

Ekotoxikologické biotesty s ptáky a savci



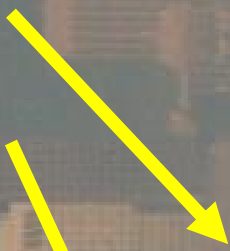
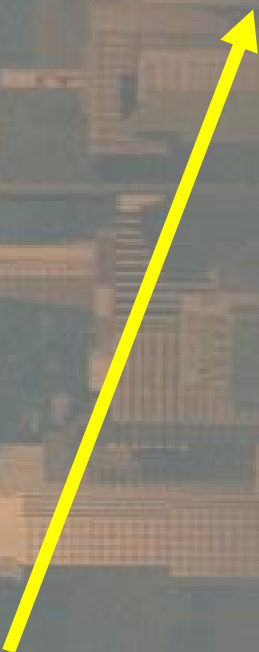
Ptáci a savci

- Sekundární a terciární konzumenti
- Druhy z řádu dravců a sov, šelmy – konečný článek potravní pyramidy
- Delší doba života – potenciál bioakumulace
- ? zakoncentrování/
metabolizace látek v potravních řetězcích



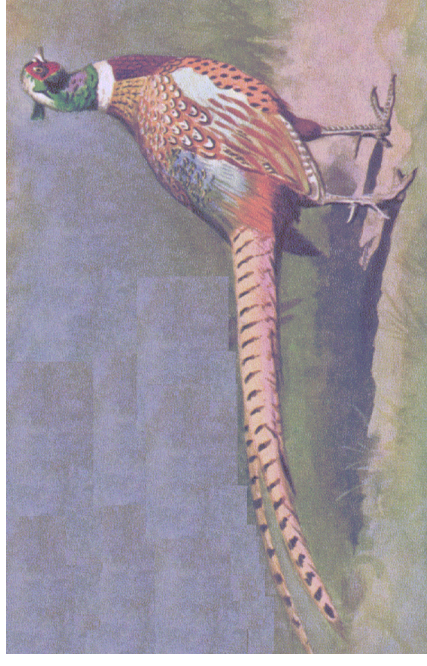
Ptáci

kontaminant



Ptáci - skupina necílových organismů pro pesticidy

- Primární intoxikace
- Sekundární intoxikace
- Údaje o toxicitě látek pro ptáky jsou nenahraditelné
 - akutní toxicita
 - chronická toxicita



Riziko pro poškození ptačích populací



Divocí ptáci v prostředí

Druhy citlivé na pesticidy, těžké kovy, POPs, sinicové toxiny

Především rybožravé druhy – vrchol potravního řetězce

- Vliv na centrální nervový systém
 - Změny chování
 - Poruchy smyslů
- Endokrinní účinky
- Poruchy reprodukce
- Mortalita embryí
- Malformace embryí



Snížení reprodukční kondice populací

Testy toxicity na volně žijících ptácích

Cíl: hodnocení vlivu antropogenních kontaminant (pesticidy, odpady atd.)

podpora registrace takových nových látek a přípravků, které:

- mohou představovat chronickou expozici ptáků
- jsou persistentní
- se mohou kumulovat v rostlinách a zvířatech
- vykazaly vliv na reprodukci laboratorních savců.

2 základní typy studií:

"screening field studies" - +/- toxicita? Mortalita, pohybová aktivita

„definitive field studies" - ? rozsah poškození? Biodiverzita, abundance,

biochemie krve, orgánů, hnízdní a pohybová aktivita, aktivita páření, počet vajec, síla skořápky, líhnivost

Testy toxicity na ptácích

OECD guidelines



Section 2: Effects on Biotic Systems

- **OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS**

205, 1984: Avian dietary toxicity test

- **OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS**

206, 1984: Avian reproduction test

EPA Series 850

Ecological Effects Test Guidelines

850.2100 Avian acute oral toxicity test

850.2200 Avian dietary toxicity test

850.2300 Avian reproduction test

850.2400 Wild mammal acute toxicity

OECD 205 Avian dietary toxicity test.



