



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Bi5595 - Základy toxikologie pro přírodovědce

Environmentální toxikologie a ekotoxikologie

Luděk Bláha

blaha@recetox.muni.cz

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Obsah bloku ENVIRONMENTÁLNÍ TOXIKOLOGIE

- **Environmentální toxikologie 1: Expozice**
 - Hlavní zdroje látek pro prostředí, hlavní skupiny látek v prostředí
 - Hlavní látky v matricích ŽP – příklady (vzduch, voda)
 - Osud látky v prostředí → Expozice
 - Rozdělování v prostředí – Kow, H
 - Transformace v prostředí – t1/2, DT50
 - Bioakumulace, Biodostupnost, Expozom
- **Environmentální toxikologie 2: Účinky na člověka**
 - Jinde v přednáškách: stejné principy, metody
- **Environmentální toxikologie 3: Ekotoxikologie**
= účinky na přírodní organismy
 - Hodnocení rizik a úloha (eko)toxikologie
 - Strategie testování (modely, trofické úrovně, baterie testů)
 - Příklady hlavních biotestů
 - Příklady využití výsledků biotestů (odvození limitů, “tiered” approach – léčiva)



Úvodem:

Ochrana přírody („environment“) před toxickými látkami je nezbytná pro zajištění “ekosystémových služeb” i zdraví a přežití samotného člověka



Příklad – VODNÍ EKOSYSTÉMY a antropogenní stres

Přímé



Nepřímé
Globální změna



Pozn: chemické látky jsou pouze jedním, a doposud málo kvantifikovaným faktorem !

Dopady



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

- **Ztráty biodiversity**
 - ? *K čemu je rozmanitost dobrá ?*



Příklad - změny v biodiverzitě



Ztráty biodiverzity



• Narušení ekosystémových služeb

- Nevyrovnané vodní cykly
 - Nedostatek vody
 - Sucha / Záplavy
- **Narušení kvality vody**
 - **Pitná voda**
 - **Koupací vody**
 - **Toxické látky v potravních řetězcích**
- Nedostatek potravy
 - Přímé → ryby (EDCs, overfishing)
 - Nepřímé → výnosy na polích
- Ekonomické dopady



Účinky na biotu → globální dopady

Míchání oceánů

→ Ochlazování atmosféry

[Nature 447, p.522, May 31, 2007]



Mořský život přispívá až 50% k mechanické energii potřebné k promíchání teplých vod z povrchu do hlubších vrstev oceánů

[Dewar, Marine Res 64:541 (2006)]

[Katija a Dabiri, Nature 460:624 (2009)]



Životní prostředí a chemické látky

(zdroje a typy znečištění, osud látek v prostředí, biodostupnost, bioobohacování látek v potravních řetězcích).



ENVIRONMENTÁLNÍ TOXIKOLOGIE

Multidisciplinární vědecká disciplína, která se zabývá škodlivými vlivy různých agens v prostředí (chemické, fyzikální, biotické) na živé organismy.

“Často se vysvětluje jako studium toxických látek v prostředí na zdraví člověka”

VS

EKOTOXIKOLOGIE

Věda studující toxické efekty v přírodě, u přírodních organismů, zejména efekty v populacích a společenstvech

(**nehumánní toxikologie**) [Truhaut 1979]

Oba pojmy se velmi často zaměňují, prolínají ...



Ekotoxikologie vs. Toxikologie

Toxikologie	Ekotoxikologie
Cílem chránit člověka před toxickými látkami	Cílem chránit populace mnoha druhů
Vždy vychází ze zvířecích modelů (testování na člověku ?)	Může využít přímého testování citlivosti druhů
Člověk je dobře charakterizován – menší chyby při extrapolacích	Jednotlivé druhy jsou velmi rozdílné – míra nejistoty při extrapolacích velká
Testovací organismy i člověk jsou teplokrevní – dobrá predikce účinků	Mnoho studenokrevných živočichů, mnoho rostlin !, bakterií !
Jednoduché dávkování a měření toxicity (výsledek LD50)	Nejednotné dávkování (vnější, vnitřní), koncentrace ve vnější vodě není stejná s dávkou v těle ...
Dobře charakterizované mechanismy působení	Méně informací o biochemických mechanismech
Dobře standardizované testovací metody	Mnoho metod, málo standardních, ? predikce efektů v ekosystémech ?



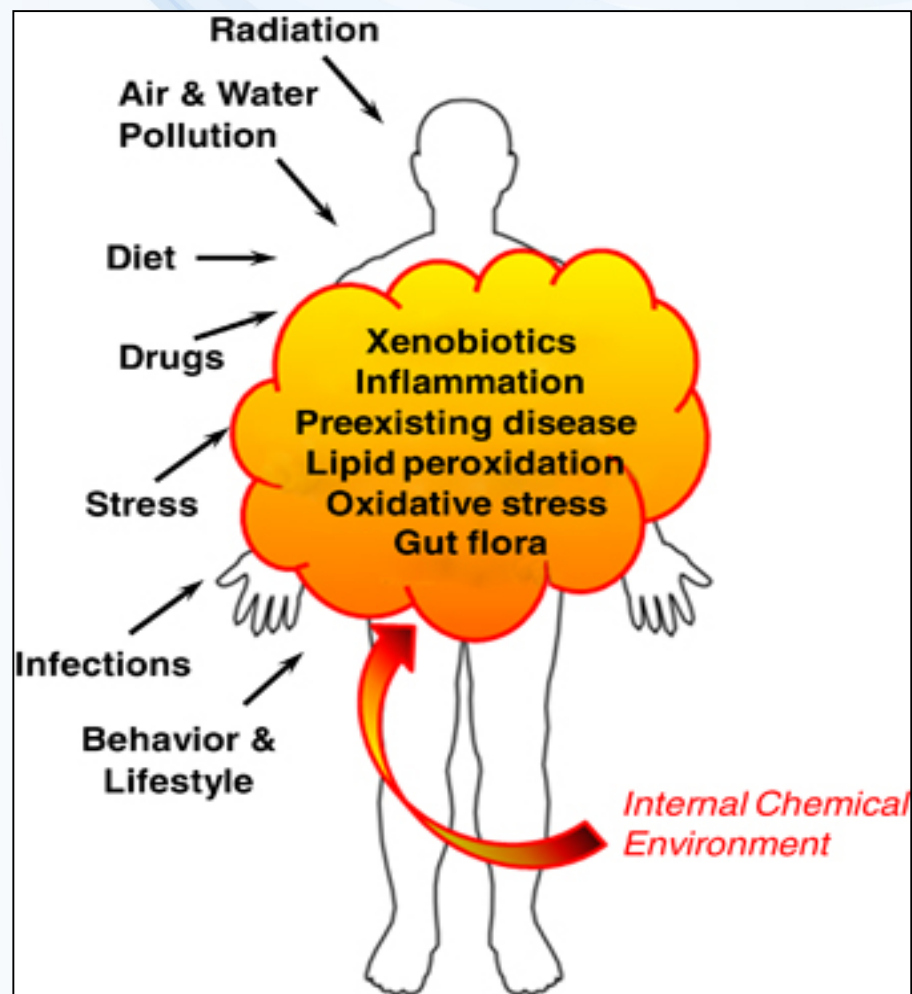
ČLOVĚK a expozice významným environmentálním toxikantům



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

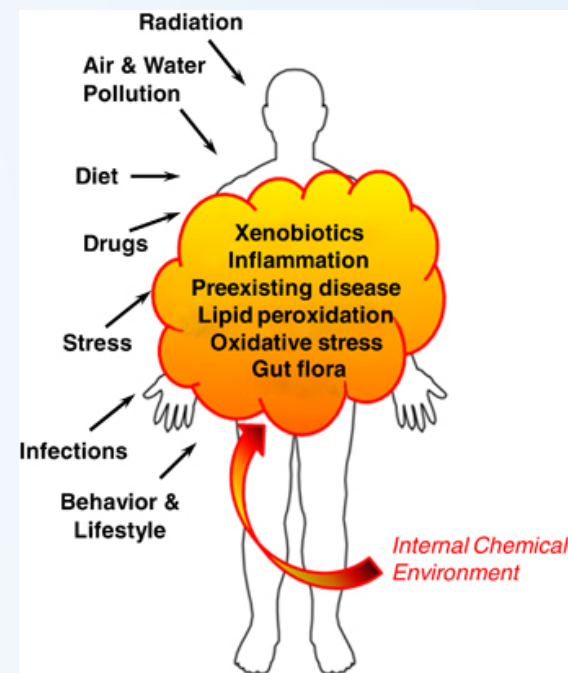
Celoživotní expozice člověka všem stresovým a nebezpečným faktorům “EXPOZOM (exposome)”

→ Škodlivé účinky
= TOXICITA



Chemické látky v hlavních složkách “prostředí” člověka

- **Potraviny** a potravní řetězce (viz jiná část přednášek):
 - Pesticidy, Toxické kovy, Veterinární léčiva ... a další
- **Ovzduší**
 - Prachové částice – vazba různých látek
 - Organické látky v ovzduší - PAHs, POPs (PCBs, PCDD/Fs, DDTs atd)
 - Další toxické látky v ovzduší – NO_x, SO_x, O₃
 - **SMOG (smoke and fog)**
 - Vnitřní prostředí – Bromované zhaševče hoření atd (PBDE/Fs)
- **Pitná voda**
 - Toxické kovy, patogeny ...
 - Organické mikropolutanty (pesticidy, léčiva – viz dále)
 - Toxiny sinic (viz dále)
- **Velký nevyřešený problém:**
SMĚSI + spolupůsobení faktorů
= Charakterizace EXPOZOMu



Hlavní ZDROJE a vstupy toxických látek do prostředí

- průmysl, produkty motorů, výroba energie
- odpadní komunální vody
- splachy z povrchů (silnice, střechy, nátěry ...)
- průmyslové odpadní vody
- pevné městské a průmyslové odpady - skládky / spalování
- zemědělské činnosti

Každý zdroj - určité charakteristické skupiny chemických látek

Příklad: Odpadní komunální vody (ČOV): Primárně vliv na vodní ekosystém

- 1) Netoxické organické látky (fekální znečištění)
- 2) Další skupiny toxických chemických látek
 - Domácí chemie (detergenty, změkčovadla, vůně)
 - Léčiva
 - Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs)
 - Chlorované látky
 - Toxické kovy
 - Polychlorované dibenzo-p-dioxiny a furany (PCDD/Fs)

TYPY zdrojů

- BODOVÉ
- LINIOVÉ (dopravní stavby apod.)
- DIFÚZNÍ – rozptýlené (zemědělství)



• Environmentální toxikanty

– podle „biologických“ vlastností

Pesticidy	Toxické pro nežádoucí organismy („pests“)	DDT, parathion, glyfosát (round-up), atrazin
Insekticidy	Toxické pro hmyz/členovce	DDT, parathion
Herbicidy	Toxické pro rostliny	2,4-D, glyfosát, atrazin
Fungicidy	Toxické pro houby/plísně	Pesticidy s toxickými kovy (Hg, Cu)
Rodenticidy	Toxické pro hlodavce	Kyanid
Karcinogeny	Indukují rakovinu	Benzo[a]pyren
Reprodukčně toxické	Vliv na rozmnožování	Ethinyl-estradiol
Endokrinní disruptory	Vliv na hormonální aparát	Ethinyl-estradiol, tributylcín



• Environmentální toxikanty

– podle „fyzikálně-chemických“ vlastností

Lipofilní (hydrofobní)	Rozpustné v tucích / málo rozpustné ve vodě	DDT
Hydrofilní	Rozpustné ve vodě	Fenol, moderní insekticidy
Neutrální organické látky	Látky bez náboje (neionizují se)	DDT, PCB
Radioaktivní látky	Nestabilní, rozpad a uvolnění záření	Radon
Surfaktanty, detergenty	Látky snižující povrchové napětí na rozhraní dvou fází	Nonylfenol, alkybenzen sulfonáty
Persistentní látky	Velmi dlouhý život v prostředí (nedegradují se)	DDT, PCB
Mošusové látky (musks), parfémy	Používané jako „vůně“ nebo regulátory zápachů	



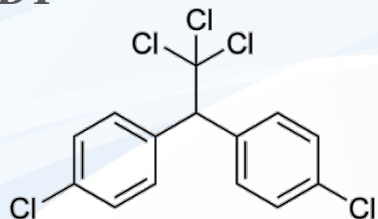
• Environmentální toxikanty

– podle „chemické struktury“

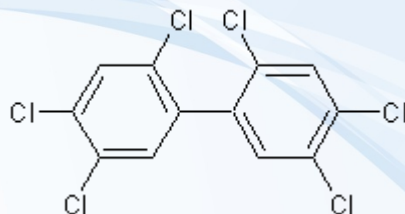
Chlorované uhlovodíky, organochlorové látky	Chlorohydrocarbons, organochlorines	DDT, PCB, PCDD/Fs
Polychlorované bifenyly (PCB)	Polychlorinated biphenyls	PCB153
Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)	Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)	Benzo[a]pyren
Polychlorované dibenzo-p-dioxiny („dioxiny“) a – furany	Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and -furans (PCDD/Fs)	2,3,7,8-TCDD
Těžké kovy, toxické kovy	Heavy metals	Hg, Pb, Cd (+ další)
Organokovové látky	Organometallics	Alkyl-cíny
Organofosfáty	Organophosphates (OPs)	Látky (insekticidy) – např. parathion
Pyrethroidy	Pyrethroids	Insekticidy/repelenty odvozené z látek produkovaných v květinách (zejm. Asteraceae) – např. cypermethrin



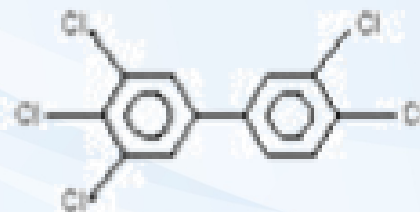
DDT



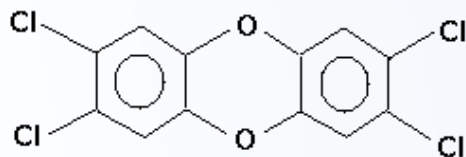
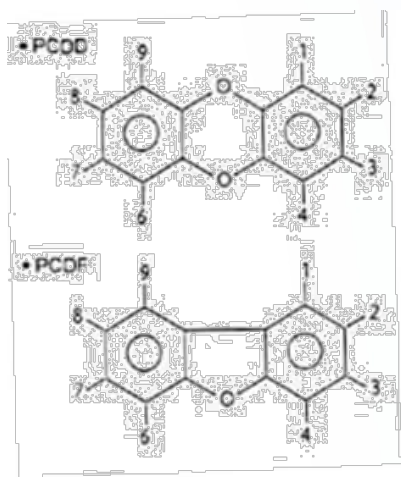
PCB153 (velmi častý)



PCB126 (toxický - koplánární)

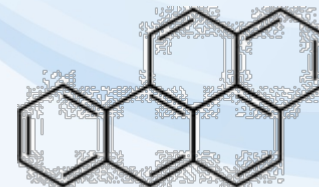


Polychlorované dioxiny a furany

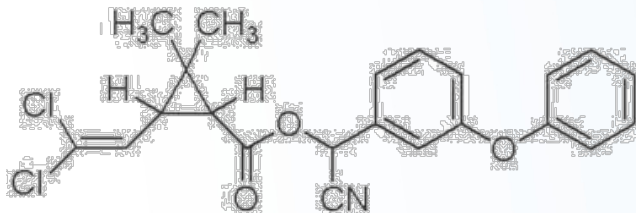


2, 3, 7, 8 - p - TCDD

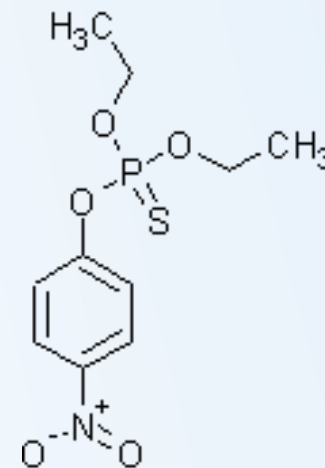
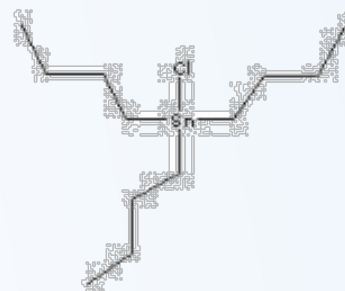
Benzo[a]pyren – zástupce PAHs



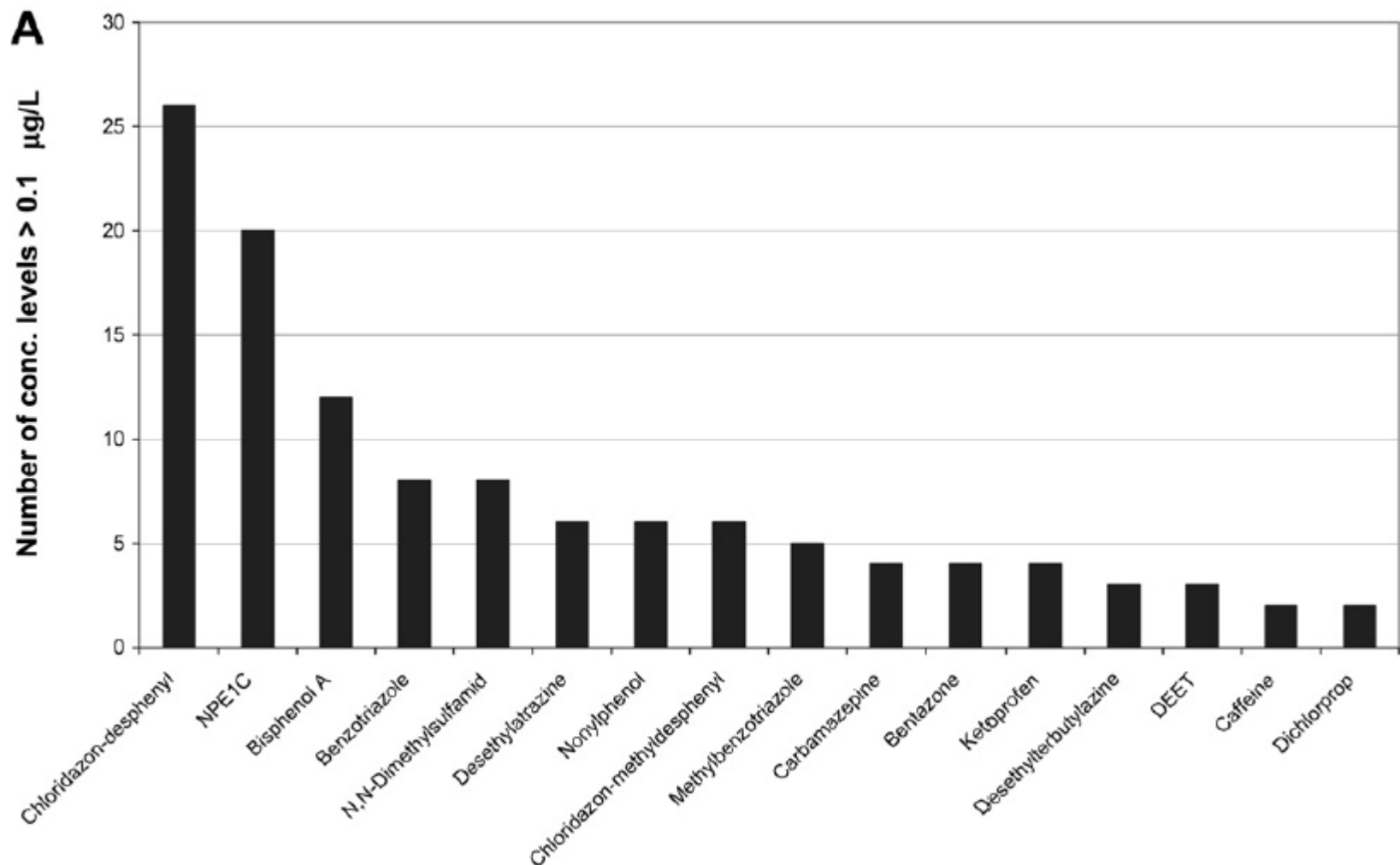
Cypermethrin



Tributyl-cín chlorid



Podzemní voda – pesticidy, repelenty, léčiva, bisfenol-A ...



