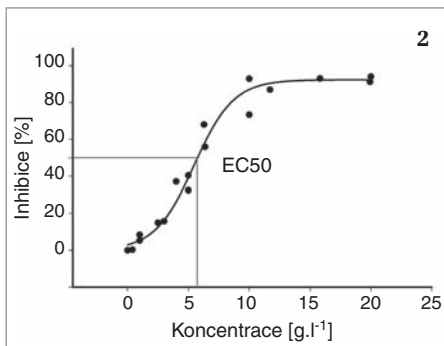


## Využití hrotnatky *Daphnia magna* v ekotoxikologických biotestech

Všechny složky životního prostředí jsou v menší či větší míře kontaminovány neustálým přísunem látek ze zdrojů lidské činnosti, které se do přírody dostávají s odpadními vodami, výfukovými plyny, ze spaloven, průmyslových závodů nebo zemědělské produkce. Mezi nejnámější skupiny znečišťujících látek (polutantů), na něž se v současnosti zaměřuje pozornost ekotoxikologů, patří těžké kovy, zbytky léčiv, pesticidy, ftaláty (látky využívané při výrobě plastů) atd. Bohužel u většiny z těchto látek není stále dokonale prostudován jejich osud (např. přetrvávání, hromadění a interakce) v životním prostředí ani jejich efekty na živé organismy. Hromadí se tyto polutanty v životním prostředí, nebo se postupně rozkládají? Jsou toxické pro vodní organismy a mají vliv na jejich reprodukci? Vykazují mutagenní nebo jiné závažné nežádoucí účinky? Cílem ekotoxikologů je na tyto otázky hledat odpovědi, na zjištěné skutečnosti upozorňovat, a tím chránit přírodu před dopady látek, o kterých nevíme, jak se budou v životním prostředí chovat.

Jedna z hlavních otázek se týká environmentální koncentrace kontaminantů. Tu jsme v současné době díky velmi citlivé analýze schopni stanovit s přesností na desetiny  $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ . Jako příklad techniky lze uvést tandemovou hmotnostní spektrometrii v kombinaci s kapalinovou chromatografií (LC-MS/MS). Takové moderní analytické metody mohou podat přesné údaje o míře znečištění životního prostředí množstvím různých látek, ale už nás bohužel nedokáží informovat o jejich účincích na živé organismy. Je to z toho důvodu, že z přítomnosti a koncentrace látky nelze spolehlivě předpovídat její toxický vliv, protože polutanty mohou v přírodě reagovat s různými složkami prostředí a tím se jejich toxický efekt mění. Navíc v případě směsi znečišťujících látek není na základě



1 Toxkit – kompletní sada k provedení biotestu, včetně testovacích organismů

2 Graf závislosti odpovědi organismu na koncentraci látky. Křivka prochází body, které odpovídají inhibici růstu organismu v různých koncentracích testované látky. EC50 – koncentrace (v tomto případě  $5,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), při níž došlo k 50% inhibici růstu vzhledem ke kontrole bez testované látky. Orig. T. Kolářek

kvalitativní ani kvantitativní analýzy možné určit, jaký bude kombinovaný efekt látek, zda synergický (látky působící společně), nebo naopak antagonistický (protichůdný účinek). Na tyto i jiné otázky dobře odpovídají právě ekotoxikologické biotesty.

### Biotesty v kostce

Jako metoda detekce toxických látek se používají od pradávna – připomeňme např. ochutnávače jídel faraonů ve starověkém Egyptě, nebo zpěvné ptáky sloužící v dolech pro zjištění přítomnosti metanu. Využíváme je tehdy, chceme-li znát vliv testované látky, směsi látek, výluhů apod. na konkrétní organismus nebo specifický ekosystém. Princip biotestu spočívá v tom, že za definovaných podmínek aplikujeme testovanou látku na testovací organismus a sledujeme jeho reakci ať již reprodukční,

nebo růstovou, změny chování, či prostě přežití. Nejvíce se testuje na vodních organismech, hlavně na rybcích, jako jsou např. dánío pruhované (*Danio rerio*), živorodka duhová (*Poecilia reticulata*), kapr obecný (*Cyprinus carpio*) nebo pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*). Velmi často se využívají také bezobratlí živočichové (perloočky, lasturnatky, vířníci), ale i některé druhy rostlin (okřehek menší – *Lemna minor*, hořčice bílá – *Synopsis alba*) a jednobuněčné zelené řasy, sinice a (heterotrofní) bakterie či kvasinky.

