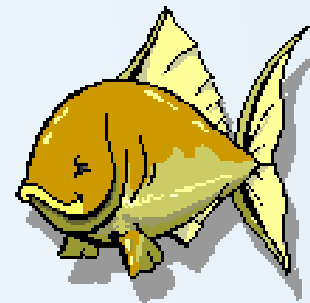
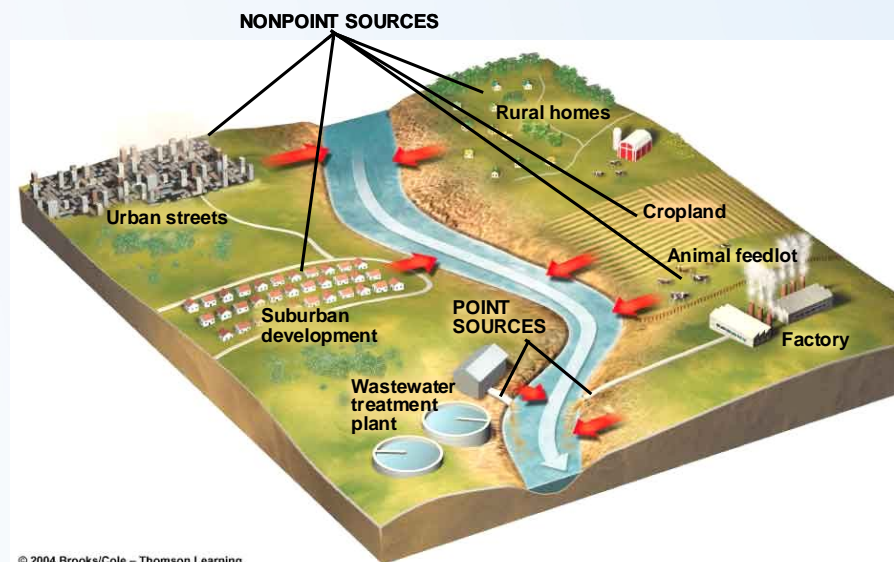


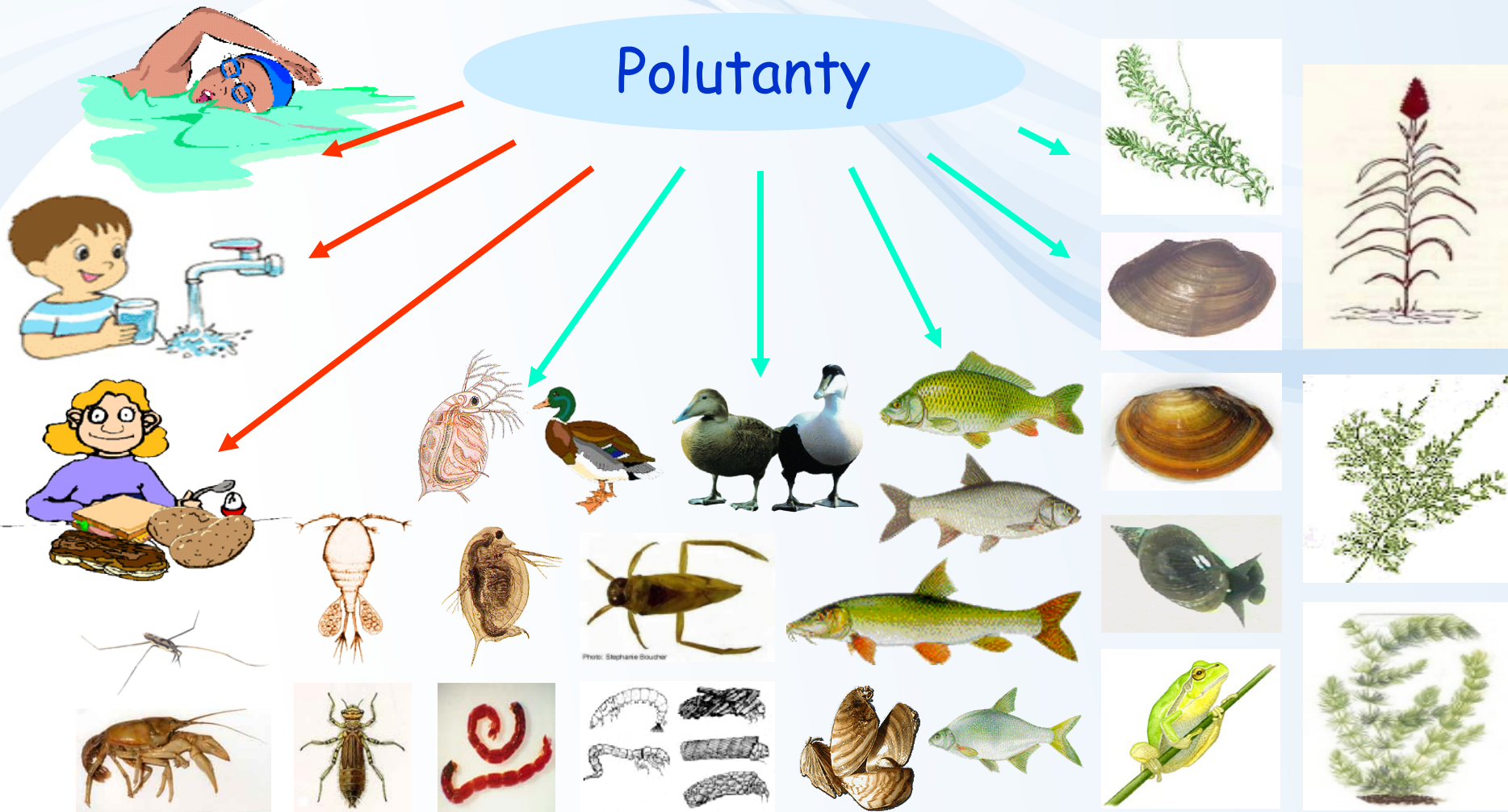
# Ekotoxikologie vodního prostředí



- Studium vlivu kontaminace vodního prostředí (tedy vody, suspendovaných částic, sedimentů) na přírodní organismy
- Serie biologických modelů - akutní i chronické (tj. subletální) účinky u zástupců producentů, konzumentů a destruentů
- Kromě *in vivo* účinků (letalita, reprodukční toxicita, embryotoxicita apod.) - biochemické odpovědi organismů na všech úrovních jako časné biomarkery toxických projevů
- Studium toxických účinků u jednotlivců, i rozvoj metodik a poznatků v oblasti vyšších organizačních stupňů (ekotoxikologie populací a společenstev)



# Znečištění – zdravotní a ekologická rizika ?



# Odpověď organismů na akvatické polutanty

Po vstupu látky do organismu

1. Spuštění obraných mechanismů s cílem detoxifikace polutantu, ale v některých případech dochází k jejich bioaktivaci
2. Snížení dostupnosti polutantu navázáním na jiné molekuly k jeho vyloučení nebo uložení.
3. Spuštění mechanismů k opravě poškození způsobeného polutantem
4. Pokud obrané mechanismy nedostačují - poškození organismu:

*Narušení přenosu energie*

*Genotoxicita*

*Endokrinní disrupce*

*Morfologické deformity*

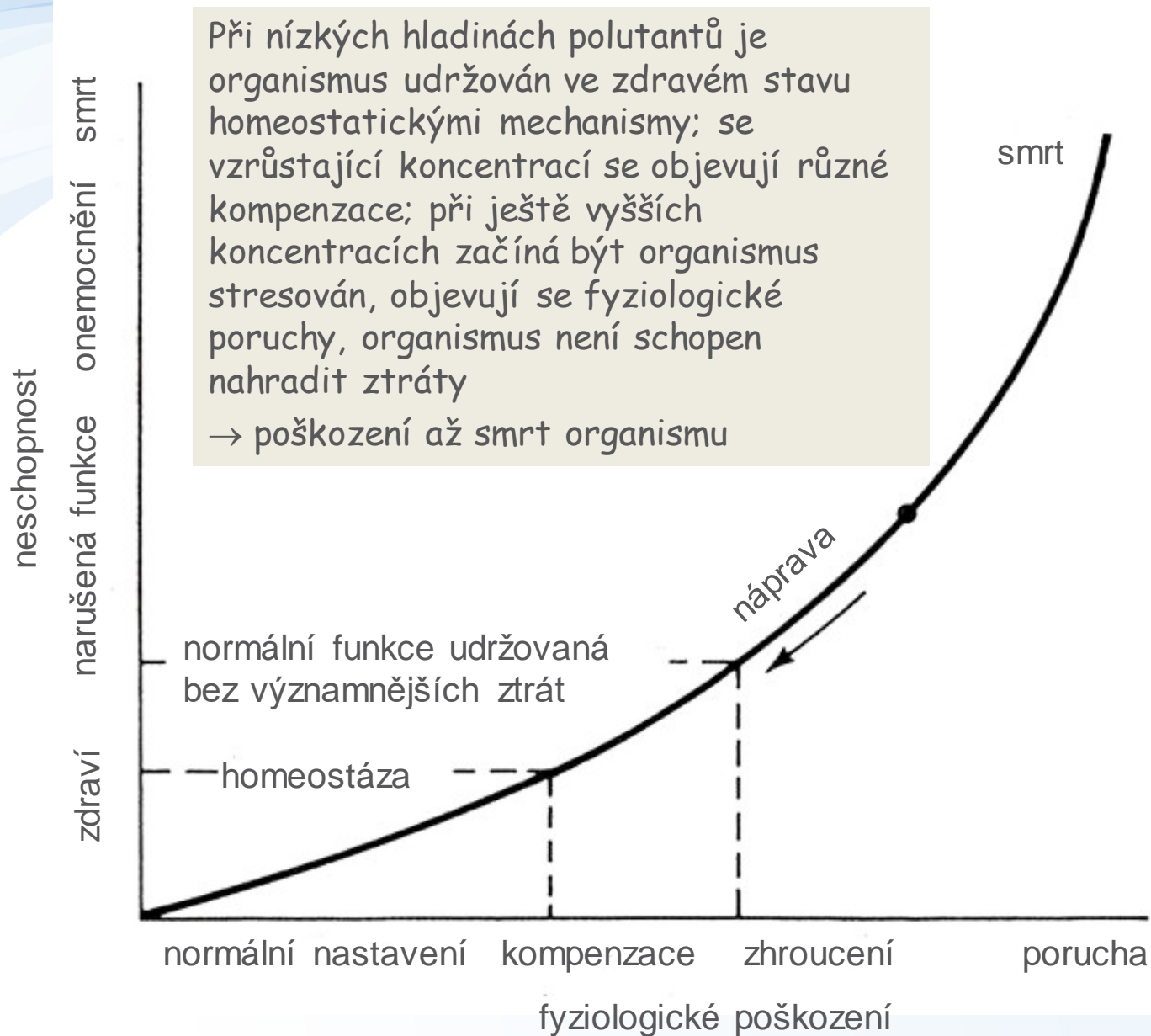
*Neurotoxická*

*Narušení reprodukce*

*Mortalita*

*změny v chování (zvýšená pohybová nebo driftová aktivita)*

*změny v životních cyklech (přežití, růst, mortalita, rozmnožování, vývoj a emergence)*



