

Mendelova univerzita v Brně
Ústav biologie obratlovců AV ČR v.v.i.

OVĚŘENÁ TECHNOLOGIE R17/2017

Alternativní značení vysazovaných ryb pro umožnění jejich následného sledování

Ing. Karel Halačka, CSc.

Ing. Eva Poštulková

doc. Ing. Radovan Kopp, Ph.D.

prof. Dr. Ing. Jan Mareš,

Brno

2018

Ověřená technologie je realizačním výstupem výzkumného projektu MZe ČR NAZV QJ1620240 Aplikace biomanipulací s využitím „topdown“ efektu s cílem omezit negativní dopady zemědělství na eutrofizaci vodárenských nádrží.

Podíl autorů:

Ing. Karel Halačka, CSc.¹ 30 %, Ing. Eva Poštulková ² 25 %,
doc. Ing. Radovan Kopp, Ph.D.² 20 %, prof. Dr. Ing. Jan Mareš² 25 %

Adresa autorů:

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

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

Mendelova univerzita v Brně
ISBN 978-80-7509-547-3

Obsah	
1. Cíl technologie	4
2. Popis technologie	4
3. Oblast výzkumu	4
4. Úvod	5
4.1. Značení (značkování) ryb	5
4.2. Výběr/použití konkrétního typu značení	5
4.3. Cíle	5
4.4. Způsob detekce ARS	9
5. Okruhy ověření	9
5.1. Toxicita ARS	9
5.2. Koncentrace ARS a velikost těla	9
5.3. Doba aplikace	9
5.4. Doba čitelnosti	10
5.5. Možnost uchování barvených ploutví	12
5.6. Praktické testování různých značení (ARS, zkrácení ploutve, VIE a splintů).	12
6. Porovnání jednotlivých způsobu značení při vysazování ryb - shrnutí	13
6.1. Barvicí látka ARS	13
6.2. Amputace části ploutve	14
6.3. Značení pomocí VIE	14
6.4. Použití splintů	14
7. Závěry	15
8. Novost postupů	15
9. Ekonomické aspekty	16
10. Popis uplatnění technologie	16
11. Seznam literatury	17

1. Cíl technologie

Cílem technologie je seznámení celého spektra rybářských subjektů, tj. chovatelů ryb, uživatelů rybářských revírů, producentů násového materiálu s možnostmi hromadného značení ryb vysazovaných do nádrží při využití koupele s přídatkem preparátu Alizarin Red S. Jedná se o značení při vysazování velkých počtů jedinců (v řádech tisíců kusů) malých velikostí (stáří 0+, max. 1+; velikost obvykle v rozmezí 3–10 cm), značení je identifikováno bez usmrcení ryb optimálně přímo v terénu. Značení umožní následné rozlišení vysazených ryb od ryb z přirozené reprodukce a monitoring pohybu těchto ryb v nádrži.

2. Popis technologie

V letech 2016-2017 byla provedena optimalizace postupu a ověřování metody hromadného značení ryb s použitím alizarinové červeně na experimentálním rybochovném zařízení Mendelovy univerzity v Brně, Ústavu biologie obratlovců AV ČR v.v.i. a provozním zařízení firmy Biofish s.r.o. v zařízení Zahrádka. Pro testování byla využita celá řada druhů ryb ve věku 0+, byly testovány různé koncentrace preparátu, doba expozice ryb v roztoku, byl proveden standardní test toxicity. Na základě dosažených výsledků byla zpracována a ověřena v průběhu roku 2017 technologie hromadného značení ryb – konkrétně bolena dravého, před jejich vysazením do vodárenské nádrže. Následně pak byl proveden monitoring výskytu obarvených ryb v nádrži. Uvedenou technologii lze využít i pro další druhy ryb.

V rámci ověření technologie se jednalo o následující druhy ryb: podoustev říční (*Vimba vimba*), ostroretka stěhovavá (*Chondrostoma nasus*), bolen dravý (*Leuciscus aspius*), amur bílý (*Ctenopharyngodon idella*), tolstolobik bílý (*Hypophthalmichthys molitrix*), kapr obecný (*Cyprinus carpio*), candát obecný (*Sander lucioperca*), štika obecná (*Esox lucius*) a karas barevná forma (*Carassius auratus*).

3. Oblast výzkumu

Ověření technologie: testování a ověření proběhlo na experimentálním rybochovném zařízení Mendelovy univerzity v Brně, Ústavu biologie obratlovců AV ČR v.v.i., rybochovném objektu firmy BioFish s.r.o., rybnících Rybníkářství Pohořelice a.s. a v nádrži Švihov podniku Povodí Vltavy a.s.

4. Úvod

4.1. Značení (značkování) ryb

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, odlišení vysazovaných jedinců, označení, resp. evidence ryb v chovu či jejich potomstva atd. Vzhledem k rozdílným požadavkům existuje i škála druhů značení.

4.2. Výběr/použití konkrétního typu 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

4.3. Cíle

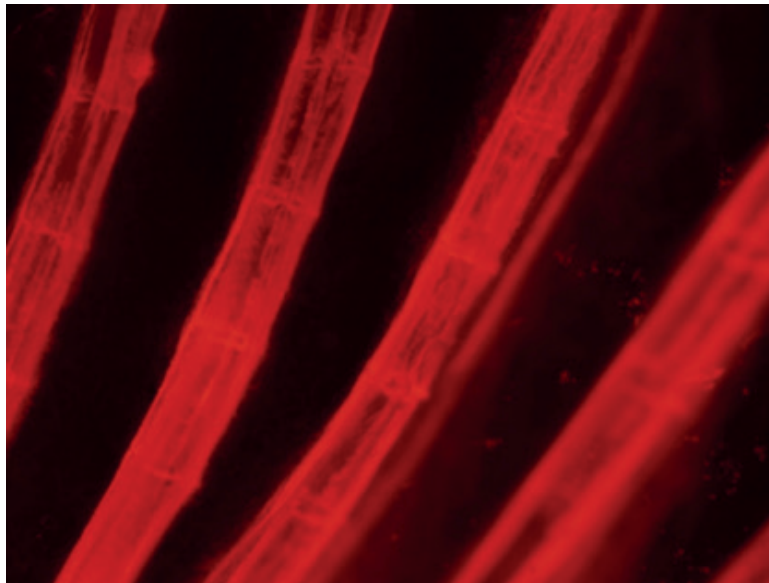
Cílem bylo ověřit možnosti značení ryb vysazovaných do vodárenských nádrží, tj. zejména dravých druhů. Jedná se o vysazování velkých počtů jedinců (v řádech tisíců) malých velikostí (stáří 0+, max 1+; velikost obvykle v rozmezí 3–10 cm), značení musí být identifikováno bez usmrcení ryb optimálně přímo v terénu. Na základě těchto podmínek byly k ověření vybrány následující druhy značení:

4.3.1. Alizarinová červeň (*Alizarin Red S*; *ARS*)

Poměrně, alespoň v České republice, nový způsob značení vycházející ze schopnosti alizarinové červeni vázat se na vápenité struktury v organismech (kost, šupina, otolit) (Obr. 1.). K detekci se využívá fluorescenčních vlastností barviva, s čímž souvisí nutnost určitého speciálního vybavení (například fluorescenční mikroskop). Aplikuje se formou pomohření ryb do roztoku barviva. Aplikace je obvykle v řádech hodin, omezujícím faktorem je zejména cena dané chemikálie. Lze využít jen jako hromadné barvení.

Tato metoda byla zvolena jako klíčová pro ověření.

Obr. 1.: Fluorescence ploutevňích paprsků v prsní ploutvi bolena po obarvení ARS



4.3.2. Odstřizení části ploutve

Kvůli nenáročnosti v minulosti častá metoda značení spočívající v odstranění koncové části ploutve (Obr. 2.). Vzhledem k možné variabilitě ve výběru dané ploutve, lze v určitém rozsahu využít i ke skupinovému či individuálnímu značení. Její aplikace se omezuje na minimální velikost ryby (minimálně několik cm), schopností poměrně rychlé regenerace ploutví (řádově v týdnech) a stresovou zátěží projevují se zejména u některých citlivých druhů ryb (candát, ouklej). V některých případech lze využít/spojit tento způsob značení v souvislosti s odběrem „finclipů“ pro molekulárně-genetické analýzy daných jedinců.

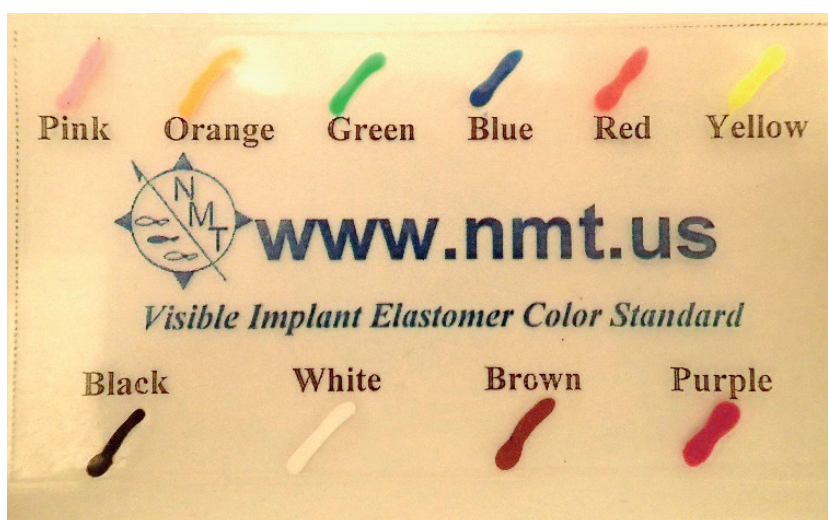
Obr. 2.: Zkrácení prsní ploutve u bolena



4.3.3. Visible Implant Elastomer Tags (VIE)

Jedná se o speciální, pro tyto účely vyvinutou barevnou hmotu, která se aplikuje podkožně pomocí injekční stříkačky. Vzhledem k možnosti výběru z několika barev (Obr. 3.) a aplikaci v různých místech povrchu těla lze v určitém rozsahu využít i ke skupinovému či individuálnímu značení (Obr. 4.). Aplikuje se nejlépe na místo s menším stupněm pigmentace se silnou pokožkou nepokryté (velkými) šupinami, což je u některých druhů ryb omezujícím faktorem. Detekovat lze zrakem bez speciálních pomůcek nebo s pomocí zdroje UV osvětlení, při kterém dochází u některých barev k fluorescenci. Nevýhodou je poměrně vysoká cena a časová náročnost.

Obr. 3.: Barevná škála elastomerů



Obr. 4.: Bolen s aplikovaným elastomerem v čelní oblasti



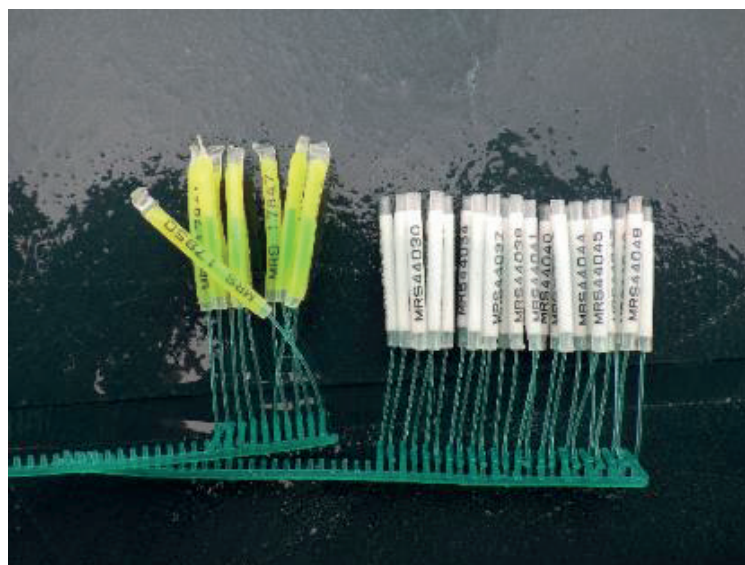
4.3.4. Splinty

Využití „splintů“ – plastových kotviček používaných původně ke značení zboží. Za pomoci splintovací pistole se aplikuje do svalů, obvykle na hřbet (Obr. 5.). Výhodou je snadná detekce, nízká cena značek a v případě využití různých barev a místa aplikace možnost skupinového značení (Obr. 6.). Je možné objednat i kotvičky s popisem přímo určené k tomuto značení. Jejich cena je sice vyšší, lze však využít pro jednoznačného individuální značení velkého množství jedinců. Nevýhodou je nutnost určité minimální velikosti jedince, zejména u citlivých druhů.

Obr. 5.: Aplikace splintů do hřbetní oblasti kapra



Obr. 6.: Splinty s individuálním kódem



4.4. Způsob detekce ARS

V rámci daných experimentů bylo k detekci ARS (tj. vyvolání fluorescence) využito v experimentálních podmínkách fluorescenčního mikroskopu. Pro terénní podmínky bylo ověřeno použití laserového světelného zdroje o vlnové délce 532 nm („zelený laser“) o výkonu 50-100 mW. Při vlastním pozorování byly využity ochranné brýle blokující světlo vlnové délky od 190-548 nm, umožňující pozorovat vyvolanou fluorescenci tkáně ohnivě-červené barvy. Pro informaci a dokreslení viditelnosti fluorescence značených ryb jsou přiloženy obrázky pořízené ve zmíněném mikroskopu.

5. Okruhy ověření

Testování bylo primárně zaměřeno na značení pomocí ARS (snášlivost ryb vůči barvivu, podmínky aplikace, doba čitelnosti), ke srovnání byly využity i další, výše uvedené druhy značení.

5.1. Toxicita ARS

V souvislosti s ověřováním vybraného způsobu značení, koncentrace ARS, délky expozice a použití ARS společně s chloridem sodným, byl proveden standardní test akutní toxicity dle ČSN EN ISO 7346-1. Na druhu *Danio rerio* byly testovány koncentrace 150; 300 a 600 mg/l, a dále uvedené koncentrace s přídávkem 10 g/l chloridu sodného. V žádné testované koncentraci ARS nebyl v průběhu 72 h trvání testu zjištěn úhyn sledovaných ryb. Přídavek chloridu sodného, který měl zlepšit fixaci barviva na kosterní struktury, způsobil úhyn všech ryb ve všech testovaných koncentracích.

5.2. Koncentrace ARS a velikost těla

V první fázi ověřování efektu ukládání ARS do těla ryb (v červnu 2016) byl ověřován efekt a tolerance vybraných druhů ryb k různé koncentraci roztoku ARS. Na základě literární údajů, byla ověřována koncentrace v rozpětí 75–150 - 300 mg/l při době aplikace 3 hodiny. Testováno bylo na bolenech dvou velikostních kategorií (50 a 65 mm SL /1,7 a 3,7 g/).

Nebyl nalezen výrazný rozdíl v intenzitě“ zejména mezi 150 a 300 a obě velikostní kategorie se barvili stejně

5.3. Doba aplikace

Efekt různé doby aplikace (koupele) byl ověřován u bolena dravého v červnu 2016. Boleni o velikosti 30-40 mm barvení roztokem ARS o koncentraci 150 mg/l, doba expozice 0 (kontrola), 1, 3, 6, 12 a 24 hodin, velikost skupin byla 20 ks (resp. kontrola 35 ks). Každá skupina označena i zkrácením ploutve.

Kontrola úspěšnosti – ve všech případech došlo k navázání barviva, nebyl pozorován rozdíl v intenzitě fluorescence v závislosti na době expozice.

Ryby dále využity k ověření stability značení – viz 5.4.

5.4. Doba čitelnosti

5.4.1. *Boleni*

Pro hodnocení doby viditelnosti barvení byli využiti boleni barvení v rámci sledování doby aplikace barviva (viz 2.3.), chovaní dále ve venkovní nádrži. Kontrola viditelnosti proběhla ve třech termínech: v dubnu 2017 (tj. 10 měsíců po aplikaci; průměrná velikost 50 mm SL), v říjnu 2017 (15 měsíců od aplikace; 56 mm) a v prosinci 2017 (18 měsíců po aplikaci; 60 mm).

V rámci první kontroly (10 měsíců) byla skupina o velikosti 33 jedinců (30 barvených, 3 kontrolní) usmrcena, ploutve umístěny na podložní sklo a hodnocena fluorescence ploutevnických paprsků a současně i možnost detekovat anomálie jednotlivých ploutví jako následek regenerace po jejich zkrácení.

Ve všech případech bylo možné pozorovat fluorescenci ploutevnických paprsků (s výjimkou ploutví odstřižených v průběhu značení). Zejména na ocasních ploutvích dobře patrna hranice mezi bazální nabarvenou a distální dorostlou neobarvenou částí. Makroskopicky byly ploutve prakticky zcela regenerovány. Pouze při použití binokulární lupy bylo v některých případech možné i bez využití fluorescence pozorovat na jednotlivých paprscích přechod mezi původní a dorostlou částí.

Kontrola po 15, resp. 18 měsících probíhala bez usmrcení ryb, pozorování bylo zaměřeno na paprsky ocasní ploutve. U všech značených jedinců byla fluorescence stále patrna v dostatečné kvalitě, zejména v místech ploutevnických paprsků, které v době aplikace barviva tvořili okraj ploutve (patrný výrazný ostrý přechod mezi obarvenou a neobarvenou částí).

5.4.2. *Skupina ryb ve věku rychleného plůdku*

Pro ověření vlivu druhu ryb, resp. vlivu rychlosti růstu na čitelnost značení ARS byla tato metoda barvení použita u několika vybraných druhů ryb, které byly následně vysazeny do rybníčních podmínek. Vybrány byly hospodářsky významné druhy ryb chované v rybnících a ryby reofilní, standardně vysazované do tekoucích vod. Konkrétně se jednalo se o následující druhy: podoustev říční, ostroretka stěhovavá, bolen dravý, amur bílý, tolstolobik bílý, kapr obecný, candát obecný, karas barevná forma. Všechny ryby pocházely z chovu Rybníkářství Pohořelice a.s.. Aplikace ARS (150 mg/l; 1 hodina) na 8 vybraných druhů ryb byla realizována 19. července 2017 (Tab. 1.).

Ryby umístěny v areálu rybníkářství Pohořelice. K výlovům rybníků došlo na konce měsíce září 2017. V podzimním období byla u vylovených ryb provedena kontrola viditelnosti zbarvení. Byla měřena SL a fluorescence paprsků ocasní ploutve živých ryb. Ze zjištěné SL bylo stanoveno procentické zvýšení tohoto parametru v průběhu vegetačního období.

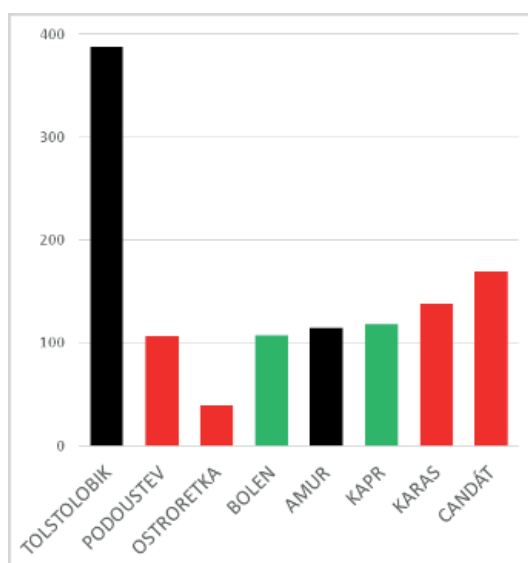
Tab. 1 Charakteristika ryb barvených pomocí ARS v Pohořelicích

Druh	Počet kusů	Délka celková (TL; mm)	Délka těla (SL; mm)	Hmotnost (w; g)
Podoustev říční	37	37,6±4,12	32,0±4,24	0,49±0,23
Ostroretka stěhovavá	52	63,5±3,34	51,7±2,11	1,94±0,27
Bolen dravý	63	63,5±7,26	51,8±6,01	1,83±0,60
Amur bílý	52	41,2±3,88	33,5±2,95	0,79±0,21
Kapr obecný	100	63,0±4,85	49,3±3,37	3,66±0,82
Tolstolobik bílý	50	40,7±1,64	32,6±1,17	0,63±0,12
Candát obecný	46	88,6±14,34	73,5±12,06	6,31±3,27
Karas barevná forma	49	57,9±7,87	44,9±5,36	3,33±1,18

Viditelnost značení bylo výrazně závislé na zvětšení velikosti sledovaných jedinců, případně i na druhu ryby, resp. morfologii ploutve (tloušťka ploutevního lemu) (Obr. 7.). Nejlepší kvalita značení byla pozorována u zejména u podoustve a ostroretky, u nichž bylo zvětšení velikosti pouze o 106, resp. 40% a jejichž ploutevní lem je poměrně tenký. Dobře bylo značení patrné i u karase (zvětšení délky 138%). Zřetelné bylo i u bolena a kapra (zvýšení délky těla o 108; resp. 118%), projevil se zde ale vliv silnější vrstvy epitelu kryjícího paprsky. Dobrá viditelnost značení u candáta (zvětšení o 169%) je evidentně zapříčiněna tenkým ploutevním lemem.

Nemožnost detekovat barvení u tolstolobika a amura byla způsobena kromě jejich přírůstkem (388, resp. 115%) i výrazně silným ploutevním lemem.

Obr. 7.: Zvětšení velikosti (% SL) a detekovatelnost značení (červeně – dobrá detekovatelnost, zelené – na hranici detekovatelnosti, černá – nedetekovatelné)



5.5. Možnost uchování barvených ploutví

Detekci značení ploutevních paprsků lze provádět buď přímo na živém jedinci, nebo po odstřížení části ploutve, kterou lze umístit na podložní sklo. Bohužel však při vysychání dochází ke ztrátě detekovatelnosti značení, neboť postupně vykazovaly fluorescenci i ploutevní paprsky nebarvené a nebylo tak možno objektivně posoudit přítomnost barviva. Je proto nejlépe detekovat značení pomocí ASR u takovýchto ploutevních vzorků co nejdříve, maximálně v průběhu několika dní.

Pro ověření podmínek uchování (řádově týdny až měsíce) barvených ryb a ploutví bylo testováno:

- umístění do etanolu (testován 70%),
- umístění do formaldehydu (používán 10% roztok).

Rehydratace nebyla ověřována. Nebyl zjištěn rozdíl ve viditelnosti značení mezi uložením ve formaldehydu a etanolu.

5.6. Praktické testování různých značení (ARS, zkrácení ploutve, VIE a splintů).

5.6.1. Švihov

Praktická aplikace ASR byla otestována v rámci pravidelného vysazování bolena 5. 8. 2017 na nádrži Švihov. Barvivo ARS o koncentraci 150mg/l, byla aplikována 44 tisíc 0+ bolenů (velikost ryb - SL 69 ± 13 mm, hmotnost $5,2 \pm 3,2$ g). Pro značení byly použity 4 nádrže s aerací (kyslík), do níž byly postupně na dobu jedné hodiny umístěny ryby v koncentraci cca 10 ks/l roztoku. Bezprostředně po značení byla daná skupina ryb vysazena do nádrže. Skupina 30 jedinců byla ponechána pro další sledování (viz 5.6.3).

Během aplikace ani po ní nebyl pozorován úhyn barvených jedinců. Náklady na barvivo činily cca 1000 Kč na 1000 ks ryb.

5.6.2. v.n. Pílská a Plumlov

K ověření rychlosti aplikovatelnosti značení pomocí splintů bylo využito kapří násady. Aplikovány byly splinty s individuálním popisem umožňující individuální značení. Značení proběhlo na podzim roku 2016 a 2017 v rámci pravidelného vysazování, značeno bylo celkem 8 tisíc ryb, byl sledován čistý čas potřebný ke značení (Obr. 8.).

V průměru byla jedna osoba schopna označit 1000 ryb během tří hodin čistého času. Náklady na značky činily 12.000 Kč (při použití neznačených splintů by kleslo na cca 100 Kč).

Obr. 8.: Kapří násada s aplikovanými splinty s individuálním kódem



5.6.3. Porovnání možností různých typů značení u bolena 0+

U bolenů označených pomocí ARS (viz. 5.6.1.) bylo (7.8.2017) aplikováno další značení:

- a) VIE /elastomer/ subkutánně na čelo a líc;
- b) odstřížení cca ½ prsní ploutve (využito pro sledování možnosti uchování vzorků viz 5.5.)

Aplikace splintů nebyla vzhledem k velikosti ryb reálná. Kontrola proběhla po jednom a dvou měsících od značení.

Po jednom měsíci bylo barvení ARS zřetelné, stejně i absence části ploutve. U elastomeru došlo k vypadávání, poněkud méně u těch lokalizovaných na líci (16%) než umístěných na čele (53%).

Při kontrole po dvou měsících byla značení pomocí ARS stále patrné, u ploutví došlo k výrazné regeneraci a u poloviny ryb již nebylo zcela zřetelné. U elastomeru bylo pozorováno další vypadávání značek umístěných na líci (absence u 37% jedinců).

6. Porovnání jednotlivých způsobů značení při vysazování ryb - shrnutí

6.1. Barvicí látka ARS

Aplikace barvicí látky je snadná, k trvalému zafixování barvy na ploutevní paprsky postačí hodinová koupel v roztoku 150 mg/l vody. Časová náročnost závisí spíše na

potřebě využít barvicí roztok z finančních důvodů opakovaně. Obecně lze použít u všech druhů ryb, limitující je dokončený vývoj ploutví a rychlost růstu ryby. Problematické je proto použití při vysazování štik, kdy ploutevní paprsky nejsou ještě zcela vyvinuté a dále použití v případech, kdy budou značení jedinci při detekci výrazně větší než v době barvení (více než dvojnásobné délka těla). Lze použít jen jako hromadné značení. Cena roztoku na dávku tisíc ryb velikosti 5–10 cm je cca 1000 Kč, roztok lze však použít opakovaně, minimálně v den namíchání. Negativum je nutnost vyvolání fluorescence, což vyžaduje odpovídající vybavení a jistou praxi.

6.2. Amputace části ploutve

Jednoduché krátkodobé značení, lze doporučit zejména v případě odběrů finclipů pro molekulárně-genetické analýzy.

6.3. Značení pomocí VIE

Dodává NMT INC Northwest Marine Technology z USA, udávaná cena za 1 ml je podle objednaného množství 20-45 \$, dále je třeba počítat s poštovným a celními poplatky, které mohou sumu až zdvojnásobit.

Nevýhodou je potřeba před aplikací barvivo namíchat (je dvousložkové) – připravenou směs je třeba spotřebovat během několika desítek minut. Vzhledem k nutnosti dodržet doporučený podíl obou složek je obtížné toho dosáhnout u malých množství (například při potřebě doznačit již jen malé množství jedinců), je potřeba namíchat minimálně cca 0,1 ml barviva, tj. dávku na desítky značek. Z výše uvedeného tak vyplývá náročnost na odhad odpovídajícího množství barviva, jinak dochází k výraznému navýšení ceny.

Další nevýhodou je možné vypadávání značky, což je způsobeno obvykle absencí vhodného místa k aplikaci. Příkladem mohou být třeba ostnoploutví (candát, okoun), u nichž je i u poměrně velkých jedinců na hlavě kůže jen velmi tenká, která se při aplikaci snadno protrhne, tělo je pokryto souvislou vrstvou šupin, které aplikaci barviva víceméně vylučují. I v případě 0+ bolenu nebylo možné řádně umístit značku v poměrně tenkém podkoží a docházelo k vypadávání.

6.4. Použití splintů

Aplikace je poměrně jednoduchá, cena závisí na použití standardní průmyslových splintů (cena kolem 350 Kč za 10 tis. ks) nebo speciálních s popisem (importované značky – 24 Kč za ks, tuzemská výroba přibližně 12 Kč za ks) K aplikaci jsou nezbytná odpovídající aplikační „pistole“ (obchodní název textilní kleště) s prodlouženou jehlou. Pořizovací cena se pohybuje v závislosti na kvalitě, síle a délce jehly v rozpětí od 400 do 1.500 Kč. Cena samotné jehly (s ohledem na použití je zapotřebí ji měnit) závisí na typu použitých kleští, požadavku na její jemnost a délku v rozpětí 25–230 Kč.

Tabulka 2: Celkové hodnocení metod značení

	ARS	ploutev	VIE	splint
cena značky	**	***	***	* ***
možnost skup/ind	*	**	**	***
obtížnost aplikace	***	***	*	**
čas aplikace	***	**	*	**
úspěšnost	***	***	* ***	***
doba čitelnosti	* **	*	***	***
vybavení k detekci	*	***	**	***

*** výborné, ** dobré, * špatné

7. Závěry

Na základě ověření způsobu barvení, toxicity použitého preparátu a zpětné čitelnosti zbarvení, včetně ověření postupu hodnocení viditelnosti značení lze konstatovat následující:

- obvykle používaná koncentrace 150 mg/l není toxická (5.1.),
- tato koncentrace je dostačující (5.3) při působení 1 hodina (5.2.),
- doba čitelnosti není závislá na době od aplikace ale na velikosti jedince (5.4.2.),
- pro detekci značení je vhodné posouzení ryb v krátké době po jejich odlovu nebo fixace odstřižených ploutví v roztoku formaldehydu nebo etanolu (5.5.).

Značit lze ryby od určité minimální velikosti, resp. ve věku, kdy již dochází k osifikaci ploutevních paprsků a vytvoření šupin.

8. Novost postupů

S rozvojem reprodukce a odchovu raných stádií v kontrolovaných podmínkách se objevuje potřeba značení takto produkovaných jedinců pro vysazení do lokalit, kde potenciálně existuje množnost jejich přirozené reprodukce. Při následném průzkumu lze vyhodnotit efekt vysazování odchovaných jedinců. Pro optimalizaci techniky vysazování konkrétních rybích druhů do přirozených lokalit je žádoucí vysazované ryby značit pro hodnocení jejich migrace na konkrétních lokalitách. Zpětným odlovem lze zhodnotit rychlost jejich šíření v přirozených podmínkách, obsazení jednotlivých lokalit nebo stanovišť, případnou proti nebo poproudovou migraci, která by vedla ke ztrátě vysazených ryb na lokalitě. V uvedených případech není zapotřebí individuální a poměrně finančně náročné značkování vysazených ryb. Navíc se zpravidla jedná o juvenilní jedince s velmi malou velikostí. Standardní značení je komplikované a pro rybu stresující. Externí značky pro mladé věkové kategorie využít nelze. Zpravidla se pro skupinové značení malých ryb používá amputace některé z ploutví. Využití koupele v roztoku látek, které se ukládají v tkáních ryb a je za určitých podmínek, optimálně

bez usmrcení ryby, možné je identifikovat, přináší nové možnosti ve značení ryb. Ověřená technologie použití preparátu Alizarin Red S k hromadnému barvení juvenilních ryb je v podmínkách ČR nová, byla ověřena a je za uvedených podmínek využitelná pro celou řadu chovaných rybích druhů. Při vlastním barvení je nutno respektovat konkrétní požadavky daného druhu na prostředí a velikost ryb.

9. Ekonomické aspekty

Předpokládané ekonomické a další přínosy využití ověřené technologie jsou shrnuty v možnostech využití značení (značkování) ryb, což 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, odlišení vysazovaných jedinců, označení, resp. evidence ryb v chovu či jejich potomstva atd. Vzhledem k rozdílným požadavkům existuje i škála druhů značení. Hromadné značení raných stádií formou koupele v preparátu Alizarin Red S umožňuje jednorázové značení velkého množství ryb v krátkém časovém intervalu. Tento způsob významně snižuje náklady na značení a zvyšuje efektivnost práce ve srovnání s jinými metodami označování ryb. S ohledem na možnost použití pro velmi malé ryby je to navíc jedna z mála možností značení. Ekonomický přínos lze kvantifikovat v rozdílu nákladů ve srovnání s dalšími způsoby značení a jejich pracovní náročností. Náklady na obarvení uvedenou metodou je na úrovni 1,- Kč na 1 ks ryby a délka koupele je 1 hodina, přičemž je možno současně obarvit několik tisíc až několik desítek tisíc ryb v závislosti na velikosti použitých nádrží. Při využití závěsných značek (splintů) je cena u označených splintů 12,- Kč za kus, u neoznačených 0,5 Kč, při časové náročnosti značení 1 tis. ks ryb 3 hodiny. Tradiční značení odstřížením ploutve je bez nákladů a produktivitou 700-1000 ks ryb za hodinu, bez hodnocení šetrnosti zákroku. Použití elastomerů je limitováno minimální velikostí ryb a nutností pořídit dodávané balení barvicí látky (cena 1 ml v závislosti na objednaném množství se pohybuje v rozpětí 20-45 \$, dále je třeba počítat s poštovním a celními poplatky, které mohou sumu až zdvojnásobit). Hůře hodnotitelná je obtížnost aplikace a její úspěšnost, kdy koupele ryb jsou standardním a běžným chovatelským zásahem.

10. Popis uplatnění technologie

Uplatnění technologie hromadného značení je u všech subjektů s potřebou značení ryb, 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. Využití je v oblasti hospodaření na tekoucích vodách – producenti nasadového materiálu, podniky Povodí, rybářské svazy, výzkumné organizace. Případně u chovatelských subjektů produkující mladší věkové kategorie.

Smlouva o uplatnění ověřené technologie byla uzavřena se společností BioFish s.r.o. se sídlem Horní Paseka 40, Ledec nad Sázavou 548 01.

11. Seznam literatury

- 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].
- Bezpečnostní list, Alizarine complexone, 2013. [Online] Available et: https://www.applichem.com/fileadmin/datenblaetter/A2866_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.
- LIUA, Q., ZHANGA, X. M., ZHANGA, P. D., NWAFILE, 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.
- RODINA, M., FLAJŠHANS, M. 2008. Využití RFID technologie ke značení ryb v ČR, *Bulletin VÚRH Vodňany*, 44(4): 100–108.

Alternativní značení vysazovaných ryb pro umožnění jejich následného sledování
Ověřená technologie R17/2017

Halačka Karel, Poštulková Eva, Kopp Radovan, Mareš Jan

Vydavatel: Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno.

Tisk: Vydavatelství Mendelovy univerzity v Brně

Vydání: první, 2018

Náklad: 100 ks

Počet stran: 18

ISBN 978-80-7509-547-3