

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce

Tolerance tilápie nilské vůči dusitanům

Autor: Bc. Pavel Brož

Vedoucí diplomové práce: Ing. Jana Máchová, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Ing. Hana Kroupová, Ph.D.

Studijní program a obor: N4103 Zootechnika, Rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice, 2013

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Dne 28. 4. 2013

Podpis: 

Poděkování

Děkuji své vedoucí diplomové práce paní Ing. Janě Máchové, Ph.D. za příkladné vedení, odbornou pomoc, poskytnuté rady a cenné připomínky, jakož i za veškeré vynaložené úsilí a strávený čas, který mi věnovala při vypracovávání této diplomové práce.

Děkuji paní MVDr. Elišce Zuskové, Ph.D. za odbornou pomoc, poskytnuté rady a cenné připomínky, které mi byly poskytnuty v rámci řešení jejího projektu, jehož jsem se zúčastnil. Děkuji za laskavé poskytnutí materiálů potřebných pro vypracování této diplomové práce.

Děkuji své konzultantce diplomové práce paní Ing. Haně Kroupové, Ph.D. za pomoc při zpracování vzorků a za poskytnutí podkladů pro vypracování této diplomové práce.

Děkuji panu dr hab. Ing. Josefu Velíškovi, Ph.D. za spolupráci na tomto projektu.

Děkuji celému kolektivu laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie VÚRH ve Vodňanech, který se podílel na řešení tohoto projektu.

Tato práce vznikla jako součást řešení projektu GACR P503/10/P492.

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Pavel BROŽ**
Osobní číslo: **V10N001P**
Studijní program: **N4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Tolerance tilápie nilské vůči dusitanům**
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cíl práce: posoudit vliv zvýšené koncentrace dusitanů na tilápii nilskou při rozdílných koncentracích chloridů ve vodě.

Metodický postup: Vliv zvýšené koncentrace dusitanů na tilápii nilskou bude posuzován na základě změn prokázaných vyšetřeními vzorků krve pokusných ryb, které budou vystaveny dusitanům. Ryby budou dlouhodobě vystaveny zvýšeným koncentracím dusitanů a po provedené expozici jim budou odebrány vzorky krve pro následná vyšetření. Na základě provedených vyšetření budou vyhodnoceny účinky dusitanů na tento druh ryby.

Toxikologické testy budou prováděny podle ČSN ISO 10229, hematologická vyšetření podle Svobodové et al. (1991) a analýzy dusitanů v krvi podle metodiky popsané v práci Shechter et al. (1972).

Rozsah grafických prací: 10 tabulek a 10 grafů

Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

ČSN ISO 10229 Jakost vod, 1996. Stanovení subchronické toxicity látek pro sladkovodní ryby - Metoda vyhodnocení účinků látek na růstovou rychlost pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum /Teleostei, Salmonidae// ČNI Praha 20 s.

Kroupová, H., Máchová, J., Svobodová, Z., 2005. Nitrite influence on fish - a review. Vet. Med. - Czech, 50. 461 - 471.

Shechter, H., Gruener, N., Shubal, H.I., 1972: Micromethod for the determination of nitrite in blood. Anal. Chim. Acta, 60.

Svobodová, Z. et al., 1987. Toxikologie vodních živočichů. SZN, Praha, 231 s.

Svobodová, Z., Pravda, D., Paláčková, J., 1991. Unified methods of haematological examination of fish. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Vodňany, Methods No. 20, 31 pp.

Svobodová, Z., Máchová, J., Drastichová, J., Groch, L., Lusková, V., Poleszczuk, G., Velíšek, J., Kroupová, H., 2005. Haematological and biochemical profile of carp blood following nitrite exposure at different concentration of chloride.

Aquaculture Research, 36 (12): 1177-1184.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Jana Máchová, Ph.D.

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant diplomové práce: Ing. Hana Kroupová, Ph.D.

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání diplomové práce: 30. listopadu 2010

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2012


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zátiší 728/II
389 25 Vodňany (2)


doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 14. ledna 2011

Obsah

1. ÚVOD.....	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1. DUSÍKATÉ SLOUČENINY VE VODÁCH	10
2.1.1. <i>Výskyt</i>	10
2.1.2. <i>Biochemické a chemické procesy</i>	10
2.1.2.1. Nitrifikace	11
2.1.2.2. Denitrifikace	12
2.2. DUSITANY.....	13
2.2.1. <i>Výskyt ve vodách</i>	13
2.2.2. <i>Mechanismus toxického působení dusitanů</i>	14
2.2.2.1. Příjem a působení u sladkovodních ryb	14
2.2.2.2. Koncentrace methemoglobinu v krvi	15
2.2.2.3 Vliv na další fyziologické funkce ryb	16
2.2.3. <i>Detoxikační mechanismus</i>	17
2.2.4. <i>Faktory ovlivňující toxicitu dusitanů</i>	18
2.2.4.1. Délka expozice.....	18
2.2.4.2. Kvalita vody.....	19
2.2.4.3. Charakter ryb	22
2.3. TILÁPIE NILSKÁ.....	23
2.3.1. <i>Systematické zařazení</i>	23
2.3.2. <i>Biologická charakteristika</i>	24
3. MATERIÁL A METODIKA	27
3.1. MATERIÁL	27
3.2. METODY	28
3.2.1. <i>Test subchronické toxicity</i>	28
3.2.2. <i>Odběry krve, hematologická a biochemická vyšetření</i>	30
3.4. STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ.....	35
4. VÝSLEDKY	36
4.1. HEMATOLOGICKÁ VYŠETŘENÍ.....	36

4.2. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	44
5. DISKUZE.....	50
5.1. HEMATOLOGICKÁ VYŠETŘENÍ.....	52
5.2. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	56
6. ZÁVĚR	59
7. SEZNAM LITERATURY	60
8. SEZNAM TABULEK, GRAFŮ A PŘÍLOH	71
9. PŘÍLOHY	72

1. ÚVOD

Dusitany se vyskytují přirozeně ve sladkých i slaných vodách. Tvoří součást koloběhu dusíku v prostředí a uplatňují se v procesu nitrifikace, kde jsou meziproduktem při oxidaci amoniaku na dusičnany. Dusitany jsou značně nestálé, v prokysličených vodách, které nejsou zatíženy antropogenní činností, zpravidla dusitany nepředstavují závažné problémy, neboť jejich koncentrace jsou nízké (obvykle na úrovni setin až desetin $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) (Lewis a Morris, 1986; Jensen, 2003; Pitter, 2009). Ve zvýšených koncentracích však dusitany představují pro ryby velké zdravotní riziko, neboť jsou přijímány přes žábry prostřednictvím chloridových buněk, což vede ke zvýšení jejich koncentrace v těle a především v tělních tekutinách. V červených krvinkách dusitany oxidují hemoglobin na methemoglobin, který potom není schopen vázat a přenášet kyslík. Se zvyšujícím se podílem methemoglobinu se snižuje kapacita krve pro transport kyslíku. Mimo to působí dusitany i na jiné fyziologické funkce. U ryb je prokázán např. vliv na metabolismus draslíku (Jensen, 2003).

S vysokým obsahem dusitanů se potýkají především chovy ryb v recirkulačních systémech s vysokým stupněm intenzifikace. V těchto zařízeních může dojít k poškození až úhynu ryb, zejména pokud nefungují dostatečně biologické filtry, které odstraňují z vody především organické látky a amoniak. Amoniak (tj. hlavní produkt metabolismu dusíkatých látek u ryb) je odstraňován při nitrifikaci, což je biochemický proces, při kterém je amoniak oxidován na až na relativně netoxické dusičnany. V první fázi nitrifikace je amoniak oxidován na dusitany a ve druhé fázi jsou dusitany oxidovány na dusičnany. Pokud neprobíhá druhá fáze nitrifikace v dostatečné intenzitě, obsah dusitanů se ve vodě zvyšuje. Děje se tak zejména při zahájení provozu rybochovných objektů, kdy nejsou ještě plně zapracovány biofiltry (Svobodová a kol., 2005b). V té době se ve vodě mohou objevit dusitany v poměrně vysokých koncentracích, které mohou dosahovat řádově desítek $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Vysoké koncentrace dusitanů v intenzivních chovech ryb představují rizika, která ovlivňují nejen efektivitu chovu, ale v některých případech vedou i ke značným ztrátám chovaných ryb. Proto je studiu účinků dusitanů na ryby a možnostem minimalizace rizik věnována značná pozornost.

Cíl

Ve své diplomové práci jsem se zaměřil především na hledání optimálního postupu pro regeneraci ryb, které byly vystaveny zvýšené koncentraci dusitanů s cílem navrhnout pro praxi postup, který by minimalizoval následky otrav ryb dusitany. Jako modelový druh ryby jsem zvolil tilápii nilskou (*Oreochromis niloticus*), což je jeden z druhů teplomilných ryb chovaných v našich podmínkách v recirkulačních systémech.

Práce byla zpracována jako součást řešení projektu GACR P503/10/P492.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2. 1. Dusíkaté sloučeniny ve vodách

2.1.1. Výskyt

Dusík patří do skupiny makrobiogenních prvků, tzv. nutrientů. Uplatňuje se při všech biologických procesech, které probíhají v podzemních, povrchových i odpadních vodách a také při biologickém čištění odpadních vod. Sloučeniny dusíku, které se vyskytují ve vodách, mohou být anorganického nebo organického původu. V biosféře neovlivněné činností člověka převažují dusíkaté látky biogenního původu, které vznikají rozkladem organických dusíkatých látek rostlinného a živočišného původu. (Pitter, 2009).

Dusík se vyskytuje ve vodách v různých oxidačních stupních, v iontové i neiontové formě. V úvahu přicházejí tyto oxidační stupně dusíku (Pitter, 2009):

Dělení je řazeno podle oxidačního stupně, ve kterém se prvek nachází.

-III....	amoniakální dusík (NH_4^+ , NH_3), kyanatany (OCN^-), (CN^-)	kyanidy
-I.....	hydroxylamin (NH_2OH),	
0.....	elementární dusík (N_2)	
+I.....	oxid dusný (N_2O)	
+III....	dusitanový dusík (N-NO_2^-)	
+V.....	dusičnanový dusík (N-NO_3^-)	

2.1.2. Biochemické a chemické procesy

Sloučeniny dusíku jsou obecně ve vodách málo stabilní. V závislosti na redoxním potenciálu a hodnotě pH podléhají chemickým a hlavně biochemickým přeměnám. Kromě toho mohou probíhat i přeměny chemické. K nejdůležitějším biochemickým přeměnám anorganických forem dusíku patří procesy nitrifikace a denitrifikace (Vymazal a Kröpfelová, 2008; Pitter, 2009).

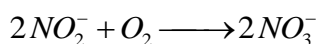
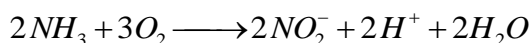
2.1.2.1. Nitrifikace

Nitrifikace je proces, při kterém dochází k biochemické oxidaci amoniakálního dusíku na dusitany až dusičnany (Reddy a Patrick, 1984). Tento proces je způsoben především chemolitotrofními (autotrofními) a výjimečně i organotrofními organismy. Chemolitotrofní nitrifikační bakterie využívají CO₂ jako zdroj uhlíku pro tvorbu biomasy a zdrojem energie je oxidace amoniakálního dusíku. Množství získané energie je však malé a pro nitrifikační bakterie je proto charakteristická malá specifická tvorba nové biomasy. Navíc jejich generační doba (zdvojnásobení počtu) bývá asi desetinásobná ve srovnání s organotrofními bakteriemi.

V procesu nitrifikace se uplatňují především bakterie rodu *Nitrosomonas* a *Nitrobacter*. Rod *Nitrosomonas* se podílí na prvním stupni oxidace, při kterém je amoniakální dusík biochemicky oxidován na dusitany. Bakterie rodu *Nitrosomonas* mají menší růstovou rychlost, než bakterie rodu *Nitrobacter*, které se podílejí na oxidaci dusitanů na dusičnany. Proto se dusitany obvykle ve vodě nehromadí a jejich koncentrace bývá nízká (Pitter, 2009).

Na průběhu nitrifikace se podílí řada faktorů. Její rychlost je ovlivněna zejména teplotou, hodnotou pH, alkalitou vody, velikostí mikrobiálního společenstva, anorganickým zdrojem C, koncentrací amonného dusíku a rozpuštěného kyslíku (Mitsch a Gosselink, 2007; Vymazal a Kröpfelová, 2008). Růstová rychlost nitrifikačních bakterií značně závisí na teplotě. Při teplotách pod 5 °C je rychlost nitrifikace velmi malá. Nejrychleji nitrifikace probíhá při teplotách v rozmezí asi od 20 °C do 30 °C. Optimální hodnota pH je asi v oblasti 7 až 8,5. Při hodnotách pH přibližně pod 6,5 a nad 9 dochází již k inhibici nitrifikace (Sundberg, 2007; Faulwetter, 2009; Pitter, 2009). Dalším velmi významným faktorem v procesu nitrifikace je nasycení vody kyslíkem. Při obsahu kyslíku pod 1 mg l⁻¹ může docházet k hromadění dusitanů ve vodě (Ruiz a kol., 2003).

Nitrifikace probíhá ve dvou stupních, které lze vyjádřit těmito rovnicemi (Pitter, 2009):

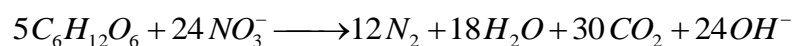


Je nutné zdůraznit, že v průběhu tohoto procesu se uvolňují vodíkové ionty a v důsledku toho dochází k poklesu hodnot pH. Volné H^+ reagují především s HCO_3^- za vzniku H_2CO_3 a následně se snižuje hodnota $KNK_{4,5}$. Při hodnotách pH pod 6 dochází k inhibici nitrifikace. (Pitter, 2009).

2.1.2.2. Denitrifikace

Denitrifikace je proces, při kterém dochází k redukcí dusičnanů a dusitanů na elementární dusík nebo oxidy dusíku v anoxických podmínkách. Denitrifikace je způsobena různými organotrofními striktně i fakultativně anaerobními mikroorganismy, nejčastěji rodu *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Achromobacter*. Na rozdíl od nitrifikace je pro denitrifikaci nutný organický substrát jako zdroj energie. Jako organický substrát slouží obvykle organické látky obsažené v odpadní vodě nebo kalu. Tyto organické látky jsou při denitrifikaci oxidovány. Pokud ve vodě není dostatečné množství organických látek, je nutné do vody přidávat exogenní, snadno biologicky rozložitelný organický substrát (např. metanol nebo kyselinu octovou) (Pitter, 2009). Denitrifikační bakterie mohou přežívat v širším rozsahu pH až do hodnoty 3,5, ale většina běžných vodních denitrifikačních bakterií má optimum pro růst v rozsahu pH 5 – 9. Rychlost denitrifikace se zvyšuje s rostoucí teplotou na 60-75°C a také přidáním organického uhlíku (Toet a kol., 2003; Burchell a kol., 2007; Vymazal a Kröpfelová, 2008).

Denitrifikaci lze schematicky popsat těmito rovnicemi (Pitter, 2009):



Na tuto reakci může navazovat proces, při kterém se molekulární dusík přemění na organický dusík. Taková reakce se nazývá fixace dusíku a děje se za přítomnosti enzymu nitrogenázy (Mitsch a Gosselink, 2007; Vymazal a Kröpfelová, 2008). Probíhat však může jen v silně kyslíkatém prostředí, které vytváří jen některé fotosyntetizující mikroorganismy jako sinice (*Anabena*, *Microcystis*, *Aphanizomenon*) uvnitř svých buněk (Snoeyink a Jenkins, 1980).

Kromě těchto zmíněných přeměn mohou probíhat i chemické reakce v závislosti na oxidačně-redukčním potenciálu a na hodnotě pH. Vysoký oxidačně-redukční potenciál

určuje jako stabilní formu dusíku dusičnany, které ale v anoxických podmínkách mohou podléhat redukci na elementární dusík (Pitter, 2009).

2.2. Dusitany

Jak již bylo uvedeno výše, dusitany jsou nedílnou součástí koloběhu dusíku v přírodě. Pro vodní živočichy jsou však dusitany vysoce toxické (Lewis a Morris, 1986; Jensen, 2003). Dusitany se přirozeně nacházejí v malém množství v živočišných tkáních. Důvodem jejich tkáňové přítomnosti je vnitřní produkce metabolitu fyziologického přenašeče molekuly oxidu dusného, který produkuje endotel, nervové buňky a aktivované mikrořágy. Pro vodní živočichy představují velké nebezpečí v tom, že je aktivně přijímají přes žábry z vodního prostředí. Zvýšená koncentrace dusitanů v těle živočichů pak vede ke zhoršení jejich zdravotního stavu a následně až k úhynu (Jensen, 1995, Jensen, 2003). Toxický vliv dusitanů u suchozemských živočichů je spojen s jejich příjmem v potravě. Dalším významným zdrojem dusitanů jsou dusičnany, které jsou přijímány v pitné vodě a v trávicím traktu jsou redukovány na dusitany. (Kiese, 1974).

2.2.1. Výskyt ve vodách

Dusitany obvykle doprovázejí ve vodách dusičnany a formy amoniakálního dusíku. Pro svoji chemickou a biochemickou nestálost se obvykle vyskytují ve velmi malých a zanedbatelných koncentracích. V přírodních vodách dusitany mezi anorganickými formami dusíku většinou nedominují z toho důvodu, že v kyslíkatém prostředí jsou rychle transformovány nitrifikací na dusičnany. Na druhé straně přichází v úvahu v bezkyslíkatém prostředí biologická denitrifikace na elementární dusík, resp. N_2O . Proto lze dusitany často prokázat v nízkých koncentracích jako meziproduct chemických a biochemických transformací sloučenin dusíku (Pitter, 2009).

Se zvýšeným zatížením dusitany se kromě splaškových, odpadních a průmyslových vod lze setkat i v intenzivním chovu ryb (Pitter, 2009). V takových vodách se může koncentrace dusitanů pohybovat řádově v desetínách, ale i jednotkách $mg \cdot l^{-1}$ $N-NO_2$ (Avnimelech a kol., 1986; Kamstra a kol., 1996; Svobodová a kol., 2005b). Proces nitrifikace se zde využívá pro snížení koncentrace amoniaku, který je hlavním produktem dusíkatého metabolismu ryb (Wood, 1993). Nitrifikací zde dochází

k biochemické oxidaci amoniakálního dusíku na dusitany a následně až na dusičnany, které jsou pro ryby téměř netoxické. Pokud však druhá fáze nitrifikace v rychlosti zaostává, dochází v systému k hromadění dusitanů, které bývá příčinou zhoršení zdravotního stavu ryb (Dvořák, 2004; Svobodová a kol., 2005b).

Zvýšené koncentrace dusitanů bývají často problémem v recirkulačních systémech, zejména krátce po zahájení provozu před zapracováním biologických filtrů nebo v důsledku nerovnováhy v procesu nitrifikace (Kamstra a kol., 1996; Avnimelech a kol., 1986).

2.2.2. Mechanismus toxického působení dusitanů

2.2.2.1. Příjem a působení u sladkovodních ryb

Sladkovodní ryby a korýši jako hyperosmotičtí živočichové potřebují aktivně přijímat ionty žábrami, aby vyrovnali jejich ztrátu močí a pasivním odtokem ze žaber. Aktivní příjem iontů se děje prostřednictvím tzv. chloridových buněk na zábrách (Maetz, 1971). Ve sladké vodě tyto buňky vylučují do vody amoniak nebo vodíkové ionty výměnou za stejný počet sodíkových iontů. Přes chloridové buňky také vylučují hydrogenuhličitanové ionty výměnou za stejné množství chloridových iontů (Love, 1980).

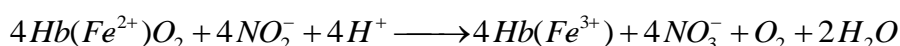
Primární problém s dusitany ve sladké vodě je způsoben tím, že ion NO_2^- má určitou afinitu k iontové výměně $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, takže pokud se dusitany vyskytují v okolní vodě, část příjmu Cl^- je nahrazena NO_2^- (ryba přijímá dusitany na úkor chloridů). Zvýšené koncentrace Cl^- v okolní vodě proto ochrání ryby před příjmem dusitanů a jejich toxickými účinky (Jensen, 2003). Ryby s vysokou rychlostí příjmu chloridů žábrami (pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), štika obecná (*Esox lucius*), okoun říční (*Perca fluviatilis*)) jsou více citlivé k dusitanům než ryby s nízkou rychlostí příjmu (úhoř říční (*Anguilla anguilla*), kapr obecný (*Cyprinus carpio*), lín obecný (*Tinca tinca*)) (Williams a Eddy, 1986).

Koncentrace dusitanů v krevní plazmě může dosáhnout i více než šedesátinásobku ve srovnání s koncentrací, která je v okolní vodě (Fontenot a kol., 1999). Dusitany se také hromadí v některých tkáních, a to v zábrách, játrech, mozku a svalech (Margiocco a kol., 1983). V těchto orgánech však nebývá koncentrace dusitanů tak vysoká jako v

krvi, ale hodnoty naměřené v játrech a mozku zasažených a uhynulých ryb mohou být až 30krát vyšší, než hodnoty naměřené v okolní vodě (Margiocco a kol., 1983).

Z krevní plazmy dusitany dále pronikají do červených krvinek, kde se váží na krevní barvivo hemoglobin, tím vzniká methemoglobinu. Methemoglobin postrádá schopnost přenášet kyslík, a tím se snižuje množství kyslíku přenášeného krví (Cameron, 1971).

Rovnici vzniku methemoglobinu lze popsat takto (Kosaka a Tyuma, 1987):



Methemoglobin obsažený v krvi je patrný na první pohled, neboť se projevuje hnědým zbarvením a zřetelně hnědé zbarvení vykazují i žábry. Hnědé žábry byly patrné u tilápie nilské (*Oreochromis niloticus*), která byla vystavena zvýšeným koncentracím dusitanů (Svobodová a kol., 2005b). Obdobně s dusitany reagují i jiné krevní bílkoviny (Doblender a Lackner, 1997). Mírnější následky methemoglobinemie vykazují ryby, které nejsou nuceny k aktivitě, a proto mají nižší aktuální potřebu kyslíku (Crawford a Allen, 1977). Naopak ryby, které jsou nuceny k aktivitě, mohou uhynout v důsledku nedostatku kyslíku (Huey a kol., 1980). Letální koncentrace dusitanů se liší v závislosti na druhu ryb a jsou také silně ovlivněny podmínkami prostředí (Margiocco a kol., 1983).

2.2.2.2. Koncentrace methemoglobinu v krvi

Podíl methemoglobinu v krvi ryb, který se obecně považuje za ohrožující, se uvádí v úrovni 50 % a vyšší (Bowser a kol., 1983; Piskač a kol., 1985; Vopršalová a Žáčková, 2000). Koncentrace methemoglobinu v nižší úrovni (okolo 20 %) nevyvolaly u tilápie nilské klinické příznaky otravy, ryby měly pouze hnědé zbarvení žaber (Svobodová a kol., 2005b). Zvýšené hodnoty methemoglobinu okolo 70-80 % běžně způsobují omezení pohyblivosti a ztrátu reakce na podráždění, zatímco vyšší hodnoty jsou letální v důsledku anoxie (Lewis a Morris, 1986). V některých případech, kdy jsou ryby neaktivní, a podíl methemoglobinu je vysoký, nemusí být tento stav ještě okamžitě fatální (nezvratný) (Tomasso a kol., 1979).

V rybí krvi lze naměřit malé množství methemoglobinu i v nepřítomnosti dusitanů ve vodě. Methemoglobin vzniká totiž samovolně autooxidací hemoglobinu molekulárním

kyslíkem. Výrazně vyšší je autooxidace při kyseljším pH 5,7 než při neutrálním pH 7 (Kiese, 1974).

Stresové zatížení může být důvodem ke zvýšení hladiny methemoglobinu v těle ryb. Například stav energetického metabolismu červených krvinek může být ovlivněn celkovou výživou, hypoxií a námahou, v jejichž důsledku dochází k posunu normální rovnováhy mezi hemoglobinem a methemoglobinem. U pstruha duhového se uvádějí koncentrace methemoglobinu na úrovni 0,9 až 3,6 % jako fyziologické (Cameron, 1971; Brown a McLeay, 1975), u lososa (*Orconrhyncus gorboscha*) před třením mohou tyto koncentrace dosáhnout hodnoty až 10,9 % (Cameron, 1971). Obecně, přítomnost methemoglobinu v koncentraci i okolo deseti procent není u ryb považována za neobvyklou nebo dokonce letální. V tomto ohledu se ryby liší od savců, u kterých obvykle koncentrace methemoglobinu v krvi jen vyjíměčně dosáhne 1 % (Beutler, 1968).

2.2.2.3 Vliv na další fyziologické funkce ryb

Nejčastěji ryby hynou ve spojení s dusitany na následky vysoké hladiny methemoglobinu v krvi, přesto však může dojít i k úhynu při nízkém množství methemoglobinu v krvi (Margioco a kol., 1983). To znamená, že toxické účinky dusitanů jsou pravděpodobně kombinací několika různých faktorů. V důsledku nedostatečného zásobení kyslíkem, vyvolaného methemoglobinemií, se lze setkat se závažným poškozením orgánů, např. jater (Arillo a kol., 1984) nebo zraku (Hofer a Gatumu, 1994). Při hypoxii tkání se v průběhu získávání energie pomocí anaerobního metabolismu zvyšuje koncentrace laktátu v krevní plazmě (Jensen a kol., 1987; Stormer a kol., 1996). Dusitany také poškozují kardiovaskulární systém (Aggergaard a Jensen, 2001). V průběhu působení dusitanů na ryby se mění metabolismus dusíku ve smyslu zvýšeného vylučování amoniaku přes žábry (Zachariasen, 2001).

Negativní vliv dusitanů na vyplavování draslíku z kosterního svalstva se ukazuje na zvýšené koncentraci draselných iontů v krevní plazmě (Jensen a kol., 1987). Vyplavováním draselných iontů z červených krvinek dochází k jejich zmenšení a k omezení jejich funkce jako kyslíkového přenašeče a dále dochází k poškození hemoglobinu (Jensen, 1990). Tyto poruchy se projevují snížením hematokritové

hodnoty, snížením počtu červených krvinek a koncentrace hemoglobinu (Jensen, 1990; Avilez a kol., 2004).

Dusitany jsou schopné biochemických reakcí se skupinami amino (NH_2) a thio (SH), díky čemuž mohou inhibovat některé z enzymů a tvořit mutagenní a karcinogenní sloučeniny (např. N-alkylnitrosamin) (Arillo a kol., 1984).

2.2.3. Detoxikační mechanismus

Červené krvinky ryb obsahují enzym reduktázu, díky které jsou schopny redukovat methemoglobin na hemoglobin (Cameron, 1971; Huey a Beitinger, 1982). V průběhu 24 až 72 hodin po přemístění ryb do čisté vody je tento enzym schopen vrátit množství methemoglobinu v krvi na obvyklou mez (Huey a kol., 1980), ale pouze za předpokladu že není otrava v příliš pokročilém stádiu. Za přítomnosti dusitanů je konečná koncentrace methemoglobinu v krvi dána rovnováhou mezi vzniklým methemoglobinem a hemoglobinem, který vznikl přeměnou pomocí reduktázy. Účinnost reduktázy pravděpodobně ovlivňuje výše teploty (Perrone a Meade, 1977).

Dusitany obsažené v krvi a tkáních se postupně oxidují na prakticky netoxické dusičnany, které jsou pak vylučovány močí a žlučí. Přeměnu dusitanů na dusičnany zajišťuje u ryb hemoglobin a další hemové bílkoviny, kataláza a cytochromoxidáza. Červenými krvinkami lze přeměnit asi 20 % z přijatého množství dusitanů výše uvedenou reakcí, která popisuje přeměnu hemoglobinu na methemoglobin. Tuto reakci lze považovat za popis toxického působení dusitanů (přeměna hemoglobinu na methemoglobin), ale naopak také za popis detoxikačního mechanismu (přeměna dusitanů na dusičnany) (Doblender a Lackner, 1997).

Intenzita biologické přeměny může být ovlivněna přítomností antioxidantů. Některé nízkomolekulární sloučeniny (např. methylenová modř, kyselina askorbová, kyselina močová) snižují toxicitu dusitanů. (Doblender a Lackner, 1996). Rychlost detoxikačního mechanismu probíhající v červených krvinkách podstatně závisí na nasycení hemoglobinu kyslíkem. Neokysličené erytrocyty totiž neprodukují žádné dusičnany v porovnání s okysličenými (Doblender a Lackner, 1997). Významně se na detoxikaci dusitanů oxidací na dusičnany podílí játra (Doblender a Lackner, 1996).

2.2.4. Faktory ovlivňující toxicitu dusitanů

Na toxicitu dusitanů má vliv celá řada faktorů. Jejich význam je však značně odlišný. Nejdůležitější faktory lze rozdělit do tří skupin podle svého charakteru.

délka expozice

kvalita vody

charakter ryb

2.2.4.1. Délka expozice

Délka expozice je časové období, po které je sledovaný organismus vystaven působení sledované toxické látky.

a) Krátkodobá expozice

Maximální koncentrace dusitanů v rybách lze s určitostí dosáhnout již po 24 až 48 hodinové expozici (Huey a kol., 1980; Eddy a kol., 1983). Hodnota LC50 zjištěná za 24 až 96 hodin se příliš nemění (Lewis a Morris 1986). Proto lze konstatovat, že relevantní doba pro krátkodobé testy toxických látek je stejná jako u jiných toxických látek 24 až 96 hodin (Kroupová a kol., 2005b).

b) Dlouhodobá expozice

Dlouhodobá expozice ryb dusitanům (delší než 96 hodin) je charakteristická úhynem ryb, snížením rychlosti růstu, poškozením tkání a změnou biochemických a hematologických ukazatelů (Kroupová a kol., 2005b).

Některé studie ukazují, že pro osmidenní test postačuje na stanovení LC50 60% koncentrace dusitanů, než jaká je třeba pro 96hLC50 (Russo a kol., 1974; Westin, 1974). Maximální koncentrace dusitanů, při které se neprojevil žádný úhyn, je podobná při 96hodinové jako při osmidenní expozici a pohybuje se v rozmezí od 30 do 50 % 96hLC50 (Russo a kol., 1974).

Dlouhodobým testem na sumcích bylo dosaženo určité adaptace ryb na nízké koncentrace dusitanů. Měřením obsahu methemoglobinu v krvi bylo zjištěno, že ryby vystavené před vlastním testem nízkým koncentracím dusitanů ($>0,01 \text{ mg} \times \text{l}^{-1} \text{ N-NO}_2^-$,

$\text{NO}_2^-/\text{Cl}^- > 0.003$) vykazují zvýšenou tvorbu methemoglobinu v krvi ve srovnání s rybami, které byly vystaveny bezprostředně relativně vysoké koncentraci dusitanů (vysoký poměr $\text{NO}_2^-/\text{Cl}^-$) (Tucker a Schwedler, 1983). S těmito výsledky se ztotožňují i jiní autoři (Doblender a Lackner, 1997; Máchová a kol., 2004b). Tato schopnost se projevila pravděpodobně díky zvýšené činnosti methemoglobin-reduktázy (Kroupová a kol., 2005b). Během 6měsíčního testu na pstruhu duhovém nebyl statisticky prokázán pokles růstu vlivem dusitanů v koncentraci na úrovni 10 % hodnoty 96hLC50 (Wedemeyer a Yasutake, 1978). Při stanovení minimální koncentrace, která vyvolá prokazatelné snížení růstu, byla zjištěná koncentrace dusitanů v úrovni 44 % minimální koncentrace vyvolávající mortalitu ryb (Colt a kol., 1981). Vyšetřením tkáně pstruha duhového po 28denní expozici dusitanům v subletální koncentraci nebylo zjištěno poškození na ledvinách ani brzlíku, drobné změny byly zjištěny pouze na žábřácích. Jednalo se však o reverzibilní změny a po 4 týdnech byla prokázána regenerace žaber (Wedemeyer a Yasutake, 1978). U sumců však žádné změny na žábřácích patrné nebyly ani při letální koncentraci dusitanů (Colt a kol., 1981). Pro koncentrace dusitanů v hodnotách dosahujících 10 % 96hLC50 nebyly zatím podány důkazy o jejich škodlivosti (Kroupová a kol., 2005b).

2.2.4.2. Kvalita vody

a) Chloridy

Silná závislost toxicity dusitanů pro vodní organizmy na salinitě vody byla prokázána už v roce 1977 (Crawford a Allen, 1977). Slaná mořská voda příznivě ovlivnila odolnost ryb vůči dusitanům a bylo zjištěno, že expozice ryb dusitanům ve slané vodě snížila 50 až 100krát jejich mortalitu ve srovnání s mortalitou ryb, které byly vystaveny stejné koncentraci dusitanů ve sladké vodě. Vliv chloridů na toxicitu dusitanů pro ryby je tak významný, že nelze vzájemně srovnávat výsledky testů toxicity, pokud nejsou doloženy koncentrace chloridů ve vodě (Svobodová a kol., 1987). V chovech ryb je proto důležité sledovat hmotnostní poměr chloridů a dusitanového dusíku ($\text{Cl}^-/\text{N-NO}_2^-$). Pro chovy lososovitých ryb by tento poměr neměl klesnout pod 17 a pro chovy ostatních ryb pod 8 (EIFAC, 1984). Ani tyto hodnoty však zdaleka nezajišťují zdraví ryb. Úhyny byly zaznamenány u sumců (*Silurus glanis*) při poměru $\text{Cl}^-/\text{N-NO}_2^-$ v rozmezí 13 až 28, u línů při poměru v rozmezí 11 až 19. Při poškození zdraví bez úhynu tilápií nilských byl zjištěn tento poměr v rozmezí 50 až 150 (Svobodová a kol.,

2005b). Četné pokusy na rybách a dalších vodních organismech potvrzují, že závislost toxicity dusitanů na obsahu chloridů ve vodě je lineární (Russo a Thurston, 1977; Palachek a Tomasso, 1984; McConnell, 1985; Máchová a Svobodová, 2001; Kozák a kol., 2005). Pozitivní vliv chloridů na snižování toxicity dusitanů pro ryby, se prokázal i v případě akvarijní ryby živorodky duhové (*Poecilia reticulata*) (Máchová a kol., 2004a). Hodnoty letálních koncentrací 96hLC50 dusitanu sodného se pro živorodky duhové pohybovaly v rozmezí 39 až 436 mg·l⁻¹ v závislosti na koncentraci chloridů (10 až 190 mg·l⁻¹) (Kroupová a kol., 2004). V případě méně citlivých druhů ryb se přidavkem chloridů výrazně zvyšuje jejich odolnost vůči dusitanům ve srovnání s citlivějšími druhy ryb (Lewis a Morris, 1986).

b) Ostatní anionty

Jsou známy i jiné anionty kromě chloridů, které mají podobný vliv na snížení toxicity dusitanů. Velmi účinné jsou bromidy, které jsou chloridům chemicky podobné. Bylo zjištěno, že koncentrace bromidů ve výši 80 mg·l⁻¹ dokáže zcela eliminovat účinky dusitanů o koncentraci 105 mg·l⁻¹ (Eddy a kol., 1983). Určitý vliv byl vysledován také u hydrogenuhličitanů a dusičnanů, ve srovnání s chloridy a bromidy je však vliv těchto aniontů velmi malý (Lewis a Morris, 1986). Anionty ve vyšším oxidačním stupni (síran, fosforečnan, boritan) jsou pro posuzování vlivu na toxicitu dusitanů zanedbatelné (Russo a kol., 1981).

c) Kationty

Ve sladkých vodách se běžně vyskytují vápník, hořčík, sodík a draslík, a proto jsou znalosti o jejich vlivu na toxicitu dusitanu velmi významné. Liší se však mechanismem jejich působení oproti chloridům (Kroupová a kol., 2005b). Přidáním síranu vápenatého se sice docílilo snížení toxicity u lososa (*Oncorhynchus tshawytscha*), ale nesnížilo se množství methemoglobinu v krvi (Crawford a Allen, 1977). Některé studie vypovídají o vyšší účinnosti chloridu vápenatého ve srovnání s chloridem sodným, což bylo prokázáno např. při pokusech na jeseteru (*Acipenser brevirostrum*) (Fontenot a Isely, 1999). Tento rozdíl však nebyl zaznamenán u sumečka skvrnitého (*Ictalurus punctatus*) (Bowser a kol., 1983). Vysoké koncentrace vápníku snižují ztrátu chloridů žábami, proto mají ryby v takovém případě nižší požadavky na příjem chloridů a tím přijímají i méně dusitanů (Krous a kol., 1982).

d) Amoniak

V rybochovných objektech s recirkulací vody vznikají problémy spojené s hromaděním amoniaku a dusitanů. Při pokusu na sumcích nebyla měřením koncentrace kortikosteroidů v krevní plazmě potvrzena domněnka aditivního spolupůsobení amoniaku a dusitanů. Pro aplikaci amoniaku byl ale použit chlorid amonný, který pravděpodobně ovlivnil výslednou toxicitu svým obsahem chloridových iontů (Tomasso a kol., 1981). Naopak vysoká mortalita byla zaznamenána u pstruha duhového, u kterého bylo použito dusitanu a dusičnanu amonného v koncentraci $600 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{NO}_2^-$ a $18 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{NH}_3$. Vysokou mortalitu ryb se však nepodařilo prokázat měřeními parametry jako důsledek synergického působení dusitanů a amoniaku (Vedel a kol., 1998).

e) Hodnota pH

Vliv koncentrace vodíkových iontů na toxicitu dusitanů je stále velmi nejasný. Výsledky jsou v tomto směru často protichůdné. Pro úpravu pH se používají pufrы, díky kterým dochází ke změně obsahu aniontů, pak je těžké odlišit vliv obsahu aniontů od vlivu pH. Důležitým faktem je používání rozsahu hodnot pH, který je mimo normální rozsah schopnosti adaptace ryb (Lewis a Morris, 1986). V rozmezí přírodě blízkých hodnot pH je zřejmě vliv samotného pH na toxicitu minimální (Kroupová a kol., 2005b).

f) Kyslík a teplota

Obsah kyslíku prokazatelně ovlivňuje toxicitu dusitanů, protože dusitany omezují přenos kyslíku krví. Proto se může nedostatečným prokysličením vody ještě více zhoršit zdravotní stav ryb (Kroupová a kol., 2005a). Při pokusu provedeném na sumcích bylo zjištěno, že ani koncentrace kyslíku $5 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ nebyla v přítomnosti dusitanů dostačující, přestože sumci běžně tolerují i koncentrace nižší (Bowser a kol., 1983).

V úzkém rozmezí teplot (22 až 30°C) se u sumců neprokázala rozdílnost toxicity dusitanů v závislosti na teplotě vody (Colt a Tchobanoglous, 1976). Jiným pokusem se zjistilo, že při teplotě 30°C se koncentrace hemoglobinu v krvi sumčeka skvrnitého vrátila do normálu mnohem rychleji než ve vodě o teplotě 10°C. To značí, že má methemoglobinémie u ryb při vyšší teplotě rychlejší průběh, což bylo potvrzeno i jiným

testem (Huey a kol., 1984). Se snižující se teplotou se zvyšuje rozpustnost kyslíku ve vodě a snižuje rychlost metabolismu u ryb. To by mělo snížit toxicitu dusitanů. Naproti tomu se s nižší teplotou snižuje schopnost detoxikace dusitanů, takže je třeba na výsledky nahlížet opatrně (Kroupová a kol., 2005a).

2.2.4.3. Charakter ryb

a) Věk a velikost ryb

Mnoho studií prokázalo, že mladší věkové kategorie jsou méně citlivé na dusitany ve srovnání se staršími jedinci téhož druhu. U lososa (*Oncorhynchus kisutch*) byla zjištěna větší odolnost u plůdku ve srovnání s ročkem (Perrone a Meade, 1977). Toto tvrzení podporují i podobné výsledky s jinými lososovitými rybami (Russo a kol., 1974; Bartlett a Neumann, 1998). Rozdílnost citlivosti může být způsobena odlišnou aktivitou methemoglobin-reduktázy u různě starých jedinců (Kiese, 1974). Odlišné je vysvětlení v rozdílné citlivosti v souvislosti s neúplně vyvinutým žaberním aparátem u mladých ryb. Raná vývojová stadia ryb dýchají převážně kůží (např. u lososů o hmotnosti 2,5 až 4 g se uvádí, že dýchání povrchem těla představuje až 96%) (Rombough a Moroz, 1990). U mladých ryb se tkáň snáze zásobují kyslíkem prostupujícím kůží ve srovnání se staršími rybami. Protože jsou dusitany krevním jedem, tak je pravděpodobné, že přítomnost dusitanů ve vodě činí mladším rybám menší zdravotní potíže než rybám starším, které jsou více závislé na krevním kyslíku (Bartlett a Neumann, 1998). V souvislosti s velikostí ryb jsou výsledky podobné. Pokusem na tilápii nilské byla zjištěna silná závislost toxicity dusitanů na velikosti ryb. U ryb o hmotnosti $4,4 \pm 1,50$ g byla zjištěna hodnota akutní letální koncentrace (96hLC50) dusitanového dusíku (N-NO_2^-) $81 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, zatímco u ryb o hmotnosti $90,7 \pm 16,43$ g byla koncentrace N-NO_2^- $8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (Atwood a kol., 2001).

b) Individuální citlivost

Citlivost jednotlivých ryb na toxicitu dusitanů se může u některých druhů značně lišit. Takové rozdíly v citlivosti u jednotlivých ryb jsou známe hlavně u pstruha duhového (Williams a Eddy, 1988). Pstruzi mohou tvořit dvě rozdílné skupiny. V první jsou ryby citlivé, které dusitany rychle přijímají. Takové ryby jsou více postiženy různými fyziologickými poruchami a vykazují dřívější mortalitu. Ve druhé skupině se

nacházejí jedinci celkově odolnější (Stormer a kol., 1996; Aggergaard a Jensen, 2001). Vysvětlení může spočívat v rozdílném počtu a velikosti povrchu chloridových buněk žaber u těchto dvou skupin pstruhů (Perry a Goss, 1992). Zjištěné rozdíly mohou být také důsledkem rozdílné účinnosti detoxikačního mechanismu a vylučování (Aggergaard a Jensen, 2001).

c) Druh ryby

Citlivost k dusitanům v závislosti na druhu ryb je značná. Nejcitlivější ze studovaných čeledí je čeleď lososovití a mezi jednotlivými druhy této čeledě již velké rozdíly nejsou. Výrazné rozdíly v citlivosti k dusitanům jsou však mezi teplomilnými rybami (Kroupová a kol., 2005a). Podobnou citlivost jako čeleď lososovitých vykazuje sumeček skvrnitý. Poněkud nižší citlivost ve srovnání s lososovitými rybami vykazuje tilápie modrá (*Tilapia aurea*) a ještě méně citlivý je sumeček černý (*Ictalurus melas*). Nejnižší citlivost k dusitanům vykazuje čeleď okounkovití (Lewis a Morris, 1986). Extrémně vysokou odolnost vůči dusitanům vykazuje okounek pstruhový (*Micropterus salmoides*), který více potlačuje vliv dusitanů, a proto se větší množství methemoglobinu v krvi u něj vytváří až při velmi vysokých koncentracích dusitanů (Palachek a Tomasso, 1984).

2.3. Tilápie nilská

2.3.1. Systematické zařazení

Tilápii nilskou lze zařadit podle De Yonga a kol. (online, 2004) následovně:

Říše.....	<i>Animalia</i> - živočichové
Oddělení.....	<i>Bilateria</i> - dvoustranně souměrní
Kmen.....	<i>Chordata</i> - strunatci
Podkmen.....	<i>Vertebrata</i> - obratlovci
Nadtřída.....	<i>Osteichthyes</i> - ryby kostnaté
Třída.....	<i>Actinopterygii</i> - paprskoploutví
Nadřád.....	<i>Teleostei</i> - kostnatí
Řád.....	<i>Perciformes</i> - ostnoploutví
Čeleď.....	<i>Cichlidae</i> - vrubozubcovití
Rod.....	<i>Oreochromis</i> - tlamoun

Druh..... *Oreochromis niloticus* - tlamoun nilský

Užívaná synonyma jsou: tilápie nilská
okounovec nilský

2.3.2. Biologická charakteristika

a) Popis

Tilápie nilská má z boků silně zploštělé tělo s ktenoidními šupinami, vysoký hřbet a krátký ocasní násadec. Má poměrně velkou hlavu a v tlamě jemné zuby. Ploutve jsou výrazně vyvinuté s patrnými skvrnami. Zbarvení těla je šedomodé až šedozelené s kovovým leskem s 8 – 10 tmavšími příčnými pruhy. (Spurný, 1998). Tilápie dorůstá délky až 50 cm a může vážit i několik kilogramů. V chovech se ale většinou setkáme s jedinci o hmotnosti 0,5 – 1 kg. V našich podmínkách se tržní hmotnost tilápie pohybuje kolem 0,2 – 0,3 kg (Adámek, 1994; Spurný, 1998). Samci rostou rychleji a jsou zbarvením pestřejší než samice (Linhart a kol. 2004). Tilápie se obvykle dožívá maximálně 7 – 8 let (Pullin a Lowe-McConnell, 1982).

b) Rozšíření

Původně tilápie nilská žila ve sladkých vodách tropické a subtropické Afriky, kde bylo identifikováno více než 70 druhů tilápií (Philippart a Ruwet, 1982; McAndrew, 2000). Postupně se tilápie rozšířila do tropických oblastí celého světa (Fryer a Illes, 1972; Khater a Smitherman, 1988). Nyní je chována v 85 zemích (Eknath a Hulata, 2009). Vyskytuje se především v jihovýchodní Asii, latinské Americe a v tichomoří (Bondad-Reantaso, 2007; Miller, 1995). V chladnějších oblastech je možné tilápie chovat na oteplených vodách případně v letním období v rybnících (Adámek, 1994).

c) Potravní nároky a rozmnožování

Tilápie je typickým omnivorním druhem. Konzumuje zooplankton i fytoplankton, nárosty řas, vyšší rostliny, zoobentos a příležitostně i vlastní potomstvo (Pullin a Lowe-McConnell, 1982; Adámek, 1994; Spurný, 1998).

Pohlavní dospělosti dosahuje tilápie v akvakulturách ve stáří čtyř měsíců a velikosti 10 cm (Linhart a kol., 2004). Samice inkubuje jikry v tlamě po dobu 7 – 10 dní. Plůdek se osamostatňuje až po strávení žloutkového vaku za 10 – 12 dní po výtěru. Samice po celou dobu inkubace nepřijímá potravu (Adámek, 1994; Spurný, 1998). Tilápie je polygamní, jeden samec se tře s více samicemi (Linhart a kol., 2004).

e) Podmínky prostředí

Tilápie nilská je schopna přežít i ve velmi nepříznivých podmínkách. Je odolná vůči vysoké teplotě a znečištění vody a také k nízké koncentraci kyslíku (Adámek, 1994; Fitzsimmons, 2007). Poměrně odolná je i vůči vysokým hodnotám pH (Bardach a kol., 1972; Pullin a Lowe-McConnell, 1982). Jako tropický druh není odolná k nízkým teplotám vody, které mohou nepříznivě ovlivnit její poměrně vysokou odolnost k nemocem (Adámek, 1994).

Boudad a Reantaso (2007) doporučují pro chov tilápie optimální teplotu v úrovni 26 – 29 °C. Jako horní mezní teplota vody pro přežití tilápie se uvádí 40 °C (Wood, 1989; Adámek, 1994; Miller, 1995). Při teplotě vody 20 °C tilápie přestává přijímat potravu a zastavuje růst (Chervinski, 1982; Rakocy, 1989). První úhyny bývají zaznamenány při 13,6 °C (Chaso-Karisa a kol., 2005). Při 12 °C se zvyšuje citlivost k bakteriálním, parazitickým i plísňovým onemocněním (Rakocy, 1989). Tuto teplotu je tilápie schopna snášet i delší dobu s občasným úhynem slabších jedinců (Adámek, 1994; Chervinski, 1982). Letální teplota je pro tilápii ve většině případů uváděna 10 °C (Stickney, 1986b; Suresh a Lin, 1992a; Kharter a Smitherman, 1988; Miller, 1995). V našich klimatických podmínkách hyne celá obsádka při poklesu teploty vody na 9 °C, ale krátkodobě tilápie údajně snese i teploty 6 – 8 °C (Adámek, 1994).

Optimální koncentrace kyslíku pro tilápii by neměla klesat pod 5 mg·l⁻¹ (Greiner a Timmons, 1998). Za kritickou hranici koncentrace kyslíku je považována hodnota 2 – 3 mg·l⁻¹ (Teichert-Coddington a Green, 1993; Miller, 1995). Tilápie je ale schopna přežít krátkodobý pokles koncentrace kyslíku pod 0,5 mg·l⁻¹ a nasycení pod 25 % (Adámek 1994). Četnými pokusy se zjistily rozdílné výsledky v přežití tilápií a to až na koncentraci 0,3 mg·l⁻¹ (Popma a Masser, 1999; Kalous, 2011).

Významnou výhodou při chovu tilapie jsou její minimální nároky na kvalitu vody a její schopnost přežít vysoké organické zatížení. Tilápie je rovněž odolná vůči vysokým

koncentracím volného amoniaku a podle literárních údajů velmi dobře snáší koncentrace do $0,85 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Chetty a kol., 1980). Rakocy (1989) uvádí, že tilápie začínají hynout až při koncentraci $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$ a $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2\text{-N}$, což to je značně vyšší odolnost, než jakou vykazují naše původní ryby. Jiní autoři udávají 96hLC50 pro $\text{NH}_3\text{-N}$ v úrovni $1,7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Thurston a kol., 1983; Campbell, 1991). Watanabe a kol. (2002), však popisují přežití tilápií až do $3,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$.

Tilápie se rovněž vyznačuje vysokou odolností vůči změnám hodnot pH vody. V řadě prací jsou udávány optimální hodnoty pH v rozmezí 6,5 a 8,8 (Greiner a Timmons, 1998; Miller, 1995; Rakocy a kol., 1989). Avšak Baccarin a Camargo (2005) popisují ve své práci pokusy, při kterých tilápie přežily hodnotu pH 5,4 a Bardach a kol. (1972) uvádí jako horní hranici pro přežití tilápie až pH 11.

Tilápie nilská vykazuje rovněž vysokou odolnost ke zvýšené salinitě vody až do $15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. (Popma a Masser, 1999). Tilápie mozambická (*Oreochromis mossambicus*) vydrží dokonce salinitu až do výše $75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a dobře prospívá v brakických vodách (Balarin a Haller, 1982).

f) Adaptace na deficit kyslíku

Kutty (1972) prokázal na tilapii mosambické schopnost adaptovat se metabolismem na kyslíkový deficit. Při teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$ s nízkým nasycením kyslíku vykazovaly tilápie zvýšenou aktivitu metabolismu, využívání proteinů a růst kyslíkového dluhu. Vyrovnáváním kyslíkového deficitu byly ryby schopny získat anaerobní energii mimo obvyklou glykolýzu – tzv. procesem "recovery metabolism".

3. MATERIÁL A METODIKA

Pokus na rybách probíhal v akvarijní místnosti pavilonu C Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích v období 20.8. - 20.9.2011. Hematologická a biochemická vyšetření vzorků krve byla prováděna v laboratoři vodní toxikologie a ichtyopatologie VÚRH ve Vodňanech.

3.1. Materiál

Testovací organizmus: pro účely tohoto pokusu byla použita tilápie nilská (*Oreochromis niloticus*), která byla dovezena z rybí líhně Tisová. Průměrná kusová hmotnost ryb činila $376,3 \pm 59,2$ g. Fotografie tilápie nilské je uvedena v Příloze I.

Kvalita vody: pro pokus byla použita termostaticky ohřívaná dechlorovaná vodovodní voda. Voda vykazovala následující fyzikálně-chemické parametry:

teplota (t):.....	23 ± 2 °C
nasycení vody kyslíkem (O ₂):	> 63 %,
kyselinová neutralizační kapacita do pH 4,5 (KNK _{4,5}):	1,1 mmol·l ⁻¹ ,
chemická spotřeba kyslíku manganometricky (CHSK _{Mn}):	1,5 mg·l ⁻¹ ,
celkový amoniak (NH ₃):	< 0,02 mg·l ⁻¹ ,
dusitanový dusík (N-NO ₂ ⁻):	< 0,01 mg·l ⁻¹ ,
suma vápníku a hořčíku ($\sum Ca^{2+} + Mg^{2+}$):	14 mmol·l ⁻¹ ,
chloridy (Cl ⁻):	5 mg·l ⁻¹ ,
fosforečnany (PO ₄ ³⁻):	0,001 mg·l ⁻¹ ,
hodnota pH:	7,2 – 7,9.

Testovaná látka: dusitany byly do vody aplikovány ve formě dusitanu sodného (NaNO₂ p.a.), koncentrace chloridů byla upravována pomocí chloridu sodného (NaCl p.a.).

Pomůcky:. běžné laboratorní nádobí (váženky, kádinky, zkumavky, laboratorní lžičky apod.), skleněná akvária o objemu 250 litrů, příslušenství pro manipulaci s rybami.

Přístroje: pH metr, OXI metr (Multil Line PA firmy WTW), (Příloha II), analytické váhy, VETTEST 8008 Analyser (Příloha III), Bürkerova počítací komůrka, mikroskop OLYMPUS zvětšení 200x, hematokritový měřič a skleněné kapiláry (Příloha IV), spektrofotometr SPECTRONIC - 20 - GENESYS (540nm), chlazená centrifuga.

3.2. Metody

3.2.1. Test subchronické toxicity

Subchronický test byl proveden podle mezinárodních norem OECD č. 204, a ČSN EN ISO 10229, které byly modifikovány pro účely našeho pokusu. Před zahájením pokusu byly ryby po dobu jednoho týdne adaptovány na podmínky pokusu v akváriích o objemu vody 200 l naplněných pitnou (vodovodní) vodou upravenou v dechlorační stanici. Po dobu adaptační fáze i v průběhu testu byly ryby krmeny komerční krmnou směsí BioMar s obsahem 47 % bílkovin a 26 % tuku. Velikost denní krmné dávky byla vypočítána z celkové hmotnosti ryb v nádrži a činila 2,5 % hmotnosti ryb.

Pokusné ryby (skupina P) byly ve dvou akváriích vystaveny po dobu 14 dnů zvýšené koncentraci dusitanů ($3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$). To je koncentrace, která se běžně vyskytuje v recirkulačních zařízeních s intenzivním chovem ryb (Svobodová a kol., 2008). Dusitany byly do nádrží dávkovány ve formě roztoku dusitanu sodného (NaNO_2). Polovina vody v akváriích (tj. 100 l) byla každý den vyměňována. Kontrolní ryby (skupina K) byly drženy také ve dvou akváriích, ale bez zvýšené koncentrace dusitanů a chloridů. Voda v nádržích byla kontinuálně vzduchována stlačeným vzduchem.

Po uplynutí 14 dnů byly odebrány vzorky krve na hematologická a biochemická vyšetření od 4 kusů ryb z každého akvária (2×4 ryby ze skupiny K a 2×4 ryby ze skupiny P). Kontrolní ryby (K) byly nadále ponechány ve vodě prosté dusitanů a pokusné ryby (P) byly rozděleny do 4 skupin (P, R1, R2, R3, každá skupina ve dvou opakováních). Do každého akvária bylo umístěno 12 kusů ryb (24 kusů pro každou skupinu).

Rozdělení ryb do skupin bylo provedeno následujícím způsobem:

Skupina (P) – pokus: u této skupiny ryb bylo pokračováno v expozici dusitanů za stejných podmínek jako v předešlých 14 dnech. Ve vodě byl udržován obsah dusitanů ve výši $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\text{NO}_2^-$.

Skupina (R1) – regenerace 1: tato skupina ryb byla vystavena stejné koncentraci dusitanů jako v předešlých 14ti dnech ($3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\text{NO}_2^-$), ale do vody byl přidán roztok chloridu sodného tak, aby výsledná koncentrace chloridů činila $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\text{Cl}^-$.

Skupina (R2) – regenerace 2: tato skupina ryb byla přelovena do vody prosté dusitanů ($< 0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{NO}_2^-$), do které byl přidán chlorid sodný v takové koncentraci, aby výsledná koncentrace chloridů činila $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{Cl}^-$.

Skupina (R3) – regenerace 3: tato skupina ryb byla přelovena do vody prosté dusitanů ($< 0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{NO}_2^-$), koncentrace chloridů zde nebyla upravována a činila $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{Cl}^-$.

Skupina (K) – kontrola: tato skupina ryb byla po celou dobu pokusu ponechána ve vodě prosté dusitanů ($< 0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{NO}_2^-$) a bez úpravy koncentrace chloridů (ve vodě tedy bylo $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{Cl}^-$).

Po dvou dnech pobytu ryb ve výše uvedených lázních (16. den testu) byly provedeny další odběry krve vždy od čtyř ryb z každé nádrže (8 ryb ze skupiny). Následující odběry krve byly provedeny v závěru pokusu (po dalších 6 dnech, tj. 22. den pokusu).

Průběh pokusu je zachycen v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Rozdělení ryb do skupin a schematické znázornění průběhu testu.

Časový průběh testu		
Do 14. dne	Do 16. dne	Do 22. dne
sk. (P): 3 mg·l ⁻¹ NO ₂ ⁻	sk. (P): 3 mg·l ⁻¹ NO ₂ ⁻	sk. (P): 3 mg·l ⁻¹ NO ₂ ⁻
	sk. (R1): 3 mg·l ⁻¹ NO ₂ ⁻ + 100 mg·l ⁻¹ Cl ⁻	sk. (R1): 3 mg·l ⁻¹ NO ₂ ⁻ + 100 mg·l ⁻¹ Cl ⁻
	sk. (R2): 100 mg·l ⁻¹ Cl ⁻	sk. (R2): 100 mg·l ⁻¹ Cl ⁻
	sk. (R3): pitná voda bez úpravy	sk. (R3): pitná voda bez úpravy
Kontrola (K): pitná voda bez úpravy	Kontrola (K): pitná voda bez úpravy	Kontrola (K): pitná voda bez úpravy

3.2.2. Odběry krve, hematologická a biochemická vyšetření

Vzorky krve byly odebírány z kaudální cévy punkcí (Příloha V) pomocí heparizované jehly a odebraná krev byla stabilizována heparinem sodným 40 IU na 1 ml krve (Heparin inj., Léčiva Česká republika). Ryby se po odběru krve zpět do nádrží nevracely, ale byly využity pro jiná vyšetření.

Bezprostředně po odběru byly stanoveny následující hematologické ukazatele podle Svobodové a kol. (1986):

Počet erytrocytů (RBC): stanovení počtu erytrocytů bylo provedeno v heparizované krvi ředěné Hayemovým roztokem v poměru 1:200 (Hayemův roztok: 2,5 g sublimátu HgCl₂ + 25 g Na₂SO₄ + 5 g NaCl + ad 1000 ml dest. H₂O). Baničkovou metodou podle Bürkera se do baničky o objemu 25 ml odměřilo přesně 4975 µl přefiltrovaného Hayemova roztoku, k tomu se opakovaným vyplachováním přidalo pipetou 25 µl

heparinizované krve a pak se zavřená baňka 2 až 3 min. krouživě míchala. Takto naředěná krev se pomocí pipety převedla do Bürkerovy počítací komůrky. Erytrocyty byly počítány v mikroskopu při 200násobném zvětšení. Jednotlivé buňky byly počítány ve 20 obdélnících pravidelně rozmístěných v mřížce komůrky. Počet zahrnoval erytrocyty umístěné zcela uvnitř obdélníků + erytrocyty jakkoliv dotčené pravé a horní rysky obdélníků. Počet erytrocytů zjištěných ve 20 obdélnících se násobil číslem 10000 a výslednou hodnotou byl počet erytrocytů v $T \cdot l^{-1}$ [tera, $T = 10^{12}$] (Svobodová a kol., 1986). Vlastní stanovení počtu erytrocytů prováděly techničky laboratoře vodní toxikologie a ichthyopatologie VÚRH ve Vodňanech. Zjištěné výsledky jsem ve své práci použil se svolením MVDr. E. Zuskové, Ph.D. (řešitelky projektu, jehož součástí je moje diplomová práce).

Počet leukocytů (WBC): stanovení počtu leukocytů bylo prováděno v heparinizované krvi ředěné roztokem podle Procházky a Škrobáka v poměru 1:200. (Procházka a Škrobákův roztok: 3,88 g NaCl + 2,5 g Na₂SO₄ + 2,91 g Na₂HPO₄·12H₂O + 0,25 g KH₂PO₄ + 7,5 ml formaldehydu 37% + 0,1 g brilantkresilové modři + ad 1000 ml dest. H₂O). Baničkovou metodou podle Bürkera se do baničky o objemu 25 ml odměřilo přesně 4975 μ l přefiltrovaného 14 dní odstátého Procházka a Škrobákova roztoku, k tomu se opakovaným vyplachováním přidalo pipetou 25 μ l heparinizované krve a pak se zavřená baňka 2 až 3 min. krouživě míchala. Pipetou s naředěnou krví byla naplněna Bürkerova počítací komůrka. Leukocyty byly počítány ve 100 velkých čtvercích v mřížce Bürkerovy počítací komůrky v mikroskopu při 200násobném zvětšení. Počet zahrnoval leukocyty umístěné zcela uvnitř čtverců + leukocyty jakkoliv dotčené pravé a horní rysky čtverců. Výsledkem byl počet erytrocytů v $G \cdot l^{-1}$ (giga, $G = 10^9$) (Svobodová a kol., 1986). Vlastní stanovení počtu leukocytů prováděly techničky laboratoře vodní toxikologie a ichthyopatologie VÚRH ve Vodňanech. Zjištěné výsledky jsem ve své práci použil se svolením MVDr. E. Zuskové, Ph.D. (řešitelky projektu, jehož součástí je moje diplomová práce).

Hematokrit (PCV): hematokrit vyjadřuje objem erytrocytů k celkovému objemu krve. Pro vyhodnocení bylo nutné oddělit erytrocyty od krevní plazmy. Oddělení erytrocytů od krevní plazmy bylo prováděno v kapilárách, kam byla nasáta čerstvě odebraná heparinizovaná krev do cca 2/3 výšky, čistý konec se utěsnil speciální hmotou a poté byly kapilárky umístěny do hematokritové odstředivky. Oddělení erytrocytů bylo dosaženo odstředěním při 14000 otáčkách za minutu po dobu 3 minut. Hodnota

hematokritu v procentech byla odečtena pomocí hematokritového měřiče, který je součástí (příslušenstvím) hematokritové odstředivky. Výsledná hodnota v % hematokritu byla vynásobena koeficientem 0,01, čímž byl získán výsledek v jednotkách $l \cdot l^{-1}$ (Svobodová a kol., 1986).

Hemoglobin (Hb): obsah hemoglobinu v krvi byl stanoven fotometrickou kyanohemiglobinovou metodou. Transformačním (Drabkinovým) roztokem se uvolnil hemoglobin z erytrocytů a převedl se na stálý kyanohemiglobin, který byl stanoven fotometricky. (Transformační roztok: 0,2 g $K_3[Fe(CN)_6]$ + 0,05 g KCN + 1 g $NaHCO_3$ + ad 1000 ml dest. H_2O). Před vlastní analýzou byly připraveny očíslované zkumavky, do kterých bylo odměřeno po 5 ml transformačního roztoku. Do těchto zkumavek bylo dávkováno 25 μ l čerstvě odebrané heparinizované krve a promícháno. Po 20 minutách byla fotometricky měřena intenzita zabarvení vzorku. Měření bylo prováděno v kyvetě o tloušťce 1 cm při vlnové délce 540 nm proti transformačnímu roztoku. Množství hemoglobinu se určilo z kalibrační křivky. Pro sestavení kalibrační křivky bylo použito kyanohemiglobinového standardu a transformačního roztoku. Výsledkem měření bylo množství hemoglobinu v $g \cdot l^{-1}$ (Svobodová a kol., 1986).

Z výše uvedených parametrů byly vypočteny další hematologické ukazatele:

Střední objem erytrocytu (MCV) byl vypočítán podle níže uvedeného vzorce:

$$MCV = \frac{PCV \cdot 1000}{RBC} [fl],$$

kde MCV je střední objem erytrocytu ve fl (femtolitr, $fl = 10^{-15} l$),

PCV je hodnota hematokritu v $l \cdot l^{-1}$,

RBC je počet erytrocytů v $T \cdot l^{-1}$.

Hemoglobin erytrocytu (MCH): hodnota hemoglobinu erytrocytu udává průměrnou koncentraci hemoglobinu v jednotlivých erytrocytech. Pro výpočet MCH bylo použito následujícího vzorce:

$$MCH = \frac{Hb}{RBC} [pg],$$

kde MCH je hemoglobin erytrocytu v pg (pikogram, $pg = 10^{-12}$ g),

Hb je množství hemoglobinu v krvi v $g \cdot l^{-1}$,

RBC je počet erytrocytů v $T \cdot l^{-1}$.

Střední barevná koncentrace hemoglobinu (MCHC): výpočtem střední barevné koncentrace byla zjištěna koncentrace hemoglobinu v objemové jednotce erytrocytů. Pro výpočet byla použita hodnota hemoglobinu (Hb) v $g \cdot l^{-1}$ a hematokritu (PCV) v $l \cdot l^{-1}$. Pro výpočet MCHC bylo použito následujícího vzorce:

$$MCHC = \frac{Hb}{PCV \cdot 1000} [l \cdot l^{-1}],$$

kde MCHC je střední barevná koncentrace erytrocytu v $l \cdot l^{-1}$,

Hb je množství hemoglobinu v krvi v $g \cdot l^{-1}$,

PCV je hodnota hematokritu v $l \cdot l^{-1}$.

Dále byl stanoven podíl methemoglobinu (MetHb) a koncentrace dusitanů v krevní plazmě (NO_2^-).

Methemoglobin (MetHb): ke stanovení methemoglobinu v krvi byla použita fotometrická metoda. Sestavená absorpční křivka methemoglobinu vykazuje charakteristický vrchol při 630 nm. Působením kyanidu draselného se převede methemoglobinu na methemoglobinkyanid, tím vrchol absorbance zmizí. V jedné části vzorku se převede veškerý hemoglobin ferrikyanidem draselným na methemoglobin, který po přidavku kyanidu draselného přejde na methemoglobinkyanid. V druhé části vzorku se převede methemoglobin, který byl původně ve vzorku přítomen na methemoglobinkyanid. Rozdíl absorbancí při 630 nm je přímo úměrný koncentraci methemoglobinu (Svobodová a kol., 1986). Vlastní stanovení methemoglobinu prováděly techničky laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie VÚRH ve Vodňanech. Zjištěné výsledky jsem ve své práci použil se svolením MVDr. E. Zuskové, Ph.D. (řešitelky projektu, jehož součástí je moje diplomová práce). Podíl methemoglobinu byl vypočten podle následujícího vzorce:

$$MetHb = \frac{E - A_1 \cdot 100}{A_3 - A_2} [\%],$$

kde E je absorbance supernatantu,

A1 je první absorbance (supernatant + KCN),

A2 je druhá absorbance (supernatant + KCN + $K_3[Fe(CN)_6]$),

A3 je třetí absorbance (hemolyzát + saponin + $K_3[Fe(CN)_6]$).

Dusitany (NO_2^-): stanovení bylo prováděno tzv. mikrometodou na stanovení dusitanů v krvi podle Shechtera a kol. (1972). Nejprve bylo třeba provést deproteinizaci. Do 1,5 ml zkumavky obsahující 0,6 ml roztoku síranu zinečnatého bylo převedeno 0,1 ml krve + 0,4 ml redestilované vody a důkladně promícháno. Dále bylo přidáno 0,1 ml 4% vodného roztoku hydroxidu sodného a znovu promícháno. Zkumavky byly uloženy na 1 hodinu na led. Následně byly odstraněny sražené bílkoviny odstředěním s pomocí centrifugy po dobu 2 min při $15000 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$.

Po odstředění bylo odebráno 0,6 ml supernatantu a převedeno do zkumavky, do které bylo přidáno 0,4 ml redestilované vody. Směs byla důkladně promíchána a poté bylo přidáno 0,1 ml roztoku kys. sulfanilové. Zkumavky se vzorky byly ponechány po dobu 15 min na ledu a po uplynutí této doby bylo přidáno 0,1 ml roztoku „Cleve’s acid“. Poté byly zkumavky ponechány po 60 min při pokojové teplotě. Přítomné dusitany se projeví červeno-fialovým zbarvením, jehož intenzita byla měřena spektrofotometrem při 520 nm. Koncentrace dusitanů v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ byla odečtena z kalibrační přímky, která byla připravena z koncentrační řady standardu (dusitanu sodného).

Biochemická analýza: krevní plazma byla z krve oddělena centrifugací po dobu 10 minut, při $12000 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$ při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$. V oddělené plazmě byly stanoveny následující ukazatele: glukóza (**GLU**) v $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, vápník (**Ca**) v $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, hořčík (**Mg**) v $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, celková bílkovina (**TP**) v $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, amoniak (**NH₃**) v $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Stanovení uvedených biochemických ukazatelů bylo provedeno na přístroji VETTEST 8008 (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA), který pracuje na principu tzv. suchých chemických a kolorimetrických analýz. Hodnocení se provádí užitím testovacích slidů (Multi – layer film slides, Kodak).

3.4. Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení zjištěných výsledků hematologického a biochemického vyšetření krve ryb exponovaných rozdílným koncentracím dusitanů a chloridů bylo provedeno pomocí softwaru Statistica 7.0 pro systém Windows (StatSoft, Česká republika). Výsledky byly nejprve testovány na normalitu (Kolmogorovův-Smirnovův test) a homoskedasticitu rozptylu (Bartlettův test). Pokud byly splněny tyto podmínky, byla použita dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) a aplikace Tukeyova HSD testu k určení rozdílů ($P < 0,05$) mezi skupinami ryb exponovaných rozdílným koncentracím dusitanů a chloridů.

4. VÝSLEDKY

Výsledky hematologického vyšetření jsou uvedeny v grafech č. 1 – 8. Výsledky biochemické analýzy jsou uvedeny v grafech č 9 – 13.

V grafech č 1 – 13 jsou uvedeny průměrné hodnoty hematologických a biochemických parametrů se směrodatnou odchylkou výběru zjištěných u jednotlivých skupin ryb při odběrech 14., 16. a 22. den (**14 d**, **16 d**, **22 d**) pokusu. Skupiny ryb jsou v grafech uváděny pod označením:

K = kontrola – po celou dobu pokusu ryby drženy ve vodě bez úpravy koncentrace dusitanů ($< 0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$) a bez úpravy koncentrace chloridů ve vodě ($5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$),

P = pokus - po celou dobu pokusu ryby drženy ve vodě se zvýšeným obsahem dusitanů ve vodě ($3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$) a bez úpravy koncentrace chloridů ($5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$);

R1 = regenerace ryb po 14ti denní expozici dusitanům ($3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$) při zvýšené koncentraci chloridů ($100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$) a nezměněné koncentraci dusitanů ($3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$),

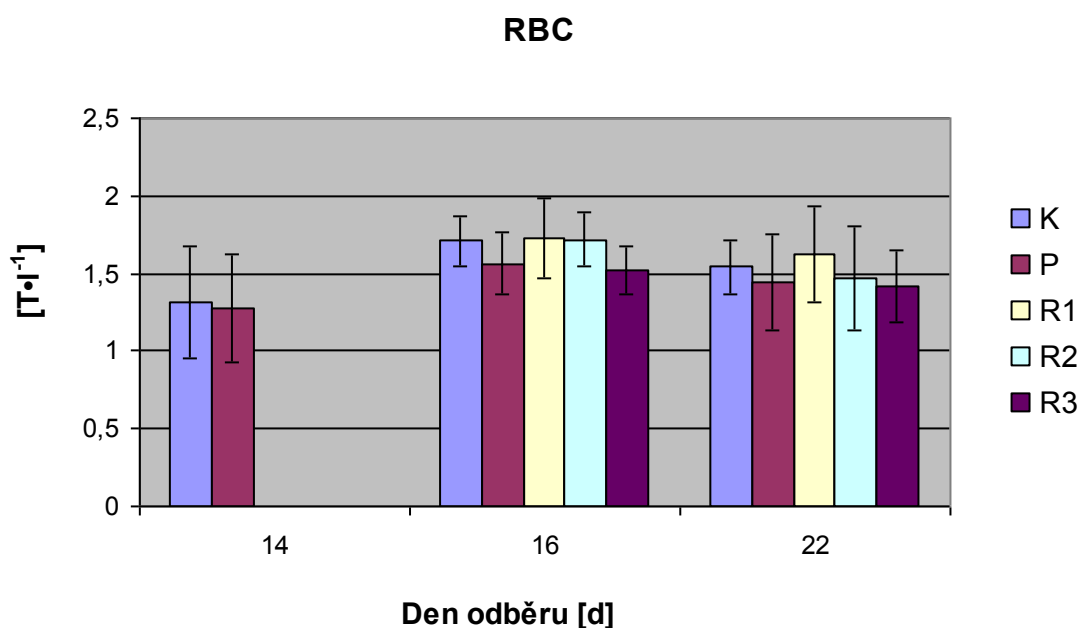
R2 = regenerace ryb po 14ti denní expozici dusitanům ($3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$) ve vodě bez úpravy koncentrace dusitanů ($< 0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$) a zvýšené koncentraci chloridů ($100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$);

R3 = regenerace ryb po 14ti denní expozici dusitanům $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} (\text{NO}_2^-)$ ve vodě bez úpravy koncentrace dusitanů ($< 0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$) i chloridů ($5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$).

4.1. Hematologická vyšetření

Počet erytrocytů (RBC): průměrné hodnoty a směrodatné odchylky výběru jsou uvedeny v grafu č. 1. Jak z uvedeného grafu vyplývá, hodnoty RCB se pohybovaly v rozmezí $1,28 \pm 0,35$ až $1,73 \pm 0,26 \text{ T}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejvyšší průměrná hodnota RBC byla zjištěna 16. den pokusu u skupiny R1 (tedy po 16 dnech expozice ryb dusitanům při zvýšené koncentraci chloridů) a činila $1,73 \pm 0,26 \text{ T}\cdot\text{l}^{-1}$. Naopak nejnižší průměrná

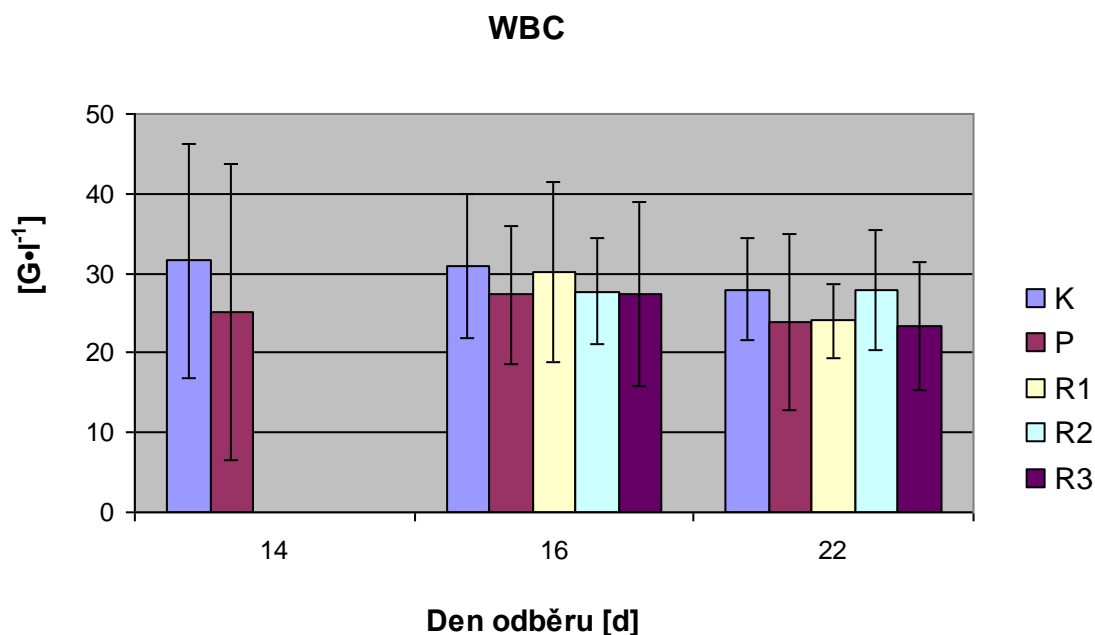
hodnota RBC byla zjištěna po 14 dnech expozice dusitanům (skupina P) a činila $1,28 \pm 0,35 \text{ T}\cdot\text{l}^{-1}$. Jak bylo zjištěno, 16. den pokusu došlo u skupin K a P k nárůstu počtu erytrocytů oproti hodnotám zjištěným 14. den pokusu. Naopak mezi 16. a 22. dnem došlo k mírnému snížení průměrného počtu RBC u všech skupin ryb. Celkově lze konstatovat, že zjištěné hodnoty počtu erytrocytů byly v průběhu celého pokusu u mezi skupin velmi dobře srovnatelné, bez výrazných rozdílů. Kontrolní skupina vykazovala vždy mírně vyšší průměr hodnot ve srovnání se skupinou P, avšak tyto rozdíly nebyly statisticky významné.



Graf č. 1: Počet erytrocytů (RBC) v tera na litr ($T = 10^{12}$) po 14, 16 a 22 dnech od zahájení pokusu; K = kontrola (pitná voda); P = $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$; R1 = $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^- + 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$; R2 = $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$; R3 pitná voda.

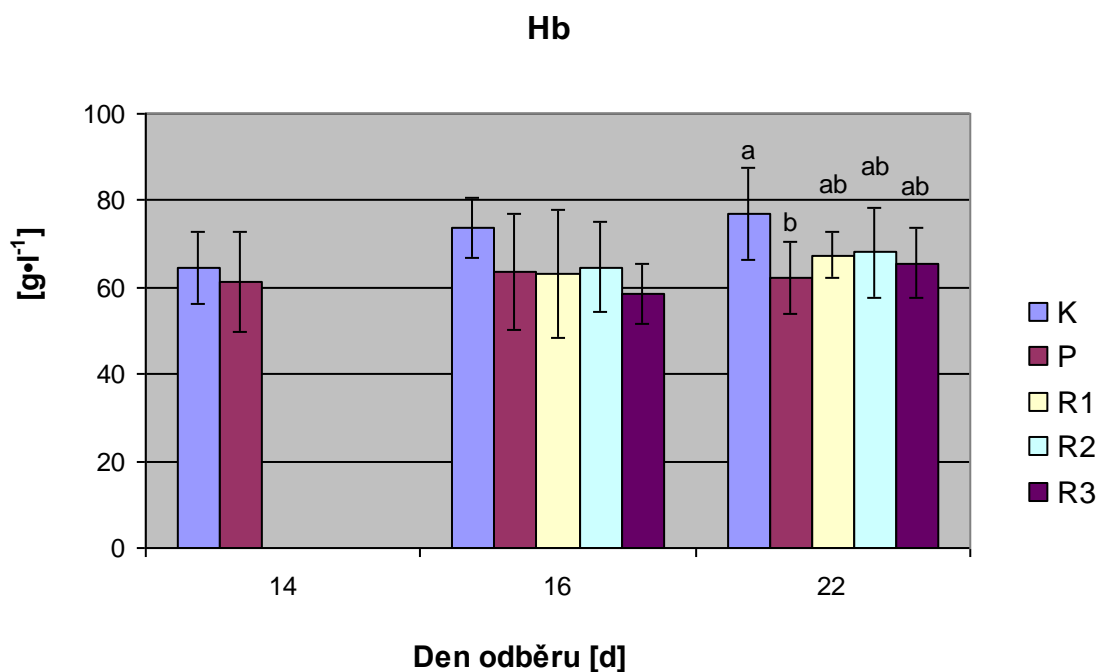
Počet leukocytů (WBC): průměrné hodnoty a směrodatné odchylky výběru jsou uvedeny v Grafu č. 2. Z uvedeného grafu vyplývá, že počty leukocytů u všech skupin ryb se pohybovaly v rozmezí $23,44 \pm 8,08$ až $31,56 \pm 14,75 \text{ G}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejvyšší průměrná hodnota WBC byla zjištěna po 14 dnech u skupiny K a činila $31,56 \pm 14,75 \text{ G}\cdot\text{l}^{-1}$. Naopak nejnižší hodnota WBC byla zjištěna po 14 dnech u skupiny R3 a činila $23,44 \pm 8,08 \text{ G}\cdot\text{l}^{-1}$. Podobně, jako v případě erytrocytů byly i hodnoty leukocytů u jednotlivých skupin ryb velmi vyrovnané a zjištěné rozdíly nebyly statisticky významné. Při srovnání

výsledků zjišťovaných u jednotlivých skupin ryb je možno pozorovat mírné snížení průměrného počtu leukocytů mezi 16. a 22. dnem u skupin K, P, R1 a R3. V průběhu celého pokusu vykazovala kontrolní skupina mírně vyšší průměrné hodnoty ve srovnání se skupinou P, největší rozdíl byl zaznamenán po 14. den pokusu, kdy průměrná hodnota WBC u skupiny K byla $31,56 \pm 14,75 \text{ G}\cdot\text{l}^{-1}$ a u skupiny P $25,19 \pm 18,55 \text{ G}\cdot\text{l}^{-1}$. Ani v tomto případě však rozdíl hodnot nebyl statisticky významný.



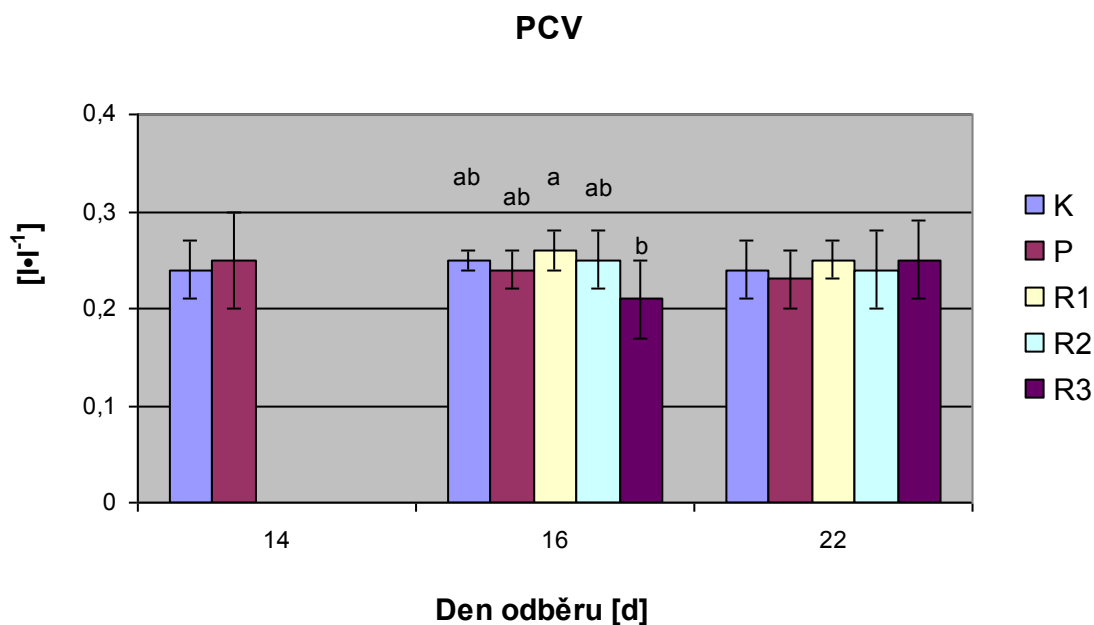
Graf č. 2: Počet leukocytů (WBC) v giga na litr ($G = 10^9$) po 14, 16 a 22 dnech od zahájení pokusu; K = kontrola (pitná voda); P = $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$; R1 = $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^- + 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$; R2 = $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$; R3 pitná voda.

Množství hemoglobinu (Hb): průměrné hodnoty a směrodatné odchylky výběru jsou uvedeny v Grafu č. 3. Z uvedeného grafu vyplývá, že hodnoty Hb se pohybovaly v rozmezí $58,59 \pm 7,01$ až $76,93 \pm 10,73 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejvyšší průměrná hodnota Hb byla zjištěna po 22 dnech pokusu u skupiny K a činila $76,93 \pm 10,73 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Naopak nejnižší průměrná hodnota byla zjištěna po 16 dnech u skupiny R3 a činila $58,59 \pm 7,01 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. V průběhu pokusu vykazovaly zjištěné hodnoty Hb velmi malé rozdíly, které nebyly statisticky významné. Statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$ však byl zjištěn 22. den pokusu, a to mezi skupinami K ($\text{Hb } 76,93 \pm 10,73 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) a P ($62,35 \pm 8,25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).



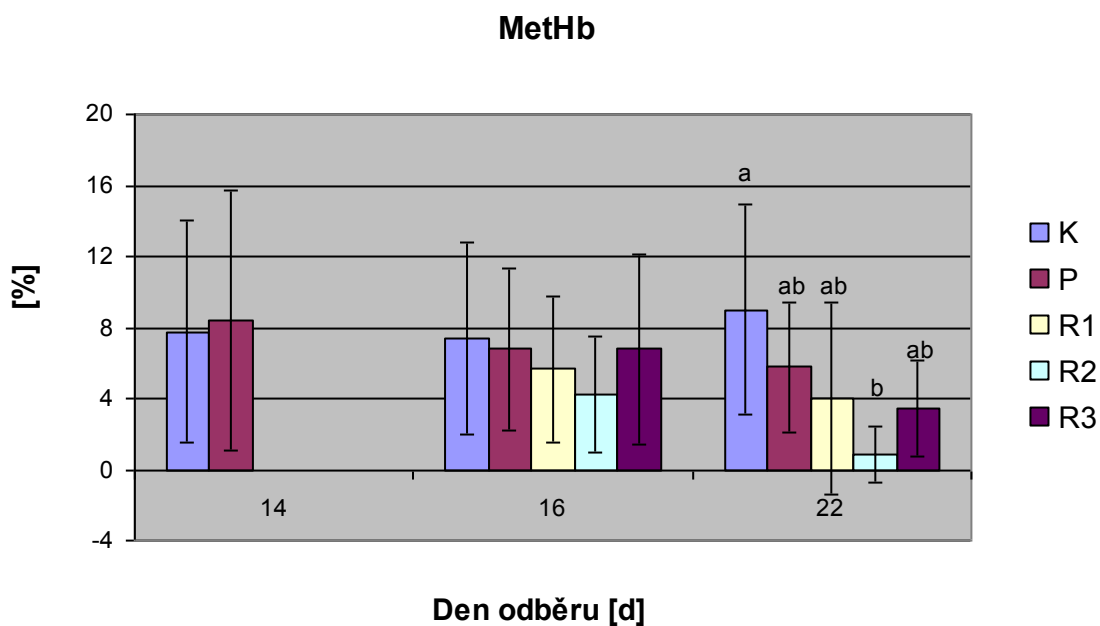
Graf č. 3: Množství hemoglobinu (Hb) v gramech na litr (g·l⁻¹) po 14, 16 a 22 dnech od zahájení pokusu; K = kontrola (pitná voda); P = 3 mg·l⁻¹ NO₂⁻; R1 = 3 mg·l⁻¹ NO₂⁻ + 100 mg·l⁻¹ Cl⁻; R2 = 100 mg·l⁻¹ Cl⁻; R3 pitná voda.

Hematokritová hodnota (PCV): průměrné hodnoty a směrodatné odchylky výběru jsou uvedeny v Grafu č. 4. Z uvedeného grafu vyplývá, že průměrné hodnoty PCV se pohybovaly v rozmezí $0,21 \pm 0,04$ až $0,26 \pm 0,02$ l·l⁻¹. Nejvyšší průměrná hodnota PCV byla zjištěna 16. den pokusu u skupiny R1 a činila $0,26 \pm 0,02$ l·l⁻¹. Naopak nejnižší průměrná hodnota byla zjištěna po 16 dnech u skupiny R3 a činila $0,21 \pm 0,04$ l·l⁻¹. Výsledky měření po 14 a 22 dnech byly velmi vyrovnané bez statisticky významných rozdílů. Po 16 dnech však byl zjištěn statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,01$ mezi skupinou R1 s průměrem PCV $0,26 \pm 0,02$ l·l⁻¹ a skupinou R3 s průměrem PCV $0,21 \pm 0,04$ l·l⁻¹.



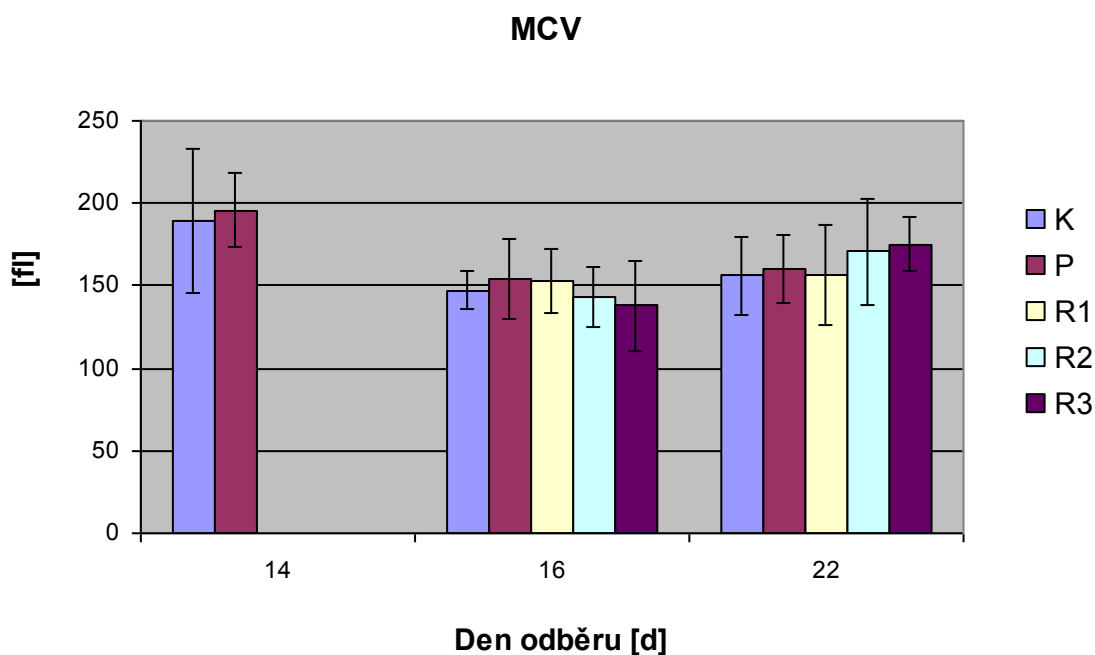
Graf č. 4: Hematokritová hodnota (PCV) v litrech na litr (l·l⁻¹) po 14, 16 a 22 dnech od zahájení pokusu; K = kontrola (pitná voda); P = 3 mg·l⁻¹ NO₂⁻; R1 = 3 mg·l⁻¹ NO₂⁻ + 100 mg·l⁻¹ Cl⁻; R2 = 100 mg·l⁻¹ Cl⁻; R3 pitná voda.

Methemoglobin (MetHb): průměrné hodnoty a směrodatné odchylky výběru jsou uvedeny v Grafu č. 5. Z uvedeného grafu vyplývá, že průměrné hodnoty MetHb se pohybovaly v rozmezí $0,88 \pm 1,58$ až $9 \pm 5,92$ %. Nejvyšší průměrná hodnota MetHb byla zjištěna po 22 dnech u skupiny K a činila $9 \pm 5,92$ %. Naopak nejnižší průměrná hodnota MetHb byla zjištěna po 22 dnech u skupiny R2 a činila $0,88 \pm 1,58$ %. Jak vyplývá z grafu, výsledky zjištěné 14. a 16. den pokusu byly srovnatelné a zjištěné rozdíly mezi skupinami nebyly statisticky významné. Statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,01$ byl zaznamenán až v závěru pokusu (22. den), a to mezi skupinou K s průměrem MetHb $9 \pm 5,92$ % a skupinou R2 s průměrem MetHb $0,88 \pm 1,58$ %.



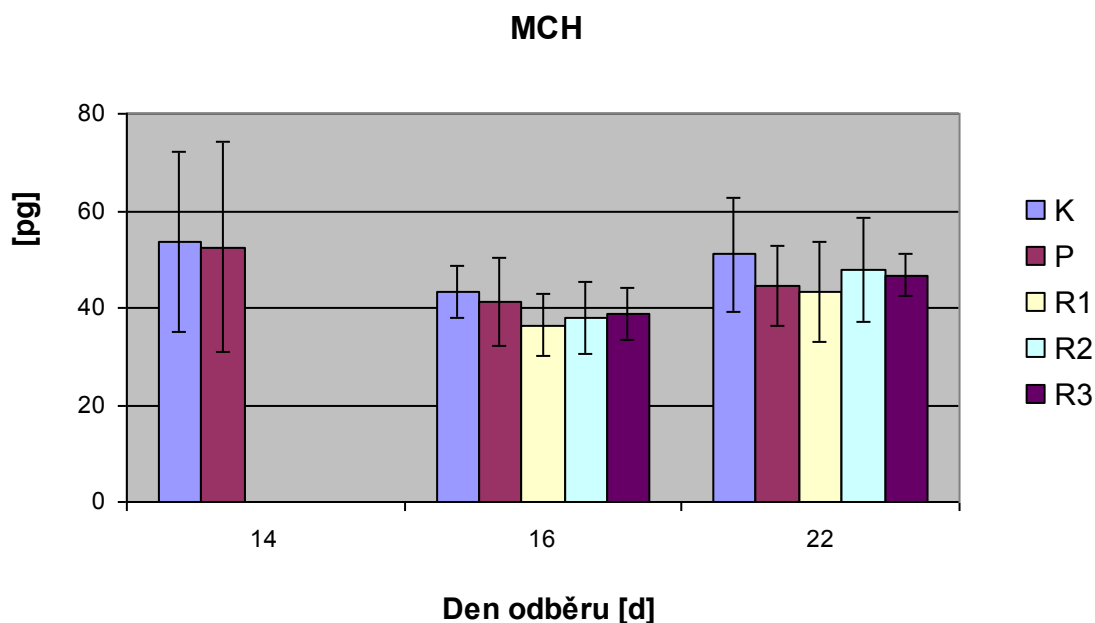
Graf č. 5: Podíl methemoglobinu (MetHb) v procentech (%) po 14, 16 a 22 dnech od zahájení pokusu; K = kontrola (pitná voda); P = $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$; R1 = $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^- + 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$; R2 = $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$; R3 pitná voda.

Střední objem erytrocytu (MCV): průměrné hodnoty a směrodatné odchylky výběru jsou uvedeny v Grafu č. 6. Z uvedeného grafu vyplývá, že průměrné hodnoty MCV všech skupin ryb se pohybovaly v rozmezí $138,06 \pm 27,27$ až $195,44 \pm 22,49$ fl. Nejvyšší průměrná hodnota MCV byla zjištěna po 14 dnech u skupiny P a činila $195,44 \pm 22,49$ fl. Naopak nejnižší průměrná hodnota MCV byla zjištěna po 16 dnech u skupiny R3 a činila $138,06 \pm 27,27$ fl. Výsledky zjištěné v průběhu testu jsou poměrně vyrovnané. Výraznější rozdíly průměrných hodnot byly zaznamenány 16. den pokusu, kdy byl zaznamenán pokles MCV u všech skupin ryb. 22. den pokusu došlo naopak k nárůstu MCV u všech skupin ryb. Zjištěné rozdíly mezi skupinami však nebyly statisticky významné.



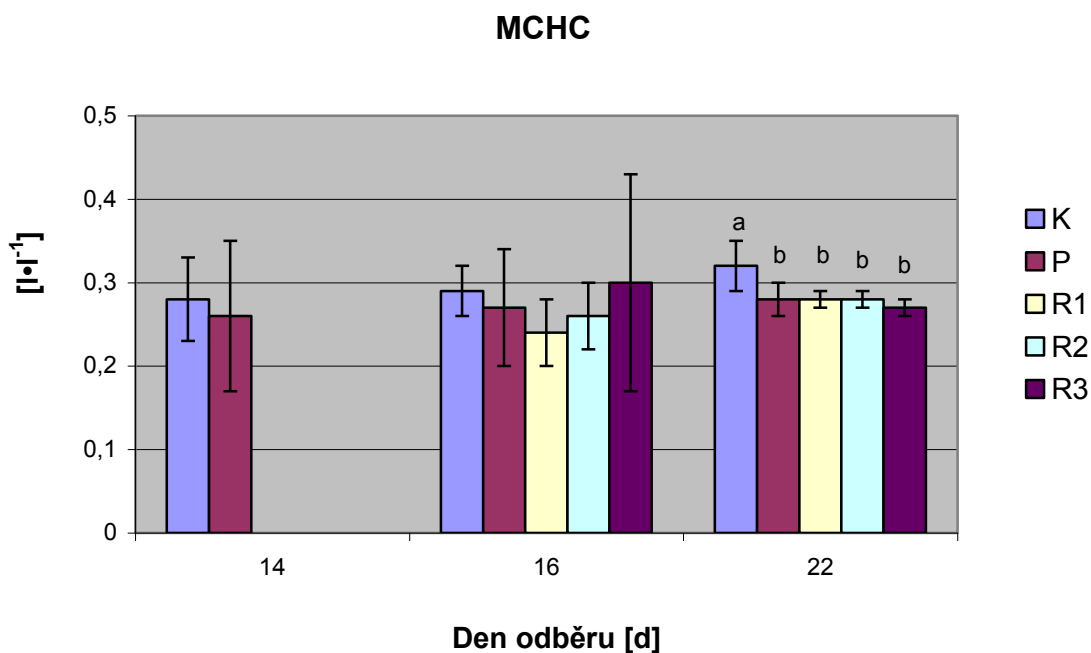
Graf č. 6: Střední objem erytrocytu (MCV) ve femtolitrech ($fl = 10^{-15} l$) po 14, 16 a 22 dnech od zahájení pokusu; K = kontrola – pitná voda; P = $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$; R1 = $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^- + 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$; R2 = $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$; R3 pitná voda.

Hemoglobin erytrocytu (MCH): průměrné hodnoty a směrodatné odchylky výběru jsou uvedeny v Grafu č. 7. Z uvedeného grafu vyplývá, že průměrné hodnoty MCHC všech skupin ryb se pohybovaly v rozmezí $36,4 \pm 6,32$ až $53,52 \pm 18,5$ pg. Nejvyšší průměrná hodnota MCH byla zjištěna po 14 dnech u skupiny K a činila $53,52 \pm 18,5$ pg. Naopak nejnižší průměrná hodnota MCH byla zjištěna 16. den pokusu u skupiny R1 a činila $36,4 \pm 6,32$ pg. 16. den pokusu došlo k poklesu průměrných hodnot MCHC u obou skupin ryb (K i P) ve srovnání s hodnotami, které byly zjištěny 14. den. 22. den došlo naopak k nárůstu MCH u všech skupin v porovnání s odběrem po 16 dnech. Rozdíly mezi skupinami nebyly statisticky významné.



Graf č. 7: Hemoglobin erytrocytu (MCH) v pikogramech ($pg = 10^{-12} g$) po 14, 16 a 22 dnech od zahájení pokusu; K = kontrola – pitná voda; P = $3 mg \cdot l^{-1} NO_2^-$; R1 = $3 mg \cdot l^{-1} NO_2^- + 100 mg \cdot l^{-1} Cl^-$; R2 = $100 mg \cdot l^{-1} Cl^-$; R3 pitná voda.

Střední barevná koncentrace erytrocytu (MCHC): průměrné hodnoty a směrodatné odchylky výběru jsou uvedeny v Grafu č. 8. Z uvedeného grafu vyplývá, že průměrné hodnoty MCHC všech skupin ryb se pohybovaly v rozmezí $0,24 \pm 0,04$ až $0,32 \pm 0,03 l \cdot l^{-1}$. Nejvyšší průměrná hodnota MCHC byla zjištěna po 22 dnech u skupiny K a činila $0,32 \pm 0,03 l \cdot l^{-1}$. Naopak nejnižší průměrná hodnota MCHC byla zjištěna po 16 dnech u skupiny R1 a činila $0,24 \pm 0,04 l \cdot l^{-1}$. Rozdíly průměrných hodnot MCHC zjištěné 14. a 16. den pokusu mezi jednotlivými skupinami nebyly statisticky významné. V průměrných hodnotách. 22. den pokusu byl zjištěn malý, ale statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,01$ mezi skupinou K a ostatními skupinami.

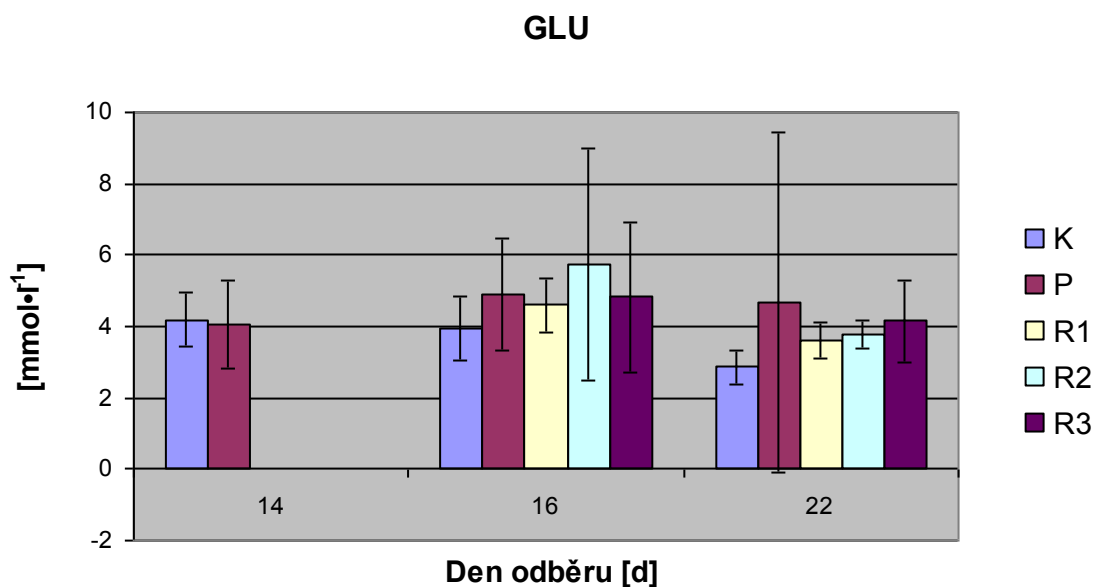


Graf č. 8: Střední barevná koncentrace erytrocytu (MCHC) v litrech na liter ($l \cdot l^{-1}$) po 14, 16 a 22 dnech od zahájení pokusu; K = kontrola; P = $3 \text{ mg} \cdot l^{-1} \text{ NO}_2^-$; R1 = $3 \text{ mg} \cdot l^{-1} \text{ NO}_2^- + 100 \text{ mg} \cdot l^{-1} \text{ Cl}^-$; R2 = $100 \text{ mg} \cdot l^{-1} \text{ Cl}^-$; R3 pitná voda.

4.2. Biochemická analýza

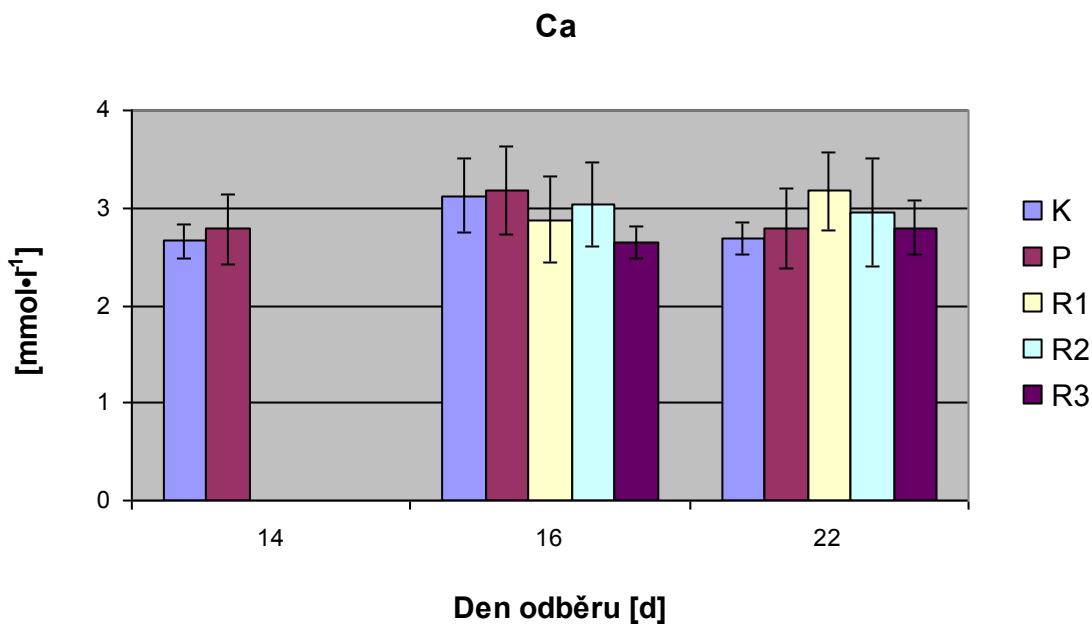
Dusitany (NO_2^-): dusitany byly stanovovány tzv mikrometodou podle Shechtera a kol. (1972). Použitím zvolené metody nebylo možné dusitany v krvi stanovit, neboť koncentrace dusitanů byla pod mezí detekce použité metody ($< 0,05 \text{ mg} \cdot l^{-1} \text{ NO}_2^-$).

Glukóza (GLU): průměrné hodnoty a směrodatné odchylky výběru jsou uvedeny v Grafu č. 9. Z uvedeného grafu vyplývá, že průměrné hodnoty GLU se pohybovaly v rozmezí $2,87 \pm 0,47$ až $5,73 \pm 3,26 \text{ mmol} \cdot l^{-1}$. Nejvyšší průměrná hodnota GLU byla zjištěna po 16 dnech u skupiny R2 a činila $5,73 \pm 3,26 \text{ mmol} \cdot l^{-1}$. Naopak nejnižší průměrná hodnota GLU byla zjištěna po 22 dnech u skupiny K a činila $2,87 \pm 0,47 \text{ mmol} \cdot l^{-1}$. Rozdíly ve zjištěných hodnotách mezi skupinami ryb nebyly statisticky významné.



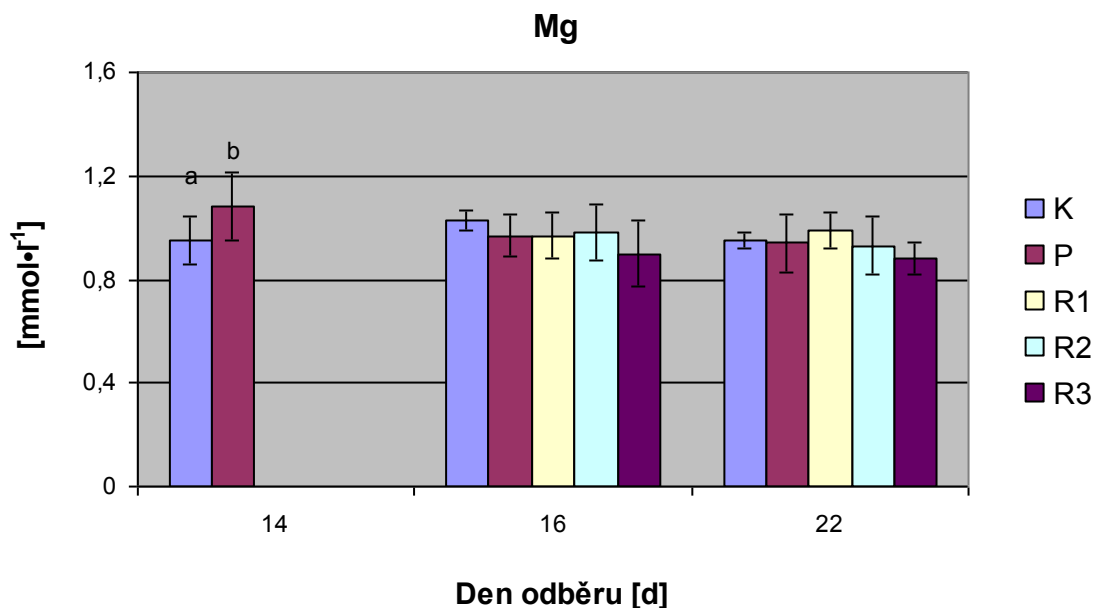
Graf č. 9: Koncentrace glukózy (GLU) v milimolech na litr ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) po 14, 16 a 22 dnech od zahájení pokusu; K = kontrola – pitná voda; P = $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$; R1 = $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^- + 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$; R2 = $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$; R3 pitná voda.

Vápník (Ca): průměrné hodnoty a směrodatné odchylky výběru jsou uvedeny v Grafu č. 10. Z uvedeného grafu vyplývá, že průměrné hodnoty Ca všech skupin ryb se pohybovaly v rozmezí $2,65 \pm 0,16 - 3,18 \pm 0,46 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejvyšší průměrná hodnota Ca byla zjištěna po 16 dnech u skupiny P a činila $3,18 \pm 0,46 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Naopak nejnižší průměrná hodnota Ca byla zjištěna po 16 dnech u skupiny R3 a činila $2,65 \pm 0,16 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jak je patrné z uvedených výsledků a níže uvedeného grafu, průměrné hodnoty Ca byly velmi vyrovnané a zjištěné rozdíly nebyly statisticky významné.



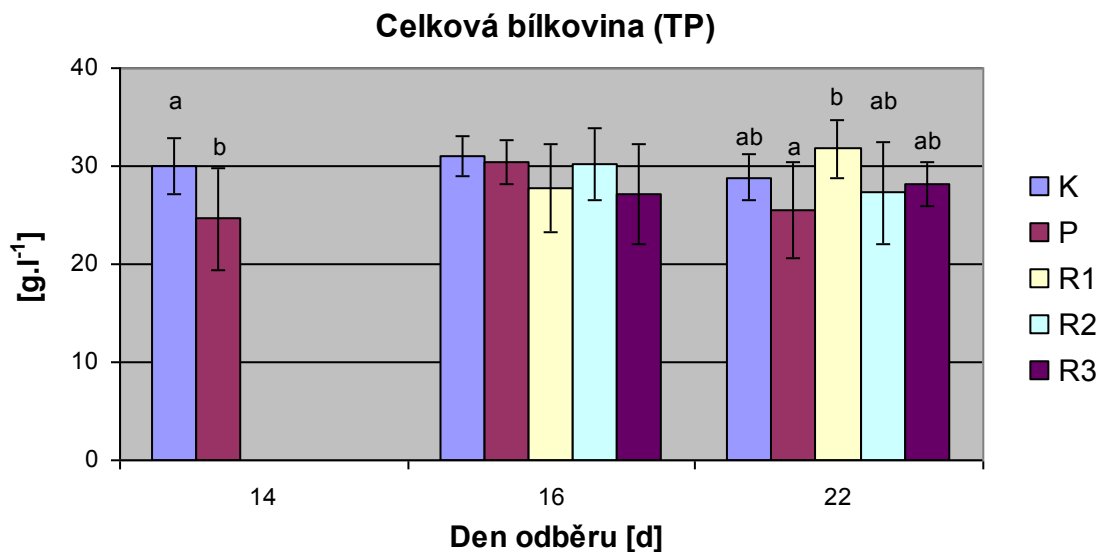
Graf č. 10: Koncentrace vápníku (Ca) v milimolech na litr ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) po 14, 16 a 22 dnech od zahájení pokusu; K = kontrola – pitná voda; P = $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$; R1 = $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^- + 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$; R2 = $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$; R3 pitná voda.

Hořčík (Mg): průměrné hodnoty a směrodatné odchylky výběru jsou uvedeny v Grafu č. 11. Z uvedeného grafu vyplývá, že průměrné hodnoty Mg všech skupin ryb se pohybovaly v rozmezí $0,88 \pm 0,06$ až $1,08 \pm 0,13 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejvyšší průměrná hodnota Mg byla zjištěna po 14 dnech u skupiny P a činila $1,08 \pm 0,13 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Naopak nejnižší průměrná hodnota Mg byla zjištěna po 22 dnech u skupiny R3 a činila $0,88 \pm 0,06 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Bezprostředně po počáteční expozici zvýšené koncentraci dusitanů (14. den pokusu) byl zjištěn u exponovaných ryb nepříliš velký, ale statisticky významný nárůst koncentrace Mg ve srovnání s kontrolou ($P < 0,05$). V následujících dnech ale již byly průměrné koncentrace Mg vyrovnané a rozdíly mezi skupinami nebyly statisticky významné.



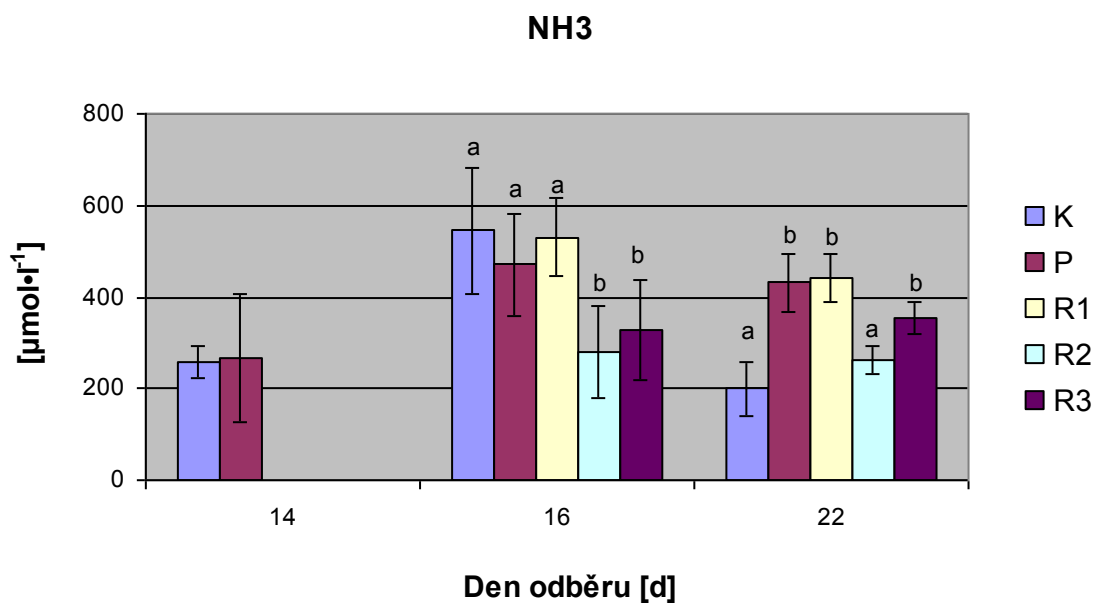
Graf č. 11: Koncentrace hořčíku (Mg) v milimolech na litr ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) po 14, 16 a 22 dnech od zahájení pokusu; K = kontrola- pitná voda; P = $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$; R1 = $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^- + 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$; R2 = $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$; R3 pitná voda.

Celková bílkovina (TP): průměrné hodnoty a směrodatné odchylky výběru jsou uvedeny v Grafu č. 12. Z uvedeného grafu vyplývá, že průměrné hodnoty TP všech skupin ryb se pohybovaly v rozmezí $24,63 \pm 5,15$ až $31,75 \pm 2,96 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejvyšší průměrná hodnota TP byla zjištěna po 22 dnech u skupiny R1 a činila $31,75 \pm 2,96 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Naopak nejnižší průměrná hodnota TP byla zjištěna po 14 dnech u skupiny P a činila $24,63 \pm 5,15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) mezi skupinami P a K byl zjištěn po 14 denní expozici, kdy průměrný obsah TP u skupiny K činil $30 \pm 2,78 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a u skupiny P činil $24,63 \pm 5,15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Dále byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) 22. den pokusu mezi skupinami P a R1, kdy průměrná koncentrace u skupiny P činila $25,5 \pm 4,87 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a u skupiny R1 činila $31,75 \pm 2,96 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.



Graf č. 12: Obsah celkového proteinu (TP) v gamech na litr ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) po 14, 16 a 22 dnech od zahájení pokusu; K = kontrola- pitná voda; P = $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$; R1 = $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^- + 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$; R2 = $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$; R3 pitná voda

Amoniak (NH_3): průměrné hodnoty a směrodatné odchylky výběru jsou uvedeny v Grafu č. 13. Z uvedeného grafu vyplývá, že průměrné hodnoty NH_3 všech skupin ryb se pohybovaly v rozmezí $199,67 \pm 60,13$ až $546 \pm 138,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejvyšší průměrná hodnota NH_3 byla zjištěna 16. den u skupiny K a činila $546 \pm 138,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a nejnižší průměrná hodnota NH_3 byla zjištěna po 22 dnech u téže skupiny a činila $199,67 \pm 60,13 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. 16. den došlo ke zvýšení průměrných hodnot NH_3 u skupin P i K oproti hodnotám zjištěným 14. den pokusu. 16. den pokusu byly zjištěny statisticky významné rozdíly ($P < 0,01$) v obsahu HN_3 mezi skupinami K, P, R1 a skupinami R2, R3. Statisticky významné rozdíly ($P < 0,01$) byly rovněž zaznamenány 22. den pokusu mezi skupinami K, R2 a skupinami P, R1, R3.



Graf č. 13: Koncentrace amoniaku (NH₃) v mikromolech na litr (µmol·l⁻¹) po 14, 16 a 22 dnech od zahájení pokusu; K = kontrola; P = 3 mg·l⁻¹ NO₂⁻; R1 = 3 mg·l⁻¹ NO₂⁻ + 100 mg·l⁻¹ Cl⁻; R2 = 100 mg·l⁻¹ Cl⁻; R3 pitná voda.

5. DISKUZE

Práce byla zaměřena na sledování negativních důsledků subchronické expozice tilápie nilské zvýšené koncentraci dusitanů a na průběh následného regeneračního procesu, který spočíval v převedení exponovaných ryb do vody rozdílných hydrochemických parametrů (rozdílný obsah dusitanů, a chloridů). Sledování vlivu expozice dusitanů i účinnosti regeneračního procesu bylo prováděno na základě změn vybraných hematologických a biochemických parametrů krve. Cílem bylo monitorovat, posoudit a porovnat změny sledovaných parametrů krve pokusných a kontrolních ryb a na základě tohoto sledování navrhnout možnosti, kterými by bylo možno minimalizovat ztráty způsobené sníženou efektivitou chovu v důsledku působení dusitanů. Expoziční koncentrace dusitanů byla záměrně volena tak, aby nepředstavovala pro tilápii nilskou bezprostřední ohrožení života, ale pouze reverzibilně ovlivnila některé ze sledovaných parametrů, na jejichž základě by bylo možno sledovat průběh regenerace. Vzhledem k tomu, že koncentrace chloridů byla ve vodě použité k pokusu velmi nízká ($5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$), byla zvolena i poměrně nízká koncentrace dusitanů ($3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$).

Jak ale ukázala prováděná hematologická a biochemická vyšetření, zvolená koncentrace dusitanů byla natolik nízká, že nevyvolala statisticky významné změny u žádného ze sledovaných parametrů. Možno tedy konstatovat, že expozice dusitanům v koncentraci $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ nepředstavovala pro tyto ryby bezprostřední zdravotní ohrožení. Podobné závěry uvádějí ve své práci Shnel a kol. (2002) kteří prokázali, že lze bezproblémově chovat tilápie nilské dlouhodobě v recirkulačním systému až do tržní velikosti ve vodě s koncentrací dusitanů do $6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$, bohužel v této práci není uvedena koncentrace chloridů, takže exaktní porovnání uvedených hodnot je obtížné. U dospělých tilápií (90,7 g) zjistili Atwood a kol. (2001) letální koncentraci po 96 hodinách $26,3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ při koncentraci chloridů $300 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$. Yanbo a kol. (2006) u plůdku tilápie (2 g) zjistili, že 96hLC50 je $44,67 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ při koncentraci chloridů $70,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$. Z těchto příkladů je jasně patrné, že koncentrace dusitanů zvolená v našem pokusu je podstatně nižší, než uvádějí výše jmenovaní autoři. Jak již ale bylo řečeno, pokusy, které citované práce uvádějí, byly prováděny za podstatně vyšších koncentrací chloridů, takže při volbě expoziční koncentrace dusitanů nebylo možno z těchto výsledků vycházet.

Vzhledem k tomu, že námi zvolená expoziční koncentrace dusitanů byla nízká a výrazně se neprojevila změnami hematologických a biochemických parametrů krve pokusných ryb, není možné hledat optimální způsob regenerace. Jak ukázaly získané výsledky, většina sledovaných parametrů krve odebrané jednotlivým skupinám ryb se výrazně nelišila a nevykazovala statisticky významné rozdíly. Ty se objevují pouze v ojedinělých případech a navíc při poměrně malém rozdílu průměrných hodnot, které nijak zásadně nevybočovaly z hodnot uváděných v literatuře jako běžně nalézané pro tilápii nilskou nebo pro kaprovité ryby.

Určitý pozitivní vliv zvýšené koncentrace chloridů lze pozorovat na příkladu výrazného snížení podílu methemoglobinu, kdy nejnižší hodnota tohoto parametru byla zaznamenána v závěru testu u skupiny ryb, která byla po expozici převedena do vody prosté dusitanů se zvýšenou koncentrací chloridů. Tato hodnota se dokonce statisticky významně lišila od hodnoty zjištěné v kontrolní skupině ryb. Avšak nutno podotknout, že podíl methemoglobinu v žádné skupině ryb nedosáhl hodnot, které by se u ryb běžně nevyskytovaly.

Pozitivní vliv chloridů na odolnost ryb a dalších vodních živočichů je z literatury velmi dobře znám. (Russo a Thurston, 1977; Palachek a Tomasso, 1984; McConnell 1985; Máchová a Svobodová, 2001). Snížení toxicity dusitanů zvýšenou koncentrací chloridů pozorovali také Yanbo a kol. (2006) v pokusu s plůdkem tilápie nilské při koncentracích $35 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a $70 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ chloridů, při kterých zjistili hodnotu 96hLC_{50} $28 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ resp. 96hLC_{50} $45 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NO}_2$. Jako prevence proti toxickému působení dusitanů v recirkulačních systémech se v literatuře doporučuje zvýšení koncentrace chloridů alespoň 100 až $150 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$ (Popma a Masser, 1999). Důležité je znát tzv. chloridové číslo udávající poměr $\text{Cl}^-/\text{NO}_2^- \text{ N}$. V průběhu našeho testu bylo nejnižší chloridové číslo u skupiny P (5,5) při koncentraci dusitanů $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ ($0,91 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{ N}$) a koncentrací chloridů $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. U ostatních skupin bylo toto číslo výrazně vyšší (> 109). Ani výše uvedený nízký poměr $\text{Cl}^-/\text{NO}_2^- \text{ N}$ nevedl u tilápií ke zhoršení jejich zdravotního stavu. To je pravděpodobně dáno nízkou koncentrací dusitanů, která ryby neohrozila ani při tak nízké koncentraci chloridů. Jako vhodný poměr chloridů k dusitanům doporučují Durborow a kol. (1997) pro tilápie chované v rybnících hodnotu vyšší než 10. Naopak Kroupová a kol. (2005b) uvádějí výši tohoto poměru v rozmezí 50 až 150. Tento rozdíl může být vyvolán prostředím, pro které byly tyto poměry stanoveny. V prvním případě, kde se jedná o chov tilápií v rybnících, se může jednat o

podstatně nižší koncentrace dusitanů, než kterým jsou ryby vystavovány v recirkulačních systémech, pro které je tento poměr doporučován ve druhé práci. Toxicitu dusitanů ovlivňují kromě chloridů mnohé další faktory, které v pokusu nebylo nutno brát v úvahu, protože všechny sledované parametry byly porovnávány s parametry zjišťovanými u kontrolních ryb.

5.1. Hematologická vyšetření

Počet erytrocytů (RBC): provedeným pokusem nebyly prokázány statisticky významné rozdíly u jednotlivých skupin ryb a zjištěné hodnoty se pohybovaly v rozmezí $1,28 \pm 0,35$ až $1,73 \pm 0,26 \text{ T}\cdot\text{l}^{-1}$. Na druhé straně je pravdou, že počet erytrocytů u skupiny ryb P vystavených dusitanům při nezvýšené koncentraci chloridů byl v průběhu celého pokusu mírně nižší ve srovnání se skupinou kontrolní K. Welker a kol. (2012), kteří sledovali vliv desetitýdenní expozice tilápií dusitanům v koncentraci $70 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ a $34 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$, prokázali snížení počtu erytrocytů z $1,53$ na $1,28 \text{ T}\cdot\text{l}^{-1}$. Podobně zaznamenali Svobodová a kol. (2005a) statisticky významný pokles erytrocytů ($P \leq 0,05$) při pokusu s dvouletými kapry (*Cyprinus carpio*), kteří byli vystaveni po dobu 96 hodin dusitanům v koncentraci dusitanů $67 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ a chloridů $11 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$. V obou popsáných příkladech bylo statisticky významné snížení počtu erytrocytů prokázáno vždy při výrazně vyšších koncentracích dusitanů (i když při současné vyšší koncentraci chloridů). Gabriel a kol. (2011) zjistili u zdravých tilápií počet erytrocytů v rozmezí $2,05$ až $4,25 \text{ T}\cdot\text{l}^{-1}$. U kapra uvádí Svobodová a kol. (1986) obvyklý počet erytrocytů podobný námi zjištěným hodnotám a to $1,1$ až $1,8 \text{ T}\cdot\text{l}^{-1}$. Předpokládám, že při našem pokusu byla koncentrace dusitanů příliš nízká na to, aby vyvolala statisticky významný rozdíl v počtu erytrocytů.

Počet leukocytů (WBC): z výsledků vyplývá, že vliv dusitanů na počet WBC nebyl prokázán. Počet leukocytů byl mezi skupinami poměrně vyrovnaný a vykazoval v průběhu testu mírně snižující tendenci takřka u všech skupin. Podobně, jako v případě erytrocytů, byly při všech odběrech prokázány snížené hodnoty leukocytů u ryb pokusných (skupina P) ve srovnání s kontrolními (skupina K). Zjištěné rozdíly však nebyly statisticky významné. Hodnoty WBC se pohybovaly v rozmezí $23,44 \pm 8,08$ až $31,56 \pm 14,75 \text{ G}\cdot\text{l}^{-1}$. Vyšší hodnoty WBC ($42,3 \pm 4 \text{ G}\cdot\text{l}^{-1}$) popisují Welker a kol. (2012) u juvenilních tilápií po 10 týdnech při koncentracích $70 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ a $34 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$. Svobodová a kol. (2005a) prokázali v 96 hodinovém pokusu s dvouletými kapry $7,1 \pm$

4,19 G·l⁻¹ při koncentraci dusitanů 67 mg·l⁻¹ NO₂⁻ a chloridů 11 mg·l⁻¹ Cl⁻. Obvyklý počet leukocytů je u tilápií uváděn v širokém rozmezí 118,75 až 93,25 G·l⁻¹ (Hrubec a kol., 2000; Manuel a kol. 2007; Gabriel a kol., 2011). Také u kapra a pstruha duhového uvádí Svobodová a kol. (1986) obvyklý počet leukocytů velmi variabilní a to 10 až 80 G·l⁻¹. Pro prokazatelný pokles počtu leukocytů je pravděpodobně výše koncentrace dusitanů 3 mg·l⁻¹ NO₂⁻ nedostačující.

Množství hemoglobinu (Hb): Z měření prováděných v průběhu našeho pokusu vyplývá, že expozice ryb dusitanům vyvolala mírné snížení koncentrace hemoglobinu. Rozdíl se zvyšoval s dobou expozice a nejvýraznější a také statisticky významný na hladině významnosti $P < 0,05$ byl v závěru pokusu, tedy po 22 dnech expozice ryb dusitanům mezi kontrolní skupinou (K: 76,93 ± 10,73 g·l⁻¹) a pokusnou (P: 62,35 ± 8,25 g·l⁻¹). U ryb ostatních skupin (tedy u ryb, které prodělávaly rekonvalescenci), byla koncentrace hemoglobinu v závěru pokusu rovněž nižší, avšak rozdíl nebyl statisticky významný. Yildiz a kol. (2006) prokázali výrazný pokles hemoglobinu v testu na tilápiích (55 g) již po dvoudenní expozici dusitanům v koncentraci 1,7 mg·l⁻¹ NO₂⁻ při 56 mg·l⁻¹ Cl⁻. Podobné hodnoty Hb (68 ± 8 g·l⁻¹) prokázali Welker a kol. (2012) u juvenilních tilápií po 10 týdenní expozici koncentraci 70 mg·l⁻¹ NO₂⁻ a 34 mg·l⁻¹ Cl⁻ ve srovnání s výsledky před zahájením expozice (72 ± 7 g·l⁻¹). Prokazatelné snížení množství Hb na úroveň 63,40 ± 6,61 g·l⁻¹ zaznamenali Svobodová a kol. (2005a) v 96 hodinovém pokusu, kdy byli dvouletí kapři vystaveni koncentraci dusitanů 67 mg·l⁻¹ NO₂⁻ při koncentraci 11 mg·l⁻¹ Cl⁻. Všechny tyto údaje potvrzují předpoklad autorů Das a kol. (2004), že dlouhodobým působením dusitanů může docházet ke snížení tvorby hemoglobinu. Obvyklé množství hemoglobinu je u tilápií uváděno v rozmezí 39,9 až 70,3 g·l⁻¹ (Hrubec a kol., 2000). U kapra a pstruha duhového uvádí Svobodová a kol. (1986) množství Hb 60 až 100 g·l⁻¹. Naším pokusem bylo prokázáno, že narušení tvorby hemoglobinu může být vyvoláno i expozicí poměrně nízkým koncentracím dusitanů, a to i u tak odolných ryb jako je tilápie nilská, pokud je expozice dostatečně dlouhá (v našem případě 22 dnů). Nutno ale podotknout, že pokles koncentrace hemoglobinu nebyl nijak dramatický a výsledná koncentrace výrazně nevybočuje z běžně uváděných hodnot. Na tomto místě bych rád ještě zmínil příznivý účinek prováděné rekonvalescence, která se projevila u všech zbývajících skupin ryb nižším poklesem koncentrace hemoglobinu a v důsledku toho nebyl zjištěný rozdíl mezi těmito skupinami a skupinou kontrolní statisticky významný.

Hematokritová hodnota (PCV): průměrné hodnoty PCV zjištěné pokusem se pohybovaly v rozmezí $0,21 \pm 0,04$ až $0,26 \pm 0,02 \text{ l}\cdot\text{l}^{-1}$. Celkově lze konstatovat, že výsledky měření byly velmi vyrovnané s výjimkou 16. dne, kdy byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($P < 0,01$) mezi skupinou R1 s průměrem PCV $0,26 \pm 0,02 \text{ l}\cdot\text{l}^{-1}$ a skupinou R3 s průměrem PCV $0,21 \pm 0,04 \text{ l}\cdot\text{l}^{-1}$. Přestože se jedná o statisticky významný rozdíl, rozdíly v průměrných hodnotách jsou velmi malé a v závěru pokusu již žádný z rozdílů nebyl statisticky významný. V literatuře se uvádí jako důsledek expozice ryb dusitanům pokles hematokritové hodnoty (Hilmy a kol., 1987). V našem případě byla po 14ti denní expozici zjištěna mírně vyšší průměrná hematokritová hodnota ve srovnání s kontrolou, ale rozdíl nebyl statisticky významný, což lze opět vysvětlit nízkou expoziční koncentrací. Yildiz a kol. (2006) prokázali výrazný pokles hematokritové hodnoty pokusem na tilápiích (55 g) při dvoudenním testu s koncentracemi $1,7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ a $56 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$. Podobně Welker a kol. (2012) zjistili pokles PCV během 5 týdnů z $0,29$ na $0,21 \text{ l}\cdot\text{l}^{-1}$ u juvenilních tilápií při koncentracích $70 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ a $34 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$. Obvyklá hematokritová hodnota je u tilápií uváděna v širokém rozmezí 17 až 45 % (Hrubec a kol., 2000; Chen a kol. 2003; Manuel a kol. 2007; Gabriel a kol., 2011). Prakticky shodné hodnoty jsou uváděny u kapra a pstruha duhového Svobodová a kol. (1986). Hodnoty hematokritu naměřené v našem pokusu nijak nevybočovaly mimo obvyklé hodnoty výše uvedených autorů, což podporuje výše zmíněné vysvětlení o nízké koncentraci dusitanů během našeho pokusu.

Methemoglobin (MetHb): průměrné hodnoty MetHb se pohybovaly v rozmezí $0,88 \pm 1,58$ až $9 \pm 5,92 \%$. S výjimkou hodnot zjištěných v závěru pokusu nebyly rozdíly statisticky významné, což odpovídá nízké koncentraci dusitanů, které byly ryby vystaveny. Statisticky významné rozdíly, které byly zjištěny v závěru pokusu mezi skupinou kontrolní (K) a skupinou R2 by snad bylo možno vysvětlit absencí dusitanů a zvýšenou koncentrací chloridů ve vodě, ve které byly umístěny ryby této skupiny. Avšak nutno zdůraznit, že žádná z průměrných hodnot nepřekročila hodnotu 10 %, což jsou hodnoty, které nelze považovat u ryb za neobvyklé Beutler (1968). Hodnoty methemoglobinu naměřené u kontrolních ryb, které nebyly vystaveny dusitanům, lze vysvětlit tvorbou methemoglobinu, který vzniká samovolně autooxidací hemoglobinu, jak uvádí Kiese (1974).

Citlivější reakci tilápií (55 g) na přítomnost dusitanů ve vodě prokázali Yildiz a kol. (2006), kteří zjistili po dvoudenní expozici ryb dusitanům v koncentraci $1,7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$

a $56 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$ zvýšený podíl MetHb ($16,83 \pm 0,41 \%$) a při koncentraci dusitanů $4,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ byl podíl MetHb $36,66 \pm 1,02 \%$. Welker a kol. (2012) zjistili razantní nárůst methemoglobinu během 5 týdnů na 86% a po 10 týdnech dokonce na $93,7 \%$ u juvenilních tilápií, které byly vystaveny koncentraci $70 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ při $34 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$. Tyto studie potvrzují, že ryby (a zvláště tilápie) jsou schopny odolávat vysoké hladině methemoglobinu (Williams a Eddy, 1988; Kamstra a kol., 1996). Obvyklé hodnoty methemoglobinu u tilápií jsou uváděny v rozmezí $4,2$ až $8,6 \%$ (Welker a kol., 2012). Výsledky našeho pokusu naznačují, že při koncentraci dusitanů $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ nedochází k výraznému nárůstu MethHb nad obvyklou úroveň zjišťovanou u tilápie nilské.

Střední objem erytrocytu (MCV): z výsledků pokusu vyplývá, že hodnoty MCV se mezi skupinami nelišily. K výraznému poklesu MCV došlo mezi 14. a 16. dnem u všech skupin bez průkazného vlivu rozdílných koncentrací sledovaných látek. Průměrné hodnoty MCV se pohybovaly v rozmezí $138,06 \pm 27,27$ až $195,44 \pm 22,49$ fl. Svobodová a kol. (2005a) však neprokázali změnu v MCV po 96 hodinovém pokusu s dvouletými kapry při koncentracích dusitanů $67 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ a chloridů $11 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$, ale jisté snížení této hodnoty prokázali s navýšením chloridů na $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$. Gabriel a kol. (2011) zjistili obvyklé hodnoty MCV u tilápií nilských (246 g) chovaných v recirkulačních systémech v rozmezí 79 až 87 fl a ve vodní nádrži v rozmezí 49 až 51 fl. U kapra uvádí Svobodová a kol. (1986) hodnotu MCV 200 až 300 fl a u pstruha duhového 350 až 400 fl. Ze srovnání s výše uvedenými autory je zřejmé velké rozpětí hodnot MCV u ryb. Z výsledků našeho pokusu vyplývá, že dusitany v námi použité koncentraci nemají na hodnotu MCV vliv.

Hemoglobin erytrocytu (MCH): provedeným pokusem nebyl prokázán vliv dusitanů na MCH. Z výsledků vyplývá, že průměrné hodnoty MCH byly u všech skupin ryb značně vyrovnané a pohybovaly se v rozmezí $36,4 \pm 6,32$ až $53,52 \pm 18,5$ pg. 16. den pokusu došlo k poklesu průměrných hodnot MCH u všech skupin ryb. Nebyla však prokázána závislost na odlišných koncentracích sledovaných látek mezi skupinami. Svobodová a kol. (2005a) však neprokázali změnu v MCH po 96 hodinovém pokusu s dvouletými kapry při koncentracích dusitanů $67 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ a chloridů $11 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$. Gabriel a kol. (2011) zjistili obvyklé hodnoty MCH u tilápií nilských (246 g) chovaných v recirkulačních systémech v rozmezí 18 až 24 pg, a v rozmezí 16,6 až 17 pg. U kapra uvádějí Svobodová a kol. (1986) množství MCH 50 až 60 pg a u pstruha duhového 65 až 75 pg. Výsledky pokusu naznačují, že se hodnoty MCH výrazně neliší od hodnot

popsaných v literatuře. Proto se porovnáním s výše uvedenými autory domnívám, že koncentrace dusitanů použitá v našem pokusu neměla negativní vliv na množství MCHC.

Střední barevná koncentrace (MCHC): z výsledků vyplývá, že průměrné hodnoty MCHC všech skupin ryb se pohybovaly v rozmezí $0,24 \pm 0,04$ až $0,32 \pm 0,03 \text{ l}\cdot\text{l}^{-1}$. V závěru pokusu se prokázaly statistické odlišnosti ($P < 0,01$) mezi kontrolou ($0,32 \pm 0,03 \text{ l}\cdot\text{l}^{-1}$) a ostatními skupinami. ($0,27$ až $0,28 \pm 0,02 \text{ l}\cdot\text{l}^{-1}$). Tyto rozdíly ale byly z celkového pohledu malé. Svobodová a kol. (2005a) zjistili po 96 hodinovém pokusu s dvouletými kapry při koncentracích dusitanů $67 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ a chloridů $11 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$ vyšší hodnotu MCHC ($0,27 \text{ l}\cdot\text{l}^{-1}$) u pokusných ryb ve srovnání s kontrolou ($0,20 \text{ l}\cdot\text{l}^{-1}$). Gabriel a kol. (2011) zjistili obvyklé hodnoty MCHC u tilápií nilských (246 g) chovaných v recirkulačních systémech v rozmezí $0,23$ až $0,29 \text{ l}\cdot\text{l}^{-1}$ a ve vodní nádrži v rozmezí $0,33$ až $0,35 \text{ l}\cdot\text{l}^{-1}$. U kapra uvádějí Svobodová a kol. (1986) obvyklé množství MCHC $0,2$ až $0,26 \text{ l}\cdot\text{l}^{-1}$ a u pstruha duhového $0,17$ až $0,2 \text{ l}\cdot\text{l}^{-1}$. Srovnáním s výše uvedenými příklady lze konstatovat, že množství dusitanů v našem pokusu nemá negativní vliv na MCHC.

5.2. Biochemická analýza

Dusitany (NO_2^-): v provedeném pokusu se nepodařilo detekovat obsah dusitanů v krevní plazmě. Mez detekce metody (Shechter a kol., 1972) se pohybuje na úrovni $0,05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$. Koncentrace dusitanů v krevní plazmě se tedy pravděpodobně pohybovala pod výše uvedenou hodnotou. U většiny sledovaných druhů ryb lze naměřit vyšší hodnoty dusitanů v krevní plazmě, než jaké jsou v okolní vodě. Toto potvrzují studie na tilápiích (Yildiz a kol., 2006; Palachek a Tomasso, 1984), zároveň se shodují, že ryby dusitany v krvi aktivně soustřeďují. Vysvětlením mohou být fyziologické pochody u ryb (Margiocco a kol., 1983). Pokusem na tilápiích nilských (55 g) zjistili Yildiz a kol. (2006) koncentraci dusitanů v krevní plazmě $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ -N ($50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$) při dvoudenním testu s koncentracemi $4,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ a $56 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$.

Glukóza (GLU): pokusem se neprokázal vliv dusitanů na koncentraci glukózy. Z měření vyplývá, že průměrné hodnoty GLU se pohybovaly v rozmezí $2,87 \pm 0,47$ až $5,73 \pm 3,26 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. V průběhu pokusu byly hodnoty poměrně vyrovnané a nevykazovaly žádný trend. Obvyklé hodnoty GLU uváděné v literatuře pro tilápii nilskou se pohybují v rozmezí $2,5$ až $5,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GLU (Hrubec a kol., 2000; Chen a

kol., 2003; Manuel a kol., 2007; Kolářová a Velíšek 2012). Hodnoty GLU se od obvyklých hodnot uváděných v literatuře neliší.

Vápník (Ca): pokusem nebyl neprokázán vliv dusitanů na koncentraci vápníku. Průměrné hodnoty Ca všech skupin ryb se pohybovaly v rozmezí $2,65 \pm 0,16 - 3,18 \pm 0,46 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a byly značně vyrovnané. Obvyklé hodnoty Ca uváděné pro tilápii nilskou se v literatuře uvádějí v rozmezí 2,7 až $4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ca (Kolářová a Velíšek 2012), vyšší obvyklé hodnoty Ca v recirkulačních systémech ($4,35$ až $7,75 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) uvádějí (Hrubec a kol., 2000; Chen a kol., 2003; Manuel a kol., 2007), zároveň však popisují velkou individuální rozkolísanost. Vyšší hodnoty vápníku mohou být způsobeny metabolickými pochody.

Hořčík (Mg): průměrné hodnoty Mg byly téměř vyrovnané ve všech skupinách a pohybovaly se v rozmezí $0,88 \pm 0,06$ až $1,08 \pm 0,13 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Přesto byl 14. den pokusu zjištěn u exponovaných ryb nepřilíš velký, ale statisticky významný ($P < 0,05$) nárůst koncentrace Mg ($1,08 \pm 0,13 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) ve srovnání s kontrolou ($0,95 \pm 0,09 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). V následujícím měření však tento rozdíl nebyl patrný. Obvyklé hodnoty Ca uváděné pro tilápii nilskou se v literatuře uvádějí v rozmezí 0,8 až $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ca (Hrubec a kol., 2000; Chen a kol., 2003; Manuel a kol., 2007; Kolářová a Velíšek 2012). Hodnoty Mg zjištěné pokusem se shodují s obvyklými hodnotami Mg popisovanými v literatuře.

Celková bílkovina (TP): průměrné hodnoty TP všech skupin ryb se pohybovaly v rozmezí $24,63 \pm 5,15$ až $31,75 \pm 2,96 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) v obsahu TP po 14 denní expozici mezi, K ($30 \pm 2,78 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) a skupinou P ($24,63 \pm 5,15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) byl v následujících odběrech podpořen, ovšem nebyl již statisticky prokázán. Zjištěný statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) 22. den pokusu mezi skupinami P a R1, kdy průměrná koncentrace u skupiny P činila $25,5 \pm 4,87 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a u skupiny R1 činila $31,75 \pm 2,96 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, se nevyznačoval trendem v průběhu celého pokusu a byl ve svém případě ojedinělý. Nelze to proto považovat za jasný ukazatel. Obvyklé hodnoty TP uváděné pro tilápii nilskou se v literatuře uvádějí v rozmezí 24 až $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ TP (Kolářová a Velíšek 2012). Hodnoty TP zjištěné pokusem se shodují s obvyklými hodnotami popisovanými v literatuře.

Amoniak (NH₃): provedeným pokusem se neprokázal vliv dusitanů na koncentraci NH₃ v krevní plazmě. Průměrné hodnoty NH₃ všech skupin ryb se pohybovaly

v rozmezí $199,67 \pm 60,13$ až $546 \pm 138,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. 16. den došlo ke zvýšení průměrných hodnot NH_3 u skupin P i K oproti hodnotám zjištěným 14. den pokusu. 16. den pokusu byly zjištěny statisticky významné rozdíly ($P < 0,01$) v obsahu NH_3 , které byly také zaznamenány 22. den pokusu mezi skupinami K, P, R1 a skupinami R2, R3. Statisticky významné rozdíly ($P < 0,01$) byly rovněž zaznamenány mezi skupinami K, R2 a skupinami P, R1, R3 22. den pokusu. Tyto zjištěné hodnoty však vzájemně nevykazovaly výrazný trend. Obvyklé hodnoty NH_3 uváděné pro tilápii nilskou se v literatuře pohybují v rozmezí 154 až $593 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_3 (Kolářová a Velíšek, 2012). Tito autoři zdůrazňují, že hladina amoniaku je v krevní plazmě velice variabilní v důsledku působení různých faktorů. Hodnoty NH_3 zjištěné naším pokusem se shodují s obvyklými hodnotami NH_3 popisovanými v literatuře. Proto lze konstatovat, že hladina dusitanů použitá v našem pokusu neměla na koncentraci NH_3 vliv.

6. ZÁVĚR

Provedeným testem na tilápii nilské bylo prokázáno, že čtrnáctidenní ani dvaadvacetidenní expozice dusitanům v koncentraci $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ při koncentraci chloridů $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$ nevyvolala zásadnější změny ve sledovaných základních hematologických a biochemických parametrech krve. Výjimkou byl mírný pokles koncentrace hemoglobinu u pokusných ryb ve srovnání s kontrolními rybami, který byl zjištěn v závěru pokusu, tedy po 22 dnech expozice ryb dusitanům. Přes některé odchylky zjištěné mezi pokusnými a kontrolními rybami prakticky žádný ze sledovaných parametrů nedosáhl hodnot, které by vybočovaly z mezí uváděných pro dané hematologické a biochemické parametry tilápie nilské nebo kapra obecného, které jsou považovány za běžně se vyskytující. V průběhu testu nebyly zaznamenány ani úhyny pokusných ryb, ani změny v jejich chování ve srovnání s kontrolními. Provedená sledování prokázala, že tilápie nilská velmi dobře snáší výše uvedenou koncentraci dusitanů při nízké koncentraci chloridů ($5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$). Z toho důvodu nebylo možno objektivně vyhodnotit účinnost rozdílných podmínek regenerace ryb po provedené expozici dusitanům.

Provedený pokus potvrdil obecně známá tvrzení o vysoké odolnosti tilápie nilské vůči dusitanům. Tato odolnost předurčuje tilápii k chovu v intenzivní akvakultuře, kde se zvýšené koncentrace dusitanů za určitých podmínek objevují. Naopak tento druh ryby není pro zmíněnou odolnost vhodný jako modelový organizmus ke sledování negativních vlivů vnějšího prostředí na jeho zdravotní stav.

Pro následující studie zabývající se vlivem dusitanů a chloridů na zdravotní stav tilápie nilské bych doporučil používat při srovnatelných koncentracích chloridů výrazně vyšší koncentraci dusitanů, než jaká byla použita v našem pokusu.

7. SEZNAM LITERATURY

- Adámek, Z., 1994. Letní chov tilapie a sumečka afrického v rybnících. Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany, č. 43, 12 s.
- Aggergaard, S., Jensen, F.B., 2001. Cardiovascular changes and physiological response during nitrite exposure in rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 59, 13–27.
- Arillo, A., Gaino, E., Margiocco, C., Mensi, P., Schenone, G., 1984. Biochemical and ultrastructural effects of nitrite in rainbow trout: Liver hypoxia as the root of the acute toxicity mechanism. *Environmental Research* 34, 135–154.
- Atwood, H.L., Fontenot, Q.C., Tomasso, J.R., Isely, J.J., 2001. Toxicity of nitrite to Nile tilapia: effect of fish size and environmental chloride. *North American Journal of Aquaculture* 63, 49–51.
- Avilez, I.M., Altran, A.E., Aguiar, L.H., Moraes, G., 2004. Hematological responses of the Neotropical teleost matrinxã (*Brycon cephalus*) to environmental nitrite. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology & Pharmacology* 139, 135–139.
- Avnimelech, Y., Weber, B., Hepher, B., Milstein, A., Zorn, M., 1986. Studies in circulated fish ponds: organic matter recycling and nitrogen transformation. *Aquaculture and Fisheries Management* 17, 231–242.
- Baccarin, A.E., Camargo, A.F.M., 2005. Characterization and evaluation of the impact of feed management on the effluents of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48, 81–90.
- Balarin, J.D., Haller, R.D., 1982. The intensive culture of tilapia in tanks, raceways and Cages In: Muir, J.F., Roberts, R.J. (Eds.), *Recent advances in aquaculture*. Croom Helm, London, England, pp.265–355.
- Bardach, J.E., Ryther, J.H., McLarney, W.O., 1972. *Aquaculture, the farming and husbandry of fresh water and marine organisms*. Wiley-interscience Inc, New York, 868 p.
- Bartlett, F., Neumann, D., 1998. Sensitivity of Brown Trout Alevins (*Salmo trutta L.*) to Nitrite at Different Chloride Concentrations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 340–346.

- Beutler, E., 1968. Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism. Grune and Stratton, New York, 185 p.
- Bondad-Reantaso, M.G. (Ed.), 2007. Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture, FAO, Rome, 628 p.
- Bowser, P.R., Falls, W.W., VanZandt, J., Collier, N., Phillips, J.D., 1983. Methemoglobinemia in channel catfish: methods of prevention. *Progressive Fish-Culturist* 45, 154–158.
- Brown, D.A., McLeay, D.J., 1975. Effect of nitrite on methaemoglobin and total haemoglobin of juvenile rainbow trout. *Progressive Fish-Culturist* 37, 36–43.
- Burchell II, M.R., Skaggs, R.W., Lee, C.R., Broome, S., Chescheir, G.M., Osborne, J., 2007. Substrate organic matter to improve nitrate removal in surface-flowconstructed wetlands. *Journal of Environmental Quality* 36, 194–207.
- Cameron, J.N., 1971. Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology A, Comparative Physiology* 40, 743–749.
- Campbell, J.W., 1991. Excretory nitrogen metabolism. In *Comparative Animal Physiology: Environmental and Metabolic Animal Physiology* (ed. Prosser C.L.), New York, Wiley-Liss, pp. 277–324.
- Colt, J., Ludwig, R., Tchobanoglous, G., Cech, J.J., 1981. The effect of nitrite on the short-term growth and survival of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 24, 111–122.
- Crawford, R.E., Allen, G.H., 1977. Seawater inhibition of nitrite toxicity to chinook salmon. *Transactions of the American Fisheries Society* 106, 105–109.
- ČSN EN ISO 10229 Jakost vod, 1996. Stanovení subchronické toxicity látek pro sladkovodní ryby – Metoda vyhodnocení účinků látek na růstovou rychlost pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Teleostei, Salmonidae)). ČNI Praha, 20 s.
- Das, P.C., Ayyappan, S., Jena, J.K., Das, B.K., 2004. Nitrite toxicity in *Cirrhinus mrigala* (Ham.): acute toxicity and sub-lethal effect on selected haematological parameters. *Aquaculture* 235, 633–644.
- De Yong, Y.S.D.M. (Ed.), 2004. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) In: *Fauna Europaea Name Search* [online]. © Copyright Fauna Europaea 2000 – 2013. Dostupné z: [url: http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=304880](http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=304880)

- Doblender, C., Lackner, R., 1996. Metabolism and detoxification of nitrite by trout hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1289, 270–274.
- Doblender, C., Lackner, R., 1997. Oxidation of nitrite to nitrate in isolated erythrocytes: a possible mechanism for adaptation to environmental nitrite. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 157–161.
- Durborow, R.M., Crosby, D.M., Brunson, M.W., 1997. Nitrite in fish ponds. Southern Regional Aquaculture Center, 462 p.
- Dvořák P., 2004. Vybraná specifika onemocnění akvarijských ryb. *Bulletin VÚRH Vodňany* 40, 101–108.
- Eddy F.B., Kunzlik P.A., Bath R.N., 1983. Uptake and loss of nitrite from the blood of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L. in fresh water and in dilute sea water. *Journal of Fish Biology* 23, 105–116.
- EIFAC, 1984. Water quality criteria for European freshwater fish: Report on nitrite and freshwater fish. EIFAC Technical Paper, 46, 19 p.
- Ekmath, E.A., Hulata, G., 2009. Use and exchange of genetic resources of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Reviews in Aquaculture* 1, 197–213.
- Faulwetter, J.L., Gagnon, V., Sundberg, C., Chazarenc, F., Burr, M.D., Brisson, J., Camper, A.K., Stein, O.R., 2009. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. *Ecological Engineering* 35, 987–1004.
- Fitzsimmons, K., 2006. Prospect and potential for global production. In: *Tilapia: biology, culture, and nutrition*. (Lim, C.E. and Webster, C.D., Eds.), The Haworth Press Inc, Binghamton, New York, USA, pp.51–72.
- Fontenot, Q.C., Isely, J.J., Tomasso, J.R., 1999. Characterization and inhibition of nitrite uptake in shortnose sturgeon fingerlings. *Journal of Aquatic Animal Health* 11, 76–80.
- Fryer, G., Illes, T.D., 1972. *The cichlid fishes of the Great lakes of Africa*. Oliver and Boyd, Scotland, 641 p.
- Gabriel, U.U., Akinrotimi, O.A., Eseimokumoh, F., 2011. Haematological Responses of Wild Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* after Acclimation to Captivity. *Jordan Journal of Biological Sciences* 4, 225–230.

- Greiner, A.D., Timmons, M.B., 1998. Evaluation of the nitrification rates of microbead and trickling filters in an intensive recirculating tilapia production facility. *Aquaculture engineering* 18, 189–200.
- Hilmy, A.M., El-Domiaty, N.A., Wershana, K., 1987. Acute and chronic toxicity of nitrite to *Clarias lazera*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 86, 247–253.
- Hofer, R., Gatumu, E., 1994. Necrosis of trout retina (*Oncorhynchus mykiss*) after sublethal exposure to nitrite. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 26, 119–123.
- Hrubec, T.C., Cardinale, J.L., Smith, S.A., 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Veterinary Clinical Pathology* 29, 7–12.
- Huey, D.W., Beiting, T.L., 1982. A hemoglobin reductase system in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Canadian Journal of Zoology* 60, 1511–1513.
- Huey, D.W., Simco, B.A., Criswell, D.W., 1980. Nitrite-induced methemoglobin formation in channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society* 109, 558–562.
- Charo-Karisa, H., Rezk, M.A., Bovenhuis, H., Komen, H., 2005. Heritability of cold tolerance in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, juveniles. *Aquaculture* 249, 115–123.
- Chen, C-Y., Wooster, G.A., Getchell, R.G, Bowser, P.A., Timmons, M.B., 2003. Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis-affected and ozone-treated tilapia in a recirculating system, with application of discriminant analysis. *Aquaculture* 218, 89–102.
- Chervinski, J., 1982. Environmental physiology of tilapia. In: R.S.V. Pullin, H.R. Lowe McConnell (Eds.), *The Biology and Culture of Tilapia*, ICLARM Conference Proceedings, 7, International Centre for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines, pp.119–128.
- Chetty, C.S., Chandaramohan, R.N., Srinivasa, Y.R., Aruna, P., Swami, K.S., 1980. Tolerance limits and detoxification mechanism in the fish *Tilapia mossambica* subjected to ammonia toxicity. *Indian fish* 27, 177–182.

- Jensen, F.B., 1990. Nitrite and red cell function in carp: control factors for nitrite entry, membrane potassium ion permeation, oxygen affinity and methaemoglobin formation. *Journal of Experimental Biology* 152, 149–166.
- Jensen, F.B., 1995. Uptake and effects of nitrite and nitrate in animals. In: Walsh P.J., Wright P. (Eds.): *Nitrogen Metabolism and Excretion*. CRC Press, Boca Raton, pp. 289–303.
- Jensen, F.B., 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A*, 135, 9–24.
- Jensen, F.B., Andersen, N.A., Heisler, N., 1987. Effects of nitrite exposure on blood respiratory properties, acid – base and electrolyte regulation in the carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Comparative Physiology B* 157, 533–541.
- Kalous, L., 2011. *Akvakultura - přednášky*, ČZU, Praha.
- Kamstra, A., Span, J.A., Van Weerd, J.H., 1996. The acute toxicity and sublethal effects of nitrite on growth and feed utilization of European eel, *Anguilla anguilla* (L.). *Aquaculture Research* 27, 903–911.
- Kharter, A.A., Smitherman, R.O., 1988. Cold tolerance and growth of three strains of *Oreochromis niloticus*. In: *The second international symposium on tilapia in aquaculture, ICLARM Conference proceedings* 15, pp. 215–218.
- Kiese, M., 1974. *Methaemoglobinaemia: A Comprehensive Treatise*. CRC Press, Cleveland, OH, 260 p.
- Kolářová, J., Velíšek, J., 2012. Stanovení a vyhodnocení biochemického profilu krve ryb. Edice metodik Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, č. 135, 54 s.
- Kozák, P., Máchová, J., Polícar, T., 2005. The effect of chloride content in water on the toxicity of sodium nitrite for spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus* RAF.). *Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture* 376, 705–714
- Kroupová, H., Máchová, J., Svobodová, Z., 2005a. Nitrite influence on fish – a Review. *Veterinární medicína Praha* 50, 461–471.
- Kroupová, H., Máchová, J., Svobodová, Z., 2005b. Dusitany ve vodním prostředí a jejich účinky na ryby - přehled. *Bulletin VÚRH Vodňany* 41, 154–164.

- Kroupová, H., Máchová, J., Svobodová Z., Valentová O., 2004. Akutní toxicita dusitanů pro *Poecilia reticulata*. In: Spurný, P. (Ed.): „55 let výuky rybářské specializace na MZLU v Brně“, 30.11. – 1.12.2004, Brno, 237–245.
- Krous, S.R., Blazer, V.S., Meade, T.L., 1982. Effects of acclimation time on nitrite movement across the gill epithelia of rainbow trout: the role „chloride cells“. *Progressive Fish-Culturist* 44, 126–130.
- Kutty, M.N., 1972. Respiratory quotient and ammonia excretion in *Tilapia mossambica*. *Marine biology* 16, 126–133.
- Lewis, W.M., Morris, D.P., 1986. Toxicity of Nitrite to Fish: A Review. *Transaction of the American Fisheries Society* 115, 183–195.
- Linhart, O., Hamáčková, J., Kahanec, M., 2004. Řízená reprodukce ryb, VÚRH JU Vodňany.
- Love M.R., 1980. The chemical biology of fishes. Academic Press, New York, vol. 2, pp. 1968–1977.
- Maetz J., 1971. Fish gills: mechanism of salt transfer in fresh water and sea water. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 262, 209–249.
- Máchová, J., Kroupová, H., Piačková, V., Hamáčková, J., Valentová, O., 2004a. Acute toxicity of nitrite for fish in relation to chloride concentration in water. In: *Ochrana zdravia ryb – aktualne problémy*, Instytut Rybactwa Śródladowego Olsztyn, 275 s.
- Máchová, J., Kroupová, H., Svobodová, Z., Valentová, O., Piačková, V., Hamáčková, J., 2004b. Tvorba methemoglobinu u tilápie nilské (*Oreochromis niloticus*) jako důsledek zvýšené koncentrace dusitanů ve vodě. Sborník příspěvků ze 7. české ichtiologické konference, Vodňany 6. – 7.5. 2004, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, VÚRH Vodňany, 137–142.
- Máchová, J., Svobodová, Z., 2001. Nitrite toxicity for fish under experimental- and farming conditions. In: 10th International conference of the EAFP Diseases of Fish and shellfish, Dublin, 9th – 14th September 2001, Poster No. 275.
- Margiocco, C., Arillo, A., Mensi, P., Shenone, G., 1983. Nitrite bioaccumulation in *Salmo gairdneri* Rich. and haematological consequences. *Aquatic Toxicology* 3, 261–270.

- Mauel, M.J., Miller, D.L., Merrill, A.L., 2007. Hematologic and plasma biochemical values of healthy hybrid tilapia (*Oreochromis aureus* × *Oreochromis nilotica*) maintained in a recirculating system. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 38, 420–424.
- McConnell, R., 1985. Toxicity of nitrite to the fathead minnow. Colorado Department of Health File Report, Denver.
- McAndrew, B.J., 2000. Evolution, phylogentic relationships and biogeography. In: Beveridge, M.C.M., McAndrews, B.J. (Eds.), *Tilapias: Biology and exploitation*. London, England. Kluwer Academic Publisher, pp. 1–32.
- Miller, W.W., 1995. *Tilapia – aquaculture curriculum guide*, United States Department of Agriculture, Ames.
- Mitsch, W.J.; Gosselink, J.G., 2007. *Wetlands*. New Jersey, Hoboken, 582 pp.
- OECD Guideline for Testing of Chemicals 204 Fish, 1984. Prolonged Toxicity Test: 14-day Study. 9 p.
- Palachek, R.M., Tomasso, J.R., 1984. Toxicity of nitrite to channel catfish (*Ictalurus punctatus*), tilapia (*Tilapia aurea*), and largemouth bass (*Micropterus salmoides*): evidence for a nitrite exclusion mechanism. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 41, 1739–1744.
- Perrone, S.J., Meade, T.L., 1977. Protective effect of chloride on nitrite toxicity to coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34, 486–492.
- Perry, S.F., Goss, G.G., Laurent, P., 1992. The interrelationships between gill chloride cell morphology and ionic uptake in 4 fresh-water teleosts. *Canadian Journal of Zoology* 70, 1775–1786.
- Phillippart, J.C. and Ruwet, J.C., 1982. Ecology and distribution of tilapias, in: Pullin, R.S.V., Lowe-McConnell, R.H. (Eds.), *The biology and culture of tilapias*. Manila Philippines: ICLARM Conference Proceedings 7, pp. 15–59.
- Piskač, A., Bartík, M., Kačmár, P., Procházka, Z., Svobodová, Z., Šikula, J., 1985. *Veterinární toxikologie*. SZN Praha, 254 s.
- Pitter, P., 2009. *Hydrochemie*. Vydavatelství VŠCHT, Praha. 592 s.

- Popma, T., Masser, M., 1999. Tilapia Life History and Biology. SRAC Publication No. 283. Stoneville, MS: Southern Regional Aquaculture Center.
- Pullin, R.S., Lowe-McConnell, R.H. (Eds.), (1982). The Biology and Culture of Tilapias. In: Proceedings of the International Conference on the Biology and Culture of Tilapias. 2-5 September 1980 at the Study and Conference Center of the Rockefeller Foundation, Bellagio, Italy (Vol. 7). The WorldFish Center.
- Rakocy, J.E., Brunson, M.W., 1989. Tank culture of tilapia. College Station, Texas: Southern Regional Aquaculture Center, No. 282, 4 p.
- Rakocy, J.E., Nair, A., Bailey, D.S., 1989. Performance of cage- cultured *Tilapia nilotica* and *Tilapia aurea* and three varieties of red tilapia, *Journal of the World Aquaculture Society* 20, 64.
- Reddy, K.R., Patrick, W.H., Broadbent, F.E. 1984. Nitrogen transformations and loss in flooded soils and sediments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 13, 273–309.
- Rombough, P.J., Moroz, B.M. 1990. The scaling and potential importance of cutaneous and branchial surfaces in respiratory gas exchange in young chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of experimental biology* 154, 1–12.
- Ruiz, G., Jeison, D., Chamy, R., 2003. Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Water Res* 37, 1371–1377.
- Russo, R.C., Smith, C.E., Thurston, R.V., 1974. Acute toxicity of nitrite to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 31, 1653–1655.
- Russo, R.C., Thurston, R.V., 1977. The acute toxicity of nitrite to fishes. In: Tubb, R.A. (Ed.), *Recent Advances in Fish Toxicity*. EPA-600/3-77-085. US Environmental protection Agency, Corvallis, OR, pp. 118–131.
- Russo, R.C., Thurston, R.V., Emerson, K., 1981. Acute toxicity of nitrite to rainbow trout (*Salmo gairdneri*): effect of pH, nitrite species, and anion species. *Canadian Journal of the Fisheries and Aquatic Sciences* 38, 387–393.
- Shechter, H., Gruener, N., Shubal, H.I., 1972. Micromethod for the determination of nitrite in blood. *Analytica chimica acta* 60, 93–99.

- Shnel, N., Barak, Y., Ezer, T., Dafni, Z., van Rijn, J., 2002. Design and performance of a zero-discharge tilapia recirculating system. *Aquacultural Engineering* 26(3), 191–203.
- Snoeyink, V.L., Jenkins, D., 1980. *Water Chemistry*. John Wiley and Sons Inc, New York.
- Spurný, P., 1998. *Ichtyologie*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita.
- Stickney, R.R., 1986. Tilapia tolerance of saline waters: a review. *Progressive Fish Culturist* 48, 161–167.
- Stormer, J., Jensen, F.B., Rankin, J.C. 1996. Uptake of nitrite, nitrate, and bromide in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): effects on ionic balance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, 1943–1950.
- Sundberg, C., Stendahl, J.S.K., Tonderski, K., Lindgren, P.E., 2007. Overland flow systems for treatment of landfill leachates - potential nitrification and structure of the ammonia-oxidizing bacterial community during a growing season. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 127–138.
- Suresh, A.V., Lin, C.K., 1992. Tilapia culture in saline waters: a review. *Aquaculture* 106, 201–226.
- Svobodová, Z., Gelnarová, J., Justýn, J., Krupauer, V., Máchová, J., Šimanov, L., Valentová, V., Vykusová, B., Wohlgemuth, E., 1987. *Toxikologie vodních živočichů*. Vydavatelství MZVŽ a CSR, Praha, 231 s.
- Svobodová, Z.; Máchová, J.; Drastichová, J.; Groch, L.; Lusková, V.; Poleszczuk, G.; Velišek, J.; Kroupová, H., 2005a: Haematological and biochemical profiles of carp blood following nitrite exposure at different concentrations of chloride. *Aquaculture Research* 36, 1177–1184.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Poleszczuk, G., Hůda, J., Hamáčková, J., Kroupová, H., 2005b. Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems. *ACTA Veterina Brno* 74, 129–137.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Kroupová, H., 2008. Otravy ryb. In: Svobodová, Z., (Ed.), *Veterinární toxikologie v klinické praxi*. Profi Press, Praha, 201–217.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Paláčková, J., 1986. Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb. *Edice metodik VÚRH JU* č. 22, 36s.

- Teichert-Coddington, D.R., Green, B.W., 1993. Tilapia yield improvement through maintenance of minimal oxygen concentrations in experimental grow-out ponds in Honduras. *Aquaculture* 118, 63–71.
- Thurston, R.V., Russo, R.C., Vinogradov, G.A., 1983. Acute toxicity of ammonia to rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society* 112, 696–704.
- Toet, S., Huibers, L.H.F.A., Van Logtestijn, R.S.P., Verhoeven, J.T.A., 2003. Denitrification in the periphyton associated with plant shoots and in the sediment of a wetland system supplied with sewage treatment plant effluent. *Hydrobiologia*, pp. 29–44.
- Tomasso, J.R., Davis, K.B., Simco, B.A., 1981. Plasma corticosteroid dynamics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) exposed to ammonia and nitrite. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38, 1106–1112.
- Tomasso, J.R., Simco, B.A., Davis, K.B., 1979. Chloride inhibition of nitrite-induced methaemoglobinaemia in Channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 36, 1141–1144.
- Tucker, C.S., Schwedler, T.E., 1983. Acclimation of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to nitrite. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 30, 516–521.
- Vedel, N.E., Korsgaard, B., Jensen, F.B., 1998. Isolated and combined exposure to ammonia and nitrite in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect on electrolyte status, blood respiratory properties and brain glutamine glutamate concentrations. *Aquatic Toxicology* 41, 325–342.
- Vopršálová, M., Žáčková, P., 2000. *Základy toxikologie pro farmaceuty*. Karolinum, Praha, 231 s.
- Vymazal, J., Kröpfelová, L., 2008. *Wastewater treatment in constructed wetlands with horizontal sub-surface flow*. Heidelberg, Springer, 566 s.
- Watanabe, W.O., Losordo, T.M., Fitzsimmons, K., Hanley, F., 2002. Tilapia Production Systems in the Americas: Technological Advances, Trends, and Challenges. *Reviews in Fisheries Science* 10, 465–498.
- Wedemeyer, G.A., Yasutake, W.T., 1978. Prevention and treatment of nitrite toxicity in juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*)—Williams E.M., Eddy F.B., 1986. Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. *Journal of Comparative Physiology B* 156, 867–872.

- Williams, E.M., Eddy, F.B., 1988. Anion transport, chloride cell number and nitrite -induced methaemoglobinaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology* 13, 29–42.
- Wood, C.M., 1993. Ammonia and urea metabolism and excretion, In: *The Physiology of Fishes*. Evans D.H. (Ed.), Boca Raton: CRC Press, 157–176, 1st Edition, 379–425.
- Wood, C.M., Perry, S.F., Wright, P.A., Bergman, H.L., Randall, D.J., 1989. Ammonia and urea dynamics in the Lake Magadi tilapia, a ureotelic teleost fish adapted to an extremely alkaline environment. *Respiration Physiology* 77, 1–20.
- Yanbo, W., Wenju, Z., Zirong, X., 2006. Acute toxicity of nitrite on tilapia, *Oreochromis niloticus*, at different external chloride concentrations. *Fish Physiology and Biochemistry* 1, 49–54.
- Yildiz, H.Y., Köksal, G., Borazan, G., Benli, C.K., 2006. Nitrite induced methemoglobinemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Ichthyology* 22, 427–426.
- Zelenka, V., 2012. *Oreochromis niloticus* - tlamoun nilský [obrázek]. In: *Biolib - Oreochromis niloticus* (tlamoun nilský) - Obrázky [online]. © 1999 -2013 Biolib - Biological Library, [vid. 18. 4. 2013]. Dostupné z: url: <http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id188834/?taxonid=16108>
- Zachariasen, F., 2001. Intraspecific differences in nitrite tolerance of rainbow trout. The role of gill and kidney. Candidate Scientific Thesis, Institute of Biology, University of Southern Denmark, Odense.

8. SEZNAM TABULEK, GRAFŮ A PŘÍLOH

Tabulka č. 2: Rozdělení ryb do skupin a schematické znázornění průběhu testu.....	30
Graf č. 1: Počet erytrocytů.....	37
Graf č. 2: Počet leukocytů.....	38
Graf č. 3: Množství hemoglobinu.....	39
Graf č. 4: Hematokritová hodnota.....	40
Graf č. 5: Methemoglobin.....	41
Graf č. 6: Střední objem erytrocytu.....	42
Graf č. 7: Hemoglobin erytrocytu.....	43
Graf č. 8: Střední barevná koncentrace erytrocytu.....	44
Graf č. 9: Glukóza.....	45
Graf č. 10: Vápník.....	46
Graf č. 11: Hořčík.....	47
Graf č. 12: Celková bílkovina.....	48
Graf č. 13: Amoniak.....	49
Příloha I: <i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus, 1758) - tlamoun nilský.....	72
Příloha II: pH metr, OXI metr (Multil Line PA firmy WTW).....	73
Příloha III: VETTEST 8008 Analyser.....	74
Příloha IV: Hematokritový měřič a skleněné kapiláry.....	75
Příloha V: Odběr krve kaudální punkcí.....	76

9. PŘÍLOHY

Příloha I:



Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) - tlamoun nilský (foto: Václav Zelenka),
(zdroj: Zelenka, online, 2012)

Příloha II:



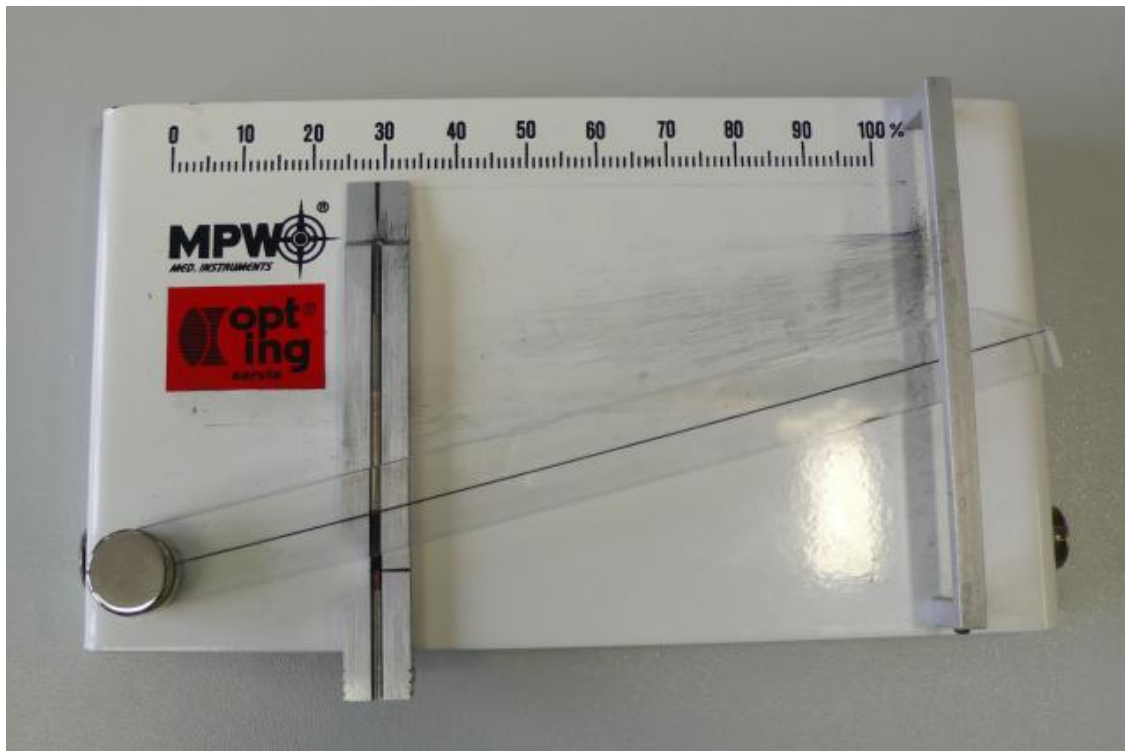
pH metr, OXI metr (Multil Line PA firmy WTW)

Příloha III:



VETTEST 8008 Analyser

Příloha IV:



Hematokritový měřič a skleněné kapiláry

Příloha V:



Odběr krve kaudální punkcí

Tolerance tilápie nilské vůči dusitanům

(Diplomová práce)

Bc. Pavel Brož

2013

Abstrakt

Toxicita dusitanů pro ryby se značně liší a závisí na mnoha vnějších i vnitřních faktorech. Koncentrace chloridů ve vodě je považována za jeden z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících toxicitu dusitanů u ryb. Cílem této diplomové práce bylo posoudit vliv zvýšené koncentrace dusitanů na tilápii nilskou (*Oreochromis niloticus*) při rozdílných koncentracích chloridů. Dospělé tilápie (průměrná hmotnost $376,3 \pm 59,2$ g) byly vystaveny po dobu 14 dnů dusitanům v koncentraci $3 \text{ mg l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ (tj. koncentrace se běžně vyskytují v recirkulačních systémech). Po 14 dnech byly pokusné ryby rozděleny do 4 skupin: skupina P: $3 \text{ mg l}^{-1} \text{ NO}_2^-$; skupina R1: $3 \text{ mg l}^{-1} \text{ NO}_2^- + 100 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cl}^-$; skupina R2: $100 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cl}^-$ a skupina R3: voda z kohoutku bez přidání dusitanů a chloridů. Tyto skupiny ryb byly drženy za těchto podmínek po následujících sedm dní.

Použitím standardních klinických postupů byly stanoveny následující hematologické biochemické parametry: RBC, WBC, Hb, PCV, MetHb, MCV, MCH, MCHC, NO_2^- , GLU, Ca, Mg, TP, NH_3 . Koncentrace testovaných dusitanů nebyla dostatečně vysoká, aby způsobila silné rozdíly parametrů. Pouze některé z nich. /změny hemoglobinu (Hb), methemoglobin (MetHb) a střední barevné koncentrace hemoglobinu (MCHC)/ byly statisticky významné. Tato skutečnost potvrdila, že tilápie je odolná zvýšené koncentraci dusitanů a díky této odolnosti je tento druh ryby vhodný pro intenzivní chov ryb. Na druhé straně tento druh ryby není příliš vhodný pro studium negativních faktorů životního prostředí na jeho stav.

Klíčová slova: krev ryb, hematologické hodnoty, biochemické hodnoty, tilápie nilská, dusitany, chloridy.

Tolerance of Nile tilapia to nitrites

(Thesis)

Bc. Pavel Brož

2013

Abstract

Nitrite toxicity to fish varies considerably and depends on a large number of external and internal factors. Chloride concentration in water is considered one of the most important factors influencing nitrite toxicity to fish. The aim of this thesis was to evaluate the effect of increased concentrations of nitrite to Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different concentrations of chloride. Tilapias adults (mean weight 376.3 ± 59.2 g) were exposed for 14 days to nitrite at the concentration of $3 \text{ mg l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ (i.e. concentration commonly found in recirculation systems). After 14 days the experimental fishes were divided into 4 groups: the group P: $3 \text{ mg l}^{-1} \text{ NO}_2^-$; the group R1: $3 \text{ mg l}^{-1} \text{ NO}_2^- + 100 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cl}^-$; the group R2: $100 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cl}^-$ and the group (R3) the tap water without addition of nitrite and chloride. Fish of these groups were held under these conditions for the following 7 days.

Using standard clinical procedures the following haematologic biochemical parameters were determined: RBC, WBC, Hb, PCV, MetHb, MCV, MCH, MCHC, NO_2^- , GLU, Ca, Mg, TP, NH_3). The tested nitrite concentration was not high enough to cause strong differences of pursued parameters. Only some of them /changes in haemoglobin (Hb), methaemoglobin (MetHb) and mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC)/ were statistically significant. This fact confirmed that tilapia is resistant to elevated nitrite concentration and due to this resistance this species of fish is convenient for intensive fish farming. On the other hand this kind of fish is not too suitable for studying of negative factors of environment on its condition.

Keywords: fish blood, haematological values, biochemical values, Nile tilapia, nitrite, chloride.