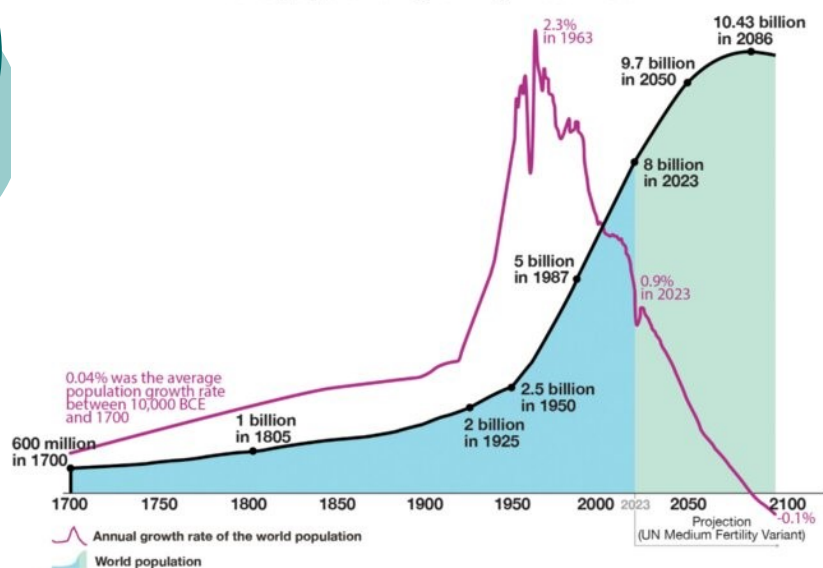
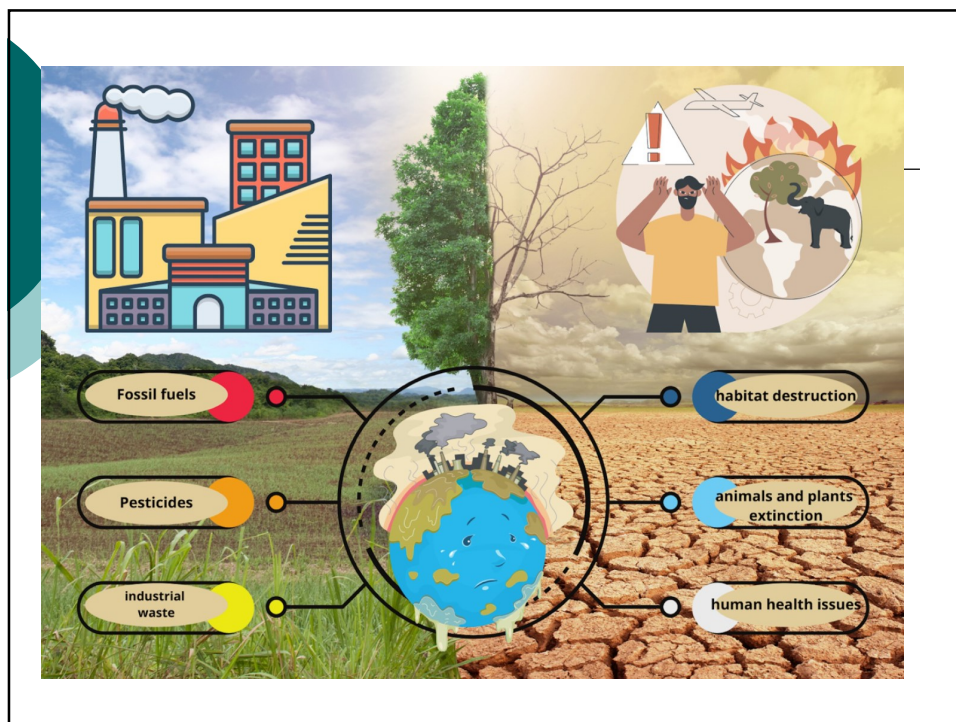


