

Experimentální modely ekotoxicity - konzumenti

Klára Hilscherová
RECETOX- Přírodovědecká fakulta MU Brno



Bezobratlí živočichové

- Přítomnost a aktivita bezobratlých je naprosto rozhodující pro stav ekosystému.
- Bezobratlé najdeme ve všech ekosystémech.
- Bezobratlí tvoří významnou část celkové biomasy v terestrických i akvatických ekosystémech, mají nepoměrně vyšší druhovou bohatost oproti obratlovcům.
- Hrají významnou roli v potravním řetězci jako destruenti, ale i konzumenti prvního a druhého řádu, s čímž je spojená možná bioakumulace.
- Díky změnám habitatu při metamorfóze mohou zasahovat do více ekosystémů i během jednoho životního cyklu, díky čemuž mohou přijímat široké spektrum polutantů a přenášet je mezi jednotlivými ekosystémy.



Testy ekotoxicity v půdě

hlístice



Půdní testy s bezobratlými

Uspořádání : umělý substrát, vlhčená petriho miska, standardní nebo přírodní půda – různé nádoby...

- zpravidla 14 dní (letalita),
56 dní – reprodukce ...

Organismy

Kroužkovci – žížaly, háďátka, roupice

Hmyz - Chvostokoci (Collembola)

roupice



žížaly



chvostokoci



Testy na včelách

- Stanovení toxicity pesticidů a jiných chemických látek pro včely
- Je-li expozice včel dané chemické látce pravděpodobná
- Cílové organismy se od užitečných příliš neliší
- Snaha minimalizovat škody
- Stupňované programy hodnocení nebezpečnosti pesticidů - postupný přechod od laboratorních zkoušek k semi-polním a polním experimentům
- **Včela medonosná** (*Apis mellifera*) je při studiu problematiky modelem i pro ostatní užitečný hmyz

Čím se může včela otrávit?

- agrochemikálie
- voda
- ovzduší
- omyl
- zlý úmysl

Toxicita:

- orální
- kontaktní
- sekundární

Zejména pro testování biocidů



Včely - Chov a krmení

- dobře větrané klíčky
- 10 včel ve skupině (náhodně)
- ve tmě při teplotě 25 ± 2 °C
- potrava – vodný cukerný roztok
- po podání zkušebních dávek potrava ad libitum

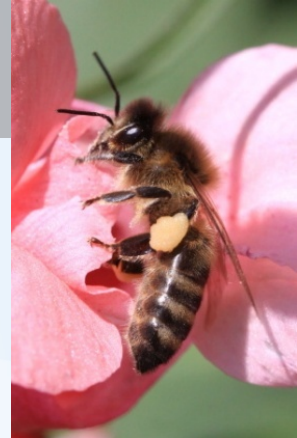


Zkouška akutní orální toxicity

- NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008
- konzumace cukerného roztoku se zkoumanou látkou
- zaznamenání mortality po 4, 24 a 48 h
- pokud mortalita v kontrole nepřekročí 10% – možné prodloužení až na 96 hodin
- pokud na nosičích – emulgátory, organická rozpouštědla apod. (1%) - pro rozpouštědla samostatná kontrolní skupina



Test akutní kontaktní toxicity



- NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008
- dospělé dělnice, klíčka po 10 ks
- zkušební látka - aplikace jako roztok v nosiči, tj. v organickém rozpouštědle (aceton, dimethylformamid, dimethylsulfoxid), nebo ve vodě se smáčedlem.
- samostatné kontrolní skupiny: voda a roztok s rozpouštědlem/nosičem.
- lokální aplikace: objem 1 μ l roztoku se aplikuje mikroaplikátorem na zádovou oblast hrudníku včely.
- pro aplikaci možná mírná narkotizace CO₂ nebo dusíkem.
- délka zkoušky: 48h; Pokud mortalita v kontrole nepřekročí 10%, možno prodloužit na 96 h. - záznamy 4/24/48/96 h



Vyhodnocení testů na včelách

- výpočet příjmu látky jednou včelou
- porovnání s kontrolními skupinami
- vyhodnocení LD₅₀
- Protokol o zkoušce
 - zkoušená látka (fyzikální a chemické vlastnosti)
 - testovací druh (název, plemeno, stáří, zdravotní stav)
 - zkušební podmínky (teplota, vlhkost, velikost a materiál klíček, příprava roztoků, datum)
 - Výsledky: mortalita pro každou koncentraci v každém čase (graf), hodnoty LD₅₀, mortalita v kontrolních skupinách, jiné účinky (neobvyklé chování, rychlost spotřebování potravy..)

Validita zkoušky:

- průměrná mortalita ve všech kontrolních skupinách ≤ 10 %
- LD₅₀ pro standard toxicity odpovídá specifikovanému rozsahu



Akutní toxicita pro včely

Absolutní toxicita v klíčkových pokusech je vyjádřena hodnotami LD50 orální a kontaktní dorsální aplikace.

Pro další hodnocení používáme vždy nižší ze získaných hodnot.

Dále hodnotíme podle této stupnice, zavedené dr. Atkinsem:

- LD50 < 2 $\mu\text{g}/\text{včela}$ = vysoce toxické
- 2 - 11 $\mu\text{g}/\text{včela}$ = mírně toxické
- > 11 $\mu\text{g}/\text{včela}$ = relativně netoxické



Stanovení toxicity pro včely

Polní (stanové) pokusy



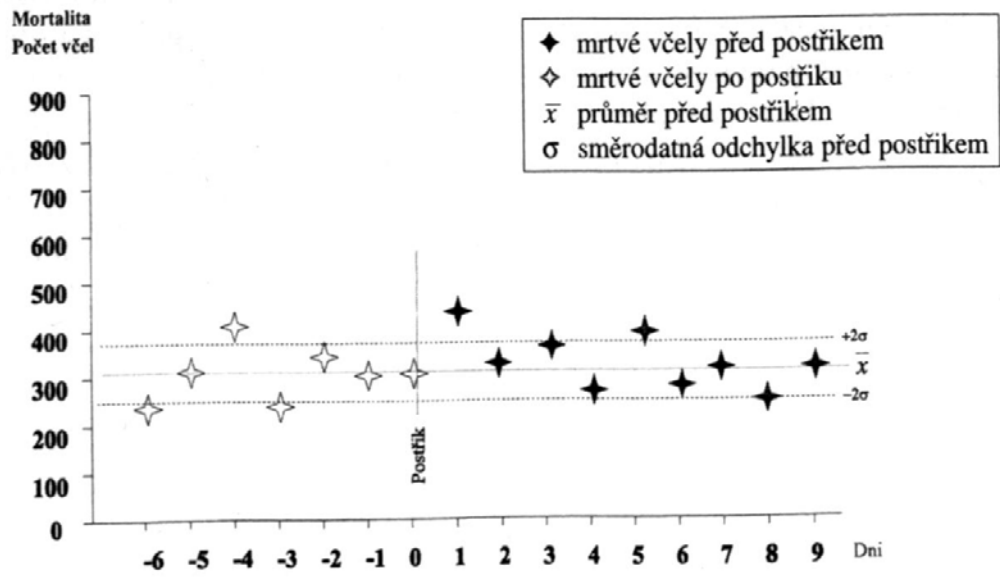
Pokusy v proletové hale



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

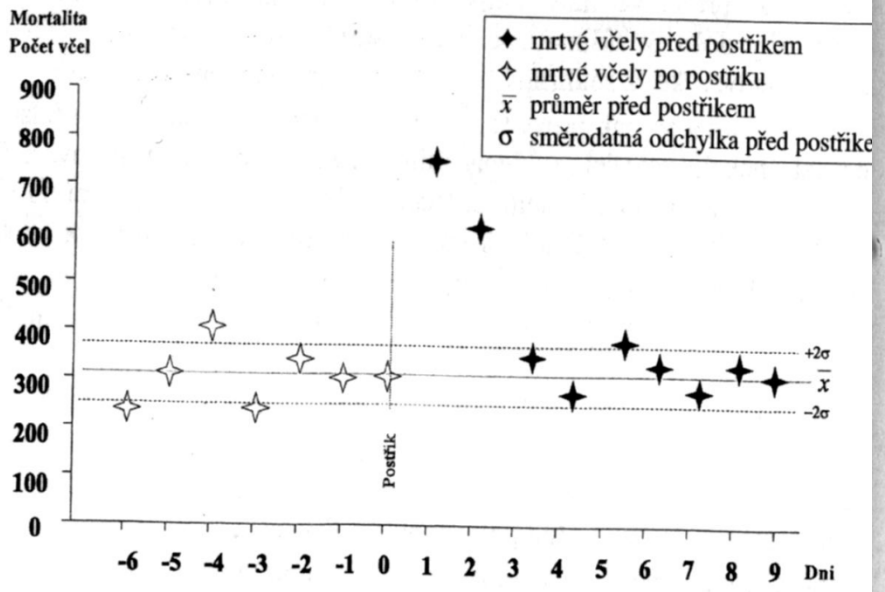
VÚ včelařský Dol,
akreditovaná zkušební laboratoř

Mortalita včel v proletové hale I - látky pro včely relativně neškodné

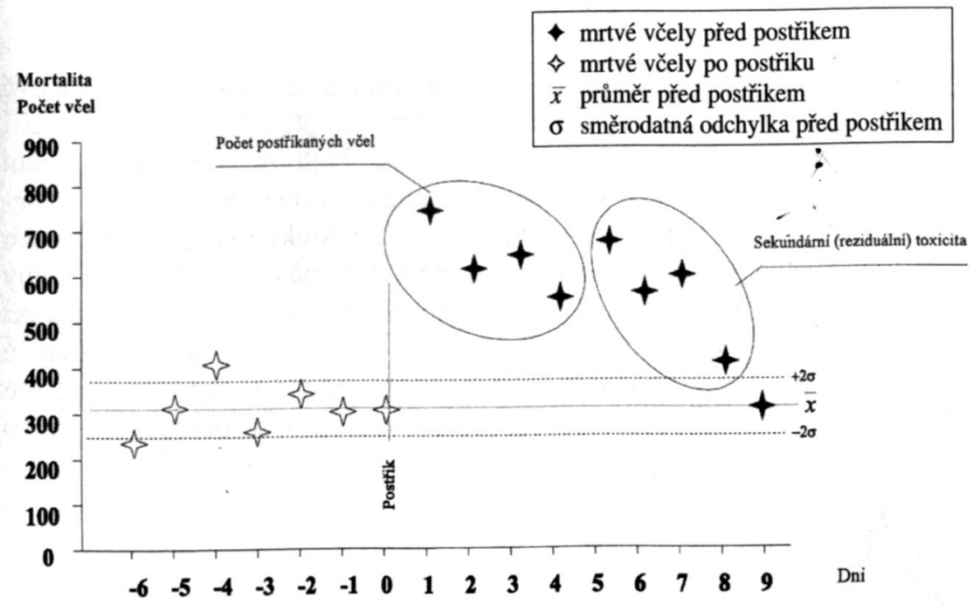


- akutní toxicita
- sekundární toxicita
- toxicita vůči vývojovým stádiím
- subletální účinky (orientace, změna vůně,...)

