

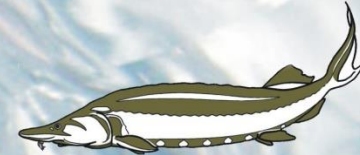
Ekotoxikologické testy jsou experimenty s různými druhy organismů (testovacích systémů), kdy sledujeme působení testované látky (toxikantu) v definovaných podmínkách prostředí.

Výsledkem je zjištění míry vlivu testované látky na testovací organismus (křivky dávka – odpověď, D-R curve) vyjádřené v hodnotách (LC, EC, NOEC aj.).

Testy toxicity by měly odpovědět na otázku, zda koncentrace testované látky bude negativním způsobem ovlivňovat funkci ekosystémů.

Testy toxicity tak mají velký význam při zavádění nových chemických látek do praxe a také při hledání a usvědčování původců havárií v povrchových a podzemních vodách.

# Testy toxicity na organizmech vodního prostředí

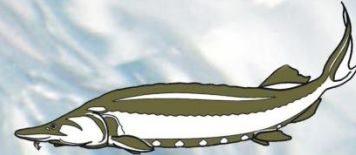


Hlavní pozornost je třeba věnovat látkám těžko rozložitelným a toxickým a rovněž látkám a přípravkům doporučovaným v rybářství a vodním hospodářství k aplikaci do vodního prostředí

Testy se dají členit podle různých kritérií:

- podle doby expozice (akutní, subakutní, subchronické, chronické)
- podle trofické úrovně (s producenty, konzumenty, destruenty)
- podle testovací matrice (voda, půda, sediment)
- podle generace testů (klasické, mikrotesty, biosenzory, biomarkery)
- podle počtu organismů (jednodruhové, vícedruhové, přírodní společenstvo)
- podle složitosti vzorku (čistě látky, směs látek, přírodní vzorky)
- podle úrovně testovaného systému (buňky a tkáně, organizmy, společenstva)

# Testy toxicity na organizmech vodního prostředí



## Postup při klasických testech toxicity:

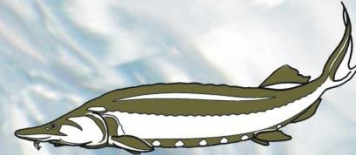
Nejdříve se provádí tzv. **limitní test**, při kterém se zjišťuje reakce testovacích organismů na koncentraci **100 mg.l<sup>-1</sup>** testovaného vzorku.

Jestliže v daném testu neuhyne žádný z testovaných organismů další testy se nevyžadují, v opačném případě nastupuje **předběžný test**.

Předběžný test se provádí s malým počtem organismů (3 ks ryb, 10 ks dafnií) v každé koncentraci a nasazuje se na široké rozmezí testované látky (0,01-100 mg.l<sup>-1</sup>).

Na základě výsledků předběžného testu se volí užší rozsah koncentrací pro tzv. základní test, z jehož výsledků se potom vypočítává hodnota LC,EC,IC.

## Testy toxicity na organizmech vodního prostředí



Počet organismů a délka testu vychází z platné legislativy a je v rámci EU sjednocována.

Součástí každého testu je kontrola, která se provádí za stejných podmínek a se stejnými organismy jako pokus.

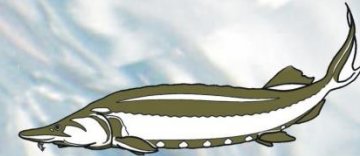
Jako ředící voda se používá voda známých fyzikálně-chemických vlastností.

Správnost postupu a citlivost použitých organismů je nutné kontrolovat za využití standardu (většinou dichroman draselný).

Vnější kontrola – ASLAB, akreditace

Při testech nutno dodržovat platnou legislativu (zákon č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání, vyhlášku č. 419/2012 Sb. o ochraně pokusných zvířat).

## Testy toxicity na organizmech vodního prostředí



Hodnocení chemických látek a přípravků se provádí dle chemického zákona č. 350/2011 Sb. a vyhlášky č. 402/2011 Sb. o hodnocení nebezpečných látek a směsí, balení a značení.

