

Testy ekotoksicity s rybami



Testy toxicity na rybích modelech

- Akutní testy toxicity
- Prolongované testy toxicity
- Chronické testy toxicity
- Testy toxicity na rybích embryích a potěru
 - Embryonální testy
 - Embryolarvální testy
- Testy ovlivnění růstu na nedospělých rybách
- Testy bioakumulace

Chemické látky a chemické přípravky – hodnocení vlastností nebezpečných pro životní prostředí

- Zák. č. 356/2003 Sb. O chemických látkách a chemických přípravcích
- Metody pro zkoušení vlastností látek a přípravků uvedeny v části I. přílohy č.2 Vyhlášky MŽP č. 222/2004 Sb., kterou s u chemických látek a přípravků stanoví základní metody pro zkoušení fyzikálně-chemických vlastností, výbušných vlastností a vlastností nebezpečných pro životní prostředí
- - akutní toxicita pro ryby
- - bioakumulace – průtoková zkouška na rybách
- - růstu na nedospělých rybách
- - toxicity na rybích embryích a potěru – krátkodobá zkouška

Akutní testy

ČSN EN ISO 7346-1 (75 7761) Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae) – Část 1: Statická metoda

ČSN EN ISO 7346-2 (75 7761) Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae) – Část 2: Obnovovací metoda

ČSN EN ISO 7346-3 (75 7761) Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae) – Část 3: Průtočná metoda

OECD 203: Test akutní toxicity na rybách – výsledkem je koncentrace, která vyvolá 50% úhyn ryb (96h LC50)

Používané druhy

Brachydanio rerio (danio pruhovaný)



Poecilia reticulata (živorodka duhová, paví očko)



Danio rerio (danio pruhovaný, zebříčka pruhovaná)



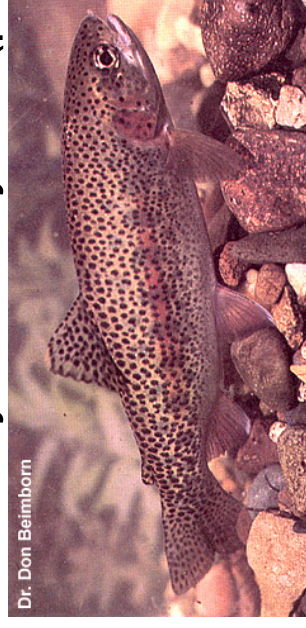
Pimephales promelas (střevle)



Cyprinus carpio (kapr obecný)



Oncorhynchus mykiss (pstruh d)



Chov ryb pro testy



Střevle potoční (*Pimephales promelas*)



- malá, malé nároky na prostor
- mimotělní vývoj
- široké rozmezí teplot i slanosti
- snadná kultivace v laboratoři
- krátká generační doba
- testy relativně levné

Danio pruhovaný (*Brachydanio rerio*)



- Čeled: Cyprinidae - kaprovití

Původ: Asie

Velikost: do 4 cm

Teplota: 20 - 26 °C

pH: 6,5 - 7,5

Tvrdość vody: 5 - 12 °dKH

Potrava: všežravec (vločkové krmivo, nitěnky, dafnie)

Rozmnožování: Samečci jsou vybarvenější a oproti samičkám dorbnější.

Rozmnožují se ve větší, hodně zarostlé, nádrži s nízkou hladinou vody, při teplotě okolo 25 °C. Na vytírání nádrží by mělo dopadat denní světlo. Nejříve do nádrže umístíme samičku a až po několika dnech přidáme samce. Pokud jsme byli úspěšní, samička naklade na rostliny až 500 jiker. Potě se líhne po dvou dnech a soběstačný je po dalším dni.

- Známý genom, dobře charakterizovaný druh
- Tisíce mutantních druhů
- Dobře popsáný model vývoje obratlovců
- Modely pro některá lidská onemocnění a poruchy

halančík japonský (Oryzias latipes):



- Zcela průhledná vajíčka
- Dostupné křížené /transgenní /mutantní druhy
- Známý genom
- X-Y určení pohlaví Low tumor background
- Sensitivní odpověď na xenobiotika

Test akutní toxicity na rybách

Účel: Test slouží ke stanovení vlivu látek a odpadních vod na chování a přežívání ryb.

Princip: Test spočívá ve sledování chování a přežívání ryb v odstupňovaných koncentracích testované látky po dobu 48 až 96 hodin



Brachydanio rerio (2,5-3,5 měsíců, 2,5-3,5 cm, 21-25°C)

Poecilia reticulata (1,5-2,5 cm, 3-3,5 měsíce, 21-25°C)

Cyprinus carpio (2,5-3,5 cm, 20-24°C)

Oncorhynchus mykiss (4,5-5,5 cm, 13-17°C)

Další druhy: *Oryzias latipes* (halančík japonský), *Lepomis macrochirus* (slunečnice modrá), *Leuciscus idus* (jelec jesen)

Při nákupu nutná **aklimatizace 10-14** dní, standardní krmení, chov jako při testu
Do testu – buď jen jedno pohlaví nebo vyrovnaný počet pohlaví

Testy akutní toxicity na rybách

Podmínky testu:

Teplota $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, osvětlení 12-16 hod 2 000 lux,
48 hod před testem přestat krmit, během testu bez krmení; bez aerace,
expozice 96 h
min. 100 ml/jedince, 3-10 jedinců/koncentraci

Limitní test: kontrola a 100 mg/L, 3-5 ryb/koncentraci

Orientační test (předběžná zkouška): 3-5 ryb/500ml, několik koncentrací

- cíl: získat informace o rozsahu koncentrací pro hlavní zkoušku

Základní test (hlavní zkouška): 7-10 ks ve 3 litrech, 3 opakování, 5 - 10 koncentrací

Uspořádání: statické, semistatické – obsádka max. 1 g na L
průtokový systém – možno vyšší obsádka

Akutní test

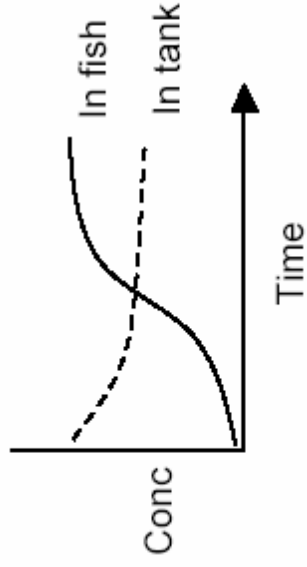
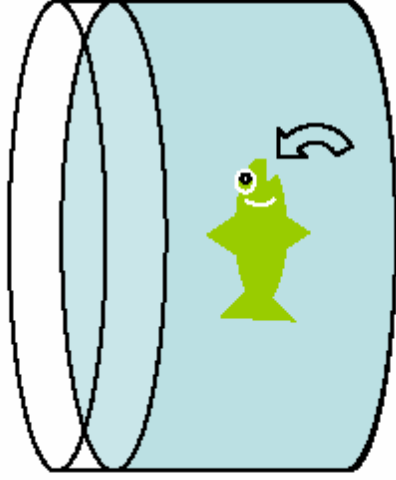
Parametry sledované v průběhu testu

- pH, teplota, O₂
- změny chování (aktivita, neklid, trhavé pohyby apod.)
- mortalita po 24, 48, 72 h
- Na konci testu - letalita – stanovení 96LC 50

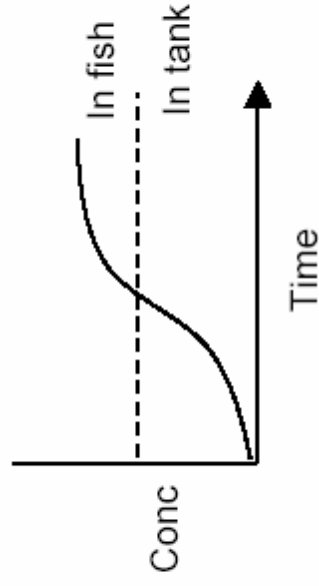
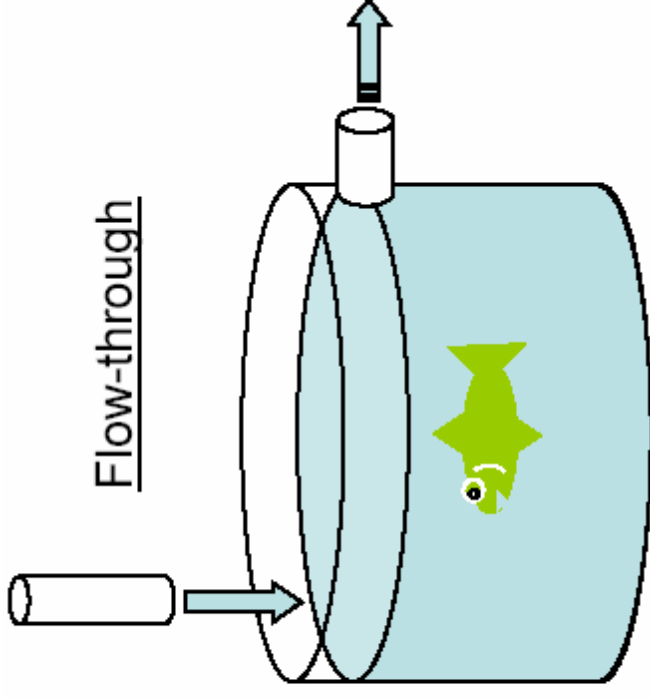
Po ukončení testu jsou pokusné organismy usmrceny oxidem uhličitým dle zákona ČNR č. 246/1992 Sb na ochranu zvířat proti týrání.

Experimentální design pro testy toxicity

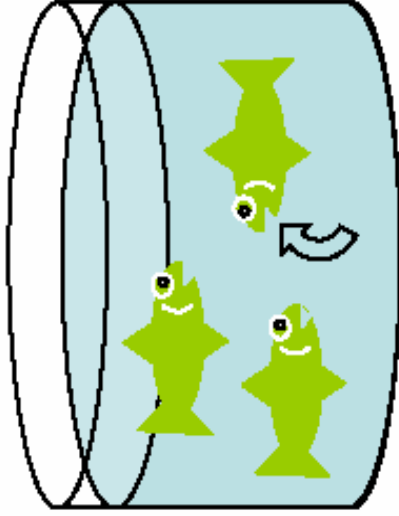
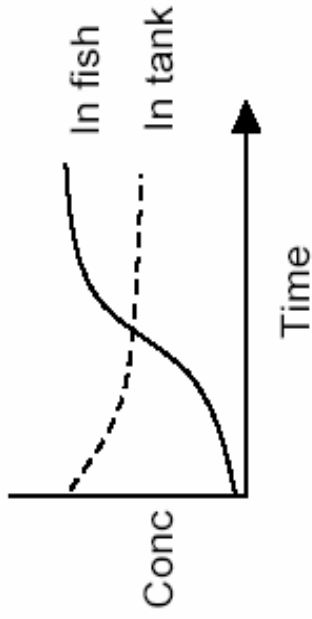
Static



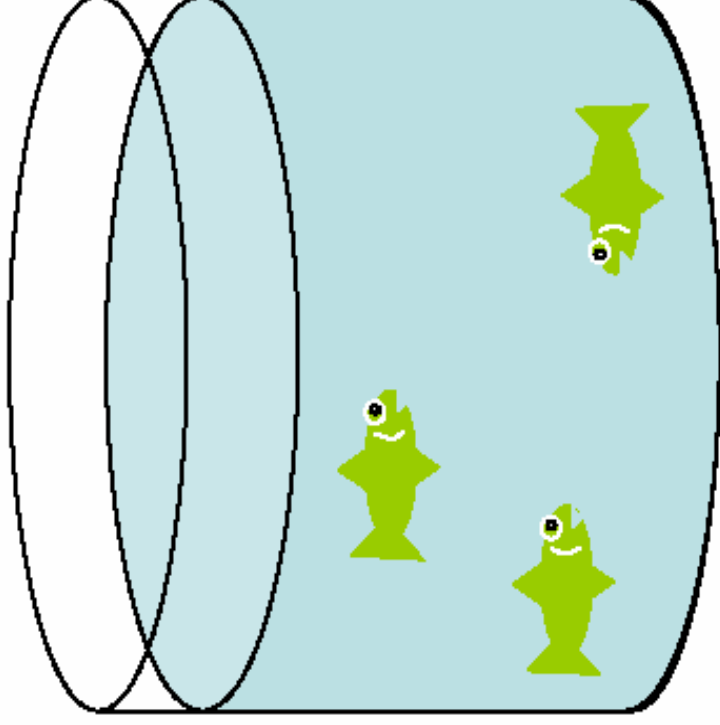
Flow-through



Překonání problémů statického designu: 1. Zvýšení objemu



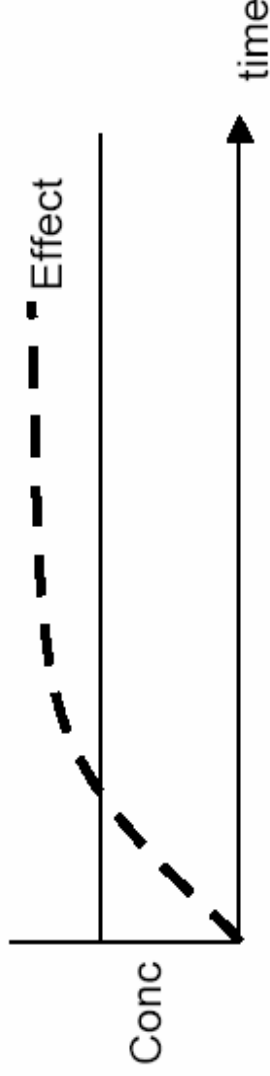
Uptake by organisms depletes chemical in solution



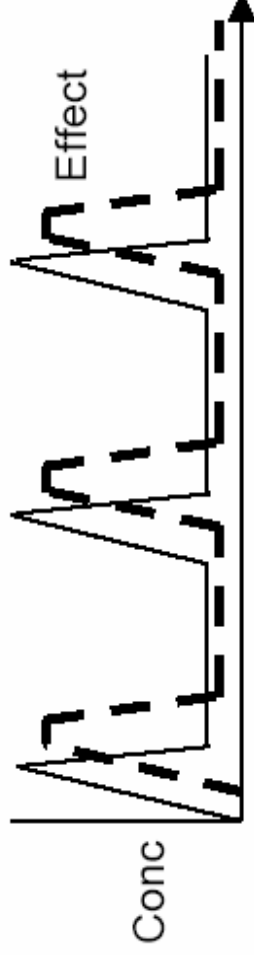
Chemical depleted slowly

Překonání problémů statického designu: 2. Semi-statické upřádání (obnovovací)

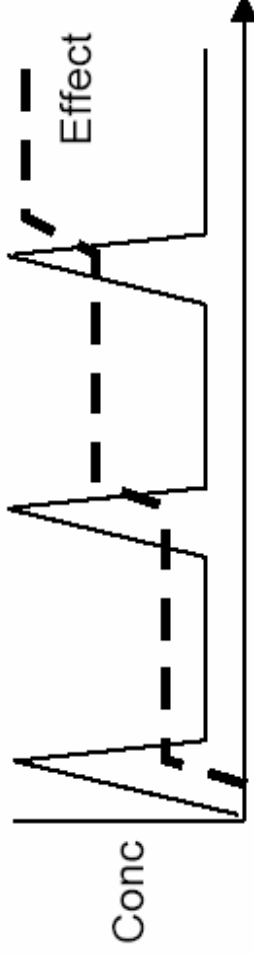
Continuous:
-exposure is function of duration



Static renewal, with recovery:
-exposure is function of max conc'n



Static renewal, no recovery:
-exposure is function of cumulative concentration



Test akutní toxicity na rybách – základní test**Druh ryby:****Vzorek:****Ředící voda:**

Datum a hodina zahájení testu:

Test nasadil:

Test odečetl:

Za správnost odpovídá:

Počet testovacích organizmů v jedné koncentraci:

Objem lázně:

Datum a hodina výměny lázně:

Doba trvání testu:

| Číslo nádrže | Testovaná dávka do ml | | Testovaný vzorek | | Mortální ryb (ks) | | | | Velikost ryb | |
|--------------|-----------------------|-------------|------------------|------------------------------|-------------------|--|--|--|--------------|-------|
| | koncentrace | dávka do ml | objem | zásobní roztok č. zás. rozt. | | | | | hmotnost | délka |
| 1 | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | | | |
| 10 | | | | | | | | | | |
| K | | | | | | | | | | |

Zásobní roztok č. 1:

Zásobní roztok č. 2:

Prolongované testy toxicity na rybách

OECD č. 204: **Prolongovaný test toxicity na rybách** – výsledkem je koncentrace, která vyvolá 50% úhyn ryb za dobu působení 14 dnů (14d LC50) a koncentrace, která nezpůsobuje poškození ryb (NOEC)

Expozice **14 dnů** (OECD-14 dnů, ISO 21 dnů)

Podle jiných norem - doba trvání testu 2 – 4 týdny
během testu krmeno
semistatická nebo průtočná expozice

Sledujeme: zrychlené dýchání, překrvení žaber, křečovitě pohyby, ztráta stability, neklid a zrychlené pohyby, úhyn (ihned odstranit z nádoby), pH, teplota, O₂

Na konci testu: stanovení 14 d LC₅₀, NOEC, LOEC

Test chronické toxicity na rybách

Druhy: *Poecilia reticulata* (paví očko), *Brachydanio rerio* (zebrička pruhovaná), *Cyprinus carpio* (kapr obecný) a *Oncorhynchus mykiss* (pstruh duhový)

Testování se provádí podle směrnice OECD.

Testy chronické toxicity (doba trvání testu 3 měsíce).

- nejčastěji pstruh duhový nebo kapr obecný
- dlouhodobé účinky testovaných látek a přípravků

Sledované parametry: chování ryb, příjem potravy,

délkové a hmotnostní přírůstky,

hematologické a biochemické ukazatele,

kumulace testované látky v rybách apod..

Náročné provedení

Vyšší vypovídací schopnost je ve srovnání s testy akutní toxicity

Pro látky, u kterých se předpokládá cílená aplikace do vodního prostředí, nebo existuje potenciální nebezpečí, že jimi bude vodní prostředí kontaminováno.

Embryonální a embryolarvální testy toxicity na rybách

Cíl: Posoudit vliv testované látky na raná vývojová stadia ryb,

Princip: Expozice oplodněných jiker v průtočném nebo semistatickém systému

ISO 12890:1999 Determination of toxicity by embryo-larval stage of freshwater fish.

OECD č. 210: Embryolarvální test toxicity na rybách – výsledkem je stanovení nejnižší účinné koncentrace (LOEC) a koncentrace, která nezpůsobuje poškození ryb (NOEC).

OECD č. 212: Embryonální test toxicity na rybách – výsledkem je stanovení nejnižší účinné koncentrace (LOEC) a koncentrace, která nezpůsobuje poškození ryb (NOEC).

Embryonální test na jikrách a plůdku

- 6-7 dní expozice, čistě embryonální stadium
- 11 druhů, nejčastěji danio, pstruh, kapr, halančík
- ukončení testu těsně před tím než dojde k úplné absorpci žloutkového váčku v kontrole

Embryolarvální test

- test na raných vývojových stadiích ryb – 31 dní expozice
- nejčastěji kapr obecný a pak dalších 16 druhů
- krmení *Artemia salina*
- 100 ks na nádobu

Sledované parametry: líhnutí a přežívání embryí, vzhled váčkovitého plůdku, rozdíly v chování, pohyblivost, na konci testu velikost - délka a hmotnost, anomálie ve vývinu
T, pH, O₂, koncentrace látky v testu

Výsledky: LOEC, NOEC, vliv látky na líhivost a dobu líhnutí, délkohmotnostní růst, výskyt morfologických odchylek

Validita testu – jako u akutního
+ líhnutí v kontrole přes 80 %, přežití v kontrole přes 75 %

Test ovlivnění růstu na nedospělých rybách

OECD č. 215 Fish juvenile growth test (2000)

Cíl: posouzení účinků dlouhodobé expozice chemickými látkami na růst nedospělých ryb

Druhy: doporučován nedospělý pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), možno i *Brachydanio rerio* (danio pruhovaný), *Oryzias latipes* (halančík japonský)

Průtočné nebo semistatické uspořádání
28 dní expozice

Vystavení ryb subletálním koncentracím

Sledované parametry: přírůstek ryb v jednotlivých nádržích
T, pH, O₂, koncentrace látky v testu

Výsledek: LOEC, NOEC,

ECX = koncentrace, která vyvolá X% změnu růstu

Metoda pro stanovení bioakumulace – průtoková zkouška na rybách

- OECD č. 305: Bioaccumulation flow-through fish test (OECD 1996b)

Dvě fáze:

- Fáze příjmu - 28 dní (až 60 dnů k dosažení rovnovážného stavu)
- Fáze vylučování
- Počet ryb - pro každý odběr 4 ryby (min. 5 odběrů během příjmu, 4 odběry během vylučování)
- Bioakumulační faktor BCF = rychlost příjmu/rychlost vylučování = koncentrace testované látky v rybách/koncentrace látky v okolním mediu

$$BCF = k_u/k_d = C_f/C_w$$

- - vztažen k celkové hmotnosti a k obsahu tuku
- Validita: mortalita menší než 10%

Testy toxicity na rybách

VALIDITA

Výsledky se považují za platné-správné, jsou-li splněna následující kritéria:

- Koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesla pod 60% nasycení
- Koncentrace testované látky neklesla pod 80%
- Mortalita kontrolního vzorku nepřesáhla 10%
- Teplota byla po celou dobu testu v rozmezí stanoveném pro daný druh ryb
- Zjištěná koncentrace LC 50 je v souladu se standardy

Testy toxicity na rybách

Protokol

- Údaje o látce - vlastnosti
- Údaje o organismech – druh, kmen, velikost, stáří dodavatel, ošetření
- Testovací postup – aerace, pH, T, objem, rybí obsádka, koncentrace, počet ryb na koncentraci, počet opakování
- Vyhodnocení – výsledky, LC50 a konfidenční intervaly, grafy, LOEC a NOEC, zhodnocení všech sledovaných parametrů