# Hodnocení nebezpečnosti látek a směsí pro akvatické ekosystémy

## Prospektivní

### Biologické hodnocení

- *in silico* predikce
- *in vivo* testy
- *in vitro* testy
- mikrokosmy, mezokosmy

### Testování:

- čistých látek
- modelových směsí
- přípravků a směsí s očekávanou expozicí



## Retrospektivní

- Chemické analýzy – stanovení koncentrace vybraných polutantů
- Biomonitoring společenstev – makrozoobentos, ryby, plankton
- Biologická hodnocení

- *in vivo* testy
- *in vitro* testy
- *in situ* studie

### Testování:

- vzorky z prostředí
- komplexní environmentální extrakty, výluhy



# Organismy používané pro ekotoxikologické biotesty

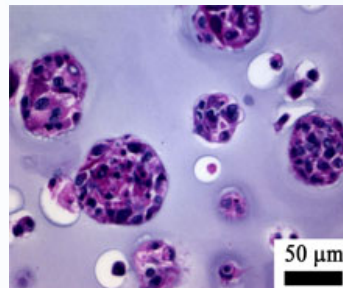
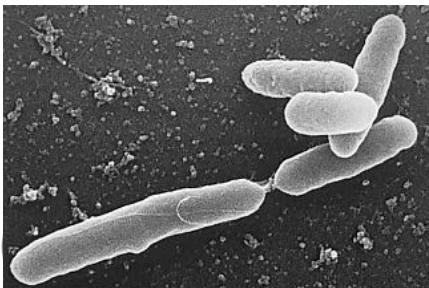
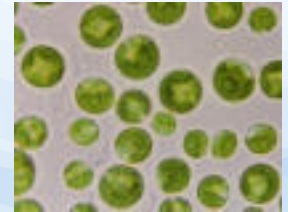
## Reprezentativní modely pro daný ekosystém

- Druh je v přírodě snadno dosažitelný
- Dá se snadno chovat v laboratorních podmínkách
- Zřetelně reaguje na toxickou látku

## Modely na všech úrovních potravního řetězce

(zastoupení různých trofických/funkčních úrovní)

- producenti - fotoautotrofní organismy,  
řasy, sinice, vyšší rostliny
- konzumenti – vodní bezobratlí (korýši, pakomáři),  
obojživelníci (drápatky)  
ryby, ptáci
- destruenti – bakterie, kvasinky



# Hodnocení ekotoxicity - akutní vs. Chronická

## LC<sub>50</sub> vs EC<sub>50</sub>/EC<sub>10</sub>/NOEC

### Akutní

- Účinky po krátké expozici (hodiny – dny)
- Většinou zaměřeny na mortalitu → LC<sub>50</sub>
- Někdy také subletální parametry
- Často vysoké dávky – limitní test



### Chronická

- Účinky po dlouhodobé expozici (týdny – měsíce)
- Účinky výsledkem kumulativního poškození
- Zaměření na **subletální parametry** (růst, reprodukce)
- **NOEC, LOEC, EC<sub>10</sub>, EC<sub>50</sub>**
- Mortalita je také zahrnuta
- Nižší dávky – dle výsledků akutního testu



# Testy toxicity – které parametry?

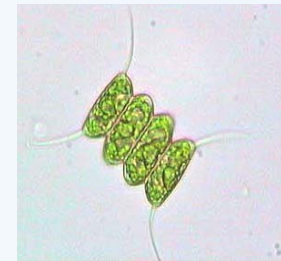
- **Specifické = sub-individuální parametry**
  - Molekulární úroveň (genová exprese)
  - Biochemická úroveň (proteomika, metabolomika, indukce enzymů)
  - Fyziologická úroveň (respirace, osmotická rovnováha apod.)
  - Jiné...



Dráhy škodlivého účinku  
(AOPs)



- **Obecné = parametry na individuální úrovni relevantní pro populaci**
  - Přežití/mortalita
  - Růst / Metabolismus
  - Reprodukce





# Standardizované akvatické testy toxicity

(ISO, OECD, ASTM)

- **Zelené řasy** - 72 či 96-h růstový test (OECD; ISO; ASTM)
- **Makrofyta** - okřehek (*Lemna minor*) – 72 až 168 hod

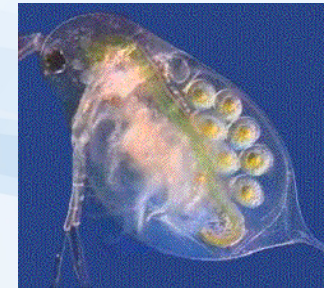


- **Vodní bezobratlí – korýši - hrotnatka velká**

*Daphnia magna* - akutní a chronické účinky

24-48 h test imobilizace (OECD; ISO; ASTM)

21-d reprodukční test (OECD)



- **Ryby**

96- h test akutní toxicity (OECD; ISO)

ELS (Early Life Stage) test (OECD)

embryo-larvální testy (OECD) – testy na raných stádiích



- **Larvy obojživelníků – FETAX**

– test embryotoxicity a teratogeneze s embryi obojživelníků

– drápatka vodní (*Xenopus laevis*) - 96- h test



# Organismy používané pro akvatické biotesty - konzumenti



*Daphnia magna* – Hrotnatka velká



*Potamopyrgus antipodarum* –  
Písečník novozélandský



Pakomáři rodu *Chironomus*



- *Tubifex tubifex* – Nitěnka obecná
- *Artemia salina*
- *Thamnocephalus platyurus*



Test s vajíčky obojživelníků (drápatky)

