

CITLIVOST EMBRYÍ *DANIO RERIO* NA ZNEČIŠTĚNÍ ODPADNÍCH VOD Z NEMOCNIC

**Alena Vlková, Martina Wittlerová, Gabriela Jírová,
Magdalena Zimová, Zdeňka Wittlingerová**





- **Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test** byl v r. 2013 přijat OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) jako **alternativní toxikologická metoda** nahrazující experimenty s dospělými rybami
- jako testovací organismy jsou používána embrya ryb *Danio rerio*

Cíle studie

- srovnání citlivosti **embryí *D.rerio*** (a tím i FET testu) na znečištění nemocničních odpadních vod s ***Daphnia magna*** a ***Aliivibrio fischeri*** (organismy běžně používané pro analýzy odp.vod a doporučené normou ČSN 75 6406 Nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení vypouštěnými do stokové sítě pro veřejnou potřebu, r. 2020)
- srovnání dvou expozičních časů: **96 h** (FET test) a **48 h** (ČSN EN ISO 15088 Stanovení akutní toxicity odp. vod pro jikry dania pruhovaného, r. 2009)
- srovnání FET testu a modifikovaného FET testu s rozšířením o hodnocení **subletálních efektů** na vývoj embryí

Vzorkování

- vzorky byly odebrány ze 7 českých nemocnic
- odběr byl proveden po čištění na výstupu z ČOV
- z každé nemocnice byl odebrán 1 prostý vzorek
- v laboratoři byly vzorky zmrazeny na $< -18^{\circ}\text{C}$



Základní charakteristiky nemocnic a jejich ČOV

Označení nemocnice	Počet lůžek	Proces čištění na ČOV	Denní produkce odpadní vody [m ³ . d ⁻¹]	Proces desinfekce
H1	476	Mechanicko-biologické	10	Cl ₂
H2	1006	Mechanicko-biologické	50	NaClO
H3	2199	Mechanicko-biologické	50-100	NaClO
H4	500	Mechanicko-biologické	30-50	Cl ₂
H5	423	Mechanicko-biologické	40	Bez chlorace
H6	1447	Mechanicko-biologické	360	Cl ₂
H7	1600	Mechanicko-biologické	100-120	NaClO

Strategie testování

1. byly testovány neřaděné vzorky H1-H7
2. výsledky byly vyhodnoceny jako **toxický efekt** v %
3. u vzorků, jejichž toxický efekt přesáhl 50 % byla testována koncentrační řada vzorku
4. výsledky byly vyhodnoceny jako **EC₅₀ nebo LC₅₀**
(koncentrace vzorku, která má negativní účinek na 50 % testovaných organismů)
5. všechny testy byly provedeny 2x a průměr byl uveden jako výsledek

Metody

FET test (OECD TG 236, r. 2013)

- testovací organismus: embrya ryb *D.rerio*
- pro produkci jiker bylo použito *D.rerio* divokého typu, linie AB z vlastního akreditovaného chovu
- chov ryb v chovném systému ZebTEC Stand-Alone (Tecniplast) s kontinuálním monitorováním a úpravou základních parametrů vody (teplota, pH, konduktivita)



Výtěr

- jedinci ve stáří 6-18 měsíců
- ve skupinách po 5-11 rybách
- v porodničkách o objemu 2 litry s perforovaným dnem