Test akutní perorální toxicity u ptáků

Testovací organismy: křepelka japonská (*Coturnix coturnix japonica*),

bažant obecný (*Phasianus colchicus*),

(případně: koroptev, vrána, kavka, špaček, racek, vlaštovka, kos, drozd, pěnice, holub, káně, poštolka, volavka, kormorán).

Design:

ptáci ze stejné populace, 10-17 dní staří, známý původ

Před testem min. 7 dní aklimatizace, na začátku zvážení jedinců,

(U volně žijících ptáků: večerní odlov, jedinec dostane při svítání jednorázově dávku v kapsuli).

Osvětlení 12 až 16 hodin denně

Expozice v potravě 5 dní (120 hodin), pak 3 dny krmná směs bez testované látky

Min. 5 koncentrací látky v krmivu (limitní test 5000 ppm) – příprava rovnoměrným rozmísením testované látky se základní krmnou směsí

Pokud dochází k úmrtí 7 a 8 den, prodloužení testu, až když 2 dny po sobě bez mortality, max. 21 dnů

10 jedinců na 1 klec

Vážení křepelek

Hmotnost těla je
zjišťována:

1. 0.den
2. 5.den
3. 8.den
4. na konci testu, je-li
prodloužen



EPA 850.2100: Avian Acute Oral Toxicity Test

min. 14 dní aklimatizace, expozice kapsulí nebo gaváží

Mladí dospělci, min. 16 týdnů

Min. 14 dní expozice

Není-li známo rozmezí koncentrací – předběžný test –
doporučeno 2, 20, 200, 2000 mg/kg b.w. (pokud
očekávána nízká toxicita stačí limitní test 2000 mg/kg b.w.

Definitivní test: 5 koncentrací, 10 jedinců na koncentraci –
dávkování na tělesnou hmotnost

Akutní test toxicity u ptáků

Během testování se sleduje:

Příznaky intoxikace a abnormality v chování

Mortalita

Hmotnost těla

V OECD 205: 0.- 5., 8. den a na konci testu, je-li prodloužen

Spotřeba krmiva

V OECD 205: 0.-5., 5.-8. den, 8.-poslední den testu, je-li prodloužen

Vyhodnocení:

doba od aplikace k prvním příznakům toxicity

mortalita – LC50 (V OECD 205: 24hLC50, 48hLC50, 78hLC50, 96hLC50, 120hLC50)

doba potřebná pro detoxikaci a obnovení fyziologických funkcí

Validita testu:

Mortalita kontrolních jedinců nepřekročila 10%

Koncentrace látky v krmivu neklesla pod 80%

Single-Dose Avian Embryotoxicity and Teratogenicity Test

Cíl: stanovení toxicity látky při přímé aplikaci na skořápku

Organismus - kachna divoká

Princip - přímá aplikace na skořápku (ropa, pesticidy, DDT, PCB)

Vyhodnocení:

- líhnivost
- nekrozy jater
- biochemické markery
- morfologické abnormality
- poruchy pohybu a metabolismu

OECD 206 Avian reproduction test (US EPA Avian chronic toxicity test.)

revidován – připravována nová verze: Avian reproduction toxicity test in the Japanese Quail or Northern Bobwhite

Cíl: stanovní reprodukční toxicity látky podávané rodičovským jedincům. Testy zahrnují účinky na reprodukci, fertilitu a teratogenitu

podpora registrace takových nových látek a přípravků, které:

- mohou představovat chronickou expozici ptáků
- jsou persistentní
- se mohou kumulovat v rostlinách a zvířatech
- vykazaly vliv na reprodukci laboratorních savců.

Testovací organismus :

kachna divoká, koroptev polní, křepelka

14 dní adaptace

Test reprodukcí toxicity (OECD 206)

Design:

- minimálně 3 koncentrace látky v potravě, dle předběžných laboratorních testů (ryba, krysa), nebo takové, které jdou 5x vyšší, než aktuální koncentrace dle analýz
- Nejlépe dle výsledků akutního perorálního testu toxicity (OECD 205) – nejvyšší koncentrace cca $\frac{1}{2}$ LC₁₀

Expozice připravena rovnoměrným rozmísením testované látky se základní krmnou směsí

Ptáci v klecích v párech

Na každou koncentraci aspoň 12 párů

- - expozice začíná 10 týdnů před hnízděním a pokračuje 1-3 měsíce ve snáškové sezóně, indukce snášky prodloužením fotoperiody
- - vejce jsou denně odebírány a uskladněny, kontrola prosvícením proti prasklinám
- každý týden či 14 dní dány na inkubaci v líhni
- V 6.-14. dni kontrola prosvícením
- Přemístění z inkubátoru do líhně (např. u křepelky 16.den)
- Vylíhlá mláďata s chovají 14 dní na adekvátní dietě

Test reprodukční toxicity (OECD 206)

V průběhu testu se sleduje:

- ✓ mortalita dospělců
- ✓ příznaky intoxikace
- ✓ hmotnost těla dospělců
 - ✓ produkce vajec
 - ✓ výskyt křápek
- ✓ tloušťka skořápky
- ✓ oplozenost vajec
 - ✓ líhivost kuřat
 - ✓ hmotnost těla mlád'at
- ✓ spotřeba potravy dospělci, mlád'aty
- ✓ Makroskopické patologické vyšetření - dospělci

Vyhodnocení:

- Mortalita, počet vajec, síla skořápky, % oplodněných
- Líhivost, % živých mlád'at po 3 a 14 dnech
- malformace, deformace očí, mozku, nohou a křídel,
- biochemické markery (bilirubin, AP, AST, GST, DNA aducts..)

Testy na mláďatech ptáků

- **Organismus** : špaček obecný
- **Design** : kapsule, pitná voda, 10 dní po narození
- **Vyhodnocení**: mortalita, hmotnost a růst orgánů, biochemie krve a orgánů



**VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA
BRNO**

**ŠKOLNÍ ZEMĚDĚLSKÝ PODNIK
NOVÝ JIČÍN
JINAČOVICE**

Aviární testy

Testy jsou prováděny na základě:

- ✓ akreditačního osvědčení a schváleného Projektu pokusu podle § 12 vyhlášky č. 311/97 Sb., o chovu a využití pokusných zvířat
- ✓ pověření podle § 40 zákona 147/96 Sb. k ověřování vlastností přípravků na ochranu rostlin

Pokusná Místnost

Regulace teploty

– optimum dle druhu
a stáří organismu

Vlhkosti (50-75%)

Světlného režimu (12-16 hod světla)

Dobrá ventilace







Test atraktivnosti různých rodenticidů pro ptáky (BBA – metodika)

- zjistit, zda je testovaná látka přijímána v množství, které způsobuje příznaky otravy nebo mortalitu
 - prognóza rizika akutních otrav ptáků v reálných podmínkách
 - venkovní voliery
 - bažanti, křepelky, holub domácí
 - adaptace 1 týden
 - 16 hod. hladovění, 8 hodin expozice – 3x po sobě
- Pak 14 dní pozorovací doba









Pozorování

- 1. hod expoziční fáze se ptáci pozorují trvale
- Následujících 7 hod. 1x za hod.
- Cyklus se opakuje 3 dny po sobě
- Na poslední expoziční fázi navazuje 14 denní pozorování



Vyhodnocení testů

- **Test akutní perorální toxicity (OECD 205)**
probitová analýza (graficky n. PC)
LC50
- **Test na atraktivitu (BBA-metodika)**
pokusná zvířata (druh, původ, věk)
popis voliér a podmínky testu vč. údajů o počasí
poznatky z pozorování - jak byla přijímána testovaná
substance
změny v chování, příznaky otravy
tělesná hmotnost testovacích jedinců
mortalita a makroskopický patologický nález

Testování toxicity na savcích

Celá řada normovaných testů na laboratorních savcích

Využití: medicína, farmacie, chemický výzkum, humánní toxikologie....

- ČSN ISO
- EPA
- OECD

In vivo, in vitro testy, specifické účinky – neurotoxicita, teratogenita, genotoxicita, karcinogenita

Akutní, subakutní, chronická toxicita

Orální, dermální, inhalační toxicita

VYHLÁŠKA 443 / 2004,

kterou se stanoví základní metody pro zkoušení toxicity chemických látek a chemických přípravků

B.1 bis	Akutní toxicita orální (per os) - metoda fixní dávky	B.17	Mutagenita - test genových mutací v savčích buňkách in vitro
B.1 tris	Akutní toxicita orální (per os) - metoda stanovení třídy akutní toxicity	B.18	Poškození DNA reparace - neplánovaná syntéza DNA - savčí buňka in vitro
B.2	Akutní toxicita inhalační	B.19	SCE - výměna sesterských chromatid in vitro
B.3	Akutní toxicita dermální	B.21	Test transformace savčích buněk in vitro
B.4	Kožní dráždivost	B.22	Dominantní letální test u hlodavců
B.5	Oční dráždivost	B.23	Analýza chromozómových aberací u savčích spermatogonií
B.6	Senzibilizace kůže	B.24	Spot test u myší
B.7	Subakutní toxicita orální (per os) (28 denní opakovaná aplikace)	B.25	Přenosné translokace u myší
B.8	Subakutní toxicita inhalační (28 denní opakovaná aplikace)	B.26	Test subchronické orální toxicity (90 denní studie orální toxicity s opakovanou aplikací hlodavcům
B.9	Subakutní toxicita dermální (28 denní opakovaná aplikace)	B.27	Test subchronické orální toxicity (90 denní studie orální toxicity s opakovanou aplikací hlodavcům
B.10	Mutagenita - test chromozómových aberací u savčích buněk in vitro	B.28	Subchronická toxicita dermální (90 denní opakovaná aplikace, studie na hlodavcích)
B.11	Mutagenita - test chromozómových aberací v kostní dřeni savců in vivo	B.29	Subchronická toxicita inhalační (90 denní opakovaná aplikace, studie na hlodavcích)
B.12	Mutagenita - in vivo mikronukleus test v savčích erytrocytech	B.30	Testování chronické toxicity
		B.31	Studie teratogeny
		B.32	Test karcinogeny

EPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OPPTS) - guidelines organizovány do 10 serií: **850 - Ecological Effects Test Guidelines**

870 - Health Effects Test Guidelines

- 870.1000 Acute toxicity testing--background
- 870.1100 Acute oral toxicity
- 870.1200 Acute dermal toxicity
- 870.1300 Acute inhalation toxicity
- 870.2400 Acute eye irritation
- 870.2500 Acute dermal irritation
- 870.2600 Skin sensitization
- 870.3050 Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents
- 870.3100 90-Day oral toxicity in rodents
- 870.3150 90-Day oral toxicity in nonrodents
- 870.3200 21/28-Day dermal toxicity
- 870.3250 90-Day dermal toxicity
- 870.3465 90-Day inhalation toxicity
- 870.3550 Reproduction/developmental toxicity screening test
- 870.3650 Combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test
- 870.3700 Prenatal developmental toxicity study
- 870.3800 Reproduction and fertility effects
- 870.4100 Chronic toxicity
- 870.4200 Carcinogenicity
- 870.4300 Combined chronic toxicity/carcinogenicity

- 870.5195 Mouse biochemical specific locus test
- 870.5200 Mouse visible specific locus test
- 870.5300 In vitro mammalian cell gene mutation test
- 870.5375 In vitro mammalian chromosome aberration test
- 870.5380 Mammalian spermatogonial chromosomal aberration test
- 870.5385 Mammalian bone marrow chromosomal aberration test
- 870.5395 Mammalian erythrocyte micronucleus test
- 870.5450 Rodent dominant lethal assay
- 870.5460 Rodent heritable translocation assays
- 870.5550 Unscheduled DNA synthesis in mammalian cells in culture
- 870.5575 Mitotic gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae*
- 870.5900 In vitro sister chromatid exchange assay
- 870.5915 In vivo sister chromatid exchange assay
- 870.6100 Acute and 28-day delayed neurotoxicity of organophosphorus substances
- 870.6200 Neurotoxicity screening battery
- 870.6300 Developmental neurotoxicity study
- 870.6500 Schedule-controlled operant behavior
- 870.6850 Peripheral nerve function
- 870.6855 Neurophysiology Sensory evoked potentials 870.7200 Companion animal safety
- 870.7485 Metabolism and pharmacokinetics
- 870.7600 Dermal penetration
- 870.7800 Immunotoxicity
- 870.8355 Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity

OECD guidelines

- Section 4: Health Effects

- 402 Acute Dermal Toxicity
- 403 Acute Inhalation Toxicity
- 404 Acute Dermal Irritation/Corrosion
- 405 Acute Eye Irritation/Corrosion
- 406 Skin Sensitisation
- 407 Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents
- 408 Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents
- 409 Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Non-Rodents
- 410 Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-day Study
- 411 Subchronic Dermal Toxicity: 90-day Study
- 412 Repeated Dose Inhalation Toxicity: 28-day or 14-day Study
- 413 Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study
- 414 Prenatal Developmental Toxicity Study
- 415 One-Generation Reproduction Toxicity Study
- 416 Two-Generation Reproduction Toxicity Study
- 417 Toxicokinetics
- 418 Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances
- Following Acute Exposure
- 419 Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances: 28-day Repeated Dose Study
- 420 Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Method
- 421 Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test
- 422 Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity
- 423 Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method
- 424 Neurotoxicity Study in Rodents
- 425 Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure
- 426 Developmental Neurotoxicity Study
- 427 Skin Absorption: In Vivo Method
- 428 Skin Absorption: In Vitro Method
- 429 Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay
- 430 In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)
- 431 In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test
- 432 In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test
- 435 In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion
- 440 Uterotrophic Bioassay in Rodents: a short-term screening test for oestrogenic properties
- 451 Carcinogenicity Studies (Original Guideline),
- 452 Chronic Toxicity Studies (Original Guideline, 453 Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies
- 471 Bacterial Reverse Mutation Test (Updated Guideline, adopted
- 473 In vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test (Updated Guideline,
- 474 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test
- 475 Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test
- 476 In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test
- 478 Genetic Toxicology: Rodent Dominant Lethal Test
- 479 Genetic Toxicology: In vitro Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells
- 480 Genetic Toxicology: Saccharomyces cerevisiae, Gene Mutation Assay
- 482 Genetic Toxicology: DNA Damage and Repair, Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells in vitro
- 483 Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test
- 484 Genetic Toxicology: Mouse Spot Test
- 485 Genetic Toxicology: Mouse Heritable Translocation Assay
- 486 Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells in vivo

Testy toxicity na volně žijících savcích (EPA 850.2400 Wild mammal acute toxicity)

Cíl: ověřit v přírodních podmínkách výsledky laboratorních testů na hlodavcích

V případě látek, které jsou přímo vnášeny do přirozeného prostředí druhu

Testovací organismy: volně žijící hlodavci - myš, hraboš, zajíc, králík, dále fretka, liška, lovná zvěř, (US - norek, skunk, bobr) – vybrat dle relevantnosti pro danou látku a prostředí aplikace