Loos et al. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants **in ground water** (Water Research 44, 2010, 4115-4126)



ENVIRONMENTÁLNÍ OSUD toxických látek



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Riziko látky v prostředí – které parametry ho podmiňují/určují?

*Schematický obrázek –
shrnuje pojmy vysvětlené v
další části přednášky*

RIZIKO (např. Úbytek populace ryb v ČR)

Vlastnosti látky NEBEZPEČNOST

Vstupuje do ryby? (**biokoncentrace**)
Může se **bioakumulovat**?
Koncentruje se v potravní pyramidě
(**bioobohacování**)?
Je pro ryby **nebezpečná/toxická**?
Jakým mechanismem/typem toxicity?

Při jakých koncentracích ?



Situace v prostředí EXPOZICE

Je látka ve vodě? (**osud**)
Je ve formě dostupné pro ryby?
(**biodostupnost**)




Jaká je biodostupná
koncentrace?

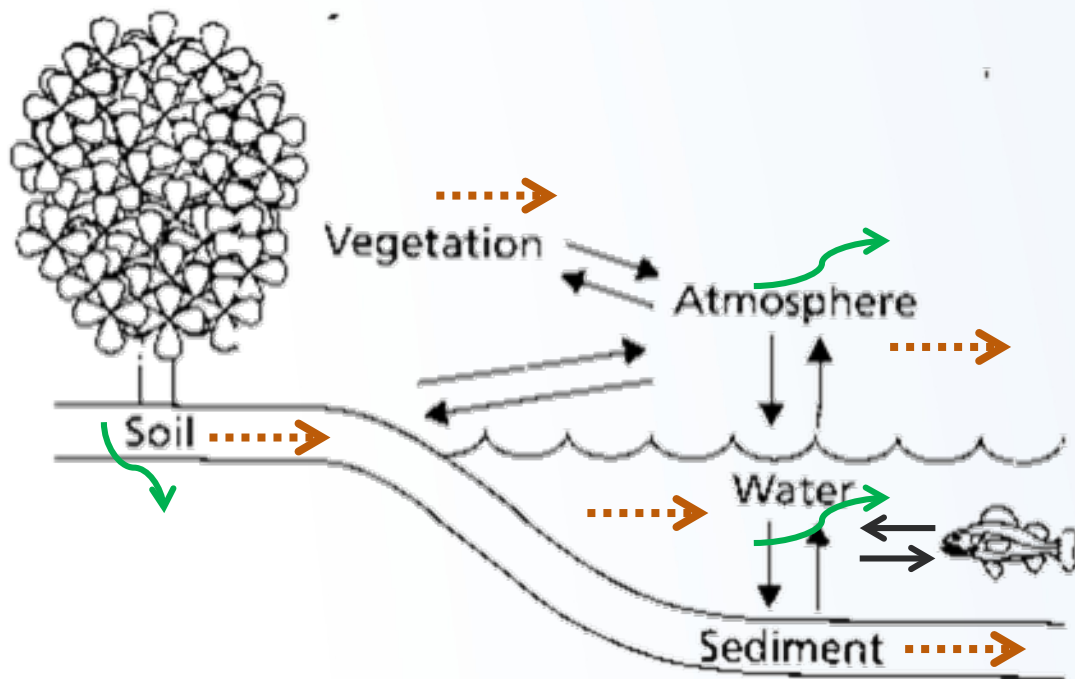


OSUD látky v prostředí určuje míru EXPOZICE

ENVIRONMENTÁLNÍ OSUD (fate) popisuje

- ? V kterých složkách prostředí se látka nachází
- ? Jak se uvnitř složek pohybuje
- ? Jak se uvnitř složek přeměňuje

ROZDĚLOVÁNÍ mezi složky 
TRANSPORT – např. vzduchem 
TRANSFORMACE 
– chemické a biologické



EXPOZICE (exposure)

Míra vystavení organismu látce (v určité koncentraci, po určitou dobu atd = *Expoziční scénáře*)

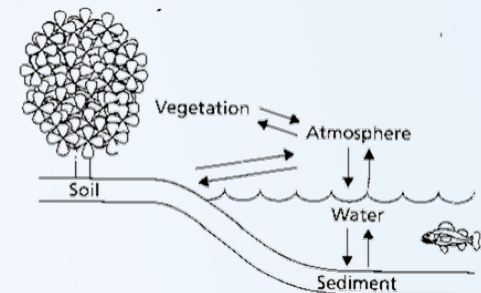


Které parametry určují jaký bude osud chemické látky?

	ROZDĚLOVÁNÍ	TRANSPORT	TRANSFORMACE
Vlastnosti látky	Polarita vs hydrofobicitá (K_{ow} , rozpustnost ve vodě) Těkavost, bod varu, vypařování (H , bod varu) Reaktivita vs stabilita a persistence (t_{1/2})		
Vlastnosti prostředí	Proudění (rychlost, směr, typ ...) Teplota Světlo (a jeho parametry) Chemické složení pH (volné H ⁺) Redox potenciál (... přítomnost O ₂) Přítomnost anorganických iontů / výměnných míst (např. jílu) Částice – typ, velikost, množství Organický materiál – typ, množství (humínové látky atp.)		
Voda			
Sedimenty			
Půda			
Atmosféra			
Vlastnosti bioty vegetace, konzumenti ...	Počet / Pohyb / Velikost (povrch) / Množství (%) tuku / Stupeň v trofické pyramidě atd. atd.		

K_{ow}, H, t_{1/2}

Kombinace uvedených parametrů určí osud a výslednou expozici organismů



Které parametry látek jsou především klíčové s ohledem na riziko **EKOTOXICITY** ?

- **1) Tendence vstupovat do organismů**
 - vyšší **hydrofobicita** (tuky v organismech)
 - rozdělovací koeficient oktanol/voda (**K_{ow}**, logP)
- **2) Stabilita (persistence, pomalá degradace)**
 - dlouhodobé působení v prostředí
 - poločas života (**t_{1/2}**)
- **3) Toxické účinky v organismech**

... o každé z vlastností musíme něco vědět

1+2 - v této části kurzu
3 – ostatní přednášky



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Vstup látky do bioty (přestup z prostředí do organismu)

- **Distribuce látky mezi složkami prostředí**

- Rozdělovací procesy mezi složkami prostředí (kompartmenty/matrice/fáze)

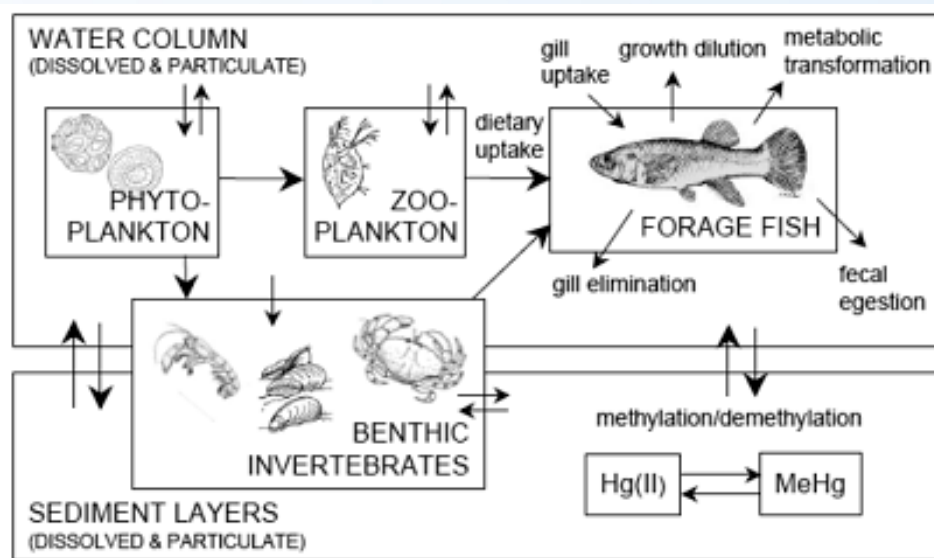
- biota/atmosféra
- půda/atmosféra

- sediment (půda) / voda
- voda/atmosféra

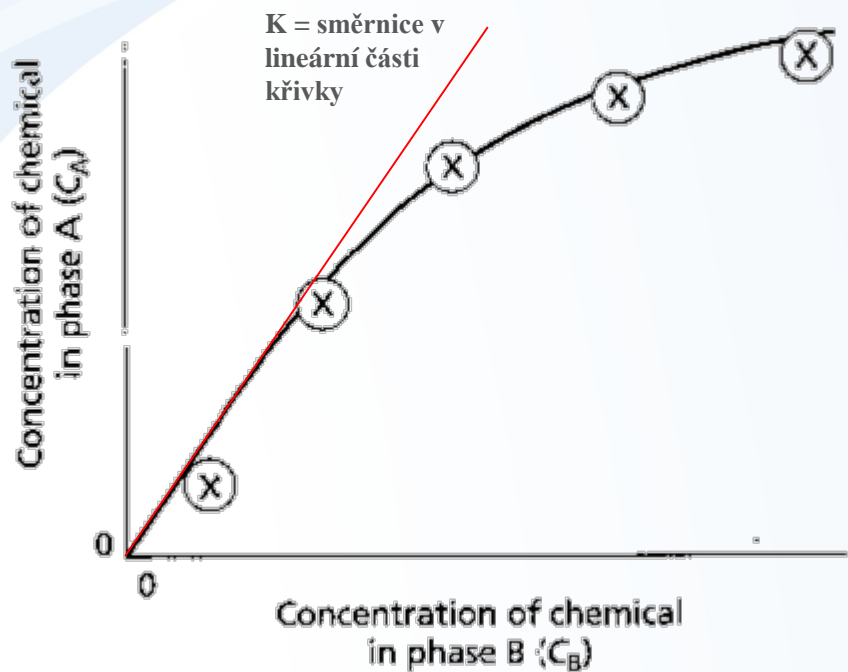
- **Jednou ze složek je BIOTA**

- důležité jsou procesy rozdělování “prostředí \leftrightarrow biota”

- Atmosféra / biota
- Voda / biota
- Sediment / biota
- Půda / biota
- Biota (potrava) / Biota (predátor)



Rozdělovací procesy mezi fázemi v ROVNOVÁZE odpovídají kinetice prvního řádu – popis *Freundlichova rovnice*



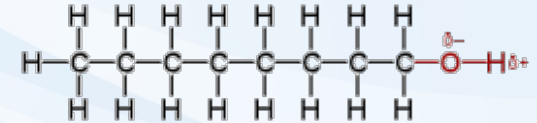
- **$C_A = K \cdot C_B^{1/n}$**
C - koncentrace ve fázích A (C_A) a B (C_B)
K - rozdělovací konstanta
n - konstanta nelinearity
- V případě lineárního vztahu ($n=1$)
 $K = C_A / C_B$
= “rozdělovací koeficient”
 - Velikost K určuje tendenci přechodu látky z fáze B do fáze A
- Z praktického experimentu (*rozdělování látky mezi dvě fáze*) lze odečíst příslušné konstanty
 $\log C_A = 1/n \cdot \log C_B + \log K$



Model rozdělování “Biota-Voda”

- **Rozdělovací koeficient BIOTA / VODA**

- je náročné stanovit
(*standardní postup – stanovení biokoncentrace: viz dále*)
- Alternativa - využití modelu s **n-oktanolem**



- **N-oktanol**

- Nemísí se s vodou, obdobné vlastnosti jako tuky či fosfolipidy biologických membrán

- **Rozdělování n-oktanol/voda**

- **Kow** – rozdělovací koeficient
- Charakterizuje HYDROFOBICITU (resp. LIPOFILICITU)
- Časté vyjádření jako logKow (resp. logP)

Experimentální stanovení Kow

System
n-oktanol/voda + přidání látky



Třepání do ustavení
rovnováhy

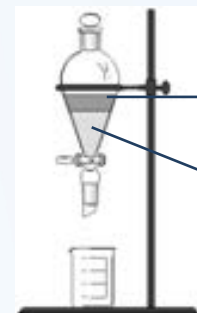
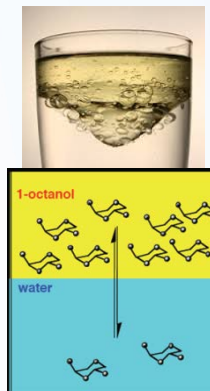
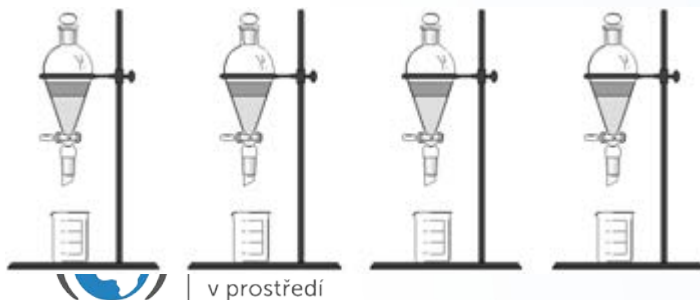


Chemická analýza
koncentrací

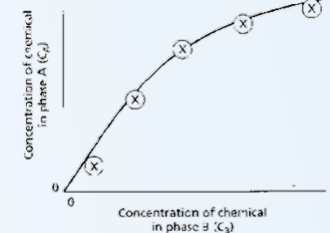


Výpočet Kow

4 různé počáteční koncentrace



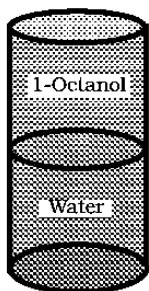
n-oct
water



Kow – příklady

Látka	Kow	logKow (logP)	K_bioakumulace (experimentální)
Lindane	5 250	3.72	470
DDT	2 290 000	6.35	1 100 000
Arochlor 1242 (PCB)	199 600	5.30	3 200
Naftalen	3 900	3.59	430
Benzen	135	2.13	13

Hydrophobicity



Measured as Water/Octanol
Partition Coefficient (P)

$$\log P_A = \log \frac{[A]_{1\text{-octanol}}}{[A]_{\text{water}}}$$

log P > 0 lipid phase
log P < 0 water phase

$$\log BCF = \log Kow - 1.32$$

Bioakumulace, Biokoncentrace, Bioobohacování

Biokoncentrace

Míra příjmu látky do organismu (ryby) z vody

BCF – Bioconcentration factor

$$BCF = \frac{Concentration_{Biota}}{Concentration_{Water}}$$

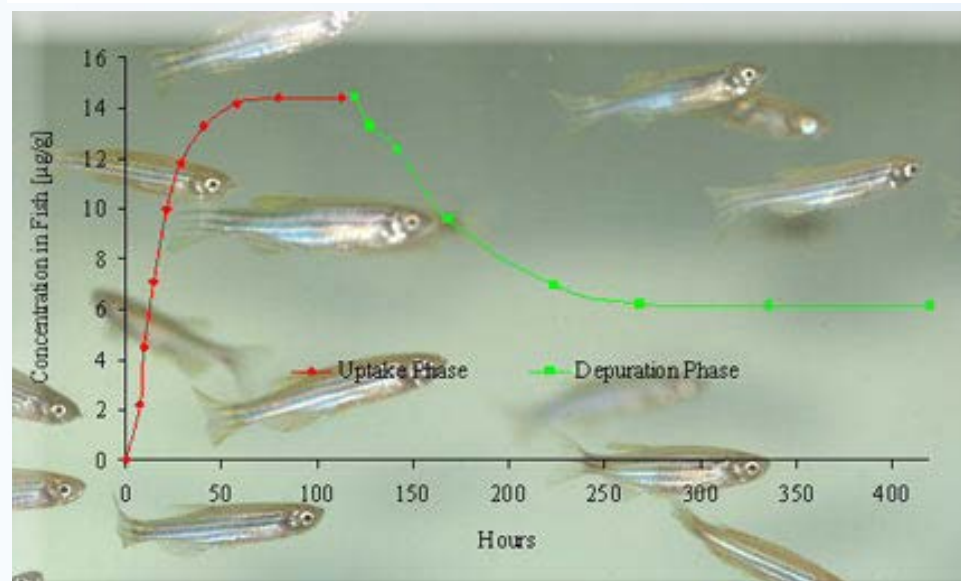
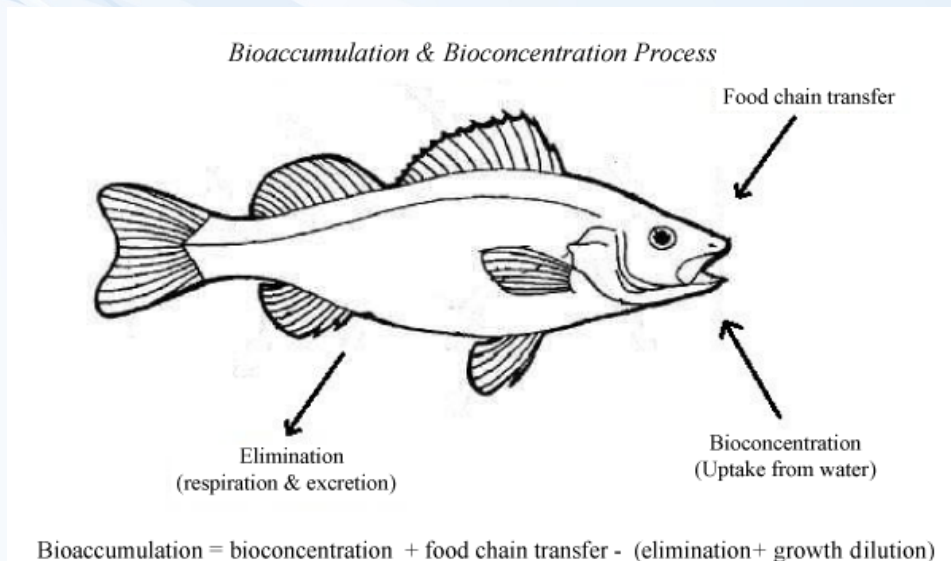
Experimentální stanovení

Testy s rybami (standard OECD 305)

Dlouhé, náročné testy, testy s rybami in vivo

BCF lze predikovat z K_{ow}

$$\log BCF = \log K_{ow} - 1.32$$



Bioakumulace, Biokoncentrace, Bioobohacování

Bioakumulace

Akumulace látky (všechny cesty expozice)

BAF – Bioaccumulation factor

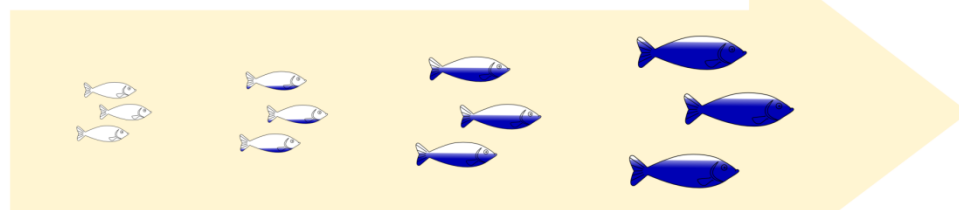
$$\text{BAF} = \frac{\text{Concentration of HM in dry fish tissue (mg Kg}^{-1}\text{)}}{\text{Concentration of HM in rivulet water (mg L}^{-1}\text{)}}$$

Bioobohacování (Biomagnification)

Zvyšování koncentrací látek v organismech v potravním řetězci

BMF – Biomagnification factor ($C_{\text{predator}}/C_{\text{food}}$)

