



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Testy ekotoxicity s rybami

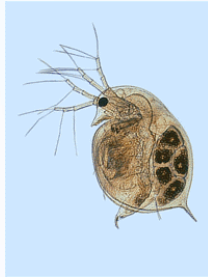
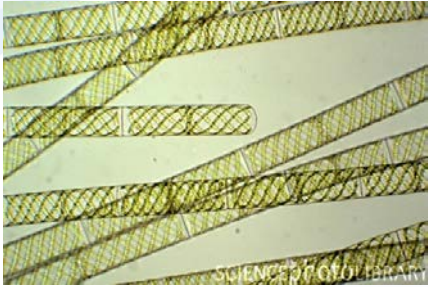


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Ryby

- Důležitá součást vodních ekosystémů



- Koloběh živin, predátoři, „top down“ efekt
- Ekonomická, sportovní, kulturní důležitost
- 48% obratlovců



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



Používané druhy

Brachydanio rerio, *Danio rerio* (danio pruhovaný, zebříčka pruhovaná)



Pimephales promelas (střevle potoční)



Poecilia reticulata (živorodka duhová, paví očko)



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.

halančik japonský (Oryzias latipes):



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



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

- Zákon č.350/2011 Sb.: Zákon o chemických látkách a chemických směsích a o změně některých zákonů (chemický zákon)
- NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek
 - ČÁST C: METODY STANOVENÍ EKOTOXICITY
- C.1. akutní toxicita pro ryby
- C.13 bioakumulace – průtoková zkouška na rybách
- C.14. růstová zkouška na nedospělých rybách
- C.15 toxicity na rybích embryích a vajíčkovém plůdku – 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

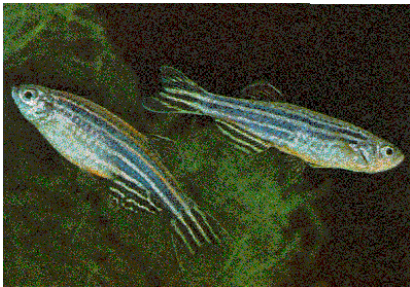
OECD 203: Test akutní toxicity na rybách – výsledkem je koncentrace, která vyvolá 50% úhyn ryb (96h LC50)



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

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, které pokrývají faktor mortality 0 – 100 %

Uspořádání: koncentrace rozpuštěného kyslíku ne nižší než 60% hodnoty nasycení vzdušným kyslíkem

Nádrže: vhodný objem vzhledem k doporučené obsádce

statické, semistatické – obsádka max. 1 g na L

průtokový systém – možno vyšší obsádka

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



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.

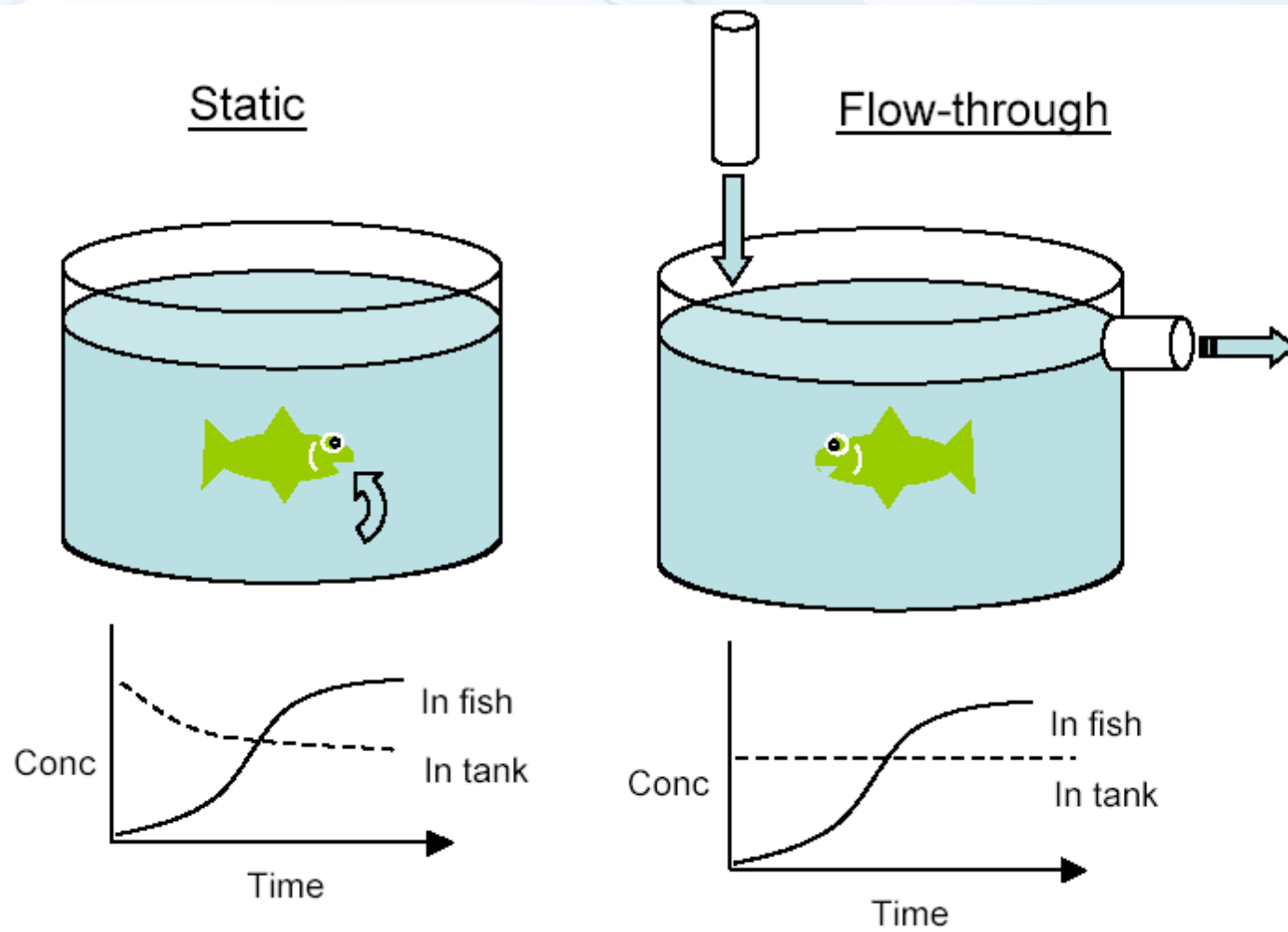
Parametry sledované v průběhu testu

- 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

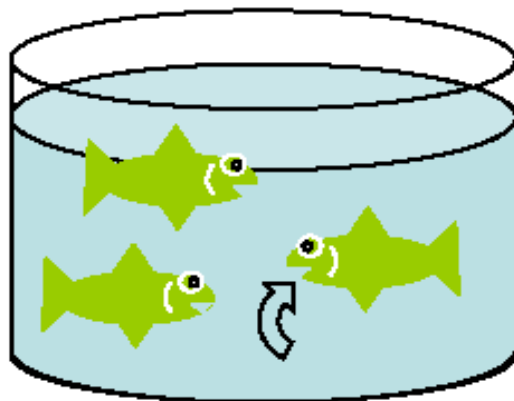
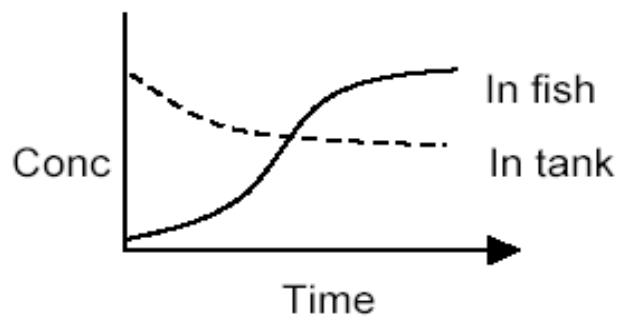
Po ukončení testu jsou pokusné organismy usmrceny oxidem uhličitým dle zákona ČNR č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání.



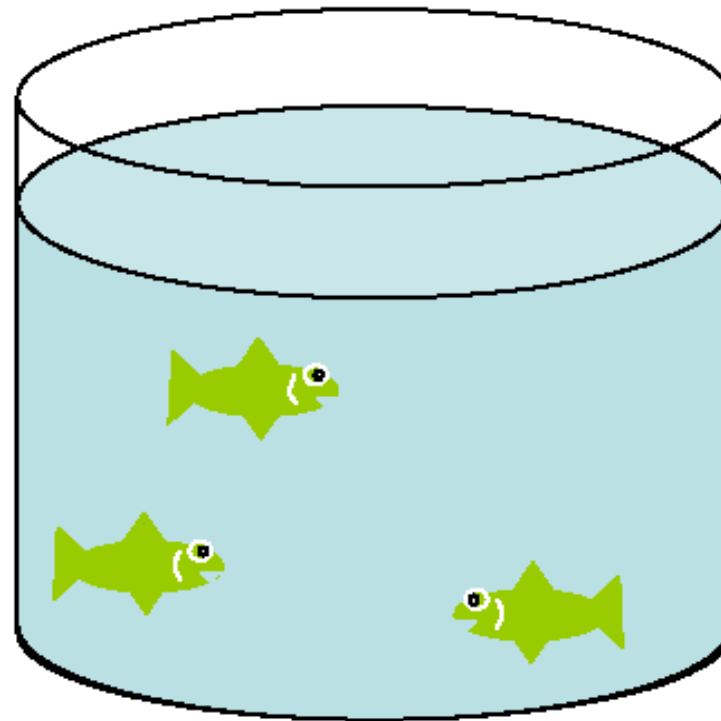
Experimentální design pro testy toxicity



Překonání problémů statického designu: 1. Zvýšení objemu



Uptake by organisms depletes chemical in solution



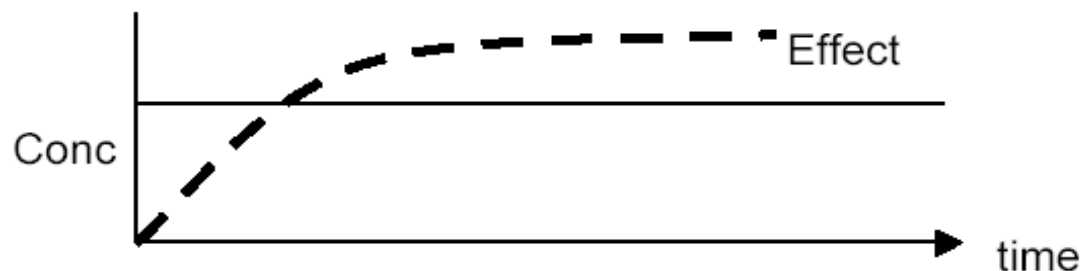
Chemical depleted slowly



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

Continuous:

-exposure is function of duration



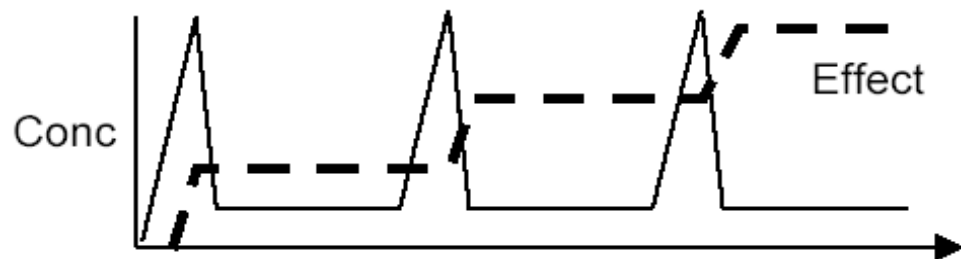
Static renewal, with recovery:

-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 nasadil:

Test odečetl:

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* (zebríčka pruhovaná), *Cyprinus carpio* (kapr obecný) a *Oncorhynchus mykiss* (pstruh duhový)

Testování se provádí podle směrnic (OECD; 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 juvenilny

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: Fish, Early-life Stage Toxicity Test

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

OECD č. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages

Embryonální test na jikrách a plůdku – výsledkem je stanovení nejnižší účinné koncentrace (LOEC) a koncentrace, která nezpůsobuje poškození ryb (NOEC).

ZKOUŠKA KRÁTKODOBÉ TOXICITY NA RYBÍM EMBRYU A VÁČKOVÉM PLŮDKU – metoda C.15 podle NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008



OECD 212 : **Embryonální test na jikrách a plůdku**

– danio 5-10 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

OECD č. 210: **Embryolarvální test**

– test na raných vývojových stádiích ryb – danio 30 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.

- Fotoperioda a teplota vody by měly vyhovovat zkušebnímu druhu
- 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 a hmotnost



OECD 212 : Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages

Embryonální test na jikrách a plůdku

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

Embryolarvální test toxicity na rybách

OECD/OCDE

210

ANNEX 2TEST CONDITIONS, DURATION AND SURVIVAL CRITERIA FOR RECOMMENDED SPECIES

SPECIES	TEST CONDITIONS			RECOMMENDED DURATION OF TEST	Typical minimum mean total length of control fish at the end of the study (mm) ⁽¹⁾	SURVIVAL OF CONTROLS (minimum)	
	Temperature (°C)	Salinity (‰)	Photoperiod (hrs)			Hatching success	Post-hatch success
Freshwater:							
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Rainbow trout	10 ± 1.5 ⁽²⁾		12 - 16 ⁽³⁾	2 weeks after controls are free-feeding (or 60 days post-hatch)	40	75%	75%
<i>Pimephales promelas</i> Fathead minnow	25 ± 1.5		16	32 days from start of test (or 28 days post-hatch)	18	70%	75%
<i>Danio rerio</i> Zebrafish	26 ± 1.5		12 - 16 ⁽⁴⁾	30 days post-hatch	11	70%	75%
<i>Oryzias latipes</i> Japanese Ricefish or Medaka	25 ± 2		12 - 16 ⁽⁴⁾	30 days post-hatch	17	80%	80%
Estuarine and Marine:							
<i>Cyprinodon variegatus</i> Sheepshead minnow	25 ± 1.5	15-35 ⁽⁵⁾	12 - 16 ⁽⁴⁾	32 days from start of test (or 28 days post-hatch)	17	75%	80%
<i>Menidia sp.</i> Silverside	22 - 25	15-35 ⁽⁵⁾	13	28 days	20	80%	60%

Key:

- (1) Typical minimum mean total length is not a validity criterion but deviations below the figure indicated should be carefully examined in relation to the sensitivity of the test. The minimum mean total length is derived from a selection of data available at the current time.
- (2) The particular strain of rainbow trout tested may necessitate the use of other temperatures. Brood stock must be held at the same temperature as that to be used for the eggs. After receipt of eggs from a commercial breeder, a short adaptation (e.g. 1-2 h) to test temperature after arrival is necessary.
- (3) Darkness for larvae until one week after hatching except when they are being inspected, then subdued lighting throughout test (12-16 hour photoperiod)⁽⁴⁾.
- (4) For any given test conditions, light regime should be constant.
- (5) For any given test this shall be performed to $\pm 2^{\circ}/_{00}$.

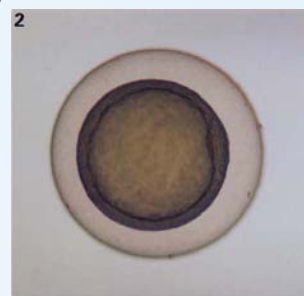
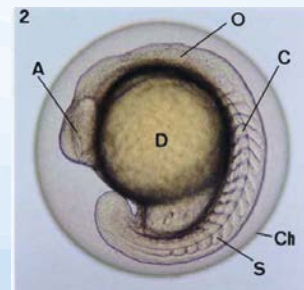
Výsledky

- 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 %



Rybí embryonální test toxicity

- Fish Embryo Toxicity (FET) Test
- alternativa k testům na zvířatech
- raná vývojová stadia nejsou považována dle platné legislativy za zvířata.
- předpokládá se, že embrya necítí bolest a celkový stres je nižší než u dospělých jedinců.
- Porovnatelné výsledky s testy na dospělých
- Variabilní a multifunkční test
- ISO 150 88, OECD 236



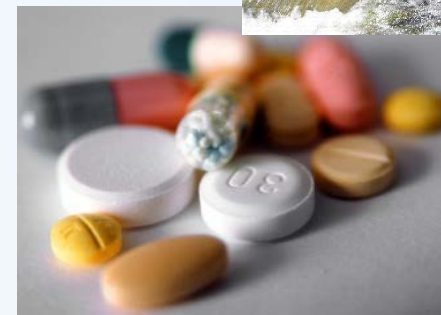
Rybí embryonální test toxicity

- 48 – 96 h, 26 °C, 14h světlo
- Dania se vytírají ihned po rozsvícení
- Jikry se odebírají 15 min po rozsvícení a následně exponují
- Efekty: letalita (LC50, NOEC, EC50), subletální efekty (teratogenita, deformace, vývoj očí, tepová frekvence)



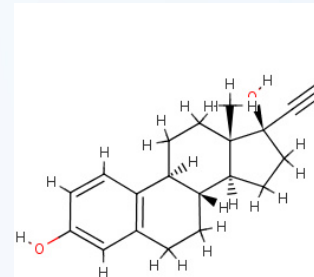
Test celkové toxicity odtoku Whole Effluent Toxicity (WET) Test

- Směsi mají odlišné toxikologické vlastnosti nežli jednotlivé látky, často nevíme, co ve směsi je
- Monitorování jednotlivých polutantů nemůže zajistit bezpečné podmínky pro organismy žijící pod výtokem odpadních vod (US EPA)
- 92 % celosvětově testovaných ryb



WET podle ISO 15088

- ČSN EN ISO 15088 (757762): Jakost vod - Stanovení akutní toxicity odpadních vod pro jikry dania pruhovaného (*Danio rerio*)
- akutní toxické účinky odpadní vody pro jikry během 48 h - embrya jsou exponována různě rozředěnou odpadní vodou
- norma použitelná i pro čištěné městské odpadní vody a průmyslové odpadní vody.
- připravena jako náhrada zkoušky akutní toxicity pro ryby - alternativa pro test na dospělcích
- pro odpadní vody poskytuje stejné nebo podobné výsledky jako zkouška akutní toxicity pro ryby
- aplikován a uzákoněn v Německu



Testy endokrinní disrupce na rybách

OECD No. 230: 21-day Fish Assay (21denní rybí test)

- A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition
- dospělci (samci i samice) exponovaní 21 dní
- danio, medaka, střevle
- na konci hodnoceny biomarkery - vitelogenin a sekundární pohlavní znaky

OECD No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay (Krátkodobý test reprodukce ryb)

- dospělci (samci i samice) střevle exponovaní 21 dní
- sledována produkce vajíček
- na konci hodnoceny biomarkery - vitelogenin a sekundární pohlavní znaky
- histopathologické hodnocení gonád samců i samic



Testy endokrinní disrupce na rybách

OECD No. 234: Fish Sexual Development Test (Test pohlavního vývoje ryb)

- Ryby exponovány od stadia oplozených vajíček až do ukončení pohlavního vývoje cca 60 dní po vykulení

na konci hodnoceno:

- biomarker - vitelogenin
- poměr pohlaví – proporce samců, samic, intersexu a ryb s nediferencovaným pohlavím
- také prostřednictvím histologie gonád



Test ovlivnění růstu na nedospělých rybách

OECD č. 215 Fish juvenile growth test (2000)

C.14. RŮSTOVÁ ZKOUŠKA NA NEDOSPĚLÝCH RYBÁCH – metoda C.14 podle NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008

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)
- C.13. BIOAKUMULACE: PRŮTOKOVÁ ZKOUŠKA NA RYBÁCH - metoda C.13 podle NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008

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 $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$
- 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