Mortalita včel v proletové hale II - látky pro včely škodlivé



Mortalita včel v proletové hale III - látky pro včely jedovaté



Testy toxicity na vodních bezobratlích

Stanovení akutní či prolongované toxicity: chemických látek, výluhů z pevných matric, průmyslových či komunálních odpadních vod, povrchových nebo podzemních vod

Normy testů na bezobratlých:

ČSN EN ISO, OECD, ASTM, US EPA, TNV, EEC, AFNOR

Testy na korýších (Crustacea) - planktonní - nejčastější

*Daphnia magna, D. pulex, Ceriodaphnia dubia, Artemia salina (mořská),
Thamnocephalus platyurus*

Testy na vířnicích (Rotifera) - *Brachionus calyciflorus*

Testy na kroužkocích (Annelida) - *Tubifex tubifex*

Testy na hmyzu (Insecta) - *Chironomus tentans*

Testy na měkkýších (Mollusca)

Potamopyrgus antipodarum

Testy na bentických korýších (Crustacea)

Gammarus, Hyallela azteca



Hrotnatka velká (*Daphnia magna*)

Říše *Animalia* (živočichové) – kmen *Arthropoda* (členovci) –
podkmen *Crustacea* (korýši) - třída *Branchiopoda* (lupenonožci) – řád *Cladocera*
(perloočky) – čeleď *Daphniidae* (hrotnatkovití) – rod *Daphnia* (hrotnatka)

Daphnia pulex (hrotnatka obecná), ***D. magna*** (h. velká)

- **zástupce zooplanktonu**
- **akutní i chronické testy**
- **běžně používaný modelový organismus**
 - **citlivost k toxikantům**
 - **rychlý životní cyklus, rychlá reprodukce**
 - **známé toxikologické parametry**
 - **snadná kultivace**
 - **biochemické markery**

3 – 5 mm dlouhý, převážně planktonní sladkovodní živočich
dospívá během 6 - 10 dní, množí se partenogeneticky,
životnost až 56 dní při 20°C



Normy testů s *Daphnia magna*

- ČSN ISO 6341 (75 7751) Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Zkouška akutní toxicity
- ČSN ISO 10706 (75 7752) Jakost vod – Stanovení chronické toxicity látek pro *daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)
- ISO 6341/1996 Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test
- ISO 1070/2000 Water quality - Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)
- OECD 202 *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test (Updated Guideline, adopted 4th April 1984)
- OECD 211 *Daphnia magna* Reproduction Test (Original Guideline, adopted 21st September 1998)



Akutní test na *Daphnia magna*

Cíl: určení koncentrace, která v testu imobilizuje 50% jedinců *Daphnia magna* (EC₅₀)

Podmínky akutního testu:

- jedinci mladší 24 hodin, získaní partenogenezí
- expozice 24/48 h, bez aerace, bez krmení, bez úpravy pH
- standardní médium (CaCO₃, MgSO₄, NaHCO₃, KCl)
- bez osvětlení nebo 16 h světla / 8 h tmy, teplota 20°C±2°C
- během testu měříme pH, teplotu, O₂
- rozpuštěný kyslík ≥ 2mg/l / ≥ 3 mg/l
- referenční látka: dichroman draselný

Zpracování a příprava vzorků vody

- Láhve se naplní vzorkem, aby se zamezilo přístupu vzduchu.
- Zkouška toxicity se provede co nejdříve po odběru, nejpozději do 6 hod. Pokud není možné tento interval dodržet, vzorek se na místě odběru zchladí na +4°C [nebo zmrazí na -20°C]. V tomto případě musí být vzorek zpracován do 48 hod.



Sledovaný parametr: imobilizace po 24, 48 hodinách - počítáme mobilní jedince
- kritérium imobilizace: jedince, kteří nejsou schopni se rozplavat ani po 15s
mírném zamíchání považujeme za imobilizované, i kdyby ještě pohybovali tykadly

Platnost výsledků = validita testu

Koncentrace rozpuštěného kyslíku na konci zkoušky je větší anebo se rovná 2 mg.l^{-1}
Procento imobilizace kontrolních vzorků je menší než nebo se rovná 10%
24h-EC50i pro dichroman draselný je v rozsahu od 0,6 do $1,7 \text{ mg.l}^{-1}$

Vyjadřování výsledků

Hodnocení:

Počet imobilních jedinců

počáteční inhibiční koncentrace - hodnoty EC50 (pro 24h a 48h)

popř. nejnižší c pro 100% imobilizaci a nejvyšší c pro 0% imobilizaci

Hodnoty 24h-EC50i, 48h-EC50i a limity odpovídající 0% a 100% imobilizace se vyjadřují:

U odpadních vod v procentech ředění

U chemických látek v miligramech na litr



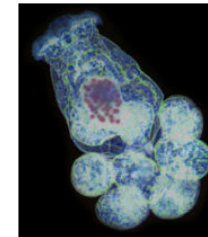
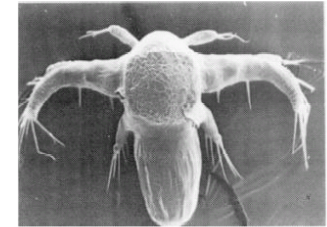
ALTERNATIVNÍ MIKROBIOTESTY ("toxkity") s bezobratlými

- Výhody: miniaturizace, zkrácení doby inkubace a tím i zjednodušení
- Možnost dlouhodobého uchování testovacích organismů ve formě kryptobiotických klidových stádií, v lyofilizovaném nebo imobilizovaném stavu.
- Organismy se před použitím v testech uvedou do aktivního stavu.
- Synchronně vylíhlí jedinci jsou uniformní a pocházejí z geneticky přesně definovaných zásobních kultur.
- V současnosti jsou mikrobiotesty komerčně dostupné v podobě tzv. toxkitů



THAMNOTOXKIT F™ MICROBIOTESTS

With the
crustacean
Thamnocephalus
platyurus



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

ROTOXKIT F chronic

Contains all the materials to
perform three
48h reproduction assays



PROTOXKIT F™ MICROBIOTESTS

With the ciliate
protozoan
Tetrahymena
thermophila



Mikrobiotesty

DAPHTOXKIT FTM magna, DAPHTOXKIT FTM pulex:

24-48h test akutní toxicity pro korýše *Daphnia magna* a *Daphnia pulex* (odpovídá OECD a ISO normám)

CERIODAPHTOXKIT FTM: 24 h test akutní toxicity pro korýše *Ceriodaphnia dubia* (odpovídá USEPA normě)

THAMNOTOXKIT FTM: 24 h test akutní toxicity pro korýše *Thamnocephalus platyurus* (Test s *Thamnocephalem* u nás normován TNO)

OSTRACODTOXKIT FTM: 6 denní chronický test toxicity (mortalita/inhibice růstu) s korýšem *Heterocypris incongruens*. Kontaktní mikrobiotest pro kontaminované sedimenty/půdy

ROTOXKIT FTM: 24 h test akutní toxicity pro vířníka *Brachionus calyciflorus* (odpovídá standardní normě ASTM E1440-91).

ROTOXKIT FTMshort –chronic: 48h krátký-chronický (reprodukční) test s vířníkem *Brachionus calyciflorus* (odpovídá francouzské normě AFNOR)

PROTOXKIT FTM: 24h chronický (inhibice růstu) test toxicity pro prvoka *Tetrahymena thermophila*. Metodika pro odpovídající test je vyvíjena v OECD.

RAPIDTOXKIT (tm): Hodinový test toxicity s larvami korýše *Thamnocephalus platyurus* pro rychlou detekci kontaminace vody.

OSTRACODTOXKIT FTM **MICROBIOTESTS**

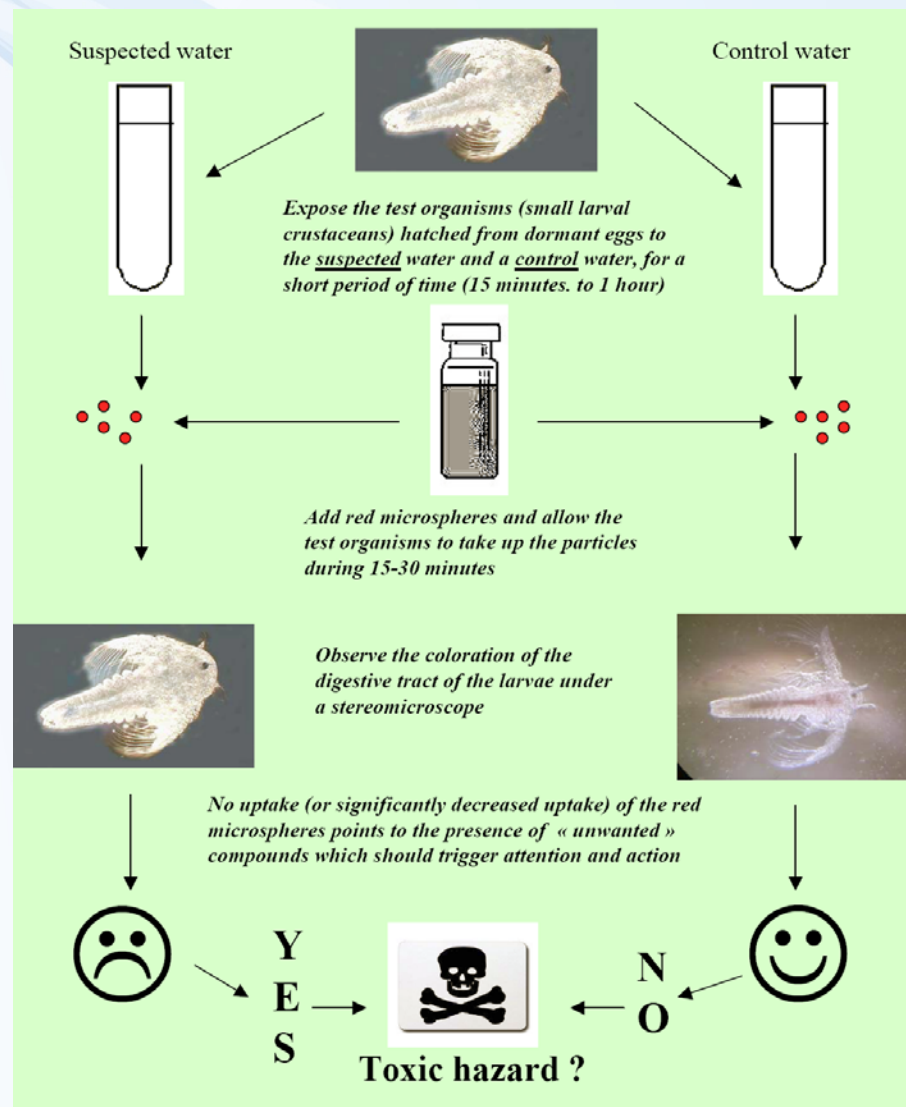
FOR SEDIMENT TOXICITY TESTING

With the
benthic crustacean
*Heterocypris
incongruens*



RAPIDTOXKIT

- Test s nejrychlejší odpovědí
- „jídelní test“ – sledováno ovlivnění příjmu potravy stresem (toxickou látkou)
- Testovací organismus: *Thamnocephalus platyurus*
- Uchování: klidová stádia, cysty
- Doba líhnutí: 30-45 hod., 25°C, 4000lx
- Inkubace: 15-60min, 25°C, 4000lx
- Pak přidány červeně obarvené mikrospory (potrava), inkubace 15-30 min
- Vyhodnocení: pod mikroskopem zhodnocen příjem potravy v jednotlivých expozičních variantách – hodnocena inhibice příjmu mikrospor v porovnání s kontrolou



Chronické testy s vodními bezobratlými živočichy

Akvatické testy

- Reprodukční test s hrotnatkou *Daphnia* spp. (ISO 1070/2000)
- Test přežívání a reprodukce s břichatkou *Ceriodaphnia dubia* (USEPA, 1989)
- Chronické biotesty s vidlonožci (*Mysidacea* – řád korýšů z podtřídy rakovců) – mořští, pronikají i do brakických a sladkých vod

Sedimentové testy

10-denní test přežívání a růstu s různonožcem *Hyalella azteca* (USEPA, 2000)

42-denní test přežívání, růstu a reprodukce s různonožcem *Hyalella azteca* (USEPA, 2000)

10-denní test přežívání a růstu s pakomárem *Chironomus tentans* (USEPA, 2000)

Celoživotní (Life-cycle) test pro hodnocení účinků kontaminace sedimentů s pakomárem *Chironomus tentans* (USEPA, 2000)



Chronický test na *Daphnia magna*



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

- organismy mladší 24h, 10 organismů na koncentraci
- individuálně v 50ml media M4/kádinku
- médium výměna 3x týdně
- expozice 21 dní
- teplota $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 6-9 ($\pm 1,5$), rozpuštěný $\text{O}_2 > 3\text{mg/l}$
- fotoperioda 16 h světla / 8 h tmy, krmení směs řas



Jednou týdně: O_2 , teplota, tvrdost a pH v médiu, kontrolních nádobách a u nejvyšší zkušební koncentrace.