Bioaccumulation



Contaminant Levels

T I M E

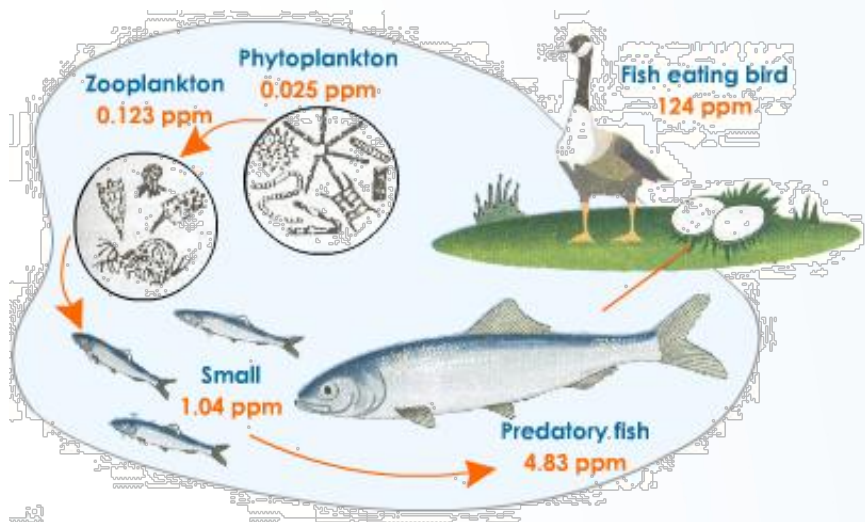


Contaminant Levels

Biomagnification



Bioobohacování (Biomagnification)



Process of Biological Magnification:
DDT concentrations increase in organisms along the food chain

(a) Freshwater Lakes in Southern Sweden

	phytoplankton	zooplankton	juvenile fish
PCB 153 (7.1)	60 (25 - 170)	48 (25 - 125)	180 (90 - 500)

(b) Fjord in Northern Norway

	sandeel (whole fish)	cod (liver)	seal (blubber)
Σ DDT (7.6 - 7.9)	60 (30 - 130)	200 (100 - 470)	2000 (600 - 7800)
PCB 153 (7.1)	25 (10 - 60)	95 (45 - 300)	1200 (550 - 2800)
HCB (5.1)	4 (2 - 8)	60 (40 - 70)	95 (90 - 100)
Σ HCH (3.8)	40 (25 - 60)	30 (20 - 40)	65 (5 - 200)

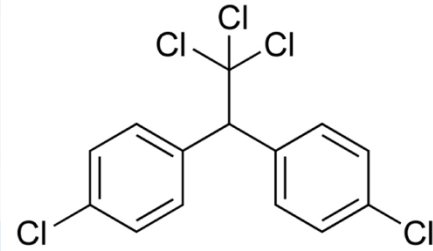
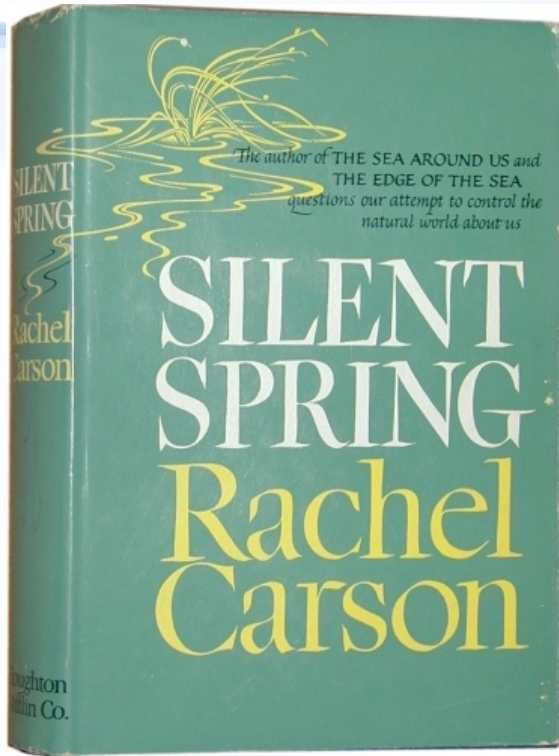
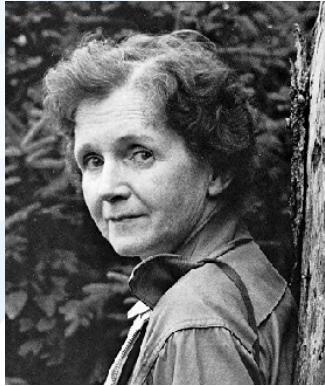
(c) Bobio River in Chile

	various fish	various water birds
Σ DDT (7.6 - 7.9)	890 (480 - 1340)	1570 (970 - 2350)
PCB 153 (7.1)	80 (50 - 130)	550 (400 - 700)
HCB (5.1)	25 (10 - 35)	50 (25 - 75)
Σ HCH (3.8)	150 (80 - 360)	45 (24 - 94)

Average values of lipid-normalized concentrations (ranges in parentheses) of some organochlorine compounds: PCB153, Σ DDT = *o,p*-DDT + *p,p*-DDT = *o,p*-DDE = *p,p*-DDE, Σ HCHs = α - + β - + δ -hexachlorohexane, and HCB = hexachlorobenzene in organisms belonging to some food chains ($\log K_{ow}$ values are given in parentheses)



1962



"DDT is good for me-e-e!"

The great expectations held for DDT have been realized. During 1946, exhaustive scientific tests have shown that, when properly used, DDT kills a host of destructive insect pests, and is a benefactor of all humanity.

Pennsalt produces DDT and its products in all standard forms and is now one of the country's largest producers of this amazing insecticide. Today, everyone can enjoy added comfort, health and safety through the insect-killing powers of Pennsalt DDT products . . . and DDT is only one of Pennsalt's many chemical products which benefit industry, farm and home.

GOOD FOR STEERS—Beef grows healthier nowadays . . . for it's a scientific fact that—compared to untreated cattle—beef steers gain up to 50 pounds extra when protected from horn flies and many other pests with DDT insecticides.

KEEP FOR THE HOME—helps you to make healthier, more comfortable homes . . . protects your family from dangerous insect pests. Use Knox-Out DDT Powders and Sprays as directed . . . then watch the bugs "bite the dust"!

GOOD FOR FRUITS—Bigger apples, juicier fruits that are free from smugly worms . . . all benefits resulting from DDT dusts and sprays.

KEEP FOR DAIRIES—Up to 20% more milk . . . more butter . . . more cheese . . . tests prove greater milk production when dairy cows are protected from the annoyance of many insects with DDT insecticides like Knox-Out Stock and Barn Spray.

GOOD FOR ROW CROPS—25 more barrels of potatoes per acre . . . actual DDT tests have shown crop increases like that! DDT dusts and sprays help truck farmers pass these gains along to you.

KEEP FOR INDUSTRY—Food processing plants, laundries, dry cleaning plants, hotels . . . dozens of industries gain effective bug control, more pleasant work conditions with Pennsalt DDT products.

PENN SALT CHEMICALS
 87 Years' Service to Industry • Farm • Home
 PENNSYLVANIA SALT MANUFACTURING COMPANY
 WIDENER BUILDING, PHILADELPHIA 7, PA.



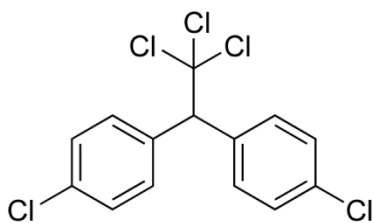
Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

<http://www2.ucsc.edu/scpbrg/>

Bitman et al. *Science* 1970, 168(3931): 594

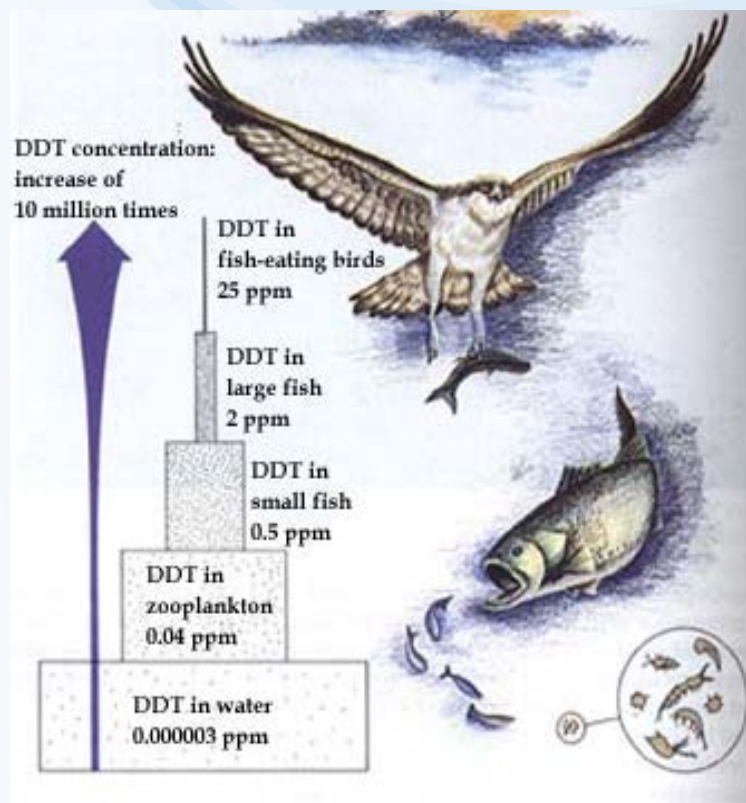


Biochemie: ptačí karbonátdehydratáza



In situ: bioakumulace
→ **úbytek populací ptáků**

In vivo: měknutí vajíček



Rozdělování ATMOSFÉRA / VODA



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Rozdělování ATMOSFÉRA / VODA

- ionizované látky se do atmosféry nevypařují
- významné rozdělování (opět) u **organických neutrálních látek**
- rozdělování mezi vodnou a kapalnou fází popisuje Henryho zákon:

$$p = H \cdot C_W$$

p - parciální tlak látky (Pa)

H - Henryho konstanta ($\text{Pa} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$) - *charakteristická pro danou látku*

C_W - koncentrace ve vodě ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$)

Pozn: ukazatelem "volatility" je např. také bod varu látky

H (Pa . mol ⁻¹ . m ⁻³)	Charakteristika
> 100	Velmi rychle se uvolňují z vody Příklad: halogenované alifatické uhlovodíky (dichlorethan apod.)
25-100	Volatilizace pomalejší Příklad: chlorované benzeny
1-25	Pomalá volatilizace Příklad: většina PCBs
< 1	Nevýznamná volatilizace Příklad: vysocechlorované PCDDs



Environmentální transformace / Persistence



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Přeměny látek v prostředí – (bio)transformace

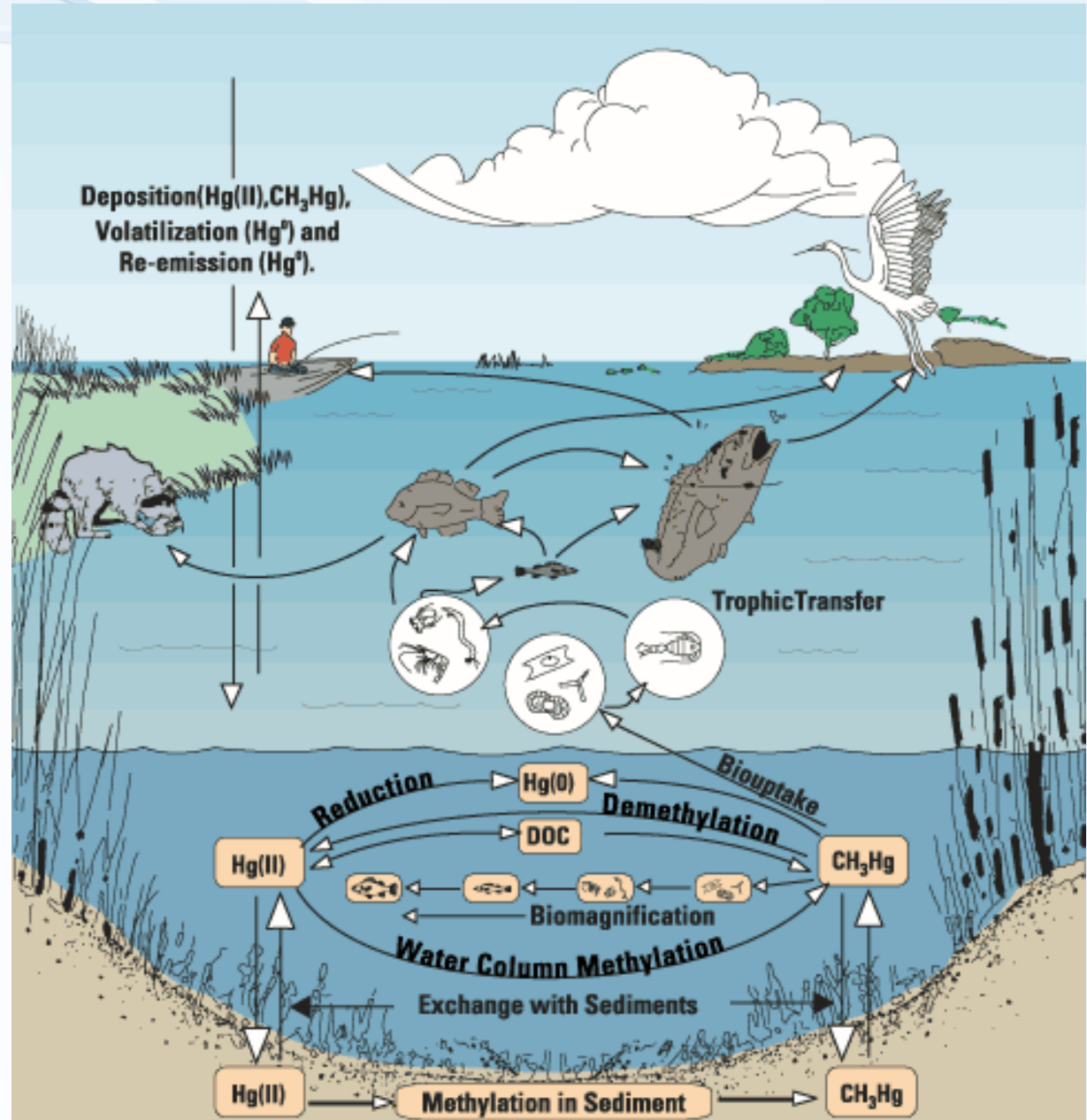
- **Typy transformací organických látek:**
 - částečná změna struktury (např. vstup OH do neutrální mk)
 - degradace na menší organické molekuly
 - úplná degradace org. látky (CO₂, H₂O)
- **Hlavní procesy**
 - **Chemické** - dle typu prostředí
 - atmosféra – fotochemické reakce, reakce s kyslíkem (!)
 - voda – hydrolyza, oxidační reakce
 - anoxické prostředí (sedimenty, podzemní voda) – redukční reakce
 - **Biotické (enzymatické)**
 - **Úplná biotransformace** („Ready biodegradability“)
 - látka je využívána mikroorganismy jako zdroj uhlíku → produkce CO₂
 - **Kometabolizace**
 - mikroorganismy potřebují jiný (hlavní) zdroj C (transformace látky v rámci „vedlejších“ procesů)
- **Výsledek transformace**
 - netoxické produkty
 - tvorba ještě toxičtějších produktů (! př. Hg → methyl-Hg)
- **Biodegradabilita vs Persistence**
 - Látky polární a reaktivní – zpravidla krátký poločas života
 - Halogenované, neutrální látky – persistentní v prostředí



Anaerobní biotransformace – příklad methyl-rtuť

Me-Hg

- Bioakumulace
- Vysoká toxicita



Charakterizace persistence – poločas života

- Kinetika transformace - kinetika prvního řádu

$$- C_t = C_0 \cdot e^{-kt}$$

C_t - koncentrace v čase t

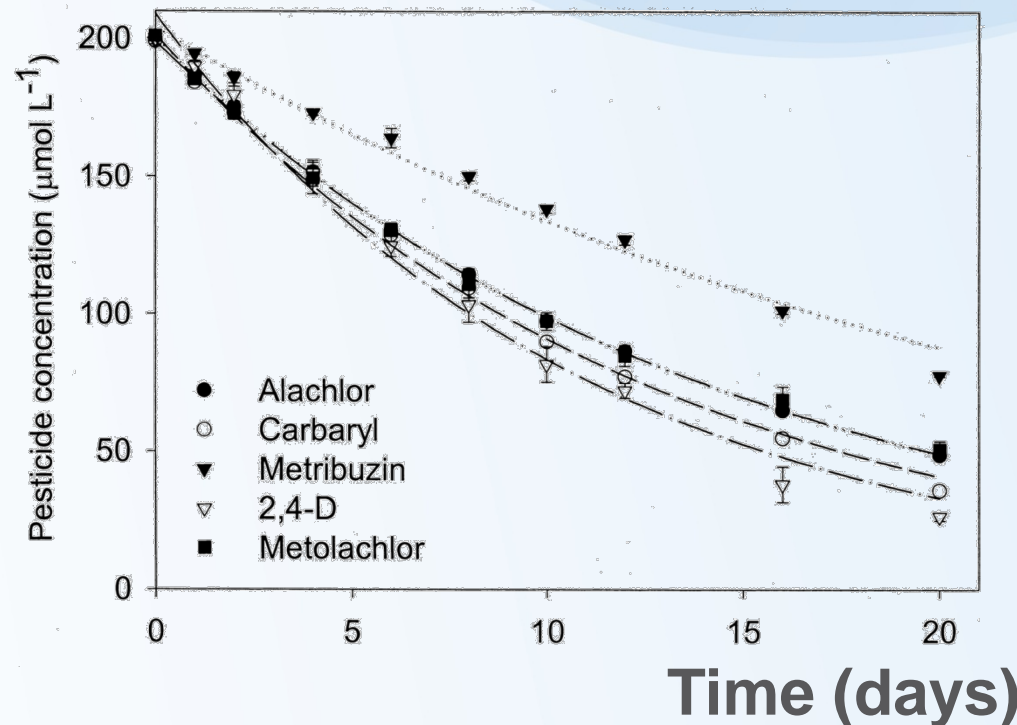
C_0 - počáteční koncentrace

k - konstanta (rychlost degradace)

t – čas

- Po odvození (poločas života, half-life)

$$t_{1/2} = \ln 2 / k = 0.693 / k$$



Poločas života vybraných pesticidů v půdě - příklady

Látka	Poločas života v půdě (roky) <i>($t_{1/2}$, resp. DT50 – disappearance time 50%)</i>
Chlorované látky	
DDT	3-10
Dieldrin	1-7
Toxafen	10
Organofosfát – chlorfenos	0,2
Karbamát – carbofuran	0,05 – 1



Osud (procesy) v prostředí → Expozice: BIODOSTUPNÁ látka

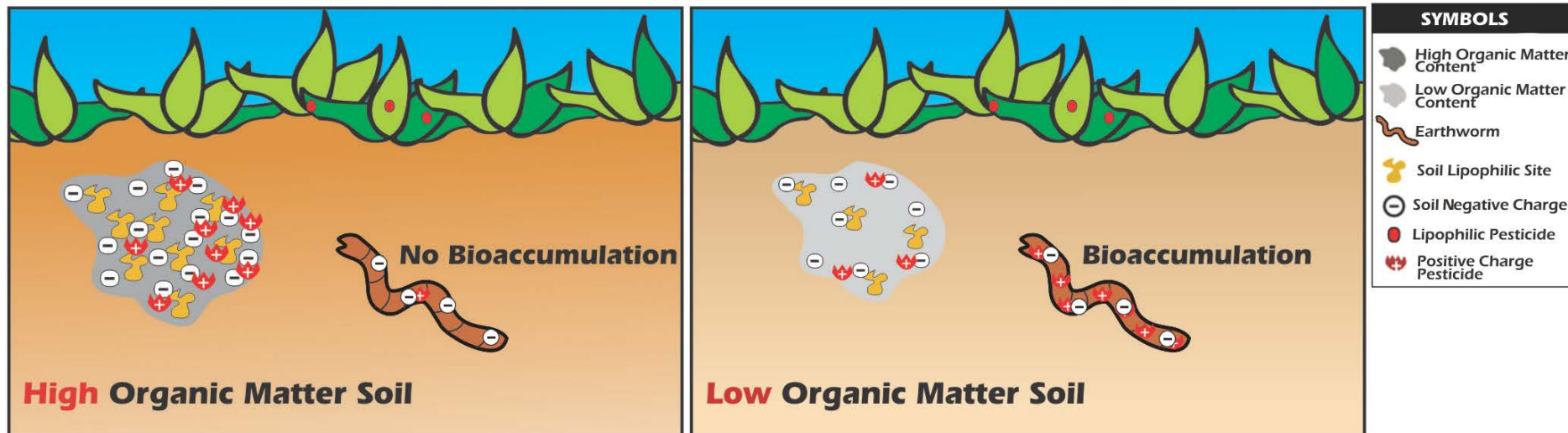


BIODOSTUPNOST

- **Pojem původně z farmakologie**
 - frakce látky, která je v těle účinná
- **V environmentálních vědách**
 - frakce látky, která může být přijata do organismu = látka je ve formě, která je dostupná (není tedy vázána v prostředí - např. na organický uhlík apod.)
- **Biodostupnost popisuje procesy (vztahy) mezi**
 - Látkami přítomnými v prostředí
 - Vstupem (akumulací) látek do organismů
 - Vlastnostmi prostředí

Příklad - Půda

dvě rozdílné půdy (vysoký a nízký obsah organického uhlíku)
biodostupnost (a tedy i bioakumulace) je vyšší v případě “low”



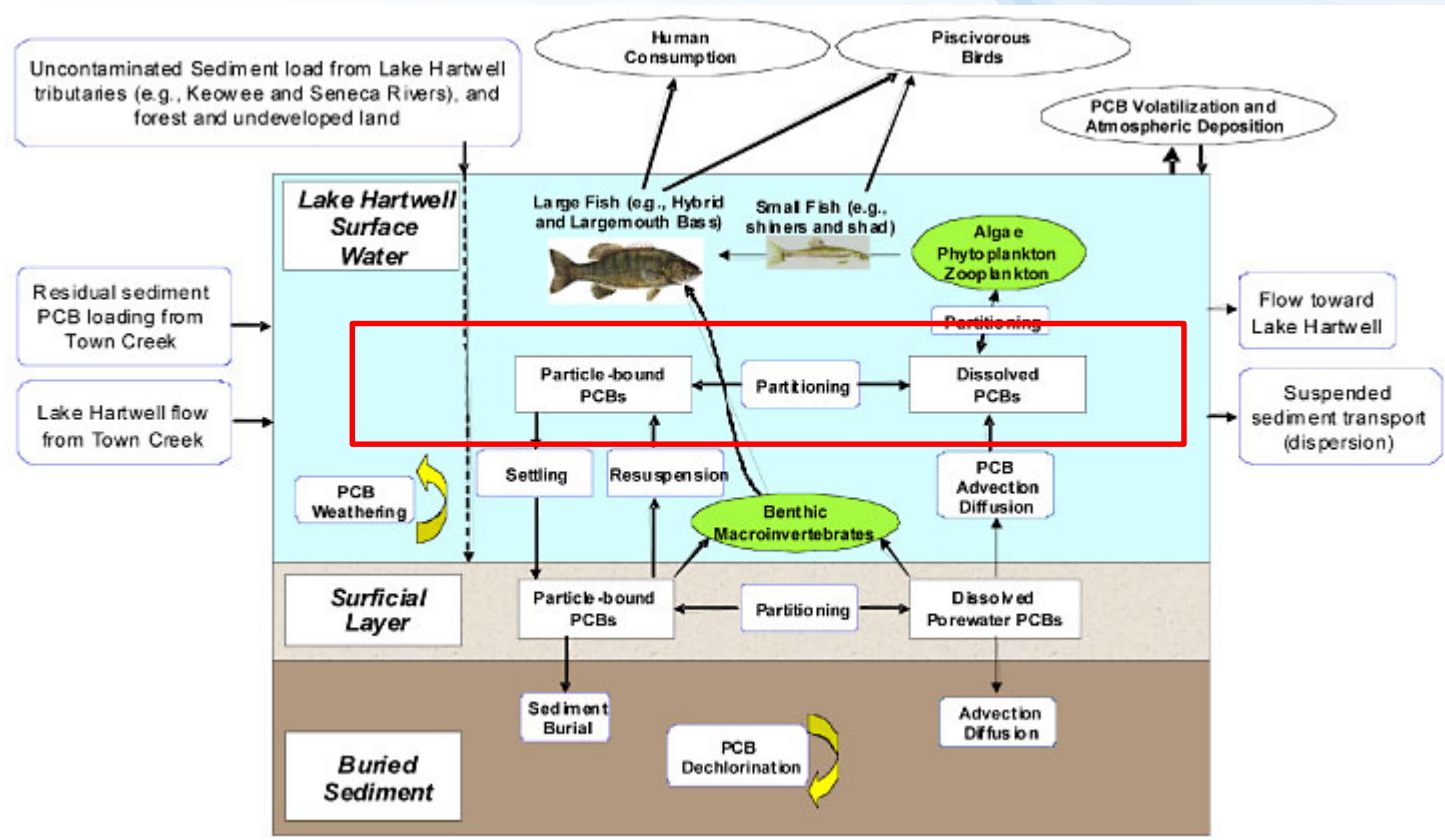
Biodostupnost - příklady

Hydrofobicita – organické látky vs. organický uhlík (humínové látky)

-> hydrofobní látky - tendence akumulace v tucích / v biotě

(ale současně i v mrtvé organické hmotě - OC)

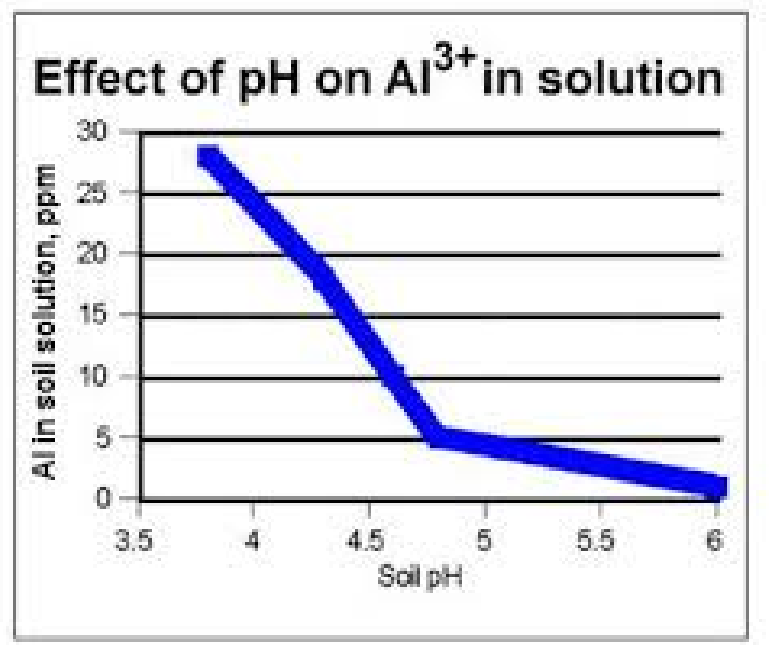
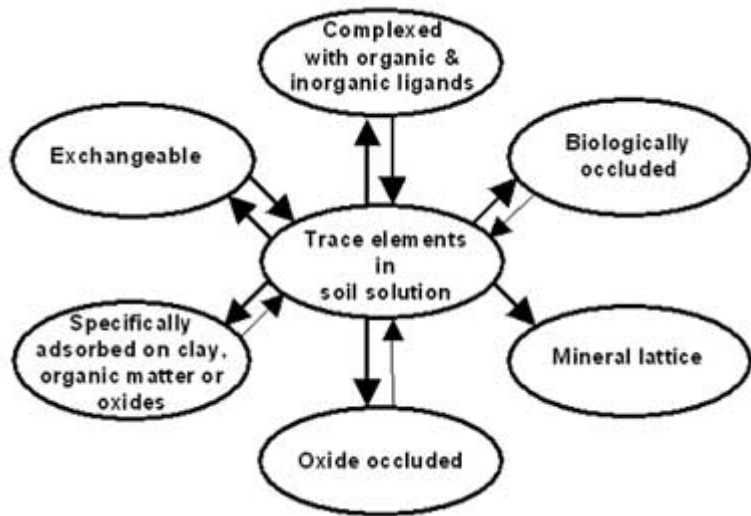
-> **vysoký obsah OC v prostředí (ve vodě): snížení biodostupnosti látek**



Biodostupnost - příklady

Toxické kovy ve vodách vs. pH / složení vod

- > vyšší pH: kovy přítomny v nerozpustných hydroxidech (snížení biodostupnosti)
- > **nižší (kyselé) pH – vyšší rozpustnost a vyšší toxicita kovů**



Základní pojmy z HODNOCENÍ RIZIK



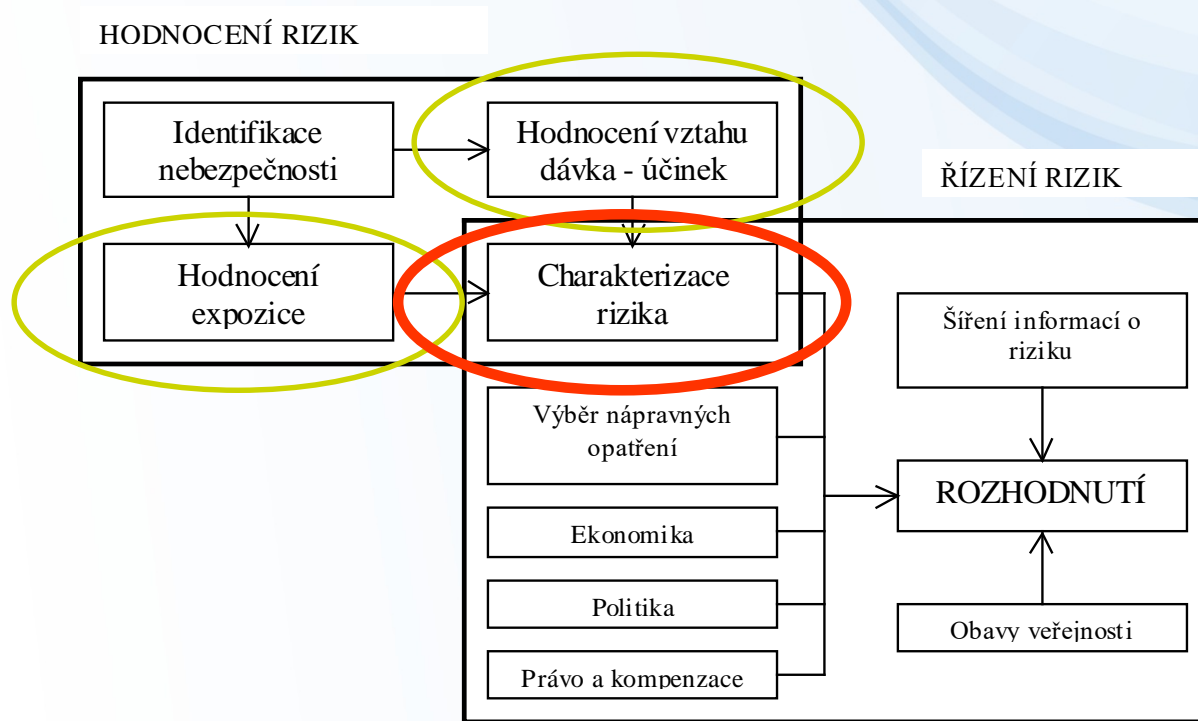
HODNOCENÍ a ŘÍZENÍ RIZIK

- **Definice**

- RIZIKO = pravděpodobnost projevu nebezpečnosti
- NEBEZPEČNOST = vlastnost látky (*stresoru*)

- **Základní schéma hodnocení a řízení rizik**

- Hlavní fáze - vyznačeno:



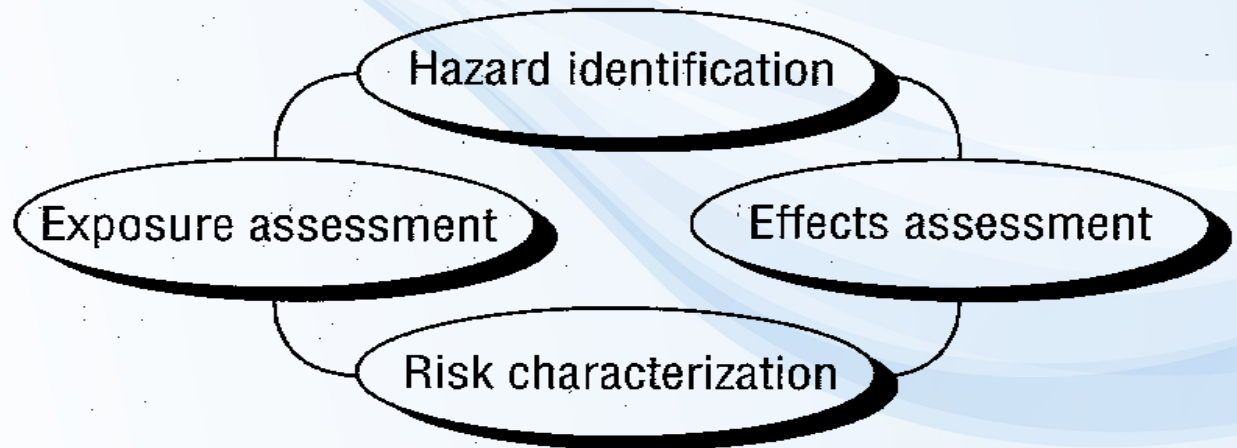
- **Řada postupů řízení rizik zakotvena v legislativě**

- chemických látek pro člověka (*zdravotní*), pro ekosystémy (*ekologická*), vznik katastrof, rizika starých zátěží



HODNOCENÍ a ŘÍZENÍ RIZIK

Hodnocení rizik



Řízení rizik → příklady

- Omezení vstupů
 - Zákazy, pokuty
- Lepší technologie
 - Např. čištění odpadních vod

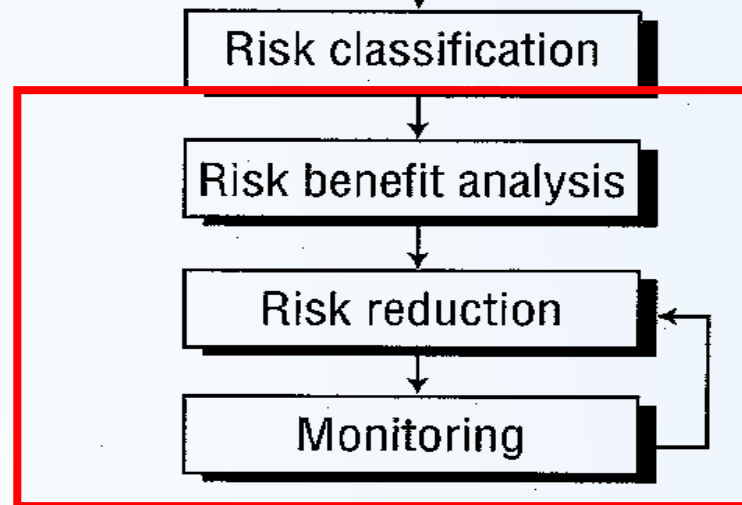


Figure 1.3. Steps in the risk management process.



HODNOCENÍ EXPOZICE

• Hodnocení expozice

- Posouzení kontaktu organismu se stresorem (*chemickou látkou*)
- V případě expozice ekosystémů - vyhodnocení koncentrací, které se v prostředí vyskytují (průměrně, nejčastěji atd)
- Hodnocení expozice člověka: hlavní expoziční cesty - potrava, voda, vzduch
 - experimentální stanovení koncentrací (analytická chemie)
 - modely distribuce, modely potravinových košů
 - teoretické úvahy a výpočty

– **výsledek**

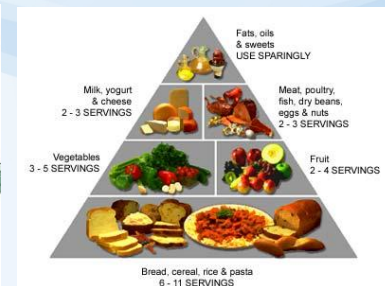
a) bodový odhad koncentrace

* Pro ekosystémy: **PEC** – predicted environmental concentration,

* Pro člověka (humánní rizika) – Dávka (např. “průměrně 7 mg/kg ž.v./ den)

b) pravděpodobnostní rozložení koncentrací / dávek

* poskytuje realističtější pohled, ale v praxi se užívá méně



Hodnocení **NEBEZPEČNOSTI** - účinků (vztah dávka-účinek)

- **Hodnocení vztahu dávka – účinek (eko/toxikologie)**

- hodnocení toxicity - odhady koncentrací vzniku akutních účinků, odhady koncentrací vzniku chronických efektů atd.
 - TOXIKOLOGIE - hodnocení humáních rizik – toxicita pro člověka, model – laboratorní zvíře
 - EKOTOXIKOLOGIE - hodnocení ekologických rizik – řada druhů – nutná zjednodušení
 - >> RECEPTORY – citlivé druhy reprezentující příslušné organismy
 - >> V praxi / nejčastější 3 druhy
- **výsledek** → bezpečná koncentrace/dávka

1) nejčastěji bodové vyjádření

**PNEC (predikovaná „no-effect concentration)
nebo TDI (humánní – tolerable daily intake)**

nebo 2) pravděpodobnostní vyjádření účinků (*viz dále, méně časté*)



PRAKTICKÁ EKOTOXIKOLOGIE (biotesty) ... v kostce



Hodnocení účinků v ekotoxikologii

Cílem ekotoxikologických analýz je poznání účinků, které působí přítomnost stresorů na organismy v prostředí – **zejména populace a společenstva**

