JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Katedra rybářství a myslivosti

Studijní program: M4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Rybářství

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Změny hematologických ukazatelů u ryb v souvislosti se zvýšenými koncentracemi dusitanů ve vodě

Vedoucí diplomové práce

Prof. MVDr. Zdeňka Svobodová, DrSc.

Autor

Miroslav Gřunděl

2008

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Zemědělská fakulta
Katedra anatomie a fyziologie hospodářských zvířat
Akademický rok: **2005/2006**

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Miroslav GŘUNDĚL**

Studijní program: **M4101 Zemědělské inženýrství**

Studijní obor: **Rybářství**

Název tématu: **Změny hematologických ukazatelů u ryb v souvislosti se zvýšenými koncentracemi dusitanů ve vodě.**

Zásady pro vypracování:

Zvětšující se potřeba intenzivního chovu ryb v kontrolovaných podmínkách, spojená s omezenou zásobou vodních zdrojů, vedla k výstavbě odchoven ryb, které recirkulují až 95 % vody. Amoniak, jako hlavní produkt látkové výměny ryb, se odstraňuje pomocí biologických fluidních filtrů nitrifikací na dusičnany, které jsou pro ryby relativně bezpečné. Právě nerovnováha v procesu nitrifikace, která může být způsobena nejrůznějšími faktory, vede často k nárůstu koncentrace dusitanů. Zvýšené koncentrace dusitanů jsou jednou z významných a častých příčin poškození a úhynu ryb v těchto rybochovných objektech Toxicita dusitanů pro ryby značně kolísá a závisí na mnoha vnitřních i vnějších faktorech (druh a věk ryb, kvalita vody apod.). Význam mnohých faktorů se průběžně ověřuje a přehodnocuje. Bližší poznání mechanismu účinků dusitanů na ryby umožní provádět opatření, která by minimalizovala poškození a ztráty ryb vlivem zvýšených koncentrací dusitanů.

Cílem práce je provedení subchronického testu toxicity na pstruhu duhovém se subletálními koncentracemi dusitanů a zhodnocení jejich vlivu na vybrané hematologické ukazatele (např. hemoglobin, methemoglobin, hematokrit, počet erytrocytů a příp. další).

Metodicky bude postupováno dle jednotných metod hematologického vyšetřování ryb. Test subchronické toxicity bude prováděn podle ČSN ISO 10229 Jakost vod - Stanovení subchronické toxicity látek pro sladkovodní ryby - Metoda vyhodnocení účinků látek na růstovou rychlost pstruha duhového [Oncorhynchus mykiss Walbaum (Teleostei, Salmonidae)]: Obnovovací metoda a OECD Guideline for Testing of Chemicals 215 Fish, Juvenile Growth Test, 2000.

Rozsah práce:	**přibližně 40 stran**
Rozsah příloh:	**3 grafy**
Forma zpracování diplomové práce:	**tištěná**

Seznam odborné literatury:

Jensen, F.B., 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A, 135:9-24.

Kroupová, H., Máchová, J., Svobodová, Z., 2005b. Nitrite influence on fish - a Review. Veterinary Medicine - Czech, 50 (11): 461-471.

Lewis, W.M., Morris, D.P., 1986. Toxicity of Nitrite to Fish: A Review. Transactions of the American Fisheries Society 115:183-195.

Svobodová Z., Máchová J., Hamáčková J., Hůda J., Kroupová H., 2005a. Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems: three case studies. Acta Veterinaria Brno 74, 129-137.

Svobodová, Z., Pravda, D., Paláčková, J., 1986. Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb. Edice Metodik, VÚRH Vodňany, 22 - 36.

Vedoucí diplomové práce:	**prof. MVDr. Zdeňka Svobodová, DrSc.** Katedra anatomie a fyziologie hospodářských zvířat
Konzultant diplomové práce:	**Ing. Jana Máchová** Katedra rybářství a myslivosti
Datum zadání diplomové práce:	**23. března 2006**
Termín odevzdání diplomové práce:	**30. dubna 2008**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice

L.S.

prof. Ing. Magdalena Hrabánková, CSc.
děkanka

doc. Ing. Jan Trávníček, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 23. března 2006

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci na téma: Změny hematologických ukazatelů u ryb v souvislosti se zvýšenými koncentracemi dusitanů ve vodě vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

Dále prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce fakultou, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 21. dubna 2008 .....

Miroslav Gřunděl

Poděkování

Děkuji vedoucímu diplomové práce Prof. MVDr. Zdeňce Svobodové, DrSc. a dále bych chtěl touto cestou poděkovat Ing. Janě Máchové a Ing. Haně Kroupové, Ph.D. za odborné vedení, vřelou pomoc a cenné rady při zpracování diplomové práce.

Děkuji také všem pracovníkům oddělení vodní toxikologie a nemocí ryb VÚRH JU se sídlem ve Vodňanech za pomoc v průběhu této práce.

Diplomová práce byla provedená v rámci Výzkumného záměru VÚRH JU ve Vodňanech č. MSM 6007665809.

SOUHRN

Cílem této práce bylo posouzení vlivu dusitanů ve vodě na ryby. Vliv dusitanů byl posuzován na základě výsledků testů akutní toxicity a subchronické toxicity na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*). Účinky dusitanů byly rovněž studovány na sumci velkém – albín (*Silurus glanis*). Z výsledků testů akutní toxicity byly vypočteny střední letální koncentrace dusitanů pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (96hLC50 = 11,2 $mg.l^{-1}$ NO_2^-) a pro sumce velkého – albín (*Silurus glanis*) (96hLC50 = 15,8 $mg.l^{-1}$ NO_2^-). Na základě výsledků testu akutní toxicity pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a s ohledem na legislativní požadavky byly zvoleny koncentrace dusitanů pro test subchronické toxicity.

Výsledky testu subchronické toxicity prokázaly, že koncentrace dusitanů 3 $mg.l^{-1}$ NO_2^- vyvolala během 28 denní expozice 65 % úhyn ryb. Tato koncentrace rovněž vyvolala snížení rychlosti růstu ryb ve srovnání s kontrolou. Rychlost růstu ryb vystavených koncentracím nižším než 3 $mg.l^{-1}$ NO_2^- byla srovnatelná s kontrolou. U ryb, které byly vystaveny dusitanům v koncentracích 0,6 $mg.l^{-1}$ NO_2^- a vyšším, byla prokázána jejich kumulace ve svalovině a v krevní plazmě. Hematologickým vyšetřením byl zjištěn u pokusných ryb statisticky významný pokles hematokritové hodnoty a koncentrace hemoglobinu a zvýšení počtu leukocytů. Ostatní sledované hematologické parametry (Ery, MCV, MCH a MCHC) byly u pokusných ryb srovnatelné s kontrolou.

Klíčová slova: pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), sumec velký - albín (*Silurus glanis*), hematologické parametry, testy toxicity, 96hLC50

SUMMARY

The aim of this thesis was to examine the influence of nitrite on fish. Influence of nitrite was evaluated on the basis of acute and sub-chronic toxicity tests results on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The effects of nitrite were also observed in wels catfish – albino (*Silurus glanis*). On the basis of the results of acute toxicity tests, values of lethal concentration of nitrite for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (96hLC50 = 11.2 $mg.l^{-1}$ NO_2^-) and for wels catfish – albino (*Silurus glanis*) (96hLC50 = 15.8 $mg.l^{-1}$ NO_2^-) were calculated. Using results of acute toxicity test for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and with respect to legislative requirements, concentrations of nitrite for sub-chronic toxicity test were selected.

The results of sub-chronic toxicity test showed that nitrite concentration of 3 $mg.l^{-1}$ NO_2^- during 28-day exposition caused 65 % fish mortality. This concentration also caused growth rate decrease compared to control. Growth rate among fish exposed to concentrations lower then 3 $mg.l^{-1}$ NO_2^- was comparable to control. Among fish exposed to nitrite concentration of 0.6 $mg.l^{-1}$ NO_2^- and higher nitrite accumulation in muscle and in blood plasma was observed. Haematological examination showed statistically significant decrease of haematocrit value and concentration of haemoglobin and increase of the number of leukocytes in experimental fish. Other measured haematological parameters (Ery, MCV, MCH and MCHC) were comparable with control.

Keywords: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), wels catfish – albino (*Silurus glanis*), haematological parameters, tests of toxicity, 96hLC50

Obsah

1. ÚVOD 10

2. TEORETICKÁ ČÁST 11

2.1 TOXICITA A TESTY TOXICITY 11

2.1.1 Pojem toxicita 11

2.1.2 Testy toxicity na vodních organismech 11

2.1.2.1 Vyjadřování výsledků testů toxicity 12

2.1.3 Interpretace výsledků 13

2.2 VLIV CIZORODÝCH LÁTEK NA ORGANISMY VODNÍHO PROSTŘEDÍ A SLEDOVÁNÍ JEJICH ÚČINKŮ 14

2.2.1 Testy toxicity na rybách 14

2.3 SLOUČENINY DUSÍKU VE VODNÍM PROSTŘEDÍ 16

2.3.1 Výskyt 16

2.3.2 Biochemické a chemické přeměny 16

2.4 DUSITANY 18

2.4.1 Úvod 18

2.4.2 Výskyt ve vodách 18

2.4.3 Mechanismus toxického působení 19

2.4.4 Vliv dusitanů na další hematologické parametry ryb 23

2.4.5 Faktory ovlivňující toxicitu dusitanů 24

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 28

3.1 MATERIÁL A METODIKA 28

3.1.1 Test akutní toxicity na sumci velkém – albín (*Silurus glanis*) 28

3.1.2 Test akutní toxicity na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*) 30

3.1.3 Test subchronické toxicity (růstový test) na pstruhu duhovém 31

3.1.4 Vyšetření hematologického profilu ryb 34

3.1.5 Stanovení dusitanů v krvi 36

3.2 VÝSLEDKY 38

3.3 DISKUZE 44

4. ZÁVĚR 46

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 47

6. PŘÍLOHY 52

Seznam použitých zkratek

LC50 koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50 % testovacích ryb v daném časovém úseku

EC50 střední účinná (efektivní) koncentrace testovaného vzorku, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50 % testovacích organismů

IC50 inhibiční koncentrace, která způsobí 50 % inhibici růstu ve srovnání s kontrolou – v testech na zelených řasách

24hLC50 koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50 % testovacích ryb v časovém úseku 24 ± 2 hodin

48hLC50 koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50 % testovacích ryb v časovém úseku 48 ± 2 hodin

72hLC50 koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50 % testovacích ryb v časovém úseku 72 ± 2 hodin

96hLC50 koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50 % testovacích ryb v časovém úseku 96 ± 2 hodin

LOEC nejnižší koncentrace testované látky, při které jsou pozorovány účinky (lowest observed effect concentration)

NOEC nejvyšší koncentrace testované látky nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky (no observed effect concentration)

Ery počet erytrocytů

Leu počet leukocytů

Hb koncentrace hemoglobinu

MetHb koncentrace methemoglobinu

PCV hematokritová hodnota

MCHC střední barevná koncentrace

MCH hemoglobin erytrocytu

MCV střední objem erytrocytu

1. ÚVOD

Zvětšující se potřeba intenzivního chovu ryb v kontrolovaných podmínkách, spojená s omezenou zásobou vodních zdrojů, vedla k výstavbě odchoven ryb, které recirkulují až 95 % vody. Amoniak, jako hlavní produkt látkové výměny ryb, se zde odstraňuje pomocí biologických fluidních filtrů nitrifikací na dusitany a následně pak na dusičnany, které jsou pro ryby méně toxické. Právě nerovnováha v procesu nitrifikace, která může být způsobena nejrůznějšími faktory, vede často k nárůstu koncentrace dusitanů ve vodě. Zvýšené koncentrace dusitanů ve vodě jsou jednou z významných a častých příčin poškození a úhynu ryb v těchto rybochovných objektech (Svobodová et al., 2005a). Problematice dusitanů se proto musí v rybochovných objektech věnovat velká pozornost.

Toxicita dusitanů pro ryby značně kolísá a závisí na mnoha vnitřních i vnějších faktorech (kvalita vody, druh a věk ryby apod.). Význam jednotlivých faktorů se průběžně ověřuje a přehodnocuje. Komplexní vysvětlení mechanismu toxického působení dusitanů na ryby, ani spolupůsobení jednotlivých vnějších faktorů není dosud zcela vysvětleno. Avšak bližší poznání mechanismu účinků dusitanů na ryby umožní provádět opatření, která by minimalizovala jejich poškození a ztráty (Kroupová et al., 2005).

Cílem diplomové práce bylo sledovat vliv krátkodobé expozice dusitanů na pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a sumce velkého - albín (*Silurus glanis*) a dále vliv dlouhodobé expozice dusitanů na pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Měření bylo prováděno ve Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém ve Vodňanech, na Oddělení vodní toxikologie a nemocí ryb.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 TOXICITA A TESTY TOXICITY

2.1.1 Pojem toxicita

Toxicita je vlastnost, která se hodnotí na základě souboru toxikologických testů (Soldán, 1997). **Expozice** je doba, po kterou je organismus vystaven účinkům látky. Podle délky expozice se rozlišuje toxicita akutní a chronická.

Akutní toxicitou se míní účinky látky, které se projeví po krátké době expozice (bezprostřední reakce organismu na krátkodobý kontakt s toxickou látkou). Naproti tomu chronická expozice se projevuje různým způsobem, od změn v chování organismů až po letální (smrtící) účinky. Doba působení látky s ohledem na termíny akutní a chronická je relativní vzhledem k rozdílným délkám života různých organismů. Délka expozice, jež může být pro určitý organismus akutní, může být pro jiný druh chronická. **Akutní expozice** se tedy definuje jako doba zasahující pouze jedno vývojové stádium organismu a **chronická expozice** jako doba zasahující více vývojových stadií nebo životních cyklů. Z toho vyplývá, že expozice trvající několik dnů může být pro ryby akutní, ale např. pro bakterie chronická (Štěpánek et al., 1979; Sladečková et al., 1995; Soldán, 1997).

2.1.2 Testy toxicity na vodních organismech

Finálním rezervoárem cizorodých látek antropogenního původu je vodní prostředí. Z toho důvodu je pozornost věnována právě metodám vlastního sledování a hodnocení vlivu těchto látek na jednotlivé zástupce organismů vodních ekosystémů, především na ryby (Svobodová a Máchová, 2003).

Testy toxicity na organismech vodního prostředí mají velký význam při hodnocení nových chemických látek, přípravků, ale také odpadů. Testy toxicity jsou také velmi důležité při hledání původců a příčin havárií na povrchových a podzemních vodách. Význam testů toxicity spočívá v možnosti hodnocení souhrnu účinků všech přítomných komponent v testovaném roztoku na testovací materiál (organismus, kultura, tkáň, buňka) (Máchová et al., 1994; Ambrožová, 2003).

Testy toxicity se provádí **na třech úrovních**, a to: 1) na úrovní buněk a tkání, 2) na úrovni jedinců (organismů), 3) na úrovni společenstev (biocenóz) (Svobodová, 2000a).

Testy na úrovní buněk a tkání se používají pro teoretické objasnění poznatků získaných při pokusech na organismech. Na úrovni organismů se provádí většina testů a

tyto testy představují určitý kompromis mezi testy na úrovni buněk a tkání a na úrovni biocenóz. Testy na úrovni biocenóz jsou nejnáročnější a používají se k hodnocení toxického účinku na celý vodní ekosystém (Svobodová et al., 2000a; Svobodová a Máchová, 2003).

Vývoj metodik testů toxicity lze charakterizovat třemi generacemi testů toxicity (Maršálek a Lukavský, 1994). **První generace** testů je představovaná klasickými, standardními a konvenčními metodikami, které jsou založené na akutních testech v laboratoři na chovaných organismech a udržovaných kulturách. **Druhá generace** testů toxicity se začíná v současné době stále více používat a je představovaná alternativními biotesty, známé pod názvem mikrobiotesty. Tyto testy využívají klidová stádia testovacích organismů. V případě testů na vodních bezobratlých (perloočky, vířníci) se používají cysty (vířníci) a ephipia (dafnie), v případě testů na rybách se aplikují tkáňové kultury a jikry. Zcela na počáteční úrovni je i **třetí generace** testů toxicity, která využívá biosenzory a je založena na fluorescenčním značení toxické látky (Sladečková et al., 1995; Svobodová et al., 2000a).

Výběr vhodného testovacího organismu se řídí požadavkem na informace, které potřebujeme získat. Obecně je třeba, aby v testech byly zastoupeny jednotlivé trofické úrovně studovaného ekosystému (producent – konzument – destruent). Ve skutečnosti se jedná o řasy, bezobratlé, ryby a bakterie.

2.1.2.1 Vyjadřování výsledků testů toxicity

Při hodnocení akutní toxicity se zjišťují hodnoty **LC50** (letální koncentrace pro 50 % testovacích organismů – v testech na rybách), hodnoty **EC50** (efektivní koncentrace, která vyvolá 50 % úhyn, či imobilizaci testovacích organismů – v testech na zástupcích zooplanktonu nebo efektivní koncentrace, která snižuje o 50 % luminiscenci emitovanou mořskými bakteriemi) a hodnoty **IC50** (inhibiční koncentrace, tj. koncentrace, která způsobí 50 % inhibici růstu ve srovnání s kontrolou – v testech na zelených řasách). Při hodnocení toxicity je důležitá nejen koncentrace látky, ale také doba působení. Proto je doba působení (expozice) dána metodikou příslušného testu toxicity a uvádí se ve výsledku. Při výpočtu hodnot LC50, EC50 a IC50 se vychází zejména z koncentrací, ve kterých došlo k více než nulové a méně než stoprocentní mortalitě, imobilizaci, či inhibici růstu.

Testy akutní toxicity se provádějí obvykle ve dvou stupních. Prvním stupněm je **předběžný test.** Předběžný test se provádí s malým počtem testovacích organismů –

například 3 – 5 kusů ryb v každé koncentraci a nasazuje se na široké rozmezí koncentrací testované látky (např. od 0,01 do 100 $mg.l^{-1}$). Na základě výsledku předběžného testu se volí užší rozsah koncentrací pro tzv. **základní test.** Do základního testu se nasazuje větší počet testovacích organismů, např. 7 – 10 kusů ryb do každé koncentrace i kontroly. Z výsledku základního testu se potom vypočítá hodnota LC50.

Součástí každého toxikologického testu je **kontrola,** která se provádí za stejných podmínek a se stejnými organismy jako pokus, jediným rozdílem je absence testované látky. Tímto způsobem se ověřuje kondice, zdravotní stav testovacích organismů a vhodnost podmínek testů (Svobodová et al., 2000a).

2.1.3 Interpretace výsledků

Dle Zákona č.356/2003 Sb. o chemických látkách a chemických přípravcích lze testované látky charakterizovat i z hlediska jejich rizikovosti tzv. **R větami.** Věta R50 "vysoce toxické pro vodní organismy", EC50 méně nebo rovno 1 $mg.l^{-1}$, věta R51 "toxické pro vodní organismy", EC50 od 1 $mg.l^{-1}$ do 10 $mg.l^{-1}$včetně, věta R52 "škodlivé pro vodní organismy", EC50 od 10 $mg.l^{-1}$do 100 $mg.l^{-1}$ včetně (Svobodová et al., 2000a).

Toxické působení látky na testovací organismus lze blíže specifikovat hodnotami koncentrací **LOEC** (lowest observed effect concentration) a **NOEC** (no-observed effect concentration). Hodnota LOEC představuje nejnižší koncentraci testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky. Hodnota NOEC pak, představuje nejvyšší koncentraci testovaného vzorku, která nevyvolá žádné pozorovatelné účinky (Máchová et al., 1994).

2.2 VLIV CIZORODÝCH LÁTEK NA ORGANISMY VODNÍHO PROSTŘEDÍ A SLEDOVÁNÍ JEJICH ÚČINKŮ

Znečištění povrchových vod bývá často příčinou poškození a úhynu ryb. Při působení cizorodých látek, zejména pesticidů, toxických kovů, ale i tenzidů na společenstvo nádrže nebo toku je možno nejdříve pozorovat poškození přirozené potravní základny ryb (zooplanktonu, zoobentosu) a teprve potom změny v chování. Z toho vyplývá, že při znečištění povrchových vod jsou obvykle prvním indikátorem kontaminace vodního prostředí vodní bezobratlí a za nimi následují ryby. Cizorodé látky se ve vodních organismech ukládají nebo metabolizují. Vzniklé metabolity se dále ukládají nebo jsou vylučovány z těla ryb (Svobodová et al., 1987).

2.2.1 Testy toxicity na rybách

Účinky cizorodých látek na rybí organismus se sledují a hodnotí na základě testů toxicity. Vlastní sledování a hodnocení účinků cizorodých látek na ryby zahrnuje především (Svobodová a Máchová, 2003):

- stanovení hodnot LC50 (případně LC5), NOEC, LOEC
- posouzení hematologického profilu ryb
- posouzení biochemického profilu krve, dalších tělních tekutin a tkání ryb
- posouzení histopatologického profilu tkání ryb
- posouzení akumulace cizorodých látek případně jejich metabolitů

Metodiky testů jsou standardizovány podle norem OECD (Organization for Economic Cooperation of Development) a ISO (International Organization for Standardization).

OECD má v současné době standardizované následující testy:

- 203 – Test akutní toxicity na rybách – výsledkem je hodnota 96hLC50
- 204 – Prolongovaný test toxicity na rybách (14 denní) – výsledkem jsou hodnoty 14dLC50, NOEC a LOEC
- 210 – Test na raných vývojových stádiích ryb (embryo-larvální test toxicity) – výsledkem jsou hodnoty NOEC a LOEC
- 212 – Krátkodobý test toxicity na embryích a na váčkovém plůdku ryb (embryonální test toxicity) – výsledkem jsou hodnoty NOEC a LOEC

- 215 – Růstový test toxicity na juvenilních rybách (28 denní) – výsledkem jsou hodnoty NOEC a LOEC

ISO má v současné době standardizované následující testy:

- ISO 7346/1 Jakost vod. Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby /*Brachydanio rerio* Hamilton – Buchanan (*Teleostei*, *Cyprinidae*)/. Část 1: Statická metoda
- ISO 7346/2 Jakost vod. Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby /*Brachydanio rerio* Hamilton – Buchanan (*Teleostei*, *Cyprinidae*)/. Část 2: Obnovovací metoda
- ISO 7346/3 Jakost vod. Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby /*Brachydanio rerio* Hamilton – Buchanan (*Teleostei*, *Cyprinidae*)/. Část 3: Průtočná metoda

Při provádění tesů toxicity na rybách je nutné dodržovat zásady a pracovat v souladu se zněním Zákona č.77/2004 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a dále Vyhlášky MZe ČR č.311/1997 Sb. o chovu a využití pokusných zvířat.

Pro rozšíření poznatků o účincích testované látky lze doplnit testy toxicity na rybách například o **hematologické vyšetření**. Změny hodnot hematologických ukazatelů lze pozorovat především po akutním působení cizorodých látek. S výjimkou působení některých hemolytických jedů (např. saponiny) a dusitanů se jedná obvykle o nespecifické změny. Pozorované změny v červeném a bílém krevním obraze lze charakterizovat následujícím způsobem:

Nejčastější změny v červeném krevním obraze:

- zvýšení koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů a hematokritové hodnoty (tyto změny jsou odezvou organismu na stres)
- snížení koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů a hematokritové hodnoty (tyto změny mohou indikovat narušení orgánů hemopoetického systému ryb)
- zvětšení středního objemu erytrocytu (MCV), hematokritové hodnoty a snížení střední barevné koncentrace (MCHC) (tyto změny mohou indikovat poruchu buněčné membrány erytrocytů)

Nejčastější změny v bílém krevním obraze:

- snížení počtu leukocytů a změny v jejich diferenciálním počtu (snížení počtu leukocytů a zejména lymfocytů má za následek snížení nespecifické odolnosti ryb)

2.3 SLOUČENINY DUSÍKU VE VODNÍM PROSTŘEDÍ

2.3.1 Výskyt

Sloučeniny dusíku mohou být buď anorganického, nebo organického původu. Sloučeniny dusíku v biosféře neovlivněné antropogenní činností jsou převážně biogenního původu, vznikají rozkladem organických dusíkatých látek rostlinného a živočišného původu. Dusík patří do skupiny tzv. **nutrientů**, které jsou nezbytné pro rozvoj mikroorganismů. Uplatňuje se při všech biologických procesech probíhajících v povrchových, podzemních a odpadních vodách (Pitter, 1999).

Formy výskytu:

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

2.3.2 Biochemické a chemické přeměny

Z biochemických přeměn anorganických forem dusíku je nejdůležitější oxidace amoniakálního dusíku na dusitany a dále na dusičnany (**nitrifikace**) a redukce dusičnanů na elementární dusík (**denitrifikace**) (Pitter, 1999).

Nitrifikací se rozumí biochemická oxidace amoniakálního dusíku na dusitany až dusičnany. Je způsobena především litotrofními (autotrofními) a výjimečně i organotrofními organismy. Chemolitotrofní nitrifikační bakterie využívají CO_2 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. Rozlišují se dva hlavní rody nitrifikačních bakterií: *Nitrosomonas* a *Nitrobacter*. Rod *Nitrosomonas* se podílí na prvním stupni oxidace na dusitany a má menší růstovou rychlost, než rod *Nitrobacter*, který se podílí na oxidaci dusitanů na dusičnany. Proto se dusitany nemohou ve vodě hromadit a jejich koncentrace bývá nízká. Růstová rychlost nitrifikačních bakterií je značně závislá na teplotě a při teplotách pod 5 °C je již rychlost nitrifikace velmi malá. Nejrychleji probíhá nitrifikace při teplotách v rozmezí asi od 20 °C do 30 °C. Optimální hodnota pH je asi v oblasti 7 až 8,5 (Pitter, 1999).

Nitrifikace probíhá ve dvou stupních, které lze znázornit následujícími rovnicemi:

$2\ NH_3 + 3\ O_2 = 2\ NO_2^- + 2\ H^+ + 2\ H_2O$

$2\ NO_2^- + O_2 = 2\ NO_3^-$

Denitrifikace je redukce dusičnanů a dusitanů na elementární dusík nebo oxidy dusíku v anoxických podmínkách. Denitrifikace je způsobena různými organotrofními striktně i fakultativně anaerobními mikroorganismy, např. rodu *Pseudomonas*, *Micrococcus, Achromobacter*. Na rozdíl od nitrifikace je pro denitrifikaci nutný organický substrát jako zdroj energie. Dusičnanový nebo dusitanový dusík je konečným akceptorem elektronů (Pitter, 1999).

Denitrifikaci lze schematicky popsat těmito rovnicemi:

$5\ CH_3OH + 6\ NO_3^- = 3\ N_2 + 7\ H_2O + 5\ CO_2 + 6\ OH^-$

$5\ C_6H_{12}O_6 + 24\ NO_3^- = 12\ N_2 + 18\ H_2O + 30\ CO_2 + 24\ OH^-$

Biologická fixace je schopnost přímo využívat atmosférický dusík, za pomocí enzymu nitrogenázy, která převádí dusík na amonné soli, glutamin a inkorporuje ho do vegetativní buňky. Biologickou fixaci provádějí symbiotičtí a volně žijící aerobní, anaerobní a fototrofní vazači atmosférického dusíku. Reakce je uskutečnitelná pouze v silně anaerobním prostředí, které je uvnitř buněk těchto organismů. Ve vodním prostředí se vyskytují především fototrofní vazači, což jsou sinice, např. rody *Anabaena* a *Aphanizomenon* (Ambrožová, 2003).

Fixaci dusíku lze schematicky znázornit následující rovnicí:

$N_2\ (g) + 8\ H^+ + 6\ e^- = 2\ NH_4^+$

Mimo biochemické přeměny mohou probíhat i **chemické přeměny** v závislosti na oxidačně-redukčním potenciálu a na hodnotě pH. Při vysokých hodnotách oxidačně-redukčního potenciálu jsou stabilní formou dusíku dusičnany, které ale v anoxických podmínkách mohou podléhat redukci na elementární dusík (Pitter, 1999).

2.4 DUSITANY

2.4.1 Úvod

Dusitany jsou přirozenou součástí koloběhu dusíku v přírodě. Přítomnost dusitanů v prostředí je problémem z důvodu jejich vysoké toxicity pro živočichy. Toxický vliv dusitanů je velmi dobře dokumentován v literatuře (Lewis a Morris, 1986; Jensen, 2003).

Přestože jsou dusitany toxické, tvoří, i když v malých koncentracích, přirozenou složku živočišných tkání. Jsou totiž vnitřně produkovány jako metabolit fyziologického přenašeče molekuly oxidu dusného, který produkuje endotel, nervové buňky a aktivované mikrofágy. Toxický vliv dusitanů na člověka a jiné suchozemské živočichy je spojen s příjmem dusitanů a dusičnanů v potravě a pitné vodě (dusičnany jsou redukovány na dusitany v gastrointestinálním traktu) (Kiese, 1974; Hotchkiss et al., 1992).

Dusitany ale nejvíce ohrožují vodní živočichy, neboť ti je aktivně přijímají žábrami z okolní vody.

2.4.2 Výskyt ve vodách

Dusitany zpravidla doprovázejí ve vodách dusičnany a formy amoniakálního dusíku. Vzhledem ke své chemické a biochemické nestálosti se obvykle vyskytují ve velmi malých a často jen stopových koncentracích. V přírodních vodách dusitany mezi anorganickými formami dusíku většinou nedominují, protože v oxických podmínkách jsou rychle transformovány nitrifikací na dusičnany. Na druhé straně přichází v anoxických podmínkách v úvahu biologická denitrifikace na elementární dusík, resp. N_2O. Proto lze dusitany často prokázat v nízkých koncentracích jako meziprodukt chemických a biochemických transformací sloučenin dusíku (Pitter, 1999).

Vyšší koncentrace dusitanového dusíku (i přes 1 $mg.l^{-1}$) se vyskytují ve splaškových, odpadních a průmyslových vodách (Pitter, 1999).

Zvýšené koncentrace dusitanů (řádově desetiny, ale i jednotky $mg.l^{-1}$ $N\text{-}NO_2^-$) se mohou vyskytovat ve vodách, kde probíhá intenzivní chov hospodářsky významných druhů ryb a akvarijních ryb (Avnimelech et al., 1986; Kamstra et al., 1996; Svobodová et al., 2005a). Proces nitrifikace je zde využíván pro snížení koncentrace amoniaku, který je hlavním produktem dusíkatého metabolismu ryb (Wood, 1993). Během procesu nitrifikace zde dochází k biochemické oxidaci amoniakálního dusíku na dusitany a následně až na dusičnany, které jsou pro ryby téměř netoxické. Pokud druhá fáze nitrifikace neprobíhá

dostatečně rychle, dochází v systému k hromadění dusitanů, které bývá příčinou zhoršení zdravotního stavu ryb (Dvořák, 2004; Svobodová et al., 2005a).

Zvýšené koncentrace dusitanů se velmi často objevují v recirkulačních systémech, zejména bezprostředně po zahájení provozu nebo v důsledku nerovnováh v procesu nitrifikace.

2.4.3 Mechanismus toxického působení

Sladkovodní ryby a korýši jsou hyperosmotičtí vůči prostředí ve kterém žijí, a proto aktivně přijímají ionty žábrami, aby vyrovnali jejich ztrátu močí a pasivním odtokem z žaber. Aktivní příjem iontů je spojen s tzv. chloridovými buňkami žaber (Maetz, 1971). Ve sladké vodě tyto buňky vylučují amoniak nebo vodíkové ionty výměnou za stejný počet sodných iontů. Chloridové buňky také vylučují hydrogenuhličitanové ionty výměnou za stejné množství chloridových iontů (Love, 1980).

Problém s dusitany ve sladké vodě je způsoben tím, že ion NO_2^- má určitou afinitu k iontové výměně Cl^-/HCO_3^-, takže pokud jsou dusitany přítomny v okolní vodě, část příjmu Cl^- je nahrazena NO_2^- (ryba přijímá dusitany na úkor chloridů). Ryby s vysokou rychlostí příjmu chloridů žábrami (pstruh duhový, okoun říční, štika obecná) jsou více citlivé k dusitanům než ryby s nízkou rychlostí příjmu (úhoř říční, kapr obecný, lín obecný) (Williams a Eddy, 1986). Zvýšené koncentrace Cl^- v okolní vodě proto ochrání ryby před příjmem dusitanů a jejich toxickými účinky (Jensen, 2003).

Koncentrace dusitanů v krevní plazmě může dosáhnout i více než šedesátkrát vyšší hodnoty než je v okolní vodě (Fontenot et al., 1999). Dusitany jsou také akumulovány v některých tkáních, a to v žábrách, játrech, mozku a svalech (Margiocco et al., 1983). V těchto orgánech bývá koncentrace dusitanů nižší než v krvi, ale hodnoty naměřené v játrech a mozku mrtvých nebo poškozených ryb mohou dosáhnout až 30 - ti násobku hodnoty naměřené v okolní vodě (Margiocco et al., 1983).

Z krevní plazmy dusitany dále pronikají do červených krvinek, kde se vážou na barvivo hemoglobin, za vzniku methemoglobinu. Methemoglobin nemá schopnost přenášet kyslík, a tím se snižuje kapacita krve pro transport kyslíku (Cameron, 1971).

Zjednodušené schéma vzniku methemoglobinu (Kosaka a Tyuma, 1987):

$$4Hb(Fe^{2+})O_2 + 4NO_2^- + 4H^+ \longrightarrow 4Hb(Fe^{3+}) + 4NO_3^- + O_2 + 2H_2O$$

Zvýšená koncentrace methemoglobinu v krvi se projevuje hnědým zbarvením krve a žaber. Hnědá barva žaber byla patrná u tilápie nilské (*Oreochromis niloticus*) již při obsahu methemoglobinu cca 20 % (Svobodová et al., 2005a). Podobným způsobem mohou s dusitany reagovat i jiné hemové bílkoviny (Doblander a Lackner, 1997).

Riziko bezprostředního ohrožení organismu těžkou methemoglobinemií se snižuje, je-li ryba neaktivní (Crawford a Allen, 1977), protože neaktivní ryba má velmi nízkou potřebu kyslíku. Je-li však ryba postižená methemoglobinemií nucena k aktivitě, může uhynout na anoxii (Huey et al., 1980).

Koncentrace methemoglobinu, které se u ryb projevují úhynem nebo ovlivňují růst, případně zabraňují normálnímu chování ryb, se liší podle druhu ryb a jsou silně ovlivněny okolními podmínkami (Margiocco et al., 1983).

Koncentrace methemoglobinu v krvi:

Rybí krev obsahuje měřitelné množství methemoglobinu i v nepřítomnosti dusitanů, neboť methemoglobin vzniká také samovolně, i když pomalu, v nepřítomnosti dusitanů. Methemoglobin vzniká autooxidací hemoglobinu molekulárním kyslíkem (Kiese, 1974).

Zvýšené hladiny methemoglobinu se mohou také objevit v důsledku blíže nespecifikovaných stresových situací. Konkrétně, stav energetického metabolismu červených krvinek může být ovlivněn celkovou výživou, hypoxií a námahou, v jejichž důsledku dochází k posunu normální rovnováhy hemoglobin – methemoglobin. Publikované hodnoty zahrnují 0,9 až 3,6 % pro pstruha duhového, 10,9 % pro lososa (*Oncorhynchus gorbuscha*) před třením. Přítomnost methemoglobinu v koncentraci okolo deseti procent nemůže být u ryb považována za něco výjimečného nebo dokonce patologického. V tomto ohledu se ryby liší od savců, u kterých za normálních okolností koncentrace methemoglobinu v krvi zřídka dosáhne 1 % (Cameron, 1971).

Vliv na další fyziologické funkce ryb:

Úhyn ryb může být spojen jak s vysokou tak s nízkou koncentrací methemoglobinu v krvi ryb (Margioco et al., 1983), což nasvědčuje tomu, že toxické účinky dusitanů jsou kombinací několika různých efektů:

- V důsledku nedostatečného zásobení kyslíkem, které je způsobeno methemoglobinemií, **může dojít k hypoxii a následně závažnému poškození některých orgánů**, např. jater (Arillo et al., 1984) nebo oční sítnice (Hofer a Gatumu, 1994). Hypoxie tkání a

získávání energie pomocí anaerobního metabolismu se projevuje zvýšením koncentrace laktátu v krevní plazmě (Jensen et al., 1987; Stormer et al., 1996).

- Dusitany způsobují **vyplavování draslíku z kosterního svalstva a z červených krvinek**, což se projevuje zvýšením koncentrace draselných iontů v krevní plazmě (Jensen et al., 1987). Vyplavování draselných iontů z červených krvinek způsobuje jejich smršťování, které je spojeno se snížením afinity hemových funkčních skupin ke kyslíku, dále vede ke snížení rozpustnosti hemoglobinu (Jensen, 1990) a následně i k strukturnímu poškození erytrocytů (Jensen et al., 1987). Tyto poruchy jsou doprovázeny snížením hematokritové hodnoty, snížením počtu červených krvinek a koncentrace hemoglobinu (Jensen, 1990; Avilez et al., 2004).

- Dusitany způsobují poškození kardiovaskulárního systému (Aggergaard a Jensen, 2001).

- Během expozice dusitanům pravděpodobně **dochází i ke změnám v metabolismu a vylučování dusíku u ryb**. Konkrétně k určitému zvýšení množství amoniaku vyloučeného žábrami a močí dochází během otravy dusitany u pstruha duhového (Zachariasen, 2001).

- Dusitany snadno **reagují** prostřednictvím svých derivátů s **– NH_2** a **– SH skupinami**, díky čemuž mohou inhibovat mnoho enzymů a podílet se na tvorbě některých mutagenních a karcinogenních sloučenin (např. N- alkylnitrosaminů) (Arillo et al., 1984).

Detoxikační mechanismus:

Červené krvinky ryb obsahují enzym reduktázu, který přeměňuje methemoglobin na hemoglobin (Cameron, 1971; Huey a Beitinger, 1982). Díky tomuto procesu dosáhne po přenesení ryb do čisté vody obsah methemoglobinu v krvi fyziologických hodnot během 24 až 72 hodin (Huey et al., 1980), pokud není otrava dusitany již v pozdním stádiu. V přítomnosti dusitanů je konečná koncentrace methemoglobinu v krvi výsledkem rovnováhy mezi vznikem methemoglobinu a jeho přeměnou pomocí reduktázy zpět na hemoglobin. Díky tomu, že jsou ryby poikilotermní živočichové, účinnost reduktázy pravděpodobně kolísá se změnami teplot během roku (Perrone a Meade, 1977).

Dále bylo zjištěno, že dusitany nahromaděné v krvi a tkáních jsou postupně oxidovány na téměř netoxické dusičnany, které jsou pak vylučovány močí a žlučí. K detoxikaci dusitanů na dusičnany dochází různými způsoby, např. pomocí hemoglobinu, dalších hemových bílkovin, katalázy a cytochromoxidázy. Téměř 20 % celkového přijmu dusitanů je detoxikováno červenými krvinkami výše uvedenou reakcí popisující přeměnu hemoglobinu na methemoglobin. Tato reakce může být tudíž považována za popis toxického působení dusitanů (přeměna hemoglobinu na methemoglobin), ale zároveň také za popis detoxikačního mechanismu (přeměna dusitanů na dusičnany) (Doblander a Lackner, 1997).

Intenzita biotransformace může být ovlivněna přítomností antioxidantů. Existuje několik nízkomolekulárních sloučenin, které snižují toxicitu dusitanů. Jedná se např. o methylenovou modř, kyselinu askorbovou, kyselinu močovou, atd. (Doblander a Lackner, 1996).

Zdá se, že detoxikační mechanismus probíhající v červených krvinkách také silně závisí na nasycení hemoglobinu kyslíkem. Anoxické erytrocyty neprodukují téměř žádné dusičnany v porovnání s okysličenými buňkami (Doblander a Lackner, 1997).

Intenzivní detoxikace dusitanů oxidací na dusičnany probíhá také v jaterních buňkách (Doblander a Lackner, 1996).

2.4.4 Vliv dusitanů na další hematologické parametry ryb

Samotné působení dusitanů na hematologické parametry ryb bylo podrobně popsáno v kapitole 2.4.3 Mechanismus toxického působení. Touto problematikou se zabývala řada autorů, jejichž výsledky jsou shrnuty v tab. 1.

Tab. 1: Vliv dusitanů na hematologické parametry různých druhů ryb (změny v porovnání s kontrolou, akutní expozice).

Druh	**NO_2^-** ($mg.l^{-1}$)	**Cl^-** ($mg.l^{-1}$)	Koncentrace hemoglobinu **(Hb)**	Koncentrace methemoglobinu **(MetHb)**	Hodnota hematokritu **(Hc)**	Počet erytrocytů **(Ery)**	**Autor**
kapr obecný	20	11	↓	↑	↓	↓	1
kapr obecný	20	132	↓ méně výrazné	↑ méně výrazné	↓ méně výrazné	↓ méně výrazné	1
sumec velký	1,6	13,50	↓	↑	---------	----------	2
lín obecný	1,22	7,00	↓	↑	---------	----------	2
tilápie nilská	2	166	↓ méně výrazné	↑ méně výrazné	---------	----------	2
pstruh duhový	3,14	0,25	↓	↑	---------	↓	3
jeseter sibiřský	130	130,5	↓	↑	---------	----------	4
Brycon cephalus	0,2	0,294	----------	↓	---------	↓	5
Brycon cephalus	0,4	0,294	----------	↓	---------	↓	5
Brycon cephalus	0,6	0,294	----------	↓	---------	↓	5

Legenda: 1 - Svobodová et al., 2005b, **2 -** Svobodová et al., 2000b, **3 -** Doblander et al., 1997, **4 -** Huertas et al., 2002, **5** - Avilez et al., 2004. Vzrůst hodnot: ↑, pokles hodnot: ↓, parametr nezměřen: ---------

2.4.5 Faktory ovlivňující toxicitu dusitanů

DÉLKA EXPOZICE:

a) Krátkodobá expozice - pro maximální akumulaci dusitanů v rybách postačuje pouze 24 - 48 hodinová expozice (Huey et al., 1980).

b) Dlouhodobá expozice – dlouhodobá expozice ryb dusitanům se projevuje úhynem ryb, snížením rychlosti růstu, poškozením tkání a změnou biochemických a hematologických ukazatelů.

Několik studií prokázalo (Russo et al., 1974), že se LC50 dusitanů po 8 dnech expozice asymptoticky blíží přibližně 60 % 96hLC50. Maximální koncentrace dusitanů, při které nebyl zaznamenán žádný úhyn, je v podstatě stejná při devadesáti šestihodinové jako při osmidenní expozici a pohybuje se v rozmezí od 30 do 50 % 96hLC50 (Russo et al., 1974).

KVALITA VODY:

Chloridy

Od roku 1977 je známo, že toxicita dusitanů silně závisí na salinitě vody (Crawford a Allen, 1977). V mořské vodě byla zaznamenána 50 až 100 krát nižší mortalita ryb, než ve sladké vodě při stejné koncentraci dusitanů. V chovech ryb se proto doporučuje sledovat hmotnostní poměr $Cl^-/N\text{-}NO_2^-$ (EIFAC, 1984). V chovu lososovitých ryb by tento poměr neměl klesnout pod 17 a v chovu ostatních ryb pod 8 (EIFAC, 1984).

Pokusy na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*) a na rybách (*Pimephales promela*s) ukázaly, že vztah mezi toxicitou dusitanů a koncentrací chloridů ve vodě, je lineární (Russo a Thurston, 1977; Palachek a Tomasso, 1984). Pozitivní vliv chloridů na snižování toxicity dusitanů pro ryby, byl prokázán i u akvarijní ryby živorodky duhové (*Poecilia reticulata*). 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 – 190 $mg.l^{-1}$) (Kroupová et al., 2004).

Ostatní anionty

Existují informace také o dalších aniontech, které mají určitý vliv na snížení toxicity dusitanů. Jedná se především o bromidy, které jsou chloridům chemicky podobné. Bylo zjištěno, že koncentrace bromidů 80 $mg.l^{-1}$ je dostatečná k potlačení nepříznivého vlivu dusitanů o koncentraci 105 $mg.l^{-1}$. Určitý vliv mají také hydrogenuhličitany a

dusičnany, ale nejsou ani zdaleka tak efektivní jako chloridy a bromidy (Lewis a Morris, 1986). Dvoumocné a trojmocné anionty (sírany, fosforečnany, boritany) mají minimální význam (Russo et al., 1981).

Kationty

Ve sladkých vodách se běžně v nemalém množství vyskytují vápník, hořčík, sodík a draslík, a proto jsou znalosti o jejich vlivu na toxicitu dusitanů velmi významné. Jejich vliv na toxicitu dusitanů pro ryby však není doposud popsán.

pH

Vliv koncentrace H^+ iontů na toxicitu dusitanů je stále velmi nejasný. Příspěvky k tomuto tématu jsou často rozporuplné. Pro manipulaci s pH se totiž používají pufry, které mění aniontové pozadí, takže je potom obtížné oddělit vliv měnícího se aniontového pozadí od vlivu samotného pH. Dalším problémem je používání rozsahu pH, který je mimo normální rozsah schopnosti adaptace ryb (Lewis a Morris, 1986).

Kyslík a teplota

Koncentrace kyslíku ovlivňuje toxicitu dusitanů, protože dusitany snižují kapacitu krve pro transport kyslíku. Proto můžeme nedostatečnými dodávkami kyslíku do vody ještě více zhoršit zdravotní stav ryb. Například pokus provedený se sumci prokázal, že koncentrace 5 $mg.l^{-1}$ kyslíku nebyla v přítomnosti dusitanů dostačující, ačkoliv sumci běžně tolerují i koncentrace nižší (Bowser et al., 1983).

VĚK A VELIKOST RYB:

Otázkou vlivu věku ryb na jejich citlivost vůči dusitanům se zabývalo mnoho studií. Byly podány přesvědčivé důkazy o tom, že mladší věkové kategorie jsou méně citlivé k toxickým účinkům dusitanů než starší a dospělí jedinci. Perrone a Meade (1977) zjistili, že plůdek lososa (*Oncorhynchus kisutch*) je odolnější vůči dusitanům, než roček stejného druhu. Russo et al. (1974) a Bartlett a Neumann (1998) došli k stejnému závěru při pokusech i na jiných lososovitých rybách. Tyto rozdíly mohou být pravděpodobně způsobeny rozdílnou aktivitou methemoglobin reduktázy u mladých a dospělých jedinců (Kiese, 1974).

Kyslík přijímaný kůží je schopen u mladých jedinců lépe proniknout do vnitřních tkání než u dospělých. Vzhledem k tomu, že jsou dusitany krevním jedem, se zdá logické,

že rybí plůdek bude schopen přežít delší dobu se sníženou kyslíkovou kapacitou krve, než dospělý jedinec, který je závislý na přísunu kyslíku krví (Bartlett a Neumann, 1998).

INDIVIDUÁLNÍ CITLIVOST:

Citlivost ryb vůči dusitanům může být u některých druhů výrazně individuální. Rozdíly v citlivosti u jednotlivých ryb jsou typické především pro pstruha duhového (Stormer et al., 1996; Aggergaard a Jensen, 2001). Pstruzi mohou být rozděleni do dvou rozdílných skupin. První skupinu tvoří ryby citlivé, které dusitany rychle akumulují. Ryby z této skupiny jsou více postiženy různými fyziologickými poruchami a vykazují dřívější mortalitu, než ryby z druhé skupiny, které jsou mnohem odolnější (Stormer et al., 1996; Aggergaard a Jensen, 2001).

Tento jev, může být vysvětlen rozdílem v počtu chloridových buněk žaber anebo rozdílem ve velikosti exponovaného povrchu mezi těmito dvěma skupinami pstruhů. Zjištěné rozdíly mohou být také důsledkem rozdílné účinnosti detoxifikačního a eliminačního mechanismu (Aggergaard a Jensen, 2001).

DRUHY RYB:

Citlivost k dusitanům se velmi liší podle druhu ryb (tab. 2). Nejcitlivější ze studovaných čeledí jsou lososovití, rozdíly mezi jednotlivými druhy jsou minimální. Výrazné rozdíly v citlivosti jsou mezi teplomilnými rybami.

Velmi odolný vůči dusitanům je okounek pstruhový (*Micropterus salmoides*), který tvoří větší množství methemoglobinu v krvi až při velmi vysokých koncentracích dusitanů (Palachek a Tomasso, 1984).

Tab. 2: Souhrn hodnot 96hLC50 dusitanového dusíku (Lewis a Morris, 1986).

Druh	**Ca^{2+}** ($mg.l^{-1}$)	**Alkalita** ($CaCO_3$ $mg.l^{-1}$)	**pH**	**Teplota** (°C)	**96hLC50** (20 $mg.l^{-1}$ Cl^-)
Studenomilné					
pstruh duhový *Oncorhynchus mykiss*	50	177	7,8	10	6,6
losos *Oncorhynchus tshawytscha*		20	7,2	13	4,7
Teplomilné					
Ictaluridae					
sumeček skvrnitý *Ictalurus punctatus*	80	190	7,9	32	6,4
sumeček černý *Ictalurus melas*					>52
Cyprinidae					
střevle *Pimephales promelas*	80	190	7,9	23	66
Semotilus atromaculatus	27	98	8,3	18	>63
kapr obecný *Cyprinus carpio*					>52
Castomidae					
Catostomus commersoni					>100
Carpiodes cyprinus					>100
Centrarchiadae					
okounek pstruhový *Micropterus salmoides*	80	190	7,9	23	140
slunečnice velkoploutvá *Lepomis macrochirus*			7,2	30	108
Taxony z jiných čeledí					
Tilapia aurea	80	190	7,9	23	15
Percina caprodes					<9
Culaea inconstans					<9
Cottus bairdi	53	177	8,1	13	>106

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MATERIÁL A METODIKA

3.1.1 Test akutní toxicity na sumci velkém – albín (*Silurus glanis*)

Test akutní toxicity na sumci velkém – albín (*Silurus glanis*) byl prováděn podle normy ČSN EN ISO 7346-2 a OECD č. 203.

Materiál a pomůcky

- **Testovací organismus:** sumec velký - albín (*Silurus glanis*). Celková délka těla ryb použitých k testům akutní toxicity byla v rozmezí 12 – 15 mm. Ryby byly do jednotlivých nádrží vybírány náhodně

Obr. 1. *Silurus glanis*.

- **Ředicí voda:** odstátá vodovodní voda (pH 7,2, $KNK_{4,5}$ 0,5 mmol.l^{-1}, $CHSK_{Mn}$ 2,2 mg.l^{-1}, ∑Ca+Mg 14,0 mg.l^{-1}, N-NH_4^+ 0,03 mg.l^{-1}, N-NO_3^- 5,2 mg.l^{-1}, N-NO_2^- 0,01 mg.l^{-1}, Cl^- 11,0 mg.l^{-1}, SO_4^{2-} 51,5 mg.l^{-1}, P-PO_4^{3-} 0,01 mg.l^{-1})
- **Testovaná látka:** dusitany byly aplikovány do lázní ve formě dusitanu sodného ($NaNO_2$ p.a.)
- **Přístroje a zařízení:** pHmetr, oximetr, analytické váhy, laboratorní váhy s přesností na 0,1 mg
- **Laboratorní nádobí:** pipety, odměrné baňky, laboratorní nádoby
- **Ostatní pomůcky:** lovící síťky a nádoby pro přenášení ryb

Podmínky testu

- **délka adaptační fáze:** 48 hodin
- **objem lázně:** 150 ml
- **teplota vody:** 21 – 24 °C
- **nasycení vody kyslíkem:** O_2 > 60 %

- **počet ryb v jedné nádrži:** 10 kusů ryb v jedné koncentraci v základním testu
- **počet paralelních stanovení:** 4 paralelní testy
- **výměna lázně:** po 48 hodinách
- **osvětlení:** 12 hodin denně
- **délka expozice:** 96 hodin
- **ostatní podmínky:** ryby nebyly krmeny

Pracovní postup

Testy akutní toxicity na sumci velkém – albín (*Silurus glanis*) byly prováděny v toxikologické laboratoři VÚRH JU Vodňany.

Adaptace ryb: ryby, které byly použity k testům, byly chovány po dobu 48 hodin v polyethylenových pytlích s aerací v ředicí vodě. Po tuto dobu nebyly krmeny.

Základní test se skládal ze sedmi koncentrací testované látky: 10; 20; 30; 50; 80; 100 a 150 $mg.l^{-1}$ NO_2^-. Do jednotlivých koncentrací testované látky bylo nasazeno 10 kusů ryb. Stejným způsobem se nasadila i kontrola. Test probíhal ve čtyřech opakováních. Po 48 hodinách byly ryby přeloveny do čerstvě připravených roztoků testované látky. Během testu se sledovala a zaznamenávala mortalita a chování ryb. Dále byla kontrolována koncentrace rozpuštěného kyslíku, pH a teplota lázně. Test probíhal po dobu 96 hodin. Po ukončení testů byly ryby, které přežily, usmrceny zvýšenou dávkou anestetika – hřebíčkového oleje.

Vyhodnocení základního testu

Na základě zjištěné mortality ryb v jednotlivých koncentracích v průběhu testu byla probitovou analýzou vypočítána hodnota 96hLC50 dusitanů. K výpočtům byl použit program EKO-TOX 5 (INGEO Liberec).

3.1.2 Test akutní toxicity na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*)

Test akutní toxicity na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*) byl prováděn podle normy ČSN EN ISO 7346-2 a OECD 203.

Materiál a pomůcky

- **Testovací organismus:** pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*). Počáteční hmotnost ryb byla 19 ± 0,3 g (hmotnosti ryb v jednotlivých nádržích se na počátku testu významně nelišily). Ryby byly do jednotlivých nádrží vybírány náhodně

Obr. 2. *Oncorhynchus mykiss*.

- **Ředicí voda:** odstátá vodovodní voda (pH 7,2, $KNK_{4,5}$ 0,5 mmol.l^{-1}, $CHSK_{Mn}$ 2,2 mg.l^{-1}, ∑Ca+Mg 14,0 mg.l^{-1}, N-NH_4^+ 0,03 mg.l^{-1}, N-NO_3^- 5,2 mg.l^{-1}, N-NO_2^- 0,01 mg.l^{-1}, Cl^- 11,0 mg.l^{-1}, SO_4^{2-} 51,5 mg.l^{-1}, P-PO_4^{3-} 0,01 mg.l^{-1})
- **Testovaná látka:** dusitany byly aplikovány do lázní ve formě dusitanu sodného ($NaNO_2$ p.a.)
- **Přístroje a zařízení:** pHmetr, oximetr, analytické váhy, laboratorní váhy s přesností na 0,1 mg
- **Laboratorní nádobí:** pipety, odměrné baňky, akvária
- **Ostatní pomůcky:** lovící síťky a nádoby pro přenášení ryb

Podmínky testu

- **délka adaptační fáze:** 48 hodin
- **objem lázně:** 20 litrů
- **teplota vody:** 14 – 15,5 °C
- **nasycení vody kyslíkem:** O_2 > 60 %
- **počet ryb v jedné nádrži:** 7 ks

- **výměna lázně**: po 24 hodinách
- **osvětlení:** 12 hodin denně
- **ostatní podmínky:** ryby nebyly krmeny, lázeň byla mírně aerovaná

Pracovní postup

Adaptace ryb: ryby, které byly použity k testům, byly chovány po dobu 48 hodin v akváriích v ředicí vodě. Po tuto dobu nebyly krmeny.

V předběžném testu bylo použito sedm koncentrací dusitanů: 3,3; 6,7; 16,7; 33,3; 66,7; 133,3 a 200 $mg.l^{-1}$ NO_2^-. Do jednotlivých nádrží o objemu 20 litrů byly nasazeny 3 kusy ryb. Stejným způsobem byla nasazena i kontrola. Po 24 hodinách se ryby přelovily do čerstvě připravených roztoků testované látky. Během testu se zaznamenávala mortalita ryb a chování ryb. Dále se kontrolovala koncentrace rozpuštěného kyslíku, pH a teplota lázně. Předběžný test probíhal po dobu 96 hodin. Na základě výsledku tohoto testu se stanovily koncentrace pro základní test.

Základní test se skládal rovněž ze sedmi koncentrací testované látky: 3,3; 6,7; 16,7; 33,3; 50,0; 66,7 a 133,3 $mg.l^{-1}$ NO_2^-. Do jednotlivých koncentrací testované látky se nasazovalo sedm kusů ryb. Test trval 96 hodin. Další postup prací byl stejný jako v předběžném testu.

Vyhodnocení základního testu

Na základě zjištěné mortality ryb v jednotlivých koncentracích v průběhu základního testu byla probitovou analýzou vypočítána hodnota 96hLC50 dusitanů. K výpočtům byl použit program EKO-TOX 5.1 (INGEO Liberec).

3.1.3 Test subchronické toxicity (růstový test) na pstruhu duhovém

Test subchronické toxicity na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*) byl prováděn s cílem stanovit subchronickou toxicitu dusitanů na základě následujících parametrů:

a) růstová rychlost ryb

b) mortalita

c) hematologické parametry

Test subchronické toxicity na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*) byl prováděn podle norem ČSN EN ISO 10229 (75 7760) a OECD 215 (Růstový test toxicity na juvenilních rybách - 28 denní).

Materiál a pomůcky

- **Testovací organismus:** pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*). Počáteční hmotnost ryb byla 19 ± 0,3 g (hmotnosti ryb v jednotlivých nádržích se na počátku testu významně nelišily). Ryby byly do jednotlivých nádrží vybírány náhodně
- **Ředicí voda:** odstátá vodovodní voda (pH 7,2, $KNK_{4,5}$ 0,5 mmol.l^{-1}, $CHSK_{Mn}$ 2,2 mg.l^{-1}, ∑Ca+Mg 14,0 mg.l^{-1}, N-NH_4^+ 0,03 mg.l^{-1}, N-NO_3^- 5,2 mg.l^{-1}, N-NO_2^- 0,01 mg.l^{-1}, Cl^- 11,0 mg.l^{-1}, SO_4^{2-} 51,5 mg.l^{-1}, P-PO_4^{3-} 0,01 mg.l^{-1})
- **Testovaná látka:** dusitany byly aplikovány do lázní ve formě dusitanu sodného ($NaNO_2$ p.a.)
- **Přístroje a zařízení:** pHmetr, oximetr, analytické váhy, laboratorní váhy s přesností na 0,1 mg
- **Laboratorní nádobí:** pipety, odměrné baňky
- **Ostatní pomůcky:** lovící síťky a nádoby pro přenášení ryb
- **Nádrže:** objem 400 litrů

Podmínky testu

- **délka adaptační fáze:** 14 dnů
- **objem lázně:** 100 litrů
- **teplota vody:** 14 – 15,5 °C
- **nasycení vody kyslíkem:** O_2 > 70 %
- **počet ryb v jedné nádrži:** 20 ks
- **výměna lázně**: po 24 hodinách
- **osvětlení:** 12 hodin denně
- **ostatní podmínky:** ryby byly krmeny dvakrát denně komerčním krmivem (BioMar, 47 % bílkovin, 26 % tuku) v celkové denní dávce 2,5 % hmotnost ryb

Pracovní postup

Adaptace ryb: ryby, které byly použity k testům, byly chovány po dobu 14 dní v 200 litrových akváriích, kde se aklimatizovaly. Byly zde krmeny stejným krmivem jako v průběhu testu.

Uvedená počáteční hmotnost ryb byla zvolena tak, aby ryby v kontrolní skupině po 28 dnech dosáhly přírůstku hmotnosti alespoň o 50 % a zároveň, aby bylo možné v závěru testu odebrat dostatečné množství krve na stanovení vybraných hematologických parametrů. Subchronický test byl proveden obnovovací metodou (výměna lázně po 24 hodinách). Pokusné ryby byly vystaveny po dobu 28 dnů koncentracím: 0,01; 0,1; 0,6; 1,0; 3,0 $mg.l^{-1}$ NO_2^- – ve dvou opakováních pro každou koncentraci. Koncentrace testované látky byly zvoleny na základě výsledků testu akutní toxicity na pstruhu duhovém. Ryby se nasazovaly po 20 kusech do jednotlivých koncentrací a kontroly. V průběhu testu se zaznamenávalo chování ryb, jejich schopnost přijímat krmivo a počty uhynulých jedinců. Ryby byly zváženy (s přesností na 0.1 g) na začátku testu, po 14 dnech a v závěru testu.

Na konci testu byla 6 rybám z každé nádrže odebrána krev na stanovení hematologického profilu a na stanovení koncentrace dusitanů v plasmě. Krev byla odebírána z *v. caudalis*. Jednotlivé vzorky krve se stabilizovaly pomocí 40 IU heparinu sodného na 1 ml krve. Koncentrace dusitanů v krevní plasmě a svalovině ryb byla měřena podle metodického postupu uvedeného v práci autorů Shechter et al. (1972). Hematologické rozbory byly prováděny podle Jednotných metod hematologického vyšetřování ryb (Svobodová et al., 1986): počet erytrocytů (Ery), počet leukocytů (Leu), koncentrace hemoglobinu (Hb) a methemoglobinu (MetHb), hematokrit (Hc), střední barevná koncentrace (MCHC), hemoglobin erytrocytu (MCH) a střední objem erytrocytu (MCV). Krevní plazma byla oddělena odstřeďováním (10 min v 12 000 × g) při teplotě 4 °C (podrobný popis metodiky viz kapitola 3.1.4 vyšetření hematologického profilu ryb). Dále byly odebírány vzorky svaloviny o hmotnosti cca 1 g na stanovení koncentrace dusitanů. Vzorky byly uchovávány před vlastní analýzou při –80 °C.

Vyhodnocení subchronického testu

Na konci testu byly vyhodnoceny rozdíly v hmotnosti ryb v jednotlivých nádržích (koncentracích) a rozdíly v hematologických ukazatelích exponovaných ryb. Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí softwarového programu Statistica 6.1 (StatSoft ČR). Data byla nejprve pomocí Kolmogorov-Smirnova testu testována na normalitu a následně byla pomocí Bartlettova testu ověřována hypotéza o homogenitě

variancí. V případě, že byla prokázána normalita dat a homogenita variancí, byla dále použita dvoucestná analýza variance (ANOVA) a následně mnohonásobné porovnání skupin pomocí Dunnettova testu. V případě, že podmínky nebyly splněny, bylo porovnání provedeno pomocí neparametrického Kruskal-Wallisova testu.

Vyhodnocení růstu

Průměrná specifická míra růstu (r) pro jednotlivé nádrže byla vypočtena jako podíl rozdílu průměru přirozených logaritmů hmotností jednotlivých ryb v nádrži na počátku a konci testu (28 dnů):

$$r = \frac{\overline{\ln w_2} - \overline{\ln w_1}}{t_2 - t_1} \cdot 100$$

kde: r = průměrná specifická míra růstu pro nádrž

w_1, w_2 = hmotnosti jedné ryby v čase t_1 a t_2 jednotlivě (g)

$\overline{\ln w_1}$, $\overline{\ln w_2}$ = průměrná hodnota přirozeného logaritmu z hodnot ln w_1 a ln w_2

t_1, t_2 = čas (dny) – začátek expozice a konec expozice

Vyhodnocení hodnot LOEC a NOEC

Hodnoty LOEC a NOEC byly vyhodnoceny probitovou analýzou na základě zjištěných průměrných specifických rychlostí růstu v jednotlivých koncentracích a kontrole. K vyjádření hodnot LOEC a NOEC byly použity hodnoty 28dLC0 (hodnota NOEC) a 28dLC10 (hodnota LOEC). K vyhodnocení byl použit program EKOTOX 5.1.

3.1.4 Vyšetření hematologického profilu ryb

Počet erytrocytů (Ery): krev byla naředěna pomocí Hayemova roztoku ve speciálních skleněných baničkách. Obsah byl poté míchán krouživými pohyby 2 – 3 minuty. Kapátkem byla naplněna počítací Bürkerova komůrka, kde byly erytrocyty počítány pod mikroskopem při 200 násobném zvětšení. Výsledný počet je uváděn v $T.l^{-1}$ (Svobodová et al., 1986).

Počet leukocytů (Leu): pro stanovení počtu leukocytů byl použit cca. 2 týdny odstátý a přefiltrovaný roztok podle Procházky a Škrobáka. Ředění a počítání bylo prováděno stejným způsobem jako u stanovení počtu erytrocytů. Počet leukocytů je uváděn v G. l^{-1} (Svobodová et al., 1986).

Koncentrace hemoglobinu (Hb): stanovení se provádělo fotometrickou kyanohemiglobinovou metodou. Dvacet mikrolitrů heparinizované krve bylo převedeno do zkumavky obsahující 7 ml transformačního roztoku. Dále pak byla změřena absorbance takto vzniklého roztoku při 540 nm. Koncentrace hemoglobinu se vypočítala z kalibrační přímky. Obsah hemoglobinu byl udán v g. l^{-1} (Svobodová et al., 1986).

Koncentrace methemoglobinu (MetHb): ke stanovení methemoglobinu v krvi, se používá fotometrická metoda, absorpční křivka methemoglobinu vykazuje charakteristický vrchol při 630 nm. Převedením methemoglobinu na methemoglobinkyanid (působením kyanidu draselného) tento vrchol zmizí. V jedné části vzorku se převede veškerý hemoglobin ferrikyanidem draselným na methemoglobin, který po přídavku kyanidu draselného přejde na methemoglobinkyanid. V druhé části vzorku se převede na methemoglobinkyanid pouze ten methemoglobin, který byl původně ve vzorku přítomen. Rozdíl absorbancí při 630 nm je přímo úměrný koncentraci methemoglobinu (Svobodová et al., 1986).

Relativní obsah methemoglobinu se vypočte podle vztahu:

$$\%\ \mathrm{MetHb} = \frac{\mathrm{E} - \mathrm{A1}}{\mathrm{A3} - \mathrm{A2}} * 100$$

E - absorbance supernatantu

A1 - první absorbance

A2 - druhá absorbance

A3 - třetí absorbance

Hematokritová hodnota (PCV): se vyjadřuje jako objem erytrocytů k celkovému objemu krve. Tato hodnota byla stanovena ve speciálních kapilárách, které byly heparinované. Po odstředění krve (3 minuty) byla na hematokritovém měřiči zjištěna procenta hematokritu. Hodnota se vynásobila koeficientem 0,01 a výsledná hodnota byla vyjádřena v PCV $1.l^{-1}$ (Svobodová et al., 1986).

Střední barevná koncentrace (MCHC): tato hodnota udává koncentraci hemoglobinu v objemové jednotce erytrocytů. Výpočet se provádí podle následujícího vzorce:

$$MCHC = \frac{Hb}{PCV * 1000}$$

Hb - koncentrace hemoglobinu

PCV - hematokritová hodnota

Hemoglobin erytrocytu (MCH): tato hodnota udává průměrnou koncentraci hemoglobinu v jednotlivých erytrocytech a uvádí se v pg (10^{-12}). Výpočet se provádí podle následujícího vzorce

$$MCH = \frac{Hb}{Ery}$$

Hb - koncentrace hemoglobinu

Ery - počet erytrocytů

Střední objem erytrocytu (MCV): tato hodnota se udává ve fentolitrech (fl). Výpočet se provádí podle následujícího vzorce:

$$MCV = \frac{PCV * 1000}{Ery}$$

PCV - hematokritová hodnota

Ery - počet erytrocytů

3.1.5 Stanovení dusitanů v krvi

Stanovení bylo prováděno podle tzv. mikrometody pro stanovení dusitanů v krvi (Shechter, 1972).

Materiál a pomůcky

- **Přístroje:** spektrofotometr, centrifuga
- **Chemikálie:** roztok kyseliny sulfanilové, roztok ledové kyseliny octové, „Cleve‘s acid“ roztok – 1- naftylamin -7- sulfonové kyseliny, zásobní roztok dusitanu sodného, roztok standardu, roztok síranu zinečnatého

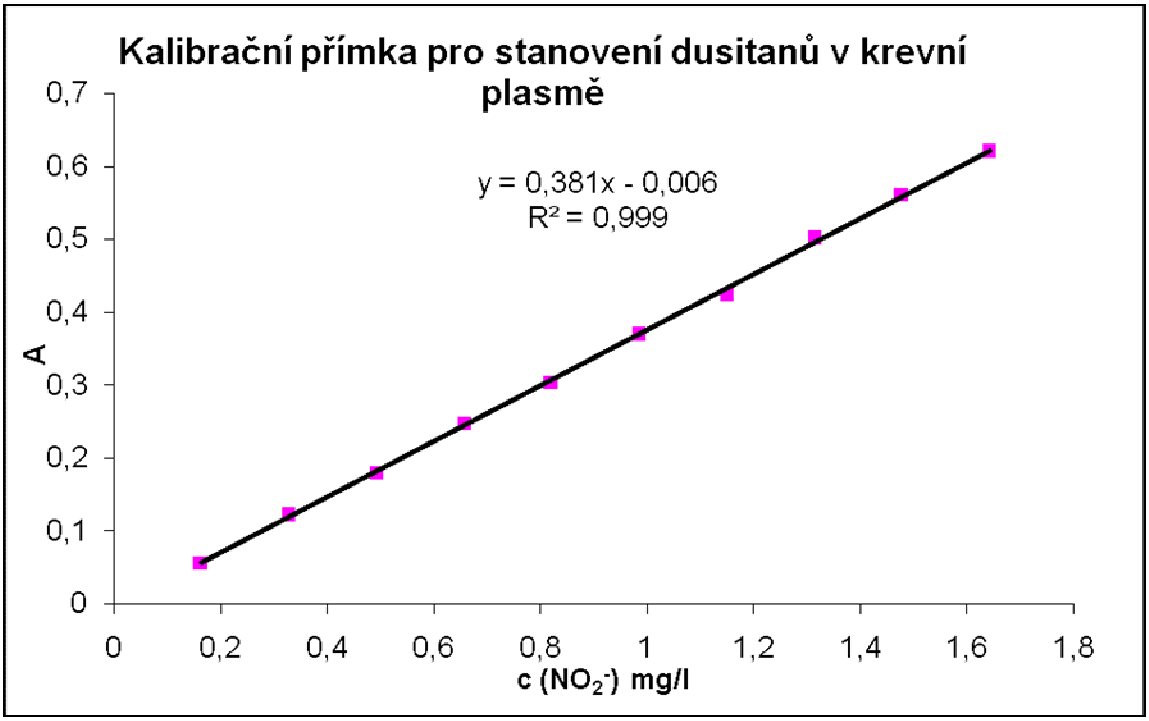
Pracovní postup

Deproteinizace: 0,1 ml krve bylo převedeno do 1,5 ml zkumavky obsahující 0,6 ml roztoku síranu zinečnatého. Dále bylo přidáno 0,4 ml redestilované vody a důkladně promícháno. Dále bylo přidáno 0,1 ml 4 % vodného roztoku hydroxidu sodného a znovu promícháno. Vzorky pak byly nechány po dobu 1 hodiny na šupinkovém ledu. Sražené bílkoviny byly následně odstraněny pomocí centrifugy (2 min při 15 000 ot./min).

Barevná reakce: 0,6 ml takto vniklého roztoku (viz výše) jsme převedli do zkumavky a přidali 0,4 ml redestilované vody, důkladně jsme promíchali a přidali 0,1 ml roztoku kys. sulfanilové. Poté jsme je nechali 15 min na ledu (proběhla diazotace). Přidali jsme 0,1 ml roztoku „Cleve's acid" a nechali 60 min při pokojové teplotě (proběhla kopulační reakce). Přítomné dusitany se projevily červeno-fialovým zbarvením, jehož intenzitu jsme měřili při 520 nm.

Příprava kalibrační přímky: několik alikvotních podílů roztoku standardu (do 0,5 ml) bylo převedeno do mikrozkumavek obsahujících 0,6 ml roztoku síranu zinečnatého. Dále bylo postupováno stejným způsobem jako při analýze vzorků (viz výše).

Obr. 3. Kalibrační přímka pro stanovení dusitanů v krevní plazmě.



Pozn.: A – absorbance, c (NO_2^-) $mg.l^{-1}$ – koncentrace dusitanů v miligramech na litr.

3.2 VÝSLEDKY

Test akutní toxicity na sumci velkém – albín (*Silurus glanis*)

Průměrná hodnota střední letální koncentrace 96hLC50 získaná v testu akutní toxicity na sumci velkém činila 15,8 mg.l^{-1} NO_2^-.

Podmínky v průběhu paralelních testů A, B, C a D jsou uvedeny v příloze (Tab. I – IV). Záznamy úhynu ryb a výsledky paralelních testů A, B, C a D jsou uvedeny v příloze (Tab. VI – IX) a (Obr. I – IV).

Test akutní toxicity na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*)

Hodnoty středních letálních koncentrací získaných v testu akutní toxicity na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*) činily: 24hLC50 - 31,9 mg.l^{-1} NO_2^-, 48hLC50 - 25,1 mg.l^{-1} NO_2^-, 72hLC50 - 11,9 mg.l^{-1} NO_2^-, 96hLC50 - 11,2 mg.l^{-1} NO_2^-.

Podmínky v průběhu základního testu jsou uvedeny v příloze (Tab. V). Záznam mortality ryb (*Oncorhynchus mykiss*) během základního testu je uveden v příloze (Tab. X).

Test subchronické toxicity (růstový test) na pstruhu duhovém

a) Mortalita, chování a růst ryb

Ryby v nejvyšší koncentraci přijímaly omezené množství krmiva, byly neklidné, vyplouvaly často k hladině. Hynuly v boční poloze nebo břichem vzhůru na dně akvária. Mortalita ryb byla zaznamenána pouze v nejvyšší koncentraci dusitanů (3 mg.l^{-1}), kde uhynulo 65 % pokusných ryb.

Při statistickém vyhodnocení hmotností ryb jednotlivých pokusných skupin a skupiny kontrolní byly zjištěny následující výsledky: výrazně nižší hmotnost ryb byla zaznamenaná pouze u poslední pokusné skupiny P5, tedy v nejvyšší testované koncentraci (Obr. 4). Hmotnosti ryb v ostatních skupinách se od kontroly významně nelišily.

V tabulce 3. jsou uvedeny hodnoty specifické růstové rychlosti a celkového přírůstku ryb v jednotlivých skupinách. Na základě těchto hodnot byly vypočítány koncentrace NOEC a LOEC: NOEC (28d LC0) = 0,01 mg.l^{-1} NO_2^-, LOEC (28d LC10) = 0,2 mg.l^{-1} NO_2^-.

Tab. 3. Specifická růstová rychlost (r) a celkový přírůstek ryb v jednotlivých skupinách v závislosti na koncentraci dusitanů ve vodě.

Skupina	**K**	**P1**	**P2**	**P3**	**P4**	**P5**
Koncentrace ($mg.l^{-1}$)	-	0,01	0,1	0,6	1,0	3,0
r	2,1	2,1	2,1	2,2	1,8	1,2
Přírůstek (%)	79	78	81	81	67	42

Pozn.: K – kontrolní skupina, P1 – P5 – pokusné skupiny.

b) Kumulace dusitanů

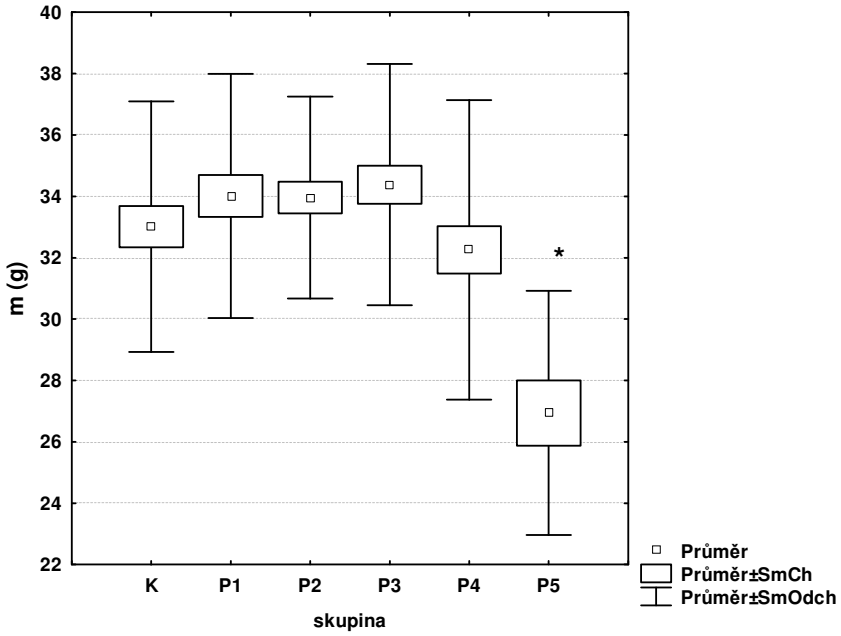
Zvýšené koncentrace dusitanů v krevní plasmě ryb byly naměřeny v pokusných skupinách P3 až P5 (Obr. 5). Ve skupinách P1, P2 a kontrole (K) byly koncentrace dusitanů pod mezí detekce. Dusitany se rovněž kumulovaly ve svalovině ryb, ale v menší míře než v plasmě (Obr. 6).

c) Hematologické vyšetření

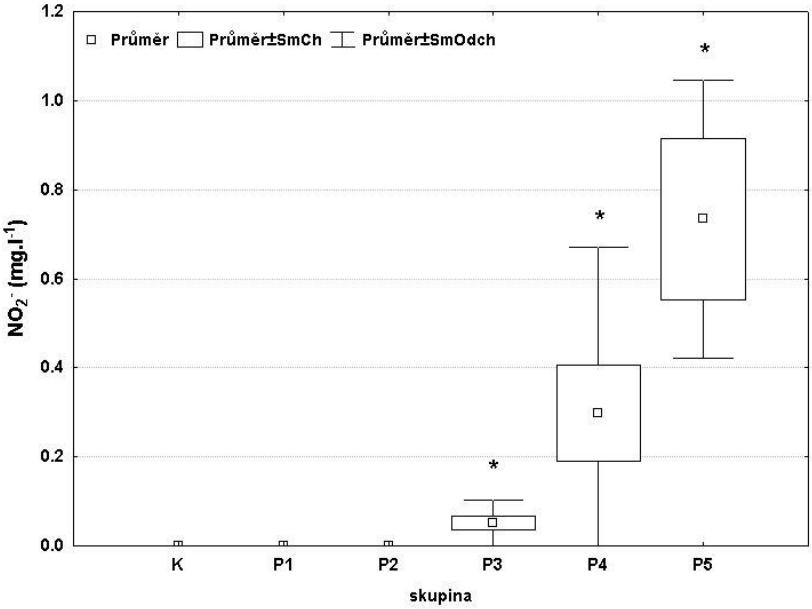
Pokud jde o hematologické ukazatele, u skupin P3 a P4 byl zaznamenán pokles hematokritu (Obr. 7) a hemoglobinu (Obr. 8). Podobné změny však paradoxně nebyly zaznamenány u skupiny P5. Na konci pokusu byla rovněž měřena koncentrace methemoglobinu v krvi ryb, mezi skupinami však nebyly zjištěny rozdíly. Dále došlo k výraznému zvýšení počtu leukocytů, a to v pokusné skupině P2 a P3 (Obr. 9). Ostatní měřené hematologické ukazatele (Ery, MCV, MCH a MCHC) nevykázaly rozdíly oproti kontrole.

Tab. 4. Průběh subchronického testu na pstruhu duhovém (počet nasazených ryb, hmotnost ryb na začátku testu, po 14 dnech expozice a na konci testu, přírůstek a mortalita ryb).

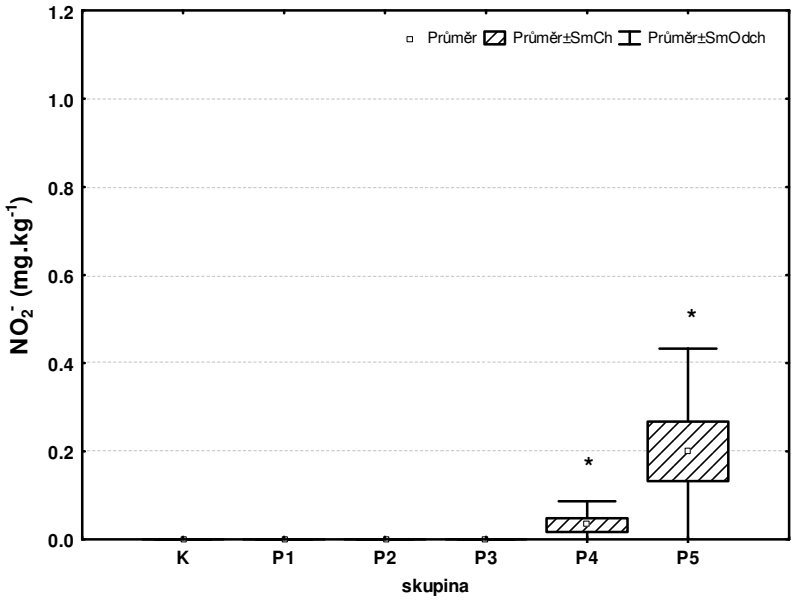
	Kontrola	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
NO_2^- ($mg.l^{-1}$)	-	0,01	0,1	0,6	1,0	3,0
počet ryb na počátku testu	40	40	40	40	40	40
průměrná hmotnost ryb při nasazení (g)	18,4	19,1	18,8	19,0	19,3	19,0
průměrná hmotnost ve 14 dnech (g)	24,8	26,2	25,4	25,5	24,8	24,8
průměrná hmotnost ve 28 dnech (g)	33,0	34,0	34,0	34,4	32,3	26,9
průměrný přírůstek ve 14 dnech (g)	2,10	2,23	2,14	2,09	1,74	1,77
průměrný přírůstek ve 28 dnech (g)	2,10	2,08	2,14	2,15	1,83	1,23
mortalita po 14 dnech (%)	0	0	0	0	0	20
celková mortalita po 28 dnech (%)	0	0	0	0	0	65



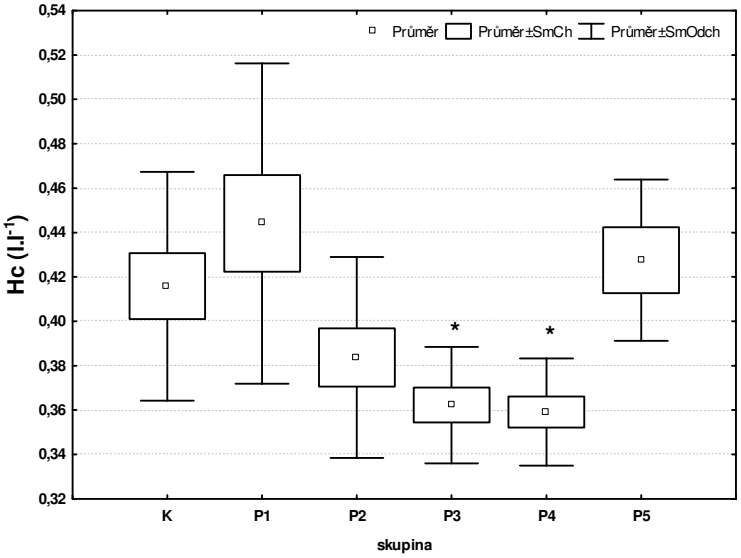
Obr. 4. Průměrná hmotnost ryb v jednotlivých skupinách na konci pokusu. K – kontrolní skupina, P1-P5 – pokusné skupiny. Signifikantní rozdíl ($p \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou je označen hvězdičkou.



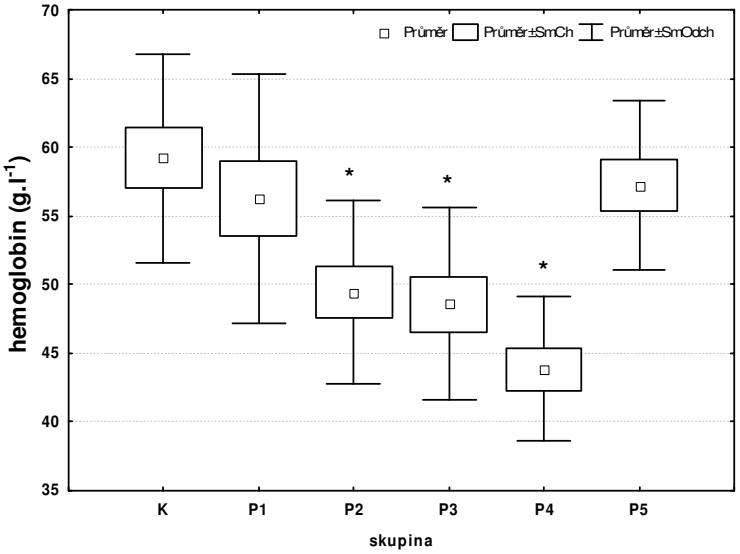
Obr. 5. Koncentrace dusitanů v krevní plasmě pokusných ryb na konci pokusu. K – kontrolní skupina, P1-P5 – pokusné skupiny. Signifikantní rozdíl ($p \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou je označen hvězdičkou.



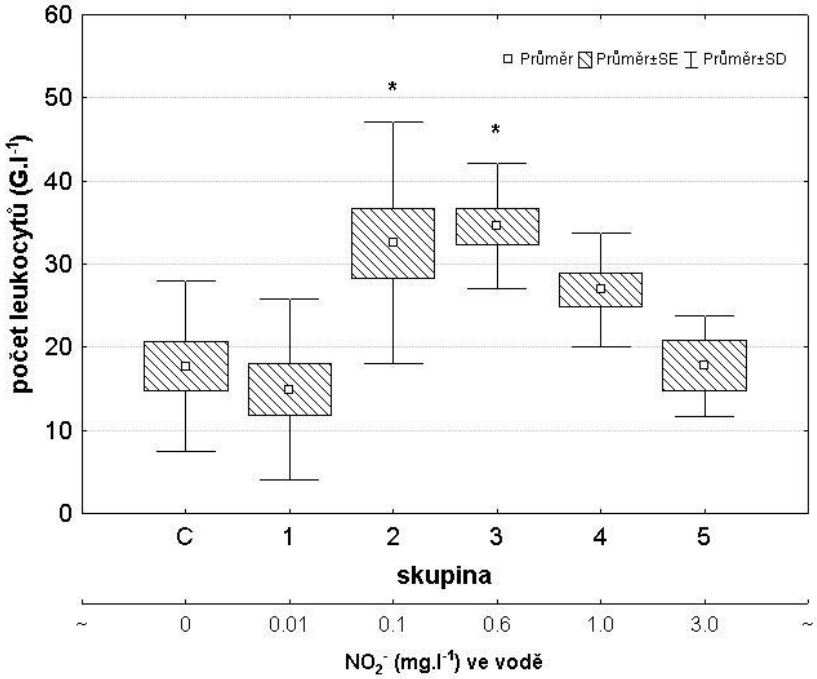
Obr. 6. Koncentrace dusitanů ve svalovině pokusných ryb na konci pokusu. K – kontrolní skupina, P1-P5 – pokusné skupiny. Signifikantní rozdíl ($p \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou je označen hvězdičkou.



Obr. 7. Hodnoty hematokritu (Hc) pokusných ryb na konci pokusu. K – kontrolní skupina, P1-P5 – pokusné skupiny. Signifikantní rozdíl ($p \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou je označen hvězdičkou.



Obr. 8. Koncentrace hemoglobinu pokusných ryb na konci pokusu. K – kontrolní skupina, P1-P5 – pokusné skupiny. Signifikantní rozdíl ($p \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou je označen hvězdičkou.



Obr. 9. Hodnoty leukocytů (Leu) pokusných ryb na konci pokusu. K – kontrolní skupina, P1-P5 – pokusné skupiny. Signifikantní rozdíl ($p \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou je označen hvězdičkou.

3.3 DISKUZE

Výsledky akutního testu toxicity potvrdily vysokou citlivost pstruha duhového k dusitanům, při poměrně nízké koncentraci chloridů (10 $mg.l^{-1}$ Cl^-). V testu akutní toxicity byla zjištěna hodnota 96hLC50 ve výši 11,2 $mg.l^{-1}$ NO_2^-, což je hodnota srovnatelná se střední letální koncentrací zjištěné za stejných podmínek pro (*Poecilia reticulata*) (96hLC50 = 26 $mg.l^{-1}$ NO_2^-) (Kroupová et al., 2004). Těmto hodnotám odpovídá i hodnota 96hLC50 zjištěná pro sumce velkého – albín (*Silurus glanis*) – 15,8 $mg.l^{-1}$ NO_2^-. Test na sumci velkém byl proveden s cílem získat základní informace o působení dusitanů na tento druh ryby a také ověřit, zda existuje rozdíl v citlivosti albinotické a normální formy sumce velkého vůči působení dusitanům. Jak se ale ukázalo, v případě normální formy sumce velkého činila hodnota 96hLC50 15,3 $mg.l^{-1}$ NO_2^- (Podlesný, 2008). Z toho vyplývá, že rozdíl v citlivosti albinotické a normální formy sumce velkého nebyl testem akutní toxicity prokázán.

Výsledky subchronického testu toxicity na pstruhu duhovém prokázaly, že již koncentrace 3 $mg.l^{-1}$ NO_2^- vyvolala při 28 denní expozici ryb výrazné snížení jejich růstové rychlosti ve srovnání s kontrolou a také 65 % úhyn ryb. V následné nižší testované koncentraci dusitanů – 1 $mg.l^{-1}$ NO_2^- nebyly zaznamenány úhyny ryb, ale bylo prokázáno snížení jejich růstové rychlosti. Žádné rozdíly v mortalitě a rychlosti růstu nebyly zjištěny ve srovnání s kontrolou v nejnižších testovaných koncentracích 0,01; 0,1 a 0,6 $mg.l^{-1}$ NO_2^-. Porovnání těchto výsledků s literárními údaji je obtížné, neboť v dostupné literatuře jsem našel pouze ojedinělé údaje o vlivu dlouhodobé expozice na růst ryb. Jedná se např. o údaje Wedemeyer a Yasutake (1978). Tito autoři nezaznamenali při chronické expozici (3 měsíce) vliv dusitanů v koncentraci 0.2 $mg.l^{-1}$ NO_2^- na růst pstruha duhového při koncentraci chloridů 2,3 $mg.l^{-1}$. Výsledky těchto autorů je však obtížné srovnávat s mými, protože oba pokusy probíhaly v odlišných podmínkách: rozdílná teplota vody, koncentrace chloridů ve vodě, délka expozice atd.

Účinky dlouhodobé expozice pstruhů duhových dusitanům, byly rovněž sledovány na základě vybraných hematologických ukazatelů a kumulace dusitanů v krevní plasmě. Zvýšené koncentrace dusitanů v plasmě byly naměřeny u ryb, které byly vystaveny koncentracím 1 $mg.l^{-1}$ NO_2^- a vyšším. Jednalo se o hodnoty 0,16 a 0,37 $mg.l^{-1}$ NO_2^-. Jak je vidět, v žádné z testovaných koncentrací nedosáhla hladina dusitanů v plazmě hodnoty převyšující koncentrace této látky v lázni. Jak se uvádí v literatuře, výraznější kumulace bývá pozorována po akutní expozici ryb dusitanům. Například Margiocco et al. (1983) při

testu akutní toxicity na pstruhu duhovém naměřil koncentrace dusitanů v plasmě, které 19krát převyšovaly koncentrace dusitanů, kterým byly ryby vystaveny. Nízké hodnoty, které jsem v plasmě ryb naměřil v mé práci, mohou souviset se schopností adaptace ryb ke zvýšeným koncentracím dusitanů v průběhu jejich dlouhodobé expozice.

Hodnoty methemoglobinu v krvi u všech pokusných i kontrolních ryb byly srovnatelné. Tento jev je pravděpodobně výsledkem schopnosti adaptace ryb vůči zvýšené koncentraci dusitanů ve vodním prostředí, stejně tak jako schopnosti ryb měnit methemoglobin zpět na hemoglobin. Tento jev popsali např. autoři Huey a Beitinger (1982) u sumečka skvrnitého (*Ictalurus punctatus*).

Za velmi zajímavé lze považovat hodnoty vybraných hematologických ukazatelů (koncentrace hemoglobinu, hodnoty hematokritu a počet leukocytů), které byly zjištěny u pstruhů duhových vystavených nejvyšší testované koncentraci. Uvedené hodnoty byly srovnatelné s kontrolou, i když tytéž parametry zjištěné u ryb v nižších koncentracích se odlišovaly. Tento jev si vysvětluji jako rozdílnou individuální citlivost pstruha duhového vůči dusitanům. Podobnou situaci pozorovali i autoři Margiocco et al. (1983), Arillo et al. (1984) a Aggergaard a Jensen (2001). Aggergaard a Jensen (2001) prováděli testy akutní toxicity na pstruhu duhovém a pozorovali velké rozdíly v míře kumulace dusitanů i mortalitě ryb. Některé ryby, které byly vystaveny určité koncentraci dusitanů, kumulovaly vysoké koncentrace dusitanů v krevní plasmě a hynuly během 24 – 48 hodin, zatímco jiné ryby vystavené stejným koncentracím dusitanů, přežívaly a hodnoty dusitanů v jejich plazmě byly nižší. Možné vysvětlení pro tuto rozdílnost můžeme nalézt v rozdílném počtu a povrchu chloridových buněk (Perry et al., 1992) nebo v individuální rozdílnosti detoxikačního mechanismu (Aggergaard a Jensen, 2001).

Vyšetření hematokritových hodnot v závěru testu prokázalo, že expozice ryb dusitanům v koncentracích 0,1; 0,6 a 1 $mg.l^{-1}$ NO_2^- vyvolala snížení hematokritové hodnoty, avšak v nejvyšší testované koncentraci toto snížení zaznamenáno nebylo. Snížení hematokritové hodnoty jako následek působení dusitanů, je popsáno rovněž v literatuře a je vysvětlováno snížením objemu červených krvinek (Knudsen a Jensen 1997).

4. ZÁVĚR

1) Test akutní toxicity na sumci velkém – albín (*Silurus glanis*) **a na pstruhu duhovém** (*Oncorhynchus mykiss*)

Výsledky ukazují, že oba druhy ryb jsou srovnatelně citlivé vůči působení dusitanů, o čemž svědčí zjištěné střední letální koncentrace:

sumec velký – albín (*Silurus glanis*): 96hLC50 = 15,8 mg.l^{-1} NO_2^-

pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*): 96hLC50 = 11,2 mg.l^{-1} NO_2^-

2) Test subchronické toxicity (růstový test) na pstruhu duhovém

Na základě výsledků získaných v testu subchronické toxicity byly

a) vypočítány koncentrace:

NOEC (nejvyšší koncentrace testovaného vzorku, která nevyvolá žádné pozorovatelné účinky 28d LC0) **= 0,01 mg.l^{-1} NO_2^-**.

LOEC (nejnižší koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky 28d LC10) **= 0,2 mg.l^{-1} NO_2^-**.

Zjištěná hodnota NOEC (0,01 mg.l^{-1} NO_2^-) pro pstruha duhového potvrzuje oprávněnost přísného limitu, který je dán směrnicí EU č. 78/659/EHS „o jakosti povrchových vod vyžadujících ochranu nebo zlepšení za účelem podpory života ryb“ (0,01 mg.l^{-1} NO_2^- pro lososové vody).

b) potvrzeny schopnosti adaptace některých ryb (v rámci jednoho druhu) vůči zvýšeným koncentracím dusitanů (někteří jedinci v nejvyšší koncentraci - 3,0 mg.l^{-1} NO_2^- přežívali a vykazovali v hematologických parametrech hodnoty srovnatelné s kontrolou).

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aggergaard, S., Jensen, F.B., 2001. Cardiovascular changes and physiological response during nitrite exposure in rainbow trout. J. Fish Biol. 59:13–27.

Ambrožová, J., 2003. Aplikovaná a technická hydrobiologie. Vydavatelství VŠCHT, Praha.

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.

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 (Vol. 139) (No. 1/3) 135-139.

Avnimelech, Y., Weber, B., Hepher, B., Milstein, A., Zorn, M., 1986. Studies in circulated fish ponds: organic matter recycling and nitrogen transformation. Aquacult. Fish. Man. 17:231–242.

Bartlett, F., Neumann, D., 1998. Sensitivity of Brown Trout Alevins *(Salmo trutta L.)* to Nitrite at Different Chloride Concentrations. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 60:340-346.

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.

Cameron, J.N., 1971. Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout. Comparative Biochemistry and Physiology A, Comparative Physiology 40:743-749.

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.

ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod, 1999. Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby /*Brachydanio rerio* Hamilton – Buchanan (*Teleostei*, *Salmonidae*)/. Část 2: Obnovovací metoda. ČNI Praha, 16 s.

Doblander, C., Lackner, R., 1996. Metabolism and detoxification of nitrite by trout hepatocytes. Biochim. Biophys. Acta 1289:270–274.

Doblander, C., Lackner, R., 1997. Oxidation of nitrite to nitrate in isolated erythrocytes: a possible mechanism for adaptation to environmental nitrite. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 54:157–161.

Dvořák P., 2004. Vybraná specifika onemocnění akvarijních ryb. Bulletin VÚRH Vodňany 40:101-108.

EIFAC, 1984. Water quality criteria for European freshwater fish: Report on nitrite and freshwater fish. EIFAC Tech. Paper, No. 46, pp. 19.

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.

Hofer, R., Gatumu, E., 1994. Necrosis of trout retina *(Oncorhynchus mykiss)* after sublethal exposure to nitrite. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 26:119–123.

Hotchkiss J.H., Helser, M.A., Maragos, C.M., Weng, Y.M., 1992. Nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds. Food safety and biological implications. In: Finley, J.W., Robinson, S.F., Armstrong, D.J. (Eds.), Food Safety Assessment. ACS Symposium Series, American Chemical Society, 484, pp. 400–418.

Huertas, M., Gisbert, E., Rodrı´guez, A., Cardona, L., Williot, P., Castello´-Orvay, F., 2002: Acute exposure of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) yearlings to nitrite: median lethal concentration (LC50) determination, haematological changes and nitrite accumulation in selected tissues. Aquatic Toxicology 57:257–266.

Huey, D.W., Beitinger, 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.

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. J. Exp. Biol. 152:149-166.

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*). J. Comp. Physiol. B 157:533–541.

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.). Aquacult. Res. 27:903–911.

Kiese, M., 1974. Methemoglobinemia: A Comprehensive Treatise, CRC Press, Cleveland, OH.

Knudsen, P.K. and Jensen, F.B., 1997. Recovery from nitrite-induced methaemoglobinaemia and potassium balance disturbances in carp. Fish Physiol. Biochem. 16, pp. 1–10.

Kosaka, H., Tyuma, I., 1987. Mechanism of autocatalytic oxidation of oxyhemoglobin by nitrite. Environ. Health Perspect. 73:147–151.

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, s. 237-245.

Kroupová, H., Máchová, J., Svobodová, Z., 2005. Nitrite influence on fish – a Review. Veterinary medicine – Czech, 50 (11):461-471.

Lewis, W.M., Morris, D.P., 1986. Toxicity of Nitrite to Fish: A Review. Transaction of the American Fisheries Society 115:183-195.

Love, M.R., 1980. The chemical biology of fishes. Academic Press, New York.

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., Svobodová, Z., Vykusová, B., 1994. Ekotoxikologické zhodnocení výluhů a tuhých průmyslových odpadů. VÚRH, Vodňany.

Margiocco, C., Arillo, A., Mensi, P., Shenone, G., 1983. Nitrite bioaccumulation in *Salmo gairdneri* Rich. and haematological consequences. Aquat. Toxicol. 3:261-270.

Maršálek, B., & Lukavský, J., (1994). Inovační trendy v ekotoxikologických biotitech.- Zborník X. Limnologickej konferencie, Stará Turá: pp. 135–138.

OECD Guideline for Testing of Chemicals 203 Fish, 1992. Acute Toxicity Test, 14 pp.

OECD Guideline for Testing of Chemicals 215 Fish, 1999. Juvenile Growth Test (Draft New Guideline, August).

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. Can. J. Fish. Aquat. Sci**.** 41:1739–1744.

Perrone, S.J., Meade, T.L., 1977. Protective effect of chloride on nitrite toxicity to coho salmon *(Oncorhynchus kisutch)*. J. Fish. Res. Board Can. 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. Can. J. Zool. 70, 1775-1786.

Pitter, P., 1999. Hydrochemie. Vydavatelství VŠCHT, Praha.

Podlesný, M., 2008. Změny biochemických ukazatelů u ryb v souvislosti se zvýšenými koncentracemi dusitanů ve vodě. Diplomová práce, ZF JU, České Budějovice, 56 s.

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. and 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.

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.

Shechter, H., Gruener, N., Shubal, H.I., 1972. Micromethod for the determination of nitrite in blood. Anal.Chim. Acta, 60:93-99.

Sladečková, A., & Sladeček, v., (1995), Hydrobiologie – Skriptum ČVUT Praha: 141 pp.

Soldán, P., (1997). Stanovení hlavní složky znečištění způsobující toxicitu odpadních vod. - VTEJ č. 4, 1997: pp. 154–157.

Stormer, J., Jensen, F.B., Rankin, J.C., 1996. Uptake of nitrite, nitrate, and bromide in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects on ionic balance. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53:1943–1950.

Svobodová, Z., Gelnarová, J., Justýn, J., Krupauer, V., Máchová, J., Simanov, L., Valentová, V., Vykusová, B., Wohlgemuth, E., 1987. Toxikologie vodních živočichů. Vydavatelství MZVŽ a ČSR, Praha.

Svobodová, Z., Máchová, J., 2003. Cizorodé látky ve vodním prostředí a problematika sledování jejich účinků. Sb. Referátů z 11. konference Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí, VÚRH JU Vodňany, Aquachemie Ostrava: 275-278.

Svobodová, Z., Máchová, J., Beklová, M., Cupáková, Š., Minks, J., 2000a. Ekotoxikologie -praktická cvičení, část I. – Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno.

Svobodová, Z., Máchová, J., Drastichová, J., Groch, L., Lusková, L., Poleszczuk, G., Velíšek, J., Kroupová, H., 2005b. Haematological and biochemical profiles of carp blood following nitrite exposure at different concentrations of chloride. Aquac. Res., in press Water quality criteria for European freshwater fish. Report on nitrite and freshwater fish. EIFAC Tech. Pap., Rome, FAO EIFAC, 1984, no 46, 19 pp.

Svobodová, Z., Máchová, J., Hamáčková, J., Hůda, J., Kroupová, H., 2005a. Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems: tree case studies. Acta Veterinaria Brno 74, 129-137.

Svobodová, Z., Máchová, J., Hamáčková, J., Kroupová, H., 2000b. Otrava ryb dusitany v recirkulačních systémech – případová studie (casestudies), MSM Project No. 126100003.

Svobodová, Z., Pravda, D., Paláčková, J., 1986. Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb. Edice metodik VÚRH JU č. 22: 36s.

Štěpánek, M., & kol. (1979). Hygienický význam životních dějů ve vodách. – Avicenum Zdravotnické nakladatelství, Praha 1979, 588 pp.

Štěpánek, M., & kol. (1982). Biologické metody vyšetřování vod ve zdravotnictví Avicenum Zdravotní nakladatelství, Praha: 118 pp.

Wedemeyer, G.A., Yasutake, W.T., 1978. Prevention and treatment of nitrite toxicity in juvenile steelhead trout *(Salmo gairdneri)*. J. Fish. Res. Bd Can. 35, 822-827.

Williams , E.M., Eddy, F.B., 1986. Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. J. Comp. Physiol. *B* 156:867–872.

Wood, C.M., 1993. Ammonia and urea metabolism and excretion. In: Ewans, DH (Ed) Physiology of Fishes. CRC Press Boca Raton, pp. 379–425.

Zachariasen, F., 2001. Intraspecific differences in nitrite tolerance of rainbow trout. The role of gill and kidney. Cand. Scient. Thesis, Institute of Biology, University of Southern Denmark, Odense.

Zákona č.77/2004 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a dále Vyhlášky MZE ČR č.311/1997 Sb. o chovu a využití pokusných zvířat.

6. PŘÍLOHY

Seznam tabulek

Tab. I. Podmínky v průběhu paralelního testu A na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*).

Tab. II. Podmínky v průběhu paralelního testu B na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*).

Tab. III. Podmínky v průběhu paralelního testu C na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*).

Tab. IV. Podmínky v průběhu paralelního testu D na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*).

Tab. V. Podmínky v průběhu základního testu na rybách pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*).

Tab. VI. Mortalita v průběhu paralelního testu A na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*).

Tab. VII. Mortalita v průběhu paralelního testu B na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*).

Tab. VIII. Mortalita v průběhu paralelního testu C na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*).

Tab. IX. Mortalita v průběhu paralelního testu D na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*).

Tab. X. Záznam mortality ryb (*Oncorhynchus mykiss*) během základního testu.

Seznam grafů a fotografií

Obr. I. Vyhodnocení testu akutní toxicity na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*), test A.

Obr. II. Vyhodnocení testu akutní toxicity na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*), test B.

Obr. III. Vyhodnocení testu akutní toxicity na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*), test C.

Obr. IV. Vyhodnocení testu akutní toxicity na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*), test D.

Obr. V. Pokusné akvárium se pstruhy duhovými (*Oncorhynchus mykiss*).

Obr. VI. Akvarijní místnost, kde probíhaly testy na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*).

Obr. VII. Chlazení epruvet na ledu se vzorky krve pro stanovení dusitanů v krvi.

Obr. VIII. Spektrometr.

Obr. IX. Otevřený spektrometr.

Obr. X. Barevná kalibrační řada (reakce) dusitanů.

Obr. XI. Měření parametrů vody při testu akutní toxicity na sumci velkém – albín (*Silurus glanis*).

Obr. XII. Mortalita sumců velkých – albín (*Silurus glanis*) v testu akutní toxicity.

Obr. XIII. Sumec velký – albín (*Silurus glanis*) v testu akutní toxicity.

Obr. XIV. Odběr krve u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) z *v. caudalis*.

Tab. I. Podmínky v průběhu paralelního testu A na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*).

Číslo nádrže	Konc. NO_2^- ($mg.l^{-1}$)	Teplota (°C)						Kyslík (% nasycení)						pH					
		0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h
1	**10**	23,3	21	22,9	23,6	23,3	23	83,5	81	81	88	84	80	7,57	7,75	7,64	7,66	7,8	7,78
2	**20**	23,4	20,6	22,8	23,6	23,3	23	85,2	82,6	81,5	88,6	83,5	82	7,58	7,70	7,61	7,60	7,71	7,7
3	**30**	23,5	20,8	22,8	23,6	23,2	23,1	87	80,6	81	91,8	77	87	7,33	7,50	7,53	7,58	7,65	7,78
4	**50**	23,6	20,7	22,9	23,8	23,3	23,1	84,1	85	83,5	94,5	78	91	7,57	7,58	7,48	7,52	7,60	7,80
5	**80**	23,7	20,6	-	-	-	-	85,2	80,4	-	-	-	-	7,56	7,59	-	-	-	-
6	**100**	23,7	20,5	-	-	-	-	84,2	78,6	-	-	-	-	7,54	7,56	-	-	-	-
7	**150**	24,1	20,5	-	-	-	-	82,3	76,6	-	-	-	-	7,63	7,54	-	-	-	-
K	**0**	23,3	21	22,9	24	23	23,1	100	87,6	86,5	86	90	89	6,99	7,59	7,5	7,6	7,8	7,8
			↑						↑							↑ **přelovení**			

Tab. II. Podmínky v průběhu paralelního testu B na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*).

Číslo nádrže	Konc. NO_2^- ($mg.l^{-1}$)	Teplota (°C)						Kyslík (% nasycení)						pH					
		0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h
1	**10**	23,1	21,1	22,8	23,5	23,2	23,1	83,8	81,2	81,2	89	85	82	7,67	7,70	7,71	7,72	7,85	7,70
2	**20**	23,6	20,4	22,9	23,7	23,4	23,1	85,4	82,3	82	89,5	84,5	86	7,58	7,69	7,55	7,65	7,89	7,75
3	**30**	23,1	20,7	22,5	23,3	23,5	23,2	87,2	80,5	84	90,5	77,5	85	7,42	7,52	7,58	7,52	7,59	7,80
4	**50**	23,5	20,8	22,7	23,9	23,1	23,3	84,3	85,9	82,5	95,5	79	92,3	7,50	7,58	7,52	7,55	7,65	7,82
5	**80**	23,4	20,3	-	-	-	-	85,5	80,6	-	-	-	-	7,54	7,58	-	-	-	-
6	**100**	23,6	20,8	-	-	-	-	84,8	78,7	-	-	-	-	7,52	7,57	-	-	-	-
7	**150**	24,2	20,4	-	-	-	-	82,6	76,2	-	-	-	-	7,52	7,45	-	-	-	-
K	**0**	23,5	21,1	22,5	24,3	24,2	22,9	97	88,5	87,5	88	93	87	6,95	7,65	7,52	7,55	7,78	7,85

↑ ↑ ↑ **přelovení**

Tab. III. Podmínky v průběhu paralelního testu C na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*).

Číslo nádrže	**Konc. NO_2^-** ($mg.l^{-1}$)	**Teplota (°C)**						**Kyslík (% nasycení)**						**pH**					
		0 h	**24 h**	**48 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**	**0 h**	**24 h**	**48 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**	**0 h**	**24 h**	**48 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**
1	**10**	23,5	21,2	22,5	23,8	23,3	22,8	85,2	83,5	82,4	87,2	85,5	83,7	7,59	7,96	7,62	7,61	7,63	7,81
2	**20**	23,7	21,4	21,9	23,2	22,9	23,3	85,9	85,6	83,2	86,3	85,7	82,9	7,52	7,45	7,57	7,56	7,67	7,62
3	**30**	23,5	21,5	22,8	23,1	23,3	22,9	87,6	82,2	85	89,3	79	84,6	7,43	7,62	7,49	7,54	7,57	7,65
4	**50**	23,5	21,5	22,9	23,4	23,1	23,4	86,3	84,5	85,3	93,7	89	91	7,46	7,56	7,60	7,52	7,64	7,50
5	**80**	23,5	21,2	-	-	-	-	87,9	82,2	-	-	-	-	7,45	7,72	-	-	-	-
6	**100**	23,5	20,9	-	-	-	-	85,7	82,3	-	-	-	-	7,58	7,39	-	-	-	-
7	**150**	24,5	21,5	-	-	-	-	83,9	75,7	-	-	-	-	7,62	7,51	-	-	-	-
K	**0**	23,4	22,1	22,9	23,2	23,2	23,5	95,7	88,9	86,5	89	94	89,5	7,55	7,56	7,65	7,60	7,65	7,71

↑ ↑ ↑ **přelovení**

Tab. IV. Podmínky v průběhu paralelního testu D na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*).

Číslo nádrže	**Konc. NO_2^-** ($mg.l^{-1}$)	**Teplota (°C)**						**Kyslík (% nasycení)**						**pH**					
		0 h	**24 h**	**48 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**	**0 h**	**24 h**	**48 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**	**0 h**	**24 h**	**48 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**
1	**10**	23,4	22,2	23,2	23,4	23,1	23,2	85,4	80,1	80,1	89,2	84,4	81,5	7,51	7,55	7,61	7,75	7,81	7,78
2	**20**	22,9	21,3	21,8	23,1	23,9	23,4	87,7	84,6	84,5	88,2	85,7	84	7,69	7,52	7,63	7,69	7,50	7,65
3	**30**	23,5	21,6	23,1	23,3	23,4	23,7	88,6	81,5	87	87,8	75,9	85,4	7,23	7,61	7,59	7,67	7,59	7,81
4	**50**	22,5	22,5	22,9	23,3	23,7	22,9	85,4	85,9	82	91,1	81,2	91,2	7,35	7,12	7,49	7,72	7,69	7,72
5	**80**	23,7	22,3	-	-	-	-	84,9	82,4	-	-	-	-	7,56	7,96	-	-	-	-
6	**100**	23,9	22,4	-	-	-	-	85,9	81,7	-	-	-	-	7,45	7,85	-	-	-	-
7	**150**	23,7	21,6	-	-	-	-	83,2	86,1	-	-	-	-	7,51	7,63	-	-	-	-
K	**0**	23,4	22,2	23,1	24,7	23,5	23,4	86	88,5	87	84,5	93,5	89	7,25	7,55	7,50	7,56	7,70	7,65
			↑						↑							↑ **přelovení**			

Tab. V. Podmínky v průběhu základního testu na rybách pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*).

Číslo nádrže	**Konc. NO_2^-** ($mg.l^{-1}$)	**Teplota (°C)**						**Kyslík (% nasycení)**						**pH**					
		0 h	**24 h**	**48 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**	**0 h**	**24 h**	**48 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**	**0 h**	**24 h**	**48 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**
1	**3,3**	14,5	15,2	15,4	13,2	14,0	15,1	92	95	100	100	94	100	7,51	7,52	7,60	7,72	7,85	7,77
2	**6,7**	14,5	15,1	15,4	13,2	14,0	14,9	92	85	100	100	95	100	7,79	7,51	7,25	7,70	7,50	7,49
3	**16,7**	14,3	15,2	15,3	13,2	14,0	14,5	89	85	100	100	96	100	7,33	7,50	7,50	7,56	7,55	7,47
4	**33,3**	14,8	15,2	15,3	13,2	14,1	15,1	85	90	100	100	89	100	7,15	7,23	7,48	7,65	7,77	7,51
5	**50**	14,8	15,2	15,3	13,2	-	-	79	90	100	100	-	-	7,26	7,80	7,32	7,49	-	-
6	**66,7**	14,8	15,3	15,3	13,1	14,1	-	82	90	100	100	85	-	7,35	7,70	7,52	7,61	7,45	-
7	**133,3**	14,8	15,2	-	-	-	-	84	90	-	-	-	-	7,41	7,61	-	-	-	-
K	**0**	14,8	15,2	15,4	13,1	14,0	15,1	90	90	100	100	93	100	7,35	7,65	7,50	7,52	7,69	7,61
			↑						↑							↑ **přelovení**			

Tab. VI. Mortalita v průběhu paralelního testu A na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*).

Číslo nádrže	Koncentrace NO_2^- ($mg.l^{-1}$)	Mortalita (ryb ks)			
		Σ 24	Σ 48	Σ 72	Σ 96
1	10	0	0	0	0
2	20	0	0	0	1
3	30	0	1	1	2
4	50	0	10	0	0
5	80	4	6	0	0
6	100	4	6	0	0
7	150	8	2	0	0
K	0	0	0	0	0

Tab. VII. Mortalita v průběhu paralelního testu B na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*).

Číslo nádrže	Koncentrace NO_2^- ($mg.l^{-1}$)	Mortalita (ryb ks)			
		Σ 24	Σ 48	Σ 72	Σ 96
1	10	0	0	0	0
2	20	0	0	0	0
3	30	0	0	6	0
4	50	0	3	6	0
5	80	6	4	0	0
6	100	1	9	0	0
7	150	4	6	0	0
K	0	0	0	0	0

Tab. VIII. Mortalita v průběhu paralelního testu C na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*).

Číslo nádrže	Koncentrace NO_2^- ($mg.l^{-1}$)	Mortalita (ryb ks)			
		Σ 24	Σ 48	Σ 72	Σ 96
1	10	0	0	0	0
2	20	0	0	1	2
3	30	0	1	9	0
4	50	0	10	0	0
5	80	2	8	0	0
6	100	0	10	0	0
7	150	0	10	0	0
K	0	0	0	0	0

Tab. IX. Mortalita v průběhu paralelního testu D na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*).

Číslo nádrže	Koncentrace NO_2^- ($mg.l^{-1}$)	Mortalita (ryb ks)			
		Σ 24	Σ 48	Σ 72	Σ 96
1	10	0	0	0	0
2	20	0	0	0	1
3	30	0	0	2	5
4	50	0	10	0	0
5	80	2	8	0	0
6	100	1	9	0	0
7	150	5	5	0	0
K	0	0	0	0	0

Tab. X. Záznam mortality ryb (*Oncorhynchus mykiss*) během základního testu.

Číslo nádrže	Koncentrace NO_2^- ($mg.l^{-1}$)	Mortalita (ryb ks)			
		Σ 24	Σ 48	Σ 72	Σ 96
1	3,3	1	1	1	1
2	6,7	0	0	1	1
3	16,7	1	1	3	3
4	33,3	1	3	5	6
5	50	5	6	7	7
6	66,7	5	6	6	7
7	133,3	7	7	7	7
K	0	0	0	0	0

Obr. I. Vyhodnocení testu akutní toxicity na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*), test A (program EKO – TOX 5.1).

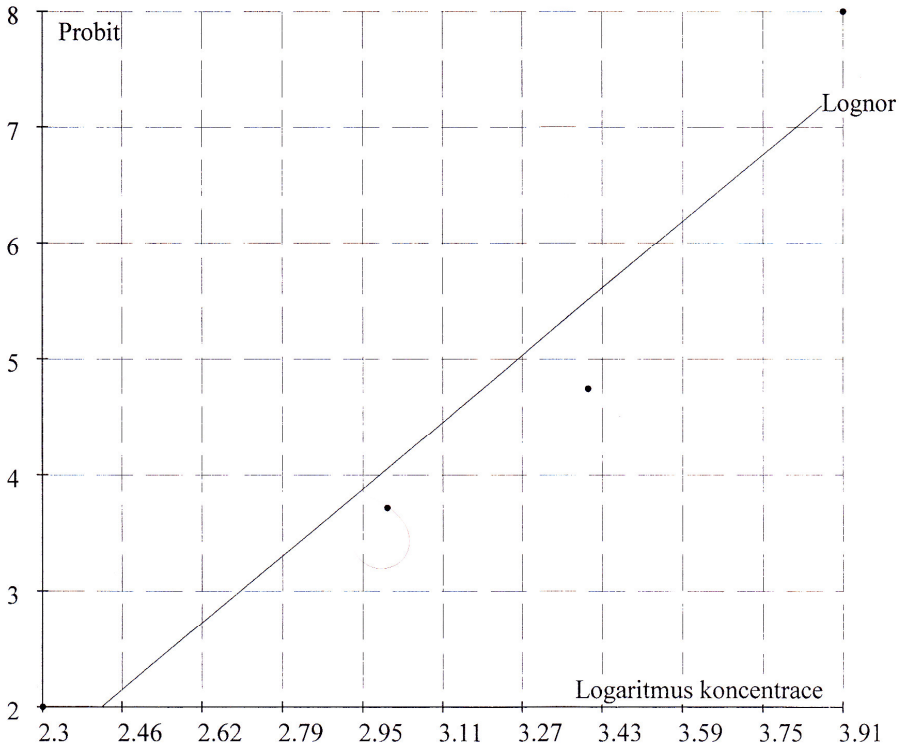
Testovaná látka: $NaNO_2$

Vstupní hodnoty: **základní test**

Koncentrace mg/l	Mortalita %
10	0.0
20	10.0
30	40.0
50	100.0

96hLC50 = 26.0 mg/l **s 95% intervalem spolehlivosti (-15.9 , +9.9)**

LC0 = 11.3 mg/l
LC100 = 60.2 mg/l



Obr. II. Vyhodnocení testu akutní toxicity na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*), test B (program EKO – TOX 5.1).

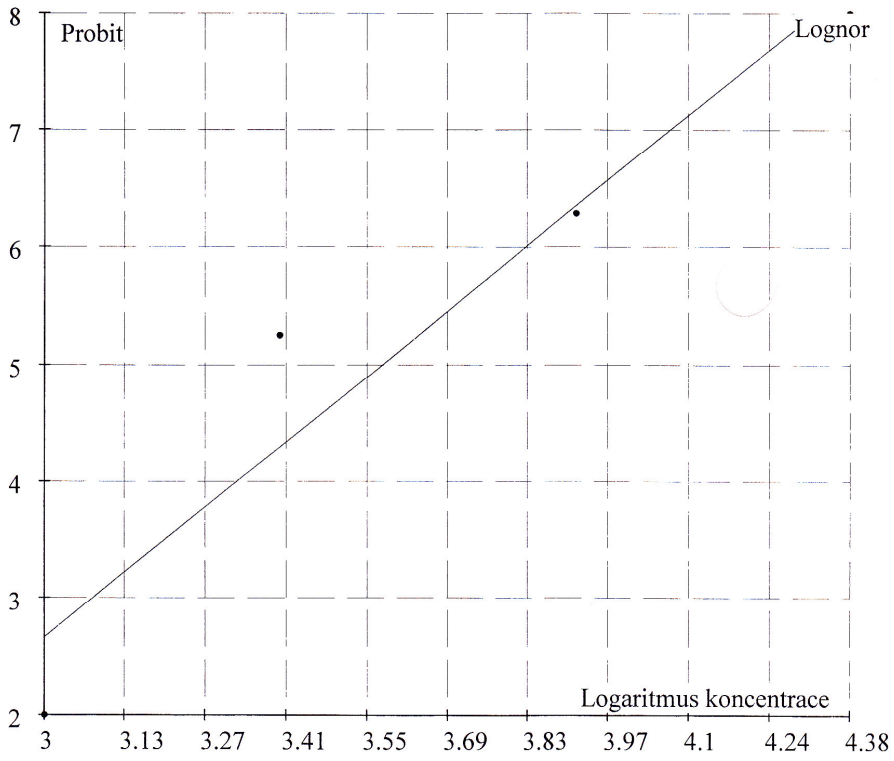
Testovaná látka: $NaNO_2$

Vstupní hodnoty: **základní test**

Koncentrace mg/l	Mortalita %
20	0.0
30	60.0
50	90.0
80	100.0

96hLC50 = 35.8 mg/l **s 95% intervalem spolehlivosti (-19.8 , +12.7)**

LC0 = 17.0 mg/l
LC100 = 75.4 mg/l



Obr. III. Vyhodnocení testu akutní toxicity na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*), test C (program EKO – TOX 5.1).

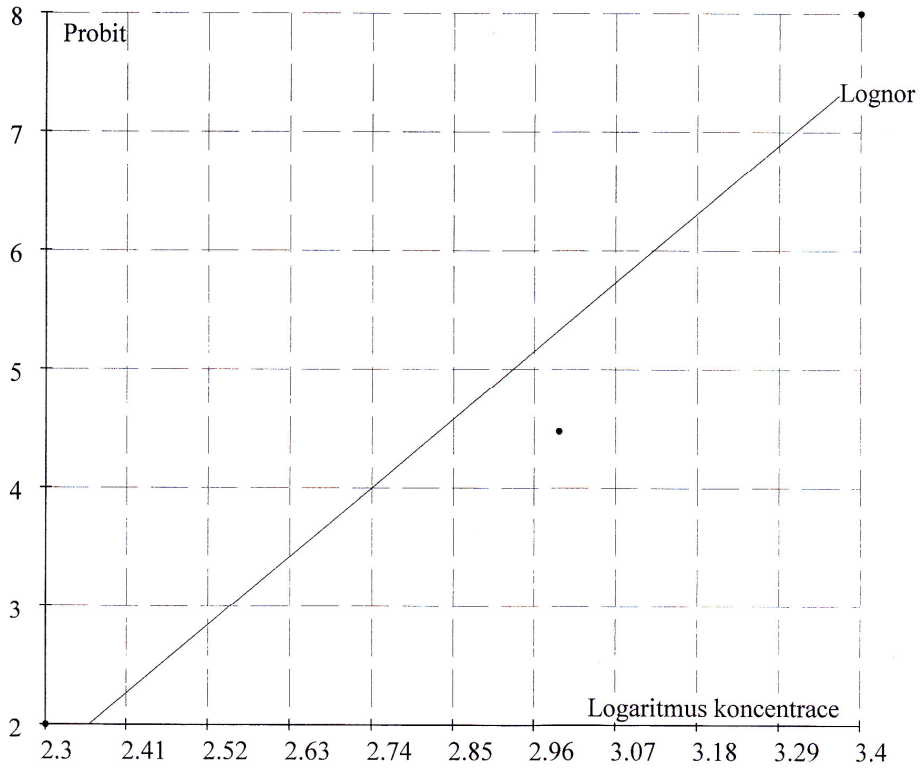
Testovaná látka: $NaNO_2$

Vstupní hodnoty: **základní test**

Koncentrace mg/l	Mortalita %
10	0.0
20	30.0
30	100.0

96hLC50 = 18.8 mg/l **s 95% intervalem spolehlivosti (-59.9 , +14.3)**

LC0 = 10.6 mg/l
LC100 = 33.2 mg/l



Obr. IV. Vyhodnocení testu akutní toxicity na rybách sumec velký - albín (*Silurus glanis*), test D (program EKO – TOX 5.1).

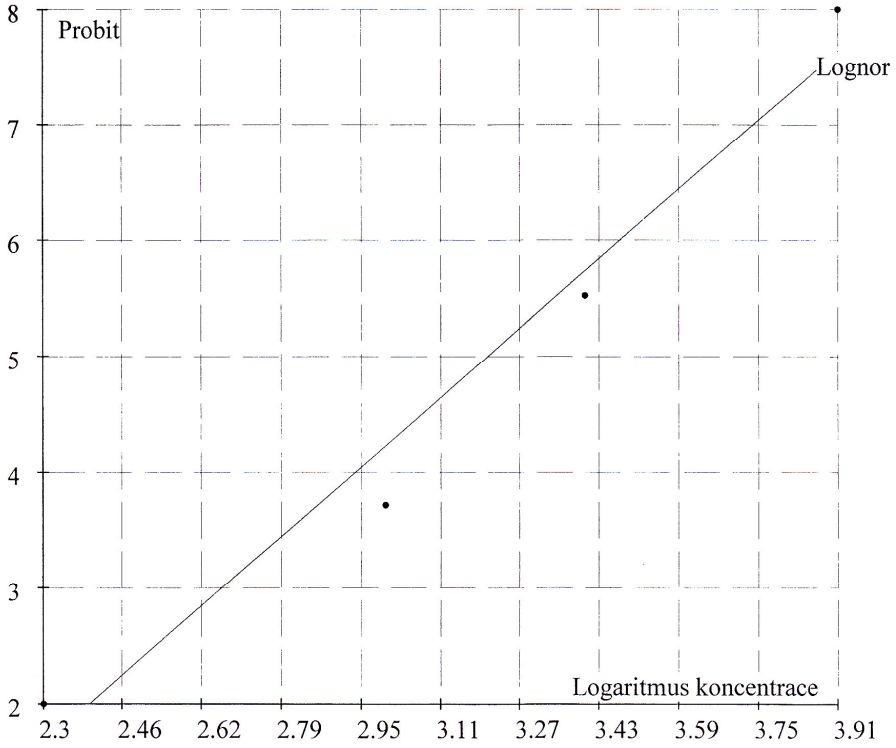
Testovaná látka: $NaNO_2$

Vstupní hodnoty: **základní test**

Koncentrace mg/l	Mortalita %
10	0.0
20	10.0
30	70.0
50	100.0

96hLC50 = 24.6 mg/l **s 95% intervalem spolehlivosti (-8.7 , +6.4)**

LC0 = 11.0 mg/l
LC100 = 55.1 mg/l



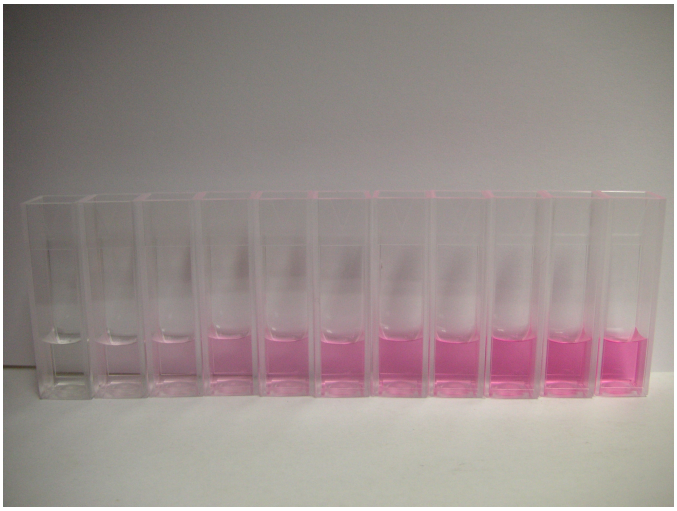
Obr. V. Pokusné akvárium se pstruhy duhovými (*Oncorhynchus mykiss*).

Obr. VI. Akvarijní místnost, kde probíhaly testy na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*).

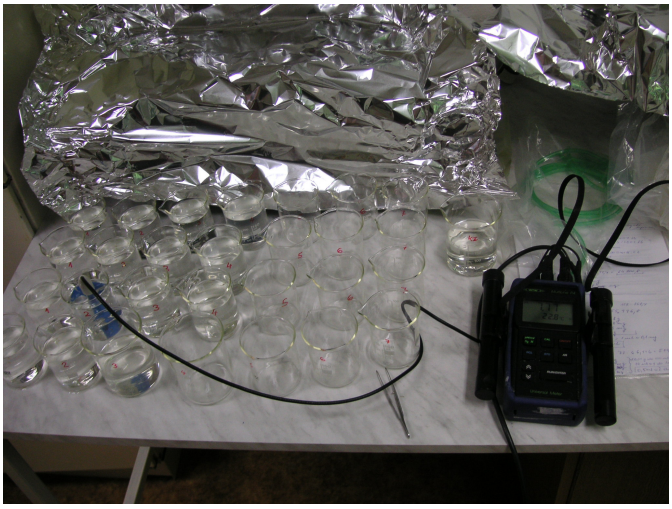
Obr. VII. Chlazení epruvet na ledu se vzorky krve pro stanovení dusitanů v krvi.

Obr. VIII. Spektrometr.

Obr. IX. Otevřený spektrometr.

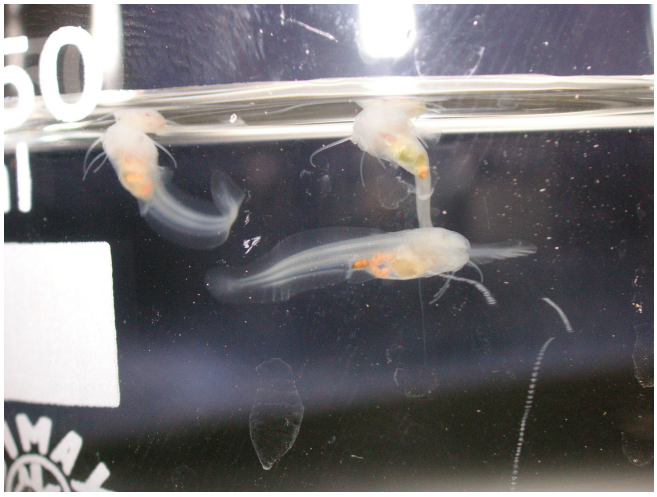


Obr. X. Barevná kalibrační řada (reakce) dusitanů.



Obr. XI. Měření parametrů vody při testu akutní toxicity na sumci velkém – albín (*Silurus glanis*).

Obr. XII. Mortalita sumců velkých – albín (*Silurus glanis*) v testu akutní toxicity.



Obr. XIII. Sumec velký – albín (*Silurus glanis*) v testu akutní toxicity.

Obr. XIV. Odběr krve u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) z *v. caudalis*.