

Ekotoksykologia

Testy ekotoksykologiczne

Plastyczność genotypowa

Ekotoksykologia zespołów

Prof. dr hab. Ryszard Laskowski
Instytut Nauk o Środowisku UJ
Ul. Gronostajowa 7, Kraków
pok. 2.1.2

<http://www.eko.uj.edu.pl/laskowski>

Testy ekotoksykologiczne – „bioeseje”

- ...przeprowadzane przy założeniu, że organizm testowy reprezentuje reakcje szerokiego spektrum organizmów.
- Kryteria przydatności do testów:
 1. wynik testu musi mówić coś na temat ryzyka ekologicznego
 2. możliwość ekstrapolacji wyników na inne organizmy i całe ekosystemy
 3. wystarczająca wrażliwość na skażenia
 4. satysfakcjonująca precyzja
 5. prostota i możliwość standaryzacji
 6. powtarzalność wyników

Rodzaje testów ekotoksykologicznych

- **Ostre:** czas ekspozycji na tyle krótki, aby nie odżywiane organizmy nie wykazywały objawów chorobowych.
- **Subchroniczne:** dłuższe niż ostre, ale nie przekraczające 1/3 okresu przedreprodukcyjnego.
- **Chroniczne:** dłuższe niż subchroniczne (często wymaga się, aby test chroniczny obejmował przynajmniej cały okres przedreprodukcyjny i część okresu reprodukcyjnego; lepiej – dłużej niż całe życie osobnika).

Testy mikrobiologiczne: zalety i przykłady

- Zalety: znaczenie funkcjonalne, łatwość hodowli, szybkość odpowiedzi
- Przykłady:
 - tempo wzrostu (biomasa lub liczba komórek)
 - aktywność enzymatyczna (np. reduktaza azotanowa, ATPaza, dehydrogenazy)
 - stężenie ATP (niezadowalająca czułość!)
 - **luminescencja – test Microtox: *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*)**
 - **respiracja i mikrokalorymetria**

Microtox

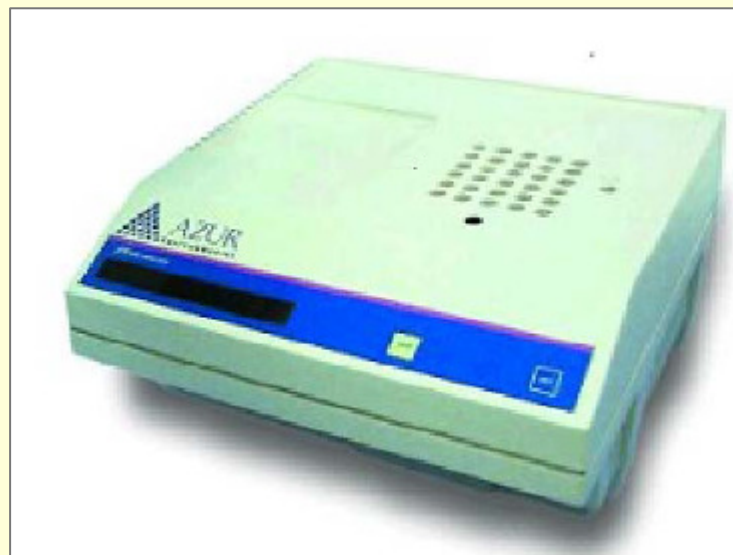
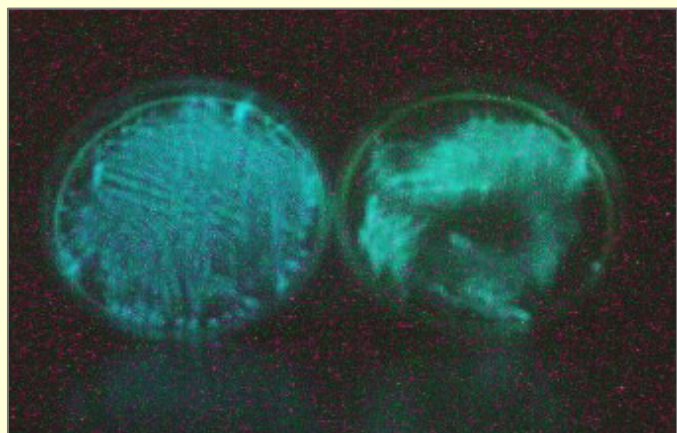
Wykorzystuje bakterie *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177)



Test ostry (45 min) i chroniczny (22 h)

Pomiar spadku luminescencji (EC_{50} , IC_{50})

Spełnia liczne normy, w tym ISO i EPA



Testy na roślinach

- Glony: standardowy test US EPA – AAP (*Algal Assay Procedure Bottle test*) → test ostry (dni)
 - *Selenastrum*, *Chlorella*, *Anabaena*, *Microcystis*
- Rzęsa wodna (*Lemna* sp.) → test ostry (4-7 dni); możliwy też chroniczny
- Rośliny lądowe → testy subchroniczne (>10 dni)
 - kiełkowanie nasion (trawa – *Lolium* sp., zboża, sałata, kapusta chińska, rzepa i inne.)
 - wzrost korzenia (różne gatunki, j.w.)
 - cykl życiowy (*Arabidopsis* sp., *Brassica* sp.)
 - fotosynteza (i respiracja)

ALGALTOXKIT F

Wykorzystuje glony *Selenastrum capricornutum*

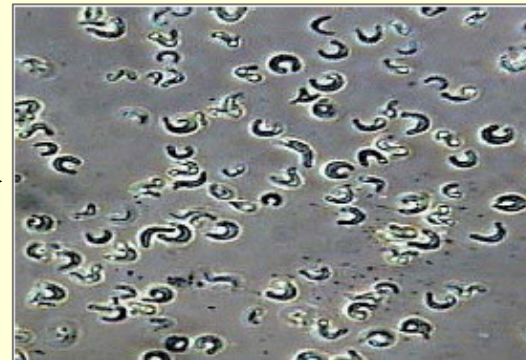
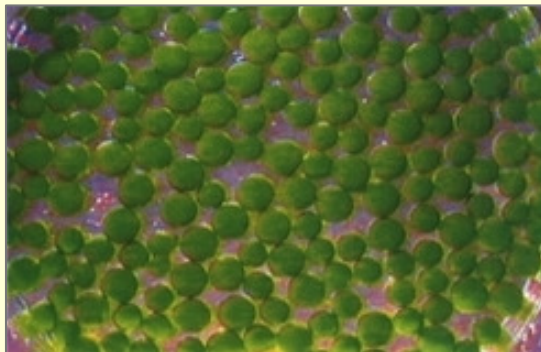


Komercyjne zestawy zawierające *Selenastrum capricornutum* zawarte w podłożu (każda kulka glonów zawiera ok. 1 mln komórek)

72-godzinny test:

- oznaczenie tempa wzrostu populacji przez pomiar gęstości optycznej (EC_{50})

