

06/2019
Technologie

TECHNOLOGIE ZNAČENÍ SEKAVCŮ POMOCÍ ALIZARINU

Ing. Karel Halačka, CSc.



Technologie 06/2019

TECHNOLOGIE ZNAČENÍ SEKAVCŮ POMOCÍ ALIZARINU

Ing. Karel Halačka, CSc.

Brno, 2019

Technologie vznikla za finanční podpory projektu TAČR TG03010048
Komerzializace výsledků zoologického výzkumu – aplikace využitelné v praktické
ochraně

Podíl autorů:

Ing. Karel Halačka, CSc. 100 %

Adresa autora:

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

Obsah

1. Cíle technologie	4
2. Popis technologie	4
3. Oblast výzkumu	4
4. Úvod	4
4.1. Značení	4
4.2. ARS	5
4.3. Sekavci	5
5. Okruhy ověření	6
5.1. Vývoj ploutevních paprsků a jejich osifikace	6
5.2. Barvení – schopnost navázání barviva na cílový orgán a letalita barvicí lázně	6
5.3. Doba čitelnosti značení a zvýšení mortality	6
5.4. Způsob detekce	7
6. Výsledky	7
6.2. Aplikace barviva	9
6.3. Doba čitelnosti značení	10
6.4. Způsob detekce	10
7. Závěry	10
8. Novost postupů	11
9. Ekonomické aspekty	11
9.1. Využití ARS	11
9.2. Možnost detekce bez nutnosti využití fluorescenčního mikroskopu.	12
9.3. Možnost využití značených ryb	12
9.4. Omezení stresové zátěže	12
10. Popis uplatnění technologie	13
11. Seznam literatury	13

1. Cíle technologie

Cílem technologie je seznámení širokého spektra relevantních subjektů, tj. orgánů ochrany přírody, ichtyologů, uživatelů rybářských revírů, chovatelů ryb s možnostmi značení sekavců pomocí alizarinové červeně (Alizarin Red S, ARS), aplikované ve formě koupele. Jedná se o typ hromadného značení ryb menších rozměrů (velikost obvykle v rozmezí 3–10 cm). Na značení navazuje návrh vhodného způsobu jeho detekce nevyžadující nákladné vybavení či nutnosti odběru vzorku tkáně (ploutevních paprsků) nebo dokonce usmrcení jedince.

2. Popis technologie

V letech 2018-2019 byla provedena optimalizace postupu a ověřování metody značení sekavců s použitím alizarinové červeně na pracovišti ÚBO. Testován byl stupeň osifikace ploutevních paprsků ocasní ploutve sekavců, vlastní aplikace ARS (čas, koncentrace), doba možného rozpoznání značení v závislosti na růstu ryb a způsob detekce zbarvení použitelný přímo v terénu při odchytu ryb.

3. Oblast výzkumu

Ověření technologie: odchov sledovaných; barvení jedinců pomocí ARS; studium osifikace, testování detekčního zařízení – Ústavu biologie obratlovců AV ČR, v. v. i.

4. Úvod

4.1. Značení

Značení ryb je technika umožňující objektivní individuální či hromadnou identifikaci jedinců. Uplatnění nachází jak v rámci chovatelské činnosti, terénních sledováních nebo v rámci výzkumu či ochrany ryb. Konkrétně lze jmenovat sledování migrací ryb, jejich růstu, odlišení vysazovaných jedinců, označení, resp. evidence ryb v experimentu či chovu atd. Vzhledem k rozdílným požadavkům existuje i škála druhů značení.

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

- ☞ akceptovatelná úroveň stresové zátěže značeného jedince jak při aplikaci, tak při detekci značení

- ☞ druh a velikost značených jedinců
- ☞ náročnost aplikace: finanční, časová, personální, potřeba speciálních aplikátorů
- ☞ náročnost následné detekce značky
- ☞ možnost skupinového či individuálního rozlišení jedinců
- ☞ úspěšnost a trvanlivost značení

4.2. ARS

Poměrně, alespoň v České republice, nový způsob značení vychází ze schopnosti alizarinové červeni (ARS) vázat se na vápenité struktury (kost, šupina, otolít) v živých organismech. K detekci se využívá fluorescenčních vlastností barviva, s čímž souvisí nutnost určitého speciálního vybavení (standardně fluorescenční mikroskop). Aplikuje se formou pomohení ryb do roztoku barviva. Čas aplikace je obvykle v řádech hodin, omezujícím faktorem je zejména cena dané chemikálie a potřebný objem lázně. Lze využít jen jako hromadné barvení.

Jak je uvedeno výše, ARS se váže na všechny kalcifikované tkáně v organismu. Vzhledem k tomu, že tato technologie je zaměřena na praktické využití značení v terénu bez nutnosti usmrcení jedince či odběru vzorků tkáně, byla směřována na barvení a detekci u ploutevnických paprsků ocasní ploutve u živých ryb.

U některých organismů vykazují tkáně větší či menší stupeň „přirozené“ fluorescence, je proto vhodné u každého druhu před aplikací ARS provést kontrolu.

4.3. Sekavci

Cílem bylo ověřit možnosti značení pomocí ARS u sekavců (*Cobitis* sp.). Sekavci jsou drobné štíhlé ryby, dorůstající velikosti 10–15 cm. Jsou zahrnuti do Evropské směrnice (NATURA 2000) přílohy II, v rámci České republiky je jejich stav hodnocen jako „silně ohrožený“. Rod sekavců zahrnuje více druhů, jejichž areál rozšíření se vzájemně překrývá a dochází k jejich křížení. To mělo za následek vytvoření hybridních komplexů zahrnující nejen jedince s rozdílnými genomy ale i o různé ploidii, kteří se obvykle rozmnožují asexuálně (gynogeneticky). Vzájemné vazby mezi jednotlivými biotypy těchto komplexů a dynamika jejich struktury není stále dostatečně objasněna, což kromě jiného snižuje efektivitu jejich ochrany. Významným praktickým přínosem pro jejich studium je možnost vhodného značení jedinců.

5. Okruhy ověření

5.1. Vývoj ploutevňích paprsků a jejich osifikace

Pro vývojovou studii byla vybrána série jedinců ze sbírek pracoviště ÚBO. Ryby byly fixovány a uloženy 4% roztokem formaldehydu. Pro dané sledování byli vybráni jedinci barvení pomocí Alcianové modři (která se váže na chrupavčitou, tedy neosifikovanou tkáň) a Alizarinové červeně ke zvýraznění chrupavky, resp. kostí (osifikovaných tkání). Cílem bylo získat informace o vývoji a postupu osifikace ploutevňích paprsků ocasní ploutve a stanovit tak, od jaké minimální velikosti, resp. stáří lze aplikovat dané značení.

5.2. Barvení – schopnost navázání barviva na cílový orgán a letalita barvicí lázně

Standardně je ARS aplikována ve vodném roztoku o koncentraci 0,15 g.l⁻¹ po dobu jedné hodiny. Vzhledem k ceně barviva a době pobytu ryb v barvicí lázni, která, zejména při značení přímo v terénu, se může jevit jako poměrně dlouhá, byla otestována možnost snížení koncentrace barviva, resp. zkrácení doby aplikace. Testováno bylo na juvenilních (SL 15–25 mm) a adultních (SL 50–60 mm) jedincích.

		koncentrace ARS	doba aplikace
		g/l	min
0	kontrola	0	0
S	standard	0,15	60
A	zkrácení doby aplikace	0,15	20
B	zkrácení doby aplikace při zvýšení koncentrace ARS	0,30	20
C	snížení doby aplikace	0,05	60

5.3. Doba čitelnosti značení a zvýšení mortality

Na době čitelnosti značení ploutevňích paprsků ryb pomocí ARS se negativně podílí dva základní faktory:

- ☞ možné postupné uvolnění barviva z tkáně, čímž se snižuje intenzita zbarvení
- ☞ intenzita růstu značeného jedince, kdy značená tkáň je překryta novou a zaujímá postupně stále menší úsek situovaný v proximální části loutevňního paprsku.

Pro testování byla vybrána skupina 28 jedinců sekavců o průměrné velikosti (SL) 35 mm (25–45 mm), z nichž polovina byla naznačena pomocí ARS standardním postupem (1 hodina při koncentraci 0,15 g/l). Kontrola čitelnosti byla provedena po značení a následně za 60, resp. 190 dní od aplikace barviva.

5.4. Způsob detekce

Jako možná náhrada za fluorescenční mikroskop bylo sledování realizováno pomocí:

- 🕒 binokulární lupy sloužící k určitému zvětšení pozorovaného objektu:
- 🕒 ukazovátka se zeleným laserovým paprskem jako zdroje excitačního paprsku
- 🕒 ochranných brýlí filtrujících excitační světlo

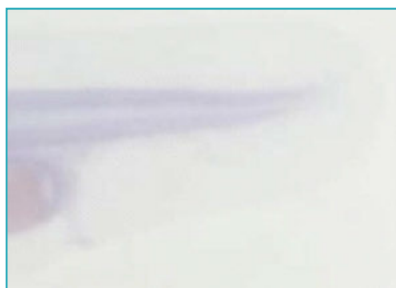


Vybavení k detekci ARS

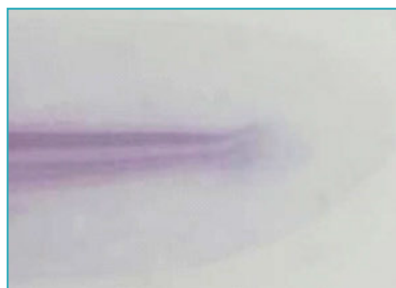
6. Výsledky

6.1. Vývoj ploutevních paprsků a jejich osifikace

(vzhledem k určitému rozrůstu jedinců během tohoto období je nutno zejména údaje o velikosti brát s jistou tolerancí)



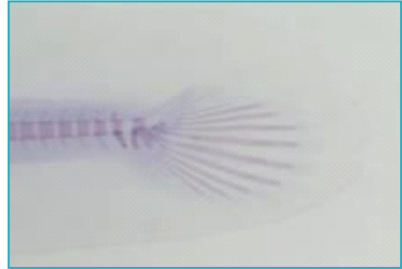
1. den po vykulení;
jedinec o velikosti 5,3 mm /TL/; ploutevní paprsky ocasní ploutve ještě nevytvořeny



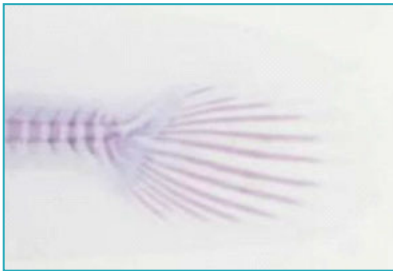
2. den
6,0 mm; počátek vývoje a osifikace prvních paprsků



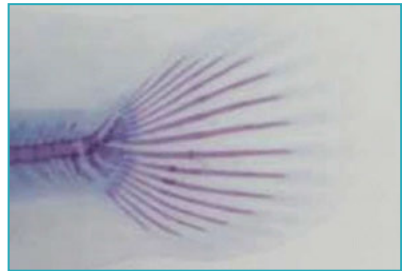
5. den
8,0 mm; začátek osifikace cca třetiny paprsků



7. den
9,0 mm; osifikace více než třetiny paprsků



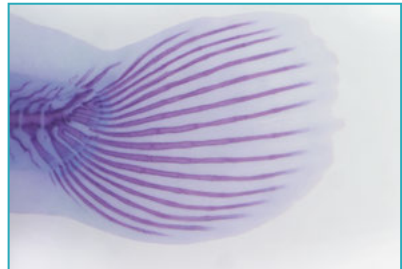
10. den
10,5 mm; částečná osifikace
zasahuje většinu paprsků



12. den
12,3 mm; částečná osifikace
již u všech paprsků



16 den
14,0 mm; pokračující osifikace všech paprsků



23 den
14,5 mm; úplná osifikace všech paprsků

Lze konstatovat, že u jedinců ve stáří cca 1 měsíc a velikosti přesahující 15 mm (TL) jsou ploutevní paprsky ocasní ploutve dostatečně vyvinuty a osifikovány. Lze tak již využít, jako prakticky jediného možného, značení pomocí roztoku ARS. Vzhledem k rychlému růstu je však nutno u takto malých jedinců počítat s dobou čitelnost pouze v řádech týdnů, poté, umožňují-li to podmínky, lze doporučit přeznačení ryb.

6.2. Aplikace barviva

Čitelnost značení byla hodnocena 2. den po aplikaci barviva. Primárně bylo hodnoceno zafixování barviva (fluorescence) na ploutevních paprscích ocasní ploutve. V žádné ze skupin nebyl pozorován úhyn jedinců jako reakce na aplikaci barviva.

6.2.0 – bez aplikace barviva

Zbarvení (fluorescence) ploutevních paprsků nebylo pozorováno.

6.2.S – standardní postup

Ploutevní paprsky ocasní ploutve všech sledovaných jedinců byly nabarveny v dostatečné intenzitě, a to po celé své délce.

6.2.A – zkrácení doby aplikace

Jen u části jedinců bylo pozorováno mírné zbarvení distálních částí některých paprsků.

Tato varianta značení se proto jeví jako nevyhovující.

6.2.B – zkrácení doby aplikace kompenzované zvýšenou koncentrací barviva

U všech juvenilních jedinců a poloviny adultních byl výsledek značení srovnatelný se standardním postupem. U zbylé poloviny adultních jedinců bylo značení na hranici detekovatelnosti.

Tuto variantu lze tedy doporučit zejména u menších ryb, v případě větších jedinců lze navrhnout určité prodloužení doby aplikace (např. z 20-ti na 30 minut).

6.2.C – snížení koncentrace barviva

U cca 1/3 jedinců (juvenilních i adultních) byl výsledek aplikace srovnatelný se standardním postupem („S“). U zbývajících juvenilních jedinců a 1/3 adultních bylo možné zbarvení, i když méně intenzivní, pozorovat. U zbylé části adultních jedinců nebylo zbarvení pozorováno.

Tuto variantu lze tedy podmíněně doporučit pouze pro krátkodobé značení u juvenilních jedinců, a to s případně prodlouženou dobou aplikace.

6.3. Doba čitelnosti značení

Po 60 dnech od aplikace barviva, kdy došlo ke zvětšení délky těla sledovaných jedinců v průměru o 44 % (z 36 na 52 mm SL), bylo značení dobře patrné u všech značených ryb. Po uplynutí 190 dní (délka těla zvýšena v průměru o 66 %; SL 59 mm) bylo značení stále dobře čitelné u více než poloviny jedinců, u ostatních již došlo k určitému poklesu čitelnosti.

V případě kontrolní skupiny ploutevní paprsky nevykazovaly fluorescenci, růst jedinců byl shodný se skupinou pokusnou.

Lze tedy konstatovat, že doba čitelnosti značení v případě sekavců, jejichž velikost v době aplikace ARS dosahuje alespoň cca 4 cm, je minimálně 6 měsíců, resp. po období zvětšení velikosti (délka těla) do cca 50 %. Po tomto období, resp. větším nárůstu velikosti je třeba počítat s postupnou ztrátou čitelnosti.

6.4. Způsob detekce

Navrhovaný způsob detekce značení (laserové ukazovátko, ochranné brýle) na ploutevních paprscích se ukázal jako plně vyhovující a lze jej proto doporučit pro praktické využití jak v laboratorních podmínkách, tak v terénu.

7. Závěry

Na základě ověření způsobu barvení, čitelnosti zbarvení a zařízení k detekci lze konstatovat následující:

- ☞ využití značení pomocí ARS lze u sekavců doporučit
- ☞ standardní způsob aplikace umístěním ryb do roztoku ARS o koncentraci 0,15 g na 1 litr vody po dobu 1 hodiny je použitelný
- ☞ v případě časového tlaku je možné zkrátit aplikaci na $\frac{1}{4}$ – $\frac{1}{2}$ při současném zvýšení koncentrace barviva na dvojnásobek standardní hodnoty
- ☞ případné snížení koncentrace barviva lze doporučit spíše u jedinců menších rozměrů
- ☞ pro detekci zbarvení lze efektivně využít jako náhradu za fluorescenční mikroskop laserové ukazovátko se zeleným paprskem spolu s odpovídajícími ochrannými brýlemi, u menších jedinců v závislosti na zrakových dispozicích a zkušenostech pozorovatele lépe v kombinaci s lupou

- ☞ paprsky ocasní ploutve se jeví jako vhodný cílový objekt při značení pomocí ARS
- ☞ k plnohodnotnému značení ploutevnických paprsků musí sekavci dosáhnout velikosti minimálně 15 mm, což odpovídá stáří jednoho měsíce
- ☞ u ryb barvených ve velikosti cca 2 cm lze počítat s dobou čitelnosti značení po dobu několika týdnů, při 4 cm několik měsíců, u větších ryb, kde, již růst bude minimální lze předpokládat čitelnost i více než rok

8. Novost postupů

S potřebou ochrany a výzkumu ryb se objevuje potřeba jejich značení. V případech, kdy není zapotřebí individuální značení, se jeví jako velmi efektivní nová metoda značení pomocí ARS. Využívá se koupele v roztoku látky, která se ukládá v tkáních ryb a lze je za určitých podmínek, optimálně bez usmrcení ryby, identifikovat, což přináší nové možnosti v oblasti značení. Ověřená technologie použití preparátu ARS k hromadnému barvení sekavců je nová a rozšiřuje možnosti jejího optimálního využití pro další druh ryb.

Naše technologie se soustředila na možnost praktického využití, rychlou detekci nenáročnou na vybavení a nevyžadující usmrcení jedince ani odběr vzorků.

9. Ekonomické aspekty

Předpokládané ekonomické a další přínosy využití ověřené technologie zahrnuje:

9.1. Využití ARS

Možnost značení sekavců umožňující objektivní identifikaci jedinců nachází uplatnění jak v rámci ochrannářských či výzkumně-ichtyologických aktivit. Konkrétně lze jmenovat sledování migrací, růstu, odlišení vysazovaných jedinců (např. vůči jedincům z přirozené reprodukce), označení, resp. evidence generačních ryb či jejich potomstva v záchranných chovech atd. Hromadné značení raných stádií formou koupele v preparátu Alizarin Red S umožňuje jednorázové značení poměrně velkého množství ryb v přijatelném 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, alespoň pro jedince pod cca 5 cm.

Ekonomický přínos lze kvantifikovat v rozdílu nákladů ve srovnání s dalším způsobem značení a jejich pracovní náročnosti. Náklady na obarvení uvedenou metodou je na úrovni maximálně 1,- Kč na 1 ks ryby a délka koupele je 1 hodina, přičemž je možno současně obarvit několik set až tisíc ryb v závislosti na velikosti použitých nádrží. 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).

9.2. Možnost detekce bez nutnosti využití fluorescenčního mikroskopu.

Náklady na pořízení mikroskopu s možností fluorescence minimálně 80–100 tis. Kč, a navíc se jedná o laboratorní zařízení nevhodné pro práci v terénních podmínkách a pro sledování živých vodních organismů. Námí navrhovaná alternativa odstraňuje všechna tato negativa, přitom cena tohoto vybavení nepřesahuje 1 tis. Kč a představuje tak významnou finanční úsporu a tím dostupnost pro široké spektrum uživatelů a může tak být klíčová pro široké využití tohoto způsobu značení u ryb.

9.3. Možnost využití značených ryb

Jako příklad využití lze uvést objektivní odhad úspěšnosti vysazování a optimalizace počtu vysazovaných ryb. Možnost sledování podílu jedinců pocházejících z vysazování a přirozené reprodukce může snížit náklady na dotační vysazování korekcí počtu vysazovaných jedinců. Dalším významným okruhem využití je sledování migrací. Zvýšení efektivity ochrany je tak dalším, i když obtížně ekonomicky kvantifikovatelným, přínosem.

9.4. Omezení stresové zátěže

V neposlední řadě lze zdůraznit naprostou minimalizaci stresové zátěže jedinců v průběhu značení. Jedinci se v průběhu značení i po něm chovají standardně a není patrné žádné zvýšení mortality.

10. Popis uplatnění technologie

Uplatnění daného značení je u všech subjektů s potřebou značení sekavců a morfologicky podobných ryb (zejména sekavčů, případně mřenka, piskoř) bez potřeby jejich individuálního rozlišení. Jedná se například o značení ryb při monitoringu a migračních studiích, při studiích prostorové distribuce a úspěšnosti vysazování. Dále pro rozlišení testovaných skupin ryb chovaných ve společné nádrži apod. Obecně lze využít očekávat v oblasti ochrany, výzkumu, péče o zdraví a výuky.

Smlouva o uplatnění ověřené technologie byla uzavřena s Agenturou ochrany přírody a krajiny České republiky.

11. Seznam literatury

Halačka K., Poštulková E., Kopp R., Mareš J., 2017: Alternativní značení vysazovaných ryb pro umožnění jejich následného sledování.

Halačka K., Mareš J., 2019: Detektor barvení nativního biologického materiálu Alizarinovou červení S Užitečný vzor 32 727.

Poštulková E., Mareš J., Halačka K., Kopp R., 2016: Toxic effect of fluorescence pigment on zebra fish (*Danio rerio*). Proceedings Of International Phd Students Conference (Mendel Net) Brno: 347–351.

Puchtler H., 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.

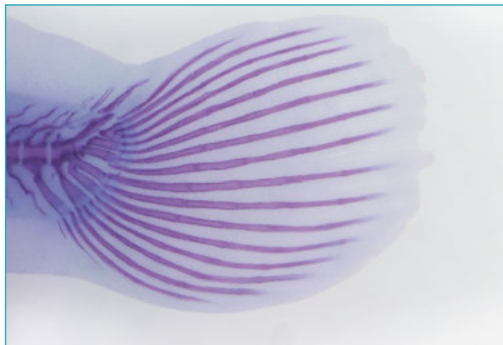
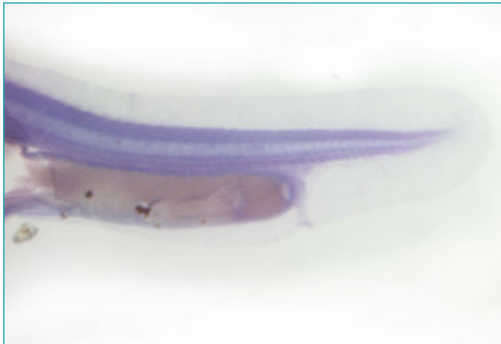
Bezpečnostní list, Alizarin Red S, 2012. (Online) Available et: https://www.applichem.com/fileadmin/datenblaetter/A2290_cs_CZ.pdf. (2016-07-10).

Helland S., 1988: Diagnostic – staining protocol of cartilage and bone, Wilson Bull, Technique for avian syringes June, 100(2); 289–293.

Technologie značení sekavců pomocí alizarinu
technologie 06/2019

Ing. Karel Halačka, CSc.

Vydavatel: Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i., Květná 170/8, 603 65 Brno
Grafická úprava a zalomení: Ján Otradovec
Tisk: Computer MCL Brno spol. s. r. o.
Vydání: první, 2019
Počet stran: 14
ISBN 978-80-87189-29-0



Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i.
Květná 8, Brno 603 65
Tel.: +420 543 422 540
E-mail: ubo@ivb.cz

www.ivb.cz