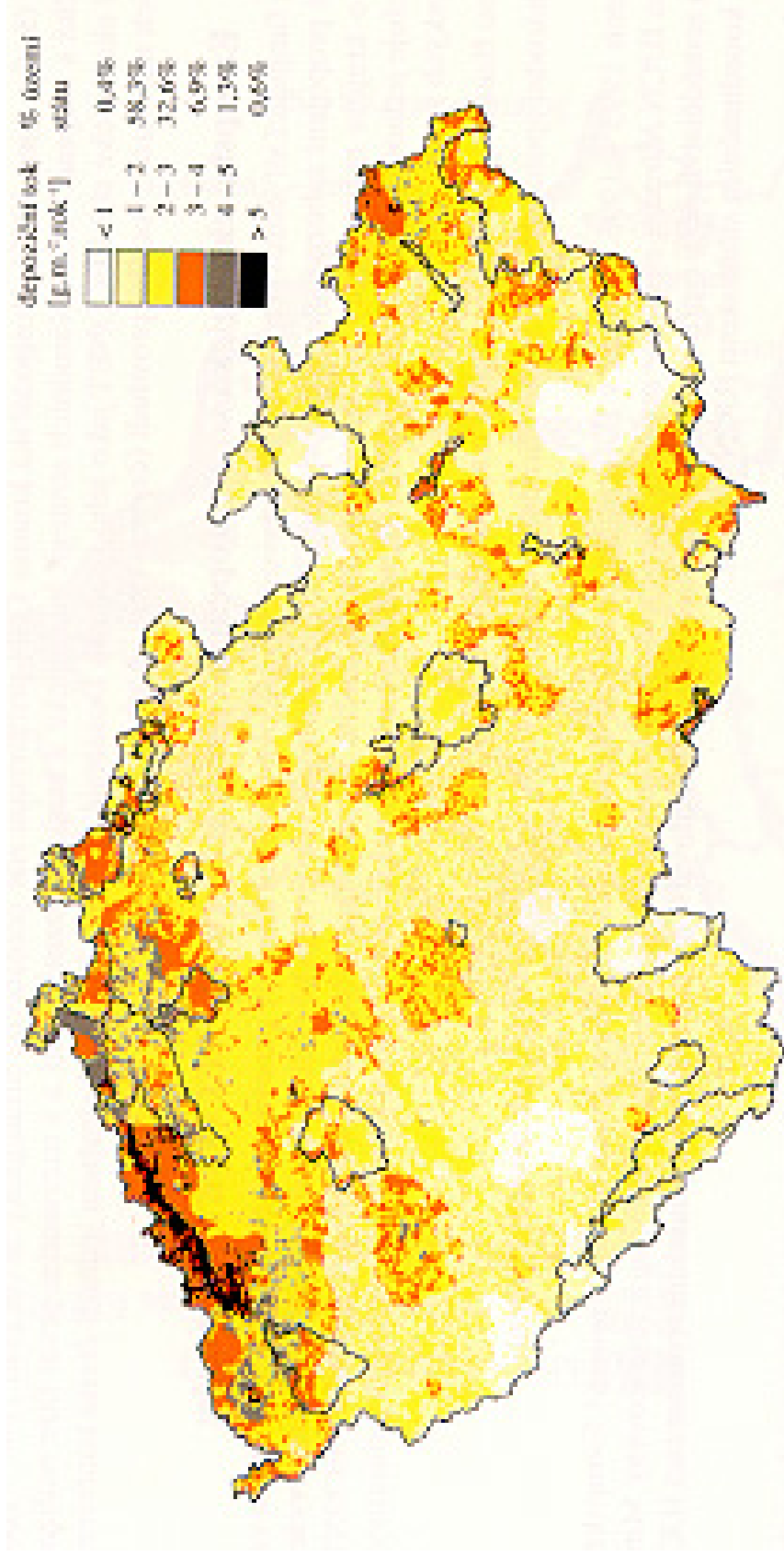
Design: 28 dnů expozice v klecích, přírodní podmínky, dávkování do vody a potravy

Vyhodnocení: mortalita, ovogeneze, spermatogram, reprodukční aktivita, vývoj embryí, biochemie krve a orgánů (slezina, játra).

Volně žijící savci jako model v biomonitoringu

Studovaná oblast - severozápadní Čechy
30°42' N 13°36'

Krušné hory, Mostecká pánev



Metody

testy mutagenních vlivů vnějšího prostředí

aberrace chromosomů v somatických a pohlavních buňkách
výskyt mikrojader v somatických buňkách
(mikronucleus test)
abnormality spermií

rezidua těžkých kovů

základní údaje z populační ekologie

Modely

rejsek malý (*Sorex minutus*)

rejsek obecný (*Sorex araneus*)

hraboš polní (*Microtus arvalis*)

normík rudý (*Clethrionomys glareolus*)

myšice lesní (*Apodemus flavicollis*)

Chromosomové aberace

hraboš polní

Mostecká pánev vs. jižní Čechy a jižní Morava

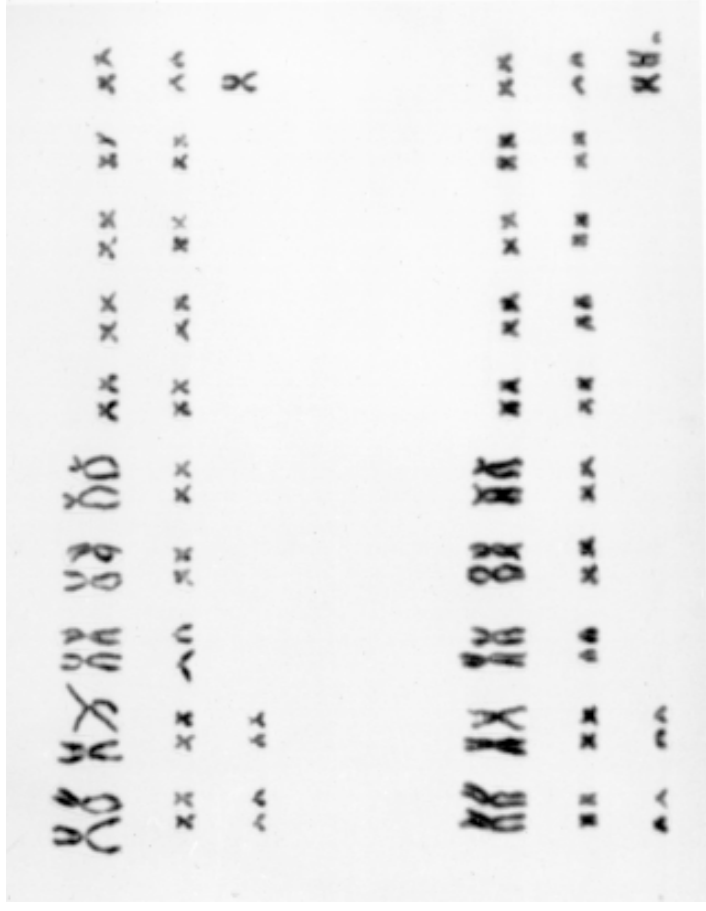
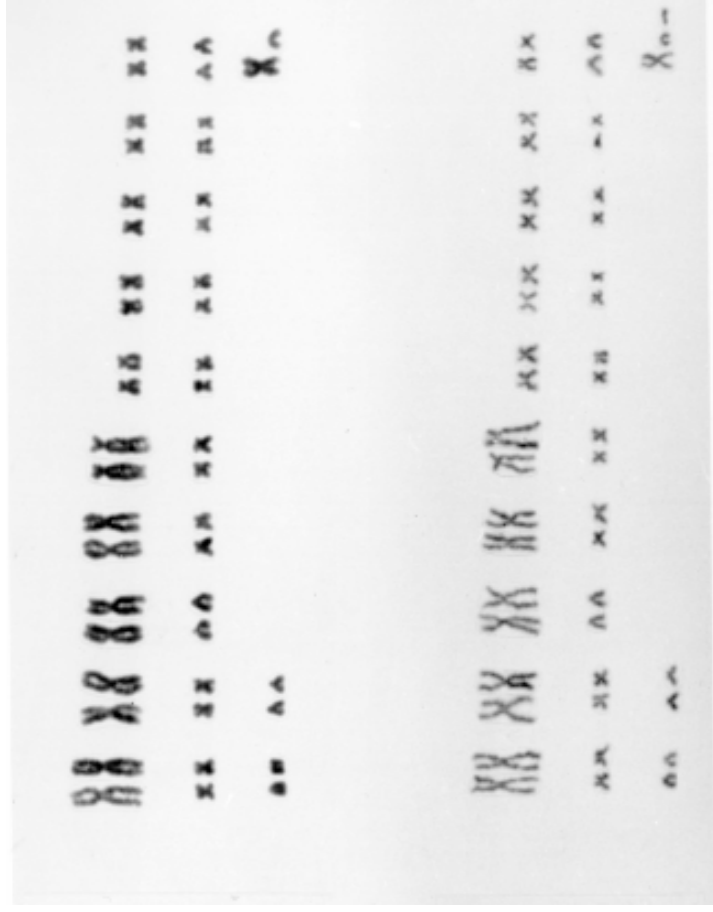
	počet vyšetřených buněk	% aberací
vzorek	2500	1,08 ^{ns}
kontrola	2500	1,16 ^{ns}

Zima J, Ekológia 4: 241-249 (1985)

Numerické anomálie pohlavních chromosomů

hraboš polní

Česká republika



Zima J et al., *Hereditas* 117: 203-207 (1999)

Výskyt abnormálních spermií

myšice lesní a norník rudý

Krušné hory vs. Labské pískovce

průměrné frekvence abnormálních spermií na 1500 buněk

DRUH		N (jedinci)	průměr	SD
<i>Apodemus flavicollis</i>	vzorek kontrola	28 27	14,00 * 8,45 *	4,56 8,37
<i>Clethrionomys glareolus</i>	vzorek kontrola	30 32	5,75 5,18	5,28 3,86

Ieradi LA et al., *Folia Zool.* 52: 57-66 (2003)

Rezidua těžkých kovů

Sorex minutus – játra [ppm, dry weight]

	<i>průměr</i>	<i>SD</i>	<i>min</i>	<i>max</i>
vzorek				
<i>Cd</i>	3,3	3,7	0	9,7
<i>Pb</i>	836,2	415,9	282,0	1614,4
kontrola				
<i>Cd</i>	4,7	4,7	0	34,9
<i>Pb</i>	29,5	13,2	11,9	63,4

Tomášková L et al., Carnegie Museum Special Publications (v tisku)

Rezidua těžkých kovů

Sorex araneus - ledviny [ppm, dry weight]

	<i>průměr</i>	<i>SD</i>	<i>min</i>	<i>max</i>
vzorek				
<i>Cd</i>	23,3	43,1	0	149,9
<i>Pb</i>	321,4	295,7	0	1187,7
kontrola				
<i>Cd</i>	5,4	9,0	0	38,5
<i>Pb</i>	193,2	299,0	0	779,8

Tomášková L et al., Carnegie Museum Special Publications (v tisku)

Populační ekologie

- **Žádný detekovatelný vliv na**

- poměr pohlaví
- populační strukturu
- reprodukci
- denzitu a produktivitu

- **sestupný trend abundance**

- snižování kvality stanoviště
v důsledku znečištění
- sukcese rostlinných společenstev



Závěry

úroveň kontaminace těžkými kovy indikuje vážné poškození zdravotního stavu

základní demografické parametry populace nevykazují známky narušení

vlivy znečištění a narušování stanovišť se projevují na úrovni jedince, ale nejsou zřetelné na úrovni populace

Další zdroje informací z monitoringu/bioindikací

- analýzy kostí a tuku dlouho žijících zvířat (více než 4 roky - jelen, prase divoké, spárkatá zvěř, vrány, kavky hnízdící na urč. Teritoriu)
- koloniálně hnízdící ptáci - rackové, kormoráni a populace hrabošů- vývoj mláďat – mortalita, teratogenita
- vnitřnosti lovné zvěře (monitoring) • odlov hrabošů z přírody -
- struktura populací
- bioakumulace PAU, PCB, DDT, TK.... • Biochemie+ genetika krve

Bioindikace nejsou biotesty!!!