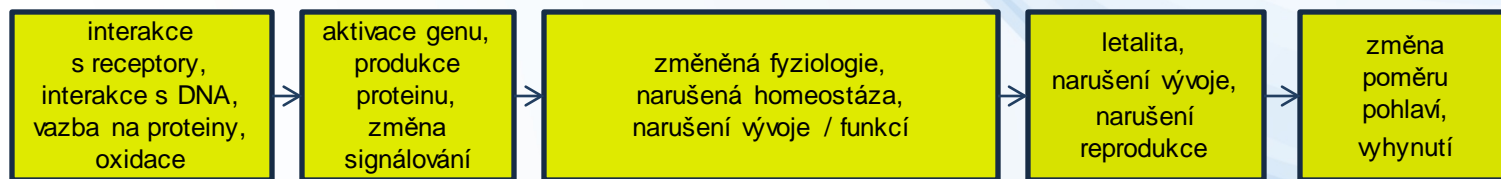
Testy s rybami

Testy s obojživelníky, s ptáky



# In vitro testy – biodetekční systémy

- testy na původních či geneticky modifikovaných prokaryotických či eukaryotických buňkách
- screening ovlivnění mechanismů chronické toxicity polutantů
- hodnocení cytotoxicity, genotoxicity, imunotoxicity
- potenciál endokrinní disrupce – různé mechanismy (např. estrogenita, androgenita)
- MIEs z AOPs – predikce škodlivých účinků/rizika



## Testování komplexních vzorků z životního prostředí

- vzorky vody, sedimentů, plavenin, biomasy
- rychlý screening znečištění
- celková biologická aktivita látek, které působí specifickým mechanismem
- možnost provést screening velkého množství vzorků
- mohou poukázat na přítomnost toxikologicky významných látek, které nejsou běžně analyticky stanovovány
- sledují i možné interakce (jako synergismus či antagonismus) působení látek v komplexních směsích
- výběr vzorků pro podrobnější studium/analýzu
- spojení s analytickou chemií, modelováním účinků směsí, frakcionací, identifikací relevantních látek



# Terénní studie

## Odběry vzorků vodního prostředí

### !! Nutná reprezentativnost

- Průzkum znečištění zájmových lokalit
- Odběry vod, sedimentů, (s)plavenin, bioty, sinicové biomasy



### Zpracování vzorků



# Polutanty v akvatických ekosystémech

- **rozpuštěné** nebo v **suspenzi**, př. **adsorbované na částice**
- všechny formy mohou být transportovány vodou na velké vzdálenosti a mohou působit na organismy

Látky adsorbované na částice a nerozpuštěné látky - část je unášena, část **sedimentuje** (podle hustoty).

Vzdálenost, na kterou jsou unášené proudící vodou závisí na fyzikálních vlastnostech polutantu, rychlosti proudící vody a charakteru koryta.

## Transport a resuspendace sedimentů

Proudy, povodně, vítr, vlny

- Způsobují pohyby sedimentů v závislosti na jejich velikosti

Porová voda

- Voda mezi částicemi sedimentů
- Nepochární polutanty → sedimenty → porová voda → vodní sloupec
- Primární zdroj expozice polutantů pro organismy žijící v sedimentu

Sedimenty mohou vázat polutanty, pak být překryty další vrstvou sedimentů → redukce biodostupnosti



# Odběry vzorků - voda

Současná běžná monitorovací praxe – aktivní jednorázové bodové odběry vody do odběrových nádob

## Nevýhody:

- **nákladné (obsluha/transport)**
  - **poskytuje pouze info o znečištění v okamžiku odběru vzorku** (na dané lokalitě v daný čas)
  - **není reprezentativní, pokud koncentrace kolísají v čase**
  - **často není dosažena požadovaná citlivost** – může být potřeba prekoncentrovat větší vzorkované množství vzorku, abychom dosáhly požadované citlivosti
- Jsou potřeba alternativní vzorkovací metody
  - Kompozitní (slévané, směsné) vzorky – pracné
  - Automatické kompozitní vzorkování - nákladné zařízení

