

**Univerzita Hradec Králové**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biologie**

**Vývoj testovací metody pro stanovení akutní  
toxicity xenobiotik u embryonálních stádií ryb**

**Diplomová práce**

Autor: Bc. Martina Nalezinková

Studijní program: N1501 - Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Vedoucí práce: RNDr. Martin Kuneš, Ph.D.

Externí konzultant: Mgr. Monika Roupcová

Hradec Králové

květen 2018

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne

Jméno a příjmení

## **Poděkování**

Velmi ráda bych poděkovala mým vedoucím diplomové práce, tedy paní Mgr. Monice Roupcové a panu RNDr. Martinovi Kunešovi, Ph.D. za skvělé vedení, ochotu, rady a strávený čas nad mou prací. Dík si zaslouží také Výzkumný ústav organických syntéz a.s. v Rybitví spolu s vedoucí úseku Toxila paní Ing. Petrou Plodíkovou za možnost spolupráce. Poděkování patří též mojí rodině a příteli za podporu.

## Anotace

NALEZINKOVÁ, M. (2018): *Vývoj testovací metody pro stanovení akutní toxicity xenobiotik u embryonálních stádií ryb*. Hradec Králové. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce RNDr. Martin Kuneš, Ph.D. a Mgr. Monika Roupcová, 83 s.

Tato práce se zabývá testováním toxicity xenobiotik na embryích dania pruhovaného podle směrnice OECD 236 (FET test). V teoretické části je popsána legislativa a základní testy, dále pak chov dania pruhovaného a jeho ontogenetický vývoj. Cílem výzkumu bylo sestavit nejvhodnější metodiku k získání dostatečného množství životaschopných jiker, kde hraje zásadní roli věk ryb, pestrá strava a poměr pohlaví. Ke tření bylo využito vytíracích nádrží s mřížkou na dně a třecích mističek se sítkou a rostlinami. Testování probíhalo v 24jamkových destičkách. Každých 24 hodin byla zaznamenávána kritéria kurčení mortality: koagulace, činnost srdce, oddělení ocásku a tvorba somitů. Stanovenou metodou byly otestovány známé i neznámé látky a spočteny hodnoty LC<sub>10</sub>, LC<sub>20</sub>, LC<sub>50</sub>, LOEC a NOEC po 96hodinové expozici. Pro látku 3,4-dichloranilin byla stanovena hodnota LC<sub>50</sub> 3,581 mg/l, pro dichroman draselný LC<sub>50</sub> 185,721 mg/l a pro látku Acid Yellow 25 LC<sub>50</sub> 17,687 mg/l. Hodnota LC<sub>50</sub> pro Reactive Yellow 85 nemohla být stanovena vzhledem k nízké toxicitě látky. Pro poslední dvě látky byl také proveden test akutní toxicity na rybách k porovnání. Dle výsledků výzkumu má FET test velký potenciál k využití místo testů akutní toxicity na rybách. Je však nutné předem posoudit vhodnost využití FET testu pro konkrétní látku vzhledem k jejím vlastnostem.

### **Klíčová slova:**

akutní toxicita, ryby, embrya, OECD 236, danio pruhované



## **Annotation**

NALEZINKOVÁ, M. (2018): *Development of testing method for evaluation of acute toxicity of xenobiotics in fish embryo*. Hradec Králové. Diploma Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisors RNDr. Martin Kuneš, PhD. and Mgr. Monika Roupcová, 83 p.

This diploma thesis deals with toxicity testing of xenobiotics on zebrafish embryos according to OECD Guideline No. 236 (FET test). The legislation and basic tests, the breeding of the zebrafish and its ontogenetic development are described in the theoretical part. The aim of the research was to develop the most appropriate methodology to obtain a sufficient quantity of viable eggs, where the age of fish, the varied diet and the sex ratio play a crucial role. Spawning trap with a grid at the bottom and dishes with sieves and plants were used for fish spawning. Testing was carried out in 24-well plates. Criteria for determination of mortality were recorded every 24 hours: coagulation, heart activity, tail separation and sommite formation. Known and unknown substances were tested by the specified method and then LC<sub>10</sub>, LC<sub>20</sub>, LC<sub>50</sub>, LOEC and NOEC were calculated after 96 hours of exposure. The LC<sub>50</sub> 3,581 mg/l was calculated for 3,4-dichloroaniline, the LC<sub>50</sub> 185,721 mg/l for potassium dichromate and the LC<sub>50</sub> 17,687 mg/l for Acid Yellow 25. The LC<sub>50</sub> value for Reactive Yellow 85 could not have been calculated due to low toxicity. An acute fish toxicity test was also performed for the last two substances for comparison. According to research results, the FET test has the great potential for use instead of acute toxicity tests on fish. However, beforehand it is necessary to assess the suitability of using the FET test for a specific substance while considering its properties.

### **Key words:**

Acute toxicity, fishes, embryos, OECD No. 236, zebrafish

# Obsah

Úvod .....	12
1 Testování toxicity .....	13
1.1 Testování toxicity látek na vodních organismech.....	13
1.2 Povinnost testování vyplývající z legislativy.....	13
1.2.1 OECD .....	13
1.2.2 REACH a ECHA .....	13
1.2.3 Legislativa České republiky.....	14
1.3 Ekotoxicita .....	14
1.4 Testování ekotoxicity na rybách .....	15
1.4.1 Akutní testy toxicity na rybách .....	15
1.4.2 Chronické testy toxicity na rybách .....	16
1.4.3 <i>In vitro</i> testování .....	17
2 Charakteristika testovaného organismu - <i>Danio rerio</i> .....	17
2.1 Zařazení do systému a rozšíření.....	17
2.2 Morfologie .....	18
2.3 Etologie.....	18
2.4 Podmínky chovu .....	19
2.5 Potrava .....	19
2.5.1 Umělá krmiva .....	19
2.5.2 Přírodní krmiva.....	19
2.6 Pohlavní dimorfismus .....	20
2.7 Rozmnožování .....	20
2.7.1 Pohlavní soustava .....	20
2.7.2 Samičí pohlavní soustava .....	20
2.7.3 Stavba a vznik jiker .....	21
2.7.4 Samčí pohlavní soustava .....	22
2.7.5 Stavba a vznik spermií.....	22
2.7.6 Tření.....	23
2.7.7 Oplození .....	24
2.7.8 <i>In vitro</i> fertilizace .....	25
2.8 Ontogenetický vývoj.....	26

2.8.1	Embryonální vývoj.....	26
2.8.2	Larvální vývoj.....	28
2.8.3	Juvenilní perioda.....	28
2.8.4	Adultní perioda .....	29
3	OECD 236 - „Fish Embryo Acute Toxicity Test“ .....	29
3.1	Obsah směrnice .....	29
3.2	Možnost náhrady za testy na rybách .....	29
3.3	Princip testu.....	30
3.4	Před započítáním testu.....	30
4	Použité chemikálie .....	31
4.1	3,4-dichloranilin .....	31
4.1.1	Fyzikální a chemické vlastnosti .....	31
4.1.2	Nebezpečné vlastnosti látky a bezpečnost práce .....	31
4.1.3	Toxicita látky.....	31
4.1.4	Zdroje látky a její využití .....	32
4.2	Dichroman draselný.....	32
4.2.1	Fyzikální a chemické vlastnosti .....	32
4.2.2	Nebezpečné vlastnosti látky a bezpečnost práce .....	32
4.2.3	Toxicita látky.....	32
4.2.4	Zdroje látky a její využití .....	33
4.3	Acid Yellow 25 .....	33
4.3.1	Fyzikální a chemické vlastnosti .....	33
4.3.2	Nebezpečné vlastnosti látky a bezpečnost práce .....	33
4.3.3	Toxicita látky.....	33
4.3.4	Zdroje látky a její využití .....	34
4.4	Reactive Yellow 85 .....	34
4.4.1	Fyzikální a chemické vlastnosti látky.....	34
4.4.2	Nebezpečné vlastnosti látky a bezpečnost práce .....	34
4.4.3	Toxicita látky.....	34
4.4.4	Zdroje látky a její využití .....	34
5	Metodika.....	35
5.1	Materiál a pomůcky .....	35
5.2	Chov testovaného organismu pro FET test .....	35
5.3	Produkce jiker.....	36

5.4	Nasazení destiček .....	38
5.4.1	Příprava 3,4-dichloranilinu pro FET test .....	39
5.4.2	Příprava dichromanu draselného pro FET test .....	39
5.4.3	Příprava Acid Yellow 25 pro FET test .....	39
5.4.4	Příprava Reactive Yellow 85 pro FET test .....	39
5.5	Hodnocení kritérií .....	39
5.5.1	Koagulace bílkovin .....	39
5.5.2	Oddělení ocasu od žloutkového vaku .....	40
5.5.3	Činnost srdce .....	40
5.5.4	Tvorba somitů .....	40
5.5.5	Vykulení .....	40
5.6	Měření fyzikálně-chemických parametrů .....	40
5.6.1	pH .....	40
5.6.2	Tvrdost .....	41
5.6.3	Konduktivita .....	41
5.6.4	Nasycení kyslíkem .....	41
5.6.5	Splnění podmínek .....	41
5.7	Validace FET testu .....	41
5.8	Vyhodnocení FET testu .....	42
5.9	Test akutní toxicity na rybách .....	42
5.9.1	Materiál a pomůcky .....	42
5.9.2	Testovaný organismus a jeho chov .....	42
5.9.3	Příprava Acid Yellow 25 pro test akutní toxicity na rybách .....	42
5.9.4	Příprava Reactive Yellow 85 pro test akutní toxicity na rybách .....	42
5.9.5	Průběh testu akutní toxicity na rybách .....	43
5.9.6	Validace testu akutní toxicity na rybách .....	43
6	Výsledky .....	44
6.1	Chov testovaného organismu .....	44
6.2	Produkce jiker .....	44
6.3	Nasazení destiček .....	46
6.4	Hodnocení kritérií .....	46
6.5	Výsledky FET testu pro 3,4-dichloranilin .....	46
6.5.1	Fyzikálně-chemické měření na začátku testu .....	46
6.5.2	Fyzikálně-chemické měření na konci testu .....	47

6.5.3	Přežití testovaných embryí .....	47
6.5.4	Vykulení .....	49
6.5.5	Výsledné hodnoty toxicity pro 3,4-dichloranilin.....	50
6.6	Výsledky FET testu pro dichroman draselný .....	50
6.6.1	Fyzikálně-chemické měření na začátku testu.....	50
6.6.2	Fyzikálně-chemické měření na konci testu.....	51
6.6.3	Přežití testovaných embryí .....	51
6.6.4	Vykulení .....	53
6.6.5	Výsledné hodnoty toxicity pro dichroman draselný.....	53
6.7	Výsledky FET testu pro Acid Yellow 25 .....	54
6.7.1	Fyzikálně-chemické měření na začátku testu.....	54
6.7.2	Fyzikálně-chemické měření na konci testu.....	54
6.7.3	Přežití testovaných embryí .....	55
6.7.4	Vykulení .....	56
6.7.5	Výsledné hodnoty toxicity pro Acid Yellow 25.....	57
6.8	Výsledky FET testu pro Reactive Yellow 85 .....	57
6.8.1	Fyzikálně-chemické měření na začátku testu.....	57
6.8.2	Fyzikálně-chemické měření na konci testu.....	58
6.8.3	Přežití testovaných embryí .....	58
6.8.4	Vykulení .....	59
6.8.5	Výsledné hodnoty toxicity pro Reactive Yellow 85.....	60
6.9	Výsledky testu akutní toxicity na rybách pro Acid Yellow 25.....	60
6.9.1	Fyzikálně-chemické měření na začátku testu.....	60
6.9.2	Fyzikálně-chemické měření v průběhu testu .....	61
6.9.3	Mortalita ryb v testu akutní toxicity.....	62
6.9.4	Výsledné hodnoty toxicity pro Acid Yellow 25.....	62
6.9.5	Validace testu akutní toxicity na rybách pro Acid Yellow 25 .....	62
6.10	Výsledky testu akutní toxicity na rybách pro Reactive Yellow 85.....	63
6.10.1	Fyzikálně-chemické měření na začátku testu.....	63
6.10.2	Fyzikálně-chemické měření v průběhu testu .....	63
6.10.3	Mortalita ryb v testu akutní toxicity.....	64
6.10.4	Výsledné hodnoty toxicity pro Reactive Yellow 85.....	65
6.10.5	Validace testu akutní toxicity na rybách pro Reactive Yellow 85 .....	65
7	Diskuze .....	66

7.1	Chov testovaného organismu .....	66
7.2	Produkce jiker.....	66
7.3	Nasazení destiček .....	68
7.4	Výsledky FET testu pro 3,4-dichloranilin.....	68
7.5	Výsledky FET testu pro dichroman draselný .....	70
7.6	Výsledky FET testu pro Acid Yellow 25 .....	71
7.7	Výsledky FET testu pro Reactive Yellow 85 .....	71
7.8	Výsledky testu akutní toxicity na rybách pro Acid Yellow 25.....	71
7.9	Výsledky testu akutní toxicity na rybách pro Reactive Yellow 85.....	72
	Závěr.....	73
	Seznam použité literatury .....	75
	Seznam příloh.....	83
	Přílohy.....	84

# Seznam použitých zkratek

**AY** = Acid Yellow

**ČSN EN** = Česká technická norma

**DCA** = dichloranilin

**DD** = dichroman draselný

**ECHA** (European Chemicals Agency) = Evropská agentura pro chemické látky

**EC<sub>x</sub>** = Koncentrace při odpovědi x %

**FET test** (Fish Embryo Acute Toxicity test) = Test akutní toxicity na embryích ryb

**LC<sub>10</sub>** = Koncentrace, při které uhynie 10 % testovaných organismů

**LC<sub>20</sub>** = Koncentrace, při které uhynie 20 % testovaných organismů

**LC<sub>50</sub>** = Koncentrace, při které uhynie 50 % testovaných organismů

**LD<sub>50</sub>** = Dávka látky, která způsobí úhyn 50 % testovaných živočichů do 24 hodin od expozice

**LID** = Nejnižší zkoušená hodnota, při které není pozorován žádný toxický účinek

**LOEC** (The Lowest Observed Effect Concentration) = Nejnižší testovaná koncentrace, při níž byly pozorovány statisticky významné účinky

**NOEC** (No Observed Effect Concentration) = Koncentrace bez pozorovaného statisticky významného účinku

**OECD** (Organisation for Economic Co-operation and Development) = Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj

**REACH** (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) = Registrace, Evaluace a Autorizace Chemických látek

**RY** = Reactive Yellow

**SVHC** (Substances of Very High Concern) = Látky vzbuzující mimořádné obavy

## Úvod

Toxikologie je v době vzniku tisíců nových chemických látek s neznámým účinkem na živé organismy nepostradatelný obor. Je definována jako obor zabývající se působením chemických škodlivin na živé organismy a ekosystémy, mechanismy působení škodlivin, diagnostikou, prevencí ale i léčbou otrav (BRHEL *et al.* 1998, GAD 2000). Zkráceně je tento pojem vysvětlován jako nauka o jedech. Jed je ovšem velmi široký pojem. Jedná se v podstatě o jakoukoli látku, která má schopnost narušit biologickou rovnováhu organismu. Jak tvrdil již Paracelsus v 16. století, rozhodující je dávka. Jedy jsou již po staletí využívány v travičství, ale v menších dávkách také jako léky (PROKEŠ *et al.* 2005). Toxikologie se nezabývá pouze akutním působením látek, ale také jejich dlouhodobým účinkem. Znalost toxikologie látek umožňuje zajistit nejen bezpečnost na pracovišti s průmyslovými chemikáliemi, ale také ochránit životní prostředí a v něm žijící organismy (MATRKA & RUSEK 1998). Působením látek na živé organismy se zabývá ekotoxikologie, která v širším pojetí zkoumá také přestup škodlivin na člověka ze složek životního prostředí nebo prostřednictvím potravních řetězců. Xenobiotika, tedy cizorodé látky, mohou mít na organismy letální účinky, ale u mnohých z nich dochází k biotransformaci, bioakumulaci a následnému přenosu potravním řetězcem na další organismy (GAD 2000, PROKEŠ *et al.* 2005, ANDĚL 2011). Proto je nutné znát dopodrobna působení všech člověkem využívaných látek, od průmyslových chemikálií až po domácí prostředky.

Toxikologie je úzce spjata s testováním na zvířatech. Jelikož toxický účinek látky závisí mj. na organismu, na který působí, je nutné provádět testy na více než jednom druhu (MATRKA & RUSEK 1998, GAD 2000). Bohužel zatím ještě nemáme k dispozici tolik možností, abychom tyto testy nahradili. To s sebou nese využití velkého počtu laboratorních zvířat. V posledních letech je snaha snížit testování na zvířatech a hledají se různé alternativy, které by měly stejnou vypovídající hodnotu (REINHARDT 1994). Testování toxicity látek na embryonálních stádiích ryb, kterým se zabývá tato diplomová práce, patří mezi možné adepty na alternativu pro testy akutní toxicity na dospělých ryb. Nejen z tohoto důvodu je nutné se tímto testem zabývat, snažit se ho zdokonalit, zavést do praxe a srovnávat výsledky s dalšími testy. V této práci je popsán vývoj testovací metody na embryích ryb dania pruhovaného na základě směrnice OECD 236 v daných laboratorních podmínkách Výzkumného ústavu organických syntéz, a.s. v Rybitví.

Cílem této diplomové práce bylo shromáždit potřebné informace o chovu testovaného organismu a o jeho tření. V praktické části byly ověřeny nejvhodnější kroky pro získání potřebného počtu jiker a následně byla navržena metodika testování xenobiotik na získaných jikrách. Stanovená metodika byla poté aplikována na minimálně jedné známé a jedné neznámé látce a nakonec byly vyhodnoceny výsledky. Cílem bylo také vyhodnotit alespoň jednu látku pomocí testu akutní toxicity na rybách a následně porovnat výsledky obou testů a zhodnotit možné alternativní využití testu na embryích ryb.



# 1 Testování toxicity

## 1.1 Testování toxicity látek na vodních organismech

Testování toxicity na vodních organismech hraje velmi důležitou roli především při hodnocení toxicity a možného dopadu na vodní společenstva u nově vytvořených látek s neznámým účinkem. Jedná se o nově vyvinuté chemické látky, pesticidy ale také o odpadní látky, které mají být určeny ke skládkování nebo vypouštěny jako odpadní vody. Testy toxicity určují především potenciální nebezpečí a potažmo způsoby nakládání s danou látkou, ale mohou také zpětně sloužit k usvědčení původců havárií způsobujících znečištění vod (SVOBODOVÁ *et al.* 2010).

## 1.2 Povinnost testování vyplývající z legislativy

### 1.2.1 OECD

Zásadní roli v testování toxicity mají směrnice OECD. Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj (Organisation for Economic Co-Operation and Development) je mezinárodní vládní organizací, která má své sídlo v Paříži. OECD byla založena v roce 1961 dokumentem Konvence o OECD (THE GOVERNMENTS OF THE REPUBLIC OF AUSTRIA *et al.* 1960, MZV ČR 2017, OECD 2017). Dnes má OECD celkem 35 členských států. Mezi klíčové partnery, kteří přispívají k práci této organizace trvale a komplexně, patří Brazílie, Indie, Indonésie, Čína a Jihoafrická republika (OECD 2017). Česká republika přistoupila mezi členy v roce 1995. Nejvyšším orgánem organizace je Rada OECD, která je sestavena z velvyslanců všech členských států a zástupce Evropské komise. Zasedání Rady řídí generální tajemník OECD. Velvyslanci se schází přibližně dvakrát měsíčně a jednou za rok se koná zasedání na ministerské úrovni. Přípravné práce vykonávají stálé a odborné výbory (MZV ČR 2017).

Hlavním cílem OECD je udržení ekonomického růstu, zaměstnanosti a životní úrovně s udržením finanční stability a rozvoje světového hospodářství. Mezi cíle OECD patří mj. podpora rozvoje zdrojů a výzkumu spolu s odborným vzděláním (THE GOVERNMENTS OF THE REPUBLIC OF AUSTRIA *et al.* 1960). OECD má průřezový charakter, což znamená, že se jako většina organizací nevěnuje pouze jedné sféře, ale celé řadě oblastí. Zabývá se nejen ekonomikou a obchodem, ale také vědou a technikou, životním prostředím či zemědělstvím (MZV ČR 2017). Členské země se společnými silami snaží o zlepšení úrovně životního prostředí z hlediska znečištěného ovzduší, obnovitelných zdrojů energie, spalování paliv, čištění odpadních vod, hospodaření s vodou i ochrany biodiverzity. K ochraně přírody napomáhá spousta kroků, mj. podpora vědy, výzkumu a vývojové spolupráce (OECD 2015a). Například v otázce chemické a biologické bezpečnosti vydává OECD směrnice popisující standardní metody pro testování bezpečnosti látek. Směrnice jsou pravidelně aktualizovány, aby odrážely vědecký a technický pokrok. Stanovují se například fyzikální a chemické vlastnosti látek, účinky na živé organismy a lidské zdraví, osud a chování v životním prostředí. Tyto směrnice jsou mezinárodně uznávané jako standardní metody a využívají je nejen odborníci v průmyslu (OECD 2017a).

### 1.2.2 REACH a ECHA

Označení REACH je zkratkou pro anglický název Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals, tedy v češtině Registrace, Evaluace (hodnocení)

a Autorizace (povolování) Chemických látek. Jedná se o nařízení Evropské unie, které vstoupilo v platnost na základě nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 z 18. prosince 2006. Toto nařízení si klade za cíl zlepšit ochranu lidského zdraví a životního prostředí před rizikovými chemickými látkami. REACH také podporuje alternativní hodnocení rizik s ohledem na snižování počtu testování na zvířatech. Toto nařízení ustanovuje nový systém kontroly chemikálií s cílem používat pouze chemické látky se známými vlastnostmi způsobem, který nepoškozuje životní prostředí a zdraví člověka a to nejpozději do roku 2020 (ES 2006, REACH 2017).

Nařízení stanovuje postupy pro hodnocení vlastností a rizik látek a shromažďování těchto údajů. Společnosti, které pracují s chemickými látkami, mají povinnost registrovat tyto látky ve spolupráci s dalšími společnostmi registrujícími stejnou látku. Společnosti nesou odpovědnost za shromažďování informací o vlastnostech a použitích látek, které vyrábějí nebo dovážejí v množství přesahující jednu tunu za rok. Taktéž mají povinnost provést posouzení rizik dané látky. Informace se předávají agentuře prostřednictvím registrační dokumentace na principu jedna látka, jedna registrace. Tedy výrobci a dovozci musí předložit žádost o registraci téže látky společně. Agentura ECHA (European Chemical Agency) a členské státy následně hodnotí žádosti o registraci z hlediska ochrany životního prostředí a lidského zdraví. Společnosti musí prokázat agentuře ECHA, jak lze bezpečně nakládat s danými látkami a zároveň musí informovat následného uživatele o opatření k řízení rizik. V případě, že rizika řídit nelze, může být nařízeno omezené používání látky. Následuje proces schvalování neboli autorizace. Cílem schvalovacího procesu je zajistit, aby byly tzv. SVHC látky (Substances of Very High Concern - Látky vzbuzující mimořádné obavy) nahrazeny látkami méně nebezpečnými (ECHA 2017).

### 1.2.3 Legislativa České republiky

Testy ekotoxicity v České republice nařizují provádět následující zákony: Zákon č. 185/2001 Sb. o odpadech a o změně některých dalších zákonů ve znění pozdějších předpisů, Zákon č. 356/2003 Sb. o chemických látkách a chemických přípravcích ve znění pozdějších předpisů a Zákon č. 326/2004 Sb. o rostlinolékařské péči ve znění pozdějších předpisů (MŽP 2001, MŽP 2003, MZe 2004). Tato povinnost vyplývá také z již zmíněného Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky (ES 2006).

## 1.3 Ekotoxicita

Ekotoxicitu definuje vyhláška Ministerstva životního prostředí o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů jako vlastnost látky, která představuje nebo může představovat akutní nebo pozdní nebezpečí pro jednu nebo více složek životního prostředí (MŽP & MZ 2001, ANDĚL 2011). Podle této vyhlášky se ekotoxicita z hlediska odpadů značí pomocí označení H14. Testy ekotoxicity jsou prováděny na rybách *Poecilia reticulata* nebo *Danio rerio* (doba působení 96 hodin), perloočkách druhu *Daphnia magna* (doba působení 48 hodin), řasách *Raphidocelis subcapitata* nebo *Desmodesmus subspicatus* (doba působení 72 hodin) a z vyšších rostlin na druhu *Sinapis alba* (doba působení 72 hodin) (MŽP & MZ 2016). Tato diplomová práce se zabývá testováním toxicity na rybách, konkrétně na jikrách dania pruhovaného. Z tohoto důvodu nebudou dopodrobna rozebírány ostatní testy toxicity na jiných organismech.

## 1.4 Testování ekotoxicity na rybách

Testováním ekotoxicity na rybách se zabývají české technické normy (ČSN), evropské normy a OECD normy. Základem dvou prvně zmíněných jsou ve většině případů právě normy OECD, které jsou volně dostupné na internetu. Testy, které tyto normy popisují, můžeme rozdělit podle délky trvání na akutní a chronické. Důvodů, proč se provádějí testy právě na rybách, je spousta. Patří mezi ně například fakt, že jsou ryby nepostradatelnou složkou potravního řetězce a významně se tak podílejí na toku živin a energie. V takovém případě se pak negativně podílí i schopnost kumulace toxických látek v rybách a působení těchto látek na další organismy v potravní síti a tedy i těch, kteří nepatří mezi vodní organismy (VOSTRADOVSKÝ 1976, LAMMER *et al.* 2009). Důležitost těchto testů zvyšuje postavení člověka na vrcholu této potravní pyramidy. Taktéž rybolov má pro lidskou populaci velký význam i z hlediska rekreačního (LAMMER *et al.* 2009). Ryby jsou především velmi dobrým ukazatelem kvality vod a jsou také prvním indikátorem při chemickém znečištění vod během havárií, které způsobují jejich značný úhyn (VOSTRADOVSKÝ 1976, LAMMER *et al.* 2009).

### 1.4.1 Akutní testy toxicity na rybách

Testů akutní toxicity na rybách není mnoho. Směrnice OECD 203 - „Fish, Acute Toxicity Test“ se zabývá akutním testem toxicity na rybách po dobu 96 hodin. Testovaný organismus není striktně určen. Důležitá je dobrá dostupnost druhu během celého roku, snadný chov a další ekonomické, biologické a ekologické faktory. Směrnici je doporučeno testování na druzích *Danio rerio* (danio pruhované), *Pimephales promelas* (jeleček velkohlavý), *Cyprinus carpio* (kapr obecný), *Oryzias latipes* (medaka japonská), *Poecilia reticulata* (živorodka duhová), *Lepomis macrochirus* (slunečnice velkoploutvá) a *Oncorhynchus mykiss* (pstruh duhový). Během testu se po 24hodinových intervalech sleduje mortalita ryb a následně je spočítána hodnota LC<sub>50</sub>, tedy koncentrace, při které uhynie 50 % testovaných organismů (OECD 1992).

Další test akutní toxicity popisuje směrnice OECD 236 - „Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test“, kterým se zabývá tato diplomová práce a bude podrobně popsán v následujících kapitolách (OECD 2013a).

Mezi základní české technické normy, které popisují postupy testování akutní toxicity, patří ČSN EN ISO 15088 a ČSN EN ISO 7346. ČSN EN ISO 15088 určuje stanovení akutní toxicity odpadních vod pro jikry dania pruhovaného. Tento test je podobný FET testu, ale testování probíhá pouze 48 hodin a jsou zde nutné specifické postupy pro práci s odpadními vodami. Vzhledem k délce testu nedochází k expozici po vykulení, které probíhá většinou až po 72 hodinách od oplození. Pozorují se stejné parametry jako u OECD 236, tedy koagulace, oddělení ocasu a tep. Tvorba somitů není v tomto testu brána v úvahu. Výsledkem tohoto testování je LID, tedy nejnižší zkoušená hodnota, při které není pozorován žádný toxický účinek. Za nulový toxický účinek je považováno přežití více než 90 % jiker (FREMROVÁ 2009). ČSN EN ISO 7346 se zabývá stanovením akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby. Doporučuje použití druhu *Danio rerio*, ale umožňuje využití i jiných sladkovodních ryb. Využity mohou být druhy jako *Lepomis macrochirus*, *Oryzias latipes*, *Pimephales promelas* či *Poecilia reticulata*. Podstatou zkoušky je stanovení hodnoty LC<sub>50</sub> po dobu 24, 48, 72 a 96 hodin (FREMROVÁ 1999).

### 1.4.2 Chronické testy toxicity na rybách

Jako chronické testy se zpravidla označují ty, které trvají déle než týden. Příkladem je test OECD 204 - „Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study“, který se využívá pro testování snadno i těžko rozpustných látek a látek těžkavých. Testovaným organismem je *Danio rerio*. Toxicitu určuje letalita, NOEC (No Observed Effect Concentration) a další pozorované efekty (OECD 1984).

OECD 210 - „Fish, Early-life Stage Toxicity Test“ popisuje testování toxicity na raných vývojových stádiích ryb. Mezi doporučené sladkovodní ryby patří *Oncorhynchus mykiss*, *Pimephales promelas*, *Oryzias latipes* a *Danio rerio*. Z mořských ryb je normou doporučeno využít *Cyprinodon variegatus* (halančíkovec diamantový) nebo *Menidia* sp. (menidie). Test probíhá do dosažení juvenilního stádia. Délka testu záleží na druhu testovaném organismu, většinou se však pohybuje kolem 30 dní. Jsou pozorovány letální a subletální účinky. Například se pozoruje stádium vývinu embryí, vykulení, vzhled, abnormální chování, váha a délka. Výsledky jsou následně porovnány s kontrolními vzorky a je určena hodnota LOEC (The Lowest Observed Effect Concentration), NOEC a EC<sub>x</sub> vyjadřující koncentraci, která způsobila změnu pozorovaného účinku (OECD 2013b).

Směrnice OECD 212 - „Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages“ popisuje krátkodobý test toxicity na embryích a plůdcích ryb. Testování probíhá na oplodněných jikrách do doby, kdy je spotřebován žloutkový váček. Pro tento test se doporučuje využít *Danio rerio*, ale možné je také testování na jiných druzích, které se shodují s druhy doporučenými v OECD 210. V testu podle směrnice OECD 212 je možné navíc využít sladkovodní druhy jako *Carassius auratus* (karas stříbřitý) nebo *Lepomis macrochirus*. Z mořských lze využít druhy *Menidia peninsulae* (medinie přílivová), *Clupea harengus* (sleď obecný) či *Gadus morhua* (treska obecná). Délka testu je podmíněna využitým testovaným organismem. U dania pruhovaného je test v porovnání např. s kaprem obecným výrazně kratší, trvá přibližně 8 - 10 dní. Zatímco u kapra obecného je nutné provádět pozorování až 55 dní (OECD 1998).

OECD 215 - „Fish, Juvenile Growth Test“ určuje zásady k posouzení účinků chemických látek na růst nedospělých ryb při dlouhodobé expozici. Test trvá 28 dní. Do testu jsou nasazeny ryby ve fázi exponenciálního růstu a po celou dobu testování jsou denně krmeny podle předem stanovené dávky, která je spočtena na základě váhy ryb. Ryby se zvažují také na konci testu a je určena hodnota EC<sub>x</sub>, která nepřímo prokazuje působení chemické látky na rychlost růstu ryb. Popřípadě je možné po porovnání s kontrolními vzorky určit NOEC a LOEC. Doporučeným testovaným organismem je *Oncorhynchus mykiss*, ve zdůvodněných případech lze také využít *Danio rerio*, popřípadě *Oryzias latipes* (OECD 2000).

Směrnice OECD 229 - „Fish Short Term Reproduction Assay“ hraje velmi důležitou úlohu při testování účinku chemických látek na rozmnožování a endokrinní systém ryb. Dospělí samci i samice jsou po dobu 21 dní vystaveni účinku různých koncentrací testovaných látek a následně jsou u nich pozorovány změny v endokrinní aktivitě a ve stavu sekundárních pohlavních znaků. K tomuto hodnocení je nutná důkladná pitva. Navíc je již v průběhu testu každý den pozorována kvantitativní plodnost. Pro testování je využíváno *Danio rerio*, *Phoxinus phoxinus* (střevle potoční) a *Oryzias latipes* (OECD 2012). Velmi podobný test popisuje OECD 230 - „21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition“, jehož hlavním cílem je

prokázání vlivu látek na estrogenní a androgenní aktivitu. Stejně jako u předchozího testování je nutné usmrčení ryb a odebrání krve pro stanovení vittelogeninu. Navíc se provádí analýza jater medaky (OECD 2009). Další obdobný test vychází ze směrnice OECD 234 - „Fish Sexual Development Test“. Tentokrát jsou účinku testované látky vystaveny již oplodněné jikry ihned od počátku svého vývoje. Expozici jsou jedinci vystaveni až do doby dokončení sexuální diferenciaci. Poté probíhá podobný postup k výše zmíněným předchozím testům. Velmi důležitým krokem je určení fenotypového a genetického pohlaví jednotlivých dospělců. K testování jsou využívány druhy *Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Gasterosteus aculeatus* (koljuška tříostná), popřípadě méně často *Pimephales promelas* (OECD 2011).

Pravděpodobně nejdelší test popisuje OECD 240 - „Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)“, který je prováděn na druhu *Oryzias latipes* od počátku dospělosti první generace (F0) až do vylíhnutí dalších jedinců v F2 generaci. Podle upraveného postupu lze tento test provádět i na danii pruhované. Vzhledem k délce testu a tedy zajištění pozorování celého vývoje, je v tomto testu hodnoceno mnoho již zmíněných jevů od přežití a počátečního vývoje, přes rozmnožování až po zhodnocení účinku na endokrinní systém a vliv na pohlaví jedinců (OECD 2015b).

### 1.4.3 *In vitro* testování

Jako možná alternativa k *in vivo* testům na rybách se nabízí *in vitro* testování na buněčných liniích ryb. Stávající výzkumy využívají především lososovitých a kaprovitých ryb a následně porovnávají výsledky s *in vivo* testy (BRAUNBECK & LAMMER 2006). Základem *in vitro* cytotoxicity je měření membránové integrity a metabolismu (SEGNER 2004). U mnoha chemikálií byla zjištěna dobrá korelace mezi výsledky *in vivo* a *in vitro* testů (BRAUNBECK & LAMMER 2006). Nicméně *in vitro* testy jsou podle výzkumů méně citlivé než testy na rybách, z toho důvodu v současné době nelze předvídat *in vivo* hodnoty LC<sub>50</sub> z výsledků *in vitro* testů. Ovšem výzkumy i přes tento výsledek přinesly jiný důležitý závěr. Velmi dobře výsledky cytotoxicity z buněčných linií ryb korelují s daty cytotoxicity ze savčích buněčných linií, čehož se dá využít jako možné alternativy pro testování na savcích (SEGNER 2004, GÜLDEN & SEIBERT 2005). Rybí buňky mají oproti savcím mnoho výhod. Příkladem je možnost inkubace při pokojové teplotě (20 °C), nejsou tedy třeba drahé inkubátory. Další výhodou je možnost skladování při teplotě 4 °C, není tedy nutné zmrazení. Navíc lze buněčné linie ryb testovat na více látek s různou osmolaritou než buňky savčí (BRAUNBECK & LAMMER 2006).

## 2 Charakteristika testovaného organismu - *Danio rerio*

### 2.1 Zařazení do systému a rozšíření

*Danio rerio* je kostnatá ryba patřící do řádu máloostní (Cypriniformes) a početné čeledi kaprovití (Cyprinidae), kam se řadí spolu s dalšími všežravými druhy pestrého vzhledu a velikosti (BECK 1992, SCHEURMANNOVÁ 1999, SCHMITZ 1999, KOTHE 2009). Tato čeleď zahrnuje více než 2 300 druhů. Zástupci se vyznačují neozubenými čelistmi, požerákovými zuby a vysunovatelnými ústy. Jejich plynový měchýř je dvoudílný. Šupiny jsou cykloidní nebo chybí (HANEL 2004). Přírodně se danio pruhované vyskytuje v jižní

a jihovýchodní Asii v prosluněných řekách a potocích, ale můžeme ho najít i v rýžovištích a zavodňovacích kanálech (SCHEURMANNOVÁ 1999, KOTHE 2009). Původem pochází z východní části Přední Indie od Kalkaty k Masulipatamu, kde žije ve velkých hejnech v rychle tekoucích vodách (BAILEYOVÁ & SANDFORDOVÁ 1998, SCHMITZ 1999, PAYSAN 2003, PETROVICKÝ 2014). Poprvé k nám byl tento druh dovezen v roce 1905 (PETROVICKÝ 2014). Danio pruhované je od 70. let 20. století hojně využíváno jako modelový organismus nejen v genetice a vývojové biologii především díky snadnému množení, vysoké plodnosti a rychlému vývoji. Další předností je velký počet kladených jiker, jejich průhlednost a malé množství žloutku, které umožňují lepší pozorování (KOTHE 2009, HIERONIMUS 2012, NASIADKA & CLARK 2012). Existují také geneticky modifikované formy. Vyšlechtěna jsou zlatožlutá dania i závojnate formy s prodlouženými ploutvemi, které jsou často choulostivější než formy původní (KOTHE 2009, HIERONIMUS 2012). S těmito jedinci je v EU zakázáno obchodovat (HIERONIMUS 2012). Často používaným synonymem k latinskému jménu *Danio rerio* je *Brachydanio rerio*. Česky se danio pruhované nazývá zebřička, z anglického zebrafish (SCHEURMANNOVÁ 1999, KOTHE 2009).

## 2.2 Morfologie

Danio pruhované dosahuje délky kolem 4,5 - 6 cm (BECK 1992, ELIÁŠ 1998, SCHMITZ 1999, PETROVICKÝ 2014). Štíhlá podlouhlá modře zbarvená ryba je ozdobena lesklými bílými až zlatými podélnými proužky (BOULENGER 1927, ELIÁŠ 1998, SCHMITZ 1999). Proužky bývají čtyři a sahají od skřelí až na ocasní ploutev. Také řitní ploutev bývá takto pruhovaná. Hřbetní ploutev je při bázi žlutě zelená, vnější část je modrá s bílou špičkou. Prsní a břišní ploutve jsou bezbarvé. Hřbet je oproti světlému břichu tmavě zbarvený, nejčastěji hnědě olivový. Oční duhovka je zlatavě červená (STERBA 1972). U tlamy se nachází dva páry vousků (ELIÁŠ 1998).



Obr. 1: Danio pruhované (CHRISTINE BUSKE 2012)

## 2.3 Etologie

*Danio rerio* je hejnová bentopelagická ryba, která se nejčastěji hbitě pohybuje blízko u hladiny (BOULENGER 1927, TALWAR & JHINGRAN 1991, BECK 1992, SCHMITZ 1999). Ráda vyskakuje nad hladinu, proto je nutné zakrývat nádrž (VERHOEF 1998, SCHMITZ 1999). U dna ji najdeme během odpočinku a tření (HANEL 2004). Žije v hejnech většinou o minimálním počtu osmi jedinců. V akváriích ji můžeme chovat v podstatě se všemi nedravými druhy ryb (BECK 1992). Tento druh nepečuje o svá mláďata a velice často požírá jikry, které obsahují velké množství bílkovin. Ztráty vyrovnává velký počet kladených jiker (SCHEURMANNOVÁ 1999).

## 2.4 Podmínky chovu

Danio pruhované je levné a snadno dostupné. Ryby jsou chovány v hejnech v akváriích dlouhých minimálně 60 cm (LAALÉ 1977, SCHEURMANNOVÁ 1999). Objem akvária by měl být větší než 60 l (HIERONIMUS 2012). Doporučený rozměr je 80 x 35 x 40 cm. V akváriu je nutné zabezpečit mírné proudění vody (KOTHE 2009). Tento druh snáší snížení teploty až na 16 °C, ale jeho optimum se pohybuje kolem 23 - 25 °C. Hodnota pH by měla být kolem 6,5 - 7,5 a tvrdost by neměla překročit 12 °dGH (ELIÁŠ 1998, HANEL 2004, KOTHE 2009, HIERONIMUS 2012). Chov probíhá ve společenských nádržích s ostatními sladkovodními rybami s podobnými nároky, jako jsou parmičky, razbory nebo labyrintky (KOTHE 2009, PETROVICKÝ 2014). Vzhledem k aktivitě dania není vhodný jeho chov spolu s plachými a klidnými rybami (VERHOEF 1998).

## 2.5 Potrava

*Danio rerio* je omnivorní (všežravá) ryba, proto by měla být krmena nejen suchým, ale také živým krmivem, jako např. nitěnkami, perloočkami nebo buchankami. Měla by být krmena několikrát (3 - 5x) denně menšími dávkami (VERHOEF 1998, SCHMITZ 1999, HIERONIMUS 2012). Jelikož dania upřednostňují hmyzí potravu, mají ke sběru z hladiny uzpůsobená horní ústa (BAILEYOVÁ & SANDFORDOVÁ 1998). Velmi důležité je rybky nepřekrmovat a podávat pestrou stravu (STERBA 1972, WESTERFIELD 2000). Pokud je jim podáván stále stejný druh krmiva, velice často ho přestanou přijímat nebo se jim sníží chuť k jídlu (STERBA 1972).

### 2.5.1 Umělá krmiva

Suchá krmiva pro ryby jsou snadno dostupná v obchodech. Dělí se na vločkovaná, granulovaná, prášková a tabletovaná (SCHMITZ 1999). Tato krmiva obsahují například výtažky z masa, šťávy ze zeleniny, moučku z garnátu, vaječný žloutek a bramborovou či ovesnou moučku, která slouží ke spojení směsi (STERBA 1972). Umělá krmiva se často využívají jako plnohodnotná strava obsahující všechny nezbytné živiny od bílkovin a tuků, přes vitamíny až po stopové prvky. Přesto je vhodné alespoň jednou za čas zpestřit tuto stravu živým krmivem (SCHMITZ 1999).

### 2.5.2 Přírodní krmiva

Pestrost potravy ryb podporuje jejich zdraví, zbarvení i chuť ke tření (STERBA 1972). Velmi často se bez přírodních krmiv vůbec nezačnou tvořit jikry. Živá potrava navíc nutí ryby klovu a většímu pohybu, což prospívá jejich kondici (SCHEURMANNOVÁ 1999). Přírodních krmiv je celá řada. Ryby jsou krmeny nálevníky (př. trepka), máloštětinatci (př. nitěnky, roupice), nižšími korýši (př. buchanky, perloočky, žábronožky), vířníky, patentkami, krylem a mnohým dalším (STERBA 1972, WESTERFIELD 2000, PLECITÝ *et al.* 2008). Tato potrava bývá prodávána živá, zmrazená nebo lyofilizovaná (vysušená ve zmraženém stavu ve vakuu bez denaturace bílkovin). Výhodou lyofilizovaného krmiva je zachování živin v podstatě ve stejné hodnotě jako při podávání živého krmiva. Dalším pozitivem je snadnější uchovávání, které je možné i při pokojové teplotě. Tato strava je navíc díky prudkému podchlazení zbavena nebezpečných zárodků a původců chorob. U živého krmení se musí dbát na kontrolu možného přemnožení samotné potravy, například trepky se rády až invazivně množí, ale také na jejich nemoci, akumulaci toxických látek a léčiv. Proto je výhodnější podávat komerčně připravenou potravu (mražená, lyofilizovaná), u které jsou tato negativa eliminována (PLECITÝ *et al.* 2008).

## 2.6 Pohlavní dimorfismus

Samičky jsou oproti štíhlým samcům zavalitější a větší (SCHEURMANNOVÁ 1999, WESTERFIELD 2000). Samec mívá zlatě lesklé proužky na modrém podkladu, také řitní ploutev bývá zlatě pruhovaná. Celkově je pestřeji zbarvený než bledší samička, u které se pruhy lesknou spíše do stříbrné až žlutavé barvy (STERBA 1972, NASIADKA & CLARK 2012). U samce lze v některých případech pozorovat načervenalý odstín zejména na anální a ocasní ploutvi (NASIADKA & CLARK 2012). Břicho samce je zbarveno do žluta, zatímco samička má břicho světle stříbrné a zavalitější díky zvětšení jiker, které přijímají výživné látky z těla samice (STERBA 1972, WESTERFIELD 2000). Samičí juvenilní vaječníky dozrávají do 11. týdne věku samice (MAACK & SEGNER 2003). U samců vaječníky degradují prostřednictvím apoptózy a tvoří se varlata (RODRIGUEZ-MARI *et al.* 2010). Samčí gonády jsou obvykle dotvořeny koncem třetího měsíce života. Přesné dokončení vývoje pohlavních žláz však závisí na podmínkách chovu a na konkrétním kmeni (MAACK & SEGNER 2003).



Obr. 2: Samice (nahore) a samec (dole) dania pruhovaného (BRAUNBECK & LAMMER 2006)

## 2.7 Rozmnožování

### 2.7.1 Pohlavní soustava

Pohlavní soustavu ryb klasicky dělíme na dva systémy, samčí a samičí. Jedná se o rozdílné struktury, ale společným znakem je přítomnost gonád (pohlavních orgánů) a vývodných pohlavních cest. Hlavní funkcí této soustavy je rozmnožování. Danio pruhované má stejně jako většina ryb oddělené pohlaví. Jedná se tedy o gonochoristy. Typ oplození je vnější (PRITCHARD 2001, DVOŘÁK *et al.* 2014). Párové pohlavní žlázy jsou zavěšeny v horní části tělní dutiny na duplikatuře peritonea. Leží podél plynového měchýře a vnějších okrajů ledvin (HARDER 1975). Pohlavní vývody mají vyústění na urogenitální papile mezi řitním otvorem a řitní ploutví (DVOŘÁK *et al.* 2014).

### 2.7.2 Samičí pohlavní soustava

Samice, nazývané také jako jikernačky, mají pohlavní orgány vaječníky neboli ovaria (HARDER 1975, HOLČÍK 1998). Ovaria produkují samičí pohlavní buňky zvané jikry. Vaječníky jsou umístěny párově v dutině tělní. Jejich velikost je často asymetrická, jelikož jsou vaječníky ovlivněny uspořádáním okolních orgánů a především sexuální aktivitou a s tím souvisejícím počtem jiker. Stavba jiker je uspořádána pomocí vazivových přepážek. Oogonie, z nichž postupně vznikají jikry, se vyvíjejí ze zárodečných buněk ve folikulech



vaječníků. Po ovulaci jsou zralé jikry odváděny do primitivního vejcovodu (oviductus) vzniklého srůstem peritoneálních duplikatur. Jelikož jsou samice nadřádu Teleostei cystovarijní, jsou jikry odváděny do vejcovodů, nikoli přímo do tělní dutiny jak je tomu u gymnovarijních samic nadřádu Chondrostei (BARUŠ *et al.* 1995).

### 2.7.3 Stavba a vznik jiker

Samičí gameta ryb (jikra) je na povrchu chráněna pružnou blánou zvanou chorion, která je opatřena jemnými póry (DEVLAMING *et al.* 1982, PETROVICKÝ 2014). Ty mají důležitou úlohu při bobtnání jikry, ke kterému dochází díky průniky vody skrze póry do vnitřní části jikry. Dalším důležitým otvorem v této bláně je mikropyle, otvor, kterým do jikry proniká spermie (PETROVICKÝ 2014). Nebuněčná blána chorion vzniká z vrstvy folikulárních epiteliálních buněk, která obaluje oogonie v raném stádiu. Chorion vytváří prostor zvaný zona pellucida, který odděluje jikru od folikulu (DEVLAMING *et al.* 1982). Pod chorionem se nachází další vrstva - žloutková blána (membrana vitellina), za níž následují dva žloutky. Horní žloutek představuje zárodečný terčík, z kterého během vývoje vzniká embryo (DEVLAMING *et al.* 1982, PETROVICKÝ 2014). Jedná se o část vajíčka, která je oproti zbylým částem chudá na žloutek (STERBA 1972). Dolní žloutek, tzv. živný, plní vyživovací funkci vyvíjejícího se embrya a tvoří žloutkový váček (PETROVICKÝ 2014). Jikry dania jsou teleocitální, tedy mají obsah žloutku umístěn u vegetativního pólu (ŠMIDT 1955, BRAUNBECK & LAMMER 2006).

Samičí gamety vznikají procesem ovogeneze, který je rozdělován na tři základní periody. Prvnímu období předchází vznik prvotních pohlavních buněk (gonogonií), které vznikají již ve stádiu morulace a shromažďují se v zadní části trupu, kde spolu s buňkami celomového a germinativního epitelu tvoří základ gonády (DVOŘÁK *et al.* 2014). Během prvního období, tzv. periody množení dochází k mitotickému dělení těchto gonogonií na dvě pohlavní prvobuňky, tzv. oogonie. Ty se dále mitoticky dělí na čtyři pohlavní prvobuňky s diploidním počtem chromozomů (HARDER 1975, BARUŠ *et al.* 1995). Během následující periody růstu se tvoří další oogonie a nastupuje pohlavní dospělost, během níž se oogonie přetváří na oocyty I. řádu. Další období se nazývá perioda zrání, která se vyznačuje redukčním dělením. Oocyty I. řádu se nerovnoměrně dělí na dva oocyty II. řádu, díky čemuž vzniká vaječná buňka, která je tvořena téměř veškerou cytoplazmou, a na ní nasedá nově vzniklá buňka pólóvá. Následuje další nerovnoměrné dělení, které dá vzniknout jednomu velkému vajíčku (ovum) se třemi drobnými pólóvými buňkami (ŠMIDT 1955, DVOŘÁK *et al.* 2014).

Zdravé jikry jsou charakteristicky zbarvené, u dania pruhovaného nejčastěji sklovitě průhledné. Zbarvení může ovlivnit přijímaná potrava, např. obsahující karotenoidy. Naopak mrtvá jikra, u které došlo ke koagulaci bílkovin, je bíle zbarvená a uvnitř jsou vidět sražené bílkoviny. Toto zakalení je viditelné i pouhým okem. Jelikož jsou mrtvé jikry rychle napadány plísněmi, které mohou přestupovat i na živé jikry, je dobré je od zdravých oddělit (PETROVICKÝ 2014). Menší, ale kvalitnější jikry, u kterých je prokázána větší šance na přežití, produkují samice větších rozměrů. Je zajímavé, že menší samice mají jikry větší, ale v tomto případě je velikost na úkor kvality a takové jikry vykazují mnohem větší úmrtnost (UUSI-HEIKKILÄ *et al.* 2010).

V některých případech může dojít k zakrnění jiker. K tomu dochází například při překrmování ryb, které může způsobit i degeneraci pohlavních žláz a neplodnost.

U některých samic, především u starších, může dojít k zatvrdnutí vaječníku a zadržení jiker v těle, což může mít za následek neplodnost nebo dokonce úhyn. K podobným problémům může dojít při častém vytírání nebo naopak při naprosté absenci samců v akváriu, kdy se samici vytvoří nekrotická ucpávka ve vejcovodu a není již schopna klást jikry (SPENCE *et al.* 2008, PETROVICKÝ 2014). Pro získání kvalitních jiker je dobré, aby byla samice umístěna se samci a plodila minimálně jednou za měsíc. Naopak ke tření bychom ji měli využívat s minimální týdenní přestávkou (NIIMI & LAHAM 1974).

#### **2.7.4 Samčí pohlavní soustava**

Samčími pohlavními orgány jsou varlata (testes). Samotný samec se označuje jako mlíčák (HARDER 1975, HOLČÍK 1998). Varlata jsou parenchymatické orgány bělavé barvy. Vnitřní stavba je tvořena semenotvornými kanálky spojenými vmezeřeným vazivem. U kaprovitých je parenchym uspořádán hroznovitě, jedná se o tzv. acinózní uspořádání (KAESTNER 1991). Tento typ varlat se tvoří z pruhů zárodečných buněk. Kulovité (acinózní) shluky vznikají opakovaným dělením těchto buněk. Shluky se protahují do délky tak, že uvnitř vzniká dutina obklopená vrstvami spermatogonií. Jednotlivé váčky a trubičky se v době pohlavní zralosti uspořádají do odvodného kanálku, tzv. ductus efferentes testis, který slouží k odvodu spermií (DVOŘÁK *et al.* 2014). Dozrálá varlata poznáme podle mléčného zbarvení. Jsou protáhlého tvaru a jejich velikost se odvíjí od sexuální aktivity samce. V době rozmnožování jsou několikanásobně větší a jejich hmotnost může tvořit až 10 % celkové váhy těla. Varlata jsou složena z centrálního kanálku obklopeného parenchymem. Na kanálek navazují postranní kanálky a váčky, ve kterých vznikají spermatogonie ze zárodečných buněk. Na spermatogoniích postupně zrají spermie (mlíčí). Díky samostatným vývodům ductus efferentes testis je oddělena cesta spermií od močových vývodů. Ductus efferentes testis se spojují v chámovod (ductus deferens) ústící do koncového sinus urogenitalis. Důležité funkce varlete jsou dvě. Funkce generativní zajišťuje tvorbu samčích pohlavních buněk. Druhým typem je funkce endokrinní, tedy produkce samčích pohlavních hormonů (BARUŠ *et al.* 1995, HOLČÍK 1998).

#### **2.7.5 Stavba a vznik spermií**

Samčí gamety (mlíčí) tvoří bílou tekutinu, která obsahuje chámové buňky (spermie). Spermie je tvořena hlavičkou, krčkem a bičíkem (BARUŠ *et al.* 1995, PETROVICKÝ 2014). Hlavičku představuje buněčné jádro. Ocásek tvoří protoplastovou část buňky. Stavba bičíku začíná krčkem, pokračuje částí spojovací a hlavní částí. Ukončen je terminálním vláknem (ŠMIDT 1955). Pohyblivost spermie určuje její oplozovací schopnost. Ta postupně klesá se stářím samců. Styk spermie s vodou ji stimuluje k pohybu. Životnost spermie je od této chvíle velmi krátká, trvá pouze několik vteřin. Pokud nedojde ke splnutí se samičí gametou, spermie hyne (PETROVICKÝ 2014). Nejvíce spermií produkují samci ve věku 10 měsíců, poté produktivita postupně klesá (NASIADKA & CLARK 2012). Spermie byly poprvé objeveny v roce 1677 Leeuwenhoekovým studentem Hammem z Leydenu. Zpočátku byly některými autory považovány za parazity chámu. Antony von Leeuwenhoek určil spermie jako organismy v počátečním stavu (ŠMIDT 1955).

Samčí gamety vznikají procesem spermatogeneze, který se podobně jako ovogeneze dělí na čtyři období. První je období rozmnožovací (perioda množení), následuje období růstu, dále období zrání a nakonec spermiogeneze neboli období přeměny - vzniku spermie

(ŠMIDT 1955). Na počátku tzv. periody množení vznikají mitotickým dělením gonogonií dvě pohlavní prvobuňky (spermatogonie), které se dále mitoticky dělí na čtyři pohlavní prvobuňky s diploidním počtem chromozomů (HARDER 1975, BARUŠ *et al.* 1995). V následujícím období růstu dochází k tvorbě dalších spermatogonií a k nástupu pohlavní dospělosti, během níž se spermatogonie přetvoří na spermatocyty I. řádu. Během periody zrání se spermatocyty I. řádu dělí na dva spermatocyty II. řádu, které vstupují do dalšího dělení dávající vzniknout spermatidám s haploidním počtem chromozomů. Spermatidy prodělávají morfologické změny z kulovité buňky na klasickou spermii s hlavičkou, krčkem a bičkem (FAWCETT 1970, FRIBOURGH *et al.* 1970).

### 2.7.6 Tření

Kladení jiker a jejich následnému oplození předchází jejich zrání. Vajíčko odnímá výživné látky z těla samice a ukládá si je v podobě žloutku. S tím souvisí zrání dědičné hmoty, které se projevuje dělením původní buňky za vzniku čtyř vaječných buněk. Pouze jedna z nich však přijímá zásoby žloutku a je schopna oplození. Tzv. abortivní zbylé tři buňky odumrou. U spermií naopak díky absenci zásobních látek zůstávají všechny čtyři chárové buňky (STERBA 1972).

U ryb probíhá vnější osemenění (tření), během něhož jsou samčí i samičí pohlavní buňky vylučovány do vnějšího prostředí, tedy do vody (ŠMIDT 1955). Ke tření jsou vhodné ryby na počátku pohlavní dospělosti. Neměly by být příliš mladé, ale ani příliš staré. Danio pruhované pohlavně dozrává mezi pátým a osmým měsícem života. Nejlépe se rozmnožuje v prvním a druhém roce života, později už skoro vůbec (SCHEURMANNOVÁ 1999). Nejvhodnější věk ryb k rozmnožování se pohybuje v rozmezí 7 - 18 měsíců života (WESTERFIELD 2000). K rozmnožování vybíráme pouze zdravé jedince, u kterých se neobjevují žádné deformace a odchylky od normálního chování (SCHEURMANNOVÁ 1999). Ryby se ke tření nasazují v párech nebo s vyšším poměrem samců (např. dva samci a jedna samice) s tím, že samice vpouštíme do třecí nádrže o den dříve než samce (ELIÁŠ 1998, SCHEURMANNOVÁ 1999). Při stejném poměru pohlaví získáme menší počet jiker (WESTERFIELD 2000). Počty jedinců určených ke tření by neměly být moc vysoké, jelikož se zvyšující se hustotou se zvyšuje i agresivita ryb a tím může být omezena jejich produkce (SPENCE & SMITH 2005). Ke zvýšení pravděpodobnosti tření je vhodné oddělit pohlaví 7-14 dní před rozmnožováním (PETROVICKÝ 2014). Nutné je každý den vyměnit alespoň 1/3 vody a 2 - 3x denně krmit především živou potravou (WESTERFIELD 2000).

U dania se někdy objevuje věrnost samice k jedinému samci, se kterým se pak primárně tře. Objem třecí nádrže pro tento druh by měl být v rozmezí 25 - 60 litrů. Lze také využít tzv. vytíračky s maximální hloubkou 10 cm (HANEL 2004). Výzkumy prokazují, že objem vody pod 200 ml snižuje množství nakladených jiker (GOOLISH *et al.* 1998). Nádrž je vhodné osadit rostlinami, jako jsou stolítky a kabomby, které nahoře svážeme do trsu, aby se jimi mohly ryby prodírat a zanechávat na lístcích jikry. Na dno je třeba umístit oblázky, skleněné kuličky nebo rošt (SCHEURMANNOVÁ 1999). Teplota během tření by měla být o něco vyšší než při běžném chovu, optimálně kolem 26 °C (HANEL 2004). Vhodné je také doplnění třecí nádrže o čerstvou vodu a dostatečné osvětlení (VERHOEF 1998, HIERONIMUS 2012).

Danio pruhované se tře ráno po rozbřesku obvykle u dna (ELIÁŠ 1998, PRITCHARD 2001). Přes noc by měla být třecí nádrž zakrytá tak, aby do ní nepronikalo světlo, a ráno odkryta

(WESTERFIELD 2000). Samotnému tření předchází námluvy. V iniciační fázi sameček pronásleduje samičku nebo plave po jejím boku a vykonává typické pohyby. V následující tzv. apetitivní (vnímavé) fázi se sameček dotýká samičky hlavou a krouží kolem ní. Samičky zůstávají během této fáze nehybné nebo plavou po samcově boku (DARROW & HARRIS 2004). V konečné fázi tření se sameček krátce přitiskne k samičce, přehodí ocas přes její hřbet, čímž stimuluje kladení jiker a následně během zlomku vteřiny oplodní uvolněné jikry spermii. Oplodněné jikry jsou těžší než voda a klesají ke dnu (ELIÁŠ 1998, SCHEURMANNOVÁ 1999). Jedna samice průměrně vyprodukuje během jednoho tření 200 až 400 jiker o velikosti kolem 1 mm (ELIÁŠ 1998, HIERONIMUS 2012). Samice může naklást dokonce až 2000 jiker (PETROVICKÝ 2014).

Je taktéž prokázána role čichových podnětů ve stimulaci ke tření. Feromony jsou důležité pro synchronizaci páření. Přítomnost samčích feromonů prokazatelně stimuluje ovulaci samic (VAN DEN HURK & RESINK 1992). Stejně tak feromony uvolněné ze samičích pohlavních žláz ovlivňují činnost samce. Tyto látky na bázi steroidních glukuronidů přilákají samce a povzbuzují ho k námluvám a tření (VAN DEN HURK & LAMBERT 1983). Přítomnost samčích feromonů dokonce kvantitativně i kvalitativně zvyšuje produktivitu samic. Naopak samičí feromony mohou snižovat produktivitu jiné samice (GERLACH 2006). Čichové podněty hrají i další důležitou roli v prevenci proti příbuzenskému křížení. Výzkumy dokazují, že dospělé samice preferují feromony nepříbuzných samců před příbuznými (GERLACH & LYSIAK 2005). Tento efekt má pravděpodobně zabránit snížené plodnosti a menší pravděpodobnosti přežití mláďat způsobené křížením příbuzných jedinců (MRAKOVČIČ & HALEY 1979). Zajímavé je, že u samců se tyto preference nevyskytují a juvenilní samice naopak dokonce upřednostňují čichové vjemy u příbuzných jedinců (GERLACH & LYSIAK 2005). Důležitou roli ve výběru samce však i nadále hraje jeho vzhled a chování (NASIADKA & CLARK 2012). Samice se přednostně vytírají s robustnějšími výrazně barevnějšími samci (PRITCHARD 2001). Význam má též hierarchie v hejnu. Dominantní samice jsou agresivní vůči níže postaveným jedincům. Tyto rozdíly jsou zřetelné nejen z chování, ale také vizuálně. Dominantní samice mají zvětšené vaječníky. Stejně tak dominantní samci disponují větším počtem spermií (FILBY *et al.* 2010). Dominance u samce zvyšuje úspěch v reprodukci, zatímco u dominantních samic nebylo toto zvýhodnění prokázáno. Hlavní roli v reprodukci tedy hraje kompetice mezi samci (PAULL *et al.* 2010).

Po vytření je nutné dospělce ihned odlovit, než požerou jikry (BOULENGER 1927, SCHEURMANNOVÁ 1999). Jinou možností je využití mřížky, kuliček či kamínků, které zabrání požeru jiker. Vhodné je také doplnění dna o trsy měchýřky jávské (*Vesicularia dubyana*), ve kterých jsou jikry chráněné (BAILEYOVÁ & SANDFORDOVÁ 1998). Samotná přítomnost kamínků podle některých pozorování napomáhá k povzbuzení ke tření (PRITCHARD 2001). Plůdek se při optimální teplotě (26 °C) líhne do tří dnů, rozplave se do pěti až šesti dnů (HANEL 2004).

### 2.7.7 Oplození

Po osemnění, které zahrnuje všechny děje přivádějící samčí a samičí pohlavní buňky v kontakt a následné vnoření spermie do plazmy vajíčka, následuje oplození. Oplození začíná spojením spermie s vajíčkem a končí asimilací těchto buněk. Pohyb spermií směrem k vajíčku je založen na chemotaxi, vajíčka totiž vylučují chemické látky, které je přitahují. Spermie proniká do vajíčka skrz mikropyle (ŠMIDT 1955). Vajíčko nasává vodu

skrz polopropustné membrány jen po určitou dobu. Potom začne působit enzym v perivitelliním roztoku, který způsobí ztuhnutí chorionu. Tato změna zabrání dalšímu nasávání vody a nabobtnáním jikry se uzavře mikropyle, což ukončí dobu možného oplození (EVERHART & YOUNGS 1981, BARUŠ *et al.* 1995). Ocásek spermie je po vstupu do vajíčka odtržen nebo se rozpustí v plazmě. Hlavička začíná bobtnat a měnit tvar v obyčejné měchýřkovité jádro. Centrozom v samičím jádře se v tuto chvíli začíná dělit a dává vzniknout dělicímu vřeténku a samčí jádro splyne se samičím (ŠMIDT 1955). Po oplození následuje rýhování, které je díky zárodečné plazmě umístěné u jednoho pólu částečné neboli parciální či meroblastické (EVERHART & YOUNGS 1981, BARUŠ *et al.* 1995).

