

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářství a hydrobiologický

Bakalářská práce

**Snižují huminové látky toxicitu dusitanů pro  
ryby?**

(Do humic substances reduce nitrite toxicity to fish?)

**Autor:** Miloslav Vaněček

**Vedoucí bakalářské práce:** Ing. Hana Kocour Kroupová, Ph.D.

**Konzultanti:** Ing. Jana Máchová, Ph.D., Dipl. Biol. Christoph Steinbach

**Studijní program a obor:** Rybářství

**Forma studia:** Kombinovaná

**Ročník:** 3

České Budějovice 2013

#### Prohlášení

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

V Českých Budějovicích 3. května 2013

.....  
Podpis

## Poděkování

Dovoluji si tímto poděkovat Ing. Haně Kocour Kroupové, Ph.D. za odborné vedení mojí bakalářské práce. Děkuji za všechny cenné rady, komentáře a čas, který mi věnovala v průběhu celého měření a zpracovávání mojí bakalářské práce.

Dále bych chtěl poděkovat Iloně Prokopové za čas a pomoc, který mi věnovala v průběhu celého měření mojí bakalářské práce.

Chtěl bych dále poděkovat Ing. Janě Máchové, Ph.D. a Ing. Olze Valentové za všechny rady a odbornou pomoc v průběhu měření a zpracování dat.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině, přátelům a spolupracovníkům za podporu, kterou mi věnovali během celého studia.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
Fakulta rybnářství a ochrany vod  
Akademický rok: 2011/2012

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Miloslav VANĚČEK**  
Osobní číslo: **V10B027K**  
Studijní program: **B4103 Zootechnika**  
Studijní obor: **Rybnářství**  
Název tématu: **Snižují huminové látky toxicitu dusitanů pro ryby?**  
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický**

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

Zvýšené koncentrace dusitanů jsou jednou z významných a častých příčin poškození a úhynu ryb v rybnářských objektech s vysokou intenzitou produkce ryb. Naopak huminové látky se dávají do vody s cílem vylepšit zdravotní stav ryb a zlepšit hydrochemické poměry vody. Cílem práce je proto stanovení vlivu huminových látek na akutní toxicitu dusitanů. Metodický postup: v laboratorních podmínkách budou provedeny testy akutní toxicity na vybraných druzích akvárijských ryb. Ryby budou vystavovány dusitanům za přítomnosti různých koncentrací huminových látek. Jako zdroj huminových látek bude použit komerčně dostupný přípravek pro akvaristy obsahující huminové látky. Testy toxicity budou prováděny podle normy ČSN EN ISO 7346-2. V průběhu každého testu budou měřeny základní hydrochemické parametry vody. Na základě výsledků testů akutní toxicity bude zjištěno, jakým způsobem přítomnost huminových látek ve vodě ovlivňuje letální koncentrace dusitanů pro vybrané akvárijské ryby.

Rozsah grafických prací: podle potřeby (předpoklad 8 - 12)  
Rozsah pracovní zprávy: 25 - 35 stran  
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná  
Seznam odborné literatury:

Horáková, M. a kol. Analytika vody, Vydavatelství VŠCHT.  
Jensen, F.B., 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*, 135(1), 9-24.  
Kroupová, H., Máchová, J., Svobodová, Z., 2005. Dusitany ve vodním prostředí a jejich účinky na ryby - přehled. *Bulletin VÚRH Vodňany* 41 (4): 154-170.  
Meinelt, T., Kroupová, H., Stüber, A., Rennert, B., Wienke, A., Steinberg, C.E.W., 2010. Can dissolved aquatic humic substances reduce the toxicity of ammonia and nitrite in recirculating aquaculture systems? *Aquaculture* 306(1-4): 378-383.  
Norma ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby *(Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae))*/ Část 2: Obnovovací metoda.  
Pitter, P. Hydrochemie. VŠCHT, Praha, 2009.  
Steinberg, C.E.W., Kamara, S., Prokhotskaya, V.Y., Manusadzianas, L., Karasyova, T.A., Timofeyev, M.A., et al., 2006. Dissolved humic substances - ecological driving forces from the individual to the ecosystem level? *Freshwater Biol.* 51: 1189-1210.  
Svobodová, Z., Máchová, J., Veselý, V., Modrá, H., Svoboda, M., a kol., 2003. Veterinární toxikologie. Praktická cvičení část I. VFU Brno.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Hana Kocour Kroupová, Ph.D.**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický  
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Jana Máchová, Ph.D.**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický  
Ostatní konzultanti: **Dipl.-Biol. Christoph Steinbach**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický  
Datum zadání bakalářské práce: **2. prosince 2011**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2013**

  
v. z. prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.  
děkan

L.S.

  
doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.  
ředitel

V Českých Budějovicích dne 3. února 2012

## Obsah

1	Úvod .....	7
2	Teoretická část .....	8
2.1	Sloučeniny dusíku ve vodě .....	8
2.2	Dusitany .....	8
2.2.1	Vznik dusitanů .....	9
2.2.2	Vliv dusitanů na ryby .....	10
2.2.3	Faktory ovlivňující toxicitu dusitanů .....	11
2.2.4	Prevence .....	13
2.3	Huminové látky .....	14
2.3.1	Vznik huminových látek .....	14
2.3.2	Výskyt ve vodách .....	15
2.3.3	Vlastnosti huminových látek .....	15
2.3.4	Vliv huminových látek na ryby .....	16
2.4	Testy toxicity .....	17
2.4.1	Význam a využití testů toxicity na vodních organismech .....	17
2.4.2	Standardizace testů .....	18
2.4.3	Testy akutní toxicity .....	19
3	Experimentální část .....	21
3.1	Metodika .....	21
3.1.1	Testy akutní toxicity na daniu pruhovaném ( <i>Danio rerio</i> ) a živorodce duhové ( <i>Poecilia reticulata</i> ) .....	21
3.1.2	Ověření koncentrace dusitanů .....	26
3.2	Výsledky .....	29
3.2.1	Platnost testů .....	29
3.2.2	Výsledky testů na daniu pruhovaném .....	29
3.2.3	Výsledky testu na Živorodce duhové .....	31
3.3	Diskuze .....	33
4	Závěr .....	35
5	Použitá literatura .....	36
6	Přílohy .....	39
7	Abstrakt .....	67

# 1 Úvod

Současná doba si žádá vysoké produkce potravin. Poptávka po kvalitních potravinách se bude v budoucnu jistě ještě zvyšovat. V otázce produkce ryb to bude zřejmě podobné. Vzhledem k požadavkům na kvalitu povrchových vod jsou rybniční ekosystémy na hranici svých produkčních možností. Dosud u nás nejsou plně využity možnosti intenzivních rybochovných zařízení s recirkulací vody. Tyto systémy jsou dnes velmi propracované a ve světě běžné. Při provozování těchto zařízení však mohou nastávat různé problémy. Pro čištění vody se zde ve valné většině případů používají biologické fluidní filtry, kde probíhá biochemická oxidace toxického metabolitu ryb, amoniaku, na dusitany a dále pak na méně toxické dusičnany. V důsledku nedostatečné funkce biologických filtrů může docházet k hromadění dusitanů, které jsou pro ryby velmi toxické. Otázkou, jak snižovat negativní účinky dusitanů, se zabývalo již mnoho studií s větším či menším úspěchem. Stále se tedy hledají nová řešení těchto problémů a jedním z možných řešení by mohly být huminové látky.

Ve své práci jsem se zaměřil na sledování účinku huminových látek na toxicitu dusitanů. Sledování jsem prováděl formou předběžných a akutních testů toxicity na akvarijské rybě daniu pruhovaném (*Danio rerio*) a živorodce duhové (*Poecilia reticulata*). Měření jsem prováděl na Jihočeské univerzitě, Fakultě rybářství a ochrany vod ve Vodňanech, v Laboratoři vodní toxikologie a ichtyopatologie.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Sloučeniny dusíku ve vodě

Dusík můžeme nalézt ve vodách v několika oxidačních stupních. Mezi hlavní formy výskytu patří (Pitter, 2009):

- III amoniakální dusík ( $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NH}_3$ )
- I hydroxylamin ( $\text{NH}_2\text{OH}$ )
- 0 elementární dusík ( $\text{N}_2$ )
- +I oxid dusný ( $\text{N}_2\text{O}$ )
- +III dusitanový dusík ( $\text{N-NO}_2^-$ )
- +V dusičnanový dusík ( $\text{N-NO}_3^-$ )

Celkový dusík vyskytující se ve vodách rozdělujeme podle zdroje na anorganický a organický dusík. Anorganický můžeme dále dělit na amoniakální, dusitanový a dusičnanový dusík. Množství anorganického dusíku se během roku mění na základě vstupů do biologických procesů, kde se stává součástí bílkovin či různých sloučenin metabolismu (Hartman a kol., 1998). Přírodním zdrojem dusíku jsou rozkladné procesy organických látek rostlinného a živočišného původu. Dalším významným zdrojem jsou odpadní vody z živočišné a zemědělské výroby, kde se jedná především o amoniakální dusík (Pitter, 2009).

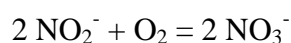
### 2.2 Dusitany

Dusitany patří mezi sloučeniny dusíku. Dusitany jsou ve vodách obvykle doprovázeny dalšími sloučeninami dusíku, především dusičnany a amoniakem. Jejich koncentrace je ovlivněna chemickými a biochemickými pochody ve vodě (Pitter, 2009).



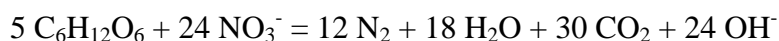
### 2.2.1 Vznik dusitanů

Dusitany mohou vznikat biochemickou oxidací amoniakálního dusíku. Tento proces se nazývá nitrifikace. Nitrifikace je realizována především bakteriemi rodu *Nitrosomonas* a *Nitrobacter*. Nitrifikace se skládá z dvou na sebe navazujících pochodů, a to nitritace, během níž se oxiduje amoniak na dusitany a nitratice, kdy se oxidují dusitany na dusičnany. Celý tento proces probíhá za oxických podmínek. Reakce lze vyjádřit následujícími rovnicemi:



Mezi faktory ovlivňující nitrifikaci patří pH, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, množství nitrifikačních bakterií a přítomnost látek inhibujících nitrifikaci jako jsou například antibiotika či methylová modř (Pitter, 2009). Optimální pH pro nitrifikaci je v rozmezí 7 až 8,5. Teplota vody by neměla klesnout pod 12°C. Při nízké koncentraci rozpuštěného kyslíku pod 1 mg·l<sup>-1</sup> dochází k hromadění dusitanů (Pitter, 2009).

Denitrifikace je proces, při němž dochází k redukci dusičnanů a dusitanů na elementární dusík. Denitrifikace probíhá za anoxických podmínek a na rozdíl od nitrifikace je jako zdroj energie využíván organický substrát. Na denitrifikaci se podílejí především bakterie rodu *Pseudomonas*, *Achromobacter* a *Micrococcus*. Pokud neprobíhá proces denitrifikace dostatečně rychle, může docházet k hromadění dusitanů (Pitter, 2009). Denitrifikaci lze vyjádřit těmito rovnicemi:



## Výskyt ve vodách

Z pohledu možnosti provádění bilancí je dobré vyjadřovat koncentraci dusitanů jako dusitanový dusík (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) nikoli jako koncentraci iontové formy NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Pro přepočítání platí vztahy (Pitter, 2009):

$$1 \text{ mg N-NO}_2^- = 3,2845 \text{ mg NO}_2^- = 71,39 \text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$$

$$1 \text{ mg NO}_2^- = 0,3045 \text{ mg N-NO}_2^- = 21,74 \text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$$

Dusitany se vyskytují v přírodních vodách díky své chemické a biochemické nestálosti ve velmi nízkých koncentracích. Zvýšené koncentrace však můžeme nalézt v odpadních splaškových vodách a to i nad 1 mg.l<sup>-1</sup>. Strojírenský a metalurgický průmysl může být dalším silným zdrojem. V odpadních vodách těchto provozů můžeme naměřit až stovky mg.l<sup>-1</sup>. Současná právní norma (nařízení vlády č. 61/2003 Sb. ve znění pozdějších předpisů) stanovuje přípustné znečištění povrchových vod dusitany, nejvýše 0,09 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup> pro vody lososové a nejvýše 0,14 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup> pro vody kaprové.

S vyššími koncentracemi se setkáváme také v rybochovných objektech s recirkulací vody. Amoniakální dusík, jako zplodina metabolismu, je zde často odbouráván pomocí biologických fluidních filtrů. V procesu čištění se využívá nitrifikace k přeměně amoniakálního dusíku na dusitany a následně dusičnany, jejichž toxicita pro ryby je mnohem menší (Pitter, 2009).

### 2.2.2 Vliv dusitanů na ryby

Sladkovodní ryby přijímají aktivně dusitany přes žaberní aparát. Touto cestou se dostávají do krve, kde se naváží na krevní barvivo hemoglobin. Hemoglobin obsahuje ion Fe<sup>2+</sup>, který se působením dusitanů oxiduje na Fe<sup>3+</sup>. Z hemoglobinu tak vzniká methemoglobin, který ztrácí schopnost vázat kyslík. Při stálém působení dusitanů se postupně množství methemoglobinu v krvi zvyšuje a ryby hynou s příznaky dušení (Jensen, 2003). Zvýšené koncentrace methemoglobinu v krvi způsobují typicky hnědé zbarvení krve a žaberního aparátu (Čítek a kol., 1997). Dusitany ovlivňují i další pochody v těle ryb: hladinu iontů, dýchací procesy, kardiovaskulární funkce, funkci ledvin či funkci žláz s vnitřní sekrecí (Kroupová a kol. 2005)

### 2.2.3 Faktory ovlivňující toxicitu dusitanů

#### Délka expozice

Krátkodobá expozice: Dusitany jsou schopny se plně akumulovat v těle ryby během 24- 48 h expozice (Huey a kol., 1980; Eddy a kol. 1983). Tento fakt je potvrzen tím, že LC50 se mezi 24 a 96 hodinou příliš nemění (Lewis a Morris, 1986).

Dlouhodobá expozice: V případě dlouhodobé expozice dusitanů můžeme mluvit o určitém přizpůsobení ryb. Předpokládá se, že ryby vystavené dlouhodobému působení dusitanů si začnou vytvářet větší množství methemoglobin reduktázy a efektivněji tak odbourávají methemoglobin z krve. Nízké koncentrace dusitanů odpovídající zhruba 10% 96hLC50 jsou považovány z dlouhodobého hlediska pro ryby neškodné. Nezpůsobují vážné zdravotní komplikace ani neovlivňují růstové schopnosti jedince (Máchová a kol., 2004)

#### Kvalita vody

Chloridy: Největší vliv na snížení toxicity dusitanů mají chloridové ionty přítomné ve vodě. Tato skutečnost vyplývá z faktu, že mezi chloridovými ionty a dusitany existuje kompetice na chloridových buňkách žaber. V případě vyšší koncentrace chloridů jsou chloridové buňky obsazeny a vstřebávání dusitanů je omezeno. Čím je vyšší koncentrace chloridů ve vodě, tím je nižší toxický účinek dusitanů na ryby (Máchová a Svobodová, 2001; Kroupová a kol., 2005; Pištěková a kol., 2005).

Ostatní anionty a kationty: Bylo zjištěno, že bromidy, které jsou chemicky velice podobné chloridům, mají podobné účinky. V určitých koncentracích také snižují toxicitu dusitanů pro ryby (Eddy a kol, 1983). Pokud je ve vodě přítomen vápník ve vyšších koncentracích, působí také příznivě na snížení toxicity dusitanů. Zvýšené koncentrace vápníku snižují ztráty chloridů žábami, snižují tedy požadavky na jejich příjem, což v konečném důsledku snižuje příjem dusitanů (Krous a kol., 1982).

pH: Vliv pH na toxicitu dusitanů není ještě zcela objasněn. Pro manipulaci s pH se totiž používají pufrы, které ovlivňují aniontové pozadí, tudíž je nesnadné jasně říci, jaký vliv má samotné pH. Dalším úskalím je používání rozsahu pH, který je mimo možnosti přizpůsobení ryb (Lewis a Morris, 1986; Kroupová a kol, 2005).

Kyslík: Množství rozpuštěného kyslíku může ovlivnit toxicitu dusitanů, protože dusitany snižují kapacitu hemoglobinu pro transport kyslíku v krvi. Nedostatečná oxygenace vodního prostředí tedy může umocnit zhoršení zdravotního stavu chovaných ryb. Při pokusech na sumcích, bylo prokázáno, že za přítomnosti dusitanů ve vodě, byla obvyklá koncentrace kyslíku nedostačující pro jejich přežití (Bowser a kol., 1983).

Teplota: Pokud se bere v potaz všeobecně známý fakt, že rozpustnost kyslíku ve vodě je závislá na teplotě (při nižší teplotě je rozpustnost kyslíku vyšší), mohli bychom dojít k závěru, že dusitany by při nižší teplotě měly být méně nebezpečné. Při nižší teplotě se ovšem snižuje výkonnost detoxikačního mechanismu, tudíž nelze jednoznačně říci, jaký vliv má teplota vody (Kroupová a kol., 2005).

### **Věk, velikost a druh ryb**

Velké množství studií ukázalo, že mladší jedinci jsou méně citliví k toxickým vlastnostem dusitanů než starší stádia, nebo dospělí jedinci. Tento rozdíl může být z části způsoben odlišnou aktivitou methemoglobin reduktázy u mladých a dospělých ryb (Kiese, 1974). Dále také tím, že rybí plůdek nemá ještě dostatečně vyvinutá žábry a přijímá kyslík hlavně kůží (Kroupová a kol., 2005).

Citlivost k toxicitě dusitanů je velmi rozdílná u různých druhů ryb. Nejcitlivější ze studovaných čeledí ryb jsou lososovití. Velké rozdíly v citlivosti vůči dusitanům můžeme nalézt mezi teplomilnými druhy ryb. Dobře snáší působení dusitanů např. okounek pstruhový (*Micropterus salmoides*) (Palachnek a Tomaso, 1984).

### **Individuální citlivost**

Odlišnou vnímavost vůči dusitanům můžeme sledovat i mezi zástupci jednotlivých druhů např. u pstruha duhového. Individuální citlivost lze vysvětlit různým počtem chloridových buněk a velikostí žaberního aparátu (Aggergaard a Jensen, 2001).

## 2.2.4 Prevence

Abychom předešli nemalým ztrátám na obsádkách ryb a finanční újmě, je třeba provádět určitá preventivní opatření, která pomohou zabránit vzniku či negativním účinkům dusitanů.

- Při uvádění nových rybochovných objektů do provozu, je třeba brát na zřetel účinnost filtrů. Samotné filtry potřebují čas na své zapracování. Z počátku totiž nejsou schopné splňovat takové nároky na čištění, na které jsou konstruovány. S tím souvisí i výše krmné dávky, která by měla korespondovat s aktuálním stavem filtru.
- Sledovat účinnost biologických filtrů a v případě jejich nízké aktivity je podpořit dodáním aktivovaného kalu z čističky odpadních vod.
- Dalším krokem je pravidelná kontrola koncentrací kyslíku, amoniaku, dusitanů, dusičnanů a chloridů.
- Podle zjištěných hodnot koncentrací dusitanů reagovat na jejich zvyšující se trend preventivním zvýšením koncentrací chloridů.
- V případě výskytu nějakých onemocnění v objektu s recirkulací vody používat koupele s antibiotiky či jinými léčivy mimo recirkulační systém, tak aby se kontaminovaná voda nedostala do biologických filtrů (Kroupová a kol., 2005).

## **2.3 Huminové látky**

Huminové látky tvoří běžnou složku vody. Vyskytují se ve vodách podzemních, ale hlavně ve vodách povrchových. Jsou to převážně aromatické látky obsahující v molekule větší počet karboxylových a fenolových skupin. Velice zjednodušeně řečeno, nejsou huminové látky nic jiného než vodní humus s vysokým obsahem rozpuštěného organického uhlíku (DOC). Ve vodním prostředí jsou biochemicky i chemicky stálé. Vyznačují se svou barvou, kyselostí a komplexační schopností. Při vyšším obsahu ve vodě mohou způsobovat i pění. Z ekotoxikologického hlediska nejsou sice závadné, mají ovšem vliv na organoleptické vlastnosti vody. Z uvedených důvodů je koncentrace huminových látek v pitných, užitkových a provozních vodách nežádoucí (Pitter, 2009).

### **2.3.1 Vznik huminových látek**

Geneze huminových látek ve vodách stojí především na konci života rostlin. Z odumřelých částí rostlin rozkladnými pochody vzniká humus. V průběhu humifikačních procesů vznikají částečně rozpustné huminové látky (huminové a fulvinové kyseliny), nakonec pak černě zbarvené nerozpustné huminy. Samotný humus se dělí na dvě složky: nehumifikovanou a humifikovanou část. Z vědeckého hlediska je mnohem důležitější humifikovaná část díky své chemické aktivitě. Vodní humus se od půdního částečně liší svým složením, závisí to na tom, zda vznikl ve stojatých či tekoucích vodách. Humus se nejvíce hromadí v dnových sedimentech. Huminy mohou také vznikat při biologickém čištění splaškových a fenolových odpadních vod. Huminové látky lze rozdělit dle rozpustnosti na huminové kyseliny (jsou tmavohnědé barvy) a fulvinové kyseliny (jsou žluté a žlutohnědé barvy)(Pitter, 2009).

### **2.3.2 Výskyt ve vodách**

Jak už bylo výše zmíněno, vyskytují se huminové látky téměř ve všech vodách, jak povrchových tak podzemních. Vody s nejvyšším obsahem můžeme nalézt v rašeliništích. Huminové látky lze ve vodách nalézt v několika skupenstvích: v pevném, koloidním a rozpuštěném. Neopomenutelný je i výskyt ve vodních sedimentech. Ve vodě samotné jsou huminové látky součástí takzvaného rozpuštěného organického uhlíku, neboli rozpuštěné organické hmoty (Vlachová 2007). Původ huminových látek můžeme rozčlenit na alochtonní a autochtonní část. Pokud mluvíme o alochtonní části, která se do vodního prostředí dostala z vnějšího prostředí, jedná se o listový spad části suchozemských a pobřežních rostlin. Půdní huminy prosakují z půdy či jsou spláchnuty. Autochtonní část vzniká přímo ve vodě, jejímž zdrojem jsou především vodní rostliny, menší měrou zde působí plankton a řasy (Vlachová 2007).

### **2.3.3 Vlastnosti huminových látek**

Huminové látky jsou schopny vytvářet rozpustné i nerozpustné komplexy s kovy. Závisí to ovšem na mnoha faktorech: především na pH, nasycení reakčních míst či koncentraci iontů a přítomnosti ligandů. Rozpuštěné huminové látky jsou částečně přijímány vodními organismy a mají na ně tedy vliv. Mezi nespecifické vlivy patří např.: exprese proteinů teplotního šoku a modulace biotransformačních enzymů a mezi specifické vlivy pak např.: inhibice uvolňování fotosyntetického kyslíku u rostlin. Z výše uvedeného tedy vyplývá, že huminové látky jsou přírodními xenobiotiky a způsobují chemický stres (Steinberg a kol., 2003). Mají však i mnoho pozitivních vlastností, a proto jsou využívány v akvaristice viz níže. Všechny vlastnosti nejsou zatím podrobně popsány.

#### 2.3.4 Vliv huminových látek na ryby

Účinky huminových látek na ryby ještě nebyly kompletně popsány. Přítomnost huminových látek ve vodě působí chemický stres, a proto mohou tedy ovlivnit složení vodních společenstev. Také působí oxidační stres, což má vliv oxidaci membrán. Tato vlastnost může vést až k zvýšení bioakumulace cizorodých látek v těle ryb. Také mohou zapříčinit feminizaci ryb. Zřejmě mají i pozitivní vlastnosti. V podmínkách velmi měkkých vod pomáhají rybám huminové látky přežít v těchto podmínkách. Stimulují příjem  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  a zabraňují tak negativním vlivům nízkého pH. Svým působením huminové látky také mohou snížit případnou kumulaci Cu a Cd v těle ryb (Steinberg a kol., 2006). Bylo zjištěno, že huminové látky snižují toxicitu dusitanů pro embrya dania pruhovaného (Meinelt a kol. 2010). Přípravky s obsahem huminových látek jsou často využívány v akvaristice v chovu tropických druhů ryb. Huminové látky způsobují nahnědlé zbarvení vytvářející křišťálově jasnou tropickou vodu, podporující zbarvení ryb a dobrý zdravotní stav. Napomáhají tak vytvoření přírodního prostředí pro ryby (Norbert, 2010). Huminové látky mají protizánětlivé vlastnosti, chrání ryby a jikry proti mykózním onemocněním a podporují hojení drobných poranění (Reptilica, 2013).



## 2.4 Testy toxicity

### 2.4.1 Význam a využití testů toxicity na vodních organismech

Při hodnocení ekotoxikologických vlastností nově vyvinutých chemických látek, různých přípravků či klasifikaci odpadů určených ke skladování, mají testy toxicity nezastupitelnou roli. Testy poskytují informace o možném toxickém vlivu na biocenózu vodního prostředí. Jejich důležitost tedy spočívá v zahrnutí všech trofických stupňů sledovaného ekosystému (producent – konzument – destruent). Provádějí se na třech úrovních od buněk a tkání, organismů až po celá společenstva. Testy poskytují informace o vlivech na živé organismy a jejich schopnosti přecházet přes biomembrány. Využívají se ke stanovení nejvyšších přípustných koncentrací s ohledem na chov ryb a hodnocení kumulace reziduí různých látek v prostředí. Testy toxicity se využívají také při vyšetření havarijních úhynů ryb. Cílem testů toxicity je stanovení hodnot letální koncentrace LC50, efektivní koncentrace EC50 a inhibiční koncentrace IC50. Hodnota LC50 představuje koncentraci, při níž uhynie 50% testovaných organismů (např. v testech na rybách). EC50 je koncentrace vyvolávající úhyn, nebo inhibici testovaných organismů (např. v testech na zástupcích zooplanktonu). IC50 je hodnota, která vyvolá zastavení růstu 50% oproti kontrole (např. v testech na okřehku). Při určení hodnot LC50, EC50, IC50 se vychází z hodnot, při kterých došlo k více než nulové a méně než stoprocentní úmrtnosti, imobilizaci či inhibici růstu (Svobodová a kol., 2010).

Pro určení správného rozptylu koncentrací se provádějí následujících testy (Svobodová a kol., 2010).

Limitní test, při kterém se pozoruje reakce organismů na koncentraci 100 mg.l<sup>-1</sup> testované látky. Pokud během testu neuhynie žádný z pokusných organismů, nepokračuje se v testování.

Předběžný test následuje po limitním testu, pokud došlo k úhynu testovaných organismů. Používá se menší počet organismů např. 3 až 5 kusů ryb nebo 10 ks dafnií v každé koncentraci a vytváří se široká řada koncentrací (např. od 0,01 do 100mg.l<sup>-1</sup>). Z výsledků se poté volí užší rozptyl koncentrací s účinnými vlastnostmi do základního testu.

Základní test se provádí s větším počtem testovaných organismů, např. 7-10 ks ryb nebo 20 ks dafnií do každé koncentrace. Při vytváření koncentrační řady se vychází z poznatků předběžného testu, jak už bylo výše řečeno. Z výsledků zjištěných při testu

se vypočítává hodnota LC (EC, IC) 50. Na základě naměřených hodnot můžeme rovněž vypočítat LOEC (nejnižší koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky) a NOEC (nejvyšší koncentrace testovaného vzorku nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky).

Součástí všech testů je kontrola, v které jsou nasazeny stejné organismy jako v pokusu za totožných podmínek. Organismy jsou ovšem nasazeny ve vodě bez testované látky pro ověření jejich zdravotního stavu.

#### **2.4.2 Standardizace testů**

Aby mohly být výsledky testů prováděné v různých laboratořích považovány za srovnatelné, bylo nutno vytvořit normy pro jejich provádění. Využívají se mezinárodní normy ISO (International Organization for Standardization) a OECD (Organization for Economic Cooperation of Development) (Svobodová a kol. 2010). Zde je seznam norem týkajících se testů na rybách a jejich vývojových stádiích.

##### **a) podle OECD:**

- 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 (embryolarvální 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.

##### **b) podle ČSN EN ISO:**

- ČSN EN ISO 7346-1 (75 7761) Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby. 1999 Část 1: Statická metoda.
- ČSN EN ISO 7346-2 (75 7761) Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby. 1999 Část 2: Obnovovací metoda.
- ČSN EN ISO 7346-3 (75 7761) Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity látek pro

sladkovodní ryby. 1999 Část 3: Průtočná metoda.

• ČSN EN ISO 10229 (75 7760) Jakost vod - Stanovení subchronické toxicity látek pro sladkovodní ryby - Metoda vyhodnocení účinku látek na růstovou rychlost pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). 1997

Pro provádění testu toxicity na rybách je nutné dodržovat zásady 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 (Svobodová a kol., 2010).

### 2.4.3 Testy akutní toxicity

Mezi nejpoužívanější testy v toxikologických laboratořích patří akutní testy toxicity. Podstavou je vystavení ryb působení účinkům testovaných látek rozpuštěných ve vodě po dobu 48, nebo 96 hodin. Během testu se sleduje stav a chování ryb. Případně uhynulé ryby se odlovují a zaznamenává se jejich počet. Provádění a podmínky testů jsou jasně stanovené normami (Svobodová a kol. 2010):

- během testu by měla mít voda konstantní teplotu např.  $23 \pm 2$  °C (dle druhu ryby)
- ředící voda je připravena podle normy ISO 7346 a ISO 6341
- délka expozice  $96 \pm 2$  hodiny a výměnou lázně každých 24 ne 48 hodin
- lázeň minimálně 1000 ml na 1 g ryby
- 10 kusů ryb v jedné koncentraci
- osvětlení 12 až 16 hodin
- bez krmení
- bez aerace
- nasycení vody kyslíkem by nemělo klesnout pod 60 %
- koncentrační řada minimálně o 6 koncentracích plus kontrola
- po nasazení, následně každých 24 hodin a na konci testu měřit teplotu, pH a koncentraci rozpuštěného kyslíku

Nejčastěji používaným testovacím druhem ryb je živorodka duhová (*Poecilia reticulata*) v rozmezí délek 15 až 25 mm a věku 3 až 4 měsíců. Také je možno použít danio pruhované (*Danio rerio*) ve velikosti 25 až 35 mm a věku 2,5 až 3,5 měsíce (Svobodová a kol, 2010).

Abychom mohli považovat proběhlý test za platný, je potřeba, aby byla splněna určitá kritéria. Koncentrace rozpuštěného kyslíku nesmí klesnout po 60 % nasycení po celou dobu testu. Koncentrace testované látky nesmí klesnout pod 80 % nominální koncentrace.

Pro vyhodnocení testu se používá probitová grafická analýza nebo výpočetní technika.

### 3 Experimentální část

Cíl: stanovení vlivu huminových látek na akutní toxicitu dusitanů

#### 3.1 Metodika

##### 3.1.1 Testy akutní toxicity na daniu pruhoaném (*Danio rerio*) a živorodce duhové (*Poecilia reticulata*)

###### Princip testu

Testy akutní toxicity na daniu pruhoaném (*Danio rerio*) a živorodce duhové (*Poecilia reticulata*) byly provedeny podle normy ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod – stanovení akutní letální toxicity pro sladkovodní ryby. Každý druh pokusných ryb byl vystaven v jednom testu odstupňovaným koncentracím dusitanů bez přídavku huminové látky a v dalších testech odstupňovaným koncentracím dusitanů s přídavkem huminové látky. Pro každý test pak byly na základě mortality v jednotlivých koncentracích a kontrole během testu vypočteny probitovou analýzou střední letální koncentrace 24h-96hLC50 dusitanů za přítomnosti i nepřítomnosti huminové látky pro jednotlivé druhy ryb.

###### Přístroje, pomůcky a materiál

Testovací organismus: daniu pruhoané (*Danio rerio*) o průměrné délce 3,36 cm (viz příloha Obr. č. 1.); živorodka duhová (*Poecilia reticulata*) o průměrné délce 2,65 cm.

Ředící voda: jako ředící voda byla použita balená kojenecká neperlivá voda značky Aquila s obsahem  $\text{Cl}^-$  3,05  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Chemikálie: dusitany byly aplikovány do vody ve formě dusitanu sodného ( $\text{NaNO}_2$ ). Zdrojem huminové látky byl přípravek značky Dupla Cur obsahující huminovou látku HS 1500 (výrobce Dohse Aquaristik KG).

Přístroje a pomůcky: oximetr, pH metr, laboratorní nádobí, analytické váhy, síťky a další pomůcky pro manipulaci s rybami.

## Podmínky testu

Délka expozice: 96 hodin

Objem lázně: předběžný test 0,5 litru, základní test 2 litry

Výměna lázně: po 48 hodinách

Teplota vody:  $23 \pm 2^\circ\text{C}$

Nasycení kyslíkem  $\text{O}_2 > 60\%$

Počet testovaných jedinců: 3 ks v jedné koncentraci v předběžném testu, 10 ks v jedné koncentraci v základním testu

Krmivo: během testů nebyly ryby krmeny

## Průběh testů

Testy akutní toxicity byly provedeny ve dvou stupních.

- 1) předběžný test na daniu pruhovaném (*Danio rerio*)
- 2) základní test na daniu pruhovaném (*Danio rerio*) a živorodce duhové (*Poecilia reticulata*)

### Předběžné testy

Předběžný test č. 1: do skleněných nádob o objemu 1,5 litru bylo připraveno 0,5 litru roztoků dusitanu sodného o koncentracích: 10, 50, 100, 250, 500, 800  $\text{mg.l}^{-1}$ . Do těchto lázní byly nasazeny 3 ks náhodně vybraných ryb druhu danio pruhované. Stejným způsobem byla nasazena i kontrola.

Předběžný test č. 2: do skleněných nádob o objemu 1,5 litru bylo připraveno 0,5 litru roztoků dusitanu sodného o koncentracích: 10, 50, 100, 250, 500, 800  $\text{mg.l}^{-1}$  s přidavkem 0,25 ml přípravku Dupla Cur (výsledná koncentrace byla 0,5ml/l přípravku). Do těchto lázní byly nasazeny 3 ks náhodně vybraných ryb druhu danio pruhované. Stejným způsobem byla nasazena i kontrola

Po nasazení se změřily v obou testech hodnoty pH, teploty a koncentrace rozpuštěného kyslíku. To se opakovalo každých 24 hodin až do ukončení testu. Po 48 hodinách byly lázně vyměněny. V průběhu testů se zaznamenávala a mortalita ryb (příloha Tab. č. 2 až 5). Na základě výsledků předběžných testů byly zvoleny koncentrace pro základní testy.

Volba koncentrací pro základní testy na živorodce duhové byla provedena na základě údajů uvedených v publikaci Kroupová a kol. (2004). Pro tento druh tedy nebylo nutné provádět předběžné testy.



Obr. 1. Průběh předběžných testů toxicity (foto J. Máchová)



Obr. č. 2 Měření základních parametrů kvality vody v průběhu základních testů toxicity (foto J. Máchová)

### Základní testy

#### Danio pruhované

Základní test č. 1: do skleněných nádob o objemu 3 litry bylo připraveno po 2 litrech roztoků dusitanu sodného o koncentracích 50, 100, 250, 500, 750 a 1000 mg.l<sup>-1</sup>. Do těchto lázní bylo nasazeno 10 kusů náhodně vybraných ryb druhu danio pruhované. Stejným způsobem byla nasazena kontrola. Test byl dvakrát opakován.

Základní test č. 2: do skleněných nádob o objemu 3 litry bylo připraveno po 2 litrech roztoků dusitanu sodného o koncentracích 50, 100, 250 500 750 a 1000 mg.l<sup>-1</sup>, do každé lázně se přidalo navíc po 1 ml přípravku Dupla Cur (výsledná koncentrace byla 0,5 ml.l<sup>-1</sup>). Do těchto lázní bylo nasazeno 10 kusů náhodně vybraných ryb druhu danio pruhované. Stejným způsobem byla nasazena kontrola. Test byl dvakrát opakován.

Základní test č. 3: do skleněných nádob o objemu 3 litry bylo připraveno po 2 litrech roztoků dusitanu sodného o koncentracích 50, 100, 250, 500, 750 a 1000 mg.l<sup>-1</sup>, do každé lázně se přidalo navíc po 2 ml přípravku Dupla Cur (výsledná koncentrace byla 1



ml.l<sup>-1</sup>). Do těchto lázní bylo nasazeno 10 kusů náhodně vybraných ryb druhu danio pruhované. Stejným způsobem byla nasazena kontrola. Test byl dvakrát opakován.

#### Živorodka duhová

Základní test č. 4: do skleněných nádob o objemu 3 litry bylo připraveno po 2 litrech roztoků dusitanu sodného o koncentracích 5, 10, 20, 30, 50, 75 a 100 mg.l<sup>-1</sup>. Do těchto lázní bylo nasazeno 10 kusů náhodně vybraných ryb druhu živorodka duhová. Stejným způsobem byla nasazena kontrola. Test byl proveden jednou.

Základní test č. 5: do skleněných nádob o objemu 3 litry bylo připraveno po 2 litrech roztoků dusitanu sodného o koncentracích 5, 10, 20, 30, 50, 75, 100 a 150 mg.l<sup>-1</sup>, do každé lázně se přidalo navíc po 1 ml přípravku Dupla Cur (výsledná koncentrace byla 0,5 ml.l<sup>-1</sup>). Do těchto lázní bylo nasazeno 10 kusů náhodně vybraných ryb druhu živorodka duhová. Stejným způsobem byla nasazena kontrola. Test byl proveden jednou.

Základní test č. 6: do skleněných nádob o objemu 3 litry bylo připraveno po 2 litrech roztoků dusitanu sodného o koncentracích 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50 a 75 mg.l<sup>-1</sup>, do každé lázně se přidalo navíc po 2 ml přípravku Dupla Cur (výsledná koncentrace byla 1 ml.l<sup>-1</sup>). Do těchto lázní bylo nasazeno 10 kusů náhodně vybraných ryb druhu živorodka duhová. Stejným způsobem byla nasazena kontrola. Test byl proveden jednou.

Po nasazení se změřily ve všech lázních hodnoty pH, teploty vody a koncentrace rozpuštěného kyslíku (obr. č. 2). To se opakovalo každých 24 hodin až do ukončení testu. Po 48 hodinách byly lázně vyměněny. V průběhu testů se zaznamenávala mortalita ryb. Hodnoty jsou uvedeny v příloze Tab. č. 8 až 25.

#### **Vyhodnocení testu**

Na základě zjištěné mortality testovaných jedinců v jednotlivých koncentracích během základních testů byly pomocí probitové analýzy vypočítány letální koncentrace dusitanu sodného při různých koncentracích přípravku Dupla cur pro jednotlivé druhy ryb. K výpočtu byl použit program EKO-TOX 5.1.

Hodnoty 96hLC50 byly stanoveny s nejistotou měření stanovenou na základě opakovaně prováděného testu akutní toxicity se standartní látkou  $K_2Cr_2O_7$ . Z naměřených hodnot 96hLC50 byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Na základě získaných výsledků byla stanovena tzv. rozšířená nejistota měření jako dvojnásobek směrodatné odchylky, což odpovídá hladině spolehlivosti 95%. Z dlouhodobého sledování prováděného v toxikologické laboratoři VÚRH JU Vodňany akreditované pro testy akutní toxicity na vodních organismech vyplývá, že rozšířená nejistota měření běžně dosahuje 20 – 30 %.

### 3.1.2 Ověření koncentrace dusitanů

V průběhu testů bylo opakovaně ověřováno, zda nominální koncentrace dusitanů odpovídají skutečné koncentraci ve vodě. Analýzy byly provedeny podle Horákové a kol. (1986).

Princip analýzy: Na základě chemické reakce sulfanilové kyseliny, která je diazotována v prostředí hydrogensíranu draselného kyselinou dusitou na diazoniovou sůl. Vzniklá sůl je kopulována s N-1(1-naftyl)-ethylendiamindihydrochloridem (NED-hydrochloridem) na červené azobarvivo. Zbarvení je úměrné koncentraci dusitanů ve vzorku (Horáková a kol. 1986). Principem metody je měření absorpce procházejícího toku monochromatického světla při stanovené vlnové délce  $\lambda = 540$  nm. Pokud je zbarvení příliš intenzivní, je třeba vzorek zředit (Horáková a kol. 1986)

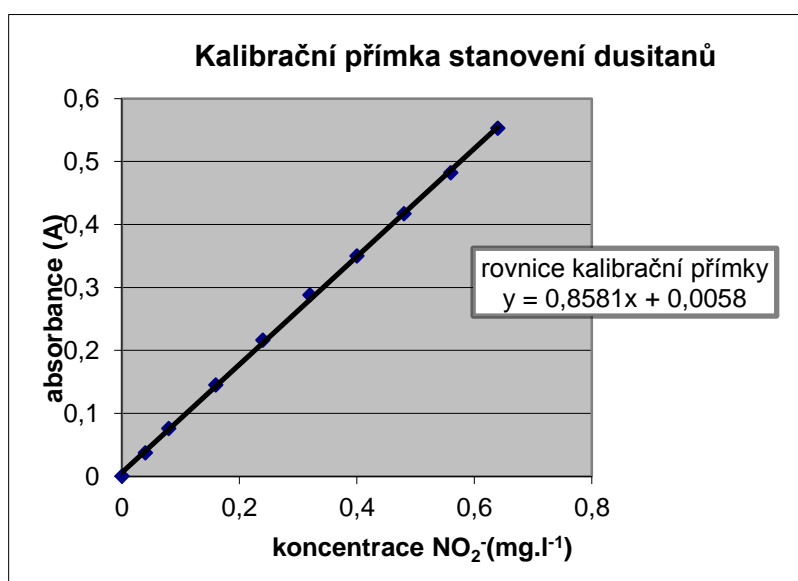
Pomůcky: spektrofotometr, kyvety, laboratorní sklo, činidla

Kalibrační graf: Byly připraveny roztoky o koncentracích iontů  $NO_2^-$  0,05 až 0,6  $mg.l^{-1}$ . Ke 25 ml roztoku v odměrné baňce o objemu 50 ml se přidalo 2,5 ml roztoku sulfanilové kyseliny, směs se promíchala a nechala se stát 10 minut. Pak se přidalo 2,5 ml roztoku N - (1-naftyl) – ethylendiamindihydrochloridu, doplnilo se destilovanou vodou po rysku, promíchalo a nechalo stát 20 minut. Vedle řady s různými koncentracemi dusitanů se připravil takzvaný slepý vzorek z destilované vody viz Obr. č. 2. v příloze. Po uplynutí stanovené doby se měřila absorbance v kyvetách při vlnové délce  $\lambda = 540$  nm. Naměřené hodnoty absorbance (Tab. č. 1) se po odečtení absorbance

slepého stanovení vynesly do kalibračního grafu proti koncentraci iontů  $\text{NO}_2^-$  v  $\text{mg.l}^{-1}$ . Z přímky kalibračního grafu byla získána rovnice pro výpočet koncentrace  $\text{NO}_2^-$  v  $\text{mg.l}^{-1}$  (Horáková a kol. 1986).

Tab. č. 1 Měření absorbance pro vytvoření kalibrační řady

Koncentrace v $\text{mg.l}^{-1}$	$\text{NO}_2^-$	0,04	0,08	0,16	0,24	0,32	0,4	0,48	0,56	0,64
absorbance		0,037	0,076	0,145	0,216	0,288	0,35	0,417	0,482	0,553



Obr. 3 Kalibrační graf a rovnice kalibrační přímky pro stanovení dusitanů.

Postup: Vzorky vody o neznámé koncentraci dusitanů se zpracují stejným postupem jako při tvorbě kalibračního grafu. Po uplynutí stanovené doby se také měří absorbance v kyvetách při vlnové délce  $\lambda = 540 \text{ nm}$ .

Výpočet: Pro výpočet hmotnostní koncentrace iontů  $\text{NO}_2^-$  nebo  $\text{N-NO}_2^-$  v  $\text{mg.l}^{-1}$  ve vzorku se využije rovnice kalibrační přímky. Před jejím použitím je třeba jí upravit do tvaru  $x = (y - 0,0058) / 0,8581$ , kde za  $y$  dosazujeme naměřené absorbance a počítáme neznámou  $x$ - koncentraci. Na závěr je nutné přihlédnout k ředění vzorku před stanovením.

Hodnocení: Měření koncentrace dusitanů v lázních bylo provedeno opakovaně: ve dvou případech v lázních po 48 hodinovém působení na ryby, jednou hned po nasazení testu. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v příloze Tab. č. 25 až 31.

## 3.2 Výsledky

### 3.2.1 Platnost testů

Před vyhodnocením testů byla provedena kontrola platnosti testu dle normy ČSN EN ISO 7346-2. V průběhu předběžného testu došlo ke snížení obsahu rozpuštěného kyslíku pod 60 %. Před nasazením základních testů se tedy přistoupilo k provzdušňování připravených lázní, aby bylo docíleno dostatečného nasycení rozpuštěného kyslíku. V průběhu základních testů toxicity neklesla koncentrace rozpuštěného kyslíku pod 60 %. Byl zaznamenán úhyn ryb v kontrole, vždy však do 10% nasazených kusů. Koncentrace dusitanů ve vodě se v průběhu testů pohybovala průměrně okolo 97 % nominální hodnoty a nikde neklesla pod 88 % nominální hodnoty. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v příloze Tab. č. 25 až 31 .

### 3.2.2 Výsledky testů toxicity na daniu pruhovaném

#### Výsledky předběžných testů

Rozsah koncentrací v předběžných testech na daniu pruhovaném činil 10 - 800 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>. Hodnoty základních parametrů kvality vody v průběhu předběžných testů jsou uvedeny v příloze Tab. č. 1 a 3.

V průběhu předběžného testu č. 1 nebyl v koncentracích 10 - 100 mg.l<sup>-1</sup> zaznamenán žádný úhyn ryb. V nejvyšší koncentraci v závěru testu uhynuly všechny testované ryby. V kontrole byl zaznamenán jeden úhyn. Mortalita ryb v předběžném testu č. 1 je uvedena v Tab. č. 2.

V průběhu předběžného testu č. 2 nebyl v koncentracích 10 - 100 mg.l<sup>-1</sup> zaznamenán žádný úhyn ryb. V koncentracích 250 – 800 mg.l<sup>-1</sup> uhynuly do konce testu dva ze tří kusů nasazených ryb. Mortalita ryb v předběžném testu č. 2 je uvedena v Tab. č. 4. Na základě výsledků předběžných testů byly připraveny koncentrace pro základní testy na daniu pruhovaném.

### Výsledky základních testů

Rozsah koncentrací v základních testech na daniu pruhovaném činil 50 - 1000 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>, v testech č. 2 a 3 byla přidána koncentrace 1300 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>. Hodnoty základních parametrů kvality vody v základních testech jsou uvedeny v příloze Tab. č. 7, 9, 11, 13, 15 a 17.

Během základních testů č. 1 byl v koncentracích 50 - 100 mg.l<sup>-1</sup> zaznamenán 10% úhyn. V koncentracích 250 - 500 mg.l<sup>-1</sup> byl průměrný úhyn 80 % testovaných organismů. V nejvyšších koncentracích došlo k takřka 100 % úhynům. V kontrole nebyl zaznamenán žádný úhyn testovaných organismů. Hodnoty mortality ryb jsou uvedeny v příloze Tab. č. 8 a 10. Na základě mortality v testech byla stanovena průměrná hodnota 96hLC50 244,7 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>.

Během základních testů č. 2 nebyl v koncentracích 50 - 100 mg.l<sup>-1</sup> zaznamenán žádný úhyn. V koncentraci 250 mg.l<sup>-1</sup> byl průměrný úhyn 15 % testovaných organismů. V nejvyšších koncentracích se pohybovala mortalita mezi 70 - 100 %. V kontrole nebyl zaznamenán žádný úhyn testovaných organismů. Hodnoty mortality ryb jsou uvedeny v příloze Tab. č. 12 a 14. Na základě mortality v testech byla stanovena průměrná hodnota 96hLC50 423,3 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>.

Během základních testů č. 3 byl v koncentracích 50 - 100 mg.l<sup>-1</sup> zaznamenán 10% úhyn. V koncentraci 250 mg.l<sup>-1</sup> byl průměrný úhyn 25 % testovaných organismů. V rozmezí koncentrací 500 až 750 mg.l<sup>-1</sup> se pohybovala mortalita okolo 87 %. V nejvyšších koncentracích došlo k 100 % úhynům. V kontrole nebyl zaznamenán žádný úhyn testovaných organismů. Hodnoty mortality ryb jsou uvedeny v příloze Tab. č. 16 a 18. Na základě mortality v testech byla stanovena průměrná hodnota 96hLC50 290,7 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>.

Hodnoty letálních koncentrací (24-96hLC50) dusitanu sodného zjištěné v základních testech toxicity na daniu pruhovaném jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tab. č. 2. Hodnoty letálních koncentrací NaNO<sub>2</sub> v mg.l<sup>-1</sup> pro danio pruhované.

Testovaný organismus	Č. testu	Typ testu	Opakování	24hLC50	48hLC50	72hLC50	96hLC50
danio pruhované	Č. 1	NaNO <sub>2</sub>	1	N	513,3	513,3	254,5
			2	546,2	278,7	270,3	234,9
	Č. 2	NaNO <sub>2</sub> + 0,5 ml.l <sup>-1</sup> hum. l.	1	N	1087,6	575,4	354,6
			2	896,1	646,5	503,0	492,0
	Č. 3	NaNO <sub>2</sub> + 1 ml.l <sup>-1</sup> hum..l.	1	N	577,8	405,2	311,2
			2	1174,2	465,2	428,7	270,2

N= nehodnoceno kvůli nízké mortalitě

### 3.2.3 Výsledky testu toxicity na živorodce duhové

#### Výsledky základních testů

Rozsah koncentrací v základních testech na živorodce duhové činil 5 - 150 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>. Hodnoty základních parametrů kvality vody v základních testech jsou uvedeny v příloze Tab. č. 19, 21 a 23.

Během základního testu č. 4 nebyl v koncentracích 5- 10 mg.l<sup>-1</sup> zaznamenán žádný úhyn. V ostatních koncentracích byl postupně zaznamenán 100% úhyn. V kontrole byl zaznamenán 10% úhyn testovaného organismu. Hodnoty mortality ryb jsou uvedeny v příloze Tab. č. 20. Na základě mortality v testu byla stanovena průměrná hodnota 96hLC50 15,3 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>.

Během základních testů č. 5 nebyl v koncentracích 5 mg.l<sup>-1</sup> zaznamenán žádný úhyn. V koncentraci 10 mg.l<sup>-1</sup> byl průměrný úhyn 20% testovaných organismů. V ostatních koncentracích dosáhla mortalita 100%. V kontrole nebyl zaznamenán žádný úhyn testovaných organismů. Hodnoty mortality jsou uvedeny v příloze Tab. č. 22. Na základě mortality v testu byla stanovena hodnota 96hLC50 11,5 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>.

Během základních testů č. 6 nebyl v koncentracích 5 - 7 mg.l<sup>-1</sup> zaznamenán žádný úhyn. V koncentraci 10 a 15 mg.l<sup>-1</sup> byl průměrný úhyn 10% testovaných organismů. V ostatních koncentracích dosáhla mortalita 100%. V kontrole nebyl zaznamenán žádný úhyn testovaných organismů. Hodnoty mortality jsou uvedeny v příloze Tab. č. 23. Na základě mortality v testu byla stanovena hodnota 96hLC50 13,7 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>.

Tab. č. 3. Hodnoty letálních koncentrací NaNO<sub>2</sub> v mg.l<sup>-1</sup> živorodka duhovou.

Testovaný organismus	Č. testu	Typ testu	24hLC50	48hLC50	72hLC50	96hLC50
živorodka duhová	Č. 4	NaNO <sub>2</sub>	33,5	23,4	16,8	15,3
	Č. 5	NaNO <sub>2</sub> +0,5 ml.l <sup>-1</sup> hum. l.	29,1	21,1	11,5	11,5
	Č. 6	NaNO <sub>2</sub> +1 ml.l <sup>-1</sup> hum. l.	29,2	N	15,2	13,7

N= nehodnoceno kvůli nízké mortalitě



### 3.3 Diskuze

Pro testování vlivu huminových látek na toxicitu dusitanů byl použit komerční přípravek značky Dupla Cur obsahující huminovou látku HS 1500. V akvaristice jsou huminové látky přidávány do vody obvykle proto, aby napomohly vytvoření přírodního prostředí pro ryby a stabilizovaly pH vody. Přípravek Dupla Cur má dle výrobce navíc protizánětlivé vlastnosti, chrání jikry proti napadení mykózami a napomáhá při hojení drobných poranění (Reptilica, 2013). Přípravek byl vybrán pro testování, protože huminová látka v něm obsažená (HS 1500) měla pozitivní vliv na snížení toxicity dusitanů pro embrya dania pruhovaného (Meinelt a kol., 2010).

Hodnota 96hLC50 dusitanu sodného bez přídavku huminové látky činila pro danio pruhované 244,7 mg.l<sup>-1</sup> (163,1 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). V práci Pištěkové a kol. (2005) je uvedena vyšší hodnota 96hLC50, a to 363,6 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub> (242,4 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Rozdíl byl způsoben rozdílnou koncentrací chloridů v ředící vodě. Testy Pištěkové a kol. (2005) byly prováděny v ředící vodě s koncentrací chloridů 19 mg.l<sup>-1</sup>, v mnou prováděných testech byla pak použita ředící voda o obsahu chloridů 3 mg.l<sup>-1</sup>. Se zvyšující se koncentrací chloridů ve vodě klesá toxicita dusitanů pro ryby (Máchová a Svobodová, 2001; Kroupová a kol., 2005; Pištěková a kol., 2005), proto byly v práci Pištěkové a kol. (2005) zjištěny vyšší hodnoty 96hLC50 dusitanu sodného.

V dalších testech na danio pruhovaném (č. 2 a 3) byla přidávána huminová látka HS 1500 ve formě přípravku značky Dupla Cur ve výsledné koncentraci přípravku 0,5 a 1,0 ml.l<sup>-1</sup>. Výrobce doporučené dávkování přípravku je 0,5 ml.l<sup>-1</sup>. V testech, kde byla výsledná koncentrace přípravku 0,5 ml.l<sup>-1</sup>, byla zjištěna průměrná hodnota 96hLC50 423,3 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub> (282,2 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Přídavkem přípravku bylo tedy docíleno zvýšení hodnoty 96hLC50 o 73 % oproti hodnotě zjištěné v testech bez přídavku přípravku Dupla Cur. V testech, kde byla výsledná koncentrace přípravku 1 ml.l<sup>-1</sup>, byla stanovena hodnota 96hLC50 290,7 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub> (193,8 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). V tomto případě tedy došlo rovněž ke zvýšení hodnoty 96hLC50, ale jen o 18 %. Vezmeme-li v úvahu, že rozšířená nejistota měření v laboratoři, kde byly testy prováděny, běžně dosahuje 20 – 30 %, je možné říci, že přípravek měl pozitivní vliv pouze v nižší testované koncentraci. Z výsledků vyplývá, že vliv testované huminové látky na danio pruhované není přímo úměrný její koncentraci. O pozitivním vlivu huminové látky HS 1500 na snížení toxicity dusitanů hovoří i Meinelt a kol. (2010). V jeho pokusu s dusitany se

podářilo docílit přidáním této huminové látky zvýšení přežití embryí dania pruhovaného.

Jiných výsledků bylo dosaženo v testech na živorodce duhové. V testu bez přídavku huminové látky byla stanovena hodnota 96hLC50 15,3 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub> (10,2 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). V testu s přídavkem přípravku Dupla Cur o výsledné koncentraci 0,5 ml.l<sup>-1</sup> byla zjištěna hodnota 96hLC50 11,5 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub> (8,2 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). V testu s vyšší koncentrací přípravku (1 ml.l<sup>-1</sup>) byla zjištěna hodnota 96hLC50 13,7 mg.l<sup>-1</sup> (9,1 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Hodnoty 96hLC50 zjištěné v testech, kde byl aplikován přípravek Dupla Cur, se lišily o méně než 20 % od hodnoty zjištěné bez přídavku přípravku. Nelze tedy tvrdit, že má testovaná huminová látka vliv na toxicitu dusitanů pro živorodkou duhovou.

Mechanismus působení huminových látek na ryby nebyl dosud podrobně popsán. O důvodu rozdílného vlivu huminové látky HS 1500 na toxicitu dusitanů pro testované druhy ryb můžeme pouze spekulovat. Určitý vliv by mohl mít rozdílný původ ryb. Danio pruhované je původem z Přední Indie, Pákistánu a Bangladéše. V místních vodách nejsou huminové látky obsaženy ve vysokých koncentracích. Pro danio tedy huminové látky nemusí být obvyklou složkou vodního prostředí, což může být onen faktor, který způsobil zvýšení hodnot LC50. Naopak živorodka duhová pochází z Jižní Ameriky, kde jsou vody s vysokým obsahem huminových látek běžné. Zřejmě proto neměla v tomto případě testovaná huminová látka vliv na toxicitu dusitanů. Lze tedy konstatovat, že vliv mnou testované huminové látky na toxicitu dusitanů není pro jednotlivé druhy stejný. Zda budou mít huminové látky pozitivní vliv, je rovněž dáno koncentrací, v které jsou dávkovány do vody. V případě mnou testovaného přípravku Dupla Cur byl zaznamenán výrazný pozitivní vliv na snížení toxicity dusitanů pro danio pruhované pouze v koncentraci doporučené výrobcem (nižší testovaná koncentrace: 0,5 ml.l<sup>-1</sup>). Vyšší koncentrace výrazný pozitivní vliv již neměla. Při používání huminových látek za účelem snižování toxicity dusitanů je tedy nutné brát na zřetel, jaký druh ryby chováme. Dále je nutné dodržovat doporučené dávkování, případně ověřit experimentálně, jaká koncentrace huminové látky má pozitivní vliv.

## 4 Závěr

Danio pruhované (*Danio rerio*): Na základě výsledků testů akutní toxicity byly stanoveny následující střední letální koncentrace dusitanů:

-bez přídavku huminové látky 163,1 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

-při koncentraci 0,5 ml.l<sup>-1</sup> přípravku Dupla Cur (huminová látka HS 1500) 282,2 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

-při koncentraci 1 ml.l<sup>-1</sup> přípravku Dupla Cur (huminová látka HS 1500) 193,8 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

Testy akutní toxicity na daniu pruhovaném prokázaly pozitivní vliv testovaného přípravku (Dupla Cur) obsahujícího huminovou látku HS 1500 na toxicitu dusitanů v koncentraci doporučené výrobcem (0,5 ml.l<sup>-1</sup>).

Živorodka duhová (*Poecilia reticulata*): Na základě testů akutní toxicity byly stanoveny následující střední letální koncentrace dusitanů:

-bez přídavku huminové látky 10,2 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

-při koncentraci 0,5 ml.l<sup>-1</sup> přípravku Dupla Cur (huminová látka HS 1500) 8,2 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

-při koncentraci 1 ml.l<sup>-1</sup> přípravku Dupla Cur (huminová látka HS 1500) 9,1 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

Testy akutní toxicity neprokázaly pozitivní vliv testovaného přípravku (Dupla Cur) obsahujícího huminovou látku HS 1500 na toxicitu dusitanů.

Testovaná huminová látka nepůsobí stejně na všechny druhy ryb. Účinek také závisí na její koncentraci ve vodě.

## 5 Použitá literatura

- Aggergaard, S. and Jensen, F.B., 2001. Cardiovascular changes and physiological response during nitrite exposure in rainbow trout. *J. Fish Biol.* 59, pp. 13–27.
- Bowser, P.R., Falls, W.W., Van Zandt, J., Collier, N., Phillips, J.D., 1983. Methemoglobinemia in channel catfish: methods of prevention. *Progressive Fish-Culturist* 45, pp. 154-158.
- Čítek, J., Svobodová, Z., Tesarčík, J., 1997. Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb. 2., aktualiz. vyd. Ilustrace Jana Gelnarová. Praha: Informatorium.
- Eddy, F.B., Kunzlik, P.A. and Bath, R.N., 1983. Uptake and loss of nitrite from the blood of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L. in fresh water and in dilute sea water. *J. Fish Biol.* 23, pp. 105–116.
- Horáková, m., Lischke, P., Grünwald, A., 1986. Chemické a fyzikální metody analýzy vod, SNTL Praha
- Hartnam, P., Příkryl, I., Štědrónský, E., 1998. Hydrobiologie. 2. přepr. vyd. Praha: Informatorium.
- Huey, D.W., Simco, B.A., Criswell, D.W., 1980. Nitrite-induced methemoglobinemia in channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society* 105, pp. 558–562.
- Jensen, F.B., 2003. Nitrite disrupts multiple physiological function in aquatic animal. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A*, 135 (1), 9-24
- Kiese, M., 1974. Methemoglobinemia: A Comprehensive Treatise, CRC Press, Cleveland,OH.
- Kroupová, H., Máchová, J., Svobodová, Z., 2005. Dusitany ve vodním prostředí a jejich účinky na ryby – Přehled, *Bulletin VÚRH Vodňany*, 4 .

- 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, 2004, Brno, s. 237-245.
- Krous, S.R., Blazer, V.S., Meade, T.L., 1982. Effects of acclimation time on nitrite movement across the gill epithelia of rainbow trout: the role „chloride cells”. *Progressive Fish-Culturist* 44, pp. 126-130.
- Lewis Jr., W.M., Morris, D.P., 1986. Toxicity of nitrite to fish: a review. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115, pp. 183–195.
- Máchová, J., Kroupová, H., Svobodová, Z., Valentová, O., Piačková, V., Hamáčková, J., 2004. Tvorba methemoglobinu u Tilápie nilské (*Oreochromis niloticus*) jako důsledek zvýšené koncentrace dusitanů ve vodě. Sborník příspěvků ze 7. české ichtyologické konference, Vodňany 6-7. 5. 2004, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech 137-142.
- Máchová, J., Svobodová, Z., 2001. Nitrite toxicity for fish under experimental- and farming conditions- poster č. P- 275, 10. International conference of the EAFP Diseases of Fish and Shellfish, Dublin, 9- 14 září 2001.
- Meinelt, T., Kroupová, H., Stüber, A., Rennert, B., Wienke, A., Steinberg, C. E. W. 2010. Can dissolved aquatic humic substance reduce the toxicity of ammonia and nitrite in recirculating aquaculture systems? *Aquaculture* 306 (2010) 378-383
- Norbert (Bob66), 2010. Začínáme s terčovci. [online].[cit. 2013-04-18]. Dostupné na <http://rybicky.net/clanky/445-zaciname-s-tercovci>
- Palachek, R.M. and 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, pp. 1739–1744.
- Pišťeková, V., Voslafiova, E., Svobodova, Z., 2005. Nitrite Toxicity to *Danio rerio*: Effects of Chloride Concentrations during Acclimatization and in Toxicity Tests. *Acta Vet. Brno* 2005, 74:435-440.

Pitter, P., 2009, Hydrochemie. 4. aktualiz. vyd. Praha: VŠCHT.

Reptilica, 2013, Dupla Cur, Protection Tonic, Huminstoff Hs 1500, 200ml [online]. Reptilica.de [cit. 2013-04-18]. Dostupné na [http://www.reptilica.de/product\\_info.php/product/Dupla-Cur-Protection-Tonic-Huminstoff-HS-1500-200-ml](http://www.reptilica.de/product_info.php/product/Dupla-Cur-Protection-Tonic-Huminstoff-HS-1500-200-ml)

Steinberg, C.E.W., Paul, A., Pflugmacher, S., Meinelt, T., Klocking, R., Wiegand, C. 2003. Pure humic substance have the potential to act as xenobiotic chemical – A review. Fresenius Environmental Bulletin 12:391-401

Steinberg, C. E. W., Kamara, S., Prokhotskaya, V. Y., Manusadžianas, L., Karasyova, T. A., Timofeyev, M. A., Jie, Z., Paul, A., Meinelt, T., Fajalla, V. F., Matsuo, A. Y. O., Burnison, B. K., Menzel, R., 2006 Dissolved humic substance – ecological driving forces from the individual to the ekosystém level? Freshwater Biology (2006) 51, 1189-1210

Svobodová, Z., Beklová, M., Máchová, J., Dobšíková, R., Mácová, S., Modrá, H., Velišek, J., 2010, Ekotoxikologie, praktická cvičení, Brno

Vlachová, K., 2007, Vliv huminových látek na toxicitu komplexních vzorků ze životního prostředí, Brno, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.

Nařízení vlády č. 61/2003 Sb. o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech, ve znění nařízení vlády č. 229/2007 Sb. a nařízení vlády č. 23/2011Sb.

## 6 Přílohy

### Seznam tabulek

Tab. č. 1. Podmínky předběžného testu č. 1 provedeného dne 18. - 22. 6. 2012 na daniu pruhovaném.

Tab. č. 2. Mortalita během předběžného testu č. 1 na daniu pruhovaném, provedeném dne 18. - 22. 2012 (nasazeny 3 kusy).

Tab. č. 3. Podmínky předběžného testu č. 2 s přídatkem 0,25ml hum. látky na 0,5l lázně provedeného dne 18. - 22. 6. 2012 na daniu pruhovaném.

Tab. č. 4. Mortalita během předběžného testu č. 2 na daniu pruhovaném, s přídatkem 0,25 ml hum. látky na 0,5l lázně provedeném dne 18. - 22. 6. 2012 (nasazeny 3 kusy).

Tab. č. 5. Koncentrace dusitanu sodného v základním testu na daniu pruhovaném.

Tab. č. 6. Koncentrace dusitanu sodného v základním testu na živorodce duhové.

Tab. č. 7. Podmínky základního testu č. 1 provedeného dne 25. - 29. 6. 2012 na daniu pruhovaném.

Tab. č. 8. Mortalita během základního testu č. 1 na daniu pruhovaném provedeném dne 25. - 29. 6. 2012.

Tab. č. 9. Podmínky základního testu č. 2 provedeného dne 25. - 29. 6. 2012 s přídatkem 1ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Tab. č. 10. Mortalita během základního testu č. 2 provedeném dne 25. - 29. 6. 2012 s přídatkem 1ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Tab. č. 11. Podmínky základního testu č. 3 provedeného dne 25. - 29. 6. 2012 s přídatkem 2ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Tab. č. 12. Mortalita během základního testu č. 3 provedeném dne 25. - 29. 6. 2012 s přídatkem 2ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Tab. č. 13. Podmínky základního testu č. 1 provedeného dne 23. - 27. 7. 2012 na daniu pruhovaném.

Tab. č. 14. Mortalita během základního testu č. 1 provedeném dne 23. - 27. 7. 2012 na daniu pruhovaném.

Tab. č. 15. Podmínky základního testu č. 2 provedeného dne 23. - 27. 7. 2012 s přídatkem 1ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Tab. č. 16. Mortalita během základního testu č. 2 provedeném dne 23. - 27. 7. 2012 a přidavkem 1ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Tab. č. 17. Podmínky základního testu č. 3 provedeného dne 23. - 27. 7. 2012 s přidavkem 2ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Tab. č. 18. Mortalita během základního testu č. 3 provedeném dne 23. - 27. 7. 2012 s přidavkem 2ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Tab. č. 19. Podmínky základního testu č. 4 provedeného dne 17. - 21. 12. 2012 na živorodce duhové.

Tab. č. 20. Mortalita během základního testu č. 4 provedeném dne 17. - 21. 12. 2012 na živorodce duhové.

Tab. č. 21 Podmínky základního testu č. 5 provedeného dne 17. - 21. 12. 2012 s přidavkem 1ml hum. látky na 2l lázně na živorodce duhové.

Tab. č. 22 Mortalita během základního testu č. 5 provedeném dne 17. - 21. 12. 2012 s přidavkem 1ml hum. látky na 2l lázně na živorodce duhové.

Tab. č. 23 Podmínky základního testu č. 6 provedeného dne 21. - 25. 1. 2013 s přidavkem 1 ml hum. látky na 2l lázně na živorodce duhové.

Tab. č. 24. Mortalita během základního testu č. 6 provedeném dne 21. - 25. 1. 2013 s přidavkem 1ml hum. látky na 2l lázně na živorodce duhové.

Tab. č. 25. Spektrofotometrické stanovení  $\text{NaNO}_2$  v základním testu č. 1 na daniu pruhovaném ze dne 28. 6. 2012, 48 hodin po přelovení, test bez přidavku huminových látek.

Tab. č. 26. Spektrofotometrické stanovení  $\text{NaNO}_2$  v základním testu č. 2 na daniu pruhovaném ze dne 28. 6. 2012, 48 hodin po přelovení, test s přidavkem 1 ml hum. látky na 2l lázně.

Tab. č. 27. Spektrofotometrické stanovení  $\text{NaNO}_2$  v základním testu č. 2 na daniu pruhovaném ze dne 28. 6. 2012, 48 hodin po přelovení, test s přidavkem 2 ml hum. látky na 2l lázně.

Tab. č. 28. Spektrofotometrické stanovení  $\text{NaNO}_2$  v základním testu č. 4 na živorodce duhové ze dne 19. 12. 2012, 48 hodin po nasazení, test bez přidavku hum. látky.

Tab. č. 29. Spektrofotometrické stanovení  $\text{NaNO}_2$  v základním testu č. 5 na živorodce duhové ze dne 19. 12. 2012, 48 hodin po nasazení, test s přidavkem 1ml hum. látky na 2l lázně.

Tab. č. 30. Spektrofotometrické stanovení  $\text{NaNO}_2$  v základním testu č. 4 na živorodce duhové ze dne 19. 12. 2012 po nasazení, test bez přidavku hum. látky.



Tab. č. 31. Spektrofotometrické stanovení  $\text{NaNO}_2$  v základním testu č. 5 na živorodce duhové ze dne 19. 12. 2012 po nasazení, test s přídatkem 1ml hum. látky na 2l lázně.

Seznam obrázků:

Obr. č. 1 Danio pruhované (*Danio rerio*) (foto J. Máchová)

Obr. č. 2. Stanovení dusitanů v průběhu testů (foto J. Máchová)

Obr. č. 3. Vyhodnocení základního testu č. 1 provedeného dne 25. - 29. 6. 2012 na daniu pruhovaném.

Obr. č. 4. Vyhodnocení základního testu č. 2 provedeného dne 25. - 29. 6. 2012 s přídatkem 1ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Obr. č. 5. Vyhodnocení základního testu č. 3 provedeného dne 25. - 29. 6. 2012 s přídatkem 2ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Obr. č. 6. Vyhodnocení základního testu č. 1 provedeného dne 23. - 27. 7. 2012 na daniu pruhovaném.

Obr. č. 7. Vyhodnocení základního testu č. 2 provedeného dne 23. - 27. 7. 2012 s přídatkem 1ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Obr. č. 8. Vyhodnocení základního testu č. 3 provedeného dne 23. - 27. 7. 2012 s přídatkem 2ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Obr. č. 9. Vyhodnocení základního testu č. 4 provedeného dne 17. - 21. 12. 2012 na živorodce duhové.

Obr. č. 10. Vyhodnocení základního testu č. 5 provedeného dne 17. - 21. 12. 2012 s přídatkem 1ml hum. látky na 2l lázně na živorodce duhové.

Obr. č. 11. Vyhodnocení základního testu č. 6 provedeného dne 21. - 25. 1. 2013 s přídatkem 2 ml hum. látky na 2l lázně na živorodce duhové.

Tab. č. 1. Podmínky předběžného testu č. 1 provedeného dne 18. - 22. 6. 2012 na daniu pruhovaném.

Číslo nádrže	Konc.	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	23,6	24,0	24,2	23,1	23,4	76,5	63,0	63,7	76,4	73,0	69,0	7,7	8,04	8,16	8,4	8,26	8,29
2	50	23,1	23,5	23,9	24,2	23,1	23,5	73,5	62,0	64,9	73,6	73,0	70,5	7,69	8,02	8,14	8,36	8,28	8,28
3	100	23,1	23,6	23,8	24,2	23,0	23,5	74,2	65,0	67,3	77,1	74,0	70,0	7,69	8,07	8,18	8,38	8,3	8,30
4	250	23,1	23,6	23,8	24,3	23,0	23,6	72,6	63,0	65,2	82,0	76,0	72,0	7,7	8,06	8,17	8,44	8,36	8,36
5	500	23,2	23,5	23,8	24,3	23,1	23,6	72,4	67,0	59,9	82,0	75,0	67,0	7,69	8,0	8,10	8,43	8,3	8,30
6	800	23,3	23,5	23,8	24,4	23,4	23,6	75,6	68,0	61,5	86,0	76,0	58,8	7,68	8,06	8,15	8,45	8,27	8,27
K	-	23,0	23,5	23,8	24,3	23,3	23,4	76,6	61,0	60,4	76,0	68,0	71,0	7,68	8,01	8,14	8,40	8,31	8,31

Tab. č. 2. Mortalita během předběžného testu č. 1 na daniu pruhovaném, provedeném dne 18. - 22. 2012 (nasazeny 3 kusy).

Číslo nádrže	Koncentrace (mg.l <sup>-1</sup> )	Mortalita ryb (ks)- datum				
		19.6	20.6	21.6	22.6	Σ
1	10	0	0	0	0	0
2	50	0	0	0	0	0
3	100	0	0	0	0	0
4	250	0	1	0	1	2
5	500	0	1	0	0	1
6	800	0	1	0	2	3
K	-	0	0	0	1	1

Tab. č. 3. Podmínky předběžného testu č. 2 s přidavkem 0,25ml hum. látky na 0,5l lázně provedeného dne 18. - 22. 6. 2012 na daniu pruhovaném.

Číslo nádrže	Konc.	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	23,5	24,2	24,3	23,0	23,4	76,9	64,0	65,0	86,0	75,0	72,6	7,73	8,04	8,20	8,46	8,35	8,30
2	50	23,3	23,5	24,2	24,2	23,0	23,5	76,4	67,0	66,0	85,6	74,0	74,0	7,70	8,09	8,20	8,47	8,34	8,32
3	100	23,3	23,5	24,2	24,0	23,0	23,5	73,6	70,0	65,2	85,6	74,0	73,0	7,71	8,08	8,17	8,47	8,30	8,28
4	250	23,3	23,6	24,2	23,9	23,3	23,6	77,6	55,0	66,0	88,0	79,0	81,0	7,74	8,02	8,21	8,49	8,40	8,43
5	500	23,2	23,4	24,2	23,9	23,2	23,6	70,4	71,0	56,0	87,0	74,0	80,0	7,72	7,98	8,09	8,46	8,29	8,43
6	800	23,2	23,5	24,2	23,9	23,2	23,6	77,7	72,0	46,0	92,5	90,0	86,0	7,72	8,10	7,99	8,50	8,58	8,54
K	-	23,4	23,5	24,4	24,6	23,0	23,4	75,5	61,0	57,2	82,0	68,0	62,0	7,67	8,02	8,08	8,43	8,24	8,18

Tab. č. 4. Mortalita během předběžného testu č. 2 na daniu pruhovaném, s přidavkem 0,25 ml hum. látky na 0,5l lázně provedeném dne 18. - 22. 6. 2012 (nasazeny 3 kusy).

Číslo nádrže	Koncentrace (mg.l <sup>-1</sup> )	Mortalita ryb (ks)- datum				
		19.6	20.6	21.6	22.6	Σ
1	10	0	0	0	0	0
2	50	0	0	0	0	0
3	100	0	0	0	0	0
4	250	1	0	1	0	2
5	500	0	0	2	0	2
6	800	0	2	0	0	2
K	-	0	0	0	0	0

Tab. č. 5. Koncentrace dusitanu sodného v základním testu na daniu pruhovaném.

	Číslo nádrže	1	2	3	4	5	6	7	K
Test č. 1	cNaNO <sub>2</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	50	100	250	500	750	1000	-	-
Test č. 2	cNaNO <sub>2</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )+ 1 ml hum. l.	50	100	250	500	750	1000	1300	-
Test č. 3	cNaNO <sub>2</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )+ 2 ml hum. l.	50	100	250	500	750	1000	1300	-

Tab. č. 6. Koncentrace dusitanu sodného v základním testu na živorodce duhové.

	Číslo nádrže	1	2	3	4	5	6	7	8	K
Test č. 4	cNaNO <sub>2</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	5	10	20	30	50	75	100	-	-
Test č. 5	cNaNO <sub>2</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )+ 1 ml hum. l.	5	10	20	30	50	75	100	150	-
Test č. 6	cNaNO <sub>2</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )+ 2 ml hum. l.	5	7	10	15	20	30	50	75	-

Tab. č. 7. Podmínky základního testu č. 1 provedeného dne 25. - 29. 6. 2012 na daniu pruhovaném.

Číslo nádrže	Konc.	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	50	-	21,7	22,0	21,5	23,1	24,4	-	89,0	93,8	96,0	91,0	94,0	-	8,56	8,49	8,31	8,54	8,44
2	100	-	21,8	22,0	21,5	23,1	24,4	-	90,0	93,2	96,0	91,0	94,0	-	8,52	8,43	8,27	8,55	8,44
3	250	-	21,7	22,0	21,5	23,1	24,5	-	92,0	94,7	97,0	92,0	91,0	-	8,57	8,42	8,35	8,57	8,23
4	500	-	21,7	22,2	21,5	23,1	24,5	-	93,0	95,4	97,0	93,0	96,0	-	8,62	8,44	8,41	8,58	8,49
5	750	-	21,6	22,3	21,4	22,8	24,3	-	94,0	95,5	97,0	93,0	94,0	-	8,63	8,43	8,50	8,61	8,49
6	1000	-	21,6	22,2	21,2	22,4	24,1	-	93,0	96,4	97,0	94,0	96,0	-	8,63	8,48	8,56	8,61	8,51
K	-	22,3	21,8	21,8	21,4	22,6	22,4	-	88,5	96,0	96,0	89,0	95,0	8,36	8,12	8,52	8,42	8,42	8,46

Tab. č. 8. Mortalita během základního testu č. 1 na daniu pruhovaném provedeném dne 25. - 29. 6. 2012.

Číslo nádrže	Koncentrace (mg.l <sup>-1</sup> )	Mortalita ryb (ks)- datum				
		24h	48h	72h	96 h	Σ
1	50	0	0	0	0	0
2	100	0	0	0	0	0
3	250	0	3	0	6	9
4	500	1	2	0	5	8
5	750	3	4	0	3	10
6	1000	0	1	9	1	10
K	-					

Tab. č. 9. Podmínky základního testu č. 2 provedeného dne 25. - 29. 6. 2012 s přidavkem 1ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Číslo nádrže	Konc.	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	50	-	22,0	21,9	21,3	23,3	24,6	-	92,0	95,0	97,0	92,0	95,0	-	8,60	8,50	8,42	8,58	8,50
2	100	-	22,1	22,2	21,3	23,5	24,7	-	92,0	94,0	96,0	91,0	94,0	-	8,54	8,49	8,21	8,53	8,45
3	250	-	21,8	21,9	21,4	23,3	24,4	-	95,0	96,0	97,0	92,0	96,0	-	8,63	8,47	8,44	8,57	8,49
4	500	-	21,9	22,2	21,4	23,2	24,5	-	94,0	94,0	97,0	92,0	94,0	-	8,61	8,44	8,32	8,55	8,39
5	750	-	21,6	21,8	21,2	22,8	24,3	-	96,0	97,0	97,0	93,0	95,0	-	8,63	8,47	8,47	8,57	8,48
6	1000	-	21,8	21,9	21,4	23,0	24,4	-	95,0	96,0	97,0	92,0	96,0	-	8,63	8,47	8,38	8,54	8,48
7	1300	-	21,9	22,4	21,4	23,3	24,5	-	93,0	95,0	97,0	92,0	94,0	-	8,57	8,46	8,19	8,55	8,44
K	-	22,3	21,2	21,2	21,0	22,7	24,1	-	94,0	96,0	97,0	93,0	96,0	8,32	8,67	8,47	8,52	8,60	8,52

Tab. č. 10. Mortalita během základního testu č. 2 provedeném dne 25. - 29. 6. 2012 s přidavkem 1ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Číslo nádrže	Koncentrace (mg.l <sup>-1</sup> )	Mortalita ryb (ks)- datum				
		24h	48h	72h	96 h	Σ
1	50	0	0	0	0	0
2	100	0	0	0	0	0
3	250	0	0	2	0	2
4	500	2	0	1	4	7
5	750	1	0	7	2	10
6	1000	4	0	3	3	10
7	1300	4	3	2	0	9
K	-	0	0	0	0	0

Tab. č. 11. Podmínky základního testu č. 3 provedeného dne 25. - 29. 6. 2012 s přidavkem 2ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Číslo nádrže	Konc.	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	50	-	20	20,2	22	21	22	88,0	94,0	94,0	89,0	97,0	97,0	8,44	8,56	8,60	8,50	8,46	8,62
2	100	-	20	20,3	22	21	22	88,0	93,0	92,0	88,0	96,0	97,0	8,27	8,55	8,52	8,60	8,48	8,61
3	250	-	20	20,2	22	21	22	87,0	93,0	92,0	88,0	96,0	96,0	8,35	8,55	8,49	8,55	8,41	8,53
4	500	-	20	20,4	22	21	22	88,0	95,0	95,0	88,0	97,0	98,0	8,18	8,56	8,61	8,45	8,44	8,54
5	750	-	20	20,2	22	21	22	88,0	95,0	94,0	88,0	96,0	98,0	8,06	8,55	8,59	8,54	8,41	8,59
6	1000	-	20	20,2	22	21	22	88,0	95,0	95,0	89,0	97,0	-	8,31	8,54	8,58	8,57	8,45	-
7	1300	-	20	20,2	22	21	22	89,0	95,0	94,0	89,0	97,0	-	8,41	8,54	8,57	8,56	8,46	-
K	-	21,5	20	20,2	22	21	22	88,0	94,0	94,0	89,0	97,0	97,0	8,44	8,54	8,61	8,50	8,48	8,64

Tab. č. 12. Mortalita během základního testu č. 3 provedeném dne 25. - 29. 6. 2012 s přidavkem 2ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Číslo nádrže	Koncentrace (mg.l <sup>-1</sup> )	Mortalita ryb (ks)				
		24h	48h	72h	96 h	Σ
1	50	0	0	0	0	0
2	100	0	0	0	0	0
3	250	0	1	0	0	1
4	500	6	0	0	1	8
5	750	4	2	0	4	10
6	1000	6	2	2	-	10
7	1300	8	0	2	0	10
K	-	0	0	0	0	0

Tab. č. 13. Podmínky základního testu č. 1 provedeného dne 23. - 27. 7. 2012 na daniu pruhovaném.

Číslo nádrže	Konc.	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	50	18,8	-	21,8	21,4	21,1	22,5	133	-	84,0	91,0	95,0	92,0	8,08	-	8,23	7,82	8,52	8,53
2	100	18,8	-	21,7	21,4	21,1	22,5	133	-	93,0	95,0	95,0	93,0	8,31	-	8,41	8,18	8,56	8,59
3	250	18,8	-	21,8	21,4	20,8	22,3	133	-	74,0	96,0	95,0	94,0	8,29	-	8,13	8,35	8,57	8,59
4	500	18,7	-	21,8	21,4	20,9	22,4	133	-	95,0	97,0	95,0	94,0	8,35	-	8,46	8,28	8,59	8,61
5	750	18,7	-	21,7	21,8	21,0	22,5	133	-	93,0	96,0	95,0	94,0	8,30	-	8,42	8,06	8,58	8,61
6	1000	18,5	-	21,5	-	-	-	133	-	96,0	-	-	-	-	-	8,48	-	-	-
K	-	18,9	-	21,8	21,5	20,7	22,3	134	-	96,0	93,0	96,0	94,0	8,35	-	8,44	8,07	8,53	8,55

Tab. č. 14. Mortalita během základního testu č. 1 provedeném dne 23. - 27. 7. 2012 na daniu pruhovaném.

Číslo nádrže	Koncentrace (mg.l <sup>-1</sup> )	Mortalita ryb (ks)- datum				
		24h	48h	72h	96 h	Σ
1	50	0	0	0	0	0
2	100	0	1	0	0	0
3	250	1	1	1	4	7
4	500	7	1	0	1	9
5	750	7	2	0	0	9
6	1000	7	3	0	0	10
K	-	0	0	0	0	0



Tab. č. 15. Podmínky základního testu č. 2 provedeného dne 23. - 27. 7. 2012 s přidavkem 1ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Číslo nádrže	Konc.	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	50	19,0	-	21,5	21,6	21,0	22,2	132,0	-	96,0	96,0	90,0	91,0	8,27	-	8,39	8,10	8,44	8,49
2	100	18,9	-	21,5	21,5	21,1	22,3	132,0	-	93,0	92,0	90,0	90,0	8,20	-	8,30	7,99	8,41	8,45
3	250	18,9	-	21,5	21,5	21,0	22,3	133,0	-	94,0	93,0	90,0	90,0	8,39	-	8,32	8,03	8,39	8,42
4	500	18,8	-	21,4	21,6	21,0	22,3	133,0	-	95,0	96,0	90,0	92,0	8,31	-	8,31	7,95	8,45	8,49
5	750	18,9	-	21,4	21,5	20,9	22,3	132,0	-	97,0	97,0	94,0	93,0	8,37	-	8,36	8,16	8,51	8,54
6	1000	18,9	-	21,5	21,5	20,8	22,1	132,0	-	98,0	98,0	95,0	94,0	8,29	-	8,43	8,02	8,52	8,56
7	1300	18,9	-	21,6	21,1	-	-	131,0	-	98,0	99,0	-	-	8,26	-	8,43	8,02	-	-
K	-	19,0	-	21,6	21,7	21,1	22,2	132,0	-	95,0	94,0	92,0	91,0	8,30	-	8,39	8,18	8,47	8,53

Tab. č. 16. Mortalita během základního testu č. 2 provedeném dne 23. - 27. 7. 2012 a přidavkem 1ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Číslo nádrže	Koncentrace (mg.l <sup>-1</sup> )	Mortalita ryb (ks)- datum				
		24h	48h	72h	96 h	Σ
1	50	0	0	0	0	0
2	100	0	0	0	0	0
3	250	0	0	1	0	1
4	500	2	0	0	0	2
5	750	4	2	0	1	7
6	1000	6	2	1	0	9
7	1300	7	3	-	-	10
K	-	0	0	0	0	0

Tab. č. 17. Podmínky základního testu č. 3 provedeného dne 23. - 27. 7. 2012 s přidavkem 2ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Číslo nádrže	Konc.	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	50	18,6	-	21,0	21,1	21,0	22,5	132,0	-	97,0	98,0	95,0	94,0	8,36	-	8,44	8,35	8,57	8,59
2	100	19,0	-	21,0	21,1	21,0	22,6	131,0	-	98,0	97,0	94,0	94,0	8,31	-	8,46	8,33	8,57	8,60
3	250	19,1	-	21,6	21,0	20,9	22,5	131,0	-	97,0	97,0	95,0	94,0	8,35	-	8,46	8,35	8,57	8,60
4	500	19,0	-	21,6	21,0	20,8	22,6	131,0	-	97,0	97,0	95,0	94,0	8,32	-	8,44	8,33	8,57	8,58
5	750	19,1	-	21,7	21,1	21,1	23,0	131,0	-	97,0	97,0	95,0	95,0	8,30	-	8,39	8,29	8,57	8,59
6	1000	18,9	-	21,3	-	-	-	132,0	-	99,0	-	-	-	8,39	-	8,40	-	-	-
7	1300	19,2	-	21,8	21,1	20,7	22,4	124,0	-	99,0	97,0	95,0	95,0	8,24	-	8,43	8,38	8,52	8,53
K	-	19,2	-	21,6	21,1	21,0	22,7	132,0	-	97,0	98,0	95,0	94,0	8,31	-	8,44	8,35	8,58	8,60

Tab. č. 18. Mortalita během základního testu č. 3 provedeném dne 23. - 27. 7. 2012 s přidavkem 2ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

Číslo nádrže	Koncentrace (mg.l <sup>-1</sup> )	Mortalita ryb (ks)- datum				
		24h	48h	72h	96 h	Σ
1	50	0	0	0	0	0
2	100	0	0	0	1	0
3	250	1	2	0	0	3
4	500	1	5	0	3	9
5	750	1	3	2	2	8
6	1000	5	5	-	-	10
7	1300	7	1	1	1	10
K	-	0	0	0	0	0

Tab. č. 19. Podmínky základního testu č. 4 provedeného dne 17. - 21. 12. 2012 na živoroďce duhové.

Číslo nádrže	Konc.	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	5	19,7	22,2	21,1	20,3	20,3	26,4	77,0	60,6	60,9	80,7	76,0	66,0	7,84	8,11	8,14	8,23	8,20	8,27
2	10	19,5	22,2	21,0	20,3	20,5	26,1	76,7	62,0	63,1	79,8	77,0	68,3	7,85	8,11	8,16	8,12	8,10	8,29
3	20	19,4	22,2	21,0	20,4	20,4	25,6	77,6	63,9	62,5	79,8	72,0	73,4	7,93	8,13	8,15	8,14	8,12	8,34
4	30	19,5	22,2	21,1	20,4	-	-	76,2	65,9	66,0	81,2	-	-	7,84	8,10	8,20	8,17	-	-
5	50	19,5	-	-	-	-	-	79,0	-	-	-	-	-	8,02	-	-	-	-	-
6	75	19,6	-	-	-	-	-	78,4	-	-	-	-	-	7,94	-	-	-	-	-
7	100	19,8	-	-	-	-	-	78,1	-	-	-	-	-	7,89	-	-	-	-	-
K	-	19,9	21,9	20,9	20,3	20,5	26,4	77,2	62,0	61,0	80,5	70,0	67,8	7,91	8,06	8,09	8,06	8,10	8,25

Tab. č. 20. Mortalita během základního testu č. 4 provedeném dne 17. - 21. 12. 2012 na živoroďce duhové.

Číslo nádrže	Koncentrace (mg.l <sup>-1</sup> )	Mortalita ryb (ks)- datum				
		24h	48h	72h	96 h	Σ
1	5	0	0	0	0	0
2	10	0	0	0	0	0
3	20	0	2	7	1	10
4	30	4	4	2	-	10
5	50	10	-	-	-	-
6	75	10	-	-	-	-
7	100	10	-	-	-	-
K	-	0	0	0	1	1

Tab. č. 21 Podmínky základního testu č. 5 provedeného dne 17. - 21. 12. 2012 s přidavkem 1ml hum. látky na 2l lázně na živorodce duhové.

Číslo nádrže	Konc.	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	5	19,4	21,1	21,0	20,4	20,3	25,2	77,6	65,2	61,9	79,6	75,0	62,6	7,84	8,10	8,11	8,19	8,12	8,21
2	10	19,3	21,1	21,0	20,4	20,2	24,8	77,3	64	63,5	79,6	72,0	74,0	7,85	8,09	8,14	8,07	8,20	8,34
3	20	19,3	21,2	21,0	20,4	20,2	-	77,5	66,0	63,0	79,9	73,0	-	7,92	8,14	8,13	8,10	8,10	-
4	30	19,4	21,2	21,1	20,5	20,2	24,5	76,5	67,0	71,5	82,1	76,0	78,7	7,81	8,12	8,23	8,16	8,20	8,43
5	50	19,4	-	-	-	-	-	78,6	-	-	-	-	-	8,00	-	-	-	-	-
6	75	19,5	-	-	-	-	-	78,1	-	-	-	-	-	7,93	-	-	-	-	-
7	100	18,9	-	-	-	-	-	68,0	-	-	-	-	-	7,62	-	-	-	-	-
8	150	19,8	-	-	-	-	-	75,7	-	-	-	-	-	7,73	-	-	-	-	-
K	-	19,6	20,9	21,0	20,3	20,2	25,8	78,5	65,0	65,5	78,8	75,0	67,6	7,90	8,12	8,15	8,11	8,15	8,34

Tab. č. 22 Mortalita během základního testu č. 5 provedeném dne 17. - 21. 12. 2012 s přidavkem 1ml hum. látky na 2l lázně na živorodce duhové.

Číslo nádrže	Koncentrace (mg.l <sup>-1</sup> )	Mortalita ryb (ks)- datum				
		24h	48h	72h	96 h	Σ
1	5	0	0	0	0	0
2	10	0	0	7	0	7
3	20	0	6	4	-	10
4	30	9	0	0	0	9
5	50	10	-	-	-	10
6	75	10	-	-	-	10
7	100	10	-	-	-	10
8	150	10	-	-	-	10
K	-	0	0	0	0	0

Tab. č. 23 Podmínky základního testu č. 6 provedeného dne 21. - 25. 1. 2013 s přidavkem 1 ml hum. látky na 2l lázně na živorodce duhové.

Číslo nádrže	Konc.	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	5	20,0	19,0	20,0	20,0	20,0	20,0	65,0	82,0	81,0	90,0	83,0	80,0	8,30	8,33	8,33	8,32	8,33	8,30
2	7	-	-	-	-	-	-	65,0	81,0	80,0	90,0	82,0	80,0	8,30	8,31	8,31	8,20	8,30	8,29
3	10	-	-	-	-	-	-	65,0	82,0	81,0	91,0	82,0	79,0	8,30	8,29	8,31	8,17	8,28	8,27
4	15	20,0	-	-	-	-	-	65,0	84,0	82,0	90,0	83,0	80,0	8,30	8,30	8,33	8,25	8,32	8,30
5	20	-	-	-	-	-	-	65,0	85,0	85,0	91,0	-	-	8,29	8,30	8,35	8,26	-	-
6	30	-	-	-	-	-	-	65,0	86,0	86,0	91,0	-	-	8,28	8,32	8,36	8,27	-	-
7	50	-	-	-	-	-	-	65,0	88,0	86,0	92,0	-	-	8,34	8,35	8,37	8,26	-	-
8	75	-	-	-	-	-	-	65,0	90,0	-	-	-	-	8,31	8,35	-	-	-	-
K	-	20,0	19,0	-	-	-	-	64,0	78,0	82,0	90,0	83,0	79,0	8,26	8,38	8,34	8,32	8,33	8,33

Tab. č. 24. Mortalita během základního testu č. 6 provedeném dne 21. - 25. 1. 2013 s přidavkem 1ml hum. látky na 2l lázně na živorodce duhové.

Číslo nádrže	Koncentrace (mg.l <sup>-1</sup> )	Mortalita ryb (ks)- datum				
		24h	48h	72h	96 h	Σ
1	5	0	0	0	0	0
2	7	0	0	0	0	0
3	10	0	0	0	1	1
4	15	0	0	1	0	1
5	20	4	6	-	-	10
6	30	8	2	-	-	10
7	50	8	2	-	-	10
8	75	10	-	-	-	10
K	-	0	0	0	0	0

Tab. č. 25. Spektrofotometrické stanovení NaNO<sub>2</sub> v základním testu č. 1 na daniu pruhovaném ze dne 28. 6. 2012, 48 hodin po přelovení, test bez přídatku hum. látky.

Číslo vzorku	1	2	3	4	5	6	K
Nominální koncentrace NaNO <sub>2</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	50	100	250	500	750	1000	-
Nominální koncentrace NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	33,3	66,6	166,6	333,3	500	666,6	-
Absorbance vzorku	0,285	0,121	0,274	0,123	0,173	0,233	0,015
Ředění	100x	500x	500x	2500x	2500x	2500x	0x
Naměřená koncentrace NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	32,5	67,1	156,2	341,4	487,1	661,9	0,01

Tab. č. 26. Spektrofotometrické stanovení NaNO<sub>2</sub> v základním testu č. 2 na daniu pruhovaném ze dne 28. 6. 2012, 48 hodin po přelovení, test s přídatkem 1 ml hum. látky na 2l lázně.

Číslo vzorku	1	2	3	4	5	6	7	K
Nominální koncentrace NaNO <sub>2</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	50	100	250	500	750	1000	1300	-
Nominální koncentrace NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	33,3	66,6	166,6	333,3	500	666,6	866,6	-
Absorbance vzorku	0,295	0,126	0,289	0,138	0,181	0,240	0,317	0,115
ředění	100x	500x	500x	2500x	2500x	2500x	2500x	0x
Naměřená koncentrace NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	33,7	70,0	165,0	385,0	510,4	682,3	906,6	0,12

Tab. č. 27. Spektrofotometrické stanovení NaNO<sub>2</sub> v základním testu č. 2 na daniu pruhovaném ze dne 28. 6. 2012, 48 hodin po přelovení, test s přidavkem 2 ml hum. látky na 2l lázně.

Číslo vzorku	1	2	3	4	5	6	7	K
Nominální koncentrace NaNO <sub>2</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	50	100	250	500	750	1000	1300	-
Nominální koncentrace NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	33,3	66,6	166,6	333,3	500	666,6	866,6	-
Absorbance vzorku	0,296	0,125	0,298	0,113	0,181	0,229	0,317	0,076
ředění	100x	500x	500x	2500x	2500x	2500x	2500x	0x
Naměřená koncentrace NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	33,8	69,4	170,2	312,3	510,4	650,2	906,6	0,08

Tab. č. 28. Spektrofotometrické stanovení NaNO<sub>2</sub> v základním testu č. 4 na živorodce duhové ze dne 19. 12. 2012, 48 hodin po nasazení, test bez přidavku hum. látky.

Číslo vzorku	1	2	3	4	K
Nominální koncentrace NaNO <sub>2</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	5	10	20	30	-
Nominální koncentrace NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	3,33	6,66	13,33	20	-
Absorbance vzorku	0,296	0,291	0,236	0,182	0,01
ředění	10x	20x	50x	100x	-
Naměřená koncentrace NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	3,38	6,64	13,4	20,5	0,1

Tab. č. 29. Spektrofotometrické stanovení NaNO<sub>2</sub> v základním testu č. 5 na živorodce duhové ze dne 19. 12. 2012, 48 hodin po nasazení, test s přidavkem 1ml hum. látky na 2l lázně.

Číslo vzorku	1	2	3	4	K
Nominální koncentrace NaNO <sub>2</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	5	10	20	30	-
Nominální koncentrace NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	3,33	6,66	13,33	20	-
Absorbance vzorku	0,259	0,285	0,232	0,187	0,005
ředění	10x	20x	50x	100x	-
Naměřená koncentrace NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	2,94	6,50	13,17	21,11	

Tab. č. 30. Spektrofotometrické stanovení NaNO<sub>2</sub> v základním testu č. 4 na živorodce duhové ze dne 19. 12. 2012 po nasazení, test bez přídavku hum. látky.

Číslo vzorku	1	2	3	4	K
Nominální koncentrace NaNO <sub>2</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	5	10	20	30	-
Nominální koncentrace NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	3,33	6,66	13,33	20	-
Absorbance vzorku	0,272	0,276	0,225	1,163	0,003
ředění	10x	20x	50x	100x	-
Naměřená koncentrace NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	3,10	6,29	12,76	18,31	-0,003

Tab. č. 31. Spektrofotometrické stanovení NaNO<sub>2</sub> v základním testu č. 5 na živorodce duhové ze dne 19. 12. 2012 po nasazení, test s přídavkem 1ml hum. látky na 2l lázně.

Číslo vzorku	1	2	3	4	K
Nominální koncentrace NaNO <sub>2</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	5	10	20	30	-
Nominální koncentrace NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	3,33	6,66	13,33	20	-
Absorbance vzorku	0,271	0,271	0,223	0,161	0,002
ředění	10x	20x	50x	100x	-
Naměřená koncentrace NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	3,08	6,17	12,65	18,08	-0,004



Obr. č. 1 Danio pruhované (*Danio rerio*) (foto J. Máchová)



Obr. č. 2. Stanovení dusitanů v průběhu testů (foto J. Máchová)



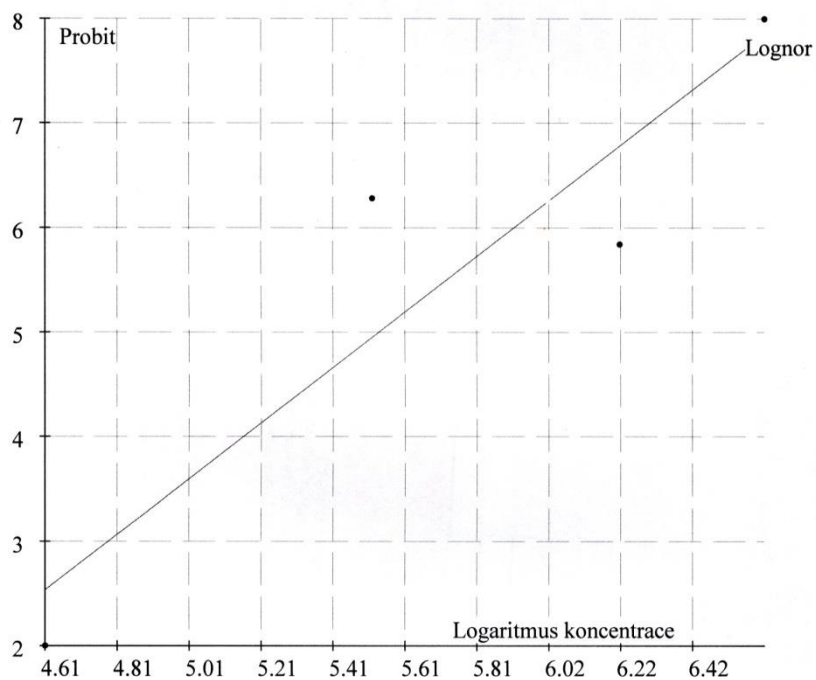
Obr. č. 3. Vyhodnocení základního testu č. 1 provedeného dne 25. - 29. 6. 2012 na daniu pruhovaném.

**Vstupní hodnoty:** **základní test**

Koncentrace mg/l	Mortalita %
100	0.0
250	90.0
500	80.0
750	100.0

**96hLC50 = 254.5 mg/l** s 95% intervalem spolehlivosti (-395.9 , +154.9)

LC0 = 81.6 mg/l  
LC100 = 793.0 mg/l



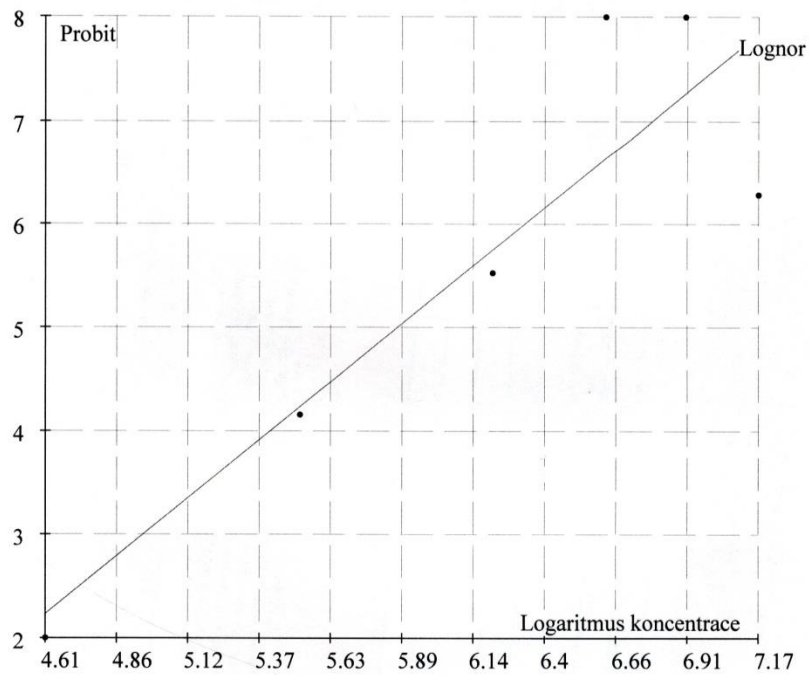
Obr. č. 4. Vyhodnocení základního testu č. 2 provedeného dne 25. - 29. 6. 2012 s  
přídavkem 1ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

**Vstupní hodnoty:** **základní test**

Koncentrace mg/l	Mortalita %
100	0.0
250	20.0
500	70.0
750	100.0
1000	100.0
1300	90.0

**96hLC50 = 354.6 mg/l s 95% intervalem spolehlivosti (-257.0 , +149.0)**

LC0 = 89.9 mg/l  
LC100 > 1000 mg/l



Obr. č. 5. Vyhodnocení základního testu č. 3 provedeného dne 25. - 29. 6. 2012 s přidavkem 2ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhoaném.

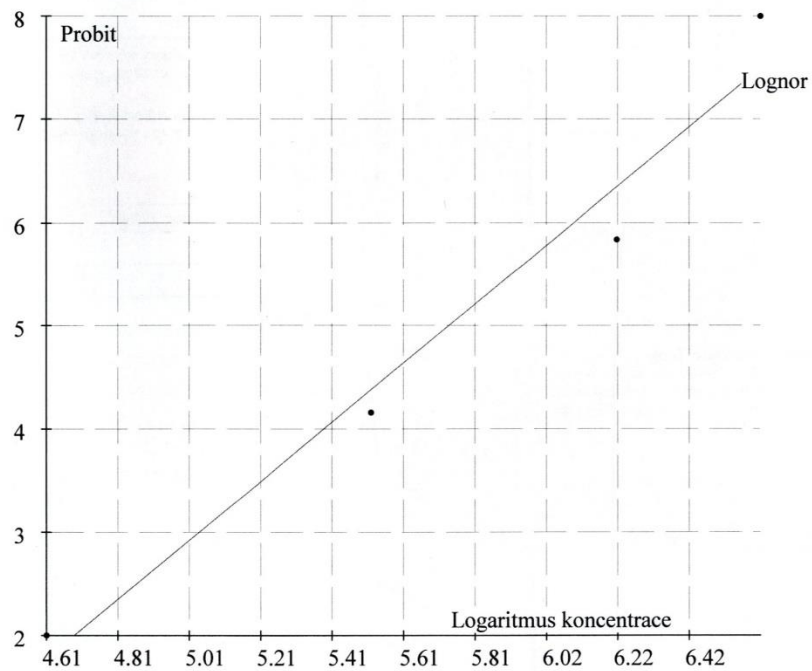
**Vstupní hodnoty:** **základní test**

Koncentrace mg/l	Mortalita %
100	0.0
250	20.0
500	80.0
750	100.0

**96hLC50 = 311.2 mg/l** s 95% intervalem spolehlivosti (-157.9 , +104.8)

LC0 = 108.1 mg/l

LC100 = 895.4 mg/l



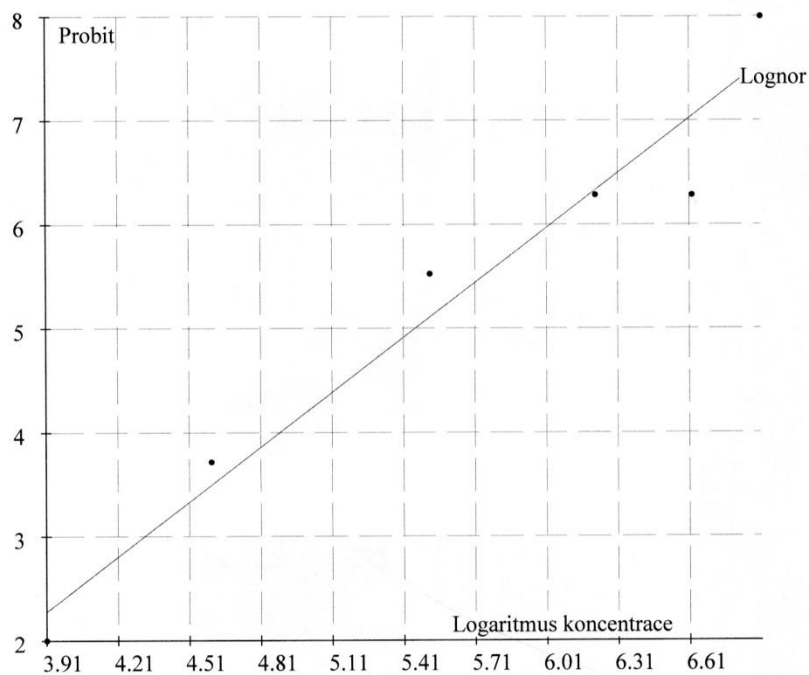
Obr. č. 6. Vyhodnocení základního testu č. 1 provedeného dne 23. - 27. 7. 2012 na daniu pruhovaném.

**Vstupní hodnoty:** **základní test**

Koncentrace mg/l	Mortalita %
50	0.0
100	10.0
250	70.0
500	90.0
750	90.0
1000	100.0

**96hLC50 = 234.9 mg/l s 95% intervalem spolehlivosti (-92.1 , +66.1)**

LC0 = 42.7 mg/l  
LC100 > 1000 mg/l



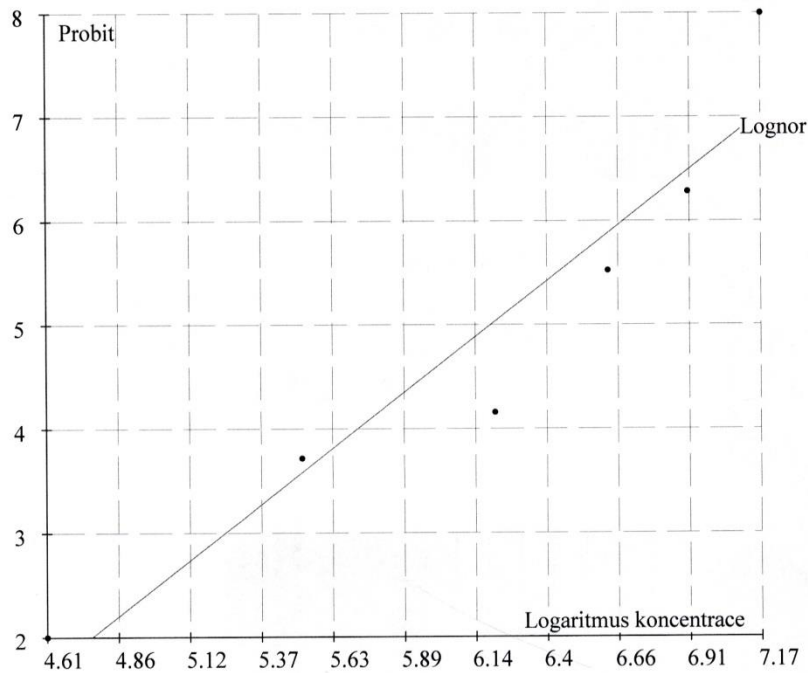
Obr. č. 7. Vyhodnocení základního testu č. 2 provedeného dne 23. - 27. 7. 2012 s  
přídavkem 1ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhoaném.

**Vstupní hodnoty:** **základní test**

Koncentrace mg/l	Mortalita %
100	0.0
250	10.0
500	20.0
750	70.0
1000	90.0
1300	100.0

**96hLC50 = 492.0 mg/l** s 95% intervalem spolehlivosti (-216.9 , +150.5)

LC0 = 117.4 mg/l  
LC100 > 1000 mg/l



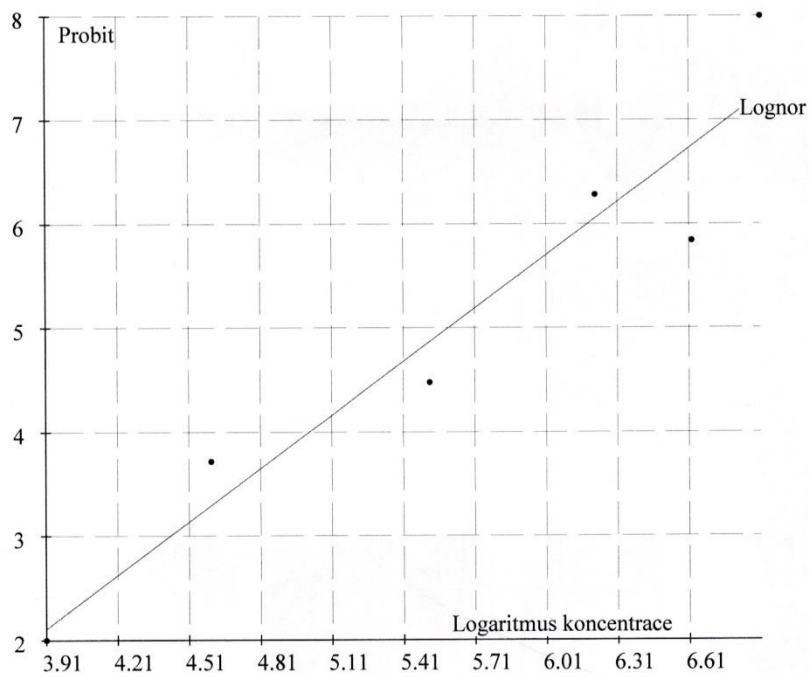
Obr. č. 8. Vyhodnocení základního testu č. 3 provedeného dne 23. - 27. 7. 2012 s  
přídavkem 2ml hum. látky na 2l lázně na daniu pruhovaném.

**Vstupní hodnoty:** **základní test**

Koncentrace mg/l	Mortalita %
50	0.0
100	10.0
250	30.0
500	90.0
750	80.0
1000	100.0

**96hLC50 = 270.2 mg/l** s 95% intervalem spolehlivosti (-142.9 , +93.5)

LC0 = 46.9 mg/l  
LC100 > 1000 mg/l



Obr. č. 9. Vyhodnocení základního testu č. 4 provedeného dne 17. - 21. 12. 2012 na živoroďce duhové.

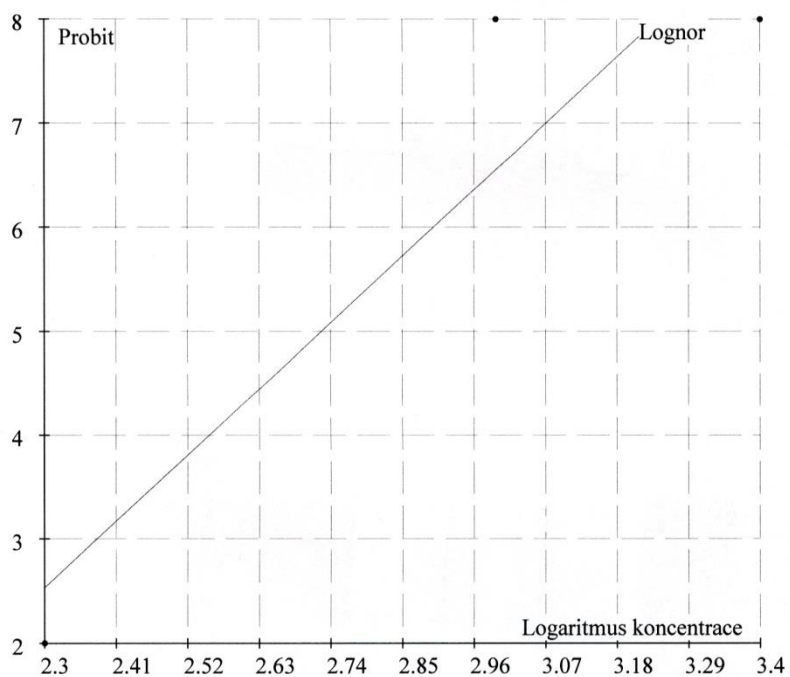
**Vstupní hodnoty:** **základní test**

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

**96hLC50 = 15.3 mg/l** s 95% intervalem spolehlivosti (-127.1 , +13.7)

LC0 = 9.1 mg/l

LC100 = 25.6 mg/l





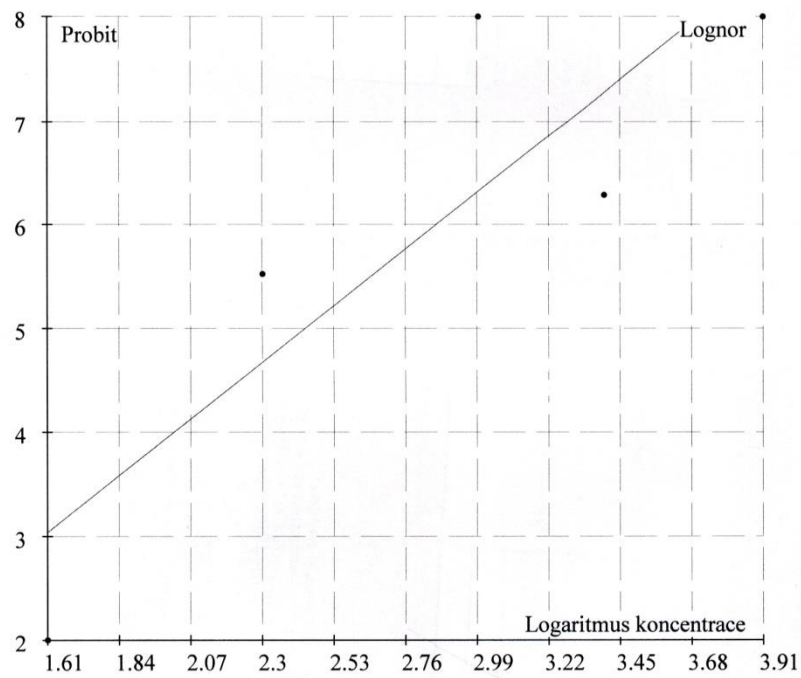
Obr. č. 10. Vyhodnocení základního testu č. 5 provedeného dne 17. - 21. 12. 2012 s  
přídavkem 1ml hum. látky na 2l lázně na živorodce duhové.

**Vstupní hodnoty:** **základní test**

Koncentrace mg/l	Mortalita %
5	0.0
10	70.0
20	100.0
30	90.0
50	100.0

**96hLC50 = 11.5 mg/l s 95% intervalem spolehlivosti (-14.0 , +6.3)**

LC0 = 3.2 mg/l  
LC100 = 40.7 mg/l



Obr. č. 11. Vyhodnocení základního testu č. 6 provedeného dne 21. - 25. 1. 2013 s přidavkem 2 ml hum. látky na 2l lázně na živorodce duhové.

Zkouška: CHEMICKÉ LÁTKY  
 Číslo vzorku: NaNO<sub>2</sub>  
 Označení vzorku:

Datum měření: 25.1.2013  
 Příloha: 1

*humivní látka DUPLA euz  
 (1ml.e<sup>-1</sup>)*

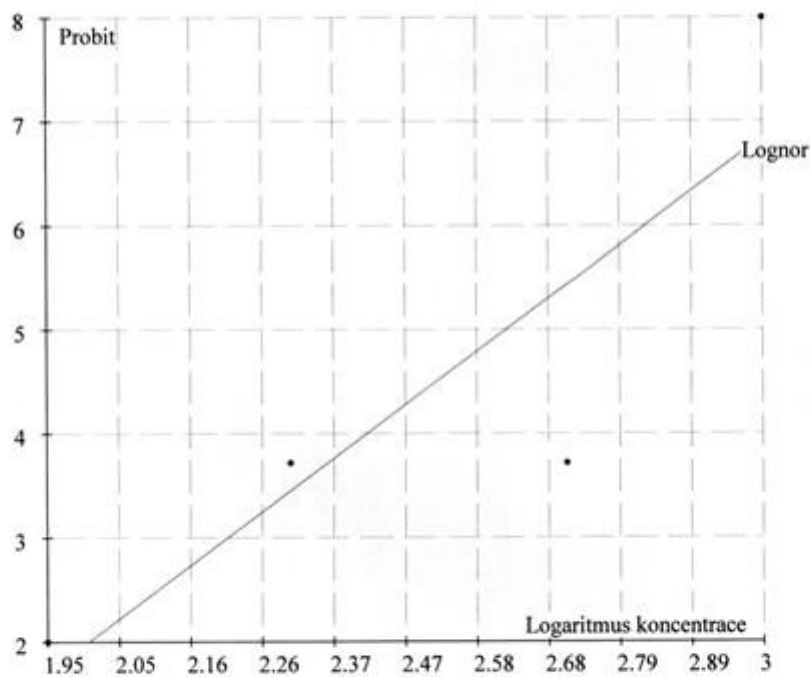
Vstupní hodnoty:

základní test

Koncentrace mg/l	Mortalita %
7	0.0
10	10.0
15	10.0
20	100.0

96hLC50 = 13.7 mg/l s 95% intervalem spolehlivosti (-11.3, +6.2)

LC0 = 7.4 mg/l  
 LC100 = 25.3 mg/l



## 7 Abstrakt

Cílem práce bylo ověřit hypotézu, zda huminové látky snižují toxicitu dusitanů pro ryby. V laboratorních podmínkách byly provedeny testy akutní toxicity na akvarijských rybách daniu pruhovaném (*Danio rerio*) a živorodce duhové (*Poecilia reticulata*). Ryby byly vystavovány dusitanům za přítomnosti či nepřítomnosti huminové látky HS 1500. Dusitany byly dávkovány ve formě  $\text{NaNO}_2$ . Zdrojem huminové látky (HS 1500) byl přípravek značky Dupla Cur (výrobce Dohse Aquaristik KG). Přípravek byl testován ve dvou různých koncentracích:  $0,5 \text{ ml.l}^{-1}$  a  $1 \text{ ml.l}^{-1}$ . Testy toxicity byly prováděny podle normy ČSN EN ISO 7346-2.

Na základě mortality zjištěné v testech akutní toxicity byly vypočítány hodnoty 96hLC50 dusitanu sodného za přítomnosti či nepřítomnosti testovaného přípravku Dupla Cur pro jednotlivé druhy ryb. Testy na daniu pruhovaném prokázaly pozitivní vliv přípravku Dupla Cur v koncentraci  $0,5 \text{ ml.l}^{-1}$  na snižování toxicity dusitanů. Hodnota 96hLC50 byla v tomto případě o 73 % vyšší než hodnota zjištěná bez přidavku testovaného přípravku. V koncentraci  $1 \text{ ml.l}^{-1}$  přípravku však již výrazný pozitivní vliv zjištěn nebyl. V testech na živorodce duhové vliv přípravku Dupla Cur na toxicitu dusitanu sodného pozorován nebyl.

Testovaná huminová látka nepůsobí stejně na všechny druhy ryb. Účinek závisí i na její koncentraci ve vodě.

Klíčová slova: *Danio rerio*, *Poecilia reticulata*, 96hLC50, testy akutní toxicity

## Abstract

The aim of this work was to verify the hypothesis that humic substances reduce toxicity of nitrite to fish. Under laboratory conditions, tests of acute toxicity were performed on aquarium fish: zebrafish (*Danio rerio*) and guppy (*Poecilia reticulata*). Fish were exposed to nitrite in the presence or absence of humic substance HS 1500. Nitrite was dosed as  $\text{NaNO}_2$ . Preparation Dupla Cur (manufacturer Dohse Aquaristik KG) was a source of the humic substance (HS 1500). The preparation was tested in two different concentrations:  $0.5 \text{ ml.l}^{-1}$  and  $1 \text{ ml.l}^{-1}$ . Toxicity tests were performed according to Czech standard ČSN EN ISO 7346-2.

Based on the observed mortality in the acute toxicity tests, 96hLC50 values of sodium nitrite for selected species were calculated in the presence or absence of the tested preparation Dupla Cur. Tests on zebrafish showed a positive effect of Dupla Cur preparation at a concentration of  $0.5 \text{ ml.l}^{-1}$  on decreasing of nitrite toxicity. In this case 96hLC50 value was about 73 % higher than the value found in the test where the preparation was omitted. At a concentration of  $1 \text{ ml.l}^{-1}$  of the preparation a significantly positive effect was not observed. In the tests on guppy, an effect of Dupla Cur preparation on the toxicity of sodium nitrite was not observed.

The tested humic substance does not have the same effect on all fish species. The effect depends on its concentration in the water.

Keywords: *Danio rerio*, *Poecilia reticulata*, 96hLC50, acute toxicity tests