Zkušební koncentrace se připravuje alespoň v pěti variantách s faktorem $< 3,2$ (geometr. řada)

Rozptyl koncentrací se nastavuje podle cíle testu:

- LOEC/NOEC
- EC_x

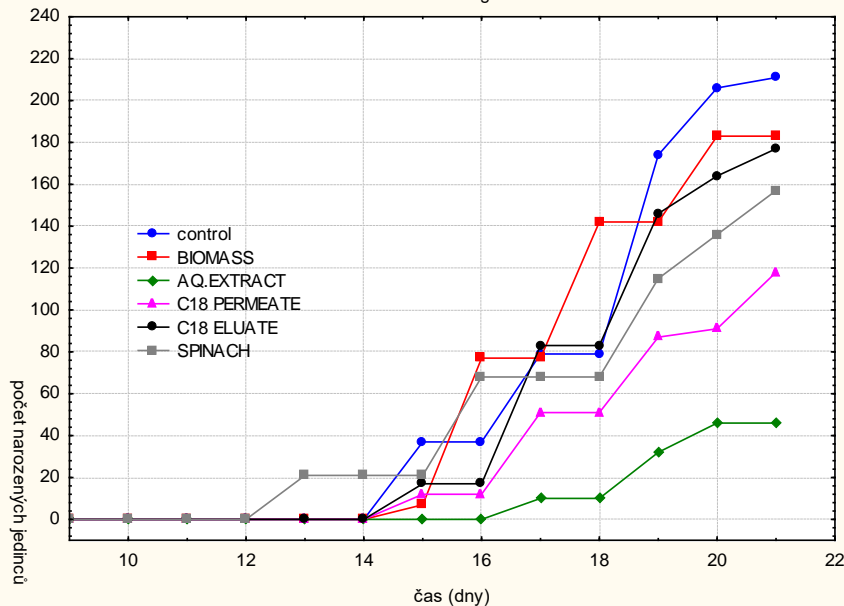
Nepoužívá se koncentrace se statisticky významným účinkem na přežití dospělců
-> toxicita pro reprodukci a mortalitu



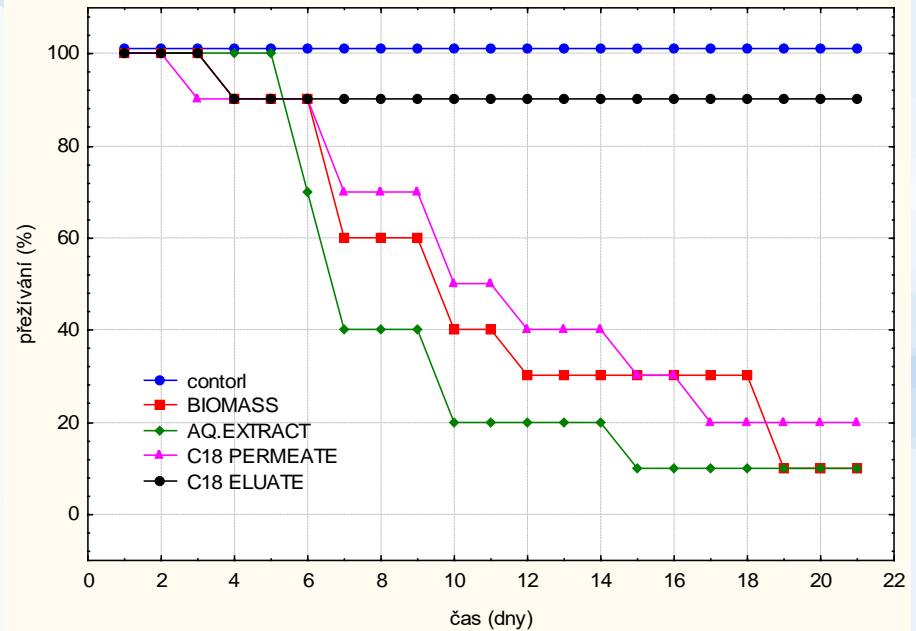
Sledované parametry

- Mortalita, přežívání
- Reprodukce
- Počet narozených juvenilů
- Den první reprodukce
- Chování - způsob pohybu

koncentrace 15 mg/l



koncentrace 135 mg/l



- další parametry (zbarvení, tukové kapénky, velikost gonád)
- měření délky matečných organismů na konci zk.
 - velikost a počet potomků jednoho organismu
 - počet potracených plůdků,...

Testy se sedimenty

- Organismy v sedimentu vystaveni látkám zachyceným v pevné i kapalně složce matrice
- Pro bentické organismy - biodostupnost chemických stresorů v sedimentech.
- Sediment = potenciální dlouhodobý zásobník/zdroj kontaminantů uvolněných do vody
- Může být nezbytné remediovat kontaminované lokality bagrováním nebo odstraněním sedimentů
- odstranění sedimentu, jeho transport a uložení mohou být velmi nákladné; studie toxicity umožní identifikovat nebezpečně kontaminované lokality – kde je třeba odstranění, kde možno ponechat bez významného rizika.
- Zejména EPA a ASTM metodiky

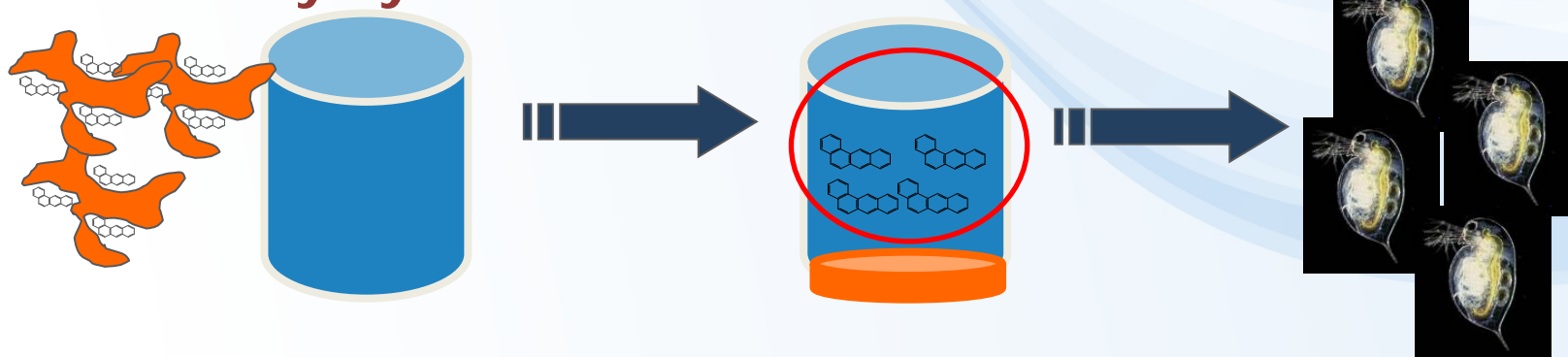


Jak hodnotit toxicitu sedimentů?

■ **Toxicita porové vody/výluhů** (několik ISO / OECD norem)

: 100 g d.w./L vody, 24h pomalé třepání, filtrace, test
V. fisheri (30 min), řasy, bezobratlí - D. magna (**2 dny**)

? Vodný výluh vs. Sediment



■ **Kontaktní toxicita** (jen málo norem ...)

: sedimenty+organismy & hodnocení účinků – červi, hmyz, šneci ... **dny - týdny**



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

Skríningové testy toxicity/genotoxicity

Bakteriální modely

Testy s výluhy sedimentů:

- *Vibrio fischerii* (Microtox) – 0,5 h
- *Escherichia coli* (Toxichromotest) – 2 h

Kontaktní verze testu

- Flash test s *Vibrio fischerii* – kinetický test - stanovení inhibičního účinku vzorků na světelnou emisi *Vibrio fischerii*
- srovnatelné se statickou zkouškou s luminiscenčními bakteriemi podle ČSN EN ISO 11348
- Flash verze - eliminace vlivu zákalu a zbarvení vzorku, umožňuje provedení testu se suspenzí vzorku bez přípravy vodného výluhu. Je mezistupněm ke kontaktním zkouškám ekotoxicity

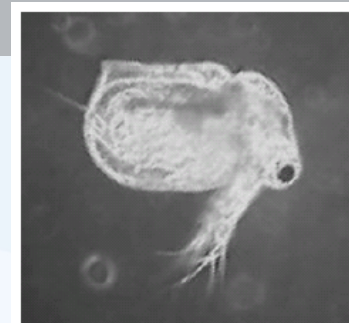
Testy genotoxicity s výluhy:

- SOS chromotest
- umuC test
- GFP test atd.



Akutní testy toxicity

Ceriodaphnia dubia



Porová voda

Eluát ze sedimentu

- 48-96 h expozice
- Příprava eluátu: 24h třepání, 100 g sedimentu/1L vody
- Druhy: *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia dubia*, střevle potoční (*Pimephales Promelas*), pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*)
- Sledované parametry: přežívání, imobilizace

Kontaktní testy - Celý sediment

- 96h – 10 dní expozice
- Druhy: různonožec (*Hyalella azteca*), jepice (*Hexagenia limbata*), pakomár (*C.tentants/riparius*)
- 10-denní test s *Hyalella azteca* a *Chironomus tentans*
- Sledované parametry: přežívání



Chronické testy toxicity

Porová voda

Eluát ze sedimentu

- 7-35 dní expozice
- Druhy: *Ceriodaphnia dubia*, střevle potoční (*Pimephales Promelas*), pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*)
- Sledované parametry: přežívání, imobilizace, růst, reprodukce, doba první reprodukce, doba úhynu, přežívání mladých

Kontaktní testy - Celý sediment

- Zpravidla 28 dní expozice
- Druhy: různonožec (*Hyalella azteca*), pakomár (*C.tentans/riparius*)
- Sledované parametry: přežívání, imobilizace, růst, reprodukce, doba první reprodukce, doba úhynu, přežívání mladých
- 28- a 42-denní testy s *H. azteca*
- Sub-chronické a celoživotní testy s *Chironomus tentans*
- 10-denní krátkodobý chronický test s larvami obojživelníků
- Chronický test s nitěnkou *Tubifex tubifex* (28 dní)



Ekotoxikologické biotesty se sedimenty – přehled EPA

| Test Medium | Species | Common Name |
|--------------------|---|--------------------------|
| Freshwater benthic | <i>Chironomus dilutus</i> | Chironomid, midge larvae |
| | <i>Chironomus riparius</i> | Chironomid, midge larvae |
| | <i>Hyaella azteca</i> | Amphipod, scud |
| | <i>Lumbriculus variegatus</i> | Oligochaete, "worm" |
| | <i>Gammarus pulex</i> | Amphipod |
| | <i>Hexagenia limbata</i> | Ephemeroptera, mayfly |
| | <i>Tubifex tubifex</i> | Oligochaete |
| | <i>Diporeia sp</i> | Amphipod, Great Lakes |
| Marine Benthic | <i>Americamysis bahia</i> TM | Mysid shrimp |
| | <i>Ampelisca abdita</i> | Amphipod (Atlantic) |
| | <i>Eohaustorius estuarius</i> | Amphipod (Pacific) |
| | <i>Leptocheirus plumulosus</i> | Amphipod (Atlantic) |
| | <i>Rhepoxynius abronius</i> | Amphipod (Pacific) |
| | <i>Grandidierella japonica</i> | Amphipod |

www.epa.gov



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



Tubifex

Gammarus



Testy s larvami pakomárů rodu *Chironomus*

- OECD 218 Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment
- OECD 219 Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water
- OECD 235 *Chironomus* sp., Acute Immobilisation Test (pouze voda – 48 h expozice)
- OECD 233 Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment (v OECD normách preferován *Chironomus riparius*)
- USEPA 2000 Celoživotní (Life-cycle) test pro hodnocení účinků kontaminace sedimentů s pakomárem *Chironomus tentans*



Chironomus riparius Meig. (pakomár)