Biotesty toksyczności substancji chemicznych

Mirosław Ślusarczyk

World population growth, 1700-2100

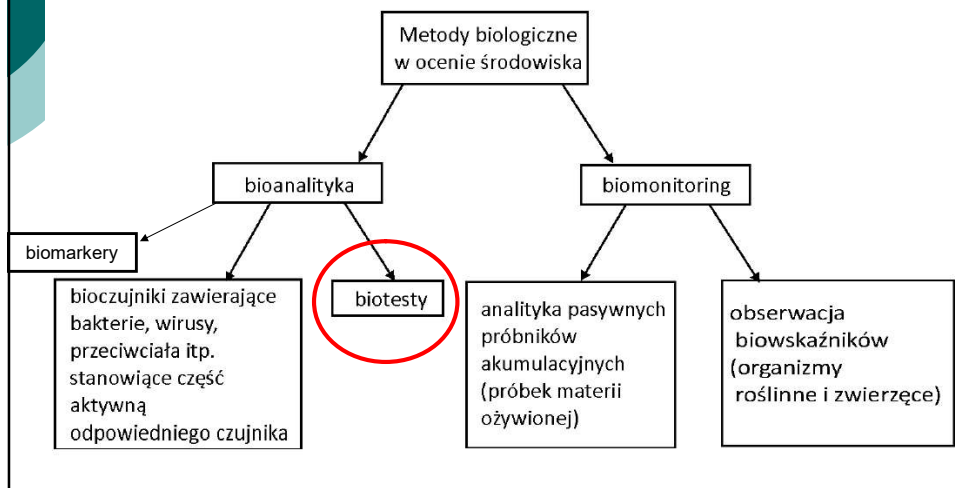




Analizyczne metody wykrywania skażeń



Biologiczne metody oceny skutków oddziaływania skażeń



Ocena oddziaływania substancji chemicznych na organizmy

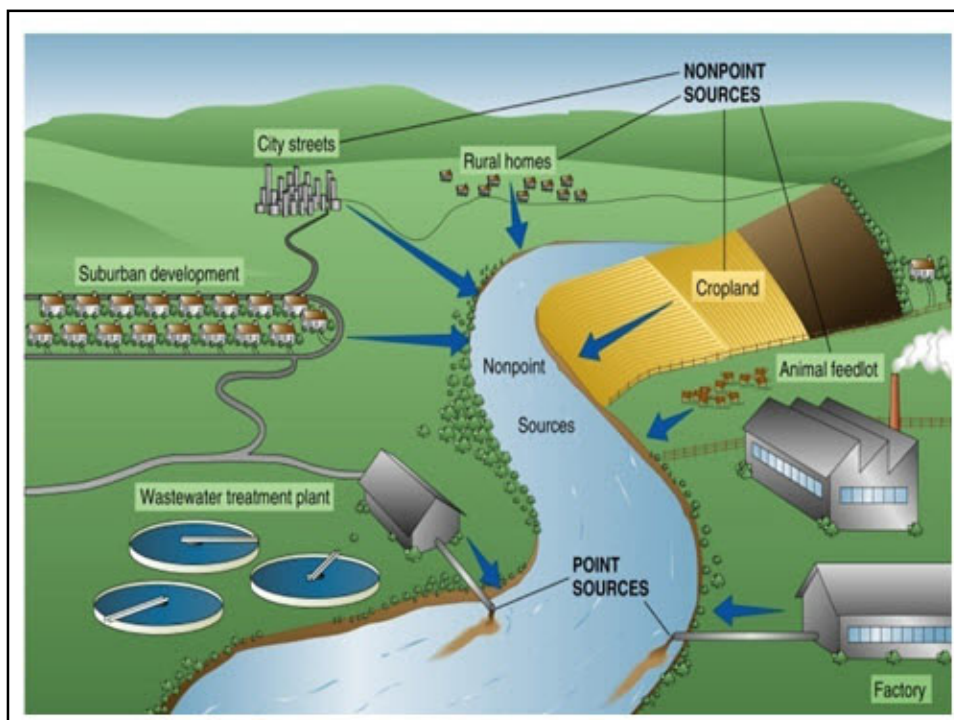
Biotest

Eksperymentalna próba

- oceny wrażliwości materiału biologicznego na oddziaływanie substancji toksycznych (określenie dawek/stężeń bezpiecznych/szkodliwych)
- wykrycia obecności substancji toksycznych w środowisku

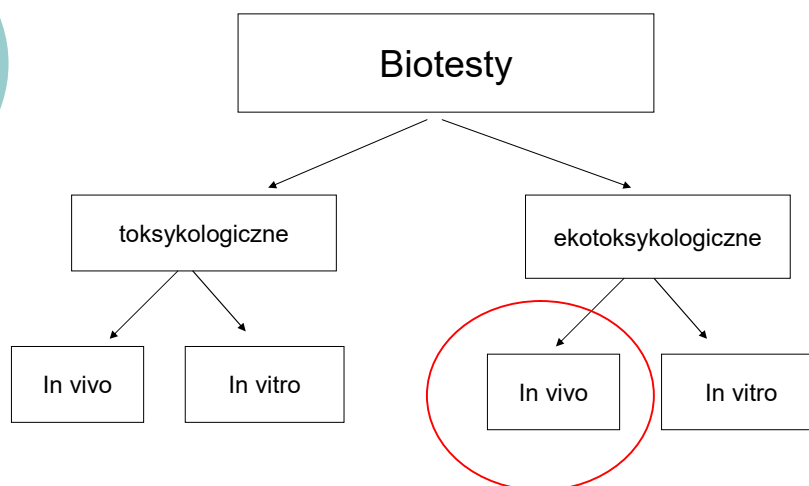
Efekt oddziaływania toksycznych mediów na organizmy zależy od:

- wrażliwości organizmów testowych
- rodzaju substancji (stopnia toksyczności)
- ilości (dawki) toksyny
 - stężenia toksyny w środowisku
 - długotrwałości oddziaływania
 - warunków towarzyszących
 - drogi oddziaływania



Biotesty (klasyfikacja)

- Czas trwania (ostre vs. chroniczne)
- Miejsce badań (lab. vs. środowisko)
- Obiekt badań (komórki, tkanki, organizmy, biocenoza)
- Kryteria oceny (śmiertelność, parametry fizjologiczne)
- Cel badań



Klasyczne metody badania toksyczności ostrej

- ustalenie dawki powodującej śmiertelność 50% osobników w populacji testowej
- duże różnice wyników badań w różnych laboratoriach



Standaryzacja badań

Procedury standardowe

- ułatwiają porównanie wyników, co zwiększa użyteczność danych,
- zwiększają dokładność danych,
- sprawiają, że test może być łatwo wykonany przez różne osoby
- mogą mieć wartość dowodową w sądownictwie



Procedury standardowe

- Organization for Economic Cooperation and Development (**OECD**),
International Standard Organization (**ISO**)

American Public Health Association (APHA),
Environmental Protection Agency (EPA),
American Society for Testing and Materials (ASTM)
Polski Komitet Normalizacyjny (PN)



Rozporządzenie Unii Europejskiej, 2006 Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (**REACH**)

Każda firma produkująca lub sprzedająca substancje chemiczne na terenie Unii Europejskiej, musi zarejestrować swoją substancję na podstawie rocznego tonażu.

Nie wymaga się danych toksykologicznych dla substancji zarejestrowanych **poniżej 1** ton rocznie, wraz ze wzrostem tonażu wymagane jest dostarczanie coraz większej ilości informacji.

Siódma poprawka do europejskiej dyrektywy kosmetycznej **zakazała testowania na zwierzętach produktów kosmetycznych i składników kosmetycznych** odpowiednio w 2004 i 2009 r.

Tonaż (t/rok)	Załącznik REACH	Toksykologia – zdrowie człowieka	Ekotoksykologia – środowisko
< 1	–	× brak wymogów (brak rejestracji)	× brak wymogów
1–10	Annex VII	• toksyczność ostra (oralna) • podrażnienie skóry i oczu • uczulenie skóry • mutagenność <i>in vitro</i> (Ames)	• glony – wzrost (OECD 201) • Daphnia – ostra (OECD 202) • biodegradowalność
10–100	Annex VIII	Annex VII + • toksyczność powtarzana 28 dni • toksyczność rozrodcza – screening (OECD 421/422)	Annex VII + • ryby – ostra (OECD 203) • Daphnia – chroniczna (OECD 211) • adsorpcja (Koc)
100–1000	Annex IX	Annex VIII + • toksyczność powtarzana 90 dni • rozszerzona toksyczność rozrodcza	Annex VIII + • ryby – FELS (OECD 210) • organizmy osadowe (<i>Chironomus</i>) • BCF (OECD 305)
>1000	Annex X	Annex IX + • pełna toksyczność rozrodcza (EOGRS / 2-pokolenia) • rakotwórczość (jeśli wskazania)	Annex IX + • pełne testy chroniczne ryb • rozszerzone testy gleby/osadów • możliwe mezokosmy

Cechy dobrego organizmu testowego

- wrażliwy,
- rodzimy,
- opisany,
- powszechny i łatwo dostępny,
- ważny ekologicznie
- wchodzący w liczne interakcje wewnątrz- i międzygatunkowe.
- łatwy w hodowli w warunkach laboratoryjnych,
- krótki cykl życiowy (w testach chronicznych)

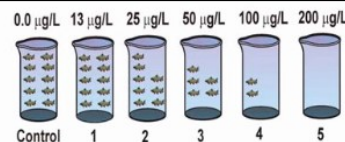
Biotesty substancji rozpuszczalnych i zawiesin

W testach wykorzystuje się ryby, bezkręgowce, glony, pierwotniaki lub bakterie

Sposoby testowania roztworów wodnych:

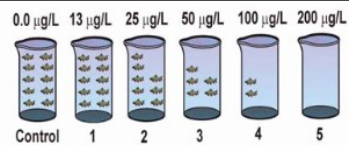
- statyczny,
- recyrkulacyjny,
- odnawialny,
- przepływowy.

Metoda statyczna



- W testach statycznych raz zadany roztwór i jego rozcieńczenia, w których umieszczone są organizmy, nie są wymieniane w czasie ekspozycji.
- Wady: stopniowe zmniejszanie stężenia substancji toksycznej i zasobów (np. tlenu) oraz gromadzenie się metabolitów.
- Metoda ta jest głównie stosowana w testach krótkoterminowych (toksyczności ostrej) z wykorzystaniem organizmów o małych rozmiarach

Metoda odnawialna



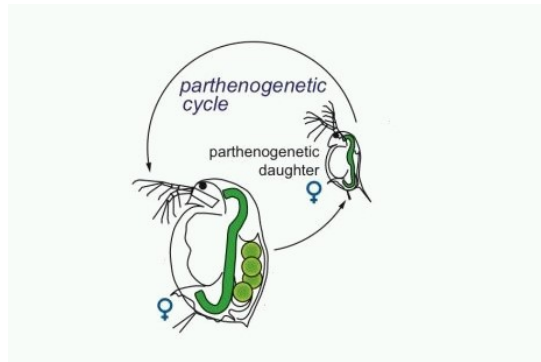
- okresowo, np. co 48 h, wymienia się w całości badany roztwór lub przenosi organizmy do nowo przygotowanych świeżych roztworów. Dzięki temu nagromadzenie się metabolitów zostaje częściowo ograniczone, poprawie ulegają warunki tlenowe oraz odnowione zostaje stężenie substancji toksycznej.
- Wady: fatyga organizmów

Testy toksyczności środowiskowej przeprowadzane metodą klasyczną na skorupiakach z rodzaju *Daphnia*

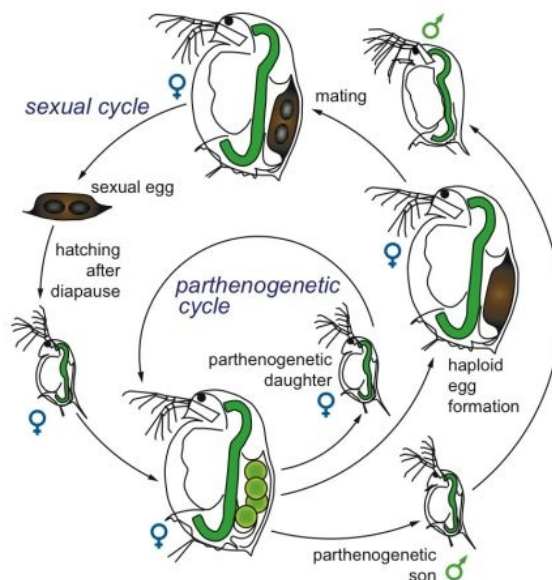
- test toksyczności ostrej
- test toksyczności chronicznej

Dlaczego *Daphnia*?

Bezkręgowiec o krótkim cyklu życiowym (czas generacji ok. 7 dni w temp 22°C) + iteroparyczność + duża płodność = wysokie tempo reprodukcji, rozwój bez przeobrażenia, rozród partenogenetyczny – szybka produkcja identycznych genetycznie zwierząt. Żyją 2-3 msce



Cykl życiowy Daphnidae



Test toksyczności ostrej

Daphnia magna

OECD 202/1984 zmiany 2004

48h oddziaływanie substancji na przeżywalność (ruchliwość) *Daphnia* sp.

Warunki testu:

Równowiekowe młodociane (<24h) klonalne samice, pochodzące ze „zdrowej” hodowli.

Min 20 samic na wariant (5 osobników * 4 powtórzenia)

Wariant kontrolny (bez testowanej substancji) + min 3 koncentracje testowanej substancji w rosnącym gradiencie koncentracji.

Pływalność samic miarą przeżywalności

Test toksyczności ostrej

Daphnia magna

OECD 202/1984 zmiany 2004

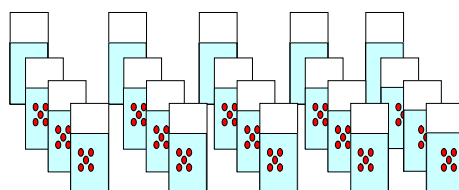
<https://hydro.biol.uw.edu.pl/toksykologia-srodowiska/>

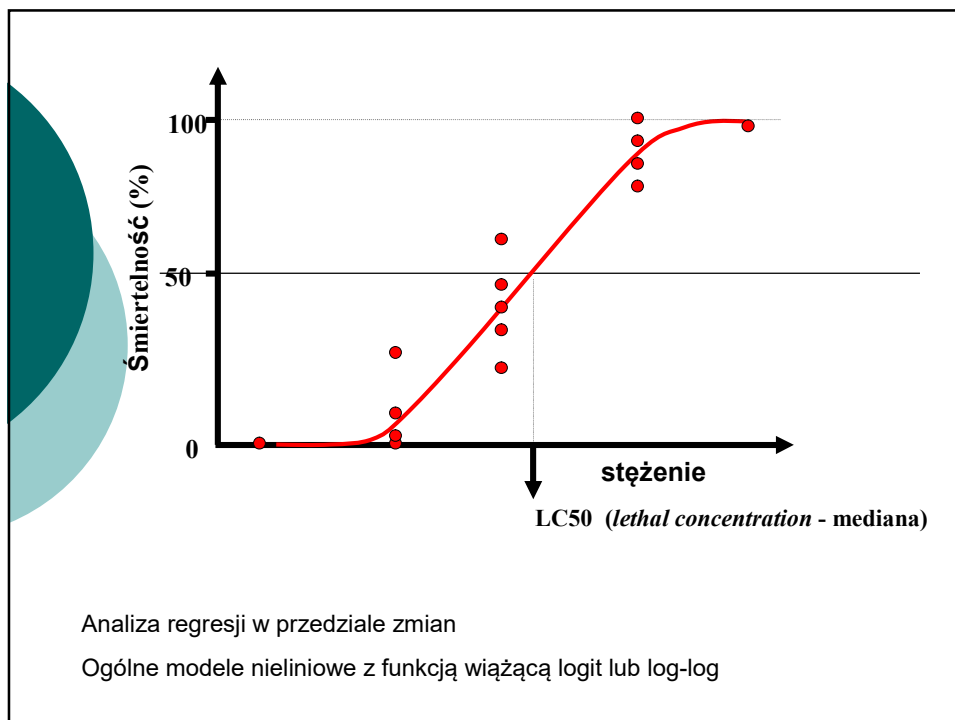
24/48h oddziaływanie substancji na przeżywalność (ruchliwość) zwierząt

Klonalne neonaty <24h

Wariant kontrolny (bez testowanej substancji) + min 3 koncentracje testowanej substancji w gradiencie koncentracji w min 4 powtórzeniach, min 5 os./powtórzenie

0 2 4 6 8 mg/l NaCl





Punkt efektu połowicznego (ang. mid point) zwykle przedstawia się w postaci wartości LC50, LD50,

- **LC50** – (ang. lethal concentration) – medialne stężenie śmiertelne, statycznie wyznaczona wielkość stężenia substancji, po narażeniu na które można oczekiwać, że w czasie ekspozycji lub w trakcie określonego, umownego okresu po ekspozycji nastąpi zgon 50% organizmów narażonych na tę substancję. Wartość LC50 wyraża się w jednostkach wagowych danej substancji na jednostkę objętości (mg/l).
- **LD50** – (ang. lethal dose) – medialna dawka śmiertelna, statycznie wyznaczona wielkość pojedynczej dawki substancji, po podaniu której można oczekiwać śmierci 50% organizmów testowych. Wartość LD50 jest wyrażana w jednostkach wagowych podanej substancji na jednostkę masy ciała badanych zwierząt (mg/kg).