- zgodny z zaleceniami OECD 201, łatwa adaptacja do norm ISO czy US-EPA



Morski ALGALTOXKIT F

Wykorzystuje okrzemki *Phaeodactylum tricornutum*

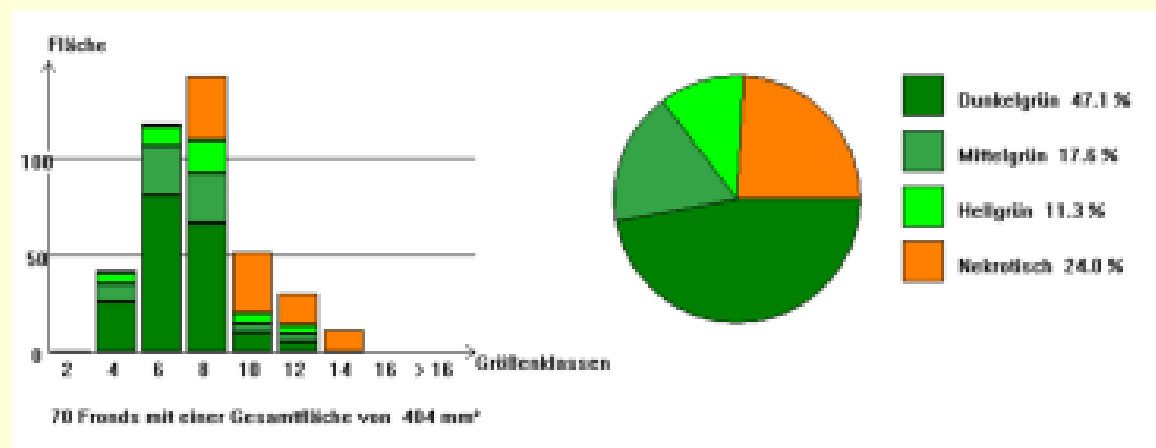
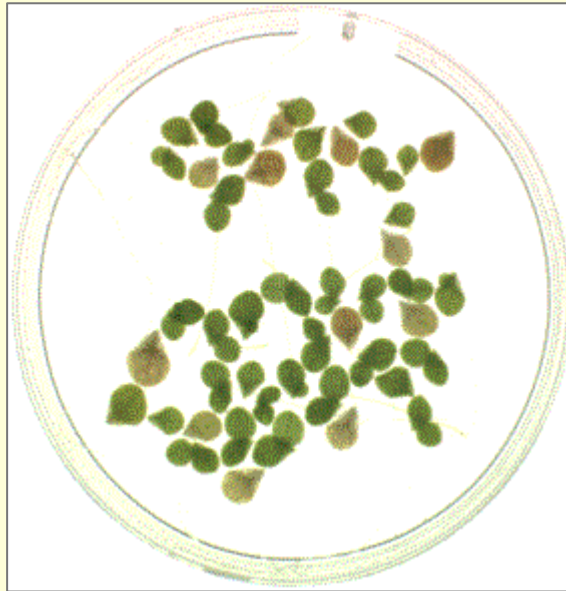


Komercyjne zestawy zawierające *Phaeodactylum tricornutum*

72-godzinny test:

- oznaczenie tempa wzrostu populacji przez pomiar gęstości optycznej (EC₅₀)
- zgodny z zaleceniami ISO

Test na *Lemna* sp. (**LemnaTec**)



PHYTOTOXKIT

Wykorzystuje sorgo (*Sorghum saccharatum*), rzeżuchę (*Lepidium sativum*) i gorczycę (*Sinapis alba*)



Komercyjne zestawy zawierające nasiona ww. roślin

3-dniowy test:

- oznaczenie skuteczności kiełkowania i tempa wzrostu korzenia i pędu (EC_{50})
- zgodny z zaleceniami ISO



Testy na zwierzętach wodnych

- słończek (*Artemia salina*) i kilka gat. rotifera – standardowe, komercyjne testy (ToxKit) → test ostry
- rozwielitki (*Daphnia* sp.)
 - test ostry (OECD – 24 h; EPA – 48 h)
 - test chroniczny – reprodukcja (21 dni)
- małże i ślimaki → testy ostre i chroniczne
- ryby → testy ostre (4 – 7 d.) i chroniczne (30 - >250 d., zależnie od gatunku)

ARTOXKIT M

Wykorzystuje morskie skorupiaki *Artemia salina*



Komercyjne zestawy zawierające jaja przetrwalne (cysty) *Artemia salina*,
24-godzinny test:

- oznaczenie śmiertelności (LC_{50})
- stosowany w wielu krajach jako standardowy test do badań nad zanieczyszczeniem wód słonych

CERIODAPHTOXKIT F

Wykorzystuje skorupiaki *Ceriodaphnia dubia*



Komercyjne zestawy zawierające jaja przetrwalne (cysty)
Ceriodaphnia dubia

24-godzinny test:

- oznaczenie śmiertelności (LC_{50})
- zgodny z normą US-EPA

DAPHTOXKIT F

Wykorzystuje skorupiaki *Daphnia magna* i *D. pulex*



Komercyjne zestawy zawierające jaja przetrwalne (cysty)
Daphnia magna lub *Daphnia pulex*

48-godzinny test:

- oznaczenie immobilizacji (EC_{50}) i śmiertelności (LC_{50})
- zgodny z zaleceniami OECD i ISO

Testy na zwierzętach lądowych

- Bezkręgowce → testy ostre i chroniczne:
 - zwierzęta glebowe i epigeiczne: dżdżownice (*Eisenia foetida*), ślimaki (*Helix aspersa*) roztocze, skoczogonki (*Folsomia candida*)
 - bezkręgowce drapieżne („pożyteczne”): biegaczowate, biedronki, kusakowate, pluskwiaki, pająki
 - parazytoidy („pożyteczne”): błonkówki, np. Aphidiidae, Ichneumonidae i inne
 - inne „pożyteczne”: pszczoła miodna (*Apis mellifera*)
- ptaki: przepiórka, kaczka krzyżówka
- gryzonie: mysz, szczur

Test na *Helix aspersa*



Cliché IRH Environnement

A. De Vaufleury, M. Coeurdassier, P. Pandard, Université de Franche Comté, France

Helix aspersa w wieku 3 do 5 tygodni

Masa 1 ± 0.3 g

Średnica muszli 15.5 ± 1 mm

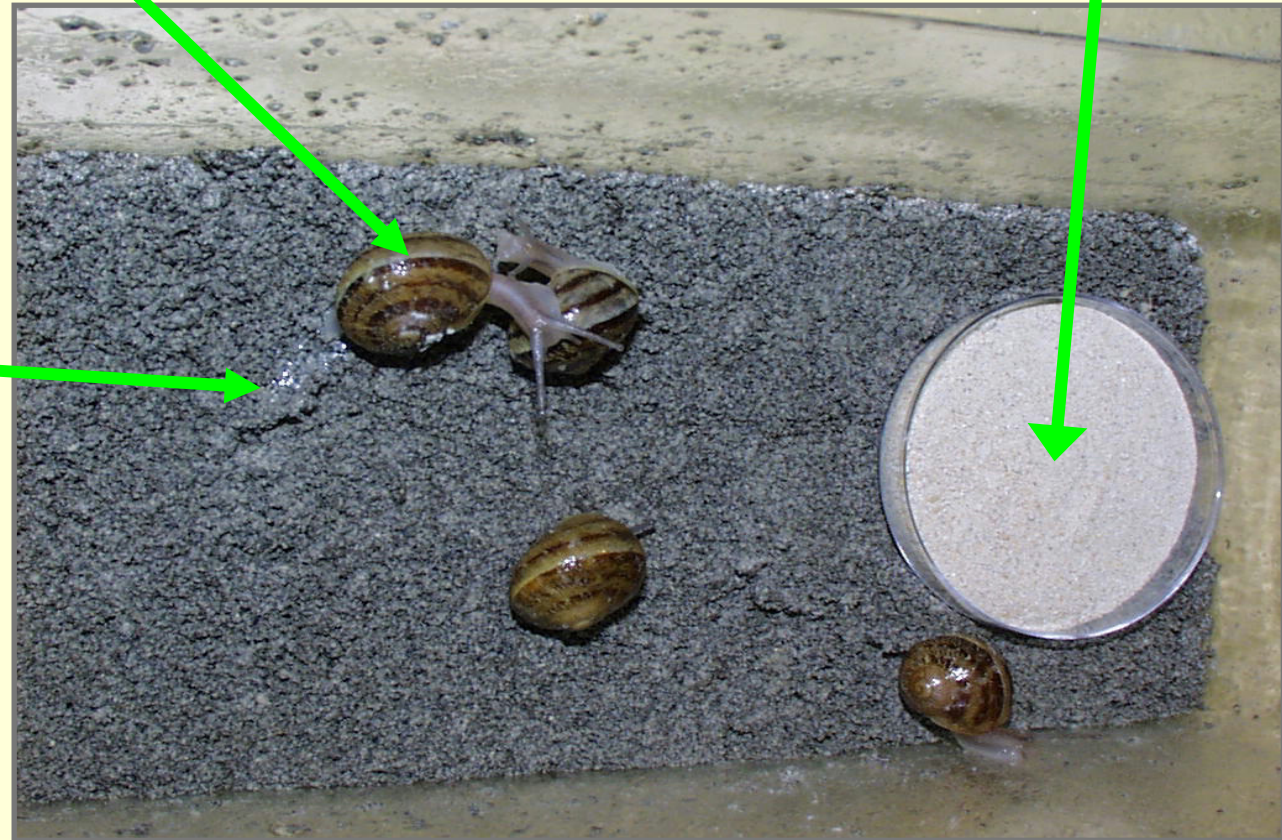
Standardowa
pożywka

Substrat:

Sztuczna gleba

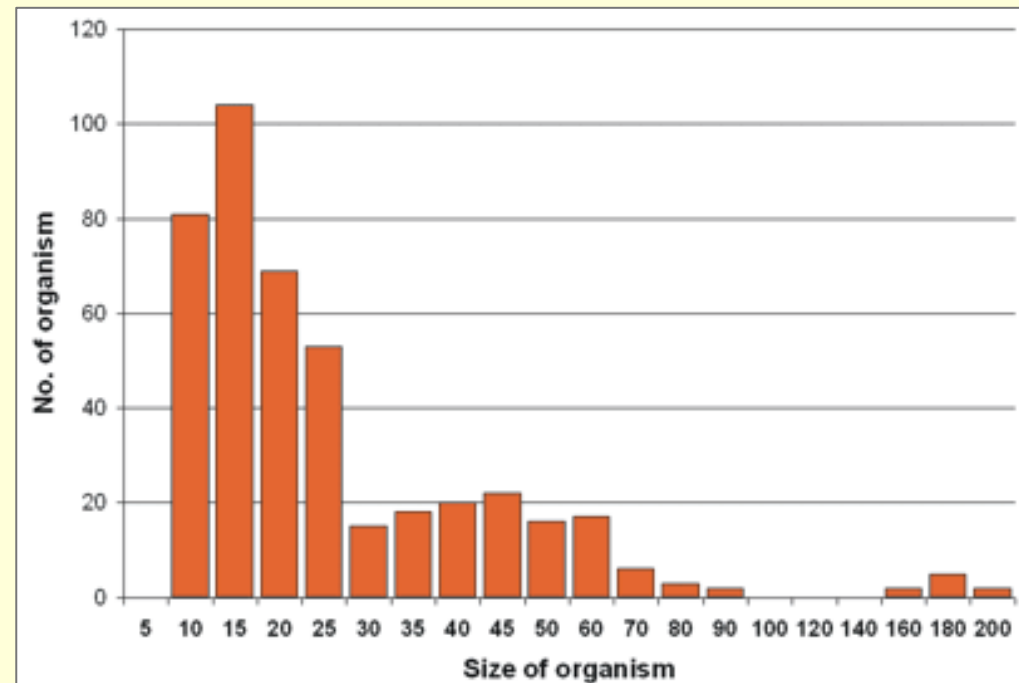
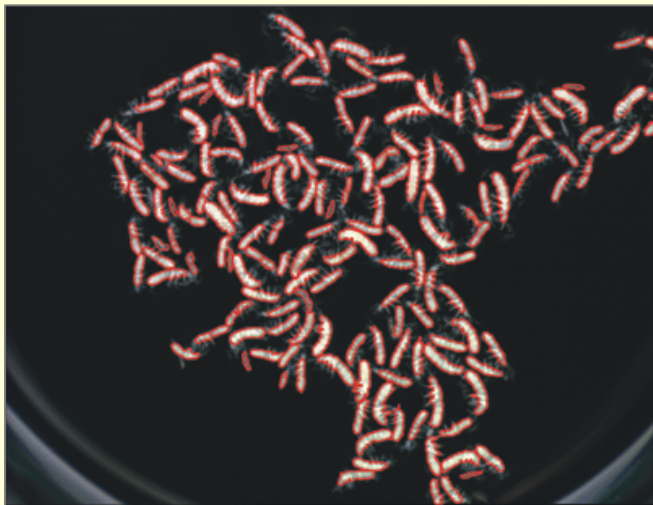
ISO, ok. 50%

WHC



20 ± 2 °C, fotoperiod 18 h L / 6 h D

Test na *Folsomia candida*



Inne gatunki bezkręgowców lądowych używane w testach ekotoksykologicznych



Enchytreus sp.

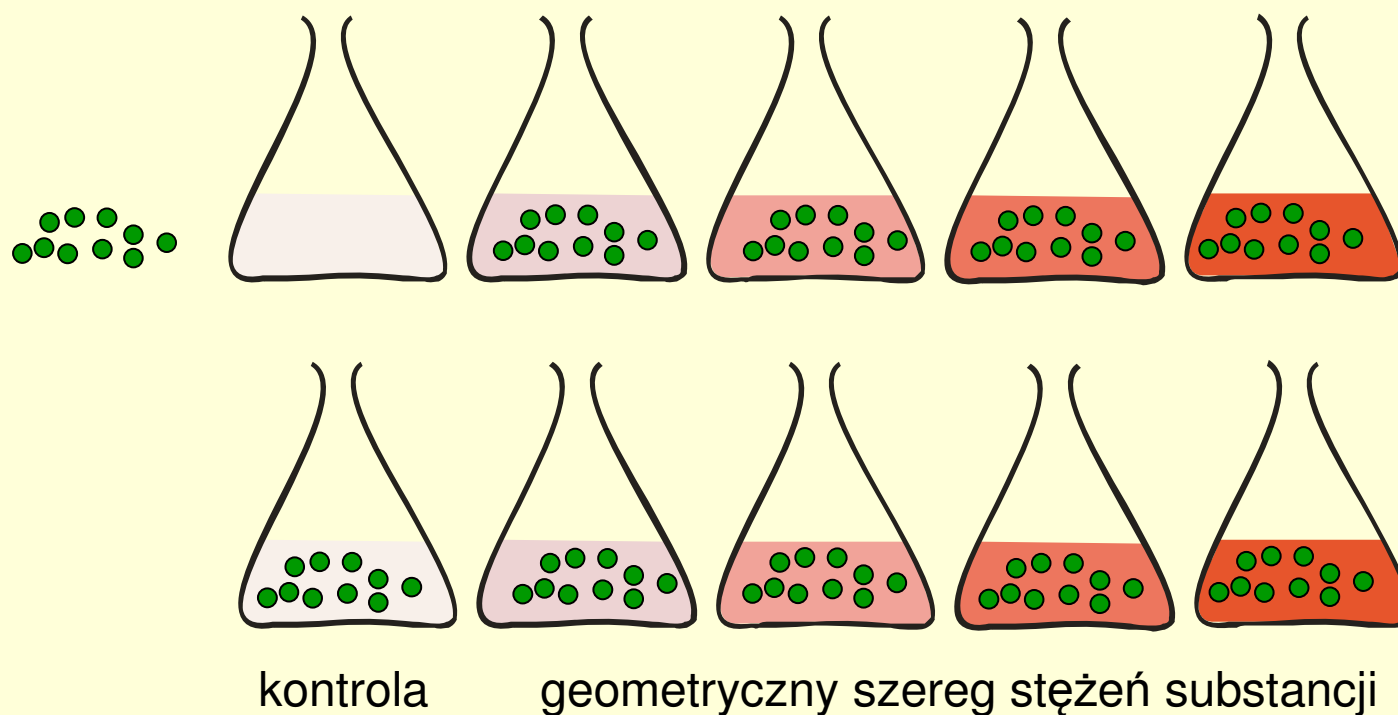


Eisenia foetida andrei



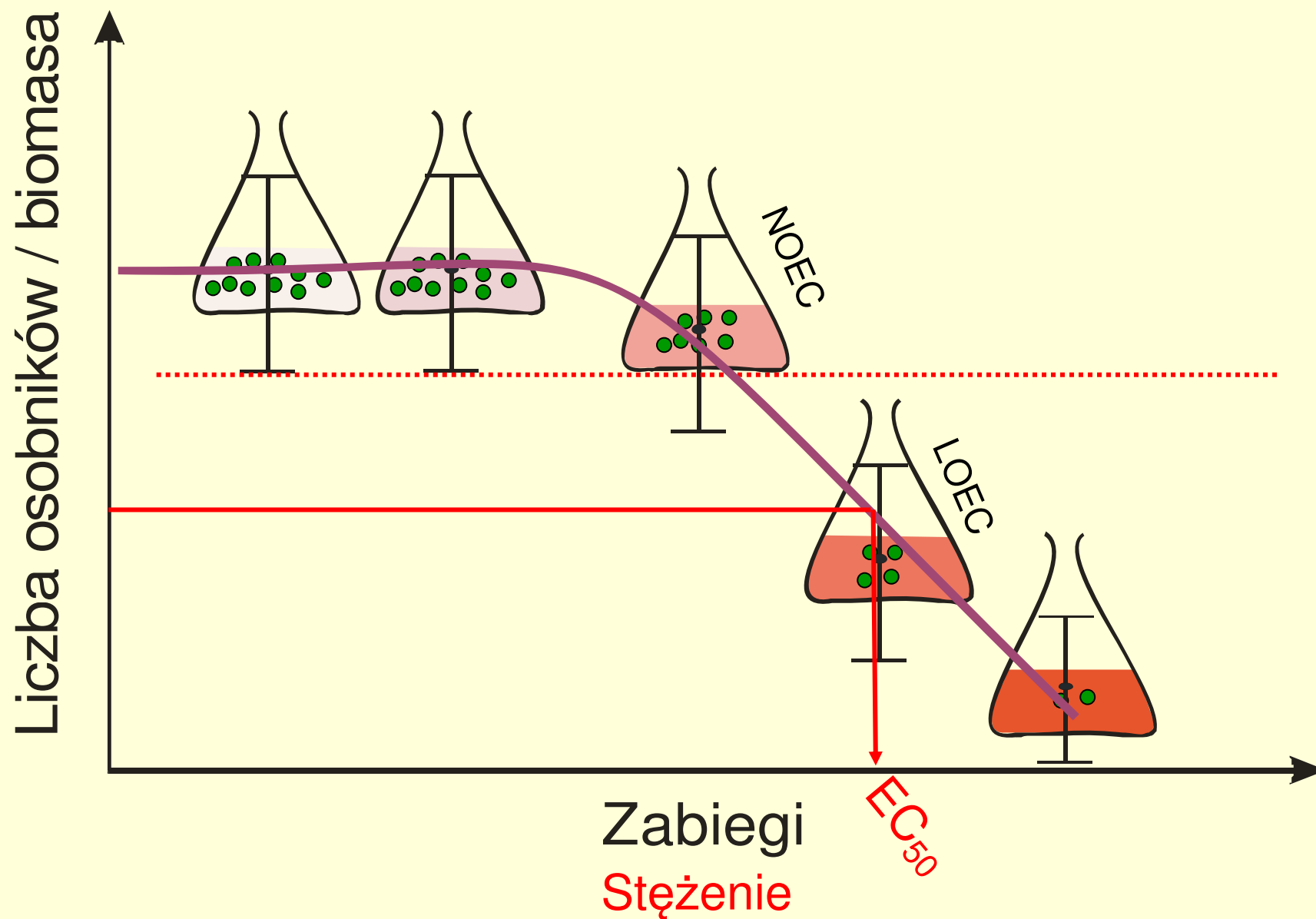
Pterostichus oblongopunctatus
(Carabidae)

Wykonanie testu



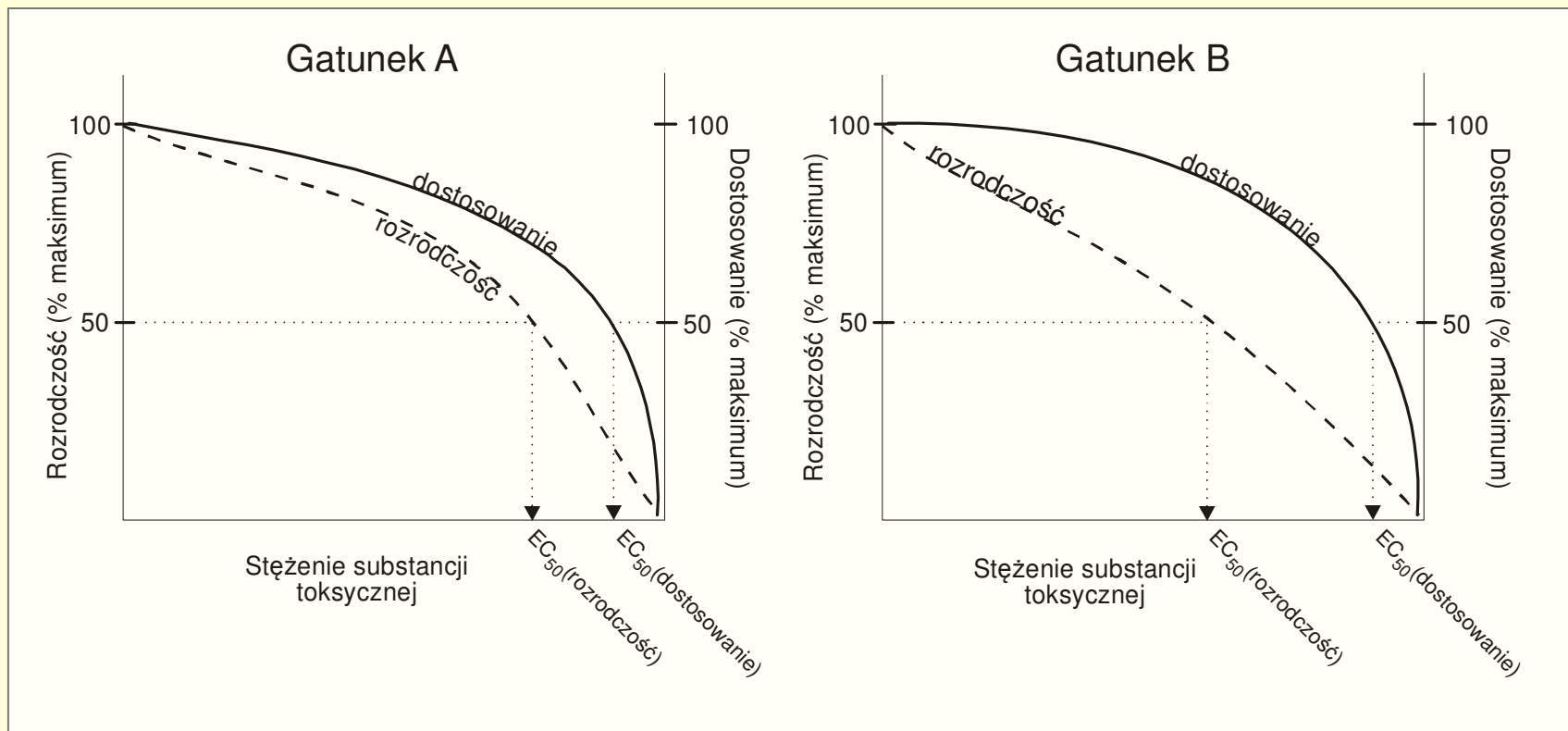
- Minimum 4 stężenia + zabieg kontrolny (bez substancji toksycznej)
- Minimum 3 powtórzenia; zwykle 5 – 10
- Obserwacja mierzonego efektu (np. liczby martwych) po określonym czasie

Analiza danych



Oddziaływanie substancji toksycznych na fenotyp i genotyp osobnika

1. Plastyczność fenotypowa → odwracalna aklimacja
 - możliwość różnego reagowania przez organizm na czynniki środowiskowe w ramach jednego programu genetycznego



Oddziaływanie substancji toksycznych na fenotyp i genotyp osobnika

2. Konwersja rozwojowa

- uruchomienie w trakcie rozwoju osobniczego alternatywnego programu genetycznego

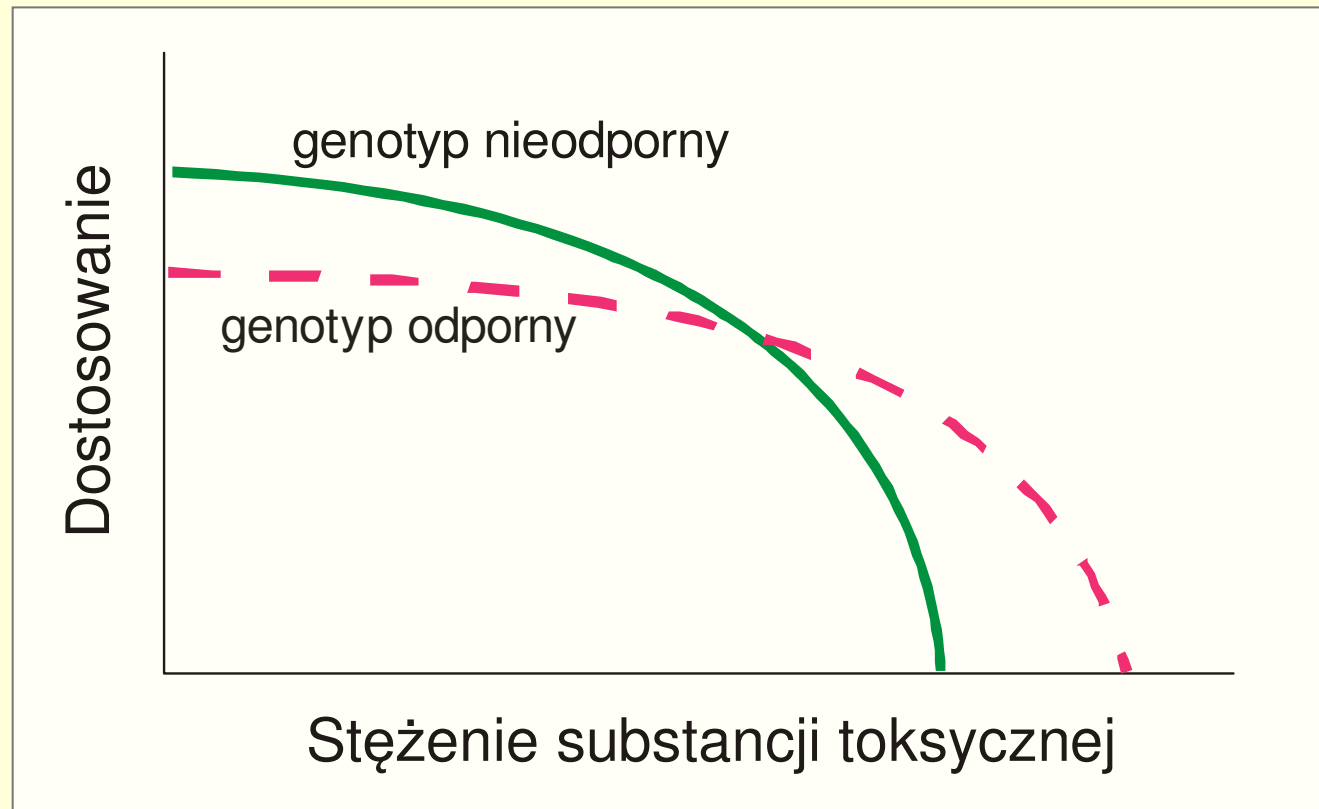
1 + 2 = *plastyczność genotypowa*

3. Adaptacja

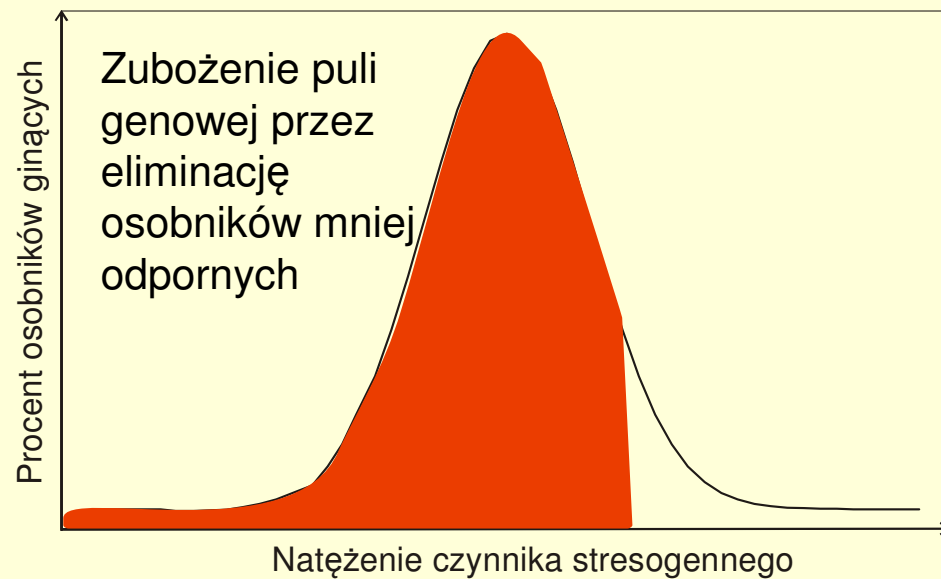
- *dobór kierunkowy* (eliminacja osobników bardziej wrażliwych)
- *dobór twardy*

Dostosowanie genotypów

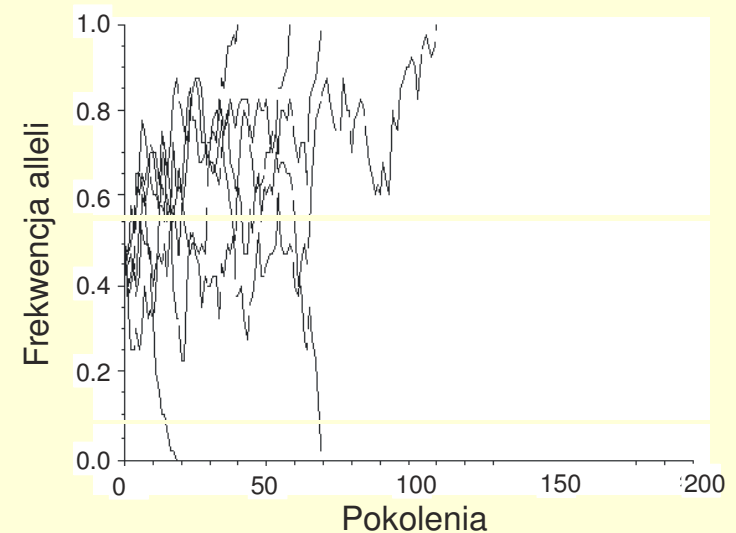
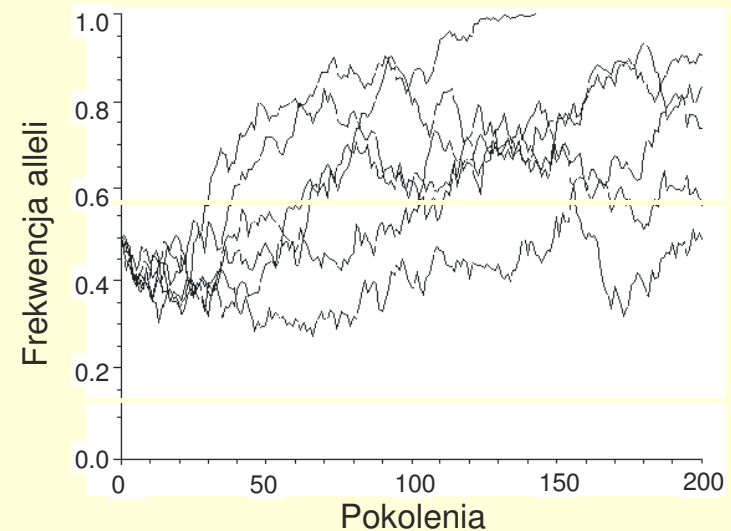
Od czasu trwania ekspozycji na substancję toksyczną i frekwencję ekspozycji zależy, co będzie preferował dobór



Wpływ substancji toksycznych na pulę genową populacji



Zubożenie puli genetycznej przez dryf genetyczny



Ekotoksykologia zespołów

- Przepływ skażeń w łańcuchach troficznych
 - współczynnik biokoncentracji (BCF):

$$\mathbf{BCF = C_n/C_0}$$

- współczynnik biomagnifikacji (BMF):

$$\mathbf{BMF = C_{n+1}/C_n}$$

Biokoncentracja i biomagnifikacja pestycydów

Stężenia DDD w kolejnych poziomach troficznych
w ekosystemie jeziora Clear w Kalifornii, USA

Element łańcucha troficznego	Poziom troficzny	Stężenie DDD (mg kg ⁻¹)
Woda	0	0,014
Fitoplankton	I	5
Ryby żywiące się planktonem	II i III	7 - 9
Ryby drapieżne	III i IV	22 - 221
Ptaki żywiące się rybami	V	2500 (w tłuszczu)

Biokoncentracja i biomagnifikacja metali

Stężenia kadmu (Cd) w kolejnych poziomach troficznych w terenie zanieczyszczonym kadmem

Poziom troficzny	Zakres stężeń Cd (mg kg ⁻¹)
Producenci (żywe rośliny)	6 - 25
Roślinożercy (równonogi, ślimaki)	29 - 171
Drapieżniki (nerki drozda, <i>Turdus philomelos</i>)	387

Biomagnifikacja – czy zjawisko uniwersalne?

Stężenia i współczynniki biomagnifikacji (BMF) ołowiu, cynku i kadmu dla roślinożerców i drapieżników zanieczyszczonego ekosystemu lądowego

Metal	Roślinożercy (mg kg ⁻¹)	Drapieżniki (mg kg ⁻¹)	BMF
Pb	122 - 685	66 - 551	0,54 – 0,80
Zn	260 - 2395	382 - 1299	1,50 – 0,54
Cd	2 – 25	29 - 377	14,50 – 15,1

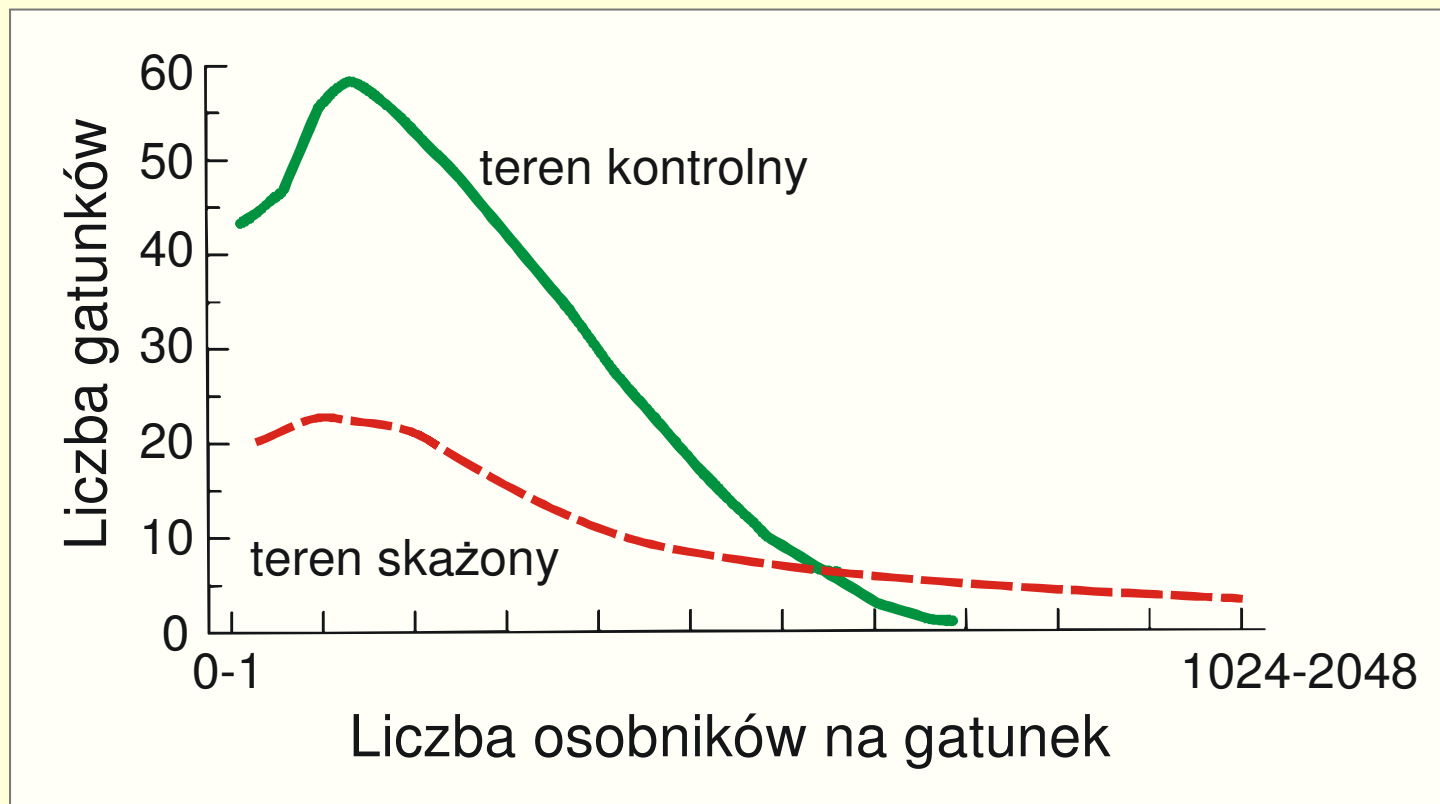
Ekotoksykologia zespołów – wpływ substancji toksycznych na bioróżnorodność

- Liczba gatunków (S)
- Bogactwo gatunkowe – indeks Margalefa: $R = \frac{S - 1}{\ln N}$
- Jednorodność gatunkowa – indeks Shannona-Wienera:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log p_i$$

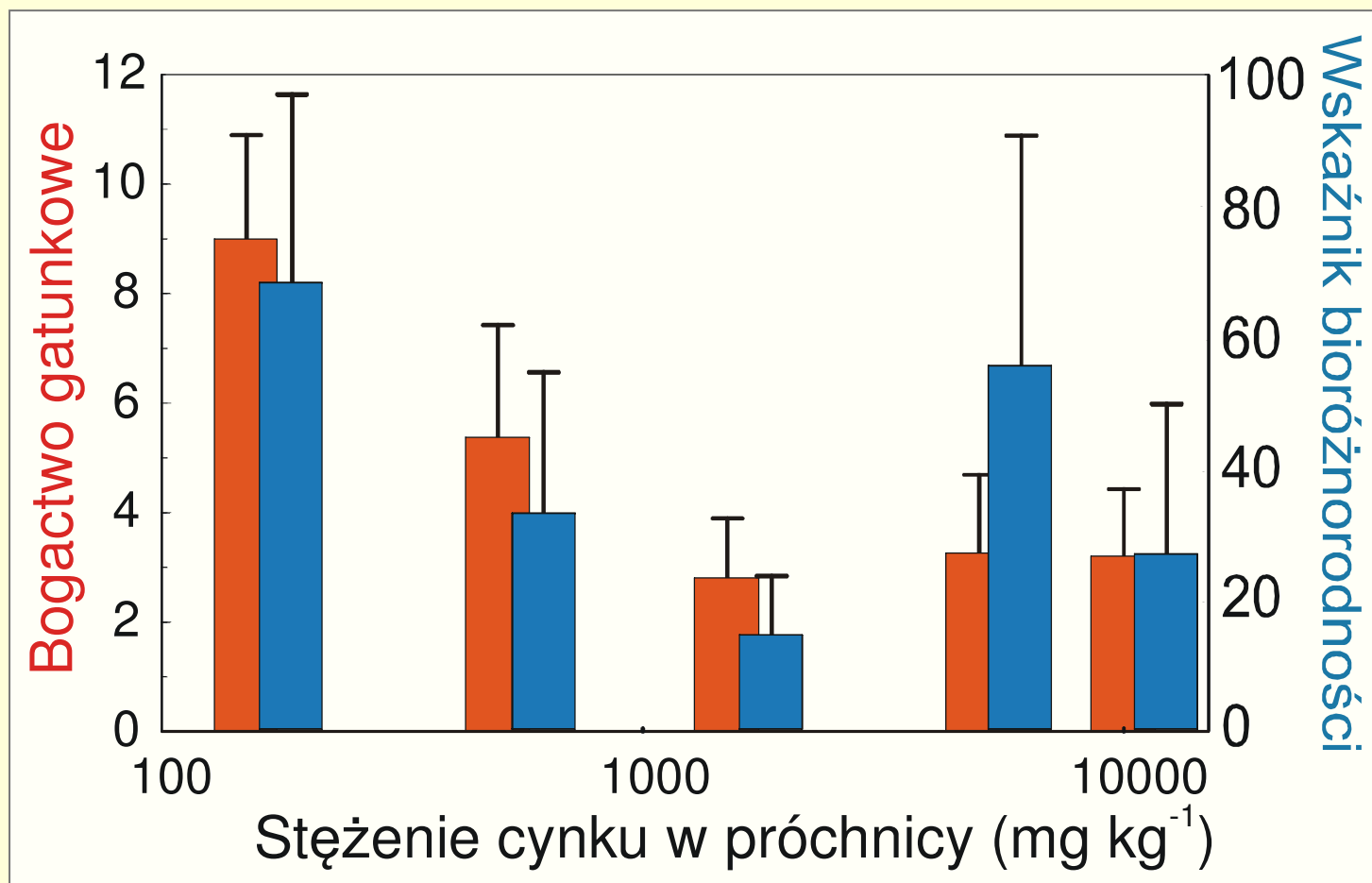
- Jednorodność gatunkowa – indeks Pielou: $J = \frac{H'}{H'_{\max}}$
 $H'_{\max} = \log S$
- Struktura dominacji – wskaźnik Simpsona: $D = \sum_{i=1}^S p_i^2$
- Hierarchiczny wskaźnik różnorodności: $HRI = \sum_{i=1}^S (n_i \times i)$

Zmiana struktury zespołu w terenie zanieczyszczonym w porównaniu do terenu kontrolnego



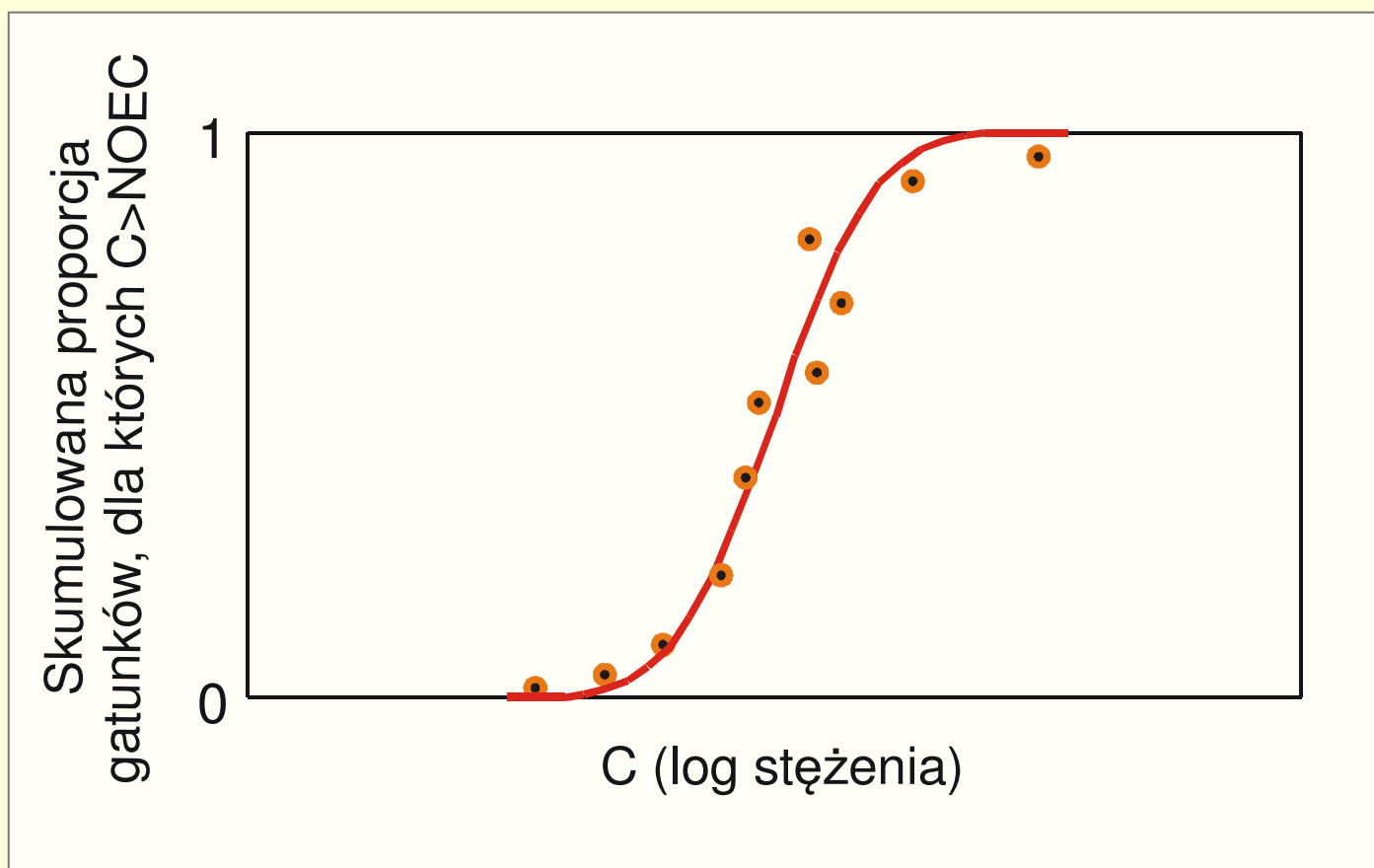
Choć na terenie zanieczyszczonym jest mniej gatunków, to osobniki są rozmieszczone pomiędzy gatunkami znacznie bardziej równomiernie – indeksy oparte o strukturę dominacji wykazałyby wyższą „bioróżnorodność” w terenie zanieczyszczonym.

UWAGA na wskaźniki bioróżnorodności!