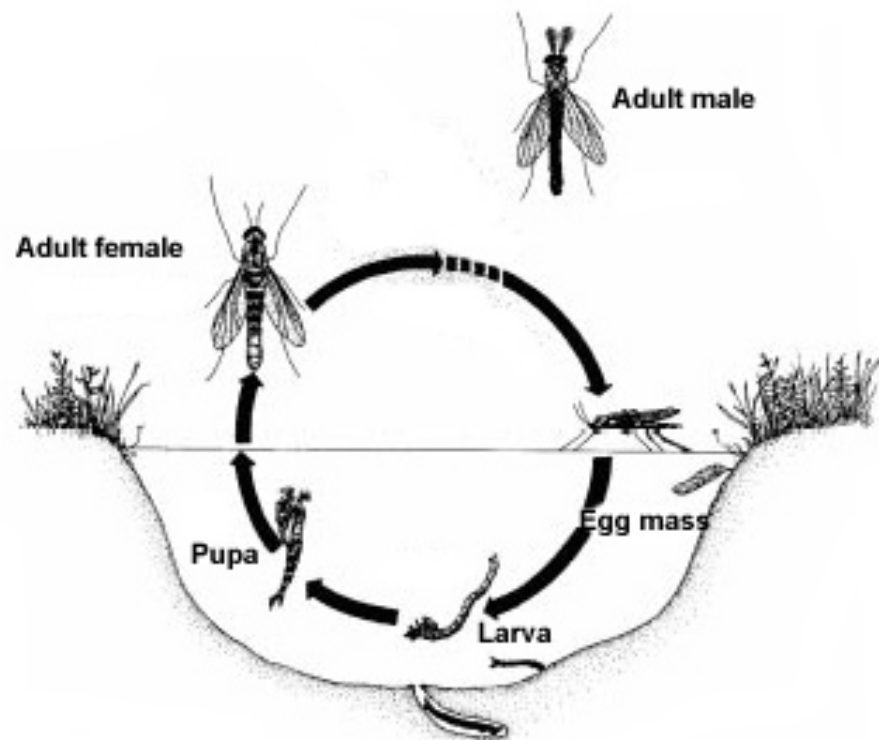
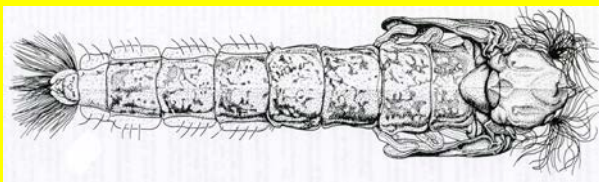
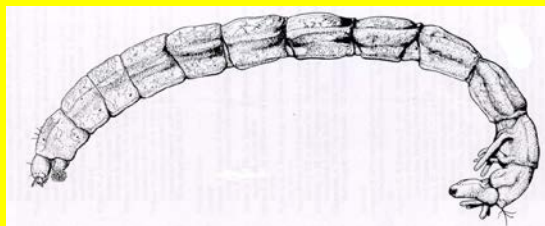
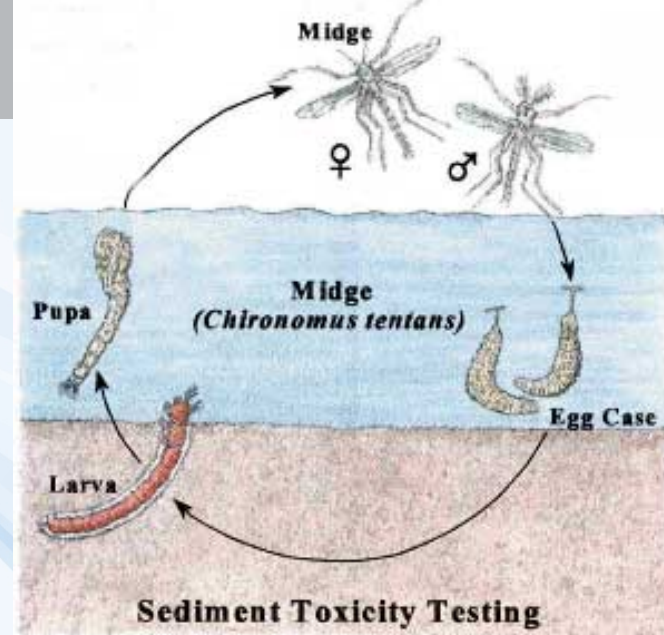
rod *Chironomus* - řád dvoukřídlí (*Diptera*) = hmyz s proměnou dokonalou

vajíčko-larva(4 instary)-kukla-imago

dominantní konzumenti 1. řádu v rámci sladkovodních akvatických ekosystémů

značná abundance, kosmopolitní rozšíření

larvy - všežravci - živí se řasami, rozsivkami, detritem



10-denní test s larvami pakomárů rodu *Chironomus*

Nasazovány larvy ve stadiu 2-3 instaru (cca 10 d staré)
10 jedinců/kádinku,
Po 10 dnech hodnoceno přežívání a růst

Celoživotní (Life-cycle) test pro hodnocení účinků kontaminace sedimentů s pakomárem *Chironomus*

Nasazovány larvy mladší jak 24 h
12 jedinců/kádinku

Doba expozice: *Ch. riparius* 27-28 dní

Ch. tentans: 50-60 d (ukončeno 7 dní po posledním vylétnutí)

Hodnocené parametry: 20-denní přežívání a váha (růst),
vylétávání samiček a samečků – poměr pohlaví, střední čas
vývoje: čas od vysazení do líhnutí, doba vylétávání, počet
nakladených vajíček, procento líhnutí a přežívání dospělců

U obou testů :100 ml sedimentu/175 ml vody
Teplota $20 \pm 2^\circ\text{C}$, sledováno pH, kyslík, vodivost
Fotoperioda 16 h světla / 8 h tmy
Pravidelné krmení, vzduchování

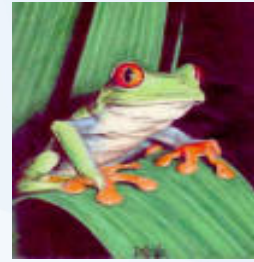


Testy toxicity s bezobratlými

Závěr

- pro konkrétní případ, vzorek a problém může zkušený ekotoxikolog vybrat vhodnou kompozici detekčního systému
- akutní testy toxicity jsou jednou z několika součástí systému hodnocení
 - chemické analýzy
 - struktura zoocenoz a fytocenoz
 - biokumulace a biokoncentrace
 - QSAR
 - biomarkery
 - atd...





Ekotoxikologické testy s obojživelníky



Obojživelníci unikátní pro (eko)toxikologické procesy:

- Jsou významnou součástí ekosystémů - reprezentují většinou **konzumenty druhého řádu** (většina druhů je insektivorních).
- Většina zástupců (zejm. ze skupiny bezocasích, *Anura*) prodělává unikátní **proces metamorfozy (embryo, larva, dospělec)**
- životní strategie **reprezentuje řadu rozličných expozičních cest** a míst pro působení polutantů
- **transdermální přenos** vody a polutantů: u obojživelníků 70-90% celkové kapacity.
- **u jiných obratlovců** jsou procesy výměny vody, iontů (a také plynů) realizovány hlavně přes **plíce/žábry, gastrointestinální trakt**



Embryotoxicita x teratogenita

Embryotoxicita – vlastnost látek, která se projevuje nepříznivými účinky na zárodek (embryo)

Embryotoxické látky působí smrt zárodků či narušení vývoje nebo růstu

Teratogenita – vlastnost látek, která způsobuje trvalé funkční nebo strukturní abnormality (malformace) během období embryonálního vývoje

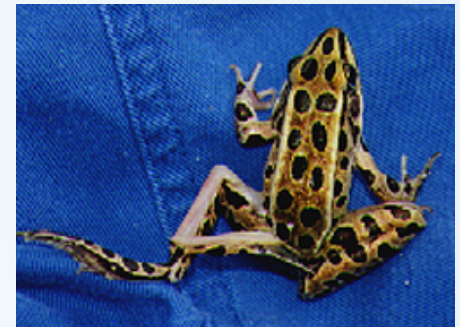
Teratogeny působí neúčinněji ve stadiu organogeneze

Malformace u obojživelníků

- celosvětový problém, souvisí se snižováním populací obojživelníků (Worldwide Amphibian Decline)
- 44 států USA, Kanada – malformovaní jedinci nalézáni přímo v prostředí (*Rana pipiens*, *Rana clamitans*, *Bufo americanus*, ...)
- hlavní příčiny – UV-B záření
 - invaze parazity (Trematoda – *Ribeiroia ondatrae*)
 - kontaminanty životního prostředí



pesticidy, herbicidy
těžké kovy



Možný důvod: Kontaminanty

“Obojživelníci jsou zvláště citliví vůči xenobiotikům v prostředí díky své fyziologii a chování” (Bidwell and Gorrie, 1995)



Ekotoxikologie obojživelníků: málo známá oblast, rozvoj v posledních letech
O koncentracích a efektech polutantů na obojživelníky existuje velmi málo údajů. Nedostupné jsou experimentální studie určující biokoncentraci (biokoncentrační faktory, BCFs) a/nebo bioakumulaci.



Testy s obojživelníky

Obojživelníci nacházejí uplatnění v testech **teratogenity**, **genotoxicity** a v testech pro odhalení **narušení endokrinního systému**

Typy studií: taxonomická diverzita, rozmnožovací aktivita, embryolarvální vývoj, biochemie orgánů. Etické překážky.

- **ISO, OECD, ASTM - FETAX** (Frog Embryo Teratogenesis Assay: *Xenopus*) *Xenopus laevis* - testování chemických látek a přípravků, sedimentů apod.
Evropa - skokan



Testy toxicity a využití v ekotoxikologii

- sporé informace - omezené použití - **ochrana obojživelníků**
- **údaje o kontaminaci**, bioakumulaci apod. máme **pouze z uhynulých jedinců** (? stáří..)
- **Biochemické ukazatele z krve** (plánované odběry v přírodních populacích – výjimečně)

Modelové druhy

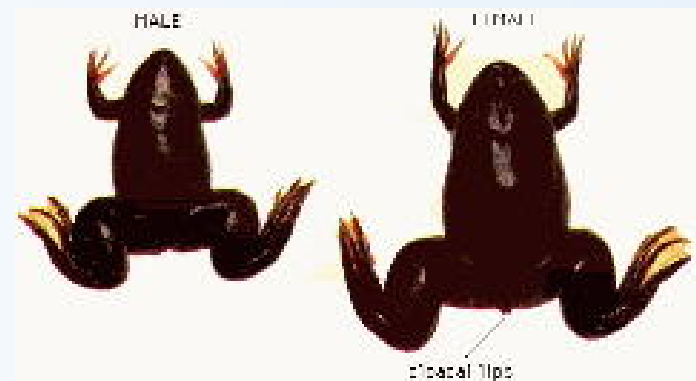
- Nejčastěji používaný modelový organizmus - drápatka vodní (*Xenopus laevis*) (**ASTM E1439-98**)
- Další používané druhy - skokani *Rana pipiens* (**ASTM E1439-98, 1998**) a *Rana temporaria*
- ropuchy *Bufo americanus* (**ASTM E1439-98, 1998**) a *Bufo arenarum*
- ocasatí obojživelníci žebrovník *Pleurodeles waltl* (AFNOR T90-325, 1992), axolotl *Ambystoma mexicanum* (Federal Register, 1998),



Modelový organismus - drápatka vodní (*Xenopus laevis*)

Studium vývojové, buněčné, molekulární biologie,
využití v embryologii, fyziologii, toxikologii

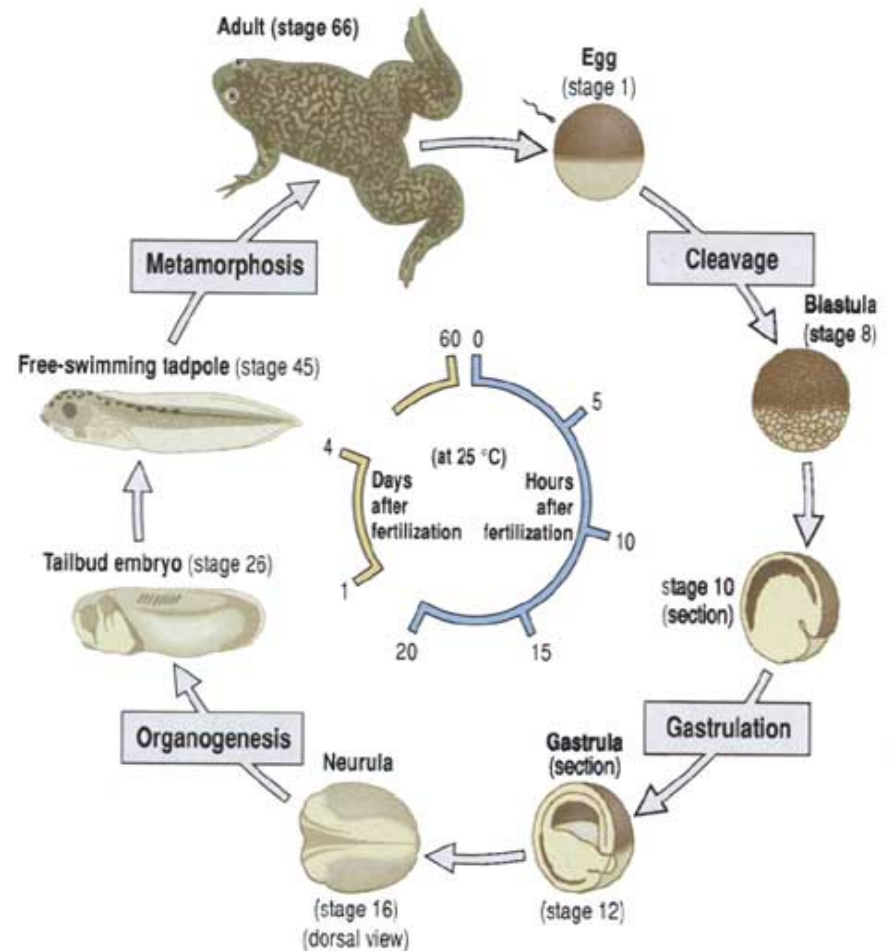
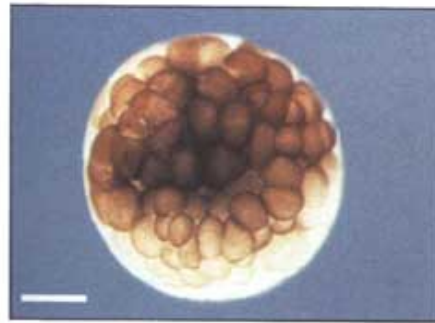
- dobrá znalost normálního vývoje, biologie a biochemie
- po celý život možnost odchovu v laboratoři
- schopné přijímat usmrcenou potravu
- akvatický způsob života larev i dospělců
- dospělci resistantní vůči chorobám
- možnost indukovaného získání embryí nezávisle na ročním období
- průhlednost larev - sledování malformací vnitřních orgánů



Frog Embryo Teratogenesis Assay: *Xenopus* (FETAX)

- Původně designován pro testování teratogenity chemických látek (farmak) na drápatce jako modelu pro obratlovce (pro lidi)
- Dobrá korelace mezi známými lidskými teratogeny a výsledky z FETAXu
- Používán pro testy jednotlivých látek, směsí, i odpadních vod

Životní cyklus
drápatky vodní



Test FETAX

- **FETAX = Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus**
- - podle metodiky **standard ASTM (American Society for Testing and Materials) E 1439-98 (1999)**: Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX).
- Laboratorní test pro odhad rizika embryotoxicity a teratogenity chemických látek a enviromentálních směsí v roztoku - **testování letální toxicity a neletálních efektů (morfologické malformace)** během embryolarválního vývoje
- Akutní, semistatický test
- **Hodnocení embryotoxicity s žábami - FETAX**
 - **expozice vajíček během embryonálního vývoje**
 - **ve standardní podobě ukončen po 96 hod**
 - **varianty – kompletní životní cyklus**

dobře standardizovaná metoda
reprezentativnost pro další obojživelníky????

US-EPA č. 1001.0 - Fathead minnow, Embryo-larval Survival and Teratogenicity lze dobře modifikovat pro účely testování efektů s obojživelníky skokan hnědý (*Rana temporaria*).
ropucha obecná (*Bufo bufo*)

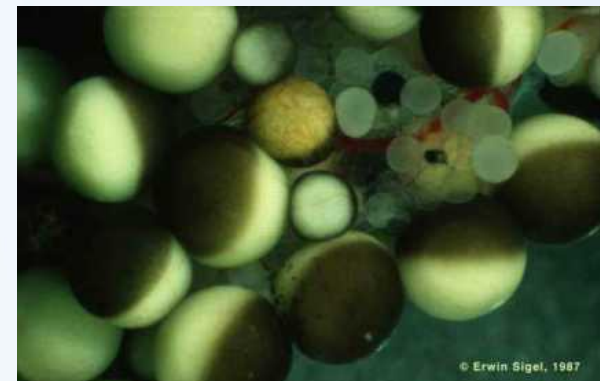


Pracovní postup I

- **Před založením testu**

- výběr vhodného páru žab
- stimulace rodičovského páru hormonem choriogonadotropinem (HCG, den před snůškou) injekčně do hřbetního lymfatického vaku samice 500-1000 IU, samec 250-500 IU
následná stimulace stejného jedince nejdříve po 90 dnech
- pár do samostatné nádrže – provzdušnění, teplota vody $21 \pm 2^\circ\text{C}$
amplexus po 2-6h -> tvorba vajíček a oplození
kladení vajíček po 9-12h od injekce

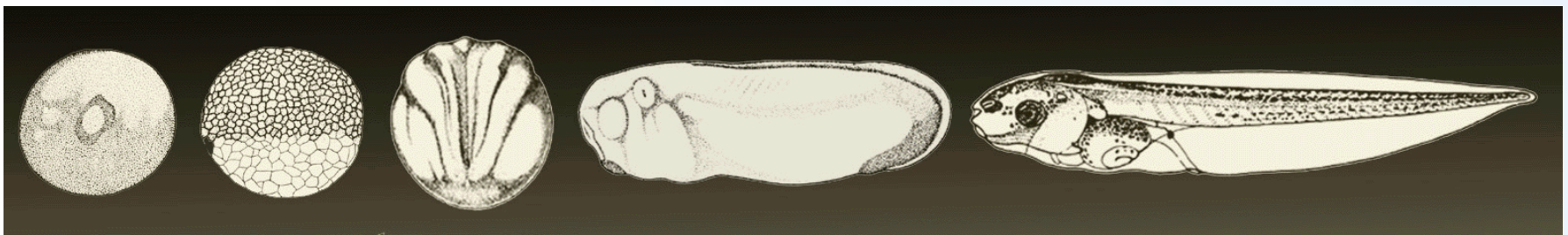
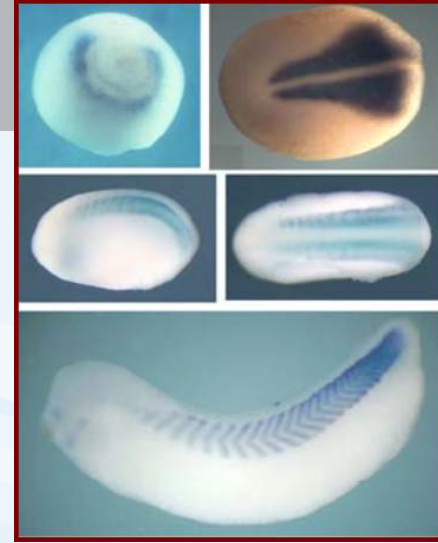
- výběr oplozených vajíček - do testu vybíráme vajíčka kulatého tvaru, nakladena jednotlivě
→ co nejkvalitnější, oplozená
- dobrá snůška: $\geq 75\%$ oplozených vajíček



Pracovní postup II

Průběh testu

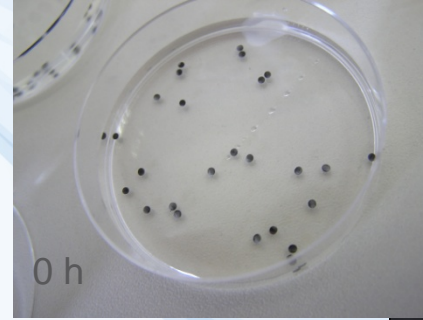
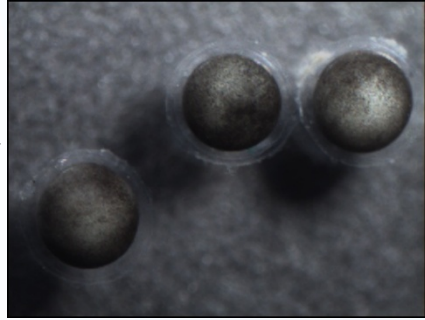
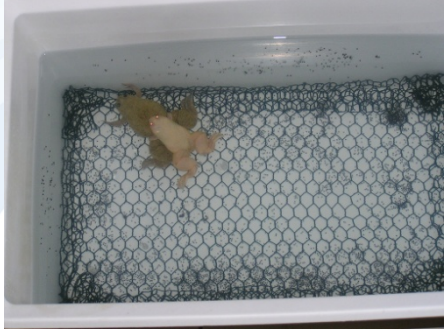
- 5 h po fertilizaci, nutné před započítáním neurulace
 - do Petriho misek po 20-25 oplozených vajíčkách + 10ml FETAX média + testovaná látka
 - expozice různým koncentracím testovaných látek v standardním FETAX médiu: koncentrační řada, každá koncentrace ≥ 2 misky
negativní kontrola ≥ 4 misky
pozitivní kontrola: 6-aminonicotinamid
all-trans retinová kyselina (ATRA)
 - teplota $24 \pm 2^\circ\text{C}$ (nižší zpomalí vývoj, vyšší znásobí výskyt malformací), uložení do inkubátoru
 - pH 7,7 (reálně mezi pH 6,5 a pH 9,0)
 - výměna expozičních roztoků/média a odběr uhynulých embryí po 24, 48, 72 hodinách
 - ukončení testu po 96h, 90% embryí by mělo dosáhnout 46. stádia vývoje
- vyhodnocení pod mikroskopem
- sledování počtu a délky přežívajících jedinců a výskyt malformací



Hormonální stimulace dospělého páru

DESIGN TESTU

↳ amplexus → oplozená vajíčka – nasazení do Petriho misek



24 h



48 h



72 h



96 h

46.stádium



↳ fixace v 3 % formaldehydu → hodnocení malformací, měření délky embryí

↳ zamražení na -80°C → tkáňový homogenát pulců použit pro biochemická stanovení



Vyhodnocení testu

po expozici standardně hodnocení embryotoxicity a teratogeny zkoumané látky:

letalita po 96h (**LC₅₀** - koncentrace způsobující 50% úhyn embryí)

% morfologických změn - malformací po 96 hod (**EC₅₀** - koncentrace způsobující malformace u 50% embryí)

inhibice růstu (**MCIG**) – minimální koncentrace způsobující inhibici růstu



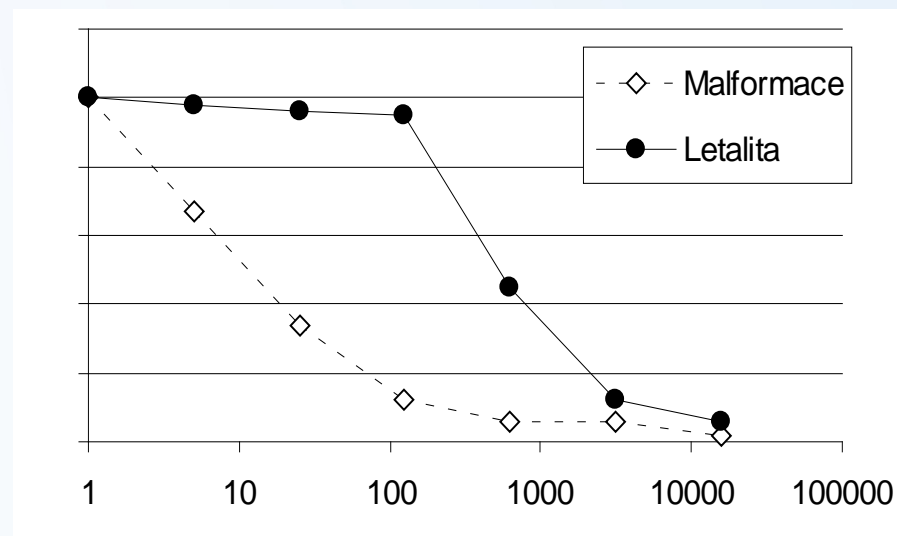
- **Index teratogenity** = hodnota podílu 96h LC₅₀ a 96h EC₅₀

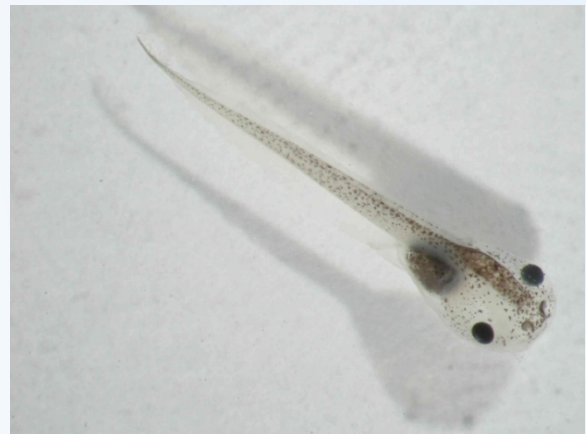
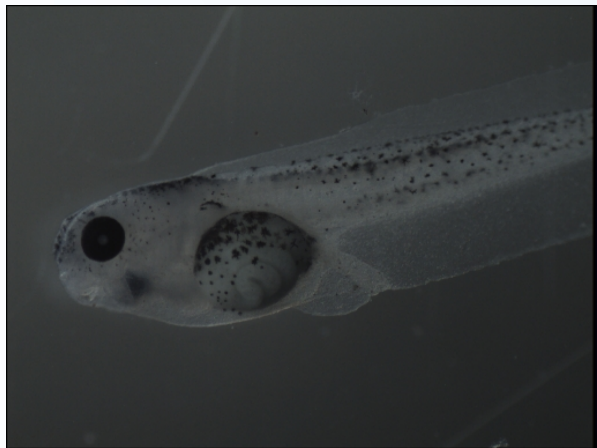
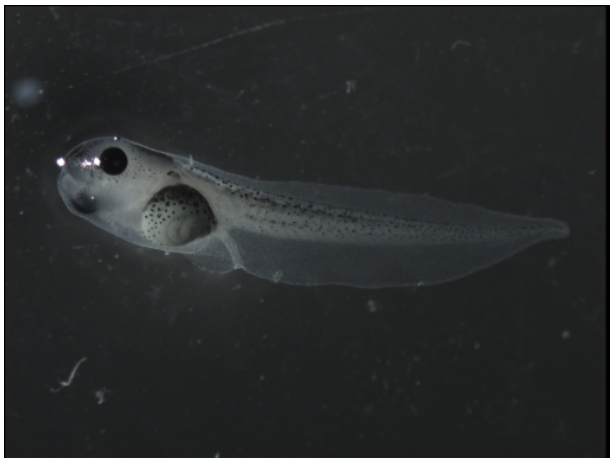
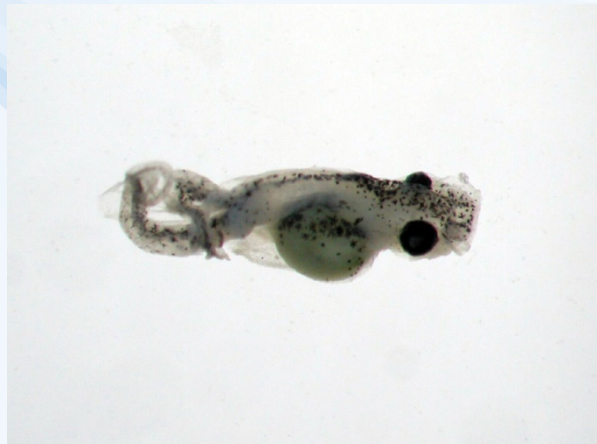
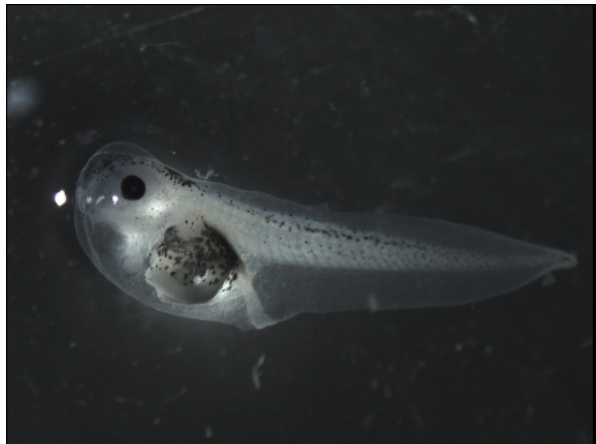
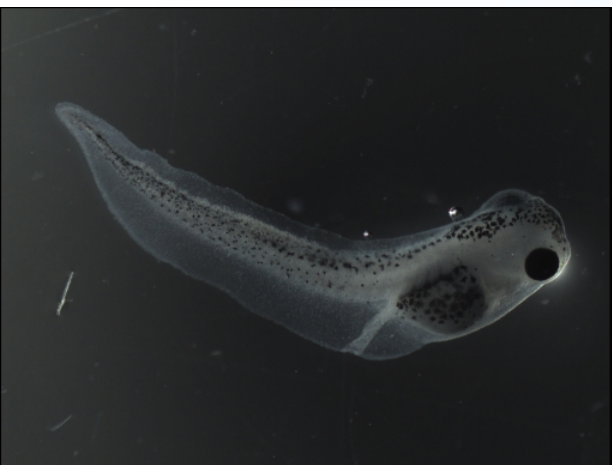
$$TI = LC_{50} / EC_{50}$$

- **TI > 1,5 indikace teratogenního potenciálu**

Další parametry:

- zpomalení vývoje
- inhibice růstu
- malformace orgánů
- biochemické markery
- změny chování

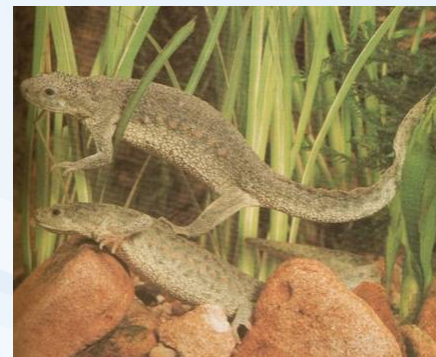




Testy genotoxicity

MN – test a Jayletův test

- Xenopus Mikronucleus Assay (MN–test) a Jayletův test (Békaert et al., 1999; Zoll-Moreux et Ferrier, 1999).
- Princip: sledování zvýšeného počtu mikrojader v erythrocytech u larev po expozici látkám s potencionálním genotoxickým účinkem.
- MN–test - larvy drápatky vodní (*Xenopus laevis*),
- Jayletův test - ocasatí obojživelníci – žebrovník (*Pleurodeles waltl*) nebo axolotla (*Ambystoma mexicanum*); French Standard NF (AFNOR T90-325, 1992). - ve Francii metoda pro určování genotoxicity látek



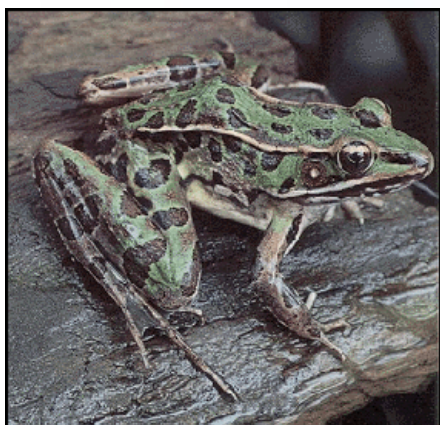
Testy narušení endokrinního systému

Viz. Přednáška č.11



Většina obojživelníků je chráněna = omezené využití pro výzkum a EB... registrace nových látek.. FETAX, QSAR

Kromě skokana hnědého všichni obojživelníci žijící v České republice chráněni zákonem č. 114/1992 Sb. o ochraně přírody a krajiny a zařazeni na seznam kriticky ohrožených, silně ohrožených nebo ohrožených druhů v příloze III. vyhlášky Ministerstva životního prostředí č. 395/1992 Sb.

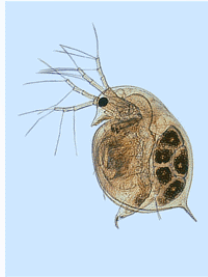
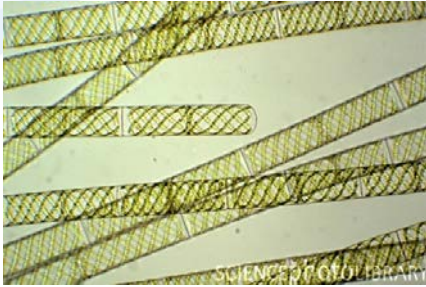


Testy ekotoxicity s rybami



Ryby

- Důležitá součást vodních ekosystémů



- Koloběh živin, predátoři, „top down“ efekt
- Ekonomická, sportovní, kulturní důležitost
- 48% obratlovců



Testy toxicity na rybích modelech

- Akutní testy toxicity
- Prolongované testy toxicity
- Chronické testy toxicity
- Testy toxicity na rybích embryích a potěru
 - Embryonální testy
 - Embryolarvální testy
- Testy ovlivnění růstu na nedospělých rybách
- Testy bioakumulace



Chov ryb pro testy



Používané druhy

Brachydanio rerio, *Danio rerio* (danio pruhovaný, zebříčka pruhovaná)



Poecilia reticulata (živorodka duhová, paví očko)



Pimephales promelas (střevle potoční)



Cyprinus carpio (kapr obecný)



Oncorhynchus mykiss (pstruh duhový)



Danio pruhovaný (*Brachydanio rerio*)



- Známý genom, dobře charakterizovaný druh
- Tisíce mutantních druhů
- Dobře popsáný model vývoje obratlovců
- Modely pro některá lidská onemocnění a poruchy

- Čeleď: Cyprinidae - kaprovití

Původ: Asie

Velikost: do 4 cm

Teplota: 20 - 26 °C

pH: 6,5 - 7,5

Potrava: všežravec (vločkové krmivo, nitěnky, dafnie)

Rozmnožování: Samečci jsou vybarvenější a oproti samičkám drobnější. Rozmnožují se ve větší, hodně zarostlé nádrži s nízkou hladinou vody, při teplotě okolo 25 °C. Na vytírací nádrž by mělo dopadat denní světlo. Nejdříve do nádrže umístíme samičku a až po několika dnech přidáme samce. Pokud jsme byli úspěšní, samička naklade na rostliny až 500 jiker. Potěr se líhne po dvou dnech a soběstačný je po dalších dni.

Chemické látky a chemické přípravky – hodnocení vlastností nebezpečných pro životní prostředí

- Zákon č.350/2011 Sb.: Zákon o chemických látkách a chemických směsích a o změně některých zákonů (chemický zákon)
- NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 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.13 bioakumulace – průtoková zkouška na rybách
- C.14. růstová zkouška na nedospělých rybách
- C.15 toxicity na rybích embryích a vajíčkovém plůdku – krátkodobá zkouška



Akutní testy

ČSN EN ISO 7346-1 (75 7761) Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae) – Část 1: **Statická metoda**

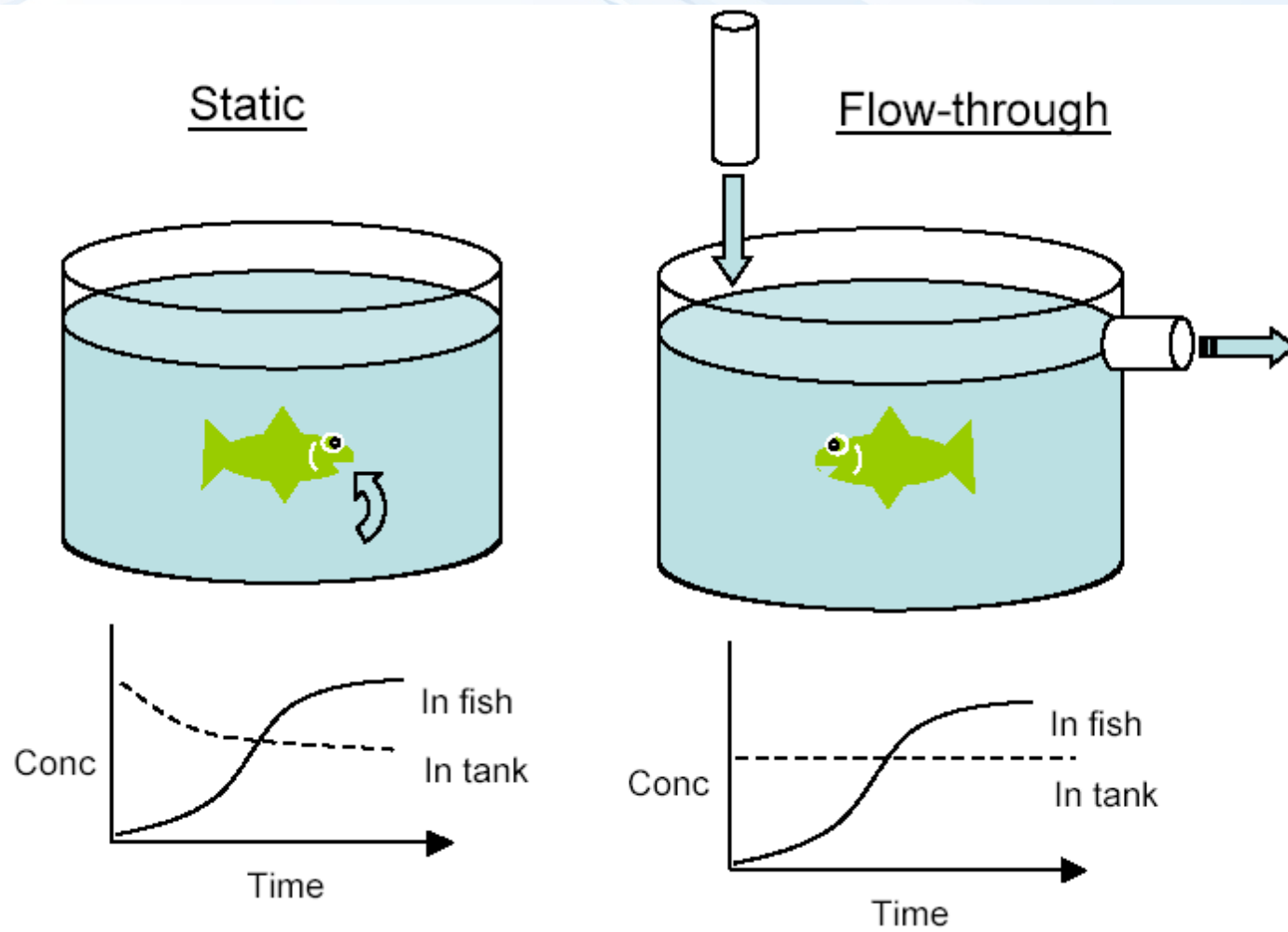
ČSN EN ISO 7346-2 (75 7761) Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae) – Část 2: **Obnovovací metoda**

ČSN EN ISO 7346-3 (75 7761) Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae) – Část 3: **Průtočná metoda**

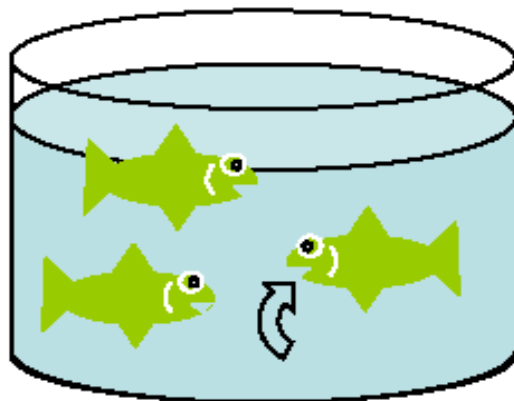
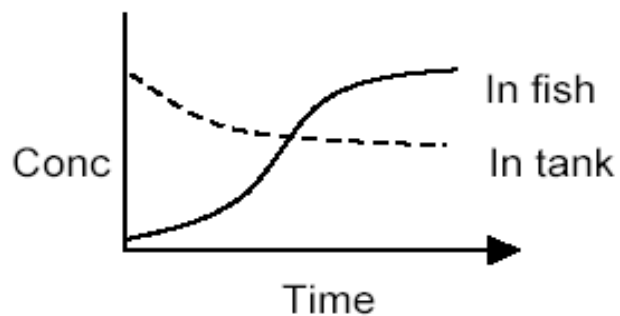
OECD 203: Test akutní toxicity na rybách – výsledkem je koncentrace, která vyvolá 50% úhyn ryb (96h LC50)



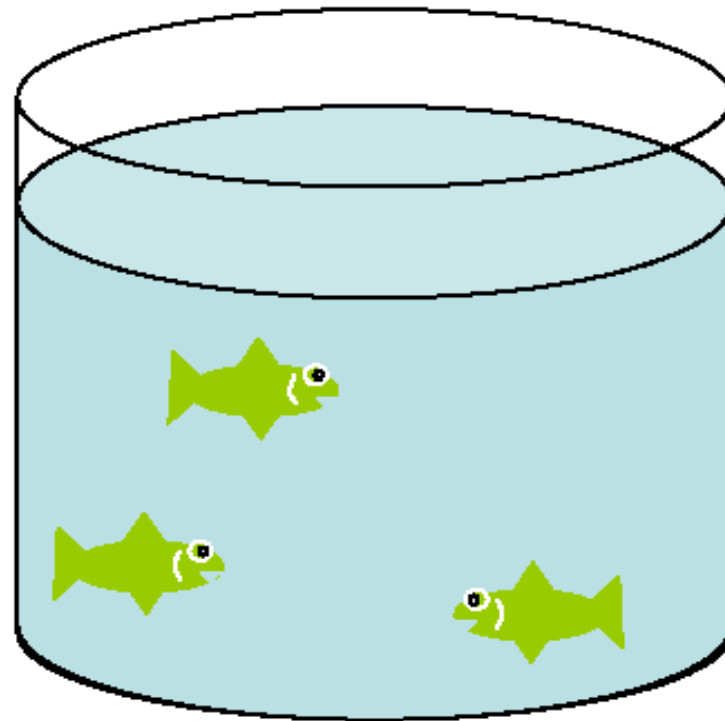
Experimentální design pro testy toxicity



Překonání problémů statického designu: 1. Zvýšení objemu



Uptake by organisms depletes chemical in solution



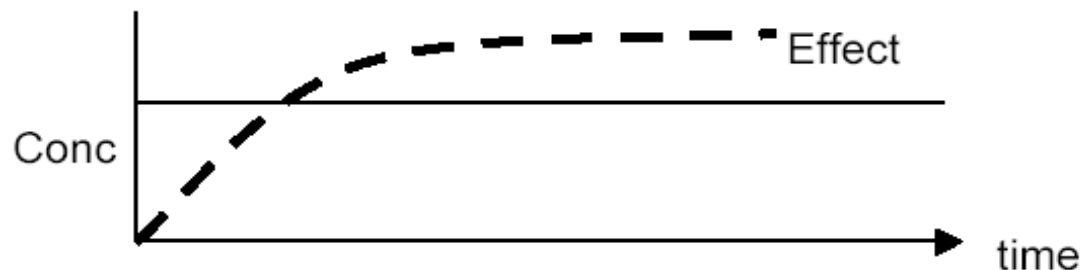
Chemical depleted slowly



Překonání problémů statického designu: 2. Semi-statické uspořádání (obnovovací)

Continuous:

-exposure is function of duration



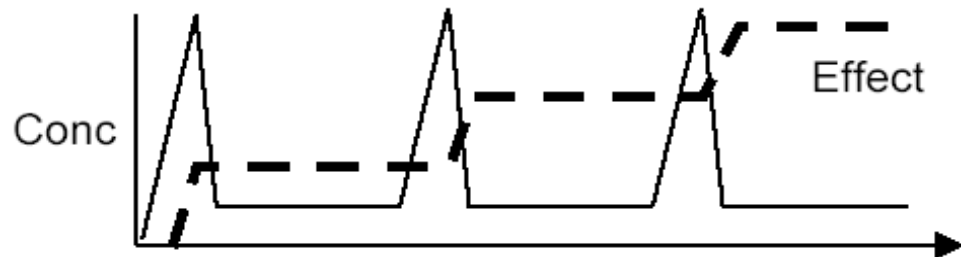
Static renewal, with recovery:

-exposure is function of max conc'n



Static renewal, no recovery:

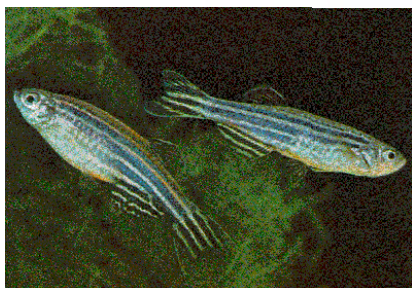
-exposure is function of cumulative concentration



Test akutní toxicity na rybách

Účel: Test slouží ke stanovení vlivu látek a odpadních vod na chování a přežívání ryb.

Princip: Test spočívá ve sledování chování a přežívání ryb v odstupňovaných koncentracích testované látky po dobu 48 až 96 hodin



Brachydanio rerio (2,5-3,5 měsíců, 2,5-3,5 cm, 21-25°C)

Poecilia reticulata (1,5-2,5 cm, 3-3,5 měsíce, 21-25°C)

Cyprinus carpio (2,5-3,5 cm, 20-24°C)

Oncorhynchus mykiss (4,5-5,5 cm, 13-17°C)

Další druhy: *Oryzias latipes* (halančík japonský), *Lepomis macrochirus* (slunečnice modrá), *Leuciscus idus* (jelec jesen)

Při nákupu nutná **aklimatizace 10-14 dní**, standardní krmení, chov jako při testu
Do testu – buď jen jedno pohlaví nebo vyrovnaný počet pohlaví





Testovací ryby



- Ryby by měly být zdravé a bez zjevných malformací
- Použitý druh by měl být zvolen podle praktických kritérií, jako je jejich dostupnost po celý rok, snadný chov, vhodnost pro zkoušení, relativní citlivost k chemickým látkám a jakékoliv další významné ekonomické a biologické faktory.

| Doporučený druh | Doporučený rozsah T (°C) | Doporučená délka ryb (cm) |
|--|--------------------------|---------------------------|
| <i>Brachydanio rerio</i> , Danio pruhovaný | 20-24 | 3,0 ± 0,5 |
| <i>Onchorhynchus mykiss</i> , Pstruh duhový | 12-17 | 6,0 ± 2,0 |
| <i>Cyprinus carpio</i> , Kapr obecný | 20-24 | 6,0 ± 2,0 |
| <i>Poecilia reticulata</i> , Živorodka duhová | 20 - 24 | 3,0 ± 1,0 |



Testy akutní toxicity na rybách

Podmínky testu:

Teplota dle druhu ryb (danio $23\pm 2^{\circ}\text{C}$), osvětlení 12-16 hod 2 000 lux, 48 hod před testem přestat krmit, během testu bez krmení; bez aerace, délka expozice 96 h, min. 100 ml/jedince

Limitní test: kontrola a 100 mg/L, 3-5 ryb/koncentraci

Orientační test (předběžná zkouška): 3-5 ryb/500ml, několik koncentrací

- cíl: získat informace o rozsahu koncentrací pro hlavní zkoušku

Základní test (hlavní zkouška): 7-10 ks ve 3 litrech, 3 opakování, 5 - 10 koncentrací, které pokrývají faktor mortality 0 – 100 %

Uspořádání: koncentrace rozpuštěného kyslíku ne nižší než 60% hodnoty nasycení vzdušným kyslíkem

Nádrže: vhodný objem vzhledem k doporučené obsádce

statické, semistatické – obsádka max. 1 g na L

průtokový systém – možno vyšší obsádka

krom série zkoušek se provede kontrolní zkouška bez zkušební látky a podle potřeby kontrolní zkouška s pomocnou látkou



Akutní test

- Ryby se kontrolují po prvních 2 – 4 h a dále nejméně každých 24 h.
- Ryby se považují za mrtvé, jestliže při dotyku ocasní ploutve nedochází k žádné reakci a nejsou-li patrné žádné dýchací pohyby.
- Zaznamenávají se všechny zjevné abnormality.

Parametry sledované v průběhu testu

- pH, teplota, obsah rozpuštěného kyslíku O₂ - denně
- změny chování (aktivita, neklid, trhavé pohyby apod.)
- mortalita po 24, 48, 72 h
- Na konci testu - letalita – stanovení 96LC 50

Po ukončení testu jsou pokusné organismy usmrceny oxidem uhličitým dle zákona ČNR č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání.



Prolongované testy toxicity na rybách

OECD č. 204: **Prolongovaný test toxicity na rybách** – výsledkem je koncentrace, která vyvolá 50% úhyn ryb za dobu působení 14 dnů (14d LC50) a koncentrace, která nezpůsobuje poškození ryb (NOEC)

Expozice **14 dnů** (OECD-14 dnů, ISO 21 dnů)

Podle jiných norem - doba trvání testu 2 – 4 týdny

během testu krmeno

semistatická nebo průtočná expozice

Sledujeme: zrychlené dýchání, překrvení žaber, křečovitě pohyby, ztráta stability, neklid a zrychlené pohyby, úhyn (ihned odstranit z nádoby), pH, teplota, O₂

Na konci testu: stanovení 14 d LC₅₀, NOEC, LOEC



Test chronické toxicity na rybách

Druhy: *Poecilia reticulata* (paví očko), *Brachydanio rerio* (zebríčka pruhovaná), *Cyprinus carpio* (kapr obecný) a *Oncorhynchus mykiss* (pstruh duhový)

Testování se provádí podle směrnic (OECD; US EPA OPPTS 850.1500 -)

Testy chronické toxicity (doba trvání testu 7 -200 dní dle druhu ryb).

- nejčastěji pstruh duhový nebo kapr obecný (doba trvání testu 3 měsíce).
- dlouhodobé účinky testovaných látek a přípravků
- zahájení s vajíčky, embryi či juvenilny

Sledované parametry: chování ryb, příjem potravy, přežívání, délkové a hmotnostní přírůstky, hematologické a biochemické ukazatele, kumulace testované látky v rybách apod..

Náročné provedení

Vyšší vypovídací schopnost ve srovnání s testy akutní toxicity

Pro látky, u kterých se předpokládá cílená aplikace do vodního prostředí, nebo existuje potenciální nebezpečí, že jimi bude vodní prostředí kontaminováno.



Embryonální a embryolarvální testy toxicity na rybách

Cíl: Posoudit vliv testované látky na raná vývojová stadia ryb

Princip: Expozice oplodněných jiker v průtočném nebo semistatickém systému

ISO 12890:1999 Determination of toxicity by embryo-larval stage of freshwater fish
OECD č. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test

Embryolarvální test toxicity na rybách – výsledkem je stanovení nejnižší účinné koncentrace (LOEC) a koncentrace, která nezpůsobuje poškození ryb (NOEC)

OECD č. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages

Embryonální test na jikrách a plůdku – výsledkem je stanovení nejnižší účinné koncentrace (LOEC) a koncentrace, která nezpůsobuje poškození ryb (NOEC)

ZKOUŠKA KRÁTKODOBÉ TOXICITY NA RYBÍM EMBRYU A VÁČKOVÉM PLŮDKU – metoda C.15 podle NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008



OECD 212: **Embryonální test na jikrách a plůdku**

- danio 5-10 dní expozice, čistě **embryonální stadium**, nejsou krmeny
- 11 druhů, nejčastěji danio, pstruh, kapr, halančík

Expozice životní stádia ryb **od čerstvě oplodněných jiker do stádia váčkových plůdků** ve zkušebních nádržích

Embrya a váčkové plůdky jsou exponovány různým koncentracím testované látky (obvykle 5)

Ukončení testu těsně před tím než dojde k úplné absorpci žloutkového váčku v kontrole

OECD 210: **Embryolarvální test**

- test na **raných vývojových stádiích ryb** – danio 30 dní expozice
- nejčastěji kapr obecný a pak dalších 16 druhů
- krmení *Artemia salina*
- 100 ks na nádobu

Sledované parametry: vliv expozice na líhnivost a dobu líhnutí, přežívání embryí, vzhled váčkovitého plůdku, rozdíly v chování, pohyblivost, na konci testu velikost - délka a hmotnost (délokohmotnostní růst), anomálie ve vývinu, výskyt morfologických odchylek T, pH, O₂, koncentrace látky v testu

Posouzení letálních a subletálních účinků a jejich porovnání s kontrolními hodnotami s cílem určit LOEC a NOEC

Případně analýza za použití regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která způsobuje určitý procentuálně vyjádřený účinek tj. LC/EC_x

OECD 212 : Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages

Embryonální test na jikrách a plůdku

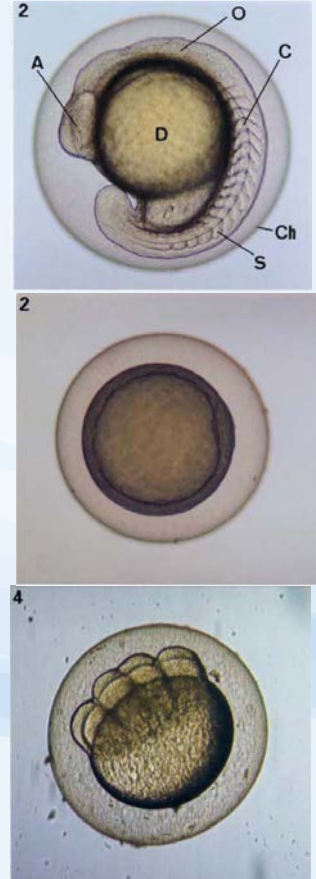
ZKŮŠEBNÍ PODMÍNKY, DÉLKA ZKOUŠKY A KRITÉRIA PŘEŽITÍ PRO DOPORUČENÉ DRUHY

| Druh | Teplota (°C) | Salinita (‰) | Fotoperioda (h) | Délka stádií (d) | | Typická délka zkoušky | Přežití v kontrolních skupinách (minimální hodnota v %) | |
|---|--------------------------|--------------|-----------------|------------------|----------------|--|---|--------------|
| | | | | Embryo | Váčkový plůdek | | Úspěšnost líhnutí | Po vylíhnutí |
| SLADKOVODNÍ | | | | | | | | |
| <i>Brachydanio rerio</i> Danio pruhované | 25 ± 1 | — | 12-16 | 3-5 | 8-10 | Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 5 dnů po vylíhnutí (8 - 10 dnů) | 80 | 90 |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> Pstruh duhový | 10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2) | — | 0(3) | 30-35 | 25-30 | Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 20 dnů po vylíhnutí (50 - 55 dnů) | 66 | 70 |
| <i>Cyprinus carpio</i> Kapr obecný | 21-25 | — | 12-16 | 5 | > 4 | Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (8 - 9 dnů) | 80 | 75 |
| <i>Oryzias latipes</i> Halančík japonský | 24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2) | — | 12-16 | 8-11 | 4-8 | Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 5 dnů po vylíhnutí (13 - 16 dnů) | 80 | 80 |
| <i>Pimephales promelas</i> Střevle | 25 ± 2 | — | 16 | 4-5 | 5 | Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (8 - 9 dnů) | 60 | 70 |

Rybí embryonální test toxicity

- Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (OECD 236)
- alternativa k testům na zvířatech - raná vývojová stadia nejsou považována dle platné legislativy za zvířata.
- předpokládá se, že embrya necítí bolest a celkový stres je nižší než u dospělých jedinců.
- Porovnatelné výsledky s testy na dospělých
- Variabilní a multifunkční test
- ISO 150 88, OECD 236

- 48 – 96 h, 26 °C, 14h světlo
- Dania se vytírají ihned po rozsvícení
- Jikry se odebírají 15 min po rozsvícení a následně exponují
- Účinky: letalita (LC50, NOEC, EC50), subletální efekty (teratogenita, deformace, vývoj očí, tepová frekvence)



Test celkové toxicity odtoku

Whole Effluent Toxicity (WET) Test - ISO 15088

- Směsi mají odlišné toxikologické vlastnosti nežli jednotlivé látky, často nevíme, co ve směsi je
- Monitorování jednotlivých polutantů nemůže zajistit bezpečné podmínky pro organismy žijící pod výtokem odpadních vod (US EPA)
- 92 % celosvětově testovaných ryb

- ČSN EN ISO 15088 (757762): Jakost vod - Stanovení akutní toxicity odpadních vod pro jikry dania pruhovaného (*Danio rerio*)
- akutní toxické účinky odpadní vody pro jikry během 48 h - embrya jsou exponována různě rozředěnou odpadní vodou
- norma použitelná i pro čištěné městské odpadní vody a průmyslové odpadní vody.
- připravena jako náhrada zkoušky akutní toxicity pro ryby - alternativa pro test na dospělých
- pro odpadní vody poskytuje stejné nebo podobné výsledky jako zkouška akutní toxicity pro ryby
- aplikován a uzákoněn v Německu



Test ovlivnění růstu na nedospělých rybách

OECD č. 215 Fish juvenile growth test (2000)

C.14. RŮSTOVÁ ZKOUŠKA NA NEDOSPĚLÝCH RYBÁCH – metoda C.14 podle NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008

Cíl: posouzení účinků dlouhodobé expozice chemickými látkami na růst nedospělých ryb

Druhy: doporučován nedospělý pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), možno i *Brachydanio rerio* (danio pruhovaný), *Oryzias latipes* (halančík japonský)

Průtočné nebo semistatické uspořádání

28 dní expozice

- vystavení nedospělých ryb v exponenciální fázi růstu po zvážení řadě subletálních koncentrací za průtokových podmínek nebo vhodných semistatických podmínek
- denní přísun potravy v množství daném počáteční hmotností ryb
- na konci testu se ryby opět zvaží

Sledované parametry: přírůstek ryb v jednotlivých nádržích

T, pH, O₂, koncentrace látky v testu

Výsledek: LOEC, NOEC,
EC_X = koncentrace, která vyvolá X% změnu růstu



Metoda pro stanovení bioakumulace – průtoková zkouška na rybách

- OECD č. 305: Bioaccumulation flow-through fish test (OECD 1996b)
- C.13. BIOAKUMULACE: PRŮTOKOVÁ ZKOUŠKA NA RYBÁCH - metoda C.13 podle NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008

Dvě fáze:

- Fáze příjmu - 28 dní (až 60 dnů k dosažení rovnovážného stavu)
- Fáze vylučování
- Počet ryb - pro každý odběr 4 ryby (min. 5 odběrů během příjmu, 4 odběry během vylučování)
- Bioakumulační faktor BCF = rychlost příjmu/rychlost vylučování = koncentrace testované látky v rybách/koncentrace látky v okolním mediu

$$BCF = k_u/k_d = C_f/C_w$$

- vztažen k celkové hmotnosti a k obsahu tuku
- Validita: mortalita menší než 10%

Testy endokrinní disrupce na rybách



Testy toxicity na rybách

VALIDITA

Má-li být zkouška platná a výsledky považovány za platné-správné, musí být splněna následující kritéria:

- Koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesla pod 60% nasycení po celou dobu zkoušky
- Koncentrace testované látky neklesla pod 80%
- Mortalita kontrolního vzorku nepřesáhla 10%
- Teplota byla po celou dobu testu v rozmezí stanoveném pro daný druh ryb, nesmí se mezi zkušebními nádržemi nebo den ode dne lišit o víc než $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$
- Zjištěná koncentrace LC 50 je v souladu se standardy
- celková míra přežití oplodněných jiker v kontrolních skupinách musí být vyšší nebo rovna stanoveným limitům pro testovaný druh
- test růstu: dostatečný nárůst střední hodnoty hmotnosti ryb v kontrolní skupině (u pstruha duhového alespoň o 50%)



Testy toxicity na rybách

Protokol má obsahovat:

- Údaje o látce – vlastnosti
- Údaje o organismech – druh, kmen, velikost, stáří, dodavatel, ošetření
- Testovací postup – aerace, pH, T, objem, rybí obsádka, koncentrace, počet ryb na koncentraci, počet opakování
- Koncentrace rozpuštěného kyslíku, hodnoty pH, teplota zkušebních roztoků každých 24 h
- Zdroj ředící vody a hlavní chemické charakteristiky (pH,...)
- Koncentrace všech pomocných látek
- Jestliže byly provedeny chemické analýzy, údaje o použitých metodách a získané výsledky
- Popis zkušebního zařízení
- Vyhodnocení – výsledky, zhodnocení všech sledovaných parametrů
- Grafy křivky závislosti účinku, vyjádřeného v procentech, na koncentraci na konci zkoušky
- Podle možnosti hodnoty LC_{50} a konfidenční intervaly při každé z doporučených dob pozorování
- NOEC - Nejvyšší zkušební koncentrace, která nevyvolala za dobu zkoušky úhyn ryb
- LOEC - Nejnižší zkušební koncentrace, která vyvolala za dobu zkoušky 100% mortalitu