Inkubace jiker

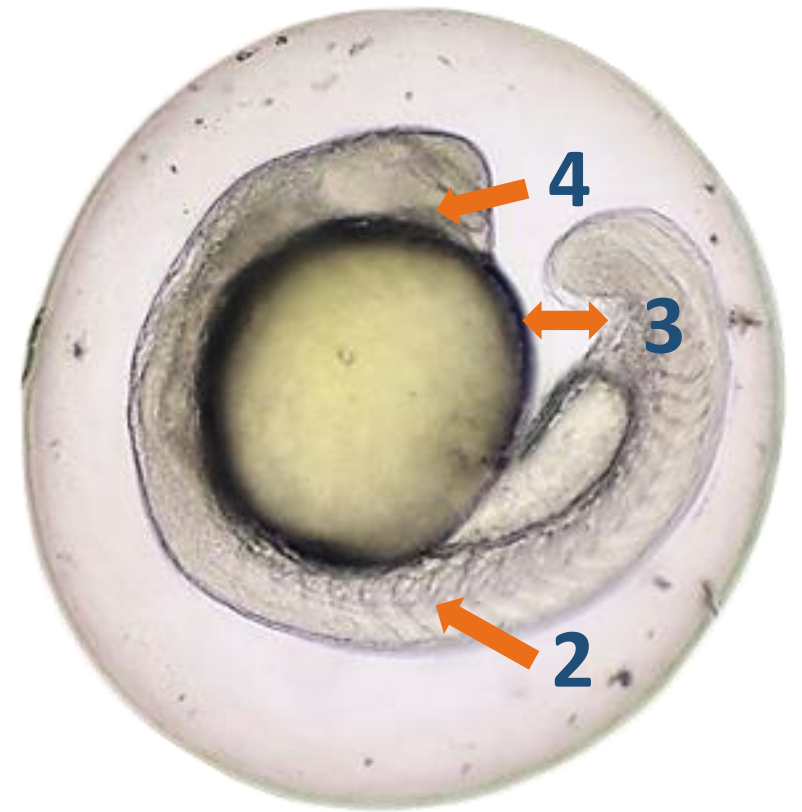
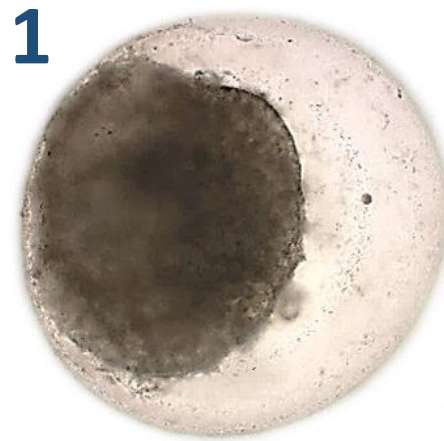
- ve 24jamkových mikrodestičkách,
- v každé jamce 2 ml vzorku a 1 jikra
- inkubace při $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ po dobu 96 hpf (hodiny po oplodnění)
- fotoperioda 16 h
- 5 koncentrací, v každé koncentraci vzorku inkubováno 20 jiker



Pozorování vývoje embryí

- každých 24 h byly sledovány **4 hlavní letální parametry:**

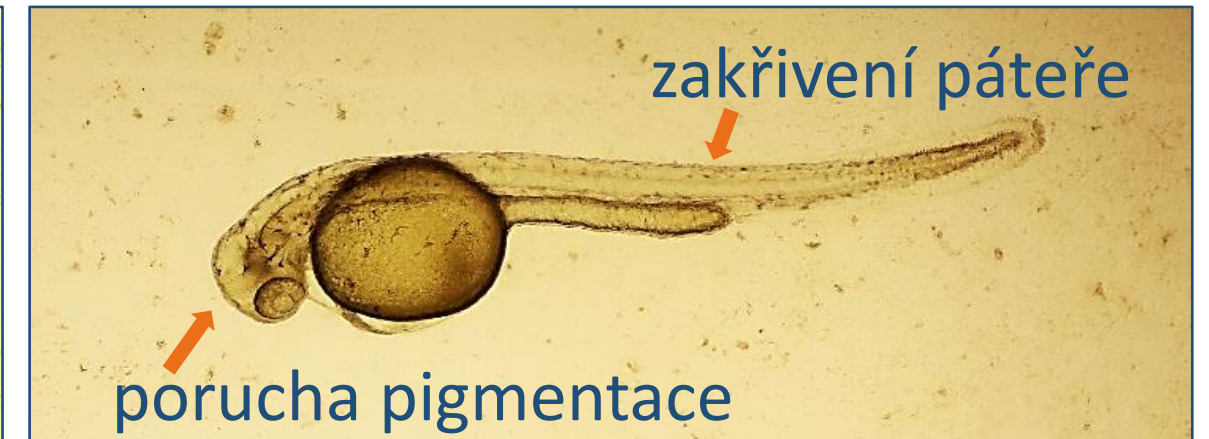
1. koagulace embrya
2. nepřítomnost tvorby somitů
(bloky mezodermu umístěné po stranách neurální trubice)
3. neoddělení ocasu
4. nepřítomnost srdečního tepu (po 48 hpf)



- **výskyt jakéhokoliv z těchto znaků znamená mrtvé embryo**

- pokud nebyly přítomny letální parametry, byla každých 24 h sledována přítomnost **5 subletálních parametrů**:
 1. zpomalený srdeční tep
 2. nedostatečný krevní oběh
 3. perikardiální edém a (nebo) edém žloutkového vaku
 4. zakřivení páteře (skolióza)
 5. porucha pigmentace
- embryo byla pozorována v destičkách pomocí invertovaného mikroskopu Olympus CKX53 s digitálním fotoaparátem Canon EOS 2000D