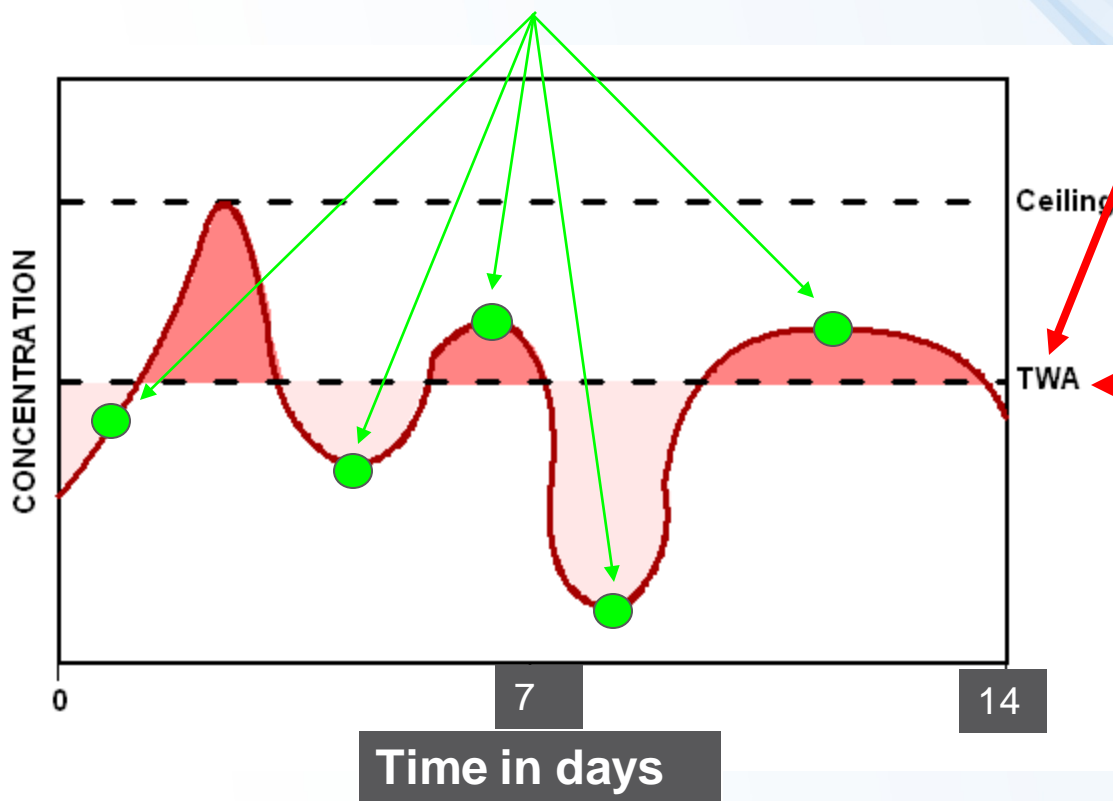


## Hodnocení vlivu odpadních vod

- test celkové toxicity odtoku = Whole Effluent Toxicity (WET)
- čištěné městské odpadní vody a průmyslové odpadní vody
- expozice různě rozředěnou odpadní vodou
- akutní toxicita pro ryby, pro dafnie
- test pro jikry dania pruhovaného (Danio rerio) - akutní účinky na jikry během 48 h

# Kolísání znečištění v čase

Concentrations  
in individual  
spot samples



**TWA = time-weighted average**

(vážený průměr  
reprezentativní pro  
daný časový úsek)

Integrativní vzorkování



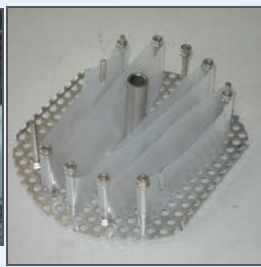
# Pasivní vzorkování



Umístění vzorkovače



Silikonové plátky



LDPE proužky

Expozice dny-týdny

Vyzvednutí vzorkovače



Kalibrační Parametry

(vzorkovací rychlost  $R_s$ ,  
rozdělovací koeficienty  $K_{sw}$ )

Modely

Výpočet koncentrace ve vodě  $C_w$



Extrakce a analýza



Silikonové vlákno





# SEDIMENTY

- dlouhodobé ukládací medium pro řadu polutantů ve vodním ekosystému
- potenciální zdroj druhotné kontaminace vod
- za jistých okolností (extrémní projevy počasí, trvalé působení kyselých dešťů, nepromyšlená změna využívání krajiny, dlouhodobé klimatické změny) se mohou zpětně uvolnit a tak vytvořit zdroj intenzivního vstupu škodlivin do prostředí, do potravních řetězců, do hydrologického cyklu.
- může docházet k remobilizaci polutantů při povodních, zásazích do vodních toků či nádrží
- charakterizace nebezpečnosti související s kontaminací sedimentů – dle toho nakládání se sedimenty
- důležitý faktor biodostupnosti kontaminantů
- možné remediace kontaminovaných lokalit bagrováním nebo odstraněním sedimentů
  - nutno minimalizovat riziko kontaminace ekosystému
  - identifikace kontaminovaných lokalit – kde je třeba odstranění, kde možno ponechat bez významného rizika



# Dnové sedimenty

Dnový sediment - kal usazený na dně nádrží a toků - anorganické i organické látky, odumřelé organismy - směs jílu, bahna, písku, organické hmoty, různých minerálů, huminových látek, odumřelých organismů a antropogenních polutantů

Zdroje tuhých částic:

- ↪ ze splachů z okolní půdy (jílové minerály, erodované horniny..),
- ↪ z antropogenních činností (MČOV, PČOV),
- ↪ tuhé částice ze sekundárních chemických reakcí (málo rozpustné fosforečnany, uhličitany, sulfidy..),
- ↪ organický detritus - zbytky odumřelých organismů živočišných a rostlinných usazujících se na dně jako jemný kal

Rovnováha voda - sedimenty

Ovlivněna obsahem organického C, N, huminových látek, anorganickým složením, výměnnou kapacitou



# Sedimenty

- velmi různorodé složení - polotuhá matrice - pevná fáze (částice) a pórová voda
  - v podstatě akvatický ekvivalent půdy
  - heterogenní prostředí
  - primární úložiště biotického i abiotického materiálu (včetně polutantů) v akvatickém prostředí
  - akumulace a inaktivace polutantů
  - akumulace polutantů v sedimentech může způsobit:
    1. Změny ve struktuře bentických společenstev
    2. Zvýšené zatížení organismů polutanty
    3. Toxicitu
- 
1. Obsah organického uhlíku – ovlivňuje sorpci neutrálních organických látek → zvýšené  $K_{ow}$  = zvýšená sorpce
  2. Distribuce zrnitostních frakcí – větší částice mají tendenci sorbovat méně polutantů
  3. Obsah a typ jílu
  4. Kationtová výměnná kapacita (KVK) – ovlivňuje sorpci kationtů
  5. pH – ovlivňuje speciaci kovů, sorpci



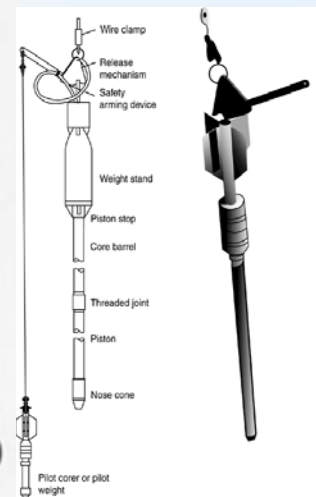
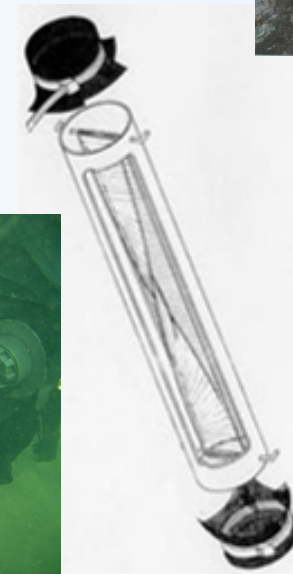
# Odběry vzorků sedimentů



## Často velmi nehomogenní materiál, velké rozdíly v zrnitosti, problematický odběr reprezentativního vzorku

- tyčové vzorkovače (vertikální profil, historie sedimentace)
- drapákové vzorkovače (směsné vzorky)
- pístové vzorkovače, namražovací vzorkovače
- pasivní vzorkovače – sedimentové pasti (plaveniny)
- pasivní vzorkovače – odběr určitých typů polutantů (zejm. pórová voda)

☹️ **Narušení fyzikálně chemických parametrů sedimentů**



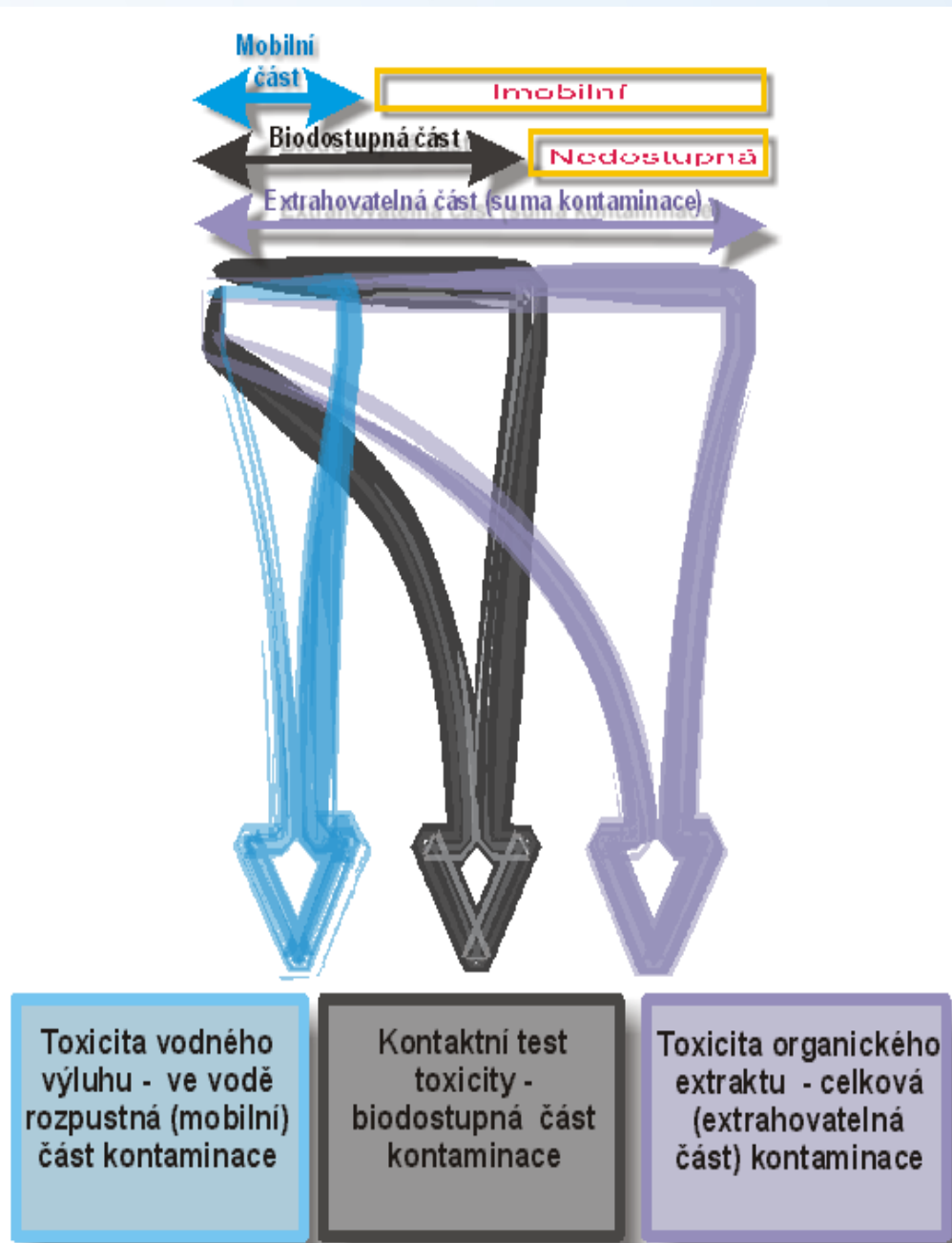
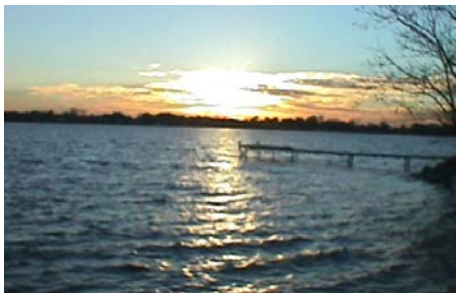
# Manipulace se vzorky

- Uskladnění:  
změny toxicity vzorků v závislosti na teplotě (chlazení (4°C) vs. mražení (<-20°C)) , době uskladnění a stupni kontaminace sedimentů
- Úpravy vzorků:
  - 1.) **homogenizace**
  - 2.) **lyofilizace vs. zmražení**
  - 3.) **příprava na chemické analýzy a biotesty**
    - **organické extrakty**
    - **vodné výluhy**
      - vodný výluh - 100 g d.w./L vody, 24h pomalé třepání, filtrace, test
    - **pórová voda**
    - **SPTs (Solid Phase testing = kontaktní toxicita)** – změny toxicity eluátů v závislosti na volbě rozpouštědla (voda, methanol, DCM) vs. toxicita biodostupné frakce kontaminantů



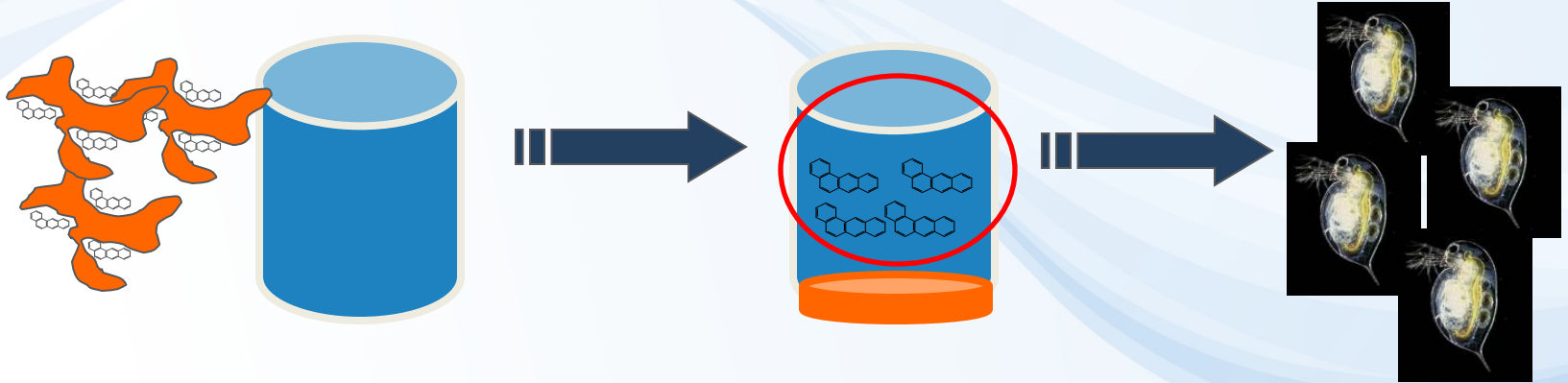
# Testování sedimentů a dalších komplexních vzorků z životního prostředí

- hodnocení ekotoxicity
  - různé trofické úrovně
- rychlý screening znečištění směrem k subletálním chronickým účinkům
  - genotoxicita,
  - endokrinně disruptivní aktivita
- výběr vzorků pro podrobnější studium/analýzu
- spojení s analytickou chemií, frakcionace, identifikace „toxicity drivers“



## ■ Ekotoxicita porové vody/výluhů/extraktů:

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



## ■ Kontaktní ekotoxicita (jen málo norem ...)

- sedimenty+organismy & hodnocení účinků – pakomáři, červi, hmyz, šneci ...

dny - týdny



- Doporučeny nejméně 2 různé druhy (např. Hyalella, Chironomus, Daphnia, ...) a dva různé sledované parametry (např. růst, přežití, reprodukce...)

# Kontaktní Testy Toxicity – ovlivňující faktory

## Faktory mimo kontaminace

- zrnitost sedimentů
- obsah a typ jílu
- obsah a charakter organického uhlíku
- struktura a vlastnosti huminových látek/organického materiálu
- pH
- obsah kyslíku
- toxicita amoniaku /sulfidů
- aktuální stav testovací populace
- výživa

## Změny toxicity sedimentů díky vzorkování a experimentálnímu postupu

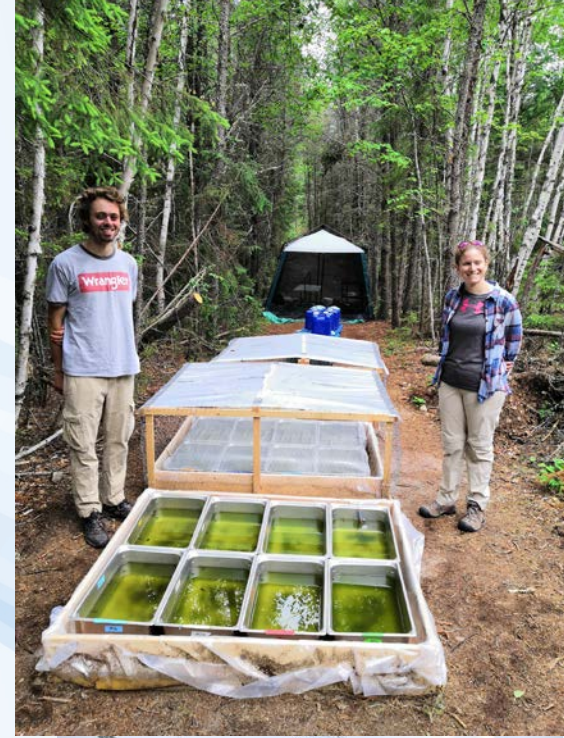
- promíchání více kontaminovaných sedimentů s tenkou vrstvou na rozhraní vody-sedimentů
- oxidace a precipitace redukováných kovů díky provzdušňování požadovanému v testu toxicity





