



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí



# Testování ekotoxicity - BIOTESTY

Luděk Bláha, PŘF MU

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Ekotoxikologický biotest

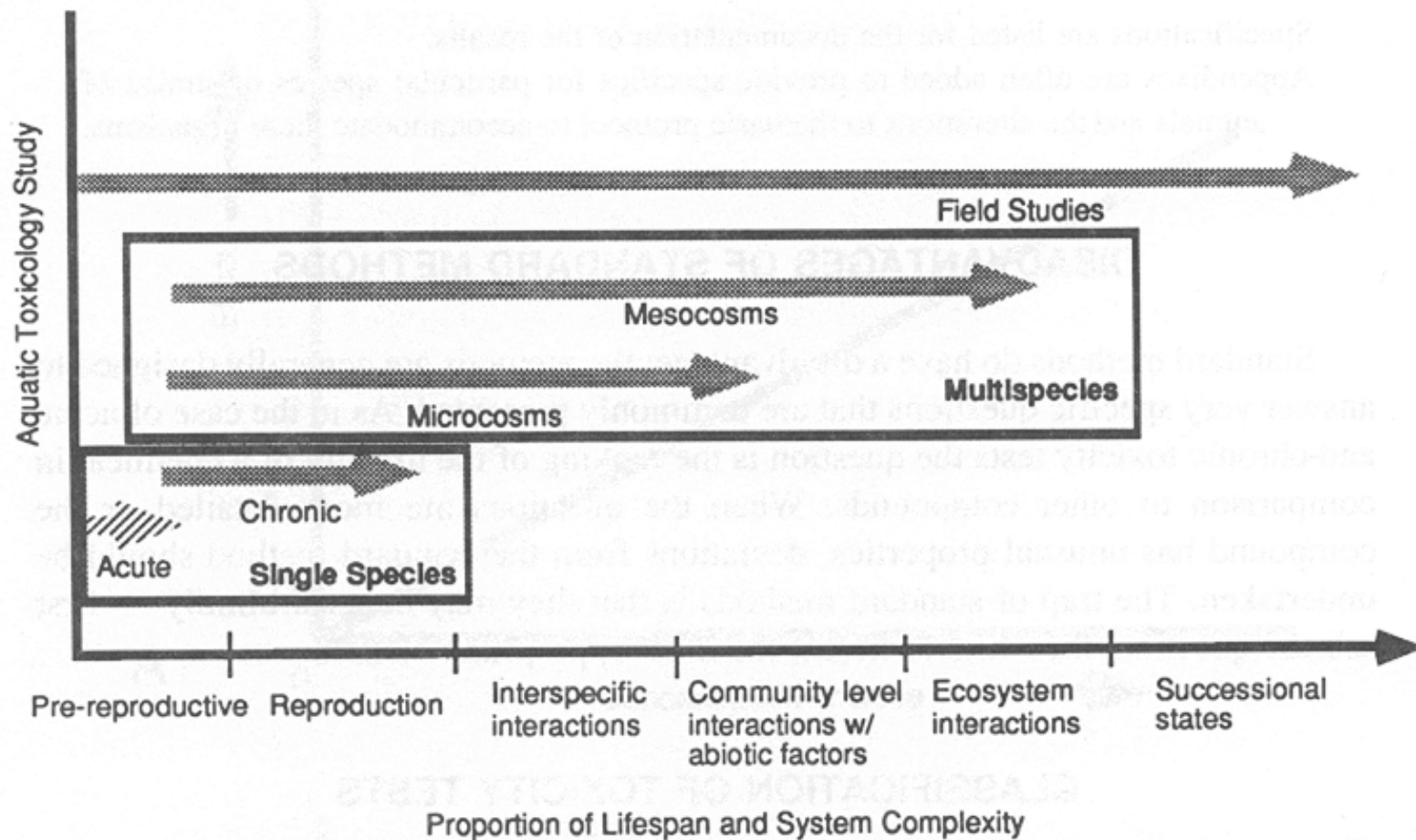
"Experimentální (*zpravidla laboratorní*) metody stanovení toxického působení stresorů (toxických látek) na přírodní organismy"

- 1) Standardní biotesty
- 2) Alternativní biotesty
- 3) Další biotesty (*specifické mechanismy, in vitro testy*)
- 4) Testy procesů (*biodegradabilita, bioakumulace ...*)
- 5) Testy orgánové toxicity s laboratorními zvířaty  
*obratlovci, savci "humánní toxikologie"*
- 6) Experimentální mikro a mezokosmy
- 7) Polní studie

**Laboratorní  
ekotoxikologické  
biotesty**

**In situ  
hodnocení  
efektů**

# EXPERIMENTÁLNÍ HODNOCENÍ EKOTOXICITY



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



# STANDARDIZOVANÉ BIOTESTY

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



- **Standardizace**
  - maximální standardizace kroků experimentálního postupu s cílem omezit faktory "intra-laboratorní" variability
  - Detailní popis všech kroků (Standardní Operační Procedury – SOPs)
  
- **Validace (validovaný postup, biotest)**
  - validovaný biotest, tj. postup jehož výsledky byly srovnávány a ověřovány ve více laboratořích (okružní testy, srovnávací studie ...)
  - Prokázáno, že v různých laboratořích poskytuje srovnatelné výsledky



# STANDARDNÍ (standardizované) BIOTESTY

- **Výhody standardních biotestů**
  - zaručení **jednotnosti a opakovatelnosti výsledků**
  - validované výsledky (viz dále) jsou vhodné pro ROZHODOVÁNÍ (*stanovení limitů pro prostředí, sanace, pokuty ...*)
  - Lze pracovat přímo s využitím dostupné „Standardní procedury“
- **Celá řada nevýhod (viz také dále), zejména:**
  - **omezená vypovídací hodnota** ("*akutní letalita pro Daphnia*"), vhodné jen pro zařazení (klasifikace) toxicity látek (více vs. méně toxické ...)
  - **omezený počet standardizovaných postupů**, zpravidla jednoduché (akutní) efekty



- **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*



# STANDARDY : Globálně nejvýznamnější jsou OECD Guidelines

<http://www.oecd.org>

ORGANISATION  
FOR ECONOMIC  
CO-OPERATION  
AND DEVELOPMENT



[Help/FAQ](#) | [MyOECD](#) | [Français](#)

Search  [»](#)

[More Search options](#)



Environment Directorate

Environment  
Directorate

▼ Chemical Safety

- Biocides
- Chemical Accidents
- Chemicals Classification and Labelling
- Chemicals Hazard/Risk Assessment
- Chemicals Risk Management
- Chemicals Testing - Guidelines
- Co-operation on the Investigation of Existing Chemicals
- Good Laboratory Practice
- New Chemicals
- Pesticides
- Pollutant Release and Transfer Registers
- Safety of Manufactured Nanomaterials

► Biodiversity, Water and Natural Resource Management

► Biosafety - BioTrack

► Climate Change

## Chemicals Testing - Guidelines

[► About](#) [► Publications & Documents](#) [► Information by Country](#)

The OECD [Guidelines for the Testing of Chemicals](#) are a collection of the most relevant internationally agreed testing methods used by government, industry and independent laboratories to assess the safety of chemical products.

- [Work Plan for the Test Guidelines Programme \(TGP\) July 2010](#)
- [Test Guidelines with components covered by Material Transfer Agreements](#)
- Peer Reviews:
  - [Endocrine Disrupters](#)
  - [Peer reviews of ecotoxicity and human health test methods](#)
- [Toxicogenomics](#)
- [OECD Harmonised Templates](#)
- [\(Q\)SARs](#)

### What's new

Don't miss

- [OECD Guidelines for the Testing of Chemicals](#)
- [Draft Test Guidelines](#)
- [Questions & Answers regarding the OECD Test Guidelines Programme \(TGP\)](#)
- [Animal Welfare](#)
- [Other Publications / Draft Publications](#)
- [OECD Harmonised Templates](#)
- [Contact Us](#)
- [Site Map](#)

...and also  
Guidance  
Document 1



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí



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

**Detaily k vybraným (nejčastěji užívaným) testům → viz dále**

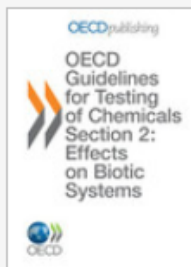
You are here: [Home](#) / [Books](#) / OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2

## OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2

*Effects on Biotic Systems*

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals

 [Subscribe to the feed](#)



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










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

ISSN : 2074-5761 (online)

DOI : 10.1787/20745761

Also available in: [French](#)

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

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

# ALTERNATIVNÍ EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY

- **Alternativní ekotoxikologické biotesty**
  - označení pro biotesty, které (doposud) nebyly zcela VALIDOVÁNY a akceptovány regulujícími organizacemi (*vlády, zákony*)
  - vypovídací hodnota však zpravidla koreluje se "standardními" testy
  - Vlastnosti alternativních testů:
    - miniaturizace (*šetření materiálem, vzorkem ...*)
    - dobrá dostupnost organismů bez nutnosti dlouhodobých kultivací
      - uchování dormantních stadií (cysty ....) např. v lednici
    - rychlost a jednoduchost

Někdy označovány jako **MIKROBIOTESTY**

- nejrozšířenější jsou tzv. TOXKIT ( [www.microbiotests.be](http://www.microbiotests.be) )
  - využívány v řadě laboratoří světa, postupná validace
  - řada "méně tradičních organismů" – prvoci, vířníci ...



# Stanovení ekotoxicity

## EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY -EXPERIMENTÁLNÍ DESIGN -

(Na co vše je třeba myslet při experimentech ?)



# Ekotoxikologické testování – EXPERIMENTÁLNÍ DESIGN

- řada charakteristik shodná pro testy v AKVATICKÉM a TERESTRICKÉM prostředí
- **Základní parametry**, které charakterizují biotest, a které je nutno evidovat, zaznamenat a zohlednit

*ke každému bodu – viz dále*

- *Komplexnost biologického systému*
- *Doba expozice*
- *Uspořádání expozice*
- *Expoziční scénář*
- *Biologický systém – organismus, druh*
- *Další specifika biologického systému*
- *Hodnocený parametr, endpoint*
- *Další abiotické faktory v experimentu*
- *Ověření expozice (chemická analýza testované látky v průběhu testu)*



# EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY

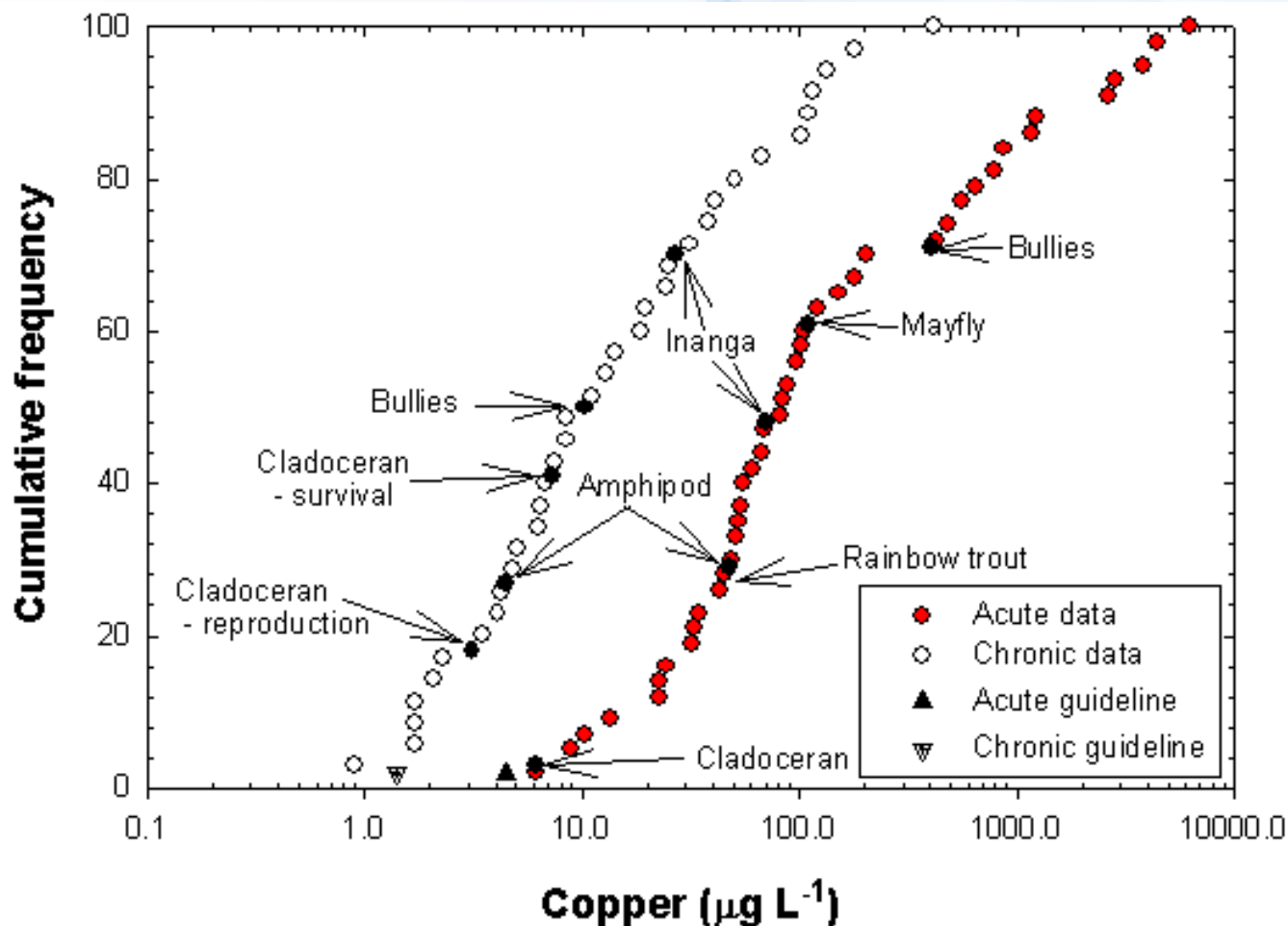
- **Komplexnost biologického systému**
  - *jednodruhové, vícedruhové testy, testy vyšších stupňů (mikrokosmy..)*
- **Délka expozice**
  - ***akutní – sub-chronická (sub-letální) – chronická***
  - *konkrétní délka závisí na generační době organismu (bakterie <<< pstruh), klasifikace není zcela jednotná. Dělení zpravidla na:*
    - akutní = 24, 48 až 96 hod, zpravidla hodnocení letality
    - chronické – dny, týdny až měsíce, hodnocení letality a neletálních efektů (růst, malformace ...)



# Srovnání výsledků akutní a chronické toxicity

Pro většinu „nespecificky“ působících látek platí:  
chronické testy: EC50 cca 10x nižší než akutní

Příklad Cu: - hodnoty EC50 (akutní vs. chronické testy) pro různé druhy





# EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY

- Uspořádání expozice - výměna testovaného vzorku
  - akvatické testy
    - **statické** (bez výměny roztoků - možné změny koncentrací, kyslíku)
    - **statické s obměnou média** (výměna v definovaných časech, á 24 h)
    - **recirkulační** (recirkulace média, technicky náročnější ...)
    - **průtočné** (kontinuální udržování koncentrací, technicky náročné ...)
  - testy toxicity sedimentů
  - terestrické testy
    - zpravidla jednorázové dávkování = statické



# EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY

## • Expoziční scénáře

(jakým způsobem je organismus vystaven látce?)

### ▪ Scénáře pro akvatické testy

- obvykle **expozice celých organismů** (*příjem povrchem těla, dýchacím aparátem, potravou*)

- méně často- méně relevantní: jednorázové injekce – spíše farmakologické studie (*ryby, vstup a dávka nejsou ovlivněny prostředím*)

- **testy zahrnují všechny významné skupiny organismů podle trofických úrovní – viz také dále: příklady**  
*rostliny* (producenti),  
*živočichové* (konzumenti),  
*bakterie* (destruenti, dekompozitoři)



# EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY

- **Expoziční scénáře**

- **Scénáře pro terestrické testy**

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



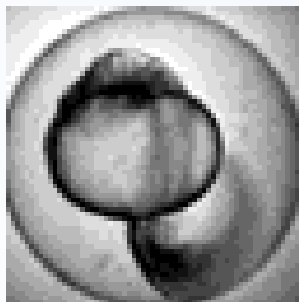
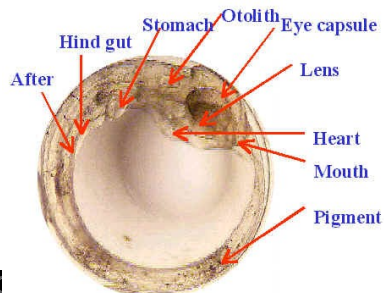
# EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY

- Výběr biologického systému - organismu
  - **závisí na CÍLECH stanovení:**
    - jasné definice cílů –
      - "ochrana hospodářsky významných druhů ryb",
      - "ochrana kvality půdy – aktivity půdních mikroorganismů",
      - „ochrana vody před toxickým odpadem" ...
    - organismus je reprezentantem dalších živých organismů
  - **PRAXE – testování látek:**
    - Organismus, typ expozice atd. - předepsán příslušným zákonem / standardem / normou
  - **Výzkum**
    - Lze (samozřejmě) definovat podle záměru/hypotézy výzkumu



# EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY

- Další specifikace biologického testovacího systému
  - výsledek stanovení toxicity a interpretaci ovlivňuje řada dalších biologických parametrů – viz diskuze v části „Toxické efekty“
    - *geneticky podmíněná citlivost příslušné kultury / klonu / variety ...*
    - *velikost a stáří jedinců*
    - *pohlaví*
    - *vývojové stadium (vajíčka, embrya, larvy, dospělci ...*
    - *Fyziologický stav a další podmínky*
      - *optimum (choroby, potrava – antioxidanty ...)*





# EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY

- **Hodnocený biologický parametr, endpoint**
  - biotesty akutní toxicity
    - **živočichové** - **nejčastěji hodnoceným parametrem je letalita**, dále imobilizace (*Daphnia*)
    - **autotrofové** – řasy: růst, **dělení, množství chlorofylu** (*fluorescence*); rostliny cévnaté – klíčení, růst
    - **destruenti** – bakterie: **růst, metabolická aktivita ...**
  - biotesty chronické toxicity
    - **živočichové** – neletální parametry – **růst**, reprodukční schopnosti a úspěšnost (**testy reprodukce**), specifické efekty - teratogenita
    - **autotrofové** – cévnaté rostliny – **klíčení, růst, tvorba gamet/semen**, rozmnožování ...



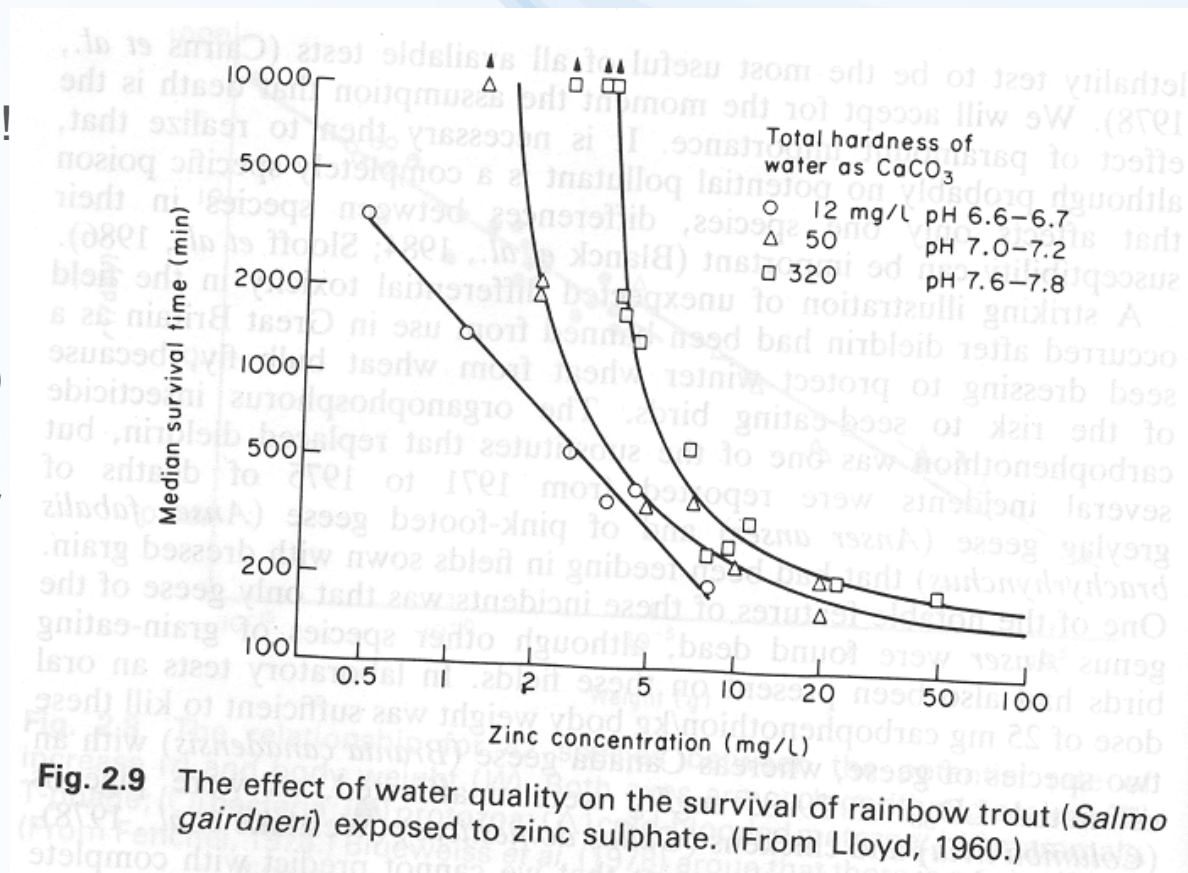


# EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY

## • Významné abiotické faktory v experimentu

Je třeba je vždy evidovat a hlídat (!), předepsány ve standardech (*např. obsah kyslíku v průběhu akvatického testu*)

- teplota
- světlo, světelná perioda
- obsah a přístup kyslíku !
- pH
- tvrdost vody – vliv na biodostupnost kovů (*akvatické experimenty*)
- složení půdy (obsah org. uhlíku – vliv na biodostupnost)



# EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY

- **Ověření expozice**

Ověření, že nedochází ke „ztrátám“ v průběhu expozice a že je zajištěna stabilní koncentrace:

Ztráty:      *sorbce na plast testovacích nádob (organické látky)*  
                    *sorbce na sklo (kovy)*  
                    *degradace / fotodegradace / biodegradace*

## **Chemické analýzy testovaných látek**

(vždy požadováno ve standardních testech)

- start expozice vs. ukončení expozice
- nejrůznější analytické metodiky – v současnosti nejčastější chromatografie
  - kapalinová (látky polární) / plynová (nepolární)
  - koncovka: nejmodernější – hmotnostní spektrometrie
- analýzy kovů – atomová absorpční spektrometrie, ICP / MS a další



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

# Biotesty - příklady

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY - PŘÍKLADY – PRODUCENTI -





# Ekotoxikologické biotesty - producenti

## AKVATICKÉ PROSTŘEDÍ

### Řasové testy toxicity

Expozice 72-96 hod,  
Hodnocení růstu (počítání buněk, absorbance, fluorescence)

- standardní uspořádání  
- *Erlenmayerovy lahve, třepání*
- miniaturizace  
- *mikrodestičky*

#### Řasy

*Pseudokirchneriella  
subcapitata*

(=*Selenastrum capricornutum*)

*Scenedesmus quadricauda*

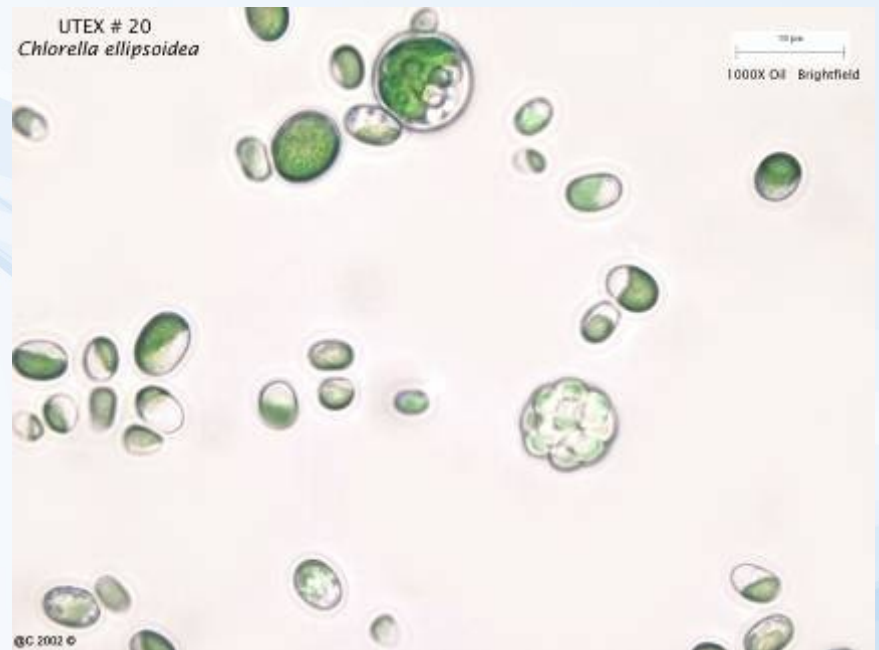
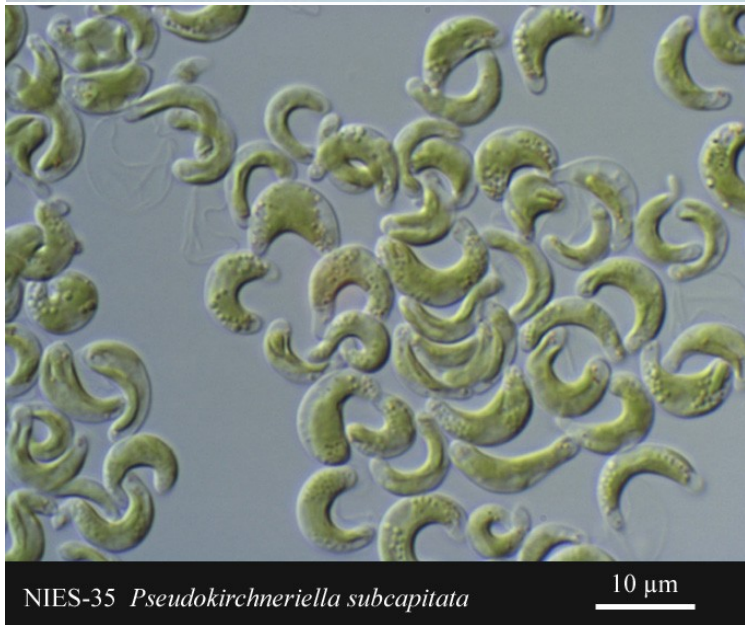
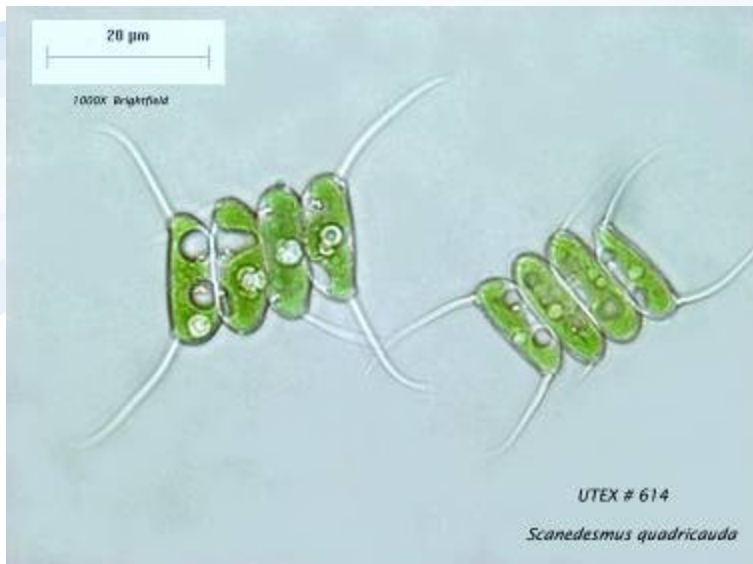
*Chlorella vulgaris*

#### Sinice

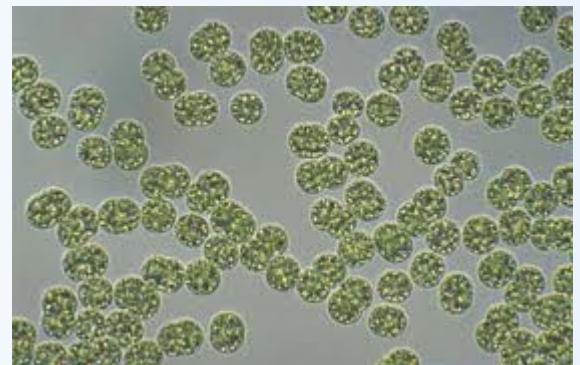
*Microcystis aeruginosa*

Klíčové k  
zapamatování:  
vyznačeno zeleně





## Sinice (cyanoBAKTERIE) *Microcystis aeruginosa*





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

Test type	Static
Organisms	Freshwater species: <i>Selenastrum capricornutum</i> , <i>Scenedesmus subspicatus</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Anabaena flos-aquae</i> , <i>Navicula pelliculosa</i> ; Saltwater species: <i>Skeletonema costatum</i> , <i>Thalassiosira pseudonana</i> , and <i>Dunaliella tertiolecta</i>
Number of organisms per chamber ( $\pm 10\%$ )	<i>Selenastrum capricornutum</i> and other freshwater green algae $2 \times 10^4$ cells/ml <i>Navicula pelliculosa</i> $2 \times 10^4$ cells/ml <i>Microcystis aeruginosa</i> $5 \times 10^4$ cells/ml <i>Anabaena flos-aquae</i> $2 \times 10^4$ cells/ml Saltwater species $2 \times 10^4$ cells/ml
Experimental design	
Test vessel type and size	Sterile Erlenmeyer flasks of borosilicate glass, any size
Test solution volume	Not to exceed 50% of the flask volume for tests conducted on a shaker, and not more than 20% of the flask volume for tests not conducted on a shaker
Number of replicate chambers per sample	2 or more
Test duration	96 h



## TESTY EKOTOXICITY S ŘASAMI (pokračování)

Physical and chemical parameters	
Water temperature	24 ± 2°C for freshwater green and blue-green algae 20 ± 2°C for <i>Navicula pelliculosa</i> and other saltwater algae
Light quality	Continuous "cool-white" fluorescent
Light intensity	Should not vary by more than ±15%: 60 μE m <sup>-2</sup> /s <sup>-1</sup> (4300 lm/m <sup>2</sup> ) for freshwater diatoms and green algae 30 μE m <sup>-2</sup> /s <sup>-1</sup> (2150 lm/m <sup>2</sup> ) for freshwater blue-green algae 82–90 μE m <sup>-2</sup> /s <sup>-1</sup> (5900 to 6500 lm/m <sup>2</sup> ) for <i>Thalassiosira</i> 60 μE m <sup>-2</sup> /s <sup>-1</sup> (4300 lm/m <sup>2</sup> ) for <i>Skeletonema</i>
Photoperiod	14 h light/10 h dark for <i>Skeletonema</i>
Test solution pH	7.5 ± 0.1 for freshwater 8.0 ± 0.1 for saltwater
Endpoint	Biomass, cell number, area underneath the growth curve



# ALTERNATIVNÍ TESTY - řasy

## Řasové testy toxicity

Alternativní mikrobiotest

-miniaturizace

-rychlá dostupnost živých řas

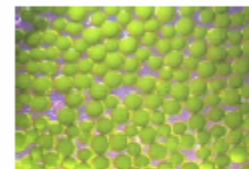
(dlouhodobé uchování :  
*alginátové kuličky*)

ALGALTOXKIT (TM)

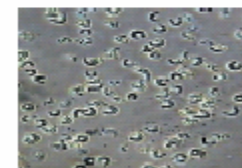
*P. subcapitata*  
(*Selenastrum capricornutum*)

## ALGALTOXKIT F™ MICROBIOTESTS

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



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



Algal cells

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

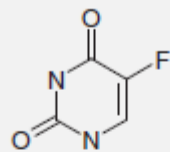
Each Algaltoxkit  
contains all the materials  
to perform two  
72h growth inhibition tests



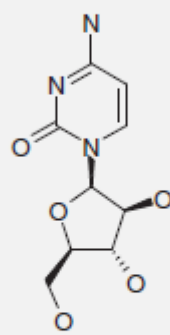
# Příklad – ekotoxická cytotatik

(Zounková et al. 2010 Chemosphere 81:253-260)

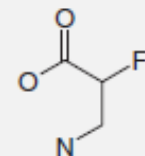
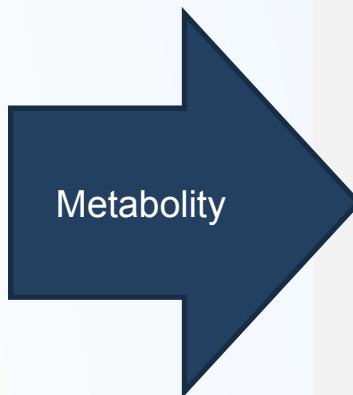
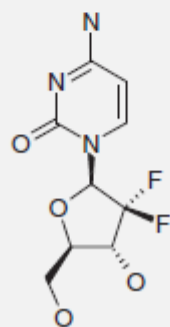
5-Fluorouracil



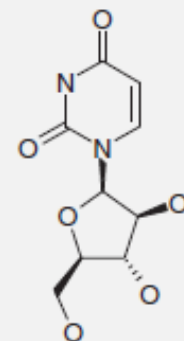
Cytarabin



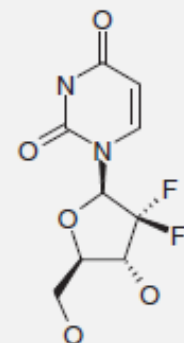
Gemcitabin



Metabolite of 5-fluorouracil



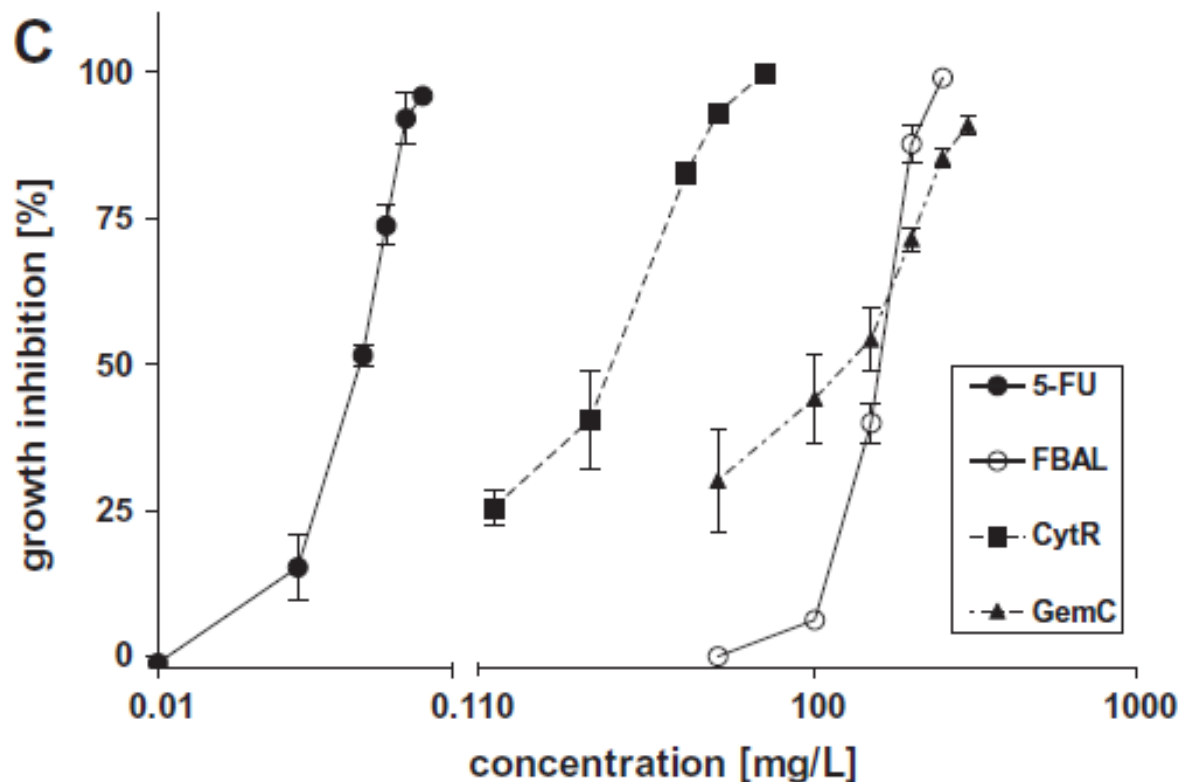
Metabolite of cytarabine



Metabolite of gemcitabine

# Inhibice růstu řas – cytostatika

(Zounková et al. 2010 Chemosphere 81:253-260)



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



# Ekotoxikologické biotesty - producenti

## AKVATICKÉ PROSTŘEDÍ

### Akvatický testy toxicity s okřehkem (*Lemna minor*)

- standardní uspořádání
- 1 týden (7dní)
- kádinky
- vyhodnocení růstu (počty lístků) – srovnání s kontrolou



# Ekotoxikologické biotesty - producenti

## Test toxicity s terestrickými rostlinami

### - nejjednodušší uspořádání (viz cvičení)

- petriho misky s vlhčeným podkladem
  - přídavky testovaného vzorku (+kontroly)
  - expozice **dny-týdny**
- hodnocení : klíčení a růst rostlin

### - modifikace

- realizace v hydroponických roztocích, **v standardní půdě**, testování přírodních vzorků půdy ...

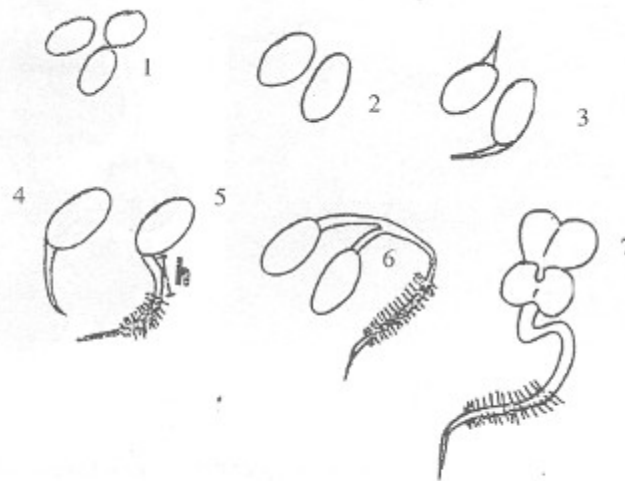
## Zástupci

### **Dvouděložných ...**

Hořčice bílá, Bob setý, Salát

### **Jednoděložných...**

Obilniny (ječmen)



Obr. 9: *Sinapsis alba* (1 - na začátku pokusu, 2 a 3 - první den pokusu, 4 a 5 - druhý den pokusu, 6 a 7 - třetí den pokusu.) h - hypokotyl





**14-d Shoot Length**  
**IC50 = 29.7 mg/g**



# Toxicita PAHs a jejich N-derivátů pro rostliny

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

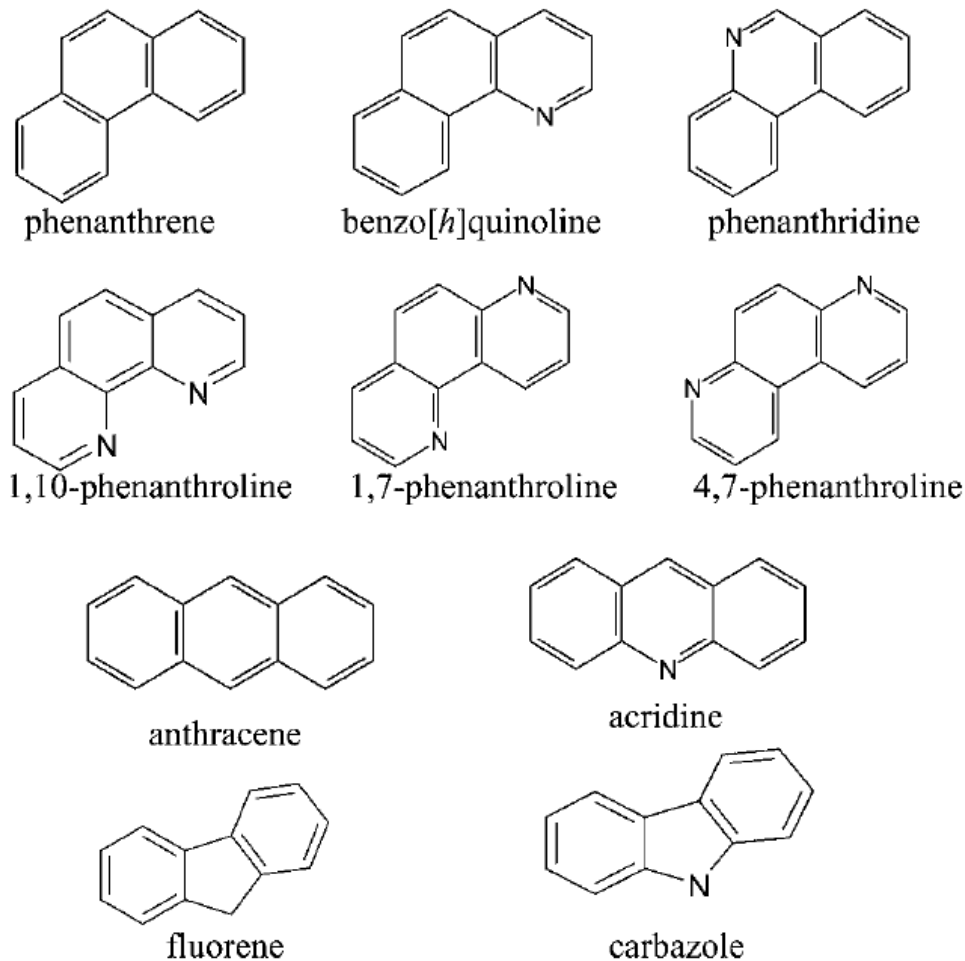


Fig. 1. Chemical structures of tested compounds.



# Toxicita PAHs a jejich N-derivátů pro rostliny

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

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

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



# Toxicita PAHs a jejich N-derivátů pro rostliny

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

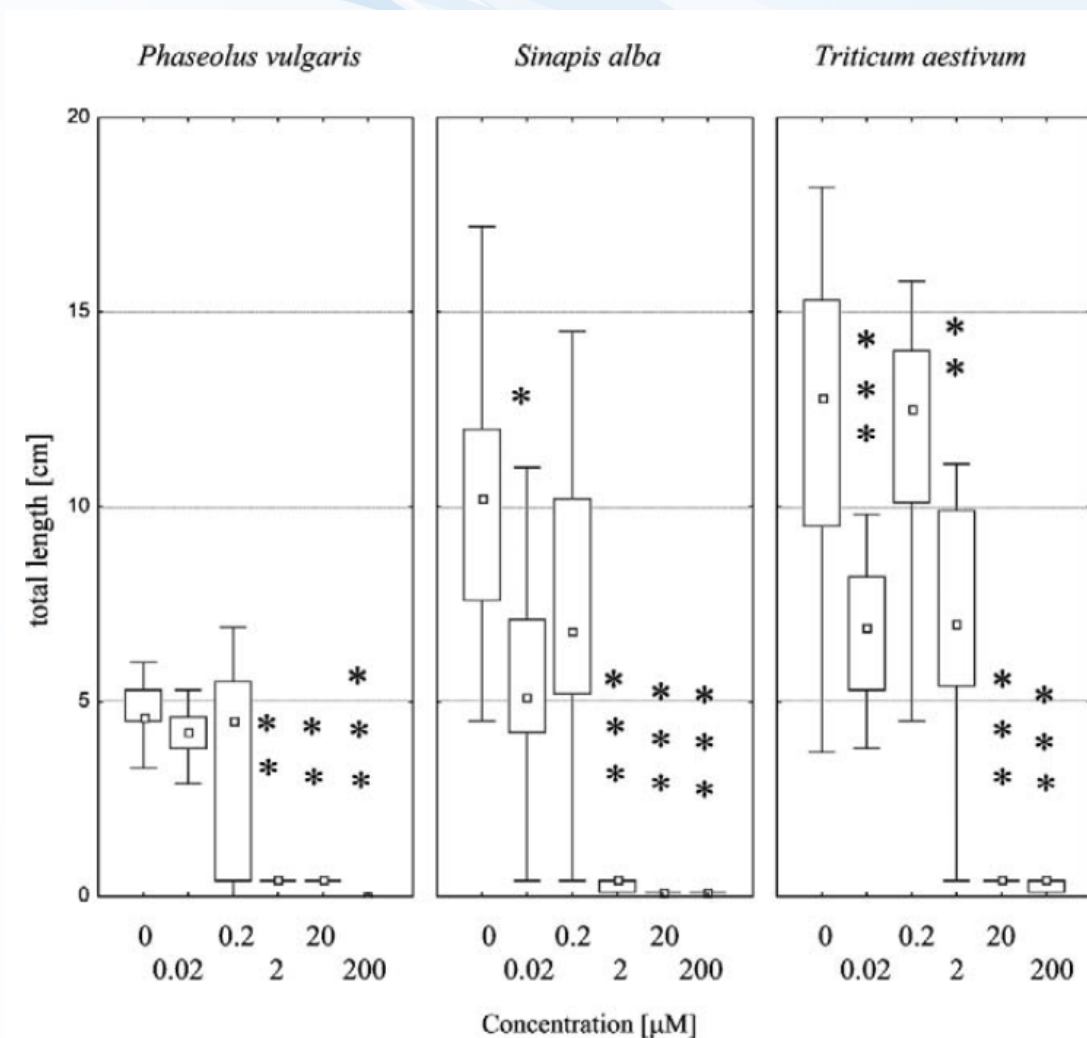


Fig. 3. Effect of 1,7-phenanthroline on total length of three different plant species after 96 h of exposure. Box plot parameters as in Figure 2. [\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ].



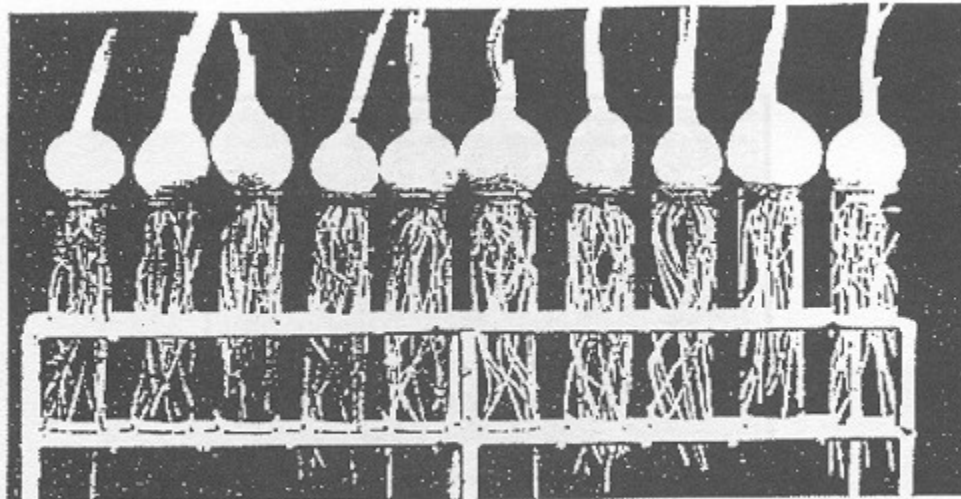
# Ekotoxikologické biotesty - producenti

## Hodnocení GENOTOXICITY s využitím rostlin

### -uspořádání

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

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



Obr. 21. Skúška na *Allium cepa*



# EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY - PŘÍKLADY - - KONZUMENTI – BEZOBRATLÍ -



# Ekotoxikologické biotesty – konzumenti - bezobratlí

Akvatické testy s bezobratlými jsou velmi běžné (nejčastější nejvíce dostupných dat - "Daphniové biotesty")

## -uspořádání

-kádinky, 10 zvířat v jedné variantě  
(3x replikát)

-akutní testy – 24+48 h

-vyhodnocení – pohyb (=mortalita)

-reprodukční testy 21 dní

Akvatičtí planktonní korýši - nejčastější

**Daphnia magna**

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

Další bezobratlí

bentičtí korýši – *Gammarus*, *Hyallela azteca*

hmyz – *Pakomáři (Chironomus)*, jepice ...





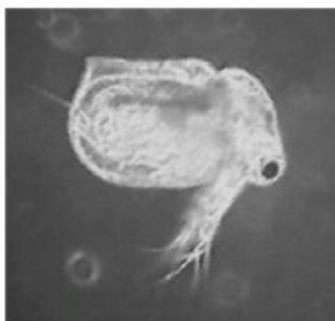
**Daphnia magna**



**Artemia salina**



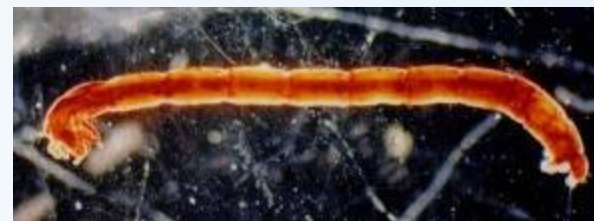
**Ceriodaphnia dubia**



**Gammarus**



**Chironomus riparius**





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

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



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

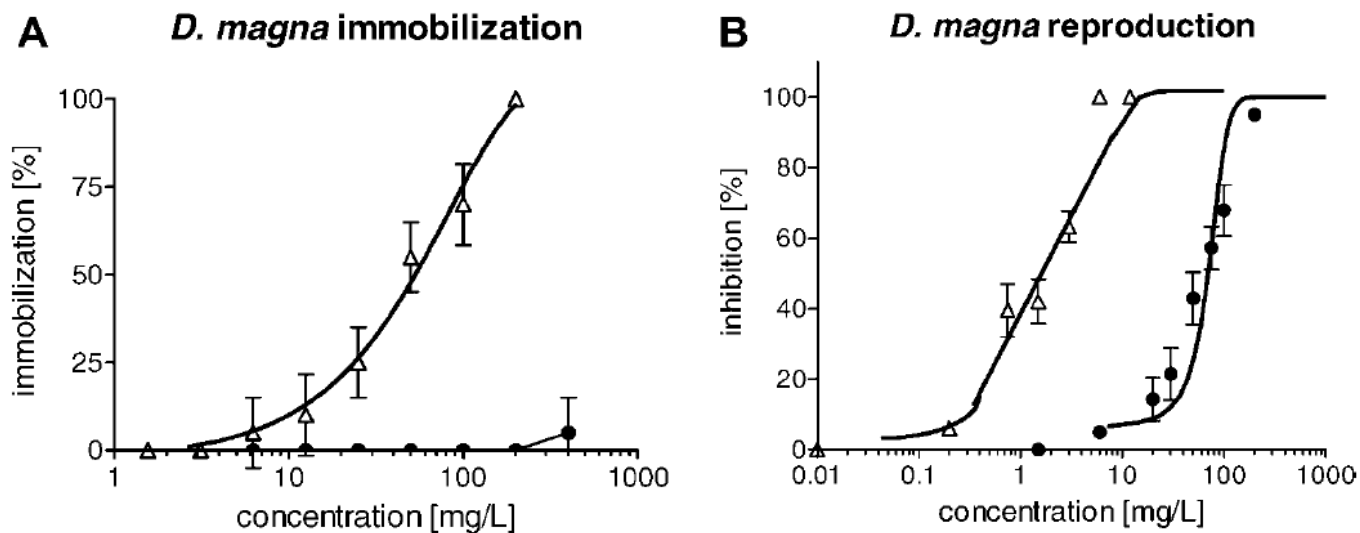


Fig. 2. Comparison of toxicity of the studied antimicrobial drugs in the acute and reproduction test with *Daphnia magna*. (A) Acute immobilization test with *D. magna*. (B) Reproduction test with *D. magna*. OTC = oxytetracycline hydrochloride (black circles), FLU = flumequine (white triangles).



# Cytostatika – toxicita pro *D. magna*

(Zounková et al. 2010 Chemosphere 81:253-260)

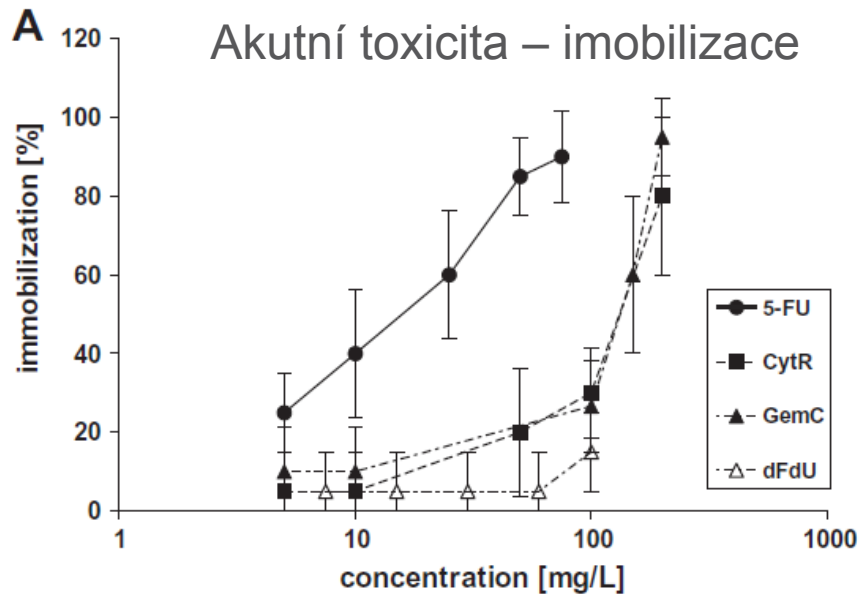


Fig. 1. Ecotoxicity (concentration–response curves) of the studied cytostatic drugs and their metabolites. (A) *Daphnia magna* acute immobilization test.

## Reprodukční toxicita 5-FU

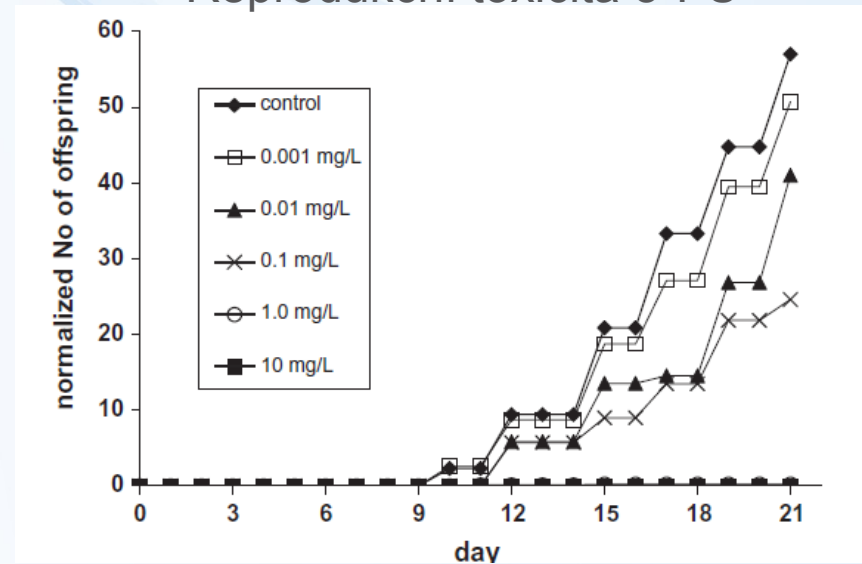


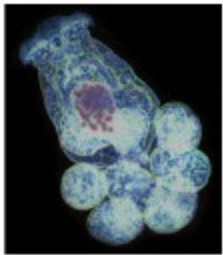
Fig. 2. Effects of 5-fluorouracil (5-FU) on the reproduction of *Daphnia magna* (numbers of offsprings) in the 21-d chronic test.

# Ekotoxikologické biotesty – konzumenti - bezobratlí

## AKVATICKÉ PROSTŘEDÍ

### ALTERNATIVNÍ MIKROBIOTESTY ("toxkity") s bezobratlími

[www.microbiotests.be](http://www.microbiotests.be)



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

#### **ROTOKIT F** *chronic*

Contains all the materials to perform three 48h reproduction assays



#### **THAMNOTOXKIT F™** *MICROBIOTESTS*

With the crustacean  
*Thamnocephalus platyurus*



#### **PROTOKIT F™** *MICROBIOTESTS*

With the ciliate protozoan  
*Tetrahymena thermophila*





# Ekotoxikologické biotesty – konzumenti - bezobratlí

## TERESTRICKÉ PROSTŘEDÍ

### Půdní testy s bezobratlími

#### -uspořádání

- umělá půda (písek, rašelina, jíl v definovaných poměrech),
- přírodní půda (specifické vlastnosti – pH, obsah org. uhlíku)
- jiné substráty (vlhčená petriho miska...)
- akutní toxicita letalita – do 14 dní
- reprodukce - 4-8 týdnů (podle organismu)

#### Organismy

Červi (kroužkovci – **žížaly** *Eisenia fetida*,  
háďátka, roupice)

**Chvostokoci** (*Collembola*) – *Folsomia candida*





© 2003 Amy Weisheit



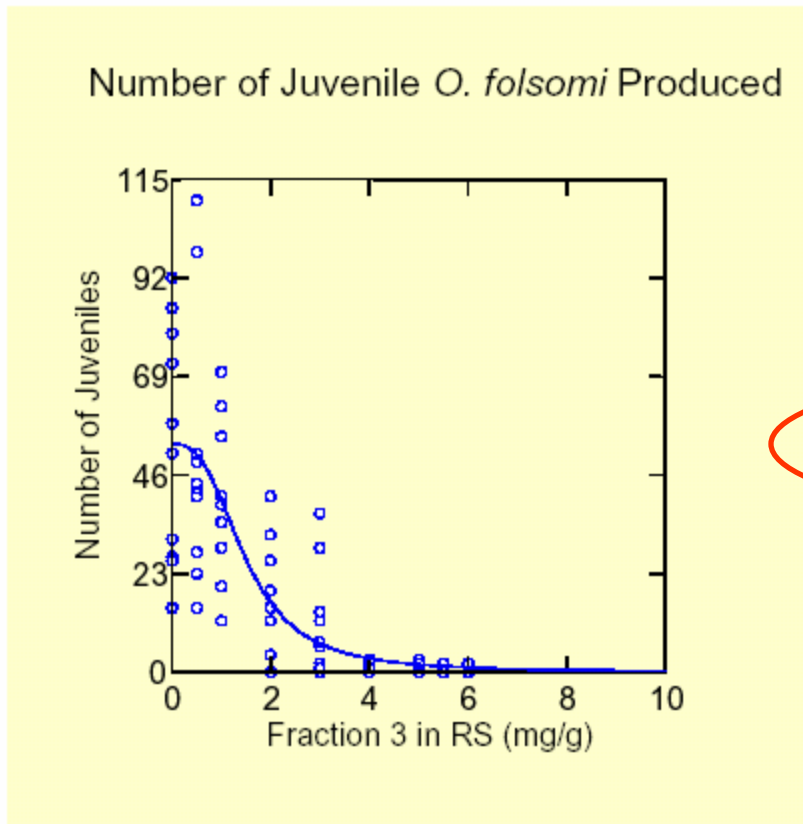
Žížaly  
*Eisenia fetida*

Roupice  
*Enchytreus crypticus*



Chvostoskok  
*Folsomia candida*

# Příklad - stanovení toxicity Cu v půdě pro chvostoskoky



**35-d Adult LC50 = 4.3 mg/g**

**Letalita pro dospělé**

**35-d IC50 (no. of juveniles) = 1.5 mg/g**

**Reprodukční toxicita – citlivější (cca 3x nižší IC50)**

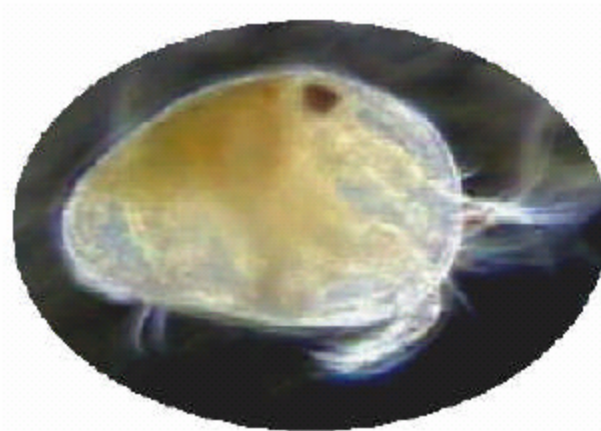
# Ekotoxikologické biotesty – konzumenti - bezobratlí

## PŮDA + SEDIMENTY

Alternativní mikrobiotest TOXKIT ([www.microbiotest.be](http://www.microbiotest.be))

### **OSTRACODTOXKIT F<sup>TM</sup>** *MICROBIOTESTS* **FOR SEDIMENT TOXICITY TESTING**

With the  
benthic crustacean  
*Heterocypris*  
*incongruens*



# Ekotoxikologické biotesty – konzumenti - bezobratlí

## TERESTRICKÉ PROSTŘEDÍ

### Další biotesty s terestrickými bezobratlími

#### VČELY

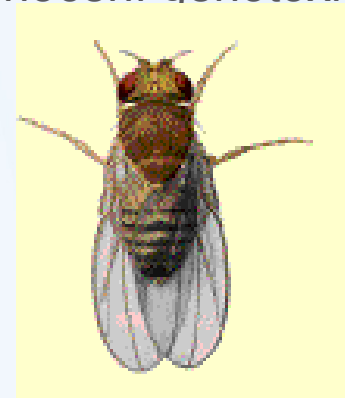
- testování insekticidů
- dávkování v potravě
- sledování mortality



#### Moucha domácí - testování léčiv: antiparazitika



#### Drosophila (hodnocení genotoxicity)



# EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY - PŘÍKLADY -

## - KONZUMENTI – OBRATLOVCI –





# Ekotoxikologické biotesty vodní – obratlovci: RYBY

-Velmi důležité (!) - *nejčastější tři testy (řasy, dafnie, ryby)*

-Akvária, specifické požadavky pro každý druh

-**Akutní testy 96 h**

-Vyhodnocení - mortalita

-**Prolongované a embryolarvální testy**  
týdny až měsíce

*Dlouhodobé testy - letalita, růst, rozmnožování,*

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

## Rybí druhy

•*Zebřička (Dánio pruhované - Danio rerio)*

•*Živorodka duhová (paví očko)*

•*V jiných státech:*

•*Medaka japonská (Japonsko)*

•*Jeleček velkohlavý (Pimephales promelas)- USA*

•*Komerční druhy (pstruh duhový, kapr ...)*



Živorodka duhová (Paví očko), *Poecilia reticulata*



*Danio rerio* (syn. *Brachydanio rerio*)



*Pimephales promelas*

Karas (zlatá forma)



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

Pstruh





Test type	Static, renewal, flow-through
Organisms	Freshwater Vertebrates Frog ( <i>Rana</i> sp.), toad ( <i>Bufo</i> sp.), coho salmon ( <i>Oncorhynchus kisutch</i> ), rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ), brook trout ( <i>Salvelinus fontinalis</i> ), goldfish ( <i>Carassius auratus</i> ), fathead minnow ( <i>Pimephales promelas</i> ), channel catfish ( <i>Ictalurus punctatus</i> ), bluegill ( <i>Lepomis macrochirus</i> ), green sunfish ( <i>Lepomis cyanellus</i> )
Age and size of test organisms:	All organisms should be as uniform as possible in age and size Fish: juvenile; weight between 0.1-5.0 g; total length of longest fish should be no more than twice that of the shortest fish
Experimental design	
Test vessel type and size	Smallest horizontal dimension should be three times the largest horizontal dimension of the largest organism Depth should be at least three times the height of the largest organism
Solution volume	At least 150 mm deep for organisms over 0.5 g each and at least 50 mm deep for smaller organisms
Feeding regime	Feed at least once a day a food that will support normal function
Test duration	Daphnids and midge larvae: 48 h All other species: 96 h in static tests, at least 96 h in renewal and flow-through test
Physical and chemical parameters	
Water temperature (°C)	Freshwater Vertebrates Frog, <i>Rana</i> sp. (22) Toad, <i>Bufo</i> sp. (22) Coho salmon, <i>Oncorhynchus kisutch</i> (12) Rainbow trout, <i>Salmo gairdneri</i> (12) Brook trout, <i>Salvelinus fontinalis</i> (12) Goldfish, <i>Carassius auratus</i> (17, 22) Fathead minnow, <i>Pimephales promelas</i> (25)



Table 1  
Eggs hatching and malformations in experiment with short-term exposure

Concentration of the extract	Start of hatching (h)	End of hatching (h)	Numbers of hatched larvae for a day			Percentage of malformed larvae (%)
			3 <sup>rd</sup> day	4 <sup>th</sup> day	5 <sup>th</sup> day	
high*	96	102	0	20	4	20.83 <sup>A</sup>
medium*	58	102	40	142	8	2.11 <sup>B</sup>
low*	56	102	134	52	3	1.06 <sup>B</sup>
control	58	102	100	87	4.5	1.56 <sup>B</sup>

No significant differences were found between the values indicated by the same letters. In case of their total absence in any of the examined indices, the values are not indicated. Capitals are used for indicating the significance of differences at the level of  $p < 0.01$ . \*see experimental treatment

Table 3  
Egg hatching and malformations in experiment with long-term exposure

Concentration of the extract	Start of hatching (h)	End of hatching (h)	Numbers of hatching larvae for a day			Percentage of malformed larvae (%)
			3 <sup>rd</sup> day	4 <sup>th</sup> day	5 <sup>th</sup> day	
medium*	58	102	160	25	1	5.38 <sup>a</sup>
low*	56	102	123	64	1	3.72 <sup>a,b</sup>
control	58	102	63	122	1	2.15 <sup>b</sup>

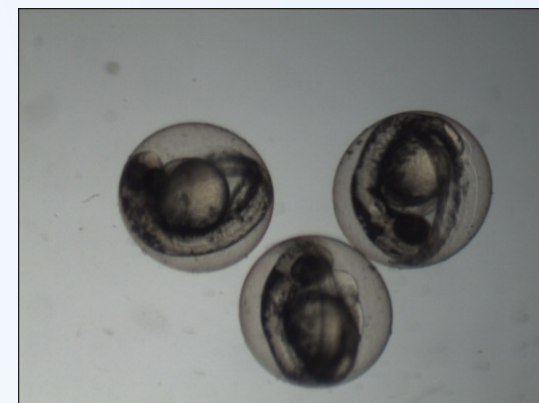
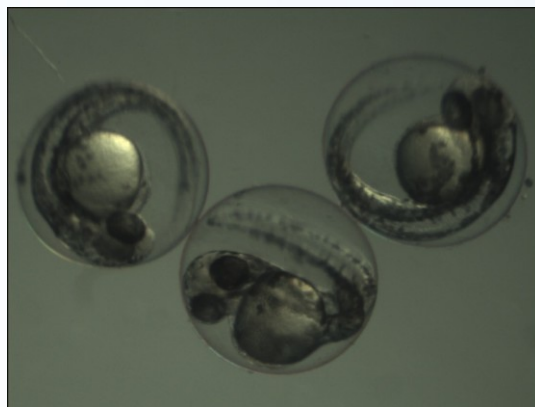
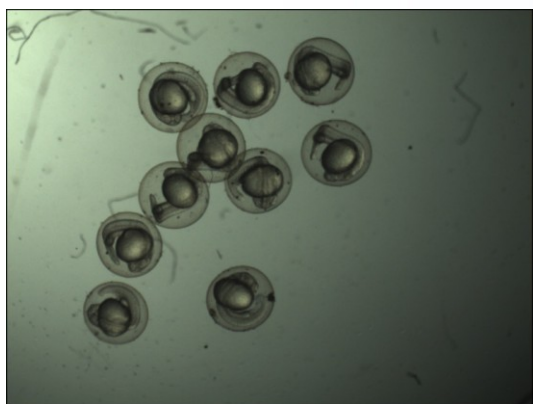
No significant differences were found between the values indicated by the same letters. In case of their total absence in any of the examined indices, the values are not indicated. Small letters are used for indicating the significance of differences at the level of  $p < 0.05$ .

\*see experimental treatment

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

## Embryonální test s *Danio rerio*

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



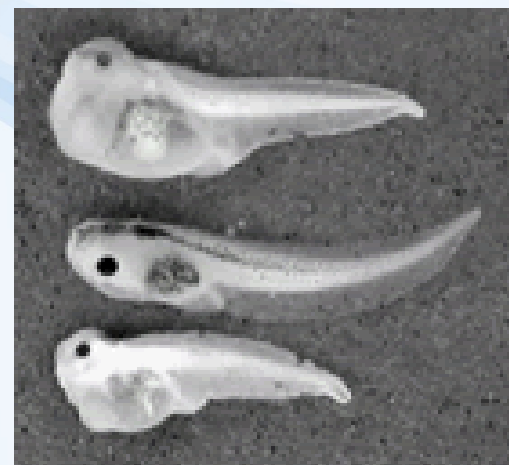
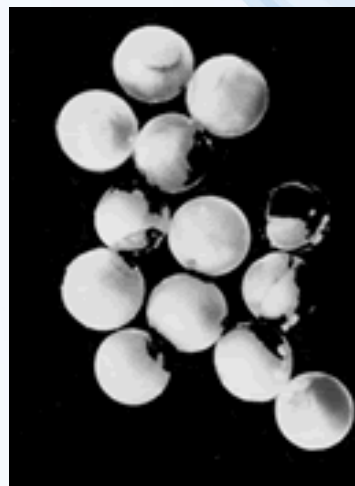


# Ekotoxikologické biotesty - obratlovci

## AKVATICKÉ PROSTŘEDÍ

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

- Uspořádání
- **Petriho misky**
- **Vajíčka až embryo**
- 96 h expozice**  
(dosažení stadia  
larvy bez žloutkového  
vaku)



**Table 4.11 The Frog Embryo Teratogenesis Assay: *Xenopus* (FETAX)**

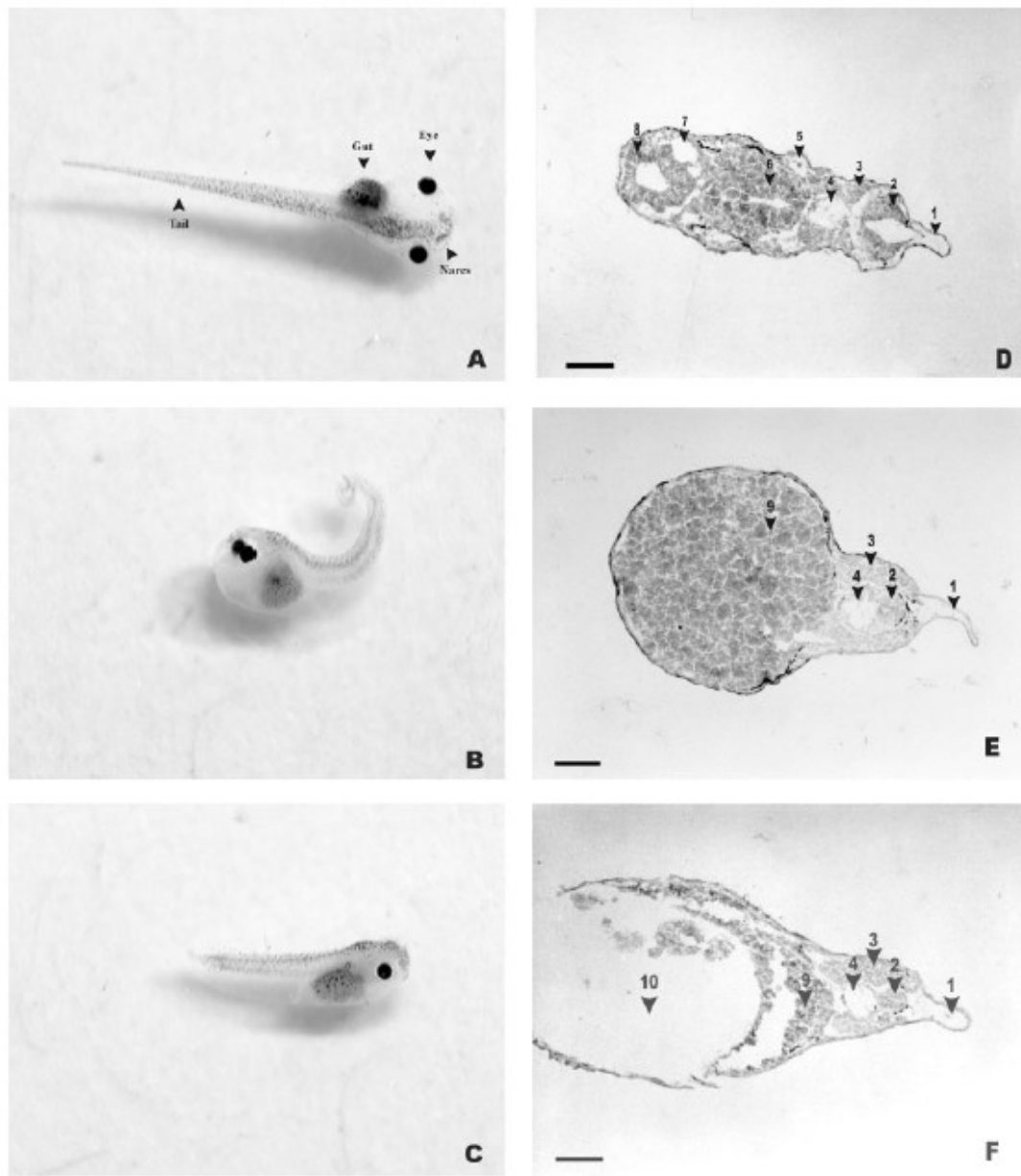
Test type	96 h static renewal
Organism	<i>Xenopus laevis</i>
Age of parent organism	Adult male: at least 2 years of age Adult female: at least 3 years of age
Size of parent organism	Adult male: 7.5–10 cm in crown-rump length Adult female: 10–12.5 cm in length
Feeding	Adult: three feedings per week of ground beef liver; liquid multiple vitamins should be added to the liver in concentrations from 0.05–0.075 cc/5 g liver
Experimental design	
Test vessel type and size	Adults: large aquarium or fiberglass or stainless steel raceways; side of tank should be opaque and at least 30 cm high. Breeding adults: 5- or 10-gallon aquarium fitted with a 1-cm mesh suspended approximately 3 cm from the bottom of the tank; nylon or plastic mesh is recommended; aquarium should be fitted with a bubbler to oxygenate the water; the top of aquarium should be covered with an opaque porous material such as a fiberglass furnace filter Embryos: 60-mm glass or 55-mm disposable polystyrene Petri dishes



Test solution volume	Adults: water depth should be 7-14 cm Embryos: 10 ml per dish
Exposure to test substance	Continuous throughout test
Replacement of test material	Every 24 h
Number of concentrations	5
Number of replicates per sample	2
Number of organisms per chamber	Adults: 4–6 per 1800 cm <sup>2</sup> of water surface area Breeding adults: 2 Embryos: 25
Test duration	96 h
Physical and chemical parameters	
Temperature	Adult: 23 ± 3°C Embryos: 24 ± 2°C
Photoperiod	12 h light / 12 h dark
pH range	6.5 to 9
TOC	10 mg/l
Alkalinity and hardness	Between 16 and 400 mg/l as CaCO <sub>3</sub>
Endpoint	Acute (mortality) and subacute (teratogenesis)



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  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{m}$ .



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

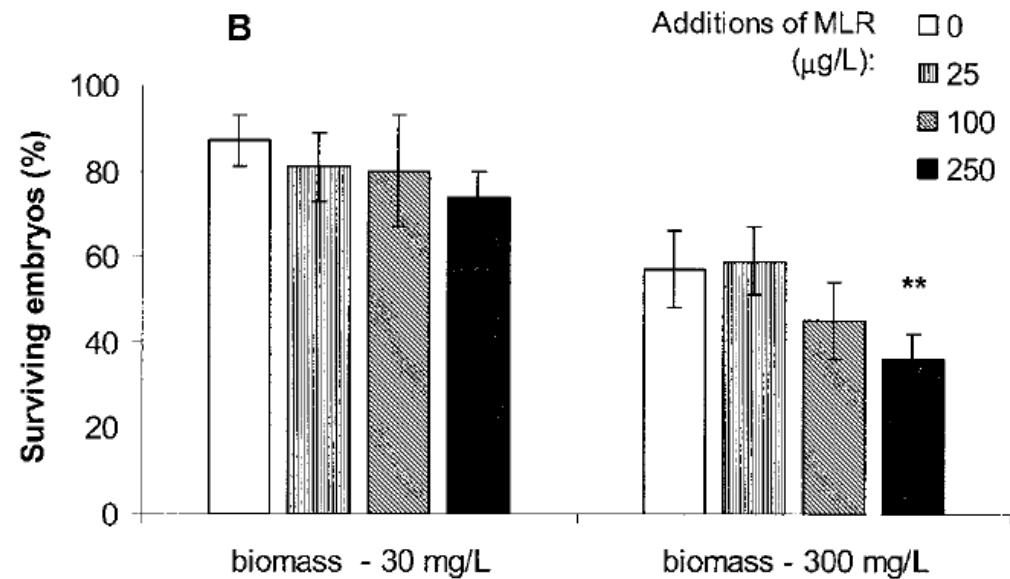
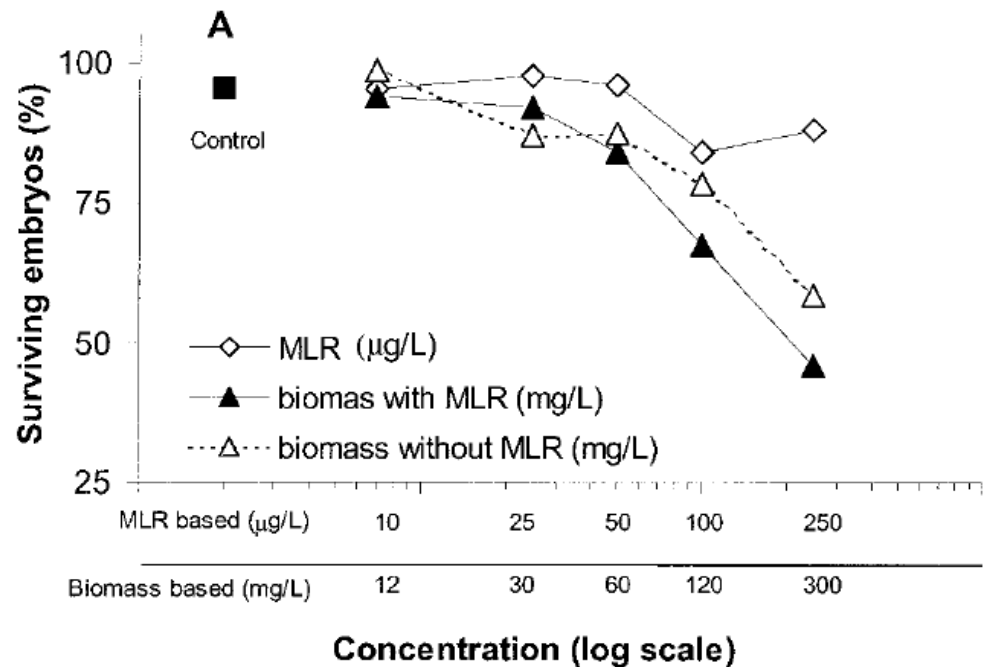
(A) Dose–response curves of purified MLR (scale in g/L on X axis), biomass containing natural microcystins (bloom dominated by *Microcystis aeruginosa*), and biomass with no detectable microcystins (bloom dominated by *M. wesenbergii*; scale milligrams of biomass d.w. per liter on X axis).

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

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

**Asterisks**

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





# Ekotoxikologické biotesty - obratlovci

## TERESTRICKÉ PROSTŘEDÍ

### Ekotoxikologické testy s ptáky

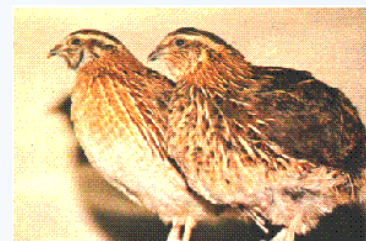
#### -uspořádání

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



Hrabaví ptáci, křepelky

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



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

bažanty, kachny ...



**Table 4.9 Summary for Conducting Reproductive Studies with Avian Species**

Test type	Avian reproduction
Organisms	Ring-necked pheasant ( <i>Phasianus colchicus</i> ), bobwhite ( <i>Colinus virginianus</i> ), Japanese quail ( <i>Coturnix japonica</i> ), chicken ( <i>Tympanuchus cupido</i> ), mallard ( <i>Anas platyrhynchos</i> ), black duck ( <i>Anas rubripes</i> ), screech owl ( <i>Otus asio</i> ), American kestrel, ring dove ( <i>Streptopelia risoria</i> ), gray partridge, crowned guinea-fowl
Age of organism	Should be within $\pm 10\%$ of the mean age of the group
Feeding	Feed and water should be available <i>ad libitum</i> . Feed consumption should be measured for 7-day periods throughout the study
Experimental design	Materials that can be dissolved by water or loosened by pecking should not be used; stainless steel, galvanized steel, or materials coated with perfluorocarbon plastics are acceptable; any design is acceptable such that the birds are able to move about freely and the pens kept clean
Test chamber type and size	
Test concentration	<ol style="list-style-type: none"> <li>(1) At least one concentration must produce an effect</li> <li>(2) The highest test concentration must contain at least 0.1% (1000 ppm)</li> <li>(3) The highest test concentration must be 100 times the highest measured or expected field concentration</li> </ol>

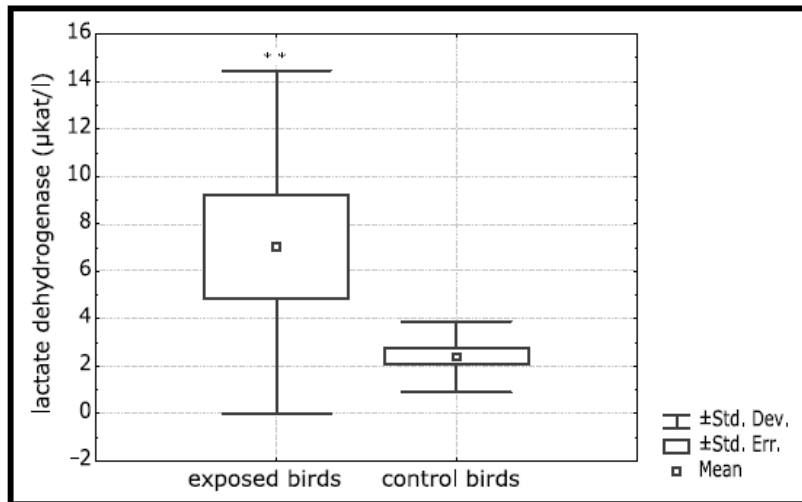


Number of test groups	A minimum of 16 pens per test concentration and control group should be used
Number of organisms per chamber	Pairs or groups containing no more than one male
Exposure to test substance	Mix test substance directly into feed
Clinical examinations	Eggs laid; normal eggs; fertile eggs; hatchability; normal young; survival; weight of young; eggshell thickness; residue analysis
Physical and chemical parameters	
Temperature	About 21°C for adults. For hatchlings, the amount and duration of heat is species-specified. A temperature gradient should be established from an appropriate heat source and range down to about 21°C
Humidity	45–70% (higher relative humidities may be appropriate for waterfowl)
Light quality	Should emit a spectrum simulating daylight
Light intensity	65 lux (6 fc)
Photoperiod	For adults: 8 hr light/16 h dark prior to photostimulation; 17 hr light/7 h dark from onset of photostimulation For hatchlings: at least 14 h of light for precocial species
Endpoint	Reproduction

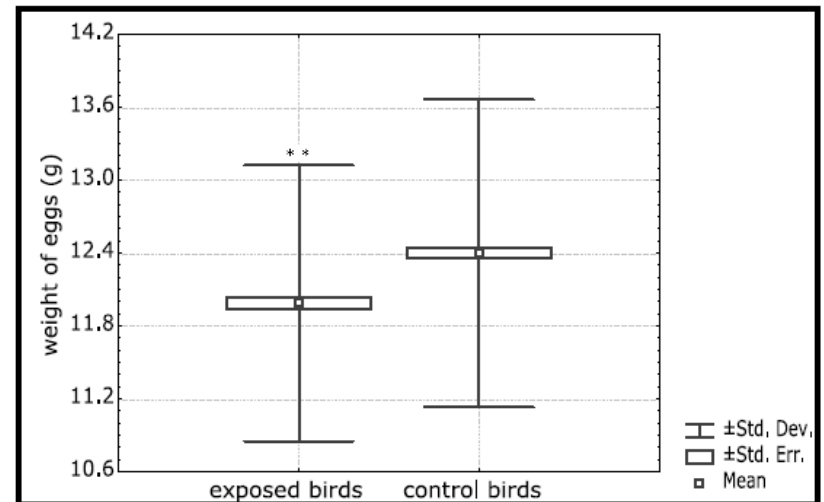


# Effects of cyanobacterial biomass on avian reproduction: a Japanese quail model

Veronika DAMKOVA<sup>1</sup>, Jana SEDLACKOVA<sup>1</sup>, Hana BANDOUCHOVA<sup>1</sup>, Lucie PECKOVA<sup>1</sup>, Frantisek VITULA<sup>1</sup>, Klara HILSCEROVA<sup>2</sup>, Veronika PASKOVA<sup>2</sup>, Jiri KOHOUTEK<sup>2</sup>, Miroslav POHANKA<sup>3</sup>, Jiri PIKULA<sup>1</sup>



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



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

# Ekotoxikologické biotesty - obratlovci

## Toxikologické testy s laboratorními zvířaty

Myš, Potkan, Křeček, Morče

### -uspořádání

- **spíše humánní toxikologie**, ale může být využito jako model pro přírodní hlodavce
- **dávkování – injekčně, inhalace, potrava**
- **délka trvání: nejčastější akutní test – i.p. injekce 24 hod sledování**
- další testy – až 96 hod, dlouhodobé až 3 měsíce
- kompletní testy karcinogenity 3 roky
- řada specifických testů (*embryotoxicita, teratogenita, imunotoxicita, kožní iritance ...*)





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

Ondrej ADAMOVSKY<sup>1</sup>, Radovan KOPP<sup>2,5</sup>, Andrea ZIKOVA<sup>2</sup>, Ludek BLAHA<sup>1</sup>,  
Jiri KOHOUTEK<sup>1</sup>, Petra ONDRACKOVA<sup>3</sup>, Hana PASKEROVA<sup>1</sup>,  
Jan MARES<sup>2</sup>, Miroslava PALIKOVA<sup>4</sup>

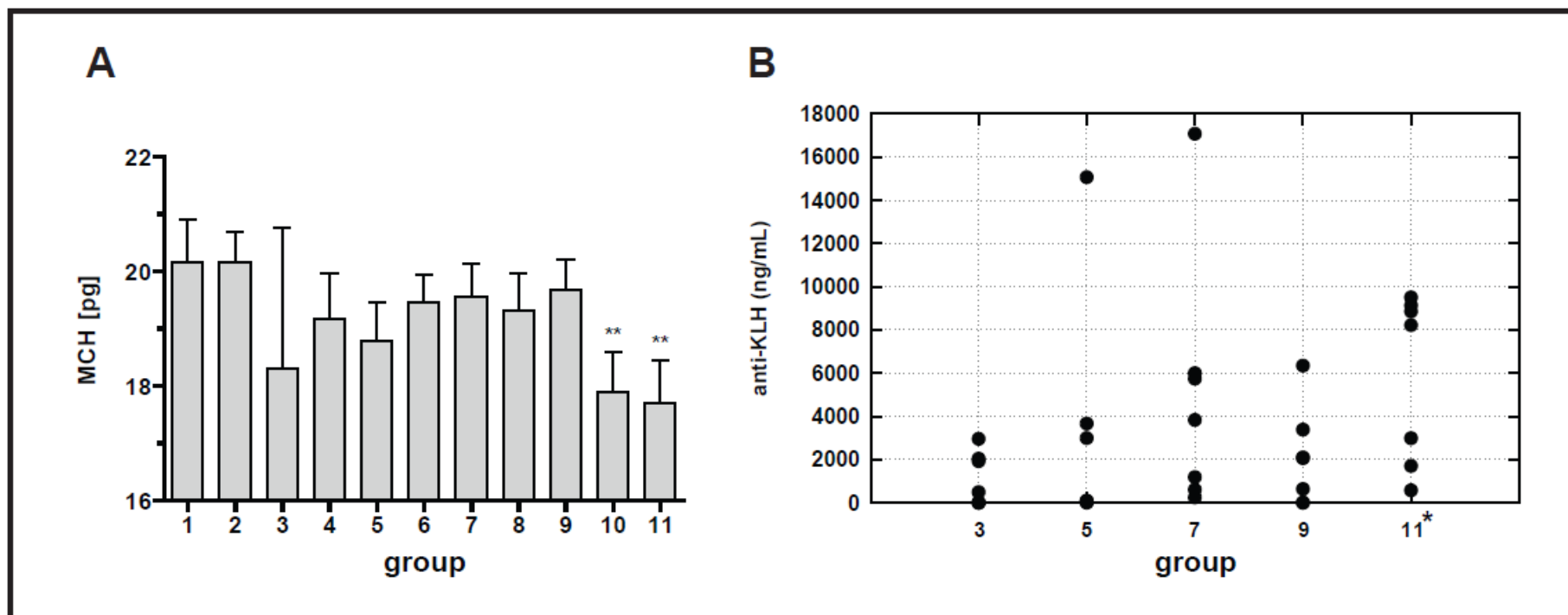
Experimentální design →

28 dní expozice v potravě

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

## Účinky microcystinu (toxin sinic) – skupiny 10 a 11

→ snížení hemoglobinu (A), zvýšená reakce na vakcinu (B)



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

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

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



# 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

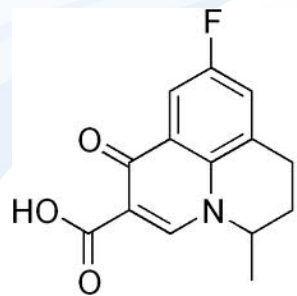
## (2) Růstové testy toxicity s bakteriemi

- 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)

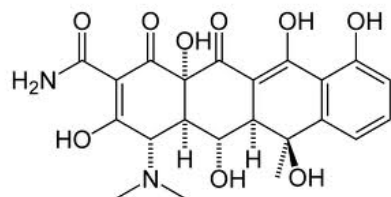
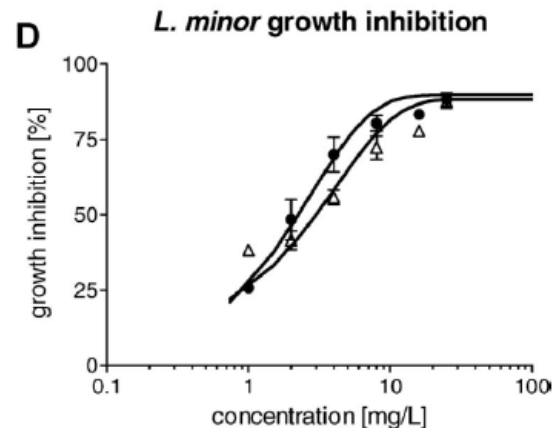
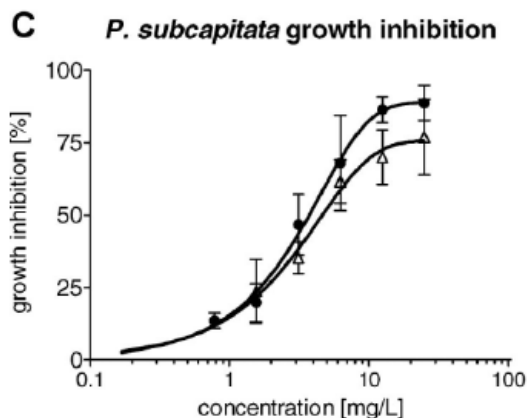
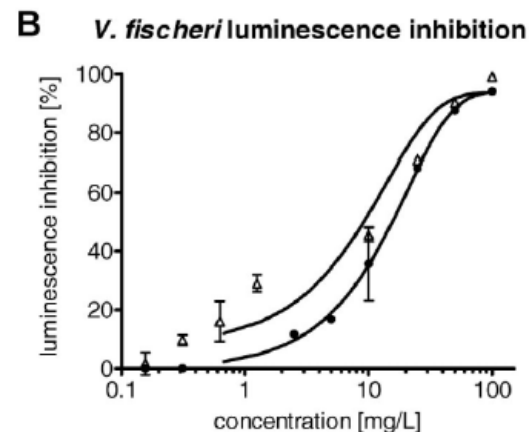
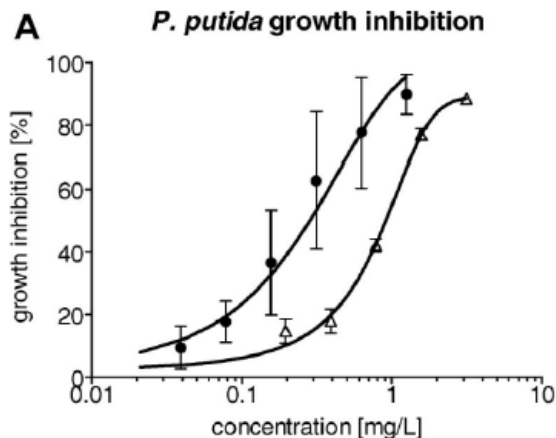




Zounkova, R., Z. Klimesova, L. Nepejchalova, K. Hilscherova and L. Blaha (2011). "Complex Evaluation of Ecotoxicity and Genotoxicity of Antimicrobials Oxytetracycline and Flumequine Used in Aquaculture." *Environmental Toxicology and Chemistry* **30(5): 1184-1189.0**



Flumequine



OTC

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



# Mikrobiální ekotoxikologické biotesty

## (3) Bakteriální testy GENOTOXICITY

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

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

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



# Mikrobiální ekotoxikologické biotesty

## (3) Bakteriální testy GENOTOXICITY

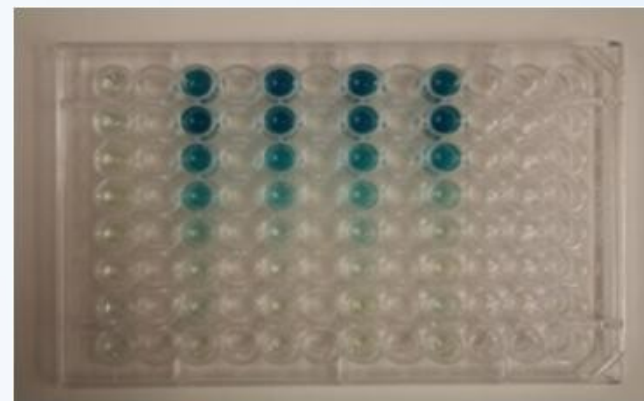
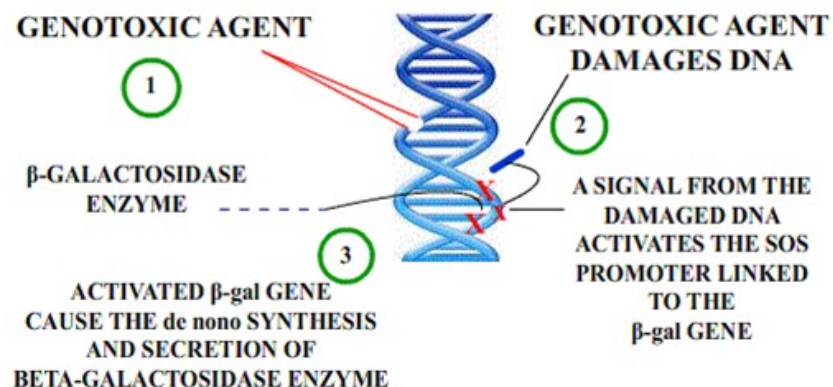
### -3.2 Specifické testy

- specifické transgenní bakterie s reporterovým genem pod kontrolou reparační DNA

-Příklad gen pro beta-galaktosidázu - SOS chromotest

- Poškození DNA → indukce aktivity: měření intenzity barvy

### CELLULAR EVENTS IN SOS BACTERIA WHEN EXPOSED TO A GENOTOXIC AGENT

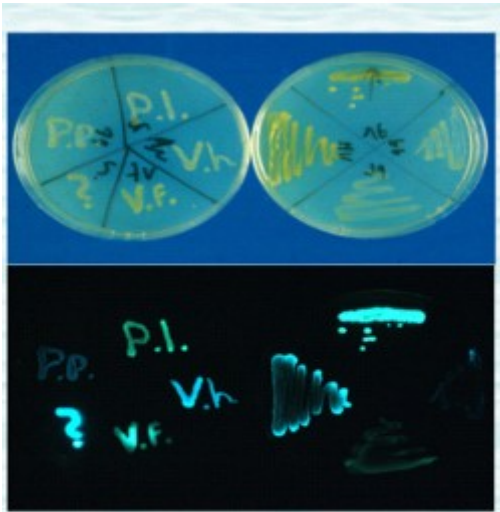


# Mikrobiální ekotoxikologické biotesty

## (3) Bakteriální testy GENOTOXICITY

### -3.2 Specifické testy

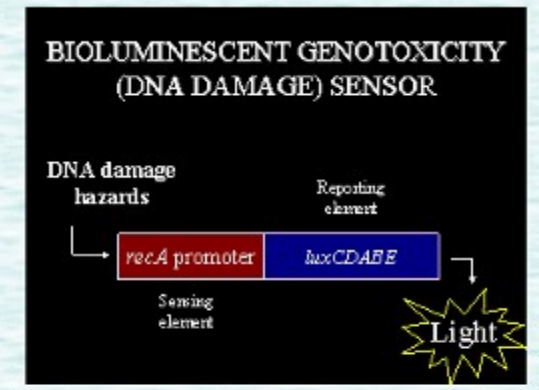
- specifické transgenní bakterie s reporterovým genem pod kontrolou reparační DNA - Příklad: 1 gen pro luciferázu (recA test)
- → mutace: měření luminescence



Agar plates with luminescent bacteria, photographed either by normal illumination (top) or in the dark by the light emitted by the bacteria only

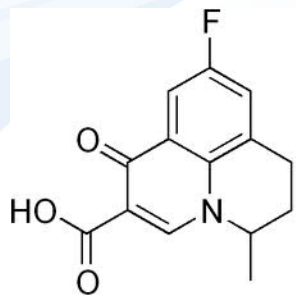


Luminescent response to a dilution series of a genotoxicant on a microtiter plate, photographed only by the light emitted by the bacteria

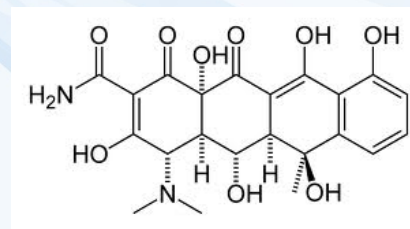




Zounkova, R., Z. Klimesova, L. Nepejchalova, K. Hilscherova and L. Blaha (2011). "Complex Evaluation of Ecotoxicity and Genotoxicity of Antimicrobials Oxytetracycline and Flumequine Used in Aquaculture." *Environmental Toxicology and Chemistry* **30(5): 1184-1189.0**



Flumequine



OTC

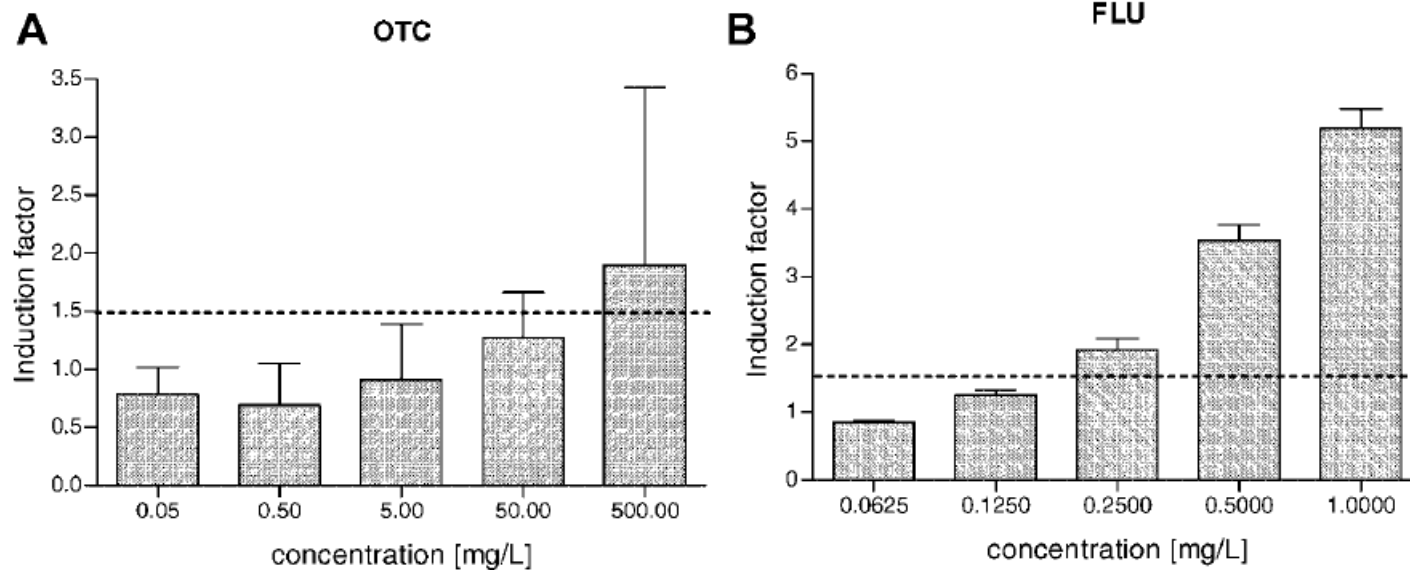


Fig. 3. Comparison of genotoxicity of the studied antimicrobial drugs in the SOS-chromotest. OTC = oxytetracycline hydrochloride, FLU = flumequine.

