

**Ekotoxikologické biotesty
s producenty
(Úvod do bloku přednášek)**

B. Maršálek

Terminologická poznámka:

- Ekotoxikologické biotesty využívající producenty (fotoautotrofní organismy) lze označit také jako **testy fytotoxicity**.
- **fytotoxiny jsou** toxiny produkované rostlinami (alkaloidy, glykosidy, antibiotika atd.). Tato terminologie je mezinárodně ustálená, takže stejně jsou chápány **mykotoxiny** (toxiny produkované plísněmi a houbami), **cyanotoxiny** (toxiny produkované sinicemi) **apod.**

Přehled základních typů organismů používaných pro ekotoxikologické biotesty s producenty

- **Sinice** (fotosyntetizující gramnegativní eubakterie) koloniální (Microcystis), vláknité (Anabaena, Nostoc) a pikocyanobakteria jednobuněčné (Synechocystis). Dusík fixující sinice jsou velmi citlivé na toxické látky a inhibice nitrogenázy patří mezi vhodné endpointy.

Přehled základních typů organismů používaných pro ekotoxikologické biotesty s producenty

- **Řasy** – jednobuněčné, cenobiální, vláknité, sladkovodní, mořské
- Řasové testy trofie a toxicity
- Kromě klasických biotestů s jednou řasou, jsou používány tzv. **Multispecies algal assays** (paralelní kultivace zástupců zelených řas, sinic a rozsivek dle podmínek zkoumané lokality
- fyziologické testy (hodnocení fotosyntetické aktivity, enzymatické aktivity,
- **Kompetice a reprodukce přírodních populací** fytoplanktonu a fytobentosu.

Přehled základních typů organismů používaných pro ekotoxikologické biotesty s producenty

- **Mechy a lišejníky -**
- bioindikační postupy s přírozenými společenstvy lišejníků, nebo s tzv. transplantovanými druhy, u kterých známe stáří a historii.
- **V případě mechů** nejsou propracovány metodiky ekotoxikologického hodnocení tak podrobně jako v případě lišejníků, ale např. vodní mech *Fontinalis* je využíván jako producent s vysokým potenciálem pro **bioakumulaci kovů**.

Přehled základních typů organismů používaných pro ekotoxikologické biotesty s producenty

- **Okřehek a submerzní vegetace-**
- OECD 221 *Lemna* sp. **Growth Inhibition Test** (Draft New Guideline,). V některých laboratořích je také používána *Spirodela polyrrhyza*, ale dle našich zkušeností je *Lemna minor* citlivější, než *Spirodela*. Dále je využívána *Elodea canadensis* a *Myriophyllum* sp. Jejich nevýhodou je **sezónnost použití**, která je omezena na květen až říjen, v zimním období neposkytují použitelné výsledky.

Přehled základních typů organismů používaných pro ekotoxikologické biotesty s producenty

- **Testy s cévnatými rostlinami** – jsou typickými testy pro hodnocení terestrických ekosystémů (orná půda, lesní půdy, hodnocení kompostů, tuhých odpadů, pesticidů apod.).

Testy toxicity s cévnatými rostlinami 1

Testy s **bylinami** (nejčastěji jednoleté, do 30 dnů po vyklíčení), nebo **dřevinami** (lesní kultury, aktivita mykorhyzy, genetické změny schopnosti syntetizovat kutikulu – obrana před imisemi, genotoxické efekty)

Testy toxicity s cévnatými rostlinami 2

- Testy s **plevelnými druhy** zde rozlišujeme tzv target species – tedy ty, které mají být např. herbicidy omezeny (oves hluchý, metlice chundelka, svlaček rolní, pýr plazivý apod.) a tzv. non-target species, které mají být nepoškozeny , versus testy s **kulturními plodinami** (kukuřice, pšenice, cukrová řepa, ovocné sady, vinice apod.

Testy toxicity s cévnatými rostlinami 3

- Testy cílené na **jednoděložné** (např. traviny) a **dvouděložné** – (řepa, konopí, sady, listnaté lesy) – toto kritérium je důležité např. při vývoji herbicidů.

Testy toxicity s cévnatými roślinami 4

- Dle zdroje matečného testovacího organismu dělíme testy s cévnatými rostlinami na testy využívající **semena** (nejčastější způsob), dále využívající **cibule a hlízy** (např. ASTM test s *Alium cepa*) a metody využívající **vegetativně množený matečný materiál** (*Lemna*, *Elodea*).