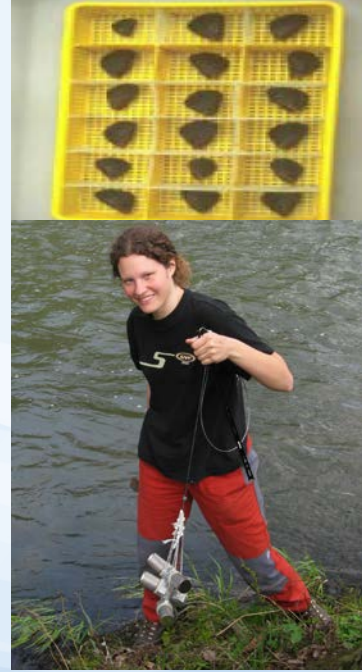
# Mikrokosmy a Mesokosmy

- kontrolované experimenty v laboratoři nebo terénu pro výzkum účinků na úrovni:
  - populace
  - společenstva
  - ekosystému
- Zpravidla vícedruhové uspořádání
- Současná expozice z vody i sedimentů
- Mikrokosmy jsou menší studie, většinou v laboratoři
- Mesokosmy jsou větší, s hodně druhy, většinou venku
  - komunikace s prostředím
  - přírodní srážky, přírodní sedimenty
  - přirozená společenstva organismů (plankton, makrofyta, ryby)
- Výhody:
  - Relevantnější než jednodruhové laboratorní studie
  - Lepší extrapolovatelnost výsledků na reálné ekosystémy

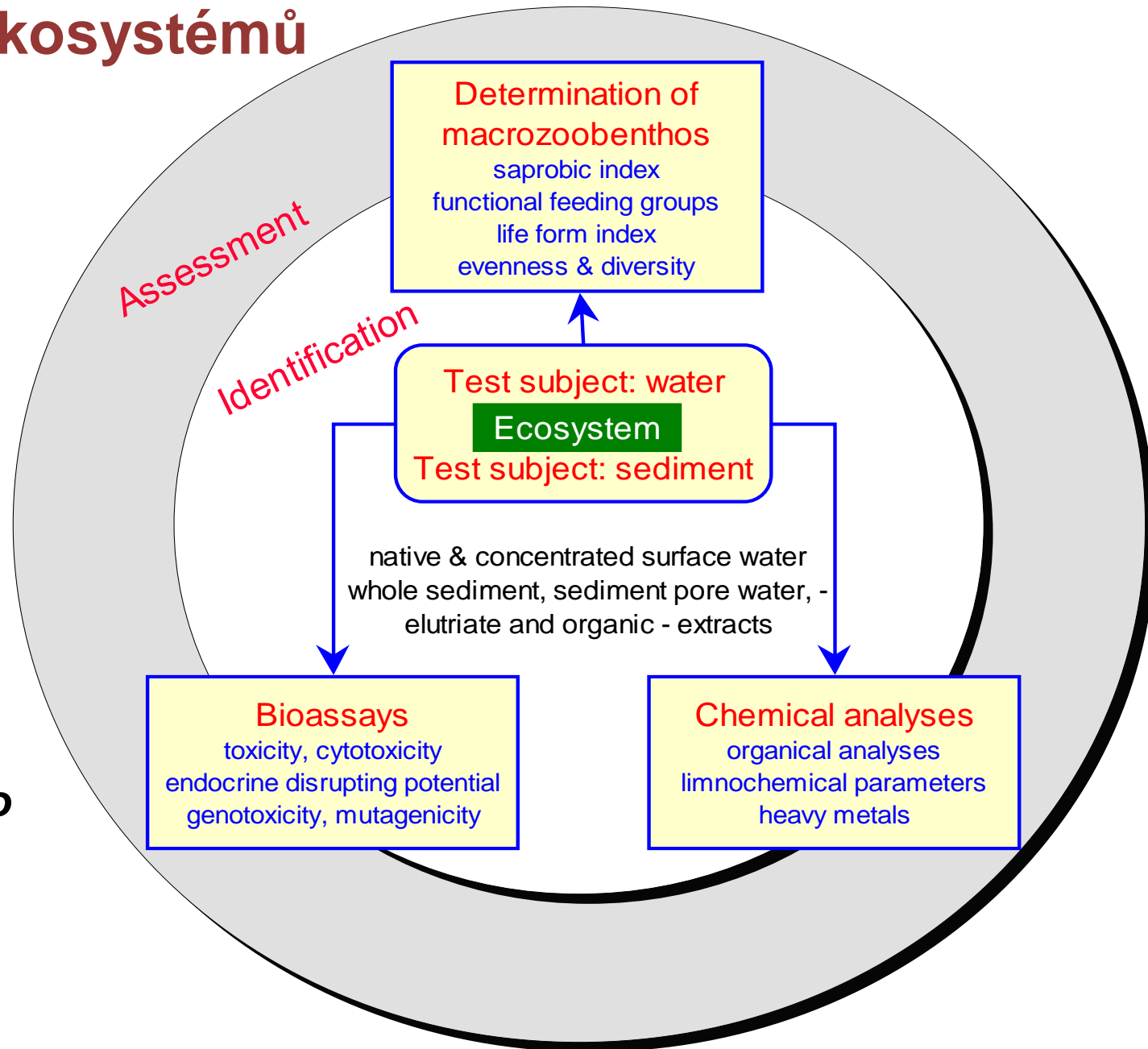


# In situ testy/terénní studie

- Klecování – měkkýši, ryby, další bezobratlí
- Odběr organismů z prostředí (zatížené vs. kontrolní lokality)
- Mortalita, zdravotní stav, příp. reprodukce a specifické biomarkery v exponovaných organismech
- Subletální biomarkery – v krvi, ve tkáních – např. metalothioneiny (těžké kovy), vitelogenin (endokrinní disrupce)
- Histopatologické vyšetření – např. jater, pohlavních orgánů (výskyt intersexu)



# Integrované hodnocení akvatických ekosystémů



... *in vitro* a *in vivo*  
biotesty