Zpravidla ověřujeme určitý rozsah koncentrací testované látky – máme několik variant vždy s jinou hodnotou (koncentrační řadu), kterou volíme podle možných reálných koncentrací v životním prostředí. Na základě účinků na testovací organismus jsme schopni odhadnout nebezpečnost dané chemikálie pro životní prostředí. To se stává po provedení experimentu předmětem výpočtů, extrapolací a předpokladů, u nichž víme, že laboratorní prostředí je od přírody vzdálené a látka může v přírodě interagovat s dalšími organismy nebo látkami. Používáme testovací organismy s dopodrobna známou ekologií, etologií, životním cyklem apod. Příkladem takového organismu je perloočka neboli hrotnatka *Daphnia magna*, která se u nás běžně vyskytuje ve stojatých vodách. Hrotnatku lze jednoduše chovat v laboratorních podmínkách, má krátkou generační periodu a dostatečnou citlivost. V testu sledujeme většinou více než jeden typ projevu látky na organismus, např. úmrtnost (letalitu, tedy počet jedinců uhynulých za určitý čas v testované koncentraci) nebo inhibici růstu a fyziologických procesů, ale také mezibuněčnou komunikaci, mutagenitu (tedy zda látka zvyšuje pravděpodobnost vzniku mutace), vlivy na reprodukci apod. Odpověď organismů v testech může být okamžitá (testy akutní toxicity), nebo také vznikající vlivem dlouhodobého působení látky (testy chronické toxicity); zde je krátká generační perioda hrotnatky velkou výhodou.

Rozdílnost odpovědí u stejného typu testu provedeného s různými organismy může být dána jejich odlišnou citlivostí k testované látce. Je proto velmi důležitá správná volba organismu – musí být mimo jiné dostatečně citlivý a také relevantním zástupcem daného ekosystému. Pro zjišťování vlivů látek různého původu na životní prostředí je třeba mít testy na všech trofických úrovních, tedy na producentech, konzumentech i destruentech, a to vytvořením specifické sady biotestů. Jen tak lze získat objektivní závěry o toxicitě dané látky pro ekosystém. Při přípravě designu biotestu se musíme zamyslet nad tím, jakou informaci chceme získat. V případě volby testovacích organismů a uspořádání biotestu to platí dvojnásob – špatný design stojí čas, peníze a pracně namnožené organismy nebo vypěstované kultury. Pro možnost univerzálního vyhodnocení míry toxicity existují mezinárodní číselné ukazatele. Jedním z pravděpodobně nejčastěji užívaných je EC50 – hodnota udávající koncentraci testované látky, při níž vykazuje efektivní účinek právě na 50% jedinců testovacích organismů. Význam tohoto parametru znázorňuje graf (obr. 2). Mezi



další běžně používané patří LD50 – dávka s letálním účinkem právě na 50 % testovaných organismů, dále LOEC – odpovídá nejnižší testované koncentraci s inhibičním efektem, NOEC – odpovídá nejvyšší testované koncentraci, ve které ještě nedošlo k inhibičnímu efektu, LC – letální koncentrace atd.

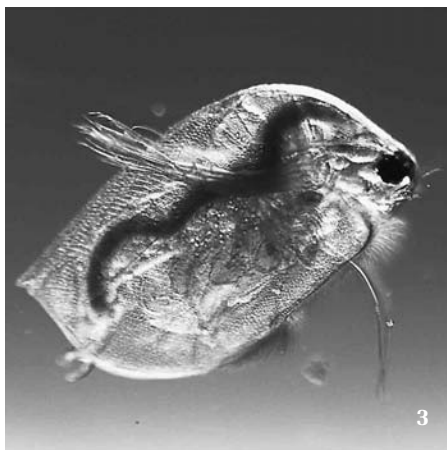
### Vývoj biotestů

Biotesty prošly za poslední čtvrtstoletí výrazným vývojem. Od klasických pokusů na rybách a klíčení semen rostlin (1. generace biotestů) jsme před ca 15 lety dospěli k mikrobiotestům, založeným na klidových stádiích zooplanktonu, lyofilizovaných kulturách bakterií (lyofilizace – odpaření vody ze zmrazeného vzorku ve vakuu), nebo imobilizovaných kulturách řas (2. generace). Nedávno byly definovány biotesty 3. generace (biosenzory, biomarkery) a také 4. generace, která přenáší signály z biotestů on-line jako systémy včasného varování např. z mezokosmových biotestů v přírodních podmínkách (viz dále; Maršálek 2002). Zjednodušeně se dá říci, že biotesty se dnes provádějí v menších objemech a s menším počtem organismů. Objevily se komerčně dostupné sady – toxikity (typický zástupce 2. generace biotestů, obr. 1), u nichž je patrná snaha testování zlevnit, ale také zjednodušit. Při práci s toxikity nemusíme udržovat laboratorní kulturu testovacích organismů, jsou dodány už v samotné soupravě v podobě cyst či trvalých vajíček – diapauzujících („spících“) stadií, která vydrží dlouho uskladněná a v laboratoři z nich můžeme znovu získat třeba právě hrotnatku do testu. Tím se uspoří mnoho času a úsilí, které bychom jinak museli vynaložit na péči o chovy příslušných organismů.

Neměli bychom také zapomínat na mezo-kosmové experimenty, v nichž jde o testování látek přímo v daném ekosystému v terénu. Provádějí ho jen špičková ekotoxikologická pracoviště na určitých lokalitách, kde je příslušnými úřady testování povoleno a zároveň svým charakterem vyhovují experimentálnímu záměru. Ve specializovaných laboratořích se používají biosenzory a biosondy, díky kterým lze monitorovat specifické mechanismy toxicity – oxidativní stres, využití určitých receptorů v buňkách apod. V posledních letech byly vyvinuty biotesty na principu on-line sledování daného organismu, např. u hrotnatky analýzou obrazu (zajímá nás rychlost a způsob pohybu v nádrži). On-line testování však není tak úplně nová metoda – využívá se třeba v úrodních nádržích pro pitnou vodu, kde pstruzi slouží ke sledování změn kvality vody. Mezi současné trendy ve směřování vývoje biotestů patří snaha přiblížit se co nejvíce reálným podmínkám v ekosystému, např. zapojením nových metod ve vzorkování (permeabilní, tedy propustné membrány). Stále častěji se využívá alternací při vyhodnocování testů (fluorescenční metody, průtoková cytometrie apod.).

### Význam biotestů

V současné době představují dynamicky se rozvíjející prostředek pro zjištění účinků látek nových, ale i běžně používaných v životě lidí všude na světě. Ekotoxikolo-



gické biotesty se netěší velké přízni veřejnosti, spíše naopak, protože při jejich použití pozorujeme obvykle letální účinky na testovací organismy. Musíme si ale uvědomit, proč se testy dělají. Je totiž přijatelnější úhyn několika testovacích organismů při testování *in vitro* nebo *in situ*, než dopustit únik potenciálně škodlivé látky do životního prostředí. Při takové situaci by mohly být úhyn organismů pochopitelně mnohem extrémnější. Na základě testů, které dokáží odhalit např. toxický účinek pro vodní organismy, může být používání takto nebezpečné látky omezeno nebo i zakázáno. Tím lze kontaminaci životního prostředí včas zabránit. Ekotoxikologické testování je jakési nutné zlo, chránící přírodu před některými výtvyry člověka. Ekotoxikologové, stejně jako toxikologové dodržují přísná etická kritéria testování a navíc vyvíjejí stále nové, např. *in vitro* a *in silico* (počítačové modely) metody detekce, které jsou ověřovány s běžnými organismy biotestů (i s hrotnatkami).

### Proč právě hrotnatka?

Při zkouškách toxických účinků na jednotlivých trofických úrovních je důležitá volba správného testovacího organismu. Hrotnatka v tomto případě představuje poměrně jednoduše kultivovatelný organismus, má krátkou generační periodu, ideální velikost a dobře se s ní manipuluje (Seda a Petrusek 2011). Zároveň velmi citlivě reaguje na cizorodé látky nebo na změny vlastností prostředí. Biotesty s hrotnatkou navíc mají značnou vypovídající hodnotu, protože jde o velmi rozšířený druh nebo spíše druhy (známe jich minimálně 620, Forro a kol. 2007). U zástupců řádu perloočky (*Cladocera*) se můžeme setkat se zvýšenou schopností osmoregulace, díky čemuž dokáží lépe aktivně řídit přestup iontů a látek dovnitř i ven ze svého těla. To má mimo jiné za následek, že se perloočky účinněji zbavují škodlivých látek nebo iontů a dokážou žít v rozmanitých podmínkách (např. Živa 2009, 3: 122–123). Lze tak z případného testování na hrotnatce usuzovat, že testovaná látka bude mít podobné dopady na životní prostředí u nás i ve světě, kde se vyskytují další druhy perlooček. Pro úplnost dodejme, že rod *Daphnia* patří systematicky do čeledi hrotnatkovití (*Daphniidae*), řádu perloočky (*Cladocera*), do třídy koryši (*Crustacea*), kmene členovci (*Arthropoda*). Řád perloočky si vysloužil název podle svého složeného oka a malých světlolomných čoček okolo něj.

**3 a 4** Samec (obr. 3) a samice (4) hrotnatky *Daphnia magna*, využívané v ekotoxikologických biotestech, se liší mimo jiné tvarem těla.

**5** Kopulující samec a samice hrotnatky. Snímky T. Kolářka

**6 a 7** Schéma rozmnožovacího cyklu (obr. 6, blíže v textu) a kopulace (7) hrotnatky *D. magna*. Orig. M. Chumchalová, podle různých zdrojů

### Postavení v potravním řetězci

Hrotnatky tvoří velmi důležitou součást potravního řetězce ve vodním ekosystému. Tito malí koryši jsou preferovanou kořistí pro predátory (např. ryby) a zároveň jde o nejpobytější filtrátory planktonních řas. Zastávají tedy významnou roli ve vodním ekosystému a s jejich přítomností (případně nepřítomností) se mění charakter nádrže. Kromě fytoplanktonu je další složkou potravy pro perloočky detrit, do něhož patří i jejich vlastní svlečené chitínové schránky. Populace perlooček v nádrži roste nebo klesá v závislosti na množství potravy (fytoplanktonu) a množství predátorů.

### Životní cyklus

Zjednodušeně lze říci, že si hrotnatky udržují dlouhodobě matriarchát, pouze když dojde ke zhoršení životních podmínek, produkují i samce. Teprve potom se začínají rozmnožovat pohlavně (viz obr. 6).

Většina perlooček je tedy schopna dvojího typu rozmnožování – partenogenetického a sexuálního. Partenogenezi rozumíme rozmnožování, kdy v zárodečném prostoru dospělá samice zraje až 60 diploidních vajíček. Rychlost dozrávání závisí hlavně na teplotě prostředí. Po jejich dozrání samice „rodí“ opět samice. Snůška vzniká za dobrých životních podmínek i jednou za dva dny. Nově narozená mláďata (nazývaná neonata) jsou podobná dospělým a geneticky shodná s matkou. Z toho vyplývá, že po většinu roku tvoří populaci hrotnatky jen samice. Jednotlivá stadia se rozlišují postupným svlékáním chitínové schránky. Jedinec se stává dospělcem v době první snůšky dalších mláďat.

Rozpozná-li perloočka zhoršení podmínek v nádrži a nastane krizová situace, začnou se některá vajíčka ve vaječniku samičky diferencovat a líhnou se z nich samci. Snůšky pak bývají nejčastěji smíšené – se samicemi a samci v jedné snůšce. Krizovou situaci můžeme nazvat zkrácení dne, úbytek potravy, změnu chemismu nebo složení vody apod. Samci se od samic





liší tvarem těla (viz obr. 3 a 4), chováním a také způsobem plavání. Nemají zárodečný prostor v těle a jsou menší než dospělé samice. Navíc se vyznačují hákovitým trnem a dlouhou brvou na prvním páru hrudních končetin. Tyto struktury slouží k přichycení samce k samici při kopulaci (obr. 5 a 7).

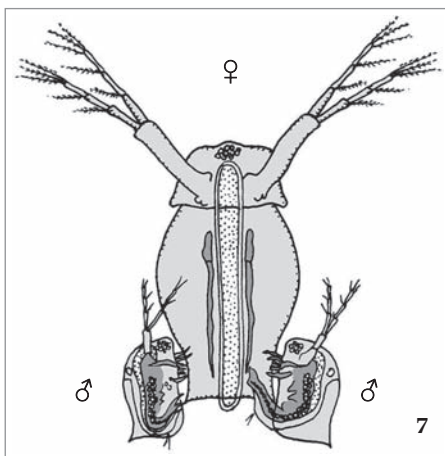
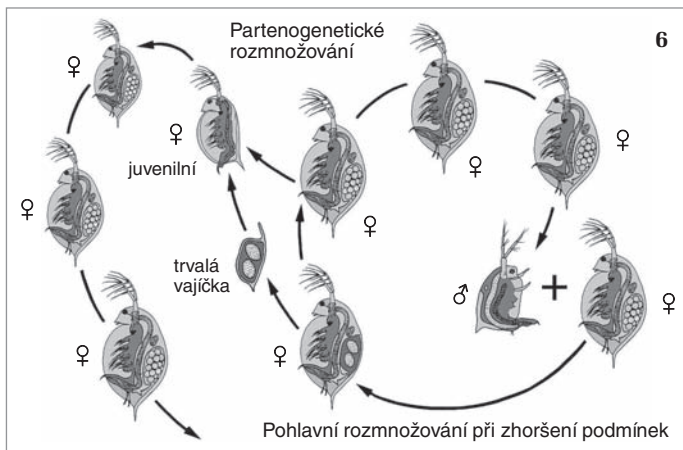
Jakmile samci dospějí, proběhne páření a ve vaječniku samičky dochází k oplodnění vajíček, která se vyvíjejí v trvalá vajíčka. Současně se vytváří ochranný obal (epipium), vznikající společně s novou schránkou samičky a uvolňující se při jejím svlečení. V tomto diapauzujícím stadiu jsou vajíčka schopna přežít opravdu extrémní podmínky jako i dlouhodobé vyschnutí.

#### Stavba těla

Tělo perloočky se ukrývá ve dvouchlopnové, ze stran zploštělé chitinové schránce. Schránka plní ochrannou funkci, začíná hlavou (v některých situacích, např. v přítomnosti predátora, tzv. helmou) a končí hrotem (spina) u abdomenu. Hrotnatka má na hlavě jedno složené oko spolu se světlo- lomnými čočkami a jedno naupliové oko. Nápadnou částí těla jsou tykadla (antény), většinou dvouvětevné, v poměru k tělu mohutné a opatřené brvami. Antény slouží k plavání. Hrotnatka nese pět párů diferencovaných plavacích končetin a jejich pomocí zároveň filtruje potravu z vody. Potrava je dále posouvána do úst a pak do hltanu, který pokračuje do střeva. Dýchání probíhá difúzí rozpuštěného kyslíku ve vodě, a to celým povrchem těla. Nad zárodečným prostorem leží soudečkovité srdce, tělo ukončuje zadeček (neboli abdomen), zakončen postabdomenem, na kterém najdeme dva drápky. Postabdomen slouží k čištění filtračního aparátu.

#### Plovoucí potrava, nebo vychytralá sňazka?

Z postavení hrotnatky v potravním řetězci jasně vyplývá, že ji velice často ohrožují predátoři. Tento malý koryš, i když zdánlivě jednoduchý organismus, se však dokáže bránit. Využívá mezidruhové komunikace, kdy jeden organismus vylučuje do prostředí chemickou látku, kterou přijímající organismus vnímá a reaguje na ni. Pro látky uvolňované do prostředí, které mají přínos pro příjemce, se vžil označení kairomony. Hrotnatka takto dokáže reagovat na látky vylučované predátory. V situaci, kdy se dostane pod velký predáční tlak ryb,