Látky se klasifikují jako nebezpečné pro životní prostředí, přiřadí se jim symbol „N“ a R-věty podle následujících kritérií:

– **R50: vysoce toxické pro vodní organizmy**

(akutní toxicita LC, EC,  $IC_{50} \leq 1 \text{ mg.l}^{-1}$ )

– **R51: toxické pro vodní organizmy**

(akutní toxicita  $1 \text{ mg.l}^{-1} < LC, EC, IC_{50} \leq 10 \text{ mg.l}^{-1}$ )

– **R52: škodlivé pro vodní organizmy**

(akutní toxicita  $10 \text{ mg.l}^{-1} < LC, EC, IC_{50} \leq 100 \text{ mg.l}^{-1}$ )

– **R53: může vyvolat dlouhodobě nepříznivé účinky ve vodním prostředí**



## Testy toxicity na organizmech vodního prostředí



Testy na **buněčných strukturách** jsou využívány především pro teoretické objasnění účinku toxické látky

Výhodou je vysoká citlivost, nízké finanční a časové nároky

Nevýhodou je nemožnost suplovat enzymaticko-imunitní systém živého organismu

Primární buněčné kultury se získávají z jednotlivých tkání ryb (nestandardní, nízká reprodukovatelnost), v současnosti se využívají stabilní buněčné linie (snadné rozpěstování, uchování v hibernovaném stavu, reprodukovatelné)

Tyto testy jsou používány pro hodnocení toxicity chemických látek, odpadních vod a tuhých průmyslových odpadů

Výsledky testů na buněčných strukturách jsou v řadě případů shodné s testy na živých organizmech

# Toxicita



Nejznámější stabilní buněčné linie používané v testech toxicity:

- RTG-1 (fibroblasty gonád pstruha duhového)
- R-1 (fibroblatické buňky jater pstruha duhového)
- PLHC-1 (jaterní buňky *Poeciliopsis lucida*)
- EPC (epithelioma papillosum cyprini)

Vyhodnocení testů buď přímo posouzením celkového počtu uhynulých buněk a rozsahu cytopatických efektů (časově náročné, subjektivní chyba)

Nebo nepřímo pomocí fyziologických reakcí buněk hodnocených na základě barevných reakcí (časová nenáročnost, možnost standardizace a miniaturizace)

# Toxicita



Většina testů se provádí na **úrovni organismů** i přes určité potíže s reprodukovatelností a s rizikem při interpretaci získaných výsledků na přírodní podmínky

Tyto testy jsou používány pro hodnocení akutní a chronické toxicity chemických látek a přípravků, odpadních vod, tuhých průmyslových odpadů, sedimentů, diagnostice otrav ryb, sledování hodnot reziduí ve vodě

Výběr organismů je prováděn tak, aby byly postiženy všechny trofické úrovně ve vodním prostředí (bakterie, řasy, planktonní organizmy a ryby)

Odpověď jednotlivých organismů na toxin není jednotná, nikdy by se neměly dělat závěry z testování pouze na jednom organismu

# Toxicita



Zapojením většího počtu testovacích organismů roste informace o zkoumaném vzorku a zvyšuje se výpovědní hodnota metody

Rozeznáváme tři generace biotestů na vodních organizmech:

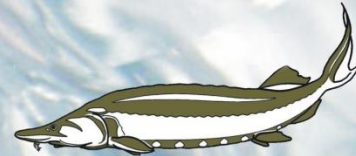
- 1. generace – tzv. klasické (standardní, konvenční) biotesty
- 2. generace – mikrobiotesty (alternativní testy toxicity)
- 3. generace – biosenzory nebo biosondy

Ekonomicky náročné, nutné zdravé a homogenní kultury

Mikrobiotesty jsou vhodná alternativa – miniaturizace, zkrácení doby inkubace (24 hodin až několik minut), možnost udržovat organismy dlouhodobě (klidová stadia, lyofilizované, imobilizované)

3. generace testů ve vývoji, předpoklad uplatnění zejména v on-line monitorovacích systémech a screeningových testech toxicity

# Toxicita



**Testy toxicity na bakteriích** – v ČR zatím nejsou v normách zahrnuty pouze v oblasti čistírenství je využíván test na inhibici spotřeby kyslíku a inhibici nitrifikace organismů aktivovaného kalu

Nejpoužívanější test v ekotoxikologii je BBTT (Microtox)-bakteriální bioluminizační test toxicity

Test využívá lyofilizovaných kultur světélkující mořské bakterie *Photobacterium phosphoreum*

Další bakteriální biotesty: (Toxi-Chromotest, Toxi-Chromopad) využívají kmen *Escherichia coli*, který je citlivý k pesticidům, mykotoxinům a těžkým kovům

EN ISO 9308-3 Jakost vod - Stanovení *Escherichia coli* v povrchových a odpadních vodách

# Toxicita



Některé testy využívají jako testovací organismus *Bacillus* sp.

POLYTOXKIT – využívá směs bakterií z aktivačních nádrží a pomocí kyslíkové elektrody se měří úbytek  $O_2$  za přítomnosti toxikantu

Bakteriální testy výhodné pro identifikaci mutagenních a genotoxických látek

Nejrozšířenější test genotoxicity – **Amesův test**

Testovací organismus *Salmonella typhimurium* (histidin-auxotrofní buňky) tzn. neschopnost syntetizovat histidin

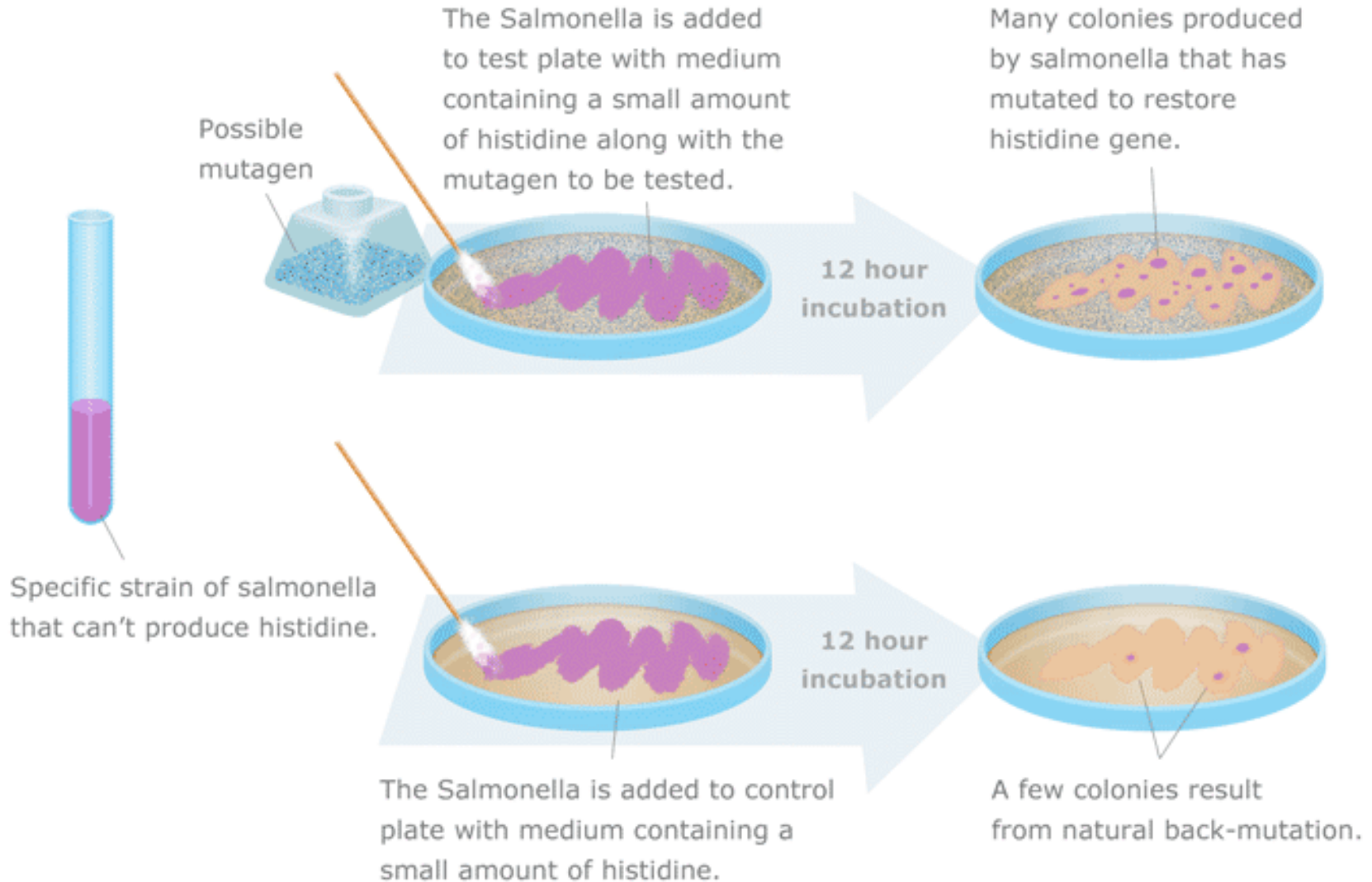
Na agaru bez histidinu, 12-72 hod.

Pokud proběhne mutace může bakterie růst.

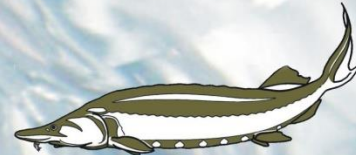
# Testy toxicity na organizmech vodního prostředí



## Ames Test



# Toxicita



**Testy toxicity na řasách** – náročné na preciznost a vybavení laboratoře, v současnosti odklon od klasických lahvových testů a rozvoj testů ve zkumavkách a serologických destičkách.

Klasický test kultivace probíhá v E-baňkách 250 ml uzavřených zátkami propouštějící vzduch, objem suspenze je 70 ml, živné médium je ISO.

Růst kultury *Raphidocelis subcapitata*, *Scenedesmus subspicatus* nebo *S. quadricauda* je měřen každých 24 hodin jako OD (optical density) při 750 nm nebo počítacem částic. Doporučuje se kontinuální míchání probubláváním nebo na třepače.

# Toxicita



Testy ve zkumavkách nejčastěji využívají 2,5 ml plastikové zkumavky, míchání 1x denně a růst řas je determinován počítačem částic nebo nefelometricky.

V současnosti jsou vyvíjeny další řasové testy ve zkumavkách.

Testy v sérologických destičkách nejčastěji s jamkami 4 ml nebo 250  $\mu$ l, kdy růst je měřen počítačem částic nebo čtecím zařízením pro SD při 750 nm popř. s fluorescenčním nástavcem.

Algaltoxkit – nová forma testu, kdy řasy jsou imobilizovány do speciální matrice ve které mohou setrvávat několik měsíců bez ztráty životaschopnosti. Matrice je v 10 cm polystyrénových kyvetách, test odpovídá směrnici OECD č. 201.

# Toxicita



V poslední době se stále častěji využívají i fyziologické a biochemické řasové testy toxicity, které sice ignorují vliv polutantů na růst řas, ale zato nejsou ovlivněny trofickými poměry testovaného vzorku.

Nejvíce se prosazují testy založené na fixaci  $\text{CO}_2$  a na iniciaci variabilní fluorescence chlorofylu.

EN ISO 8692 Kvalita vod - Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas. (72 hod., standardní osvětlení, živné medium)

ČSN 75 7746 Jakost vod - Stanovení inhibičních účinků látek na účinnost fotosyntézy (komplexy enzymů fotosyntézy ze špenátu)

ČSN EN ISO 20079 Jakost vod - Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (*Lemna minor*) - Zkouška inhibice růstu okřešku (7 dnů, standardní osvětlení, živné medium, sleduje se počet stélek)

# Toxicita



**Testy toxicity na vodních bezobratlých** – velmi různorodý soubor organismů s rozdílnou citlivostí k různým látkám.

Nejvýznamnějšími testovacími organizmy jsou buchanky, nitěnky a perloočky, které patří mezi nejcitlivější vodní organizmy k většině cizorodých látek.

Využívá se 24 (48) hodinový imobilizační test na perloočkách, kdy se hodnotí procentuální zastoupení dafnií neschopných pohybu a 21denní reprodukční test, kdy se stanovuje vliv látky na mortalitu a reprodukční schopnost dafnií.

V současnosti jsou ve světě i u nás používány testy druhé generace využívající klidová stadia bezobratlých

Testy jsou k dispozici v kompletním komerčním balení.

# Toxicita



Testovací organismus je vylíhnut z klidových stadií (cyst, efipií) během 20-24 hodin, pak proběhne 24 hodinový akutní test při teplotě 25 °C, kritériem hodnocení je mortalita.

V současnosti jsou nejvíce využívány tyto testy toxicity:

Thamnotoxkit F - využívá jako testovací organismus nižšího korýše *Thamnocephalus platyurus*. Tento test lze využívat jako alternativu ke konvenčnímu testu s perloočkami.

Rotoxkit F - využívá jako testovací organismus vířníka *Brachionus calyciflorus*. Zajímavý test pro ČR, protože testovaný vířník je běžnou součástí našich ekosystémů.

Daphtoxkit – pracuje s klidovými stadii perloočky *Daphnia magna*.

# Toxicita



EN ISO 6341 Kvalita vod - Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Zkouška akutní toxicity. (24-48 hod., standardní podmínky)

ISO 10706 Jakost vod - Stanovení chronické toxicity látek pro *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). (21 dní)

ISO 20665 Jakost vod - Stanovení chronické toxicity pro *Ceriodaphnia dubia*. (7 dní)

ISO 14380 Kvalita vod - Stanovení akutní toxicity pro *Thamnocephalus platyurus* (Crustacea, Anostraca). (24 hod.)

ISO 20666 Jakost vod - Stanovení chronické toxicity pro *Brachionus calyciflorus* během 48 h. (inhibice růstu)

# Toxicita



**Testy toxicity na rybách** – prvořadá pozornost vodní toxikologie.

Direktivy EHS a OECD (metodika v ČR je v podstatě shodná) uvádí jako testovací organizmy 8 druhů ryb mezi nimi *Brachydanio rerio*, *Poecilia reticulata*, pstruh duhový a kapr obecný.

Srovnávací testy jednotlivých druhů akvarijních ryb a pstruha duhového zjistily vyšší citlivost k polutantům u *B. rerio* ve srovnání s *P. reticulata*. Také samice *P. reticulata* jsou citlivější k polutantům ve srovnání se samci téhož druhu.

V porovnání s akvarijními rybami vyplynula výrazně vyšší citlivost Pd k polutantům. Z toho důvodu není možné nahradit velmi citlivé, ale náročné testy na Pd testy na akvarijních rybách.

# Toxicita



Akutní testy toxicity jsou prováděny po dobu 24 až 96 hodin ve statických, semistatických nebo průtočných podmínkách. Stanovení hodnoty LC50 se provádí pomocí probitové analýzy.

EN ISO 7346-1(2)(3) Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio*] - Statická metoda (obnovovací metoda, průtočná metoda).

EN ISO 15088 Jakost vod - Stanovení akutní toxicity odpadních vod pro jikry dania pruhovaného (*Danio rerio*) (48 hod.)

Prolongovaný test toxicity (směrnice OECD č. 204) - jde o 14denní semistatický nebo průtočný test (výsledek 14dLC50).

V posledním období je tento test vyžadován i u nás, především u výrobků exportovaných do států západní Evropy.

ISO 10229 Jakost vod - Stanovení subchronické toxicity látek pro sladkovodní ryby-Metoda vyhodnocení účinku látek na růstovou rychlost pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (14 nebo 28 dní)

# Toxicita



Za účelem zvýšení citlivosti se začaly k testům toxicity využívat raná vývojová stadia ryb tzv. embryolarvální testy (směrnice OECD č. 201)

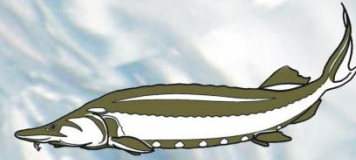
ISO 12890 Jakost vod - Stanovení toxicity pro embryonální a larvální stadia sladkovodních ryb - Semistatická metoda (96 hod.)

Pro sledování dlouhodobého působení toxických látek jsou zaváděny chronické testy toxicity, kdy výsledkem je hodnota nejvyšší přípustné koncentrace (NPK)

Výsledky z posledních let ukazují, že nejvyšší vypovídací schopnost o vlivu toxikantů na ryby mají:

- histopatologická vyšetření tkání ryb
- stanovení reziduí v tkáních ryb
- imunotoxikologická odezva ryb

# Toxicita



- Histopatologické vyšetření tkání je zaměřeno především na játra, ledviny, slezinu, žábra a mozek ryb. Změny na orgánech nejsou specifické pro individuální typ kontaminace, ale poskytnou informaci o působení celého komplexu polutantů.
- Imunitní odezva ryb na působení toxikantů byla doposud sledována velmi sporadicky a vliv těchto látek na mechanismy imunitní odpovědi ryb je velmi málo znám.
- Mezi užívané metody posouzení úrovně nespecifické imunitní odpovědi ryb patří stanovení počtu leukocytů a leukogramu, měření fagocytární aktivity, stanovení celkového množství imunoglobulinů v séru, stanovení lysozymu v séru a řada dalších.

# Toxicita

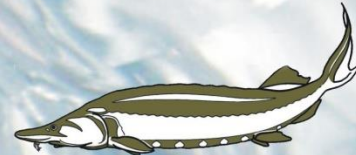


**Testy na úrovni biocenóz** – výhodou je, že toxický účinek sledujeme v přírodě samotné, nevýhodou, že změny ve složení biocenóz nemusí být vyvolány přímým účinkem sledovaného polutantu.

Testy se využívají především při sledování vlivu látek a přípravků aplikovaných do vodního prostředí (farmaka, dezinfekční prostředky, medikovaná krmiva aj.) a rovněž k sledování úbytku reziduí těchto látek.

Druhou formou testů na úrovni biocenóz je sledování dlouhodobě znečišťovaných lokalit (např. těžkými kovy).

# Toxicita



V těchto případech je prováděno průběžné chemické a biologické monitorování jednotlivých složek ekosystému (sedimenty dna, zoobentos, nárosty a ryby).

K opakované kontrole obsahu polutantů jsou určeny tzv. indikátorové druhy, většinou jde o druhy nejrozšířenější.

Biologický monitoring se v současné době začíná více využívat, jeho výhodou je schopnost vypovídat o vlivu polutantů v celém komplexu, se všemi synergistickými a antagonistickými vlivy (saprobní index).

U ryb existuje široké rozmezí fyziologických hodnot hematologických a biochemických ukazatelů a většinou nelze prakticky odlišit, zda se jedná o změny fyziologické nebo o změny vyvolané působením různých polutantů.

# Akumulační bioindikátory ve vodní ekotoxikologii



•řasa (*Ulva lactuca*)



•pramenička obecná  
(*Fontinalis antipyretica*)



•beruška vodní  
(*Asellus aquaticus*)



•chrostíci  
(*Hydropsyche* sp.)



•bahnivka rmutná  
(*Bithynia*)



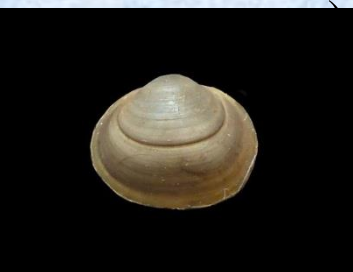
•hltanovka bahenní  
(*Erpobdella octoculata*)



•slávička mnohotvárná  
(*Dreissena polymorpha*)



•okružanka rohovitá  
(*Shaerium*)



•slávka jedlá  
(*Mytilus edulis*)



•cejn velký  
(*Abramis brama*)



•jelec tloušť  
(*Leuciscus cephalus*)



# Toxicita

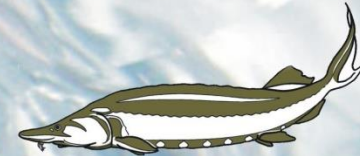


Proto jsou hledány takové „biomarkery“, které by intenzivně odrážely vliv znečišťujících látek a přitom by výrazně nepodléhaly fyziologickému kolísání.

Využívají se tyto biomarkery:

- Inhibice acetylcholinesterázy
- Poškození DNA
- Narušení procesů při tvorbě hemu (tvorba porfyrinů, inhibice dehydratázy kyseliny delta-aminolevulové (ALAD) olovem
- Stanovení hladiny methemoglobinu v krvi ryb
- Indukce vitellogeninu
- Test mikrojader (MNT)
- Hodnocení ukazatelů nespecifické odolnosti ryb
- Sledování biomarkerů oxidativního stresu u ryb
- Cytochromy P450

# Testy toxicity na organizmech vodního prostředí



Hodnoty GSH byly signifikantně zvýšeny u ryb z prostředí vodního květu sinic ve srovnání s rybami bez sinic. Na druhou stranu byly u ryb z akvárií zjištěny signifikantně nižší hodnoty GSH ve srovnání s rybami z prostředí bez sinic.