Příklady subletálních efektů/po 96 hpf



- pro stanovení srdeční frekvence byla embryo zaznamenána na video a při zpomalení videa byl změřen **srdeční tep**

normální srdeční tep 48 hpf *zpomalený srdeční tep*



Vyhodnocení FET testu

- mortalita embryí byla spočítána po 48 hpf (FET 48 h) a po 96 hpf (FET 96 h) na základě vyhodnocení 4 hlavních letálních parametrů
- mortalita embryí + přidání subletálních účinků bylo vyhodnoceno po 96 hpf (FET 96 h+sub)
- výsledky byly vyjádřeny jako % mortality (toxický efekt) nebo jako LC_{50}

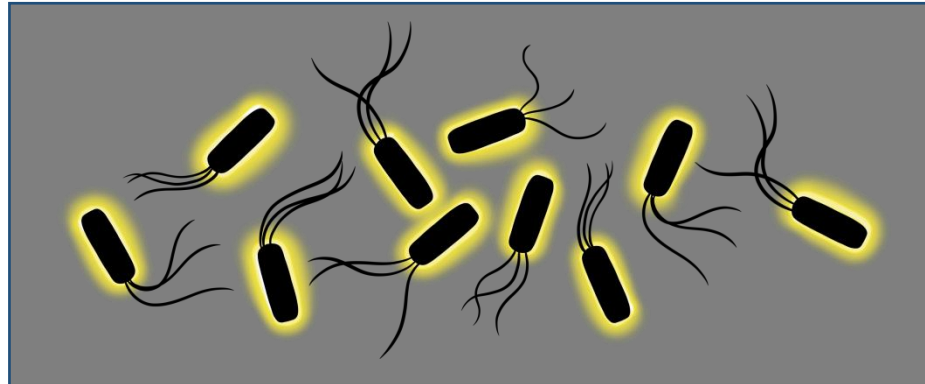
Test inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* (ISO 6341, r. 2012)

- testovací organismus: novorozenci *D.magna* mladší než 24 h
- z vlastního laboratorního chovu
- byly vystaveny 5 koncentracím vzorku
- v každé koncentraci 20 dafnií
- inkubace při $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ po dobu 48 h, fotoperioda 16 h, bez krmení
- na konci testu spočítání imobilizovaní jedinci (dafnie, které nejsou schopné plavat do 15 s po promíchání vzorku)
- výsledky vyjádřeny jako % imobilizace (toxický efekt) nebo jako EC_{50}



Test inhibice luminiscence *Aliivibrio fischeri* (ISO 11348-2, r. 2007)

- zkušební organismus: sušené luminiscenční bakterie *A.fischeri* NRRL-B-11177 (f. HACH LANGE)
- bylo testováno 10 koncentrací v replikátech
- inkubace suspenze bakterií + vzorku při $15\pm 1^{\circ}\text{C}$
- luminiscence měřena po 15 a 30 min pomocí luminometru Sirius (Berthold Detection Systems)
- výsledky vyjádřeny jako % inhibice luminiscence (toxický efekt) nebo jako EC_{50}



Použité metody a jejich charakteristiky

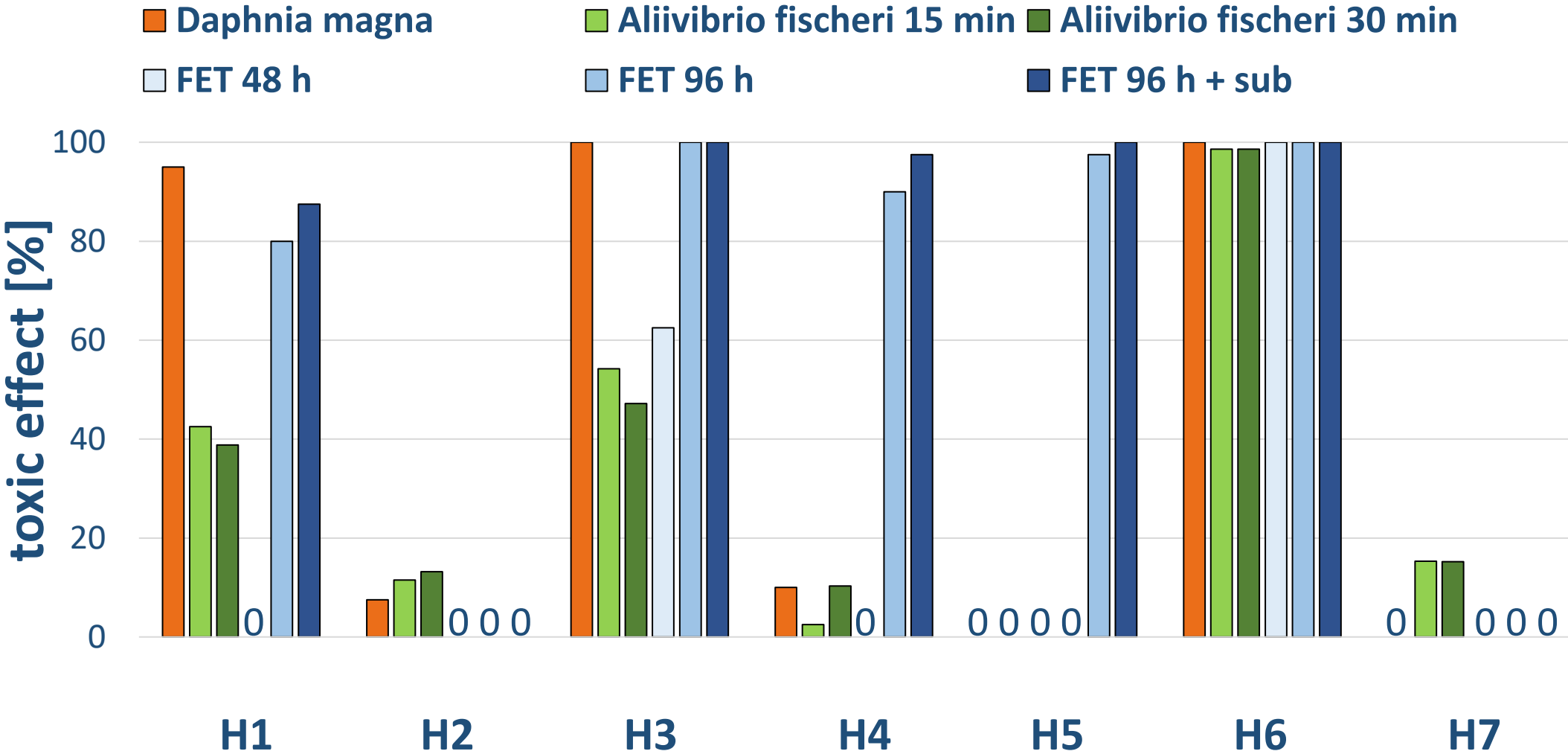
Označení metody	Testovací organismus	Norma	Čas expozice	Sledovaný parametr
Dm	<i>Daphnia magna</i>	ISO 6341	48 h	Imobilizace, EC ₅₀
Af 15 min	<i>Aliivibrio fischeri</i>	ISO 11348-2	15 min	Inhibice luminiscence, EC ₅₀
Af 30 min	<i>Aliivibrio fischeri</i>	ISO 11348-2	30 min	Inhibice luminiscence, EC ₅₀
FET 96 h	<i>Danio rerio (embryo)</i>	OECD TG 236	96 h	Mortalita, LC ₅₀
FET 48 h	<i>Danio rerio (embryo)</i>	OECD TG 236 modifikace	48 h	Mortalita, LC ₅₀
FET 96 h+sub	<i>Danio rerio (embryo)</i>	OECD TG 236 modifikace	96 h	Mortalita + subletální efekty, LC ₅₀

Výsledky

Srovnání citlivosti metod na základě hodnot toxického efektu

- vzorky H1, H3 až H6: metody FET 96 h a FET 96 h+sub byly vysoce citlivé – toxický efekt 62,5 % - 100 %, u ostatních metod toxický efekt více variabilní: 0 % - 100 %
- vzorky H2, H7: toxicita nízká nebo nulová pro všechny metody

Ekotoxicita vyjádřená jako toxický efekt [%]