je schopna v následující dceřině (filiální) generaci zmenšit své tělo, aby nebyla tak lehce viditelným soustem. Když predáční tlak pomine, a tím klesne množství specifické chemické látky predátora, tělo perloočky se v dalších generacích opět zvětšuje, což přináší konkurenční výhodu v zápasu o potravu s dalšími býložravými planktonními organismy. Známe i podobné vztahy perlooček s listonohy, jejich dalšími predátory. V tomto případě za přítomnosti kairomonů produkovaných listonohy vytvoří trnovou korunu na helmě své schránky, která ji chrání proti požírání listonohem (Petrušek a kol. 2009, také Živa 2009, 6: 265–266). Tento jev nebo spíše jeho projevy v morfologických změnách daného druhu označujeme jako cyklomorfóza. Další faktory, které indukují vznik cyklomorfózy, zůstávají předmětem zkoumání.

#### Testy s perloočkami

Tyto testy patří k nejčastěji prováděným všude na světě. Normované známe dva – testy akutní a chronické toxicity. Rozdíl spočívá v čase expozice hrotnatek sledované látky. V obou případech se používají jedinci z laboratorního chovu ve stáří do 24 hod. V praxi se lze setkat i s jinými variantami – prolongovaný 10denní test (něco mezi akutním a chronickým) nebo např. zkrácený 14denní reprodukční test zaměřený na embryotoxicitu.

Test akutní toxicity na hrotnatce trvá 24 hod., lze jej ale prodloužit na 48 hod., a to zejména pokud se po 24 hod. neprojevil žádný toxický efekt. Provádí se v testovacích 30jamkových destičkách. Každá řada jamek odpovídá jedné koncentraci látky, nebo jedné z více najednou testovaných látek. První řada bývá většinou kon-

trolní s čistým médiem, vůči ní se nakonec porovnávají testovací řady. Test akutní toxicity může mít také podobu toxikitu, tedy biotestu 2. generace, kde používáme hrotnatky vylíhlé z klidových stádií.

Druhý zmiňovaný test chronické toxicity je značně složitější a zároveň mnohem náročnější na čas, použitý materiál i zařízení. Za odvedenou práci ale stojí, neboť podává mnohem více informací o toxicitě látky a hlavně o jejím dlouhodobém účinku, a to napříč několika generacemi organismu. Pro každou variantu se nasadí 10 jedinců, přičemž každá hrotnatka má svou vlastní kádinku a každou také jednotlivě sledujeme. Důležité je, kdy se objeví první snůška, jaká je frekvence dalších a počet mládat v každé snůšce. Na konci testu se jako důležitý parametr zjišťuje rozměr hrotnatky od hlavy po konec schránky, spina a helma se nezapočítávají. Celý test trvá 21 dní, během nichž se hrotnatky pravidelně krmí řasovou kulturou a mění se médium v kádinkách. Na základě dat z tohoto testu lze usuzovat, jaký vliv má testovaná látka při dlouhodobé expozici a jak působí na reprodukci.

#### Závěrem

Ekotoxikologické biotesty jsou i přes obrovský pokrok v přístrojové technice stále jedním ze spolehlivých způsobů, jak se dozvědět více o vlivu polutantů na vodní a terestrické ekosystémy. Můžeme tak pozorovat, že pokročilé technologie společně s testovacími organismy vytvářejí stále lepší a vyspělejší metody, a tak se ekotoxikologie posouvá dále vpřed. Hrotnatka jako modelový organismus v ekotoxikologii se v roli relevantního zástupce vodního ekosystému nadále hojně používá a dále blíže zkoumá, a jsou u ní sledovány stále nové efekty (změny biochemických parametrů, exprese genů atd.). Pohled veřejnosti na provádění ekotoxikologických biotestů není vždy přívětivý a vychází z domněnky, že se zbytečně usmrcejí testovací organismy. Je ale nutné uvědomit si souvislosti. Ve skutečnosti jde o jediný způsob, jak organismy naopak ochránit před běžně používanými látkami, které mohou být nebezpečné nejen pro člověka, ale pro všechny složky životního prostředí. Ekotoxikologie je důležitá vědní disciplína, která se snad časem dočká většího pochopení a upevní svůj význam v testování chemických látek.

Použitá literatura uvedena na webu Živa.