- suborganismální úroveň
- jednotlivé organismy
- populační efekty
- efekty ve společenstvech
- ekosystémové efekty



ekologická realita, relevance

laboratoř

laboratoř

laboratoř
mikro/mezokosmy

mikro/mezokosmy
polní studie
terénní pozorování

terénní pozorování



obtížnost stanovení



Hodnocení ekotoxicity – základní strategie

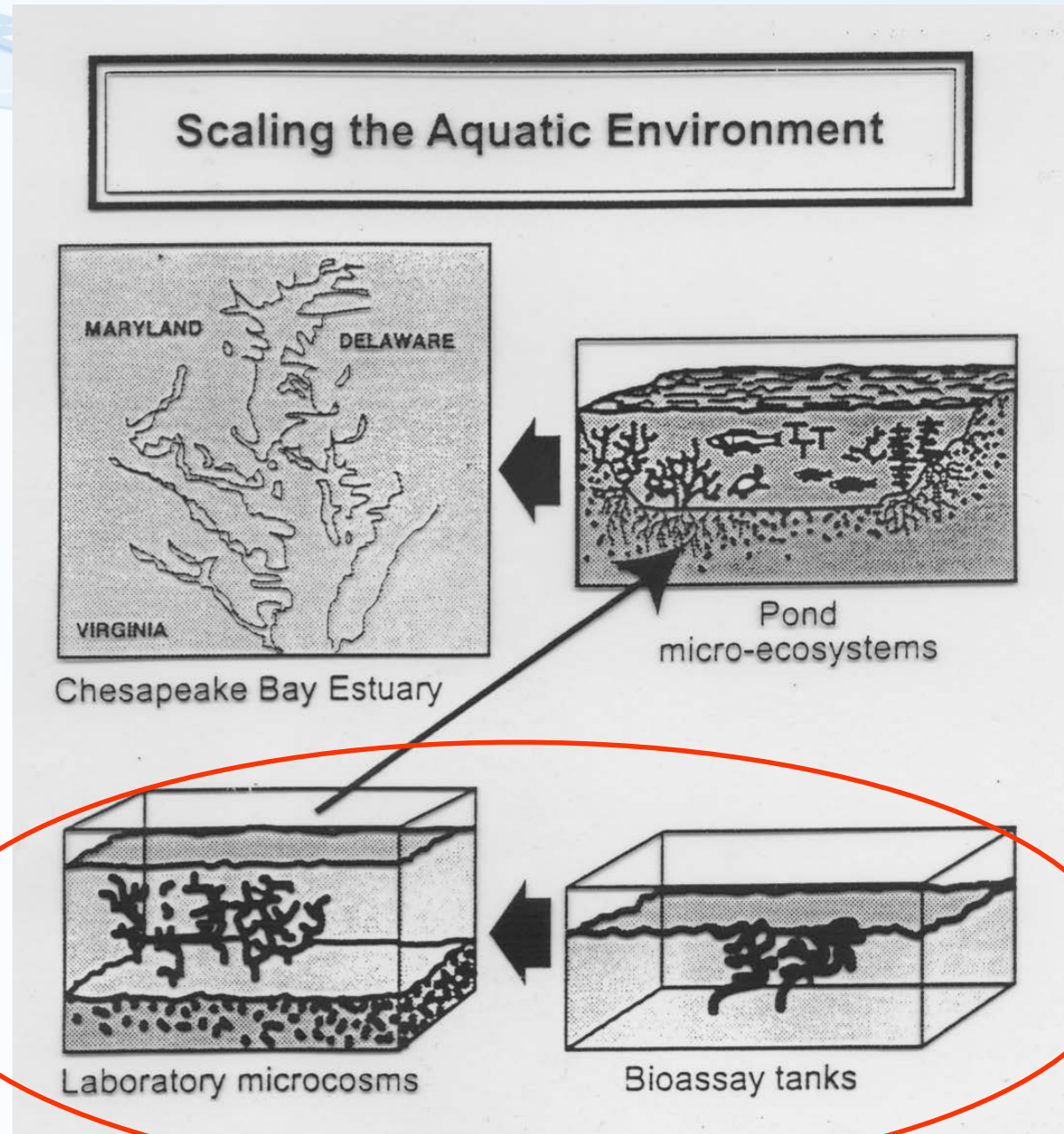
- **Cílem je poznání účinků v ekosystému**
 - Nelze poznat účinky u všech existujících druhů !
 - **Výběr MODELOVÝCH druhů**
 - = reprezentanti svých „ekologických skupin“ (trofických úrovní)
 - Využití kombinace několika testů = **baterie testů**
- **Hlavní ekologické skupiny = trofické úrovně**
 - Producenti (autotrofové – řasy, rostliny)
 - Konzumenti – bezobratlí a obratlovci
 - Dekompozitoři (destruenti) – bakterie
- **Nejběžnější organismy využívané v bateriích testů**
 - Vodní prostředí – řasy, hrotnatka (*D. magna*), ryba
 - Půda – rostliny + žížaly (příp. roupice, chvostoskoci)



Testování ekotoxicity v praxi

= Účinky na vybraných modelových organismech (systémech)

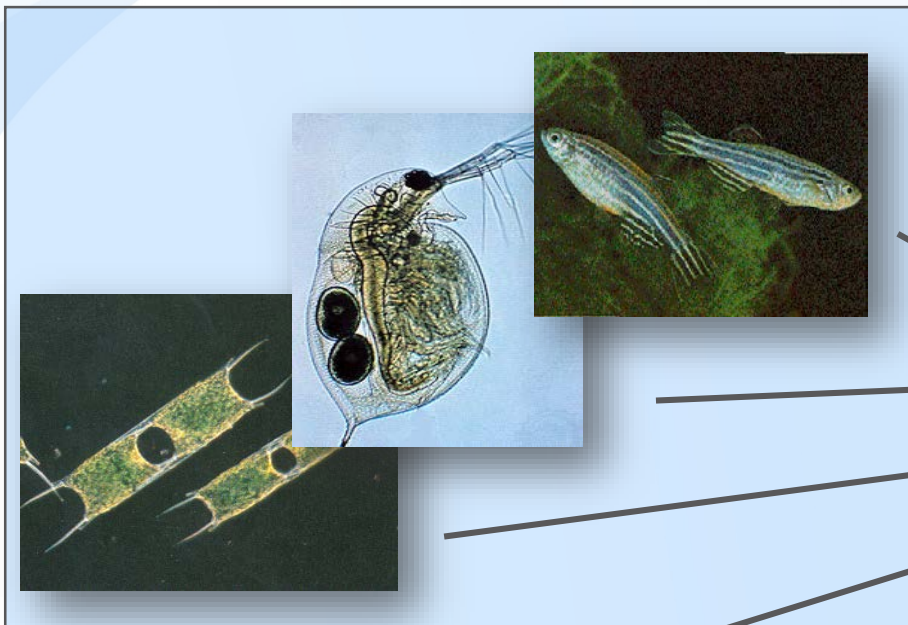
→ predikce / extrapolace pro celý ekosystém



laboratoř



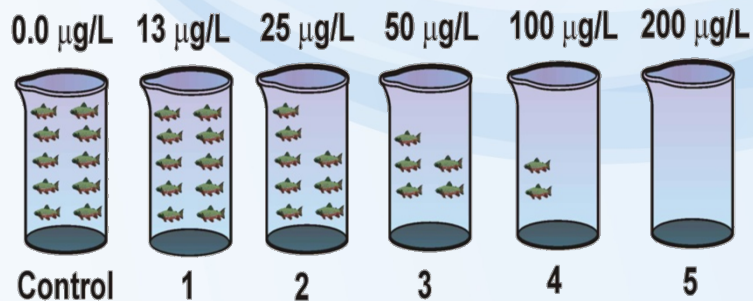
Ekotoxicita 1 – biotesty (nejčastější přístup)



Cu addition



Concentration:



96-hour LC50 = 50 µg/L

Effect concentrations expressed in total/dissolved Cu

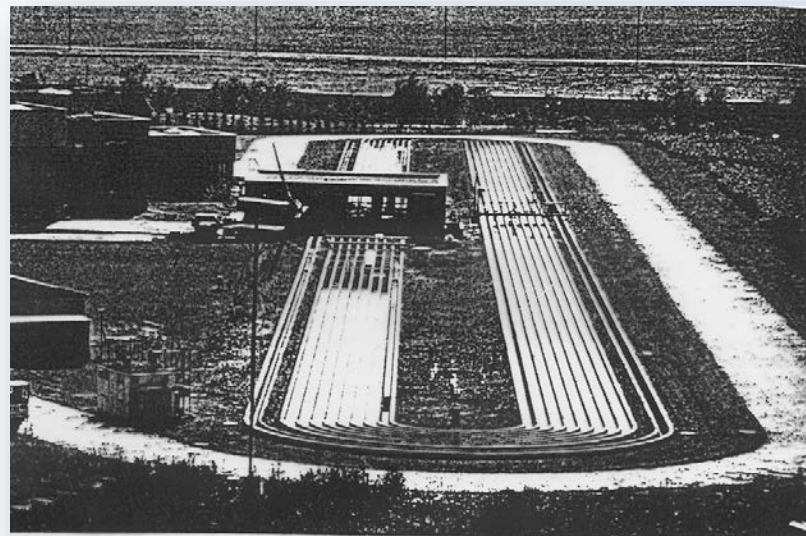
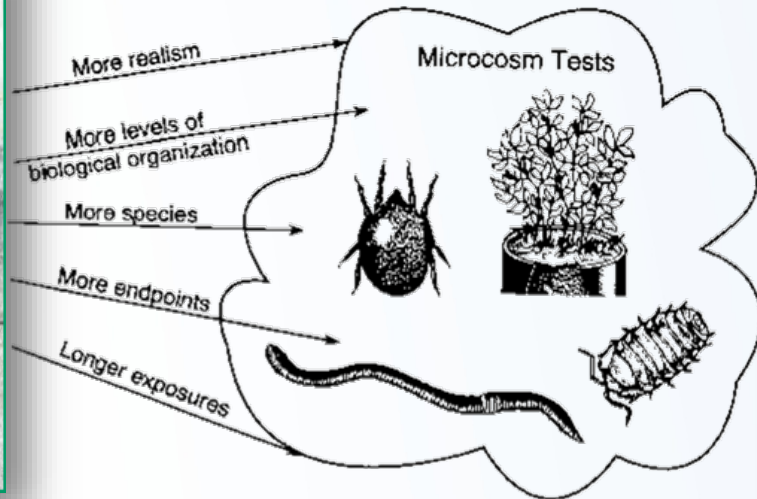


??? Safe concentrations ???



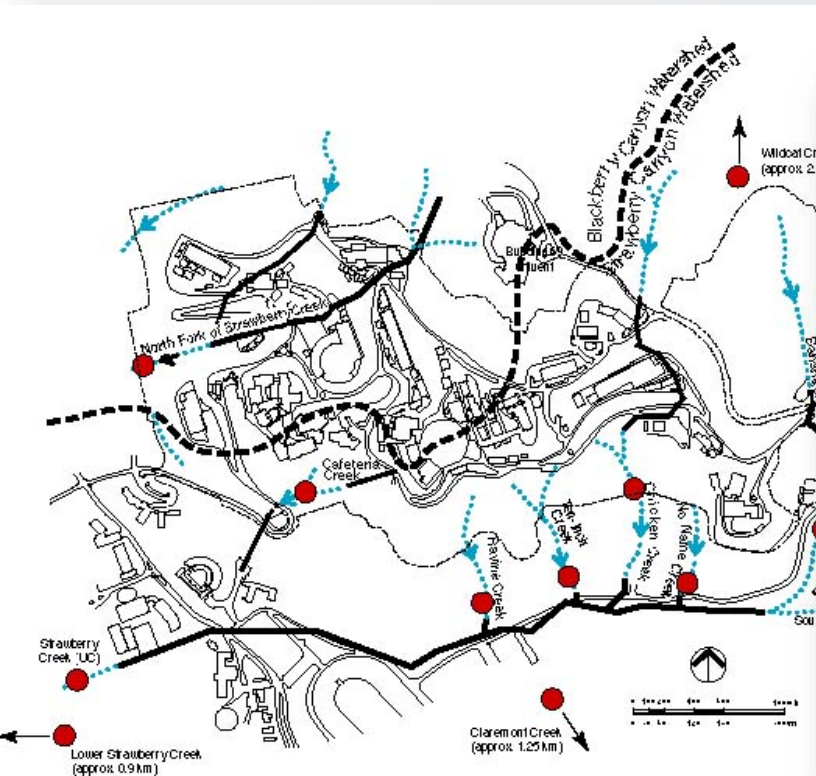
Ekotoxicita 2 – mikrokosmy a mesokosmy

Expensive & time consuming (e.g. *Pesticide testing*)
Variable results (natural variability ...)
Higher ecological relevancy



Ekotoxicita 3 – Terénní studie

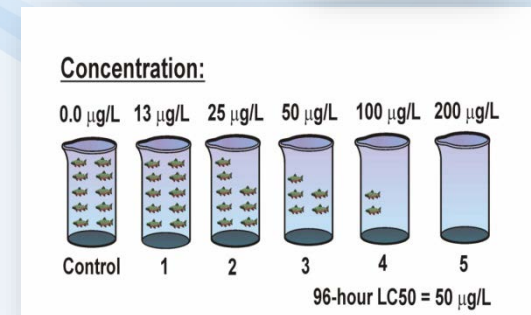
Komplexní přístup (chemistry, biology, geology, climate, pedology ..)
Ecotoxicology + Ecology
Comparing „contaminated“ to „control“ sites



Praktické využití biotestů (1/2)

- **Testování chemikálií (jednotlivé látky)**

- Tradiční biotesty byly vyvinuty pro testování čistých látek (nikoliv směsí nebo kontaminovaných vzorků ŽP !)
- Výhody – standardizované přístupy
 - OECD – Guideline methods - series „2“ Effects on biota
 - ISO methods
 - E.g. Fish tests - OECD 203 / ISO 7346
 - E.g. D. magna - OECD 202 / ISO 6341
- Nevýhody: často omezená vypovídací hodnota
 - Často pouze AKUTNÍ
 - Příliš standardizované (neodpovídá prostředí)
 - Nezohledňují biodostupnost apod.
 - Nesledují vliv směsí
 - Nezohledňují specifické mechanismy (např. endokrinní disrupce)
 - Atd...

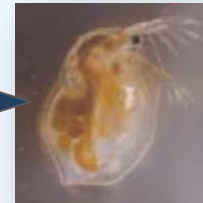
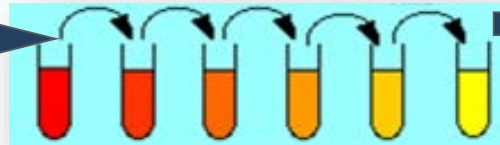


Praktické využití biotestů (2/2)

- Testování **kontaminovaných vzorků (odpady, voda, půda)**
 - Nově v ekotoxikologii – řada otázek
 - Whole effluent toxicity testing (WET)
 - Contact soil toxicity assays
 - Komplexní a komplikované
 - Ne vždy je jasná kauzalita „cause-effects“
 - Přírodní variabilita
 - Př. Řasové testy – účinky živin (N, P) ve výluhu >> toxické látky



Výluh 1:10



Mixture at different ratios



STANDARDIZOVANÉ BIOTESTY

- Během času byly vypracovány metody, které jsou **evidovány, doporučovány nebo realizovány v rámci:**
 - organizací evidujících standardy (*ISO.org, ČSNl.cz, ASTM.org*)
 - dalších (mezi)národních organizací (*OECD.org, WHO.int, Evropská Unie – ecb.jrc.it, US EPA, národní vlády*)
- **Existují standardizované postupy pro hodnocení jednodruhových, vícedruhových efektů i hodnocení polních experimentů a sledování**
 - Na dalších snímcích výběr / příklady



Vodní 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

Organismy v sedimentech

Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment	23 Nov 2004
Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water	23 Nov 2004
Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment	23 July 2010
Test No. 225: Sediment-Water Lumbriculus Toxicity Test Using Spiked Sediment	15 Oct 2007



Půdní 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 (Eisenia fetida/Eisenia andrei)	23 Nov 2004
Test No. 228: Determination of Developmental Toxicity of a Test Chemical to Dipteran Dung Flies(Scathophaga stercoraria L. (Scathophagidae), Musca autumnalis De Geer (Muscidae))	16 Oct 2008
Test No. 232: Collembolan Reproduction Test in Soil	08 Sep 2009
Test No. 226: Predatory mite (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) 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

Další biotesty

Test No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test	21 Sep 1998
Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test	21 Sep 1998
Test No. 205: Avian Dietary Toxicity Test	04 Apr 1984
Test No. 206: Avian Reproduction Test	04 Apr 1984
Test No. 223: Avian Acute Oral Toxicity Test	23 July 2010



Vodní bezobratlí

ISO 6341:1996	Water quality -- Determination of the inhibition of the mobility of <u><i>Daphnia magna</i></u> Straus (Cladocera, Crustacea) -- <u>Acute toxicity test</u>
ISO 10706:2000	Water quality -- Determination of <u>long term toxicity of substances to <i>Daphnia magna</i></u> Straus (Cladocera, Crustacea)
ISO/DIS 14380	Water quality -- Determination of the <u>acute toxicity to <i>Thamnocephalus platyurus</i></u> (Crustacea, Anostraca)
ISO/CD 16303	Water quality -- Determination of toxicity of <u>fresh water sediments using <i>Hyaella azteca</i></u>
ISO 10872:2010	Water quality -- Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and <u>reproduction of <i>Caenorhabditis elegans</i></u> (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 <i>Ceriodaphnia dubia</i>
ISO 20666:2008	Water quality -- Determination of the chronic toxicity to <i>Brachionus calyciflorus</i> 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 <i>Heterocypris incongruens</i> (Crustacea, Ostracoda)
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/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 <i>Acartia tonsa</i>



Půdní bezobratlí

ISO 11268-1:1993	Soil quality -- Effects of pollutants on earthworms (<i>Eisenia fetida</i>) -- Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate
ISO 11268-2:1998	Soil quality -- Effects of pollutants on earthworms (<i>Eisenia fetida</i>) -- Part 2: Determination of effects on reproduction
ISO 11268-3:1999	Soil quality -- Effects of pollutants on earthworms -- Part 3: Guidance on the determination of effects in field situations
ISO 11267:1999	Soil quality -- Inhibition of reproduction of <i>Collembola (Folsomia candida)</i> by soil pollutants
ISO 16387:2004	Soil quality -- Effects of pollutants on Enchytraeidae (<i>Enchytraeus sp.</i>) -- Determination of effects on reproduction and survival
ISO 15952:2006	Soil quality -- Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae) -- Determination of the effects on growth by soil contamination
ISO 20963:2005	Soil quality -- Effects of pollutants on insect larvae (<i>Oxythyrea funesta</i>) -- Determination of acute toxicity
ISO 17512-1:2008	Soil quality -- Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour -- Part 1: Test with earthworms (<i>Eisenia fetida</i> and <i>Eisenia andrei</i>)
ISO/DIS 17512-2	Soil quality -- Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour -- Part 2: Test with collembolans (<i>Folsomia candida</i>)
ISO 23611-1:2006	Soil quality -- Sampling of soil invertebrates -- Part 1: Hand-sorting and formalin extraction of earthworms
ISO 23611-2:2006	Soil quality -- Sampling of soil invertebrates -- Part 2: Sampling and extraction of micro-arthropods (<i>Collembola</i> and <i>Acarina</i>)
ISO 23611-3:2007	Soil quality -- Sampling of soil invertebrates -- Part 3: Sampling and soil extraction of enchytraeids
ISO 23611-4:2007	Soil quality -- Sampling of soil invertebrates -- Part 4: Sampling, extraction and identification of soil-inhabiting nematodes
ISO/DIS 23611-5	Soil quality -- Sampling of soil invertebrates -- Part 5: Sampling and extraction of soil macro-invertebrates
ISO/DIS 23611-6	Soil quality -- Sampling of soil invertebrates -- Part 6: Guidance for the design of sampling programmes with soil invertebrates



Rostliny

ISO 11269-1:1993	Soil quality -- Determination of the effects of pollutants on soil flora -- Part 1: Method for the measurement of <u>inhibition of root growth</u>
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 -- <u>Chronic toxicity in higher plants</u>
ISO/CD 29200	Soil quality -- Assessment of genotoxic effects on higher plants -- Micronucleus test on <i>Vicia faba</i>



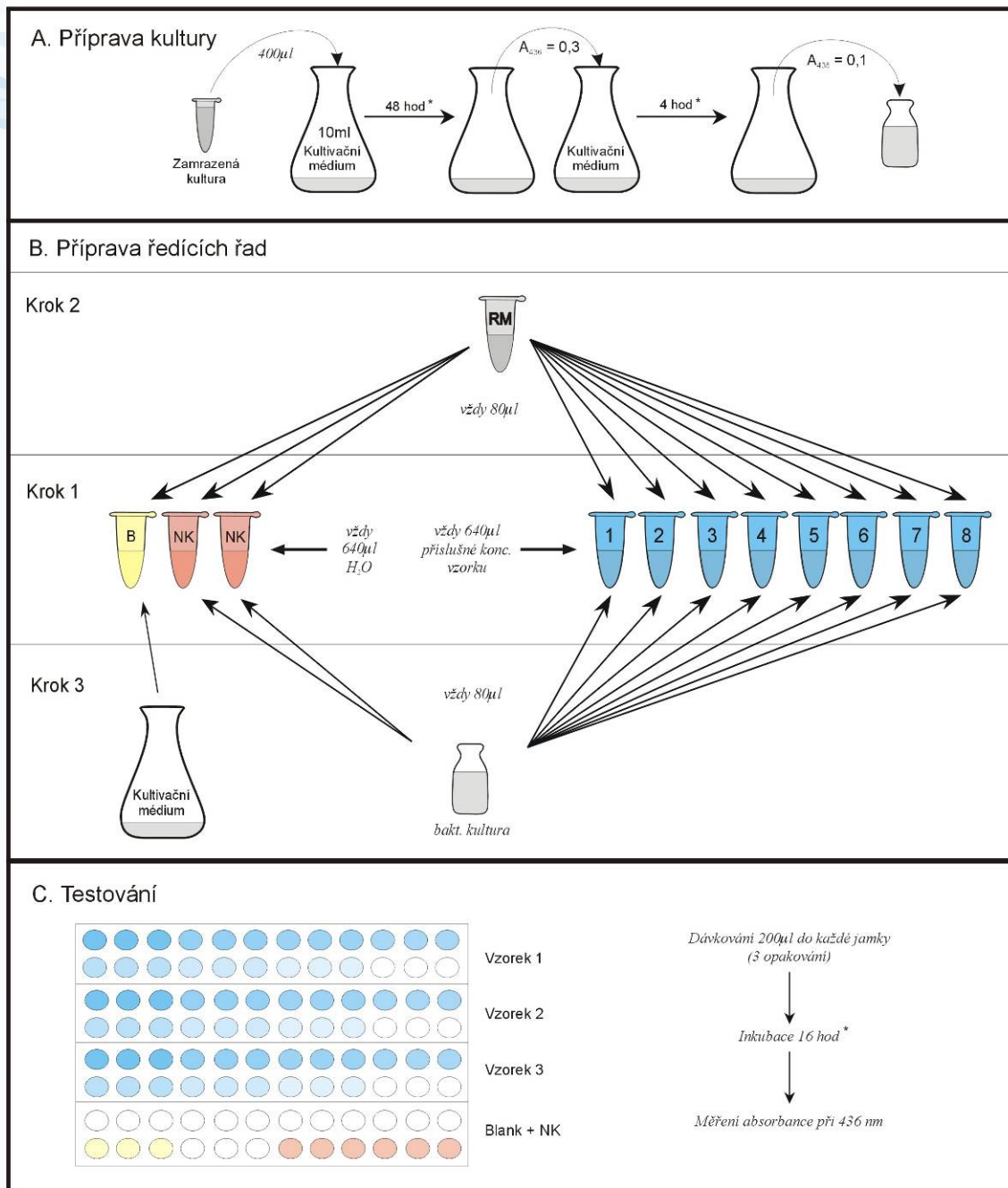
Jaké vlastnosti má mít „modelový“ organismus pro standardizovaný biotest ?

- snadná dostupnost (*laboratorní kultury, komerční dostupnost ...*)
- snadné uchování a chov v laboratorních podmínkách do dostatečných množství pro experimenty (rychlý reprodukční cyklus)
- Známa biologie druhu a genetika příslušné kultury y
- jsou prostudovány relativní citlivosti druhu / kultury k různým třídám toxických látek
- citlivost druhu by měla být dobrým reprezentantem příslušné skupiny organismů
 - *Daphnia* → korýši / bezobratlí
 - *Zebřička* → kaprovité ryby / obratlovci



OBECNÉ SCHÉMA BIOTESTU

- 1) Příprava organismu
- 2) Příprava vzorku (ředící řady – testování dávka:odpověď)
- 3) Expozice
- 4) Vyhodnocení (křivka dávka-odpověď)



Biologické účinky v závislosti na koncentraci látek

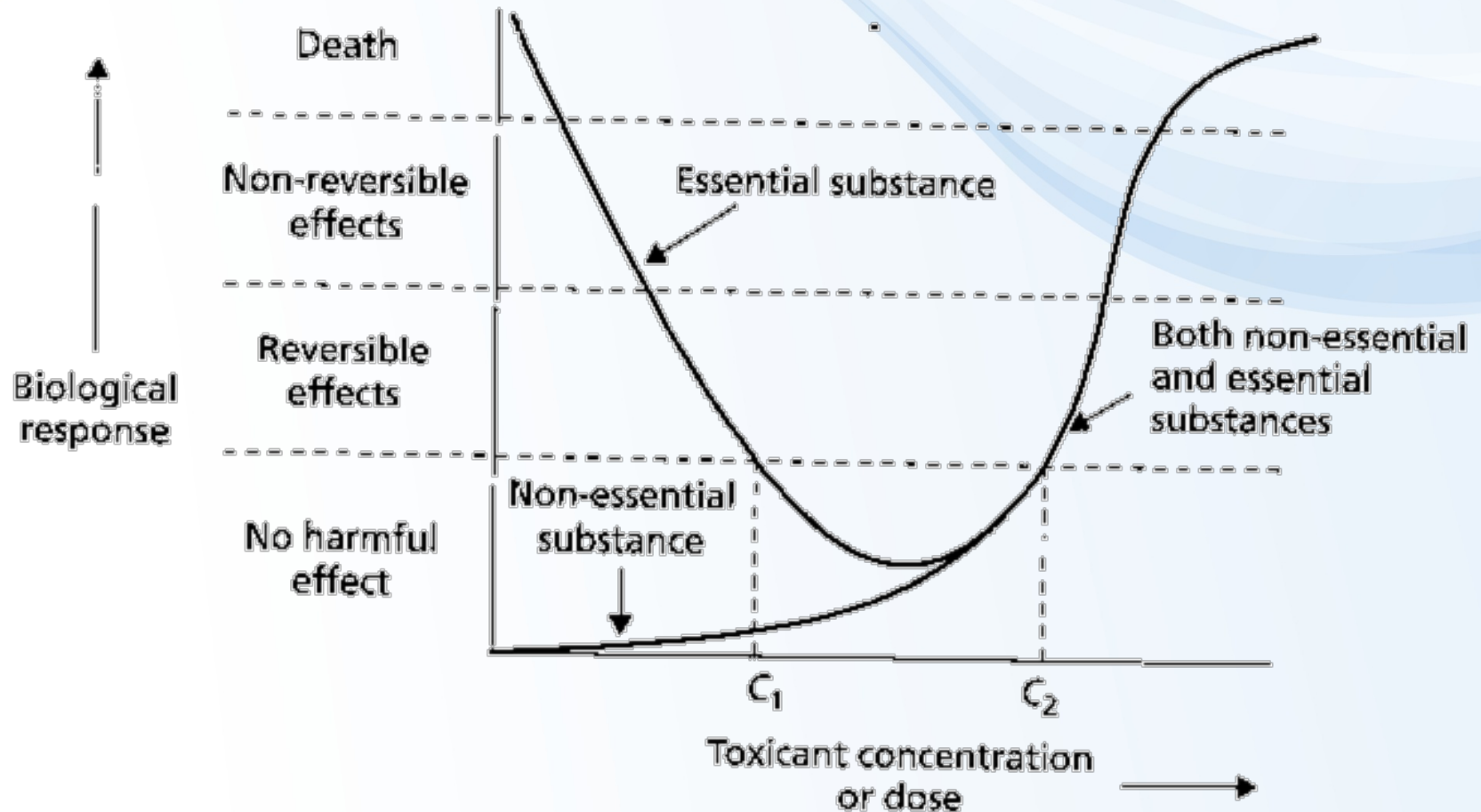
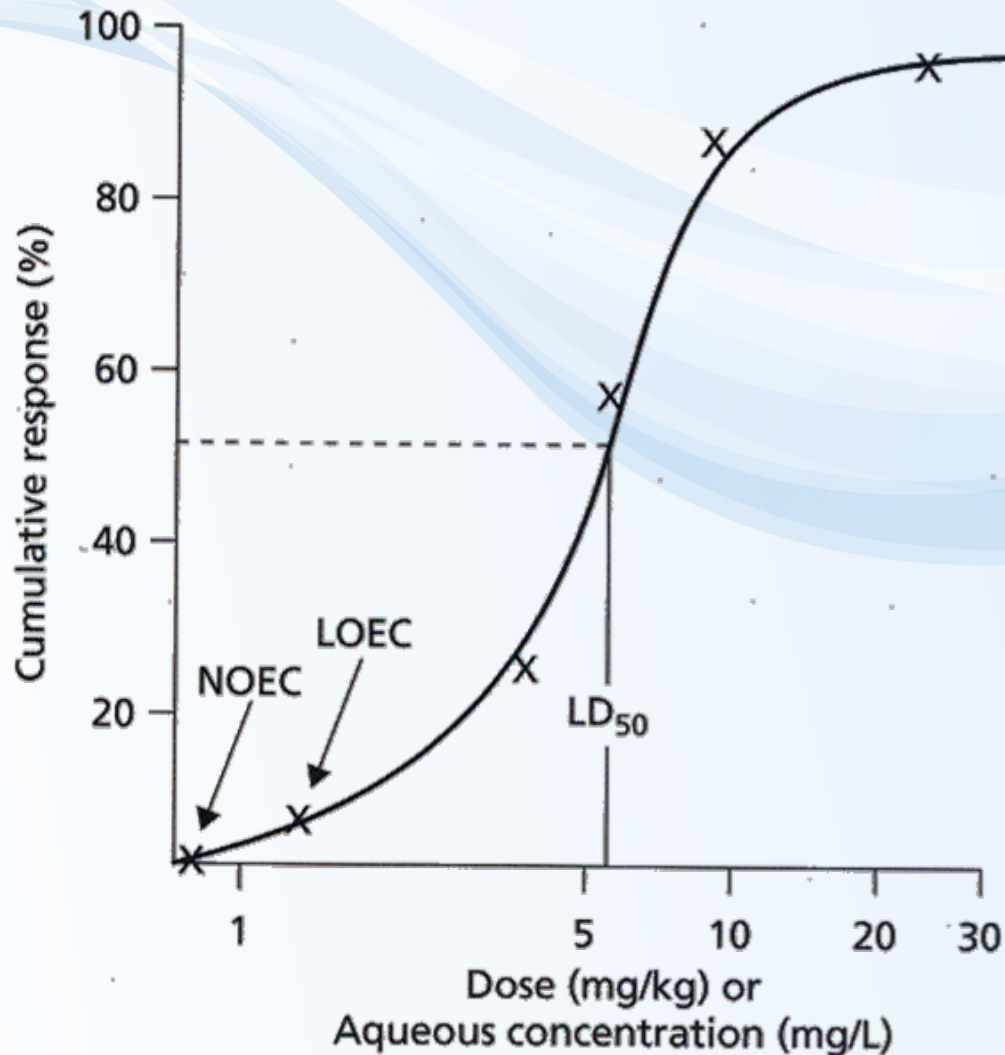


Fig. 6.2 Cumulative dose–response curve. In a lethality experiment the response is the cumulative percentage of animal mortalities with the actual data points indicated as crosses. Lowest observable effect concentration (LOEC) and no observable effect concentration (NOEC) are indicated.



LOG koncentrace !!!



Pro srovnání toxicity různých látek (vzorků) se užívají parametry odvozené z křivky dávka-odpověď

1) Parametry odvozené přímo z experimentálních dat

LOEC/L *Lowest Observable Effect Concentration/L*

- první nejnižší koncentrace použitá v experimentu, která vyvolala významné efekty

NOEC/L *No Observable Effect Concentration/Level*

- podobně: koncentrace použitá v experimentu ...

Nedostatky - subjektivní

- závisí na zvolených koncentracích
- jiný experiment → jiné výsledky (koncentrační rozmezí, ředící faktor – rozdíly mezi koncentracemi 2x, 5x, 10x...)



Pro srovnání toxicity různých látek (vzorků) se užívají parametry odvozené z křivky dávka-odpověď

2) další parametry odvozené z křivky dávka – odpověď

EC_x (x=1,5,10,25,50,75,90,99 apod.)

- ne vždy je v experimentu dosaženo „přesně 5% efektu“
- parametry se počítají (z „modelované křivky“)

STANDARD - Hodnoty odvozené pro 50% efekt

- nejčastěji užívány pro srovnání toxicity (!)
- odhady v oblasti 50% efektů zatíženy nejmenší chybou
viz předchozí modelový experiment „nejvíce je průměrných“ a proto je odhad průměru nejpřesnější

Parametry

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





Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Biotesty

příklady 1: vodní prostředí

Nejčastější kombinace v legislativách – 3 testy:

- Řasy (72h-96h růstový test)
- D. magna (akutní test 48h)
- Ryby (akutní test 96h)

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Ekotoxikologické biotesty - producenti

Řasové testy toxicity

- standardní uspořádání
- 72-96 hod, Erlenmayerovy lahve, třepání
- sledování růstu, počtů buněk, biomasy – kvantifikace chlorofylu (fluorescence)
- miniaturizace mikrodestičky

Řasy

Selenastrum capricornutum

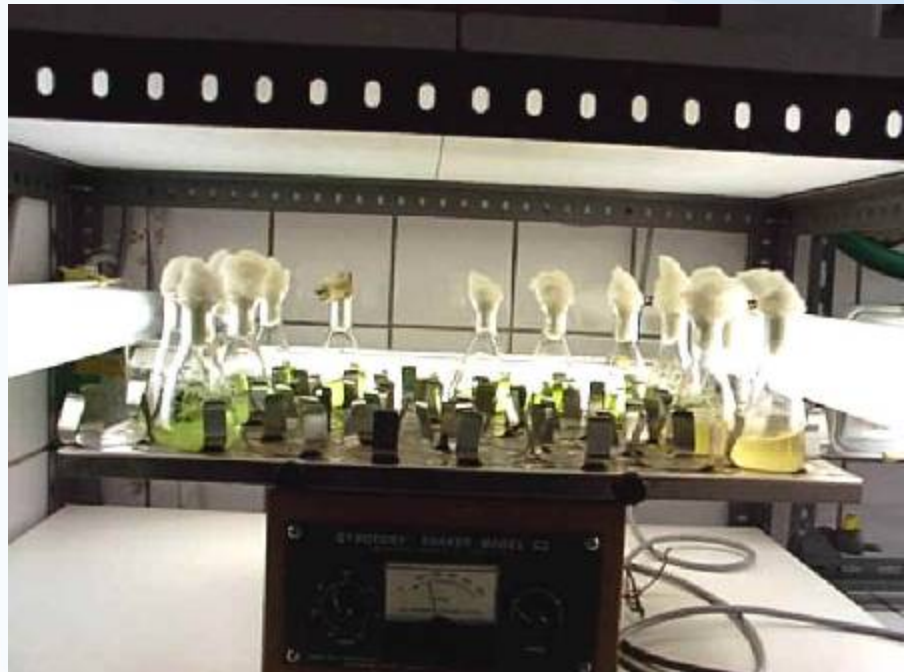
Scenedesmus subcapitatus

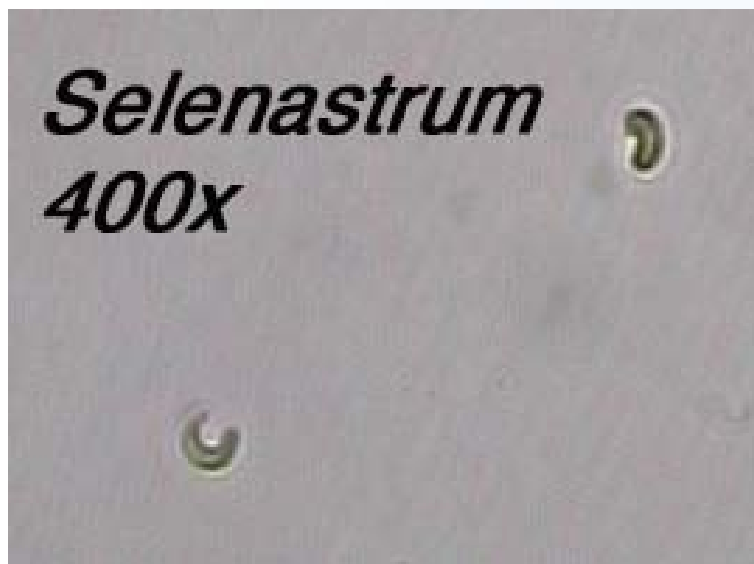
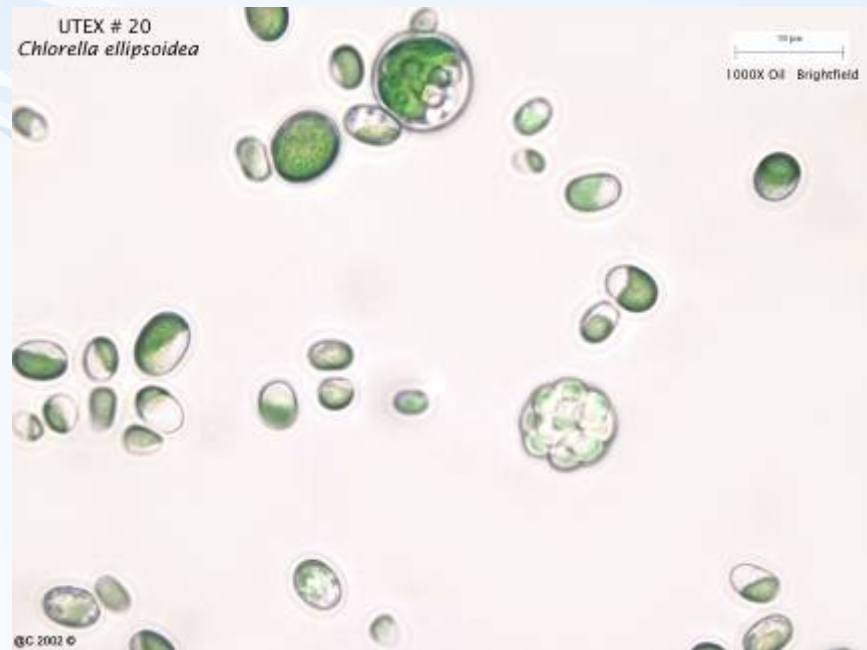
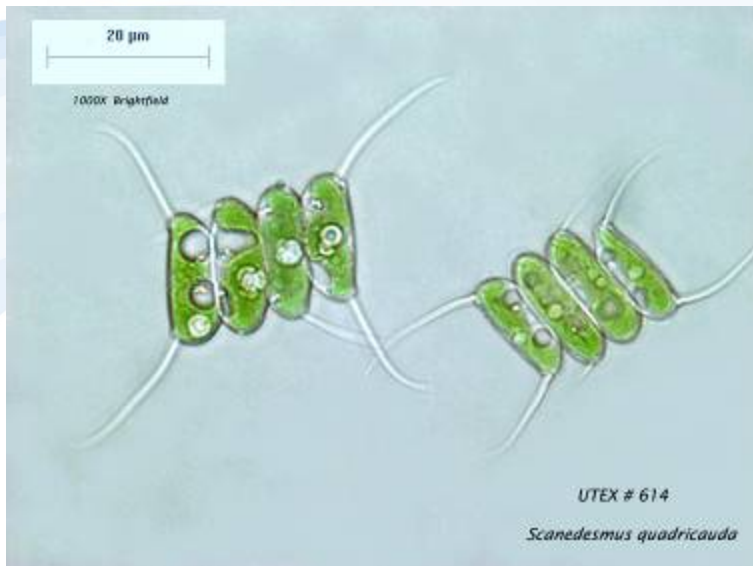
Sc. quadricauda

Chlorella vulgaris

Sinice

Microcystis aeruginosa





Microcystis aeruginosa



EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY - PŘÍKLADY - - KONZUMENTI – BEZOBRATLÍ -



Ekotoxikologické biotesty – konzumenti - bezobratlí

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

-uspořádání

-kádinky,

-**akutní testy – 48 h,**

- prolongované testy 21 d
(reprodukce)

Akvaticí planktonní korýši - nejčastější

Daphnia magna,

Ceriodaphnia dubia, Artemia salina (mořská)

Další bezobratlí

bentičtí korýši – Gammarus, Hyallela azteca

hmyz – Pakomáři (Chironomus), jepice ...



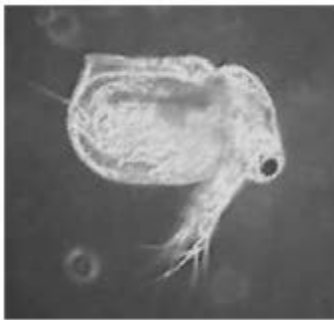
Daphnia magna



Artemia salina



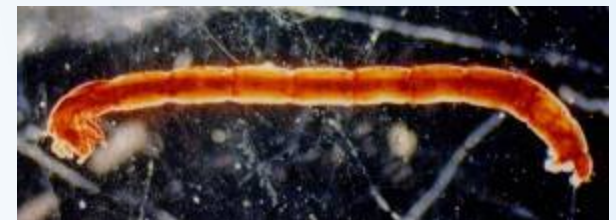
Ceriodaphnia dubia



Gammarus



Chironomus riparius



EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY - PŘÍKLADY -

- KONZUMENTI – OBRATLOVCI –



Ekotoxikologické biotesty - obratlovci

- Rybí biotesty - uspořádání

Akvária

- akutní testy 96 h

- prolongované a embryolarvální testy
dny až měsíce

Dlouhodobé testy - letalita, růst, rozmnožování,

- *testy xenoestrogenity (vývoj intersexu)*

- *různá uspořádání (statické, průtočné ...)*

Rybí druhy

Zebřička (Danio rerio)

Pstruh duhový, Živorodka duhová (paví očko),

Karas, Kapr, Střevle (Pimephales promelas)

Specifické testy (endokrinní disruptce, karcinogenita)

Halančík rýžovištní – Japanese medaka



Živorodka duhová (Paví očko),
Poecilia reticulata



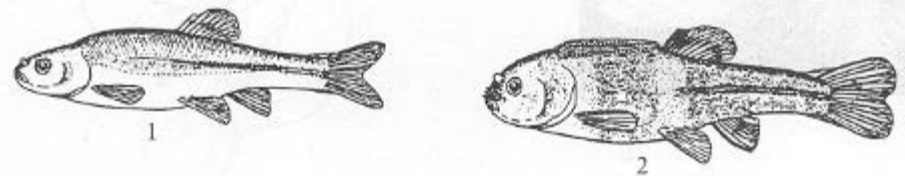
Danio rerio (syn. *Brachydanio rerio*)



Karas (zlatá forma)



Americký druh střevle
(*Pimephales promelas*)



Obr. 3: *Pimephales promelas* (1 - samička, 2 - samček)

Pstruh

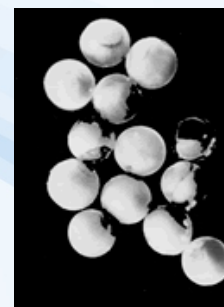


Ekotoxikologické biotesty - obratlovci

FETAX – Frog Embryo Teratogenicity Assay Xenopus Drápatka (*Xenopus laevis*)

-uspořádání

- toxikologie – **experimenty s vajíčky**,
embryi a larvami
- petriho misky
- 96 h (dosažení stadia larvy bez žloutk.
vaku)



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.

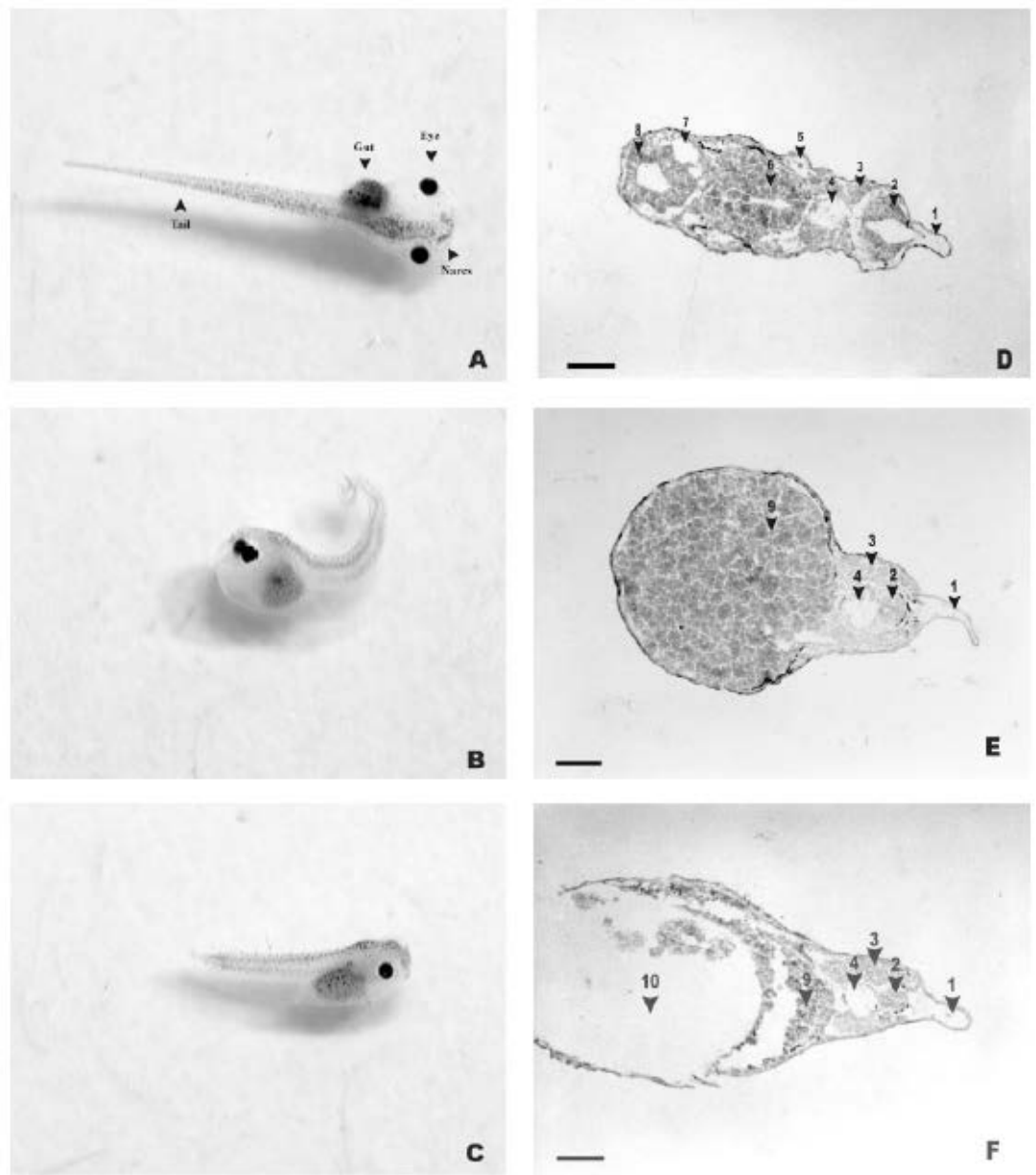


Fig. 2. Macroscopic (A, B, C) and microscopic (D, E, F) examination of *Xenopus laevis* embryos. (A) and (D) are controls; (B) and (E) are strongly malformed embryos exposed to 100 µg microcystin-LR/L for 96; (C) and (F) are malformed embryos after exposure to cyanobacterial biomass of *Microcystis aeruginosa* (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.



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
- kultivace bakterií (Erlenmayerovy nádoby, miniaturizace – mikrodestičky)
- vyhodnocení – nárůst biomasy (zákal)





Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Biotesty

příklady 2: půdní prostředí

Nejčastější kombinace v legislativách – 2testy

- Rostliny
- Žížaly

Plus v legislativě ČR a SR také test klíčení s hořčicí

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

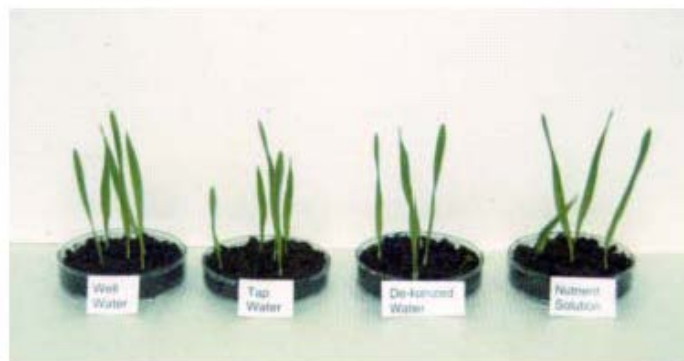
Testy klíčení s rostlinami:

- hořčice (*Sinapis alba*) – vodné médium
- Salát (*Lactuca sativa*) - půda

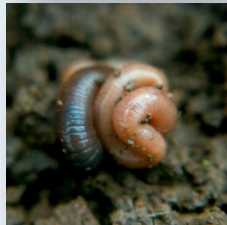
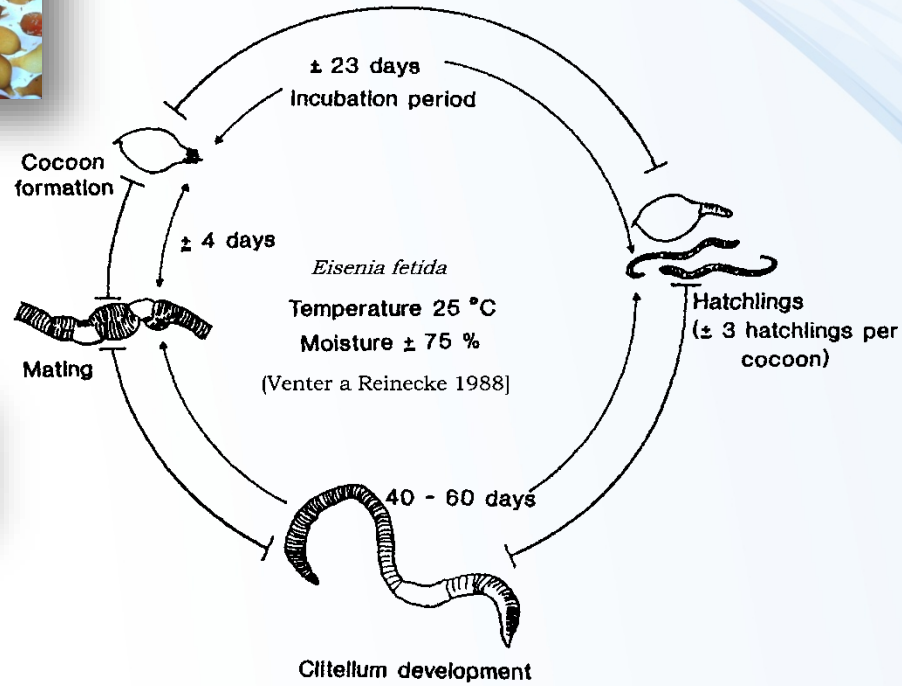




14-d Shoot Length
IC50 = 29.7 mg/g

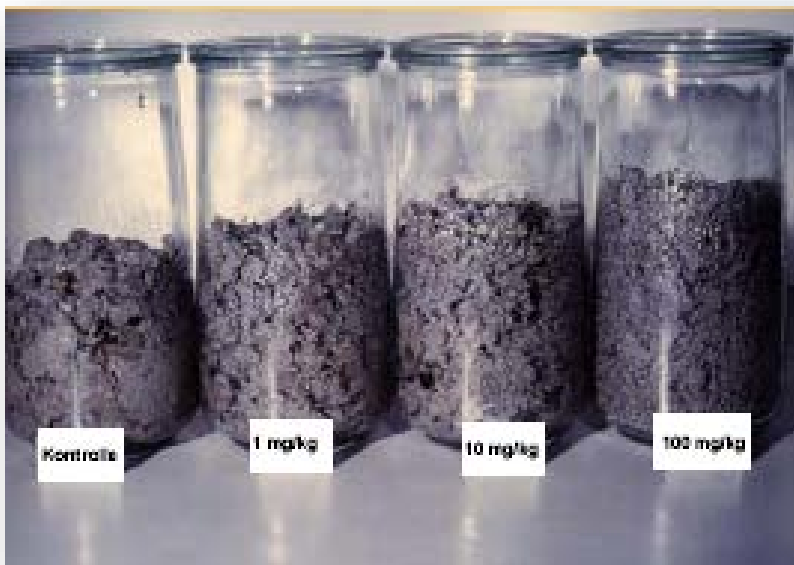


Testy se žížalami



Akutní test s žížalou

- 500 g soil + 10 adult *Eisenia fetida*
- 14 days
- mortality and weight



Ekotoxikologické biotesty – konzumenti - bezobratlí

Další biotesty s terestrickými bezobratlými

VČELY

- testování insekticidů
- dávkování v potravě
- sledování mortality



Moucha domácí - testování léčiv:
antiparazitika

Drosophila
(hodnocení genotoxicity)



Ekotoxikologické biotesty - obratlovci

Ekotoxikologické testy s ptáky

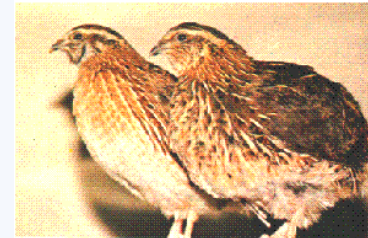
-uspořádání

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



Hrabaví ptáci, křepelky

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



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

bažant, kur domácí, kachny ...



Využití EKOTOXIKOLOGIE V PRAXI

Příklad 1 – biotesty a odvození limitů pro jednotlivé látky



HODNOCENÍ RIZIK

- Hodnocení vztahu dávka – účinek (eko/toxikologie)

- př. hodnocení toxicity - odhady koncentrací vzniku akutních účinků, odhady koncentrací vzniku chronických efektů
- *hodnocení humáních rizik – toxicita pro člověka, model – laboratorní zvíře*
- *hodnocení ekologických rizik*
 - řada druhů – nutná zjednodušení:
RECEPTORY – citlivé druhy reprezentující příslušné organismy

- výsledek

1) nejčastěji bodové vyjádření

PNEC (*predikovaná „no-effect concentration*)

nebo TDI (humánní – tolerable daily intake)

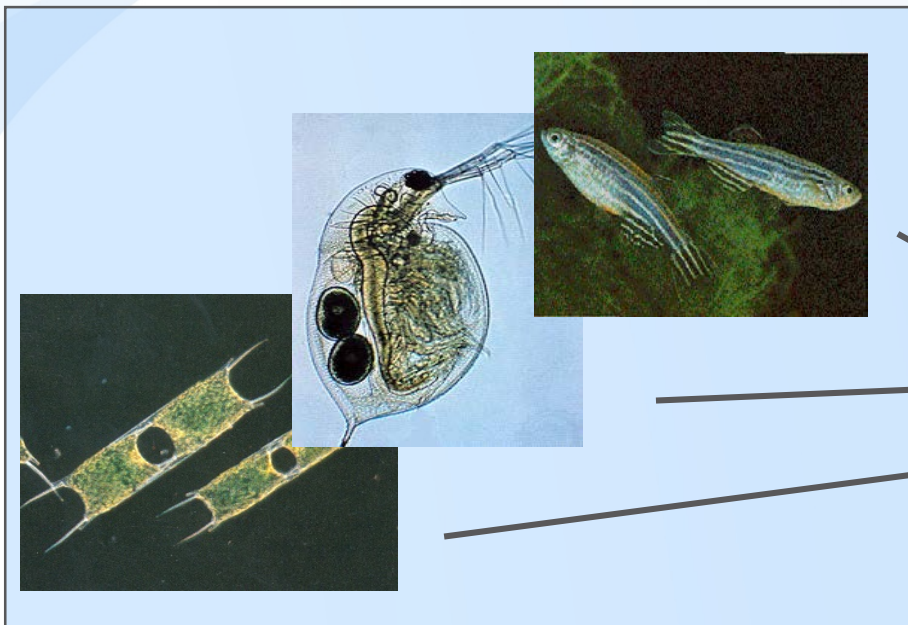
nebo 2) pravděpodobnostní vyjádření (*viz dále*)



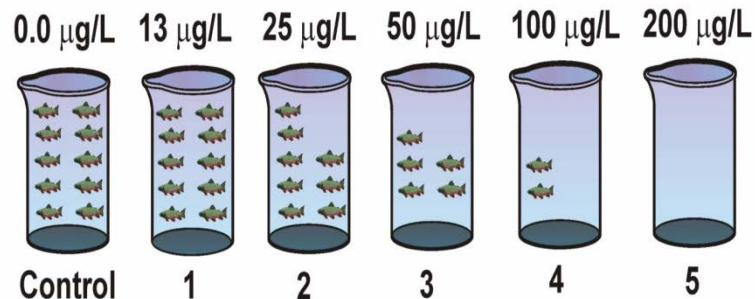
Praktické odvození PNEC

Krok 1: Experimentální testy ekotoxicity

Přídavek látky (Cu) / směsi



Concentration:



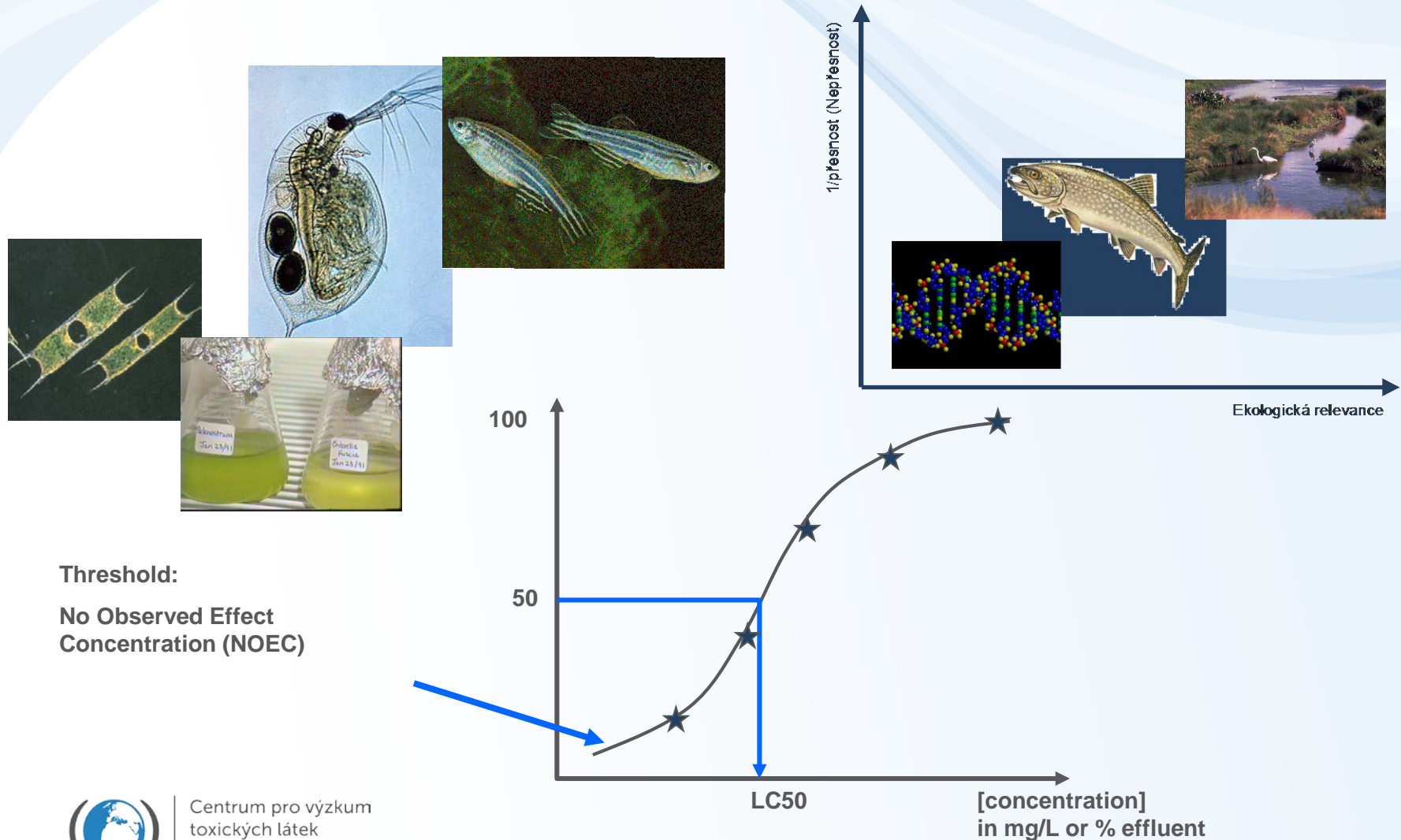
Účinky - koncentrace
(celkový/rozpuštěný Cu)

V praxi – 3-4 akutní biotesty



Krok 2: Vyhodnocení → odvození EC50 a/nebo NOEC

??? Jak lze extrapolovat 3 hodnoty EC50 do reality (ekosystémy) →
PNEC (Predicted No Effect Concentration)



EXTRAPOLACE EC_x/NOEC → PNEC: faktory nejistoty

- **Faktory nejistoty / Extrapolační faktory / Faktory hodnocení**
(uncertainty / extrapolation / assessment factors)
 - *? Jak moc je kmen *D. magna* relevantní (intradruhová variabilita)*
 - *? Jsou laboratorní druhy relevantní pro přírodní organismy (mezidruhová variabilita)*
 - *? Citlivost druhů v laboratořích vs. v přírodě*
 - *v laboratořích zpravidla druhy s malou citlivostí – „robustní“ druhy lze chovat ALE přírodní = citlivé ne*
 - *? Jsou použity citlivé parametry (endpointy)*
 - *Klasické testy = mortalita << citlivější reprodukce (ale méně využívána v biotestech)*
 - *? Je relevantní laboratorní expozice pro přírodní podmínky*
 - *Biodostupnost látek / „ageing“ látek*
 - *Expozice v optimu (potrava, podmínky – pH, T)*
 - *Spolupůsobení stresových faktorů (další látky, klima, predace/kompetice)*
 - *Adaptace organismů*



EXTRAPOLACE EC_x/NOEC → PNEC

- **Využití faktorů při extrapolaci**
 - *UF* – *uncertainty factors*,
 - *AF* – *assessment factors*

Hodnoty UF/AF zpravidla = 2, 5, 10, 100, 1000
(podle konkrétního předpisu / zákona / akceptované dohody mezi požadavky společnosti a potřebami průmyslu/spotřebitelů)

Využití faktorů: násobení (dělení) získaných výsledků ekotoxicity

$$\mathbf{PNEC = EC_{50} / AF}$$

např. k dispozici jsou data ze 3 biotestů

→ využije se nejnižší hodnota EC_x : protektivní cíl



→ **odvození PNEC** = bezpečná koncentrace
→ nastavení „limitů“ (EQS – environmental quality standards)

Hodnoty ekotox. EC50 / NOEC

Extrapolace pomocí faktorů (příklady)

Dostupná data	Assessment factor
L(E)C50 short-term toxicity tests	1000
NOEC for 1 long-term toxicity test	100
NOEC for additional long-term toxicity tests of 2 trophic levels	50
NOEC for additional long-term toxicity tests of 3 species of 3 trophic levels	10

PNEC



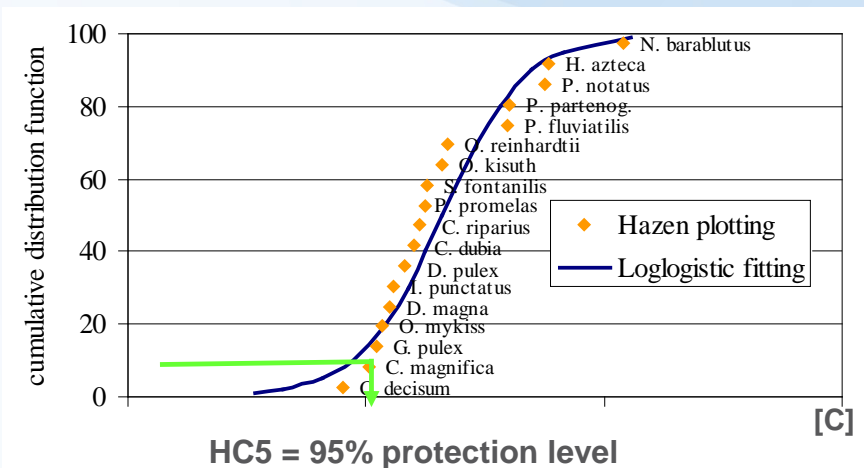
→ **odvození PNEC** = bezpečná koncentrace
 → nastavení „limitů“ (EQS – environmental quality standards)

Hodnoty ekotox. EC50 / NOEC

Extrapolace pomocí faktorů (příklady)

Dostupná data	Assessment factor
L(E)C50 short-term toxicity tests	1000
NOEC for 1 long-term toxicity test	100
NOEC for additional long-term toxicity tests of 2 trophic levels	50
NOEC for additional long-term toxicity tests of 3 species of 3 trophic levels	10

Species sensitivity distribution (SSD)
statistická metoda – zohlední dostupná data
 = EC50 více druhů



PNEC



PNEC vs limity EQS

- PNEC
 - hodnota odvozená vědeckou metodou (experimentální nebo modelované ECx) s využitím standardizovaných postupů hodnocení rizik (AFs/UFs, SSD)
- EQS (Environmental Quality Standards)
= NEK (Normy Environmentální Kvality)
 - limit v zákonech, nařízeních atd.
 - je odvozen z PNEC, konkrétní hodnota je „politickým“ rozhodnutím a dohodou zúčastněných stran
 - Příklad: Ethinylestradiol (endokrinní disruptor) - odhadnutý PNEC je extrémně nízký (0.001 ng/L). Praktické souvislosti : (i) nelze sledovat (neexistují analytické metody s nízkým limitem detekce), (ii) ČOV reálně nemohou efektivně čistit odpadní vody → v praxi budou koncentrace EE2 vždy nad PNEC ... atd:
Politická debata: “Riziko je třeba řídit. Jaká hodnota EQS v zákoně je akceptovatelná, rozumná, smysluplná? “



NEK pro prioritní látky

Rámcová směrnice EU o vodách WFD (výběr, příklady)

Aktuálně (od 2015) seznam 44 prioritních látek (výběr dole)

+ seznam „sledovaných látek“ (watch list) – viz dále

Č.	Název látky	Číslo CAS ¹	RP-NEK ² Vnitrozemské povrchové vody ³	RP-NEK ² Ostatní povrchové vody	NPK-NEK ⁴ Vnitrozemské povrchové vody ³	NPK-NEK ⁴ Ostatní povrchové vody	NEK Biota ¹²
(21)	rtuť a její sloučeniny	7439-97-6			0,07	0,07	20
(22)	naftalen	91-20-3	2	2	130	130	
(23)	nikl a jeho sloučeniny	7440-02-0	4 ¹³	8,6	34	34	
(24)	nonylfenoly (4-nonylfenol)	84852-15-3	0,3	0,3	2,0	2,0	
(25)	oktylfenoly ((4-(1,1',3,3'- tetramethylbut yl)-fenol)	140-66-9	0,1	0,01	nepoužije se	nepoužije se	
(26)	pentachlorben zen	608-93-5	0,007	0,0007	nepoužije se	nepoužije se	

Kde najít limity / normy environmentální kvality ?

(= EQS – Environmental Quality Standards)

- **ČR**
 - v příslušných zákonech / vyhláškách
 - omezený výčet nejvýznamnějších látek
- **EU**
 - V příslušných legislativách
 - Příklad: Rámcová směrnice o vodě
(**WFD – Water Framework Directive**)
- **Databáze EQS**
 - Německá agentura pro ŽP: **UBA** (→ viz dále)



UBA, Německo

<http://webetox.uba.de/webETOX/public/search/ziel/open.do>



ETOX: Information System Ecotoxicology and Environmental Quality Targets

[Home](#) | [login](#) | [logout](#) | [Mater Data / Admistration](#) | [German](#)

Home

▶ [Effect Data](#)
▶ [Quality Target](#)

▶ [Organism](#)
▶ [Substance](#)
▶ [Reference](#)

Contact
▶ [Email](#)

Disclaimer
▶ [Disclaimer](#)

Downloads
▶ [ETOX-Info](#)
▶ [Glossary](#)
▶ [Handbook](#)

Imprint
▶ [Imprint](#)

Links
▶ [other pages](#)
▶ [Publications](#)

other Sources
▶ [Umweltbundesamt](#)

Quality Target

In all text fields you can use * and ? as wildcards.

Substance Name

<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>

Substance No

<input type="text"/> *)	<input type="text"/>
<input type="text"/> *)	<input type="text"/>

Protected Asset

<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>

Use

<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>

Protection Level

Institution

Country

County

Medium

Specific Search

▶ [Substance Name](#)
▶ [Substance No](#)
▶ [Reference](#)



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

UBA, Německo

Seznam dalších zdrojů – EKOTOXIKOLOGICKÁ DATA

ETOX -- Links

ETOX: Information System Ecotoxicology and Environmental Quality Targets

Links to other Providers

Date: 07.06.2012

Content

The list of providers below contains some exemplary links which may be useful for the assessment of substances or for the search of ecotoxicity data and environmental quality targets.

1 Databases and Information systems

1.1 Substance databases

ECOTOX Datenbank der US EPA	http://www.epa.gov/ecotox
Gemeinsamer Stoffdatenpool Bund/Länder	http://www.gsbl.de

1.2 Information systems

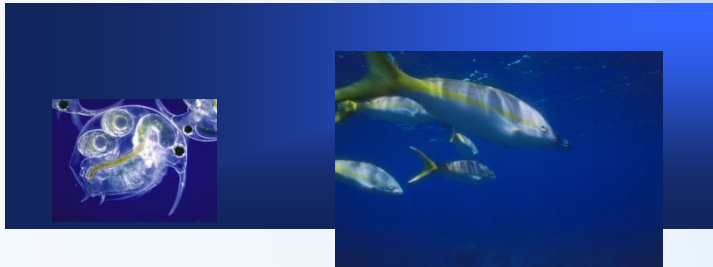
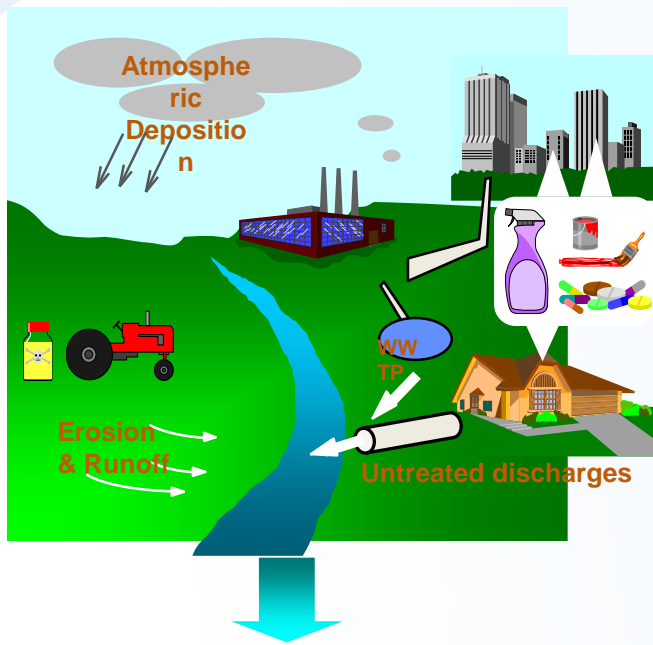
Canadian Environmental Quality Guidelines (CEQG) Canada, British Columbia	http://www.ccme.ca/publications/cegg_rcqe.html http://www.env.gov.bc.ca/wat/wq/#criteria
European Chemical Substance Information System	http://esis.jrc.ec.europa.eu/
France: INERIS Chemical Substance Portal Environmental database	http://chimie.ineris.fr/en/index.php http://www.ineris.fr/substances/fr/page/9
Netherlands: Rijkswaterstaat RIZA	http://www.helpdeskwater.nl/onderwerpen/monitoring/normen-waterbeheer-0/



Shrnutí – odvození a využití EQS

Expozice (dávka)

Efekt (Jaká expozice vyvolá efekt ?)



KONCENTRACE
v prostředí
Měřená nebo modelovaná
(PEC = Predicted Env. Conc.)



Laboratorní a polní studie
Ekotoxikologické testy

Limit
(PNEC nebo EQS)

**RIZIKO existuje když $PEC / PNEC > 1$
→ řízení rizika**



Využití EKOTOXIKOLOGIE V PRAXI

Příklad 2: Legislativa REACH

→ více viz také jinde: „Regulatorní toxikologie“



REACH

Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals

- 27-2-2001: White Paper on the Strategy for Future Chemicals Policy
- 23-10-2003: Commission's proposal REACH
- Prosinec 2008: Povinná před-registrace („phase-in“)
(všechny chemikálie musely být registrovány u ECHA)

The screenshot shows the ECHA website interface. At the top, there is the ECHA logo (European Chemicals Agency) and a search bar. Below the logo, there is a navigation menu with links: About Us, Regulations, Addressing Chemicals of Concern, Information on Chemicals, Chemicals in our Life, and Support. The main content area is titled "REACH 2013" and features a prominent blue banner with the text "ACT NOW! REACH 2013" and a magnifying glass icon. Below the banner, there is a table with the following data:

Phase-in substances intended to be registered for 2013 deadline	3857
Number of substances for which at least one potential registrant has declared the intention to register the substance.	
of which were registered by the 2010 deadline	868
of which are 'new' phase-in substances to be registered for 2013 deadline	2989

Below the table, there is a section for "Calendar" with a link to "11-12 October 2012 Second Lead registrant workshop" and a section for "Webinars".

European Chemicals
Agency
(<http://echa.europa.eu>)



- **Data požadovaná v REACH pro každou látku**
(registrační dossier)
 - **Fyz-chem parametry, např.**
 - Kow, bod varu, výpar (Henryho konstanta)
 - **Toxikologie (lidská), např.**
 - Akutní a chronická toxicita, iritace na kůži, karcinogenita
 - **Environmentální rizika – ekotoxikologie, např.**
 - Akutní a chronická toxicita, biodegradace, bioakumulace





Registrační dokumentace:

- Příloha 1:

7. POSOUZENÍ NEBEZPEČNOSTI PRO ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ

7.1 Vodní prostředí (včetně sedimentu)

7.2 Suchozemské prostředí

7.3 Ovzduší

7.4 Mikrobiologická aktivita v systémech čištění odpadních vod

12.1 Ekotoxicita

Uvedou se důležité dostupné údaje o toxicitě pro vodní organismy, jak akutní, tak chronické toxicitě pro ryby, koryšce, řasy a jiné vodní rostliny. Jsou-li k dispozici, uvedou se dále údaje o toxicitě pro půdní mikro- a makroorganismy a další organismy důležité z hlediska životního prostředí, jako jsou ptáci, včely a rostliny. Má-li látka inhibiční účinky na aktivitu mikroorganismů, zmíní se možný dopad na čistírny odpadních vod.

U látek podléhajících registraci se uvedou souhrny informací získaných použitím příloh VII až XI.



REACH



- Nařízení 440/2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006, o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek

- ČÁST C: METODY STANOVENÍ EKOTOXICITY

- C.1. AKUTNÍ TOXICITA PRO RYBY
- C.2. ZKOUŠKA AKUTNÍ IMOBILIZACE DAFNIÍ (DAPHNIA SP.)
- C.3. ZKOUŠKA INHIBICE RŮSTU ŘAS
- C.4. STANOVENÍ „SNADNÉ“ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI
- C.5. ROZKLAD – BIOCHEMICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU
- C.6. ROZKLAD – CHEMICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU
- C.7. ABIOTICKÝ ROZKLAD – HYDROLÝZA JAKO FUNKCE PH
- C.8. TOXICITA PRO ŽÍŽALY
- C.9. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST – ZAHN – WELLENISOVA ZKOUŠKA
- C.10. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST – SIMULAČNÍ ZKOUŠKA S AKTIVOVANÝM KALEM
- C.11. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST – ZKOUŠKA NA INHIBICI DÝCHÁNÍ AKTIVOVANÉHO KALU
- C.12. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST – MODIFIKOVANÁ ZKOUŠKA SCAS
- C.13. BIOAKUMULACE: PRŮTOKOVÁ ZKOUŠKA NA RYBÁCH
- C.14. RŮSTOVÁ ZKOUŠKA NA NEDOSPĚLÝCH RYBÁCH
- C.15. ZKOUŠKA KRÁTKODOBÉ TOXICITY NA RYBÍM EMBRYU A VÁČKOVÉM PLŮDKU
- C.16. ZKOUŠKA AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITY PRO VČELU MEDONOSNOU
- C.17. VČELA MEDONOSNÁ – ZKOUŠKA AKUTNÍ KONTAKTNÍ TOXICITY
- C.18. STANOVENÍ ADSORPCE/DESORPCE ŠARŽOVITOU ROVNOVÁŽNOU METODOU
- C.19. ODHAD ADSORPČNÍHO KOEFICIENTU (KOU) PRO PŮDY A ČISTÍRENSKÉ KALY POMOCÍ HPLC
- C.20. ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI DAPHNIA MAGNA
- C.21. PŮDNÍ MIKROORGANISMY: ZKOUŠKA NA TRANSFORMACI DUSÍKU
- C.22. PŮDNÍ MIKROORGANISMY: ZKOUŠKA NA TRANSFORMACI UHLÍKU
- C.23. AEROBNÍ A ANAEROBNÍ TRANSFORMACE V PŮDĚ
- C.24. AEROBNÍ A ANAEROBNÍ TRANSFORMACE V SYSTÉMECH VODA/SEDIMENT



REACH – požadavky na testy (eko)toxicity



Požadavky se zvyšují v souvislosti s produkcí (množství tun/rok)

Classification categories	Test requirements in REACH			
	>1t		>10t	>100t
		New or prioritised substance		
Reproductive toxicity (a generation test)	no	no	no	no
Chronic toxicity and cancer	no	no	no	(yes)
90-day study	no	no	no	(yes)
28-day study	no	no	(yes)	yes
Acute toxicity (a second route of exposure)	no	no	yes	yes
Acute toxicity	no	yes	yes	yes
Skin allergy	no	yes	yes	yes
Skin and eye irritation	no	yes	yes	yes
Mutagenicity (In vitro)	no	yes	yes	yes
Further ecotoxicity studies (incl long term tests)	no	no	no	yes
Acute toxicity: fish	no	no	yes	yes
Acute toxicity: algae	no	yes	yes	yes
Acute toxicity: Daphnia	no	yes	yes	yes
Biotic degradation	no	yes	yes	yes

SHRNUTÍ – EKOTOXIKOLOGIE V PRAXI

- Podobné principy jako bylo ukázáno na příkladech jsou uplatňovány i v dalších oblastech
 - Environmentální normy (EQS, příklad odpady):
 - kaly ČOV, vytěžené sedimenty, voda ...
 - Nebezpečné látky (příklad veterinární léčiva)
 - pesticidy, biocidy
 - komplexní legislativa REACH (viz dále)



ENVIRONMENTÁLNÍ TOXIKOLOGIE - SHRNUÍ

- **Environmentální toxikologie 1: Expozice**
 - Hlavní zdroje látek pro prostředí, hlavní skupiny látek v prostředí
 - Hlavní látky v matricích ŽP – příklady (vzduch, voda)
 - Osud látky v prostředí → Expozice
 - Rozdělování v prostředí – Kow, H
 - Transformace v prostředí – t1/2, DT50
 - Bioakumulace, Biodostupnost, Expozom

- **Environmentální toxikologie 2: Ekotoxikologie**
= účinky na přírodní organismy
 - Strategie testování (modely, trofické úrovně, baterie testů)
 - Příklady hlavních biotestů (vodní – řasy, dafnie, ryby / půdní – rostliny, žížaly)
 - Příklady využití výsledků biotestů (odvození limitů, REACH, “tiered” approach – léčiva)