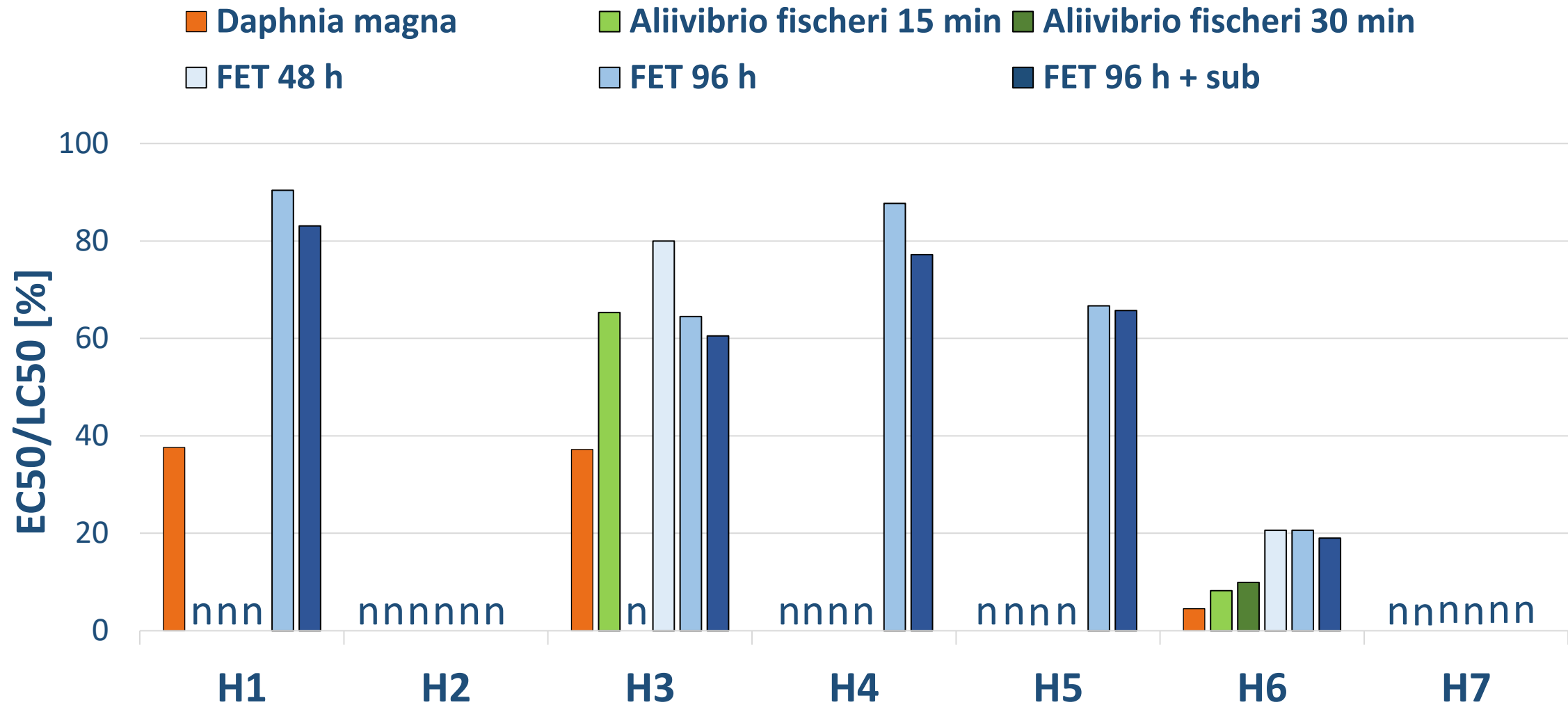


Srovnání citlivosti metod na základě hodnot EC_{50} , LC_{50}

- byly testovány pouze vzorky a organismy, u nichž hodnoty toxického efektu přesáhly 50 %
- vzorky H1, H3, H6: vyhodnoceny jako nejtoxičtější vzorky, nejcitlivější organismus byla *D.magna* ($EC_{50} = 4,5 \% - 37,6 \%$)
- vzorky H1, H3 - snižování citlivosti metod v pořadí:
D.magna > FET 96 h+sub > FET 96 h > *A.fischeri* 15 min > FET 48 h
- vzorky H6 - snižování citlivosti metod v pořadí:
D.magna > *A.fischeri* 15 min > *A.fischeri* 30 min > FET testy

Ekotoxicita vyjádřená jako EC₅₀, LC₅₀

n = nebylo stanoveno



Srovnání citlivosti metod v rámci FET testů

- po vyhodnocení všech výsledků zjištěna klesající citlivost takto:

FET 96 h+sub > FET 96 h > FET 48 h

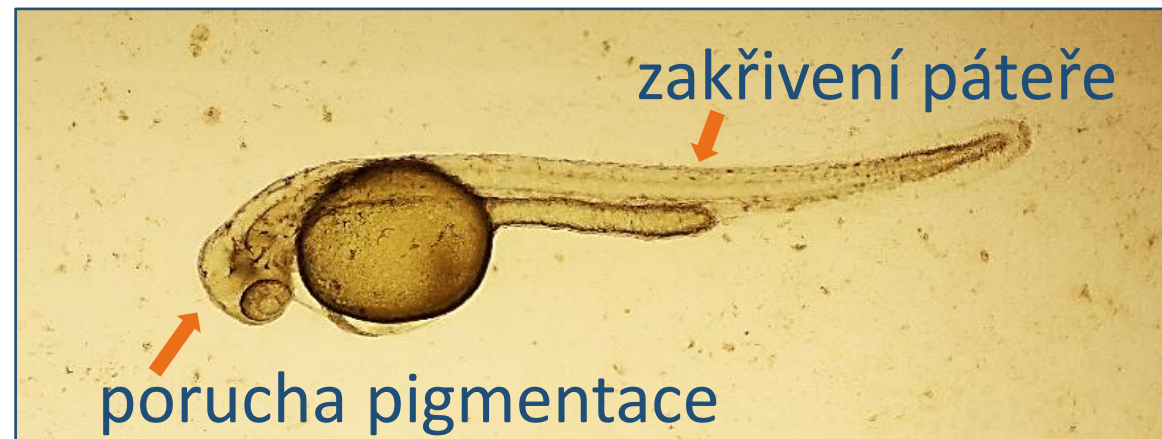


Subletální parametry

- přítomnost subletálních účinků se lišila u jednotlivých vzorků a zároveň byla závislá na době expozice embryí

Subletální efekty	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
48 hpf / 96 hpf							
zpomalený srdeční tep	- / +	- / -	+ / +	- / +	- / +	+ / +	- / -
nedostatečný krevní oběh	- / +	- / -	+ / +	- / +	- / +	+ / +	- / -
přítomnost edému	- / +	- / -	+ / +	- / +	- / +	- / -	- / -
zakřivení páteře	- / +	- / -	+ / +	- / +	- / +	- / +	- / -
porucha pigmentace	- / +	- / -	+ / +	- / +	- / +	+ / +	- / -

Příklady subletálních efektů



Frekvence výskytu subletálních parametrů:

- zakřivení páteře: 34,5 %
- nedostatečný krevní oběh: 26,4 %
- zpomalený srdeční tep: 25,7 %
- porucha pigmentace: 12,7 %
- výskyt edému: 0,7 %

Závěry

- výsledky studie prokázaly **vysoce variabilní hodnoty akutní toxicity** čištěných nemocničních odpadních vod
- **prodloužená doba inkubace** embryí ze 48 hpf na 96 hpf významně **zvýšila citlivost FET testu** u 57 % testovaných vzorků
- **zahrnutí** vybraných **subletálních parametrů** do závěrečného vyhodnocení FET testu způsobilo **zvýšení jeho účinnosti** o 1–12 %
- na základě porovnání tří organismů lze konstatovat, že **citlivost embryí *D.rerio* je srovnatelná** nebo v některých případech vyšší než citlivost *D.magna* a *A.fischeri*
- **FET test lze považovat za vhodnou a dostatečně účinnou metodu pro rutinní testování ekotoxicity nemocničních odpadních vod**



Děkuji Vám za pozornost
alena.vlkova@szu.cz



EUROPEAN UNION
European Structural and Investment Funds
Operational Programme Research,
Development and Education



Tato práce vznikla za podpory projektu „Mezinárodní konkurenceschopnost SZÚ ve výzkumu, vývoji a vzdělávání v alternativních toxikologických metodách“, reg.č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000860, financovaného z EFRR/ESF.

Srovnání embryonálního vývoje

Developmental Stage	Human (Day)	Rat (Day)	Zebrafish (Hour)
Blastula/Blastocyst	4–6	3–5	2–5
Implantation	8–10	6	n/a
Neural Plate Formation	17–19	9.5	10
First Somite	19–21	9–10	10–11
10 Somite Stage	22–23	10–11	14
Neural Tube Formation	22–30	9–12	18–19
First Pharyngeal Arch	22–23	10	24
Initiation of Organogenesis	21	5	10
First Heartbeat	22	10.2	24
Birth/Hatching	253	21	48–72

Teratogeneze

- FETAX