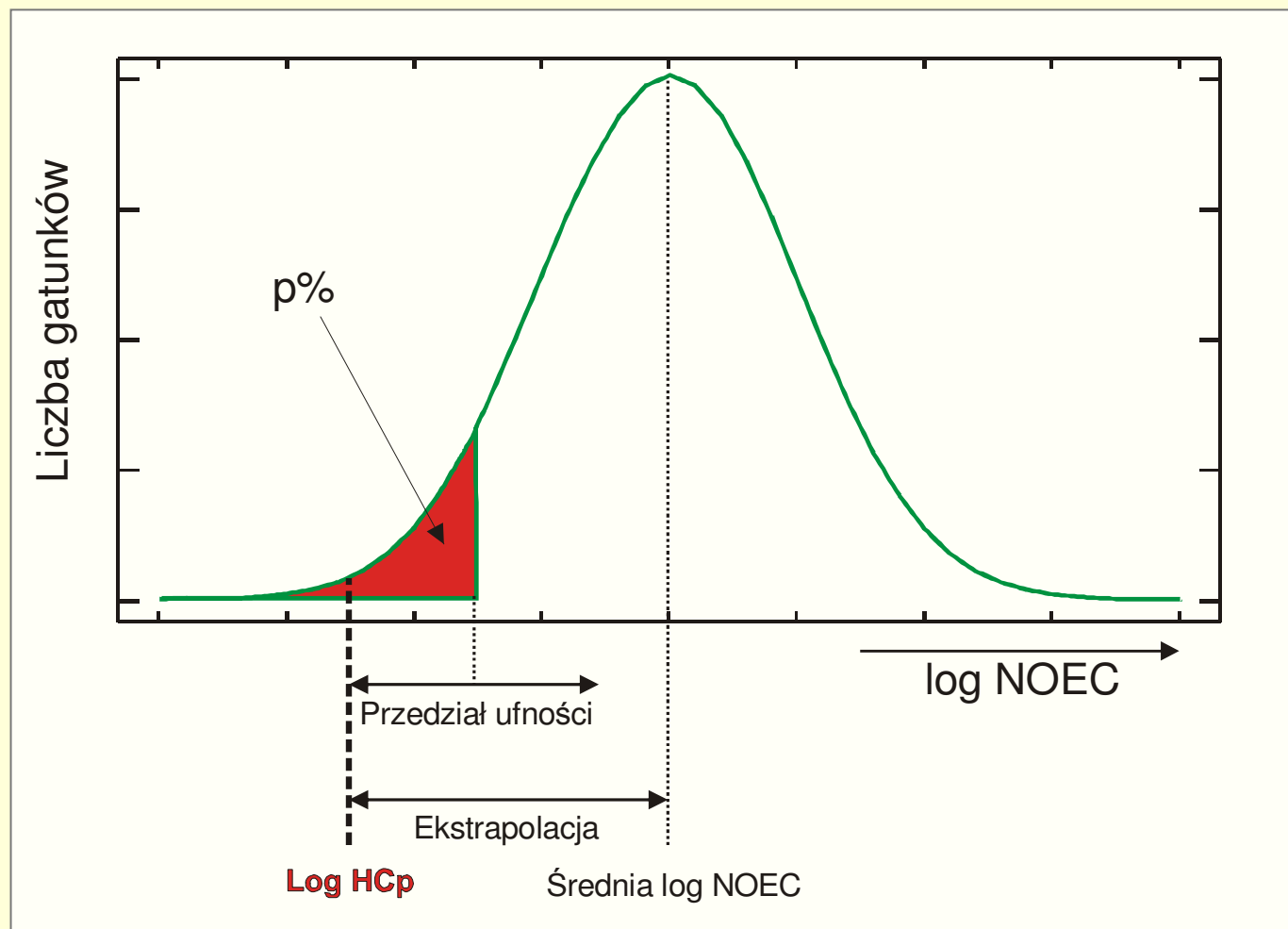


Zmiany bogactwa gatunkowego i wskaźnika bioróżnorodności McIntosha zespołu chrząszczy z rodziny biegaczowatych (Carabidae) wzdłuż gradientu skażenia metalami w okolicach huty cynku i ołowiu „Bolesław” koło Olkusza

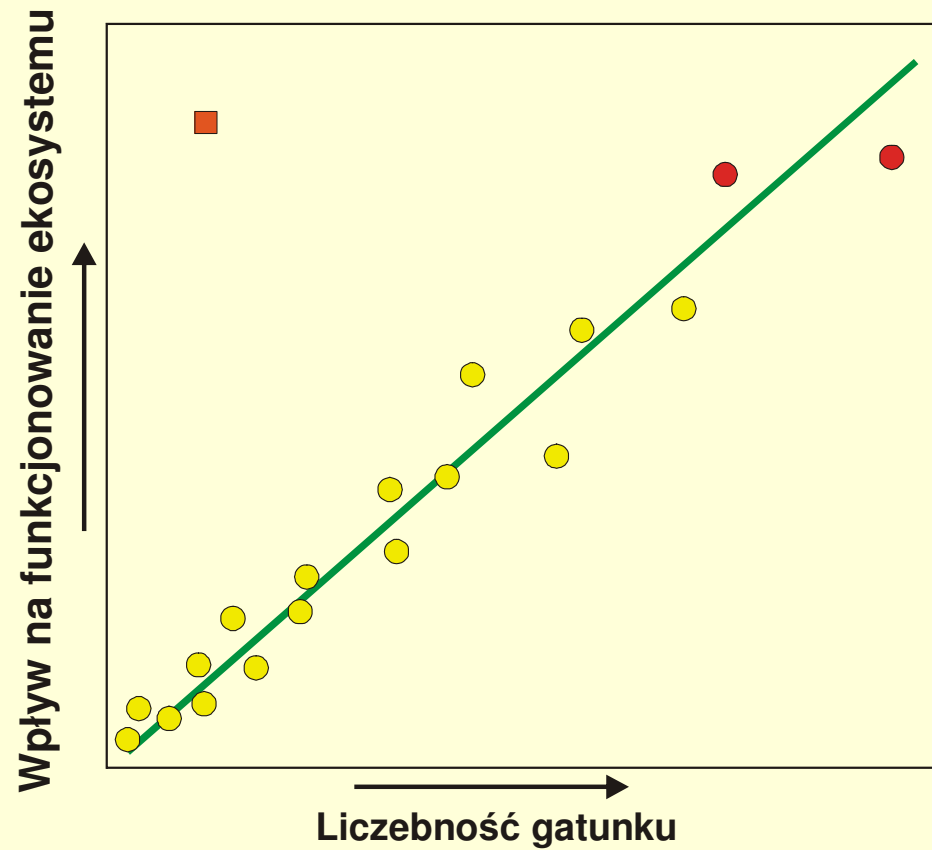
Rozkład wrażliwości gatunków w zespole



HCp – miara wpływu substancji na zespół

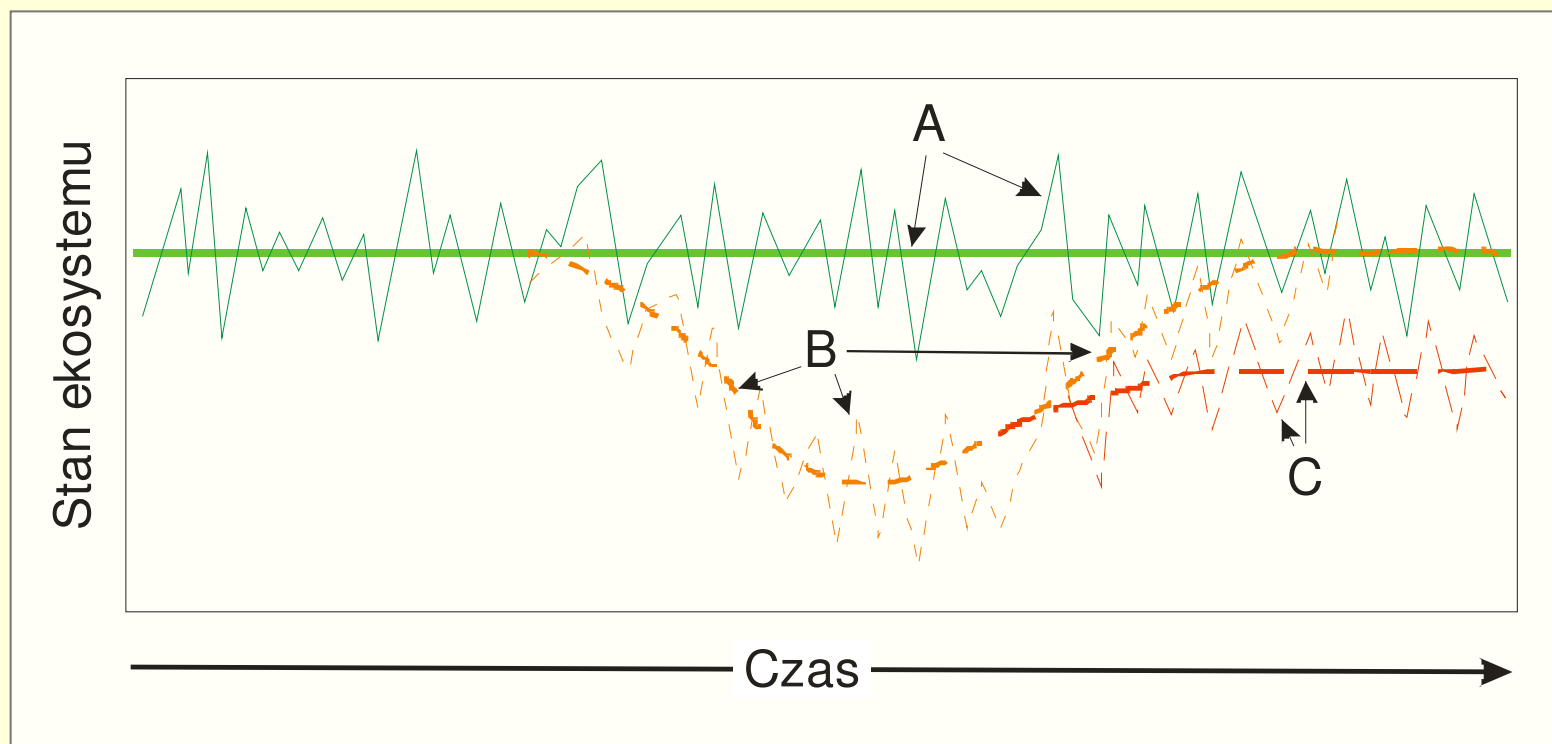


UWAGA z miarami typu HCp!



- Gatunki kluczowe ze względu na liczebność
- Gatunki zwornikowe

Odporność ekosystemu na zakłócenia



Niestety odporności nie zawsze wystarcza...

