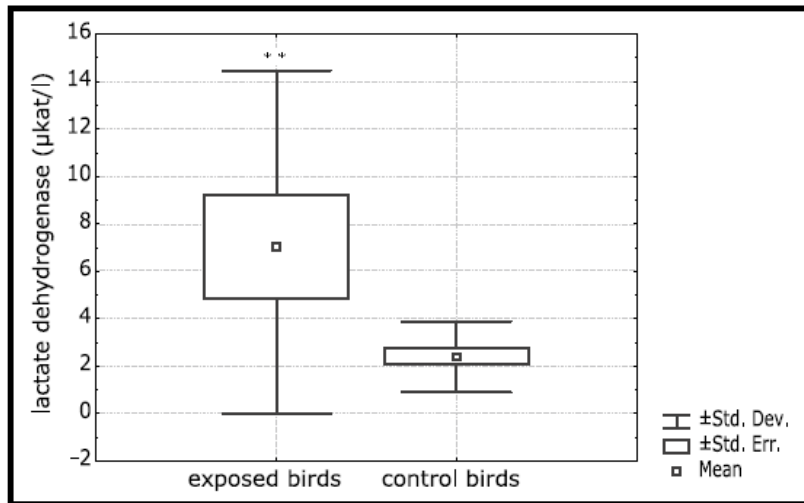


Figure 1. Comparison of LDH activities of exposed and control Japanese quails. Number of animals (16 pairs in both groups), ** = $p < 0.01$.

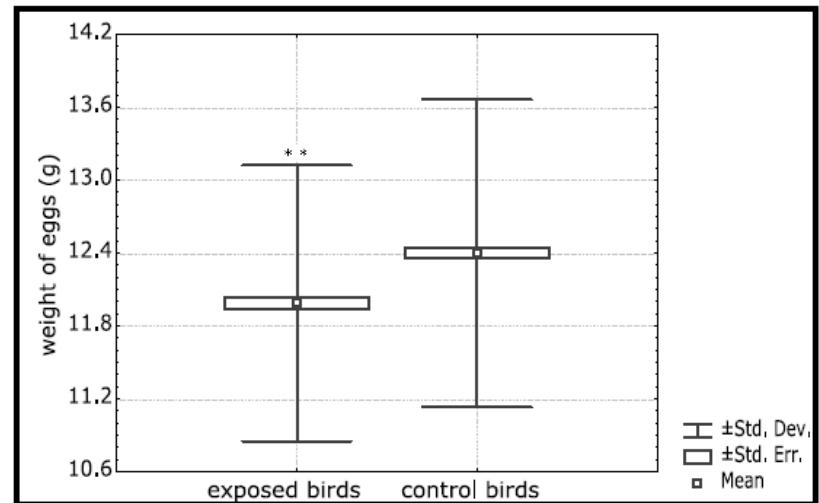


Figure 2. Comparison of weights of eggs laid by exposed and control Japanese quail hens (n = 821 and 824, respectively; ** = $p < 0.01$).

Ekotoxikologické biotesty - obratlovci

Toxikologické testy s laboratorními zvířaty

Myš, Potkan, Křeček, Morče

-uspořádání

- **spíše humánní toxikologie**, ale může být využito jako model pro přírodní hlodavce
- **dávkování – injekčně, inhalace, potrava**
- **délka trvání: nejčastější akutní test – i.p. injekce 24 hod sledování**
- další testy – dlouhodobé 28 dní až měsíce
- kompletní testy karcinogenity 3 roky
- řada specifických testů (*embryotoxicita, teratogenita, imunotoxicita, kožní iritance ...*)



The effect of peroral administration of toxic cyanobacteria on laboratory rats (*Rattus norvegicus* var. alba)

Ondrej ADAMOVSKY¹, Radovan KOPP^{2,5}, Andrea ZIKOVA², Ludek BLAHA¹,
Jiri KOHOUTEK¹, Petra ONDRACKOVA³, Hana PASKEROVA¹,
Jan MARES², Miroslava PALIKOVA⁴

Experimentální design →

28 dní expozice v potravě

1. optimal food + no fish meat + placebo
2. optimal food + fish meat (20%) + placebo
3. optimal food + fish meat (20%) + KLH
4. optimal food + fish meat (20%) + biomass of *Microcystis* (1%) (5 variants of microcystins, total concentration 2.698 mg/g dry mass (MC-RR 1462 µg/g, MC-LR 1088 µg/g, MC-YR 96 µg/g and 2 non identified 43 a 9 µg/g) + placebo
5. optimal food + fish meat (20%) + *Microcystis* (1%) + KLH
6. optimal food + fish meat (20%) + *Arthrospira* (1%) + placebo
7. optimal food + fish meat (20%) + *Arthrospira* (1%) + KLH
8. optimal food + fish meat (20%) + *Chlorella* (1%) + placebo
9. optimal food + fish meat (20%) + *Chlorella* (1%) + KLH
10. optimal food + fish meat (20%) + MCs (the same concentrations as in 4.+5) + placebo
11. optimal food + fish meat (20%) + MCs (the same concentrations as in 4.+5) + KLH

Účinky microcystinu (toxin sinic) – skupiny 10 a 11 → snížení hemoglobinu (A), zvýšená reakce na vakcinu (B)

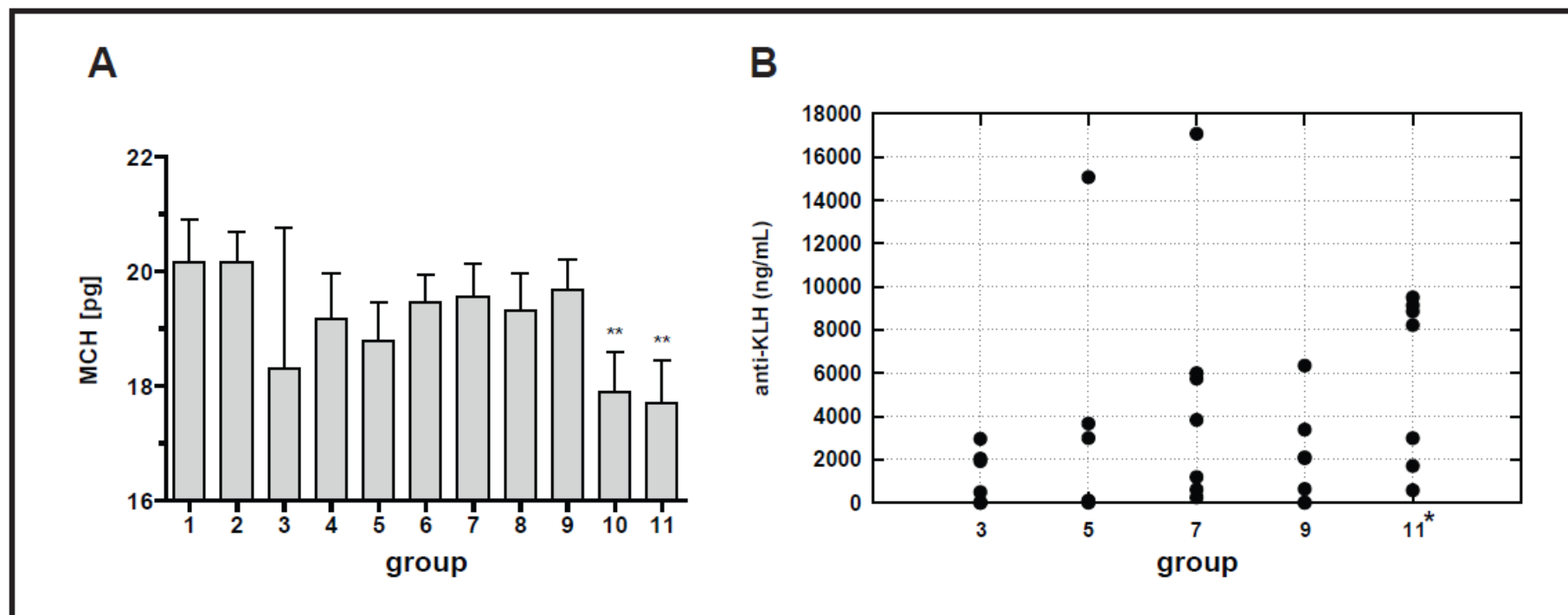


Fig. 3. (A) Effect of different exposure on the mean corpuscular hemoglobin (MCH) of rats exposed daily for 28 days with *Microcystis* cell extracts (group 3,4) or microcystins (10,11). Data are expressed as mean \pm SD, N=7.

**Statistically significant are groups 10,11 from the controls 1+2.

(B) The concentration of anti-KLH antibody (ng/mL) 21 days after immunization with KLH (200 μ g/rat). Figure shows stimulation of immune system in the group fed with food with MCs (group 11). *Significantly higher then control group 3 (ANOVA + LSD test)