Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta

POSUDEK OPONENTA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení studenta: **Bc. Martina Nalezinková**
Studijní obor: Systematická biologie a ekologie
Studijní program: N1501 - Biologie
Vedoucí práce: RNDr. Martin Kuneš, Ph.D.
Odborný konzultant: Mgr. Monika Roupcová
Oponent: doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.
Katedra: Biologie
Název diplomové práce: **Vývoj testovací metody pro stanovení akutní toxicity xenobiotik u embryonálních stádií ryb.**

Development of testing method for evaluation of acute Toxicity of xenobiotics in fish embryo.

Předložená diplomová práce se zabývá testováním toxicity xenobiotik na embryích dania pruhovaného podle směrnice OECD 236, tzv. 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 zisku 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 síťkou a rostlinami. Testování probíhalo ve 24 jamkových destičkách. Každých 24 hodin byla zaznamenávána kritéria k určení mortality: koagulace, činnost srdce, oddělení ocásku a tvorba somitů. Stanovenou metodou byly otestovány známé i neznámé látky a spočteny hodnoty LC10, LC20, LC50, LOEC a NOEC po 96hodinové expozici. Pro látku 3,4-dichloranilin byla stanovena hodnota LC50 3,581 mg/l, pro dichroman draselný LC50 185,721 mg/l a pro látku Acid Yellow 25 LC50 17,687 mg/l. Hodnota LC50 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

Formální úroveň:

Po formální stránce byla zvolena pro diplomovou práci koncepce, umožňující jasnou a velmi dobrou orientaci v této poměrně složité problematice. Diplomová práce obsahuje všechny náležitosti, je pečlivě a přehledně zpracována a jednotně zformátována a působí uceleným dojmem. Text diplomové práce je zpracovaný čtivě, přehledně a didakticky vyváženě – bez věcných chyb. Celé pojetí zpracované problematiky svědčí o vysokých odborných

(teoretických i praktických) kvalitách studentky magisterského studia a předkladatelky diplomové práce.

Struktura/členění diplomové práce:

Práce je psaná standardním způsobem včetně všech požadovaných náležitostí a v souhrnu má práce 88 stran (včetně 31 tabulek, 7 grafů, 10 obrázků, 5 příloh) literárních odkazů a použitých zkratek. Grafické zpracování a úprava mají vysokou úroveň.

Literární zdroje, citace a jejich použití:

Seznam literatury uvádí 111 literárních odkazů a 14 internetových zdrojů. Podstatnou část tvoří relevantní a recentní literární odkazy zahraničních vědeckých časopisů včetně internetových odkazů, což svědčí o velmi dobré práci diplomantky se zahraničními databázemi a především jejím dobrém jazykovém vybavení. Citace uvedené v textu i seznam literatury jsou provedeny jednotně.

Teoretická část:

Literární přehled je zpracována velmi kvalitně, vysvětluje testování toxicity na vodních organizmech, povinnosti plynoucí z legislativy, OECD, REACH, ECHA, platnou legislativu, ekotoxicitu, její testování na rybách- jak akutní, tak chronické testy, seznamuje nás s testovaným organismem Danio rerio, morfologií, etologií, podmínkami chovu, potravou, rozmnožováním, pohlavní soustavou- samčí a samičí, stavbou a vznikem spermií, třením, oplozením, fertilizací *in vitro,* ontogenetickým vývojem, s akutním testem „OECD 236 - Fish Embryo Acute Toxicity Test“, principy testu,použitými chemikáliemi- 3,4-dichloranilinem, dichromanem draselným, Acid Yellow 25, Reactive Yellow 85, dále jejich fyzikálními a chemickými vlastnostmi, nebezpečnými vlastnostmi a bezpečností práce, jejich toxicitou, zdroji a konečně jejich využitím.

Metodika a její zhodnocení:

Metodická část úzce navazuje na část teoretickou a zabývá chovem testovaného organismu pro FET test, produkcí jiker, nasazením destiček, přípravou výše zmíněných chemikálií pro realizaci FET testu, hodnotícími kritérii- jako koagulace bílkovin, oddělení ocasu od žloutkového vaku, činnosti srdce, tvorbou somitů, vykulením, dále měřením fyzikálně chemických parametrů – pH, tvrdost, konduktivita, nasycení kyslíkem, podmínkami a jejich splněním, validací a vyhodnocením FET testu, přípravou chemikálií Acid Yellow 25 a 85 pro akutní testy toxicity na rybách, průběhem testu a validací testu.

Výsledky a jejich zhodnocení:

Dále jsou velmi přehledně shrnuty výsledky – týkající se chovu testovaného organismu, produkce jiker, nasazení destiček a výsledky FET testu pro 3,4-dichloranilin, dichroman draselný, Acid Yellow 25 a 85, které zahrnují fyzikálně-chemická měření na začátku testů a na jejich konci, dále přežitím testovaných embryí, vykulením, mortalitou ryb v testu akutní toxicity a konečně validacemi testu akutní toxicity na rybách. Výsledky jsou shrnuty v přehledných tabulkách a grafech.

Diskuze je vedena na odpovídající úrovni a porovnává dosažené výsledky. K chovu ryb bylo využíváno chovné zařízení ZEBTEC BENCHTOP, výhodné z hlediska kontroly kvality vody a jejích fyzikálně-chemických parametrů. Během výzkumu byl zjištěn dominantní vliv krmení ryb na jejich vitalitu a produktivitu.

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 dospělcích 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. 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.

Splnění cílů práce:

Cíle práce jsou jasně formulovány. Vytyčené cíle a zadání diplomové práce bylo naplněno- a to na úrovni současných nejnovějších odborných znalostí. Zvolená metoda práce odpovídá stavu poznání v dané době, dále technickému vybavení a možnostem pracoviště. Závěrem lze říci, že autorka prokázala velmi dobrou orientaci v řešené problematice i vysokou zručnost při vlastní experimentální práci.

Velmi si cením toho, že naše studentka byla schopná se vyškolit a výborně prosadit v laboratorní experimentální práci v oblasti akvatické ekotoxikologie a že prezentovaný FET test bude možné využívat místo testů akutní toxicity na dospělcích ryb.

Navíc oceňuji osobní přínos studentky v zavedení metody velmi dobře využitelné v laboratorní praxi a diplomovou práci hodnotím jako vynikající.

Práce velmi dobře splňuje základní požadavky kladené na tento typ prací, a proto ji doporučuji k ústní obhajobě.

Otázky k ústní obhajobě práce:

1) Akutní test toxicity na rybách trvá 96 h, kdy je výsledkem hodnota 96hLC_{50}, což umožňuje označit specifickou rizikovost jednotlivých chemických látek a přípravků pro vodní organismy.
Věděla by studentka na základě LC_{50}, jaká hodnota (koncentrace) LC_{50} obecně je považována za vysoce toxickou, dále toxickou a konečně škodlivou pro vodní organismy.

Datum: 28. 5. 2018 Podpis oponenta diplomové práce: