

# Metoda pro stanovení akutní toxicity pro ryby



# Metoda

- Účelem této zkoušky je stanovit akutní letální toxicitu látek pro sladkovodní ryby.
- Akutní toxicitou se rozumí zřetelný nepříznivý účinek, který je v krátké době (řádově ve dnech) v organismu vyvolán expozicí látky. V této zkoušce se akutní toxicita vyjadřuje prostřednictvím střední letální koncentrace ( $LC_{50}$ )

# Podstata zkušební metody

- Ryby se vystaví účinku různým koncentracím zkušební látky přidané do vody po dobu 96 h. Úhyn je zaznamenán nejméně každých 24 h a je-li to možné, vypočtou se při každém pozorování koncentrace, které způsobí úhyn 50% ryb ( $LC_{50}$ ).

# Popis zkušební metody

- Mohou být použity tři postupy:
- Statická zkouška – zkouška při níž zkušební roztok neprotéká.
- Semistatická metoda – zkouška při níž zkušební roztok neprotéká, ale je pravidelně po delších časových úsecích zcela vyměňován.
- Průtoková metoda – zkouška toxicity, při níž se voda ve zkušebních nádržích neustále obměňuje, přičemž se zkušební látka přivádí s vodou, kterou se zkušební médium obnovuje.

# Činidla

- Roztoky zkušebních látek
- Zásobní roztoky o požadované koncentraci se připraví rozpuštěním látky v deionizované vodě nebo může být použita pitná voda, kvalitní přírodní voda nebo upravená voda (kvalitní destilovaná nebo deionizovaná s vodivostí menší než 5  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). Upřednostňuje se voda o tvrdosti 10 – 250 mg/l (vztaženo na  $\text{CaCO}_3$ ) a pH 6,0 – 8,5



# Přístroje

- Veškeré přístroje musí být vyrobeny z chemicky inertního materiálu:
- systémy pro automatické ředění (pro průtokovou metodu),
- přístroj pro měření koncentrace kyslíku,
- vybavení pro stanovení tvrdosti vody,
- vhodný přístroj pro měření teploty
- pH-metr.





# Testovací ryby



- Ryby by měly být zdravé a bez zjevných malformací
- Použitý druh by měl být zvolen podle praktických kritérií, jako je jejich dostupnost po celý rok, snadný chov, vhodnost pro zkoušení, relativní citlivost k chemickým látkám a jakékoliv další významné ekonomické a biologické faktory.

Doporučený druh	Doporučený rozsah t (°C)	Doporučená délka ryb (cm)
<i>Brachydanio rerio</i> , Danyo pruhovaný	20-24	3,0 ± 0,5
<i>Onchorhynchus mykiss</i> , Pstruh duhový	12-17	6,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> , Kapr obecný	20-24	6,0 ± 2,0
<i>Poecilia reticulata</i> , Živorotka duhová	20 - 24	3,0 ± 1,0

# Chov

- Ryby by měly pocházet pokud možno z jednoho chovu a měly by být stejné délky a stejného stáří. Musí být chovány nejméně 12 dní v následujících podmínkách:
- voda - upravená voda (čistota p.a.; kvalitní destilovaná, deionizovaná s vodivostí menší než 5  $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
- osvětlení - 12-16 h denně
- koncentrace rozpuštěného kyslíku - 80% hodnoty nasycení vzdušným kyslíkem
- krmení - třikrát týdně nebo jednou za den; vysazení krmení 24 h před začátkem



# Mortalita a aklimatizace

Po 24 h aklimatizaci se zaznamená mortalita a použijí se následující kritéria:

- mortalita vyšší než 10% populace za 7 dní: celá osádka ryb se vyřadí
- mortalita 5 - 10% populace: v chovu se pokračuje dalších 7 dní. Nedojde-li k dalším případům úhynu, osádka se použije, v opačném případě musí být vyřazena
- mortalita menší než 5% populace: osádka je pro zkoušku použitelná
- všechny ryby musí být nejméně 7 dní před použitím nasazeny do vody stejné kvality a teploty, jaká se použije při zkoušce



# Zkušební postup

- Krom série zkoušek se provede kontrolní zkouška bez zkušební látky a podle potřeby kontrolní zkouška s pomocnou látkou
- Ryby se exponují zkušební látce za podmínek:
- Délka expozice 96h
- Počet ryb: nejméně 7 na každou koncentraci
- Nádrže: vhodný objem vzhledem k doporučené osádce
- Osádka: pro statickou a semistatickou zkoušku se doporučuje 1g/l
- Zkušební koncentrace: nejméně 5 koncentrací, které pokrývají faktor mortality 0 – 100 %
- Osvětlení 12 - 16 h
- Koncentrace rozpuštěného kyslíku: ne nižší než 60% hodnoty nasycení vzdušným kyslíkem
- Krmení: žádné

- Ryby se kontrolují po prvních 2 – 4 h a dále nejméně každých 24 h.
- Ryby se považují za mrtvé, jestliže při dotyku ocasní ploutve nedochází k žádné reakci a nejsou-li patrné žádné dýchací pohyby.
- Zaznamenávají se všechny zjevné abnormality.
- Měření pH, obsahu rozpuštěného kyslíku a teploty se provádí denně.

# Data a hodnocení

- Na pravděpodobnostní logaritmičtý papír se pro každé období, kdy byla prováděna pozorování vynese pro každou expoziční dobu mortalita v % proti koncentraci
- Pokud je možné odhadnout se standardními postupy pro každou délku expozice hodnoty  $LC_{50}$  a meze spolehlivosti ( $p=0,05$ ), tyto hodnoty se zaokrouhlí na jednu – dvě plané číslice.

# Zprávy

- Protokol má obsahovat:
- Údaje o testovacích rybách (název, kmen,...)
- Zdroj ředící vody a hlavní chemické charakteristiky (pH,...)
- Koncentrace všech pomocných látek
- Jestliže byly provedeny chemické analýzy, údaje o použitých metodách a získané výsledky
- Popis zkušebního zařízení
- Koncentrace rozpuštěného kyslíku, hodnoty pH, teplota zkušebních roztoků každých 24 h
- Graf křivky závislosti účinku, vyjádřeného v procentech, na koncentraci na konci zkoušky
- Podle možnosti hodnoty LC<sub>50</sub> při každé z doporučených dob pozorování
- Nejvyšší zkušební koncentrace, která nevyvolala za dobu zkoušky úhyn ryb
- Nejnižší zkušební koncentrace, která vyvolala za dobu zkoušky 100% mortalitu

**Děkuji za pozornost**