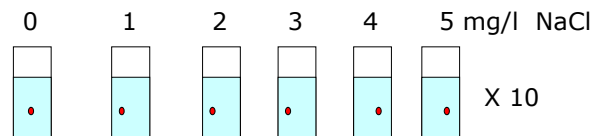
Test toksyczności chronicznej (długotrwałej, przewlekłej) OECD 211

<https://hydro.biol.uw.edu.pl/toksykologia-srodowiska/>

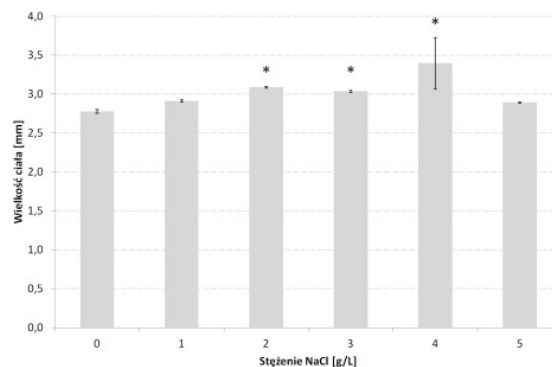
Oddziaływanie toksyny w ciągu cyklu życiowego org.
21 (7) dniowe oddziaływanie substancji na samice *Daphnia* od narodzin
do reprodukcji

Wariant kontrolny (bez testowanej substancji) + min 3 konc.
Substancji. Medium wymieniane min 3x na tydzień

Min 10 samic przetrzymywanych pojedynczo na wariant



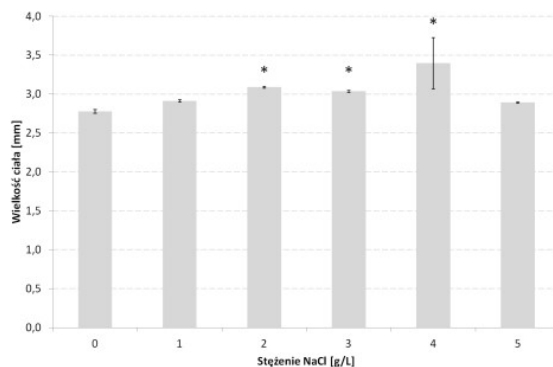
Płodność, rozrodczość, tempo wzrostu miarą wrażliwości zwierząt
Porównujemy ww. parametry przy użyciu ANOVA lub GLM
Poszukujemy NOEC, LOEC



Wykres 2. Średnia wielkość ciała dorosłych samic *D. magna* w zależności od stosowanych stężeń chlorku sodu. Słupkami zaznaczono błąd standardowy. Gwiazdką *** zaznaczono układy badawcze, które istotnie statystycznie różniły się od układu kontrolnego.

Do opisu stężeń minimalnych lub niewywołujących efektów używa się wielkości zdefiniowanych następująco:

- **NOEC** (ang. no observed effects concentration) – największe stężenie, dla którego nie występuje istotny wzrost częstości lub nasilenia skutków działania danej substancji u badanych organizmów w stosunku do próbki kontrolnej.
- **NOEL** (ang. no observed effects level) – największa dawka, dla której nie występuje istotny wzrost częstości lub nasilenia skutków działania danej substancji u badanych organizmów w stosunku do próbki kontrolnej.
- **LOEC** (ang. lowest observed effects concentration) – najmniejsze stężenie, dla którego występuje istotny wzrost częstości lub nasilenia skutków działania danej substancji u badanych organizmów w stosunku do próbki kontrolnej.
- **LOEL** (ang. lowest observed effects level) – najmniejsza dawka, dla której występuje istotny wzrost częstości lub nasilenia skutków działania danej substancji u badanych organizmów w stosunku do próbki kontrolnej.
- **MATC** (ang. maximum acceptable toxicant concentration) – max dopuszczalne stężenie substancji toksycznej. $MATC = \sqrt{(NOEC)(LOEC)}$



Wykres 2. Średnia wielkość ciała dorosłych samic *D. magna* w zależności od stosowanych stężeń chlorku sodu. Słupkami zaznaczono błąd standardowy. Gwiazdką *** zaznaczono układy badawcze, które istotnie statystycznie różniły się od układu kontrolnego.



Przygotowanie raportu

- Wstęp 3-4 zdania
- Cel. 2-3 zdania
- Metody 4-6 zdań, ze schematem eksp
- Wyniki. 2-3 wykresy z analizą statystyczną i komentarzem tekstowym
- Wnioski. 3-4 zdania

**Termin oddania do 23 stycznia, godz. 23.23,
sposób – listownie na adres m.slusarczyk@uw.edu.pl.**



Materiały ćwiczeniowe

<https://hydro.biol.uw.edu.pl/toksykologia-srodowiska/>

Literatura:

Traczewska TM. 2011. Biologiczne metody oceny skażenia
środowiska. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej