

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta rybářství a ochrany vod

Diplomová práce

2014

Bc. Vojtěch Bulíček

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta rybářství a ochrany vod
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce

**Vliv huminové látky HS 1500 na toleranci
jesetera malého vůči dusitanům**

Autor: Bc. Vojtěch Bulíček

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

Konzultant bakalářské práce: Ing. Hana Kocour Kroupová, Ph.D.

Studijní program: Zootechnika

Studijní obor: Rybářství

Forma studia: prezenční

Ročník: 2

České Budějovice, 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že, v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou 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.

Datum:

V Českých Budějovicích dne 5. 5. 2014

.....

Bc. Vojtěch Bulíček

Poděkování

Dovoluji si tímto poděkovat Ing. Janě Máchové, Ph.D. za vedení mé diplomové práce. Za všechny užitečné rady a čas, které mi v průběhu měření a zpracování této práce věnovala.

Dále bych rád poděkoval Iloně Prokopové za pomoc a zabezpečení technického zázemí pro mou práci.

Rovněž děkuji celému kolektivu laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie VÚRH JU Vodňany za všechnen čas a pomoc, které mi věnovali v průběhu celého měření mé diplomové práce.

V neposlední řadě bych rád poděkoval svým rodičům, kteří mě podporovali celých pět let studia.

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Vojtěch BULÍČEK**
Osobní číslo: **V12N001P**
Studijní program: **N4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Vliv huminové látky HS 1500 na toleranci jesetera malého vůči dusitanům**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

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

Cíl práce: cílem práce je posoudit vliv huminové látky HS 1500 na akutní toxicitu dusitanu sodného pro jesetera malého.

Metodický postup:

V úvodní části práce bude zpracován literární přehled o negativních účincích zvýšených koncentrací dusitanů na ryby a vlivu kvality vody na toleranci ryb vůči dusitanům.

V praktické části budou provedeny testy akutní toxicity s dusitanem sodným na jeseteru malém za použití ředící vody s nízkým obsahem chloridů a těže vody se dvěma koncentracemi huminových látek. Na základě výsledků těchto testů budou vypočteny hodnoty LC50 a bude posouzen vliv přítomnosti huminových látek na toleranci jesetera malého vůči dusitanům. Současně budou provedeny biochemické analýzy krve exponovaných ryb a zhodnocen vliv přítomnosti huminových látek na kumulaci dusitanů v krevní plazmě a na tvorbu methemoglobinu.

Na základě získaných výsledků bude zhodnocen vliv preparátu HS 1500 na odolnost ryb vůči dusitanům a bude diskutována možnost využití tohoto preparátu v intenzivních chovech ryb, kde vysoké koncentrace dusitanů mohou výrazně ohrozit zdravotní stav produkovaných ryb nebo dokonce způsobit jejich velké ztráty.

Rozsah grafických prací: 10 tabulek, 10 grafů, 5 obrázků

Rozsah pracovní zprávy: 50 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

ČSN EN ISO 7346-2, 1996. Jakost vod-Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae*)]. Část 2: Obnovovací metoda. ČNI Praha 16 s.

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

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

Svobodová, Z., Máchová, J., Kroupová, H., 2008. Otravy ryb. In: *Veterinární toxikologie v klinické praxi*, Ed. Svobodová, Z., Profi Press, 201-217.

Meinelt, T., Kroupová, H., Stuber, A., Rennert, m 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. 378-383.

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

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

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

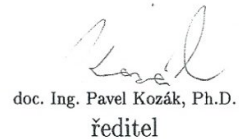
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání diplomové práce: 7. prosince 2012

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2014


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

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


doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 14. února 2013

Obsah

1. ÚVOD.....	3
2. LITERÁLNÍ PŘEHLED.....	4
2.1. Jeseterovité ryby (<i>Acipenseridae</i>).....	4
2.1.1. Charakteristika jeseterovitých ryb.....	4
2.1.2. Jeseter malý (<i>Acipenser ruthenus</i>).....	5
2.2. Sloučeniny dusíku a jeho přeměny.....	6
2.2.2. Původ.....	6
2.2.3. Formy výskytu dusíku.....	7
2.2.4. Nitrifikace.....	7
2.2.5. Denitrifikace.....	9
2.2.6. Dusitany.....	9
2.3. Vliv dusitanů na ryby.....	11
2.3.1. Příjem a mechanismus účinku dusitanů pro ryby.....	11
2.3.2. Toxicita dusitanů pro ryby.....	12
2.4. Testy toxicity na vodních organizmech.....	15
3. Experimentální část.....	17
3.1. Materiál a metodika.....	17
3.1.2. Materiál a pomůcky.....	17
3.1.3. Přehled provedených testů akutní toxicity.....	18
3.1.4. Metodika testů toxicity.....	19
3.1.5. Metodika souvisejících analýz a vyšetření.....	24
3.2. Výsledky.....	34
3.2.1. Platnost testů.....	34
3.2.2. Výsledky zkoušky toxicity přípravku Huminfeed na jeseteru malém a živorodce duhové.....	35
3.2.3. Výsledky testu akutní toxicity s NaNO ₂ na jeseteru malém.....	36

3.2.4. Výsledky hodnocení vlivu zvýšené koncentrace dusitanů na hematologické a biochemické parametry jesetera malého za přítomnosti a bez přítomnosti přípravku Huminfeed.....	38
4. Diskuze.....	49
5. Závěr.....	51
6. Přehled použité literatury.....	52
7. Seznam zkratk.....	55
8. Seznam přílohy.....	56
9. Přílohy.....	59
10. Abstrakt.....	99
11. Abstract.....	100

1. Úvod

Zvýšené koncentrace dusitanů se často nacházejí ve vodách s intenzivním chovem ryb. Z rybářské praxe i z odborné literatury jsou známy případy vážného poškození a havarijních úhynů ryb právě v důsledku vysokých koncentrací dusitanů ve vodě (např. Lewis a Morris, 1986; Williams a Eddy, 1986; Kosaka a Tyuma, 1987; Jensen, 2003 in Kroupová a kol., 2005; Máchová a kol., 2009; Svobodová a kol., 2007). Tolerance ryb vůči dusitanům je velmi úzce spjata s kvalitou vody, zejména s koncentrací chloridů. Pozitivní vliv chloridů je v literatuře poměrně dobře zdokumentován a sporadicky se také objevují informace o pozitivním vlivu přítomnosti huminových látek. Možností snížení toxicity dusitanů pomocí huminových látek se zabývali již Meinelt a kol. (2010) a Vaněček (2013).

Předložená práce navazuje na mou bakalářskou práci, ve které jsem se zabýval toxicitou dusitanů pro jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) a jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*) (Bulíček, 2012). Cílem této práce je ověřit účinek huminové látky HS 1500 obsažené v přípravku Huminfeed na jeseteru malém. Veškeré testy byly provedeny ve spolupráci s Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, v Laboratoři vodní toxikologie a ichtyopatologie VÚRH JU Vodňany.

2. Literární přehled

2.1 Jeseterovité ryby (*Acipenseridae*)

2.1.1. Charakteristika jeseterovitých ryb

Systematické zařazení (Gela a kol., 2008):

Třída: Ryby – *Osteichthyes*

Podtřída: Paprskoploutví – *Actinopterygii*

Nadřád: Chrupavčítí – *Chondrostei*

Čeleď: Jeseterovítí – *Acipenseridae*

Rod: Jeseter - *Acipenser*

Jeseteři mají protáhlé, vřetenovité tělo, v zadní části laterálně zploštělé, pokryté 5ti řadami kostěných štítků (jednu hřbetní, dvě boční a dvě břišní). Ocasní ploutev je heterocerní, se zvláštními šupinami na jejím horním laloku (*fulcræ*). Zadní konec ocasního násadce pokrývají kosočtverečné šupiny. Vrchní část hlavy je pokryta dotýkajícími se nebo blízko sebe ležícími kostěnými štítky (Baruš a Oliva, 1995). Jeseteři se vyznačují poměrně dlouhým rypcem s typicky spodními ústy. Na spodní straně rypce se nacházejí čtyři vousky (Hanel, 1998). Hřbetní ploutev je umístěna v poslední třetině těla, za insercí břišních ploutví. První paprsek ploutví je přeměněn v tvrdý trn (Baruš a Oliva, 1995).

Většina jeseterů žije v moři a do řek vytahuje na tření (diadromní druhy). Ve sladkých vodách žije trvale jen několik druhů. Jeseterovité ryby patří mezi hospodářsky nejcennější druhy ryb pro jejich kvalitní maso a kaviár, který se vyrábí z jejich jiker (Hanel, 1998). V důsledku neracionálních zásahů a dalších antropogenních vlivů se areál rozšíření všech druhů zmenšil, některé druhy jsou vážně ohrožené (Baruš a Oliva, 1995). Jeseteři dosahují velmi rozdílných velikostí od 70 do 700 centimetrů. V této čeledi je popsáno 24 druhů (Hanel, 1998).

2.1.2. Jeseter malý (*Acipenser ruthenus*)

Jeseter malý je nejmenší druh jesetera, který dorůstá délky 60 – 70 cm a dosahuje hmotnosti okolo 6,5 kg. Zřídka může dorůstat až velikosti 120 cm a hmotnosti 16 kg. Ryby se dožívají stáří okolo 25 let (Hanel, 1998). Jedná se o potamofilní, netažný sladkovodní druh jesetera, vyskytující se v oblasti řek Černého, Azovského a Kaspického moře. Ojedinelé nálezy se vyskytují i v řekách úmoří Baltského a Barentsova moře. V České republice se jeseter malý vyskytuje v řece Moravě, kam vytahuje z Dunaje. Zdržuje se v korytě řeky, v jámách, při pobřeží jen u strmých břehů nad hlubokou vodou. Tělo jesetera malého je protáhlé, relativně nízké, dolní ret je rozpolcený, vousky na průřezu okrouhlé, krátké, na vnitřní straně zpravidla obrvené, natažené dosahují k přednímu okraji úst. Profil hřbetu a hlavy je konkávní, hřbetní štitky mají dlouhý, dozadu obrácený hrot, který přesahuje základnu štitku. Boční štitky jsou kosočtvercového tvaru a částečně se překrývají. Zbarvení těla je šedohnědé nebo zelenohnědé, břišní strana žlutavá nebo špinavě hnědá (Baruš a Oliva, 1995). V době tření se u pohlavně zralých ryb na hlavě objevuje bělavý povlak (Hanel, 2001).

Meristické znaky (Hanel, 1998):

- D 32 – 48
- A 16 – 39
- 11 – 18 břišních štitků
- 10 – 17 hřbetních štitků
- 56 – 71 bočních štitků
- 14 – 26 žaberních tyčinek
- 25 – 45 fulker

Potrava a rozmnožování

Potrava jesetera malého se skládá převážně z larev a kulek hmyzu, zejména chrostíků a pakomárů. Menší roli v potravě jeseterů tvoří měkkýši, jepice a detrit. V době tření jiných druhů ryb se jeseter malý živí jejich jikrami.

Samci jesetera malého pohlavně dospívají ve 3. až 5. roce života, samice ve 4. až 7. roce života (Hanel, 1998). V době tření se ryby shromažďují a táhnou proti proudu. Délka tahu ryb není známa. Optimální teplota pro výtěr jesetera malého je 12 – 17 °C (Baruš a Oliva, 1995). Tření probíhá v proudnici řeky. Plodnost jedné samice je až 100 000 jiker (Hanel, 1998). Samci opakují tření každoročně, podobně i samice mladší než 7 let. Starší samice vynechávají a třou se jen v dvouletých či tříletých intervalech (Baruš a Oliva, 1995).

2.2. Sloučeniny dusíku a jeho přeměny

Dusík spolu s fosforem patří mezi nejdůležitější makrobiogenní prvky. Patří do skupiny tzv. nutrientů, které jsou nezbytné pro rozvoj mikroorganismů (Pitter, 2009).

2.2.2. Původ

Sloučeniny dusíku mohou být organického nebo anorganického původu. V biosféře neovlivněné antropogenní činností jsou sloučeniny dusíku převážně biogenního původu a vznikají rozkladem organických dusíkatých látek rostlinného a živočišného původu. Významným antropogenním zdrojem dusíku jsou převážně splaškové odpadní vody, vyprodukované člověkem, který denně vylučuje 11 – 23 g celkového dusíku. Tato hodnota se označuje jako specifická produkce dusíku. Uváděná hodnota se liší v závislosti na vybavenosti bytu a nejčastěji se počítá se specifickou produkcí 12 g na 1 obyvatele za den. (Pitter, 2009). Dalším významným zdrojem dusíku jsou odpady ze zemědělství (hnojení dusíkatými látkami, odpady z živočišné výroby). Dusíkaté látky se vyskytují i v atmosféře (oxidy dusíku NO, N₂O a NO₂ obecně NO_x a amoniakální dusík NH₃). Jejich reakcemi vznikají v atmosférických vodách dusitany a dusičnany.

2.2.3. Formy výskytu dusíku

Dusík se ve vodě vyskytuje v různých oxidačních stupních, v iontové i neiontové formě (Pitter, 2009)

-III amoniakální dusík (NH_4^+ , NH_3), kyanatany (OCN^-), kyanidy (CN^-)

-I hydroxylamin (NH_2OH)

0 elementární dusík (N_2)

+I oxid dusný (N_2O)

+III dusitanový dusík (N-NO_2^-)

+V dusičnanový dusík (N-NO_3^-)

Ve vodách se stanovuje celkový dusík ($N_{\text{celk.}}$), který se dále dělí na anorganicky a organicky vázaný dusík ($N_{\text{anorg.}}$ resp. $N_{\text{org.}}$).

$$N_{\text{celk.}} = N_{\text{anorg.}} + N_{\text{org.}}$$

Organicky vázaný dusík se vyskytuje ve vodách ve formě bílkovin a jejich rozkladných produktů (peptidů a aminokyselin), močoviny, alifatických a aromatických aminů, aminosacharidů, heterocyklických dusíkatých sloučenin apod., včetně dusíkatých látek vznikajících rozkladem biomasy mikroorganismů. Mezi hlavní formy anorganicky vázaného dusíku patří amoniakální, dusitanový a dusičnanový dusík. Další možnou anorganickou formou jsou volné kyanidy, kyanatany, kyanokomplexy a aminokomplexy.

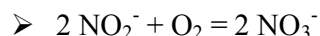
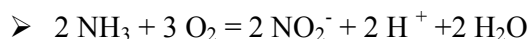
Sloučeniny dusíku jsou ve vodách málo stabilní a podléhají v závislosti na oxidačně-redukčním potenciálu a hodnotě pH zejména biochemickým přeměnám. K těmto biochemickým přeměnám patří např. nitrifikace a denitrifikace.

2.2.4. Nitrifikace

Nitrifikace je biochemická oxidace amoniakálního dusíku na dusitany a posléze na dusičnany probíhající v oxických podmínkách (Pitter, 2009). Nitrifikace probíhá ve dvou stupních. V první fázi (nitritace) se amoniakální dusík biochemickou cestou

oxiduje na dusitany s využitím činnosti bakterií zejména rodu *Nitrosomonas*, ale také *Nitrosococcus*, *Nitrosospira* a *Nitrosocystis*. Ve druhé fázi (nitratace) jsou vzniklé dusitany oxidovány na dusičnany mikroorganismy *Nitrobacter* a *Nitrocystis*. Obě skupiny organismů (nitritační i nitratační) jsou chemolitotrofní a jako zdroj uhlíku potřebují CO₂ (Švehla a kol., 2007). Nitrifikační bakterie jsou v přírodě velmi rozšířeny, hromadí se v dnových sedimentech, v půdě a v nerozpuštěných látkách ve vodě. Nitrifikace proto probíhá ve vodách v oxických podmínkách obvykle velmi snadno. Růstová rychlost nitrifikačních bakterií je závislá na teplotě vody (Pitter, 2009). Průběh nitrifikace je ovlivněn různými faktory, především koncentrací rozpuštěného kyslíku, hodnotou pH a teplotou vody (Švehla a kol., 2007). Optimální teplota vody pro nitrifikaci je v rozmezí od 20 °C do 30 °C. Při nižších teplotách vody rychlost nitrifikace značně klesá. Při teplotách pod 5°C je již rychlost nitrifikace velmi malá, ale při biologickém čištění odpadních vod dochází k inhibici nitrifikace již mnohem dříve, a to již při teplotách vody 12 °C a nižších (Pitter, 2009). Optimální rozmezí hodnot pH pro rod *Nitrosomonas* je v rozmezí od 7,9 do 8,2. Pro bakterie rodu *Nitrobacter* se tato hodnota pohybuje v rozmezí od 7,2 do 7,6 (Švehla a kol., 2007). Při hodnotách pH přibližně pod 6,5 a nad 9,0 dochází k inhibici nitrifikace. Významný vliv na nitrifikaci má také koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě. Úplná nitrifikace probíhá pouze při dostatečně vysoké koncentraci rozpuštěného kyslíku ve vodě. Při koncentraci pod 1 mg.l⁻¹ může docházet k hromadění dusitanů ve vodě (Pitter, 2009).

Jak již bylo uvedeno, proces nitrifikace probíhá ve dvou stupních, které lze znázornit následujícími rovnicemi (Pitter, 2009):



Jak je patrné z uvedených rovnic, při nitrifikaci dochází k uvolňování vodíkových iontů, které okyselují prostředí. Tím se snižuje KNK_{4,5} a při nedostatečné tlumivé kapacitě vody může významně klesnout i hodnota pH.

2.2.5. Denitrifikace

Denitrifikace je označení pro biochemickou redukci dusičnanů a dusitanů na N_2 . V malém množství může vznikat též NO_2 . Denitrifikace probíhá pomocí různých organotrofních bakterií, jako jsou například *Pseudomonas* a *Micrococcus* (Švehla a kol., 2007). Stejně jako nitrifikace probíhá i denitrifikace ve vodách poměrně snadno, pokud jsou dodrženy anoxické podmínky (Pitter, 2009). Na rozdíl od nitrifikace je pro denitrifikaci nutný organický substrát jako zdroj energie. Jde obvykle o organické látky obsažené v odpadní vodě nebo kalu (Pitter, 2009).

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

- $5 CH_3OH + 6 NO_3^- = 5 CO_2 + 3 N_2 + 7 H_2O + 6 OH^-$
- $5 C_6H_{12}O_6 + 24 NO_3^- = 12 N_2 + 18 H_2O + 30 CO_2 + 24 OH^-$

Na rozdíl od nitrifikace se při denitrifikaci uvolňují hydroxidové ionty, proto při denitrifikaci dochází k alkalizaci prostředí a při nízké tlumivé kapacitě vody může dojít k výraznému zvýšení její hodnoty pH (Pitter, 2009).

2.2.6. Dusitany

Dusitany zpravidla doprovázejí ve vodách dusičnany a amoniakální dusík. Jako minerály se však dusitany nevyskytují. Pokud jsou přítomné ve vodách, vznikají zejména biochemickou oxidací amoniakálního dusíku. Dusitany jsou chemicky a biochemicky velmi nestabilní, neboť v oxických podmínkách podléhají nitrifikaci a v anoxických podmínkách denitrifikaci, a proto se ve vodě vyskytují ve velmi malých koncentracích. Ve velmi čistých vodách bývají dusitany přítomné jen ve stopových koncentracích (Pitter, 2009). Běžné koncentrace v povrchových vodách nepřesahují $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ (viz tab. 2). Současná legislativa (nařízení vlády č. 61/2003 Sb. ve znění pozdějších předpisů) stanovuje jako přípustné znečištění povrchových vod koncentraci dusitanů NO_2^- nejvýše $0,6 \text{ mg.l}^{-1}$ pro vody lososové a nejvýše $0,9 \text{ mg.l}^{-1}$ pro vody kaprové (Kroupová a kol., 2005). Vyšší koncentrace dusitanů se běžně vyskytují ve splaškových odpadních vodách, v koncentracích překračující 1 mg.l^{-1} . Ještě vyšší koncentrace dusitanů se nachází v některých odpadních vodách ze strojírenských

závodů, např. v odpadních vodách z povrchové a tepelné úpravy kovů a obrábění, v odpadních vodách odtékajících z některých lázní v kalárnách a z lázní používaných pro oxidaci železných předmětů, tzv. černění. V těchto vodách se mohou vyskytovat koncentrace dusitanů v řádech desítek až stovek mg.l^{-1} , což může podstatně ovlivnit jejich vlastnosti a celkovou dusíkovou bilanci (Pitter, 2009). Zvýšené koncentrace dusitanů se mohou vyskytovat i ve vodách s intenzivním odchovem ryb, nebo v recirkulačních systémech. V recirkulačních akvakulturních systémech, zejména bezprostředně po zahájení provozu nebo v důsledku nedostatečné funkce biologických filtrů, hrozí hromadění dusitanů ve vodě, s následným úhynem ryb (Svobodová a kol., 2007; Svobodová a kol., 2008).

Tab. 1 Průměrné koncentrace amoniakálního, dusitanového, dusičnanového a celkového anorganického dusíku v některých řekách ČR (Pitter, 2009)

Řeka- profil	ρ (N_{amon}) [mg.l^{-1}]	ρ (N-NO_2) [mg.l^{-1}]	ρ (N-NO_3) [mg.l^{-1}]	ρ (N_{anorg}) [mg.l^{-1}]	c (N_{anorg}) [mmol.l^{-1}]
Berounka – nad Plzní	0,350	0,053	5,33	5,733	0,409 5
Berounka – Bukovec	1,252	0,112	5,23	6,594	0,471 0
Berounka – Lahovice	0,378	0,037	5,40	5,815	0,415 4
Svratka – Vír	0,304	0,023	5,74	6,067	0,433 4
Svratka – pod Brnem	3,588	0,133	4,65	5,371	0,383 6
Svratka – Židlochovice	2,950	0,179	5,23	8,359	0,597 0
Otava – Sušice	0,147	0,004	1,15	1,301	0,092 9
Otava – Střelské Hoštice	0,164	0,012	1,50	1,676	0,119 7
Otava – Písek	0,276	0,043	2,49	2,809	0,200 6
Jizera – Horní Sytová	0,138	0,008	1,25	1,396	0,099 7
Jizera – Nový Vestec	0,327	0,046	3,41	3,783	0,270 2

2.3. Vliv dusitanů na ryby

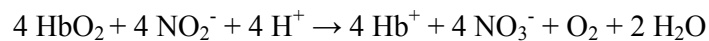
2.3.1. Příjem a mechanismus účinku dusitanů na ryby

Sladkovodní ryby a koryši jsou hyperosmotičtí vůči prostředí ve kterém žijí, a proto aktivně přijímají ionty žábami, aby se vyrovnávala ztráta močí a pasivním odtokem z žaber. Aktivní příjem iontů je spojen s tzv. chloridovými buňkami žaber (Maetz, 1971). Dusitanové ionty se vstřebávají do organismu především přes tyto chloridové buňky žaber (Svobodová a kol., 2007). Mezi ionty chloridů a dusitanů existuje kompetice na chloridových buňkách. Dusitany mají ve sladké vodě určitou afinitu k iontové výměně $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. K zabránění vstřebávání dusitanů rybami se proto zvyšuje koncentrace chloridů ve vodě. Tento krok slouží k většímu podílu obsazení chloridových buněk chloridy oproti toxickým dusitanům. Tuto teorii o nahrazení části příjmu chloridů dusitany potvrzuje i fakt, že ryby s vyšší rychlostí příjmu chloridů žábami jako například pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) a okoun říční (*Perca fluviatilis*) jsou více náchylní k otravám dusitany než ryby s nižší rychlostí příjmu jako kapr obecný (*Cyprinus Carpio*) a lín obecný (*Tinca tinca*) (Williams a Eddy, 1986 in Kroupová a kol., 2005). Pro posouzení toxicity dusitanů pro ryby je proto nutné sledovat hmotnostní poměr koncentrací chloridů a N-NO_2^- ve vodě (Svobodová a kol., 2007).

Toxický účinek dusitanů na ryby spočívá v oxidaci hemoglobinu na methemoglobin, který není schopen přenášet kyslík. Tím se snižuje transportní kapacita krve pro kyslík. Zvýšené množství methemoglobinu v krvi je doprovázeno hnědým zbarvením krve a žaber (Svobodová a kol., 1992). K úhynům ryb dochází zpravidla až v koncentracích methemoglobin okolo 80 %. Při koncentracích dusitanů v krvi nad 80 % se začínají u ryb projevovat malátné pohyby, ztrácení orientace. Často jsou zjišťovány i křeče svaloviny jako důsledek poškození nervové soustavy v důsledku nedostatečného zásobení kyslíkem (Svobodová a kol., 2007). Pokud množství methemoglobinu v krvi nepřesáhne 50 % z celkového množství hemoglobinu, nedochází zpravidla k úhynu ryb. V těchto případech je nutno ryby přenést do čisté vody bez přítomnosti dusitanů, kde jsou ryby v rozmezí 24 – 48 hodin schopny regenerace pomocí enzymu methemoglobin reduktázy obsaženým v červených

krvinkách (Svobodová a kol., 1992). Dusitany nahromaděné v krvi a tkáních jsou postupně oxidovány na téměř netoxické dusičnany, které jsou pak vylučovány močí a žlučí (Kroupová a kol., 2005).

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



2.3.2. Toxicita dusitanů pro ryby

Toxicita dusitanů pro ryby závisí na mnoha vnitřních a vnějších faktorech, jako je například druh a věk ryby či kvalita vody. Letální koncentrace se pohybují v rozmezí 0,3 až 300 mg.l⁻¹ NO₂⁻ (Svobodová a kol., 2007). Rozdíly v citlivosti vybraných druhů ryb vůči dusitanům dokumentuje tabulka 2.

Tab. 2 Toxicita dusitanů (hodnoty 96hLC50 jsou uvedeny v mg.l⁻¹ N-NO₂⁻) pro vybrané druhy ryb (Lewis a Morris, 1986)

Druh	Ca ²⁺ (mg.l ⁻¹)	Alkalita (CaCO ₃ mg.l ⁻¹)	Teplota (°C)	pH	96hLC50 (20 mg.l ⁻¹ Cl)
Studenomilné					
Pstruh duhový <i>Oncorhynchus mykiss</i>	50	177	10	7,8	6,63
Losos <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>		20	13	7,2	4,7
Teplomilné					
<i>Ictaluridae</i>					
Sumeček skvrnitý <i>Ictalurus punctatus</i>	80	190	32	7,9	6,4
Sumeček černý <i>Ictalurus melas</i>					> 52
<i>Cyprinidae</i>					
Sřevle černoskvrná <i>Semotilus atromaculatus</i>	27	98	18	8,3	> 63
Kapr obecný <i>Cyprinus carpio</i>					> 52
<i>Castomidae</i>					
<i>Catostomus commersoni</i>					> 100
<i>Carpiodes cyprinus</i>					> 100
<i>Centrarchiidae</i>					
Okounek pstruhový <i>Micropterus salmoides</i>	80	190	23	7,9	140
Slunečnice velkoploutvá <i>Lepomis macrochirus</i>			30	7,2	108
Taxony z jiných čeledí					
<i>Oreochromis aureus</i>	80	190	23	7,9	15
Candátek kozlíkovitý <i>Percina caprodes</i>					> 9
Koljuška říční <i>Culaea inconstans</i>					> 9
<i>Cottus bardi</i>	53	177	13	8,1	> 106

Sporadické údaje v literatuře (např. Meinelt a kol., 2010) rovněž uvádějí, že toxicitu dusitanů pro ryby lze ovlivnit přítomností huminových látek.

Huminové látky jsou běžnou součástí přírodních vod, především povrchových. Rozkladnými a syntetickými pochody se z odumřelé rostlinné hmoty v půdě tvoří humus, tmavě zbarvená amorfní složka půdy. Humifikuje se zhruba polovina primární organické hmoty, zbytek se mineralizuje. Huminové látky jsou převážně aromatické

látky obsahující v molekule větší počet karboxylových a fenolových skupin. Ve vodách jsou chemicky i biochemicky stabilní. Huminové látky se dělí podle rozpustnosti v kyselém a alkalickém prostředí a podle rozpustnosti v etanolu na huminové kyseliny, které jsou tmavohnědé barvy a fulvinové kyseliny, které mají žlutou až žlutohnědou barvu (Pitter, 2009).

Huminové kyseliny mají nižší stupeň disociace než fulvokyseliny. Jsou to vysokomolekulární dusíkaté cyklické organické kyseliny, heterogenního a polydispersního charakteru. Jejich obecným znakem je rozpustnost v hydroxidech a alkalických roztocích a schopnost srážet se působením kyselin. Fulvinové kyseliny jsou vysokomolekulární dikarboxylové dusíkaté sloučeniny, které mají s huminovými kyselinami mnoho společného v stavbě základních jednotek, ale také mnoho rozdílných vlastností. Jsou méně odolné vůči kyselé hydrolyze než huminové kyseliny, liší se od nich nižší polydispersitou, rozpustností ve vodě a v minerálních kyselinách, nižším obsahem uhlíku, jednodušší stavbou a velkým množstvím příměsí typu meziproduktů rozkladu organických zbytků. (Kolář, 1987).

Tab. 3 Elementární složení huminových látek přítomných v přírodních vodách (Pitter, 2009)

Prvek	Fulvinové kyseliny	Huminové kyseliny
C (%)	46,0	57,0
O (%)	48,6	37,1
H (%)	4,0	4,4
N (%)	1,2	2,0
O : C	1,056	0,651
H : C	0,087	0,077
N : C	0,026	0,035

Z ekotoxikologického hlediska jsou huminové látky sice nezávadné, ovlivňují však do značné míry organoleptické vlastnosti vody. Ve vyšších koncentracích se mohou huminové látky projevit i pěněním na turbulentních místech toku. Z uvedených důvodů je koncentrace huminových látek v některých druzích vod limitována (Pitter, 2009)

2.4. Testy toxicity na vodních organizmech

Testy toxicity na organizmech vodního prostředí slouží zejména k hodnocení potenciálního nebezpečí pro vodní ekosystém jako celek (Svobodová a kol., 1986; Svobodová a kol., 2000). Testy toxicity se také používají k hodnocení toxického účinku nově vyvinutých a do praxe zaváděných chemických látek a přípravků včetně pesticidů i při klasifikaci odpadů určených ke skladování. Testovací organizmy se proto volí tak, aby zastoupily celou trofickou úroveň (producenti, konzumenti, destruenti). K hodnocení ekologického rizika chemických látek a přípravků včetně pesticidních látek jsou vyžadovány výsledky testů akutní toxicity na řasách, daňkách a na rybách. Testy toxicity jsou velmi významnou pomocí při hledání a usvědčování původců havárií na povrchových a podzemních vodách (Svobodová a kol., 2000). Podrobnější informace o testech toxicity na vodních organizmech uvádím ve své bakalářské práci např. Bulíček (2012) a zde prezentuji pouze stručné informace, které považuji za důležité v souvislosti s tématem předložené diplomové práce.

Testy toxicity se provádějí na úrovni buněk a tkání, na úrovni organismů (jedinců) a na úrovni biocenóz (Svobodová a kol., 1992). Toxické působení látek na živé systémy se zkoumají buď ve zkumavce „*in vitro*“ nebo na živých zvířatech „*in vivo*“. Většina toxikologických dat pochází z testování na živých zvířatech, protože zvíře je nejdokonalejším modelem pro toxikologické experimenty (Horák a kol., 2004). Testy toxicity se dělí podle délky expozice na akutní a chronické testy toxicity. Přechodnou kategorií mezi testy akutní a chronické toxicity jsou testy subchronické toxicity (Svobodová a kol., 2000). Provedení testu závisí na typu látky, předběžných informacích o toxicitě a požadavcích na přesnost (Horák a kol., 2004).

Akutní testy toxicity slouží k určení toxicity testované látky při krátkodobé expozici (96 hodin) organismu dané látky. V průběhu testu se kontroluje a zaznamenává stav a chování testovaných organismů a odstraňují se uhynulí jedinci. Výsledkem testu akutní toxicity jsou hodnoty LC50, EC50 a IC50, koncentrace, které vyvolají mortalitu, imobilizaci nebo inhibici růstu testovacích organismů za určitou dobu působení (obvykle 24 až 96 hodin) u 50 % testovaných organismů (Svobodová a kol., 2000).

Posloupnost testů toxicity

Při zjišťování hodnot LC50, EC50 a IC50 se vychází z koncentrací, ve kterých došlo k více než nulové a méně než stoprocentní mortalitě, imobilizaci či inhibici růstu. Proto je při provádění testů velmi důležité zvolit správný rozsah koncentrací (Svobodová a kol., 2000). Nejprve se provádí tzv. **limitní test**. Při tomto testu se zjišťuje odpověď testovaných organismů na koncentraci 100 mg.l⁻¹ testované látky. Pokud v limitním testu neuhyne žádný testovaný organizmus, další testy se již neprovádí. V případě úhynu se následně provádí **předběžný test**. Tento test se provádí s malým počtem testovacích organismů (3-5 ks ryb nebo 10 ks dafnií v každé koncentraci a kontrole) na široké škále koncentrací testované látky. Předběžný test slouží k určení rozsahu koncentrací testované látky pro **základní test**. Test se provádí s větším počtem testovacích organismů (min. 7-10 ks ryb v každé koncentraci a kontrole). Z výsledku základního testu se vypočítává hodnota IC50, EC50, LC50 (Svobodová a kol., 2000).

Důležitou součástí každého testu toxicity je **kontrola**, která se provádí se stejnými organismy ve stejných podmínkách. Kontrolní organismy se nasazují do ředící vody bez přítomnosti testované látky. Ředící voda nesmí ovlivňovat toxicitu testované látky a musí vyhovovat fyziologickým potřebám testovacích organismů (Svobodová a kol., 2000). Toxikologická laboratoř je povinna provádět v určitých časových intervalech tzv. **vnitřní kontrolu**. Vnitřní kontrola se provádí pomocí základního testu, v němž je testovanou látkou tzv. **standard**. Jako standard se u nás i v zahraničí používá dichroman draselný (K₂Cr₂O₇ p.a.). V naší republice se dále používá jako standard p-nitrofenol (p.a.) a heptahydrát síranu zinečnatého (ZnSO₄ · 7H₂O p.a.). Provedení testu se standardem a porovnání takto získaných hodnot LC50, EC50 či IC 50 s obecně platnými hodnotami umožňuje laboratoři tzv. vnitřní kontrolu správnosti postupu i citlivosti použitých testovacích organismů (Svobodová a kol., 2000).

3. Experimentální část

3.1. Materiál a metodika

3.1.2. Materiál a pomůcky

Testovací organismus:

Jako testovací organismus byl použit jeseter malý o průměrné délce těla 18,3 cm a průměrné hmotnosti 26,7 g.

Ryby byly získány z Genetického rybářského centra VÚRH JU Vodňany.

Pro kontrolu snášenlivosti ryb vůči přípravku Huminfeed byla použita ryba živorodka duhová (*Poecilia reticulata*).

Testovaná látka: dusitan sodný NaNO_2 p.a., který byl používán jako zdroj dusitanů a dále byl použit přípravek Huminfeed jako zdroj huminových látek, jehož vliv na citlivost jesetera malého vůči dusitanům byl testován.

Přístroje a pomůcky:

- oximetr a pHmetr (multifunkční přístroj MultiLine P4 firmy WTW)
- analytické váhy (Mettler AE 200)
- spektrofotometr (Spectronic 20 Genesys),
- lihový skleněný teploměr
- centrifuga (High speed brushless centrifuge MPVR 350 R)
- hematokritová odstředivka (Microcentrifuge MPW 55)
- laboratorní nádobí (kádinky, skleněné tyčinky, stříčka, váženka, pipety)
- injekční stříkačky vypláchnuté heparinem
- skleněné nádrže o objemu 150 litrů
- síťky pro manipulaci s rybami

Ředící voda: jako ředící voda byla použita dechlorovaná vodovodní voda následujících parametrů

- pH 8,3
- $\text{KNK}_{4,5}$ 0,5 mmol.l^{-1}
- CHSK_{Mn} 2,2 mg.l^{-1}
- $\Sigma\text{Ca+Mg}$ 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}
- P-PO_4^{3-} 0,01 mg.l^{-1}

3.1.3. Přehled provedených testů akutní toxicity

1) Byly provedeny testy akutní toxicity na jeseteru malém (koncentrace 30 a 60 mg.l^{-1}) a živorodce duhové (koncentrace 60 a 120 mg.l^{-1}) s přípravkem Huminfeed. Cílem těchto testů bylo prokázat, zda přípravek Huminfeed nevykazuje akutně letální účinky na testovací organizmy. Pro vlastní testy akutní toxicity dusitanů na jeseteru malém a ověření vlivu přítomnosti huminové látky byl uvedený přípravek použit v koncentraci 30 mg.l^{-1} .

2) Byly provedeny testy akutní toxicity na jeseteru malém s dusitanem sodným, který byl dávkován do ředící vody (1, 5, 10, 20, 30, 50 mg.l^{-1}) a dále s dusitanem sodným, který byl dávkován do ředící vody ve stejných koncentracích spolu s přípravkem Huminfeed v koncentraci 30 mg.l^{-1} . Koncentrace dusitanu sodného byly zvoleny na základě výsledků získaných při zpracování mé bakalářské práce, která byla zaměřena na stanovení akutní toxicity dusitanu sodného pro jesetera malého a jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*) (Bulíček, 2012). Cílem testů bylo ověřit, do jaké míry ovlivní přítomnost huminových látek akutní letální účinky dusitanu sodného na jesetera malého.

3) V návaznosti na zjištění, že přítomnost přípravku Huminfeed neovlivnila akutní letální účinky dusitanu sodného na jesetera malého, byly provedeny testy akutní toxicity, při kterých byl jeseter malý vystaven po dobu 48 hodin dusitanu sodnému

v koncentraci 10 mg.l^{-1} a dále dusitanu sodnému v téže koncentraci za přítomnosti přípravku Huminfeed v koncentraci 30 mg.l^{-1} . Uvedené testy byly provedeny ve dvou paralelkách a po ukončení testů byla přežívajícím rybám odebrána krev na hematologické a biochemické vyšetření. Cílem těchto testů bylo posoudit, do jaké míry ovlivní, přítomnost přípravku Huminfeed sledované hematologické a biochemické parametry testovacích organizmů.

3.1.4. Metodika testů toxicity

1) Zkouška toxicity přípravku Huminfeed na jeseteru malém a živorodce duhové

Ryby byly vystaveny po dobu 96 hodin přípravku Huminfeed v koncentracích 30 a 60 mg.l^{-1} v případě jesetera malého a 60 a 120 mg.l^{-1} v případě živorodky duhové. Současně byly nasazeny kontroly, kde byly ryby drženy v ředící vodě bez testované látky. Do každé koncentrace bylo nasazeno 5 ks náhodně vybraných ryb. Test byl proveden obnovovací metodou s výměnou lázně po 48 hodinách. V průběhu testu byly sledovány chování a mortalita ryb a prováděna kontrola základních parametrů kvality vody (hodnoty pH, koncentrace rozpuštěného kyslíku a teplota). Na základě nulové mortality ryb byla konstatována nezávadnost testované látky.

Podmínky testu:

- **Délka expozice:** 96 hodin
- **Objem lázně:** 5 l v případě živorodky duhové
20 l v případě jesetera malého
- **Výměna lázně:** po 48 hodinách
- **Teplota vody:** $18 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$
- **Nasycení vody kyslíkem:** $\text{O}_2 > 60 \%$
- **Osvětlení:** 12 hodin denně
- **Ostatní podmínky:** aerace, bez krmení

2) Stanovení akutní letální koncentrace dusitanu sodného pro jesetera malého

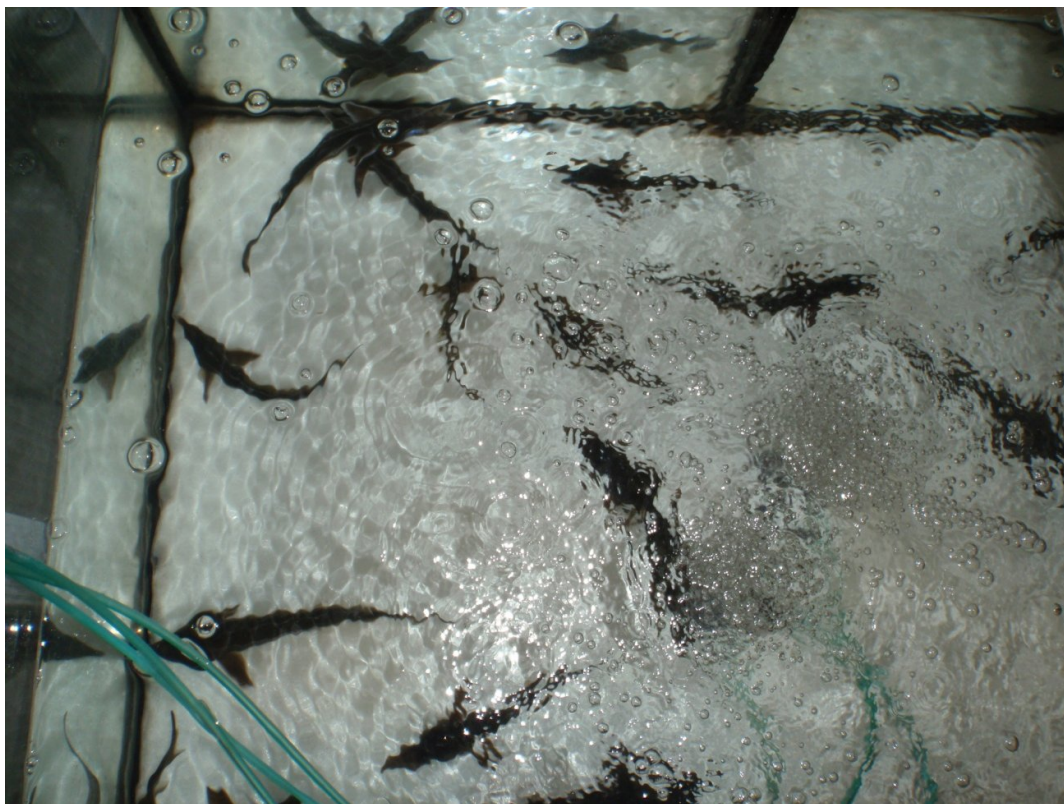
Testy akutní toxicity byly provedeny podle mezinárodně platné normy ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod. Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby */Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)/. Část 2: Obnovovací metoda.

Pro určení hodnot LC50 byly ryby vystaveny po dobu 96 hodin dusitanu sodnému v koncentracích 1, 5, 10, 20, 30, 50 mg.l⁻¹. Tytéž koncentrace dusitanu sodného byly použity v testu, kde byl společně k testované látce přidán přípravek Huminfeed v koncentraci 30 mg.l⁻¹. Současně byla nasazena kontrola I, kde byly testovací organizmy drženy v ředící vodě bez testované látky a kontrola H, kde byly testovací organizmy drženy v ředící vodě s přidavkem přípravku Huminfeed v koncentraci, která byla použita v testu. Do každé koncentrace bylo nasazeno 8 ks náhodně vybraných ryb. Test byl proveden obnovovací metodou s výměnou lázně po 48 hodinách.

V průběhu testu byly sledovány chování a mortalita ryb a prováděna kontrola základních parametrů kvality vody (hodnoty pH, koncentrace rozpuštěného kyslíku a teplota). Před výměnou lázně byla provedena kontrola koncentrace dusitanů ve vodě. Uhynulí jedinci se zaznamenávali a odlovovali z nádrže. Na základě zjištěné mortality ryb v jednotlivých koncentracích byly vypočteny pomocí probitové analýzy programem EKOTOX 5.1 střední letální koncentrace 24hLC50, 48hLC50, 72hLC50 a 96hLC50.

Podmínky testu:

- **Délka expozice:** 96 hodin
- **Objem lázně:** 150 l
- **Výměna lázně:** po 48 hodinách
- **Teplota vody:** 18 ±2 °C
- **Nasycení vody kyslíkem:** O₂ > 60 %
- **Osvětlení:** 12 hodin denně
- **Ostatní podmínky:** aerace, bez krmení



Obr. 1 Výměna lázně v nádrži bez přidaného přípravku Huminfeed po 48 hodinové expozici (foto V. Bulíček)

3) Posouzení vlivu zvýšené koncentrace dusitanů na hematologické a biochemické parametry jesetera malého za přítomnosti a bez přítomnosti přípravku Huminfeed

Ryby byly vystaveny po dobu 48 hodin dusitanu sodnému v koncentraci 10 mg.l^{-1} , která byla zvolena na základě výsledků základního testu s dusitanem sodným za přítomnosti huminové látky (odpovídá zjištěné hodnotě 96hLC50). Přípravek Huminfeed byl dávkován v koncentraci 30 mg.l^{-1} .

Byly hodnoceny následující parametry:

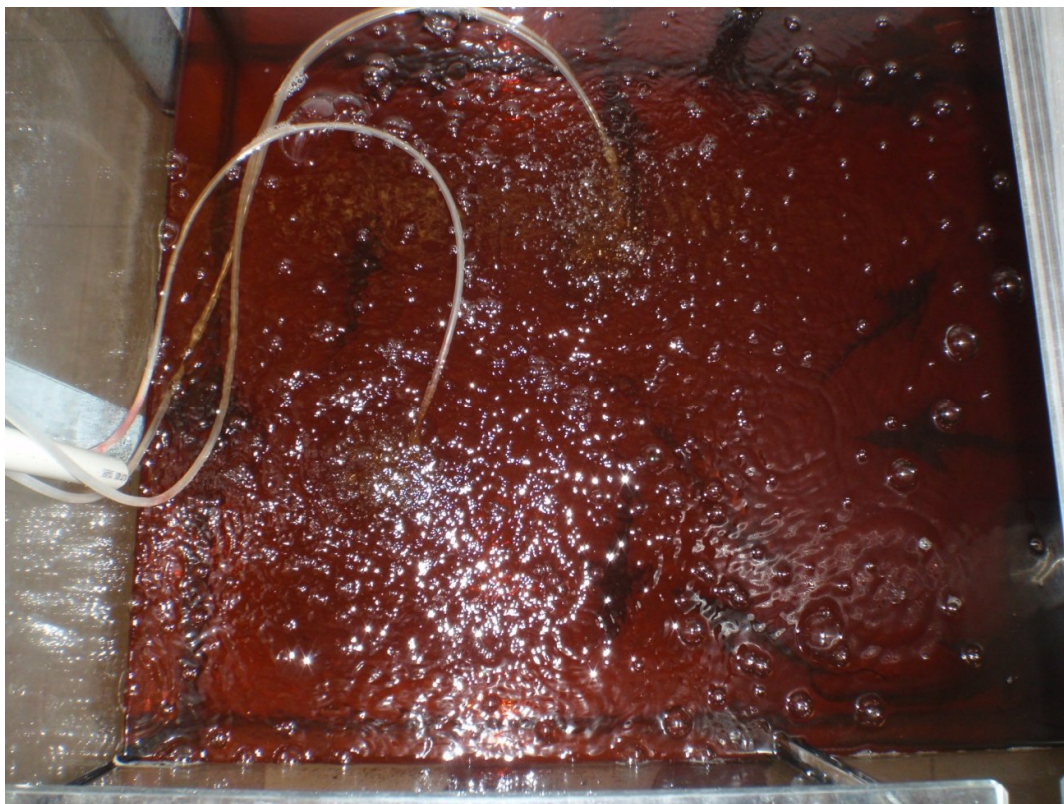
- Hematokrit
- Hemoglobin
- Methemoglobin
- Erytrocyty
- Leukocyty

- Koncentrace dusitanů v krvi
- Glukóza
- Laktát
- Kyselina močová
- Močovina
- NH₃

Ryby byly vystaveny po dobu 48 hodin dusitanu sodnému v koncentraci 10 mg.l⁻¹, která byla určena na základě základního testu z hodnoty 96hLC50. Stejná koncentrace dusitanu sodného byla použita v testu, kde byl k testované látce přidán přípravek Huminfeed v koncentraci 30 mg.l⁻¹. Současně byla nasazena kontrola (K), kde byly testovací organizmy drženy v ředící vodě bez testované látky a kontrola, kde byly testovací organizmy drženy v ředící vodě s přidavkem přípravku Huminfeed v koncentraci, která byla použita v testu (Kh). Uvedené testy byly provedeny ve dvou paralelkách a po ukončení testů byla přežívajícím rybám odebrána krev na hematologické a biochemické vyšetření.

V průběhu testu byly sledovány chování a mortalita ryb a prováděna kontrola základních parametrů kvality vody (hodnoty pH, koncentrace rozpuštěného kyslíku a teplota). Po konci testu byla provedena kontrola koncentrace dusitanů ve vodě. Uhynulí jedinci se zaznamenávali a odlovovali z nádrže. Výsledky sledování základních parametrů kvality vody v průběhu testu jsou uvedeny v příloze.

Do osmi skleněných nádrží o velikosti 150 litrů bylo připraveno 100 litrů dechlorované vody. Dvě nádrže o koncentraci huminové látky 30 mg.l⁻¹ a koncentraci dusitanu sodného 10 mg.l⁻¹ a dvě nádrže o koncentraci dusitanu sodného 10 mg.l⁻¹ bez huminové látky. Současně byly nasazeny dvě kontroly o koncentraci huminové látky 30 mg.l⁻¹ a dvě kontroly bez huminové látky. Do každé nádrže bylo nasazeno 15 ks náhodně vybraných ryb. Během testu byla sledována a zaznamenávána mortalita ryb a hodnoty pH, kyslíku a teploty. Uhynulé ryby byly z nádrží odstraňovány. Po 48 hodinách byl test ukončen. Hematologické a biochemické vyšetření ryb bylo provedeno u 5 ks ryb před zahájením expozice, dále u 5 ks bezprostředně po ukončení 48hodinové expozice a u 5 ks po 14 denní rekonvalescenci ryb v ředící vodě.



Obr. 2 Nádrž s jeseterem malým po 48 hodinové expozici dusitanům v přítomnosti přípravku Huminfeed v koncentraci 30 mg.l^{-1} (foto V. Bulíček)

Podmínky testu

- **Délka expozice:** 48 hodin
- **Objem lázně:** 150 l
- **Výměna lázně:** po 48 hodinách
- **Teplota vody:** $18 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$
- **Nasycení vody kyslíkem:** $\text{O}_2 > 60 \%$
- **Osvětlení:** 12 hodin denně
- **Ostatní podmínky:** aerace, bez krmení

3.1.5. Metodika souvisejících analýz a vyšetření

1) Stanovení koncentrace dusitanů ve vodě

Dusitany byly stanoveny spektrofotometricky po reakci s kyselinou sulfanilovou a N-(1-naftyl)-ethylendiamindihydrochloridem (NED-hydrochloridem) (Horáková a kol., 1986)

Postup: k 50 ml odebraného vzorku bylo přidáno 2,5 ml roztoku kyseliny sulfanilové, směs byla promíchána, po 10 minutách stání při laboratorní teplotě byl přidán NED-hydrochlorid a směs byla opět promíchána. Po dalších 20 minutách byla spektrofotometricky změřena intenzita vzniklého růžového zbarvení při vlnové délce 520 nm proti slepému stanovení. Koncentrace dusitanů byly potom odečteny z kalibrační přímky.

2) Odběr krve

Odběr krve pro biochemická i hematologická sledování byl proveden ihned po vylovení ryb z prostředí, ve kterém byly chovány (Kolářova a Velíšek, 2012). Vlastní odběr krve prováděl veterinární lékař, kterému jsem při odběru asistoval.

Průměrná velikost a hmotnost testovaných ryb byla 18,3 cm a 26,7 g. U takto velkých ryb bylo možno odebrat krev pouze ze srdce (kardiopunkcí) (Kolářová a Velíšek, 2012). Odběr byl proveden pomocí velmi tenké injekční jehly promyté heparinem, který sloužil ke stabilizaci krve. Po odběru byly ryby šetrně usmrceny.



Obr. 3 Odběr krve jesetera malého (foto V. Bulíček)

3) Stanovení hematologických parametrů

Byly stanovovány hodnoty hematokritu, hemoglobinu, methemoglobinu, erytrocytů a leukocytů. U všech měřených hodnot bylo postupováno podle metodiky Svobodová a kol. (2012). Vzhledem k tomu, že většinu stanovení bylo nutno provést ve velmi krátkém časovém intervalu po odběru, nemohl jsem provést všechna měření sám. Pokud není v metodice uvedeno jinak, stanovení jsem prováděl samostatně nebo jsem při práci asistoval.

a) Stanovení hematokritu

Krev na stanovení hematokritu byla nasáta do skleněných kapilár o velikosti 7,5 cm přibližně do dvou třetin. Jeden konec se utěsnil pomocí modelovací hmoty tak, aby mezi krví a těsnicí hmotou nezůstal vzduch. Takto utěsněné kapiláry se vložily do hematokritové odstředivky na 3 minuty při 14 000 otáčkách. Po odstředění byl na

hematokritovém měřidle odečten podíl hematokritu v procentech. Zjištěné hodnoty se vynásobily koeficientem 0,01, a tak byly převedeny na jednotky $l.l^{-1}$ a jsou uvedeny v příloze.



Obr. 4 Odstředěné (první tři kapiláry zleva) a neodstředěné hematokritové kapiláry, v některých případech byla krev hemolytická a po odstředění nedošlo k vytvoření jasně ohraničených zón (třetí kapilára zleva) (foto V. Bulíček)

b) Stanovení množství hemoglobinu

Ke stanovení hemoglobinu v krvi byla použita fotometrická kyanohemoglobinová metoda. Do zkumavek bylo připraveno 5 ml transformačního roztoku. Do těchto zkumavek bylo přidáno 20 μ l odebrané krve. Zkumavky byly ihned promíchány. Po 20 minutách byl vzorky fotometricky měřeny pomocí 1cm kvety při vlnové délce 540 nm proti transformačnímu roztoku. Množství hemoglobinu bylo určeno z kalibrační křivky. Výsledné hodnoty se udávají v $g.l^{-1}$ a jsou uvedeny v příloze.

Transformační roztok byl připraven podle van Kampena a Zijlstra:

- Ferrikyanid draselný $K_3[Fe(CN)_6]$ – 0,20 g
- Kyanid draselný KCN – 0,05 g
- Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4 – 0,14 g
- Destilovaná voda – ad 1000 ml

c) Stanovení methemoglobinu

Stanovení relativního obsahu methemoglobinu v krvi bylo provedeno pomocí metody, která využívá absorpčního maxima methemoglobinu při vlnové délce 630 nm. Do 5 ml destilované vody ve zkumavce bylo odměřeno 0,2 ml krve. Tato krev se odstředila po dobu 3 minut při 14 000 otáčkách. Vzniklý vodný hemolyzát se stáhl pipetou do zásobní zkumavky. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v příloze.

Tab. 4 Schéma postupu:

Zkumavka	A	B
Vodný hemolyzát	1,5 ml	1,5 ml
Fosfátový pufr	1,5 ml	1,5 ml
Roztok ferrikyanidu draselného	1 kapka	-
Destilovaná voda	-	1 kapka
Změřit absorbanci proti destilované vodě při 630 nm		
Naměřená absorbance	M_1	N_1
Roztok kyanidu draselného	1 kapka	1 kapka
Po uplynutí 5 minut změřit absorbanci proti destilované vodě při 630 nm		
Naměřená absorbance	M_2	N_2

Procentuální zastoupení methemoglobinu v krvi se vypočítá pomocí vzorce:

$$\frac{(N_1 - N_2) \cdot 100}{M_1 - M_2}$$

Pracovní roztoky:

Fosfátový pufr:

- Kyselý fosforečnan draselný (KH_2PO_4) – 5,572 g
- Fosforečnan sodný (Na_2HPO_4) – 3,560 g
- Destilovaná voda – 500 ml

Roztok ferrikyanidu draselného:

- Ferrikyanid draselný ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) – 5 g
- Destilovaná voda – 100 ml

Roztok kyanidu draselného:

- Kyanid draselný (KCN) – 1 g
- Destilovaná voda – 20 ml

d) stanovení počtu erytrocytů

Stanovení počtu erytrocytů bylo provedeno v heparinizované krvi ředěné Hayemovým roztokem v poměru 1 : 200. Toto stanovení prováděla paní I. Prokopová (technička).

Hayemův roztok má následující složení:

- Chlorid rtuťnatý HgCl_2 – sublimát – 2,5g
- Síran sodný Na_2SO_4 – 25 g
- Chlorid sodný – NaCl – 5 g
- Destilovaná voda – ad 1000 ml.

Před použitím se připravený Hayemův roztok filtroval přes filtrační papír. K ředění krve byla použita tzv. baničková metoda podle Bürkera. Ředění se provedlo ve speciálních skleněných baničkách o objemu 25 ml, do kterých se nejprve napipetovalo přesně 4 975 μl Hayemova roztoku a potom 25 μl odebrané heparinizované krve. Špička mikropipety se opětovným nasáním roztoku několikrát propláchla, aby došlo k dokonalému vymytí krve. Poté se banička uzavřela gumovou zátkou a její obsah se promíchal krouživým pohybem po dobu jedné minuty. Kapátkem se naplnila počítací Bürkerova komůrka (hemocytometr) naředěnou krví. Erytrocyty se počítaly ve dvaceti obdélnících stejnoměrně rozmístěných po celé mřížce počítací komůrky. Počítalo se pod mikroskopem při zvětšení 200x. Při vlastním stanovení se postupovalo tak, že se

počítaly všechny erythrocyty, které byly uvnitř obdélníků, aniž by se dotýkaly některé z jejich stran. Z erythrocytů, které se dotýkaly stran, se počítaly jen ty, které se dotýkaly pravé a horní strany, a to uvnitř i vně. Celkové napočítané množství erythrocytů se vydělilo číslem 100 a výsledný počet byl množství erythrocytů v $T.l^{-1}$ (T -tera = 10^{12}).

e) Stanovení počtu leukocytů

Stanovení počtu leukocytů se provedlo v heparizované krvi, ředěné roztokem Natt – Herrick v poměru 1:200. Toto stanovení prováděla paní M. Pečená (veterinární technička).

Příprava a složení roztoku Natt – Herrick:

- Chlorid sodný (NaCl) – 3,88 g
- Síran sodný (Na₂SO₄) – 2,5 g
- Hydrogenfosforečnan sodný (Na₂HPO₄) – 1,74 g
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄) – 0,25 g
- Formaldehyd 37% - 7,5 ml
- Methylóvá violeť 2B – 0,1 g

Roztok byl doplněn destilovanou vodou do objemu jednoho litru, nechal se ustát 24 hodin a přefiltroval se přes filtrační papír. K ředění krve byla použita tzv. baničková metoda podle Bürkera. Ředění se provedlo ve speciálních skleněných baničkách o objemu 25 ml, do kterých se nejprve napipetovalo přesně 4 975 μ l Hayemova roztoku a potom 25 μ l odebrané heparinované krve. Špička mikropipety se opětovným nasáním roztoku několikrát propláchla, aby došlo k dokonalému vymytí krve. Nádobka se uzavřela gumovou zátkou a její obsah se promíchal krouživým pohybem po dobu 2 – 3 minut. Poté se opatrným nasáváním a vypouštěním Pasteurovou pipetou roztok znovu promíchal a Bürkerova komůrka (hemocytometr) se naplnila naředěnou krví. Leukocyty se počítaly ve 100 velkých čtvercích pod mikroskopem při zvětšení 200x. Při počítání se postupovalo tak, že se počítaly všechny leukocyty, které byly uvnitř velkých čtverců. Z leukocytů, které se dotýkaly stran, se počítaly jen ty, které se dotýkaly pravé a horní strany uvnitř nebo vně. Celkové napočítané množství leukocytů ve 100 velkých

čtvercích se vydělilo dvěma a výsledkem byl počet leukocytů, udávaný v $G.l^{-1}$ (G – giga = 10^9).

4) Stanovení biochemických parametrů

Byly stanovovány hodnoty glukózy, laktátu, amoniaku, močoviny a kyseliny močové v krvi ryb. U všech těchto měřených hodnot bylo postupováno podle metodiky Kolářová a Velíšek, 2012. Dále bylo provedeno stanovení dusitanů v krvi ryb, podle metodiky Shechter a kol., 1972.

a) Měření na biochemickém analyzátoru

Měření biochemických parametrů krve (glukózy, laktátu, amoniaku, močoviny a kyseliny močové) probíhalo pomocí přístroje VETTEST 8008. Pro analýzu biochemických parametrů byla použita krevní plazma (10 μ l). Dle požadavků na analýzu jsou do přístroje vloženy příslušné testovací disky. Pipeta automaticky rozdělí 10 μ l vzorku na každý disk a začne čtení. Samotná analýza trvá cca 5 – 6 minut. Vlastní měření prováděl J. Velíšek.



Obr. 5 Příklad VETTEST 8008 (foto V. Bulíček)

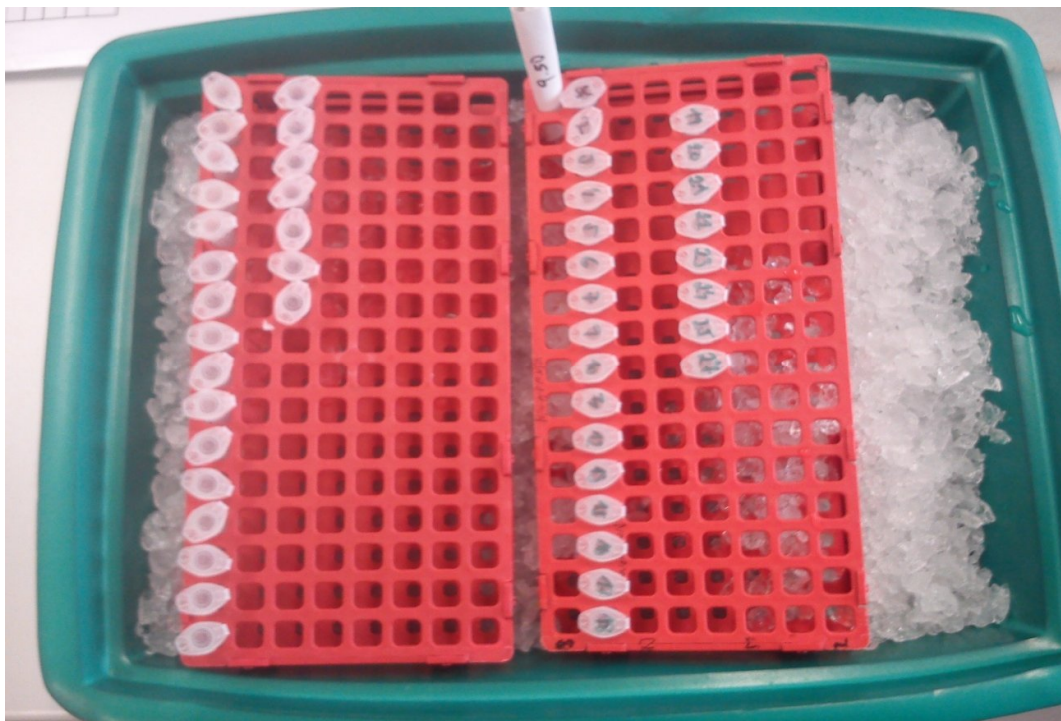
b) Mikrometoda pro stanovení dusitanů v krvi ryb

Pracovní postup:

Deproteinizace – 0,1 ml krve se převedlo do 1,5 ml zkumavky obsahující 0,6 ml roztoku síranu zinečnatého. Dále bylo přidáno 0,4 ml dvakrát předestilované vody a důkladně promícháno. Dále bylo přidáno 0,1 ml 4 % (w/v) vodného roztoku hydroxidu sodného a znovu promícháno. Poté byly vzorky umístěny na led, kde se následující hodinu chladily. Vzniklé sražené bílkoviny byly následně odstraněny pomocí centrifugy (2 min při 15000 ot/min).

Barevná reakce – 0,6 ml vzniklého roztoku z deproteinizace bylo převedeno do zkumavky (100/10) a bylo přidáno 0,4 ml dvakrát předestilované vody, zkumavky byly řádně promíchány a následně bylo přidáno 0,1 ml roztoku kyseliny sulfanilové. Vzorky byly umístěny na led, kde se následujících 15 minut chladily (proběhla diazotace).

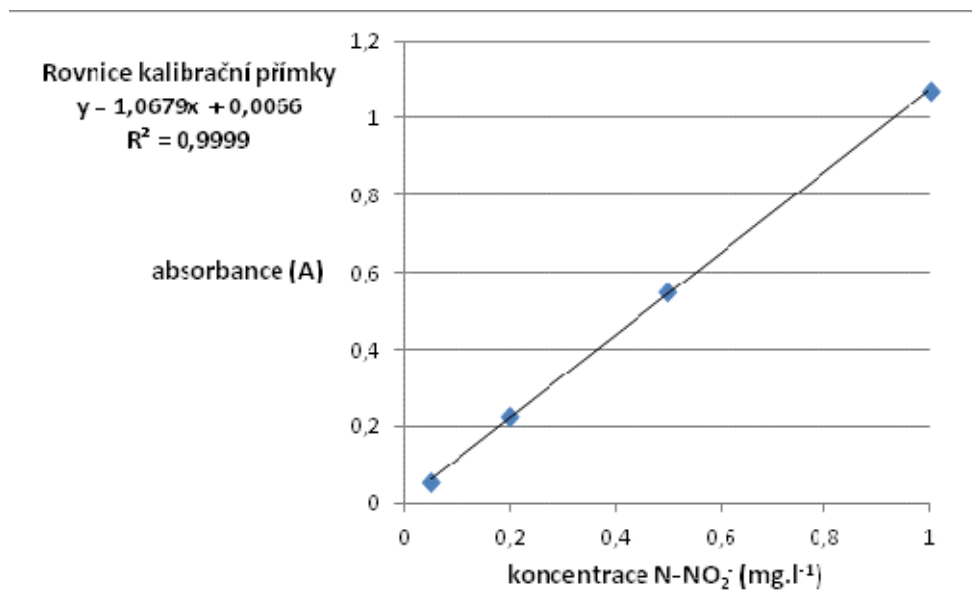
Následně bylo přidáno 0,1 ml roztoku „Cleve’s acid“. Po 60ti minutách při pokojové teplotě (proběhla kopulační reakce) byla měřena absorbance při 520 nm. Ve vzorcích s přítomností dusitanů vznikl komplex červeno – fialového zbarvení.



Obr. 6 Vzorky testované krve (foto V. Bulíček)

Příprava kalibrační křivky – několik alikvotních podílů roztoku standardu (až do 1 ml) bylo převedeno do mikrozkušavek obsahujících 0,6 ml roztoku síranu zinečnatého. Dále bylo postupováno stejným způsobem jako při analýze vzorků (viz výše).

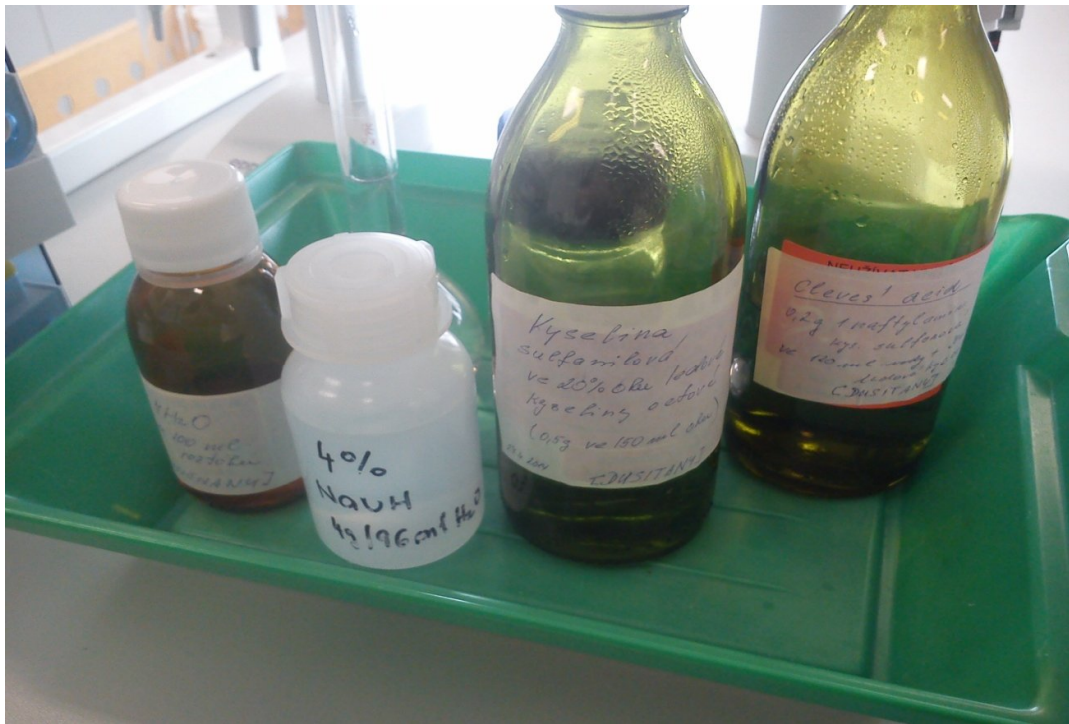
- Slepé stanovení = dvakrát předestilovaná voda



Graf. 1 Kalibrační graf a rovnice kalibrační přímky pro stanovení dusitanů

Pracovní roztoky:

- Roztok kyseliny sulfanilové – 0,5 g kyseliny sulfanilové bylo rozpuštěno v 150 ml 20 % (w/v) roztoku ledové kyseliny octové.
- Roztok „Cleve’s acid“ – 0,2 g 1-naftylamin-7sulfonové kyseliny bylo ohřáto v 120 ml vody. Následně byl roztok přefiltrován, ochlazen a bylo přidáno 30 ml ledové kyseliny octové.
- Zásobní roztok dusitanu sodného – 0,4928 g bylo rozpuštěno ve vodě a doplněno v odměrné baňce na 1 litr vodou (1 ml = 100 μg dusitanového dusíku). Roztok byl konzervován pomocí 1 ml přečištěného chloroformu.
- Roztok standardu – 10 ml zásobního roztoku dusitanu sodného byl doplněn v odměrné baňce na 1 litr vodou (1 ml = 1 μg dusitanového dusíku). Tento roztok byl připraven těsně před použitím.
- Roztok síranu zinečnatého – 4,31 g heptahydrátu síranu zinečnatého bylo rozpuštěno ve vodě a doplněno vodou na 100 ml.



Obr. 7 Pracovní roztoky (foto V. Bulíček)

3.2. Výsledky

3.2.1. Platnost testů

Před vyhodnocením testů bylo zkontrolováno dodržení kritérií daných normou ČSN EN ISO 7346-2:

- V průběhu testů nedošlo v žádném případě k úhynu kontrolních organismů
- Nasycení vody kyslíkem nepokleslo pod 60 %
- Koncentrace testované látky před výměnou lázně se nelišila od nominální koncentrace o více než 10 %.

Požadovaná kritéria validace byla splněna a dosažené výsledky jsou tudíž platné.

3.2.2. Výsledky zkoušky toxicity přípravku Huminfeed na jeseteru malém a živorodce duhové

V průběhu 96ti hodinové expozice přípravku Huminfeed, nedošlo k žádnému úhynu testovacích ryb v žádné koncentraci ani v kontrole u obou druhů ryb (tab. 5 a 6). Ryby nevykazovaly žádné známky poškození, a tak bylo konstatováno, že přípravek Huminfeed nemá v testovaných koncentracích (30 a 60 mg.l⁻¹ v případě jesetera malého a 60 a 120 mg.l⁻¹ v případě živorodky duhové) akutně toxické účinky na tyto druhy ryb. Pro další testy na jeseteru malém byla zvolena koncentrace přípravku Huminfeed pro základní test 30 mg.l⁻¹, neboť vyšší koncentrace tohoto přípravku dávala vodě velmi intenzivní tmavou barvu, která by mohla mít při dlouhodobé aplikaci na ryby nežádoucí účinky (např. nedostatek slunečního záření, špatná orientace, apod.).

Tab. 5 Mortalita pokusných ryb v průběhu zkoušky toxicity přípravku Huminfeed na jeseteru malém (do každé koncentrace bylo nasazeno 5 kusů ryb)

Koncentrace přípravku Huminfeed (mg.l ⁻¹)	Mortalita za 24 hodin		Mortalita za 48 hodin		Mortalita za 72 hodin		Mortalita za 96 hodin	
	ks	%	ks	%	ks	%	ks	%
0 mg.l ⁻¹ (kontrola)	0	0	0	0	0	0	0	0
30 mg.l ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0
60 mg.l ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 6 Mortalita pokusných ryb v průběhu zkoušky toxicity přípravku Huminfeed na živorodce duhové (do každé koncentrace bylo nasazeno 5 kusů ryb)

Koncentrace přípravku Huminfeed (mg.l ⁻¹)	Mortalita za 24 hodin		Mortalita za 48 hodin		Mortalita za 72 hodin		Mortalita za 96 hodin	
	ks	%	ks	%	ks	%	ks	%
0 mg.l ⁻¹ (kontrola)	0	0	0	0	0	0	0	0
60 mg.l ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0
120 mg.l ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0

3.2.3. Výsledky testu akutní toxicity s NaNO₂ na jeseteru malém

Klinické příznaky otravy: Pokusné ryby vystavené koncentracím 1, 5 a 10 mg.l⁻¹ NaNO₂⁻ bez přítomnosti huminové látky nejevily během prvních 24 hodin trvání testu žádné změny chování ve srovnání s kontrolou. Ryby vystavené vyšším koncentracím (20, 30 a 50 mg.l⁻¹ NaNO₂⁻) vykazovaly příznaky poškození (zrychlené dýchání, malátný pohyb). V následujících dnech vykazovaly příznaky poškození i ryby v koncentraci 10 mg.l⁻¹, zatímco chování ryb v nižších koncentracích zůstávalo beze změn.

V testu s přídáním huminovou látkou jeví příznaky poškození ryby v koncentracích 10 – 50 mg.l⁻¹ NaNO₂⁻ již v průběhu prvních 24 hodin, ryby v nižších koncentracích nejevily žádné známky poškození. V průběhu dalších dnů zůstala situace stejná.

Mortalita pokusných ryb v průběhu obou základních testů je uvedena v tabulkách 7 a 8.

Tab. 7 Mortalita pokusných ryb v průběhu základního testu na jeseteru malém bez přídání huminové látky (do každé koncentrace bylo nasazeno 8 kusů ryb)

Koncentrace mg.l ⁻¹ NaNO ₂	Mortalita za 24 hodin		Mortalita za 48 hodin		Mortalita za 72 hodin		Mortalita za 96 hodin	
	ks	%	ks	%	ks	%	ks	%
0 mg.l ⁻¹ (kontrola)	0	0	0	0	0	0	0	0
1 mg.l ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0
5 mg.l ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0
10mg.l ⁻¹	0	0	1	13	3	38	3	38
20 mg.l ⁻¹	5	63	6	75	6	75	6	75
30 mg.l ⁻¹	5	63	6	75	6	75	8	100
50 mg.l ⁻¹	7	88	7	88	8	100	8	100

Tab. 8 Mortalita pokusných ryb v průběhu základního testu na jeseteru malém s přidanou huminovou látkou (do každé koncentrace bylo nasazeno 8 kusů ryb)

Koncentrace NaNO ₂	Koncentrace přípravku Huminfeed (mg.l ⁻¹)	Mortalita za 24 hodin		Mortalita za 48 hodin		Mortalita za 72 hodin		Mortalita za 96 hodin	
		ks	%	ks	%	ks	%	ks	%
0 mg.l ⁻¹ (kontrola)	30 mg.l ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0
1 mg.l ⁻¹	30 mg.l ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0
5 mg.l ⁻¹	30 mg.l ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0
10 mg.l ⁻¹	30 mg.l ⁻¹	1	13	1	13	1	13	4	50
20 mg.l ⁻¹	30 mg.l ⁻¹	2	25	5	63	6	75	8	100
30 mg.l ⁻¹	30 mg.l ⁻¹	4	50	7	88	8	100	8	100
50 mg.l ⁻¹	30 mg.l ⁻¹	5	63	7	88	7	88	8	100

Na základě mortality pokusných ryb byly probitovou analýzou vypočteny hodnoty LC50, které jsou uvedeny v tabulce 9 a 10, včetně hodnot, které odpovídají přepočtu na dusitaný (NO₂⁻) a dusitanový dusík (N-NO₂⁻)

Tab. 9 Přehled hodnot LC50 NaNO₂ a jejich přepočet na NO₂⁻ a N-NO₂⁻ pro jesetera malého bez přidané huminové látky

Délka expozice	NaNO ₂	NO ₂ ⁻	N-NO ₂ ⁻
24hLC50	26,3 mg.l ⁻¹	17,5 mg.l ⁻¹	5,3 mg.l ⁻¹
48hLC50	20,5 mg.l ⁻¹	13,7 mg.l ⁻¹	4,2 mg.l ⁻¹
72hLC50	15,7 mg.l ⁻¹	10,5 mg.l ⁻¹	3,2 mg.l ⁻¹
96hLC50	12,8 mg.l ⁻¹	8,5 mg.l ⁻¹	2,6 mg.l ⁻¹

Tab. 10 Přehled hodnot LC50 NaNO₂ a jejich přepočet na NO₂⁻ a N-NO₂⁻ pro jesetera malého s přidanou huminovou látkou

Délka expozice	NaNO ₂	NO ₂ ⁻	N-NO ₂ ⁻
24hLC50	32,7 mg.l ⁻¹	21,8 mg.l ⁻¹	6,6 mg.l ⁻¹
48hLC50	20 mg.l ⁻¹	13,3 mg.l ⁻¹	4,1 mg.l ⁻¹
72hLC50	16,1 mg.l ⁻¹	10,7 mg.l ⁻¹	3,3 mg.l ⁻¹
96hLC50	10 mg.l ⁻¹	6,7 mg.l ⁻¹	2,0 mg.l ⁻¹

K výpočtu uvedených hodnot byl použit program EKOTOX 5.1. Příslušné grafy jsou uvedeny v příloze (obr. I až VIII).

Zjištěné hodnoty 24hLC50 – 96hLC50 ukazují, že přítomnost huminové látky HS 1500 nijak výrazně neovlivňuje toleranci jesetera malého vůči dusitanům. Hodnota 24hLC50 je sice v případě testu s huminovou látkou o cca 20 % vyšší, což by svědčilo o

vyšší toleranci ryb k testované látce, avšak tento rozdíl v podstatě nevybočuje z variability, která je u výsledků biologických testů běžná. Navíc, střední letální koncentrace při delší době expozice (48, 72 a 96 hodin) jsou téměř shodné, což potvrzuje předpoklad, že přidaná huminová látka neovlivnila letální účinky dusitanů.

3.2.4. Výsledky hodnocení vlivu zvýšené koncentrace dusitanů na hematologické a biochemické parametry jesetera malého za přítomnosti a bez přítomnosti přípravku Huminfeed

V tomto testu byly ryby vystaveny po dobu 48 hodin dusitanu sodnému v koncentraci, která odpovídala hodnotě 96hLC50 (10 mg.l⁻¹ NaNO₂). V tabulce XY je uvedena mortalita ryb, která byla v průběhu expozice a následné rekonvalescence ryb pozorována. V průběhu expozice došlo k úhynu části pokusných ryb.

Odběr krve z tak malých ryb byl poměrně problematický a řada vzorků byla hemolytická. Takové vzorky krve nebylo možno použít k dalšímu vyšetření. Problémy nastaly zejména při počítání červených a bílých krvinek a při stanovení methemoglobinu. Tyto parametry proto nebyly statisticky vyhodnoceny, výsledky stanovení jsou uvedeny pouze v příloze. Pro statistické vyhodnocení ostatních sledovaných parametrů byly hodnoty získané ze dvou paralelních skupin spojeny do jednoho souboru a poté porovnávány. Označení takto vzniklých skupin bylo následující:

- **P** – skupina ryb před expozicí
- **K** - ryby kontrolní po 48 hodinách trvání pokusu
- **Kh** - ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 48 hodinách trvání pokusu
- **1** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO₂ v koncentraci 10 mg.l⁻¹
- **1h** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO₂ v koncentraci 10 mg.l⁻¹ za přítomnosti přípravku Huminfeed v koncentraci 30 mg.l⁻¹
- **Kr** - ryby kontrolní po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě
- **Khr** - ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě
- **1r** – ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě
- **1hr** – ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě, jejichž expozice dusitanům probíhala za přítomnosti přípravku Huminfeed

Zjištěné výsledky byly porovnány analýzou variance ANOVA nebo neparametrickým testem pokud předpoklady pro použití ANOVY nebyly splněny. Předpoklady pro použití ANOVY byly otestovány pomocí testu Cochran – Hartley – Bartlet (test homogenity variancí). Pokud byly předpoklady splněny, byl následně použit Tukeyův HSD test pro mnohonásobné porovnání. Jako neparametrický test byl použit Kruskal – Wallisův test. Testy byly provedeny při hladině významnosti $p < 0,05$.

Výsledné průměrné koncentrace biochemických a hematologických parametrů krve jesetera malého jsou uvedeny v tabulce 12 a znázorněny graficky v grafech 2 – 8.

Počet vzorků, které byly v jednotlivých skupinách použity při hodnocení jednotlivých parametrů, jsou uvedeny v příloze.

Tab. 11 Mortalita pokusných ryb v průběhu testu na jeseteru malém s přidáním huminovou látkou (do každé koncentrace bylo nasazeno 15 kusů ryb)

Skupina	Mortalita během expozice dusitanům	
	do 24 hodin	do 48 hodin
K ₁	0	0
K ₂	0	0
Kh ₁	0	0
Kh ₂	0	0
1 ₁	0	2
1 ₂	0	3
1h ₁	0	2
1h ₂	2	0

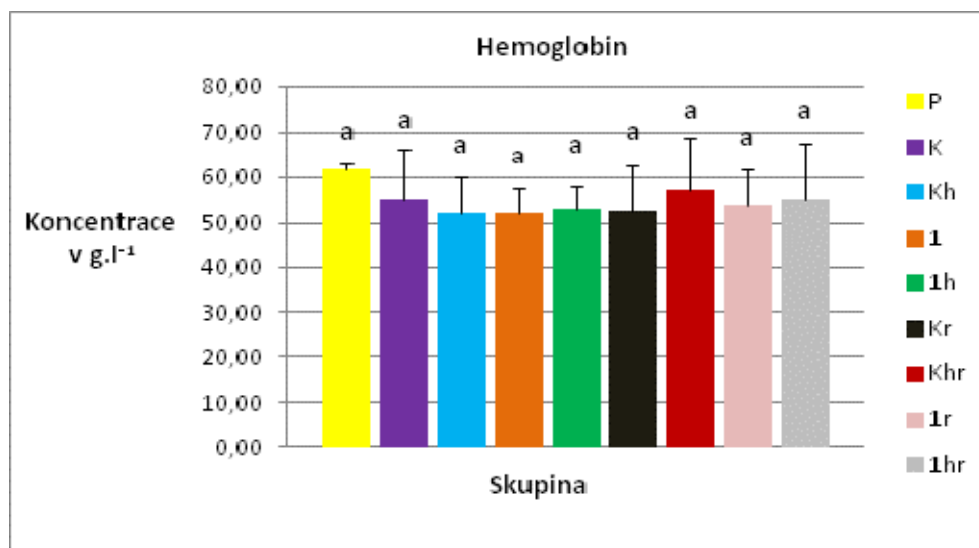
Označení skupin: **K** - ryby kontrolní **Kh** - ryby kontrolní za přítomnosti přípravku Huminfeed v koncentraci 30 mg.l⁻¹ **1** - ryby pokusné exponované NaNO₂ v koncentraci 10 mg.l⁻¹; **1h** - ryby pokusné exponované NaNO₂ v koncentraci 10 mg.l⁻¹ za přítomnosti přípravku Huminfeed v koncentraci 30 mg.l⁻¹; (indexy 1 a 2 označují jednotlivé paralelky)

Tab. 12 Průměrné koncentrace hematologických a biochemických parametrů krve jesetera malého u jednotlivých skupin

Skupina	Hemoglobin (g.l ⁻¹)	Hematokrit (l.l ⁻¹)	Dusitany (mg.l ⁻¹ ¹ NaNO ₂ ⁻)	Glukóza (mmol.l ⁻¹)	Laktóza (mmol.l ⁻¹)	Kyselina močová (μmol.l ⁻¹)	Močovina (mmol.l ⁻¹)	Amoniak (μmol.l ⁻¹)
P	61,88 ± 5,01	0,225 ± 0,024	0,028 ± 0,025	2,590 ± 0,497	0,540 ± 0,128	6,025 ± 0,096	0,125 ± 0,096	796,000±111,520
K	55,03 ± 11,37	0,265 ± 0,033	0,015 ± 0,012	2,184 ± 0,276	0,523 ± 0,036	6,113 ± 0,125	0,113 ± 0,083	319,625±215,094
Kh	52,28 ± 7,67	0,241 ± 0,034	0,011 ± 0,008	2,102 ± 0,210	0,608 ± 0,133	6,089 ± 0,117	0,122 ± 0,120	380,556±170,746
l	52,07 ± 5,34	0,223 ± 0,030	7,055 ± 3,440	1,932 ± 0,276	1,816 ± 0,282	6,060 ± 0,107	0,100 ± 0,094	240,100 ± 102,388
lh	53,00 ± 5,09	0,243 ± 0,036	7,328 ± 2,119	1,898 ± 0,220	2,185 ± 0,320	6,063 ± 0,141	0,163 ± 0,092	375,750±136,095
Kr	52,50 ± 9,95	0,216 ± 0,039	0,015 ± 0,015	1,723 ± 0,422	1,491 ± 0,548	6,000 ± 0,115	0,071 ± 0,076	392,000±187,785
Khr	57,29 ± 11,32	0,241 ± 0,112	0,016 ± 0,019	1,917 ± 0,097	1,575 ± 0,303	5,975 ± 0,096	0,175 ± 0,150	367,500±48,727
lr	53,68 ± 7,91	0,205 ± 0,024	0,052 ± 0,030	2,647 ± 1,667	1,619 ± 0,824	6,088 ± 0,309	0,213 ± 0,285	450,250±211,213
lhr	55,01 ± 12,38	0,217 ± 0,041	0,020 ± 0,028	1,720 ± 0,300	1,476 ± 0,351	6,063 ± 0,151	0,113 ± 0,064	420,125±72,582

Hemoglobin

Průměrné koncentrace hemoglobinu v krvi včetně statistických rozdílů (ANOVA, HSD nestejný N test, $p < 0,05$) jsou uvedeny v grafu 2.



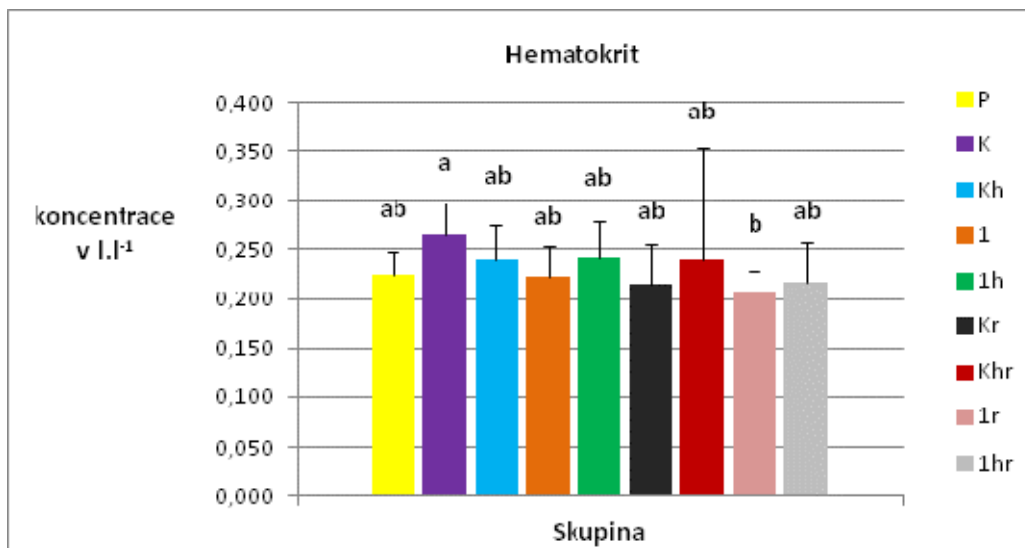
Graf. 2 Průměrné koncentrace hemoglobinu v krvi jesetera malého

Označení skupin: **P** - ryby před expozicí; **K** - ryby kontrolní po 48 hodinách trvání pokusu; **Kh** - ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 48 hodinách trvání pokusu; **1** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO_2 v koncentraci 10 mg.l^{-1} ; **1h** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO_2 v koncentraci 10 mg.l^{-1} za přítomnosti přípravku Huminfeed v koncentraci 30 mg.l^{-1} ; **Kr** - ryby kontrolní po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **Khr** - ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **1r** - ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **1hr** - ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě, jejichž expozice dusitanům probíhala za přítomnosti přípravku Huminfeed

Průměrné koncentrace hemoglobinu v krvi ryb jednotlivých skupin byly srovnatelné a zjištěné rozdíly nebyly statisticky významné. A proto lze konstatovat, že přítomnost dusitanů ani huminové látky HS 1500 neměla na koncentraci hemoglobinu žádný vliv.

Hematokrit

Průměrné koncentrace hematokritu v krvi včetně statistických rozdílů (Neparametrický Kruskal – Wallisův test, $p < 0,05$) jsou uvedeny v grafu 3.



Graf. 3 Průměrná koncentrace hematokritu v krvi jesetera malého

Označení skupin: **P** - ryby před expozicí; **K** - ryby kontrolní po 48 hodinách trvání pokusu; **Kh** - ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 48 hodinách trvání pokusu; **1** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO_2 v koncentraci 10 mg.l^{-1} ; **1h** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO_2 v koncentraci 10 mg.l^{-1} za přítomnosti přípravku Huminfeed v koncentraci 30 mg.l^{-1} ; **Kr** – ryby kontrolní po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **Khr** – ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **1r** – ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **1hr** – ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě, jejichž expozice dusitanům probíhala za přítomnosti přípravku Huminfeed

Průměrné výše hematokritu u ryb jednotlivých skupin byly srovnatelné a zjištěný statisticky významný rozdíl mezi skupinou K a 1r se týká skupin na sobě navzájem nezávislých, a proto nemají o vlivu huminové látky HS 1500 žádnou vypovídající hodnotu. Proto lze na základě dosažených výsledků konstatovat, že huminová látka HS 1500 neovlivnila výši hematokritu.

Koncentrace dusitanů v krevní plazmě

Průměrné koncentrace dusitanů v krvi včetně statistických rozdílů (Neparametrický Kruskal – Wallisův test, $p < 0,05$) jsou uvedeny v tabulce 13.

Tab. 13 Průměrné koncentrace dusitanů v krevní plazmě jesetera malého

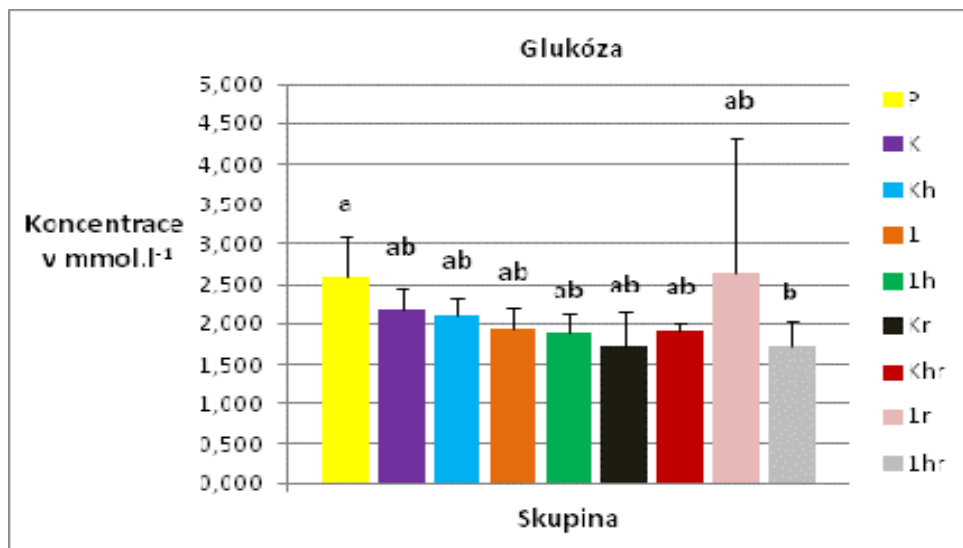
Skupina	Koncentrace NaNO_2 (mg.l^{-1})	Statistická významnost
P	0,028	ab
K	0,015	a
Kh	0,011	a
1	7,055	b
1h	7,328	b
Kr	0,015	a
Khr	0,016	a
1r	0,052	ab
1hr	0,033	ab

Označení skupin: **P** - ryby před expozicí; **K** - ryby kontrolní po 48 hodinách trvání pokusu; **Kh** - ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 48 hodinách trvání pokusu; **1** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO_2 v koncentraci 10 mg.l^{-1} ; **1h** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO_2 v koncentraci 10 mg.l^{-1} za přítomnosti přípravku Huminfeed v koncentraci 30 mg.l^{-1} ; **Kr** – ryby kontrolní po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **Khr** – ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **1r** – ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **1hr** – ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě, jejichž expozice dusitanům probíhala za přítomnosti přípravku Huminfeed

Průměrná koncentrace dusitanů v krevní plazmě pokusných ryb se výrazně zvýšila, a to bez ohledu na přítomnost huminové látky (zjištěný rozdíl byl malý a nebyl statisticky významný). V průběhu následujících 14 dnů rekonvalescence klesla koncentrace dusitanů v krevní plazmě u obou pokusných skupin na původní úroveň a zjištěný rozdíl opět nebyl statisticky významný. Z těchto výsledků vyplývá, že přítomnost huminové látky HS 1500 neovlivnila příjem dusitanů do těla ryb.

Glukóza

Průměrné koncentrace glukózy v krvi včetně statistických rozdílů (Neparametrický Kruskal – Wallisův test, $p < 0,05$) jsou uvedeny v grafu 4.



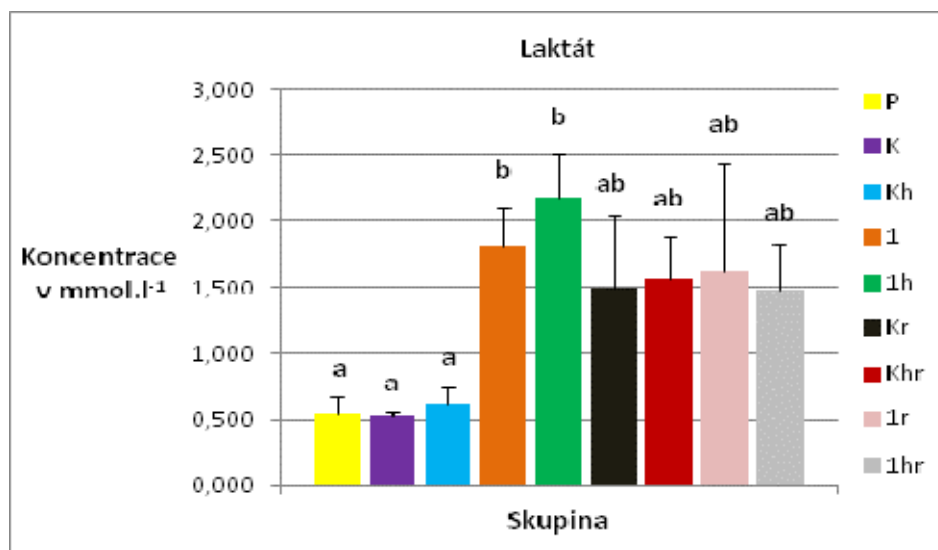
Graf. 4 Průměrná koncentrace glukózy v krevní plazmě jesetera malého

Označení skupin: **P** - ryby před expozicí; **K** - ryby kontrolní po 48 hodinách trvání pokusu; **Kh** - ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 48 hodinách trvání pokusu; **I** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO₂ v koncentraci 10 mg.l⁻¹; **Ih** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO₂ v koncentraci 10 mg.l⁻¹ za přítomnosti přípravku Huminfeed v koncentraci 30 mg.l⁻¹; **Kr** – ryby kontrolní po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **Khr** – ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **Ir** – ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **Ihr** – ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě, jejichž expozice dusitanům probíhala za přítomnosti přípravku Huminfeed

Průměrné koncentrace glukózy v krevní plazmě ryb jednotlivých skupin byly srovnatelné a zjištěný statisticky významný rozdíl mezi skupinou P a Ihr se týká skupin na sobě navzájem nezávislých, a proto lze konstatovat, že koncentrace glukózy nebyla ovlivněna dusitany, ani přítomností huminové látky Huminfeed.

Laktát

Průměrné koncentrace laktátu v krvi včetně statistických rozdílů (Neparametrický Kruskal – Wallisův test, $p < 0,05$) jsou uvedeny v grafu 5.



Graf. 5 Průměrná koncentrace laktátu v krevní plazmě jesetera malého

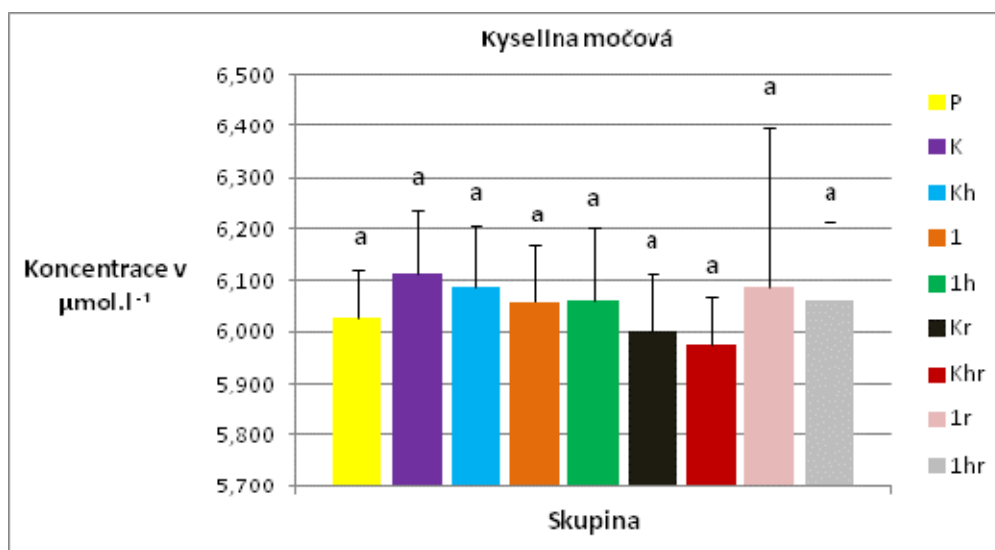
Označení skupin: **P** - ryby před expozicí; **K** - ryby kontrolní po 48 hodinách trvání pokusu; **Kh** - ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 48 hodinách trvání pokusu; **1** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO₂ v koncentraci 10 mg.l⁻¹; **1h** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO₂ v koncentraci 10 mg.l⁻¹ za přítomnosti přípravku Huminfeed v koncentraci 30 mg.l⁻¹; **Kr** – ryby kontrolní po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **Khr** – ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **1r** – ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **1hr** – ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě, jejichž expozice dusitanům probíhala za přítomnosti přípravku Huminfeed

Koncentrace laktátu byly nejnižší před zahájením expozice a na téměř shodné úrovni se udržovaly během následujících 48 hodin v obou kontrolách. Ke statisticky významnému zvýšení koncentrace laktátu došlo v průběhu 48 hodinové expozice dusitanům u obou skupin pokusných ryb a zjištěný rozdíl mezi skupinou 1 a 1h nebyl statisticky významný. To svědčí o tom, že přítomnost huminové látky Huminfeed neměla na toleranci ryb vůči dusitanům vliv. V průběhu následné 14 denní rekonvalescence došlo k poklesu koncentrace laktátu u obou pokusných skupin ryb na

úroveň srovnatelnou s kontrolními rybami. Tyto hodnoty však byly vyšší ve srovnání s hodnotami zjištěnými u ryb před zahájením expozice a po 48 hodinách trvání testu u kontrolních ryb.

Kyselina močová

Průměrné koncentrace kyseliny močové v krvi včetně statistických rozdílů (Neparametrický Kruskal – Wallisův test, $p < 0,05$) jsou uvedeny v grafu 6.



Graf. 6 Průměrná koncentrace kyseliny močové v krevní plazmě jesetera malého

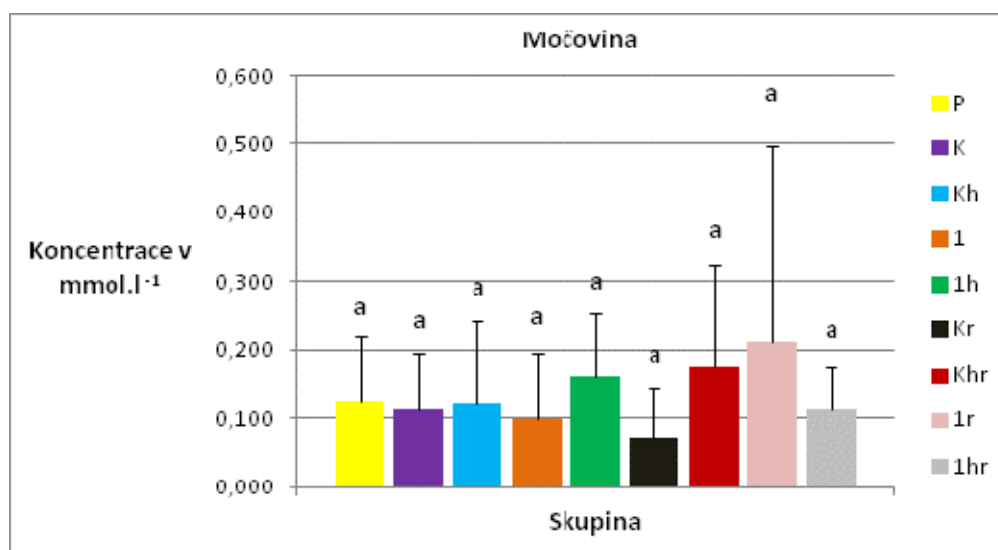
Označení skupin: **P** - ryby před expozicí; **K** - ryby kontrolní po 48 hodinách trvání pokusu; **Kh** - ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 48 hodinách trvání pokusu; **1** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO₂ v koncentraci 10 mg.l⁻¹; **1h** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO₂ v koncentraci 10 mg.l⁻¹ za přítomnosti přípravku Huminfeed v koncentraci 30 mg.l⁻¹; **Kr** – ryby kontrolní po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **Khr** – ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **1r** – ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **1hr** – ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě, jejichž expozice dusitanům probíhala za přítomnosti přípravku Huminfeed

Průměrné koncentrace kyseliny močové v krevní plazmě ryb jednotlivých skupin byly srovnatelné a zjištěné rozdíly nebyly statisticky významné. Na základě těchto

výsledků lze konstatovat, že zvýšená koncentrace dusitanů, ani přítomnost huminové látky HS 1500 neovlivnily koncentraci kyseliny močové v krevní plazmě ryb.

Močovina

Průměrné koncentrace močoviny v krevní plazmě včetně statistických rozdílů (Neparametrický Kruskal – Wallisův test, $p < 0,05$) jsou uvedeny v grafu 7.



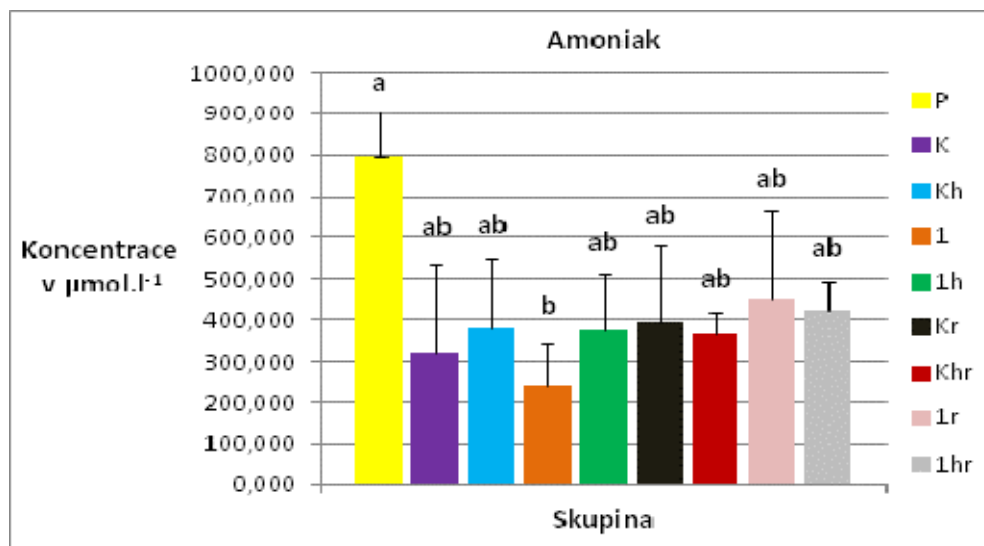
Graf. 7 Průměrná koncentrace močoviny v krevní plazmě jesetera malého

Označení skupin: **P** - ryby před expozicí; **K** - ryby kontrolní po 48 hodinách trvání pokusu; **Kh** - ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 48 hodinách trvání pokusu; **1** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO₂ v koncentraci 10 mg.l⁻¹; **1h** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO₂ v koncentraci 10 mg.l⁻¹ za přítomnosti přípravku Huminfeed v koncentraci 30 mg.l⁻¹; **Kr** – ryby kontrolní po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **Khr** – ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **1r** – ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **1hr** – ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě, jejichž expozice dusitanům probíhala za přítomnosti přípravku Huminfeed

Průměrné koncentrace močoviny v krevní plazmě ryb jednotlivých skupin byly srovnatelné a zjištěné rozdíly nebyly statisticky významné. Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že zvýšená koncentrace dusitanů, ani přítomnost huminové látky HS 1500 neovlivnily koncentraci močoviny v krevní plazmě ryb.

Amoniak

Průměrné koncentrace amoniaku v krevní plazmě včetně statistických rozdílů (Neparametrický Kruskal – Wallisův test, $p < 0,05$) jsou uvedeny v grafu 8.



Graf. 8 Průměrná koncentrace amoniaku v krevní plazmě jesetera malého

Označení skupin: **P** - ryby před expozicí; **K** - ryby kontrolní po 48 hodinách trvání pokusu; **Kh** - ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 48 hodinách trvání pokusu; **1** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO_2 v koncentraci 10 mg.l^{-1} ; **1h** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO_2 v koncentraci 10 mg.l^{-1} za přítomnosti přípravku Huminfeed v koncentraci 30 mg.l^{-1} ; **Kr** – ryby kontrolní po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **Khr** – ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **1r** – ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **1hr** – ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě, jejichž expozice dusitanům probíhala za přítomnosti přípravku Huminfeed

Z výsledků je patrné, že ryby měly zvýšenou koncentraci amoniaku v krevní plazmě před expozicí, což mohl být důsledek nedostatečného strávení potravy. V průběhu 48 hodin trvání testu se koncentrace amoniaku v krevní plazmě všech skupin ryb výrazně snížila a s výjimkou ryb skupiny 1 nebyly mezi jednotlivými skupinami ryb zjištěny statisticky významné rozdíly. V krvi ryb skupiny 1 došlo k nejvýraznějšímu poklesu koncentrace amoniaku (a tento rozdíl byl statisticky významný). Po rekonvalescenci byly koncentrace amoniaku u všech skupin ryb srovnatelné a rozdíly nebyly statisticky významné.

4. Diskuze

Na základě testů akutní toxicity provedených na jeseteru malém byly vypočteny hodnoty středních letálních koncentrací dusitanu sodného při expozici ryb 24, 48, 72 a 96 hodin. Výsledné hodnoty zjištěné v testu bez přítomnosti huminové látky HS 1500 obsažené v přípravku Huminfeed i v testu s přidavkem této látky byly velmi dobře srovnatelné. Hodnota 96hLC50 zjištěná v testu s přidavkem přípravku Huminfeed činila $10 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NaNO}_2$, což odpovídá koncentraci dusitanů $6,7 \text{ mg.l}^{-1}$. V testu bez přítomnosti tohoto přípravku to byly hodnoty $12,8 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NaNO}_2$ a $8,5 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$. Předpoklad možného pozitivního vlivu huminové látky HS 1500 na toleranci jesetera malého vůči dusitanům se tudíž nepotvrdil. Vlivem přítomnosti huminových látek ve vodě na toleranci ryb vůči dusitanům se zabývali např. Meinelt a kol. (2010) a Vaněček (2013). Oba autoři popisují ve svých pracích příznivý vliv huminových látek na toleranci vůči dusitanům v případě dania pruhovaného (*Danio rerio*). Meinelt a kol. (2010) konstatoval pozitivní vliv huminové látky ve své pokusu na embryích dania pruhovaného, kde se mu podařilo přidáním huminové látky HS 1500 zvýšit procento přežití embryí (autor však neuvádí konkrétní údaje). Rovněž Vaněček (2013) se zabýval vlivem huminové látky HS 1500, která byla součástí přípravku Dupla Cur. Tento autor uvádí, že vlivem přidavku přípravku Dupla Cur došlo ke zvýšení hodnoty 96hLC50 dusitanu sodného pro danio pruhované o 73 %. Ale, jak uvádí Vaněček (2013) dále, pozitivní vliv se neprokázal v testu na živorodce duhové. Z toho vyplývá, že vliv uvedeného přípravku na toleranci ryb vůči dusitanům úzce souvisí s druhem testovaných ryb. Vzhledem k tomuto faktu je zřejmé, že vliv huminových látek na toleranci ryb vůči dusitanům nelze zobecňovat (jako je tomu např. u chloridů). Pokud by měly být huminové látky využity jako prevence otrav ryb dusitany, je třeba ověřit jejich účinnost pro každý jednotlivý druh.

Zjištěné koncentrace 96hLC50 $8,5 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ (bez přípravku Huminfeed) a $6,7 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ (s přípravkem Huminfeed) korespondují s výsledky mé bakalářské práce (Bulíček, 2012), kde hodnota 96hLC50 u jesetera malého činila $7,73 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$. Ve své bakalářské práci (Bulíček, 2012) jsem se také zabýval akutní toxicitou dusitanů pro jesetera sibiřského. Zjištěné hodnota 96hLC50 činila $26,53 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$. Tyto výsledky ukazují, že jeseter malý je velmi citlivý druh. Tuto domněnku potvrzuje i práce Máchová a kol. (2009). Tito autoři se zabývali problematikou rozdílné citlivosti 3

hybridů jeseterů vůči dusitanům a uvádějí hodnoty 96hLC50 v rozmezí od 16-47 mg.l⁻¹ NO₂⁻.

To, že huminové látky obsažené v přípravku Huminfeed, neměly žádný vliv na toleranci jesetera malého vůči dusitanům, potvrdil i soubor hematologických a biochemických vyšetření, který byl proveden po 48 hodinové expozici ryb dusitanu sodnému a následně po 14 denní rekonvalescenci. Výsledky provedených vyšetření prokázaly, že hodnoty hemoglobinu, hematokritu, amoniaku, glukózy, kyseliny močové a močoviny nebyly v průběhu 48 hodinové expozice dusitanu sodného ovlivněny jeho přítomností, ani přítomností přípravku Huminfeed. Vliv dusitanů na vybrané hematologické a biochemické ukazatele studovali u kapra obecného např. Kroupová a kol. (2006). Uvedení autoři zjistili, že 48 hodinová expozice tohoto druhu ryby dusitanu sodnému v koncentraci 1,45 mmol.l⁻¹ (tj. 66,7 mg.l⁻¹ NO₂⁻) při koncentraci chloridů 0,31 mmol.l⁻¹ (tj. 11 mg.l⁻¹ Cl⁻) vyvolala zvýšení koncentrace amoniaku, močoviny a kyseliny močové v krevní plazmě, naopak hodnoty hematokritu, počtu erytrocytů a koncentrace hemoglobinu byly výrazně nižší než hodnoty u kontrolních ryb. Toto rozdílné zjištění může souviset s jiným druhem ryb použitým k testu a nižší koncentrací dusitanů, které byl jeseter malý vystaven.

Expozice ryb dusitanům se projevila nárůstem koncentrace laktátu v krevní plazmě, což pravděpodobně souvisí s tkáňovou hypoxií, která byla vyvolána sníženou kapacitou krve pro transport kyslíku. Negativní vliv dusitanů na schopnost krve přenášet kyslík je velmi dobře známa a popisuje ho řada autorů (Bodansky, 1951; Cameron, 1971 apod.).

Expozice jesetera malého dusitanům v koncentraci 6,7 mg.l⁻¹ NO₂⁻, tj. 2,0 mg.l⁻¹ N-NO₂⁻) bez přítomnosti huminové látky vyvolala u pokusných ryb nárůst koncentrace dusitanů v krevní plazmě na hodnotu 7,19 mg.l⁻¹ N-NO₂⁻, (tj. 23,6 mg.l⁻¹ NO₂⁻). To znamená, že koncentrace dusitanů zjištěná v krevní plazmě je cca 3,6 krát vyšší ve srovnání s jejich koncentrací ve vodě. Kroupová a kol. (2006) zjistila při výše uvedeném pokusu, že koncentrace dusitanového dusíku v krevní plazmě kaprů byla po expozici 7,2 krát vyšší než koncentrace ve vodě, což je v řádové shodě s výsledky, které jsem zjistil ve své práci.

5. Závěr

- 1) Přípravek Huminfeed nevykazuje v koncentracích 30 a 60 mg.l⁻¹ akutně toxický vliv na jesetera malého (*Acipenser ruthenus*).
- 2) Přípravek Huminfeed nevykazuje v koncentracích 60 a 120 mg.l⁻¹ akutně toxický vliv na živorodku duhovou (*Poecilia reticulata*).
- 3) Přípravek Huminfeed v koncentraci 30 mg.l⁻¹ neovlivňuje toleranci jesetera malého vůči dusitanům.
- 4) Vzhledem ke skutečnosti, že pozitivní vliv huminových látek na odolnost ryb vůči dusitanům závisí na druhu ryby, doporučuji provést s tímto přípravkem testy zejména s těmi druhy ryb, které jsou chovány v recirkulačních systémech, a které jsou dusitany nejvíce ohrožovány. V případě pozitivního výsledku doporučuji ověřit, zda přítomnost huminové látky neovlivní negativně funkci biologických filtrů.

- 5) Pokud jde o koncentraci přípravku Huminfeed, která by mohla být v praxi využita, doporučuji nepřekračovat hodnotu 30 mg.l⁻¹, aby se výrazně nezhoršily světelné podmínky v chovu ryb v důsledku ztmavnutí barvy vody.

6. Přehled použité literatury

- Baruš, V., Oliva, O., 1995. Mihulovci a ryby. Academia. Praha.
- Bodansky, O., Methemoglobinemia and methemoglobin – producing compounds. Pharmacological Review 3, 144 – 196. In Kroupová, H., Máchová, J., Piačková, V., Flajšhans, M., Svobodová, Z., Poleszczuk, G., 2006. Nitrite intoxication of common carp (*Cyprinus Carpio L.*) at different water temperatures. Acta Veterinaria Brno 75 (4), 561 – 569.
- Bulíček V., 2012. Akutní toxicita dusitanů pro jeseterovité ryby. Bakalářská práce, FROV JU, Vodňany.
- Cameron, J. N., 1971. Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 40, 743 – 749.
- Gela, D., Rodina M., Linhart O., 2008. Řízená reprodukce jeseterů (*Acipenser*). Edice metodik, VÚRH JU Vodňany, č. 78.
- Hanel, L., 1998. Svět zvířat VIII. Ryby 1. Albatros Praha.
- Hanel, L., 2001. Naše ryby a rybaření. Nakladatelství Brázda, s.r.o., Praha.
- Horák, J., Linhart, I., Klusoň P., 2004. Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.
- Horáková, M., Lischke, P., Grünwald, A., 1986. Chemické a fyzikální metody analýzy vod. SNTL – Nakladatelství technické literatury Alfa – vydavatelstvo technickej a ekonomickej literatúry, Bratislava.
- Jensen, F.B., 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. Comparative Biochemistry and Physiology – Part A, 135, 9-24.
- Kolář, L., 1987. Organické hnojení a humus. Vysoká škola zemědělská v Praze.
- Kolářová, J., Velíšek, J., 2012. Stanovení a vyhodnocení biochemického profilu krve ryb. Edice metodik, VÚRH JU Vodňany, č. 135.

- Kosaka, H., Tyuma, I., 1987. Mechanism of autocatalytic oxidation of oxyhemoglobin by nitrite. *Environmental Health Perspect* 73, 147-151.
- Kroupová, H., Máchová, J., Svobodová, Z., 2005. Nitrite in aquatic environment and its influence on fish. *Veterinární Medicína* 11, 461-471.
- Kroupová, H., Máchová, J., Svobodová, Z., Piačková, V., Smutná, M., 2006. The ability in common carp after nitrite poisoning. *Veterinární Medicína – CZECH* 51 (8), 423 - 431
- Lewis, W.M., Morris, D.P., 1986. Toxicity of Nitrite to Fish: A Review. *Transactions of the American Fisheries Society* 115, 183-195.
- Máchová, J., Velíšek, J., Kroupová, H., Sudová, E., Beránková, P., Flajšhans, M., Gela, D., 2009. Acute toxicity of nitrite and its effects on some biochemical parameters of sturgeons. In *Abstracts of the 46th Congress of the European Society of Toxicology, EUROTOX 2009, Dresden, Germany, Toxicology Letters* 189, S191.
- 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 Science* 262, 209-249.
- 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, 378-383.
- Pitter, P., 2009. *Hydrochemie*. Vydavatelství VŠCHT Praha.
- Shechter, H., Gruener, N., Shubal, H. I., 1972. Micromethod for the determination of nitrite in blood. *Analytica Chimica Acta* 60, 93 – 99
- Svobodová, Z., a kol., 1987. *Toxikologie vodních živočichů*. SZN, Praha.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Vykusová, B., 1992. Havarijní a dlouhodobé znečištění povrchových vod. *VÚRH, Vodňany*.

- Svobodová, Z., Máchová, J., Beklová, M., Cupáková, Š., Minks, J., 2000. Ekotoxikologie praktická cvičení, část I. Ústav veterinární a farmaceutická univerzita Brno.
- Svobodová, Z., a kol., 2007. Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb. Informatorium, Praha.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Kroupová, H., 2008. Otrava ryb. In Veterinární toxikologie v klinické praxi, Ed. Svobodová, Z., Profi Press.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Modrá, H., 2012. Metody hematologického vyšetřování ryb. Edice metodik, VÚRH JU Vodňany, č. 122.
- Švehla, P., Tlustoš, P., Balík, J., 2007. Odpadní vody. Česká zemědělská univerzita v Praze, Katedra agrochemie a výživy rostlin, druhé přepracované vydání.
- Vaněček, M., 2013. Snižují huminové látky toxicitu dusitanů pro ryby?. Bakalářská práce, FROV JU, Vodňany.
- Williams, E. M., Eddy, F. B., 1986. Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. *Journal of Comparative Physiology*. B 156, 867 – 872

7. Seznam zkratek

EC50: koncentrace testovaného vzorku, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50 % testovaných organismů *Daphnia magna*.

IC50: koncentrace testovaného vzorku, která způsobí 50 % inhibici růstu kořene hořčice bílé ve srovnání s kontrolou.

Koncentrace látky: hmotnost látky rozpuštěné v ředící vodě a doplněné do 1 litru ředící vodou (mg.l^{-1}).

Kontrola: ředící voda s testovacími organismy bez testovaného vzorku.

LC: letální koncentrace.

LC50: koncentrace testovaného vzorku, která způsobí úhyn 50 % testovaných ryb.

Limitní test: provádí se koncentrací 100 mg.l^{-1} testovaného vzorku, aby se prokázalo, že hodnota LC (EC, IC)50 tohoto vzorku je větší, než uvedená koncentrace (100 mg.l^{-1}).

Předběžný test: test k upřesnění koncentrací pro základní test, provádí se na širokém rozmezí koncentrací testovaného vzorku.

Ředící voda: voda připravena podle ČSN EN ISO 7346 nebo pitná voda, která je zbavena chloru probubláváním vzduchem po dobu 24 hodin. Údaje o použité ředící vodě je nutno uvést do protokolu.

Standard: $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ – kontrolní látka, u níž je opakovaně určována hodnota LC(EC, IC)50 tzv. vnitřní kontrola laboratoře. Změny LC(EC, IC)50 standardu odrážejí variabilitu podmínek testu a kondici testovaných organismů.

Základní test: test, jehož výsledky umožňují dostatečně přesně stanovit hodnotu LC(EC, IC)50. Tvoří ho zpravidla 6 až 10 různých koncentrací testovaného vzorku v rozmezí stanoveném předběžným testem.

8. SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1:** Sledování základních parametrů kvality vody v průběhu zkoušky toxicity na živorodce duhové
- Příloha 2:** Sledování základních parametrů kvality vody v průběhu zkoušky toxicity na jeseteru malém
- Příloha 3:** Sledování základních parametrů kvality vody v průběhu základního testu na jeseteru malém s přítomností přípravku Huminfeed
- Příloha 4:** Sledování základních parametrů kvality vody v průběhu základního testu na jeseteru malém bez přítomnosti přípravku Huminfeed
- Příloha 5:** Sledování základních parametrů kvality vody v průběhu testu na jeseteru malém
- Příloha 6:** Kontrolní stanovení koncentrace dusitanů ve vodě po skončení testu
- Příloha 7:** Naměřené hodnoty hemoglobinu u ryb před expozicí
- Příloha 8:** Naměřené hodnoty hematokritu u ryb před expozicí
- Příloha 9:** Naměřené hodnoty methemoglobinu u ryb před expozicí
- Příloha 10:** Naměřené hodnoty biochemického profilu krve u ryb před expozicí
- Příloha 11:** Naměřené hodnoty červených krvinek u ryb před expozicí
- Příloha 12:** Naměřené hodnoty bílých krvinek u ryb před expozicí
- Příloha 13:** Naměřené hodnoty hemoglobinu u ryb po 48 hodinové expozici
- Příloha 14:** Naměřené hodnoty hemoglobinu u ryb po 48 hodinové expozici
- Příloha 15:** Naměřené hodnoty hematokritu u ryb po 48 hodinové expozici
- Příloha 16:** Naměřené hodnoty hematokritu u ryb po 48 hodinové expozici
- Příloha 17:** Naměřené hodnoty methemoglobinu u ryb po 48 hodinové expozici
- Příloha 18:** Naměřené hodnoty methemoglobinu u ryb po 48 hodinové expozici
- Příloha 19:** Naměřené hodnoty biochemického profilu krve u ryb po 48 hodinové expozici
- Příloha 20:** Naměřené hodnoty biochemického profilu krve u ryb po 48 hodinové expozici
- Příloha 21:** Naměřené hodnoty červených krvinek u ryb po 48 hodinové expozici
- Příloha 22:** Naměřené hodnoty červených krvinek u ryb po 48 hodinové expozici
- Příloha 23:** Naměřené hodnoty bílých krvinek u ryb po 48 hodinové expozici
- Příloha 24:** Naměřené hodnoty bílých krvinek u ryb po 48 hodinové expozici

- Příloha 25:** Naměřené hodnoty hemoglobinu u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci
- Příloha 26:** Naměřené hodnoty hemoglobinu u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci
- Příloha 27:** Naměřené hodnoty hematokritu u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci
- Příloha 28:** Naměřené hodnoty hematokritu u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci
- Příloha 29:** Naměřené hodnoty methemoglobinu u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci
- Příloha 30:** Naměřené hodnoty methemoglobinu u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci
- Příloha 31:** Naměřené hodnoty biochemického profilu krve u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci
- Příloha 32:** Naměřené hodnoty biochemického profilu krve u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci
- Příloha 33:** Naměřené hodnoty červených krvinek u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci
- Příloha 34:** Naměřené hodnoty červených krvinek u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci
- Příloha 35:** Naměřené hodnoty bílých krvinek u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci
- Příloha 36:** Naměřené hodnoty bílých krvinek u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci
- Příloha 37:** Počet vzorků, které byly v jednotlivých skupinách použity při hodnocení jednotlivých parametrů
- Příloha 38:** Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém bez přítomnosti přípravku Huminfeed, výsledná hodnota 24hLC50= 26,3 mg.l⁻¹
- Příloha 39:** Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém bez přítomnosti přípravku Huminfeed, výsledná hodnota 48hLC50= 20,5 mg.l⁻¹
- Příloha 40:** Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém bez přítomnosti přípravku Huminfeed, výsledná hodnota 72hLC50= 15,7 mg.l⁻¹
- Příloha 41:** Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém bez přítomnosti přípravku Huminfeed, výsledná hodnota 96hLC50= 12,8 mg.l⁻¹
- Příloha 42:** Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém s přítomností přípravku Huminfeed, výsledná hodnota 24hLC50= 32,7 mg.l⁻¹
- Příloha 43:** Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém s přítomností přípravku Huminfeed, výsledná hodnota 48hLC50= 20,0 mg.l⁻¹
- Příloha 44:** Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém s přítomností přípravku Huminfeed, výsledná hodnota 72hLC50= 16,1 mg.l⁻¹

Příloha 45: Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém s přítomností přípravku Huminfeed, výsledná hodnota 93hLC50= 10,0 mg.l⁻¹

9. Přílohy

Příloha 1 Sledování základních parametrů kvality vody v průběhu testu na živorodce duhové

Číslo nádrže	Koncentrace huminové látky (mg.l ⁻¹)	Teplota (°C)					Kyslík (% nasycení)					pH				
		Datum měření a délka expozice														
		2.12	3.12	4.12	5.12	6.12	2.12	3.12	4.12	5.12	6.12	2.12	3.12	4.12	5.12	6.12
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1	60	17,9	19	19	19	19	92	85	71	72	70	7,9	7,6	7,5	7,4	7,4
2	120	17,7	19	19	19	19	94	89	85	72	67	7,8	7,7	7,5	7,4	7,4
Kontrola	0	17,3	19	19	19	19	93	89	70	70	68	8	7,9	7,5	7,5	7,5

Příloha 2 Sledování základních parametrů kvality vody v průběhu testu na jeseteru malém

Číslo nádrže	Koncentrace huminové látky (mg.l ⁻¹)	Teplota (°C)					Kyslík (% nasycení)					pH				
		Datum měření a délka expozice														
		2.12	3.12	4.12	5.12	6.12	2.12	3.12	4.12	5.12	6.12	2.12	3.12	4.12	5.12	6.12
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1	30	17	19	19	19	19	91	83	80	90	75	7,7	7,4	7,4	7,5	7,5
2	60	17,1	19	19	19	19	91	85	79	91	82	7,7	7,4	7,4	7,5	7,5
Kontrola	0	17	19	19	19	19	81	75	80	85	67	7,4	7,4	7,5	7,6	7,4

Příloha 3 Sledování základních parametrů kvality vody v průběhu základního testu na jeseteru malém s přítomností přípravku Huminfeed

Číslo nádrže	Koncentrace NaNO ₂ (mg.l ⁻¹)	Teplota (°C)					Kyslík (% nasycení)					pH				
		Datum měření a délka expozice														
		11.12	12.2	13.12	14.12	15.12	11.12	12.12	13.12	14.12	15.12	11.12	12.12	13.12	14.12	15.12
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1	1	17,5	18	17	18	17,9	111	111,5	102	97	93	8	7,8	7,5	7,4	7,4
2	5	17,3	18	18	18	18,2	105	112	100	95	92	7,8	7,8	7,6	7,5	7,4
3	10	17,4	17,6	17,5	18	18	109	114	98	97	95	7,9	7,8	7,6	7,4	7,3
4	20	17,2	17,4	17,5	18	18	111	112,9	100	94	89	7,8	7,8	7,6	7,5	7,3
5	30	17,5	17,7	17	18		109	114	105	95		7,8	7,8	7,6	7,4	
6	50	17,5	17,4	17	18	18	106	116	103	97	93	7,8	7,8	7,6	7,4	7,4
Kontrola	0	17,7	18	17	18,5	18,2	111	108	98	92	87	7,8	7,8	7,5	7,4	7,3

Příloha 4 Sledování základních parametrů kvality vody v průběhu základního testu na jeseteru malém bez přítomnosti přípravku Huminfeed

Číslo nádrže	Koncentrace NaNO ₂ (mg.l ⁻¹)	Teplota (°C)					Kyslík (% nasycení)					pH				
		Datum měření a délka expozice														
		11.12	12.12	13.12	14.12	15.12	11.12	12.12	13.12	14.12	15.12	11.12	12.12	13.12	14.12	15.12
0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h		
1	1	17,5	18	17	18,5	18,5	105	108	98	95	93	7,6	7,7	7,8	7,8	7,8
2	5	17,4	18	17,5	18,9	18,7	109	107	100	97	94	7,6	7,7	7,7	7,8	7,8
3	10	17,5	18	18	18,7	18,8	110	109	101	100	97	7,6	7,7	7,7	7,7	7,8
4	20	17,7	18	17,5	18	18,5	98	102	101	100	95	7,6	7,6	7,6	7,6	7,7
5	30	17,7	18	16,9	17,5	18	104	108	99	95	94	7,6	7,7	7,6	7,6	7,7
6	50	17,4	18	17	17,9		106	110	105	92		7,6	7,8	7,6	7,6	
Kontrola	0	17,6	18,1	17,5	18,5	18,6	107	101	88	85	84	7,6	7,6	7,9	7,9	7,9

Příloha 5 Sledování základních parametrů kvality vody v průběhu testu na jeseteru malém

Označení nádrže	Koncentrace NaNO ₂ (mg.l ⁻¹)	Koncentrace huminové látky (mg.l ⁻¹)	Teplota (°C)			Kyslík (% nasycení)			pH		
			Datum měření a délka expozice								
			11.2	12.2	13.2	11.2	12.2	13.2	11.2	12.2	13.2
			0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
K1	0	0	15,5	16,4	16,5	95	96	107	7,9	7,8	7,7
K2	0	0	16	17,1	16,8	103	103	94	7,8	7,7	7,8
1	10	0	16	17	16,9	101	112	108	7,7	7,8	7,8
2	10	0	16	17,1	17	100	108	106	7,7	7,7	7,7
K1H	0	30	15	16,2	16,5	95	100	105	7,8	7,7	7,7
K2H	0	30	16	17,2	16,6	97	108	88	7,7	7,8	7,8
1H	10	30	16	16,8	16,9	101	111	103	7,7	7,8	7,8
2H	10	30	16,5	16,9	16,4	101	109	103	7,8	7,7	7,7

Příloha 6 Kontrolní stanovení koncentrace dusitanů ve vodě po skončení testu

Číslo nádrže	Teplota (°C)	Kyslík (% nasycení)	pH	Koncentrace NO ₂ ⁻ (mg.l ⁻¹)
	Datum měření			
	27.2	27.2	27.2	27.2
K1	15,6	98	7,9	0,175
K2	16	101	7,7	0,020
1	15,9	103	7,8	0,660
2	15,9	104	7,8	0,540
K1H	15,7	98,4	7,7	0,390
K2H	16,3	104	7,7	0,155
1H	15,5	103	7,7	0,610
2H	16	105	7,7	0,025

Příloha 7 Naměřené hodnoty hemoglobinu u ryb před expozicí

Skupina	Absorbance	Koncentrace hemoglobinu v g.l ⁻¹
P	0,179	64,10
P	0,170	60,88
P	0,166	59,44
P	0,156	55,86
P	0,193	69,11

Příloha 8 Naměřené hodnoty hematokritu u ryb před expozicí

Skupina	A	B	Průměr	Koncentrace hematokritu v l.l ⁻¹
P	21	20	20,5	0,21
P	21	23,5	22,25	0,22
P	20,5	20	20,25	0,20
P	23	24	23,5	0,24
P	27	25	26	0,26

Příloha 9 Naměřené hodnoty methemoglobinu ryb před expozicí

Skupina	M1	N1	M2	N2	%
P	0,194	0,138	0,065	0,020	91,4
P	0,206	0,069	0,064	0,007	43,6
P	0,217	0,088	0,079	0,016	52,17
P	0,214	0,082	0,031	0,009	39,89
P	0,256	0,102	0,055	0,030	35,82

Příloha 10 Naměřené hodnoty biochemického profilu krve u ryb před expozicí

Skupina	Glukóza (mmol.l ⁻¹)	Laktát (mmol.l ⁻¹)	kyselina močová	močovina	NH ₃ (μmol.l ⁻¹)	Koncentrace dusitanů v krvi (mg.l ⁻¹)
P	-	-	-	-	-	-
P	3,14	0,4	5,9	0	653	0,065
P	2,14	0,51	6,1	0,1	817	0,023
P	2,2	0,54	6	0,2	790	0,010
P	2,88	0,71	6,1	0,2	924	0,016

Příloha 11 Naměřené hodnoty červených krvinek u ryb před expozicí

Skupina	paralelka																				Součet	Koncentrace (T.l ⁻¹)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
P	3	3	5	4	4	5	6	7	6	8	4	4	4	3	6	3	6	3	5	3	92	0,92
P																						
P	3	3	2	2	6	4	3	2	2	2	0	5	2	2	2	1	4	2	3	1	51	0,51
P	2	1	6	4	2	2	2	1	3	4	3	3	2	1	2	3	2	6	3	6	58	0,58
P																				-		

Příloha 12 Naměřené hodnoty bílých krvinek u ryb před expozicí

Skupina	paralelka										součet	Koncentrace (G.l ⁻¹)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
P	5	3	1	1	6	2	2	4	1	5	30	15
P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P	2	2	0	2	1	6	1	4	3	3	24	12
P	1	1	3	2	2	1	1	1	1	3	16	8
P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Příloha 13 Naměřené hodnoty hemoglobinu u ryb po 48 hodinové expozici

Skupina	Absorbance	Koncentrace hemoglobinu v g.l ⁻¹
K	0,154	55,15
K	0,186	66,60
K	0,462	165,44
K	0,175	62,67
K	0,184	65,89
K	0,163	58,37
K	0,160	57,29
K	0,122	43,69
K	0,126	45,12
K	0,092	32,94
Kh	0,142	50,85
Kh	0,148	53,00
Kh	0,121	43,33
Kh	0,180	64,46
Kh	0,133	47,63
Kh	0,121	43,33
Kh	0,170	60,88
Kh	0,132	47,27
Kh	0,140	50,13
Kh	0,173	61,95

Příloha 14 Naměřené hodnoty hemoglobinu u ryb po 48 hodinové expozici

Skupina	Absorbance	Koncentrace hemoglobinu v g.l ⁻¹
1	0,142	50,85
1	0,157	56,22
1	0,149	53,36
1	0,125	44,76
1	0,148	53,00
1	0,141	50,49
1	0,160	57,29
1	0,131	46,91
1	0,172	61,59
1	0,129	46,19
1h	0,152	54,43
1h	0,145	51,92
1h	0,169	60,52
1h	0,155	55,50
1h	0,147	52,64
1h	0,117	41,90
1h	0,159	56,94
1h	0,135	48,34
1h	0,155	55,50
1h	0,146	52,28

Příloha 15 Naměřené hodnoty hematokritu u ryb po 48 hodinové expozici

Skupina	A	B	Průměr	Koncentrace hematokritu v l.l ⁻¹
K	27	28	27,5	55,15
K	28	30	29	66,60
K	21	19	20	165,44
K	27	29	28	62,67
K	30	28	29	65,89
K	30	28	29	58,37
K	30	28	29	57,29
K	24	24	24	43,69
K	22	22	22	45,12
K	28	26	27	32,94
Kh	22	22	22	50,85
Kh	28	26	27	53,00
Kh	19	18	18,5	43,33
Kh	26	28	27	64,46
Kh	20	20	20	47,63
Kh	-	-	-	43,33
Kh	26	26	26	60,88
Kh	22	22	22	47,27
Kh	25	25	25	50,13
Kh	28	28	28	61,95

Příloha 16 Naměřené hodnoty hematokritu u ryb po 48 hodinové expozici

Skupina	A	B	Průměr	Koncentrace hematokritu v l.l ⁻¹
1	21	20,5	20,75	50,85
1	26	28	27	56,22
1	23	23	23	53,36
1	22	21,5	21,75	44,76
1	17	17	17	53,00
1	22	23	22,5	50,49
1	24	22	23	57,29
1	20	20	20	46,91
1	29	25	27	61,59
1	22	20,5	21,25	46,19
1h	20	22	21	54,43
1h	26	26	26	51,92
1h	34	32	33	60,52
1h	24	25	24,5	55,50
1h	25	24	24,5	52,64
1h	-	-	-	41,90
1h	22,5	22	22,25	56,94
1h	23	22	22,5	48,34
1h	21	23	22	55,50
1h	24	24,5	24,25	52,28

Příloha 17 Naměřené hodnoty methemoglobinu u ryb po 48 hodinové expozici

Skupina	M1	N1	M2	N2	%
K	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-
K	0,041	0,056	0,045	0,060	100,00
K	0,021	0,022	0,023	0,024	100,00
K	0,029	0,022	0,028	0,023	-100,00
K	0,025	0,020	0,024	0,023	-300,00
K	0,023	0,020	0,022	0,020	0,00
K	0,025	0,018	0,023	0,016	100,00
K	0,021	0,022	0,020	0,021	100,00
Kh	0,022	0,025	0,032	0,035	100,00
Kh	0,070	0,027	0,028	0,029	-4,76
Kh	0,057	0,070	0,066	0,066	-44,44
Kh	-	-	-	-	-
Kh	0,043	0,027	0,059	0,027	0,00
Kh	0,052	0,046	0,050	0,045	50,00
Kh	0,024	0,025	0,023	0,027	-200,00
Kh	0,025	0,023	0,032	0,025	28,57
Kh	0,022	0,029	0,021	0,025	400,00
Kh	0,031	0,018	0,030	0,023	-500,00

Příloha 18 Naměřené hodnoty methemoglobinu u ryb po 48 hodinové expozici

Skupina	M1	N1	M2	N2	%
1	0,031	0,031	0,032	0,035	400,00
1	0,041	0,036	0,045	0,036	0,00
1	0,029	0,039	0,030	0,041	200,00
1	0,038	0,034	0,035	0,037	-100,00
1	0,065	0,065	0,066	0,068	300,00
1	0,030	0,029	0,024	0,028	16,67
1	0,033	0,027	0,026	0,029	-28,57
1	0,053	0,041	0,050	0,045	-133,33
1	0,033	0,035	0,031	0,036	-50,00
1	-	-	-	-	-
1h	-	-	-	-	-
1h	0,025	0,032	0,024	0,031	100,00
1h	0,028	0,025	0,027	0,022	300,00
1h	0,036	0,032	0,035	0,030	200,00
1h	0,034	0,037	0,029	0,039	-40,00
1h	-	-	-	-	-
1h	0,033	0,033	0,032	0,032	100,00
1h	0,028	0,033	0,025	0,033	0,00
1h	0,049	0,046	0,045	0,047	-25,00
1h	0,052	0,044	0,045	0,050	-85,71

Příloha 19 Naměřené hodnoty biochemického profilu krve u ryb po 48 hodinové expozici

Skupina	Glukóza (mmol.l ⁻¹)	Laktát (mmol.l ⁻¹)	kyselina močová (μmol.l ⁻¹)	Močovina (mmol.l ⁻¹)	NH ₃ (μmol.l ⁻¹)	Koncentrace dusitanů v krvi (mg.l ⁻¹)
K	-	-	-	-	-	0,000
K	1,94	0,61	6,3	0,1	606	0,019
K	-	-	-	-	-	-
K	2,45	0,52	6,2	0,2	613	0,014
K	1,7	0,51	6,1	0,2	436	0,013
K	1,73	0,52	0,1	0	124	0,037
K	1,58	0,5	6	0,1	144	0,029
K	2,13	0,51	6,1	0	151	0,003
K	1,93	0,5	6,2	0,2	201	0,020
K	1,83	0,51	5,9	0,1	282	0,006
Kh	2,19	0,61	6	0,1	563	0,001
Kh	2,09	0,7	6,3	0,2	432	0,013
Kh	1,8	0,53	6,2	0,4	534	0,028
Kh	-	-	-	-	-	-
Kh	1,77	0,61	6	0,1	611	0,008
Kh	2,51	0,92	6	0,1	473	0,002
Kh	2,15	0,53	6	0	155	0,013
Kh	2,02	0,56	6,2	0,1	312	0,003
Kh	2,07	0,51	6	0,1	189	0,013
Kh	2,32	0,5	6,1	0	156	0,012

Příloha 20 Naměřené hodnoty biochemického profilu krve u ryb po 48 hodinové expozici

Skupina	Glukóza (mmol.l ⁻¹)	Laktát (mmol.l ⁻¹)	kyselina močová (μmol.l ⁻¹)	Močovina (mmol.l ⁻¹)	NH ₃ (μmol.l ⁻¹)	Koncentrace dusitanů v krvi (mg.l ⁻¹)
1	1,97	1,84	6,2	0,1	214	3,940
1	2,36	1,93	0,1	6,1	209	9,166
1	2,28	2,01	6,1	0,2	229	3,734
1	2,01	1,8	6,2	0,1	201	3,341
1	2,04	2,38	6,1	0,3	529	14,503
1	1,72	1,52	6	0,1	197	6,825
1	1,8	1,6	6,1	0	203	7,873
1	1,64	1,75	6	0,1	231	5,645
1	2,02	1,95	5,9	0	197	5,720
1	1,48	1,38	5,9	0	191	9,802
1h	-	-	-	-	-	-
1h	1,79	2,13	6	0,2	244	11,451
1h	1,86	2,67	6,1	0	272	6,825
1h	2,06	2,08	6	0,1	248	6,900
1h	1,74	1,87	5,9	0,2	259	6,619
1h	-	-	-	-	-	-
1h	1,78	1,74	6,2	0,2	508	7,237
1h	2,38	2,53	6,3	0,3	574	8,491
1h	1,83	2,08	5,9	0,1	493	3,847
1h	1,74	2,38	6,1	0,2	408	7,255

Příloha 21 Naměřené hodnoty červených krvinek u ryb po 48 hodinové expozici

Skupina	Paralelka																				Součet	Koncentrace (T.l ⁻¹)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	9	6	8	4	4	5	1	2	1	5	6	4	6	4	3	4	5	3	1	4	85	0,85
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	6	2	6	5	6	1	5	7	8	3	5	5	3	2	4	4	3	3	5	4	87	0,87
K	3	9	5	0	6	3	4	4	4	5	5	5	4	3	2	4	1	4	6	6	83	0,83
K	4	4	9	9	9	5	4	6	5	6	8	6	6	7	7	8	5	7	5	8	128	1,28
K	2	4	1	8	3	1	2	5	2	5	2	6	4	7	4	2	4	3	5	7	77	0,77
K	2	6	4	1	1	2	0	3	0	1	3	2	2	2	4	2	5	1	3	2	46	0,46
K	3	5	5	5	2	1	1	5	4	5	6	7	3	5	5	5	6	3	4	7	87	0,87
K	5	3	2	2	4	3	7	6	7	8	3	6	5	3	5	5	7	5	2	5	93	0,93
Kh	3	2	4	3	1	7	2	4	5	3	4	2	2	1	2	6	2	2	3	3	61	0,61
Kh	4	2	0	2	1	3	2	2	6	5	1	2	2	1	2	3	3	5	3	1	50	0,5
Kh	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kh	3	3	7	7	6	4	5	3	7	3	8	6	6	3	5	7	2	5	6	4	100	1
Kh	4	2	0	1	3	7	4	2	4	3	3	7	5	2	2	2	2	5	3	4	65	0,65
Kh	4	2	5	5	6	2	2	4	4	5	1	4	3	3	7	2	4	4	3	3	73	0,73
Kh	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kh	2	4	2	5	3	3	3	1	3	5	4	3	4	5	6	5	5	3	2	6	74	0,74
Kh	4	7	3	6	5	4	2	8	9	3	3	4	6	4	7	5	3	3	3	5	94	0,94
Kh	2	7	7	2	5	3	4	4	8	5	6	7	4	4	2	5	4	6	5	5	95	0,95

Příloha 22 Naměřené hodnoty červených krvinek u ryb po 48 hodinové expozici

Skupina	Paralelka																				Součet	Koncentrace (T.l ⁻¹)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
1	3	2	3	2	7	6	2	6	5	2	3	2	4	4	5	5	3	2	3	3	72	0,72
1	5	1	2	6	8	6	4	6	4	5	4	6	4	5	9	5	6	1	3	4	94	0,94
1	5	3	2	5	3	2	4	6	7	5	7	3	2	4	3	5	2	5	5	5	83	0,83
1	4	6	4	6	9	7	1	2	7	9	1	5	4	6	5	3	4	5	4	3	95	0,95
1	3	1	0	2	5	3	2	1	2	2	2	4	3	3	3	0	7	5	4	3	55	0,55
1	3	6	3	4	12	11	4	6	4	4	6	4	5	1	7	6	6	6	5	4	107	1,07
1	6	6	6	4	6	4	6	7	3	5	6	6	7	7	3	5	5	3	4	10	109	1,09
1	9	4	6	7	3	7	6	3	12	7	5	6	5	6	7	4	7	7	8	2	121	1,21
1	3	4	7	3	2	7	2	3	8	5	4	5	4	8	8	6	6	2	6	5	98	0,98
1	3	2	4	6	1	4	5	6	4	5	7	4	8	6	1	4	4	4	5	6	89	0,89
1h	4	6	2	3	3	2	6	4	6	9	5	1	4	8	4	3	4	6	5	1	86	0,86
1h	6	11	6	1	5	3	2	10	6	4	2	7	6	6	7	4	2	7	3	6	104	1,04
1h	5	4	6	4	5	4	3	8	7	5	7	3	1	5	10	8	5	4	8	8	110	1,1
1h	7	13	6	13	8	10	4	12	6	3	10	6	5	14	5	5	5	9	8	8	157	1,57
1h	5	6	5	4	9	9	6	4	7	4	8	5	4	5	6	7	7	6	7	5	119	1,19
1h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1h	7	1	7	3	3	3	3	6	8	1	3	2	3	6	8	6	4	5	8	7	94	0,94
1h	5	6	6	6	3	3	3	4	7	4	2	9	2	4	6	2	6	4	3	4	89	0,89
1h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Příloha 23 Naměřené hodnoty bílých krvinek u ryb po 48 hodinové expozici

Skupina	paralelka										Součet	Koncentrace (G.l ⁻¹)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	1	5	1	7	5	4	6	5	5	12	51	25,5	
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
K	11	8	9	8	4	8	11	7	4	7	77	38,5	
K	3	3	3	3	3	4	1	0	3	7	30	15	
K	8	5	6	4	2	3	2	2	4	4	40	20	
K	6	7	6	8	7	3	5	6	8	4	60	30	
K	2	2	1	3	1	1	2	2	2	3	19	9,5	
K	3	3	2	6	2	1	6	1	2	5	31	15,5	
K	1	6	3	2	4	2	6	4	7	4	39	19,5	
Kh	2	1	1	2	6	1	2	3	3	4	25	12,5	
Kh	3	3	1	1	2	3	6	2	2	0	23	11,5	
Kh	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Kh	3	3	4	3	7	4	1	6	4	5	40	20	
Kh	3	3	1	4	3	1	8	3	1	7	34	17	
Kh	4	2	3	3	4	1	1	3	2	1	24	12	
Kh	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Kh	7	3	4	2	2	1	7	3	3	2	34	17	
Kh	7	6	5	6	6	8	4	4	4	6	56	28	
Kh	5	2	3	1	5	4	4	7	4	4	39	19,5	

Příloha 24 Naměřené hodnoty bílých krvinek u ryb po 48 hodinové expozici

Skupina	paralelka										Součet	Koncentrace (G.l ⁻¹)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	2	3	1	3	1	2	1	2	1	2	18	9
1	3	2	2	3	6	6	2	6	6	3	39	19,5
1	2	1	3	2	1	2	3	1	2	1	18	9
1	2	6	8	8	3	2	6	12	5	3	55	27,5
1	5	3	1	3	4	4	9	8	4	5	46	23
1	20	22	16	25	23	16	20	9	20	8	179	89,5
1	23	19	16	24	28	23	29	34	26	13	235	117,5
1	6	9	14	9	5	11	7	8	11	10	90	45
1	4	5	8	8	8	6	6	6	5	10	66	33
1	2	1	6	2	2	8	4	4	3	7	39	19,5
1h	0	0	4	1	1	4	2	1	1	1	15	7,5
1h	6	8	7	8	10	11	11	8	4	10	83	41,5
1h	7	11	8	8	9	6	6	2	7	7	71	35,5
1h	10	12	10	7	8	9	9	17	10	17	109	54,5
1h	11	8	9	8	12	13	4	9	2	7	83	41,5
1h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1h	5	3	8	7	4	5	5	3	5	5	50	25
1h	5	2	1	2	2	4	3	1	3	4	27	13,5
1h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Příloha 25 Naměřené hodnoty hemoglobinu u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci

Skupina	Absorbance	Koncentrace hemoglobinu v g.l ⁻¹
Kr	0,163	58,37
Kr	0,109	39,03
Kr	0,154	55,15
Kr	0,191	68,40
Kr	0,159	56,94
Kr	0,168	60,16
Kr	0,121	43,33
Kr	0,125	44,76
Kr	-	-
Kr	-	-
Khr	0,145	51,92
Khr	0,202	72,33
Khr	0,111	39,75
Khr	-	-
Khr	0,158	56,58
Khr	0,180	64,46
Khr	0,125	44,76
Khr	-	-
Khr	0,169	60,52
Khr	0,190	68,04

Příloha 26 Naměřené hodnoty hemoglobinu u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci

Skupina	Absorbance	Koncentrace hemoglobinu v g.l ⁻¹
1r	0,113	40,46
1r	0,133	47,63
1r	0,139	49,77
1r	0,148	53,00
1r	0,197	70,54
1r	0,162	58,01
1r	0,147	52,64
1r	0,165	59,08
1r	0,150	53,71
1r	0,145	51,92
1hr	0,151	54,07
1hr	0,148	53,00
1hr	0,111	39,75
1hr	0,170	60,88
1hr	-	-
1hr	0,162	58,01
1hr	-	-
1hr	0,136	48,70
1hr	0,126	45,12
1hr	0,225	80,57

Příloha 27 Naměřené hodnoty hematokritu u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci

Skupina	A	B	Průměr	koncentrace hematokritu v l.l ⁻¹
Kr	22	22	22	58,37
Kr	18	16	17	39,03
Kr	20	22	21	55,15
Kr	22	22	22	68,40
Kr	20	20	20	56,94
Kr	-	-	-	60,16
Kr	18	20	19	43,33
Kr	22	20	21	44,76
Kr	30	32	31	-
Kr	20	20	20	-
Khr	22	20	21	51,92
Khr	25	23	24	72,33
Khr	-	-	-	39,75
Khr	18	20	19	-
Khr	20	20	20	56,58
Khr	21	18	19,5	64,46
Khr	20	20	20	44,76
Khr	20	20	20	-
Khr	22	22	22	60,52
Khr	54	54	54	68,04

Příloha 28 Naměřené hodnoty hematokritu u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci

Skupina	A	B	Průměr	Koncentrace hematokritu v l.l ⁻¹
1r	20	18	19	40,46
1r	19	18	18,5	47,63
1r	22	24	23	49,77
1r	18	20	19	53,00
1r	-	-	-	70,54
1r	22	24	23	58,01
1r	20	22	21	52,64
1r	22	20	21	59,08
1r	25	23	24	53,71
1r	18	16	17	51,92
1hr	25	23	24	54,07
1hr	21	21	21	53,00
1hr	22	20	21	39,75
1hr	21	23	22	60,88
1hr	30	32	31	-
1hr	21	21	21	58,01
1hr	-	-	-	-
1hr	22	20	21	48,70
1hr	17	16	16,5	45,12
1hr	-	-	-	80,57

Příloha 29 Naměřené hodnoty methemoglobinu u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci

Skupina	M1	N1	M2	N2	%
Kr	0,248	0,090	0,145	0,070	19,41
Kr	0,149	0,047	0,041	0,032	13,88
Kr	0,0160	0,063	0,056	0,044	18,26
Kr	0,238	0,092	0,103	0,078	10,37
Kr	0,200	0,089	0,081	0,072	11,76
Kr	0,144	0,098	0,067	0,063	45,45
Kr	0,147	0,090	0,067	0,060	37,5
Kr	0,158	0,100	0,074	0,071	34,52
Kr	0,196	0,209	0,121	0,145	85,33
Kr	-	-	-	-	-
Khr	0,187	0,111	0,101	0,101	11,62
Khr	0,279	0,136	0,155	0,110	20,97
Khr	-	-	-	-	-
Khr	0,196	0,099	0,092	0,079	19,23
Khr	-	-	-	-	-
Khr	-	-	-	-	-
Khr	0,146	0,060	0,035	0,028	28,82
Khr	-	-	-	-	-
Khr	0,280	0,141	0,174	0,088	50
Khr	-	-	-	-	-

Příloha 30 Naměřené hodnoty methemoglobinu u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci

Skupina	M1	N1	M2	N2	%
1r	0,217	0,092	0,102	0,047	39,13
1r	-	-	-	-	-
1r	0,169	0,145	0,067	0,085	58,82
1r	0,139	0,130	0,063	0,071	77,63
1r	-	-	-	-	-
1r	0,177	0,114	0,051	0,066	38,09
1r	0,179	0,139	0,083	0,063	79,16
1r	-	-	-	-	-
1r	-	-	-	-	-
1r	-	-	-	-	-
1hr	0,222	0,074	0,072	0,055	12,66
1hr	0,180	0,090	0,056	0,046	35,48
1hr	0,160	0,075	0,049	0,050	22,52
1hr	0,190	0,074	0,071	0,066	6,72
1hr	-	-	-	-	-
1hr	-	-	-	-	-
1hr	-	-	-	-	-
1hr	0,151	0,121	0,060	0,061	65,93
1hr	0,145	0,137	0,084	0,092	73,77
1hr	0,167	0,120	0,070	0,075	46,39

Příloha 31 Naměřené hodnoty biochemického profilu krve u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci

Skupina	Glukóza (mmol.l ⁻¹)	Laktát (mmol.l ⁻¹)	kyselina močová (μmol.l ⁻¹)	Močovina (mmol.l ⁻¹)	NH ₃ (μmol.l ⁻¹)	Koncentrace dusitanů v krvi (mg.l ⁻¹)
Kr	2,01	2,06	5,9	0,1	497	0,013
Kr	1,61	1,82	5,9	0,1	496	0,039
Kr	-	-	-	-	-	-
Kr	1,38	1,68	5,9	0	379	0,014
Kr	1,8	1,7	6,1	0	559	0,033
Kr	2,38	1,69	6,2	0,2	548	0,000
Kr	1,08	1,01	6	0,1	169	0,000
Kr	1,8	0,48	6	0	96	0,018
Kr	-	-	-	-	-	-
Kr	-	-	-	-	-	-
Khr	1,94	1,95	5,9	0,1	428	0,043
Khr	-	-	-	-	-	-
Khr	-	-	-	-	-	-
Khr	1,78	1,27	5,9	0,1	328	0,015
Khr	-	-	-	-	-	-
Khr	-	-	-	-	-	-
Khr	1,99	1,4	6	0,1	328	0,006
Khr	-	-	-	-	-	-
Khr	1,98	1,68	6,1	0,4	386	0,000
Khr	-	-	-	-	-	-

Příloha 32 Naměřené hodnoty biochemického profilu krve u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci

Skupina	Glukóza (mmol.l ⁻¹)	Laktát (mmol.l ⁻¹)	kyselina močová (μmol.l ⁻¹)	Močovina (mmol.l ⁻¹)	NH ₃ (μmol.l ⁻¹)	Koncentrace dusitanů v krvi (mg.l ⁻¹)
1r	1,72	1,68	6	0,1	404	0,093
1r	-	-	-	-	-	-
1r	2,01	1,98	6,2	0,2	486	0,029
1r	1,29	1,08	5,9	0,1	306	0,056
1r	-	-	-	-	-	-
1r	1,93	1,38	5,9	0,1	379	0,024
1r	1,78	1,08	5,9	0	348	0,021
1r	6,38	3,48	6,8	0,9	950	0,029
1r	1,34	0,98	5,9	0,1	301	0,052
1r	2,08	1,29	6,1	0,2	428	0,093
1hr	1,69	1,74	6,1	0,1	445	0,057
1hr	1,08	0,74	5,9	0	286	0,000
1hr	1,94	1,56	6,2	0,1	378	0,041
1hr	2,01	1,78	6,1	0,2	420	0,071
1hr	-	-	-	-	-	0,011
1hr	1,6	1,28	5,9	0,1	396	0,013
1hr	-	-	-	-	-	-
1hr	1,78	1,54	5,9	0,1	440	0,000
1hr	1,98	1,79	6,3	0,2	526	0,000
1hr	1,68	1,38	6,1	0,1	486	0,000

Příloha 33 Naměřené hodnoty červených krvinek u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci

Skupina	Paralelka																				Součet	Koncentrace (T.l ⁻¹)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
Kr	0	3	3	1	1	4	0	3	1	1	1	3	2	1	1	0	3	4	1	3	36	0,36
Kr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kr	3	4	4	6	0	3	2	2	2	3	4	3	3	4	7	1	3	3	2	3	62	0,62
Kr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kr	3	0	1	1	1	2	2	1	0	2	5	1	1	2	3	1	1	1	1	1	30	0,3
Kr	4	4	2	5	3	3	2	2	4	2	6	4	0	4	3	4	4	5	1	5	67	0,67
Kr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kr	1	1	4	2	2	3	0	2	3	1	1	2	4	1	2	2	1	3	4	4	43	0,43
Kr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Khr	1	1	1	1	2	3	0	1	2	0	2	2	4	0	2	2	0	2	0	2	28	0,28
Khr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Khr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Khr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Khr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Khr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Khr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Khr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Khr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Khr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Příloha 34 Naměřené hodnoty červených krvinek u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci

Skupina	Paralelka																				Součet	Koncentrace (T.l ⁻¹)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
1r	6	3	2	4	4	3	7	5	3	3	2	6	2	2	0	2	0	1	4	3	62	0,62
1r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1r	0	4	0	2	2	2	3	3	3	1	3	2	2	2	2	4	0	4	4	2	45	0,45
1r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1r	2	0	1	2	5	2	3	2	3	3	5	2	4	1	4	2	3	5	4	1	54	0,54
1r	3	2	3	3	2	2	3	1	3	2	3	2	3	2	3	5	2	4	2	3	53	0,53
1r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1r	2	4	1	2	4	0	5	2	4	5	4	7	2	4	3	3	4	3	5	2	66	0,66
1r	2	6	2	0	3	2	2	4	1	3	3	3	3	2	1	4	4	3	3	2	53	0,53
1hr	3	1	8	6	3	3	1	2	2	3	2	1	3	2	1	4	5	6	3	3	62	0,62
1hr	2	3	3	1	6	2	1	3	2	4	3	3	2	2	4	2	5	2	3	2	55	0,55
1hr	4	0	0	4	3	4	4	2	1	1	2	2	3	4	1	5	5	6	3	5	59	0,59
1hr	2	3	3	2	1	3	2	4	1	3	4	5	0	3	2	2	3	3	5	0	51	0,51
1hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1hr	2	3	3	0	2	3	1	1	3	1	5	3	3	0	2	1	2	1	3	5	44	0,44
1hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1hr	6	4	5	4	3	5	7	6	5	9	8	0	4	8	6	5	2	10	8	3	108	1,08

Příloha 35 Naměřené hodnoty bílých krvinek u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci

Skupina	paralelka										Součet	Koncentrace (G.l ⁻¹)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Kr	1	3	1	4	1	2	1	3	2	3	21	10,5
Kr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kr	4	0	1	4	3	0	3	2	3	0	20	10
Kr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kr	2	1	3	2	1	3	3	1	2	2	20	10
Kr	1	1	2	0	1	1	2	2	1	2	13	6,5
Kr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kr	2	1	2	0	1	1	0	2	1	2	12	6
Kr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Khr	3	3	5	0	5	4	3	2	6	2	33	16,5
Khr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Khr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Khr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Khr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Khr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Khr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Khr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Khr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Khr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Příloha 36 Naměřené hodnoty bílých krvinek u ryb po 14 – ti denní rekonvalescenci

Skupina	paralelka										Součet	Koncentrace (G.l ⁻¹)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1r	2	2	4	4	3	3	2	2	2	1	25	12,5
1r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1r	0	2	1	2	2	1	2	2	1	2	15	7,5
1r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1r	1	3	4	4	2	3	2	4	2	1	26	13
1r	3	1	1	2	2	3	4	3	1	2	22	11
1r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1r	1	1	1	2	1	2	0	2	1	1	12	6
1r	1	2	3	2	1	1	1	2	2	1	16	8
1hr	1	2	2	2	1	3	3	2	1	2	19	9,5
1hr	4	2	3	2	5	3	1	1	2	1	24	12
1hr	1	2	3	2	1	1	1	2	1	1	15	7,5
1hr	3	0	1	1	1	2	1	1	2	1	13	6,5
1hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1hr	1	2	2	2	1	1	1	2	1	2	15	7,5
1hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1hr	3	3	3	4	3	3	2	3	2	1	27	13,5

Příloha 37 Počet vzorků, které byly v jednotlivých skupinách použity při hodnocení jednotlivých parametrů

Hodnocený parametr	Počet vzorků, které byly hodnoceny ve skupině								
	P	K	Kh	1	1h	Kr	Khr	1r	1hr
Hemoglobin	5	9	10	10	10	8	8	10	8
Hematokrit	5	10	9	10	9	9	9	9	8
Dusitany	4	9	9	10	8	7	4	8	9
Glukóza	4	8	9	10	8	7	4	8	8
Laktát	4	8	9	10	8	7	4	8	8
Kyselina močová	4	8	9	10	8	7	4	8	8
Močovina	4	8	9	10	8	7	4	8	8
Amoniak	4	8	9	10	8	7	4	8	8

Označení skupin: **P** - ryby před expozicí; **K** - ryby kontrolní po 48 hodinách trvání pokusu; **Kh** - ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 48 hodinách trvání pokusu; **1** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO₂ v koncentraci 10 mg.l⁻¹; **1h** - ryby pokusné po 48 hodinové expozici NaNO₂ v koncentraci 10 mg.l⁻¹ za přítomnosti přípravku Huminfeed v koncentraci 30 mg.l⁻¹; **Kr** – ryby kontrolní po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **Khr** – ryby kontrolní s přítomností huminové látky po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **1r** – ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě; **1hr** – ryby pokusné po 14 denní rekonvalescenci v ředící vodě, jejichž expozice dusitanům probíhala za přítomnosti přípravku Huminfeed

Příloha 38 Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém bez přítomnosti přípravku Huminfeed, výsledná hodnota 24hLC50= 26,3 mg.l⁻¹

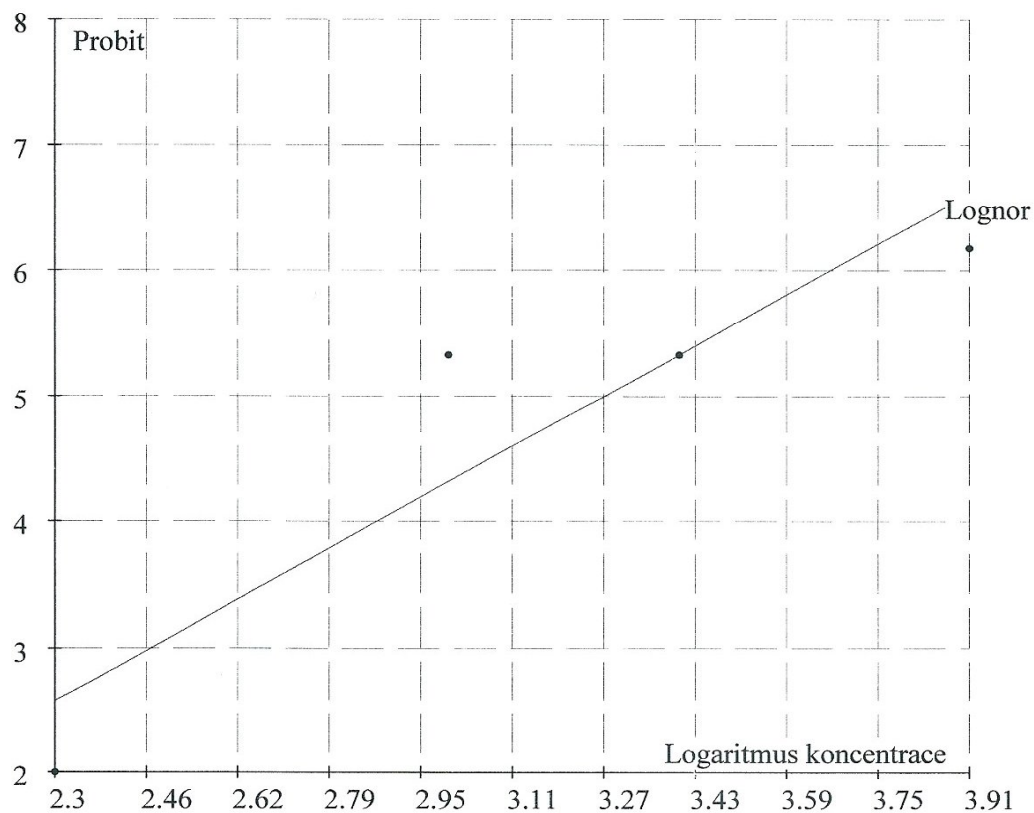
Zkouška: CHEMICKÉ LÁTKY Datum měření: 11.12.2013
Číslo vzorku: NaNO2 bez hum látky Příloha: 1
Označení vzorku:

Vstupní hodnoty: základní test

Koncentrace mg/l	Mortalita %
10	0.0
20	63.0
30	63.0
50	88.0

24hLC50 = 26.3 mg/l s 95% intervalem spolehlivosti (-27.1 , +13.3)

LC0 = 7.9 mg/l
 LC100 = 87.0 mg/l



Příloha 39 Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém bez přítomnosti přípravku Huminfeed, výsledná hodnota 48hLC50= 20,5 mg.l⁻¹

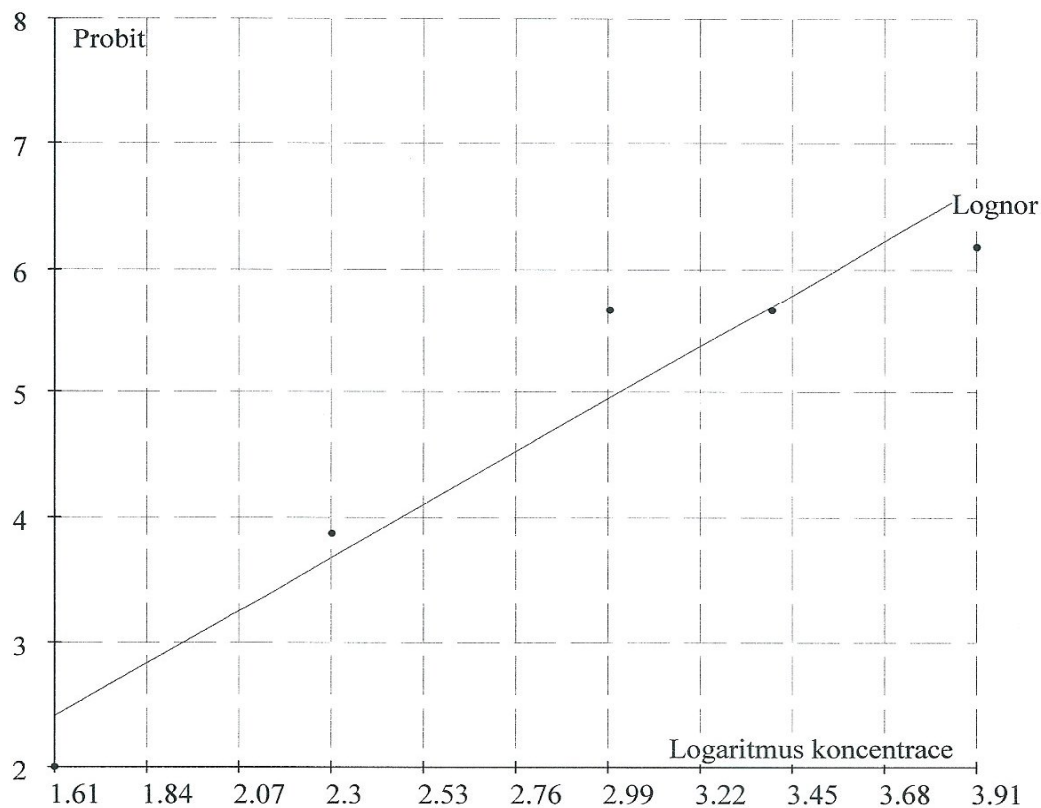
Zkouška: CHEMICKÉ LÁTKY Datum měření: 11.12.2013
Číslo vzorku: NaNO2 bez hum látky Příloha: 1
Označení vzorku:

Vstupní hodnoty: základní test

Koncentrace mg/l	Mortalita %
5	0.0
10	13.0
20	75.0
30	75.0
50	88.0

48hLC50 = 20.5 mg/l s 95% intervalem spolehlivosti (-10.8 , +7.1)

LC0 = 4.0 mg/l
 LC100 = 104.8 mg/l



Příloha 40 Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém bez přítomnosti přípravku Huminfeed, výsledná hodnota 72hLC50= 15,7 mg.l⁻¹

Zkouška: CHEMICKÉ LÁTKY Datum měření: 11.12.2013

Číslo vzorku: NaNO₂ bez hum látky Příloha: 1

Označení vzorku:

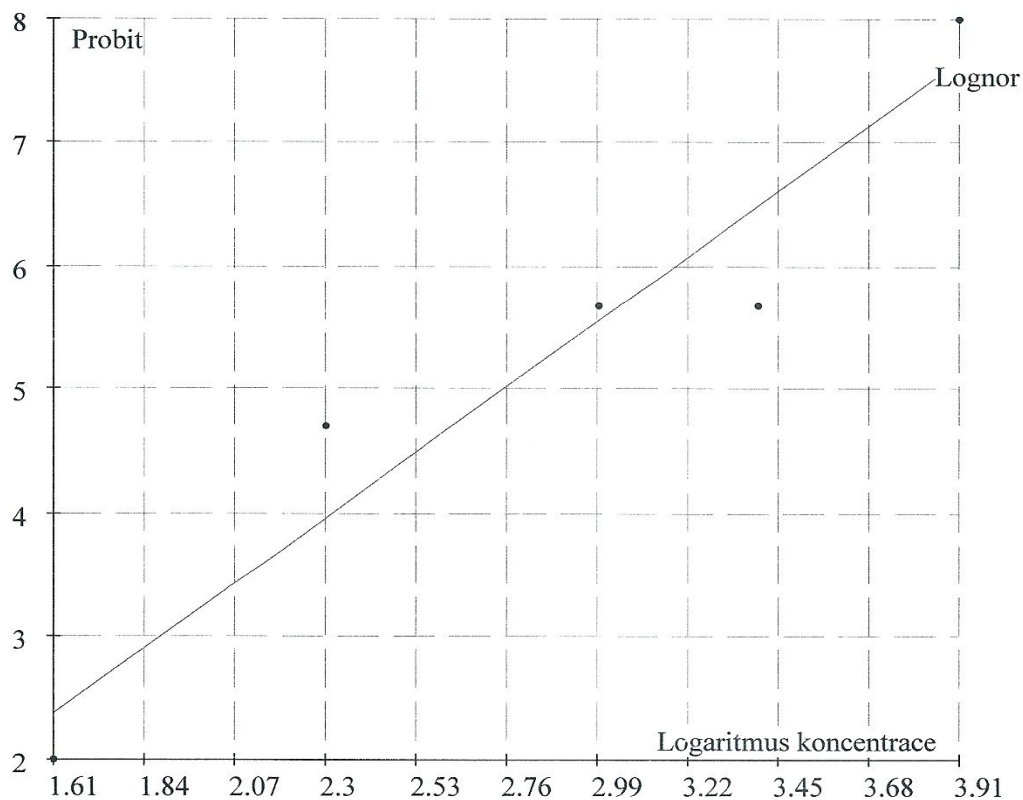
Vstupní hodnoty: základní test

Koncentrace mg/l	Mortalita %
5	0.0
10	38.0
20	75.0
30	75.0
50	100.0

72hLC50 = 15.7 mg/l s 95% intervalem spolehlivosti (-8.2 , +5.4)

LC0 = 4.2 mg/l

LC100 = 58.0 mg/l



Příloha 41 Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém bez přítomnosti přípravku Huminfeed, výsledná hodnota 96hLC50= 12,8 mg.l⁻¹

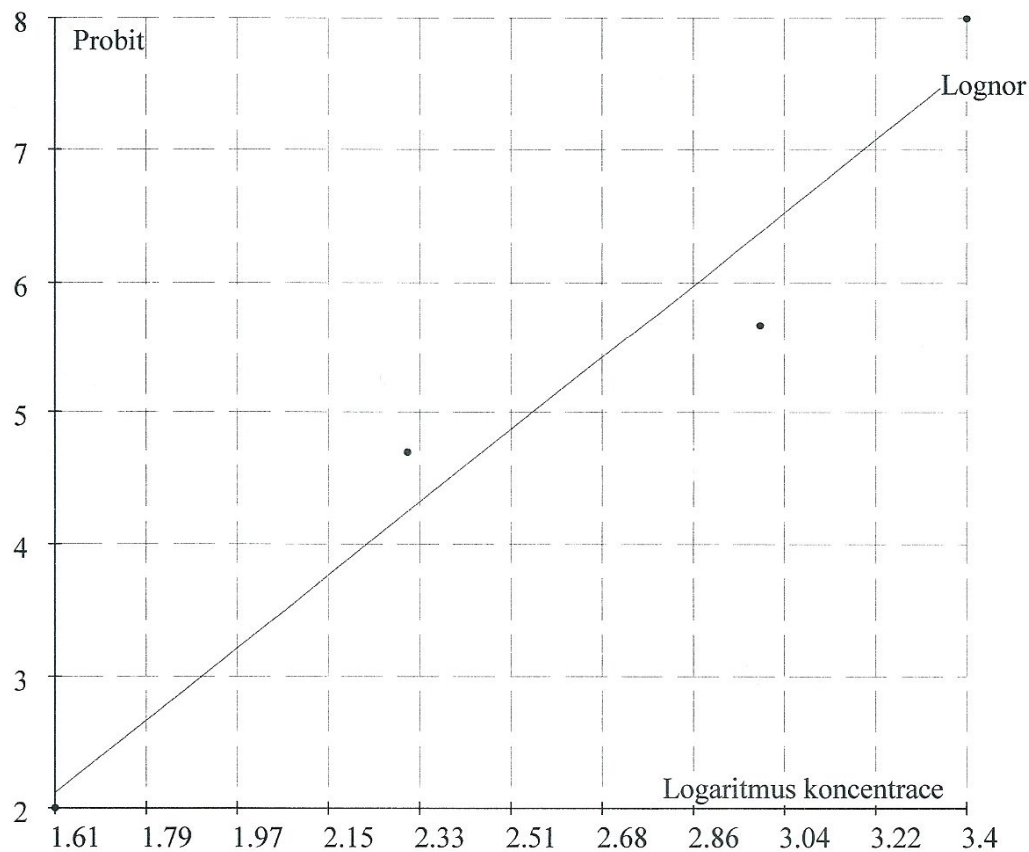
Zkouška: CHEMICKÉ LÁTKY Datum měření: 11.12. 2013
Číslo vzorku: NaNO2 bez hum látky Příloha: 1
Označení vzorku:

Vstupní hodnoty: základní test

Koncentrace mg/l	Mortalita %
5	0.0
10	38.0
20	75.0
30	100.0

96hLC50 = 12.8 mg/l s 95% intervalem spolehlivosti (-7.2 , +4.6)

LC0 = 4.8 mg/l
 LC100 = 33.9 mg/l



Příloha 42 Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém s přítomností přípravku Huminfeed, výsledná hodnota 24hLC50= 32,7 mg.l⁻¹

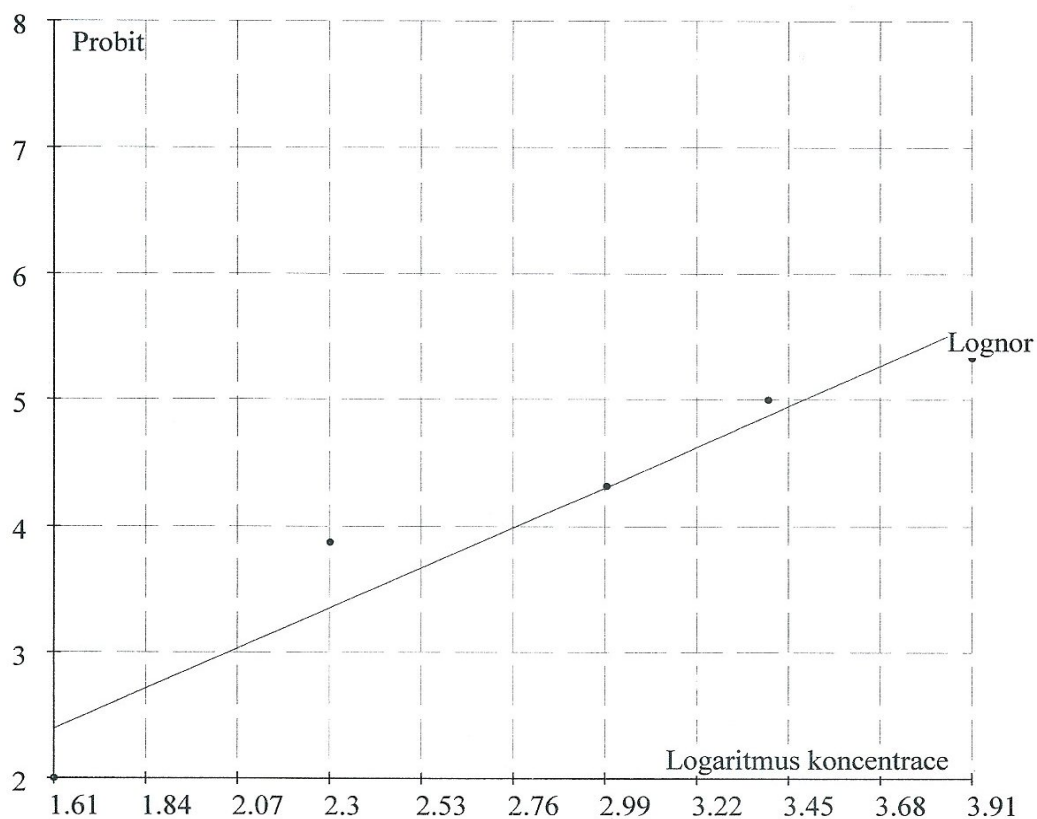
Zkouška: CHEMICKÉ LÁTKY Datum měření: 11.12.2013
Číslo vzorku: NaNO₂ s hum látkou Příloha: 1
Označení vzorku:

Vstupní hodnoty: základní test

Koncentrace mg/l	Mortalita %
5	0.0
10	13.0
20	25.0
30	50.0
50	63.0

24hLC50 = 32.7 mg/l s 95% intervalem spolehlivosti (-21.7 , +13.1)

LC0 = 3.8 mg/l
 LC100 = 284.5 mg/l



Příloha 43 Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém s přítomností přípravku Huminfeed, výsledná hodnota 48hLC50= 20,0 mg.l⁻¹

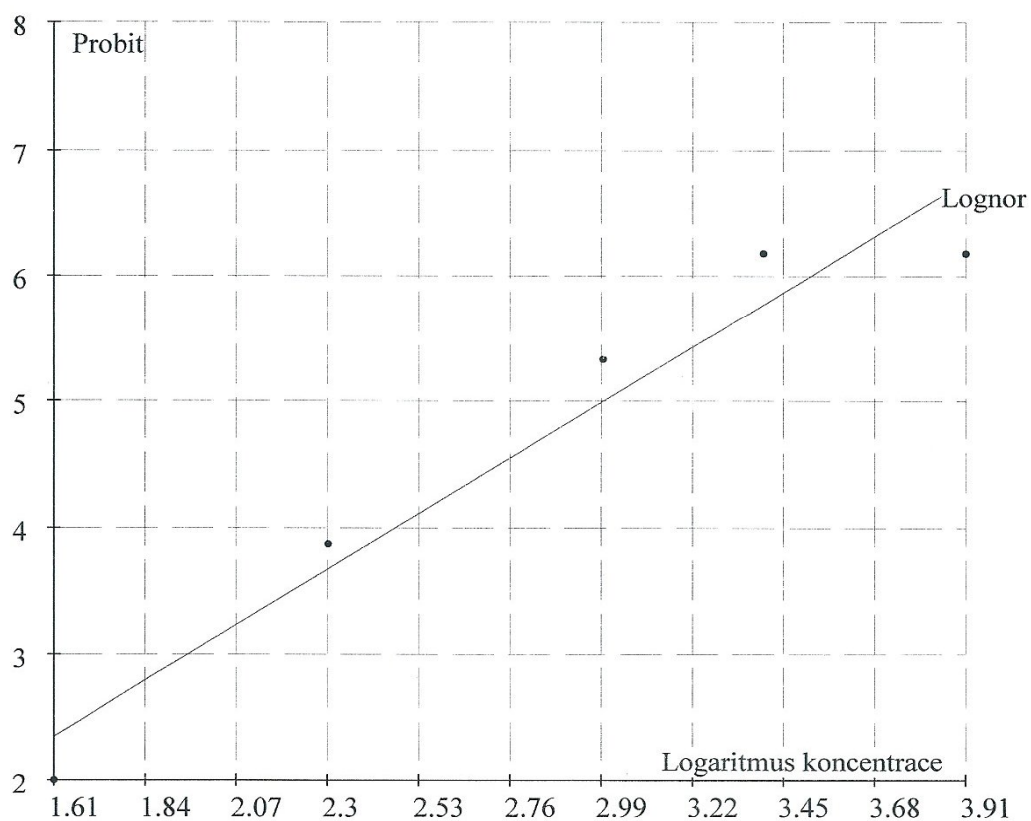
Zkouška: CHEMICKÉ LÁTKY **Datum měření:** 11.12.2014
Číslo vzorku: NaNO₂ s hum látkou **Příloha:** 1
Označení vzorku:

Vstupní hodnoty: **základní test**

Koncentrace mg/l	Mortalita %
5	0.0
10	13.0
20	63.0
30	88.0
50	88.0

48hLC50 = 20.0 mg/l s 95% intervalem spolehlivosti (-9.0 , +6.2)

LC0 = 4.1 mg/l
LC100 = 96.5 mg/l



Příloha 44 Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém s přítomností přípravku Huminfeed, výsledná hodnota 72hLC50= 16,1 mg.l⁻¹

Zkouška: **CHEMICKÉ LÁTKY** Datum měření: **11.12.2013**
 Číslo vzorku: **NaNO₂ s hum látkou** Příloha: **1**
 Označení vzorku:

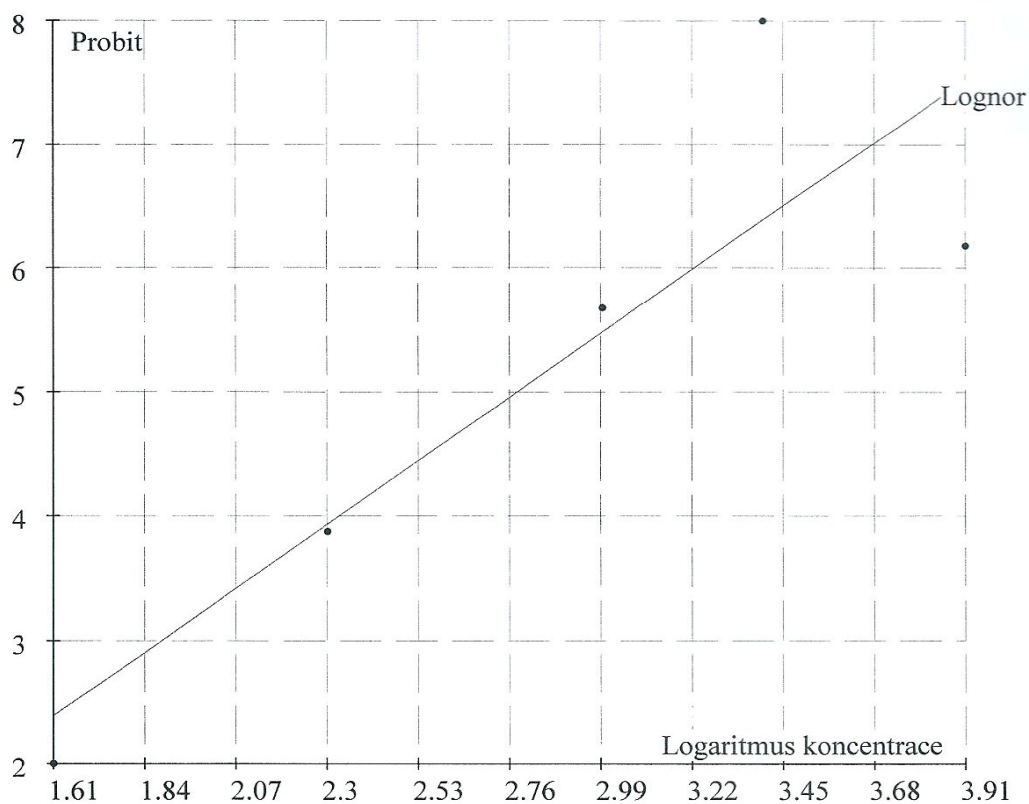
Vstupní hodnoty: základní test

Koncentrace mg/l	Mortalita %
5	0.0
10	13.0
20	75.0
30	100.0
50	88.0

72hLC50 = 16.1 mg/l s 95% intervalem spolehlivosti (-16.4 , +8.1)

LC0 = 4.2 mg/l

LC100 = 61.8 mg/l



Příloha 45 Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém s přítomností přípravku Huminfeed, výsledná hodnota 96hLC50= 10,0 mg.l⁻¹

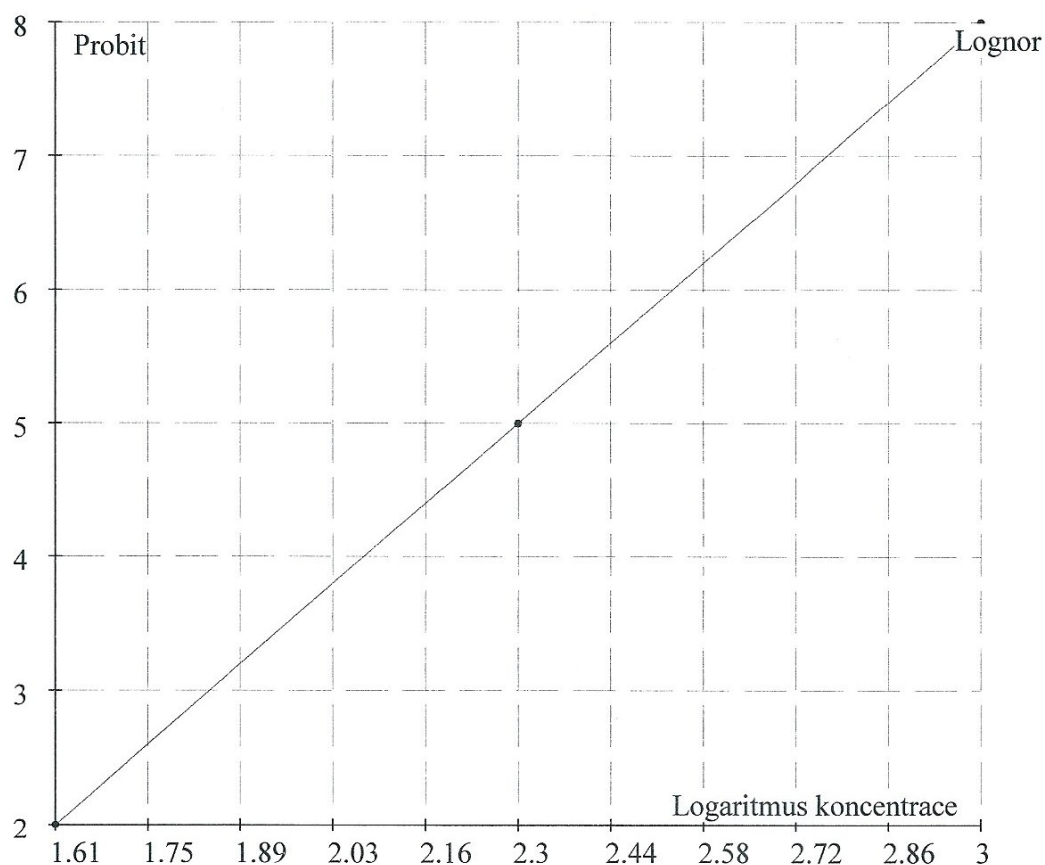
Zkouška: CHEMICKÉ LÁTKY **Datum měření: 11.12.2013**
Číslo vzorku: NaNO₂ s hum látkou **Příloha: 1**
Označení vzorku:

Vstupní hodnoty: **základní test**

Koncentrace mg/l	Mortalita %
5	0.0
10	50.0
20	100.0

96hLC50 = 10.00 mg/l s 95% intervalem spolehlivosti (-0.00 ; +0.00)

LC0 = 5.00 mg/l
 LC100 = 20.00 mg/l



10. Abstrakt

Vliv huminové látky HS 1500 na toleranci jesetera malého vůči dusitanům

Cílem práce bylo posoudit vliv huminové látky HS 1500 na toleranci jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) vůči dusitanům. Jako zdroj látky HS 1500 byl použit přípravek Huminfeed. Tolerance jesetera malého vůči dusitanům byla posouzena na základě výsledků testů akutní toxicity a na základě výsledků hematologického a biochemického vyšetření krve ryb, které byly vystaveny zvýšené koncentraci dusitanů v přítomnosti a bez přítomnosti přípravku Huminfeed. Testy byly provedeny podle normy ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod. Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby /*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae*)/.

Výsledky testů akutní toxicity provedené s dusitanem sodným bez přídavku huminové látky (96hLC50 = 12,8 mg.l⁻¹ NaNO₂) a s přídavkem huminové látky v koncentraci 30 mg.l⁻¹ (96hLC50 = 10,0 mg.l⁻¹ NaNO₂) byly velmi dobře srovnatelné a prokázaly, že přítomnost huminové látky neovlivnila akutní letální účinky dusitanů na tento druh ryby. Vliv přítomnosti přípravku Huminfeed nebyl prokázán ani hematologickým a biochemickým vyšetřením krve ryb (hodnoceny byly následující parametry: hemoglobin, hematokrit, glukóza, laktát, kyselina močová, močovina, amoniak a koncentrace dusitanů v krevní plazmě), které byly po dobu 48 hodin vystaveny koncentraci 10 mg.l⁻¹ NaNO₂. Na základě těchto výsledků byl vysloven závěr, že přítomnost přípravku Huminfeed s obsahem huminové látky HS 1500 neovlivňuje toleranci jesetera malého vůči dusitanům.

Klíčová slova: akutní toxicita, biochemické vyšetření, dusitany, hematologické vyšetření, huminové látky, Huminfeed, jeseter malý, 96hLC50.

11. Abstract

Influence of humic substance HS 1500 on tolerance of Sterlet to nitrite

The aim of the thesis was to assess the effect of humic substance HS 1500 on the tolerance of Sterlet (*Acipenser ruthenus*) to nitrite. Preparation Huminfeed was used as a source of substance HS 1500. Tolerance of Sterlet to nitrite was assessed on the basis of the results of acute toxicity tests and the results of haematological and biochemical blood examination of fish that were exposed to increased concentrations of nitrite in the presence and absence of preparation Huminfeed. The tests were performed according to internationally recognized standards ČSN EN ISO 7346-2 (Water quality. Determination of acute lethal toxicity of substances to freshwater fish / *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae) / . Part 2: Refresh method).

Results of acute toxicity tests performed with sodium nitrite without the addition of humic substance (96hLC50 = 12.8 mg.l⁻¹ NaNO₂) and with the addition of humic substance in a concentration of 30 mg.l⁻¹ (96hLC50 = 10.0 mg.l⁻¹ NaNO₂) were very comparable and showed that the presence of humic substance did not influence acute lethal effects of nitrite on this fish species. Influence of the presence of preparation Huminfeed has not been demonstrated either by haematological and biochemical examination of blood of fish which had been exposed for 48 hours to concentration of 10 mg.l⁻¹ NaNO₂ (following parameters were assessed: haemoglobin, haematocrit, glucose, lactate, uric acid, urea, ammonia and concentration of nitrite in the blood). Based on these results, it can be concluded that the presence of preparation Huminfeed containing humic substance HS 1500 does not affect tolerance of Sterlet to nitrite.

Keywords: acute toxicity, biochemical examination, nitrite, haematological examination, humic substances, Huminfeed, Sterlet, 96hLC50.