

Cvičení č. 8

Testy toxicity na savcích a rybách

Testy toxicity se u nás provádějí v akreditovaných laboratořích nebo na vědeckých pracovištích.

Je nutno při nich dodržovat pravidlo 3R.

Po získání výsledku se látky zařazují do kategorií toxicity a jsou jim přiděleny H (Hazard) a P (Precautionary, varování) věty. K tomu jsou označeny příslušnými piktogramy (červeně orámovaný kosočtverec). To vychází z mezinárodní legislativy (GHS/CLP = Global harmonising system/classification, labelling, packaging). Dříve se využíval systém R (Risk) a S (Safety) vět (dnes ještě na starých baleních prodávaných před rokem 2015).

Výsledkem jsou hodnoty LD50, LC50 (obě popisují letalitu), NOEC a LOEC (popisují neletální efekty).

OECD (Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj)

- provádí harmonizaci metodik testů mezi jednotlivými členskými zeměmi, nejčastěji se u nás využívají tyto testy

Testy toxicity na savcích

- 401 – akutní orální test
- 423 – metoda stanovení třídy akutní toxicity
- Pokud neznáme toxicitu přípravku či látky – limitní test s dávkou 2000 mg/kg (pokud je negativní, dále testy neprovádíme)
- Oba testy probíhají 14 dní, kdy se zvířata sledují po jednorázovém podání testované látky

Akutní orální test

- od roku 2002 nepoužíván, ale mnoho chemikálií bylo podle něj testováno
- prováděl se na 10 zvířatech s několika dávkami (používalo velké množství laboratorních zvířat)
- výsledkem ale byla přesná LD50
- přidělovány byly tyto R věty:
 - R 28 – vysoce toxické látky, LD do 25 mg/kg
 - R 25 – toxické látky LD 25 - 200 mg/kg
 - R 22 – zdraví škodlivé látky – LD 200 – 2000 mg/kg

Metoda stanovení třídy akutní toxicity

- na 3 zvířatech (obvykle samicích), pouze jedna startovací dávka
- 4 pevně stanovené dávky 5, 50, 300 a 2000 mg/kg
- výchozí dávka se stanoví tak, aby způsobila úhyn alespoň několika zvířat – pak se podle počtu uhynulých volí dávka vyšší (pokud k úhynu nedošlo), nebo stejná (+ i na samcích) či nižší (4 schémata ve směrnici dle startovací dávky)
- zařazení podle globálního harmonizačního systému (GHS) – kategorie 0 – 5000 mg/kg

kategorie 1	0-5 mg/kg.ž. hm
kategorie 2	>5-50 mg/kg.ž. hm
kategorie 3	>50-300 mg/kg.ž. hm
kategorie 4	>300-2000 mg/kg.ž. hm
kategorie 5	>2000-5000 mg/kg.ž. hm

- kategorie 1+2 = H300, fatální po požití
- kategorie 3 = H301, toxický po požití
- kategorie 4 = H302, škodlivý po požití

Testy toxicity na rybách

Typy technického provedení testů:

- Test statický – ryby jsou celou dobu testu ve stejném roztoku (už se nepoužívá - zplodiny metabolismu, pokles koncentrace testované látky atd.)
- Test semistatický – každý den ryby přeloveny do čerstvého roztoku
- Test průtočný – kontinuální průtok média

Existují 4 testy toxicity na rybách podle OECD:

- OECD 203: akutní test toxicity na rybách (trvá 96 hodin)
- OECD 210: test toxicity na ranných vývojových stádiích ryb (embryolarvální test toxicity – u kapra 31 dní)
- OECD 212: embryonální test toxicity (6-7 dní – z jikry vznikne plůdek za 3 dny, pak ještě 3 dny výživa ze žloutkového vaku – embryo. Když začne exogenní výživa, už je to larvální stádium).
- OECD 215: růstový test na juvenilních rybách (28 dní)

Pokud neznáme toxicitu přípravku či látky – limitní test s koncentrací 100 mg/l (pokud je negativní, dále testy neprovádíme)

Druhy nejčastěji používané v testech toxicity:

Danio pruhované - zebřička (*Danio rerio*)

Kapr obecný (*Cyprinus carpio*)

Halančík japonský (*Oryzias latipes* – u vlivu xenoestrogenních látek)

Živorodka duhová – gupka, paví očko (*Poecillia reticulata*)

Pstruh duhový (*Onchorhynchus mykiss*)

Vždy nutno provést validaci testu, kritéria validace jsou:

- 1) aby v kontrolním vzorku nebyl úhyn větší než 10 % u dospělců, více než 25 % u embryí
- 2) nasycení vody kyslíkem musí být nejméně 60%
- 3) koncentrace testované látky nesmí poklesnout pod 80 % původní hodnoty
- 4) teplota musí odpovídat danému druhu, nesmí kolísat více než $\pm 1^\circ\text{C}$

Je nutno provést taktéž test na standardu - $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (dichroman draselný)

– tímto se kontroluje stav ryb (každá laboratoř má LC/LOEC dichromanu po několika testech určenou), s tímto výsledkem to porovnáme a musíme se vejít do normy. Pokud je zrovna u daného pokusu LC dichromanu nižší/vyšší než je standard dané laboratoře, znamená to, že dodané ryby jsou na látku citlivější/méně citlivé, než je průměrná populace, a testy toxicity jsou neplatné

Akutní test – OECD 203:

- Nejprve se udělá limitní test – 100mg/l látky
- Pokud ryby neuhynou, tak nepokračujeme, látka je v pořádku. Pokud uhynou, pak si uděláme orientační test
- Tam si navolíme široké rozmezí koncentrací a výsledkem je získání užšího rozmezí koncentrací, které jsou škodlivé. (Viz příklad $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 10mg/l všechny přežily, 20mg/l – všechny uhynuly)
- Pak se provede základní test: zvolí se 7-10 koncentrací v tomto rozmezí (plus kousek nahoru i dolů – 8-25mg/l)
- Do každého akvária se dává 10 ryb, výsledkem je LC50 (96h) – v jaké koncentraci uhynie 50 % ryb za 96 hodin

Juvenilní test – OECD 215:

- Sleduje se váhový přírůstek ryb
- Používá se pouze pstruh duhový (dobře žere a přírůstky jsou signifikantní) nebo danio pruhované
- Výsledkem je NOEC a LOEC

Embryonální a embryolarvální testy (OECD 210+212) viz výukové video a informace z přednášky.

Pro ryby/vodní organismy se užívají věty:

H400 - Vyroce toxický pro vodní organismy

H401 - Toxický pro vodní organismy

H402 - Škodlivý pro vodní organismy

H410 - Vyroce toxický pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky

H411 - Toxický pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky

H412 - Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky

H413 - Může vyvolat dlouhodobé škodlivé účinky pro vodní organismy

Dříve:

R 50 – vysoce toxický, LC je méně než 1 mg/l

R 51 – toxický, LC je 1-10 mg/l

R 52 – škodlivý, LC je 10-100 mg/l

R 53 – látka dlouhodobě přetrvávající v prostředí

Praktická část: Probitová analýza v počítačovém programu – výpočet LC50

Výukový videofilm Metoda stanovení třídy akutní toxicity

Výukový videofilm Embryolarvální test na rybách