

**VISOKA ŠOLA ZA VARSTVO OKOLJA**

DIPLOMSKO DELO

**PREGLED IN PRIMERJAVA METOD TESTIRANJA  
STRUPENOSTI NA MODELU IZBRANIH KOPENSKIH IN  
VODNIH NEVRETENČARJEV**

VID JUG

VELENJE, 2015

**VISOKA ŠOLA ZA VARSTVO OKOLJA**

**DIPLOMSKO DELO**

**PREGLED IN PRIMERJAVA METOD TESTIRANJA  
STRUPENOSTI NA MODELU IZBRANIH KOPENSKIH IN  
VODNIH NEVRETENČARJEV**

**VID JUG**

Varstvo okolja in ekotehnologije

Mentorica : doc. dr. Lucija Kolar

VELENJE, 2015

Priloga 2: Sklep o diplomskem delu



Številka: 726-27/2013-2

Datum in kraj: 6. 3. 2014, Velenje

Na podlagi Diplomskega reda

izdajam

### SKLEP O DIPLOMSKEM DELU

Študent-ka VŠVO

Vid Jug

lahko izdela diplomsko delo pri predmetu: Kinetika okoljskih onesnaževalcev in uporaba testnih organizmov

Mentor-ica: doc. dr. Lucija Kolar

Somentor-ica: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Naslov diplomskega dela v slovenskem jeziku: Pregled in primerjava metod testiranja strupenosti na modelu izbranih kopenskih in vodnih nevretenčarjev

Naslov diplomskega dela v angleškem jeziku: Review and comparison of toxicity methods on the model of selected aquatic and oil daily organisms

Diplomsko delo je potrebno izdelati skladno z Navodili za izdelavo diplomskega dela.

Pravni pouk: Zoper ta sklep je možna pritožba na Senat v roku 3 delovnih dni.



Dekan  
doc. dr. Boštjan Pokorny

## Izjava o avtorstvu

Podpisani/a Vid Jug, z vpisno številko 34100014,

študent/ka dodiplomskega / podiplomskega (obkrožite) študijskega programa Varstvo okolja in  
ekotehnologije, sem avtor/ica diplomskega dela z naslovom

Pregled in primerjava metod testiranja strupenosti na modelu izbranih kopenskih in vodnih  
nevretenčarjev,

ki sem ga izdelal/a pod mentorstvom doc. dr. Lucije Kolar in somentorstvom \_\_\_/\_\_\_.

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- je predloženo delo moje avtorsko delo, torej rezultat mojega lastnega raziskovalnega dela;
- da oddano delo ni bilo predloženo za pridobitev drugih strokovnih nazivov v Sloveniji ali tujini;
- da so dela in mnenja drugih avtorjev, ki jih uporabljam v predloženem delu, navedena oz. citirana v skladu z navodili VŠVO;
- da so vsa dela in mnenja drugih avtorjev navedena v seznamu virov, ki je sestavni element predloženega dela in je zapisan v skladu z navodili VŠVO;
- se zavedam, da je plagiatorstvo kaznivo dejanje;
- se zavedam posledic, ki jih dokazano plagiatorstvo lahko predstavlja za predloženo delo in moj status na VŠVO;
- je diplomsko delo jezikovno korektno in da je delo lektoriral/a doc. dr. Lucija Kolar;
- da dovoljujem objavo diplomskega dela v elektronski obliki na spletni strani VŠVO;
- da sta tiskana in elektronska verzija oddanega dela identični.

V Velenju, dne 22.04.2015

podpis avtorja/ice

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Luciji Kolar za pomoč in usmerjanje pri nastajanju diplomske naloge.

Rad bi se zahvalil tudi družini in prijateljem za vso podporo v času študija.

Najlepša hvala!

## IZVLEČEK:

Testi strupenosti so metode, ki omogočajo natančno presojo strupenosti raznovrstnih snovi za organizme. Diplomsko delo opisuje in primerja teste strupenosti na treh izbranih nevretenčarjih: kopenski rak enakonožec (*Porcellio scaber*), deževnik (*Eisenia fetida*) in vodna bolha (*Daphnia magna*). Izkazalo se je, da sta slednji vrsti najpogosteje uporabljena modela za preučevanje strupenih snovi. Vse tri obravnavane vrste so zelo primeren testni model zaradi ekološke pomembnosti, primerne občutljivosti, praktičnosti uporabe in možnosti preučevanja različnih vrst snovi - kemikalij. Do nekaterih razlikovanj med njimi prihaja pri načinu izpostavljenosti kemikalijam ter občutljivosti na določen tip kemikalij in ekološki vlogi. Iz tega sledi ugotovitev, da je tudi uporaba nestandardnih organizmov, npr. raka enakonožca, v testih strupenosti zelo pomembna. Z izjemo slednjega, sta sicer ostali vrsti standardizirani s strani številnih mednarodnih organizacij (npr. Organizacije za gospodarsko sodelovanje in razvoj – OECD), ki za vsako od njih predpisujejo poenoten testni postopek za preučevanje akutnih (preživetje) in kroničnih (razmnoževanje, rast itn.) učinkov ter ju rutinsko uporabljamo za presojo vplivov strupenih snovi na okolje v procesu ocene tveganja za okolje (ERA). Ta proces omogoča napoved usode onesnaževalcev v okolju in varovanje populacij nevretenčarjev.

Ključne besede: onesnaževanje, kemikalije, testi strupenosti, nevretenčarji, akutni in kronični učinki, ocena tveganja za okolje.

## ABSTRACT:

Toxicity tests on invertebrates are well established methods that are useful for risk assessment of different types of chemicals. In the present study, a review and comparance of three invertebrates species is made: terrestrial isopod (*Porcellio scaber*), earthworm (*Eisenia fetida*) and water flea (*Daphnia magna*). It is concluded that the latter two are the most used model species for assessing of chemicals. All of them are very suitable testing organisms due to ecological importance, relevant sensitivity, practical reasons and possibility of studying different types of chemicals. There are also some differencies among them, namely, route of exposure, specific chemical-related sensitivity and ecological role. We also showed that non-standard species, such as terrestrial isopod, are of importance in assessing risk that chemicals pose to the environment. Apart of isopods, earthworms and water fleas are standardized from numerous of international organizations (e.g. The Organisation for Economic Co-operation and Development – OECD) which mean there are no differences in test design, other than among species. In general, standard methods allow to study lethal (survival or immobilisation) and sub-lethal (reproduction, growth etc.) effects and are routinely used for purpose of ecological risk assessment (ERA). Such a process allows probabilistic determination of chemicals fate effects in the environment and on the other hand also serves as a protection of invertebrates populations.

Key words: pollution, chemicals, toxicity testing, invertebrates, acute and chronic effects, ecological risk assessment.

## KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	Opredelitev problema .....	1
1.2	Namen in cilji diplomske naloge .....	2
1.3	Hipoteze.....	3
2	EKOTOKSIKOLOŠKE ŠTUDIJE .....	4
2.1	Razvoj in prihodnji izzivi .....	5
2.2	Dopolnjevanje s kemijsko – fizikalnimi metodami .....	7
2.3	Pristopi k testiranju strupenosti.....	8
2.4	Standardne metode testiranja strupenosti .....	10
2.5	Nestandardne metode testiranja strupenosti .....	10
2.5.1	Laboratorijski testi z eno vrsto .....	11
2.5.2	Izogibalni test .....	11
2.5.3	Testi v prirejenem (modelnem) ekosistemu (mikro in mezokozmos).....	12
2.5.4	Testi v naravnem okolju .....	13
3	USODA KEMIKALIJ V KOPENSKIH IN VODNIH EKOSISTEMIH .....	14
3.1	Transportni in razgradni procesi v okolju .....	15
3.1.1	Abiotska in biotska razgradnja.....	16
3.2	Skladiščenje v tleh in usedlinah.....	17
3.3	Medsebojni vplivi kemikalij .....	17
3.4	Vplivi kemikalij na nevretenčarje .....	18
3.4.1	Biodostopnost .....	18
3.4.2	Bioakumulacija, biopretvorba in izločanje .....	20
4	METODE V TESTIH STRUPENOSTI.....	22
4.1	Čas testiranja in iskani odzivi .....	23
4.1.1	Kratkotrajne študije .....	23
4.1.2	Dolgotrajne študije .....	24
4.2	Vloga poti izpostavljenosti .....	24
4.3	Sistemi izpostavitve za vodne organizme .....	25
4.3.1	Statični sistem.....	25
4.3.2	Obnavljajoči sistem .....	25
4.3.3	Pretočni sistem.....	26

4.3.4	Izpostavitev preko hrane .....	26
4.4	Sistemi izpostavitve za kopenske organizme .....	27
4.4.1	Uporaba umetne/standardne zemljine .....	27
4.4.2	Direktna izpostavitev .....	27
4.4.3	Kemikalije dodane k hrani .....	28
4.5	Odnos med koncentracijo in učinkom .....	28
5	UPORABA NEVREtenČARJEV V TESTIH STRUPENOSTI .....	30
5.1	Izbira primerne vrste .....	32
5.2	Glavne prednosti nevretenčarjev .....	32
5.2.1	Fiziološke značilnosti .....	32
5.2.2	Razširjenost .....	32
5.3	Zakonodaja in uporaba nevretenčarjev .....	32
6	TESTI STRUPENOSTI NA IZBRANIH KOPENSKIH IN VODNIH NEVREtenČARJIH .....	33
6.1	Standarden testni organizem: deževnik ( <i>Eisenia fetida/Eisenia andrei</i> ) .....	33
6.1.1	Opis vrste .....	33
6.1.2	Razširjenost .....	34
6.1.3	Ekološka vloga .....	34
6.1.4	Uporaba v testih strupenosti .....	34
6.2	Nestandarden testni organizem: kopenski rak enakonožec ( <i>Porcellio scaber</i> ) .....	36
6.2.1	Opis vrste .....	36
6.2.2	Razširjenost .....	36
6.2.3	Ekološka vloga .....	37
6.2.4	Uporaba v testih strupenosti .....	37
6.3	Standarden testni organizem: vodna bolha ( <i>Daphnia magna/Daphnia pulex</i> ) .....	38
6.3.1	Opis vrste .....	38
6.3.2	Razširjenost .....	39
6.3.3	Ekološka vloga .....	39
6.3.4	Uporaba v testih strupenosti .....	40
7	PRESOJA RAZLIČNIH TIPOV KEMIKALIJ .....	42
7.1	Industrijske kemikalije .....	42
7.2	Nanomateriali in nanodelci .....	42
7.3	Kovine .....	43
7.4	Biološko aktivne snovi .....	44
7.4.1	Pesticidi .....	45



7.4.2	Veterinarska in humana zdravila .....	45
8	NEVRETEŃARJI V OCENI TVEGANJA ZA OKOLJE .....	47
8.1	Identifikacija nevarnosti .....	48
8.2	Ocenjevanje izpostavljenosti .....	48
8.3	Ocenjevanje učinkov .....	49
8.4	Opredelitev tveganja .....	49
9	SKLEPI .....	50
10	POVZETEK .....	53
11	SUMMARY .....	55
12	VIRI .....	57

## KAZALO SLIK

Slika 1:	Shematski prikaz prenosa kemikalije v istem mediju (pod št. 1, 5, 8) in med različnimi mediji (pod št. 2,3,4,6,7) zaradi advekcijskih in disperzijskih mehanizmov.....	16
Slika 2:	Shematski prikaz poti bioprivzema in nadaljnje usode kemikalije na modelu deževnika. ....	20
Slika 3:	Shematski prikaz najpomembnejših dejavnikov za zasnovo testa strupenosti .....	23
Slika 4:	Pretočni sistem za test na vodnih bolhah ( <i>Daphnia magna</i> ).....	26
Slika 5:	Poenostavljen odnos med koncentracijo snovi in učinkom. ....	29
Slika 6:	Povezava med biodiverzitetjo (x os) in funkcionalnostjo ekosistema (y os).....	31
Slika 7:	Deževnik ( <i>Eisenia fetida</i> ) .....	33
Slika 8:	Kopenski rak enakonožec ( <i>Porcellio scaber</i> ). ....	36
Slika 9:	Vodna bolha ( <i>Daphnia magna</i> ). ....	39
Slika 10:	Shematski prikaz potrebnih korakov v oceni tveganja za okolje. ....	48

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Uporabna področja ekotoksikoloških študij na področju presoje in biomonitoringa. ....	4
Preglednica 2:	Pregled in osnovni opis različnih pristopov do testiranja strupenosti na vrsti ali več vrstah.....	9
Preglednica 3:	Primerjava testov akutne in kronične strupenosti .....	35
Preglednica 4:	Pregled študij za nekatere tipe kemikalij. ....	38
Preglednica 5:	Osnovne značilnosti testov akutne in kronične strupenosti na vrsti <i>D.magna/D.pulex</i> .....	41
Preglednica 6:	Vpliv količine proizvedenih kemikalij na zahtevane ekotoksikološke podatke. ....	42

## SEZNAM OKRAJŠAV

BKF: biokoncentracijski faktor

DDT: dikloro difenil trikloroetan

EC<sub>50</sub>: koncentracija, ki ima določen učinek na 50% izpostavljenih osebkov

ECC: Evropska ekonomska skupnost

ERA: ocena tveganja za okolje

ESTMA: Organizacija za testiranje in materiale

ISO: Mednarodna organizacija za standardizacijo

Kp: porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda

LC<sub>50</sub>: koncentracija, ki povzroči letalnost pri 50% izpostavljenih osebkov

LOEC: najnižja koncentracija z opaznim učinkom na izpostavljene osebkove

NOEC: koncentracija brez opaznega učinka na izpostavljene osebkove

NEL: odmerki brez učinka

OECD: Organizacije za gospodarsko sodelovanje in razvoj

PAH: policiklični aromatski ogljikovodiki

PCB: poliklorirani bifenili

PEC: predvidena okoljska koncentracija

PNEC: predvidena koncentracija brez učinka

TCDD: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin

US EPA: Organizacija za varovanje okolja in standardizacijo

# 1 UVOD

Ohranjanje kvalitete, rodovitnosti in strukture tal ter čistosti vodnih teles je bistvenega pomena za biodiverzitetu in ekološko integriteto kopenskih in vodnih ekosistemov (Renoux in Sunahara, 2002) ter za sonaravno upravljanje z njimi (Peijnenburg in Vijver, 2009), kar je glavno načelo trajnostnega razvoja (Cairns, 2000). Za sledenje tem smernicam, moramo za kemikalije, ki jih dandanes intenzivno uporabljamo, natančno poznati kratkotrajne in predvsem dolgotrajne (subletalne) učinke na okoljske organizme. Pri tem si lahko v veliki meri pomagamo z uporabo testov strupenosti na kopenskih in vodnih nevretenčarjih, ki so zelo primerni indikatorji (kemičnega) stresa in imajo osrednjo vlogo v funkcionalnosti ekosistema (Renoux in Sunahara, 2002).

## 1.1 Opredelitev problema

Eden poglobitnih problemov, s katerim se soočamo v svetu zadnjih nekaj desetletij je onesnaževanje okolja z raznovrstnimi snovmi - kemikalijami (Sánchez-Bayo, 2011; Cardoso in Alves, 2012), ki lahko z bioaktivnim delovanjem negativno vplivajo na neciljne prostoživeče organizme, zmanjšujejo njihovo številčnost in s tem vplivajo na glavna ekosistemska parametra – strukturo in dinamiko (Gargošová idr. 2011). Takšne kemikalije so ekotoksične za nekatere vrste in predstavljajo aktualni problem – s skupnim imenovalcem, da so za organizme strupene že v relativno majhnih koncentracijah (mg ali µg/L ali kg medija) (Sánchez-Bayo, 2011). Po dostopnih podatkih dandanes uporabljamo več kot 100.000 različnih kemikalij, vsako leto se na trgu pojavi okoli 1700 novih, kar je že s stališča pridobivanja najnujnejših podatkov o vplivih teh kemikalij na okolje velik zalogaj (Cairns, 2010).

Ker smo priča masovni uporabi farmacevtskih učinkovin, pesticidov (Danaher idr. 2012), industrijskih kemikalij, prehranskih dodatkov in drugih strupeno rizičnih snovi (AltTox, 2011), nas upravičeno skrbi njihov vpliv na okolje (Danaher idr. 2012). Danes z veliko težavo najdemo regijo na svetu, kjer se ne pojavljajo ostanki ali sledovi organskih in anorganskih onesnaževal antropogenega izvora (Sánchez-Bayo idr. 2011). Podatki kažejo tudi na to, da se uporaba in proizvodnja novih farmacevtskih učinkovin (humanih in veterinarskih) letno povečuje (Kolar idr. 2008), obenem pa razpolagamo z majhno mero podatkov o njihovih vplivih na ekosistem (Patwardhan in Ghaskadbi, 2013).

Zaradi kemičnega onesnaževanja čutijo posledice bolj občutljivi organizmi, med katere v veliki meri prištevamo tudi nevretenčarje, ki so zelo pomembni pri tvorjenju pestrosti in ohranjanju stabilnosti ekosistema. Opravljajo namreč številne in zelo pomembne ekosistemske funkcije (npr. predelava organske snovi, opraševanje itd.) prav tako so bistven člen v prehranjevalni verigi, tako v kopenskih kot tudi v vodnih ekosistemih (Macadam idr. 2009; Lagadic in Caquet, 1998).

Ravno zaradi zelo pomembne vloge nevretenčarjev v ekosistemu, je njihova uporaba v ekotoksikoloških študijah in standardiziranih testih strupenosti zelo razširjena. Še zlasti uporabljamo tiste vrste kopenskih in vodnih nevretenčarjev, ki so reprezentativni v svojem trofičnem nivoju in že temeljito raziskani (Cardoso in Alves, 2012). Izmed teh v tej diplomski nalogi obravnavamo izbrana kopenska organizma, to sta deževnik (*Eisenia fetida/andrei*)

(standardna testna vrsta) in rak enakonožec (*Porcellio scaber*) (nestandardna testna vrsta) in izbrani vodni organizem, tj. vodna bolha (*Daphnia magna/Daphnia pulex*) (standardna testna vrsta). Za te vrste smo naredili podrobnejši pregled in primerjavo testov strupenosti ter obravnavali učinke na nivoju celotnega sistema – organizma, to so letalnost, zmanjšana reprodukcija, motnje rasti itd.

Z uporabo testnih nevretenčarskih organizmov lahko tako na splošno ocenimo stanje okolja (biomonitoring) ali pred komercialno uporabo določene kemikalije testiramo njene učinke (strupenost). Standardne postopke testiranja strupenosti na nevretenčarjih predpisujejo mednarodne organizacije kot so Mednarodna organizacija za standardizacijo (ISO), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD), Organizacija za varovanje okolja in standardizacijo (US EPA), Organizacija za testiranje in materiale (ESTMA), Evropska ekonomska skupnost (EEC) idr. (Gargošová idr. 2011). V ekotoksikoloških študijah na nevretenčarjih se pojavljajo tudi nestandardni postopki, v njih se pogosto uporablja kopenskega raka enakonožca (*P. scaber*) (Drobne, 1997).

Kot posledica onesnaževanja s kemikalijami (predvsem s pesticidi) v celotni Evropi biodiverziteti nevretenčarjev upada, le nekaj vrst je ustrezno zaščiteneh (Cardoso in Alves, 2012). Strokovnjaki na tem področju so enotni in opozarjajo, da se populacije kopenskih nevretenčarjev (zlasti v Veliki Britaniji) nevarno zmanjšujejo. Eden od glavnih krivcev je predvsem onesnaževanje okolja zaradi uporabe kemikalij v kmetijstvu. Strupene snovi so prisotne tudi v vodnih telesih (predvsem sladkovodnih) in poleg eutrofikacije in zakisanosti povzročajo zmanjševanje populacij vodnih nevretenčarjev (Macadam idr. 2009).

## 1.2 Namen in cilji diplomske naloge

Glede na podatke, da smo dandanes priča široki rabi in izpustom kemičnih snovi v okolje, kakor tudi veliki težnji po ustvarjanju novih, je namen diplomskega dela raziskati, kako lahko s pomočjo različnih modelov testiranja strupenosti na kopenskih in vodnih nevretenčarjih predvidevamo obnašanje strupov v živih sistemih ter kakšno vrednost imajo rezultati testiranja pri zmanjševanju oz. prepovedi uporabe strupenih snovi, ki lahko imajo kvarne učinke za prostoživeče organizme, združbe ali celoten ekosistem.

Nadalje želim prikazati standardizirane metode testiranja strupenosti na izbranih kopenskih in vodnih nevretenčarjih ter raziskati njihovo uporabno vrednost in uspešnost pri testiranju strupenih snovi. Predstavil bom vsako metodo testiranja posebej, ovrednotil njeno funkcijo ter prikazal prednosti in slabosti posamezne metode. Prav tako bom predstavil tudi eno testno vrsto, ki še ni mednarodno standardizirana, a se pogosto uporablja, kar bo služilo končni primerjalni razpravi.

Cilj, ki ga želim doseči, je natančno raziskati vlogo različnih testnih vrst, pri uporabi različnih metod testiranja za dokončno razumevanje delovanja strupenih snovi na žive organizme. Obenem pričakujem, da bom s pomočjo zastavljenih delovnih hipotez pridobil odgovore, ki bodo osvetlili nekatera področja ekotoksikologije in doprinesli k boljšemu razumevanju, pregledu in pomenu testiranja strupenosti na nevretenčarjih.

### 1.3 Hipoteze

V diplomski nalogi preverjamo naslednje hipoteze:

- Glede standardnih in nestandardnih testov

Standardni postopki, ki jih predpisujejo različne organizacije po svetu, so med seboj primerljivi in v nekaterih primerih tudi združljivi.

Nestandardizirani postopki testiranja strupenosti na nevretenčarjih služijo kot podpora standardnim in so izjemno pomembni pri kritični presoji rezultatov.

- Glede uporabe različnih vrst nevretenčarjev

Deževniki so, kot predstavniki testnih organizmov, ki živijo v zemlji ena bolj preučevanih vrst neveretenčarjev, zlasti vrsta *E. fetida*, medtem ko je med vodnimi organizmi to vodna bolha vrste *D. magna*.

Med nestandardiziranimi organizmi, živečimi na kopnem so med bolj pogosto uporabljenimi kopenski raki, zlasti vrsta *P. scaber*, med bolj preučevanimi.

- Glede izvora testiranih snovi/strupov

Izvor preučevane snovi/strupu ima vpliv na izbor testnega organizma, vrste testa in spremljan odziv (endpoint).

Večja kompleksnost naravnega okolja lahko vodi do razhajanj med rezultati laboratorijskih testiranj strupenosti in stanjem bioindikatorjev iz okolja.

## 2 EKOTOKSIKOLOŠKE ŠTUDIJE

Za preučevanje negativnih vplivov na kopenski in vodni ekosistem, ki so lahko v veliki meri posledica strupenih onesnaževal, se v 70. letih prejšnjega stoletja pojavi nova veda - ekotoksikologija. Zaradi velike kompleksnosti okolja v ekotoksikologiji uporabljamo izrazito multidisciplinaren pristop, ki povezuje znanja iz ekologije, kemije in toksikologije z namenom razumevanja kompleksnosti interakcij strupov v naravnem okolju (Sánchez-Bayo, 2011).

Glavni namen te vede je ovrednotiti, razumeti in predvideti škodljiv vpliv ksenobiotikov na organizme. V ekotoksikologiji preučujemo učinke na nivoju vrste, populacije, združbe ali celotnega ekosistema (Wijesinghe, 2012). Zaradi kompleksnosti okolja, je pomembno tudi preučevanje prenosa, usode in vzajemnega delovanja med nevarnimi snovmi in okoljem (Sedmak, 2011). Glavni cilj, ki ga želimo z ekotoksikološkimi raziskavami doseči je zaščita celotnega ekosistema – njegove strukture in funkcije (Van Gestel, 2012). Da bi bili pri tem uspešni, uporabljamo merljive odzive (npr. preživetje, reprodukcijska uspešnost, izguba telesne mase idr.), ki nam jih podajo organizmi v testiranju strupenosti in jih izražamo s parametri (npr. LC<sub>50</sub> - srednja letalna koncentracija, EC<sub>50</sub> - srednja koncentracija učinka, LOEC - najnižja koncentracija z opaznim učinkom in NOEC - koncentracija brez opaznega učinka).

Največkrat se poslužujemo uporabe tehtno izbranih (ekosistemsko reprezentativnih in standardiziranih) organizmov in s pridobljenimi rezultati testiranja določimo tiste (varne) koncentracije kemikalij, ki nimajo pomembnega učinka na populacijo in združbo v ekosistemu (Sánchez-Bayo, 2011). Medtem ko so testi strupenosti zasnovani tako, da nam pomagajo oceniti takojšne učinke kemikalije pred izpustom v okolje, z metodami biomonitoringa ocenjujemo dolgoročne učinke, npr. biomagnifikacijo (proces kjer prihaja do povečevanja koncentracije strupene snovi vzdolž prehranjevalne verige, kar je možno zaradi večje sposobnosti organizmov, da nekatere snovi po privzetju kopičijo in ne izločijo) in beležimo spremembe (trende stanja) v okolju zaradi nekega onesnaževalca, ki je tam že prisoten (Cardoso in Alves, 2012).