Dle způsobu experimentálního uspořádání dělíme na testy využívající

- **extrakt** na filtračním papíru v petriho misce (nejméně přirozený, ale často používaný způsob), dále **přímý kontakt** sedimentu, odpadu, nebo zeminy s klíčící rostlinou v petriho misce či květináči v prvních 2-6 týdnech po vyklíčení, a konečně **nádobové pokusy** postihující celý životní cyklus rostliny

Způsoby vyhodnocování používaných pro EB s producenty 1

- **Řasy a sinice** hodnotíme většinou pomocí změny počtu buněk v čase experimentu ve srovnání s kontrolou.
- **Alternace:**
 - koncentrace pigmentů (např. chlorofylu a),
 - fyziologické aktivity (příjmu živin) a metabolické aktivity (fotosyntetické aktivity, enzymatické aktivity)

Způsoby vyhodnocování používaných pro EB s producenty 2

- **Lišejníky** hodnotíme dle:
 - struktury přirozených společenstev **BI**
 - metabolické aktivity přírodních a exponovaných (transplantovaných) druhů **EB**
 - dle morfologických – fytopatologických změn na stélce **BI**
 - dle bioindikačních hodnot (citlivých a toxitolerantních taxonů) **BI**.

Způsoby vyhodnocování používaných pro EB s producenty 3

- Okřehek a submerzní vegetace-
 - počet nových lístků,
 - hmotnost,
 - defekty tvorby chlorofylu, nepřírozené tvary a celou škálu biochemických paramerů (esterázy, dehydrogenázy, SOD, glutation, RUBISCO, až po metody využívající zobrazování a kinetiku fluorescence chlorofylu pomocí CCD- FLIA

Způsoby vyhodnocování používaných pro EB s producenty 4 – cévnaté rostliny

- **měření délky** kořene, hypokotyle, popřípadě nadzemní části rostliny a plochy listů. – běžné, ale ne nejcitlivější.
- **hmotnost živá/ sušina** nadzemní biomasy, kořene a její sušinu,
- **defekty chlorofylu, nekrózy a další pozorované abnormality.**
- **aktivity dehydrogenáz, fosfatáz, oxidáz nebo peroxidáz, popř. syntézy glutationu.**

Způsoby vyhodnocování používaných pro EB s producenty -cévnaté rostliny

- V případě nádobových pokusů hodnotíme
 - dobu nutnou k dosažení fenologických fází (např. odnožování, sloupkování, metání, kvetení, zrání semen,
 - klíčivost semen ,
 - odolnost proti chorobám a škůdcům ve srovnání s kontrolou apod.
- V případě lesních dřevin hodnotíme
 - přírůstky,
 - odolnost proti chorobám a škůdcům,
 - fotosyntetickou aktivitu,
 - ovlivnění syntézy kutikuly,
 - přítomnost a aktivitu mykorhyzy atd.

Možnosti využití producenů pro různé typy ekotoxikologických testů

- Stanovení toxických efektů – letalita, inhibice růstu, nebo fyziologických procesů.
- **Genotoxicita, mutagenita.** Možnost použít řasy a cévnaté rostliny pro detekci chromozomových zlomů, tvorby mikrojadérek, iniciace nádorů na kořenech, poruchy tvorby kutikuly, mutace na úrovni intaktní rostliny, tvorba DNA aduktů atd.
- Hodnocení **detoxifikační aktivity**, přítomnost a aktivita detoxifikačních systémů (PCR, ELFO, LC-MS, formy glutationu, SOD apod.
- Hodnocení **vlivu toxikantů na rezistenci k patogenním organismům**
- Využití fototrofních organismů pro **hodnocení biokumulací a biokoncentrací** toxikantů v přírodním prostředí.
- Hodnocení podílu autotrofních organismů na detoxifikaci/ imobilizaci toxických látek v životním prostředí (**bioremediace pomocí cévnatých rostlin, nebo cyanobakterií**)

Test inhibice růstu Lemna minor

OECD Lemna sp. Growth inhibition test (2002)

Testovací organismus:

Lemna minor, Lemna gibba, tvořeny 2-5 lístky,

Podmínky testu:

24±°C., expozice 7 dní, 100 ml vody v 150ml kádinkách 10 lístků/opakování, (9-12 -- všude stejně)

6-10 000 lux, statický, pH 6,5, v průběhu testu kontrolujeme pH, teplotu

Vyhodnocení:

Rychlost růstu, hmotnost biomasy, počet lístků,

Validace

Výsledky testu jsou považovány za platné, když:

- Průměrný počet lístků v kontrole vzrostl 8x
- pH se nezměnilo po dobu testu více než o 1,5
- 168 IC 50 pro dvojchroman draselný je 10-60mg/L

Test inhibice růstu kořene *Sinapis alba*

OECD 208 Terrestrial (non target) Plant test

Testovací organismus

Sinapis alba, *Lactuca sativa*, *Lepidium sativum*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays*

Kulturní, plevelné

Jednoděložné dvouděložné Klíčivost 90%

Podmínky testu:

20± °C, 5ml/ PM 10-14 cm, 30 semen/ PM, expozice 72 h, 2-3 paralelní testy, inkubace ve tmě - termostat, filtrační papír.

Vyhodnocení: podle normy

- délka kořene, počet vyklíčených semen
- délka, tvar a hmotnost kořene a hypokotylu, defekty tvorby chlorofylu na světle, množství chlorofylu, aktivity enzymů, aktivita PSII.

Validace Výsledky testu jsou považovány za platné, když:

- klíčivost v kontrole je alespoň 90%
- Zjištěná koncentrace LC 50 je v souladu se standardy