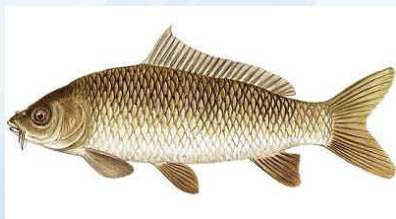




Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Testy ekotoxicity s rybami



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

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. č.350/2011 Sb.: úplné znění zákona 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 rerio* (danio pruhovaný, zebříčka pruhovaná)



Poecilia reticulata (živorodka duhová, paví očko)



Pimephales promelas (střevle potoční)



Cyprinus carpio (kapr obecný)



Oncorhynchus mykiss (pstruh duhový)



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*)



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

- Čeleď: Cyprinidae - kaprovití

Původ: Asie

Velikost: do 4 cm

Teplota: 20 - 26 °C

pH: 6,5 - 7,5

Tvrdost vody: 5 - 12 °dKH

Potrava: všežravec (vločkové krmivo, nitěnky, dafnie)

Rozmnožování: Samečci jsou vybarvenější a oproti samičkám drobnější.

Rozmnožují se ve větší, hodně zarostlé nádrži s nízkou hladinou vody, při teplotě okolo 25 °C. Na vytírací nádrž by mělo dopadat denní světlo.

Nejdříve do nádrže umístíme samičku a až po několika dnech přidáme samce. Pokud jsme byli úspěšní, samička naklade na rostliny až 500 jiker. Potěr se líhne po dvou dnech a soběstačný je po dalším dni.

halančík japonský (Oryzias latipes):



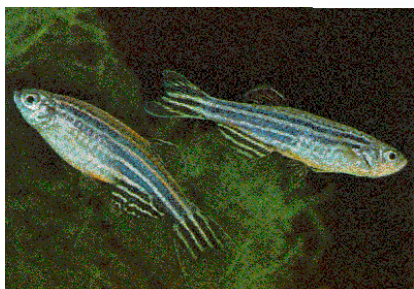
- Zcela průhledná vajíčka
- Dostupné křížené /transgenní /mutantní druhy
- Známý genom
- X-Y určení pohlaví
- Sensitivní odpověď na xenobiotika



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





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> , Danio 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> , Živorodka 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 - přírodní voda získána z nekontaminovaného zdroje stálé kvality
 - pitná voda, upravená voda (čistota p.a.; kvalitní destilovaná, deionizovaná s vodivostí menší než 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$)
 - pH od 6,0 do 8,5; tvrdost 10 - 250 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (vztaženo na CaCO_3)
- 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

Při 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



Testy akutní toxicity na rybách

Podmínky testu:

Teplota dle druhu ryb (danio 23 ± 2 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



Zkušební postup

- Krom série zkoušek se provede kontrolní zkouška bez zkušební látky a podle potřeby kontrolní zkouška s pomocnou látkou

Základní test - Ryby se exponují zkušební látce za podmínek:

- Délka expozice 96h
- Počet ryb: nejméně 7 na každou koncentraci
- Nádrže: vhodný objem vzhledem k doporučené obsádce
- 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



Akutní test

- 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.

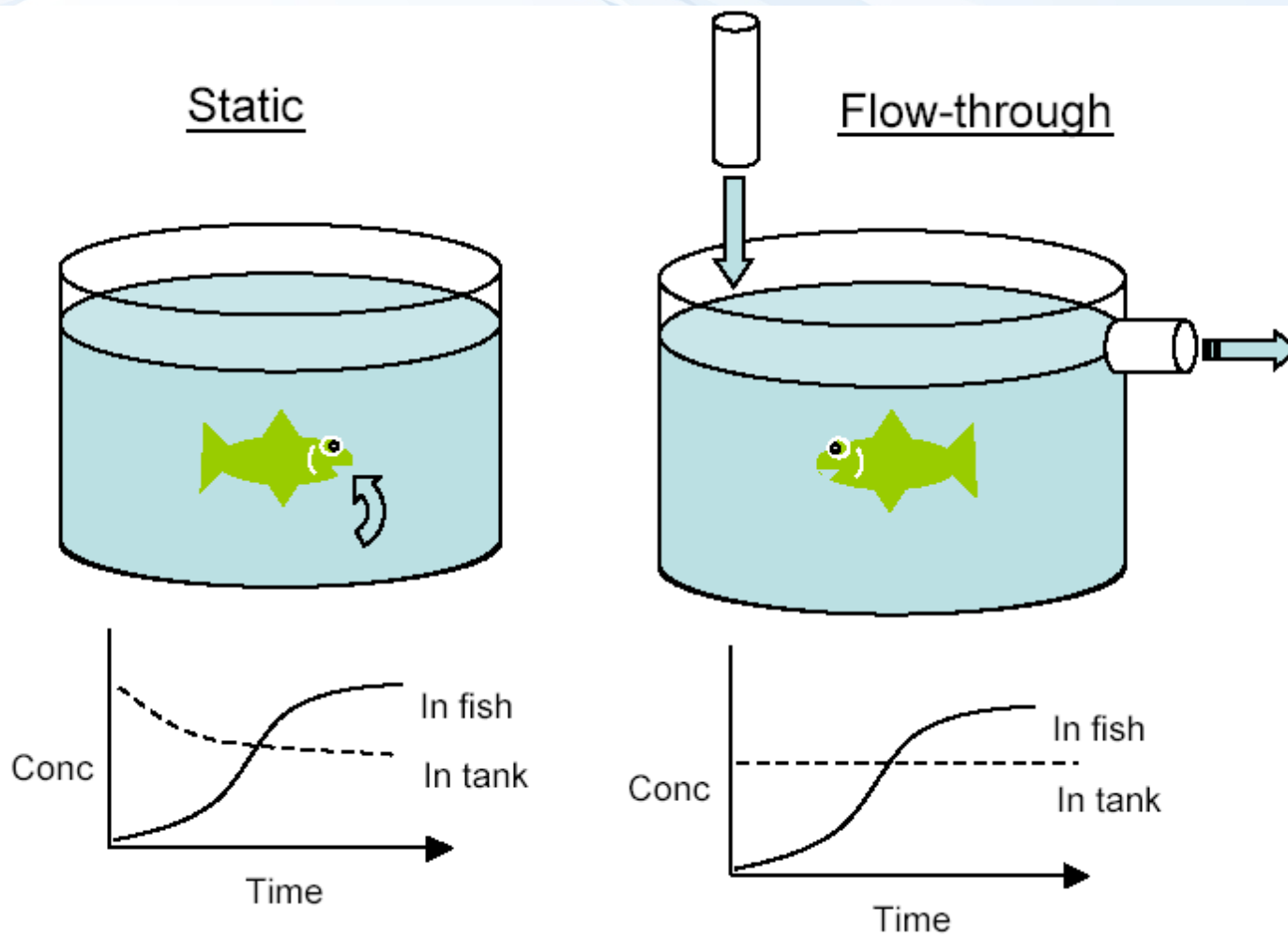
Parametry sledované v průběhu testu

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

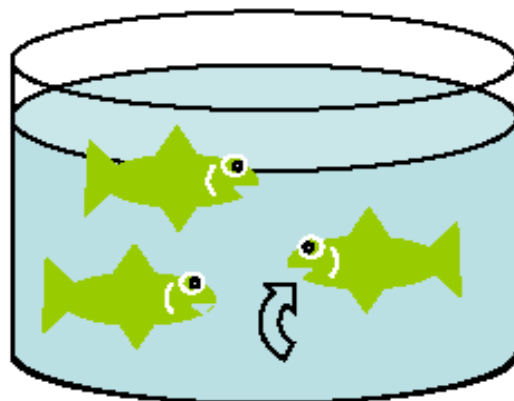
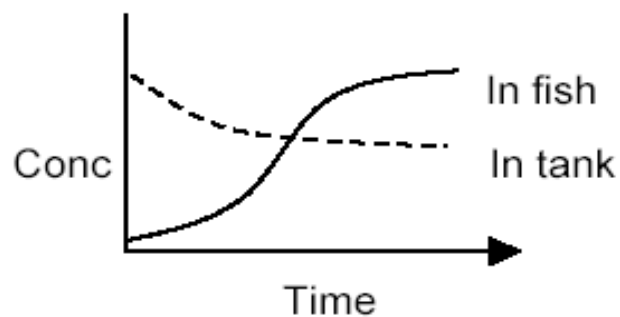
Po ukončení testu jsou pokusné organismy usmrceny oxidem uhličitým dle zákona ČNR č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání.



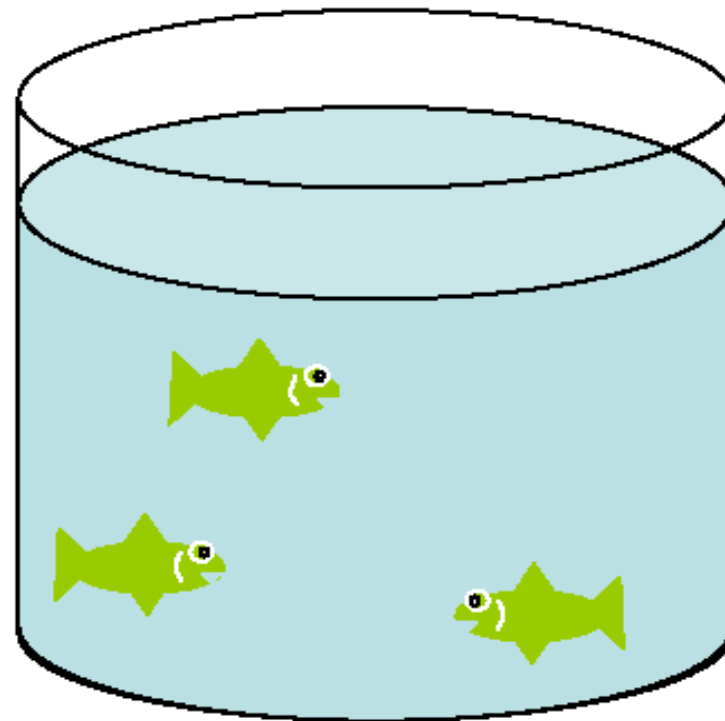
Experimentální design pro testy toxicity



Překonání problémů statického designu: 1. Zvýšení objemu



Uptake by organisms depletes chemical in solution



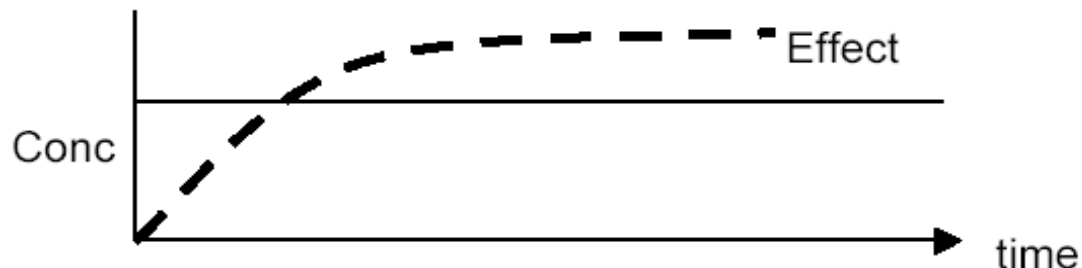
Chemical depleted slowly



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

Continuous:

-exposure is function of duration



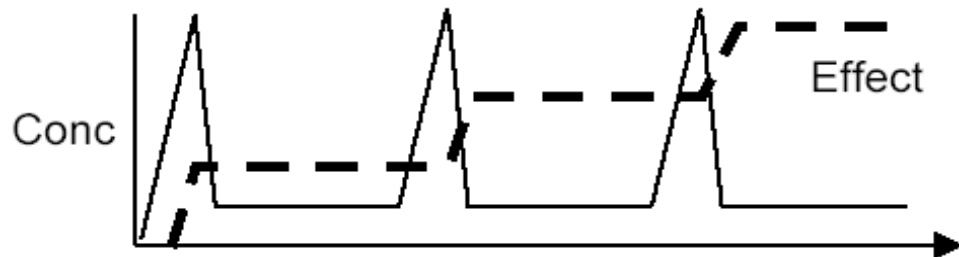
Static renewal, with recovery:

-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:

Za správnost odpovídá:

Podmínky v průběhu testu

Číslo Nádře	Konc.	Teplota (°C)					Kyslík (% nasycení)					pH							
		Datum a hodina měření																	
		0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h
1																			
2																			
3																			
4																			
5																			
6																			
7																			
8																			
9																			
10																			
K																			

↑
přelovení

↑

↑



Test akutní toxicity na rybách – základní test

Vzorek:

Ředící voda:

Datum a hodina zahájení testu:

Počet testovacích organizmů v jedné koncentraci:

Objem lázně:

Doba trvání testu:

Druh ryby:

Test nasadí:

Test odečte:

Za správnost odpovídá:

Datum a hodina výměny lázně:

Číslo nádrže	Testovaný vzorek				Mortalita ryb (ks) - datum a hodina							Velikost ryb		
	koncentrace	dávka do ml	zásobní roztok										hmotnost	délka
			objem	č. zás. rozt.										
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 směrnic (OECD TG 210; US EPA OPPTS 850.1500)

Testy chronické toxicity (doba trvání testu 7 -200 dní dle druhu ryb).

- nejčastěji pstruh duhový nebo kapr obecný (doba trvání testu 3 měsíce).
- dlouhodobé účinky testovaných látek a přípravků
- zahájení s vajíčky, embryi či juvenilily

Sledované parametry: chování ryb, příjem potravy, přežívání, délkové a hmotnostní přírůstky, hematologické a biochemické ukazatele, kumulace testované látky v rybách apod..

Náročné provedení

Vyšší vypovídací schopnost 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).

VI. METODA PRO STANOVENÍ TOXICITY NA RYBÍCH EMBRYÍCH A POTĚRU - KRÁTKODOBÁ ZKOUŠKA – metoda C.15 podle přílohy směrnice 2001/59/ES (příloha Vyhl. 222/2004)



Embryonální test na jikrách a plůdku

– 6-7 dní expozice, čistě embryonální stadium, nejsou krmeny

- 11 druhů, nejčastěji danio, pstruh, kapr, halančík

Expozice životní stádia ryb od čerstvě oplodněných jiker do stádia váčkových plůdků ve zkušebních nádržích

Embrya a váčkové plůdky jsou exponovány různým koncentracím testované látky (obvykle 5)

Ukončení testu těsně před tím než dojde k úplné absorpci žloutkového váčku v kontrole

Embryolarvální test

– test na raných vývojových stádiích 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



Pracovní postup I.

- 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 II.

- 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_3
- 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)



Embryonální test toxicity na rybách – VI. METODA PRO STANOVENÍ TOXICITY NA RYBÍCH EMBRYÍCH A POTĚRU - KRÁTKODOBÁ ZKOUŠKA

ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY, DÉLKA ZKOUŠKY A KRITÉRIA PŘEŽITÍ 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 vylíhnutí
SLADKOVODNÍ								
<i>Brachydanio rerio</i> Danio pruhované	25 ± 1	—	12-16	3-5	8-10	Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 5 dnů po vylíhnutí (8 - 10 dnů)	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Pstruh duhový	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0(3)	30-35	25-30	Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 20 dnů po vylíhnutí (50 - 55 dnů)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> Kapr obecný	21-25	—	12-16	5	> 4	Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (8 - 9 dnů)	80	75
<i>Oryzias latipes</i> Halančík japonský	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12-16	8-11	4-8	Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 5 dnů po vylíhnutí (13 - 16 dnů)	80	80
<i>Pimephales promelas</i> Střevle	25 ± 2	—	16	4-5	5	Pokud možno ihned od oplodnění (od časného stádia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (8 - 9 dnů)	60	70

Výsledky

- 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_x
- **Výsledky:** LOEC, NOEC, vliv látky na líhnivost 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)

XIV. METODA PRO STANOVENÍ RŮSTU NA NEDOSPĚLÝCH RYBÁCH – METODA C.14 PODLE PŘÍLOHY SMĚRNICE KOMISE 2001/59/ES

(příloha Vyhl. 222/2004)

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 nedospělých ryb v exponenciální fázi růstu po zvážení řadě subletálních koncentrací za průtokových podmínek nebo vhodných semistatických podmínek
- denní přísun potravy v množství daném počáteční hmotností ryb
- na konci testu se ryby opět zvaží

Sledované parametry: přírůstek ryb v jednotlivých nádržích

T, pH, O₂, koncentrace látky v testu

Výsledek: LOEC, NOEC,

EC_x = 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

Má-li být zkouška platná a výsledky považovány za platné-správné, musí být splněna následující kritéria:

- Koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesla pod 60% nasycení po celou dobu zkoušky
- Koncentrace testované látky neklesla pod 80%
- Mortalita kontrolního vzorku nepřesáhla 10%
- Teplota byla po celou dobu testu v rozmezí stanoveném pro daný druh ryb, nesmí se mezi zkušebními nádržemi nebo den ode dne lišit o víc než 1,5 C
- Zjištěná koncentrace LC 50 je v souladu se standardy
- celková míra přežití oplodněných jiker v kontrolních skupinách musí být vyšší nebo rovna stanoveným limitům pro testovaný druh
- test růstu: dostatečný nárůst střední hodnoty hmotnosti ryb v kontrolní skupině (u pstruha duhového alespoň o 50%)



Testy toxicity na rybách

Protokol má obsahovat:

- 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
- Koncentrace rozpuštěného kyslíku, hodnoty pH, teplota zkušebních roztoků každých 24 h
- 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
- Vyhodnocení – výsledky, zhodnocení všech sledovaných parametrů
- Grafy křivky závislosti účinku, vyjádřeného v procentech, na koncentraci na konci zkoušky
- Podle možnosti hodnoty LC_{50} a konfidenční intervaly při každé z doporučených dob pozorování
- NOEC - Nejvyšší zkušební koncentrace, která nevyvolala za dobu zkoušky úhyn ryb
- LOEC - Nejnižší zkušební koncentrace, která vyvolala za dobu zkoušky 100% mortalitu





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována
Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem
České republiky



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí