

## Metoda pro stanovení toxicity na rybích embryích a potěru

– krátkodobá zkouška – metoda C.15 podle přílohy směrnice 2001/59/ES

- Při této zkoušce jsou exponována životní stádia ryb od čerstvě oplodněných jiker do stádia vččkových plůdků
  - Replika metody OECD TG 212
  - Tato zkouška je určena k zjištění letálních a v omezené míře i subletálních účinků chemických látek na specifická stádia a testovací druhy
  - Měla by poskytnout užitečné informace, neboť by
1. Mohla být přechodem mezi letálními a subletálními zkouškami
  2. Mohla by být použita jako screeningová zkouška pro úplnou zkoušku toxicity na časných vývojových stádiích nebo pro zkoušky chronické toxicity

- Očekává se, že zkouška na embryu a váčkovém plůdku je méně citlivá než úplná zkouška na časných vývojových stádiích, zejména pokud jde o vysoce lipofilní chemické látky ( $\log P_{o/w} > 4$ ) a chemické látky se specifickým mechanismem účinku. Menší rozdíly se očekávají v případech látek s nespecifickým, narkotickým mechanismem účinku
- Nejvíce zkušeností s touto zkouškou je získáno u sladkovodní ryby *Brachydanio rerio* – Danio pruhované. Lze ovšem použít i jiné druhy jako Pstruh duhový, Kapr obecný, Karas zlatý, sled' a další...



## Princip testu

- Expozice oplodněných jiker ve zkušebních nádržích
- Ukončení testu těsně před tím, než dojde k úplné absorpci žloutkového vajíčka (nejsou krmeny)
- Embrya a vajíčkové plůdky jsou exponovány různým koncentracím testované látky (obvykle 5)
- Posouzení letálních a subletálních účinků a jejich porovnání s kontrolními hodnotami s cílem určit LOEC a NOEC
- Případně analýza za použití regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která způsobuje určitý procentuálně vyjádřený účinek tj. LC/EC<sub>x</sub>

## Pracovní postup

- Výběr vhodného počtu zdravých ryb a jejich udržování alespoň dva týdny před předpokládaným třením ve vhodné vodě
- Po tření přenos oplodněných jiker bez přístupu vzduchu do zkušebních nádrží
- Zahájení nejlépe do 30 min. po oplodnění jiker. V každém případě před počátkem stádia gastruly (Mikroskopické vyšetření jiker, aby se ověřilo, že v prvních stádiích vývoje nedošlo k nepravidelnostem)
- Náhodné rozdělení jiker k expozici a na jednu koncentraci alespoň 30 ks rovným dílem mezi alespoň tři další zkušební nádrže



## Pracovní postup

- Velikost násady by měla být tak nízká, aby bylo možné udržet koncentraci rozpuštěného kyslíku bez provzdušňování na alespoň 60%
- Fotoperioda a teplota vody by měly vyhovovat zkušebnímu druhu
- Optimální hodnoty pH a tvrdosti vody jsou 7.8 a 250 mg/l, vyjádřeno jako CaCO<sub>3</sub>
- Zkouška umožňuje volit mezi semistatickým a průtokovým uspořádáním (závisí to na povaze zkoušené látky)
- Pozorování:
  - co nejpřesnější identifikace stádia gastruly na začátku expozice

- líhnutí a přežívání alespoň 1x denně (každých 30 min. během prvních tří hodin) – odstranění uhynulých embryí a plůdků
- zaznamenávání plůdků s neobvyklým tělesným vzhledem nebo pigmentací
- zaznamenávání neobvyklého chování
- na konci zkoušky se zaznamenává tělesná délka (standardní/celková) a hmotnost (doporučuje se hmotnost za sucha – 24h při 60°C)

# Vyhodnocení

- Dvojfázový přístup. 1. statistická analýza dat o mortalitě, nenormálním vývoji a době líhnutí. 2. u koncentrací u kterých nebyly pozorovány žádné nepříznivé účinky na tyto parametry se statisticky vyhodnotí délka (toxická látka může selektivně usmrcovat menší ryby, prodlužovat délku líhnutí a indukovat makroskopické malformace a tedy zkreslovat délku- zajistí to validitu statistiky zkoušky)
- Pro stanovení hodnot LOEC/NOEC analýza odchylky pro každou sadu paralelních skupin pomocí analýzy variace (ANOVA)
- Stanovení LC<sub>50</sub> a EC<sub>50</sub>



## Validita zkoušky

- Má-li být zkouška platná, musí být splněny následující podmínky:
  - celková míra přežití oplodněných jiker v kontrolních skupinách (případně i v nádržích s přidaným rozpuštěným) musí být vyšší nebo rovna stanoveným limitům pro testovaný druh
  - koncentrace rozpuštěného kyslíku musí ležet mezi 60 a 100 % nasycení vzduchem po celou dobu zkoušky
  - teplota vody se po celou dobu zkoušky nesmí mezi zkušebními nádržemi nebo den ode dne lišit o víc než  $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$  a měla by být udržována v rozpětí teplot stanoveném pro zkušební druh
  - koncentrace testované látky nesmí klesnout pod 80%

# ZKŮŠEBNÍ PODMÍNKY, DÉLKA ZKOUŠKY A KRITÉRIA PŘEŽÍTÍ PRO DOPORUČENÉ DRUHY

| Druh  | Teplota (°C)             | Salinita (‰) | Fotoperioda (h) | Délka stádií (d) |                | Typická délka zkoušky  | Přežití v kontrolních skupinách (minimální hodnota v %) |              |
|---|--------------------------|--------------|-----------------|------------------|----------------|--|---|--------------|
|   |                          |              |                 | Embryo           | Váčkový plůdek |  | Úspěšnost líhnutí                                       | Po vylihnutí |
| <b>SLADKOVODNÍ</b>                          |                          |              |                 |                  |                |  |   |              |
| <i>Brachydanio rerio</i><br>Danio pruhované | 25 ± 1                   | —            | 12-16           | 3-5              | 8-10           | Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 5 dnů po vylihnutí (8 - 10 dnů)   | 80  | 90           |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i><br>Pstruh duhový | 10 ± 1 (1)<br>12 ± 1 (2) | —            | 0(3)            | 30-35            | 25-30          | Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 20 dnů po vylihnutí (50 - 55 dnů) | 66  | 70           |
| <i>Cyprinus carpio</i><br>Kapr obecný       | 21-25                    | —            | 12-16           | 5                | > 4            | Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 4 dnů po vylihnutí (8 - 9 dnů)    | 80  | 75           |
| <i>Oryzias latipes</i><br>Halančík japonský | 24 ± 1 (1)<br>23 ± 1 (2) | —            | 12-16           | 8-11             | 4-8            | Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly ) do 5 dnů po vylihnutí (13 - 16 dnů) | 80  | 80           |
| <i>Pimephales promelas</i><br>Sřevle        | 25 ± 2                   | —            | 16              | 4-5              | 5              | Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 4 dnů po vylihnutí (8 - 9 dnů)    | 60  | 70           |