Z uporabo ekotoksikoloških študij si lahko pomagamo na različnih področjih presoje in biomonitoringa številnih onesnaževalcev v okolju (Preglednica 1). Testiranje strupenosti ima pomembno vlogo tudi v okoljski zakonodaji (Van Straalen, 2003).

Preglednica 1: Uporabna področja ekotoksikoloških študij na področju presoje in biomonitoringa.

<b>Ekotoksikološke študije za kopenske in vodne ekosisteme</b>	
Področja raziskav	Vključenost v pomembnejše predpise EU
<b>Presoja</b>	
-Odpadne vode -Izcedne vode	Vodna direktiva (angl. Water Framework Directive) 2000/60 EC
Novo proizvedene kemikalije	Direktiva 93/67/EEC, REACH
<b>Biomonitoring</b>	
Tal	Uredba Evropskega parlamenta in Sveta (ES) št. 850/2004 o obstojnih organskih onesnaževalih
Vode in sedimentov	Vodna direktiva 2000/60 EC

(Vir: Povzeto po Cardoso in Alves, 2012; Ministrstvo za okolje in prostor Republike Slovenije)

Splošno gledano so lahko testni modeli v ekotoksikoloških študijah zelo različne vrste organizmov iz različnih taksonomskih skupin, npr. bakterije (razkrojevalci), alge (proizvajalci), nevretenčarji in ribe (potrošniki) (Adams in Rowland, 2003). Za ugotavljanje natančnejših učinkov v raziskavi lahko uporabimo tudi po eno reprezentativno vrsto iz vsakega trofičnega nivoja (Cairns, 2000). Pri testiranju strupenosti kemikalij za vodne organizme je to tudi zakonjeno (Deydier, 2013).

Zelo veliko se v ekotoksikoloških študijah, zaradi ekoloških, toksikoloških in ekonomskih prednosti, uporabljajo kopenski in vodni nevretenčarji. Razlogov za to je več: poleg bakterij predstavljajo skupino bolj razširjenih organizmov na Zemlji, saj poseljujejo skoraj vse vrste habitatov, imajo kratko življenjsko dobo in se hitro ter številčno razmnožujejo, hkrati so zelo občutljivi na kemikalije (Cattaneo, 2009).

Največji delež ekotoksikoloških študij obsega laboratorijska testiranja z namenom ocenitve primernosti uporabe na novo proizvedenih kemikalij. V tem primeru skušamo z laboratorijskim testiranjem določene živalske vrste določiti vrednosti brez opaznega učinka (NOEC) in slednjo prenesti na nivo populacije in združbe v kopenskem ali vodnem ekosistemu (Van Gestel, 2012). Takšen prenos (ekstrapolacija) rezultatov je zaradi vseh interakcij (med medijem, kemikalijami in organizmi) v naravnem okolju precej zahtevna naloga. Zato imajo v tem procesu veliko težo tudi praktične izkušnje s preteklimi primeri onesnažitve okolja, ki so običajno zelo dolgoročnega značaja (desetletje ali več) (Bourdeau idr. 1990).

Ker želimo za vsako kemikalijo v čim večji meri poznati dolgoročne učinke na ekosistem, je v ekotoksikologiji pomembno: (1) dobro poznati subletalne učinke strupenih snovi, (2) način izpostavitve, privzem snovi in procese v organizmu (metabolizem in skladiščenje) (Van Gestel, 2012).

## 2.1 Razvoj in prihodnji izzivi

Prelomnica v načinu dojemanja onesnaženosti okolja je po mnenju mnogih knjiga *Silent Spring* (Tiha pomlad), avtorice Rachel Carson, ki je bila izdana leta 1962. V njej so opisani negativni učinki uporabe sintetičnih kemikalij za neciljne organizme, kar je pritegnilo pozornost širše javnosti. Nekaj let po izdaji knjige so sledile številne raziskave učinkov sintetičnih kemikalij na neciljne organizme (predvsem na plenilske vrste ptic). Rezultat raziskav je bil, od leta 1972 naprej, prepovedana uporaba pesticida DDT, ki je imel, kot se je izkazalo, negativne učinke na reprodukcijsko uspešnost nekaterih vrst ptic. To je bil začetek intenzivnejših raziskav okoljskega onesnaževanja z različnimi skupinami kemikalij (Wijesinghe, 2012).

Pojem ekotoksikologija je prvič uporabil Truhaut in sicer leta 1969. Po njegovi definiciji je ekotoksikologija: »Veja toksikologije, ki obravnava strupene učinke naravnih ali sintetičnih onesnaževal na ekosistem in njegove sestavne dele«. Potrebo po novi vedi – ekotoksikologiji, je povzročilo tudi zavedanje, da so lahko negativni učinki zaradi prehajanja onesnaževal po prehranjevalni verigi (biomagnifikacija) še izrazitejši kot direktni učinki na organizme (prav tam, 2012).

Za podporo v ocenjevanju tveganja pri uporabi strupenih snovi je bil v 80. in 90. letih preteklega stoletja razvoj testov strupenosti prioriteta. Predvsem je bil v ospredju razvoj testov strupenosti

na posamezni vrsti v kontroliranih pogojih (laboratoriju), kot tudi bolj realističnih študij na modelu ekosistema in terenskih testiranj, z glavnim poudarkom na tem, da bi iz sistema pridobili čim bolj natančen vpogled v strukturne (število in biomasa vrste) in funkcijske (interakcije med organizmi) odzive ekosistema (Gargošová idr. 2011). Tako so se v zadnjih 30. letih razvile številne standardne metode testiranja strupenosti. Največjo vlogo pri standardizaciji je imela organizacija OECD, ki je v sklopu programa »testiranje kemikalij« harmonizirala testne postopke in jih uspešno standardizirala. V zgodnjih 80. letih je organizacija OECD izdala 51 standardnih postopkov ocenjevanja učinkov in usode kemikalij v okolju, tako smo jih imeli pred nekaj leti na voljo 55 (Hilbeck idr. 2008).

Kljub temu, da so bili nevretenčarji že zelo dobro raziskani in je bilo znano, da so zelo primerni za uporabo v bioindikaciji, je bila do leta 1995 mednarodno standardizirana samo uporaba deževnikov v umetni zemljini (OECD, 1984). Danes sicer obstaja še druga vrsta standardnih protokolov, ki jih predlaga ISO in so med drugim na voljo tudi za ocenjevanje učinkov na nevretenčarjih. Kot primer lahko izpostavimo postopek testiranja strupenosti na skakačih (*Folsomia candida*) (ISO, 1999) in tudi na deževnikih (*Eisenia fetida/andrei*) (ISO, 2012). Še vedno je standardnih testov strupenosti za kopenske organizme manj kot za vodne (Cardoso in Alves, 2012).

V 70. letih so bile ustanovljene tudi številne organizacije, ki so pripomogle k razvoju orodij, ki služijo pri odločitvah o regulaciji onesnaževanja okolja s kemikalijami. Med njimi so Mednarodna akademija za varnost okolja (IAES, Mednarodna ekotoksikološka skupnost za varnost okolja (SECO-TOX) in Združenje za okoljsko toksikologijo in kemijo (SETAC) (prav tam, 2012).

Danes so glavna okoljska onesnaževala v Evropi in Severni Ameriki pod nadzorom regulacijskih teles, njihova uporaba zato upada in s tem tudi uporaba testnih organizmov za določanje neposredne strupenosti. Glavni izziv ostaja biomonitoring onesnaženih območij in ocenjevanje na novo proizvedenih kemikalij (Van Straalen, 2003). Potrebno je poudariti, da se pojavlja vse večja potreba po modifikaciji obstoječih testov strupenosti, da bodo primernejši za testiranje strupenosti nekaterih t.i. novodobnih kemikalij kot so nanodelci (Van Gestel, 2012) ali za presojo tveganja za okolje pri uporabi gensko spremenjenih organizmov (GSO) (Hilbeck, 2008).

Ker se nahajamo v dobi hitrih družbenih, tehnoloških in okoljskih sprememb, je nadaljnji razvoj ekotoksikologije povezan s temi tremi segmenti. Cairns (2000) meni, da je prihodnost, z novo paradigmo trajnostnega razvoja, v ekotoksikologiji povezana z razvojem novih tehnik, ki bodo v skladu: (1) s povečanim interesom trajnostnega izkoriščanja materialnih dobrin; (2) z zaščito ekosistemskih storitev; in (3) s poudarkom na robustnosti (zdravju) ekosistema in ne zgolj preprečitvi letalnosti organizmov, kot je bilo to pravilo v preteklosti.

Zaradi podnebnih sprememb je v bližnji ali daljni prihodnosti neizogibno, da bomo primorani razviti nove postopke v ekotoksikologiji. Tudi manjše spremembe temperature (npr. 2-3 °C) vplivajo na razgradnjo in privzem kemikalij. Širitev tropske podnebne cone na sever in jug bo ustvarila potrebo po uporabi drugih testnih vrst, prav tako bodo nastale druge ekosistemске spremembe, ki jih bo potrebno upoštevati v testih strupenosti. Tako bomo primorani bodisi modificirati standardizirane postopke, bodisi razviti nove načine testiranja strupenosti (Cairns, 2008).

Aktualna težava v zadnjih letih je natančnejše razumevanje interakcij med različnimi kemikalijami (strupenost mešanic) in med kemikaliji ter ostalimi stresorji v okolju (Gargošová idr.



2011). Pojavlja se tudi potreba po razvoju novih orodij, ki bodo pripomogla k učinkovitejši ekstrapolaciji testnih rezultatov na različne nivoje ekosistemske organiziranosti (Bourdeau idr. 1990). Prav tako nekateri avtorji (Gargošová idr. 2011; Tišler in Zagorc-Končan, 2008) navajajo potrebo po večji vključenosti testov strupenosti za okoljske analize, ki bodo tudi zakonodajno podprte (npr. za presojo aktivnega blata, iztokov iz čistilnih naprav ipd.).

Razvijajo se tudi modeli za natančnejšo oceno regulativnih procesov pri identifikaciji farmacevtskih učinkovin, ki lahko predstavljajo tveganje za neclilne organizme v vodnih telesih in zagotovitev pravilno izbranih ter dovolj občutljivih testov za uporabo v oceni tveganja farmacevtikov za okolje. Na tem področju so možnosti razvoja naslednje: (1) razvoj novih standardnih testov, ki bodo primernejši za presojo farmacevtskih učinkovin; (2) prilagoditev obstoječih testov z dodanimi odzivi organizma, ki bodo omogočali spremljanje zelo različnih učinkov farmacevtikov in (3) povečati uporabo nestandardnih postopkov v oceni tveganja (Agerstrand, 2011).

## 2.2 Dopolnjevanje s kemijsko – fizikalnimi metodami

Kemijske analize so zelo pomembne pri identifikaciji ksenobiotikov v okolju (Tišler in Zagorc-Končan, 2008) in ugotavljanju njihovih koncentracij, ki jih primerjamo s predpisanimi vrednostmi, vendar si z njimi ne moremo dovolj dobro pomagati pri ocenjevanju učinkov na organizme. Pomanjkljivost tega pristopa je, da četudi noben izmerjen parameter ne presega mejnih vrednosti, lahko prihaja do negativnih učinkov na organizme (Lobnik, 2008). Uporaba kemijsko-specifičnega pristopa je še posebej pomanjkljiva pri ocenjevanju kompleksnih mešanic, kot so iztoki iz industrijskih obratov in čistilnih naprav. Mnogo primerneje je določanje strupenosti iztokov z izpostavitvijo vodnih organizmov, kar pripomore k pravilnejši karakterizaciji iztokov (Tišler in Zagorc-Končan, 2008).

Za karakterizacijo nevarnosti ksenobiotikov za okolje moramo natančno poznati njihov vpliv na organizem, to lahko dosežemo samo z uporabo biotesta. Za merjenje kvalitete vode, sedimenta, tal in stanja živali lahko poleg fizikalno-kemijskih analiz uporabljamo tudi ekotoksikološke teste (Lobnik, 2008). Po navedbah številnih avtorjev (Tišler in Zagorc-Končan, 2008; Lobnik, 2008; Sánchez-Bayo, 2011) je uporaba biotestov pri ocenjevanju kompleksnih mešanic kemikalij zelo potrebna, vendar za vsa področja še ni zakonsko določena. Vedno več bioloških testov je sicer mednarodno standardnih in so del državnih zakonodaj (Lobnik, 2008).

Po Lobnik-u (2008) so pomanjkljivosti kemijske analize pri presoji učinkov na organizme naslednje:

- strupenost lahko povzročajo snovi, ki v kemijsko analizo niso vključene;
- snovi, katerih koncentracije ne presegajo mejnih vrednosti, so lahko v medsebojnih kombinacijah ali v določenih razmerah izredno strupene;
- strupeni so lahko tudi razgradni ali pretvorbeni produkti;
- ni jasna količina snovi, ki je biološko dostopna;

- ni jasen vpliv na živo naravo;
- ob spremembah razmer v okolju pride do aktivacije snovi ali sproščanja snovi akumuliranih v zemlji ali sedimentu v velikih koncentracijah v okolje (navadno v površinsko ali podtalno vodo).

Ekotoksikološki testi so edini način s katerim lahko natančno ocenimo učinke kemikalij, nevarnih odpadkov in drugih mešanic na ekosistem. Z uporabo obeh pristopov – kemijske analize in biotesta lahko identificiramo potencialno strupene snovi in tudi razumemo njihove vplive na kopenske in vodne ekosisteme (Gargošová idr. 2011). Danes je tudi splošno sprejeto prepričanje, da preprosta biološka analiza – prisotnost oz. odsotnost določenih živalskih vrst (še posebej populacije ali združbe) v vodnem ekosistemu predstavlja bolj zanesljiv indikator o (dolgoročnem) stanju okoljskih pogojev kot kemijsko – fizikalne meritve (Adams in Rowland, 2003).

### **2.3 Pristopi k testiranju strupenosti**

V ekotoksikološkem testiranju lahko izbiramo med širokim naborom testnih postopkov in modelov. V splošnem se odločamo med dvema načinoma: uporabimo standardne ali nestandardne postopke (Agerstrand, 2011).

Za testiranje strupenosti lahko uporabimo testne modele z eno vrsto, ki je reprezentativna v svojem trofičnem nivoju, ali večimi vrstami iz različnih trofičnih nivojev. Izbira je odvisna od tega, katere odzive želimo poiskati. S testiranjem ene vrste želimo izvedeti direktne učinke strupene snovi na življenjske procese (preživetje, reprodukcija, rast itd.). Medtem ko s testiranjem več vrst v prirejenem ekosistemu (mikro ali mezokozmos) ugotavljamo indirektne učinke testnih snovi s parametri, ki opisujejo npr. določene ekosistemske procese (razpad organske snovi), strukturo (število in biomasa vrste), funkcionalnost ekosistema (interakcije med organizmi) in usodo testnih snovi (privzem v organizem). Uporabljamo jih za ocenjevanje učinkov na vodne in kopenske sisteme (Sánchez-Bayo, 2011; Renoux in Sunahara, 2002). Pri takšnem načinu testiranja običajno ne iščemo klasičnih odzivov, ki so značilni za teste strupenosti na eni vrsti in so še najprimernejši za specifične študije, npr. kadar želimo preveriti učinke strupenih snovi na v znanem, določenem okolju (Renoux in Sunahara, 2002). Čeprav so opisani testi ekološko zanesljivejši kot testi z eno vrsto, je ekstrapolacija rezultatov med različnimi okolji zaradi specifičnosti posameznih okoljskih pogojev, zelo težavna. Naravni pogoji in ekologija sistema morajo biti dobro znani, to žal za večino okolij ni na voljo (Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

V raziskovalne namene uporabljamo zelo različne teste strupenosti na nevretenčarjih. Razdelimo jih lahko na: standardne teste, s katerimi merimo predvsem preživetje in reprodukcijo in so splošno uveljavljeni ter standardizirani s strani mnogih mednarodnih organizacij, zato jih praviloma edine uporabljamo v zakonodaji; nestandardne teste, ki so lahko standardizirani oz. priznani s strani katere od mednarodnih organizacij in običajno omogočajo merjenje specifičnih odzivov (npr. izogibalna sposobnost deževnika) ali so tudi specifične zasnove (mikro/mezokozmos model) in zaradi takšnih značilnosti ne ustrezajo vsesplošni uporabi, zato jih

v tem smislu ne prištevamo med standardne teste. Med nestandardne teste (npr. test na raku enakonožcu) lahko prištevamo tudi takšne, ki niso standardizirani s strani kakšne od mednarodnih organizacij, vendar lahko z njimi merimo standardne odzive kot je preživetje, kakor tudi nestandardne kot je stopnja prehranjevanja, za kar obstajajo strokovna priporočila metod testiranja.

Čeprav v zakonodajnih postopkih praviloma uporabljamo standardizirane metode, lahko v nekaterih primerih uporabimo tudi nestandardne metode (npr. mezokozmos model), vendar je potrebno takšen postopek temeljito obrazložiti in dokumentirati (Deydier, 2013).

V (Preglednica 2) je predstavljena klasifikacija testov strupenosti, ki jih uporabljamo v oceni tveganja za okolje in jih lahko opredelimo glede na število vrst vključenih v testiranje, čas trajanja in še natančneje, glede na način izvajanja v laboratorijske teste in kompleksnejše študije, ki vključujejo več vrst in so okoljsko reprezentativnejše, vendar dražje in precej dolgotrajnejše (Cardoso in Alves, 2012).

Preglednica 2: Pregled in osnovni opis različnih pristopov do testiranja strupenosti na vrsti ali več vrstah.

Uporaba ene vrste	Opazovani odzivi	Merljivi parametri odziva	Čas trajanja testa	Mednarodne organizacije
Laboratorijski test	Preživetje, reprodukcijska uspešnost, rast itd.	LC <sub>x</sub> , EC <sub>x</sub> , LOEC in NOEC	do 8 tednov	(OECD, US EPA, ISO, ESTMA, EEC idr.)
Izogibalni test*	Izogibanje	EC <sub>x</sub>	do 3 dni	(ISO) -Učinki onesnaževal na deževnike, 17512-1:2008 -Učinki onesnaževal na skakače, 17512-2:2011
<b>Uporaba več vrst</b>				
Test v modelnem ekosistemu (mikro in mezokozmos)	Ekosistemski procesi, struktura, funkcionalnost ekosistema, usoda kemikalije	NOEC, EC <sub>x</sub>	do več mesecev	(US EPA) -Pretočni sladkovodni test, OPPTS850.1900
Terenski test	Številčnost in diverziteta vrst	NOEC, LOEC	do 1. leta	(ISO) - Učinki onesnaževal na deževnike, ISO/DIS 11268-3

(Vir: Prirejeno po Gherhardt in Bolcu, 2011; Cardoso in Alves, 2012; Renoux in Sunahara, 2002; Van Gestel, 2012)

\*Se uporablja kot dopolnilna metoda pri ocenjevanju ekotoksičnosti kemikalij

Kot najpomembnejšo fazo lahko opredelimo testiranje strupenosti na posameznih vrstah iz najpomembnejših trofičnih nivojev (nevretenčarji in rastline), nato sledijo ostale faze kot so

preučevanje učinkov na nivoju združbe z uporabo modelnega ekosistema (Cardoso in Alves, 2012).

Testi z eno vrsto imajo številne prednosti za zagotavljanje potreb pri rutinski uporabi (Van Leeuwen in Vermeire, 2007):

- so hitro izvedljivi, enostavni za uporabo in ekonomični;
- se lahko standardizirajo;
- so relativno enostavni za ponovitev;
- z njimi lahko merimo zelo različne učinke strupenosti.

Po drugi strani imajo testi z več vrstami številne prednosti z ekološkega stališča (Kuperman idr. 2002):

- so visoko primerljivi z naravnim okoljem in ponovljivi;
- dajejo podatke o funkciji in strukturi ekosistema;
- dajejo podatke posrednih in sinergističnih učinkov kemikalij na nivoju ekosistema;
- dajejo podatke o usodi kemikalij.

## **2.4 Standardne metode testiranja strupenosti**

Standardne metode, kot že omenjeno, predpisujejo številne mednarodne organizacije za standardizacijo, uradne mednarodne organizacije in nacionalne organizacije. Slednje se rutinsko uporabljajo in predstavljajo najpomembnejši del pri ocenjevanju ekološkega tveganja pri uporabi kemikalij (Agerstrand, 2011). Zaradi zelo pomembne vloge v biosferi se v standardnih metodah pojavljajo tudi številni vodni in kopenski nevretenčarji. Največ standardov obstaja na področju sladkovodnih nevretenčarjev – predvsem gre za test z vodnimi bolhami in kotačniki (Renoux in Sunahara, 2002). Razlogi za to so: (1) večino strupenih snovi najdemo v vodnih telesih, (2) so enostavnejši za izvedbo in (3) predstavljajo prvo stopnjo pri iskanju učinkov ksenobiotikov na okolje (OECD, 2006). Dodaten razlog, da okoljske agencije po svetu več pozornosti namenjajo vprašanju usode onesnaževalcev vodnih teles v primerjavi s kopnim, saj je tveganje razpršitve onesnaženja bistveno večje (Robinson in Thorn, 2005).

## **2.5 Nestandardne metode testiranja strupenosti**

Poleg standardnih metod, opisanih v uradnih dokumentih, je drugje v literaturi opisana tudi uporaba številnih nestandardnih testnih metod (EPA, 1994) s katerimi lahko v nekaterih primerih obravnavamo bolj občutljive vrste, ki nudijo dodatne in pomembne informacije za oceno ekološkega tveganja (NAS, 2006). Nestandardne testne metode so različno zasnovane in so na voljo za laboratorijsko testiranje, teste na modelu kopenskega ekosistema (mikro in mezokozmos) in terenske teste (Peijnenburg in Vijver, 2009). Nekatero med njimi so tudi standardizirane s strani katere od mednarodnih organizacij (npr. izogibalni test).

V večini primerov so nestandardne metode primernejše za študije specifične narave (npr. način delovanja strupene snovi na vrsto, iskanje razlik v delovanju metabolizma med organizmi itd.) in ne ustrezajo zakonodajnim potrebam (NAS, 2006). V primeru modelnih ekosistemov z uporabo več vrst je razlogov več (Bourdeau idr. 1990): (1) čas trajanja testa je predolg (traja min. 45-90 dni); (2) kredibilnost testa za različna okolja je vprašljiva in (3) proces zahteva veliko človeške pozornosti, kar poveča stroške.

### **2.5.1 Laboratorijski testi z eno vrsto**

V testih strupenosti uporabljamo tudi nestandardne laboratorijske metode z uporabo nevretenčarjev. Ko govorimo o nestandardnih kopenskih nevretenčarjih, sodijo med najpogosteje uporabljene organizme kopenski enakonožni raki vrste *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea), ki je širše prepoznan kot ekološko zelo pomemben in toksikološko zanesljiv indikator strupenosti (Caseiro, 2000). V nekaterih primerih uporabljamo nestandardne metode, ker so ustreznejše za študije specifične narave (EPA, 1994) kot npr. način delovanja kemikalije na vrsto ali razlike v metabolizmu vrst. V takšne namene je primerna tudi uporaba nestandardnih metod (NAS, 2006). V laboratorijskih testih uporabljamo tako vodne kot kopenske nestandardne vrste (Caseiro, 2000; EPA, 1994).

Nestandardne testne metode imajo tudi potencialno razvojno vlogo, saj bi jih lahko v prihodnje uporabili za presojo novodobnih kemikalij kot so npr. nanodelci (Van Gestel, 2012) ali vse bolj razširjena raba farmacevtskih učinkovin (NAS, 2006).

### **2.5.2 Izogibalni test**

Testni pristop, ki v zadnjem času pridobiva na pomembnosti, je izogibalni test in zajema sposobnost deževnikov, da se izognejo onesnaženi zemljini (Peijnenburg in Vijver, 2009). To sposobnost deževnikov lahko uporabimo pri indikaciji strupenosti določene zemljine (Peijnenburg in Vijver, 2009) in jo uporabljamo za preliminarni del laboratorijskega testiranja, ko želimo ugotoviti koncentracije kemikalij z učinkom ali za hitro ocenitev naselivitvene sposobnosti okolja po sanaciji ipd. (Cardoso in Alves, 2012).

Deževniki so primerni zaradi kemičnih receptorjev na njihovi koži, ki so zelo občutljivi na prisotnost kemikalij. Zaradi tega in njihovega načina gibanja so zelo primerni za uporabo v izogibalnem testu. Še posebej veliko uporabljamo deževnike vrste *Eisenia fetida* (Gherhardt in Bolcu, 2011; Peijnenburg in Vijver, 2009). Glavni prednosti takšnega pristopa sta hitrejša ocenitev strupenosti kot pri standardnih testih (Peijnenburg in Vijver, 2009; Cardoso in Alves, 2012) in ekološko zanesljiv parameter (izogibanje), ki ga opredeljujemo kot visok prag občutljivosti (Cardoso in Alves, 2012) in ga z običajnimi testi strupenosti ne merimo (Gherhardt in Bolcu, 2011). Izvedba teh testov v povezavi s kroničnimi in akutnimi daje več podatkov o vplivu kemikalij na organizem, saj sprememba v obnašanju posameznega organizma ali cele populacije predstavlja učinek (Cardoso in Alves, 2012). Glede na to, da se pri akutnem in kroničnem testiranju o spremembah obnašanja redko poroča, je namen izogibalnega testa določiti spremembo obnašanja. Pomembna prednost takšnega testa je, da se relativno hitro izvede (Cardoso in Alves, 2012). Migracija deževnikov pomeni podobno kot letalnost – odsotnost koristnih funkcij in povečano degradacijo ekosistema (Gherhardt in Bolcu, 2011).

Lastnosti zemlje kot so količina in kvaliteta organske snovi, tekstura in pH zemljine, vplivajo na izogibalni odziv in očitno je, da se morajo lastnosti zemljine primerno upoštevati pri interpretaciji

rezultatov izogibalnega testa (Peijnenburg in Vijver, 2009). Testna zemljina, ki se uporablja, je umetna ali naravna iz neonesnaženih mest in zmerne podnebja (Gherhardt in Bolcu, 2011). Rezultati izogibalnih testov se izražajo z  $EC_{50}$  in drugimi deleži parametra EC (Cardoso in Alves, 2012).

### **2.5.3 Testi v prirejenem (modelnem) ekosistemu (mikro in mezokozmos)**

Študije v modelnem ekosistemu z uporabo več vrst so zasnovane tako, da lahko z njimi bolj realno od testiranj na eni vrsti, napovemo strupenost testirane snovi za ekosistem (Cardoso in Alves, 2012). V takšnih testih iščemo različne odzive sistema na strukturni ali funkcijski osnovi ekosistema, sestava modela je običajno pogojena z namenom študije za specifično naravno območje. Glede na strukturo se modelni sistemi razlikujejo po kompleksnosti, lahko so zelo različni v velikosti in sintetično ali naravno zasnovani. Prav tako so omejeni v biotskih in abiotskih komponentah (predvsem mikrokozmos) kar onemogoča enačenje z naravnim ekosistemom (Renoux in Sunahara, 2002).

V veliki meri umetno zasnovan model ekosistema (mikrokozmos) v primerjavi s testiranjem ene vrste omogoča relativno visok približek razmer v naravnem okolju in je hkrati učinkovito ponovljiv. V model mikrokozmosa uvrščamo teste, ki se običajno izvajajo v laboratorijskih pogojih in vključujejo vrste iz različnih trofičnih nivojev (prehranjevalna veriga), vključno z mikroorganizmi, ki imajo osrednjo vlogo pri kroženju hranil in pri procesih pretvorb kemikalij.

Podobno je osnovan tudi mezokozmos model, vendar s pomembno razliko v tem, da je večjih dimenzij in z več vključenimi organizmi, kar omogoča še natančnejšo primerjavo z naravnim okoljem. V modelu mezokozmosa tudi uporabljamo zemljino iz naravnega okolja in ohranjenim talnim profilom, vključno z naravno prisotno združbo organizmov in ga običajno izvajamo na prostem z nekaj zaščite pred okoljskimi vplivi (t.i. »semi-field« okolje). Glavni cilj tega sistema je čim natančneje posnemati razmere naravnega okolja, hkrati izvajati kontroliran in ponovljiv proces (Cardoso in Alves, 2012; Renoux in Sunahara, 2002).

Največji izziv pri sestavi modela z več vrstami je v tem, da po eni strani želimo čim bolj zmanjšati variabilnost sistema in doseči ponovljivost rezultatov, po drugi strani model narediti čim bolj primerljiv dejanskim naravnim razmeram, ki so zelo variabilne (Renoux in Sunahara, 2002).

Čeprav je velikost prirejenega ekosistema omejena, lahko preučujemo kompleksne biotske in abiotske interakcije. Parametre, ki se raziskujejo se lahko enostavno modelira, okoljske pogoje lahko kontroliramo, s čimer se izognemo nekontrolirani distribuciji ostankov in metabolitov v biosferi. Zasnova modelnih ekosistemov opisanih v literaturi se razlikuje v nekaterih glavnih značilnostih: velikosti, strukturi zemljine, uporabljenih organizmih (naravna ali izbrana združba) in glede na mesto izpostavitve (laboratorij ali naravno okolje) (Cardoso in Alves, 2012).

Takšna modela sta v primerjavi s testi na eni vrsti, manj ekonomična in ju običajno izvajamo z manj kontrolnimi skupinami. To je pomemben dejavnik, ki vpliva na pogostost njune uporabe. Ne uporabljamo ju za namen rutinskega preverjanja strupenosti snovi (prav tam, 2012).

Z uporabo modelnega ekosistema lahko v osnovi preučujemo: (1) usodo kemikalij; (2) direktni učinek na organizme; (3) indirektni učinek na ekosistem. Tako omogoča tudi merjenje prehranjevalne aktivnosti, vedenjska odstopanja in sposobnost izogibanja vrste (Peijnenburg in Vijver, 2009).

#### **2.5.4 Testi v naravnem okolju**

Terenska testiranja lahko uporabljamo v kombinaciji z modelnimi sistemi in na podlagi medsebojne primerjave rezultatov preverimo ustreznost modelnega sistema (Renoux in Sunahara, 2002). Pogoji pri takšnem načinu testiranja so zelo variabilni in se lahko močno spreminjajo v časovni enoti kot je 1 dan (npr. dnevno/nočni cikel), vpliv vremenskih razmer: količina dežja/snega, sprememba temperature idr. Negativne učinke na organizme se oceni na nivoju vrste in združbe z vpogledom v njihovo številčnost, populacijsko gostoto in stopnjo odraslih organizmov. Čas izpostavljenosti organizmov v takšnih testih, lahko zajema različna letna obdobja in več generacij organizmov (Peijnenburg in Vijver, 2009).

### 3 USODA KEMIKALIJ V KOPENSKIH IN VODNIH EKOSISTEMIH

Z ekološkega vidika obstaja med kopenskim in vodnim ekosistem precejšna podobnost; mnoge kopenske in vodne vrste so filogenetsko zelo podobne, podobno velja za biotsko strukturo, v obeh okoljih tudi potekajo osnovne systemske funkcije. V največji meri se okolji razlikujeta po zadrževalni sposobnosti kemikalij, podobno velja za dinamičnost in biodostopnost kemikalij. Zaradi tega se pristopi testiranja strupenosti, za vodne in kopenske vrste precej razlikujejo (Persoone in Gillett, 1990).

Kopenski sistemi so habitatno pestrejši, povezave med sestavinami so kompleksnejše – z veliko heterogenostjo v fizikalnih, kemijskih in bioloških karakteristikah ter pod precejšnjim vplivom različnih dejavnikov: geoloških, topografskih, klimatskih in atropogenih dejavnikov. To predstavlja velik izziv za razumevanje usode kemikalij. Na drugi strani v vodnih sistemih obstaja problematika hitrega prenosa kemikalij po okolju, zato je tveganje za razpršeno onesnaženje toliko večje (OEHHA, 2009; OECD, 2006).

Pomembna razlika je tudi v načinu izpostavljenosti kemikalijam vodnih in kopenskih organizmov; slednji so prizadeti predvsem zaradi privzema ksenobiotikov iz prehranskih virov. V vodnem okolju je pelagična favna v neposrednem stiku s kemikalijami, raztopljenimi ali suspendiranimi v mediju, zato je prenos onesnaževal po prehranjevalni verigi manj pomemben oz. veliko počasnejši v primerjavi z direktnim privzemom k iz medija. V obeh okoljih obstaja možnost, da se lahko favna, živeča v zemlji ali sedimentu, zastrupi s stikom in/ali zaužitjem strupenih delcev (Persoone in Gillett, 1990). V kolikšni meri so delci strupeni, je odvisno od njihove velikosti, pH prebavnega trakta vrste in strukture kemikalije (OEHHA, 2009).

Ker so tla zelo heterogeno okolje, je tudi razporeditev kemikalij heterogena. Zemeljska tla lahko razdelimo na različne profile, ki vzdolž vertikale naravno tvorijo plasti ali horizonte. Glede na habitat in gibljivost, so organizmi kemikalijam izpostavljeni predvsem v zgornji zemeljski plasti (A horizontu): v tem horizontu je prisotna najvišja biotska aktivnost, tu najdemo koreninske sisteme in humus (Van Gestel, 2012; OEHHA, 2009).

Običajno imajo strupene snovi, ki predstavljajo visoko tveganje za organizme, tri skupne značilnosti: (1) dolgo razpolovno dobo (dolgoživost) v okolju; (2) visoko sposobnost akumulacije v organizmih in (3) biološki učinek na organizme (Leblanc, 2004).

Mnoge kemikalije, s kratko razpolovno dobo, ki jih izpuščamo v okolje, ne predstavljajo večjega tveganja. Takšne običajno razpadejo v bližini mesta izpusta. Povsem drugače je z neprekinjenim odlaganjem dolgoživih snovi v okolje, saj to zelo poveča tveganje za akumulacijo le-teh do zelo strupenih koncentracij. Takšne kemikalije, zaradi odpornosti na degradacijske procese učinkujejo škodljivo na organizme še dolgo po njihovi uporabi. Obenem lahko, z atmosferskim transportom in površinskimi vodami dosežejo globalno porazdelitev. V preteklosti so nekatere (DDT, PCB, TCDD idr.) že povzročile hude okoljske probleme (Leblanc, 2004). Zato skupino organokloridnih pesticidov, zaradi dolge razpolovne dobe (npr. DDT  $t_{1/2}=10$  let, uvrščamo med najhujša okoljska onesnaževala (Adams in Rowland, 2003).



### 3.1 Transportni in razgradni procesi v okolju

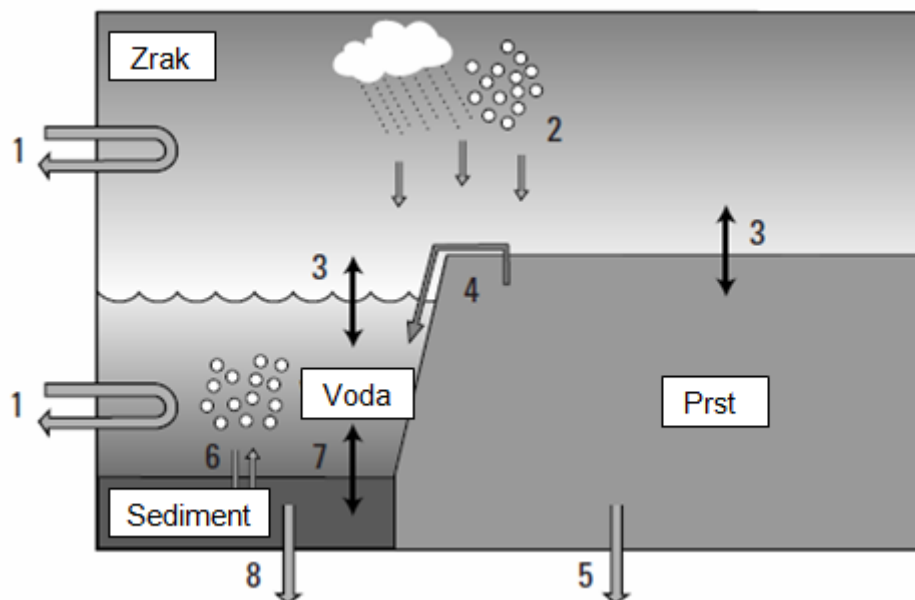
Kemikalije se v okolju prenašajo v istem in med različnimi mediji (vodo-usedlinami, zrakom-zemljo itd.) zaradi adveksijskih (fizikalnih) in disperzijskih (difuzijskih) mehanizmov. Prenos z difuzijo do koncentracijskega gradienta je zlasti prisoten pri razporeditvi kemikalij med različnimi mediji (Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

V istem mediju proces advekcije pomeni, da se kemikalija prenese iz točke vira onesnaženja na preostali del skupaj z gibanjem zračne ali vodne mase. Drugi pomemben mehanizem je molekularna difuzija, ki poteka zaradi koncentracijskega gradienta vzdolž faze, dokler se kemijski potencial v mediju ne izenači. Pri prenosu kemikalije v istem mediju sta oba omenjena mehanizma v medsebojni odvisnosti (konvekcija) (prav tam, 2007).

Prenos kemikalij med različnimi mediji med drugim poteka s pomočjo fizikalnih nosilcev: pri depoziciji iz zraka v vodo in tla so to lahko aerosoli in dežne kapljice; med vodno in usedlinsko fazo prihaja do sedimentacije in resuspenzije (onesnaženih) delcev; do prenosa iz tal v vodno fazo prihaja zaradi raztapljanja kemikalij in pronicanja skozi talni profil. Razpršitev med različnimi mediji poteka s pomočjo difuzije (izhlapevanja in absorpcije plinov) med zrakom in vodo/zemljo. Smer prenosa je pri tem odvisna od koncentracijskih razlik med mediji (prav tam, 2007). Opisane mehanizme prenosa kemikalij v mediju in med mediji shematsko prikazuje (Slika 1).

Zelo pomembna lastnost, ki vpliva na fizikalni prenos kemikalij v ekosistemu, je topnost v vodi (koeficient  $K_p$ : porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda). Kemikalije z visoko topnostjo v vodni fazi se v zelo kratkem času raznesejo po okolju. Imajo značilno nizek koeficient adsorpcije v zemlji in sedimentih, kot tudi sposobnost biokoncentriranja. So tudi hitro razgradljive, saj topnost v vodi pomembno vpliva na stopnjo fotolize, hidrolize, oksidacije in izhlapevanje (Peijnenburg in Vijver, 2009).

Na prenašanje in porazdelitev onesnaževal poleg njihovih specifičnih lastnosti vplivajo tudi naravni procesi v okolju. Glavni med njimi so: (1) izhlapevanje, ki vpliva na globalno razporeditev, značilno za spojine z višjim parnim tlakom (npr. hlapni organokloridi: Lindan); (2) raznos z vetrom in višjimi atmosferskimi tokovi, ki prenašajo delce in prah z adsorbiranimi spojinami; (3) adsorpcija na suspendirane vodne delce in odlaganje v usedlinah, kar zmanjšuje biodostopnost; in (4) pronicanje in odvodnjavanje, ki je značilno za bolj vodotopne spojine (Leblanc, 2004).



Slika 1: Shematski prikaz prenosa kemikalije v istem mediju (pod št. 1, 5, 8) in med različnimi mediji (pod št. 2,3,4,6,7) zaradi advekcijskih in disperzijskih mehanizmov.

(Vir: Van Leeuwen in Vermeire, 2007)

### 3.1.1 Abiotska in biotska razgradnja

Številni fizikalno-kemijski dejavniki vplivajo na delni ali popolni razpad kemikalij v ekosistemu. Veliko pomembnih razgradnih procesov poteka zaradi vpliva svetlobe (fotoliza) in vode (hidroliza), vendar mnogo počasneje kot mikrobná razgradnja (Leblanc, 2004).

Svetlobna energija, predvsem UV sevanje (300-400 nm), vpliva na spojine do te mere, da razgradi kemijske vezi med molekulami in pospeši razpadni proces kemikalij. Vpliv je največji v ozračju ali vodi, kjer je intenziteta svetlobe najvišja. Hitrost fotolizne razgradnje je odvisna od jakosti svetlobe in sposobnosti molekul spojine za absorpcijo svetlobe (prav tam, 2004).

Nenasičene aromatske spojine, kot so npr. policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH), so zelo občutljive na svetlobno energijo zaradi visoke absorpcije. Svetlobna energija prav tako pripomore k pospešitvi procesa oksigenacije spojine v procesu hidrolize ali oksidacije (prav tam, 2004).

Kemijske vezi spojine, v kombinaciji z dodanim virom energije (svetlobo ali toploto), lahko razgradi tudi voda. Ta razcepi estrsko vez spojine pri čemer nastaneta karboksilna kislina in alkohol. Takšni reakciji pravimo hidroliza. Estrske vezi najdemo pri organofosfatnih pesticidih (npr. paration), zato so ti zelo podvrženi hidrolizi, kar izjemno zniža razpolovno dobo teh kemikalij v okolju. Intenziteta hidrolize se poveča z višjo temperaturo in z močno kislostjo ali bazičnostjo vodnega medija. V vodnem okolju je hidroliza poleg biodegradacije najpomembnejši mehanizem, ki vpliva na razpad kemikalij (Leblanc, 2004; Renoux in Sunahara, 2002).

Razpad organskih onesnaževal običajno poteka mnogo hitreje s pomočjo mikroorganizmov (bakterij in gliv). Proces poteka ob prisotnosti določenih encimov, ki sodelujejo pri pridobivanju energije – celičnem dihanju. Rezultat procesa je lahko popolna mineralizacija kemikalije do molekul H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> in anorganskih elementov (Leblanc, 2004). Fizikalno-kemijski kot tudi mikrobiološki procesi lahko vodijo tudi do nastanka stranskih produktov in dolgoživih presnovkov (Renoux in Sunahara, 2002), ki so v številnih primerih celo bolj strupeni od matične spojine. Takšen primer je nonilfenol etoksilat, ki razpade na alkilfenol, ki je bolj nevaren za okolje kot izhodiščna spojina (Robinson in Thorn, 2005).

### 3.2 Skladiščenje v tleh in usedlinah

Usedline in tla imajo veliko zmogljivost skladiščenja onesnažil (precej večjo od vodnega medija), še posebej dolgoživih hidrofobnih organskih spojin in dvovalentnih/trivalentnih kationov. Posledično tla in usedline služijo kot odlagališča kemikalij in so vir strupenih snovi adsorbiranih na talne delce. Vsebnost gline in organske snovi ter pH vrednost so najpomembnejši dejavniki, ki vplivajo na kationsko izmenjevalno kapaciteto (CEC) (zadrževanje kationov: kovin) in anionsko izmenjevalno kapaciteto (AEC) (zadrževanje anionov: organskih anionov) zemlje in usedlin. Slabo založena tla z organsko snovjo imajo tudi zmanjšano pufersko sposobnost, mikrobo aktivnost in sposobnost zadrževanja vode (Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

Stopnja adsorpcije organskih molekul na talne delce je sicer odvisna od: (1) lastnosti onesnaževala, kot je molekulska masa, ionska speciacija, kislinsko-bazno ravnovesje, polarnost in lastnosti funkcionalne skupine in (2) od lastnosti zemljine, kot je vsebnost organskega materiala, delež gline in njenih mineralov, pH, vsebnost vode, nasipna teža, kationsko izmenjevalna kapaciteta in odstotek bazne nasičenosti (OEHHA, 2009).

### 3.3 Medsebojni vplivi kemikalij

Ocena tveganja za okolje se praviloma izvede s testiranjem strupenosti za posamezno strupeno snov, vendar se običajno v ekosistemu nahaja več snovi hkrati, še posebej je kompleksnost onesnaženja izrazita v vodnem okolju. To je razlog, da moramo v čim večji meri poznati tudi potencialne interakcije kemikalij (Eaton in Gilbert, 2008).

Kemikalije v kombinaciji lahko povzročijo skupni učinek na organizem, ki je večji ali manjši od učinka posamezne kemikalije. Vzrok je vplivanje ene kemikalije na toksikokinetiko in/ali toksikodinamiko druge v medsebojni interakciji. V zadnjih letih se v ekotoksikologiji temu namenja vse več pozornosti (Gargošová idr. 2011), saj poznavanje tega pogostokrat vodi do boljšega razumevanja mehanizmov strupenosti preučevanih kemikalij (Eaton in Gilbert, 2008).

Poznamo štiri osnovne oblike skupnega delovanja spojin, ki opišejo učinke mešanic (prav tam, 2008):

**Aditivnost** je pojavna oblika, ko je kombinacija dveh kemikalij enaka vsoti učinka obeh posameznih spojin (primer: 2+3=5). To je najbolj pogost učinek pri interakciji med dvema

kemikalijama. Tipičen primer so organofosfatni insekticidi, kjer kombinacija dveh povzroči aditivno delovanje na isto tarčno tkivo v organizmu.

**Sinergizem** je pojavna oblika, ko je kombinacija dveh kemikalij veliko večja kot vsota njunih učinkov (primer:  $2+2=20$ ). Takšen primer delovanja sta ogljikov tetraklorid in etanol, ki sta hepatoksični spojini, z vzajemnim delovanjem pa povzročita mnogo večje poškodbe jeter, kot zgolj seštevek njunih posameznih učinkov.

**Potenciacija** je pojavna oblika, ko kemikalija nima strupenega učinka na določen biosistem, vendar njena prisotnost zelo poveča strupenost druge kemikalije (primer:  $0+2=10$ ). Takšen primer je izopropanol, ki ob prisotnosti ogljikovega tetraklorida, vpliva na občutno povečanje njegove samostojne strupenosti.

**Antagonizem** je pojavna oblika, ko ena kemikalija preprečuje delovanje druge ali kadar pride do medsebojnega preprečevanja delovanja (primer:  $4+0=1$ ;  $4+(-4)=0$ ;  $4+6=8$ ). Takšna interakcija je izmed vseh opisanih najmanj škodljiva za organizem, saj preprečuje oz. zmanjšuje negativno delovanje strupene snovi na organizem.

### 3.4 Vplivi kemikalij na nevretenčarje

Kopenski in vodni organizmi so lahko onesnaževalom izpostavljeni preko različnih poti: (1) z direktnim stikom z medijem (zaužitjem talnih/sedimentnih delcev in kontaktom ali z vdihavanjem); (2) po prenosu onesnaževala med sestavnimi deli v mediju ali po prenosu med različnimi mediji (sedimentom, podtalnice ali zraka); in (3) s plenilskim razmerjem do onesnaženega plena in z ostalimi ekološkimi povezavami (npr. simbiotsko razmerje) (Renoux in Sunahara, 2002; Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

Za boljše razumevanje biodostopnosti in strupenosti posameznih kemikalij ali mešanic je nujno, da razumemo kinetiko in dinamiko strupenih snovi. Razumevanje tega pripomore k ekstrapolaciji rezultatov testiranj na populacijski nivo. Toksikokinetika je predvsem pomembna pri presoji novodobnih kemikalij kot so nanodelci, ki sorazmerno s časom zaradi agregacije, aglomeracije in raztapljanja, spreminjajo svoje lastnosti (Van Gestel, 2012).

#### 3.4.1 Biodostopnost

Običajno je samo manjši delež celokupne koncentracije ksenobiotika v okolju (t.i. »biodostopne frakcije«), na razpolago za privzem v organizem. Delež biodostopne koncentracije je odvisen od sestave zemeljskega medija, sedimentov in vodnega medija. V kolikšni meri je neka snov dostopna, je odvisno od njenih značilnosti ter časa izpostavljenosti kemikaliji (Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

Organizmi lahko kemikalije privzamejo direktno iz medija ali iz prehranskih virov (rastlin, organske snovi v razpadu in plena). To se v največji meri zgodi s pasivno difuzijo zaradi koncentracijskega gradienta v telesu organizma. Ta proces omogoča vstop v organizem mnogim organskim kemikalijam in kovinam. Privzem v organizem se zgodi v trenutku, ko kemikalija preide lipidni dvosloj celične membrane, zato je bioakumulacijski potencial kemikalije v precejšni meri odvisen od njene lipofilnosti (Leblanc, 2004; O'Flaherty, 2000).

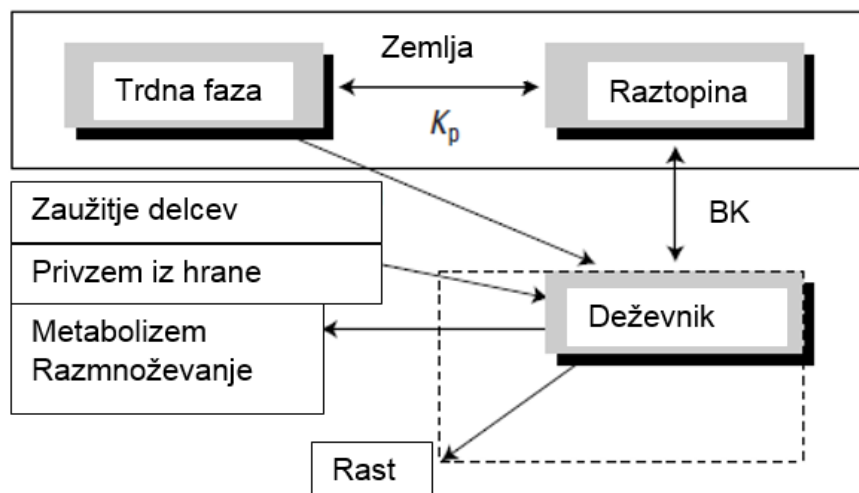
Lipofilne kemikalije se v zemljini običajno adsorbirajo na organsko snov. Če so tla slabše založena z organsko snovjo, so organizmi neposredno izpostavljeni večji količini kemikalije za privzem. Tla se po vsebnosti organske snovi lahko zelo razlikujejo, kar zelo pomembno vpliva na usodo kemikalije (Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

Glavna pot privzema kemikalije se med različnimi organizmi razlikuje, hkrati so lahko pri tem vpletena zelo različna tkiva. Ločimo dva načina privzema v organizem in pri tem običajno vpletena tkiva: dermalni (privzem preko kože, dlake idr.) ali oralni (privzem preko pljučnih membran, prebavnega trakta idr.) (Leblanc, 2004).

Deževniki, nematodi in ostali črvi privzamejo organske hidrofobne kemikalije predvsem zaradi stika s kapilarno vodo. Enako velja za privzem težkih kovin v ionski obliki ( $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  idr.), ki se v kapilarni vodi koncentrirajo ob zmanjšanju pH v tleh. Sorpcijska komponenta tal (organska snov in glina) zelo vpliva na biodostopno koncentracijo onesnaževala (Van Leeuwen in Vermeire, 2007; Peijnenburg in Vijver, 2009).

O pomembnem vplivu organske snovi na biodostopnost onesnaževala priča tudi študija, ki so jo izvedli Bradham idr. 2006 (v Van Gestel (2012)). Dokazali so, da je preživetje deževnikov v različnih vrstah zemljine (glede na vsebnost organske snovi), pri izpostavitvi enaki koncentraciji testne snovi, zelo spremenljivo (Van Gestel, 2012).

Deževniki so zaradi načina vedenja in morfoloških lastnosti v neposrednem stiku z vodno in trdno fazo tal tekom življenjskega cikla (Peijnenburg in Vijver, 2009). (Slika 2) na modelu deževnika med drugim prikazuje različne poti privzema onesnaževala v organizem oz. celokupno biodostopnost onesnaževala v tleh. Pri tem je porazdelitev onesnaževala med trdno in vodno fazo tal odvisna od koeficienta  $K_p$ . Za deževnika je sicer onesnaževalo najbolj dostopno v vodni fazi tal (raztopina), privzem preko ostalih poti je za ta organizem manj značilen. V kolikšni meri se privzem iz vodne faze zgodi je odvisno od biokoncentracijskega faktorja (BKF), ki služi določanju privzema kemikalije v organizem. Z naraščanjem BKF vrednosti se večja potencial negativnih učinkov na organizem (Van Leeuwen in Vermeire, 2007; Peijnenburg in Vijver, 2009).



Slika 2: Shematski prikaz poti bioprivzema in nadaljnje usode kemikalije na modelu deževnika.

(Vir: Van Leeuwen in Vermeire, 2007)

Vodni organizmi lahko strupene snovi privzamejo iz medija preko različnih poti. Mnogi od njih v največji meri privzamejo kemikalije s pasivno difuzijo skozi kožo. Druga možna oblika privzema je iz hrane (Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

Mnogi vodni nevretenčarji se prehranjujejo z usedlinami in z organskimi delci ali so v usedlinah živeče vrste. Zaradi tega skupaj z delci organizmi privzamejo veliko količino onesnaževal. Zaradi različne koncentracije onesnaževal vzdolž sedimentnega profila, obstaja različno tveganje za posamezne bentoške vrste, na to vplivajo še ekološke in prehranjevalne razlike. Po načinu prehranjevanja lahko organizme razdelimo v dve skupini (prav tam, 2007):

**Površinski prehranjevalci:** takšen primer nevretenčarja je školjka (*Macoma*), ki se hrani predvsem na površju usedlin.

**Globji prehranjevalci:** takšen primer nevretenčarjev sta postranica (*Amphipoda*) in mnogoščetinec (*Polychaeta*).

### 3.4.2 Bioakumulacija, biopretvorba in izločanje

Podobno kot dolgoživost in akumulacija kemikalij v abiotskem okolju, je bioakumulacija preložena strupenost za organizme, ki nastopi šele, ko se kemikalija bioakumulira v dovolj visoki koncentraciji – običajno večji kot je prisotna v neposrednem okolju. Mesta skladiščenja v organizmu so običajno lipidi, strupenost pa nastopi šele po prehodu kemikalije do tarčnega mesta (tkiva). Vzrok za prehod so običajno naravni mehanizmi v organizmu (npr. reprodukcija), ob tem ko le-ta poveča potrebo po lipidih. Učinek je lahko letalnost organizma ob dosegu spolne zrelosti (Leblanc, 2004).

Bioakumulacijski potencial je poleg fiziologije vrste odvisen tudi od lastnosti kemikalije, v največji meri od njene topnosti v maščobah, ki je določljiva s koeficientom  $K_p$ . Lipofilne kemikalije prav tako izkazujejo povečano zmožnost adsorpcije na sediment ali talne delce, tako postanejo manj

dostopne za privzem v organizem. Takšne se lahko skladiščijo tudi v zarodkih in vplivajo na sposobnost razmnoževanja vrste (prav tam, 2004).

Izpostavimo lahko tri glavne dejavnike, ki v medsebojni odvisnosti vplivajo na stopnjo bioakumulacije (prav tam, 2004):

- okoljski: dolgoživost in koncentracija kemikalije v okolju;
- kemični: lipofilnost kemikalije;
- biološki: količina lipidov v organizmu ter sposobnost biopretvorbe in izločanja.

Pri vodnih organizmih se pojavlja problematika biokoncentriranja kemikalij, zaradi predelave ogromnih količin vode. Oceani, jezera in reke služijo kot odlagališča za lipofilne snovi, ki so jih vodni organizmi sposobni koncentrirati do mnogo višjih koncentracij od ozadja v mediju. Do kakšne mere, pa je odvisno od vsebnosti lipidov v organizmu (Leblanc, 2004).

Dodatno k strupenosti doprinese proces biomagnifikacije, a je za vodne organizme delež bioakumulacije kemikalije običajno večji iz medija kot iz hrane (prav tam, 2004).

Biokoncentracija kovin je zelo odvisna od fizioloških procesov organizma, saj se ti procesi razlikujejo pri različnih organizmih. Pri kopenskih raki enakonožcih se odvečne kovine skladiščijo v hepatopankreasu (delu prebavnega trakta členonožcev), medtem ko se v deževniku kopičijo v klorarogenem tkivu (t.i. »chloragogenous tissue«). Gre za sposobnost sinteze skladiščnega proteina za kovine – metalotioneina pri omenjenih organizmih. Podobno velja za koncentriranje organskih kemikalij v lipidnih tkivih. Medtem, ko se lahko organske spojine z vezanim kovinskim atomom (organokovine) skladiščijo v lipidih in proteinih (Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

Odziv organizma na skladiščenje strupenih snovi je sposobnost biopretvorbe ksenobiotika v manj škodljivo obliko. Cilj tega kemičnega procesa je kemikalijo pretvoriti v bolj vodotopno obliko in s tem olajšati njeno izločanje ter na ta način zmanjšati koncentracijo nevarne spojine v telesu. Zato so lahko manj lipofilne kemikalije hitreje biopretvorjene in izločene iz telesa. Kopenski raki enakonožci in skakači kažejo izjemno sposobnost biopretvorbe organskih kemikalij, kot so npr. policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH) ( $t_{1/2}=1$  dan), ta sposobnost pa ni značilna za deževnika (Van Gestel, 2012; Van Leeuwen in Vermeire, 2007; Leblanc, 2004).

Procesi izločevanja vodijo do zmanjševanja koncentracije ksenobiotika v organizmu. Poti izločanja ksenobiotikov pri nevretenčarjih so lahko različne. Na to vpliva anatomija in morfologija notranjih organov in obtočilni sistem, ki je pri nevretenčarjih pogostokrat odprt (Cattaneo, 2009).

Na izločanje kemikalij v veliki meri, podobno kot na privzem v organizem, vplivajo pasivni procesi. Večina hidrofobnih kemikalij se iz organizma izloči s pasivno difuzijo ali z iztrebki. Prav tako sta pomembna dejavnika rast, ki vpliva na razredčevanje kemikalije v telesu (Van Leeuwen in Vermeire, 2007) in razmnoževanje; npr. členonožci so skupina organizmov, ki kažejo sposobnost izločanja kovin med kopulacijo (Cattaneo, 2009).

## 4 METODE V TESTIH STRUPENOSTI

Strupenost opredeljujemo kot lastnost določene kemikalije, da v stiku z zunanjo površino oz. notranjostjo organizma povzroči lokalne ali sistemske poškodbe (Lobnik, 2008). Odmerek je količina snovi, ki jo organizem enkratno ali večkratno privzame v določenem časovnem intervalu (Sánchez-Bayo, 2011).

Potencialno strupenost za organizem predstavlja vsaka kemikalija. To je ponazoril Paracelsus (1493-1541). Njegovo opažanje je postavilo temelj za razvoj funkcijske zveze med količino odmerka in odzivom organizma (Eaton in Gilbert 2008).

Glede na čas trajanja lahko teste strupenosti delimo na akutne in kronične. Kdaj je določena spojina za organizem strupena, je med drugim odvisno od načina kontakta spojine z osebkom, koncentracije spojine v okolju in od pogostosti izpostavitve organizma škodljivemu delovanju (Lobnik, 2008).

Toksini se glede na odmerek, ki povzroči škodljiv učinek, hude poškodbe ali letalnost, zelo razlikujejo. Nekateri med njimi, ki jih prištevamo med zelo strupene, povzročijo letalen odziv ( $LD_{50}$ ) že v mikrogramskih odmerkih, takšen primer je botulin (0,00001 mg/kg), ki je nevrotoksin naravnega izvora in ga tvorijo bakterije (*C. botulinum*). Nekatere druge kemikalije so strupene pri odmerkih večjih od nekaj gramov, takšen primer je etanol (10000 mg/kg) (Eaton in Gilbert, 2008).

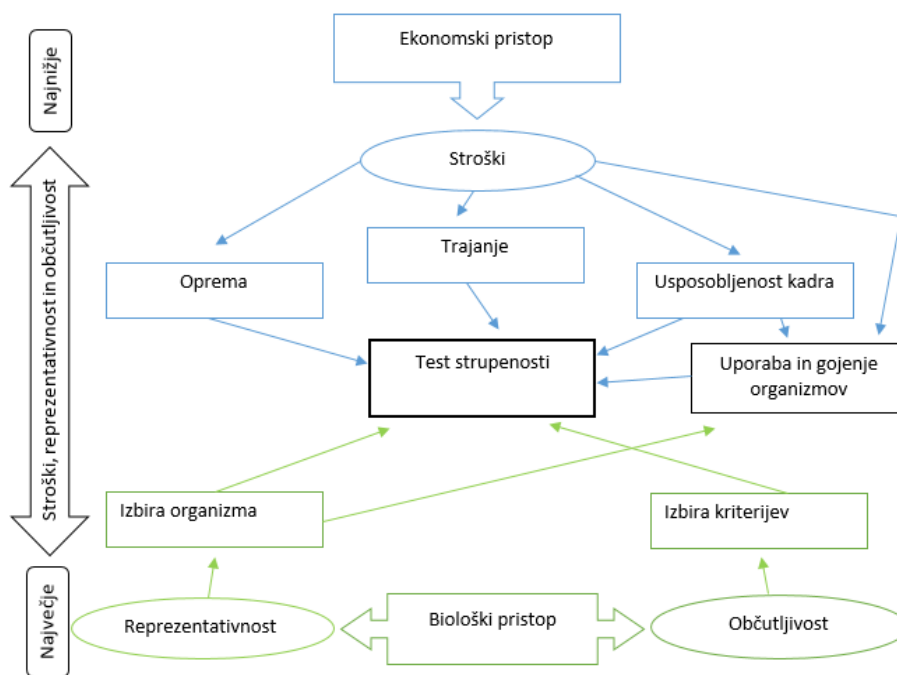
Do kvarnih učinkov strupene snovi na organizem prihaja, ko le-ta po različnih poteh (skozi kožo, z zaužitjem ali dihanjem), vstopi v organizem in se s kroženjem snovi prenese po telesu do mesta učinka. Tega so sposobne, poleg matične spojine, doseči tudi biopretvorjene aktivne snovi, medtem ko se preostali del presnovi in izloči, običajno do nestrupenih produktov (Sánchez-Bayo, 2011).

Zasnova vseh testov strupenosti v osnovi temelji na določitvi naslednjih komponent (James idr. 2000):

- izbira testne vrste,
- izbira odzivov, ki jih merimo (in zato primerne metode),
- čas izpostavljenosti,
- čas trajanja testa (opazovani čas) in
- serija uporabljenih odmerkov.

Najprimernejša testna vrsta je reprezentativna v različnih habitatnih tipih, ima primerljivo občutljivost z drugimi vrstami, funkcijske povezave v združbi ter je primerno razširjena ali ima osrednjo vlogo v ekosistemu. Upoštevanje omenjenih zahtev, predvsem zaradi težav pri gojenju nekaterih vrst v laboratoriju in s tem povezanih stroškov, žal vedno ni mogoče (Persoone in Gillett, 1990). Zato zasnova vsakega rutinskega (standardnega) testa (Slika 3) temelji na biološkem in ekonomskem pristopu (Persoone in Gillett, 1990; Ratte idr. 2003).





Slika 3: Shematski prikaz najpomembnejših dejavnikov za zasnovanje testa strupenosti

(Vir: Persoone in Gillett, 1990).

## 4.1 Čas testiranja in iskani odzivi

Teste strupenosti glede na čas izpostavitve organizmov delimo na kratkotrajne (akutne) in dolgotrajne (kronične) laboratorijske študije. Za izvajanje slednjih so potrebna opazovanja in merjenja v daljšem časovnem obdobju – za čas življenja organizma ali celo skozi več generacij, medtem ko testi akutne strupenosti zajemajo krajše obdobje življenja nekega organizma. V vseh testih strupenosti uporabljamo poenotene metode za opazovanje in meritev učinkov kemikalij na organizme (Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

Toksikološki odzivi so vrednosti pridobljene iz testov strupenosti in so rezultat specifičnih meritev med potekom ali na koncu testa. V glavnem uporabljamo dve skupini odzivov, to so ocenjeni in merjeni odzivi. Ocenjeni odzivi se navezujejo na populacije in združbe in so kazalci vitalnosti, npr. stopnja rasti populacije. Na drugi strani se merljivi odzivi navezujejo na merjenja, običajno na nivoju organizma, in jih uporabljamo za presojo ocenjenih odzivov. Najbolj običajni merljivi odzivi so preživetje, rast in razmnoževanje vrste (Newman in Clemens, 2008).

### 4.1.1 Kratkotrajne študije

Test akutne strupenosti izvajamo na kopenski ali vodni modelni vrsti, ki jo enkratno izpostavimo različnim koncentracijam testne snovi. Akutno strupenost v splošnem definiramo kot povzročanje hudih učinkov na organizem že pri kratkotrajni izpostavljenosti kemikaliji. Glavni namen je določitev tiste koncentracije, ki povzroči določen (merljiv) odziv testne vrste v relativno kratkem času (običajno do 7 dni) (Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

Parametra, ki jih najpogosteje merimo, sta preživetje ( $LC_{50}$ ) in neobičajno obnašanje organizmov, npr. imobilizacija: nepremičnost vodnih bolh ( $EC_{50}$ ) (prav tam, 2007). Prav tako lahko določimo parametra kot sta NOEC, ki določuje prag pod katerim se učinki na organizem ne pojavijo in LOEC, ki določuje opazni učinek na organizem, hkrati pa beležimo kakršnokoli nenavadno obnašanje testnih organizmov (Newman in Clemens, 2008).

Kratkotrajne laboratorijske študije na vrsti so, poleg prihranka časa in nizkih stroškov pri izvedbi, zelo učinkovite za hitro oceno kemikalije, ki vključuje informacijo o pragu učinka (pražna koncentracija) in za oceno selektivne strupenosti (različnost v občutljivosti posameznih vrst). Takšne študije so na splošno zelo koristne pri iskanju območja pojavnosti učinka, ki ga natančneje raziščemo z dodatnimi študijami (Van Leeuwen in Vermeire, 2007; James, 2000).

Pomanjkljivost kratkotrajne študije je v tem, da ne omogoča vpogleda v celotno strupenost ali tveganje zaradi izpostavitve kemikaliji: (1) za ugotavljanje strupenosti nizkih koncentracij kemikalij in (2) nekatere med njimi, imajo v odmerkih, ki ne povzročijo akutne strupenosti, teratogene, nevrovedenjske in druge negativne učinke (Eaton in Gilbert 2008).

#### **4.1.2 Dolgotrajne študije**

S testi kronične strupenosti ocenjujemo učinke spojin na organizme v daljšem časovnem obdobju, pogostokrat skozi celotno življenjsko obdobje organizma ali tudi na generacije potomcev in lahko hkrati merimo preživetje in subletalne odzive modelne vrste (Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

Kronični testi strupenosti temeljijo na iskanju subletalnih odzivov kot so: motnje rasti osebka (pokazatelj je dolžina in teža), motnje razvoja, preložen čas izvalitve, razmnoževalna uspešnost (npr. skupno število mladičev), vedenjski dejavniki itd. Glavni cilj je določiti koncentracijo kemikalije, ki na organizme nima omenjenih subletalnih učinkov (NOEC) (prav tam, 2007).

Testiranje kronične strupenosti lahko zajema izpostavljenost organizmov skozi njihov delni življenjski cikel ali za čas življenja. V testih strupenosti za čas življenja organizme ene ali več generacij izpostavimo seriji koncentracij testne snovi in merimo subletalne učinke. Takšni testi se običajno pričnejo izvajati z jajčeci, ličinkami ali mladiči in nadaljujejo do začetka razmnoževanja organizmov. Prav tako se lahko po potrebi podaljšajo na testiranje več generacij (prav tam, 2007).

Vrste, ki se lahko uporabijo v takšnih testih, so omejene na tiste, ki lahko preživijo celotno življenje v laboratorijskih pogojih. Glavni pomanjkljivosti takšnega testa sta dolgo življenje nekaterih vrst in s tem povezani stroški. Posledično za rutinsko izvajanje uporabljamo teste razmnoževanja na delnem življenjskem ciklu vrste (prav tam, 2007).

## **4.2 Vloga poti izpostavljenosti**

Glavne poti preko katerih lahko strupena snov vstopi v organizem so: prebavni trakt (z zaužitjem zastrupljene hrane, delcev idr.), dihalne poti (z vdihavanjem) in koža (topikalni ali dermalni privzem) (Eaton in Gilbert, 2008).

Na stopnjo absorpcije po zaužitju in na privzem pri vdihavanju ali dermalni izpostavljenosti neke snovi lahko vpliva pomožna snov, v kateri je ta snov raztopljena in drugi dejavniki, ki lahko

spreminjajo obliko testne snovi. Na strupenost lahko pomembno vpliva tudi način izpostavljenosti: splošen primer je strupena snov, ki ima potencial negativnega vpliva na osrednji živčni sistem (OŽS), vendar zaradi oralnega vnosa in razgradnje v jetrih nikoli ne doseže mesta strupenega učinka, kot bi ga v primeru izpostavitve preko vdihavanja (prav tam, 2008), kar je značilno za vretenčarske vrste.

### **4.3 Sistemi izpostavitve za vodne organizme**

Pri večini testov strupenosti na vodnih organizmih je testna učinkovina raztopljena v vodnem mediju. V kolikšni meri testni organizem privzame kemikalijo običajno ni poznano, zato strupenost določamo na podlagi zunanje koncentracije kemikalije v testnem mediju. Na podlagi tega moramo poleg časa izpostavljenosti poznati tudi dejansko koncentracijo kemikalije v sistemu, kar v nekaterih primerih predstavlja težavo in sicer zaradi določenih lastnosti kemikalij, ki so lahko: hlapne, hidrofobne, razgradljive in s potencialom adsorpcije ter bioakumulacije. Za odpravo teh problemov uporabljamo štiri osnovne tipe testnih sistemov za dovajanje testne snovi: statični, obnavljajoči, pretočni in izpostavitvev preko hrane (Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

#### **4.3.1 Statični sistem**

Statični sistem je preproste tehnične sestave in omogoča izpostavitvev testnih organizmov isti testni raztopini skozi obdobje testiranja. Takšen sistem izpostavitve se običajno uporablja za test akutne strupenosti (Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

Glavne prednosti statičnega sistema izpostavitve so (1) enostavnost za izvedbo, (2) nižja raven stresa za organizme v primerjavi z obnavljajočim sistemom in (3) nizki stroški (prav tam, 2007). V praksi se je takšen sistem izkazal kot najprimernejša rešitev pri testiranju strupenosti naslednjih mešanic: (industrijskih) iztokov, sedimentov, izkopnega materiala itd. (Newman in Clemens, 2008).

Uporaba statičnih in obnavljajočih sistemom izpostavitve se odsvetuje za testiranje snovi z morebitnimi naslednjimi lastnostmi: nestabilnost, sposobnost sorpcije na testno posodo, povečana hlapnost ali poraba kisika. Za kemikalije, ki izkazujejo navedene lastnosti, se priporoča uporaba pretočnega sistema (opisan v nadaljevanju tega poglavja). Poleg omejitev pri izbiri testne snovi, je pomanjkljivost statičnega sistema, v izogib porabi kisika v testni raztopini, omejitev dovoljene biomase v postopku (do 1 g/L testne raztopine (prav tam, 2008).

#### **4.3.2 Obnavljajoči sistem**

Obnavljajoči ali delno mirujoči (t.i. »semi-static«) sistem je zelo podoben statičnemu sistemu, vendar s pomembno razliko v tem, da organizme med trajanjem testa premeščamo v druge testne posode s svežo raztopino, ali del testne raztopine zamenjujemo s svežo (Van Leeuwen, 2007).

V obnavljajočih sistemih je mogoče organizme hraniti, kar tudi omogoča izvedbo dolgotrajnejše študije. Takšni sistemi so zelo primerni za: testiranje strupenosti na manjših organizmih (npr. vodni bolhi), ki jih v pretočnih sistemih zaradi nizke sposobnosti upiranja silam pretoka v mediju ali splošne občutljivosti (npr. ceponožci), ni priporočljivo uporabljati, ali kadar imamo na voljo precej omejeno količino testne snovi za izvajanje dolgotrajnih študij (prav tam, 2007).

Obstajajo tudi nekatere pomanjkljivosti: pogosto rokovanje testnih organizmov povečuje stres in možnost poškodb, koncentracija testne snovi ni konstantna med testiranjem, zato obstaja potreba po večjem nadzoru v primerjavi s statičnim testom (prav tam, 2007).

### 4.3.3 Pretočni sistem

Pretočni sistem je zasnovan z namenom izpostavitve organizmov relativno konstantni koncentraciji kemikalije in kontrolne raztopine. Zasnova sistema omogoča bodisi neprestan dotok bodisi prekinitveni dotok sveže raztopine, kar posledično pripomore k hitremu obnavljanju testne koncentracije v sistemu. Med drugim lahko ohranjamo konstantno temperaturo in koncentracijo kisika v vodi (Van Leeuwen in Vermeire, 2007). Na (Slika 4) je prikazan primer zasnove pretočnega sistema za testiranje strupenosti nanodelcev (nTiO<sub>2</sub>) na vodnih bolhah.

Pretočni sistem je zelo primeren za testiranje nestabilnih ali hidrofobnih kemikalij. Največja pomanjkljivost takšnega sistema je kompleksnost, kar pomeni, da obstaja zahteva po dobrem nadzoru in vzdrževanju (npr. pogosto preverjanje dejanske koncentracije testne učinkovine). Po drugi strani je spremenljivost koncentracije precej manjša kot v statičnih in obnavljajočih testih, kar ima za posledico večjo natančnost rezultatov (prav tam, 2007).

Običajno z opisanim sistemom izvajamo dolgotrajne študije. Pretok raztopine nam obenem omogoča testiranje večjega števila organizmov v primerjavi z dimenzijsko enakim statičnim sistemom (Newman in Clemens, 2008).



Slika 4: Pretočni sistem za test na vodnih bolhah (*Daphnia magna*).

(Vir: Bundschuh idr. 2012)

### 4.3.4 Izpostavitve preko hrane

Snovi, ki so običajno slabo topne v vodi, jih izpostavljeni organizmi akumulirajo, kar v standardnih testnih sistemih predstavlja težavo. Pri testiranju potencialno strupenih snovi z log Kow > 4,5 s težavo zagotavljamo konstantno izpostavljenost organizmov dovolj veliko za merjenje strupenosti. Testne koncentracije netopne kemikalije/preiskovane snovi ali tiste, zmešane skupaj z veliko količino topila (po navodilih OECD je to največ 100 mg/L) lahko dajejo napačne podatke o dejanski strupenosti. V oceni tveganja za okolje rezultate testiranja s takšnimi kemikalijami po pravilu interpretiramo kot napačne (Van Leeuwen, 2007).

V testih z izpostavitvijo preko hrane organizme hranimo z zastrupljeno hrano z natančno določeno koncentracijo v času, ki je odvisen od pričakovane razpolovne dobe kemikalije. Na koncu testne dobe preživele organizme izpostavimo neoporečni hrani in analiziramo sposobnost očiščenja. Podatki, ki jih pridobimo pri takšnem načinu testiranja, zajemajo stopnjo sprejemanja (asimilacije) kemikalije iz hrane, bioakumulacije in razpolovne dobe (prav tam, 2007).

#### **4.4 Sistemi izpostavitve za kopenske organizme**

Testi strupenosti na kopenskih nevretenčarjih so se razvili z namenom pridobitve informacij o potencialnem tveganju za kopenske ekosisteme. Informacije se lahko uporabijo za določanje smernic kakovosti zemlje. Za mesta onesnaženja se lahko pravilneje določi remediacijske postopke. Zaradi visokih stroškov povezanih z remediacijo zemlje, je poglobitno, da imamo ustrezne laboratorijske testne metode s katerimi identificiramo potencialno tveganje in uporabljamo »in situ« bioanalize za določevanje tveganja specifičnega mesta (Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

V testih strupenosti s kopenskimi organizmi uporabljamo, odvisno od predvidenega načina izpostavljenosti organizma v naravnem okolju, različne sisteme izpostavitve. Tri glavne poti privzema onesnažil v organizem so: zaužitje in oralni privzem iz hrane in zemeljskih delcev, dermalni privzem iz zemlje ali površine rastlin in vdihavanje (prav tam, 2007).

Pri testih strupenosti z nevretenčarji se običajno izbere takšna metoda izpostavitve, ki najbolje ponazarja privzem organizma v naravnem okolju (prav tam, 2007).

##### **4.4.1 Uporaba umetne/standardne zemljine**

Mnogi kopenski nevretenčarji živijo v tleh, zato za testiranje strupenosti na takšne vrste (med katere prištevamo deževnike in členonožce) uporabljamo predvsem umetno zemljino kot sistem izpostavitve (Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

Na način, kot je pripravljen testni substrat – testna snov, lahko odmerek izrazimo kot koncentracija na enoto suhe zemljine (mg/kg). Snov, ki jo lahko uporabljamo v testih strupenosti je lahko: zemljina vzeta iz narave, ali umetno pripravljena zemljina po navodilih, opisanih v mednarodnih standardih (prav tam, 2007). Za povečanje primerljivosti z naravnim okoljem, v testih strupenosti zelo veliko uporabljamo standardizirano in komercialno dostopno zemljino Lufa 2.2 (Speyer, Nemčija) (Van Gestel, 2012).

Vrsta zemljine najpomembneje vpliva na biodostopnost (razporeditev kemikalije med trdno, plinasto in vodno fazo) in posledično na strupenost za organizem, zato moramo natančno poznati njene fizikalno-kemijske lastnosti (Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

##### **4.4.2 Direktna izpostavitvev**

Metodo topikalnega nanosa snovi običajno uporabljamo za izpostavitvev členonožcev in poteka na način, da snov po predhodni imobilizaciji organizma direktno nanesimo na določen površinski del telesa (običajno prsni koš). Takšna metoda omogoča natančno poznavanje odmerka, kateremu je organizem izpostavljen, in se izraža kot absolutna količina odmerka za organizem. S stališča preučevanja strupenih snovi je to najbolj zaželena metoda izpostavitve,

saj lahko vsakršen učinek direktno povežemo z odmerkom. Prav tako pri takšnem postopku testiranja niso prisotni dejavniki, ki lahko moteče vplivajo na rezultat: hranjenje, gibanje in ostale aktivnosti. Največja pomanjkljivost je slaba primerjava z naravnim okoljem organizma, kjer biodostopnega odmerka običajno ne poznamo (Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

Uporabljamo tudi metodo potopitve v testno raztopino, ki je primerna za izpostavitve členonožcev. V takšni metodi uporabljamo standardiziran čas izpostavitve. Glavna prednost je enostavnost za uporabo, vendar obstaja tudi slabost, ki se kaže v tem, da ne poznamo odmerka, ki ga organizem prejme. Učinke izražamo na podlagi koncentracije kemikalije v potopni raztopini. Z opisano metodo lahko testiramo tudi deževnike, saj je znano, da kemikalije v največji meri privzamejo iz vodne faze tal (prav tam, 2007).

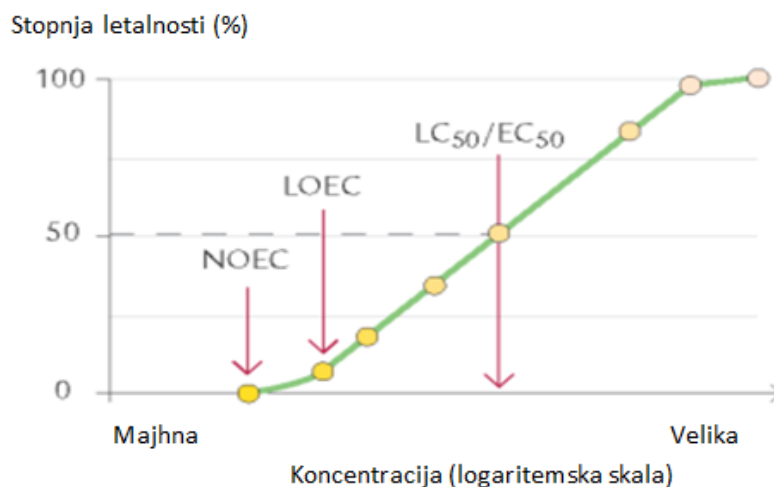
Uporaba obeh testnih metod (topikalna in celotelesna izpostavljenost) ima, zaradi malo skupnega z dejansko izpostavljenostjo organizmov v naravnem okolju, precej omejeno napovedno vrednost za okolje. Ostale poti izpostavljenosti so namreč prav tako pomembne pri izpostavljenosti organizmov v naravi (prav tam, 2007).

#### **4.4.3 Kemikalije dodane k hrani**

Rastlinojedi nevretenčarji so skupina organizmov, ki je kemikalijam neposredno izpostavljena zaradi prehranjevanja z onesnaženim rastlinjem. Hrana, ki jo uporabljamo v testih, je zelo odvisna od vrste, ki jo testiramo, prav tako je stopnja privzema iz hrane za različne organizme zelo različna. Medvrstne primerjave na podlagi odnosa med koncentracijo in učinkom niso praktične zaradi razlikovanj med uporabljenimi hrano in zaradi fizioloških značilnosti testnih osebkov. Nekatere vrste členonožcev se lahko prav tako izogibajo zastrupljeni hrani (Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

#### **4.5 Odnos med koncentracijo in učinkom**

Testi strupenosti so zasnovani na podlagi vednosti, da je učinek neke testne snovi na organizem odvisen od njene koncentracije. Takšna zveza omogoča določljivost parametrov, ki opisujejo učinek ( $LC_{50}$ ,  $EC_{50}$ , LOEC) in takšnega, ki nima učinka (NOEC) (Slika 5). V testih akutne strupenosti določujemo srednjo letalno koncentracijo ( $LC_{50}$ ) ali srednjo koncentracijo z učinkom ( $EC_{50}$ ), medtem ko v testih kronične strupenosti običajno določujemo subletalne koncentracije ( $EC_x$ , LOEC), ki vplivajo na razmnoževanje, rast, obnašanje itn. ter koncentracijo brez učinka (NOEC) (Newman in Clemens, 2008).



Slika 5: Poenostavljen odnos med koncentracijo snovi in učinkom.

(Vir: <http://www.denstoredanske.dk/>)

Nasprotno od grafično prikazane (Slika 5) »klasične« zveze med odmerkom in učinkom, omenimo še hormezo, pri kateri ima graf bifazni potek oz. inverzno obliko črke U. Hormesis (gr. hitro gibanje) je biološki fenomen pri katerem (dober, pozitiven) učinek – odpornost na stres, hitrejša rast, razmnoževanje izhaja iz daljše izpostavljenosti odmerkom neke snovi, ki je sicer strupena oz. celo letalna pri visokih odmerkih (Mattson, 2008). Stimulativen učinek za organizem je dobro razviden na nivoju organizma (npr. povečano razmnoževanje) (Novak idr. 2012).



## 5 UPORABA NEVRETEŃARJEV V TESTIH STRUPENOSTI

Kopenski nevretenčarji, ki jih v osnovi prepoznavamo kot organizme z zunanjim skeletom, skupaj predstavljajo 95 % vseh vrst na Zemlji, zavzemajo največji delež biomase med živalmi in naseljujejo ter prevladujejo v večini habitatnih tipov. Med nevretenčarji največji delež predstavlja skupina hroščev, ki jo sestavlja okoli 300.000 različnih vrst, od tega jih slaba desetina živi v Evropi (Norris, 2011; Haslett, 2007).

Testi strupenosti na nevretenčarjih ne predstavljajo visokih stroškov, se izvedejo v razumnem času in so enostavni za uporabo v standardnih protokolih za različne namene testiranja. Kot testne vrste so nevretenčarji še posebej primerni pri pridobivanju ekotoksikoloških podatkov novih kemikalij (Cattaneo, 2009).

Nevretenčarji imajo osrednjo vlogo v ekosistemu, saj opravljajo različne ekosistemske storitve z veliko ekonomsko vrednostjo, med katerimi so najpomembnejše: opravevanje, razgradnja organske snovi, ohranjanje strukture in plodnosti zemlje, regulacija populacij ostalih vrst (škodljivcev) itd. (Norris, 2011). Prav tako imajo pomembno vlogo v medicini in v tehnologiji materialov ter sistemov (izdelava molekularnih struktur, v robotiki ipd.). Zaradi tega je zelo pomembno ohraniti njihovo biodiverzitetu (Haslett, 2007).

Vodni nevretenčarji so pri presoji učinkov kemikalij za vodne ekosisteme osrednjega pomena saj omogočajo prepoznavo strupenosti že v nižjih členih prehranjevalne verige. Neposredni strupeni učinki kemikalij sicer vplivajo na razporeditev, gostoto in vedenjske spremembe vodnih nevretenčarjev. Poleg tega, da so vodni nevretenčarji ekološko in ekonomsko zelo pomembni, je pomemben vidik tudi njihovo medvrstno razlikovanje v morfološki in fiziološki zasnovi ter ekološki vlogi, kar omogoča merjenje zelo različnih odzivov na strupene snovi (Maciorowski in Clarke, 1980).

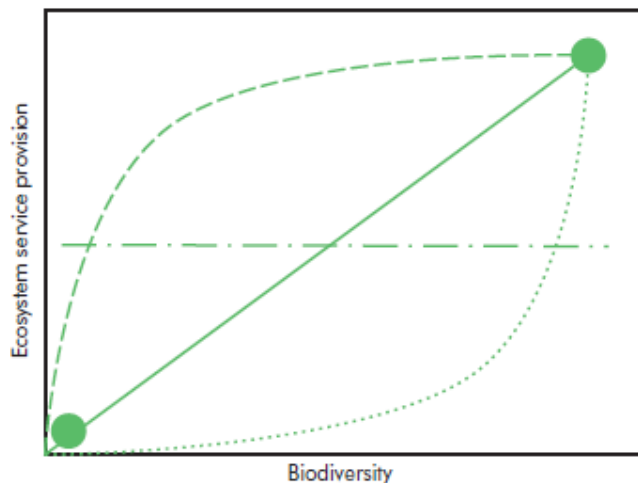
Kopenski nevretenčarji sodelujejo pri številnih bioloških in biokemijskih procesih. S pretvorbo (predvsem mineralizacijo) organskega materiala imajo pomembno vlogo za ekosistem in kmetijstvo (Cardoso in Alves, 2012).

Podatki monitoringa populacij prostoživečih živali, z izjemo nekaterih vrst vretenčarjev, so v Sloveniji pomanjkljivi. Še zlasti je zelo slabo poznavanje večine nevretenčarjev, med njimi tudi ogroženih skupin za katere so na voljo le grobi približki (Agencija Republike Slovenije za okolje, 2001).

V nekaterih Evropskih državah je okoljski monitoring nevretenčarjev nekoliko bolj v ospredju. Zaradi velike izgube biodiverzitet v Veliki Britaniji v zadnjih 50. letih, se je na otočju povečala potreba za bolj temeljit okoljski monitoring, zato imajo nekoliko bolj temeljit pregled nad stanjem nekaterih skupin nevretenčarjev. Tako zbrani podatki za nekatere opravevalce kažejo na upad teh vrst po letu 1980. Drugi primer je primerjalna študija na nacionalni ravni, v kateri so leta 2007 ocenili gostoto v zemlji živečih nevretenčarjev (do globine 8 cm) in prišli do sklepa, da se je njihova gostota, v primerjavi z letom 1998, povečala v vseh najbolj pogostih habitatnih tipih (z izjemo obdelovalnih površin: žitnih polj). Opazili so predvsem povečanje gostote pršic, zato predpostavljajo, da se različne skupine nevretenčarjev odzovejo na spremembe v ekosistemu zelo različno. Rezultati iz raziskave so pokazali tudi majhno, vendar statistično pomembno, zmanjšanje pestrosti vrst nevretenčarjev v vseh preučevanih habitatnih tipih (Norris, 2011).



Biodiverziteteta kopenskih in vodnih vrst zelo pomembno vpliva na stabilnost in raznovrstnost številnih funkcij v ekosistemu, kar pripomore k večji stabilnosti kopenskega ali vodnega ekosistema (Slika 6). Posledično morebiten upad biodiverzitetete povzroči, poleg zmanjšanja ekosistemskih storitev, tudi veliko večjo spremenljivost le-teh v prostoru in času. Tako biodiverziteteta potencialno služi kot varovalni mehanizem pri ohranjanju ekosistemskih storitev ob okoljskih spremembah (Norris, 2011).



Slika 6: Povezava med biodiverziteteto (x os) in funkcionalnostjo ekosistema (y os).

(Vir: Norris, 2011)

Črtna črta na (Slika 6) prikazuje, da je funkcionalnost ekosistema odporna na zmerno stopnjo izgube biodiverzitetete; medtem ko pikčasta črta prikazuje, da je posamezna storitev v ekosistemu zelo občutljiva tudi na majhno izgubo biodiverzitetete. To je razvidno iz polne črte. Horizontalna črta s pikami prikazuje scenarij, v katerem je storitev ekosistema kot celote neprizadeta glede na spremembo v biodiverziteteti. Zelena kroga prikazujeta običajno dosegljive podatke, ki posplošeno prikazujejo, da izguba biodiverzitetete zmanjša storitve ekosistema. Dosegljivi podatki so običajno preskopi za natančnejši opis te zveze (Norris, 2011).

Zaščita nevretenčarjev na globalnem nivoju je potrebna zaradi naslednjih razlogov (Haslett, 2007):

- so pomemben člen ekosistema in v njem upravljajo raznolike funkcije,
- od vseh vrst prispevajo največ k biodiverziteteti,
- prevladujejo v večini ekosistemov;
- imajo osrednjo vlogo v prehranjevalni verigi za višje organizme.

## 5.1 Izbira primerne vrste

Izbira organizma v testu strupenosti je odvisna od tipa informacij, ki jih iščemo, fizikalnih in kemičnih lastnosti kemikalije ali vzorca in od občutljivosti in okoljske razširjenosti testnega organizma (Gargošová idr. 2011). Vrste nevretenčarjev, ki so primerne pri ocenjevanju kvalitete zemlje, so: hrošči, mravlje, pajkovci, pršice, skakači in različne vrste deževnikov (Cardoso in Alves, 2012).

Med ekologi in kmetijskimi pridelovalci obstaja strokovno mnenje, da so deževniki najboljši indikatorji kakovosti zemlje. Zelo pomembni so tudi beli črvi (podskupina *Oligochaeta*), vendar so nekoliko manj raziskani. Ti predstavljajo manjši del biomase v zemlji, vendar so izjemno pomembni pri ekosistemskih storitvah v kisljih tleh, kjer lahko nadomestijo deževnike, ki so sicer najbolj razširjeni med talno favno (prav tam, 2012).

## 5.2 Glavne prednosti nevretenčarjev

### 5.2.1 Fiziološke značilnosti

Velika prednost mnogih nevretenčarjev pri študijah onesnaženosti okolja je njihova nezmožnost selitve na večje razdalje. Prav tako se npr. v primeru onesnaženja vodotoka ali zemlje ne morejo izogniti izpostavljenosti onesnaževalom (Lagadic in Caquet, 1998).

Ostale fiziološke značilnosti nevretenčarjev so še: sposobnost aseksualnega razmnoževanja, kar zagotavlja veliko število genetsko enakih potomcev (klonov) in produkcija jajčec. Dodatne prednosti so tudi visoka ponovljivost faze razvoja ličinke, majhna velikost odraslih organizmov in njihovo preprosto gibanje, ki omogoča, da hitro opazimo vedenjske motnje (Cattaneo, 2009).

### 5.2.2 Razširjenost

Nevretenčarji so dominantna skupina v kraljestvu živali, najdemo jih širom sveta in tudi v zelo prostranih okoljih. Zato so pogostokrat edini organizem s katerimi lahko ocenjujemo stanje okolja (Lagadic in Caquet, 1998).

## 5.3 Zakonodaja in uporaba nevretenčarjev

Danes je uporaba vretenčarjev, kot modelov pri testiranju strupenosti zaradi etičnih razlogov sporna. Uporaba drugih metod celičnih kultur in računalniškega modeliranja (*»in silico«* metode) je razširjena, vendar nima enake uporabne vrednosti kot testiranje na živih organizmih (Patwardhan in Ghaskadbi, 2013).

Zato je v prihodnje na mestu uporaba organizmov z slabše razvitimi čutilnimi sistemi, kar je značilnost nevretenčarjev (prav tam, 2013). Čutilne sposobnosti se namreč povezuje z večjo kompleksnostjo živčnega sistema, tega ni opaziti pri večini nevretenčarjev (Mather, 2001). Zato se, z izjemo čebel in pikapolonic (Lagadic, 1998), nevretenčarji ne pojavljajo v zakonodaji, ki regulira testiranje na živalih, kot prepovedani (Laurent in Caquet, 1998; Patwardhan in Ghaskadbi, 2013).

## 6 TESTI STRUPENOSTI NA IZBRANIH KOPENSKIH IN VODNIH NEVREtenČARJIH

### 6.1 Standarden testni organizem: deževnik (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*)

#### 6.1.1 Opis vrste

Deževnik (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*) ima kratko relativno življenjsko dobo. Povprečna znaša 594 dni. Posamezen osebek pa lahko živi do 5 let. Dihanje in izločanje odpadnih snovi poteka skozi zgornjo plast kože (epidermis). Za deževnike je značilen sklenjen krvožilni sistem. Ta organizem spolno dozori v nekaj tednih, kar je razvidno iz dobro razvitega sedla (kliteluma). Po naravi je dvospolnik (hermafrodit). Parjenje poteka z navzkrižno oploditvijo in izmenjavo spermijev. Po oploditvi se sedlo formira v kokon iz katerega se, po inkubacijski dobi, ki traja 18-26 dni, običajno izležejo do 4. deževniki. Velja, da je deževnik zelo ploden, saj lahko tedensko proizvede do 5 kokonov (Dominguez in Edwards, 2011; OECD, 1984b; Peijnenburg in Vijver, 2009).

Vrsta *Eisenia fetida* (Slika 7) ima značilno, v obliki prog, pigmentirano kožo. Medtem vrsta *Eisenia andrei* nima tako izražene pigmentacije in je nekoliko temnejše rdeče barve (OECD, 1984b). Čeprav sta vrsti filogenetsko različni, med njima ne prihaja do večjih razlik. Omeniti velja stopnjo rasti in začetek tvorjenja kokonov, ki hitreje poteka pri vrsti *Eisenia fetida* (Dominguez in Edwards, 2011).



Slika 7: Deževnik (*Eisenia fetida*)

(Vir: <http://www.tier3.de/field-studies/soil-organisms/>)

### 6.1.2 Razširjenost

Kompostnega deževnika (*E. fetida*) pogosto najdemo v zemlji bogati z organskimi snovmi, predvsem so zelo značilni za Evropo in Severno Ameriko. Vrsta živi v zgornji plasti zemlje in se hrani z delno razpadlim organskim materialom. So ekološko pomembni zaradi rahljanja zemlje. Okoljski pogoji, ki imajo največji vpliv na populacije deževnikov so vlažnost, temperatura in pH. Predvsem slednji parameter se omenja kot omejujoč dejavnik pri razširjenosti deževnikov (Peijnenburg in Vijver, 2009).

Deževniki iz družine *Lumbricidae* večinoma ne naseljujejo habitatov, kjer je pH manjši od 4,0. Omejujoč faktor je lahko tudi pomanjkanje organske snovi (prav tam, 2009).

### 6.1.3 Ekološka vloga

Kopenski organizmi imajo pomembno vlogo pri ohranjanju rodovitnosti zemlje. V skupini nevretenčarjev po pomembnosti in zastopanem deležu biomase (>80 %) še posebej izstopajo deževniki iz družine *Lumbricidae*. Ta družina deževnikov zelo številčno naseljuje zemeljska tla: na približno 0,4 ha lahko živi čez milijon osebkov (Peijnenburg in Vijver, 2009).

Vrsti *Eisenia fetida/andrei* spadata med epigeične vrste, kar pomeni, da živita na površju tal pod steljo in se prehranjujeta z delno razpadlo organsko snovjo. Nekatere druge značilnosti teh dveh vrst so tudi: visoka stopnja presnove in absorpcije organske snovi; prilagodljivost na različne okoljske pogoje; relativno kratka življenjska doba; visoka stopnja rodnosti (Dominguez in Edwards, 2011).

Deževniki oblikujejo rove v zemlji, ki služijo dostopu zraka in vode. Takšna zemljišča lahko absorbirajo 4-10-krat več vode. Rovi preprečujejo površinsko spiranje in pripomorejo k obnavljanju podtalnice (Peijnenburg in Vijver, 2009).

### 6.1.4 Uporaba v testih strupenosti

Navodila za testiranje strupenosti na deževnikih so izdale številne mednarodne organizacije (ASTM, US EPA itd.). OECD je standardizirala test akutne in test kronične strupenosti na vrsti *Eisenia fetida/Eisenia andrei* in sta na kratko opisana v nadaljevanju ter podana v (Preglednica 3).

Omenjeni vrsti sicer ne živita povsem v zemlji, običajno ju najdemo na kompostu ali gnoju, vendar sta zelo enostavni za gojenje v laboratoriju. Gojimo ju lahko na substratu kot so konjski iztrebki ali iztrebki ovac (Van Leeuwen in Vermeire, 2007). Iskani odzivi kot so preživetje, reprodukcija in spremembe telesne mase, so v standardnih testih strupenosti dobro opisani. Ostali odzivi kot so obnašanje, morfološke in fiziološke spremembe, se poročajo občasno in jih ne ocenjujemo na standarden način (Peijnenburg in Vijver, 2009).

**OECD (št. 207) – test akutne strupenosti:** negativne učinke na standardno testno vrsto *Eisenia fetida* (Savigny 1826) ali *Eisenia andrei* (Andre 1963), pri čemer uporabimo odrasle osebe (z razvitim klitelumom), ugotavljamo na dva načina: najpreprostejša je uporaba filtrirnega papirja, kamor naneseemo testno snov in merimo strupene učinke ( $EC_x$ ) v času 48-72 h. Takšen pristop lahko služi predvsem kot preliminarni del testiranja in sicer za ugotavljanje stopnje strupenosti testne snovi (pri iskanju koncentracijskega območja pojava učinka) in ne omogoča nikakršne napovedi usode kemikalije v tleh. Drugi način je uporaba testnih posod z umetno

zemljino v katere primešamo vsaj pet različnih koncentracij testne snovi in merimo preživetje ( $LC_{50}$ ) osebkov po prvem tednu oz. na koncu testa po drugem tednu. Hkrati lahko beležimo neobičajne spremembe (fizikalne in patološke simptome ali razločne spremembe v obnašanju). Uporaba sistema z umetno zemljino, ki do določene mere ponazarja naravno okolje, daje napovedno vrednost za preživetje in neobičajno obnašanje deževnikov. Za veljavnost testa mora preživetje osebkov v kontrolni skupini dosegati vsaj 90 % (OECD, 1984b).

**OECD (št. 222) – test kronične strupenosti:** negativne učinke na standardno testno vrsto *Eisenia fetida* (Savigny 1826) ali *Eisenia andrei* (Andre 1963), pri čemer uporabimo osebkke stare od 2 do 12 mesecev (z razvitim klitelumom), ki jih izpostavimo vsaj petim različnim testnim koncentracijam, ki jih primešamo v umetno zemljino ali nanesimo na njeno površje (npr. testiranje pesticidov), prvič ocenjujemo po 4. tednih. Pri tem merimo preživetje in učinke na rast ter odstranimo odrasle organizme. Prav tako je priporočeno poročanje o nenavadnem obnašanju odraslih osebkov (npr. nesposobnost zakopa v zemljino) in morfoloških spremembah (npr. rane). Učinke na razmnoževanje, kar je osrednji namen tega testa, ocenimo po dodatnih 4. tednih. Pri tem merimo število preživelih mladičev v testni zemljini in na podlagi podatkov naredimo primerjavo s kontrolno skupino ter na ta način določimo NOEC. Merimo lahko tudi  $EC_x$  (npr.  $EC_{10}$  ali  $EC_{50}$ ) in določimo koncentracijo, ki povzroči za x % zmanjšanje št. mladičev. Pogoji v kontrolni skupini za veljavnost testa: v vsaki ponovitvi (10 deževnikov) mora biti vsaj 30 mladičev, koeficient variacije je lahko največ 30 % in letalnost odraslih po 4. tednih ne sme presegati 10 % (OECD, 2004).

Čeprav prenos rezultatov laboratorijskega testiranja na dejanske razmere v okolju ni povsem zanesljiv, imata odziva kot sta preživetje in razmnoževalna sposobnost najbolj zanesljivo napovedno vrednost za okolje, saj sta v testih strupenosti najbolj definirana (Peijnenburg in Vijver, 2009).

Preglednica 3: Primerjava testov akutne in kronične strupenosti

OECD, št. navodil	207	222
Vrsta testa	Akutni test	Kronični test
Sistem izpostavljenosti	Filtrirni papir Umetna zemljina	Umetna zemljina
Trajanje testa	Filtrirni papir: 3 dni Umetna zemljina: 14 dni	56 dni
Svetlobna temperatura perioda,	16h, 20 °C ( $\pm 2$ °C)	16h, 20 °C ( $\pm 2$ °C)
Merjen odziv	Preživetje	Preživetje in rast odraslih osebkov; sposobnost razmnoževanja
Parameter	$LC_{50}$	Razmnoževanje: NOEC; $EC_x$ (npr. $EC_{10}$ , $EC_{50}$ ) Preživetje: $LC_{50}$ Sprememba telesne mase: % začetne

(Vir: OECD, 1984b, 2004).

## 6.2 Nestandarden testni organizem: kopenski rak enakonožec (*Porcellio scaber*)

### 6.2.1 Opis vrste

Kopenski raki enakonožci (Slika 8) imajo podolgovato telo ovalne oblike. Pred zunanjimi vplivi jih štiti kutikula, zgrajena iz hitina in proteinov. Da lahko rastejo, se pogostokrat levijo (Holnung, 2011). Razlikujemo tri telesne regije: glava, oprsje in zadek. Na glavi sta dva para tipalnic: antenuli sta zelo majhni in komaj opazni; medtem je drugi par tipalnic (anten) normalno razvit. Oprsje sestavlja sedem, med seboj gibljivo povezanih segmentov, ki so sestavljeni iz hrbtnih (tergitov) in trebušnih ploščic (sternitov). Na slednjih je po en par nog hodilk (pereiopodov), ki so sestavljene iz šestih prostih členkov. Zadek je sestavljen iz petih členov, ki med seboj niso trdno zrasli. Končuje se z dodatnim šestim členom – repom na katerem je par repnih nožic (uropodov). Srce in dihalni aparat (škrge) se nahajata v zadku. So ločenih spolov, z izrazitim spolnim dimorfizmom. Oploditev je notranja (Mršič, 1997).

### 6.2.2 Razširjenost

Raki enakonožci (latinsko ime: *Isopoda*) so majhni kopenski organizmi (1,2-30 mm). Po dosedanjih ugotovitvah obstaja okoli 5000 vrst, ki poseljujejo večji del sveta in zelo različne habitatne tipe (Paoletti in Hassall, 1999). Na splošno se zadržujejo v habitatih z višjo talno, predvsem pa stalno visoko zračno vlago. Najdemo jih predvsem v okoljih z veliko kalcija (na apnencih in dolomitih). Živijo pretežno v tleh in so endogeične vrste (Mršič, 1997).

Vrsta *Porcellio scaber* poseljuje vlažne gozdne habitate. Živi v gozdni stelji, trhljem lesu, pod kamni, skorjo itn. Poseljujejo predvsem vlažne gozdne habitate (prav tam, 1997). Ker je ta vrsta zelo razširjena, jo najdemo tudi na nekoliko bolj obljudenih mestih; lesenih skednjih, starejših ostrejših itd. (Paoletti in Hassall, 1999).



Slika 8: Kopenski rak enakonožec (*Porcellio scaber*).

(Vir: <http://www.eakringbirds.com/eakringbirds5/isopodswoodlice.htm>)

### 6.2.3 Ekološka vloga

Kopenski raki enakonožci so glavni predstavniki kopenskih makro razgrajevalcev/razkrojevalcev. Imajo pomembno vlogo pri procesu razgradnje organske snovi in kroženju esencialnih hranil, kar zagotavlja rodovitnost zemlje (Paoletti in Hassall, 1999). Po naravi so omnivori, vendar se hranijo predvsem z razpadajočo organsko snovjo (Jereb idr. 2003). Zmožni so pleniti ličinke žuželk in se posluževati kanibalizma (Paoletti in Hassall, 1999). Njihovi glavni plenilci so vretenčarji: ptiči, dvoživke, kuščarji, sesalci (predvsem rovka) in nevretenčarji: pajki, škorpijoni, strige in drugi insekti (prav tam, 1999).

So pomemben člen v procesu nastajanja humusa. Celuloze in lignina ne prebavljajo, pomembni pa so pri mehanskem drobljenju rastlinskih ostankov, kar pripomore k večji aktivni površini delcev za mikrobno razgradnjo in hitrejšemu prehajanju delcev globje v zemljo (Mršič, 1997; Paoletti in Hassall, 1999). Prav tako pripomorejo k prenosu propagul bakterij in gliv ter pospešujejo mikorizo (Paoletti in Hassall, 1999).

Kot škodljivci na kmetijsko pridelovalnih površinah se ne omenjajo. Škodo lahko povzročijo v primeru, da jim kronično primanjkuje (relativno širokega nabora) običajne hrane (prav tam, 1999).

### 6.2.4 Uporaba v testih strupenosti

Kopenski raki enakonožci so pomembna skupina kopenskih organizmov in predstavljajo dober model za preučevanje strupenosti kemikalij. Najpomembnejši razlogi za to so: dobro poznane biološke in fiziološke značilnosti organizma, relativno enostavno gojenje v laboratorijskih razmerah, razširjenost in pomembna ekološka vloga. Na podlagi tega so splošno priznani kot primeren kopenski testni organizem in jih za ocenjevanje strupenosti kemikalij tudi pogosto uporabljamo (Drobne, 2008; Renoux in Sunahara, 2002; Paoletti in Hassall, 1999).

Med najbolj pogosto uporabljenimi vrstami enakonožcev je tudi vrsta *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). Ta vrsta se je v preteklih študijah že izkazala za primerno pri ocenjevanju učinkov kovin, insekticidov, biocidov, veterinarskih zdravil in nanodelcev. Nekaj študij je podanih v (Preglednica 4). Merjenje nekaterih standardnih odzivov, kot je rast, razmnoževanje in življenjski cikel, za to vrsto ni najbolj praktično. Razlogi za to so: stopnja rasti je med enakonožci zelo spremenljiva že v nekaj tednih; razmnoževanje lahko traja zelo dolgo; življenjski cikel večine enakonožcev traja zelo dolgo (običajno 6-8 mesecev) (Novak idr. 2012).

Subletalni učinki, ki jih običajno merimo v testih strupenosti na rakah enakonožcih, so motnje pomembnih življenjskih funkcij (motnje hranjenja in izguba teže) in obnašanje. Spremembe v stopnji hranjenja so, pri zastrupitvi hrane z organskimi kemikalijami ali kovinami, hitro opazne. Prav tako lahko merimo tudi standarden odziv kot je preživetje (Drobne, 2008; Novak idr. 2012).



Preglednica 4: Pregled študij za nekatere tipe kemikalij.

Avtor študije	Preučevana kemikalija	Testni medij/sistem	Način in trajanje izpostavitve	Hranjenje	Merjeni parametri
Hrženjak idr. (2009)	Insekticid: klormefos	Umetna zemljina (Lufa 2.2)	Oralna: 28 dni	Peleti (zmleti javorjevi listi, zajčja hrana in posušen krompir)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Preživetje (LC<sub>50</sub>)</li> <li>Vedenjski vzorec (izogibanje substratu)</li> </ul>
Novak idr. (2012)	Nanodelci (TiO <sub>2</sub> )	Petrijevka	Oralna: 28 dni (intervalno merjenje: 3, 7, 14 in 28 dan).	Lešnikovi listi	<ul style="list-style-type: none"> <li>Preživetje (LC<sub>50</sub>) in izguba teže</li> <li>Zmanjšana stopnja prehranjevanja</li> </ul>
Zidar idr. (2009)	Kovine: Zn in Cd	Petrijevka	Oralna: 28 dni	Lešnikovi listi, želatina in ribja hrana	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stopnja prehranjevanja (EC<sub>50</sub>)</li> <li>Združen učinek (Zn+Cd)</li> </ul>

Zaenkrat še ne obstaja standardizirana testna vrsta med kopenskimi raki enakonožci, vendar ta organizem kaže potencial za hitro, rutinsko in ekonomično testiranje strupenosti kemikalij za kopenske ekosisteme (Drobne, 2008).

Zaradi pomembne vloge nevretenčarjev v ekosistemih, je nujno pridobivati toksikološke podatke tudi za nestandardne vrste, saj je tako mogoče določiti občutljivost različnih vrst na neko strupeno snov ali onesnaževalo (prav tam, 2008).

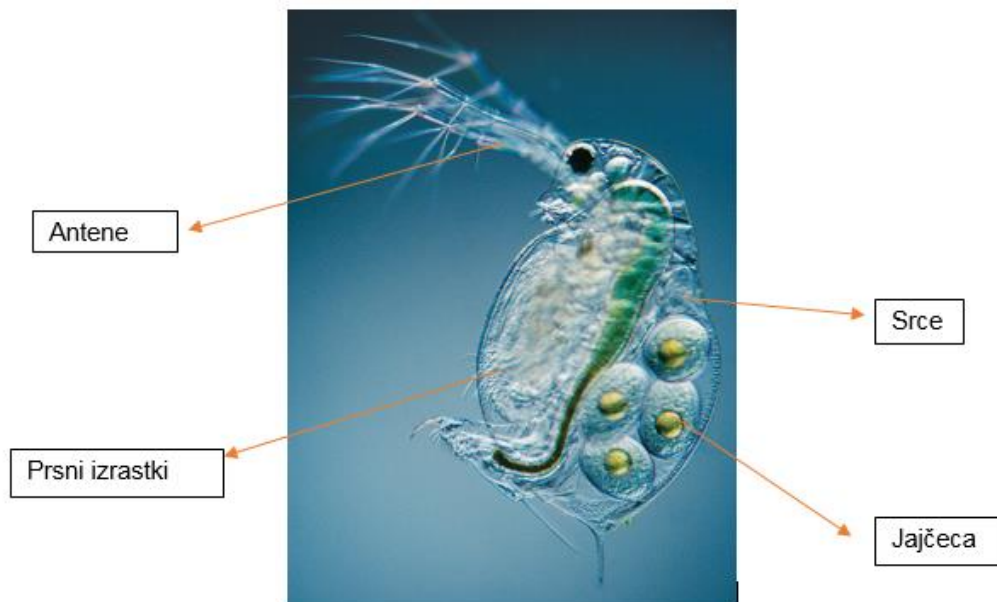
### 6.3 Standarden testni organizem: vodna bolha (*Daphnia magna*/*Daphnia pulex*)

#### 6.3.1 Opis vrste

Vodna bolha *Daphnia magna* (Slika 9) v dolžino meri 2-5 mm in v idealnih razmerah živi do okoli 60 dni. Samci te vrste so manjši od samic in zrastejo največ do 2 mm. Na glavi ima dva relativno dolga para razvejanih anten, ki omogočajo značilno vertikalno gibanje vodne bolhe. Notranje organe ščiti prozorna, dvodelna ovojnica, ki je zgrajena iz hitina. Ta prostoplavajoči organizem hrano in kisik dovaja s pomočjo prsnih izrastkov, ki poleg tega pomagajo pri ustvarjanju toka za gibanje. Vodna bolha ima enodelno razvito oko, ki omogoča sprejemanje različnih barvnih spektrov in zaznava gibanje (Elenbaas, 2012).



Običajni generacijski čas tega organizma znaša 10 dni. V tem času se prvič pojavijo razviti mladiči. Kasneje se mladiči pojavljajo v časovnem intervalu 2-3 dni. Večino leta se vodne bolhe razmnožujejo partenogenetsko; iz neoplojenih (diploidnih) jajčec se razvijejo samice, ki so genetsko enake staršu. Med težjimi pogoji (pomanjkanje hrane, temperaturni ekstremi, velika populacijska gostota) se vrsta lahko razmnožuje tudi spolno. Običajni čas spolnega razmnoževanja nastopi pozno v jeseni, tako nastala (haploidna) jajčeca so namreč odpornejša na zimske pogoje (Elenbaas, 2012; Van Leeuwen in Vermeire, 2007).



Slika 9: Vodna bolha (*Daphnia magna*).

(Vir: <http://www.telegraph.co.uk/earth/earthpicturegalleries/7615408/Bugs-Britannica.html?image=2>)

### 6.3.2 Razširjenost

Medtem, ko je *Daphnia magna* razširjena predvsem v Evraziji, vrsta *Daphnia pulex* poseljuje večji del Severne poloble (Ratte idr. 2003). Vrsti naseljujeta sladkovodna telesa in somornico (slanosti do 8 ‰). Tipični habitat so jezera, reke in sezonski vodostaji. Temperatura okolja, ki omogoča optimalen razvoj vrst se giblje med 18-22 °C. Prav tako vrsti kažeta povečano toleranco do večjih odstopanj od optimalne temperature. Živita v skupinah in sta zelo številčni v habitatu, ki ga naseljujeta (Elenbaas, 2012).

### 6.3.3 Ekološka vloga

Vodne bolhe imajo zelo pomembno vlogo v prehranjevalnih verigah. Hranijo se s filtriranjem vode, z delci velikosti do 50 mikronov. Najpomembnejši prehranski vir predstavlja zooplankton in fitoplankton. Kot vir hrane lahko služijo tudi bakterije, organski delci in spore gliv. Na ta način imajo čistilno funkcijo v stoječih vodnih telesih in so tudi indikator kvalitete vode. Vodne bolhe so plen za mnoge vrste rib, insekte in druge nevretenčarje (Elenbaas, 2012).

### 6.3.4 Uporaba v testih strupenosti

Vodne bolhe rodu *Daphnia* so najbolj proučevan sladkovodni testni organizem (Robinson in Thorn, 2005; Ratte idr. 2003; Cattaneo, 2009). Vodne bolhe imajo stereotipno vedenje (premikanje s sunkom in izrazit odziv na svetlobo), ki v primeru kemičnega onesnaženja ni več izraženo (Cattaneo, 2009). V testih strupenosti uporabljamo različne vrste vodnih bolh: veliko vodno bolho (*Daphnia magna*), navadno vodno bolho (*Daphnia pulex*) itd. Primernost njihove uporabe se kaže predvsem v tem, da so enostavne za gojenje, ne zahtevajo veliko prostora, poraba testnega materiala je majhna, so najbolj pomemben predstavnik v trofičnem nivoju, imajo relativno kratek življenjski cikel ter kažejo povečano občutljivost na različne vrste kemikalij (Robinson in Thorn, 2005; Van Leeuwen in Vermeire, 2007). Dodatna prednost, ki pripomore k večji ponovljivosti testnih rezultatov, je tudi partenogenetski način razmnoževanja (produkcija mladičev z enako genetsko zasnovo). Takšen organizem je zato visoko standardiziran (Ratte idr. 2003).

V testih strupenosti na vodnih organizmih sicer uporabljamo tudi druge nevretenčarje (npr. mehkužce), vendar se, kot sladkovodnega predstavnika s številnimi ekološkimi in toksikološkimi prednostmi, največ poslužujemo uporabe vodnih bolh (Robinson in Thorn, 2005).

Natančne postopke testiranja strupenosti na vodnih bolhah predpisujejo številne mednarodne organizacije. V oceni tveganja za okolje običajno uporabljamo akutni in kronični test strupenosti, ki ju predpisuje OECD (Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj). Kratek povzetek in osnovne značilnosti obeh testov (Preglednica 5) so podani v nadaljevanju.

**OECD št. 202 – test akutne strupenosti:** negativne učinke na standardno testno vrsto *Daphnia magna/Daphnia pulex*, pri čemer uporabimo osebke starosti <24h, ocenjujemo po enem dnevu oz. na koncu testa po dveh dnevih. Pri tako zasnovanem testu je najprimernejša uporaba statičnega testnega sistema, saj osebke med testom ne hranimo. Uporabimo vsaj pet različnih koncentracij testne snovi. V takšnem testu merimo učinke na gibalno sposobnost vodnih bolh. Nezmožnost gibanja (imobilizacijo) določimo na podlagi naslednjih kriterijev: vodna bolha ni sposobna plavati oz. po pretresenju testnega medija ne premika anten ali drugih izrastkov. Določimo lahko parameter  $EC_{50}$ . Pogoji za priznavanje testa: v kontrolni skupini ima sposobnost gibanja vsaj 90 % osebke; za kontrolno in testno skupino velja, da je v mediju vsaj 3 mg/L raztopljenega kisika (OECD, 1984a).

**OECD št. 211 – test kronične strupenosti:** negativne učinke na standardno testno vrsto *Daphnia magna/Daphnia pulex*, pri čemer uporabimo osebke starosti <24h, ocenjujemo na koncu testa po treh tednih. Osrednji namen testa je oceniti razmnoževalno sposobnost vodnih bolh pri izpostavitvi vsaj petim različnim koncentracijam testne snovi. Pri tem uporabimo obnovljivi ali pretočni sistem izpostavitve, izbira je odvisna od narave testne snovi (hlapnost ipd.). Prav tako moramo poznati še nekatere ostale lastnosti testne snovi: topnost v vodi, stopnjo biodegradacije itd. Med testom osebke hranimo z zelenimi algami (npr. *Chlorella sp.*). Na koncu testa merimo preživetje samic in število živih mladičev na živo samico za vsako testno koncentracijo in statistične podatke primerjamo s kontrolno skupino ter tako določimo parametra kot sta LOEC in NOEC. Strupene učinke za razmnoževanje lahko določimo tudi z  $EC_x$  (npr.  $EC_{10}$  ali  $EC_{50}$ ) in določimo koncentracijo ki povzroči za x % zmanjšanje št. mladičev. Pogoji za priznavanje testa: v kontrolni skupini mora preživeti vsaj 80 % samic in povprečno število mladičev na preživelo samico je vsaj 60 (OECD, 2012).

Preglednica 5: Osnovne značilnosti testov akutne in kronične strupenosti na vrsti *D.magna/D.pulex*.

OECD, št. navodil	202	211
Vrsta testa	Akutni test (imobilizacija)	Kronični test (sposobnost razmnoževanja)
Testni medij	*Lendt M4 ali M7	
Sistem izpostavljenosti	Statični, obnovljivi in pretočni	Obnovljivi in pretočni
Trajanje testa	2 dni	21 dni
Hranjenje	Brez	Vsaj 3 krat tedensko (zelene alge)
Svetlobna perioda, temperatura	16 h, 18-22 °C	
Merjen odziv	Gibalna sposobnost	Razmnoževanje, gibalna sposobnost
Parameter	EC <sub>50</sub>	EC <sub>x</sub> , LOEC, NOEC

(Vir: OECD, 1984a; OECD, 2012)

\*se ne uporablja za testiranje kemikalij, ki vsebujejo kovine. Primernejša je uporaba sladke trde vode (rekonstituirane po ASTM), ki ne vsebuje kelatnega reagenta.

## 7 PRESOJA RAZLIČNIH TIPOV KEMIKALIJ

Ekotoksini, kot tudi imenujemo strupena onesnaževala, so lahko naravnega ali umetnega izvora. Skupno jim je to, da že v nizkih odmerkih negativno učinkujejo na neciljne organizme. V naravi prisotni strupi (npr. koncentrirani v rastlinskih tkivih kot del obrambnega mehanizma pred škodljivci in naravni depoziti globoko pod zemeljskim površjem) niso toliko problematični, kot strupi sintetičnega porekla, ki predstavljajo neposredno nevarnost neciljnim organizmom živečim v onesnaženem okolju ter okolju na splošno.

Pomembnost pridobivanja ekotoksikoloških podatkov za različne tipe kemikalij – industrijske kemikalije, pesticide, zdravila (humana, veterinarska) itd., je prepoznana z mednarodnim soglasjem, v obliki zakonodaje na ravni Evropske unije (EU). Glede na razlikovanja v namenu uporabe različnih tipov kemikalij, je za vsakega od teh točno določena količina potrebnih ekotoksikoloških podatkov. Na podlagi teh razlikovanj moramo npr. za pesticide pridobiti največ ekotoksikoloških podatkov, saj jih uporabljamo namensko za škodovanje organizmom (Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

### 7.1 Industrijske kemikalije

Potrebni podatki za proizvedene, uvožene in prodajane industrijske kemikalije v EU so določeni v uredbi REACH (kratica za: registracijo, evalvacijo, avtorizacijo in omejevanje kemikalij). Glavni cilj te uredbe je zagotovitev varnosti ljudi, kot tudi ostalega okolja pri uporabi kemikalij. Zahtevani ekotoksikološki podatki za industrijske kemikalije so pogojeni z obsežnostjo proizvodnje le-teh, kot je prikazano v (Preglednica 6).

Preglednica 6: Vpliv količine proizvedenih kemikalij na zahtevane ekotoksikološke podatke.

Tonaža kemikalij (t)	Priloga (REACH)	Zahtevani ekotoksikološki podatki za nevretenčarje
>1	VII	Akutni test na vodni bolhi
>10	VIII	Ni dodatnih zahtev
>100	IX	Dodatek: -kronični test na vodni bolhi -akutni test za kopenske nevretenčarje
>1000	X	Dodatek: kronični test za nevretenčarje

(Vir: Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

### 7.2 Nanomateriali in nanodelci

Za okolje potencialno nevarnost predstavljajo tudi nanomateriali, ki so relativno mlada skupina kemikalij, katerih vpliv na okolje je zaenkrat slabo raziskan (Cataneo, 2009). Uporaba nanomaterialov je zelo razširjena, uporabljamo jih v industriji, zdravstvu, kmetijstvu itn. Narašča tako njihova proizvodnja, kot tudi uporaba na novih področjih. Posledično je pričakovati njihovo vse večjo prisotnost v vodnih telesih, tleh itn. (European Commission, 2012).

Nanomateriali so majhni delci, ki so biološko in okoljsko stabilni ter topni v vodi, njihov dolgoročni vpliv na okolje še ni poznan (European Commission, 2008). To je material, ki ima vsaj eno dimenzijo 100 nm ali manj. Ti so lahko nanodimenzije v eno dimenzijo (npr. filmi), dve dimenziji (npr. vlakna in cevke) ali tri dimenzije (delci). Fizikalno-kemijske lastnosti pri takšni velikosti so zaenkrat še slabo znane. Njihove skupne značilnosti so v glavnem koloidna narava in sposobnost tvorjenja agregatov (Cattaneo, 2009).

Potencialna nevarnost nanomaterialov je v veliki meri odvisna od tega, za kakšno vrsto delcev gre in kakšen je način njihove uporabe (prav tam, 2009). Njihovo obnašanje in usoda v okolju sta v največji meri odvisna od velikosti, oblike in velikosti aktivne površine nanodelca. Visoko reaktivnost in dinamičnost delcev pogojuje predvsem razmerje med velikostjo aktivne površine in volumnom. Tudi dejavniki v okolju vplivajo na fizikalno-kemijske lastnosti nanomaterialov. Ta kompleksnost povzroča izjemno težavno določitev predvidene okoljske koncentracije (PEC). Posledično se pojavlja potreba po novih metodah vzorčenja in kemijsko analitičnih postopkov za določevanje vsebnosti nanomaterialov v okolju. V kolikšni meri in na kakšen način so okoljski organizmi izpostavljeni nanomaterialom tako še ni povsem jasno. Zaradi tega napoved tveganja za okolje še ni možna (European Commission, 2012).

Podobno kot velja za ostale kemikalije, različne skupine nanomaterialov ne predstavljajo enake nevarnosti, zato obstaja potreba po temeljiti oceni njihove nevarnosti za okolje (European Commission, 2008). V tem trenutku jih s standardnimi testi strupenosti še ne moremo ocenjevati, saj so zasnovani za »konvencionalne« kemikalije, zato je njihova uporabnost vprašljiva (Cattaneo, 2009). Zaradi neposredne povezanosti med strupenostjo in površinsko velikostjo nanomaterialov, je vrednotenje strupenosti zgolj na podlagi odnosa med koncentracijo in učinkom, pomanjkljivo (European Commission, 2012).

Uporaba testov strupenosti na nevretenčarjih se zdi eden primernejših pristopov k reševanju te problematike. Testiranje strupenosti nanomaterialov na nevretenčarjih je primerno zaradi njihovih specifičnih lastnosti (hitra reprodukcija, hitro opazne motnje, velikost itn.). Za razliko od prokariotov so nevretenčarji sposobni sprejeti nanomaterialne iz okolja v telo na več načinov: z direktnim zaužitjem ali posredno preko plena, filtriranjem vode, dihanjem in s stikom s tlemi (Cattaneo, 2009).

Cattaneo (2009) navaja, da so nanotoksikološke študije neenakomerno porazdeljene med kopenske in vodne nevretenčarje. V veliko primerih zajemajo vodne organizme, predvsem sladkovodne. Najpogosteje uporabljena vrsta do sedaj so vodne bolhe (*D. magna*, *D. pulex* in *C. dubia*). Najbolj preučevani nanomateriali so fulereni in kovinski oksidi (skupaj predstavljajo 70 % raziskav tega področja).

### 7.3 Kovine

Antropogena aktivnost (industrija, rudarstvo, transport itn.) v različni meri vpliva na naravno ozadje kovin v okolju. Povečane koncentracije kovin v okolju lahko vodijo do večje izpostavljenosti vodnih in kopenskih organizmov, kar se kaže predvsem v bioakumulaciji kovin (Sánchez-Bayo, 2011).

Vnos kovin v okolje je trajen poseg v okolje. Te se v tleh ne razgrajujejo, temveč ostajajo. Sprejem kovin v organizme, spiranje in erozija tal so tisti dejavniki, ki pomembno vplivajo na zmanjševanje kovin v tleh. Po nekaterih ocenah je čas, v katerem se koncentracija kovine v tleh zmanjša za polovico, za Zn v tleh 70 do 510 let, za Cd v tleh 13 do 1.100 let, za Cu v tleh 310 do 1.500 let in za Pb v tleh 740 do 5.900 let (Romih idr. 2010).

Po zbranih podatkih v Romih idr. (2010) so v Sloveniji s strupenimi kovinami onesnažena tla na naslednjih območjih: Jesenice (povečane vsebnosti: Cd, Zn, Fe in As); vpadnice (povečane vsebnosti: Pb in Cd); Mežiška dolina (onesnaženje z: Zn, Cd in Pb); Celjska kotlina (preko 6000 ha onesnaženih s: Zn, Cd in Pb).

Nekatere kovine so mikrohranila (Fe, Co, Cr, Cu, Mn, Zn in Mo) in esencialne pri sintezi določenih biomolekul. Takšne vrste kovin so v majhnih odmerkih za organizme nujno potrebne. Obenem so – ob povečanju odmerka – strupene. Nekatere ostale: arzen, kadmij, svinec in živo srebro, se v organizmih prav tako pojavljajo vendar nimajo koristne metabolne funkcije in so v organizmu nezaželene že v majhnih odmerkih (Sánchez-Bayo, 2011).

Kovine lahko postanejo zelo dostopne in strupene za kopenske organizme, ko se v podtalni vodi poveča vsebnost prostih kovinskih ionov (npr.  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ). Na potencial ionizacije in dostopnosti kovin v tleh vplivajo tudi številni fizikalni in kemični dejavniki: pH, organska snov in kemijska oblika elementov v okolju (npr. karbonat, oksid, sulfat). Povečane vsebnosti kovin so lahko tudi v hrani, pri tem je strupenost odvisna od: velikost zaužitih delcev, pH prebavil in kemijske oblike kovine (OEHHA, 2009).

Vzdrževanje homeostaze je proces, ki nevretenčarjem omogoča, da odvečne količine privzete kovine skladiščijo v proteinih (v metalotioneinu, ki se nahaja v večini tkiv), kar začasno prepreči metabolno aktivnost kovine. Takšen regulacijski mehanizem do določene mere omogoča izognitev neposredni strupenosti zaradi prevelike izpostavljenosti kovinam (Newman in Clements, 2008).

Preučevanje učinkov neesencialnih kovin na organizme je težavno tudi zaradi tega, ker se običajno istočasno pojavljajo z ostalimi kovinami ali organskimi kemikalijami v okolju. Večina študij zajema testiranje posameznih kovin, kar precej poenostavlja realne razmere v okolju (prav tam, 2008).

## 7.4 Biološko aktivne snovi

Po direktivi 91/414/ES, ki zadeva uporabo in kontrolo fitofarmaceutskih sredstev (FFS), so države članice EU obvezane priložiti ekotoksikološke podatke za vsako proizvedeno aktivno snov in FFS. To je v omenjeni direktivi določeno v prilogi II, poglavje 8 in prilogi III, poglavje 10. Testiranje strupenosti zajema različne skupine neciljnih organizmov, med drugim tudi nevretenčarje: deževnika kot v zemlji živečega predstavnika in vodno bolho, kot reprezentativno vodno vrsto (European Commission, 2002a).

Test akutne strupenosti na deževnikih je obvezen, če obstaja možnost onesnaženja tal zaradi uporabe aktivnih sredstev. Pri tem je možno uporabiti standarde različnih organizacij: Evropske komisije (88/302), OECD, št. 207 ali ISO 11268-1: 1993.

Na podlagi priloge II je potreba po nadaljnjem testiranju kronične strupenosti odvisna od vzorca izpostavljenosti aktivni snovi (neprekinjena ali ponavljajoča izpostavljenost). Prav tako je potreben v primeru, da na podlagi ocene akutne strupenosti določimo TER (razmerje med strupenostjo in izpostavljenostjo), ki je manjši od 10. Primerne metode so ISO 11268-2:1998 in OECD, št. 222.

Test akutne strupenosti na vodni bolhi je vedno potreben. Testi kronične strupenosti so potrebni za snovi, ki se v naravno okolje vnašajo/izpuščajo več kot enkrat na sezono, ali za tiste, katerih polovična razpolovna doba v vodi znaša najmanj 2 dni. To pomeni, da se skoraj vedno pojavlja potreba po testiranju kronične strupenosti. Uporabljajo se standardi akutne in kronične strupenosti (OECD, št. 202/211) (European Commission, 2002b).

#### **7.4.1 Pesticidi**

Pesticidi so po definiciji Ministrstva za kmetijstvo in okolje Republike Slovenije »snovi ali mešanice snovi, namenjene za preprečevanje, uničevanje ali nadzorovanje katerihkoli škodljivih organizmov [...]«. V upravnem delovnem področju Evropske Unije se pesticidi delijo na fitofarmacevtska sredstva, ki se v kmetijstvu uporabljajo za varstvo rastlin in pridelkov pred povzročitelji bolezni in pred plevelom, in biocide, ki se uporabljajo izven kmetijstva, to je v javni higieni, industriji, domovih ipd. (Ministrstvo za kmetijstvo in okolje Republike Slovenije).

Med okoljskimi onesnaževali, zaradi visoke biološke aktivnosti in strupenosti (akutne in kronične) še posebej izstopajo pesticidi. Običajno so zasnovani z namenom selektivne strupenosti. Ob tem je poznavanje le-te omejeno na nekaj testnih vrst, zato se pojavlja možnost učinkovanja na neciljne organizme (Zacharia, 2011).

Nevretenčarji so pesticidom izpostavljeni na dva načina: z direktnim stikom (v primeru škropljenja) in v stiku z ostanki snovi na rastlinah in drugje v okolju. Občutljivost na pesticide so do sedaj pokazali tudi nekateri nevretenčarji, ki jih običajno ne uporabljamo v testih strupenosti (Cardoso in Alves, 2012).

Pesticidi so sestavljeni iz aktivne snovi (običajno vsebujejo več različnih) in nosilca ali stabilizatorja – inertne snovi. Slednja praviloma nima pomembnega učinka na organizme.

Sintetične pesticide v širšem smislu klasificiramo na podlagi naslednjih značilnosti:

- način delovanja: kontaktni (učinkujejo v stiku s tarčnim organizmom; v rastlinsko tkivo občutno ne prodirajo) in sistemski (prodirajo v organizem),
- razpon delovanja: selektivni (učinkujejo na določeno vrsto ali skupino organizmov) in neselektivni (učinkujejo na mnoge organizme),
- ciljni organizem: insekticidi (žuželke), baktericidi (bakterije), fungicidi (glive), itn.
- kemijska sestava: lastnosti aktivne snovi (organoklorni, organofosforni, karbamatni, piretroidi,...)

#### **7.4.2 Veterinarska in humana zdravila**

Zaradi naraščajoče uporabe farmakološko aktivnih snovi, kakor tudi njihove vse večje raznovrstnosti, veterinarska dejavnost predstavlja nevarnost za onesnaženje okolja. Vir emisije

so lahko iztrebki pašnih živali, v katerih je možno nahajališče strupenih metabolitov. Pri tem se običajno pojavlja nevarnost izpostavljenosti kopenskih organizmov (npr. deževnika) (Kolar idr. 2008).

Testiranje ekotoksičnosti zdravil za uporabo v veterinarski medicini opredeljuje direktiva EU o uporabi veterinarskih zdravil (2001/82/ES). To je določeno v delu 3, poglavje 1 (5): ocena ekotoksičnosti je obvezna za vsako vlogo za dovoljenje za promet z zdravilom za zdravila za uporabo v veterinarski medicini, razen za vloge, vložene v skladu s členi 12 (3) (j) ter 13 (1).

Tudi uporaba humanih zdravil predstavlja potencialno nevarnost negativnih učinkov na okolje. Glavni zbiralnik uporabljenih zdravil so čistilne naprave, ki tako predstavljajo možnost onesnaženja zaradi izpustov v površinske vode in odlaganja odpadnega blata v kopenske ekosisteme. Zdravila se pojavljajo tudi na odlagališčih odpadkov, kar predstavlja nevarnost onesnaženja podtalnice oz. pitne vode. Zaradi tega je potrebno poznati učinke zdravil na vodne in kopenske organizme (EMEA, 2006).

Pridobivanje podatkov o možnih tveganjih za okolje pred dajanjem humanih zdravil v promet narekuje direktiva EU o uporabi zdravil v humani medicini (2001/83/ES). To je določeno pod naslovom 3, člen 8 (3) (ca).

Na podlagi te direktive je s strani Evropske agencije za zdravila (EMEA) izdano vodilo za izvedbo ocene tveganja za okolje, ki ga v osnovi sestavljata dva dela: (1) ocenjevanje fizikalno-kemijskih lastnosti zdravila in (2) ocenjevanje učinkov zdravila na organizme. Odvisno od lastnosti zdravila so lahko potrebni ekotoksikološki podatki za vodne (vodna bolha, OECD 211) in kopenske organizme (deževnik, OECD 207; skakači (*Collembola*), ISO 11267) (EMEA, 2006).



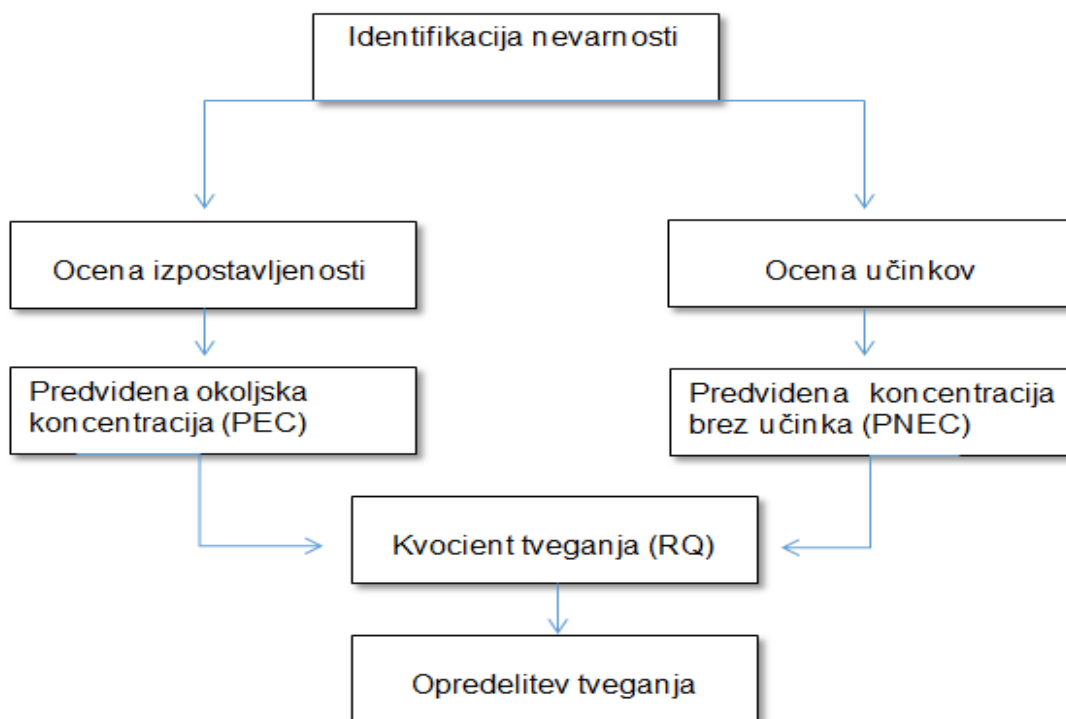
## 8 NEVRETEŃARJI V OCENI TVEGANJA ZA OKOLJE

Testi strupenosti so sestavni del ocene tveganja za okolje (ERA) za presojo novih in spremljanju obstojećih kemikalij, ki jih izpušćamo v okolje. V ta namen uporabljamo standardne testne vrste.

V oceni tveganja za okolje v splošnem poznamo dva pristopa. Z enim pristopom ugotavljamo potencialne učinke (novih) kemikalij z namenom regulacije njihove uporabe ali prepovedi izdaje na prosti trg. Takšnemu pristopu pravimo »prognoza«. V postopku uporabljamo standardne teste strupenosti s katerimi pridobimo informacije o tistih koncentracijah testirane kemikalije, ki ne pomenijo tveganja za okolje. Ta pristop se dopolnjuje s podatki o predvideni okoljski koncentraciji (PEC), kar skupaj omogoća napoved tveganja za okolje (Van Gestel, 2012).

Drugi pristop imenujemo »diagnoza« in nam pomaga oceniti dejansko ekološko stanje nekega okolja. Pri tem se poslućujemo uporabe, t.i. TRIAD orodja, ki ga sestavlja: spremljanje stanja populacij v ekosistemu, kemijske meritve in ekotoksikološki podatki. Slednje pridobimo na način, da izbrane organizme izpostavimo vzorcem iz okolja (zemlji, vodi, iztrebkom itn.). Takšni testi strupenosti obićajno potekajo v laboratoriju, v redkih primerih tudi na samem mestu onesnaženja v okolju, t.i. »*in situ*« testi. V splošnem takšen pristop omogoća doloćitev remediacijskih postopkov za zmanjšanje tveganja, ki ga predstavljajo onesnažena zemljišća (prav tam, 2012).

ERA je v splošnem postopek, ki omogoća ocenitev verjetnosti nezaželenih vplivov na okolje in je pomemben del evropske zakonodaje. Predstavlja najpomembnejše orodje, ki slući pri ocenjevanju tveganja, ki ga za okolje predstavljajo kemikalije. Področja uporabe so zelo različna: določujemo lahko stopnjo tveganja na nacionalni ravni kot tudi tveganje za specifićna obmoćja onesnaženja na lokalni ravni. Celoten postopek ERA sestavljajo štirje glavni koraki (Van Leeuwen in Vermeire, 2007): identifikacija tveganja, ocena izpostavljenosti, ocena učinkov in opredelitev tveganja (Slika 10).



Slika 10: Shematski prikaz potrebnih korakov v oceni tveganja za okolje.

(Vir: Van Leeuwen in Vermeire, 2007).

## 8.1 Identifikacija nevarnosti

Identifikacija nevarnosti je začetni korak v oceni tveganja za okolje in vključuje zbiranje in presojo podatkov o nezaželenih vplivih kemikalij na okolje. V ekološkem smislu so to vplivi na preživetje, rast in razmnoževanje organizmov. Te podatke pridobimo iz laboratorijskih testov. Prav tako lahko nevarnost identificiramo na podlagi fizikalno-kemijskih lastnosti kemikalije. Glavni namen je presoditi ali obstaja nevarnost negativnega delovanja kemikalije na okolje.

## 8.2 Ocenjevanje izpostavljenosti

Izpostavljenost ocenjujemo na podlagi monitoringa kemikalije v okolju. Medtem ko za novo proizvedene kemikalije oceno izpostavljenosti napovemo z uporabo okoljskega modela. Takšna napoved v splošnem vključuje: ocenjeno količino emisije, možne poti in stopnjo prenosa ter pretvorbo in razpad kemikalije v okolju, in daje podatek o koncentraciji, ki ji bo okolje izpostavljeno. Ocena izpostavljenosti za nove kemikalije je lahko precej nezanesljiv del v procesu ERA. Razlogov za to je več, med njimi je tudi geografska raznolikost med področji uporabe kemikalije in s tem povezana razlikovanja v abiotski in biotski strukturi. Glavni namen tega koraka v oceni tveganja je določiti PEC za različne okoljske medije (vodo, zemljo, sedimente itn.).

### 8.3 Ocenjevanje učinkov

Ocena učinkov v splošnem zajema preučevanje zveze med odmerkom in učinkom. Iskane podatke o strupenosti testne snovi običajno pridobimo iz standardnih laboratorijskih testov strupenosti. Cilj je določiti odmerke brez učinka (NEL: no effect levels) na testno vrsto in jih z dodajanjem faktorjev varnosti (v razponu 10-10.000) pretvoriti v napovedno ali ocenjeno NEL za ekosistem. Pomen uporabe faktorjev ocenjevanja je zavarovanje vrst, ki jih ne testiramo in njihove občutljivosti na testno snov ne poznamo. V standardnih testih strupenosti namreč obravnavamo samo majhen del vseh možnih učinkov na ekosistem.

Predvideno koncentracijo brez učinka (PNEC) lahko iz toksikoloških podatkov pridobimo na naslednje načine: kadar razpolagamo samo s podatki za  $LC_{50}$  uporabimo faktor 1000; če so na voljo podatki za eno vrsto NOEC (npr. za vodno bolho), uporabimo faktor 100; če imamo na voljo vrednosti NOEC za vrste iz različnih trofičnih nivojev, izberemo najobčutljivejši organizem in uporabimo faktor 10. Takšen sistem omogoča primerjavo strupenosti kemikalij, tudi če imamo na voljo samo podatke o akutni strupenosti.

PNEC, zaradi različnih načinov izpostavljenosti in organizmov in njihove občutljivosti na kemikalije, določujemo za vsak okoljski medij posamezno (vodo, zemljo, sediment itn.).

### 8.4 Opredelitev tveganja

Opredelitev tveganja je zadnji korak v oceni tveganja za okolje in zajema oceno škode, ki jo neželeni učinek ima/bo imel za okolje. V splošnem združuje prejšnje korake: identifikacijo nevarnosti; oceno vplivov (določitev NEL ali PNEC); oceno izpostavljenosti (določitev PEC). Tveganje za okolje izražamo s kvocientom tveganja (RQ), ki je razmerje med PEC/PNEC. Pri tem absolutna napoved tveganja za okolje ni mogoča. Tega lahko ocenimo na bolj splošen način: znano je, da se tveganje večja sorazmerno s kvocientom med izpostavljenostjo in vplivom. Na podlagi tega se razmerje manjše od 1 smatra, da snov ne predstavlja tveganja za okolje v danem scenariju.

## 9 SKLEPI

Eden izmed namenom diplomskega dela je bil prikazati standardne testne metode na izbranih kopenskih in vodnih nevretenčarjih ter raziskati njihovo uporabno vrednost in uspešnost pri testiranju strupenih snovi. Prav tako je bil namen opisati vsako testno metodo posebej, ovrednotiti njeno funkcijo ter prikazati prednosti in slabosti posamezne metode, kot tudi predstaviti eno nestandardno testno vrsto, ki se veliko uporablja. Pri tem smo postavili naslednje hipoteze glede standardiziranih in nestandardiziranih testov:

**H1:** Standardni postopki, ki jih predpisujejo različne organizacije po svetu, so med seboj primerljivi (skladni) in v nekaterih primerih tudi združljivi. **Potrjeno**

**Komentar:** Standardi za obravnavana nevretenčarja: deževnik (*E. fetida*) in vodna bolha (*D. magna*), ki jih izdajajo različne organizacije, so zasnovani in se izvajajo na isti način. Zato je v EU zakonodaji, kjer je navedena zahteva po ekotoksikoloških podatkih, možna uporaba standardov različnih organizacij. Združljivi so lahko v smislu, da akutnemu testu, ki ga predpisuje ena organizacija sledi, če je potrebno, kronični test, ki ga predpisuje druga organizacija. Tako lahko pridobimo vse potrebne ekotoksikološke podatke za določeno kemikalijo na podlagi standardov različnih organizacij.

Pri primerjavi standardnih testov akutne in kronične strupenosti za posamezen organizem se pojavljajo razlike, glavne med njimi so: trajanje testiranja, kar pogojujejo lastnosti testnega organizma (npr. spolni razvoj, rast) in v osnovi velja, da kronični test presega 10-kraten čas testiranja akutne strupenosti, kar je relativno veliko; spremljani odzivi: test kronične strupenosti omogoča spremljanje večjega števila odzivov na organizmu, ki se počasneje izrazijo a so lahko prav tako pomembni kot letalnost, npr. sposobnost razmnoževanja. Sposobnost preživetja je možno oceniti z obema testoma, vendar je kronični test zasnovan za dolgotrajnejše študije, z nižjo biodostopno koncentracijo testne snovi v sistemu, zato se letalni učinek lahko izkaže na daljši rok. Še vedno so akutni testi strupenosti potrebni za merjenje preživetja, saj določena testna snov hitro razpade in izkaže učinek na organizem.

**H2:** Nestandardni postopki testiranja strupenosti na nevretenčarjih služijo kot podpora standardnim in so izjemno pomembni pri kritični presoji rezultatov. **Potrjeno**

**Komentar:** Kot se je izkazalo na primeru nestandardne vrste – raka enakonožca (*P. scaber*) – so takšni postopki testiranja res potrebni, saj je občutljivost na kemikalije med nevretenčarji različna. Tako lahko merimo standardne odzive kot je preživetje na različnih vrstah. Prav tako obstajajo medvrstne razlike v ekološki vlogi, fiziologiji itd. kar pomembno vpliva na način izpostavljenosti kemikalijam in posledično privzemu v organizem. Tako lahko pridobimo in izmerimo tudi nekatere nestandardne odzive kot je stopnja prehranjevanja.

Za testiranje ekotoksičnosti se lahko uporabijo različne vrste nevretenčarjev, nekatere med njimi se uporabljajo zelo pogosto. Zato smo postavili naslednje hipoteze glede uporabe različnih vrst nevretenčarjev:

**H3:** Deževniki so, kot predstavniki testnih organizmov, ki živijo v zemlji, ena bolj preučevanih vrst nevretenčarjev, zlasti vrsta *E. fetida*, medtem ko je med vodnimi organizmi to vodna bolha vrste *D. magna*. **Potrjeno**

**Komentar:** Deževniki so res zelo preučevan organizem, saj so v neposrednem stiku s kemikalijami v tleh. Na podlagi tega se v testih strupenosti tisti iz družine *Lumbricidae* zelo veliko uporabljajo. Največ se uporablja vrsta *E. fetida*, saj je v naravi zelo razširjena in enostavna za gojenje. V zakonodaji je ta vrsta določena za testiranje industrijskih kemikalij, ki se proizvedejo v večjih tonažah, in za testiranje biološko aktivnih snovi v določenih primerih, kadar obstaja možnost onesnaženja tal – na uporabo te vrste vpliva tudi zakonodaja. Med vodnimi nevretenčarji je vodna bolha tisti organizem, ki se v testih strupenosti uporablja največ, med njimi po uporabi izstopa *D. magna*. Pri tem so razlogi za uporabo podobni kot veljajo za deževnika. Ta vrsta se med nevretenčarji največ predpisuje v zakonodaji, saj služi za testiranje vsake proizvedene industrijske kemikalije in biološko aktivne snovi. Zaradi stalne možnosti onesnaženja vodnih teles in veljavne zakonodaje, je *D. magna* najbolj uporabljen testni organizem med nevretenčarji. Zakonodaja vpliva na redno uporabo te vrste. Oba organizma sta sicer zelo pomembna indikatorja kvalitete okolja.

**H4:** Med nestandardnimi organizmi, živečimi na kopnem pa je kopenski rak, zlasti vrsta *P. scaber*, med bolj preučevanimi. **Potrjeno**

**Komentar:** Kopenski rak enakonožec se uporablja za preučevanje različnih tipov kemikalij, še zlasti se veliko uporablja pri preučevanju vplivov kovin in nanodelcev. Pri tem je vrsta *P. scaber* med bolj preučevanimi.

Na podlagi zavedanja, da strupene snovi prihajajo v okolje iz različnih virov (kmetijstvo, veterinarska in humana zdravila, industrija itd.) smo postavili naslednje hipoteze glede izvora testiranih snovi/strupov:

**H5:** Izvor preučevane snovi/strupca ima vpliv na izbor testnega organizma, vrste testa in spremljan odziv. **Ovrženo**

**Komentar:** Vrste nevretenčarjev, ki jih uporabljamo za pridobivanje ekotoksikoloških podatkov snovi različnega izvora so po zakonu točno določene (to sta deževnik in vodna bolha). Deževnik služi kot dodaten testni organizem (test na vodni bolhi je potreben za vsako proizvedeno kemikalijo) za namen preučevanje vpliva kemikalij na kopenske organizme. Postopek izbire vrste testa je določen v zakonodaji, kjer po uporabi testa akutne strupenosti sledi test kronične strupenosti, če je ta potreben (običajno kadar kemikalija izkazuje lastnosti kot je dolga razpolovna doba ali kadar gre za ponavljajoče izpuste v okolje). Izvor snovi tudi nima vpliva na izbor odziva organizma, ti so določeni v standardnih testnih metodah (preživetje, sposobnost razmnoževanja itd.).

Odziv kot je sposobnost razmnoževanja, je težje meriti na nekaterih nestandardnih organizmih (rak enakonožec), zato spremljamo druge kronične učinke (motnje hranjenja in izguba teže). Spremembe v stopnji hranjenja so, pri zastupitvi hrane z organskimi kemikalijami ali kovinami, hitro opazne.

**H6:** Večja kompleksnost naravnega okolja lahko vodi do razhajanj med rezultati laboratorijskih testiranj strupenosti in stanjem bioindikatorjev iz okolja. **Ovrženo**

**Komentar:** Zaradi skopih podatkov o stanju nevretenčarjev v okolju je težko delati takšne primerjave. Ena od posledic onesnaževanja s kemikalijami se omenja tudi upad biodiverzitete med nevretenčarji, na kar lahko vpliva tudi neprimerno ravnanje s kemikalijami v kmetijstvu in ne

nezmožnost napovedi usode kemikalij v okolju. Razhajanje med kompleksnostjo naravnega okolja in rezultati testov strupenosti je v veliki meri odpravljeno z dodajanjem faktorjev varnosti v presoji tveganja za okolje. Na takšen način lahko zavarujemo tudi najbolj občutljive vrste nevretenčarjev in vse ostale na katerih kemikalije ne testiramo. Ta del procesa v oceni tveganja za okolje ni povsem zanesljiv, vendar pomembno prispeva k ohranjanju populacij nevretenčarjev.

Za takšno napoved, ki temelji na zvezi med odmerkom in učinkom velja, da se ob večanju kompleksnosti naravnega okolja zmanjšuje njena napovedna zmožnost, saj lahko že samo okolje v veliki meri vpliva na strupenost in so zato vplivi na organizem vse manj točni. Zaradi tega obstaja pri prognozi še drugačen pristop, in sicer uporaba mikro/mezokozmos modela, ki je zasnovan na podlagi nekaterih dejanskih značilnosti (kompleksnosti) nekega okolja in kot takšen predstavlja bolj realno vrednost rezultatov testiranja strupenosti za naravno okolje. V osnovi velja, da smiselnost uporabe mikro/mezokozmos modela narašča skupaj s kompleksnostjo naravnega okolja, saj je strupenost v tem primeru bolj razpršena in tako v večji meri vpliva na ekosistem kot celoto in njegovo delovanje. V nekoliko drugačnem primeru, ko je okolje že onesnaženo lahko teste strupenosti uporabimo za diagnozo oz. določitev strupenosti okolja in to omogoča bolj realno oceno stanja okolja, saj testne organizme v večji meri izpostavimo dejanski strupenosti medija.

## 10 POVZETEK

Odlaganje raznovrstnih (strupenih) snovi v okolje je eden poglobitnejših okoljskih problemov, s katerim se soočamo zadnjih nekaj desetletij. Obenem se večja proizvodnja in uporaba humanih in veterinarskih zdravil v zadnjih letih, kar predstavlja nevarnost onesnaženja okolja s strupenimi metaboliti. Različni viri emisije in nepredvidljivo obnašanje nekaterih tipov kemikalij v okolju predstavljata potencialno tveganje nezaželenih učinkov na populacijah neciljnih kopenskih in vodnih nevretenčarjev.

Usoda omenjenih skupin snovi v okolju je lahko zelo različna, na to vplivajo njihove specifične fizikalno-kemijske lastnosti. Na nevretenčarske vrste lahko negativno vpliva koncentracija ksenobiotika, ki je v okolju prosta za privzem v organizem, torej delež, ki se nahaja v biodostopni obliki. Nevretenčarji so skupina organizmov, ki je zlasti občutljiva na povišane vsebnosti kemikalij v okolju. Ti organizmi po skupni biomasi dominirajo v najrazličnejših kopenskih ter vodnih ekosistemih in posledično v njih opravljajo številne koristne storitve. Testi strupenosti omogočajo ugotavljanje učinkov škodljivih kemikalij na koristne nevretenčarje.

Osrednji namen diplomskega dela je bil natančneje raziskati različne modele testiranja strupenosti na kopenskih in vodnih nevretenčarjih in predstaviti standardne testne vrste, kakor tudi eno testno vrsto, ki se pogosto uporablja, a ne kot standard. Zanimala nas je uporabna vrednost testov strupenosti pri prepovedi oz. zmanjševanju uporabe strupenih snovi, kot tudi uspešnost/primernost pri testiranju različnih snovi. Vse to smo želeli prikazati v okviru treh izbranih vrst.

Kot se je izkazalo lahko strupenost preučujemo na eni testni vrsti ali na več različnih vrstah, ki skupaj tvorijo umetno zasnovan t.i. mikro- ali mezokozmos. Izbira pristopa je pogojena z iskanimi odzivi sistema: pri testu z eno vrsto iščemo direktne učinke na organizem (npr. letalnost) kar je visoko standardizirano, medtem ko s testi z več vrstami iščemo indirektne učinke (npr. število in biomasa vrste), kar je z ekološkega stališča tudi bolj primerno, vendar so metode v manjši meri standardizirane, kar je posledica slabše ponovljivosti zaradi upoštevanja tudi drugih ne le koncentracije testne snovi. Pojavlja se tudi standarden test strupenosti na nivoju specifičnega odziva – izogibanja. Pri tem pristopu uporabljamo deževnike, saj imajo povečano kožno občutljivost na kemikalije. Primernost uporabe takšnega odziva je omejena na preliminarni del testiranja, torej za hitro ocenitev koncentracij kemikalije, ki imajo učinek na organizem.

Med kopenskimi nevretenčarji, ki so primerni za uporabo v testih strupenosti največ uporabljamo deževnike iz družine *Lumbricidae*. Kot se je izkazalo še posebej veliko uporabljamo vrsto *E. fetida*, ki je tudi standardni testni model, predpisan s strani več mednarodnih organizacij. Med vodnimi nevretenčarji največ uporabljamo vrsto *D. magna*, ki je prav tako standarden organizem. Na obeh omenjenih vrstah lahko izvajamo akutni in kronični test strupenosti. Takšne raziskave so zelo pomemben del ocene tveganja za okolje.

S testi akutne strupenosti lahko v kratkem času določimo koncentracijo testne snovi, ki ima letalen učinek za organizem. Pri tem lahko merimo odziv organizma, kot sta preživetje ali nepremičnost. Takšna metoda je precej omejena, saj ne omogoča vpogleda v celotno strupenost, zato se uporablja predvsem pri iskanju območja pojava učinka, ki ga po potrebi raziščemo z dodatnimi študijami. Medtem testi kronične strupenosti omogočajo merjenje

množice odzivov, s poudarkom na subletalnih odzivih: motnje razmnoževanja, rasti itd. Pri tem lahko določimo tudi koncentracijo, ki na organizem nima učinkov (NOEC).

V zakonodaji so akutni testi potrebni v začetnih fazah ocenjevanja kemikalij. Kronični testi strupenosti so potrebni npr. v povezavi s proizvodnjo večjih količin kemikalij ali s kontinuirano uporabo določenih spojin na prostem.

Na voljo so tudi nestandardni testni organizmi, ki so širše prepoznani kot primerni za testiranje vplivov ksenobiotikov. Takšen primer modelnega organizma je kopenski rak enakonožec (*P. scaber*). Glavni namen uporabe tega organizma je pridobivanje dodatnih informacij o vplivih strupenih snovi na okolje, saj med organizmi prihaja do razlik v načinu izpostavljenosti in občutljivosti na nekatere kemikalije. To omogoča kritično presojo rezultatov testiranja s standardnimi vrstami. Omenjena vrsta ima tudi določen potencial za postopek standardizacije v primeru presoje nanomaterialov, saj se jo v ta namen tudi veliko uporablja.



## 11 SUMMARY

In the last couple of decades environmental contamination with various chemicals poses a serious concern. Moreover, this problem is still growing on a daily basis, actually: manufacturing of new chemicals, pharmaceuticals, incorrect disposal... all leading to the pollution of soil and water and consequently poses a severe risk to the whole ecosystem. In this diploma we focused on non-target soil dwelling and water invertebrates as they form a very important group of organisms in ecosystems.

In general, environmental fate of chemicals strongly depends on a physical-chemical properties of the medium and the compound. Furthermore, non-target organisms exposed to the contaminants may be affected only by a fraction of a chemical in the medium – bioavailable concentration. Ecotoxicity tests are well-established methods allowing to study short term and long term adverse effects of chemicals on beneficial invertebrate species. As invertebrates dominate in the land and water biomass and provide essential ecosystem services toxicity testing of chemicals on different species of invertebrates seems reasonable, also due to their high sensitiveness to chemicals.

The aim of the present diploma was to review and compare toxicity tests on terrestrial and aquatic invertebrates with special emphasize on the standard and selected non-standard model that was already used a lot in ecotoxicity studies and it is gaining more of the attention recently. In particular, two questions were raised providing an underlying structure of the diploma: »What is the usefulness of toxicity tests for the prevention of environmental pollution?« and »How precise are toxicity tests with respect to the different types of chemicals?«. The diploma provides answers on this questions, all in the frame of the three selected species of invertebrates.

As diploma showed, it is possible to measure toxicity of chemicals on single species or many different species placed together in a model known as micro- or mesocosmos. The selection of either approach is related to the measuring of the direct effects (standardized endpoints: e.g. survival, reproduction output) or the indirect effects (not standardized: e.g. reduction of number; biomass of species) on organisms. From ecological point of view, those endpoints related to the indirect effects are recognized for more ecological issues but on the other hand they lack standardization and are time consuming and costly. Furthermore, in addition to the endpoints mentioned, there are also other tests in use. For example: an avoidance (behavioral) test in earthworms where earthworms serve as a most suitable organisms due to their epidermal sensitiveness to chemicals. However, this endpoint is mainly limited to preliminary studies as a quick assessment of chemicals that might have a fatal effect on organism.

Among terrestrial standard test species earthworms (Lumbricidae) are the most frequently used organisms, which especially goes for *E. fetida*, included in several standard protocols. Among aquatic species water flea *D. magna* is predominantly used, also being a highly standardized organism. Due to the mentioned facts, both species provide through insight into an acute and chronic actions of toxicants and are a first option for study of the requested endpoints for the ecological risk assessment.

Acute toxicity tests are used in order to assess concentration that causes lethal effect on organisms in short time. Thus, it is possible to measure endpoints such as survival and immobilization. From an ecological point of view, such method is limited, providing only a small

part of the effects of chemicals on organisms and it is the most appropriate for assessing the concentration range where effect occurs.

On the other hand, chronic studies produce more ecologically important endpoints such as sublethal effects: reproduction output, growth etc. As a result, we can obtain no observed effect concentration (NOEC).

According to the European Union legislation, there are requirements for acute toxicity tests to be performed on invertebrates in the first tiers of assessing of chemicals. In addition to the short term trials, there are also chronic toxicity tests required in the case of massive production or continuous usage of a compound.

For testing of chemicals, there are also available non-standard test organisms, wide recognized as a very appropriate models for study of chemicals. Such an example is isopod (*P. scaber*). In general, usage of non-standard species is the most important providing the additional toxicity data that are necessary in order to compare toxicity of chemicals for organisms of different ecological levels. Therefore, non-standard species provide a critical data in comparison to standard species, based on different sensitivity and way of exposure. As a test model, isopod (*P. scaber*) has a potential for becoming standard species in order to assess metals and a group of emerging chemicals, e.g. nanomaterials among which environmental fate is still a matter of scientific research.

## 12 VIRI

- Agencija Republike Slovenije za okolje (2001). *Pregled stanja biotske raznovrstnosti in krajinske pestrosti v Sloveniji*. Ljubljana, Tehnična založba Slovenije, 308 str.
- Adams, J.W., Rowland, D.C. (2003). *Aquatic Toxicology Test Methods*. V: Handbook of ecotoxicology, 2nd ed. Florida: Boca Raton, Lewis Publishers, str. 19 – 42.
- AltTox (non-animal methods for toxicity testing). (2011). *Toxicity testing overview*. Medmrežje: <http://alttox.org/ttrc/tox-test-overview/> (14.5. 2014).
- Agerstrand, M., Breitholtz, M., Rudén, C. (2011). *Comparison of four different methods for reliability evaluation of ecotoxicity data: a case study of non-standard test data used in environmental risk assessments of pharmaceutical substances*. Environmental Sciences Europe, 23 (17).
- Bourdeau, P., in ostali. (1990). *Short-term Tests in Ecotoxicology*. V: Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects. John Wiley & Sons Ltd, str. 49-56.
- Bradham, K, in ostali (2006). Effect of soil properties on lead bioavailability and toxicity to earthworms. Environmental Toxicology and chemistry, 25, str. 769-775.
- Bundschuh, M., in ostali (2012). *Titanium Dioxide Nanoparticles Increase Sensitivity in the Next Generation of the Water Flea Daphnia magna*. Institute for Environmental Sciences, University of Koblenz-Landau, Germany. PLOS ONE.
- Cairns, J. (2000). *The Genesis and Future of the Field of Ecotoxicology*. CRC Press LLC.
- Cairns, J. (2008). *Ecotoxicology Risk Assessment for a Changing World*. Sci. & Soc., 6 (2), str. 113-122.
- Caseiro, I., in ostali (2000). *Optimization of Culture Conditions of Porcellio dilatatus (Crustacea: Isopoda) for Laboratory Test Development*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 47, str. 285-291.
- Cattaneo, A.G., in ostali. (2009). *Ecotoxicology of nanomaterials: the role of invertebrate testing*. ISJ - Invertebrate Survival Journal, 6, str. 78 – 97.
- Cardoso, E., Alves, P. (2012). *Soil Ecotoxicology*. Ecotoxicology. InTech, str. 28-50.
- Drobne D. (1997). *Terrestrial isopods-a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment*. V: Environmental Toxicology and Chemistry, 16, str. 1159 – 1164.
- Drobne, D., in ostali (2008). *Toxicity of imidacloprid to the terrestrial isopod Porcellio scaber (Isopoda, Crustacea)*. V: Chemosphere, 71, str. 1326 – 1334.
- Dominguez, J., Edwards, C. (2011). *Biology and Ecology of Earthworm: Species Used for Vermicomposting*. V: Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management, ur. Edwards, A.C., Arancon, Q.N., Sherman, R. Taylor & Francis Group, LLC, str. 27-40.

- Danaher, M., Radeck, W., Kolar, L., Keegan, J., Cerkvnik- Flajs, V. (2012). *Recent developments in the analysis of avermectin and milbemycin residues in food safety and the environment*. Current Pharmaceutical Biotechnology, 13, str. 936 – 951.
- Deydier, L. (2013). *How to bring your registration dossier in compliance with REACH – tips and hints Part 2*. European Chemicals Agency – ECHA.
- EMA - European Medicines Agency (2006). *Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use*. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), London.
- EPA (1994). *Catalogue of Standard Toxicity Tests for Ecological Risk Assessment*. ECO Update; Intermittent Bulletin, 2 (2). USA, Environmental Protection Agency.
- European Commission (2002a). *Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology Under Council Directive 91/414/EEC*. Directorate E - Food Safety: plant health, animal health and welfare, international questions.
- European Commission (2002b). *Guidance Document on Aquatic Ecotoxicology in the context of the Directive 91/414/EEC*. Directorate E - Food Safety: plant health, animal health and welfare, international questions.
- Eaton, L.D., Gilbert, G.S. (2008). *Principles of toxicology*. V: Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, Seventh Edition, ur. Klaassen, D.C. McGraw-Hill Companies, Inc., str. 11-44.
- Elenbaas, M. (2012). *Daphnia magna*. Medmrežje: [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Daphnia\\_magna/](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Daphnia_magna/) (29.7.2014)
- European Commission (2012). *Environmental Exposure to Nanomaterials – Data Scoping Study*. Milieu Ltd, 227 str.
- Gherhardt, T., Bolcu, C. (2011). *Avoidance Behavior of Eisenia Foetida to Acetone, Deltamethrin and Glyphosate*. Annals of West University of Timisoara: Series of Chemistry 20 (2), str. 1-10.
- Gargošová, Z. H., in ostali. (2011). *The Use of Methods of Environmental Analysis and Ecotoxicological Tests in the Evaluation of Wastewater*. Waste Water - Evaluation and Management. InTech, str. 4 – 30.
- Haslett, R.J. (2007). *European Strategy for the conservation of invertebrates. Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats (Bern Convention)*. Nature and environment, No. 145. Council of Europe Publishing, 91 str.
- Hilbeck, A., in ostali (2008). *Analysis and validation of present ecotoxicological test methods and strategies for the risk assessment of genetically modified plants*. Bundesamt für Naturschutz (BfN), Federal Agency for Nature Conservation.
- Hrženjak, R., in ostali (2009). *Strupenost organofosfatnega pesticida klormefosa za deževnike Eisenia andrei inkopenske enakonožce Porcellio scaber*. ABS – Acta Biologica Slovenia. Vol. 52, Št. 2: 85-94.

- ISO (1999). *Soil quality -- Inhibition of reproduction of Collembola (Folsomia candida) by soil pollutants*. Guideline 11267. International Standardization Organization, Geneva, Switzerland.
- ISO (2012). *Soil quality -- Effects of pollutants on earthworms. Part 1: Determination of acute toxicity to Eisenia fetida/Eisenia Andrei*. Guideline: 11268-1. International Standardization Organization, Geneva, Switzerland.
- James, C.R., Roberts, M.S, Williams, L.P. (2000). *General Principle of Toxicology*. V: Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications, Second Edition, ur. Phillip L. Williams. John Wiley & Sons, Inc., str. 3-34.
- Jereb, V., in ostali (2003). *Transformations of mercury in the terrestrial isopod Porcellio scaber (Crustacea)*. The Science of the Total Environment 304, 269–284.
- Kolar, L., Kožuh, E. N., Hogerwerf, L., Van Gestel, C.A.M. (2008). *Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates*. Environmental Pollution, 151, str. 182 – 189.
- Lagadic, L., Caquet, T. (1998). *Invertebrates in testing of environmental chemicals: are they alternatives?*. Environmental Health Perspectives, 106, 593 – 611.
- Leblanc, G.A. (2004). *Basics of Environmental Toxicology*. V: A Textbook of Modern Toxicology, Third Edition. John Wiley & Sons, Inc., str. 463-478.
- Lobnik, A. (2008). *Navodila za vaje pri predmetu ekologija in okoljevarstvo*. Maribor, Univerza v Mariboru, Fakulteta za strojništvo, str. 31-33.
- Maciorowski, H.D, Clarke, McV. R. (1980). *Advantages and Disadvantages of using Invertebrates in Toxicity Testing*. V: Aquatic Invertebrate Bioassays. American Society for Testing and Materials, str. 36-46.
- Mršič, N. (1997). *Živali naših tal: uvod v pedozoologijo – sistematika in ekologija s splošnim pregledom talnih živali*. Tehniška založba Slovenije, 416 str.
- Macadam, C.R., Rotheray, G.E. (2009). *A strategy for Scottish invertebrate conservation*. Stirling, Buglife – The Invertebrate Conservation Trust, str. 3-19.
- Mattson, M.P. (2008). *Hormesis defined*. Ageing Research Reviews, 7 (1): 1-7.
- NAS (The National Academy of Sciences) (2006). *Toxicity Testing for Assessment of Environmental Agents: Interim Report*. Committee on Toxicity Testing and Assessment of Environmental Agents, The National Academies Press Washington, D.C.
- Newman, C.M., Clements, H.W. (2008). *Ecotoxicology: A Comprehensive Treatment*. CRC Press, Taylor & Francis Group, 829 str.
- Novak, S., Drobne, D., Menard, A. (2012). *Prolonged feeding of terrestrial isopod (Porcellio scaber, Isopoda, Crustacea) on TiO2 nanoparticles*. ZooKeys 176: 261–273.
- OECD (1984b). *Earthworm, Acute Toxicity Tests*. Guideline for testing of chemicals, No. 207.
- OECD (1984a). *Daphnia sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test*. Guideline for testing of chemicals, No. 202.

- OECD (2004). *Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)*. Guidelines for the testing of chemicals, No. 222. Paris, France.
- OECD (2006). *Summary of Considerations in the Report from the OECD Expert Group on Ecotoxicology*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing.
- OECD (2012). *Daphnia magna Reproduction Test*. Guideline for the testing of chemicals, No. 211.
- O'Flaherty, J.E. (2000). *Absorption, Distribution, and Elimination of Toxic Agents*. V: Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications, Second Edition, ur. Phillip L. Williams. John Wiley & Sons, Inc., str. 35-53.
- OEHHA – Office of Environmental Health Hazard Assessment (2009). *Soil Toxicity and Bioassessment Test Methods for Ecological Risk Assessment: Toxicity Test Methods for Soil Microorganisms, Terrestrial Plants, Terrestrial Invertebrates and Terrestrial Vertebrates*. California, Environmental Protection Agency.
- Persoone, G., Gillett, J. (1990). *Toxicological versus Ecotoxicological Testing. Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects*. John Wiley & Sons Ltd., str. 287-299.
- Paoletti, M.G., Hassall, M. (1999). *Woodlice (Isopoda: Oniscidea): their potential for assessing sustainability and use as bioindicators*. Agriculture, Ecosystems and Environment, 74, str. 157-165.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Vijver, M.G. (2009). *Earthworms and Their Use in Eco(toxico)logical Modeling*. V: Ecotoxicology Modeling. Springer Science+Business Media, str. 177-204.
- Patwardhan, V., Ghaskadbi, S. (2013). *Invertebrate Alternatives for Toxicity Testing: Hydra Stakes its Claim*. ALTEX Proceedings, 2 (1), str. 69 – 76.
- Renoux, Y.A., Sunahara, I.G. (2002). *Introduction*. V: Environmental analysis of contaminated sites. John Wiley & Sons Ltd., str. 4-7.
- Ratte, H.T., Hammers-Wirtz, M., Cleuvers, M. (2003). *Ecotoxicity testing*. V: Bioindicators & Biomonitoring: principles, concepts and applications. Trace Metals and other Contaminants in the Environment, vol. 6. Elsevier Ltd., str. 221-255.
- Robinson, L., Thorn, I. (2005). *Ecotoxicology*. V: Toxicology and Ecotoxicology in Chemical Safety Assessment. Blackwell Publishing Ltd., str. 56-70.
- Romih, N., Grabner, B., Lasnik, R.C. (2010). *Remediacija onesnaženih tal s težkimi kovinami*. Inštitut za okolje in prostor. Celje.
- Sánchez-Bayo, F. (2011). *Sources and Toxicity Of Pollutants*. V: Ecological Impacts of Chemicals. Bentham Science Publisher Ltd., str. 3-12.
- Sánchez-Bayo, F., in ostali (2011). *Concluding Remarks*. V: Ecological Impacts of Toxic Chemicals. Bentham Science Publisher Ltd., str. 238-241
- Sedmak, B. (2011). *Študijsko gradivo: ekotoksikologija*. Velenje, Visoka šola za varstvo okolja.

- Van Straalen, M.N. (2003). *Ecotoxicology Becomes Stress Ecology*. V: Environmental Science & Technology, American Chemical Society, str. 325-330.
- Van Leeuwen, C.J., Vermeire, T.G. (2007). *Risk assessment of chemicals: An Introduction 2nd edition*. National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.
- Van Gestel, C.A.M. (2012). *Soil ecotoxicology: state of the art and future directions*. ZooKeys, 176, str. 275 – 296.
- Wijesinghe, R.M. (2012). *Ecotoxicology: Why is it a discipline of growing importance?* Sri Lanka, Institute of Biology, 32<sup>nd</sup> Annual Sessions, str. 6-12.
- Zidar, P., Van gestel, C.A.M., Štrus, J. (2009). *Single and joint effect of Zn and Cd on Porcellio scaber (Crustacea, Isopoda) exposed to artificially contaminated food*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72, 2075–2082.