

VÝZKUMNÝ ÚSTAV RYBÁŘSKÝ A HYDROBIOLOGICKÝ
VODŇANY

STANOVENÍ NEJVYŠŠÍCH PŘÍPUSTNÝCH
KONCENTRACÍ LÁTEK VE VODĚ
Z HLEDISKA POŽADAVKŮ CHOVU RYB

EDICE

METODIK



Z. SVOBODOVÁ, B. VYKUSOVÁ

**STANOVENÍ
NEJVYŠŠÍCH PŘÍPUSTNÝCH
KONCENTRACÍ LÁTEK
VE VODĚ Z HLEDISKA
POŽADAVKU CHOVU RYB**

č. 32

VODŇANY
1989

O b s a h :

| | strana |
|--|--------|
| Úvod | 3 |
| Testovací organismy - ryby | 4 |
| Adaptace ryb | 4 |
| Podmínky testu | 4 |
| Krmení ryb | 5 |
| Stanovení koncentrací testovaných látek | 5 |
| Prevence onemocnění ryb v testu | 6 |
| Období provádění a doba trvání testu | 7 |
| Sledování ukazatele v testu | 7 |
| Vyhodnocení testu | 8 |
| Bezpečnost práce a ochrana zdraví při provádění testů | 8 |

Úvod:

Nejvyšší přípustná koncentrace /NPK/ z hlediska požadavků chovu ryb je podle Lesnikova /1979/ taková koncentrace látky a jejích metabolitů ve vodě, která při stálém působení nevyvolává negativní účinky na:

- hydrochemický režim recipientů a mikroorganismy
- primární produkci recipientů
- planktonní potravní organismy
- ryby /jikry, plůdek ryb v období larválního vývoje, ryby vyšších věkových kategorií/ včetně jejich tržní hodnoty /hygienické hledisko/.

Hodnoty NPK látek slouží jako základní podkladový materiál pro hodnocení přítokové vody pro chov ryb. V procesu plánování výstavby rybochovných objektů je posouzení kvality přítokové vody zásadním úkolem. Kromě toho hodnoty NPK stanovené z hlediska požadavků chovu ryb jsou využívány k diagnostickým účelům při posuzování příčin poškození nebo úhynu ryb. Pro vodohospodářské orgány jsou měřítkem pro povolování vypouštění jednotlivých látek v odpadních vodách do recipientů s obsádkou ryb.

Vlastní metodika stanovení nejvyšších přípustných koncentrací z hlediska požadavků chovu ryb zahrnuje sledování vlivu látek na hydrochemický režim recipientů a testy chronické toxicity na vybraných zástupcích vodních organismů. Výsledné NPK se stanoví podle ukazatele nebo organismu, který je negativně ovlivněn při nejnižší koncentraci látky a jejího metabolitu.

Předkládaná metodika je součástí metody stanovení NPK z hlediska požadavků chovu ryb, zahrnuje testy chronické toxicity na rybách vyšších věkových kategorií včetně jejich tržní hodnoty /hledisko hygienické/. Návrh metodiky stanovení NPK byl zpracován na základě údajů sovětských autorů /Lesnikov a kol. 1979, 1982/ a na základě vlastních zkušeností získaných při provádění testů chronické toxicity na rybách.

Testovací organismy - ryby:

K testům chronické toxicity je používán jednoletý plůdek kapra obecného / K_1 / o průměrné počáteční hmotnosti 50 - 70 g a jednoletý plůdek pstruha duhového / Pd_1 / o průměrné počáteční hmotnosti 20 - 30 g. V případě potřeby jsou k testům používány i další druhy ryb /lín obecný, býložravé ryby atd./. Do každé testovací nádrže /pokusné a kontrolní/ se nasazuje 20 - 30 kusů na podmínky testu adaptovaných ryb.

Adaptace ryb:

Plůdek kapra k testům chronické toxicity se získává z rybníčního chovu, plůdek pstruha duhového z odchoven pstruhů. Adaptace ryb na podmínky testu musí trvat minimálně 14 dnů. Adaptaci ryb je možno ukončit poté, kdy ryby po 4 - 5 dnů nevykazují změny v chování a ochotně přijímají celou dávku předkládaného krmiva.

Podmínky testu:

Testy chronické toxicity se provádějí v neprůtočných akváriích o objemu 200 - 300 l /na 1 kus ryby 10 l zředovací vody/. Při zvýšené mortalitě ryb /nad 25 %/ se úměrně snižuje objem zředovací vody. Použitá zředovací voda má odpovídat fyzikálním a chemickým parametrům požadovaným pro pitnou vodu pro hromadné zásobování podle ČSN 83 0611 "Pitná voda" s následujícími doplňky:

teplota - pro K_1 20 ± 2 °C

pro Pd_1 16 ± 2 °C

pH - pro K_1 i Pd_1 $7 \pm 0,5$

kyslík - pro K_1 min. 5 - 6 mg.l⁻¹

pro Pd_1 min. 8 mg.l⁻¹

/zajišťuje se pomocí provzdušování/

měď - max. 0,001 mg.l⁻¹

aktivní chlór - použít vodu bez přítomnosti aktivního chlóru

veškerý amoniak - max. 0,3 mg.l⁻¹

hliník - max. 0,1 mg.l⁻¹

zinek - pro K_1 max. 0,01 mg.l⁻¹

pro Pd_1 max. 0,001 mg.l⁻¹

KNK_{4,5} /kyselinová kapacita do pH 4,5/ - v rozmezí
0,5 - 1,5 mmol.l⁻¹
veškeré rozpuštěné látky - v rozmezí 50 - 500 mg.l⁻¹

U výsledků testů chronické toxicity je žádoucí uvádět fyzikálně chemické vlastnosti zředovací vody, včetně iontové síly, osmotického tlaku a koncentrace vápníku a hořčíku.

Světelný režim je přirozený, neupravuje se.

Krmení ryb:

Kaprům K₁ se předkládá krmná směs KP 1, krmná dávka činí 2 % hmotnosti obsádky. Krmí se denně. Navíc se denně dává přídatek zooplanktonu nebo nítěnek, čerstvá hmotnost tohoto přídatku činí zhruba 10 - 20 % hmotnosti krmné dávky KP 1.

Plůdku pstruha duhového Pd₁ se předkládá mleté nebo nadrobno krájené hovězí srdce nebo slezina, 2krát týdně rybí filé nebo nítěnký. Krmná dávka činí 5 - 7 % hmotnosti obsádky. Krmí se denně.

Každý druhý až třetí týden se v jednotlivých testovacích nádržích stanoví celková hmotnost ryb a krmná dávka se upraví podle zjištěné hmotnosti obsádky.

Stanovení koncentrací testovaných látek:

V testu chronické toxicity na rybách se zpravidla používá 5 pokusných nádrží s různými koncentracemi testované látky a 1 kontrolní nádrž se zředovací vodou. Základem pro určení koncentrací testované látky jsou výsledky testu akutní toxicity provedeného podle ON 46 6807 "Test akutní toxicity na rybách a dalších vodních živočiších", a to konkrétně hodnota 48h LC 5. Jednotlivé koncentrace se rozvrhnou tak, aby nejvyšší koncentrace ještě vykazovala toxické účinky a nejnižší koncentrace byla bez negativních vlivů na testovací organismy. Jako příklad rozvržení koncentrací je možno použít následující schéma:

| Nádrž | Koncentrace testované látky |
|---------------|-----------------------------|
| 1 | 48h LC5 snižená 3krát |
| 2 | 48h LC5 snižená 10krát |
| 3 | 48h LC5 snižená 30krát |
| 4 | 48h LC5 snižená 100krát |
| 5 | 48h LC5 snižená 300krát |
| 6 /kontrolní/ | 0 |

Před zahájením testu chronické toxicity se doporučuje provést 96 hodinový test toxicity na buněčných kulturách ryb. Výsledky tohoto testu umožňují upřesnit nejnižší koncentraci použitou v testu.

Udržení stálé koncentrace testované látky se zajišťuje každodenní přípravou čerstvé lázně, do níž jsou ryby přelovovány. Aby se zamezilo znečištění pokusných a kontrolních nádrží zbytky krmiva, je nutno krmivo podávat do starých lázní, a to těsně před přelovením ryb do lázní čerstvě připravených.

Prevence onemocnění ryb v testu:

Zahájení testu chronické toxicity je možno provést pouze s rybami v dobrém zdravotním a výživném stavu. Hlavním preventivním opatřením je potom zajištění optimální skladby předkládaného krmiva a hygieny prostředí. Optimální skladba předkládaného krmiva je zajišťována u kaprů každodenním přídávkem zooplanktonu ke krmné dávce, u pstruhů duhových 2krát v týdnu krmnou dávkou složenou z rybího filé nebo nitěnek. Hygiena prostředí je zajišťována každodenním pečlivým vymýváním testovacích nádrží po přelovení ryb a před napuštěním čerstvé vody.

V případě potřeby se v průběhu testu chronické toxicity provádějí preventivní a léčebné koupele ryb. Jako nejvhodnější se širokým spektrem účinku se doporučuje kombinovaná koupel v malachitové zeleni a ve formaldehydu. Koupelová lázeň obsahuje $0,25 \text{ mg.l}^{-1}$ malachitové zeleně a $0,125 \text{ ml}$ 36 - 38 % vodného roztoku formaldehydu v 1 litru. Doba trvání koupele je 2 hodiny při zajištěném provzdušování 24 hodin před zahájením koupele a v den provádění koupele se ryby nekrmí.

Období provádění a doba trvání testu:

Testy chronické toxicity na kapru se provádějí pouze ve vegetační sezóně, mimo tuto sezónu ryby mají snížené reflexy a snížený příjem krmiva. Testy na pstruhu duhovém se provádějí v jarním, podzimním a zimním období, v létě nelze udržet potřebnou teplotu vody.

Chronické testy toxicity jsou prováděny po dobu 90 až 100 dnů.

Sledování ukazatele v testu:

- Před zahájením testu - celková hmotnost nasazených ryb, zdravotní stav ryb /patologicko-anatomický, parazitární příp. bakteriolog. nález/.
- V průběhu testu - stav a chování ryb, reakce na vnější podráždění, příjem krmiva, hmotnostní růst /zjišťován jedenkrát za 2 až 3 týdny/, mortalita.
- V závěru testu - hmotnost a délka těla jednotlivých ryb, Fultonův koeficient vyživenosti, relativní hmotnost sleziny, relativní hmotnost hepatopankreatu /pouze u K_1 /
- patologicko-anatomické změny, výsledky parazitárního příp. bakteriologického vyšetření, histologické vyšetření kůže, žaber, svaloviny, mozku, srdce, jater, sleziny, ledvin a střeva pokusných a kontrolních ryb
 - stanovení reziduí látek a jejich metabolitů ve svalovině, játrech a žábrách ryb /provádí se při testování látek, u nichž se předpokládá kumulace/
 - hematologické vyšetření /počet erytrocytů, hematokritová hodnota, množství hemoglobinu, střední objem erytrocytu, střední barevná koncentrace, hemoglobin erytrocytu, počet leukocytů, leukokritová hodnota, diferenciální rozpočet leukocytů a další/.

- výběr použitých metod se provede podle charakteru působení testované látky
- biochemické vyšetření krevní plasmy /aktivity enzymů AST, ALT, GDH, LDH, AF, ALAD, celkové bílkoviny, celkové lipidy, glukóza, stresové hormony - adrenalin, noradrenalin, jednotlivé anorganické složky a další/, výběr se provede podle charakteru působení testované látky
 - stanovení ukazatelů nespecifické imunity /lysozym, fagocytární schopnost leukocytů a další/
 - stanovení organoleptických vlastností sva-
loviny.

Vyhodnocení testu:

Po zpracování a vyhodnocení veškerých výsledků testu chronické toxicity se za nejvyšší přípustnou koncentraci /NPK/ označí ta koncentrace, která ve srovnání s kontrolní skupinou nevyvolala významné změny u pokusných ryb. Pokud jsou zjištěny významné změny u pokusných ryb z nejnižší testované koncentrace je NPK nižší než tato koncentrace a je nutno test zopakovat s použitím nižších koncentrací testované látky.

Bezpečnost práce a ochrana zdraví při provádění testů:

Na práce v toxikologických laboratořích se vztahují zásady nařízení vlády č. 56 ze dne 10. 4. 1987 o jedech a jiných látkách škodlivých zdraví, prováděcí vyhláška ministerstva zdravotnictví a spravedlnosti č. 57/1967 ze dne 1. 6. 1967 a ČSN 01 8003 Bezpečnostní předpisy pro práci v chemických laboratořích. Pracovníci, kteří provádějí testy toxicity, musí znát povahu a účinky testovaných látek, způsoby, jak s nimi zacházet, ochranná opatření, která je nutno dodržovat a zásady první pomoci. O těchto otázkách musí být pravidelně jedenkrát ročně proškolení a přezkoušování. Veškeré testované látky musí být řádně označeny

a uchovány, aby nemohlo dojít k jejich záměně. Dále je nutno zajistit bezpečný způsob likvidace toxických lázní a očisty veškerých materiálů použitých v testu chronické toxicity.

Adresa autorů:

MVDr. Zdeňka S v o b o d o v á , CSc. a Ing. Blanka V y -
k u s o v á , Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický,
389 25 Vodňany

Lektoroval:

Ing. Pavel Dočkal, CSc., Výzkumný ústav vodohospodářský,
Ostrava

V edici Metodik vydal Výzkumný ústav rybářský a hydrobio-
logický ve Vodňanech - Redakce: R. Berka - Náklad: 750 vý-
tisků - Povolení k tisku: JČKNV, odb. kultury, 330020788 -
Tisk: Jihočeské tiskárny, n.p., provoz Strakonice - Předáno
do tisku: listopad 1988