### 2.7.8 *In vitro* fertilizace

V některých případech lze k získání embryí využít *in vitro* fertilizaci, díky které docílíme zisku velkého množství synchronně se vyvíjejících embryí. Pokusy s umělým osemněním probíhaly již v 17. století a v rybím hospodářství získaly velký význam pro zvýšení produktivity (ŠMIDT 1955).

Samce a samice je nutné oddělit den před fertilizací do samostatných nádrží. Spermie se získávají o hodinu dříve než vajíčka. Nejprve je nutná anestezie samce (WALKER & STREISINGER 2000). K anestezii lze využít různé látky. Jako nejpoužívanější anestetikum ryb je uváděn tricain methanosulfonát, látka známá také jako MS 222. Jedná se o bílý prášek, jehož předností je dobrá rozpustnost a rychlá účinnost. Jde zatím o jediné registrované anestetikum v zemích EU. Podle druhu a velikosti ryb se využívají koncentrace v rozmezí 30 - 350 mg/l. Před aplikací je doporučována hladovka ryb 12 - 24 hodin. K anestezii dochází nejpozději do 15 minut a návrat do původního stavu po umístění do čisté vody trvá 1 - 30 minut. Výrobce uvádí několik druhů, pro které výslovně nedoporučuje využití tohoto anestetika. V tomto výčtu se nevyskytuje *Danio rerio* ani jiné druhy tohoto rodu. Další látkou využívanou k anestézii je například 2-phenoxyethanol, který je využíván nejčastěji v koncentraci 0,3 - 0,4 ml/l. K anestezii dochází do 5 - 10 minut. Nevýhodou je jeho dráždivý účinek na kůži a oči. Je tedy nutné dbát zvýšené opatrnosti a během manipulace používat nejen rukavice ale také brýle nebo ochranný štít. K anestezii lze využít také hřebíčkový olej, jehož účinnou látkou je eugenol. Velkou předností je přírodní původ hřebíčkového oleje, kvůli kterému ovšem nelze přesně definovat jeho složení. Nejčastěji se využívá v dávce 30 - 40 mg/l. Anestezie nastupuje do 5 - 10 minut, ale je uváděna delší doba zotavení v porovnání s jinými anestetiky. Pro akvarijní ryby se nejčastěji využívá koncentrace v rozmezí 0,025 - 0,033 ml/l. Pro *Danio rerio* byla stanovena hodnota LC<sub>50</sub> 19 mg/l (KOLÁŘOVÁ *et al.* 2007).

Nástup účinků anestetik je obecně rozdělován do čtyř fází, přičemž první fáze se vyznačuje klidným chováním. Ryba se normálně pohybuje a vyhýbá se překážkám. Během druhé fáze je naopak aktivnější, neklidná, plave rychle a již se nevyhýbá překážkám. Obranné reflexy bývají silné a dýchání nepravidelné. Třetí fáze je rozdělována na dvě části. V tzv. 3a fázi dochází k celkovému povrchovému znecitlivění. Ryba se pomalu naklání na bok, je méně aktivní a ztrácí obranné reflexy. Dýchání je znovu pravidelné, ale zpomaluje se. Ve fázi 3b probíhá celkové úplné znecitlivění. Ryba je v této fázi anestezie v boční poloze, vůbec se nehýbe a nevykazuje žádné obranné reflexy. Dýchání je pravidelné, klidné a zpomalené. Ve čtvrté fázi již dochází k zástavě dýchání nebo je dýchání pouze mělké (KOLÁŘOVÁ *et al.* 2007).

Ve chvíli, kdy začne působit anestezie, je potřeba rybu opláchnout a umístit ji břichem vzhůru na namočenou houbu. Genitální oblast se osuší, aby nebyla přítomna voda, která by aktivovala spermie. Pomocí měkké pinzety je ryba jemně zmáčknuta ze stran a z genitálního otvoru jsou následně odebrány vycházející spermie. Spermie je nutno udržovat v tzv. Hankově roztoku chloridu sodného. Složení Hankova roztoku je následující:

0.137 M NaCl  
5.4 mM KCl  
0.25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1.3 mM CaCl<sub>2</sub>  
1.0 mM MgSO<sub>4</sub>  
4.2 mM NaHCO<sub>3</sub> (WALKER & STREISINGER 2000).

Jikry jsou získávány s rozbřeskem a stejně jako u samců se začíná anestézií a opláchnutím vodou. I v tomto případě je nutné osušit genitálie, jelikož voda způsobuje bobtnání jiker a mohla by zabránit oplození. Samice je umístěna do Petriho misky o průměru 35 mm a jemně je stišeno břicho vlhkými prsty. Pokud je samice připravena ke kladení jiker, vyjdou ven snadno. Rybu je nutné ihned po získání jiker vrátit do vody. Následně jsou vybrány vhodné jikry nejpozději do 90 minut. V Petriho misce jsou smíchány samčí a samičí gamety a k nim přidána voda. Oplození probíhá do 20 - 60 sekund. Poté už nejsou spermie aktivní (WALKER & STREISINGER 2000). Oplozené jikry je třeba řádně promýt, aby později uhynulé spermie, které ulpěly na povrchu jiker, nekazily vodu svými rozkladnými produkty (ŠMIDT 1955). Po *in vitro* fertilizaci je nutné nechat odpočinout samce minimálně tři týdny a samice alespoň čtyři týdny. Abychom zabránili úhynu ryb, je nutné nevystavovat je anestezii příliš dlouho a zacházet s nimi během zákroku velmi opatrně (WALKER & STREISINGER 2000).

## 2.8 Ontogenetický vývoj

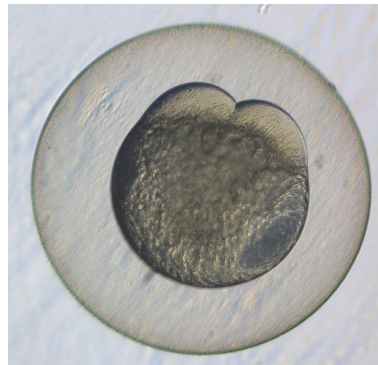
Vývoj ryb dělíme na čtyři periody - embryonální, larvální, juvenilní a adultní (BARUŠ *et al.* 1995, GAISLER & ZIMA 2007).

### 2.8.1 Embryonální vývoj

Embryonální perioda se vyznačuje endogenní výživou ze zásobního žloutku a začíná oplozením jikry a jejím dělením. Konec této periody nastává s přechodem embrya na exogenní výživu (GAISLER & ZIMA 2007, PETROVICKÝ 2014). V této periodě je stěžejní inkubační doba vajíčka, která začíná oplozením a končí vykulením. Nejvíce ji ovlivňuje teplota vody, ale také intenzita osvětlení a tlak vzduchu. Se zvyšující se teplotou se do určité míry zkracuje délka inkubační doby (PETROVICKÝ 2014). Embryonální periodu lze rozdělit na tři vývojové fáze. První fáze se nazývá ovulární a označuje období rýhování vajíčka. Druhá je fáze embryonální, při níž je embryo uvnitř vaječných obalů. Tato fáze končí jeho vykulením z jikry, kterým začíná fáze eleuteroembryonální. Eleuteroembryo je označení pro právě se líhnoucí embryo, které dává vzniknout volnému zárodku, tzv. váčkovému plůdku (BARUŠ *et al.* 1995)

Na úplném začátku vývoje embrya probíhá rýhování oplozením vzniklé zygoty, které spočívá v jejím opakovaném dělení. Štěpení je meroblastické a diskoidální (ŠMIDT 1955, BRAUNBECK & LAMMER 2006). Diskoidální rýhování se jinak nazývá také terčovité

a vyznačuje se tím, že se z celého vajíčka dělí pouze plasmový terčík, který se nachází na animálním pólu a obsahuje jádro (ŠMIDT 1955). Dvě rýhy probíhají od animálního pólu (chudý na žloutek) k vegetativnímu (bohatý na žloutek). Třetí rýha probíhá napříč předchozích a rovnoběžně s rovníkem vajíčka. Zárodečný terčík se rozdělí do mnoha buněk s postupem 2, 4, 8, 16 atd. (STERBA 1972, KIMMEL *et al.* 1995, NAGEL 2002). Vzniklé dceřiné buňky se nazývají blastoméry. Celkový útvar se v této fázi nazývá morula. Jedná se o plný kulovitý útvar krytý na povrchu světlolomnou vrstvou zvanou zona pellucida (KLIKA *et al.* 1986). 16-ti buněčné stádium vzniká obvykle do dvou hodin od oplození a ze zygoty se následně vyvíjí blastula (STERBA 1972, KIMMEL *et al.* 1995, NAGEL 2002). Blastula je dutý kulovitý útvar vzniklý rozestoupením blastomér moruly. Povrch blastuly pokrývají ploché buňky trofoblastu, pod nímž se blastoméry na jednom pólu seskupí v buněčný uzel, tzv. embryoblast (KLIKA *et al.* 1986).



Obr. 3: Dvoubuněčné stádium 50 minut po oplození (foto: NALEZINKOVÁ)

Již po třech hodinách od oplození lze pozorovat 256 blastomér a do pěti hodin vzniká tzv. gastrula (KIMMEL *et al.* 1995, NAGEL 2002). Gastrulace zakončuje rýhování, po kterém následuje organogeneze. Začátek gastrulace se vyznačuje nadzvedáním blastodisku neboli zadního okraje zárodečného terčíku následkem počínajícího vchlipování, které je doprovázeno vznikem střevní dutiny. Na počátku se také vytváří okrajový uzlík. Jedná se o hrbolek, který vzniká díky vrstevnatosti vchlipujících se částí a jeho poloha označuje zadní konec zárodka. Gastrulace zahrnuje pochody vedoucí k tvorbě vnitřního (entoderm) a vnějšího (ektoderm) zárodečného listu. Během tohoto procesu se také vytváří střední zárodečný list (mesoderm). Centrální část entodermu se nazývá střevní entoderm a později z něj vzniká trávicí trakt (ŠMIDT 1955, NAGEL 2002). Ve stádiu gastruly dochází k epibolickému pohybu, blastoderm se ztenčuje a oblast mezi periblastem a blastodermem se zakřivuje. Stádium gastruly je přibližně do deseti hodin od oplození ukončeno a následuje segmentace - organogeneze (KIMMEL *et al.* 1995).

Nejspodnější řada buněk, které se dotýkají žloutku, přijímá výživné látky. Dochází ke ztluštění zárodečného terčíku a vzniku přívěsku, který se prodlužuje dovnitř terčíku a tvoří základ embrya, tzv. embryonální uzlík. Podél osy prodloužení embryonálního uzlíku vzniká mícha a pětidílný mozek. Následně se tvoří základy očí, nosu a rovnovážného ústrojí. Postupně se rýsuje hlava a trup se dělí na segmenty (STERBA 1972). První somity se objevují již po deseti hodinách od oplození (KIMMEL *et al.* 1995). V místě zadního mozku vznikají žaberní štěrbin. Embryo se protahuje do délky, terčík je přerůstán hlavou a ocasem. Postupně začíná být viditelné srdce se zřetelným pulsem a v jeho blízkosti vznikají párové ploutve. Žloutek se s ubývajícími zásobami zmenšuje, zatímco cévy se tvoří

po stále větší ploše embrya a přivádějí živiny (STERBA 1972, NAGEL 2002). Ve chvíli, kdy ze žloutku zbývá už jen žloutkový váček, se začíná tvořit ústní otvor, střevo a řitní otvor. S tímto vznikem se začínají tvořit také fermenty, které rozruší obal jikry. Svaly nabývají na síle, embryo vykazuje trhavé pohyby, až se nakonec protrhne z narušeného vaječného obalu a dochází k tzv. vykulení (STERBA 1972, GAISLER & ZIMA 2007, PETROVICKÝ 2014). Vykulením je ukončena inkubační doba vajíčka. Stádium po vykulení se nazývá eleuteroembryo nebo také váčkový plůdek, který dýchá díky tzv. Cuvierovým průduchům. Tyto průduchy jsou umístěny v přední části žloutkového váčku. S postupným vývojem dýchá pomocí cév v hřbetní ploutvičce a nakonec žábry (PETROVICKÝ 2014). Postupem času je spotřebován žloutkový váček a ryby začínají přijímat potravu ústy. Vývoj se v této fázi zpomaluje, dotváří se ploutve, ryba se zabarvuje a embryonální vývoj je ukončen (STERBA 1972, NAGEL 2002). Fotografie vývoje embrya dania pruhovaného v čase jsou součástí příloh (viz Příloha č. 1).

### 2.8.2 Larvální vývoj

Po embryonální periodě následuje perioda larvální (tzv. protopterygiolarvální), která začíná s přechodem na exogenní výživu, tedy rozplaváním plůdku. Konec této periody určuje ukončení osifikace osního skeletu, zformování trvalých orgánů a vstřebání embryonálního ploutevního lemu. V této fázi je již jedinec podobný dospělci (GAISLER & ZIMA 2007, DVOŘÁK *et al.* 2014, PETROVICKÝ 2014). Během larvální periody se vyvíjí larvální orgány, které zastupují doposud nevyvinuté konečné orgány dospělého (PETROVICKÝ 2014). Vývoj lze rozdělit na etapy. V první etapě po vykulení má plůdek slabě vyvinuté hrudní ploutve, velký žloutkový váček, zavřená nepohyblivá ústa a střevo nemá dutiny. V tomto období se živí žloutkem. První etapě se také říká fáze rané larvy (ŠMIDT 1955, DVOŘÁK *et al.* 2014). Během druhé etapy se začíná plovací měchýř naplňovat vzduchem. Ploutevní řasa se diferencuje na laloky trupu a ocasu. Dochází ke zvětšování hrudní ploutve a otevírání úst. Ústa začínají být pohyblivá díky tvorbě základů kostí horní a dolní čelisti. Začínají se objevovat zuby a ve střevě vzniká dutina. Díky tomu může plůdek přejít na samostatnou výživu. Proto během třetí etapy dochází k resorpci žloutku. Plůdek je poté lehčí, navíc se zvětšuje i plovací měchýř a to umožňuje lepší pohyblivost a setrvačnost v určité hloubce. Ke kostem horní a dolní končetiny se přidá také kost předčelistní a pravé požerákové zuby. Během další etapy se vyvíjí ploutevní paprsky. V páté etapě je dokončena jejich tvorba. Orgány postranní čáry vytvoří dvě řady na bocích těla. V šesté etapě se již mění možnost výživy. O dost později nastává poslední sedmá etapa, během níž se zvětšuje výška i délka těla plůdku, vyměňují se požerákové zuby, dotváří se střevní klička a orgány postranní čáry se vyvíjejí i na spodní straně těla (ŠMIDT 1955). Poslední etapa je někdy označována jako fáze pozdní larvy a označuje období, kdy jedinec přechází do juvenilní periody (DVOŘÁK *et al.* 2014).

Larvální perioda je kritická pro tropické ryby, tedy i danio pruhované, a je tedy nutné hlídat optimální podmínky chovu a podávat vhodnou potravu. Primární je především dostatečné množství potravy, která nahradí vstřebaný žloutkový váček, jinak larvy rychle hynou. Po překlenutí této fáze larva dorůstá do stádia mladé ryby a není již tolik náchylná (PETROVICKÝ 2014).

### 2.8.3 Juvenilní perioda

Již během larvální periody můžeme u ryb pozorovat periodu smíšené výživy, během níž larva ještě využívá zásob ze žloutkového váčku, ale dokáže již také přijímat potravu



z vnějšího prostředí. Přejít z larvální do juvenilní periody probíhá postupně, tzv. evolutivně (FLOCK 1971). Během této periody se dokončuje vývoj všech tělesných struktur a formuje se tělo dospělého jedince. Konec periody je charakterizován zahájením příprav k dosažení pohlavní dospělosti (FLOCK 1971, DVORÁK *et al.* 2014).

#### **2.8.4 Adultní perioda**

Dosažením pohlavní zralosti začíná adultní perioda, která se vyznačuje intenzivní rozmnožovací aktivitou a značným tělesným růstem. Gonády jsou na počátku periody ve III. stádiu zralosti. Nástupem trvalých příznaků stárnutí končí adultní perioda a jedinec přechází do stádia senescence, tedy stárnutí. Během senescence se postupně snižuje rozmnožování spolu s plodností i kvalitou jiker a perioda je ukončena smrtí jedince (ŠMIDT 1955, DVORÁK *et al.* 2014).

## **3 OECD 236 - „Fish Embryo Acute Toxicity Test“**

### **3.1 Obsah směrnice**

Směrnice OECD 236 popisuje akutní test toxicity na embryích dania pruhovaného. Konkrétně je pozorován vliv testovaných chemikálií na stádia embryonálního vývoje, nikoli pouze mortalita. FET test je založen na předchozích studiích a validacích metod s *Danio rerio* a byl úspěšně aplikován na širokou škálu látek, vykazujících různé mechanismy působení, rozpustnosti a dalších vlastností (OECD 2013a). V rámci Evropské unie vyšla tato metoda v nařízení komise (EU) 2017/735 ze dne 14. února 2017 jako metoda s názvem C.49 Zkouška akutní toxicity na rybích embryích (FET) (EVROPSKÁ KOMISE 2017).

### **3.2 Možnost náhrady za testy na rybách**

FET test nabízí jedinečnou možnost náhrady testování toxicity látek na dospělých ryb. Současná legislativa o ochraně zvířat a požadavky REACH podněcují k hledání alternativních testů, jelikož akutní testování na rybách stále přísnějším požadavkům nevyhovuje. Důvodem je především častá mortalita, která je hlavním ukazatelem toxicity, a předpokládané utrpení testovaných jedinců (NAGEL 2002, LAMMER *et al.* 2009, BELANGER *et al.* 2012). Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 ze dne 18. prosince 2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek se svými výnosy snaží zajistit vysokou úroveň ochrany lidského zdraví a životního prostředí pro současné i budoucí generace a zároveň zachovat konkurenceschopnost chemického průmyslu a udržitelný rozvoj. Základem těchto cílů je princip předběžné opatrnosti, aby se předešlo poškození lidského zdraví a dopadům na životní prostředí. Dalším cílem je podpora náhrady nebezpečných látek látkami méně nebezpečnými. Velmi důležitým bodem je snaha o testování toxicity a ekotoxicity bez pokusů na zvířatech, pokud je to možné (ES 2006).

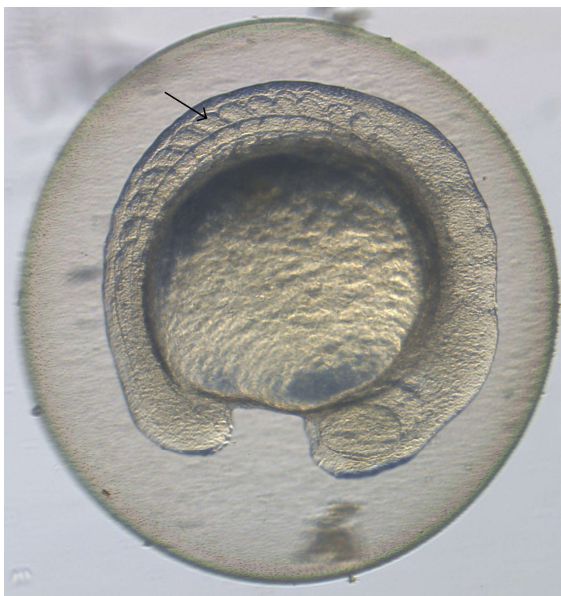
Jako náhrada za akutní testy toxicity na dospělých ryb zatím FET test brán není, ale výzkumy a porovnávání výsledků testovaných látek na embryích a na dospělých ryb ukazují na jejich velmi blízký vztah. Díky tomu by bylo možné využívat výsledky FET testu jako predikci pro toxicitu na dospělých jedincích a eliminovat tak testy na vnímavějších dospělých a později je možná zcela nahradit (LAMMER *et al.* 2009, BELANGER *et al.*

2012). V nezávislém statistickém výzkumu Ratta a Wirtze z roku 2003, ve kterém byly porovnávány výsledky analýz 56 látek pomocí FET testu a testu akutní toxicity na rybách, byla taktéž zjištěna dobrá korelace výsledků ( $R^2 = 0.854$ ;  $\alpha = 0.05$ ). Z výsledků vyplývá dobrý vztah mezi hodnotami  $LC_{50}$  obou testů, méně však pro využití jako predikčního modelu (BRAUNBECK & LAMMER 2006).

V Německu jsou již od roku 2005 povinné testy ekotoxicity odpadních vod na embryích ryb a od té doby se výrazně snížil počet akutních testů toxicity na rybách (NAGEL 2002, BRAUNBECK & LAMMER 2006). Podle dalších výzkumů (LANGE *et al.* 1995, NAGEL 2002) je testování na embryích ryb dokonce i citlivější než testy cytotoxicity na buněčných liniích RTG-2 pstruha duhového, které byly taktéž zkoumány jako možná alternativa k akutním testům toxicity na rybách.

### 3.3 Princip testu

FET test probíhá 96 hodin, během kterých jsou čerstvě oplozené jikry dania pruhovaného vystaveny účinkům testované látky. Každých 24 hodin jsou pozorovány čtyři základní ukazatele letality: koagulace oplodněných jiker, absence tvorby somitů, nedostatečné oddělení ocásku od žloutkového váčku a tlukot srdce. Po ukončení pozorování je jako výsledek testování spočtena hodnota  $LC_{50}$  a další ukazatelé toxicity (OECD 2013a).



Obr. 4: Embryo se zakládajícími se somity 24 hodin po oplození (foto: NALEZINKOVÁ)

### 3.4 Před započítím testu

Před začátkem testu je nutné zjistit si všechny dostupné informace o testované látce, jako je například molekulová hmotnost, rozpustnost ve vodě, stálost, tlak par, biologická rozložitelnost a další. Z rozpustnosti a tlaku par můžeme stanovit Henryho konstantu, která bude indikovat, zda může během testování dojít ke ztrátám vlivem odpařování. Pokud je testovaná látka směs, musí být charakterizovány vlastnosti jednotlivých složek a musí být zváženo, zda poskytne optimální výsledky (OECD 2013a). Důležité je také zhodnotit, zda se nejedná o látky, které jsou aktivovány prostřednictvím metabolismu, jelikož existují důkazy, že embrya dania vykazují biotransformační kapacitu (INCARDONA *et al.* 2011, WEIGT *et al.* 2011). Nicméně, metabolické schopnosti embryí se liší

od dospělých jedinců. Proto, pokud existují náznaky, že metabolity nebo jiné transformační produkty mohou být toxičtější než zkoumaná mateřská látka, doporučuje se provést test nejprve s těmito metabolity či transformačními produkty a zahrnout tyto výsledky do závěrečné toxicity. Molekulová hmotnost hraje také zásadní roli. Pokud zkoumáme látku s molekulovou hmotností vyšší než 3 kDa, popřípadě objemné struktury či látky způsobující zpožděné líhnutí (vykulení), které by mohlo zabránit expozici, neočekáváme citlivost embryí k těmto látkám. Důvodem je omezená biologická dostupnost látky. V těchto případech zvážíme využití jiných testů toxicity (OECD 2013a).

## 4 Použité chemikálie

### 4.1 3,4-dichloranilin

#### 4.1.1 Fyzikální a chemické vlastnosti

3,4-dichloranilin (DCA) je aromatický amin se sumárním vzorcem  $C_6H_5Cl_2N$  a molekulovou hmotností 162,02 g/mol (MONTEIERO *et al.* 2006, MŽP 2009, NIOSH 2014). Bod tání této látky je 72 °C a bod varu 272 °C (MŽP 2009, MERCK 2010). Hustota se pohybuje kolem 1,57 g/cm<sup>3</sup>. Tato látka se vyskytuje především ve formě malých světle hnědých krystalů (MERCK 2010, NIOSH 2014). Rozpustnost těchto krystalů je ve vodě při 20 °C 0,73 g/l (MERCK 2010). 3,4-dichloranilin patří mezi chlorované organické uhlovodíky (MŽP 2009).

#### 4.1.2 Nebezpečné vlastnosti látky a bezpečnost práce

3,4-dichloranilin je hořlavá látka, při jejímž hoření se uvolňují toxické výpary. Z toho důvodu je nutné nenechat se s touto hořlavinou blízkou ohni. Při inhalaci se objevují symptomy jako je zmodrání rtů, kůže, případně i nehtů. Dále pak závratě, bolesti hlavy a nevolnost. Při vyšší dávce je exponovaný člověk zmatený, dochází ke křečím a v poslední řadě upadnutí do bezvědomí. Proto je nutné zabránit disperzi prachu a používat ochranné pomůcky. 3,4-dichloranilin může procházet přes kůži, proto je nezbytné při manipulaci používat rukavice a ochranný oděv. Při zasažení očí dochází k jejich zčervenání, zasažený cítí bolest a jeho vidění je rozmazané. K ochraně očí je dobré při manipulaci s touto látkou používat ochranné brýle, nejlépe štít. Jelikož se po požití objevují silné bolesti břicha, je nutné dbát na zákaz konzumace jídla a pití během práce s touto látkou a po jejím skončení na řádné umytí rukou. Opakovaný nebo dlouhodobý kontakt s 3,4-dichloranilinem může vést k senzibilizaci pokožky a také může mít účinky na krev, které mohou vést k tvorbě methemoglobinu (MERCK 2010, NIOSH 2014).

#### 4.1.3 Toxicita látky

3,4-dichloranilin je velmi toxická látka především pro vodní organismy, ale také pro ostatní obratlovce a bezobratlé (MŽP 2009). Nejvíce je známý svou toxicitou u savců a ryb (CROSSLAND 1990, KHAN *et al.* 1995, VALENTOVIC *et al.* 1997, GUILHERMINO *et al.* 1998). U ryb i savců je prokázán vznik methemoglobinémie (CROSSLAND 1990). Hodnota  $LC_{50}$  pro danio pruhované při 96hodinové expozici byla stanovena na 8,4 mg/l (MERCK 2010). Během testování embryonálních stádií ryb (*Gobiocypris rarus*) docházelo ke vzniku vývojových vad, poruchám činnosti srdce a k velké míře úmrtnosti (ZHU *et al.* 2012). Především u savců byl pozorován toxický účinek na slezinu a hemolytická anémie (GUILHERMINO *et al.* 1998).

#### 4.1.4 Zdroje látky a její využití

Do vodního prostředí se 3,4-dichloranilin může dostávat z výroby spojené s chemickým průmyslem (MŽP 2009). Tato látka je totiž využívána jako meziprodukt při výrobě herbicidů, azobarviv a léčiv (CROSSLAND 1990, LO *et al.* 1994, GUILHERMINO *et al.* 1998). Taktéž vzniká rozkladem některých herbicidů, jako například linuronu, diuronu a propanilu. Může vzniknout i během rozkladu látky využívané v kosmetickém průmyslu - trichlorkarbanilidu (CROSSLAND 1990, GUILHERMINO *et al.* 1998). 3,4-dichloranilin není v České republice vyráběn, ale je sem dovážen minimálně dvěma podniky. Imisní limit pro přípustné znečištění povrchových vod byl pro tuto látku stanoven na 2 µg/l. Hodnoty 3,4-dichloranilinu jsou monitorovány činností ČHMÚ (MŽP 2009).

## 4.2 Dichroman draselný

### 4.2.1 Fyzikální a chemické vlastnosti

Dichroman draselný (potassium dichromate), sumárním vzorcem  $K_2Cr_2O_7$ , je pevná látka oranžové barvy bez zápachu. Tato látka má molární hmotnost 294,14 g/mol, bod tání 398 °C a bod varu větší než 500 °C (ŠVEC 2010, NIOSH 2015). Jedná se o silné oxidační činidlo, které není hořlavé. Relativní hustota se při 20 °C pohybuje kolem 2,69 g/cm<sup>3</sup>. Rozpustnost ve vodě při 20°C je 29,4 g/l (ŠVEC 2010).

### 4.2.2 Nebezpečné vlastnosti látky a bezpečnost práce

Dichroman draselný je žíravý, hrozí tedy poleptání kůže, a proto je nutné používat rukavice a ochranný oděv. Potřeba jsou také ochranné brýle nebo štít, jelikož dichroman dráždí oční sliznici (ŠVEC 2010, NIOSH 2015). Při zasažení oka dochází k jeho zarudnutí, bolestem a rozmazanému vidění. Zasažení očí může vést k těžkým popáleninám (NIOSH 2015). Při inhalaci může tato látka vyvolat silnou respirační alergickou reakci (MASTER *et al.* 1993, ŠVEC 2010). Po vdechnutí cítí poškozený pocit pálení, bolet v krku je doprovázena kašlem a dýchavičností (NIOSH 2015). Tato chemikálie mimořádně poškozují sliznice horních cest dýchacích (ŠVEC 2010). Nejedná se o hořlavinu, ale dokáže zlepšit hoření jiných látek (NIOSH 2015).

Dichroman draselný je z hlediska mutagenity řazen do kategorie 1B, je u něho tedy podezření na genetické poškození. Do kategorie 1B je řazen také z hlediska karcinogenity, může tedy vyvolat rakovinu (PATLOLLA *et al.* 2009, ŠVEC 2010, NIOSH 2015). Taktéž je cytotoxický, teratogenní a při prodloužené nebo opakované expozici může poškodit orgány (PATLOLLA *et al.* 2009, ŠVEC 2010). Při požití této látky se výrazně projeví její toxicita. Intoxikovaný má krvavé průjmy, zvracení doprovází křeče, následně dochází k selhání oběhu a bezvědomí. Může dojít k trvalému poškození jater a ledvin (ŠVEC 2010, NIOSH 2015). Dlouhodobá nebo opakovaná expozice může způsobit senzibilizaci pokožky a astma. Vzhledem k účinkům látky na dýchací cesty může dojít k perforaci nosní přepážky (NIOSH 2015).

### 4.2.3 Toxicita látky

Hodnota LD<sub>50</sub> u samic krys byla při orálním podání stanovena na 90,5 mg/kg, u samců na 168 mg/kg. Při dermální intoxikaci hodnoty LD<sub>50</sub> přesahovaly 2000 mg/kg. Toxicita pro ryby testovaná na druhu *Lepomis macrochirus* při 96hodinové expozici dosahovala hodnot LC<sub>50</sub> 0,131 mg/l. EC<sub>50</sub> pro druh *Daphnia magna* vyšla 0,035 mg/l při 48hodinové expozici. Během testů byla prokázána možnost akumulace látky v organismu. Dichroman

draselný je jednoznačně vysoce toxický pro vodní organismy a může dlouhodobě nepříznivě působit na životní prostředí (ŠVEC 2010).

#### **4.2.4 Zdroje látky a její využití**

Dichroman draselný se široce využívá v průmyslovém odvětví (ARIVARASU *et al.* 2008). Nesmí v žádném množství přijít do kanalizací, nesmí být vypouštěn do půdy nebo do blízkosti vodotečí a vodních zdrojů (ŠVEC 2010).

### **4.3 Acid Yellow 25**

#### **4.3.1 Fyzikální a chemické vlastnosti**

Látka Acid Yellow 25 má sumární vzorec  $C_{23}H_{20}N_5NaO_6S_2$  (EPA 1979, NCBI 2017). Molární hmotnost této látky je 549,552 g/mol. Název v původním znění dle IUPAC je Sodium 4-[3-methyl-4-[[4-methyl-3-(phenylsulfamoyl)phenyl]diazenyl]-5-oxo-4H-pyrazol-1yl]benzen-sulfonate (NCBI 2017). Jedná se o žluto oranžový prášek, který má žlutou barvu po rozpuštění ve vodě. Je mírně rozpustný v ethanolu a acetonu (WDV 2012). Ve vodě byla rozpustnost při 90 °C stanovena na 30 g/l (SYNTHESIA 2011).

#### **4.3.2 Nebezpečné vlastnosti látky a bezpečnost práce**

Četné výzkumy se zabývají odstraňováním reziduí barviv z odpadních vod, jelikož odpadní voda z textilního průmyslu je jednou z nejproblémovějších průmyslových odpadních vod. Zejména kyselá textilní barviva, mezi něž patří i Acid Yellow 25, jsou charakterizována vyšší potřebou biologické a chemické oxidace. Syntetický původ a komplexní aromatické struktury barviv navíc znesnadňují jejich biodegradaci (ŞAŞMAZ *et al.* 2011). Obecně barviva ve vodách snižují průnik slunečního světla do vody a potažmo tak negativně působí na fotosyntetickou aktivitu vodních organismů a obsah kyslíku (BANAT *et al.* 1996). Chemické znečištění tohoto typu patří k hlavním ekologickým problémům a nese s sebou rizika pro zdraví člověka toxickými, mutagenními a karcinogenními účinky (CHUNG *et al.* 1992). V souvislosti s azobarvivy se mluví především o mutacích a rakovině močového měchýře (CHEMWATCH 2010).

Vzhledem k nedostatečnému počtu testů na zvířatech nebyla látka Acid Yellow 25 klasifikována jako nebezpečná při požití. Taktéž se nepředpokládá, že je materiál dráždivý pro oči, ale přímý kontakt s oční sliznicí může být přechodně nepříjemný. Na zvířatech již byla testována reakce kůže při styku s touto látkou. Přestože byl výsledek negativní, doporučuje se při manipulaci použití rukavic a zabránění styku látky s narušenou pokožkou. Předpokládá se, že Acid Yellow 25 nemá nepříznivé zdravotní účinky při jeho inhalaci (proběhly testy na zvířatech), ale u osob s poruchami dýchacích funkcí může inhalace nadměrné koncentrace částic způsobit zdravotní potíže. Častější inhalace může způsobit chronické onemocnění, jako např. pneumokoniózy, které snižují plicní funkci (CHEMWATCH 2010).

#### **4.3.3 Toxicita látky**

O látce Acid Yellow 25 zatím nebyly publikovány informace o její toxicitě pro člověka. Z hlediska ekotoxicity naznačuje analýza více než 200 kyselinových barviv, že některá barviva obsahující monokyseliny a dikyseliny vykazují u ryb a vodních organismů střední až vysokou toxicitu (akutní hodnoty < 100 mg/l). Barviva se třemi a více kyselými skupinami vykazují nízkou toxicitu (akutní hodnoty > 100 mg/l) vůči rybám

a bezobratlým. Všechna kyselá barviva vykazují mírnou toxicitu vůči zeleným řasám. Účinky na řasy však nejsou výsledkem přímé toxicity, ale představují především nepřímý účinek v důsledku stínění. Nebezpečí pro člověka přináší potenciální bioakumulace v potravním řetězci. Ta je však vzhledem k vlastnostem barviv považována za nízkou. Některá kyselá barviva mohou být akutně toxická pro vodní organismy (ryby, korýše, řasy a bakterie). Neiontová barviva jsou považována za toxická nebo potenciálně toxická (CHEMWATCH 2010).

#### **4.3.4 Zdroje látky a její využití**

Acid Yellow 25 patří mezi kyselá barviva a využívá se pro potisk a barvení látek, především vlny a polyamidových vláken. Někdy se také využívá k nátěrům papíru (WDV 2012). Na trh dodává toto barvivo například společnost Synthesia, a.s. pod názvem egacidová žluť R (SYNTHESIA 2011).

### **4.4 Reactive Yellow 85**

#### **4.4.1 Fyzikální a chemické vlastnosti látky**

Látka Reactive Yellow 85 patří mezi trojvazné sodné soli a její molekulová hmotnost dosahuje hodnoty 975,67 g/mol (KOPECKÝ & MIKULÁŠEK 2005). Sumárním vzorcem je Reactive Yellow 85 zapisován následovně  $C_{27}H_{22}Cl_2N_{14}Na_2O_9S_2$ . Vyskytuje se ve formě žlutého prášku, jehož rozpustnost ve vodě při 20 °C je 200 g/l (WDV 2012a). Podle IUPAC je tato látka v původním jazyce nazývána Trisodium 4-[[4-[[3-[[4-amino-6-chloro-1,3,5-triazin-2-yl]amino]-4-sulfonatophenyl]amino]-6-chloro-1,3,5-triazin-2-yl]amino]-6-[(5-carbamoyl-1-ethyl-2-hydroxy-4-methyl-6-oxo-1,6-dihydropyridin-3-yl)diazetyl]benzene-1,3-disulfonate (SYNTHESIA 2011a).

#### **4.4.2 Nebezpečné vlastnosti látky a bezpečnost práce**

Pro Reactive Yellow 85 platí stejná obecná charakteristika nebezpečnosti jako pro Acid Yellow 25, jelikož se také jedná o kyselá textilní barvivo (ÇABU *et al.* 2013).

#### **4.4.3 Toxicita látky**

O látce Reactive Yellow 85 zatím nebyly publikovány informace o její toxicitě. Reaktivní barviva o vysoké koncentraci (> 100 mg/l) obecně nejsou považována za toxická pro vodní organismy (CHEMWATCH 2010).

#### **4.4.4 Zdroje látky a její využití**

Reactive Yellow 85 je reaktivní azobarvivo, které se používá pro barvení a potisk především bavlněných látek, může být však použito i pro hedvábí a další druhy látek (WDV 2012a). Na trh je toto barvivo dodáváno například společnostmi Synthesia, a.s. pod názvem ostazinová žluť H-8G (SYNTHESIA 2011a).

## 5 Metodika

### 5.1 Materiál a pomůcky

K provedení FET testu bylo potřeba využít následujících pomůcek a materiálu:

- ❖ Přístroj na měření koncentrace kyslíku (WTW 730)
- ❖ Přístroj na měření pH (WTW 539)
- ❖ Zařízení pro stanovení tvrdosti vody
- ❖ Zařízení pro kontrolu teploty
- ❖ Nádrže vhodné kapacity vyrobené z inertního materiálu
- ❖ Sterilní 24jamkové mikroadestičky o hloubce jamek 20 mm
- ❖ Inkubátor nebo klimatizovaná laboratoř
- ❖ Petriho misky, skleněné kádinky různých objemů a další laboratorní sklo
- ❖ Pipety různých objemů
- ❖ Vytírací nádrže s roštem rozdělené přepážkou
- ❖ Vytírací mističky opatřené sítkou s umělou rostlinou
- ❖ Stereomikroskop s minimálním zvětšením 80x
- ❖ Potřebné chemikálie

### 5.2 Chov testovaného organismu pro FET test

K výzkumu byly využity ryby druhu *Danio rerio* z akreditovaného chovu z Českých Budějovic. Ryby byly v laboratoři chovány v zařízení ZEBTEC BENCHTOP (Zebrafish housing system) od firmy TECNIPLAST.



Obr. 5: Chovné zařízení ZEBTEC BENCHTOP (foto: NALEZINKOVÁ)



Zařízení ZEBTEC BENCHTOP hlídá a automaticky upravuje kvalitu vody (pH, teplotu, konduktivitu) podle nastavení uživatele a zajišťuje její neustálou filtraci. ZEBTEC je složen ze dvou řad nádrží. Ve spodní řadě se nachází větší nádrž o objemu 6 l, v horní řadě nádrž o objemu 3,5 l. Na zařízení byla nastavena konduktivita 700  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , teplota 26 °C a pH 7,2.

Ryby byly krmeny třikrát denně sušeným krmivem značky Tetramin. Postupně bylo přidáváno také mražené krmivo (nitěnky, žábronožky, patentky, dafnie). To bylo podáváno až třikrát do týdne a jednou za týden byly ryby krmeny žábronožkami *Artemia salina* z chovného zařízení Artemia set.

### 5.3 Produkce jiker

Na začátku výzkumu byl testován nejefektivnější způsob produkce jiker. První tření probíhala tak, že byla obě pohlaví den před plánovaným třením umístěna do vytírací nádrže. Tato nádrž byla opatřena mřížkou na dně, která sloužila k ochraně jiker před požerem rybami. Dále byla nádrž rozdělena přehradkou na dvě poloviny. Samice a samci byli díky přepážce stále odděleni. Voda použitá k vytírání byla odebrána ze zařízení ZEBTEC. Takto připravené nádrže se spolu s rybami přes noc překryly a umístily do místnosti vyhřívané na stálých 26 °C.



Obr. 6: Vytírací nádrž s rybami doplněná o rostliny (foto: NALEZINKOVÁ)

Ráno byly vytírací nádrže odkryty, osvětleny a oddělovací přepážka byla odstraněna. Vytírací nádrže byly umístěny ve sklonu 45° na tmavé podložky. Takto připravené ryby k vytírání byly ponechány v klidu alespoň půl hodiny a následně bylo v půlhodinovém intervalu kontrolováno, zda již došlo ke tření.

V další fázi výzkumu byl testován delší časový úsek oddělení pohlaví ryb. Ryby byly do vytírací nádrže umístěny již tři dny před plánovaným třetím a na konci pracovního dne zakryty. Po třech dnech (na začátku pracovního týdne) byly odkryty, byla odstraněna přepážka, vyměněna voda a nádrže byly umístěny na tmavé podložky ve sklonu 45°. Následně byla tato metoda nahrazena za oddělení pohlaví 1-2 týdny před plánovaným třením v chovném zařízení ZEBTEC v oddělených nádobách. Tyto ryby byly umístěny do vytírací nádrže v den plánovaného třetí a po hodině zatemnění byly vpuštěny k sobě.



Některé vytírací nádrže byly doplněny o umělé rostliny, které sloužily ke stimulaci tření. Bylo vyzkoušeno několik variant poměru pohlaví ve vytíracích nádržích od 1:1 do 4:4 a různý věk ryb od 3 do 20 měsíců.

Později byl k metodice tření přidán krok výměny vody ve vytíracích nádržích. Maximálně po dvou hodinách byly vyměněny 2/3 vody za čerstvou vodu ze zařízení ZEBTEC vyhřátou na 27 °C. Taktéž bylo přidáno další osvětlení vytíracích nádrží a byl testován vliv slunečního záření. To bylo provedeno tak, že byly některé vytírací nádrže umístěny do místnosti, kam nedopadá přímé sluneční světlo. Zbytek nádrží byl umístěn v osluněné místnosti.

V poslední fázi výzkumu byl souběžně s rybami ve vytíracích nádržích využit další model získávání jiker. Z plastových a skleněných Petriho misek o průměru 60 a 90 mm, sítky a umělých rostlin byly vyrobeny vytírací mističky. Ze sítky s průměrem ok 5 mm byla vystřižena kolečka o stejném průměru, jako měly Petriho misky, a následně byla jednotlivá kolečka připevněna pomocí tavné pistole k příslušné Petriho misce. K síťce byl následně upevněn trs v horní části spojených umělých rostlin. Takto připravené mističky byly umístěny na dno jednotlivých nádrží chovného zařízení ke zbylým rybám neodděleného pohlaví ráno v den plánovaného tření nebo již odpoledne předtím. Mističky byly každou půl hodinu kontrolovány, zda se v nich neuchytily jikry.



Obr. 7: Vytírací mističky (foto: NALEZINKOVÁ)

Během výzkumu byla testována také možnost *in vitro* fertilizace. Zásadním krokem k této metodě bylo určení správné anestezie, jelikož v literatuře o anestezii konkrétně dania pruhovaného a především o dávce anestetik mnoho není. Anestetikum MS 222 nebylo využito vzhledem k vysokým finančním nákladům. K našim účelům bylo využito hřebíčkového oleje z Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Ryby, které byly určeny k *in vitro* fertilizaci, byly den předem odděleny v samostatných nádržích a nedostaly krmení. Vybráni byli větší samci a samice se zvětšeným bříškem. Další den byly testovány různé koncentrace od velmi malých dávek s postupným zvyšováním a zaznamenáváním účinku anestezie podle reakcí ryb. Pro jednotlivé koncentrace byla vždy využita nová ryba o podobných rozměrech. Nikdy tedy nebyla tatáž ryba vystavena účinkům anestetik

opakovaně, aby nebyla ohrožena na zdraví a nedošlo ke zkreslení výsledků. Anestetická lázeň byla připravována tak, že se nejprve odměřená dávka hřebíčkového oleje rozmíchala v malém množství vody a poté se přidala do lázně ve skleněné kádince. Poté se kádinka umístila na míchačku a roztok se nechal alespoň hodinu míchat.

Po určení vhodné dávky anestetik byl testován odběr mlíčí a jiker. První byly získávány spermie. Uspaný samec byl pomocí plastové lžice odebrán z hřebíčkové lázně, opláchnut v další kádince s vodou ze zařízení ZEBTEC a umístěn břichem vzhůru do úzké štěrbině ve vlhké houbě, která byla položena v Petriho misce. Oblast genitálií byla osušena pomocí vatové tyčinky. Pomocí hladkých kleští bylo co nejjemněji zmáčknuto břicho ryby. Případné mlíčí, které by vyšlo ven, mělo být odsáto pomocí mikrokapiláry jemným sáním a uloženo v Hankově roztoku (složení viz kap. 3.7.8) maximálně po dobu 90 minut. Na začátku světelného cyklu byl proveden pokus se získáním jiker. Samice byla uspana v anestetické lázni, vyjmuta pomocí umělé lžice a opláchnuta v čisté vodě ze zařízení ZEBTEC. Ryba byla následně lehce osušena buničinou a vložena do Petriho misky o průměru 35 mm. Vlhkými prsty bylo jemným tlakem přejížděno přes břicho od přední části až po ocasní. Ryba byla následně uložena do kádinky s čistou vodou a případně získané jikry byly smíchány se suspenzí mlíčí a Hankova roztoku.

#### 5.4 Nasazení destiček

V případě úspěšného tření, byly jikry co nejdříve odebrány z vytírací nádrže pomocí plastové pipety o objemu 2,5 ml s odříznutým hrotem pro zvětšení sacího otvoru. Následně byly jikry důsledně propláchnuty pomocí sítky alespoň 1 litrem vody ze zařízení ZEBTEC, případně ředící vodou. Poté byly umístěny do Petriho misky s ředící vodou a pomocí stereolupy byly vybrány pouze životaschopné nezkoagulované jikry na počátku dělení. Tyto jikry byly co nejdříve nasazeny pomocí pipet do 24jamkových mikrodestiček s testovanou látkou. Do jedné jamky byla umístěna vždy jedna jikra. Dvacet jamek mikrodestičky bylo naplněno danou koncentrací testované látky a zbylé čtyři jamky byly naplněny ředící vodou a sloužily jako kontrola destičky, kde byla pro platnost destičky povolena mortalita maximálně jednoho embrya. Pokud byl získán dostatečný počet jiker, bylo nasazeno minimálně pět mikrodestiček s různými koncentracemi testované látky. Jednotlivé jamky mikrodestiček byly plněny 1 - 2 ml testovaného roztoku. Mimo koncentrační řadu testované látky byly nasazeny také dvě kontrolní destičky. Jako pozitivní kontrola byla využita referenční látka 3,4-dichloranilin o koncentraci 4 mg/l. Destička s pozitivní kontrolou byla nasazena stejným způsobem jako testované koncentrace, tedy dvacet jamek s 3,4-dichloranilinem a kontrolní čtyři jamky naplněné ředící vodou. Jako negativní kontrola sloužila standardní ředící voda, která byla ve všech jamkách destičky, o následujícím složení (podle ISO 7346-1 a ISO 7346-2):

- ❖ 294,0 mg/l dihydrátu chloridu vápenatého ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )
- ❖ 123,3 mg/l heptahydrátu síranu hořečnatého ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ )
- ❖ 63,0 mg/l hydrogenuhličitanu sodného ( $\text{NaHCO}_3$ )
- ❖ 5,5 mg/l chloridu draselného (KCl)

Takto nasazené destičky byly ponechány k inkubaci v místnosti se stálou teplotou 26 °C a po 24 hodinách byly odečteny první výsledky pozorování.

#### 5.4.1 Příprava 3,4-dichloranilinu pro FET test

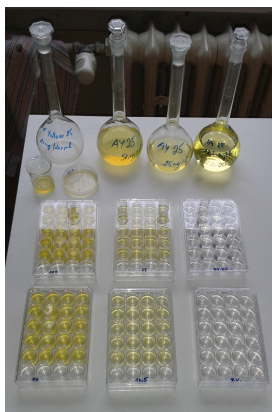
Pro nasazení FET testu pro 3,4-dichloranilin byla stanovena koncentrační řada: 3,6 mg/l, 2,6 mg/l, 1,9 mg/l, 1,4 mg/l a 1 mg/l. Namíchaný zásobní roztok 3,4-dichloranilinu byl několik hodin před přípravou dalších koncentrací a nasazením testu důsledně promíchán na míchačce kvůli snížené rozpustnosti látky ve vodě. Po vytemperování roztoků v mikroadestičkách na 26 °C byly nasazeny jikry.

#### 5.4.2 Příprava dichromanu draselného pro FET test

Dichroman draselný byl pro FET test namíchán v koncentracích 80 mg/l, 100 mg/l, 120 mg/l, 140 mg/l, 160 mg/l a 180 mg/l. Jelikož se jednalo o velmi dobře rozpustnou látku, nebylo nutné použití míchaček.

#### 5.4.3 Příprava Acid Yellow 25 pro FET test

Pro žlutou barvu Acid Yellow 25 byla stanovena následující koncentrační řada: 100 mg/l, 50 mg/l, 25 mg/l a 12,5 mg/l. Jelikož je tato látka velmi špatně rozpustná, bylo před nasazením testu zapotřebí míchačky a ultrazvuku po dobu několika hodin.



Obr. 8: Nasazené mikroadestičky pro test látky AY 25 (foto: NALEZINKOVÁ)

#### 5.4.4 Příprava Reactive Yellow 85 pro FET test

Pro nasazení FET testu pro barvu Reactive Yellow 85 byly namíchány koncentrace 100 mg/l, 50 mg/l, 25 mg/l, 10 mg/l, 5 mg/l a 1 mg/l. Díky dobré rozpustnosti nebylo nutné dlouhodobé míchání.

### 5.5 Hodnocení kritérií

Po 24hodinových intervalech (tedy 24, 48, 72 a 96 hodin po oplození) bylo pomocí stereomikroskopu LEICA S8APO s fotoaparátem LEICA MC170 HD hodnoceno pozorování čtyř základních kritérií:

#### 5.5.1 Koagulace bílkovin

Zkoagulované jikry byly rozpoznány i pouhým okem díky mléčně bílé barvě jasně odlišné od průhledného obalu správně se vyvíjejícího embrya. Zkoagulované jikry pozorované pod mikroskopem byly zbarveny do tmavého odstínu.

### 5.5.2 Oddělení ocasu od žloutkového vaku

Jako další kritérium bylo pozorováno oddělení ocasu embrya od žloutkového vaku. Tento jev byl dobře pozorovatelný především u embryí vykazujících pohyb. Ocas se odděluje nejdříve za 24 hodin od oplození.

### 5.5.3 Činnost srdce

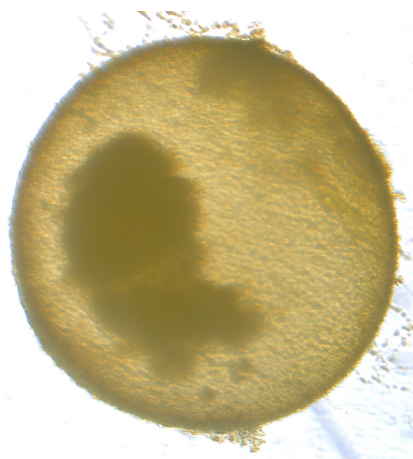
Činnost srdce byla hodnocena vždy až po 48 hodinách po oplození. V případě, že byla pozorována činnost srdce bez cirkulace krve aortou, nebyl tento stav považován za letální. Jako letální ukazatel nebyl brán ani nepravidelný či slabý tlukot srdce. Pokud nebyla zaznamenána žádná aktivita srdce, musela být tato skutečnost ověřena alespoň minutovým pozorováním pod minimálním zvětšením 80x. Teprve poté mohlo být embryo označeno za mrtvé.

### 5.5.4 Tvorba somitů

Jako další kritérium byla hodnocena tvorba somitů (prvosegmentů). K dobrému rozpoznání tvorby somitů i při menším zvětšení sloužily spontánní pohyby embrya, které jejich tvorbu indikují. U správně se vyvíjejícího embrya bylo již po 24 hodinách inkubace vytvořeno kolem dvaceti somitů. Pokud nebyly somity dotvořeny po 48 hodinách, bylo embryo považováno za mrtvé.

### 5.5.5 Vykulení

Dále bylo zaznamenáváno vykulení, přestože již nepatří k hlavním kritériím potřebným pro výpočet hodnoty  $LC_{50}$ . Vykulení bylo zaznamenáváno nejdříve po 48 hodinách inkubace.



Obr. 9: Zkoagulovaná jikra (foto: NALEZINKOVÁ)

## 5.6 Měření fyzikálně-chemických parametrů

Na začátku a na konci testu byly měřeny následující parametry u ředící vody, 3,4-dichloranilinu a alespoň u nejvyšší koncentrace testované látky:

### 5.6.1 pH

Hodnoty pH byly měřeny pomocí přístroje WTW 539 s elektrodou SenTix 81.

### 5.6.2 Tvrdost

Tvrdost roztoků byla stanovována podle normy ČSN IS 6059 pomocí odměrné metody s EDTA. Nejprve bylo naměřeno 20 ml měřeného vzorku, k tomu bylo přidáno 30 ml destilované vody. Tento roztok byl přelit do titrační baňky o objemu 250 ml a pomocí pipety byly přidány 4 ml tlumivého roztoku a 3 kapky indikátoru eriochromčerně. Takto připravený roztok byl ihned titrován za stálého míchání roztokem EDTA z byrety. Po vymizení fialové barvy roztoku byla zaznamenána spotřeba EDTA a spočítána tvrdost pomocí vzorce:

$$C_{Ca+Mg} = (C_1 \cdot V_3) / V_0$$

kde  $c_1$  je koncentrace roztoku EDTA (mmol/l),  $V_0$  je zkoušený objem vzorku (ml) a  $V_3$  je spotřeba roztoku EDTA k titraci (ml).

Stejný postup byl zopakován znovu se stejným vzorkem a výsledná tvrdost byla vypočtena jako průměr obou výsledků. Výsledek byl vyjádřen v mmol/l.

### 5.6.3 Konduktivita

Konduktivita byla měřena pomocí přístroje Mettler Toledo FE 30 se sondou Cela LE 703 po předešlé kalibraci pomocí KCl při 25 °C. Výsledky byly uvedeny v  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

### 5.6.4 Nasycení kyslíkem

Nasycení kyslíkem bylo měřeno pomocí oximetru WTW 730 se sondou Cell Ox 325 v jednotkách mg/l.

### 5.6.5 Splnění podmínek

Tvrdost ředící vody se musela pohybovat v rozmezí 100-300 mg/l  $\text{CaCO}_3$ . Hodnota pH musela být v rozmezí 6,5 - 8,5 a v průběhu celého testu se nesměla změnit o více než 1,5 jednotek. Pokud se předpokládala významná změna pH během testu, musela být jeho hodnota upravována pomocí NaOH nebo HCl.

## 5.7 Validace FET testu

K validaci testu bylo třeba splnit všechny následující podmínky:

- ❖ Celková míra oplození jiker by měla být vyšší než 70 %.
- ❖ V průběhu celého testu musí být teplota v jamkách mikrodestiček  $26 \pm 1$  °C.
- ❖ Celkové přežití v negativní kontrole (ředící voda) na konci testu musí být  $\geq 90$  %.
- ❖ Celková mortalita v pozitivní kontrole (3,4-dichloranilin) na konci testu musí být minimálně 30 %.
- ❖ V negativní kontrole na konci testu musí být vykuleno  $\geq 80$  % embryí.
- ❖ Nasycení kyslíkem by mělo být na konci testu u negativní kontroly a u nejvyšší koncentrace testované látky  $\geq 80$  %.

## 5.8 Vyhodnocení FET testu

Po 96 hodinách inkubace a pozorování byly znovu změřeny hodnoty pH, nasycení kyslíkem, konduktivita a tvrdost u negativní a pozitivní kontroly a u nejvyšší koncentrace testované látky. Následně byly vyhodnoceny průběžné výsledky, stanovena hodnota LC<sub>10</sub>, LC<sub>20</sub>, LC<sub>50</sub>, LOEC a NOEC pomocí programu ToxRat Professional Version 3.2.1.

## 5.9 Test akutní toxicity na rybách

Test akutní toxicity na rybách byl prováděn podle směrnice OECD 203 s úpravou počtu testovaných koncentrací. Bylo využito rozšířeného limitního testu s navýšením o jednu testovanou koncentraci. Test byl proveden pro porovnání s výsledky získaných z FET testu.

### 5.9.1 Materiál a pomůcky

Pro průběh testu akutní toxicity byly využity následující pomůcky a materiál:

- ❖ Přístroj na měření koncentrace kyslíku (WTW 730)
- ❖ Přístroj na měření pH (WTW 539)
- ❖ Zařízení pro stanovení tvrdosti vody
- ❖ Zařízení pro kontrolu teploty
- ❖ Nádrže vyrobené z inertního materiálu a vhodné kapacity
- ❖ Potřebné chemikálie
- ❖ Běžné laboratorní vybavení (kádinky, odměrné baňky, pipety atd.)

### 5.9.2 Testovaný organismus a jeho chov

Pro testování byl vybrán druh *Poecilla reticulata*, který byl chován v laboratorních podmínkách minimálně 12 dní před začátkem testu. Týden před testem byly ryby přesunuty do vody, která byla následně využita během celého testu. Ryby byly chovány při světelné periodě 12 - 16 hodin s teplotou vody 21 - 25 °C a obsahem kyslíku vyšším než 80 % saturace vzduchu. Krmění bylo podáváno denně a 24 hodin před testem bylo přerušeno. Pro chov byla využita voda s hlídanou kvalitou. Tvrdost se musela pohybovat v rozmezí 10 až 250 mg/l CaCO<sub>3</sub> a pH v hodnotách mezi 6 - 8,5.

### 5.9.3 Příprava Acid Yellow 25 pro test akutní toxicity na rybách

Pro test akutní toxicity na rybách byly namíchány koncentrace 50 mg/l a 100 mg/l látky Acid Yellow 25. K ředění roztoků byla využita standardní ředící voda. Z důvodu špatné rozpustnosti látky bylo nutné míchání roztoku po dobu několika hodin. Bylo využito méně testovaných koncentrací z důvodu snahy o snížení počtu testovaných organismů a z důvodu předpokládané nízké toxicity látky po předchozím testování akutní toxicity na rybách.

### 5.9.4 Příprava Reactive Yellow 85 pro test akutní toxicity na rybách

Pro testování látky Reactive Yellow 85 pomocí testu akutní toxicity na rybách byly namíchány koncentrace 50 mg/l a 100 mg/l. K ředění roztoků byla využita standardní ředící voda. Jelikož byla látka velmi dobře rozpustná ve vodě, nebyly nutné žádné další

postupy. Stejně jako u Acid Yellow 25 byl z totožných důvodů snížen počet testovaných koncentrací na dvě.

### 5.9.5 Průběh testu akutní toxicity na rybách

Test probíhal v inertních nádržích s maximálním zatížením 1 g ryby na litr vody. Pro každou koncentraci a negativní kontrolu bylo nasazeno sedm zdravých ryb, které nevykazovaly abnormální chování. Světelná perioda byla stejná jako při běžném chovu. Teplota byla udržována v hodnotě  $22 \pm 2$  °C. Ryby nebyly během testu krmeny. Ryby byly ponechány v klidu v nerušené místnosti, aby nebylo ovlivněno jejich chování. Mortalita a případné změny chování či vzhledu ryb byly odečítány po 2, 24, 48, 72 a 96 hodinách expozice. Ryby byly považovány za mrtvé v případě nulového pohybu žaber a žádné reakce při dotyku. Byly zaznamenány případné abnormality jako ztráta rovnováhy, zpomalený nebo naopak zrychlený pohyb, respirační funkce, pigmentace apod. Ve stejných intervalech byly měřeny fyzikálně-chemické parametry všech testovaných koncentrací i negativní kontroly. Bylo měřeno pH a obsah kyslíku. Dále byla zaznamenávána teplota vzduchu v laboratoři. Po 96 hodinách expozice byly odečteny poslední výsledky, zpracovány všechny hodnoty a spočtena hodnota  $LC_{50}$ ,  $LOEC$  a  $NOEC$ .



Obr. 10: Nasazený test akutní toxicity pro RY 85 a AY 25 (foto: NALEZINKOVÁ)

### 5.9.6 Validace testu akutní toxicity na rybách

Test byl validní pouze v případě, že byly splněny následující podmínky:

- ❖ V negativní kontrole nesmělo uhynout více ryb než jedna.
- ❖ Během testu musely být udržovány konstantní podmínky. Pokud by tuto podmínku nebylo možné splnit, bylo nutné využít semistatické nebo průtokové postupy.
- ❖ Koncentrace rozpuštěného kyslíku musela být nejméně 60% hodnota nasyceného vzduchu během celého testu.

## 6 Výsledky

### 6.1 Chov testovaného organismu

Jelikož ryby krmené pouze suchým krmivem nevykazovaly dostatečnou vitalitu, nebyly výrazně zbarvené k odlišení pohlaví a samičkám se nenadouvala břítka jikrami, bylo postupně k suchému krmivu přidáváno také mražené krmivo a živé artemie. Při podávání této stravy alespoň třikrát do týdne se stav ryb a jejich produktivita znatelně zvýšila.

### 6.2 Produkce jiker

První z testovaných variant produkce jiker s překrytím přes noc nepřinesla dostačující výsledky. Ryby se většinou první den vůbec nevytřely, nebo jen velmi malý počet a s nízkou produktivitou. Nejčastěji se při této metodě vytřely až druhý den, tedy po jedné noci ve tmě, kdy byla pohlaví oddělená a druhé noci ve tmě, kdy již byly ve třecí nádrži společně samci i samice bez prepážky.

Třídenní pobyt ve třecích nádržích při odděleném pohlaví přinesl lepší výsledky ohledně produktivity, ale tento způsob získání jiker nebyl pro ryby vhodný. Vzhledem k menší velikosti nádrže, která nebyla vybavena filtrací, docházelo k občasnému úhynu některé z ryb. Proto byla tato varianta zavržena.

Nejefektivnější bylo oddělení pohlaví ryb 1-2 týdny před plánovaným třením v chovném zařízení ZEBTEC. Samičkám se začaly více tvořit jikry a samci byli lépe připraveni ke tření. Tímto způsobem byla zvýšena produktivita ryb a třel se jich také větší počet.

Více se vytíraly ryby umístěné v nádržích s umělými rostlinami. Ke tření však docházelo i v nádržích, které rostlinami opatřeny nebyly, ovšem méně často.

Tab. 1: Úspěšnost tření různých poměrů pohlaví ryb

Poměr pohlaví (samice:samec)	Četnost nasazení	Četnost vytření	Procentuální úspěšnost tření
1:2	25	5	20,0 %
2:2	7	1	14,3 %
2:3	19	3	15,8 %
2:4	5	3	60,0 %
3:3	7	6	85,7 %
3:4	22	12	54,5 %
4:4	16	2	12,5 %

Nejčastěji se třely ryby v poměru 3:3 (samice:samec) a to v 85,7 % případů nasazení tohoto poměru. Časté tření bylo také pozorováno u poměru 2:4, které bylo úspěšné v 60 % případů. Více jak 50% úspěšnost vykazoval také poměr 3:4. Naopak nejméně se třely ryby v poměru pohlaví 4:4, pouze 12,5 % případů nasazených v tomto poměru. Podobně málo produktivní bylo nasazení poměrů 2:2 a 2:3 (viz Tab. 1).

Významný byl také věk ryb použitých ke tření. Příliš mladé ryby ve věku kolem tří měsíců se netřely téměř vůbec. Stejně tak příliš staré ryby ve vyšším věku než jeden a půl roku nebyly dostatečně produktivní, ale ke tření docházelo. Nejvíce se třely ryby ve věku okolo jednoho roku.



Test vlivu výměny vody ve vytíracích nádržích za čerstvou a teplejší přinesl dobré výsledky. Některé ryby se vytřely do několika minut po výměně vody. K tomu docházelo především v ranních a dopoledních hodinách, pozdější výměna vody nepřinesla žádný výrazný efekt.

Přidané umělé osvětlení zvýšilo produktivitu taktéž především v ranních hodinách. Testování přemístění vytíracích nádrží do více prosluněné místnosti nepřineslo žádné znatelné zlepšení v produktivitě ryb. Naopak se ryby více třely v deštivém nebo bouřlivém počasí.

Pokus s vytíracími mističkami umístěnými v chovném zařízení byl úspěšný. Během necelé hodiny bylo několik mističek naplněno desítkami jiker. Při opakování pokusu po několika dnech bylo tření také úspěšné, ale již ne v takovém množství. Záleželo na aktuálním stavu a vitalitě ryb.

Testování vhodné koncentrace hřebíčkového oleje k anestezii bylo započato koncentrací 0,020 ml/l. Do pěti minut po vložení ryby do této lázně došlo ke zpomalení pohybů a ryba se držela při dně kádinky a neplavala. Po dalších deseti minutách byl stav stále stejný. Ryba byla navrácena do čisté vody a do dvou minut znovu normálně plavala. Následně byla vystavena koncentraci 0,025 ml/l jiná ryba stejné velikosti. Po jedné minutě začala plavat zrychleně, po dvou minutách přestala plavat a držela se u dna. V dalších pěti minutách ryba sice plavala, ale již na boku a po celé kádince. Po osmi minutách od vložení do lázně začala plavat dokola u dna kádinky. Po patnácti minutách plavání ryby zpomalilo, začaly se vyskytovat trhavé pohyby, ale k dostatečným účinkům anestezie nedošlo a proto byla ryba přesunuta do lázně s čistou vodou. Ryba se do pěti minut vrátila do normálního stavu. Další testovaná koncentrace byla 0,030 ml/l. Po jedné minutě v hřebíčkové lázni bylo u ryby pozorováno zmatené plavání po celé kádince. Po dvou minutách začala ryba plavat dokola u dna kádinky a byly zaznamenány trhavé pohyby. Po třech minutách se ryba začala obracet na bok, ale stále plavala po celé kádince. Po pěti minutách již ryba přestávala plavat a její dýchání se zpomalilo. Po osmi minutách byl proveden pokus s vyjmutím ryby pomocí plastové lžičky na Petriho misku, ale ryba ještě vykazovala hodně pohybu, a proto byla vrácena zpět do lázně. Po celkových deseti minutách od prvního vložení do hřebíčkové lázně, přestala ryba plavat a stáčela se na bok nebo až břichem vzhůru. Po vyjmutí z lázně byla anestezie stále účinná a po rychlém opláchnutí v čisté vodě a uložení na Petriho misku byly pozorovány pouze nepatrné pohyby. Po vložení do kádinky s čistou vodou začala ryba do jedné minuty opět normálně plavat, ale stále šla lehce chytit. Po čtyřech minutách se již vrátila do normálního stavu a chycení bylo obtížné stejně jako u vitálních ryb bez anestezie. Koncentrace 0,030 mg/l hřebíčkového oleje byla tedy určena jako vhodná pro anestezii dania pruhovaného o běžné velikosti. Pro větší jedince je nutné využít koncentraci 0,035 mg/l, ale až po vyzkoušení působení nižších koncentrací. Doporučená minimální doba působení anestetik byla stanovena na deset minut. Ryba by se měla po vložení do čisté vody vrátit do původního stavu do pěti minut.

Samotné testování následné *in vitro* fertilizace bylo po několika neúspěšných pokusech o získání jiker a mlíčí ukončeno z důvodu bezpečnosti ryb. Jikry ani mlíčí se nám nepodařilo odebrat a tedy ani následně otestovat další kroky *in vitro* fertilizace.

### 6.3 Nasazení destiček

Zpočátku byly získané jikry proplachovány jen malým množstvím ředící vody. Jelikož však docházelo k velkému procentu zkoagulování těchto jiker většinou do druhého dne, bylo proplachování jiker prováděno intenzivněji. Ke zlepšení vitality jiker a zabránění nadměrné koagulace a zkreslení výsledků byly nově získané jikry před nasazením do mikrodestiček propláchnuty minimálně jedním litrem čerstvé vody získané ze zařízení ZEBTEC.

Byl zkoušen různý objem plnění jamek mikrodestiček. Jako nejlepší, s ohledem na částečné vypařování a ztráty při manipulaci s jikrami, byl stanoven objem 2 ml roztoku testované látky v jedné jamce.

### 6.4 Hodnocení kritérií

Pro sledování koagulace bílkovin nebylo zcela nutné použití stereomikroskopu, tento jev byl pozorovatelný pouhým okem jako mléčné zakalení jikry. Při pozorování oddělení ocasu od žloutkového vaku u embryí, která nevykazovala pohyb, bylo nutné zvětšení stereomikroskopu alespoň 20x. Pokud embrya nevykazovala spontánní pohyby a somity nebyly dobře patrné, bylo často nutné pro jejich pozorování větší zvětšení. Stejně tak i při pozorování činnosti srdce. V takovém případě bylo velmi časté rozostření obrazu způsobené pozorováním přímo v jamkách mikrodestiček. Ke kvalitnějšímu pozorování bylo zapotřebí dobře kombinovat zaostřování a nastavení zvětšení především se změnou lomu světla, případně přisvícením. Často ani to nepomohlo především z důvodu umístění jiker u stěn jamek. V takovém případě bylo ideálním řešením přemístění jikry pomocí pipety či jiného sterilního předmětu do středu jamky. Pokud ani tento krok nestačil k dobrému zhodnocení daného kritéria, přistoupilo se k přesunu jikry s malým množstvím roztoku z jamky na malou Petriho misku pomocí sterilní pipety. Takto připravené jikry byly již dobře pozorovatelné do detailu.

### 6.5 Výsledky FET testu pro 3,4-dichloranilin

#### 6.5.1 Fyzikálně-chemické měření na začátku testu

Tab. 2: Hodnoty fyzikálně-chemického měření u pozitivní a negativní kontroly a nejvyšší koncentrace testovaného 3,4-dichloranilinu stanovené na začátku testu

	Negativní kontrola	Pozitivní kontrola	3,4-DCA (5 mg/l)
pH	7,29	8,51	7,83
konduktivita ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	621	628	757
tvrdost (mmol/l)	2,48	2,44	2,58
nasycení kyslíkem (mg/l)	7,29	8,57	7,84

Testovaný 3,4-dichloranilin o koncentraci 5 mg/l vykazoval hodnotu pH na začátku testování 7,83. U této koncentrace byla naměřena konduktivita 757  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a nasycení

kyslíkem 7,84 mg/l při 24,8 °C, tedy 95,49 % nasycení. Pomocí titrační metody byla stanovena tvrdost na 2,58 mmol/l. Nasycení kyslíkem u negativní kontroly bylo na začátku testu 7,29 mg/l při 26,4 °C, tedy 91,58 % (viz Tab. 2).

### 6.5.2 Fyzikálně-chemické měření na konci testu

Tab. 3: Hodnoty fyzikálně-chemického měření u pozitivní a negativní kontroly a nejvyšší koncentrace testovaného 3,4-dichloranilinu stanovené na konci testu

	Negativní kontrola	Pozitivní kontrola	3,4-DCA (5 mg/l)
pH	7,59	7,96	7,71
konduktivita (μS/cm)	708	853	939
tvrdost (mmol/l)	2,38	2,87	2,58
nasycení kyslíkem (mg/l)	10,13	7,54	7,71

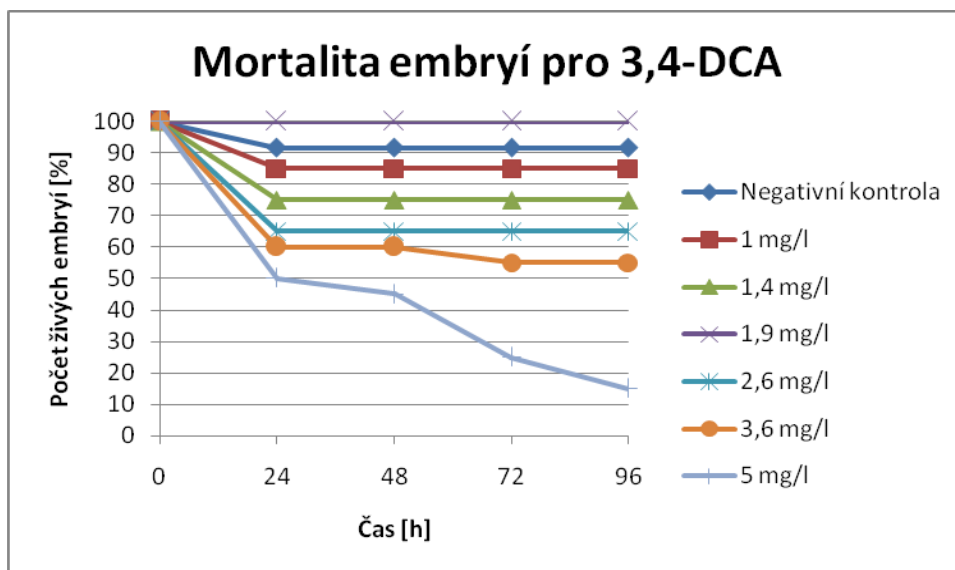
Hodnota pH u testovaného 3,4-dichloranilinu o koncentraci 5 mg/l byla na konci testu změřena pomocí pH metru na 7,71. Konduktivita se pohybovala kolem 939 μS/cm. Tvrdost byla stanovena titrací na 2,58 mmol/l a saturace kyslíkem byla 7,71 mg/l při 25,6 °C, tedy 95,42 %. Nasycení kyslíkem u negativní kontroly bylo na konci testu 10,13 mg/l při 25,4 °C. Validace tedy byla v tomto ohledu v pořádku (viz Tab. 3).

### 6.5.3 Přežití testovaných embryí

Tab. 4: Mortalita embryí v negativní a pozitivní kontrole a v jednotlivých koncentracích testovaného 3,4-dichloranilinu (3,4-DCA)

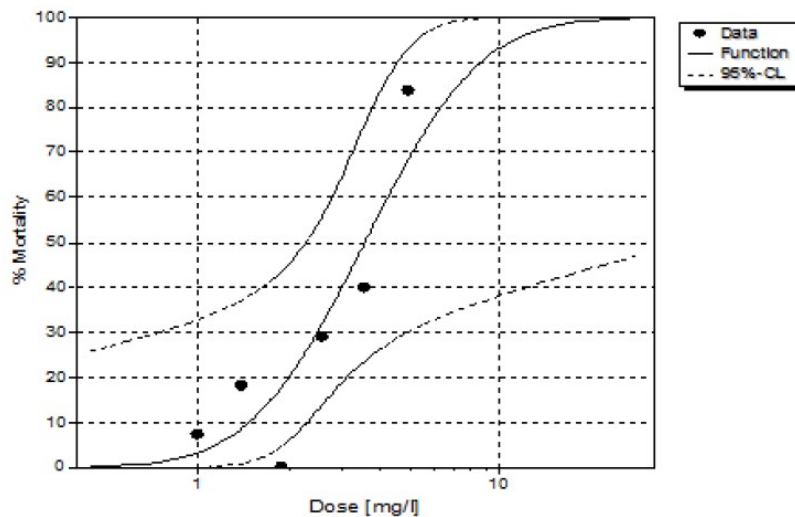
Testovaná látka	Počet nasazených jiker	Počet živých embryí na konci testu	Počet mrtvých embryí na konci testu	Mortalita v %
Negativní kontrola	24	22	2	8,3
Pozitivní kontrola	20	11	9	45
1,0 mg/l 3,4-DCA	20	17	3	15,0
1,4 mg/l 3,4-DCA	20	15	5	25,0
1,9 mg/l 3,4-DCA	20	20	0	0,0
2,6 mg/l 3,4-DCA	20	13	7	35,0
3,6 mg/l 3,4-DCA	20	11	9	45,0
5,0 mg/l 3,4-DCA	20	3	17	85,0

Nejvyšší mortalita byla zaznamenána u koncentrace 5,0 mg/l 3,4-dichloranilinu. Zde byla stanovena na 85 %. Nejnižší mortalita u testované látky byla stanovena u koncentrace 1,9 mg/l. V této koncentraci uhynulo 0 % embryí. U většiny embryí v nejvyšší testované koncentraci byl pozorován edém srdce a absence cirkulace krve aortou (viz Příloha č. 2 a Příloha č. 3). U všech embryí exponovaných nejvyšší koncentraci byla také pozorována absence spontánních pohybů. U koncentrace 2,6 mg/l byl edém srdce pozorován u méně než poloviny embryí a byl také méně výrazný. Tato embrya již vykazovala spontánní pohyby. Mortalita u pozitivní kontroly vyšla na konci testu 45 %, tedy vyšší než dané minimum k validaci (30 %). Přežití u negativní kontroly bylo 91,7 %. Validace tohoto testu byla tedy s ohledem na mortalitu v negativní a pozitivní kontrole v pořádku (viz Tab. 4).



Graf 1: Přežití testovaných embryí v 3,4-dichloranilinu (3,4-DCA) v závislosti na čase v porovnání s negativní kontrolou

Během prvních 24 hodin vystavení jiker 3,4-dichloranilinu byla úmrtnost ve všech koncentracích testované látky i v negativní kontrole podobná. Po 24 hodinách expozice klesl počet živých embryí u všech koncentrací kromě koncentrace 1,9 mg/l, kde zůstala nulová mortalita až do konce testu. U ostatních koncentrací vyjma 3,6 mg/l a 5 mg/l se ustálila úmrtnost již po 24 hodinách a dále se nezvyšovala. U koncentrace 3,6 mg/l došlo ke změně po 72 hodinách expozice a počet živých embryí klesl pod 60 %. Výraznější negativní působení testované látky nastalo při delší expozici především u koncentrace 5 mg/l, kde po 48 hodinách expozice kleslo procento živých embryí pod 50 %, po 72 hodinách pod 30 % a na konci testu bylo živých pouze 25 % embryí (viz Graf 1).



Graf 2: Křivka závislosti mortality na dávce 3,4-dichloranilinu získaná v programu ToxRat Professional Version 3.2.1

Křivka závislosti mortality embryí na koncentraci testovaného 3,4-dichloranilinu zřetelně ukazuje zvyšující se mortalitu embryí při rostoucí koncentraci. Jedinou odchylku způsobuje nulová mortalita v koncentraci 1,9 mg/l (viz Graf 2).

#### 6.5.4 Vykulení

Tab. 5: Vykulení embryí v čase v závislosti na koncentraci 3,4-dichloranilinu (3,4-DCA)

Doba od oplození	Neg. kontr.	1,0 mg/l 3,4-DCA	1,4 mg/l 3,4-DCA	1,9 mg/l 3,4-DCA	2,6 mg/l 3,4-DCA	3,6 mg/l 3,4-DCA	5,0 mg/l 3,4-DCA
48 hod	0	0	0	0	0	0	0
72 hod	21	17	15	19	13	12	3
96 hod	22	17	15	20	13	12	3

V negativní kontrole se do konce testu vylíhlo (nebo tzv. vykulilo) 22 embryí z 24 nasazených a 22 přeživších. Vykulení u negativní kontroly tedy bylo 91,7 %, což potvrzuje validitu testu. Nejméně embryí se vykulilo v koncentraci 5,0 mg/l 3,4-dichloranilinu, konkrétně tři embrya z 20 nasazených a tří přeživších. 100% vykulení bylo zaznamenáno u koncentrace 1,9 mg/l 3,4-dichloranilinu, kde bylo na konci testu vykuleno všech 20 nasazených jiker (viz Tab. 5).

### 6.5.5 Výsledné hodnoty toxicity pro 3,4-dichloranilin

Tab. 6: Hodnoty toxicity pro 3,4-dichloranilin získané pomocí FET testu (95% interval spolehlivosti)

Vyjádření toxicity	Toxické koncentrace (mg/l)
LC <sub>10</sub>	1,481
LC <sub>20</sub>	2,005
LC <sub>50</sub>	3,581
LOEC	3,600
NOEC	2,600

Hodnota LC<sub>50</sub> pro 3,4-dichloranilin při 96hodinové expozici byla pomocí FET testu stanovena na 3,581 mg/l. Nejnižší testovaná koncentrace, při níž byly pozorovány statisticky významné účinky (LOEC) byla stanovena na 3,600 mg/l. Naopak koncentrace bez pozorovaného statisticky významného účinku (NOEC) vyšla 2,600 mg/l (viz Tab. 6).

## 6.6 Výsledky FET testu pro dichroman draselný

### 6.6.1 Fyzikálně-chemické měření na začátku testu

Tab. 7: Hodnoty fyzikálně-chemického měření u pozitivní a negativní kontroly a nejvyšší koncentrace testovaného dichromanu draselného

	Negativní kontrola	Pozitivní kontrola	Dichroman draselný (180 mg/l)
pH	7,88	6,78	6,32
konduktivita (μS/cm)	804	598	789
tvrdost (mmol/l)	2,40	0,31	2,50
nasycení kyslíkem (mg/l)	7,41	7,60	7,62

Hodnota pH pro dichroman draselný o nejvyšší testované koncentraci 180 mg/l byla na začátku testu stanovena na 6,32. Konduktivita byla změřena na hodnotu 789 μS/cm. Tvrdost byla titrací stanovena na 2,50 mmol/l a saturace kyslíkem byla 7,62 mg/l při 25,9 °C, tedy 94,78 %. U negativní kontroly byla na počátku testu hodnota nasycení kyslíkem 7,41 mg/l při 26,3 °C, tedy 92,86 % (viz Tab. 7).

### 6.6.2 Fyzikálně-chemické měření na konci testu

Tab. 8: Hodnoty fyzikálně-chemického měření u pozitivní a negativní kontroly a nejvyšší koncentrace testovaného dichromanu draselného stanovené na konci testu

	Negativní kontrola	Pozitivní kontrola	Dichroman draselný (180 mg/l)
pH	8,04	7,24	6,59
konduktivita ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	1054	209	805
tvrdost (mmol/l)	2,58	0,10	2,56
nasycení kyslíkem (mg/l)	7,49	7,56	7,41

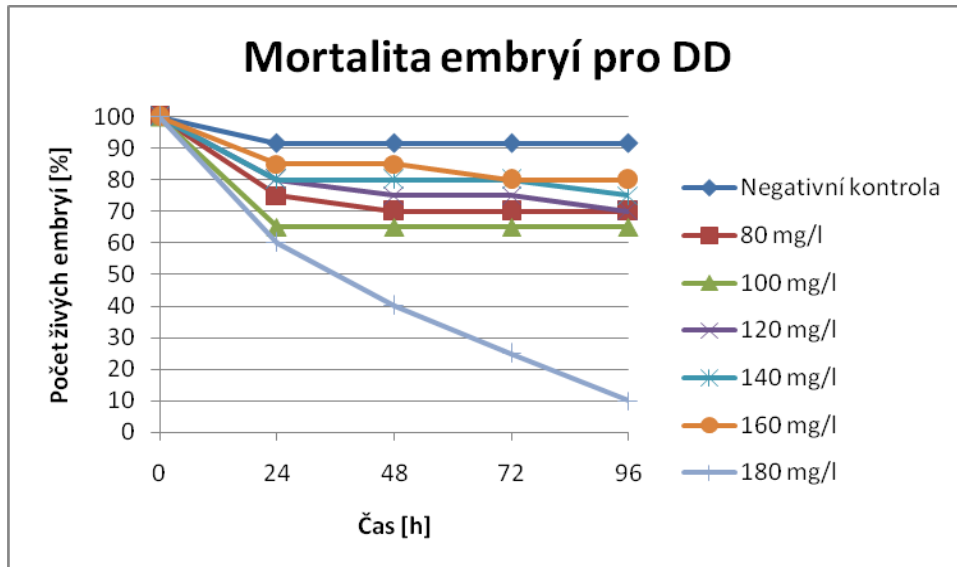
Dichroman draselný o koncentraci 180 mg/l vykazoval na konci testu pH 6,59. Konduktivita byla změřena na 805  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Tvrdost byla stanovena na 2,56 mmol/l a nasycení kyslíkem bylo 7,41 mg/l při 24,4 °C, tedy 89,60 %. U negativní kontroly bylo nasycení kyslíkem změřeno na hodnotu 7,49 mg/l při 23,6 °C, tedy 89,17 %. Validace testu byla tudíž v pořádku. Stejné kritérium bylo měřeno také u pozitivní kontroly a výsledkem byla hodnota 7,56 mg/l (viz Tab. 8).

### 6.6.3 Přežití testovaných embryí

Tab. 9: Mortalita embryí v negativní a pozitivní kontrole a v jednotlivých koncentracích testovaného dichromanu draselného (DD)

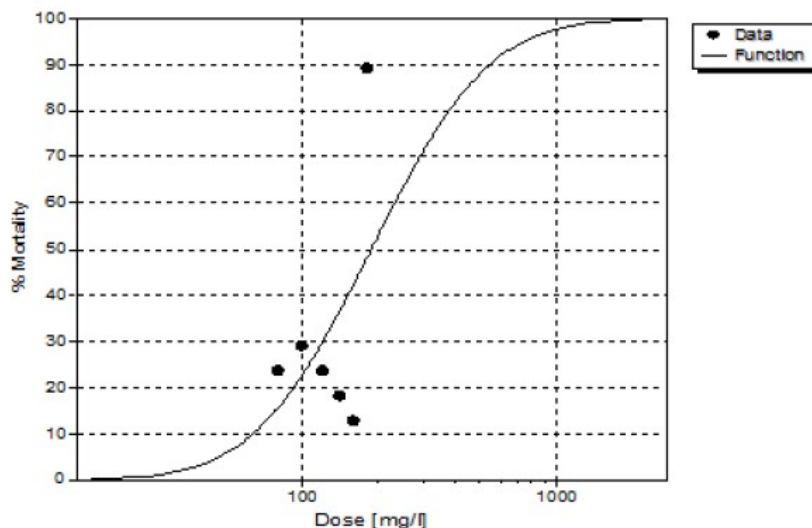
Testovaná látka	Počet nasazených jiker	Počet živých embryí na konci testu	Počet mrtvých embryí na konci testu	Mortalita v %
Negativní kontrola	24	22	2	8,3
Pozitivní kontrola	20	0	20	100,0
80 mg/l DD	20	14	6	30,0
100 mg/l DD	20	13	7	35,0
120 mg/l DD	20	14	6	30,0
140 mg/l DD	20	15	5	25,0
160 mg/l DD	20	16	4	20,0
180 mg/l DD	20	2	18	90,0

Nejvyšší mortalita embryí u testované látky byla pozorována u koncentrace 180 mg/l. V této koncentraci uhynulo 90 % embryí. Naopak nejnižší mortalita, 20 %, byla stanovena pro koncentraci 160 mg/l dichromanu draselného. U pozitivní kontroly byla na konci testu stanovena mortalita 100 %, tedy byl test v pořádku zvalidován. Mortalita u negativní kontroly byla 8,3 %. Validace testu proběhla i v tomto ohledu bez problému (viz Tab. 9).



Graf 3: Přežití testovaných embryí v dichromanu draselném (DD) v závislosti na čase v porovnání s negativní kontrolou

Mortalita se během 24hodinových intervalů u koncentrací 80 mg/l, 100 mg/l, 120 mg/l, 140 mg/l a 160 mg/l dichromanu draselného výrazně nezvyšovala. Odlišný průběh vykazovala mortalita u koncentrace 180 mg/l, která se s postupujícím časem výrazně zvyšovala. Na konci testu přežilo v této koncentraci pouze 10 % embryí (viz Graf 3).



Graf 4: Křivka závislosti mortality na koncentraci dichromanu draselného získaná z programu ToxRat Professional Version 3.2.1



Křivka závislosti mortality na koncentraci dichromanu draselného vykazuje velký nárůst díky mortalitě embryí v koncentraci 180 mg/l, která oproti nižším koncentracím prudce vzrostla (viz Graf 4).

#### 6.6.4 Vykulení

Tab. 10: Vykulení embryí v čase v závislosti na koncentraci dichromanu draselného (DD)

Doba od oplození	Neg. kontr.	80 mg/l DD	100 mg/l DD	120 mg/l DD	140 mg/l DD	160 mg/l DD	180 mg/l DD
48 hod	17	3	0	0	1	0	0
72 hod	20	13	12	8	6	4	2
96 hod	20	15	13	10	7	4	2

V negativní kontrole bylo na konci testu vykuleno 20 embryí z 24 nasazených a 22 přeživších. Vykulení tedy bylo procentuálně 91,7 %, čili vyšší než 80 %, které je hranicí pro validaci testu. Pouze dvě vykulená embrya byla pozorována na konci testu v koncentraci 180 mg/l. Naopak nejvyšší míra vykulení byla zaznamenána u koncentrace 80 mg/l a to počtem 15 vykulených embryí z 20 nasazených a 14 přeživších embryí (viz Tab. 10),

#### 6.6.5 Výsledné hodnoty toxicity pro dichroman draselný

Tab. 11: Hodnoty toxicity pro dichroman draselný získané pomocí FET testu (95% interval spolehlivosti)

Vyjádření toxicity	Toxické koncentrace (mg/l)
LC <sub>10</sub>	-
LC <sub>20</sub>	91,643
LC <sub>50</sub>	185,721
LOEC	180,000
NOEC	160,000

Hodnota LC<sub>50</sub> pro dichroman draselný byla pomocí FET testu při 96hodinové expozici stanovena na 185,721 mg/l. Hodnota LC<sub>20</sub> vyšla 91,643 mg/l. LOEC byla stanovena na 180 mg/l a NOEC na 160 mg/l (viz Tab. 11).

## 6.7 Výsledky FET testu pro Acid Yellow 25

### 6.7.1 Fyzikálně-chemické měření na začátku testu

Tab. 12: Hodnoty fyzikálně-chemického měření u pozitivní a negativní kontroly a nejvyšší koncentrace testované látky Acid Yellow 25 na začátku testu

	Negativní kontrola	Pozitivní kontrola	Acid Yellow 25 (100 mg/l)
pH	7,84	7,78	7,69
konduktivita (μS/cm)	625	249	637
tvrdost (mmol/l)	2,38	2,33	2,37
nasycení kyslíkem (mg/l)	8,13	8,59	8,28

Hodnota pH pro nejvyšší koncentraci testované barvy Acid Yellow 25 (100 mg/l) byla stanovena na začátku testu na 7,69. Konduktivita byla 637 μS/cm a saturace kyslíkem 8,28 mg/l při 22,3 °C, tedy 96,06 %. Tvrdost byla stanovena pomocí titrace na 2,37 mmol/l. U negativní kontroly se nasycení kyslíkem pohybovalo kolem 8,13 mg/l při 22,6 °C, tedy 94,98 % (viz Tab. 12).

### 6.7.2 Fyzikálně-chemické měření na konci testu

Tab. 13: Hodnoty fyzikálně-chemického měření u pozitivní a negativní kontroly a nejvyšší koncentrace testované látky Acid Yellow 25 stanovené na konci testu

	Negativní kontrola	Pozitivní kontrola	Acid Yellow 25 (100 mg/l)
pH	7,82	7,67	7,68
konduktivita (μS/cm)	711	824	718
tvrdost (mmol/l)	2,47	2,42	2,49
nasycení kyslíkem (mg/l)	7,89	7,87	7,81

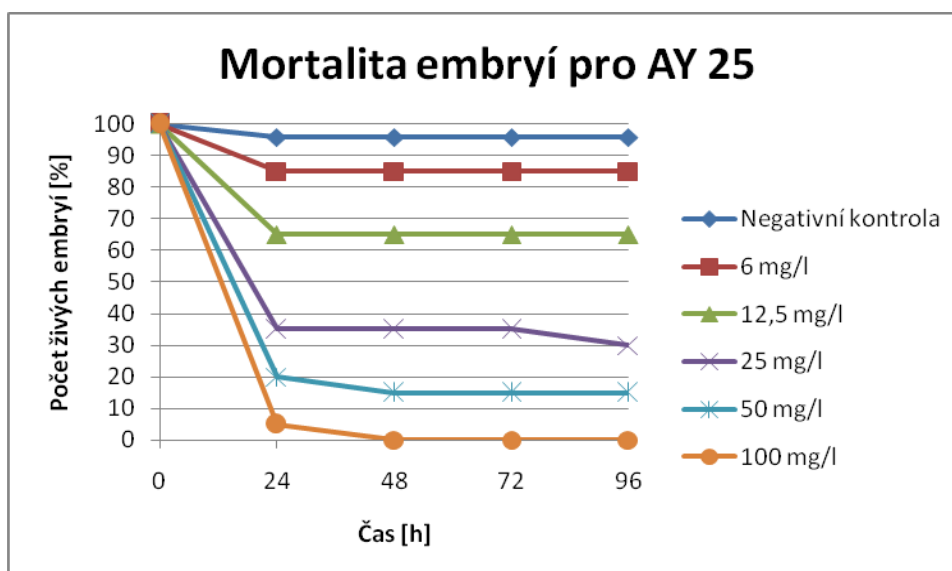
Hodnota pH změřená pro látku Acid Yellow 25 o koncentraci 100 mg/l na konci testu byla 7,68. U stejné koncentrace této látky byla stanovena konduktivita 718 μS/cm a nasycení kyslíkem 7,81 mg/l při 22,2 °C, tedy 90,50 %. Tvrdost byla stanovena na 2,49 mmol/l. Hodnota saturace kyslíkem u negativní kontroly byla 7,89 mg/l při 22,2 °C, tedy procentuálně 91,43 %. Validace testu byla tedy v tomto ohledu v pořádku (viz Tab. 13).

### 6.7.3 Přežití testovaných embryí

Tab. 14: Mortalita embryí v negativní a pozitivní kontrole a v jednotlivých koncentracích testované látky Acid Yellow 25 (AY 25)

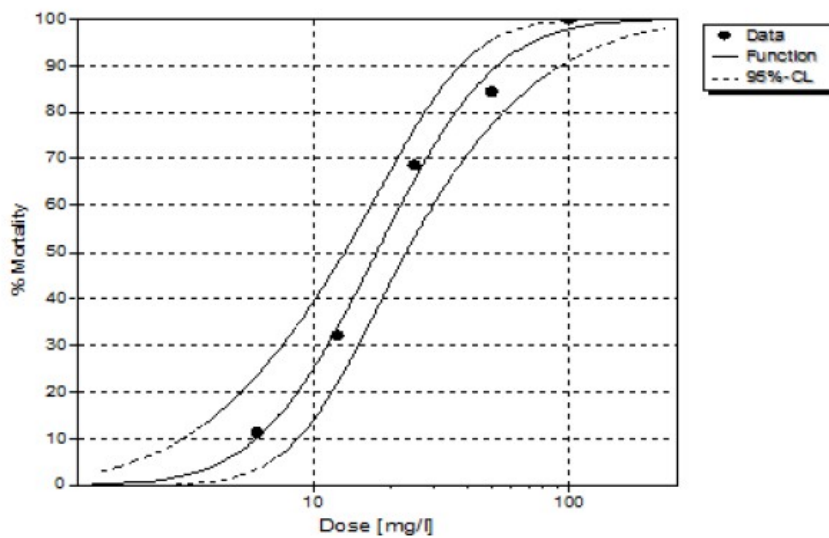
Testovaná látka	Počet nasazených jiker	Počet živých embryí na konci testu	Počet mrtvých embryí na konci testu	Mortalita v %
Negativní kontrola	24	23	1	4,2
Pozitivní kontrola	20	6	14	70
6 mg/l AY 25	20	17	3	15,0
12,5 mg/l AY 25	20	13	7	35,0
25 mg/l AY 25	20	6	14	70,0
50 mg/l AY 25	20	3	17	85,0
100 mg/l AY 25	20	0	20	100,0

Nejvyšší mortalita embryí v testované barvě Acid Yellow 25 byla zaznamenána u koncentrace 100 mg/l. Mortalita byla při této koncentraci 100 %. Naopak u koncentrace 6 mg/l této látky byla mortalita pouze 15 %. V pozitivní kontrole byla mortalita 70 % a v negativní kontrole 4,2 %. Tento test byl tedy s ohledem na mortalitu v kontrolních vzorcích validní (viz Tab. 14).



Graf 5: Přežití testovaných embryí v roztocích látky Acid Yellow 25 (AY 25) v závislosti na čase v porovnání s negativní kontrolou

Počet živých embryí u negativní kontroly byl po 24 hodinách inkubace vyšší než 95 %. Tento stav zůstal nezměněný až do konce testu a jeho validita tak byla v pořádku. Stejný neměnný průběh byl pozorován i u koncentrace 6 mg/l látky Acid Yellow 25, kde byla mortalita po celou dobu ustálena na 15 %. V koncentraci 12,5 mg/l se mortalita ustálila na hodnotě 35 %. V koncentraci 25 mg/l byla mortalita po 24, 48 i 72 hodinách expozice 65 %, po 96 hodinách se zvýšila na 70 %. V koncentraci 50 mg/l byla stanovena mortalita po 24hodinové expozici na 80 %, dále během testu vzrostla na 85 %. U koncentrace 100 mg/l byla mortalita po 24 hodinách expozice 95 %, po 48 hodinách vzrostla na 100 % (viz Graf 5).



Graf 6: Křivka závislosti mortality na dávce látky Acid Yellow 25 získaná z programu ToxRat Professional Version 3.2.1

Křivka závislosti účinku na dávce látky Acid Yellow 25 ideálně vyjadřuje zvyšující se mortalitu s rostoucí koncentrací bez jakýchkoliv výrazných odchylek (viz Graf 6).

#### 6.7.4 Vykulení

Tab. 15: Vykulení embryí v čase v závislosti na koncentraci látky Acid Yellow 25 (AY 25)

Doba od oplození	Neg. kontr.	6 mg/l AY 25	12,5 mg/l AY 25	25 mg/l AY 25	50 mg/l AY 25	100 mg/l AY 25
<b>48 hod</b>	1	0	0	0	0	0
<b>72 hod</b>	19	5	3	4	0	0
<b>96 hod</b>	23	16	12	6	3	0

V negativní kontrole bylo na konci testu zaznamenáno 23 vykulených embryí z 24 nasazených a 23 žijících. Validace testu byla tedy v pořádku. Nejvíce vykulených embryí v koncentrační řadě testované látky Acid Yellow 25 se vyskytovalo v koncentraci 6 mg/l. Zde bylo vykuleno 16 embryí z 20 nasazených a 17 živých. Naopak nulové vykulení

bylo pozorováno u koncentrace 100 mg/l, kde z 20 nasazených nepřežilo žádné embryo a žádné se nevykulilo (viz Tab. 15).

### 6.7.5 Výsledné hodnoty toxicity pro Acid Yellow 25

Tab. 16: Hodnoty toxicity pro Acid Yellow 25 získané pomocí FET testu (95% interval spolehlivosti)

<b>Vyjádření toxicity</b>	<b>Toxické koncentrace (mg/l)</b>
<b>LC<sub>10</sub></b>	5,954
<b>LC<sub>20</sub></b>	8,653
<b>LC<sub>50</sub></b>	17,687
<b>LOEC</b>	12,500
<b>NOEC</b>	6,000

Pomocí FET testu při 96hodinové expozici látky Acid Yellow 25 byla stanovena hodnota LC<sub>10</sub> 5,954 mg/l, hodnota LC<sub>20</sub> vyšla 8,653 mg/l a hodnota LC<sub>50</sub> byla 17,687 mg/l. Hodnota LOEC byla určena na 12,5 mg/l a NOEC na 6,0 mg/l (viz Tab. 16).

## 6.8 Výsledky FET testu pro Reactive Yellow 85

### 6.8.1 Fyzikálně-chemické měření na začátku testu

Tab. 17: Hodnoty fyzikálně-chemického měření u pozitivní a negativní kontroly a nejvyšší koncentrace testované látky Reactive Yellow 85

	<b>Negativní kontrola</b>	<b>Pozitivní kontrola</b>	<b>Reactive Yellow 85 (100 mg/l)</b>
<b>pH</b>	7,98	8,46	7,87
<b>konduktivita (μS/cm)</b>	939	630	758
<b>tvrdost (mmol/l)</b>	2,45	2,42	2,32
<b>nasycení kyslíkem (mg/l)</b>	7,72	8,43	7,26

Pro nejvyšší koncentraci testované barvy Reactive Yellow 85 (100 mg/l) bylo naměřeno pH 7,87. Konduktivita byla stanovena na 758 μS/cm a tvrdost na 2,32 mmol/l. Nasycení kyslíkem se pohybovalo kolem 7,26 mg/l při 23,5 °C, procentuálně tedy 86,22 %. U negativní kontroly byl naměřen obsah kyslíku 7,72 mg/l při 22,8 °C, tedy 90,50 % (viz Tab. 17).

### 6.8.2 Fyzikálně-chemické měření na konci testu

Tab. 18: Hodnoty fyzikálně-chemického měření u pozitivní a negativní kontroly a nejvyšší koncentrace testované látky Reactive Yellow 85 stanovené na konci testu

	Negativní kontrola	Pozitivní kontrola	Reactive Yellow 85 (100 mg/l)
pH	7,71	7,81	7,74
konduktivita ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	722	1157	758
tvrdost (mmol/l)	2,58	2,99	2,46
nasyčení kyslíkem (mg/l)	7,13	7,11	6,96

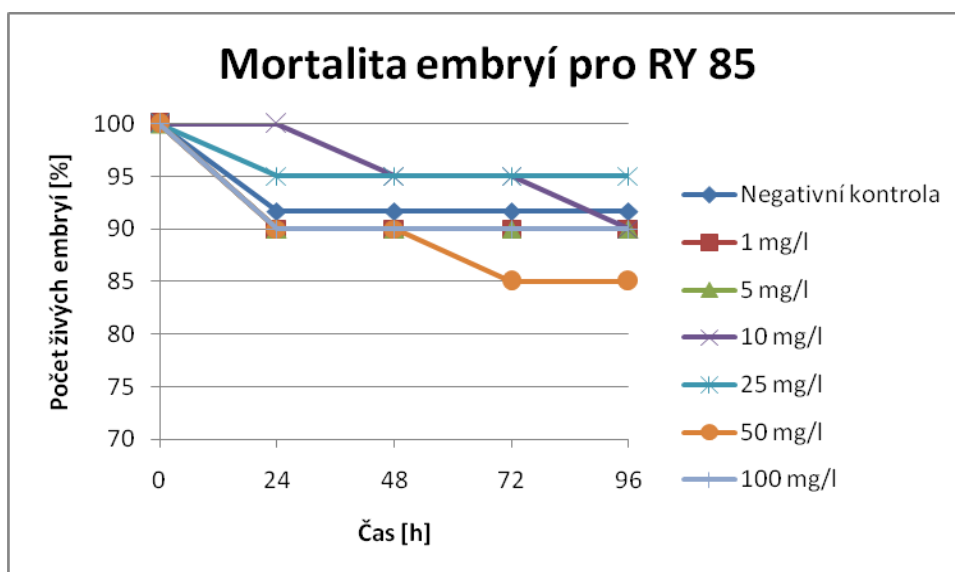
Hodnota pH u barvy Reactive Yellow 85 o koncentraci 100 mg/l byla na konci testu 7,74. Konduktivita u téže koncentrace byla 758  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Tvrdost byla stanovena na 2,46 mmol/l a nasycení kyslíkem bylo změřeno na 6,96 mg/l při 24,2 °C, procentuálně tedy 80,60 %. Saturace kyslíkem byla u negativní kontroly 7,13 mg/l při 24,0 °C, tedy 85,59 %. Validace testu byla v tomto směru v pořádku (viz Tab. 18).

### 6.8.3 Přežití testovaných embryí

Tab. 19: Mortalita embryí v negativní a pozitivní kontrole a v jednotlivých koncentracích testované látky Reactive Yellow 85

Testovaná látka	Počet nasazených jiker	Počet živých embryí na konci testu	Počet mrtvých embryí na konci testu	Mortalita v %
Negativní kontrola	24	22	2	8,3
Pozitivní kontrola	20	6	14	70
1 mg/l RY 85	20	18	2	10,0
5 mg/l RY 85	20	18	2	10,0
10 mg/l RY 85	20	18	2	10,0
25 mg/l RY 85	20	19	1	5,0
50 mg/l RY 85	20	17	3	15,0
100 mg/l RY 85	20	18	2	10,0

U koncentrace 50 mg/l testované látky Reactive Yellow 85 byla zaznamenána nejvyšší mortalita hodnotou 15 %. Naopak nejnižší mortalita, pouhých 5 %, byla stanovena pro koncentraci 25 mg/l. V pozitivní kontrole vyšla mortalita na konci testu 70 % a v negativní kontrole 8,3 %. Validace testu tedy proběhla v pořádku (viz Tab. 19).



Graf 7: Přežití testovaných embryí v roztocích látky Reactive Yellow 85 v závislosti na čase v porovnání s negativní kontrolou

Počet živých embryí se v negativní kontrole po 24 hodinách inkubace ustálil na 91,7 %, test byl tedy validní. U koncentrace 1 mg/l a 5 mg/l testované látky Reactive Yellow 85 byla mortalita 10 % během celého testu. V koncentraci 10 mg/l byla po 24 hodinách expozice mortalita nulová, po 48 hodinách vzrostla na 5 % a na konci testu byla stanovena na 10 %. U koncentrace 25 mg/l byla mortalita po celou dobu testu 5 %. U koncentrace 50 mg/l byla po 24 a 48 hodinách expozice pozorována 10% mortalita, která se v následujících dnech zvýšila na 15 %. U nejvyšší koncentrace (100 mg/l) testované látky byla po celou dobu testu mortalita ustálená na 10 % (viz Graf 7). Vzhledem k nízké toxicitě látky nelze interpretovat vypovídající graf závislosti mortality na dávce.

#### 6.8.4 Vykulení

Tab. 20: Vykulení embryí v čase v závislosti na koncentraci látky Reactive Yellow 85 (RY 85)

Doba od oplození	Negativní kontrola	1 mg/l RY 85	5 mg/l RY 85	10 mg/l RY 85	25 mg/l RY 85	50 mg/l RY 85	100 mg/l RY 85
48 hod	0	0	0	0	0	0	0
72 hod	14	18	18	18	18	10	4
96 hod	22	18	18	18	19	17	11

Na konci testu bylo v negativní kontrole vykuleno 22 embryí z 24 nasazených a 22 žijících. Test byl tedy v tomto ohledu validní. Nejvíce vykulených embryí bylo zaznamenáno v koncentraci 25 mg/l látky Reactive Yellow 85. V této koncentraci se vykulo 19 embryí z 20 nasazených a 19 žijících. Nejméně vykulených embryí bylo pozorováno v koncentraci 100 mg/l s počtem 11 vykulených z 20 nasazených a 18 živých embryí na konci testu (viz Tab. 20).

### 6.8.5 Výsledné hodnoty toxicity pro Reactive Yellow 85

Tab. 21: Hodnoty toxicity pro Reactive Yellow 85 získané pomocí FET testu (95% interval spolehlivosti)

Vyjádření toxicity	Toxické koncentrace (mg/l)
LC <sub>10</sub>	-
LC <sub>20</sub>	-
LC <sub>50</sub>	-
LOEC	>100,000
NOEC	>=100,000

Hodnoty LC<sub>10</sub>, LC<sub>20</sub> a LC<sub>50</sub> nebylo možné vzhledem k nízké toxicitě látky Reactive Yellow 85 pomocí FET testu stanovit, jedná se tedy o koncentrace vyšší než 100 mg/l. Taktéž LOEC a NOEC byly tudíž pro tuto látku větší než 100 mg/l (viz Tab. 21).

## 6.9 Výsledky testu akutní toxicity na rybách pro Acid Yellow 25

### 6.9.1 Fyzikálně-chemické měření na začátku testu

Tab. 22: Hodnoty fyzikálně-chemického měření u deionizované a zřed'ovací vody na začátku testu

	Deionizovaná voda	Zřed'ovací voda
pH	6,1	8,08
konduktivita (μS/cm)	0,98	nestanovuje se
tvrdost (mmol/l)	nestanovuje se	2,33
nasycení kyslíkem (mg/l)	nestanovuje se	7,35



Deionizovaná voda, která byla využita k míchání všech roztoků, měla na počátku testu hodnotu pH 6,1. Konduktivita byla změřena na 0,98  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Namíchaná zředovací voda měla pH 8,08. Tvrdost byla stanovena na hodnotu 2,33 mmol/l a nasycení kyslíkem na 7,35 mg/l (viz Tab. 22).

### 6.9.2 Fyzikálně-chemické měření v průběhu testu

Tab. 23: Koncentrace rozpuštěného kyslíku a teplota prostředí u jednotlivých koncentrací testované látky Acid Yellow 25 (AY 25) a u negativní kontroly v průběhu testu akutní toxicity na rybách

	Koncentrace O <sub>2</sub> v 100 mg/l AY 25 (mg/l)	Koncentrace O <sub>2</sub> v 50 mg/l AY 25 (mg/l)	Koncentrace O <sub>2</sub> v negativní kontrolě (mg/l)	Teplota prostředí (°C)
<b>0 hod</b>	7,87	7,52	7,35	20,6
<b>24 hod</b>	7,64	7,48	7,39	20,6
<b>48 hod</b>	7,32	7,01	6,85	20,0
<b>72 hod</b>	7,35	7,38	7,22	20,3
<b>96 hod</b>	7,34	7,32	7,09	20,2

Nasycení kyslíkem u koncentrace 100 mg/l látky Acid Yellow 25 se během testu pohybovalo v rozmezí 7,32 - 7,87 mg/l. U koncentrace 50 mg/l těže látky bylo rozmezí 7,01 - 7,52 mg/l. V negativní kontrole se saturace kyslíkem pohybovala v hodnotách 6,85 - 7,39 mg/l. Teplota prostředí byla během celého testu 20,0 - 20,6 °C (viz Tab. 23).

Tab. 24: Hodnoty pH pro jednotlivé koncentrace testované látky Acid Yellow 25 (AY 25) a pro negativní kontrolu v průběhu testu akutní toxicity na rybách

	pH v 100 mg/l AY 25	pH v 50 mg/l AY 25	pH v negativní kontrolě
<b>0 hod</b>	7,79	7,83	8,08
<b>24 hod</b>	7,75	7,66	7,64
<b>48 hod</b>	7,70	7,66	7,74
<b>72 hod</b>	7,88	7,81	7,76
<b>96 hod</b>	7,73	7,32	7,79

Hodnota pH se u koncentrace 100 mg/l látky Acid Yellow 25 během testu pohybovala v rozmezí 7,70 - 7,88. U koncentrace 50 mg/l těže látky byly naměřeny hodnoty pH 7,32 - 7,83. Negativní kontrola měla pH v rozmezí 7,64 - 8,08 během celého testu (viz Tab. 24).

### 6.9.3 Mortalita ryb v testu akutní toxicity

Tab. 25: Počet živých ryb v různých koncentracích látky Acid Yellow 25 (AY 25) a v negativní kontrole v průběhu testu s počátečním počtem sedm ryb v jedné koncentraci

	Počet živých ryb v 100 mg/l AY 25	Počet živých ryb v 50 mg/l AY 25	Počet živých ryb v negativní kontrole
<b>2 hod</b>	7	7	7
<b>24 hod</b>	7	7	7
<b>48 hod</b>	7	7	7
<b>72 hod</b>	7	7	7
<b>96 hod</b>	7	7	7

Na počátku testu bylo do koncentrace 100 mg/l látky Acid Yellow 25 nasazeno sedm ryb. Na konci testu bylo napočítáno sedm živých ryb bez jakýchkoli abnormalit v chování i ve vzhledu. Stejně výsledky, tedy nulová mortalita a žádné abnormality, byly odečteny i u koncentrace 50 mg/l těžé látky a u negativní kontroly (viz Tab. 25).

### 6.9.4 Výsledné hodnoty toxicity pro Acid Yellow 25

Tab. 26: Výsledné hodnoty akutní toxicity pro Acid Yellow 25

Vyjádření toxicity	Toxické dávky (mg/l)
<b>LC<sub>50</sub></b>	>100,000
<b>LOEC</b>	>100,000
<b>NOEC</b>	>100,000

Jelikož byla mortalita nulová pro všechny testované koncentrace látky Acid Yellow 25, LC<sub>50</sub> získaná pomocí testu akutní toxicity na rybách druhu *Poecilla reticulata* byla s 99% jistotou stanovena na hodnotu větší než 100 mg/l (viz Tab. 26).

### 6.9.5 Validace testu akutní toxicity na rybách pro Acid Yellow 25

K validaci testu musely být splněny následující podmínky:

- ❖ V negativní kontrole byla mortalita nulová.
- ❖ Během testu byly udržovány konstantní podmínky.
- ❖ Saturace kyslíkem pro koncentraci 100 mg/l látky Acid Yellow 25 se snížila maximálně na 81,2 %. Pro koncentraci 50 mg/l testované látky bylo maximální snížení na hodnotě 77,72 %. Nasycení kyslíkem se u negativní kontroly maximálně snížilo na hodnotu 75,94 %.

Validace testu tedy ve všech ohledech proběhla v pořádku.

## 6.10 Výsledky testu akutní toxicity na rybách pro Reactive Yellow 85

### 6.10.1 Fyzikálně-chemické měření na začátku testu

Tab. 27: Hodnoty fyzikálně-chemického měření u deionizované a zředovací vody na začátku testu

	Deionizovaná voda	Zředovací voda
<b>pH</b>	6,1	8,08
<b>konduktivita (μS/cm)</b>	0,98	nestanovuje se
<b>tvrdost (mmol/l)</b>	nestanovuje se	2,33
<b>nasycení kyslíkem (mg/l)</b>	nestanovuje se	7,35

V testu bylo pracováno s deionizovanou vodou, jejíž pH bylo stanoveno na 6,1 a konduktivita byla změřena na 0,98 μS/cm. Zředovací voda, která byla využita jako negativní kontrola a k ředění zásobního roztoku testované látky, měla pH 8,08. Tvrdost byla stanovena pomocí titrace na 2,33 mmol/l a koncentrace kyslíku byla 7,35 mg/l (viz Tab. 27).

### 6.10.2 Fyzikálně-chemické měření v průběhu testu

Tab. 28: Koncentrace rozpuštěného kyslíku a teplota prostředí u jednotlivých koncentrací testované látky Reactive Yellow 85 (RY 25) a u negativní kontroly v průběhu testu akutní toxicity na rybách

	Koncentrace O <sub>2</sub> v 100 mg/l RY 85 (mg/l)	Koncentrace O <sub>2</sub> v 50 mg/l RY 85 (mg/l)	Koncentrace O <sub>2</sub> v negativní kontrolě (mg/l)	Teplota prostředí (°C)
<b>0 hod</b>	7,67	7,57	7,35	20,6
<b>24 hod</b>	7,65	7,55	7,39	20,6
<b>48 hod</b>	7,03	7,04	6,85	20,0
<b>72 hod</b>	7,41	7,24	7,22	20,3
<b>96 hod</b>	7,18	7,13	7,09	20,2

Nasycení kyslíkem se u látky Reactive Yellow 25 během testu pohybovalo v rozmezí 7,03 - 7,67 mg/l. U koncentrace 50 mg/l testované látky bylo změřeno rozmezí 7,04 - 7,57 mg/l. Hodnoty kyslíku v negativní kontrole byly stanoveny na 6,85 - 7,39 mg/l. Teplota prostředí, ve kterém byly umístěny nádoby s testovanými organismy v daných roztocích, se pohybovala v rozmezí 20,0 - 20,6 °C (viz Tab. 28).

Tab. 29: Hodnoty pH pro jednotlivé koncentrace testované látky Reactive Yellow 85 (RY 85) a pro negativní kontrolu v průběhu testu akutní toxicity na rybách

	pH v 100 mg/l RY 85	pH v 50 mg/l RY 85	pH v negativní kontrole
<b>0 hod</b>	7,96	8,00	8,08
<b>24 hod</b>	7,83	7,75	7,64
<b>48 hod</b>	7,74	7,79	7,74
<b>72 hod</b>	7,75	7,76	7,76
<b>96 hod</b>	7,85	7,82	7,79

Hodnoty pH látky Reactive Yellow 85 o koncentraci 100 mg/l se během testu pohybovaly v rozmezí 7,74 - 7,96. U koncentrace 50 mg/l téže látky byly hodnoty pH v rozmezí 7,75 - 8,00. Hodnoty pH v rozmezí 7,74 - 8,08 byly naměřeny v průběhu testu u negativní kontroly (viz Tab. 29).

### 6.10.3 Mortalita ryb v testu akutní toxicity

Tab. 30: Počet živých ryb v různých koncentracích látky Reactive Yellow 85 (RY 85) a v negativní kontrole v průběhu testu s počátečním počtem sedm ryb v jedné koncentraci

	Počet živých ryb ve 100 mg/l RY 85	Počet živých ryb v 50 mg/l RY 85	Počet živých ryb v negativní kontrole
<b>2 hod</b>	7	7	7
<b>24 hod</b>	7	7	7
<b>48 hod</b>	7	7	7
<b>72 hod</b>	7	7	7
<b>96 hod</b>	6	7	7

Na počátku testu bylo do všech roztoků vloženo po sedmi kusech živých ryb. Na konci testu bylo u koncentrace 100 mg/l látky Reactive Yellow 85 napočítáno šest živých ryb. U koncentrace 5 mg/l téže látky a u negativní kontroly bylo i na konci testu sedm živých ryb a mortalita byla tedy nulová (viz Tab. 30).

#### 6.10.4 Výsledné hodnoty toxicity pro Reactive Yellow 85

Tab. 31: Výsledné hodnoty akutní toxicity pro Reactive Yellow 85

Vyjádření toxicity	Toxické dávky (mg/l)
LC <sub>50</sub>	>100,000
LOEC	>100,000
NOEC	>100,000

Vzhledem k nízké mortalitě bylo LC<sub>50</sub> pro látku Reactive Yellow 85 stanoveno na hodnotu větší než 100 mg/l. Úhyn jedné ryby v koncentraci 100 mg/l na konci testu nebyl považován za významný, jelikož je taková hodnota mortality povolena i pro negativní kontrolu (viz Tab. 31).

#### 6.10.5 Validace testu akutní toxicity na rybách pro Reactive Yellow 85

K validaci testu byly splněny následující podmínky

- ❖ V negativní kontrole byla mortalita nulová.
- ❖ Během testu byly udržovány konstantní podmínky.
- ❖ Nasycení kyslíkem u koncentrace 100 mg/l látky Reactive Yellow 85 se snížilo maximálně na 77,94 %. Pro koncentraci 50 mg/l téže látky bylo maximální snížení na hodnotě 78,05 %. U negativní kontroly se saturace kyslíkem během testu maximálně snížila na 75,94 %.

Validace testu tedy ve všech bodech proběhla v pořádku.

## 7 Diskuze

### 7.1 Chov testovaného organismu

K chovu ryb bylo využíváno chovné zařízení ZEBTEC BENCHTOP, které bylo velmi výhodné z hlediska kontroly kvality vody a jejích fyzikálně-chemických parametrů. Chovné zařízení bylo vhodně prostorově uspořádané, dobře tedy sloužilo k oddělování skupin ryb různého stáří a k jejich následnému rozdělování podle pohlaví. Ryby se z jednotlivých nádrží dobře lovily díky absenci vegetace a dalšího materiálu a menším rozměrům nádrže oproti klasickým chovným akváriím. Negativně bych na tomto zařízení hodnotila manipulaci s jednotlivými nádržemi. Během jejich přenosu poměrně často docházelo k vytékání vody z odvodných trubíc. Jako další negativum tohoto zařízení shledávám absenci osvětlení nádrží. ZEBTEC tuto problematiku řeší pouze doporučením minimální intenzity světla (54÷350 Lux) na povrchu vody v chovném zařízení (TECNIPLAST 2014).

Během výzkumu byl zjištěn dominantní vliv krmení ryb na jejich vitalitu a produktivitu. Ryby, které byly krmeny pouze sušeným krmivem, velmi často vůbec nevykazovaly zřetelný pohlavní dimorfismus ve zbarvení ani ve velikosti. Samicím se dostatečně netvořily jikry a z toho důvodu neměly zvětšená bříška a pokusy o tření nebyly úspěšné. Po přidání mraženého krmiva pestrého složení (žábronožky, nitěnky, dafnie či patentky) několikrát týdně se zvýraznil pohlavní dimorfismus ryb a zlepšila se produktivita tření. Pro úspěšné získání jiker potřebných pro testování je tedy nutné co nejdříve napodobovat přirozené podmínky ryb nejen kvalitou vody, ale také brát v potaz jejich všežravost (VERHOEF 1998, SCHMITZ 1999, HIERONIMUS 2012). Potvrdilo se tedy, že strava musí být opravdu pestrá, ale ryby naopak nesmíme ani překrmovat (STERBA 1972, WESTERFIELD 2000). Taktéž bylo dáno za pravdu tvrzení, že se rybám bez přírodních krmiv velmi často ani netvoří jikry (SCHEURMANNOVÁ 1999).

### 7.2 Produkce jiker

Na počátku výzkumu byla pohlaví rozdělena pouhý den před plánovaným třením. Jednodenní oddělení doporučuje několik autorů (ELIÁŠ 1998, SCHEURMANNOVÁ 1999). Tento způsob se ukázal jako málo efektivní, ryby se třely jen výjimečně a většinou až druhý den po připuštění k sobě. Z toho důvodu byla prodloužena doba oddělení pohlaví a ryby byly umístěny odděleně do vytírací nádrže již tři dny před třením. Od tohoto způsobu jsme následně ustoupili z důvodu častějšího úhynu ryb, kažení vody a nedostatku kyslíku i místa pro ryby. Pokud bychom v tom chtěli pokračovat, bylo by nutné zvolit větší vytírací nádrže se zavedením okysličení a výměny vody, případně často vodu vyměňovat ručně, což není v tomto případě možné. Nejvíce se osvědčilo oddělení pohlaví ryb 1 - 2 týdny před plánovaným třením přímo v nádržích zařízení ZEBTEC. Minimálně týdenní oddělení doporučují někteří autoři jako zásadní (PETROVICKÝ 2014). Samicím se díky oddělení od samců začaly více tvořit jikry a samci získali výraznější zbarvení a sexuální apetit. Ideální by ovšem bylo buď zatemnění těchto nádrží přes noc před třením, nebo přesun ryb do vytíracích nádrží s umístěnými přehrádkami a jejich zatemnění přes noc. To bohužel nebylo v našich podmínkách možné vzhledem k délce testu po dobu pěti dnů a tedy potřebě zisku jiker již na začátku pracovního týdne. Tma byla tedy pouze přirozeně během noci. Avšak i tímto způsobem byla dostatečně zvýšena produktivita ryb a třel se jich větší počet. A to především v kombinaci s dobrým krmením.

Doplnění vytíracích nádrží o umělé rostliny statisticky významně nezvýšilo úspěšnost tření, ale jednoznačně ji ani nesnížilo. Umělé rostliny sloužily nejen jako stimulanty ke tření a jako vytírací materiál, ale také k lepšímu duševnímu stavu ryb (SCHEURMANNOVÁ 1999).

Literatura se ohledně otázky doporučeného poměru pohlaví ryb ke tření poměrně rozchází. Samotná směrnice OECD doporučuje poměr 2:1 ve prospěch samců (OECD 2013a). Nám se nejvíce osvědčil stejnocenný poměr pohlaví 3:3, přestože je ve většině literatury doporučen vyšší poměr samců (ELIÁŠ 1998, SCHEURMANNOVÁ 1999, OECD 2013a). Ke tření došlo ve více než 85 % takto nasazených nádrží. Úspěšné tření však bylo zaznamenáno i u poměru 2:2 a to v 60 %. Tyto výsledky se tedy liší od většiny doporučení využívat ke tření vyšší poměr samců na jednu samici. Nejčastěji doporučovaný poměr 2:1 byl při našem výzkumu úspěšný pouze ve 20 % nasazení (viz Tab. 1).

Během testování jsme pozorovali vliv výměny vody ve vytíracích nádržích (VERHOEF 1998, WESTERFIELD 2000, HIERONIMUS 2012). Po výměně vody za čerstvou a teplejší se velmi často zvýšila produktivita ryb. Vliv měla zřejmě především vyšší teplota, která mohla mít stimulační účinek (HANEL 2004). Svou roli mohl hrát také vyšší obsah kyslíku ve vodě a proudění během vylévání a nalévání vody, které mohlo rybám připomínat vlnobití během bouře, které jsou pro oblast, kde se přirozeně vyskytují a třou, typické (BAILEYOVÁ & SANDFORDOVÁ 1998, SCHEURMANNOVÁ 1999, KOTHE 2009). Vliv výměny vody ovšem zeslábl s pokročilým časem. Po dopoledni již výměna vody neměla žádný znatelný význam na tření zřejmě z toho důvodu, že převládala pudová potřeba tření pouze v ranních hodinách (ELIÁŠ 1998). Ovšem během našeho výzkumu docházelo poměrně často ke tření i v odpoledních hodinách. Největší produktivita však byla nejvíce po rozbřesku.

Zvýšení osvětlení nepřineslo statisticky významné zlepšení produktivity ryb, přestože je na osvětlení kladen velký důraz (ELIÁŠ 1998, VERHOEF 1998, HIERONIMUS 2012). Ryby se třely i v zakrytých uměle neosvětlených nádržích většinou v době skutečného rozbřesku. Stačilo tedy jen mírné prosvítání světla a přirozené nastavení denního rytmu ryb. To mohlo být způsobeno nedokonalým splněním čistě laboratorních podmínek a vniku vnějšího světla do laboratoří. Lépe by možná docházelo ke tření až během umělého osvětlení při zajištění stoprocentní tmy zakrytím méně propustným materiálem.

Pokus s vytíracími mističkami umístěnými přímo v chovném zařízení byl úspěšný. Výhodou této metody je nulová manipulace s rybami, přítomnost filtrace a neustále hlídané fyzikálně-chemické parametry vody. Tato metoda je mimo výroby mističek časově nenáročná a vhodná i pro samotné ryby, jelikož zůstávají v prostředí, na které jsou zvyklé a získají rostliny ke tření. Velká část oplozených jiker, kterou by jinak odplavila filtrace, klesne přímo do připravených mističek a pracovník si je poté jen jednoduše odebere pomocí pipety. V našem případě byla k tvorbě mističek využita tavná pistole. Některé mističky se po kontaktu s vodou částečně rozlepily a mohly se do nich poté dostat ryby. Nevýhodou této metody je tedy při využití tavné pistole nutnost následných oprav porušených mističek. Dalším úskalím by mohlo být uvolňování látek z lepidla do vody. Z toho důvodu bych k dalším pokusům doporučila otestování samotného lepidla nebo využití jiného typu, které je pevnější a již bylo provedeno jeho testování z hlediska toxicity, vlivu na ryby a na chemismus vody. Dalším problémem bylo vznášení plastových mističek

ze dna nádrže vlivem filtrace a lehkého materiálu. Tento problém byl následně vyřešen zatížením misek popřípadě výměnou za misky skleněné. Nejvhodnější metodou k získání jiker je dle výsledků našeho výzkumu kombinace obou postupů, tedy nasazení vytíracích nádrží v nejúspěšnějším poměru pohlaví ryb, která budou ideálně dva týdny před třením oddělená, a ke zbylým rybám do chovného zařízení nainstalovat vytírací mističky. Tím se zvýší pravděpodobnost úspěšného zisku většího počtu jiker potřebných k testování.

Testování vhodné koncentrace hřebíčkového oleje k anestezii bylo dokončeno s výsledkem 0,030 mg/l. Vhodné je však raději otestovat nejdříve nižší koncentraci a její účinky. Nejlépe je začít s koncentrací 0,025 mg/l na určitou průměrnou velikost ryb a podle konkrétních reakcí stanovit nejvhodnější koncentraci, přestože se bude pravděpodobně pohybovat v rozmezí 0,030 - 0,035 mg/l. Naše výsledky se tedy shodují s koncentrací uváděnou v literatuře pro akvarijní ryby, která je 0,025 - 0,033 ml/l. Doba zotavení má být u hřebíčkového oleje delší než u ostatních anestetik jako např. MS 222, to se však naším výzkumem neprokázalo, spíše naopak. Ryby se zotavily během pěti minut po vložení do čisté vody (KOLÁŘOVÁ *et al.* 2007). Hřebíčkový olej se tedy pro danio pruhované ukázal jako vhodné anestetikum, které je dokonce několikanásobně levnější než jiná anestetika.

Výzkum *in vitro* fertilizace dania pruhovaného jsme z důvodu zdraví ryb předčasně ukončili, jelikož se jedná o velmi malá a zranitelná zvířata a tato metoda je nejvíce využívána u velkých ryb, kde nehrozí větší nebezpečí poranění. Je možné, že bychom při větší intenzitě stisku břicha ryb jikry a mlíčí získali, ale tato metodika je vhodnější spíše pro zkušené pracovníky s takto malými rybami. Dalším možným vysvětlením nulového zisku gamet by mohl být špatný výběr ryb k tomuto účelu. To je však méně pravděpodobné, jelikož byly vybírány samice s velkým bříškem a vitální pestře zbarvení samci. Testování *in vitro* fertilizace bylo ukončeno také z toho důvodu, že jsme již v té době získávali dostatečné množství jiker ostatními přirozenějšími metodami a nebylo tedy nutné vystavovat ryby zbytečnému riziku.

### **7.3 Nasazení destiček**

Během výzkumu byla zjištěna důležitost proplachování čerstvě oplozených jiker velkým množstvím ředící vody. Stejný efekt mělo také proplachování vodou ze zařízení ZEBTEC. Oplachování jiker doporučují také někteří autoři (ŠMIDT 1955, PRITCHARD 2001, OECD 2013a) z důvodu odstranění nečistot a uhynulých spermií, které by následně během svého rozkladu kazily vodu a přispívaly ke koagulaci jiker. Tento krok byl zásadní pro celý průběh testu, jelikož velká část nepropláchnutých jiker do dalšího dne zkoagulovala, což mohlo zkreslovat výsledky testu a navodit dojem, že je testovaná látka silně toxická. Na nepravost tohoto mylného domnění, že má látka silný toxický účinek a z toho důvodu většina jiker zkoagulovala, v takovém případě poukáže negativní kontrola a kontroly destiček. V případě, že se jedná o nepropláchnuté jikry nebo jinak poškozené, dojde ke koagulaci také u jiker nasazených v kontrolách. Prokázala se tak důležitost nejen proplachování, ale především také nasazení kontrol. V takovém případě bylo nutné test provést celý znovu (OECD 2013a).

### **7.4 Výsledky FET testu pro 3,4-dichloranilin**

Mortalita embryí v koncentracích 3,4-dichloranilinu měla zvyšující se tendenci se zvyšující se koncentrací. Pro nejnižší koncentraci byla stanovena mortalita pouhých 15 %, zatímco



u nejvyšší koncentrace již byla mortalita 85 % (viz Tab. 3). Přestože jsme předpokládali pro koncentraci 5 mg/l již 100% mortalitu. Jikry byly zřejmě poměrně odolné, což dokazuje dokonce nulová mortalita u koncentrace 1,9 mg/l této látky. Vliv mohla mít také horší rozpustnost 3,4-dichloranilinu, která je při 20 °C ve vodě 0,73 g/l (MERCK 2010). Z toho důvodu jsme zaznamenali nutnost dostatečného promíchávání na míchačce po dobu několika hodin, aby se látka stihla rozpustit. Nejpravděpodobněji však naše výsledky ukazují na možnost, že koncentrace 1 mg/l, 1,4 mg/l a 1,9 mg/l ještě neměly dostatečný toxický efekt a mortalita byla z velké části přirozená, proto mohla být u koncentrace 1,9 mg/l dokonce nulová, přestože ani v běžných podmínkách není nulová mortalita zcela běžná. Od koncentrace 2,6 mg/l byl již znatelný stoupající toxický efekt (viz Graf 1). Tento výsledek potvrzuje také studie (BELANGER *et al.* 2012), ve které byly porovnávány výsledky FET testu mj. pro 3,4-dichloranilin z různých laboratoří. Průměr  $LC_{50}$  pro test trvající 96 hodin vyšel 2,89 mg/l. Jednotlivé výsledky byly velmi variabilní a pohybovaly se v rozmezí hodnot od 1,06 mg/l do 5,33 mg/l. V této studii byly uvedeny také výsledky testů akutní toxicity na rybách a pro 3,4-dichloranilin vyšel průměr  $LC_{50}$  7,43 mg/l. Minimální hodnota  $LC_{50}$  byla 1,94 mg/l a maximální 9,8 mg/l. Z těchto výsledků lze usuzovat na větší odolnost dospělých ryb oproti embryím. Velká variabilita výsledků byla u obou typů testů. Možná větší citlivost FET testu oproti testu na dospělých ryb může být brána spíše pozitivně, jelikož je dle mého názoru žádoucí, aby byly testy toxicity více citlivé a zabraňovaly tak větší měrou negativním dopadům xenobiotik na organismy. Důležité je především to, že i embrya ryb ve volné přírodě jsou vystavena účinkům cizorodých látek a je tedy nutné zavést do legislativy povinnost testovat dopad i na tato stádia, bez nichž by dospělci nevznikli a potažmo to má tak dopad samozřejmě i na ně.

U vykultivování embryí v 3,4-dichloranilinu byl zaznamenán klesající trend. V nejnižší koncentraci (1 mg/l) látky bylo na konci testu vykultivováno 17 embryí, zatímco v nejvyšší koncentraci (5 mg/l) pouze tři embrya (viz Tab. 5). Ve všech případech došlo k vykultivování všech žijících embryí, což znamená, že měla látka smrtící účinek již ve stádiu jikry, nikoli až po vykultivování. Potenciální následná mortalita vykultivovaných embryí by mohla být pozorována u dlouhodobějších testů. Přestože byl u většiny embryí v nejvyšší testované koncentraci pozorován edém srdce (viz Příloha č. 2 a 3) a absence cirkulace krve aortou, byla činnost srdce brána jako dostatečná a tedy nebyl tento efekt hodnocen jako letální (OECD 2013a), přestože byl pravděpodobně z dlouhodobého hlediska neslučitelný se životem. Tento fakt je možným úskalím hodnocení činnosti srdce podle směrnice OECD 236, ale musí být bráno v úvahu, že se jedná o hodnocení pouhých čtyř dnů. Mortalita se ve většině případů projevila již po 24hodinové expozici a s časem již dále nerostla. Výjimkou byly vyšší koncentrace 3,4-dichloranilinu (3,6 mg/l a 5 mg/l), u kterých mortalita postupně stoupala. U všech embryí exponovaných koncentrací 5 mg/l této látky byla pozorována absence spontánních pohybů, které mj. indikují tvorbu somitů (OECD 2013a). Somity nebyly u většiny embryí vytvořeny ani do konce testu, což bylo považováno za letální (OECD 2013a). Tento jev zvýšil celkovou mortalitu embryí v této koncentraci.

Výsledná hodnota  $LC_{50}$  pro 3,4-dichloranilin, která byla 3,581 mg/l, a výsledky mortality u jednotlivých koncentrací dokazují vhodnost určené koncentrace 4 mg/l této látky pro využití jako pozitivní kontroly (OECD 2013a). Toxicita je v této koncentraci pro dané účely dostatečná. Hodnota NOEC, která byla námi stanovena na 2,6 mg/l, a hodnota LOEC

stanovená na 3,6 mg/l dokazují předchozí tvrzení o malém toxickém účinku koncentrací 1 mg/l, 1,9 mg/l a 2,6 mg/l. Zároveň hodnota LOEC taktéž dokazuje vhodnost dané koncentrace 4 mg/l pro využití jako pozitivní kontroly, jelikož již od koncentrace 3,6 mg/l jsou pozorovatelné statisticky významné účinky (viz Tab. 6).

## 7.5 Výsledky FET testu pro dichroman draselný

Mortalita embryí u dichromanu draselného měla odlišný průběh oproti stoupající tendenci 3,4-dichloranilinu. Prvních pět koncentrací v koncentrační řadě mělo podobnou mortalitu v rozmezí 20 - 35 %. Přestože se jedná o změny v rozmezí 15 %, bylo použito označení „podobná mortalita“ vzhledem k vlivům přirozeného úhynu embryí. Oproti negativní kontrole, u které byla zaznamenána mortalita 8,3 %, jsou však tyto hodnoty vyšší a tedy lze předpokládat alespoň nízký toxický účinek dichromanu draselného již v těchto koncentracích. Rapidní vzrůst mortality (na 90 %) byl zaznamenán u koncentrace 180 mg/l, kde byl již toxický účinek jasně patrný (viz Tab. 9). V této koncentraci bylo zřejmě dosaženo mezního bodu toxického působení látky. Od této koncentrace byl toxický účinek již velmi silný a to prokazuje i graf závislosti účinku na dávce (viz Graf 4). Na zmíněném grafu i na grafu mortality (viz Graf 3) je viditelná nejprve klesající tendence mortality se zvyšující se koncentrací a následné výrazné zvýšení u nejvyšší koncentrace. Klesající tendenci mortality v první polovině grafu lze vysvětlit již zmíněnou přirozenou mortalitou, na kterou měla látka nulový nebo jen nepatrný vliv. To dokazuje i hodnota LOEC, která byla pro dichroman draselný stanovena na 180 mg/l, tedy teprve při této koncentraci byly pozorovány statisticky významné účinky (viz Tab. 11).

Vykulení na rozdíl od mortality vykazuje u dichromanu draselného klasickou klesající tendenci s rostoucí koncentrací (viz Tab. 10). Přestože tedy neměl dichroman draselný výrazný letální účinek u nižších koncentrací, působil negativně na schopnost vykultivovat embryí. Embrya, která se do konce testu nestihla vykultivovat, nebyla ve většině případů vykultivována ani v následujících dnech, jak jsme zjistili díky prodlouženému pozorování. Nevykultivovaná embrya, která byla na konci testu stanovena jako živá, tedy nakonec také uhynula. Pro tuto látku by byl tedy vhodnější delší test, aby byly výsledky přesnější, případně zavedení výsledků vykultivování na konci testu přímo do stanovení mortality, tedy přidání vykultivování mezi kritéria hodnocení letality. Díky této změně by  $LC_{50}$ , která byla pomocí 96hodinového FET testu stanovena na 185,721 mg/l, vyšla nižší a podle mého názoru by byla taková hodnota reálnější. Stejně tak by se snížila hodnota NOEC, která byla stanovena na 160 mg/l (viz Tab. 11). Také hodnota LOEC by byla po zavedení těchto změn nižší.

Podle jednoho výzkumu (BRAUNBECK *et al.* 2004), kde byl mj. testován chroman draselný, hraje v tomto případě důležitou roli také ochrana embrya chorionem. Vědci pozorovali embrya, stejně jako při našem testování dichromanu draselného, po delší dobu po vykultivování a zjistili, že je toxický vliv této látky mnohem vyšší až při přímém kontaktu a tedy chorion tvoří alespoň z určité části ochrannou bariéru. U embryí s chorionem docházelo k výraznějšímu vlivu látky na embrya až v koncentracích vyšších než 200 mg/l, zatímco u embryí bez chorionu docházelo k postupnému nárůstu toxického působení již od koncentrace 150 mg/l. S ohledem na porovnání výsledků tohoto výzkumu s našimi výsledky lze konstatovat, že byla pro naše testování dichromanu draselného zvolena nízká koncentrační řada a bylo by tedy vhodné testovat vyšší koncentrace. Díky tomu se prokazuje důležitost volby správných koncentrací. V našem případě jsme koncentrace

volili podle předchozích výsledků testů akutní toxicity na rybách, které jsou v této laboratoři prováděny dvakrát ročně a výsledky LC<sub>50</sub> při 96hodinové expozici se pohybují v rozmezí 97 - 172 mg/l. Průměr hodnot LC<sub>50</sub> pro dichroman draselný získaných při akutních testech na rybách v laboratořích VUOSu za posledních 20 let vyšel 126 mg/l (VUOS 2017).

## 7.6 Výsledky FET testu pro Acid Yellow 25

Letální efekt látky Acid Yellow 25 měl stoupající charakter bez jakéhokoli přerušení. Pro nejnižší koncentraci 6 mg/l byla stanovena mortalita pouhých 15 %, pro nejvyšší pak 100 % (viz Tab. 14). U tohoto testu byla tedy vhodně navržena koncentrační řada. Zvyšující se letální efekt podle mého názoru souvisí především se zvýšeným zbarvením roztoků a především s usazováním barvy na dně, která tak více působila na jikry (viz Příloha č. 4). Působení mohlo být tedy nejen toxické, ale i mechanické. Většina přeživších jiker se do konce testu vykulila, výjimkou byla jedna jikra v koncentraci 6 mg/l a jedna jikra v koncentraci 12,5 mg/l (viz Tab. 15). Na vykulení tedy tato látka neměla významný vliv. Barva Acid Yellow 25 byla pomocí FET testu stanovena jako toxická, přestože nebyl tento výsledek vzhledem k předchozím testům na zelených řasách i na dospělých rybách předpokládán. Z toho důvodu jsme tuto látku otestovali ještě na dospělých ryb podle směrnice OECD 203. Za předpokladu, že by byla tato látka dobře rozpustná a nesrážela se na dně, možná by byla stanovena jako netoxická. Vzhledem k tomu, že v přirozeném prostředí vlivem pohybu vody nedochází tak často k takto rapidnímu usazování, mohla by látka na jikry působit menší měrou. K potvrzení této myšlenky by bylo vhodné pokusit se například v dalších studiích o napodobení přirozených podmínek a zajistit míchání roztoku během testu. To však nebylo v tomto testu možné. Další variantou, kterou by bylo možné vyzkoušet, by bylo zavedení semistatického přístupu do FET testu místo námi využívaného statického pojetí. Obě tyto varianty směrnice OECD 236 povoluje. Každodenní výměna roztoku, který by byl předtím řádně promíchán, by mohla zamezit srážení barvy na dně a výsledky by tak mohly být více vypovídající. Další možností by mohlo být rozpuštění látky při minimální teplotě 90 °C, vzhledem k rozpustnosti 30 g/l při této teplotě (SYNTHESIA 2011) a následné ochlazení roztoku na námi požadovanou teplotu.

## 7.7 Výsledky FET testu pro Reactive Yellow 85

Testování druhé žluté barvy Reactive Yellow 85, která byla na rozdíl od Acid Yellow 25 dobře rozpustná, přineslo naprosto odlišné výsledky. Tato látka způsobila maximální mortalitu 15 %, kterou lze ještě považovat z velké části za přirozenou (viz Tab. 19). U koncentrací 1 až 50 mg/l byla do konce testu vykulena všechna embrya, zatímco u nejvyšší koncentrace 100 mg/l se nevykulilo sedm živých embryí (viz Tab. 20). Vyšší koncentrace této látky, potažmo vyšší zbarvení roztoku, tedy zřejmě negativně působila na schopnost vykulení embryí. Embrya mohla být vykulena později, ale vzhledem ke stanovené délce testu to nelze tvrdit s jistotou. Vzhledem k výsledné nízké toxicitě látky nemohla být stanovena hodnota LC<sub>50</sub> a hodnoty LOEC a NOEC byly stanoveny jako vyšší než 100 mg/l (viz Tab. 21).

## 7.8 Výsledky testu akutní toxicity na rybách pro Acid Yellow 25

Pro porovnání výsledků FET testu s testy akutní toxicity na rybách a zhodnocení možného alternativního využití FET testu byly provedeny testy na rybách u dvou látek, u kterých se

předpokládala nízká toxicita, abychom snížili negativní vlivy testování na zvířatech. Přestože jsme předpokládali nízkou toxicitu, použili jsme pro testování nejnížší možný počet nasazených ryb a byly testovány pouze dvě koncentrace. Látka Acid Yellow 25 vyšla v testu akutní toxicity na rybách podle směrnice OECD 203 málo toxická, respektive při nejvyšší koncentraci 100 mg/l byla mortalita nulová. Hodnota  $LC_{50}$  tedy byla vyšší než 100 mg/l (viz Tab. 26). V porovnání s výsledky FET testu pro tuto látku tedy nebyla nalezena shoda, ale důvodem byla zřejmě již zmíněná špatná rozpustnost látky a její usazování na dně jamek, kde leží také jikry. Tomuto problému se dospělé ryby vyhnuly díky promíchávání vody jejich plaváním. Přesto bylo v menší míře pozorováno i během tohoto testu usazování barvy na dně. V tomto případě však neměly tyto sraženiny žádný vliv na ryby, které se stále pohybovaly u hladiny. Tím se samozřejmě nevylučuje možnost, že jsou jikry vůči této látce více citlivé než dospělci. Jako alternativu v tomto případě tedy FET test brát nelze, ale s určitými úpravami průběhu testu v případě špatně rozpustných látek, za předpokladu že by bylo zamezeno srážení, by to v budoucnu možné být mohlo.

## **7.9 Výsledky testu akutní toxicity na rybách pro Reactive Yellow 85**

Opačná situace nastala s výsledky testu akutní toxicity na rybách pro Reactive Yellow 85, tedy pro dobře rozpustnou žlutou barvu (WDV 2012a). V tomto testu bylo také stanoveno  $LC_{50}$  na hodnotu vyšší než 100 mg/l. Uhynula pouze jedna ryba na konci testu u koncentrace 50 mg/l (viz Tab. 30), což není statisticky významné a taková mortalita je povolena i pro negativní kontrolu (OECD 1992). Výsledky FET testu a testu na dospělých ryb se tedy shodují na nízké toxicitě této látky (viz Tab. 21 a Tab. 31). V tomto případě by tedy bylo možné použít FET test jako alternativu pro testy akutní toxicity na rybách.

## Závěr

Testování toxicity látek je nepostradatelnou součástí ochrany všech organismů na Zemi. V mnoha případech je k tomu nutné využití zvířat. Současná legislativa se snaží testování na zvířatech co nejvíce omezit a z toho důvodu jsou zaváděny alternativní testy. Mezi testy, které by měly být postupně nahrazeny alternativou, patří také testování akutní toxicity na dospělých ryb podle směrnice OECD 203. Jako možná náhrada se nabízí tzv. FET test prováděný na embryích ryb, který již není podle klasifikace řazen mezi testy na zvířatech. FET test, jehož postup je stanoven směrnicí OECD 236, zatím není v České republice hojně využíván. Z toho důvodu byl v roce 2017 proveden výzkum v laboratořích VUOS v Rybitví a stanovena nejvhodnější metodika určená přímo pro konkrétní podmínky laboratoře, která byla následně vyzkoušena na dvou známých a dvou neznámých látkách.

Stěžejním krokem celé metodiky bylo získání dostatečného množství životaschopných jiker. K tomu bylo zapotřebí nastavení vhodného chovu dania pruhovaného. Ryby byly chovány v zařízení ZEBTEC, které zajišťovalo kvalitu vody. Během výzkumu byl zjištěn zásadní vliv krmení ryb. Ryby musely být krmeny nejen umělým krmivem, ale také pestrá živou stranou, jinak nebyly dostatečně vitální, nevykazovaly pestrý pohlavní dimorfismus a málo se třely. Další důležitou podmínkou k úspěšnému tření bylo oddělení pohlaví ryb 1 - 2 týdny před plánovaným testem. Jako nejvhodnější poměry pohlaví ryb (samice:samci) se osvědčily poměry 3:3, 3:4 a 2:4. Důležitou roli hrál také věk ryb. Nejvhodnější věk ryb ke tření byl kolem jednoho roku. Ryby starší než rok a půl se netřely již téměř vůbec. Ke tření byly využity vytírací nádrže s roštem, který bránil požeru jiker rybami. Ke zvýšení pravděpodobnosti zisku většího počtu jiker byly do nádrží zařízení ZEBTEC ke zbylým rybám nainstalovány vytírací mističky se sítkou opatřené umělými rostlinami.

Získané jikry musely být propláchnuty minimálně jedním litrem zředovací vody nebo čerstvou vodou z chovného zařízení. Testování probíhalo v 24jamkových mikrodestičkách s víčkem vždy tak, že 20 jamek bylo vyplněno testovanou látkou o dané koncentraci a zbylé čtyři jamky byly naplněny ředící vodou a sloužily jako kontrola destičky. Kromě koncentrační řady testované látky byly nasazeny ještě dvě kontrolní destičky. Jako pozitivní kontrola sloužil 3,4-dichloranilin o koncentraci 4 mg/l a jako negativní kontrola byla využita ředící voda. Následně byly každých 24 hodin zaznamenávány změny hlavních kritérií letality: koagulace, činnost srdce, tvorba somitů a oddělení ocásku od žloutkového vaku. Po 96 hodinách byly pomocí programu ToxRat Professional Version 3.2.1 vyhodnoceny výsledky a stanoveny hodnoty LC<sub>10</sub>, LC<sub>20</sub>, LC<sub>50</sub>, LOEC a NOEC. Pro testovaný 3,4-dichloranilin vyšla hodnota LC<sub>50</sub> 3,581 mg/l, pro dichroman draselný LC<sub>50</sub> 185,721 mg/l a pro látku Acid Yellow 25 LC<sub>50</sub> 17,687 mg/l. Hodnota LC<sub>50</sub> pro Reactive Yellow 85 nemohla být stanovena vzhledem k nízké toxicitě látky.

Následně byly provedeny testy akutní toxicity na dospělých ryb pro látky Acid Yellow 25 a Reactive Yellow 85 k porovnání výsledků. U látky Acid Yellow 25 byly výsledky jednoznačně rozdílné. V testu na dospělých ryb vyšla hodnota LC<sub>50</sub> vyšší než 100 mg/l, tedy se neprojevovalo žádné toxické působení, zatímco pomocí FET testu byla stanovena hodnota LC<sub>50</sub> na 17,687 mg/l. Důvodem k rozdílným výsledkům byla shledána srážlivost látky a její usazování na dně. Jikry byly látkou zcela obaleny a docházelo tak k mnohem větší interakci. Pro tuto látku tedy nebyl FET test vhodný a bylo by nutné přistoupit

k úpravě postupu například každodenní výměnou roztoku. V případě Reactive Yellow 85 byly výsledky FET testu a testu na dospělých ryb totožné. V obou případech nebyla zaznamenána toxicita látky a byla tedy stanovena hodnota  $LC_{50}$  vyšší než 100 mg/l. Podle srovnání výsledků s literaturou lze usuzovat na větší citlivost jiker oproti dospělcům. Dle našich výsledků tedy lze FET test v budoucnu využívat místo testů akutní toxicity na dospělých ryb v případě vhodných vlastností testovaných látek, tedy alespoň pro velkou část z nich. Je nutné předem správně posoudit vhodnost využití FET testu pro konkrétní látku vzhledem k jejím vlastnostem.

## Seznam použité literatury

1. ANDĚL, P. (2011): Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring. - Evernia s.r.o., Liberec, ISBN 978-80-903787-9-7.
2. ARIVARASU, N. A., FATIMA, S. & MAHMOOD, R. (2008): Oral administration of potassium dichromate inhibits brush border membrane enzymes and alters antioxidant status of rat intestine. - Archives of Toxicology 82 (12): 951 - 958, ISSN 0340-5761.
3. BAILEYOVÁ, M. & SANDFORDOVÁ, G. (1998): Svět akvariálních ryb. Ryby sladkovodní, brakických vod a mořské. - Václav Svojtka & Co., Praha, ISBN 80-7237-003-0.
4. BANAT, I. M., NIGAM, P., SINGH, D. & MARCHANT, R. (1996): Microbial decolorization of textile-dyecontaining effluents: A review. - Bioresource Technology 58: 217 - 227, ISSN 0960-8524.
5. BARUŠ, V., ČERNÝ, K., GAJDŮŠEK, J., HENSEL, K., HOLČÍK, J., KÁLAL, L., KRUPAUER, V., KUX, Z., LIBOSVÁRSKÝ, J., LOM, J., LUSK, S., MORAVEC, F., OLIVA, O., PEŇÁZ, M., PIVNIČKA, K., PROKEŠ, M., RÁB, P., ŠPINAR, Z., ŠVÁTORA, M. & VOSTRADOVSKÝ, J. (1995): Fauna ČR a SR. Mihulovci (*Petromyzontes*) a ryby (*Osteichthyes*) (1). - Academia, Praha, ISBN 80-200-0500-5.
6. BECK, P. (1992): Abeceda akvaristiky. - Granit, s. r. o., Praha, ISBN 80-85805-79-0.
7. BELANGER, S. E., RAWLINGS, J. M. & CARR, G. J. (2012): An Update to the Fish Embryo Toxicity-Acute Fish Toxicity Relationship and Prospects for Support of the Use of the FET as an Animal Alternative. - Meeting of the OECD ad hoc Expert Group on the Fish Embryo Test.
8. BOULENGER, E. G. (1927): The Aquarium Book. - Duckworth, Londýn.
9. BRAUNBECK, T., BÖTTCHER, M., HOLLERT, H., KOSMEHL, T., LAMMER, E., LEIST, E., RUDOLF, M. & SEITZ, N. (2004): Towards an alternative for the acute fish LC<sub>50</sub> test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species - an update. - Alternatives to animal experimentation 22 (2): 87 - 102, ISSN 1868-596X.
10. BRAUNBECK, T. & LAMMER, E. (2006): Fish Embryo Toxicity Assays. - Aquatic Ecology & Toxicology Department of Zoology, University of Heidenberg, Germany.
11. BRHEL, P., PICKA, K. & HRUBÁ, D. (1998): Úvod do průmyslové toxikologie. - Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Brno, ISBN 80-210-1738-4.
12. ÇABU, A., AYTAR, P., GEDIKLI, S., ÖZEL, W. K. & KOCABIYIK, E. (2013): Biosorption of acidic textile dyestuffs from aqueous solution by *Paecilomyces* sp. isolated from acidic mine drainage. - Environmental Science and Pollution Research 20 (7): 4540 - 4550, ISSN 1614-7499.
13. CROSSLAND, N. O. (1990): A review of the fate and toxicity of 3,4-dichloroaniline in aquatic environments. - Chemosphere 21 (12): 1489 - 1497, ISSN 0045-6535.
14. DALEŠICKÝ, J. (1996): Jakost vod - Stanovení sumy vápníku a hořčíku, odměrná metoda s EDTA. ČSN EN ISO 6059. - Hydroprojekt a. s., Praha.
15. DARROW, K. O. & HARRIS, W. A. (2004): Characterization and development of courtship in zebrafish, *Danio rerio*. - Zebrafish 1 (1): 40 - 45, ISSN 1557-8542.

16. DEVLAMING, V., GROSSMAN, G. & CHAPMAN, F. (1982): On the use of Gonosomatic index. - *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Physiology* 73 (1): 31-39, ISSN 1095-6433.
17. DVOŘÁK, P., ANDREJI, J., VELÍŠEK, J. & PYSZKO, M. (2014): Urogenitální soustava (*Apparatus urogenitalis*). - In: DVOŘÁK, P., PYSZKO, M., VELÍŠEK, J., DVOŘÁKOVÁ LÍŠKOVÁ, Z. & ANDREJI, J. [eds.] (2014): *Anatomie a fyziologie ryb: 105 - 120*, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, ISBN 978-80-87437-80-3.
18. ELIÁŠ, J. (1998): *Rady chovatelům - akvarijní ryby*. - Adventinum nakladatelství, s. r. o., Praha, ISBN 978-80-7151-252-3.
19. EPA (1979): Toxic Substances Control Act (TSCA) Chemical Substance Inventory: User guide and indices to the initial inventory: Substance name index. - U.S. Government Printing Office, Washington, D. C.
20. ES (2006): Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 ze dne 18. prosince 2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnic Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES. - Evropský parlament a rada EU.
21. EVERHART, W. H. & YOUNGS, W. D. (1981): *Principles of Fishery Science*. - Cornell University Press, New York, ISBN 978-08-01413-34-6.
22. EVROPSKÁ KOMISE (2017): Nařízení komise (EU) 2017/735 ze dne 14. února 2017, kterým se přizpůsobuje technickému pokroku příloha nařízení (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. - Evropská komise.
23. FAWCETT, D. W. (1970): A comparative view of sperm ultrastructure. - *Biology of Reproduction* 2 (2): 90-127, ISSN 1529-7268.
24. FILBY, A. L., PAULL, G. C., BARTLETT, E. J., VAN LOOK, K. J. & TYLER, C. R. (2010): Physiological and health consequences of social status in zebrafish (*Danio rerio*). - *Physiology & Behavior* 101 (5): 576-587, ISSN 0031-9384.
25. FLOCK, A. (1971): The lateral line organ mechanoreceptors. - In: HOAR, W. S. & RANDAL, D. J. [eds.] (1983): *Fish physiology: 241 - 263*, Academic Press, New York, ISBN 978-0-12-350405-0.
26. FREMROVÁ, L. (1999): *Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [Brachydanio rerio Hamilton - Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]*. ČSN EN ISO 7346. - Hydroprojekt a. s., Praha.
27. FREMROVÁ, L. (2009): *Jakost vod - Stanovení akutní toxicity odpadních vod pro jikry dania pruhovaného (Danio rerio)*. ČSN EN ISO 15088. - Hydroprojekt a. s., Praha.
28. FRIBOURGH, J. H., MCCLENDON, D.E. & SOLOFF, B. L. (1970): Ultrastructure of the Goldfish, *Carassius auratus* (Cyprinidae), Spermatozoon. - *Copeia* 2: 274 - 279, ISSN 1938-5110.
29. GAD, S. C. (2000): *In vitro toxicology*. Second Edition. - Taylor and Francis, London, ISBN 0-203-36281-0.
30. GAISLER, J. & ZIMA, J. (2007): *Zoologie obratlovců*. - Academia, Praha, ISBN 978-80-200-1484-9.



31. GERLACH, G. & LYSIAK, N. (2005): Kin recognition and inbreeding avoidance in zebrafish, *Danio rerio*, is based on phenotype matching. - *Animal Behaviour* 71 (6): 1371 - 1377, ISSN 0003-3472.
32. GERLACH, G. (2006): Pheromonal regulation of reproductive success in female zebrafish: female suppression and male enhancement. - *Animal Behaviour* 72 (5): 1119 - 1124, ISSN 0003-3472.
33. GOOLISH, E. M., EVANS, R., OKUTAKE, K. & MAX, R. (1998): Chamber volume requirements for reproduction of the zebrafish *Danio rerio*. - *The Progressive Fish-Culturist* 60 (2): 127 - 132.
34. GUILHERMINO, L., SOARES, A. M. V. M., CARVALHO, A. P. & LOPES, M. C. (1998): Acute Effects of 3,4-Dichloroaniline on Blood of Male Wistar Rats. - *Chemosphere* 37 (4): 619 - 632, ISSN 0045-6535.
35. GÜLDEN, M. & SEIBERT, H. (2005): Impact of bioavailability on the correlation between *in vitro* cytotoxic and *in vivo* acute fish toxic concentrations of chemicals. - *Aquatic Toxicology* 72 (4): 327 - 337, ISSN 0166-445X.
36. HANEL, L. (2004): Akvaristika: Biologie a chov vodních živočichů, II. speciální část. - Karolinum, Praha, ISBN 80-246-0744-1.
37. HARDER, W. (1975): Anatomy of Fishes Part I: Text. - Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, ISBN 978-3-510-65067-5.
38. HIERONIMUS, H. (2012): 8000 akvárií na dva druhy ryb. Akvariijní ryby jako modelová zvířata. - *Aquaristik* 2: 15 -18, ISSN 1803-6961.
39. HOLČÍK, J. (1998): Ichtyológia. - Příroda, Bratislava, ISBN 80-07-01035-1.
40. CHUNG, K. T., STEVENS, S. E. & CERNIGLIA, C. E. (1992): The Reduction of Azo Dyes by the Intestinal Microflora. - *Critical Reviews in Microbiology* 18: 175 - 190, ISSN 1040-841X.
41. INCARDONA, J. P., LINBO, T. L. & SCHOLZ, N. L. (2011): Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. - *Toxicology and Applied Pharmacology* 257 (2): 242 - 249, ISSN 0041-008X.
42. KAESTNER, A. (1991): Lehrbuch der speziellen Zoologie. - Gustav Fisher Verlag, Jena, ISBN 978-33-34604-12-0.
43. KHAN, M. F., KAPHALIA, B. S. & ANSARI, G. A. S. (1995): Erythrocyte-aniline interaction leads to their accumulation and iron deposition in rat spleen. - *Journal of Toxicology and Environmental Health* 44 (4): 415 - 421, ISSN 0098-4108.
44. KIMMEL, C. B., BALLARD, W. W., KIMMEL, S. R., ULLMANN, B. & SCHILLING, T. F. (1995): Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. - *Developmental Dynamics* 203 (3): 253 - 310, ISSN 1097-0177.
45. KLIKA, E., VACEK, Z., DVOŘÁK, M. & KAPELLER, K. (1986): Embryologie. - Avicenum, Praha.
46. KOLÁŘOVÁ, J., VELÍŠEK, J., NEPEJHALOVÁ, L., SVOBODOVÁ, Z., KOUŘIL, J., HAMÁČKOVÁ, J., MÁCHOVÁ, J., PIAČKOVÁ, V., HAJŠLOVÁ, J., HOLADOVÁ, K., KOCOUREK, V., KLIMÁNKOVÁ, E., MODRÁ, H., DOBŠÍKOVÁ, R., GROCH, L. & NOVOTNÝ, L. (2007): Anestetika pro ryby. - Jihočeská univerzita, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Vodňany, ISBN 80-8588-61-4.
47. KOPECKÝ, V. & MIKULÁŠEK, P. (2005): Desalination of Reactive Yellow 85 by nanofiltration. - *Environment Protection Engineering* 31 (3-4): 1 - 12, ISSN 0324-8828.

48. KOTHE, H. W. (2009): 250 druhů akvarijských ryb. -Euromedia Group, k. s., Praha, ISBN 978-80-242-2522-7.
49. LAALE, H. W. (1977): The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review. - Journal of Fish Biology 10 (2): 121 - 173, ISSN 1095-8649.
50. LAMMER, E., CARR, G. J., WENDLER, K., RAWLINGS, J. M., BELANGER, S. E. & BRAUNBECK, T. (2009): Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? - Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 149 (12): 196 - 209, ISSN 1532-0456.
51. LANGE, M., GEBAUER, W., MARKL, J. & NAGEL, R. (1995): Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* and RGT-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. - Chemosphere 30 (11): 2087 - 2102, ISSN 0045-6535.
52. LO, H. H., VALENTOVIC, M. A., BROWN, P. I. & RANKIN, G. U. (1994): Effect of chemical form, route of administration and vehicle on 3,5-dichloroaniline-induced nephrotoxicity in the Fischer 344 rat. - Journal of Applied Toxicology 14 (6): 417 - 422, ISSN 1099-1263.
53. MAACK, G. & SEGNER, H. (2003): Morphological development of the gonads in zebrafish. - Journal of Fish Biology 62 (4): 895 - 906, ISSN 1095-8649.
54. MASTER, F. J., POORAN, D. A., PETIGARA, S. D., WEISZ, E. & ARNOLD, H. (1993): Diseases of the Skin. - B. Jain Publishers Pvt. Ltd, New Delhi, ISBN 81-70211-36-0.
55. MATRKA, M. & RUSEK, V. (1998): Průmyslová toxikologie: Úvod do obecné a speciální toxikologie. - Univerzita Pardubice, Fakulta Chemicko-technologická, Pardubice, ISBN 80-7194-131-X.
56. MERCK (2010): Bezpečnostní list podle nařízení (ES) č. 1907/2006/EC (REACH), v platném znění - 3,4-dichloranilin. - Merck KGaA, Darmstadt.
57. MONTEIRO, M., QUINTANEIRO, C., PASTORINHO, M., PEREIRA, M. L., MORGADO, F., GUILHERMINO, L. & SOARES, A. M. V. M. (2006): Acute effects of 3,4-dichloroaniline on biomarkers and spleen histology of the common goby *Pomatoschistus microps*. - Chemosphere 62 (8) 1333 - 1339, ISSN 0045-6535.
58. MRAKOVČIČ, M. & HALEY, L. E. (1979): Inbreeding depression in the Zebra fish *Brachydanio rerio* (Hamilton Buchanan). - Journal of Fish Biology 15 (3): 323 - 327, ISSN 1095-8649.
59. MZe (2004): Zákon č. 326/2004 Sb. ze dne 31. května 2004 o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů. - Ministerstvo zemědělství.
60. MŽP & MZ (2001): Vyhláška 376/2001 Sb. ze dne 17. října 2001 o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů. - Ministerstvo životního prostředí a Ministerstvo zdravotnictví, Praha.
61. MŽP & MZ (2016): Vyhláška 94/2016 Sb. ze dne 23. března 2016 o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů. - Ministerstvo životního prostředí a Ministerstvo zdravotnictví, Praha.
62. MŽP (2001): Zákon č. 185/2001 Sb. ze dne 15. května 2001 o odpadech a o změně některých dalších zákonů. - Ministerstvo životního prostředí.
63. MŽP (2003): Zákon č. 356/2003 Sb. ze dne 23. září 2003 o chemických látkách a chemických přípravcích. - Ministerstvo životního prostředí.

64. MŽP (2009): Program na snížení znečištění povrchových vod nebezpečnými závadnými látkami a zvláště nebezpečnými závadnými látkami 2010 - 2013. - Ministerstvo životního prostředí České Republiky.
65. NAGEL, R. (2002): DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio* - a general model in ecotoxicology and toxicology. - ALTEX 19 (1): 38 - 48, ISSN 1868-596X.
66. NASIADKA, A. & CLARK, M. D. (2012): Zebrafish Breeding in the Laboratory Environment. - ILAR Journal 53 (2): 161 - 168, ISSN 1930-6180.
67. NIIMI, A. J. & LAHAM, Q. N. (1974): Influence of breeding time interval on egg number, mortality, and hatching of the zebra fish *Brachydanio rerio*. - Canadian Journal of Zoology 52 (4): 515 - 517, ISSN 1480-3283.
68. OECD (1984): Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-day Study. Test Guideline No. 204, Guidelines for the Testing of Chemicals. - OECD, Paris.
69. OECD (1992): Fish, Acute Toxicity Test. Test Guideline No. 203, Guidelines for the Testing of Chemicals. - OECD, Paris.
70. OECD (1998): Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages. Test Guideline No. 212, Guidelines for the Testing of Chemicals. - OECD, Paris.
71. OECD (2000): Fish, Juvenile Growth Test. Test Guideline No. 215, Guidelines for the Testing of Chemicals. - OECD, Paris.
72. OECD (2009): 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition. Test Guideline No. 230, Guidelines for the Testing of Chemicals. - OECD, Paris.
73. OECD (2011): Fish Sexual Development Test. Test Guideline No. 234, Guidelines for the Testing of Chemicals. - OECD, Paris.
74. OECD (2012): Fish Short Term Reproduction Assay. Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals. - OECD, Paris.
75. OECD (2013a): Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Test Guideline No. 236, Guidelines for the Testing of Chemicals. - OECD, Paris.
76. OECD (2013b): Fish, Early-life Stage Toxicity Test. Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals. - OECD, Paris.
77. OECD (2015a): Environment at a Glance 2015: OECD Indicators. - OECD Publishing, Paris, ISBN 978-92-64-23519-9.
78. OECD (2015b): Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT). Test Guideline No. 240, Guidelines for the Testing of Chemicals. - OECD, Paris.
79. PATLOLLA, A. K., BARNES, C., HACKETT, D. & TCHOUNWOU, P. B. (2009): Potassium Dichromate Induced Cytotoxicity, Genotoxicity and Oxidative Stress in Human Liver Carcinoma (HepG<sub>2</sub>) Cells. - International Journal of Environmental Research and Public Health 6 (2): 643 - 653, ISSN 1660-4601.
80. PAULL, G. C., FILBY, A. L., GIDDINS, H. G., COE, T. S., HAMILTON, P. B. & TYLER, C. R. (2010): Dominance hierarchies in zebrafish (*Danio rerio*) and their relationship with reproductive success. - Zebrafish 7 (1): 109-117, ISSN 1557-8542.
81. PAYSAN, K. (2003): Akvariijní ryby. - Granit, s. r. o., Praha, ISBN 80-7296-021-0.
82. PETROVICKÝ, I. (2014): Akvariijní ryby. - Adventinum, s. r. o., Praha, ISBN 978-80-7442-049-8.
83. PLECITÝ, V., ŽDICHYNEC B. & NÁCOVSKÝ, P. (2008): Akvárium doma. - Aesculapus - KS, Praha, ISBN 978-80-901132-7-5.
84. PRITCHARD, V. L. (2001): Behaviour and morphology of the zebrafish, *Danio rerio*. PhD dissertation. - The University of Leeds.

85. PROKEŠ, J., BARTONÍČEK, F., BRANIŠ, M., POUČKOVÁ, P., ŠTABLOVÁ, R., ŠTAMBERGOVÁ, A., VEČERKOVÁ, J. & WENKE, M. (2005): Základy toxikologie: Obecná toxikologie a ekotoxikologie. - Galén, Praha, ISBN 80-7262-301-X.
86. REINHARDT, C. A. (1994): Alternatives to animal testing: New ways in biomedical sciences, trends and progress. - VCH, Weinheim, ISBN 3-527-30043-0.
87. RODRÍGUEZ-MARÍ, A., CAÑESTRO, C., BREMILLER, R. A., NGUYEN-JOHNSON, A., ASAKAWA, K., KAWAKAMI, K. & POSTLETHWAIT, J. H. (2010): Sex Reversal in Zebrafish fancl Mutants Is Caused by Tp53-Mediated Germ Cell Apoptosis. - PLoS Genetics 6 (7): 1 - 14.
88. ŞAŞMAZ, S., GEDIKLI, S., AYTAR, P., GÜNGÖRMEDI, G., ÇABUK, A., HÜR, E., UNAL, A. & KOLANKAYA, N. (2011): Decolorization potential of some reactive dyes with crude laccase and laccase-mediated system. - Applied Biochemistry and Biotechnology 163: 346 - 361, ISSN 1559-0291.
89. SEGNER, H. (2004): Cytotoxicity assays with fish cells as an alternative to the acute lethality test with fish. - Alternatives to Laboratory Animals 32 (4): 375 - 382, ISSN 0261-1929.
90. SCHEURMANNOVÁ, I. (1999): Akvariijní rybky. - Vasut, Praha, ISBN 80-7236-084-1.
91. SCHMITZ, S. (1999): Akvariijní ryby. - Priroda a. s., Bratislava, ISBN 80-07-01060-2.
92. SPENCE, R. & SMITH, C. (2005): Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, *Danio rerio*. - Animal Behaviour 69 (6): 1317 - 1323, ISSN 0003-3472.
93. SPENCE, R., GERLACH, G., LAWRENCE, C. & SMITH, C. (2008): The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. - Biological Reviews Cambridge Philosophical Society 83 (1): 13 - 34, ISSN 1469-185X.
94. STERBA, G. (1972): Akvaristika: Akvariijní technika, Biologie, ekologie a anatomie ryb, Popis jednotlivých druhů ryb. - Práce, Praha.
95. SVOBODOVÁ, Z., BEKLOVÁ, M., MÁCHOVÁ, J., DOBŠÍKOVÁ, R., MÁCOVÁ, S., MODRÁ, H. & VELÍŠEK, J. (2010): Ekotoxikologie - praktická cvičení. Testy toxicity na organismech vodního prostředí. - Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno, ISBN 978-80-7305-120-4.
96. ŠMIDT, G. A. (1955): Embryologie živočichů, část I.: Obecná embryologie. - Československá Akademie věd, Praha.
97. ŠVEC, P. (2010): Bezpečnostní list podle nařízení (ES) č. 1907/2006/EC (REACH), v platném znění - dichroman draselný. - PENTA s. r. o.
98. TALWAR, P. K. & JHINGRAN, A. G. (1991): Inland fishes of India and adjacent countries, Volume 2. - Oxford & IBH, Rotterdam, ISBN 81-2040-639-7.
99. TECNIPLAST (2014): ZEBTEC Benchtop System - Návod k použití. - Tecniplast, Itálie.
100. THE GOVERNMENTS OF THE REPUBLIC OF AUSTRIA, THE KINGDOM OF BELGIUM, CANADA, THE KINGDOM OF DENMARK, THE FRENCH REPUBLIC, THE FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY, THE KINGDOM OF GREECE, THE REPUBLIC OF ICELAND, IRELAND, THE ITALIAN REPUBLIC, THE GRAND DUCHY OF LUXEMBOURG, THE KINGDOM OF THE NETHERLANDS, THE KINGDOM OF NORWAY, THE PORTUGUESE REPUBLIC, SPAIN, THE KINGDOM OF SWEDEN, THE SWISS CONFEDERATION, THE TURKISH REPUBLIC, THE UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND & THE UNITED STATES OF AMERICA (1960): Convention on the Organisation for Economic Co-operation and Development. - Paris.

101. UUSI-HEIKKILÄ, S., WOLTER, C., MEINELT, T. & ARLINGHAUS, R. (2010): Size-dependent reproductive success of wild zebrafish *Danio rerio* in the laboratory. - *Journal of Fish Biology* 77 (3): 552 - 569, ISSN: 1095-8649.
102. VALENTOVIC, M. A., YAHIA, T., BALL, J. G., HONG, S. K., BROWN, P. I. & RANKIN, G. O. (1997): 3,4-Dichloroaniline acute toxicity in male Fischer 344 rats. - *Toxicology* 124 (2): 125 - 134, ISSN 0300-483X.
103. VAN DEN HURK, R. & LAMBERT, J. G. D. (1983): Ovarian steroid glucuronides function as sex pheromones for male zebrafish, *Brachydanio rerio*. - *Canadian Journal of Zoology* 61 (11): 2381-2387, ISSN 1480-3283.
104. VAN DEN HURK, R. & RESINK, J. W. (1992): Male reproductive system as sex pheromone producer in teleost fish. - *Journal of Experimental Zoology* 261 (2): 204 - 213, ISSN 1932-5231.
105. VERHOEF, E. (1998): Akvariijní ryby - tropické akvariijní ryby od A do Z. - Rebo Productions CZ, spol. s r. o., Čestlice, ISBN 978-80-255-0234-1.
106. VOSTRADOVSKÝ, J. (1976): Vliv trvalého znečištění na ryby a rybářství. - In: ALBERTOVÁ, O., LEONTOVYČ, I., SVOBODOVÁ, Z., VOSTRADOVSKÁ, M. & VOSTRADOVSKÝ, J. (1976): *Základy ichtyologie*. Bulletin metodického střediska vodohospodářských laboratoří č. 28: 46 - 53, Výzkumný ústav vodohospodářský, Praha, ISBN 60-579-76.
107. VUOS (2017): Závěrečná zpráva- Dichroman draselný – Akutní toxicita pro ryby.
108. WALKER, C. & STREISINGER, G. (2000): Embryo production by In-vitro Fertilization - In: WESTERFIELD, M. (2000): *The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. - University of Oregon Press, Eugene, 978-01-280-3475-0.
109. WEIGT, S., HUEBLER, N., STRECKER, R., BRAUNBECK, T. & BROSCARD, T. H. (2011): Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. - *Toxicology* 281 (1 - 3): 25 - 36, ISSN 0300-483X.
110. WESTERFIELD, M. (2000): *The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. - University of Oregon Press, Eugene, 978-01-280-3475-0.
111. ZHU, B., LIU, T., HU, X. & WANG, G. (2012): Developmental toxicity of 3,4-dichloroaniline on rare minnow (*Gobiocypris rarus*) embryos and larvae. - *Chemosphere* 90 (3) 1032 - 1039, ISSN 0045-6535.

#### Internetové zdroje:

1. ECHA (2017): REACH [online]. [cit. 8. 11. 2017]. Dostupné z WWW: <https://echa.europa.eu/cs/regulations/reach/understanding-reach>
2. CHEMWATCH (2010): Material Safety Data Sheet: Acid Yellow 25 (sc-214483) [online]. [cit. 7. 11. 2017]. Dostupné z WWW: <http://datasheets.scbt.com/sc-214483.pdf>
3. CHRISTINE BUSKE (2012): Zebrafish research: Growing demands in South America [online]. [cit. 21. 02. 2018]. Dostupné z WWW: <http://www.noldus.com/blog/zebrafish-research-growing-demands-in-south-america>
4. MZV ČR (2017): Základní informace o OECD [online]. [cit. 8. 11. 2017]. Dostupné z WWW:

- [http://www.mzv.cz/oecd.paris/cz/zakladni\\_informace\\_o\\_oecd/index.html](http://www.mzv.cz/oecd.paris/cz/zakladni_informace_o_oecd/index.html)
5. NCBI (2017): PubChem Compound Database - Acid Yellow 25 (CID 23675736). - National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 6. 11. 2017]. Dostupné z WWW:  
[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acid\\_Yellow\\_25](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acid_Yellow_25)
  6. NIOSH (2014): International Chemical Safety Cards (ICSC) - 3,4-dichloroaniline. - The National Institute for Occupational Safety and Health [online]. [cit. 5. 9. 2017]. Dostupné z WWW:  
<https://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng0144.html>
  7. NIOSH (2015): International Chemical Safety Cards (ICSC) - Potassium dichromate. - The National Institute for Occupational Safety and Health [online]. [cit. 6. 9. 2017]. Dostupné z WWW:  
<https://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng1371.html>
  8. OECD (2017): About the OECD [online]. [cit. 8. 11. 2017]. Dostupné z WWW:  
<http://www.oecd.org/about/>
  9. OECD (2017a): OECD Guidelines for the Testing of Chemicals [online]. [cit. 8. 11. 2017]. Dostupné z WWW:  
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>
  10. REACH (2017): Registrace, Evaluace a Autorizace Chemických látek [online]. [cit. 8. 11. 2017]. Dostupné z WWW:  
<http://www.reach.cz/>
  11. SYNTHESIA, a. s. (2011): EGACIDOVÁ ŽLUŤ R [online]. [cit. 7. 11. 2017]. Dostupné z WWW:  
<https://dyes.synthesia.eu/cze/organicka-barviva/textilni-barviva/egacidova-zlut-r>
  12. SYNTHESIA, a. s. (2011a): OSTAZINOVÁ ŽLUŤ H-8G [online]. [cit. 7. 11. 2017]. Dostupné z WWW:  
<https://dyes.synthesia.eu/cze/organicka-barviva/textilni-barviva/ostazinova-zlut-h-8g>
  13. WDV (2012): Acid Yellow 25. - World Dye Variety [online]. [cit. 6. 11. 2017]. Dostupné z WWW:  
<http://www.worlddyevariety.com/acid-dyes/acid-yellow-25.html>
  14. WDV (2012a): Reactive Yellow 85. - World Dye Variety [online]. [cit. 6. 11. 2017]. Dostupné z WWW:  
<http://www.worlddyevariety.com/reactive-dyes/reactive-yellow-85.html>

## Seznam příloh

**Příloha č. 1:** Fotografie vývoje embrya dania pruhovaného v čase

**Příloha č. 2:** Fotografie nesprávně se vyvíjejícího embrya v 3,4-dichloranilinu o koncentraci 4 mg/l celkem 66 hodin od oplození

**Příloha č. 3:** Fotografie nesprávně se vyvíjejícího vykuleného embrya v 3,4-dichloranilinu o koncentraci 4 mg/l celkem 90 hodin od oplození

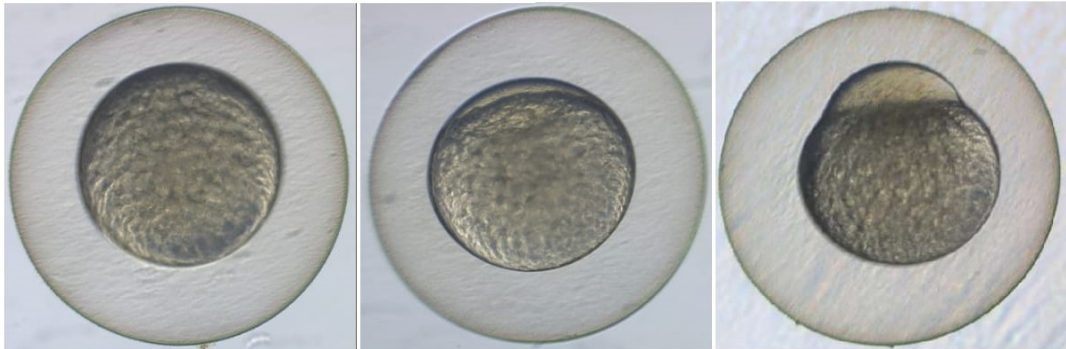
**Příloha č. 4:** Fotografie embrya v chorionu obaleném barvou Acid Yellow 25 o koncentraci 100 mg/l celkem 26 hodin od oplození

**Příloha č. 5:** Tabulka zápisu pozorování kritérií mortality - příklad

# Přílohy

Příloha č. 1: Fotografie vývoje embrya dania pruhovaného v čase (foto: NALEZINKOVÁ)

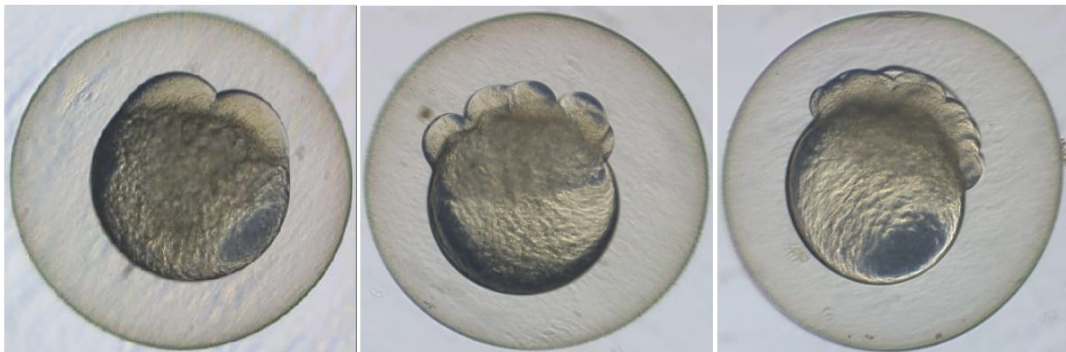
Embryonální vývoj druhu *Danio rerio*



0 hod

0,3 hod

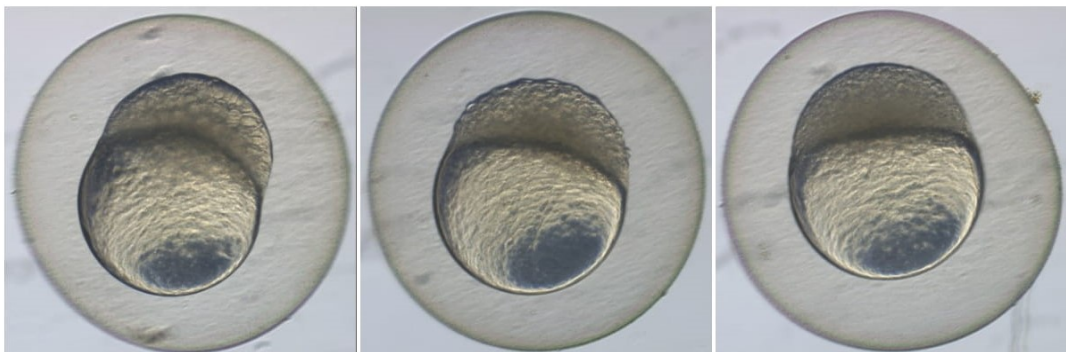
0,5 hod



0,8 hod

1,5 hod

2,5 hod



3,5 hod

4 hod

5 hod



6 hod

24 hod

48 hod



Embryonální vývoj druhu *Danio rerio* - pokračování



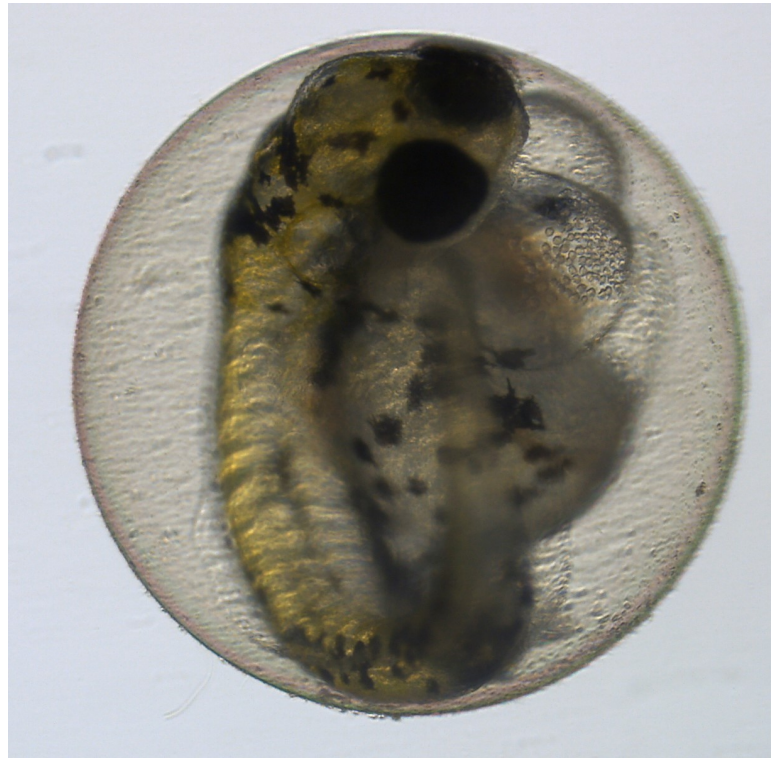
72 hod



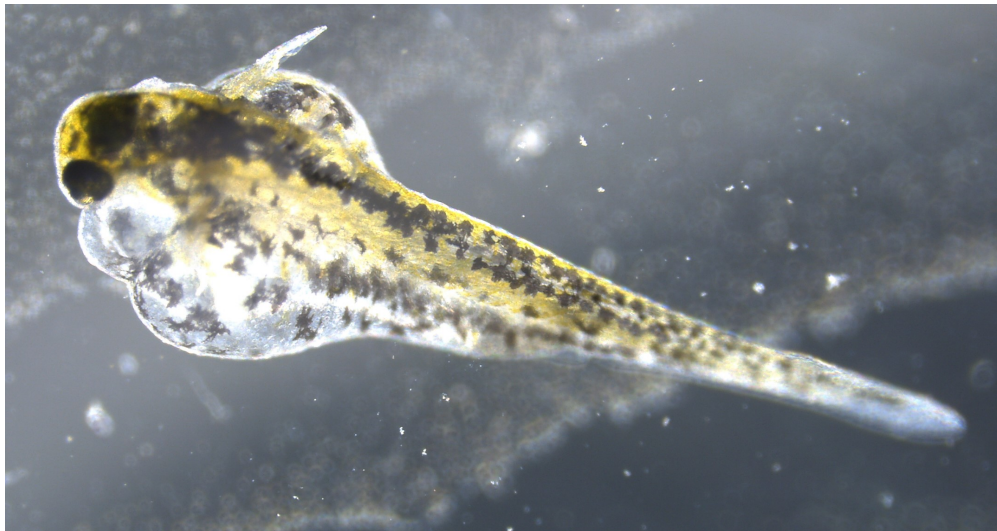
96 hod

0 hod	zygota
0,3 hod	hromadění cytoplazmy na animálním pólu
0,5 hod	období štěpení, 1-buněčné stádium
0,8 hod	období štěpení, 2-buněčné stádium
1,5 hod	období štěpení, 16-buněčné stádium
2,5 - 5 hod	stádium blastuly
6 hod	stádium gastruly
24 hod	období segmentace (tvorba somitů, svalové křeče, otolity, ocas)
48 hod	období pharyngulární (základ žaber, nervů, cirkulace krve, oddělení ocasu)
72 hod	období vykulení (tvorba ploutví, úst, neuromasty, pravidelný srdeční rytmus)
96 hod	rozplavání plůdku

**Příloha č. 2:** Fotografie nesprávně se vyvíjejícího embrya v 3,4-dichloranilinu o koncentraci 4 mg/l celkem 66 hodin od oplození, zvětšení 70x (foto: NALEZINKOVÁ)

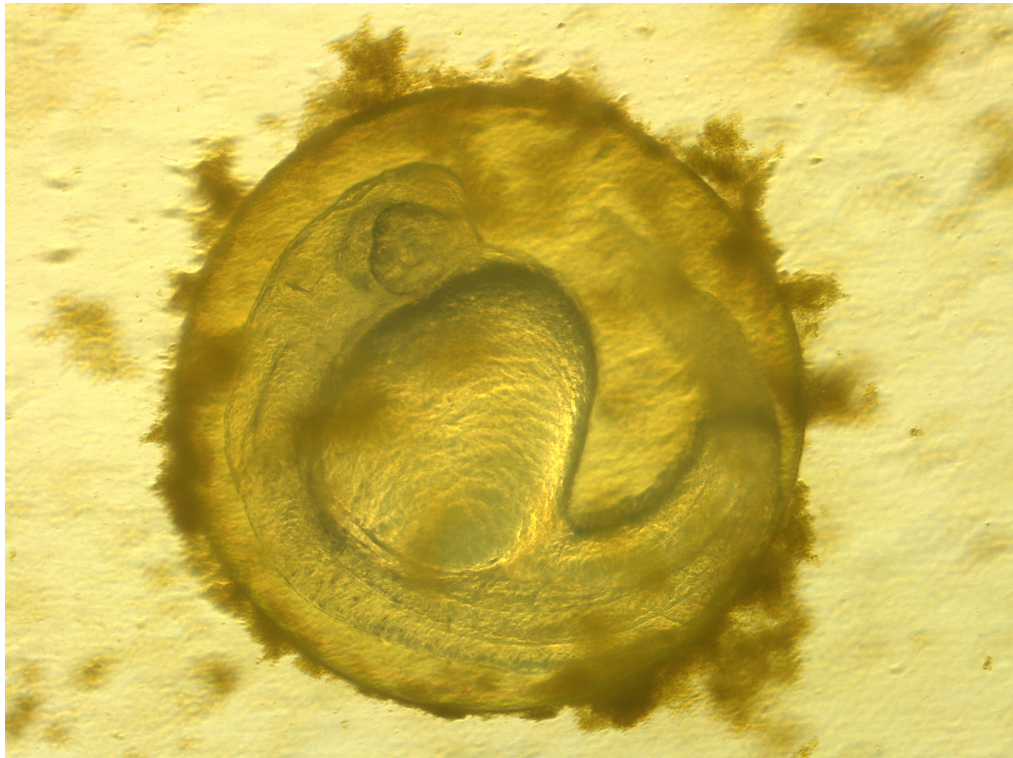


**Příloha č. 3:** Fotografie nesprávně se vyvíjejícího vykuleného embrya 90 hodin po oplození v 3,4-dichloranilinu o koncentraci 4 mg/l, zvětšení 63x (foto: NALEZINKOVÁ)





**Příloha č. 4:** Fotografie embrya v chorionu obaleném barvou Acid Yellow 25 o koncentraci 100 mg/l celkem 26 hodin od oplození, zvětšení 70x (foto: NALEZINKOVÁ)



**Příloha č. 5:** Tabulka zápisu pozorování kritérií mortality - příklad

**Testovaná látka:** Acid Yellow 25

**Koncentrace:** 50 mg/l

**Datum:** 7. 4. 2017

**Doba od oplození:** 96 hodin

---

❖ **Pozorování: Koagulace bílkovin**

	1	2	3	4	5	6
A	-	-	+	+	+	-
B	-	+	+	-	+	-
C	+	+	+	+	+	-
D	-	+	+	+	+	-

Celkem považováno za mrtvé: 15/20

❖ **Pozorování: Nedostatečné oddělení ocasu**

	1	2	3	4	5	6
A	-	-	+	+	+	-
B	-	+	+	-	+	-
C	+	+	+	+	+	-
D	+	+	+	+	+	-

Celkem považováno za mrtvé: 16/20

❖ **Pozorování: Nedostatečný tlukot srdce**

	1	2	3	4	5	6
A	-	-	+	+	+	-
B	-	+	+	-	+	-
C	+	+	+	+	+	-
D	-	+	+	+	+	-

Celkem považováno za mrtvé: 15/20

❖ **Pozorování: Nedostatečná tvorba somitů**

	1	2	3	4	5	6
A	+	-	+	+	+	-
B	-	+	+	-	+	-
C	+	+	+	+	+	-
D	+	+	+	+	+	-

Celkem považováno za mrtvé: 17/20

Celkem vykuleno embryí: 3

Celková mortalita v testu: 17/20 (85 %)

❖ **Poznámky:**

A1 - bez cirkulace krve

D1 - nesprávný vývoj