

MOŽNOSTI ZNAČENÍ VYSAZOVANÝCH RYB POMOCÍ ARS – APLIKACE A DETEKCE

K. HALAČKA¹, E. POŠTULKOVÁ², R. KOPP², J. MAREŠ², L. VETEŠNÍK¹

¹Ústav biologie obratlovců Akademie věd ČR, v.v.i., Květná 8, Brno 603 65;

²Oddělení rybářství a hydrobiologie, Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, Brno 613 00

ÚVOD

Značení (značkování) ryb je technika umožňující objektivní individuální či hromadnou identifikaci jedinců. Uplatnění nachází jak v rámci chovatelské činnosti, terénních sledováních nebo v rámci výzkumu. Konkrétně lze jmenovat sledování migrací ryb, jejich růstu, posouzení úspěšnosti vysazování/přirozené reprodukce, označení, resp. evidence ryb v chovu či jejich potomstva atd.

Vzhledem k rozdílným požadavkům existuje i škála druhů značení.

Výběr/použití konkrétního typu značení záleží na řadě faktorů, z nichž patří zejména:

- minimalizace stresové zátěže značeného jedince jak při aplikaci tak i po ní
- druh a velikost značených jedinců
- náročnost aplikace finanční, časová a potřeba speciálních aplikátorů
- možnost skupinového či individuálního rozlišení jedinců
- úspěšnost a trvanlivost značení
- náročnost následné detekce značky.

Cílem studie bylo vyzkoušet využití Alizarinové červeně při značení vybraných druhů ryb, současně ho prakticky ověřit při vysazování a dále ověřit jednoduchý způsob detekce značení při následném odlovu. V průběhu testování byl ověřena toxicity použitého barviva, délka barvení a minimální velikost vhodná pro aplikaci barviva. Součástí vyhodnocení bylo stanovení detekovatelnosti značení v průběhu růstu ryb.

Alizarin Red S – ARS

V České republice nový způsob značení ryb menších rozměrů (obvykle do cca 10 cm) vycházející ze schopnosti alizarinové červeně (ARS) vázat se na vápenité struktury v organismech (kost, šupina, otolit) (PUCHTLER et al., 1968). Aplikuje se

formou pomoření ryb do roztoku barviva, prakticky lze využít jen jako hromadné barvení. Čas aplikace je obvykle v řádech hodin (např. BAER J. a RÖSCH R. 2008; ECKMAN R. 2003; LIUA Q. et al., 2009; LÜ H. et al., 2015), omezujícím faktorem je zejména cena dané chemikálie a potřebný objem lázně. Pokud je značení zaměřeno na praktické využití v terénu bez nutnosti usmrcení jedince či odběru vzorků tkáně, je zaměřeno na ploutevní paprsky, nejlépe ocasní ploutve, u živých ryb.

Obr. 1.: Zelené laserové ukazovátko a ochranné brýle jako alternativa fluorescenčního mikroskopu pro terénní sledování ryb značených ARS.



Detekce

Využívá se fluorescenčních vlastností barviva. Lze tak detekovat i jen velmi slabé obarvení, s tím souvisí nutnost určitého speciálního vybavení, kterým je standardně fluorescenční mikroskop.

Vyvolání fluorescence se děje speciálními světelnými zdroji (filtry), které jsou součástí daného mikroskopu. Pro ARS je doporučena vlnová délka 530 – 560 nm. Jako alternativu jsme vyzkoušeli použití laserového ukazovátko s udávanou vlnovou délkou 532 nm (zelené) o výkonu 50 mW (výrobce OXLasers). Pro vlastní pozorování je třeba odfiltrovat světlo zdroje a současně umožnit sledovat potenciální excitaci navázané ARS, která se v tomto případě nachází na hladině 580 nm. V případě fluorescenčního mikroskopu plní tuto funkci speciální filtry. V našem

případě bylo otestováno jejich nahrazení ochrannými brýlemi pro práci s laserem, zabraňující průchodu světla o vlnové délce 190-540 nm ale světlo o vlnové délce 580 nm propouštějící (dodavatel SOH, Praha).

Při nasvícení objektu, v našem případě ploutevních paprsků, výše uvedeným laserovým zdrojem bylo možné při použití ochranných brýlí pozorovat emisi světla (ohnivě červené zbarvení) v místech nabarvených ARS.

K omezujícím faktorům kromě vybavení k detekci patří dále toxicita barviva, jeho cena, doba, po kterou lze značení u ryb pozorovat, přirozená fluorescence sledované tkáně a velikost ryb.

Toxicita barviva, stresová zátěž

Obvykle se využívá koncentrace 0,15 g na jeden litr barvicího roztoku a čas barvení jedna hodina. Za těchto podmínek (a ani při několikanásobně vyšší koncentraci či době) nebyl pozorován úhyn ryb v souvislosti s aplikací ani změna chování ryb při či po ukončení aplikace (POŠTULKOVÁ et al., 2016). V případě použití u různých druhů a velikostních kategorií ryb lze však doporučit předchozí kontrolní test.

Náklady na barvení

Cena ARS se pohybuje okolo 40 Kč za gram, tj. při koncentraci 0,15 g.l⁻¹ budou tedy náklady 600 Kč na 100 l barvicího roztoku. V závislosti na velikosti ryb a opakovanému využití roztoku se cena barvení jedné ryby pohybuje řádově v desetihaléřích až korunách.

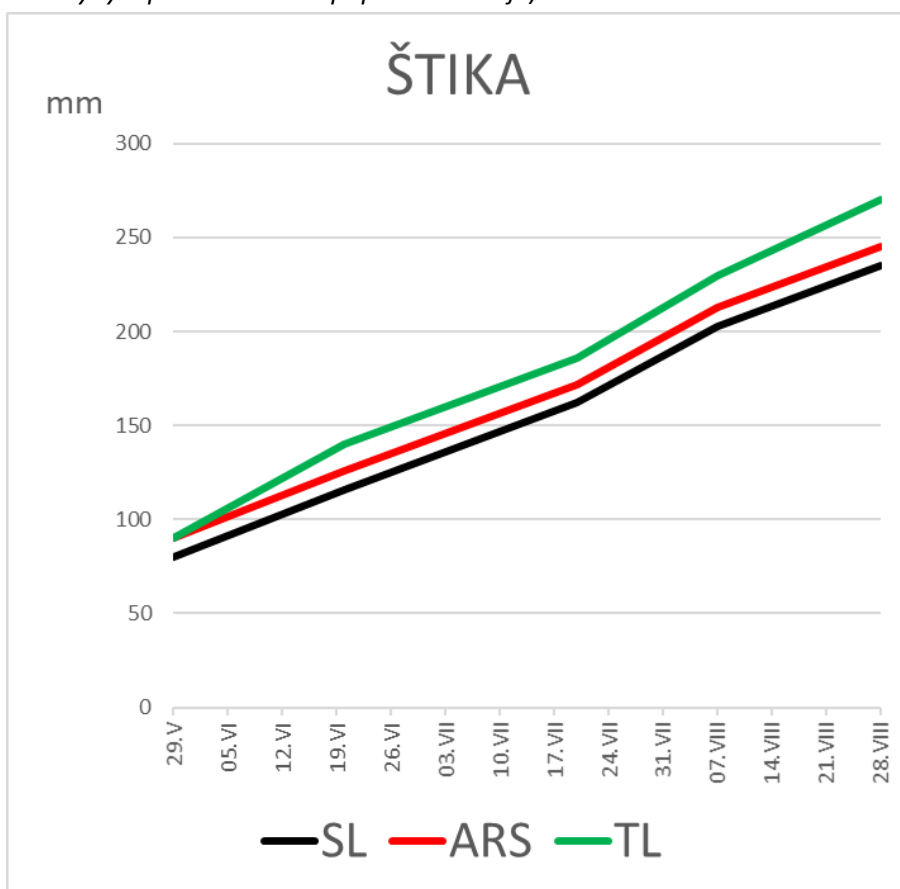
Doba detekovatelnosti barviva

Ukazuje se, že doba, po kterou lze označené ryby rozlišit je značně dlouhá a závisí zejména na růstu jedince, kdy dochází k „ředění“ či obrůstání tkáně se zafixovaným barvivem. V případě využití ploutevních paprsků lze postupně pozorovat prodlužující se distální, nově dorůstající část paprsku, proximální, nabarvená část si zachovává prakticky stejnou délku. Přechodová linie je ostře vymezena a je vhodné se na ni soustředit při pozorování.

Vliv na dobu detekovatelnosti má zřejmě intenzita pigmentace a tloušťka kůže, neboť snižuje prostupnost barviva při aplikaci a omezující prostupnost světla při detekci. Obecně lze předpokládat použitelnost tohoto typu značení i při zvětšení velikosti těla jedince na dvojnásobek, v některých případech i trojnásobek oproti rozměrům v době značení. Za těchto podmínek je značení patrné i po několika

letech. Barvení ryb včetně vyhodnocení „čitelnosti“ značení byla zpracována v podobě ověřené technologie (Halačka a kol., 2018).

Obr. 2.: Změna velikosti (SL, TL) značené štiky v období května-srpna a hranice mezi zbarvenou a nezbarvenou částí ploutevních paprsků v ocasní ploutvi (vzdálenost SL-ARS, tj. obarvená část paprsků je konstantní; vzdálenost ARS-TL se postupně s růstem ryby a prodlužováním paprsků zvětšuje)

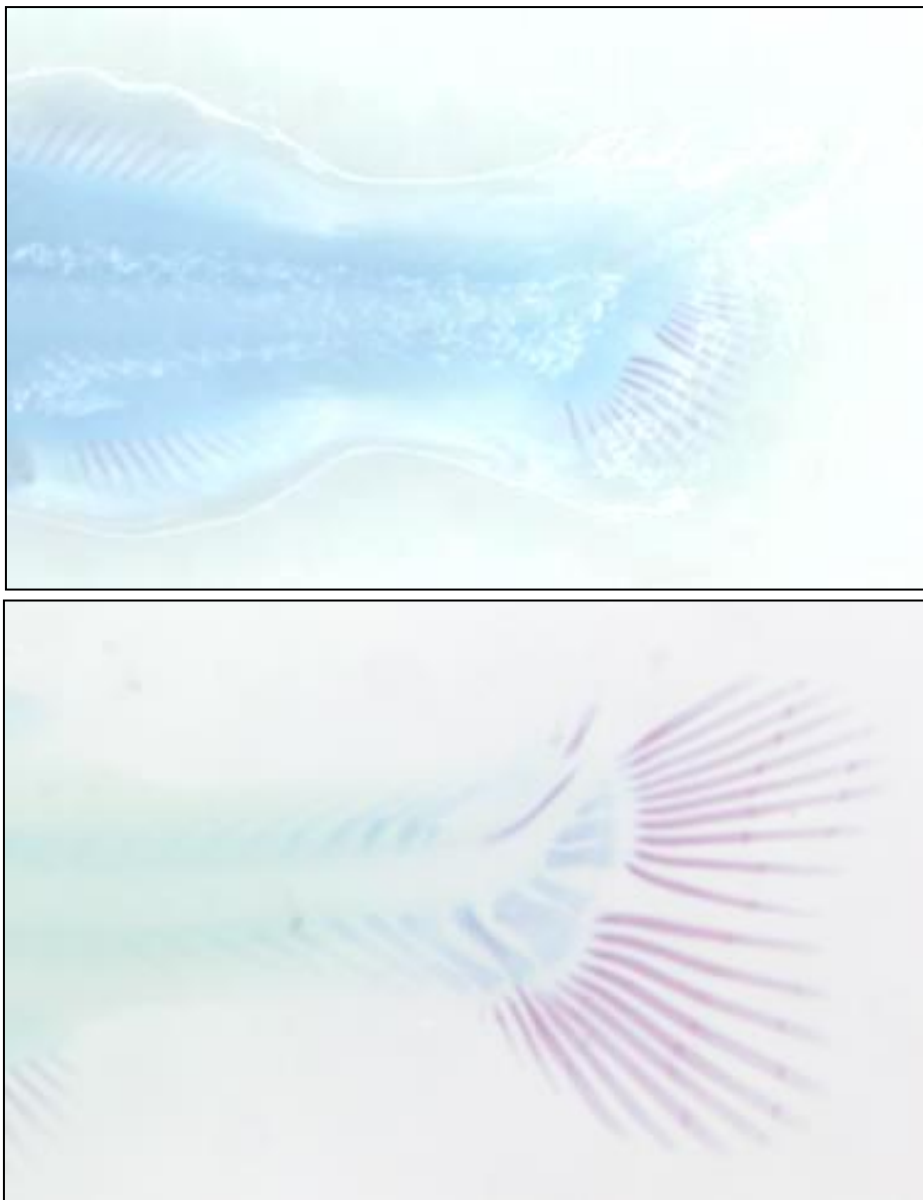


Přirozená fluorescence

Daná fluorescence není omezena jen na ARS, ale dochází k ní v různé i u řady dalších látek či materiálů, a její intenzita může záviset na řadě podmínek, například vlhkosti objektu. To je i případ ploutevních paprsků, kdy u fixovaného materiálu postupně při vysychání lze pozorovat stoupající schopnost přirozené fluorescence což znemožňuje rozlišení částí obarvených ARS. Je proto lépe fixovaný materiál ploutví umístěný standardně na podložních sklech prohlédnout v průběhu několika dní, nemá smysl jej dlouhodobě uchovávat pro tyto účely. V případě nutnosti

detekce značení po delším období je lépe jej fixovat např. ve formaldehydu nebo alespoň zmrazit.

Obr. 3.: Vývoj ploutevních paprsků u štiky; vlevo jedinec ve stáří 23 dní a velikosti 13 mm (TL) – tvorba a počátek osifikace paprsků postupuje dorzálně, vpravo - 30 dní; 26 mm (TL) – finalizující osifikace paprsků



V některých případech, jako u štiky, byla přirozená fluorescence poměrně výrazná i u paprsků živých jedinců, bylo proto obtížné rozlišit značené jedince bezprostředně po obarvení. Po určité době (cca několik dní) při prodloužení paprsků o nově narostlé úseky se vytváří znatelná linie mezi těmito a původními nabarvenými částmi, což umožňuje objektivní detekci přítomnosti ARS.

Velikost značených jedinců

Minimální velikost jedinců je dána jednak nutností přítomností ploutevních paprsků a jejich osifikací a dále předpokládanou dobou sledování, tj. velikosti jedince v tomto období. Nedokončená osifikace bude limitující v případě štiky, která se vysazuje vzhledem ke kanibalismu v poměrně malé velikosti a vývoj kosterní soustavy ještě nemusí být ukončen. Současně při intenzivním růstu těchto jedinců nelze předpokládat délku sledování více než několik týdnů, maximálně měsíců.

Maximální velikost je dána cenou barvicího roztoku a potřebnou velikostí manipulačních nádrží, pravděpodobně u ryb s velikostí nad 15 cm je již vhodnější použít jiného typu značení, které navíc může umožnit značení individuální či alespoň skupinové (elastomery, alfa-tagy). V některých situacích, jako například sledování růstu několika vybraných jedinců, kdy se ARS využije i jako „časově-velikostní“ značky lze aplikaci doporučit.

ZÁVĚR

Značení pomocí ARS lze u ryb využít, a to zejména u skupinového značení a jedinců velikosti okolo 5-10 cm, kde prakticky neexistuje alternativní způsob.

Značení je možné pozorovat po dobu několika měsíců až let v případě zvětšení velikosti jedince o maximálně 100-200 % velikosti v době aplikace barviva.

Pro detekci ARS v ploutevních paprscích lze využít alternativního vybavení - malého laserového zdroje zeleného světla a ochranných brýlí, což umožní jednat detekci přímo v terénu u živých jedinců a jednak výrazné snížení nákladů na detekci.

Vzhledem k tomu, že se jedná o poměrně nový způsob značení a lze předpokládat určité mezidruhové rozdíly, je vhodné před hromadnou aplikací provést základní otestování (koncentrace barviva, čas aplikace, zřetelnost značení, doba čitelnosti).

Uplatnění ARS je vhodné u všech subjektů s potřebou značení ryb (chovatelé ryb a producenti násadového materiálu, podniky Povodí, rybářské svazy, výzkumné organizace), ovšem bez potřeby jejich individuálního rozlišení. Jedná se například o odchované ryby vysazované do tekoucích vod pro odlišení ryb pocházejících z přirozené reprodukce. Pro značení ryb vysazených do lokality s možností jejich dalšího monitoringu s ohledem na jejich prostorovou distribuci, rychlost pohybu po

nádržích, obsazování lokalit, etc. Dále pro rozlišení dvou skupin ryb odchovávaných ve společné nádrži apod.

PODĚKOVÁNÍ

Tato studie byla podpořena projektem NAZV QJ1620240 Aplikace biomanipulací s využitím "topdown" efektu s cílem omezit negativní dopady zemědělství na eutrofizaci vodárenských nádrží.

LITERATURA

- BAER, J., RÖSCH, R. 2008. Mass-marking of brown trout (*Salmo trutta* L.) larvae by alizarin: method and evaluation of stocking. *Journal of Applied Ichthyology*, 24(1): 44–49.
- Bezpečnostní list, Alizarin Red S, 2012. [Online] Available et: https://www.applichem.com/fileadmin/datenblaetter/A2290_cs_CZ.pdf. [2016-07-10].
- ECKMAN, R. 2003. Alizarin marking of whitefish, *Coregonus lavaretus* otoliths during egg incubation. *Fisheries Management And Ecology*, 10(4):233–239.
- HALAČKA, K., POŠTULKOVÁ, E., KOPP, R., MAREŠ, J., 2018: Alternativní značení vysazovaných ryb pro umožnění jejich následného sledování. Ověřená technologie R17/2017, MENDELU Brno, 18 s.
- LIUA, Q., ZHANGA, X. M., ZHANGA, P. D., NWAFILI, S. A 2009. The use of alizarin red S and alizarin complexone for immersion marking Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (T.) *Fisheries Research*, 98(1-3): 67–74.
- LÜ, H., CHEN, H., FU, M., PENG, X., XI, D., ZHANG, Z. 2015 Experimental evaluation of calcein and alizarin red S for immersion marking grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Japanese Society of Fisheries Science*, 81(4): 653–662.
- POŠTULKOVÁ, E., MAREŠ, J., HALAČKA, K., KOPP, R., 2016, Toxic effect of fluorescence pigment on zebra fish (*Danio rerio*). Conference: 23rd International PhD Students Conference (MendelNet) Location: Mendel Univ Brno, Fac AgriSciences, Brno, Czech Republic Date: Nov 09-10, 2016, Proceedings Of International Phd Students Conference, (Mendelnet 2016) Pages: 347-351
- PUCHTLER, H., SUSAN N. MELOAN, S., N., TERRY, M., S. 1968. On the history and mechanism of Alizarin and Alizarin Red S stains for Calcium. *The Journal Of Histochemistry and Cytochemistry*, 17(2):110–124.