

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

**Vylučování amoniaku rybami za rozdílných
oxických podmínek prostředí**

Autor: Lucie Müllerová

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Olga Valentová

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

Studijní program a obor: Ekologie a ochrana prostředí, Ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice, 2015

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě. Zveřejnění je elektronickou formou v databázi 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: 5. 5. 2015

Podpis studenta:

Lucie Müllerová

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Olze Valentové a neméně tak i konzultantce Ing. Janě Máchové, Ph.D. za metodické vedení, odbornou pomoc, užitečné rady, trpělivost a všechen čas, který mi věnovaly během měření a zpracovávání této práce.

Dále bych ráda poděkovala dr. hab. Ing. Josefu Velískovi, Ph.D. za pomoc při statistickém vyhodnocení dat a odběrech a biochemickém vyšetření krve ryb.

Rovněž bych chtěla poděkovat techničce Iloně Prokopové za čas a pomoc v průběhu měření a stejně tak i celému kolektivu Laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie VÚRH JU ve Vodňanech.

Můj dík patří také prof. MVDr. Zdeňce Svobodové, DrSc., která mi velmi ochotně pomohla v orientaci v biochemické problematice mé práce.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta rybářství a ochrany vod
Akademický rok: 2013/2014

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

Jméno a příjmení: **Lucie MÜLLEROVÁ**
Osobní číslo: **V12B022P**
Studijní program: **B1601 Ekologie a ochrana prostředí**
Studijní obor: **Ochrana vod**
Název tématu: **Vylučování amoniaku rybami za rozdílných oxických podmínek prostředí**
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

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

Cíl práce: Cílem práce je vyhodnotit a porovnat intenzitu vylučování amoniaku rybami při rozdílné koncentraci rozpuštěného kyslíku ve vodě.

Metodický postup: Budou provedeny experimenty na kapru obecném, který bude ve dvou časových intervalech po příjmu krmiva vystaven rozdílným oxickým podmínkám (100% nasycení vody kyslíkem a výrazný deficit kyslíku). V průběhu následných 2-5 hodin budou měřeny koncentrace amoniaku ve vodě, kde byly ryby umístěny a vypočtena specifická produkce amoniaku. V závěru pokusu bude rybám odebrána krev na stanovení amoniaku v krevní plazmě.

Rozsah grafických prací: cca 5 tabulek a 5 grafů

Rozsah pracovní zprávy: 25-45 stran

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Horáková, M., Lischke, P., Grunwald, A., 1986. Chemické a fyzikální metody analýzy vod. SNTL Praha 1989, 389 s.

Rosso, F. L. D., Bolner, K., & Baldisserotto, B. 2006. Ion fluxes in silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. *Neotropical Ichthyology*, 4(4), 435-440s.

Smutná, M., Svobodová, Z., Vorlová, L., 2001. Vznik a pohyb amoniaku ve vnitřním prostředí ryb. (Source and move of ammonia in internal environment of fishes). In: *Sborník z konference Ochrana zdraví ryb. VÚRH JU Vodňany*, 97-112s.

Svobodová, Z., Máchová, J., Kroupová, H., Smutná, M., Groch, L., 2007.

Ammonia autointoxication of common carp: case studies. *Aquaculture International*, 15 (3-4): 277-286s.

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Olga Valentová

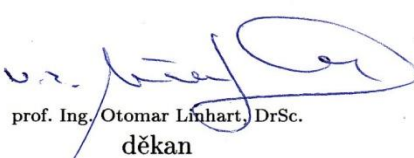
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

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


Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání bakalářské práce: 14. února 2014

Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2015


prof. Ing. Otomar Línhart, 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 2014

Obsah

1	Úvod	8
2	Literární přehled	9
2.1	Základní vlastnosti vody	9
2.1.1	Fyzikálně – chemické vlastnosti	9
2.1.2	Organoleptické vlastnosti	11
2.2	Kvalita vody ve vztahu k chovu ryb	12
2.2.1	Význam nejdůležitějších parametrů kvality vody pro život ryb	13
2.2.1.1	Teplota	13
2.2.1.2	pH	15
2.2.1.3	Kyslík ve vodě	16
2.2.1.4	Amoniak	18
2.3	Metabolismus dusíkatých látek	22
2.4	Vliv koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě na odolnost ryb vůči kontaminujícím látkám	24
2.5	Vliv koncentrace rozpuštěného kyslíku na množství amoniaku vylučovaného rybami	25
3	Materiál a metodika	26
3.1	Metodika pokusů na kapru obecném	26
3.1.1	Předběžné pokusy	27
3.1.2	Hlavní pokus	28
3.1.3	Dodatečný pokus	29
3.2	Stanovení vybraných fyzikálně chemických parametrů kvality vody	30
3.2.1	Stanovení amoniakálního dusíku	30
3.2.2	Stanovení hodnot pH, teploty vody a koncentrace rozpuštěného kyslíku	32
3.3	Vyšetření krve – stanovení hematologických a biochemických ukazatelů	32
3.3.1	Odběr krve	32
3.3.2	Stanovení počtu erytrocytů, leukocytů, hematokritu a hemoglobinu	33
3.3.3	Stanovení amoniaku a glukózy	34
3.4	Statistické vyhodnocení výsledků	34
4	Výsledky	34
4.1	Předběžné pokusy	35

4.2	Hlavní pokus	38
4.2.1	Produkce amoniakálního dusíku	38
4.2.2	Výsledky hematologického a biochemického vyšetření krve.....	40
4.3	Dodatečný pokus	41
5	Diskuze	44
6	Závěr	48
7	Použitá literatura	49
8	Seznam příloh	55
9	Přílohy	56
10	Abstrakt	62
11	Abstract	63

1 Úvod

Toxická forma amoniaku je jednou z příčin způsobujících úhyn ryb jak ve volných vodách, tak v uzavřených produkčních systémech, kde je voda pro chov ryb používána opakovaně. Amoniak je hlavním konečným produktem dusíkatého metabolismu většiny sladkovodních ryb (Svobodová a kol., 2007). Z celkového množství vyloučených dusíkatých látek kaprem (*Cyprinus carpio*) je 92 % amoniaku, z toho je 88 % amoniaku vylučováno přes žábry a 4 % přes ledviny (Wood, 1993).

Kyslík rozpuštěný ve vodě je nezbytný pro život ryb a jiných vodních organismů ve vodním prostředí. V uzavřených produkčních systémech, kde je chováno velké množství ryb v poměrně malém objemu vody, bývá se zajištěním dostatku kyslíku problém. Nízké koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě, zvláště při dlouhodobé expozici, vyvolávají u ryb stres. Jedním z projevů stresu u ryb je snížení jejich schopnosti vylučovat amoniak přes žábry, což vyvolá zvýšení jeho koncentrace v krevní plasmě. V konečném důsledku může dojít k autointoxikaci amoniakem a úhynu ryb (Svobodová a kol., 1987, 2003).

Cílem této práce bylo zjistit, do jaké míry ovlivňuje koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě vylučování amoniaku rybami do vody a dále zjistit, zda se omezená schopnost vylučování amoniaku do vody projeví na zvýšení jeho koncentrace v krvi.

2 Literární přehled

2.1 Základní vlastnosti vody

2.1.1 Fyzikálně – chemické vlastnosti

Voda je nejrozšířenější látka na Zemi a je nepostradatelnou pro všechny formy života. Kvalita vody ovlivňuje chemické, fyzikální a biologické procesy, které v ní probíhají. V různých formách vytváří podmínky pro život organismů a tím ovlivňuje existenci přírodních ekosystémů (Blinová, 2009).

V přírodě převládá molekula vody H_2O a na D_2O („těžká voda“) připadá jen asi 0,015 hmotnostních %. V D_2O probíhají reakce pomaleji a menší je i rozpustnost látek v takové vodě. Atmosférické vody a vody, které vznikly táním sněhu a ledu obsahují méně D_2O než podzemní vody (Pitter, 1999). Některé fyzikálně – chemické konstanty těchto molekul jsou uvedeny na Tab. 1.

Tab. 1: Fyzikálně-chemické konstanty čisté vody a těžké vody. Upraveno podle Pittera (1999).

Konstanta	Jednotka	H_2O	D_2O
Hustota (25 °C)	kg.m^{-3}	997,045	1 104,46
Maximální hustota	kg.m^{-3}	1 000,00	1 105,97
Teplota, při které je hustota vody maximální	°C	3,98	11,20
Bod varu (101 325 Pa)	°C	100,00	101,43
Bod tuhnutí (101 325 Pa)	°C	0,00	3,813
Relativní permitivita (25 °C)	-	78,25	78,26
Dynamická viskozita (25 °C)	mPa.s	0,890	1,101
Povrchové napětí (25 °C)	mN.m^{-1}	71,96	71,85
Kritický tlak	MPa	22,13	21,73
Kritická teplota	K	647,35	644,65
Kritická teplota	°C	374,2	371,5
Měrné teplo tání	kJ.kg^{-1}	333,7	-
Měrné výparné teplo	kJ.kg^{-1}	2255,5	-

Molekula vody má dipólový charakter a to díky rozdílné elektronegativitě atomů kyslíku a vodíku (Pitter, 1999). Opačně nabitě atomy se přitahují a mezi atomy vodíku

vzniká úhel $104,45^\circ$ (Blinová, 2009). Z toho vyplývá, že je voda silná polární sloučenina, v níž se rozpouštějí polární látky (Pitter, 1999).

K základním fyzikálním vlastnostem vody patří:

Teplota vody je významným ukazatelem jakosti vody. Ovlivňuje formy výskytu a rozpustnost některých látek a tím i jejich dostupnost (Pitter, 1999). Teplota je označována jako klíčový faktor vodního ekosystému, protože ovlivňuje průběh biochemických a chemických procesů (Buttner a kol., 1993).

Hustota kapalně vody se od 0°C zvětšuje a při $3,98^\circ\text{C}$ má největší hustotu. Od $3,98^\circ\text{C}$ hustota zase klesá až k teplotě varu, kdy se mění na vodní páru. Největší hustoty vody využívají vodní živočichové v zimě, kdy nezamrzá celá nádrž, jelikož voda s nejvyšší hustotou klesá ke dnu a lehký led zůstává na hladině (Pitter, 1999).

Povrchové napětí - voda má největší povrchové napětí ze všech kapalin, hned po rtuti. Čím větší je povrchové napětí kapaliny, tím menší je její smáčecí schopnost. Povrchového napětí využívají různé vodní organismy, které se díky němu mohou udržet na hladině (Blinová, 2009). Vypadá to, jako by byl povrch vody pokryt neviditelnou tenkou pružnou vrstvičkou. Tato vrstvička je schopna udržet na svém povrchu drobné částičky jako je prach nebo pyl (Pitter, 1999).

Viskozita je velikost vnitřního tření pohybující se vody. Dynamická viskozita je dána odporem, který klade voda vlastnímu pohybu. Viskozita vody klesá se vzrůstající teplotou, tedy v teplé vodě je odpor vůči pohybu menší než ve studené vodě (Blinová, 2009).

K základním chemickým vlastnostem vody patří:

Hodnota pH, která je definována jako záporná hodnota dekadického logaritmu aktivity H^+ iontů vyjádřených v mol.l^{-1} . Je to důležitá veličina k posuzování kyselosti nebo zásaditosti vody vlivem látek obsažených ve vodě. Stupnice pH je od 0 do 14, kde je 0 nejvíce kyselé pH a 14 je nejvíce zásadité pH. Hodnota pH 7 znamená, že je roztok neutrální (Blinová, 2009).

Neutralizační kapacita vody je látkové množství silné jednosytné kyseliny nebo zásady, které spotřebuje 1 litr vody k dosažení zvolené hodnoty pH. Podle snižování nebo zvyšování hodnoty pH sledovaného vzorku během stanovení se dělí neutralizační

kapacita vody na kyselinovou neutralizační kapacitu (KNK) nebo zásadovou neutralizační kapacitu (ZNK) a vyjadřuje se v mmol.l^{-1} (Horáková a kol., 2007).

V přírodních a odpadních vodách je obsaženo velké **množství rozpuštěných anorganických a organických látek**. Z hydrochemického a hygienického hlediska jsou všechny tyto látky považovány za rozpustné nebo alespoň částečně rozpustné, včetně elementárních kovů. Obsah rozpuštěných látek se vyjadřuje v hmotnostních koncentracích, nejčastěji v mg.l^{-1} , nebo v látkových koncentracích - mmol.l^{-1} (Pitter, 1999).

Rozpustnost plynů ve vodě určuje Henryho zákon, který říká, že množství rozpuštěného plynu je při stálé teplotě přímo úměrné tlaku plynu nad kapalinou. Rozpustnost plynů klesá s rostoucí teplotou, tudíž se mohou odstranit z vody varem (Pitter, 1999).

2.1.2 Organoleptické vlastnosti

Organoleptické vlastnosti jsou vlastnosti, které se dají zjistit smyslovými orgány. Patří sem barva, pach, chuť, zákal a teplota (Horáková a kol., 2007).

Barvu vody způsobují rozpuštěné i nerozpuštěné látky. Čistá voda je v tenké vrstvě bezbarvá, ale v metrových vrstvách se nám jeví jako světle modrá (Pitter, 1999). Přírodní vody ale mají většinou nějaké zabarvení, které je způsobené například humínovými látkami, obsahem železa nebo třeba drobnými koloidními částicemi jílu. V období vegetace mohou způsobit zelenožluté nebo zelenomodré zbarvení vody sinice a řasy (Horáková a kol., 2007).

Pach vody způsobují svojí přítomností ve vodě látky, které jsou přirozenou součástí vody, látky biologického původu, ale také látky obsažené ve splaškových a průmyslových odpadních vodách. Pach znehodnocuje pitnou vodu, která poté působí odpudivě, i když je jinak zdravotně nezávadná. Proto nesmí být pach vody patrný ani při zahřátí vody. Koncentrace pachotvorné látky, která vyvolává postižitelný pach, je tzv. prahová koncentrace a udává se v mg.l^{-1} (Pitter, 1999).

Chuť vody - většina látek, které způsobují pach vody, ovlivňují i její chuť. Chuťové vlastnosti jednotlivých složek závisí na jejich koncentraci, ale i na vzájemné kombinaci složek, které jsou přítomny ve vodě. Velký vliv na chuť vody má hodnota pH (Horáková, 2007). Pitter (1999) zmiňuje, že intenzita chuťových vjemů klesá se stoupající teplotou.

Zákal vody způsobují nerozpuštěné látky anorganického a organického původu (Blinová, 2009). Nerozpuštěné látky snižují intenzitu procházejícího záření a rozptylují toto záření všemi směry (Pitter, 1999).

Teplota vody je jedním z nejdůležitějších organoleptických ukazatelů. Ideální teplota pro pitnou vodu je 8 až 12 °C. Pokud je voda teplejší než 15 °C, již neosvěžuje a naopak chladnější voda než 5 °C může poškodit zažívací trakt (Horáková, 2007).

2.2 Kvalita vody ve vztahu k chovu ryb

Všechny tělesné funkce ryb, jako jsou dýchání, příjem potravy, růst, vylučování, rozmnožování a rovnováha iontů v těle, jsou spojené s vodou. Kvalita vody je limitujícím faktorem v komerční výrobě ryb a rozhoduje tedy o úspěchu či neúspěchu v akvakultuře (Swann, 1997).

Význam jednotlivých ukazatelů kvality vody pro růst, vývoj a přežití ryb je rozdílný. Jednotlivé parametry se vzájemně ovlivňují a doplňují, a proto musí být vhodnost kvality vody pro chov ryb posuzována komplexně (Buttner a kol, 1993).

Odolnost různých druhů ryb je velmi odlišná a proto se udávají limitní koncentrace pro kaprovité a lososovité ryby zvlášť (Pitter, 1999). Požadavky na kvalitu vody pro kaprovité a lososovité ryby jsou řešeny i legislativně, a to formou nařízení vlády č. 61/2003 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech, ve znění pozdějších předpisů. V příloze č. 3 tohoto nařízení jsou uvedeny imisní standardy ukazatelů přípustného znečištění povrchových vod, z nichž níže v Tab. 2 uvádím nejdůležitější z nich.

Tab. 2: Imisní standardy: ukazatele a hodnoty přípustného znečištění povrchových vod. Upraveno podle nařízení vlády č. 61/2003 Sb., ve znění pozdějších předpisů.

Ukazatel	Jednotka	Požadavky pro užívání vody		Obecné požadavky
		Lososové vody	Kaprové vody	
Rozpuštěný kyslík	mg.l ⁻¹			> 6
Biochemická spotřeba kyslíku	mg.l ⁻¹	2		6
Chemická spotřeba kyslíku	mg.l ⁻¹			35
Celkový fosfor	mg.l ⁻¹	0,07		0,20
Celkový dusík	mg.l ⁻¹			8
Volný amoniak	mg.l ⁻¹	0,001	0,001	
Amoniakální dusík	mg.l ⁻¹	0,03	0,16	0,5
Dusitanový dusík	mg.l ⁻¹	0,09	0,14	
Dusičnanový dusík	mg.l ⁻¹			7
Teplota vody	°C	11	15	25
Reakce vody (pH)	-			6 - 8

Kvalita vody musí být posuzována nejen z hlediska jejího přímého působení na ryby, ale i z hlediska podmínek, které zaručí správný vývin potravy pro ryby (Pitter, 1999).

2.2.1 Význam nejdůležitějších parametrů kvality vody pro život ryb

2.2.1.1 Teplota

Teplota vody ovlivňuje jak její kvalitu, tak i intenzitu metabolismu ryb a vodních organismů (Bronmark a Hansson, 2005), tedy aktivitu, chování, krmení, růst a reprodukci (Swann, 1997). Teplota těla ryb se řídí podle teploty prostředí, protože jsou ryby poikilotermní živočichové (Svobodová a kol., 2003). Obvykle se jejich tělesná teplota pohybuje v rozmezí 0,5 – 1°C nad nebo pod teplotou vody, ve které žijí (Svobodová a kol., 1993).

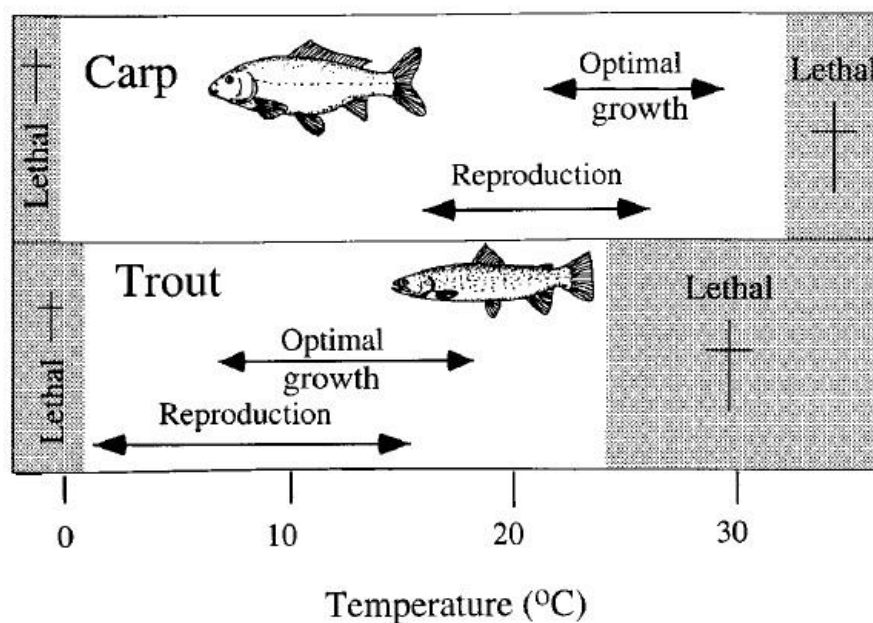
Čím vyšší je teplota vody, tím vyšší je i rychlost metabolismu ryb. To ale platí zejména pro teplomilné ryby, neboť studenomilné ryby mají jiný typ metabolismu, který může probíhat i při poměrně nízkých teplotách. Naopak, při vysokých teplotách vody (obvykle nad 20°C) jsou studenomilné ryby méně aktivní a konzumují méně potravy (Svobodová a kol., 1993).

Pro metabolismus kaprovitých ryb je ideální teplota mezi 18 – 28 °C, neboť v tomto rozmezí probíhá intenzivní trávení a vstřebávají se živiny. U lososovitých ryb se uvádí rozmezí mezi 8 – 16 °C (Svobodová a kol., 2003).

Teplota vody má také velký vliv na počátek a průběh řady onemocnění ryb. Imunitní systém většiny druhů ryb má optimální výkon při teplotách vody kolem 15°C (Svobodová a kol., 1993). Příliš vysoké teploty mohou vést k inaktivaci enzymů nebo dokonce k denaturaci (Bronmark a Hansson 2005).

Naopak, pokud ryby pobývají v chladnější vodě, než je jejich teplotní optimum, dochází k zastavení příjmu potravy, snižují se přírůstky a zpomaluje se činnost imunitního systému. Naopak při pobytu ryb v teplejší vodě se objevují klinické příznaky dušení, jelikož se snižuje i obsah kyslíku rozpuštěného ve vodě (Svobodová a kol., 2008).

Rozmezí teplot, ve kterých mohou ryby přežít a množit se, se liší v závislosti na jejich druhu (Bronmark a Hansson, 2005). Hranice optimálních teplot se v průběhu vývoje ryb poněkud mění. Liší se tak teplotní optima pro období tření, embryonální a larvální vývoj a následně pro juvenilní periodu i kulturní stadia (Máchová a Svobodová, 2014). Příkladem může být Obr. 1, kde jsou vyznačena teplotní optima pro přežití, reprodukci a růst kapra a pstruha.



Obr. 1: Teplotní optima pro přežití, reprodukci a růst kapra a pstruha (Převzato z Bronmarka a Hanssona (2005)).

Některé druhy ryb tolerují široký rozsah teplot, takové jsou nazývány eurytermní. Naopak jiné druhy ryb, kterým se daří v úzkém rozsahu teplot, se nazývají stenotermní (Bronmark a Hansson 2005).

2.2.1.2 pH

Měření hodnoty pH se provádí kolorimetricky (použitím indikátorových papírků, barevných indikátorů) nebo elektrometrickými metodami. Nejčastěji se ale v dnešní době hodnoty pH měří potenciometricky s použitím pH metru (Horáková a kol., 2007).

Hodnota pH přírodních vod je vysoce ovlivněna koncentrací oxidu uhličitého (Bhatnagar a Devi, 2013). Buttner a kol. (1993) popisuje průběh pH v ranních hodinách. Před východem slunce je hodnota pH nízká v důsledku vysoké koncentrace oxidu uhličitého, který pochází z disimilace zelených organismů. Rozpuštěný oxid uhličitý ve vodě totiž představuje formu slabé kyseliny. Po rozednění začíná probíhat fotosyntetická asimilace, při které fytoplankton i makrofyta odčerpávají z vody oxid uhličitý a produkují kyslík. V důsledku poklesu koncentrace oxidu uhličitého se zvyšuje pH vody. Proto je nejnižší denní hodnota pH obvykle spojena s nejnižším obsahem rozpuštěného kyslíku a naopak.

Hodnota pH ve vodách významně ovlivňuje chemické a biochemické procesy a dokonce i formy výskytu některých látek přítomných ve vodách (Tölgyessy a kol., 1989) a jejich toxicitu pro ryby a další vodní organismy. Hodnotu pH vody ovlivňují ve vodě probíhající chemické a biologické procesy, jako například nitrifikace, denitrifikace, aerobní a anaerobní biologický rozklad. Dále může být pH vody ovlivněno lidskou činností. Nízké hodnoty pH mohou být důsledkem kontaminace vody silážími šťávami, které obsahují organické kyseliny. Naopak vysoké hodnoty pH mohou být způsobeny únikem betonových směsí při stavbách mostů, jezů nebo při stavebních úpravách prováděných v blízkosti vodních toků (Pitter, 1999). Svobodová a kol. (1993) také uvádí, že k nízké hodnoty pH vody se objevují v jarním období při tání sněhu v oblastech rašelinišť a vysoké hodnoty pH se mohou objevit v eutrofních nádržích v důsledku intenzivní fotosyntetické asimilace. K náhlým změnám hodnot pH může dojít i při havarijních únicích kyselin nebo hydroxidů (Svobodová a kol., 1987).

Extrémně vysoké nebo nízké pH způsobuje poškození tkání ryb, zejména žaber. Na obranu proti působení nízkého nebo vysokého pH vody mohou ryby produkovat

zvýšené množství hlenu na kůži a na vnitřní straně skřelí (Svobodová a kol., 1993). Dále se ryby před extrémními změnami pH chrání snížením frekvence dýchacích pohybů, což vede ke snížení průtoku vody přes žábry (Svobodová a kol., 2008).

Pro všechny ryby se uvádí optimální hodnota pH vody v rozmezí 6,5 – 8,5. Lososovité ryby jsou ale citlivější na vyšší pH než kaprovité a naopak vůči nižšímu pH jsou odolnější. K poškození až úhynu u lososovitých ryb dochází při pH nad 9,2 a pod 4,8. U kaprovitých ryb je to při pH nad 10,8 a pod 5 (Svobodová a kol., 1993, 2003).

2.2.1.3 Kyslík ve vodě

Koncentrace rozpuštěného kyslíku patří v akvakultuře k nejdůležitějším parametrům kvality vody (Swann, 1997). Koncentrace kyslíku je velmi důležitým ukazatelem kyslíkového režimu vod a zároveň i indikátorem čistoty toků (Horáková a kol., 1989).

Hlavními zdroji kyslíku v rybnících a jezerech jsou difúze z atmosféry, působení větru a vlnění a fotosyntéza (Francis-Floyd, 2003), která produkuje kyslík během dne. Zelené rostliny a fytoplankton přeměňují vodu a oxid uhličitý, za přítomnosti slunečního záření, na kyslík a organické sloučeniny - cukry. Během celého dne je kyslík spotřebováváný respirací. V tomto procesu, kdy rostliny a živočichové spalují cukry, spotřebovávají kyslík a produkují oxid uhličitý. Fotosyntéza většinou vyprodukuje víc kyslíku, než je spotřebováno. V rybnících je nejnižší hladina kyslíku před svítáním a nejvyšší před setměním (Buttner, 1993). Francis-Floyd (2003) to označuje jako denní cyklus kyslíku.

Rozpustnost kyslíku ve vodě je ovlivněna atmosférickým tlakem, množstvím a charakterem látek obsažených ve vodě a teplotou vody (Svobodová a kol., 2003). S rostoucí teplotou klesá rozpustnost kyslíku ve vodě, zatímco rychlost metabolismu ryb a s tím i spojená spotřeba kyslíku, se s rostoucí teplotou zvyšuje (Buttner a kol., 1993). Pokud se zvyšuje teplota vody, zvyšuje se i rychlost rozkladu organických látek. To má velký dopad na množství rozpuštěného kyslíku, který je při rozkladných procesech spotřebováván rychleji, než se stačí doplnit přestupem z atmosféry (Máchová a Svobodová, 2014).

Koncentrace rozpuštěného kyslíku se vyjadřuje v hmotnostních koncentracích (mg.l^{-1}) nebo v % nasycení vody kyslíkem vztažených k rovnovážné

koncentraci kyslíku ve vodě za dané teploty a daného atmosférického tlaku (Horáková a kol., 2007). Koncentrace v % nasycení se porovnává s rovnovážnou koncentrací, tedy se stoprocentním nasycením vody kyslíkem. Pokud je naměřená koncentrace rozpuštěného kyslíku nižší než odpovídá 100% nasycení, jedná se o kyslíkový deficit. To je koncentrace kyslíku, která chybí při dané teplotě k jejímu nasycení. Naopak, pokud je naměřená koncentrace rozpuštěného kyslíku vyšší než by za dané teploty odpovídalo 100% nasycení, jedná se o přesycení vody kyslíkem (Svobodová a kol., 2003).

K deficitu kyslíku ve vodě nejčastěji přispívá znečištění vod organickými snadno rozložitelnými látkami, jako jsou komunální vody a potravinářské, zemědělské či jiné odpadní vody. Při rozkladu organických látek ve vodě dochází ke spotřebě rozpuštěného kyslíku (Svobodová a kol., 1987). V rybnících, kde nedošlo na konci vegetačního období k dostačujícímu rozkladu organické hmoty a zamrzla již vodní hladina, hrozí také kyslíkový deficit. Ten se může ještě zvýšit, pokud je led pokryt souvislou vrstvou sněhu (Valentová a kol., 2014). Nízká hladina rozpuštěného kyslíku je zodpovědná za více úhynů ryb než jakékoliv jiné problémy (Swann, 1997).

Nasycení vody kyslíkem v tocích se pohybuje obvykle mezi 85% až 95%. Někdy se ale může stát, že dojde k přesycení vody kyslíkem a to až o několik desítek procent. Většinou je to způsobeno mimořádnou turbulencí vody, jako jsou například jezy, přejeje či vodopády. K přesycení ale také může dojít při intenzivní fotosyntetické činnosti zelených organismů ve vodě (Pitter, 1999).

S poškozením ryb, způsobeném přesycením vody kyslíkem, se setkáváme jen zřídka (Svobodová a kol., 1993). Přesycení vody kyslíkem je nežádoucí zejména pro plůdek, který může vážně poškodit (Svobodová a kol., 2003), nebo pro ryby přepravované v polyetylenových vacích s kyslíkovou atmosférou. Kritická úroveň kyslíku ve vodě je 250 – 300% nasycení. Žábry těchto postižených ryb mají nápadně světle červené zbarvení a konce žaberních lamel se třepí. Pokud jsou tyto ryby vysazeny do vody, mohou trpět sekundárními plísněmi a některé z nich mohou zahynout. Ryby, přizpůsobené tak vysokému nasycení kyslíkem, musí být postupně aklimatizovány na normální koncentraci kyslíku (Svobodová a kol., 1993).

Naopak, dlouhé vystavení nízké hladině kyslíku je pro ryby škodlivé a vede k zastavení příjmu potravy, snížení intenzity metabolismu, zvyšuje stres a náchylnost k chorobám (Buttner, 1993). V těchto případech se objevují příznaky dušení – pohyb

ryb pod hladinou, výjezdy ryb k přítoku a ztráta únikového reflexu, u kaprovitých ryb lze pozorovat nouzové dýchání. V závažných případech vede deficit kyslíku k úhynu ryb. Koncentrace nižší než 4 mg.l^{-1} je pro povrchové vody nežádoucí (Svobodová a kol., 1987, 2003). V intenzivních chovech v rybnících, klecích, průtočných a recirkulačních systémech se voda obohacuje kyslíkem buď aerací nebo dotací kyslíku (Buttner, 1993).

Teplomilné druhy ryb tolerují nižší koncentrace kyslíku než studenomilné (Buttner, 1993). Nejnáročnější na množství kyslíku ve vodě jsou lososovité ryby, které potřebují koncentraci mezi $8 - 10 \text{ mg.l}^{-1}$ rozpuštěného kyslíku ve vodě. Pokud ale tato koncentrace klesne pod 3 mg.l^{-1} , začínají se projevovat příznaky dušení. Méně náročné jsou pak kaprovité ryby, které požadují optimální koncentraci kyslíku ve vodě v rozmezí $6 - 8 \text{ mg.l}^{-1}$. Příznaky dušení jsou u kaprovitých ryb pozorovány až při poklesu koncentrace kyslíku na $1,5 - 2 \text{ mg.l}^{-1}$ (Svobodová a kol., 1987).

2.2.1.4 Amoniak

Amoniak je slabá báze a ve vodných roztocích se vyskytuje ve dvou formách. Součet obou forem je označován jako celkový amoniak (Evans a kol., 2005). Amoniak je hlavním konečným produktem metabolismu dusíkatých látek u kostnatých ryb (Randall a Tsui, 2002), ale i primárním produktem rozkladu organických dusíkatých látek jak rostlinného, tak živočišného původu. Celková koncentrace amoniaku v krvi ryb je dána součtem amoniaku přijatého z vnějšího prostředí a amoniaku jakožto produktu bílkovinného metabolismu. A právě tento endogenní amoniak, který produkují ryby, se podílí na hromadění amoniaku v těle ryb (Svobodová a Máchová, 2014).

Amoniak reaguje dobře s vodou a je mírně rozpustný v lipidech. Vzhledem k tomu, že fosfolipidy biologických membrán jsou nepropustné pro NH_4^+ , prochází amoniak membránami jako NH_3 . NH_3 je vysoce rozpustný ve vodě a tudíž výrazně kontrastuje s lipofilními molekulami CO_2 . Proto je propustnost NH_3 pro téměř všechny buněčné membrány mnohem menší než propustnost CO_2 nebo O_2 (Marcaggi and Coles, 2001).

Žábry jsou primárním místem vylučování amoniaku z těla ryb (Wilkie, 2002; Weihrauch a kol., 2009), ale i příjmu z vnějšího prostředí do krve. Tento přechod je regulován pouze koncentračním spádem amoniaku (Wilkie, 2002; Randall a Tsui, 2002). Žábry vyvíjejí extrémně vysokou metabolickou činnost, která představuje téměř 10% z celkové spotřeby kyslíku kostnatých ryb pro účely

osmoregulace, ale podle Evanse a kol. (2005) se zdají být celkové metabolické výdaje pro vylučování amoniaku minimální.

Amoniak je produkován a také akumulován v buňce. Proto si ryby vyvinuly řadu různých strategií na obranu proti toxicitě amoniaku na buněčné a subbuněčné úrovni (Ip a kol., 2001a, 2001c). Jedna z nich je přeměna nahromaděného amoniaku na různé volné aminokyseliny v mozkové tkáni. To potlačuje rychlost produkce amoniaku rybami a snižuje rychlost katabolismu volných aminokyselin (Ip a kol., 2001c; Tsui a kol., 2004).

Zatímco vylučování amoniaku je při nízkých hodnotách pH pro ryby jednoduché, pro ryby vystavené vysokému pH je to velký problém. Při vysokém pH je totiž vysoká pufrací kapacita (Weihrach a kol., 2009), koncentrační spád amoniaku je snížen a to může vést k nahromadění amoniaku uvnitř těla ryb (Wilkie a Wood, 1996). Při příliš rychlém zvýšení hladiny amoniaku v krvi nebo při dosažení toxické hladiny amoniaku může dojít k úhynu ryb (Wilkie a kol., 1993).

Ve vodách s vysokou obsádkou ryb nebo v neprůtočných zařízeních může celkový amoniak rychle stoupat, což eliminuje příznivý koncentrační spád pro NH_3 a NH_4^+ , vyžadující aktivní vylučování amoniaku proti koncentračnímu spádu (Randall a Tsui, 2002). U ryb je jediný jednoznačně prokázaný případ vylučování celkového amoniaku proti koncentračnímu spádu zaznamenán u *Periophthalmodon schlosseri* (lezec Schlosserův), obojživelné kostnaté ryby dýchající vzdušný kyslík, která žije v brakické vodě v bažinách jihovýchodní Asie (Wilson a kol., 2000).

Formy výskytu ve vodě

Amoniakální dusík nalezneme ve vodách ve dvou formách. Jako disociovanou, vázanou formu NH_4^+ , která je netoxická pro vodní organismy. A jako nedisociovanou, molekulární formu NH_3 , která ovšem pro vodní organismy, hlavně ryby, toxická je (Svobodová a kol., 2003; Evans a kol., 2005). Jejich vzájemný poměr ve vodě závisí na teplotě a pH (Svobodová a kol., 2003). V Tab. 3 je znázorněna závislost podílu NH_3 v procentech veškerého amoniaku na hodnotách pH a teploty vody. Rattner a Heath (2003) uvádí, že vlivem zvýšení teploty o 10°C při stejné hodnotě pH v rozmezí 7 – 9 se zdvojnásobí podíl nedisociované toxické formy amoniaku. Rovnováha mezi těmito formami amoniaku může být vyjádřena jako $\text{NH}_3 + \text{H}_3\text{O}^+ \Leftrightarrow \text{NH}_4^+ + \text{H}_2\text{O}$, kde pH této reakce je mezi 9,0 - 9,5 (Marcaggi and Coles, 2001).

Tab. 3: Závislost obsahu NH_3 v procentech veškerého amoniaku na pH a teplotě vody.
Upraveno podle Svobodové a kol., (2003).

pH	T °C					
	0	5	10	15	20	25
7,0	0,082	0,12	0,175	0,26	0,37	0,55
7,2	0,13	0,19	0,28	0,41	0,59	0,86
7,4	0,21	0,30	0,44	0,64	0,94	1,36
7,6	0,33	0,48	0,69	1,01	1,47	2,14
7,8	0,52	0,75	1,09	1,60	2,32	3,35
8,0	0,82	1,19	1,73	2,51	3,62	5,21
8,2	1,29	1,87	2,71	3,91	5,62	8,01
8,4	2,02	2,93	4,23	6,06	8,63	12,13
8,6	3,17	4,57	6,54	9,28	13,02	17,95
8,8	4,93	7,05	9,98	13,95	19,17	25,75
9,0	7,60	10,73	14,95	20,45	27,32	35,46
9,2	11,53	16,00	21,79	28,95	37,33	46,55
9,4	17,12	23,19	30,36	39,23	48,56	57,99
9,6	24,66	32,37	41,17	50,58	59,94	68,63
9,8	34,16	43,14	52,59	61,86	70,34	77,62
10,0	45,12	54,59	63,74	71,99	78,98	84,60
10,2	56,58	65,58	73,59	80,29	85,63	89,70
10,4	67,38	75,12	81,54	86,59	90,42	93,24
11,0	89,16	92,32	94,62	96,26	97,41	98,21

Zdroje

Atmosférické vody obsahují amoniakální dusík poměrně hojně, jelikož se v ovzduší vyskytují amonné sloučeniny. Díky tomu jsou významným zdrojem sloučenin dusíku srážkové vody. V povrchových vodách ale obvykle koncentrace amoniakálního dusíku nepřesahují 1 mg.l^{-1} . V podzemních vodách je výskyt amoniakálního dusíku ve velmi nízkých koncentracích, pokud nejsou tyto vody kontaminované dusíkatými hnojivy či fekáliemi (Pitter, 1999).

Antropogenním zdrojem amoniakálního dusíku jsou odpadní vody z městských kanalizací, průmyslové odpady a rozklad biologických odpadů (Randall a Tsui, 2002). Anorganického původu mohou být z velké části dusíkatá hnojiva, která se ze zemědělsky obdělávaných ploch dostávají do vod splachem nebo infiltrací. Dále je

velké množství amoniakálního dusíku v průmyslových odpadních vodách z galvanického pokovování, jelikož se do některých pokovovacích lázní přidávají amonné soli. Někdy se také přidávají amonné sloučeniny do vody při chloraminaci, kvůli hygienickému zabezpečení (Pitter, 1999).

Účinky amoniaku na ryby

Vzhledem ke stanovení toxicity amoniakálního dusíku pro ryby je nutno rozlišovat jeho dvě formy výskytu. Nedisociovaná molekula NH_3 je pro ryby silně až velmi silně jedovatá (Svobodová a kol., 1987).

U živočichů s žábami je citlivost na amoniak větší v počátečních stádiích vývoje, protože poměr povrchu žaber k tělesné hmotnosti je větší a také proto, že fyziologické detoxikační mechanismy jsou stále nedokonalé (Figueroa- Lucero a kol., 2012).

Jak uvádí Svobodová a kol. (1987), nejvyšší přípustná koncentrace amoniaku NH_3 , kdy ještě nejsou způsobeny žádné změny na organismu, je pro lososovité ryby $0,0125 \text{ mg.l}^{-1}$ a pro ryby kaprovité $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$. Dále uvádí případ, kdy byl vystaven plůdek kapra obecného působení koncentrace $0,2 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NH}_3$. Po 150 hodinách byly zjištěny závažné histologicko – patologické změny na respiračním epitelu žaber. Druhý případ se týká koncentrace v rozmezí $0,14$ až $0,40 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NH}_3$, které byl vystaven plůdek kapra obecného v období 4 – 26 dnů po vykolení. Tato koncentrace amoniaku vedla k výraznému zaostávání ve vývoji, byl narušen vývoj ploutevního aparátu, hlavně břišních ploutví, a byla snížena pigmentace pokožky.

Při otravě ryb amoniakem dochází ke zvýšení hladiny amoniaku v krvi a dochází k toxické nekróze žaber. Zpočátku se u ryb projevuje mírný neklid a zrychluje se frekvence pohybů skřelí. Ryby se začínají zvedat k hladině a u kaprovitých ryb je možné pozorovat nouzové dýchání. Neklid se postupně zvyšuje, pohyby skřelí začínají být nepravidelné a následuje nástup fáze excitace. U ryb jsou pozorovatelné silné reakce na podněty z vnějšího prostředí, tonicko-klonické křeče svaloviny, ryby ztrácejí rovnováhu a vyskakují nad hladinu. Poté se začínají pokládat na bok a mají křečovitě rozevřenou tlamu i skřele. Následuje krátká fáze zdánlivého zotavení. Ryby sice jeví mírný neklid, ale zaujmou normální polohu. Jako poslední následuje fáze velmi silné excitace, kdy rybám zbledne povrch těla a následuje úhyn ryb (Svobodová a kol., 1987, 2008).

Pokud je z nějakého důvodu omezeno vylučování amoniaku přes žaberní aparát do vody, dochází k autointoxikaci ryb amoniakem (Svobodová a kol., 1987). Jednou z takových příčin může být náhlé přesazení nakrmených ryb do chladnější vody o 8 °C a více. V tomto případě dojde k poruše nebo úplnému zastavení procesu trávení. Nestrávená nebo částečně natrávená potrava začne v trávicím traktu ryb plynovat a nahromaděné plyny způsobí zvětšení dutiny tělní. Dále se výrazně sníží intenzita metabolismu, díky čemuž se začne snižovat vylučování amoniaku přes žábry a to vede k velkému zvýšení koncentrace amoniaku v krevní plazmě a k následnému úhynu ryb (Svobodová a kol., 1993, 2003).

2.3 Metabolismus dusíkatých látek

Metabolismus dusíku a vylučování amoniaku během vývoje ryb jsou rozhodujícími aspekty jejich rané fyziologie, protože hlavním zdrojem energie je endogenní absorpce aminokyselin ze žloutkového vajíčka. Katabolismus proteinů a aminokyselin vede ke tvorbě amoniaku, potenciálně toxického dusíkatého konečného produktu, který musí být buď vyloučen, nebo transformován tak, aby nedošlo k poškození vyvíjející se embryonální tkáně (Wright a Fyhn, 2001).

Hlavním zdrojem amoniaku v těle ryb je deaminace aminokyselin, která probíhá hlavně v játrech, ledvinách, svalovině a ve střevě. Ryby jsou zásobovány potřebnými aminokyselinami z bílkovin, které získávají z potravy. Většina těchto aminokyselin vstupuje do portálního oběhu a je transportována do jater. Výjimkou je glutamin, který je primárním zdrojem energie již pro enterocyty, syntézu proteinů a pro transport nutrietů, iontů a vody. Klíčový enzym glutamátdehydrogenáza vykazuje ve střevě vyšší aktivitu než v játrech a zavádí glutamin a glutamát do Krebsova cyklu. Rozkladem glutaminu a oxidativní deaminací glutamátu vzniká ve střevě amoniak (Smutná a kol., 2001). V žaludku dravých ryb probíhá proteolýza pomocí enzymu pepsinu. Aminokyseliny se vstřebávají ze střeva v podobě volných aminokyselin nebo dipeptidů. Dipeptidy jsou přepravované nezávisle na koncentračním gradientu kationtů (Ballantyne, 2001).

Erytrocyty se vyznačují vysokou aktivitou těch enzymů, které se výrazně angažují v metabolismu aminokyselin. V erytrocytech ryb probíhá intenzivní využívání

glutaminu, který je z energetického hlediska velice přínosný a vedle toho je i donorem amoniaku (Smutná a kol., 2001). Absorpce aminokyselin do krve probíhá na bazolaterálním povrchu střevních buněk. Bazolaterální membrána má minimálně 3 nosiče aminokyselin. Díky elektrochemickému gradientu sodíku a draslíku přenášejí nosiče aminokyseliny krví do většiny buněk jako volné aminokyseliny. Hladina volných aminokyselin v plazmě vrcholí přibližně 12 hodin po nakrmení a potom se vrátí na původní hodnotu (Ballantyne, 2001).

V tkáních jater se nachází nejvyšší koncentrace volných aminokyselin, protože jsou játra hlavním orgánem jejich katabolismu. Katabolismus aminokyselin u ryb vede ke tvorbě amoniaku. Odhaduje se, že játra vyprodukují 50 - 70% amoniaku v těle ryb (Ballantyne, 2001). Vzniklý amoniak transportují ryby z jater převážně do žaber a menší část do ledvin za účelem exkrece. Oproti tomu játra savců přeměňují amoniak na močovinu a tu transportují do ledvin za účelem eliminace (Smutná a kol., 2001). Primární mechanismus katabolismu aminokyselin v játrech ryb probíhá pomocí transdeaminázy. Amino skupina je převedena na α -ketoglutarát za vzniku glutamátu, který je potom deaminován glutamátdehydrogenázou. Metabolismus glutamátu je u ryb a savců odlišný. Glutamát je u ryb primárně deaminovaný za vzniku amoniaku, u savců je většina glutamátu transaminována na aspartát. Rychlost procesu deaminace jaterních aminokyselin klesá v anoxických podmínkách v důsledku inhibice glutamátdehydrogenázy (Ballantyne, 2001).

Kosterní svalovina představuje více jak 50% z celkové hmotnosti ryb a soustřeďuje nejvíce volných aminokyselin. Červená svalovina, ve které převládají aerobní pochody, má větší kapacitu pro utilizaci aminokyselin než bílá svalovina. Bílá svalovina pracuje za anaerobních podmínek, obsahuje více proteinů a je zásobárnou aminokyselin pro období hladovění nebo migrace (Smutná a kol., 2001).

Riziko toxického účinku amoniaku se snižuje díky jeho přeměně na méně toxické sloučeniny jako je glutamin a močovina. Glutamin vzniká z glutamátu a NH_4^+ , tato reakce je katalyzovaná glutaminsyntetázou ve svalech nebo játrech. Glutamát může také vznikat z α -ketoglutarátu a NH_4^+ , tato reakce je katalyzována glutamátdehydrogenázou. K tvorbě jedné molekuly glutaminu je potřeba dvou molekul amoniaku (Ip a kol., 2001b). Tvorbu glutaminu lze označit jako důležitou strategii mozku při detoxifikaci amoniaku u mnoha druhů sladkovodních kostnatých ryb (Saha a kol., 2002; Wicks a Randall, 2002).

Podle podmínek prostředí a druhu ryb je 60 – 90 % z celkového množství vylučovaného dusíku u kostnatých ryb vylučováno jako amoniak pasivním transportem díky koncentračnímu spádu přes žábry. Působení vysoké koncentrace amoniaku snižuje životaschopnost, zpomaluje růst a je příčinou různých fyziologických problémů. Amoniak stimuluje vylučování kortikosteroidních hormonů do krve a je stresovým faktorem (Kopp a kol., 2008).

2.4 Vliv koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě na odolnost ryb vůči kontaminujícím látkám

V dostupné literatuře se setkáváme s mnoha údaji o vlivu rozpuštěného kyslíku na toxicitu látek pro ryby. Autoři těchto prací poukazují na to, že nižší koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě mohou výrazně ovlivnit toxicitu některých látek a toxinů. Ale jen někteří z nich řeší v této souvislosti toxicitu amoniaku. Např. Lloyd (1961) zjistil při pokusech na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*), že koncentrace rozpuštěného kyslíku má výrazný vliv na toxicitu solí zinku, mědi, olova, směsi jednosytných fenolů a amoniaku. Tuto skutečnost vysvětluje tím, že snížení koncentrace rozpuštěného kyslíku vede ke zvýšení rychlosti dýchání ryb. S tím souvisí intenzivnější vystavení ryb toxickým látkám obsaženým ve vodě.

Tuto teorii podporuje i Davis (1975), který uvádí, že nízké hladiny kyslíku způsobují metabolický stres, zvyšují citlivost ryb na toxické látky a také úroveň jejich akumulace v důsledku zvýšeného průtoku vody přes žábry. Rossouw (2003) poukazuje na vyčerpání rozpuštěného kyslíku ve spojení s přítomností amoniaku, které může vést ke zhoršení stresové reakce rybami. Thurston a kol. (1981) zjistil pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a Wajsbrota a kol. (1991) pro juvenilní jedince pražmy mořské (*Sparus aurata*), že toxicita amoniaku se zvyšuje s klesajícím nasycením vody kyslíkem. Studie Donga a kol. (2013) naznačuje, že přesycení vody kyslíkem může u japonského platýze zvýšit toleranci amoniaku a snížit tak jeho poškození žaber, což částečně vysvětluje podstatu využití aerace v intenzivním chovu ryb.

2.5 Vliv koncentrace rozpuštěného kyslíku na množství amoniaku vylučovaného rybami

V dostupné literatuře existuje velké množství prací, které se zabývají vlivem teploty vody, exkrecí amoniaku a spotřebou kyslíku rybami (např. Kutty, 1972; Hillaby a Randall, 1979; Jarboe, 1995; Wood, 2001; Lee a kol., 2012).

Naproti tomu jsem našla pouze jednu práci (Rosso a kol., 2006), která se přímo zabývá problematikou, na kterou je zaměřena moje bakalářská práce. Zde autoři zjišťovali vliv koncentrace rozpuštěného kyslíku na vylučování amoniaku a dalších iontů (Na^+ , K^+ , Cl^-) u juvenilních jihoamerických sumečků (*Rhamdia quelen*, dále jen sumeček). Při svých pokusech adaptovali juvenilny sumečků na koncentraci rozpuštěného kyslíku 6 mg.l^{-1} a poté je převedli do akvárií s rozdílnými koncentracemi rozpuštěného kyslíku ($2,5$; $3,5$; $4,5 \text{ mg.l}^{-1}$), u kontrolní skupiny byla ponechána hladina 6 mg.l^{-1} . Z jejich studie vyplývá, že po převedení ryb do zhoršených oxických podmínek došlo k narušení iontové rovnováhy. Ryby převedené do akvária s nejnižší koncentrací kyslíku vykazovaly již po 1 hodině výrazně vyšší vylučování sodíku a chloridů. V případě amoniaku byly po hodinové expozici ryb rozdílným oxickým podmínkách zaznamenány srovnatelné hodnoty vylučování amoniaku, ale po 24 hodinách se vylučování amoniaku ve skupině ryb vystavených nejnižší koncentraci kyslíku téměř zastavilo. Po 120 hodinách bylo vylučování amoniaku rybami vystavenými $2,5$ a $3,5 \text{ mg.l}^{-1}$ signifikantně nižší ve srovnání s kontrolními rybami a s rybami vystavenými $4,5 \text{ mg.l}^{-1}$.

3 Materiál a metodika

Pokusy probíhaly v Laboratoři vodní toxikologie a ichtyopatologie VÚRH JU ve Vodňanech.

Pokusné organismy: použity byly okrasné formy kapra obecného (*Cyprinus carpio* f. *Koi*), které byly získány od firmy ALCEDOR s r.o. Zliv. Jedna skupina kaprů byla chována na FROV již cca 1 rok, další skupina ryb byla touto firmou dodána přímo na provedení těchto pokusů a byla po dobu 14 dnů adaptována na laboratorní podmínky. Ryby byly průběžně krmeny kompletní krmnou směsí KP1.

Použité přístroje a pomůcky: spektrofotometr (Spectronic 20 Genesys), pHmetr a oximetr (multifunkční přístroj MultiLine P4 firmy WTW), hematokritová odstředivka a odstředivka na plazmu (Microcentrifuge MPW-55), biochemický analyzátor (VETTEST 8008), analytické váhy (Mettler AE 200), lihový teploměr, hematokritové měřidlo, jednorázové injekční jehly a stříkačky, Bürkerova komůrka, kapiláry na hematokrit (7,5 cm), modelovací hmota, laboratorní nádoby (zkumavky, pipety, váženky, stříčka, odměrné baňky), potravinářské sklenice (objem 4 litry), skleněná akvária (objem 30 litrů), vzduchovací motorčky, hadičky, vzduchovací kameny, síťky na přelovování ryb.

3.1 Metodika pokusů na kapru obecném

Celkem byly provedeny 4 pokusy:

- Předběžný pokus 1
- Předběžný pokus 2
- Hlavní pokus
- Dodatečný pokus

3.1.1 Předběžné pokusy

Předběžné pokusy byly provedeny dne 6. 8. 2014 s cílem předběžně ověřit časový průběh změn základních parametrů kvality vody (pH, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace amoniaku).

Předběžný pokus 1

Podmínky pokusu:

- Teplota vody: 20 – 22 °C
- Koncentrace rozpuštěného kyslíku:
 - Sklenice č. 1: 0,40 – 8,48 mg.l⁻¹
 - Sklenice č. 2: 0,39 – 8,48 mg.l⁻¹
 - Sklenice č. 3: 4,46 – 8,48 mg.l⁻¹
- Průměrná hmotnost použitých ryb: 111,8 ± 21,2 g

Pokus probíhal v potravinářských sklenicích naplněných vodovodní vodou zbavenou chloru, která byla vytemperována na teplotu místnosti. Voda ve sklenicích byla provzdušněna tak, aby bylo dosaženo rovnovážné koncentrace kyslíku při dané teplotě, tedy 100% nasycení. Po dosažení rovnovážné koncentrace rozpuštěného kyslíku bylo odměřeno do dalších 3 připravených sklenic po 3 litrech vody, poté byly do těchto sklenic umístěny ryby (po jedné rybě do každé sklenice). Následně byly sklenice doplněny po okraj připravenou vodou a zaznamenán přesný objem vody v každé sklenici.

Sklenice č. 1 byla pokryta potravinářskou fólií, aby byl omezen přestup kyslíku z ovzduší do vody. Sklenice č. 2 byla ponechána otevřená, aby byl umožněn přestup kyslíku do vody a rybám dána možnost nouzového dýchání. Voda ve sklenici č. 3 byla v průběhu celého pokusu provzdušňována (všechny tři sklenice jsou na obrázku v Příloze 6). Na začátku a dále v hodinových intervalech byly v jednotlivých sklenicích měřeny hodnoty pH, koncentrace rozpuštěného kyslíku, teplota a odebírány vzorky vody pro stanovení koncentrace amoniakálního dusíku. Po dvou hodinách byl pokus ukončen.

Předběžný pokus 2

Podmínky pokusu:

- Teplota vody: 20 – 22 °C
- Koncentrace rozpuštěného kyslíku:
 - Sklenice č. 1: 0,65 – 8,43 mg.l⁻¹
 - Sklenice č. 2: 2,43 – 8,43 mg.l⁻¹
 - Sklenice č. 3: 6,40 – 8,43 mg.l⁻¹
- Průměrná hmotnost použitých ryb: 81,3 ± 21,7 g

Na základě zkušeností získaných v prvním předběžném pokusu, ze kterého vyplynulo, že koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě ve sklenici, která je překryta folií a ve sklenici bez folie je srovnatelná, byl proveden druhý předběžný pokus. Tento pokus byl proveden stejným způsobem s tím rozdílem, že sklenice č. 1 byla překryta silnější vrstvou folie, ve sklenici č. 2 byla voda mírně provzdušňována a voda ve sklenici č. 3 byla intenzivněji provzdušňována (Příloha 7).

3.1.2 Hlavní pokus

Hlavní pokus byl proveden dne 18. 11. 2014 ve větším rozsahu, aby bylo možno provést statistické vyhodnocení výsledků. Navíc byla pokusným rybám odebírána krev pro zhodnocení vlivu rozdílných oxických podmínek na vybrané hematologické a biochemické parametry.

Podmínky pokusu:

- Teplota vody: 20 – 22 °C
- Koncentrace rozpuštěného kyslíku:
 - Skupina 1: 0,69 – 9,60 mg.l⁻¹
 - Skupina 2: 7,90 – 9,80 mg.l⁻¹
- Průměrná hmotnost použitých ryb: 197,5 ± 37,7 g

Těsně před zahájením pokusu byla 6 rybám odebrána krev na stanovení vybraných hematologických a biochemických parametrů (počet červených a bílých krvinek, hematokrit a hemoglobin, koncentrace amoniaku a glukózy).

Vlastní pokus probíhal ve 12 akváriích o objemu 30 l, do kterých bylo napuštěno 15 l vodovodní vody zbavené chloru. Voda v akváriích byla provzdušňována do dosažení 100% nasycení vody kyslíkem. Poté byly ryby rozděleny po 3 kusech do jednotlivých akvárií, kde voda v akváriích č. 1 – 6 (skupina 1) nebyla provzdušňována a její hladina byla pokryta polystyrénem obaleným v igelitu, aby se co nejvíce omezil styk vodní hladiny se vzduchem (Příloha 8). Každou půlhodinu byl měřen kyslík rozpuštěný ve vodě, pH a teplota. Vzorek vody pro stanovení koncentrace amoniakálního dusíku byl odebrán na začátku, po 1 hodině, 1,5 hodině, 2 hodinách a 3 hodinách, kdy byl pokus ukončen. Po ukončení pokusu byla odebrána krev 6 rybám – jedné rybě z každého akvária.

Do dalších akvárií č. 7 – 12 (skupina 2) bylo nasazeno po 3 rybách. Voda v těchto akváriích byla provzdušňována a v průběhu následujících 3 hodin byla prováděna měření ve stejném rozsahu jako u skupiny 1, včetně odběru krve na konci testu.

3.1.3 Dodatečný pokus

Vzhledem k tomu, že v průběhu hlavního pokusu se nám získané výsledky nejevily jako dostatečně přesvědčivé, rozhodli jsme se k provedení „dodatečného“ pokusu s rybami, které byly v laboratoři dlouhodobě k dispozici, a se kterými byly provedeny i předběžné pokusy.

Podmínky pokusu:

- Teplota vody: 20 – 22 °C
- Koncentrace rozpuštěného kyslíku:
 - Sk. 1: 0,76 – 9,27 mg.l⁻¹
 - Sk. 2: 6,64 – 9,51 mg.l⁻¹
- Průměrná hmotnost použitých ryb: 102,7 ± 22,8 g

Dne 19. 1. 2015 byly tyto ryby po nakrmení vysazeny po 1 kusu do 10 potravinářských sklenic se 3 litry vodovodní vody zbavené chloru. Ve sklenicích č. 1 – 5 (sk. 1) voda nebyla provzdušňována a její otvor byl pokryt potravinářskou fólií, ve sklenicích č. 6 – 10 (sk. 2) byla voda provzdušňována. Bezprostředně po umístění ryb do sklenic byly odebrány vzorky vody na stanovení amoniaku a byly měřeny koncentrace rozpuštěného kyslíku. Tato měření se opakovala po 1 hodině, 2 hodinách,

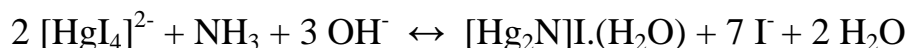
3,5 hodinách, 4,5 hodinách, koncentrace rozpuštěného kyslíku byly navíc měřeny po 0,5 hodině.

Po 4,5 hodinách trvání testu, kdy ryby ve sklenicích sk. 1 jevíly zjevné známky dušení (nouzové dýchání, snížená reakce na podráždění), bylo započato s provzdušňováním vody i v těchto sklenicích a ve všech sklenicích byly dále v hodinových intervalech měřeny koncentrace rozpuštěného kyslíku a amoniaku ve vodě. Po 7 hodinách byl pokus ukončen a ryby vráceny do chovné nádrže.

3.2 Stanovení vybraných fyzikálně – chemických parametrů kvality vody

3.2.1 Stanovení amoniakálního dusíku

Amoniakální dusík byl stanoven metodou absorpční spektrofotometrie po reakci s Nesslerovým činidlem podle ČSN 83 0530. Toto stanovení je založeno na reakci amoniaku a hydroxidu alkalických kovů se tetrajodortuřnatanem sodným nebo draselným za vzniku jodidu, která probíhá podle rovnice:



Uvedený jodid je málo rozpustná žlutohnědá sloučenina, která při nízkých koncentracích amoniaku vytváří žlutohnědé koloidní roztoky vhodné pro fotometrické měření.

Před samotným měřením byla připravena řada kalibračních roztoků v rozmezí 0,16 až 3,2 mg.l⁻¹ N-NH₄⁺ následujícím způsobem – nejprve byl připraven standardní zásobní roztok o koncentraci 100 mg.l⁻¹ N-NH₄⁺ (0,3819 g chloridu amonného předem vysušeného při 105 °C bylo rozpuštěno v destilované vodě a poté doplněno na 1000 ml). Ze standardního zásobního roztoku byl připraven pracovní roztok o koncentraci 4 mg.l⁻¹ N-NH₄⁺ (20 ml zásobního roztoku bylo napipetováno do odměrné baňky o objemu 500 ml, doplněno destilovanou vodou po rysku a důkladně promícháno).

Do odměrné baňky o objemu 50 ml bylo vždy napipetováno takové množství pracovního roztoku, jak je uvedeno v Tab. 4 a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Tab. 4: Množství pracovního roztoku pro kalibrační řadu.

Pracovní roztok (ml) v 50 ml	0	2	5	10	15	20	25	30	40
Koncentrace N-NH₄⁺ (mg.l⁻¹)	0	0,16	0,40	0,80	1,20	1,60	2,00	2,40	3,20

Takto připravené roztoky byly promíchány a převedeny do kádinek. K roztokům bylo přidáno 0,5 ml roztoku Seignetovy soli (vinanu sodnodraselného) a 1 ml Nesslerova činidla (tetrajodortuřnatan sodný nebo draselný) a poté byly roztoky promíchány. Po uplynutí reakční doby (10 minut) byly vybarvené kalibrační roztoky (Obr. 2) proměřeny na spektrofotometru Genesys 20 (Příloha 9) v 1 cm kyvetách proti slepému stanovení při vlnové délce 412 nm.

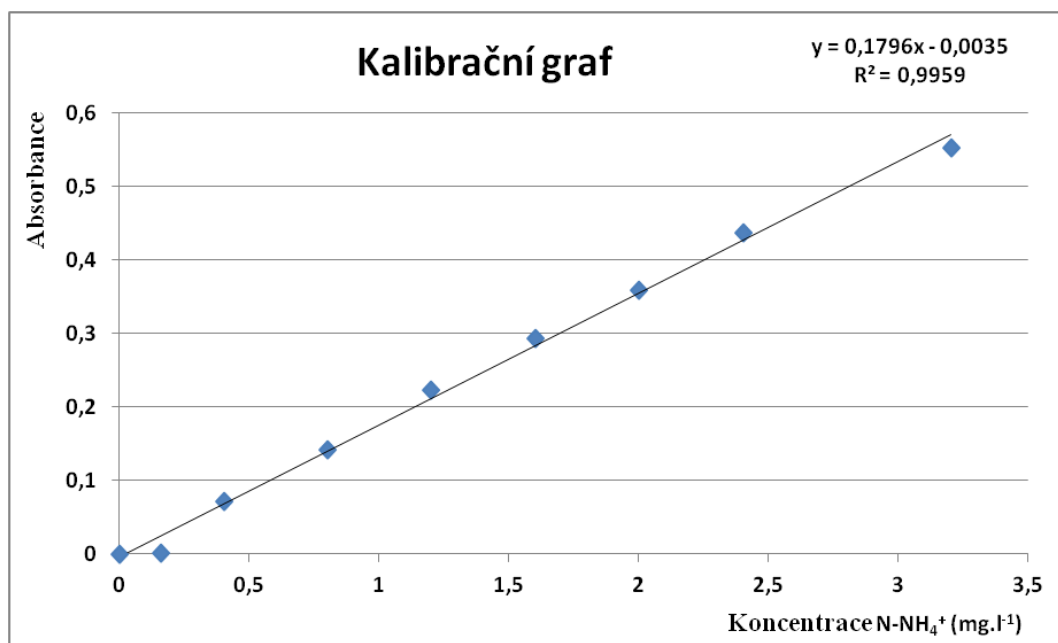


Obr. 2: Vybarvená kalibrační řada po uplynutí reakční doby roztoků.

Z naměřených hodnot absorbancí (Tab. 5) byl sestaven kalibrační graf (Graf 1) v programu MS Excel a zjištěna regresní rovnice, s jejíž pomocí byly vypočteny koncentrace amoniakálního dusíku ve vodě měřené v průběhu testu.

Tab. 5: Naměřené hodnoty absorbancí pro kalibrační řadu.

Koncentrace N-NH₄⁺ (mg.l⁻¹)	0	0,16	0,40	0,80	1,20	1,60	2,00	2,40	3,20
Absorbance	0	0,001	0,071	0,142	0,223	0,294	0,359	0,437	0,553



Graf 1: Kalibrační graf s regresní rovnicí pro stanovení koncentrace amoniakálního dusíku.

3.2.2 Stanovení hodnot pH, teploty vody a koncentrace rozpuštěného kyslíku

Hodnoty pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku byly měřeny pomocí multifunkčního přístroje Multiline P4 firmy WTW (Příloha 10). Před zahájením měření byly provedeny kalibrace tohoto přístroje. Teplota vody byla měřena skleněným lihovým teploměrem.

3.3 Vyšetření krve – stanovení hematologických a biochemických ukazatelů

Odběr krve a následná hematologická a biochemická vyšetření jsou poměrně náročné, a proto nebylo možné, abych je prováděla sama. Z toho důvodu se těchto prací zúčastnili pracovníci Laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie, jejichž jména uvádím vždy u prací, které vykonávali.

3.3.1 Odběr krve

Před samotným odběrem krve ryb byly připraveny zkumavky, do kterých byla přidána kapka protisrážecího přípravku (roztoku heparinu). Vodný roztok sodné soli heparinu v koncentraci 5000 m.j. na 1 ml slouží ke stabilizaci krve. Zkumavky

s heparinem byly ponechány otevřené při laboratorní teplotě do druhého dne, aby heparin vyschnul. Před odběrem byla vždy heparinem propláchnuta odběrová jednorázová injekční jehla i stříkačka. Dále byly připraveny nádoby a léčebné přípravky pro následnou dezinfekční koupel ryb.

Odběr krve byl proveden vždy bezprostředně po vylovení ryb z pokusných nádrží. Krev byla odebírána z ocasních cév ryb, krev odebíral dr hab. Ing. Josef Velíšek, Ph.D. (Příloha 11). Následně po odběru krve byl vpich dezinfikován celkovou dezinfekční ponořovací koupelí v manganistanu draselném, ryba byla vrácena do chovné nádrže a k dalším pokusům již nebyla využívána.

3.3.2 Stanovení počtu erytrocytů, leukocytů, hematokritu a hemoglobinu

Hematologické vyšetření krve ryb bylo provedeno za pomoci MVDr. Elišky Zuskové, Ph.D., Ing. Jany Máchové, Ph.D. a Ilony Prokopové.

Pro stanovení počtu erytrocytů a leukocytů u ryb byl připraven Hayemův roztok (na analytických vahách bylo naměřeno 2,5 g chloridu rtuťnatého, 25 g síranu sodného, 5 g chloridu sodného, v odměrné baňce o objemu 1000 ml doplněno po rysku destilovanou vodou a po promíchání byl roztok přefiltrován).

Stanovení počtu erytrocytů a leukocytů bylo provedeno počítací metodou v heparizované krvi ředěné Hayemovým roztokem v poměru 1 : 200, kterou byla naplněna Bürkerova komůrka (hemocytometr). Dalším stanovením byla získána hematokritová hodnota, která vyjadřuje poměr objemu erytrocytů k celkovému objemu krve. Toto stanovení bylo provedeno pomocí heparizovaných kapilár dlouhých 7,5 cm, do kterých byla nasáta krev cca do dvou třetin výšky, a jeden konec byl utěsněn modelovací hmotou. Poté byly kapiláry vloženy do hematokritové odstředivky (14000 ot.min⁻¹, 3 min) a po odstředění se na hematokritovém měřidle odečítala procenta hematokritu (Příloha 12).

Dále byla stanovena fotometrickou kyanohemoglobinovou metodou koncentrace hemoglobinu v krvi ryb. Pro stanovení koncentrace hemoglobinu v krvi ryb byl připraven transformační roztok (na analytických vahách bylo naměřeno 0,10 g ferrikyanidu draselného, 0,025 g kyanidu draselného, 0,07 g dihydrogenfosforečnanu draselného, v odměrné baňce o objemu 500 ml doplněno po rysku destilovanou vodou, po promíchání uchováno v chladu a temnu).

Ze získaných hodnot hematokritu (PCV) a počtu erytrocytů (Er) byl vypočten střední objem erytrocytu (MCV):

$$MCV = \frac{PCV \cdot 1000}{Er}$$

Z koncentrace hemoglobinu (Hb) a počtu erytrocytů (Er) byl vypočten hemoglobin erytrocytu (MCH):

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

Z koncentrace hemoglobinu (Hb) a hodnot hematokritu (PCV) byla ještě vypočtena střední barevná koncentrace (MCHC):

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

3.3.3 Stanovení amoniaku a glukózy

Koncentrace amoniaku a glukózy byly měřeny v krevní plazmě. Pro získání krevní plazmy byla odebrána krev do předem připravených zkumavek se zaschlým roztokem heparinu. Odebraná krev byla opatrně promíchávána v uzavřené zkumavce po dobu cca 15 s, aby se krev spojila s protisrážecím přípravkem. Neprodleně poté byly vzorky odstředěny na odstředivce (14 000 ot.min⁻¹, 2 min). Po odstředění byla krevní plazma stažena automatickou pipetou (při práci mi pomáhala laborantka Ilona Prokopová). Vzorky plazmy byly zamrazeny a poté podrobeny analýze obsahu glukózy a amoniaku (měření prováděl dr hab. Ing. Josef Velíšek, Ph.D.).

3.4 Statistické vyhodnocení výsledků

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno použitím jednosměrné analýzy variance (ANOVA - Tuckey test) programu Statistica, verze 12.0 pro Windows (StatSoft).

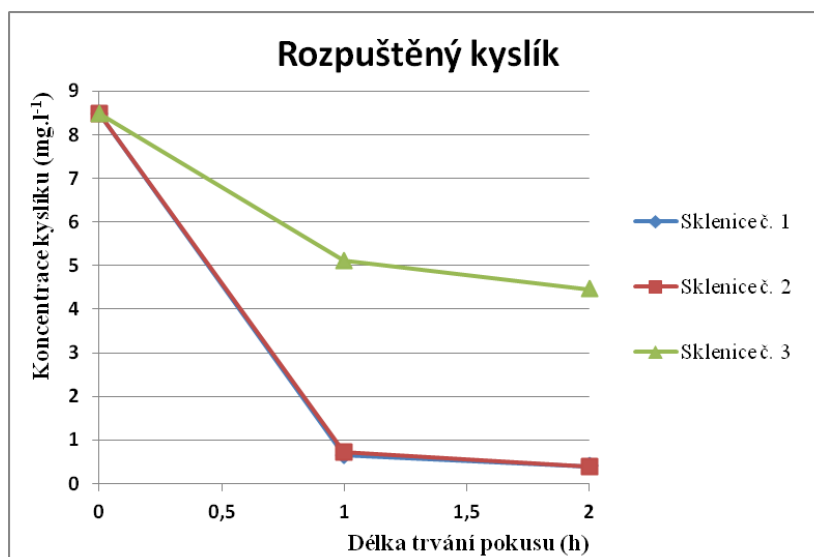
4 Výsledky

4.1 Předběžné pokusy

Předběžný pokus 1

Chování ryb v průběhu pokusu: Na začátku pokusu, kdy byly ryby přendány do sklenic, bylo jejich chování téměř bez rozdílu. O několik minut později byly pozorovány první změny v chování. Ryba ve sklenici č. 1 (bez vzduchování, s folií) byla klidná, ale výrazně zrychlila frekvenci dýchání a držela se u dna. Ryba ve sklenici č. 2 (bez vzduchování s otevřenou hladinou) byla aktivní, chvílemi se snažila nouzově dýchat (zdržovala se u hladiny) a střídavě se pohybovala v prostoru celé sklenice. Ryba ve sklenici č. 3 (kontrolní, se vzduchováním) byla aktivní, pohybovala se v prostoru celé sklenice, občas vyjížděla k hladině a snažila se o únik. V průběhu pokusu se chování u ryby ve sklenici č. 1 změnilo nejvýrazněji. Postupně se u ní dostavila útlumová fáze, pohyby ploutví nebyly téměř postřehnutelné, ale frekvence otevírání skřelí se výrazně zrychlila. Útlumová fáze byla poté vystřídána fází excitační, byly pozorovány záškuby těla a snaha vyskočit ven. Po nárazu do folie ryba téměř bez pohybu klesala ke dnu. Chování ryby ve sklenici č. 2 bylo klidné, ryba se zdržovala u hladiny a nouzově dýchala. Zato u ryby ve sklenici č. 3 se chování téměř nezměnilo. Byla stále aktivní a snažila se dostat ven s občasným nadechnutím z hladiny.

V následujícím grafu (Graf 2) je zobrazen průběh koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě během tohoto pokusu, ze kterého je patrné, že koncentrace kyslíku v průběhu pokusu ve sklenici č. 1 a sklenici č. 2 byly téměř vyrovnané (uzavření sklenice folií se na koncentraci rozpuštěného kyslíku ve vodě neprojevalo). Konkrétní hodnoty rozpuštěného kyslíku jsou uvedeny v Příloze 1 společně s hodnotami pH.



Graf 2: Průběh koncentrace kyslíku rozpuštěného ve vodě během předběžného pokusu 1 (voda ve sklenici č. 1 byla bez vzduchování a s folií na hladině, ve sklenici č. 2 bez vzduchování a s otevřenou hladinou, ve sklenici č. 3 byla vzduchována).

Pozn.: vzhledem k tomu, že koncentrace kyslíku ve sklenicích č. 1 a 2 byly téměř shodné, v grafickém znázornění hodnoty splývají.

Po dvou hodinách trvání pokusu, kdy ryba ve sklenici č. 1 začala projevovat výrazné příznaky dušení, byly ve vodě změřeny koncentrace celkového amoniakálního dusíku (Tab. 6). Na jejich základě byla vypočtena produkce amoniakálního dusíku jednotlivými rybami v přepočtu na 1 kg jejich hmotnosti.

Tab. 6: Koncentrace amoniakálního dusíku ve vodě na konci předběžného pokusu 1 (po 2 hodinách expozice) a celková produkce amoniakálního dusíku v přepočtu na 1 kg hmotnosti ryb.

Číslo sklenice	Koncentrace amoniakálního dusíku (mg.l ⁻¹ N-NH ₄ ⁺)	Produkce amoniakálního dusíku za 2 hodiny na 1 kg hmotnosti ryb (mg N-NH ₄ ⁺)
1	0,39	13,74
2	0,26	10,37
3	1,94	49,51

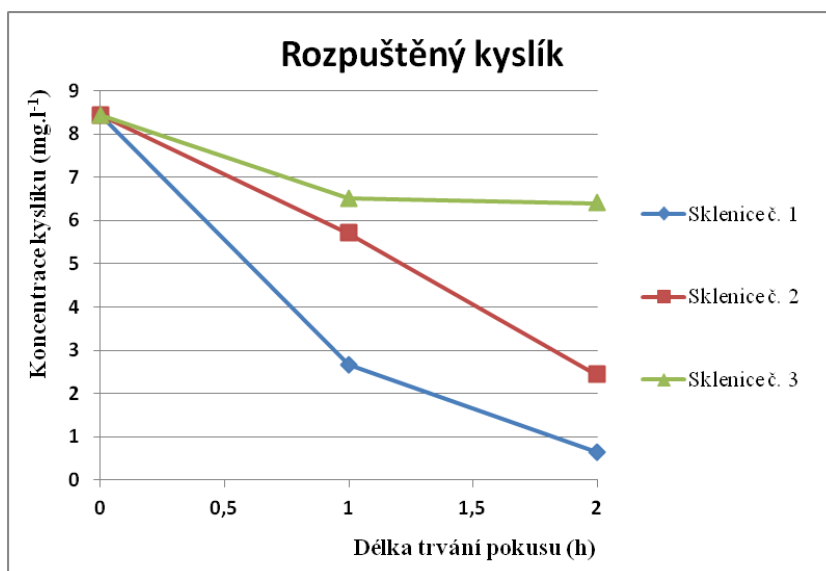
Ze získaných výsledků vyplývá, že ryba ve sklenici č. 3 vyprodukovala nejvíce amoniakálního dusíku a produkce amoniakálního dusíku rybami ve sklenicích č. 1 a 2 byly téměř shodné, což odpovídá, srovnatelným podmínkám, kterým byly tyto ryby vystaveny.

Předběžný pokus 2

Tento pokus probíhal podobně jako předběžný pokus 1 s tím rozdílem, že bylo upraveno vzduchování vody v jednotlivých sklenicích, aby bylo dosaženo větších rozdílů v obsahu kyslíku ve vodě.

Chování ryb v průběhu pokusu: Ryba ve sklenici č. 1 (bez vzduchování, silnější vrstva folie) byla nejprve hodně aktivní, pohybovala se po celé sklenici, zrychlovala frekvenci otevírání skřelí, ale po chvíli se zklidnila. Začala se držet u hladiny a zpomalila dýchání. Ryba ve sklenici č. 2 (mírné vzduchování) byla zprvu nejvíce aktivní, pohybovala se po celé sklenici, po chvíli se trochu zklidnila, nicméně byla oproti předchozímu pokusu stále dost aktivní a občas nouzově dýchala z hladiny. Ve sklenici č. 3 (silné vzduchování) byla ryba aktivní, pohybovala se v prostoru celé sklenice a projevovaly se u ní únikové reflexy (snaha uniknout ze sklenice).

Po dvou hodinách byl pokus ukončen, aby bylo možné porovnání s předchozím pokusem. V následujícím grafu (Graf 3) je zobrazen průběh koncentrací kyslíku během pokusu. Zde jsou jasně vidět větší vzájemné rozdíly v koncentraci rozpuštěného kyslíku v jednotlivých sklenicích ve srovnání s předešlým pokusem, kterých se podařilo dosáhnout úpravou vzduchování. Konkrétní hodnoty rozpuštěného kyslíku jsou uvedeny v Příloze 1 společně s hodnotami pH.



Graf 3: Průběh koncentrace kyslíku rozpuštěného ve vodě během předběžného pokusu 2 (voda ve sklenici č. 1 byla bez vzduchování a se silnější vrstvou folie na hladině, ve sklenici č. 2 s mírným vzduchováním, ve sklenici č. 3 byla silně vzduchována).

Ve vodě byly po dvou hodinách opět změřeny koncentrace celkového amoniakálního dusíku a na jejich základě byla vypočtena produkce amoniakálního dusíku jednotlivými rybami v přepočtu na 1 kg jejich hmotnosti (Tab. 7).

Tab. 7: Koncentrace amoniakálního dusíku ve vodě na konci předběžného pokusu 2 (po 2 hodinách expozice) a celková produkce amoniakálního dusíku v přepočtu na 1 kg hmotnosti ryb.

Číslo sklenice	Koncentrace amoniakálního dusíku ($\text{mg.l}^{-1} \text{N-NH}_4^+$)	Produkce amoniakálního dusíku za 2 hodiny na 1 kg hmotnosti ryb (mg N-NH_4^+)
1	0,44	24,61
2	1,58	85,29
3	2,20	70,19

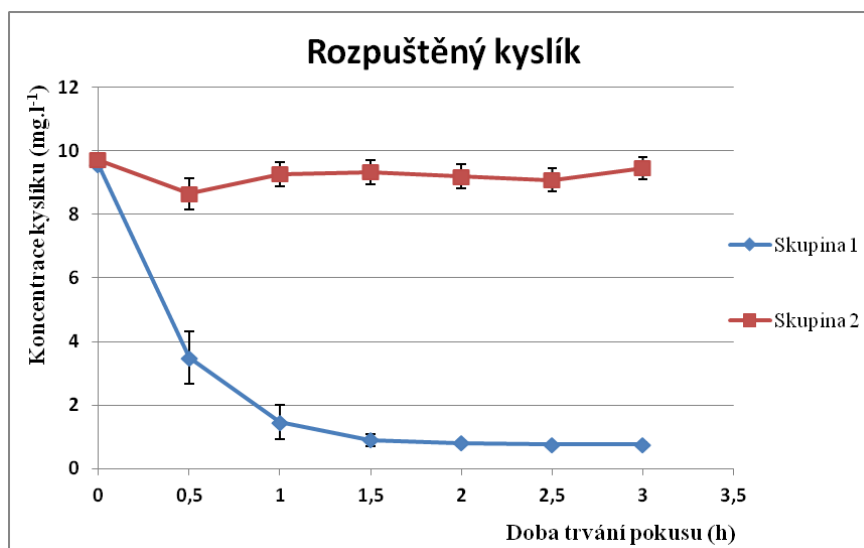
Ze získaných výsledků v tomto pokusu vyplývá, že nejvíce amoniakálního dusíku vyprodukovala ryba ve sklenici č. 2 a srovnatelná hodnota byla naměřena ve sklenici č. 3. Výrazně nižší produkce amoniakálního dusíku byla zjištěna u ryby ve sklenici č. 1, což odpovídá kyslíkovým poměrům.

4.2 Hlavní pokus

4.2.1 Produkce amoniakálního dusíku

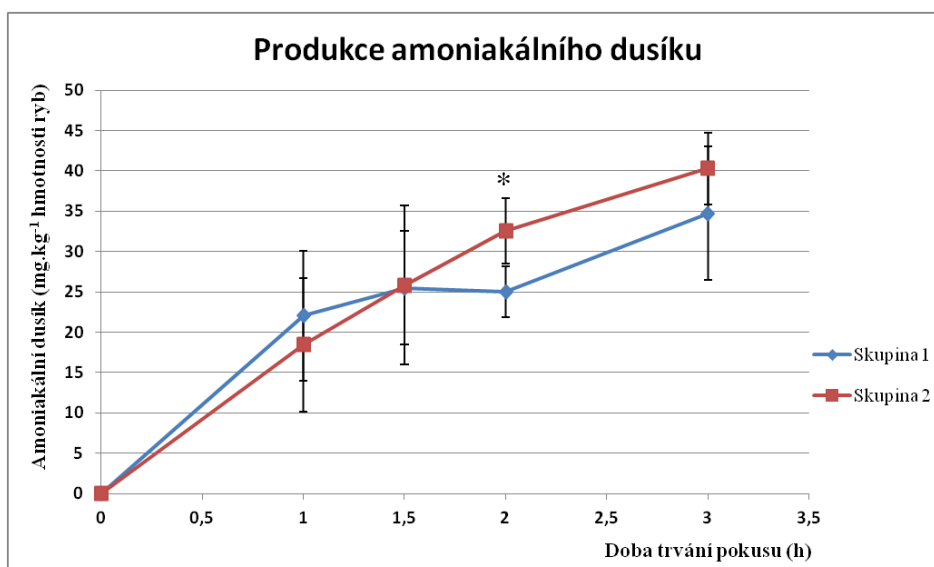
Ryby v akváriích č. 1 – 6 (skupina 1 – voda bez vzduchování, polystyrén na hladině) vykazovaly obdobné chování jako ryby v předběžných pokusech ve sklenicích č. 1. Chování ryb v akváriích č. 7 – 12 (skupina 2 – se vzduchováním) bylo stejné jako chování ryb se vzduchovanou vodou v předběžných pokusech.

V následujícím grafu je znázorněn průběh koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě (Graf 4). Konkrétní hodnoty průměrné koncentrace rozpuštěného kyslíku jsou uvedeny v Příloze 2.



Graf 4: Průběh koncentrace kyslíku rozpuštěného ve vodě během hlavního pokusu – průměrné hodnoty ± směrodatné odchylky (voda v akváriích skupiny 1 byla bez vzduchování, v akváriích skupiny 2 byla vzduchována).

Hodnota pH byla na začátku pokusu u obou skupin 8, ale u skupiny 1 v průběhu pokusu poklesla na 7. U skupiny 2 v průběhu pokusu nebyla zaznamenána žádná změna v hodnotě pH. Zjištěné koncentrace amoniakálního dusíku ve vodě jsou uvedeny v Příloze 3 a produkce celkového amoniakálního dusíku v přepočtu na 1 kg hmotnosti ryb uvádí Graf 5.



Graf 5: Kumulativní produkce amoniakálního dusíku na 1 kg hmotnosti ryb v průběhu hlavního pokusu – průměrné hodnoty ± směrodatné odchylky (voda v akváriích skupiny 1 byla bez vzduchování, v akváriích skupiny 2 byla vzduchována).

*) statistická významnost rozdílu $P < 0,05$

Přestože byla koncentrace rozpuštěného kyslíku ve skupině 1 a skupině 2 prokazatelně rozdílná, produkce amoniakálního dusíku rybami je v obou skupinách podobná.

4.2.2 Výsledky hematologického a biochemického vyšetření krve

Průměrné hodnoty a příslušné směrodatné odchylky výběru výsledků hematologického a biochemického vyšetření krve ryb jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. 8, Tab. 9).

Tab. 8: Hodnoty hematologického a biochemického vyšetření krve ryb – průměrné hodnoty \pm směrodatné odchylky (Er – počet erytrocytů, Leuko – počet leukocytů, Hk – hematokrit, Hb – hemoglobin, NH₃ – amoniak, GLU – glukóza; skupina 1 – před zahájením pokusu, skupina 2 – na konci pokusu bez vzduchování, skupina 3 – na konci pokusu se vzduchováním).

Skupiny ryb	Er (T.l ⁻¹)	Leuko (G.l ⁻¹)	Hk (l.l ⁻¹)	Hb (g.l ⁻¹)	NH ₃ (μmol.l ⁻¹)	GLU (mmol.l ⁻¹)
1	0,93 \pm 0,28	37,67 ^a \pm 17,61	0,29 ^a \pm 0,02	73,77 \pm 3,66	261,00 ^a \pm 48,94	3,12 ^a \pm 0,64
2	1,13 \pm 0,34	50,42 ^a \pm 16,77	0,44 ^b \pm 0,06	81,64 \pm 13,40	255,17 ^a \pm 27,99	11,04 ^b \pm 1,74
3	1,00 \pm 0,35	20,08 ^b \pm 7,79	0,27 ^a \pm 0,02	74,54 \pm 4,15	167,50 ^b \pm 33,35	3,98 ^a \pm 0,72

Pozn.: Rozdílný index nad hodnotami značí statisticky významný rozdíl ($P < 0,01$) mezi skupinami.

Tab. 9: Hodnoty středního objemu erytrocytu (MCV), hemoglobinu erytrocytu (MCH) a střední barevné koncentrace (MCHC) – průměrné hodnoty \pm směrodatné odchylky (skupina 1 – před zahájením pokusu, skupina 2 – na konci pokusu bez vzduchování, skupina 3 – na konci pokusu se vzduchováním).

Skupiny ryb	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (l.l ⁻¹)
1	327,80 \pm 76,93	84,43 \pm 20,60	0,26 ^a \pm 0,01
2	408,56 \pm 93,98	76,07 \pm 16,28	0,19 ^b \pm 0,01
3	310,14 \pm 120,36	84,66 \pm 31,60	0,28 ^c \pm 0,01

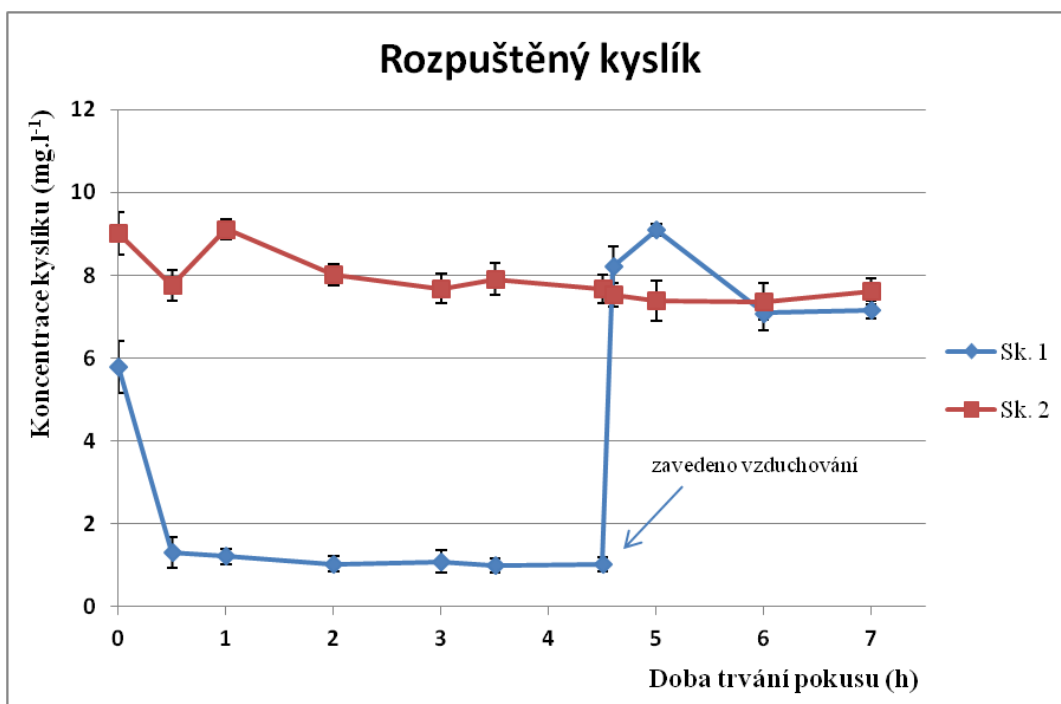
Pozn.: Rozdílný index nad hodnotami značí statisticky významný rozdíl ($P < 0,01$) mezi skupinami.

Ze získaných výsledků je patrné, že rozdíly hodnot počtu erytrocytů, hemoglobinu a tudíž i hodnot středního objemu erytrocytu a hemoglobinu erytrocytu mezi skupinami nejsou statisticky významné. Statisticky významný rozdíl byl však prokázán v případě hematokritu, a to mezi skupinami 2 a 3 i mezi skupinami 1 a 2 ($P < 0,01$). V počtu leukocytů byl prokázán statisticky významný rozdíl ($P < 0,01$) mezi skupinami 1 a 3, a také mezi skupinami 2 a 3. Rovněž v koncentraci amoniaku byl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi skupinami 1 a 3 a skupinami 2 a 3. V obsahu glukózy v krvi ryb byl statisticky významný rozdíl ($P < 0,01$) mezi skupinami 1 a 2 a také mezi skupinami 2 a 3. Pouze u střední barevné koncentrace byl statisticky významný rozdíl u všech skupin ($P < 0,01$).

4.3 Dodatečný pokus

Ryby ve sklenicích č. 1 – 5 (sk. 1 – voda bez vzduchování, folie na hladině) vykazovaly stejné chování jako ryby v předchozích pokusech, které byly ve vodě bez vzduchování. Po 4,5 hodinách, kdy bylo zavedeno vzduchování, začaly být ryby aktivnější, zrychlovaly frekvenci dýchání a pohybovaly se po celém prostoru sklenice. Chování ryb ve sklenicích č. 6 – 10 (sk. 2 – vzduchování) bylo stejné jako v předchozích pokusech, kdy byla voda vzduchována.

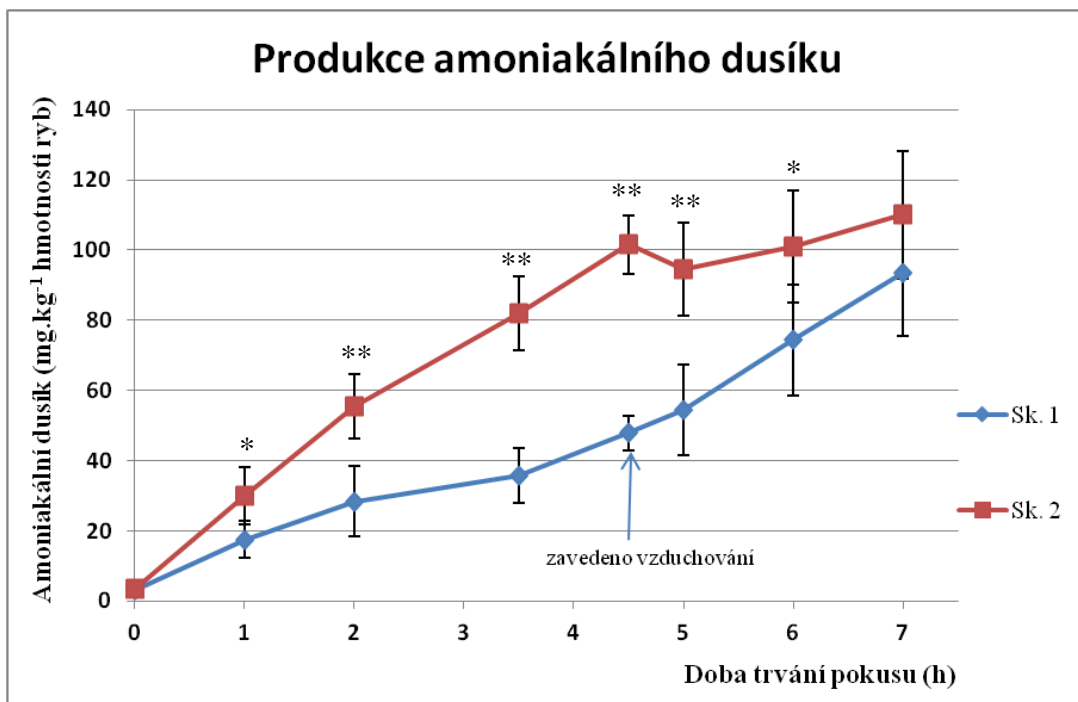
Koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě změřené během pokusu jsou uvedeny v grafu (Graf 6), ve kterém je vidět intenzivní nárůst koncentrace kyslíku po zavedení vzduchování u sk. 1. Ke konci pokusu se koncentrace kyslíku u obou skupin shodovala. Konkrétní hodnoty průměrné koncentrace rozpuštěného kyslíku jsou uvedeny v Příloze 4.



Graf 6: Průběh koncentrace kyslíku rozpuštěného ve vodě během dodatečného pokusu – průměrné hodnoty ± směrodatné odchylky (voda ve sklenicích sk. 1 byla bez vzduchování, ve sklenicích sk. 2 byla vzduchována).

Hodnota pH byla na začátku pokusu u obou skupin 8, v průběhu pokusu u skupiny 1 poklesla na 7 a u skupiny 2 nebyla zaznamenána žádná změna stejně jako u hlavního pokusu. Po zavedení vzduchování se u obou skupin pH zase vyrovnalo a drželo se kolem 8.

Koncentrace celkového amoniakálního dusíku změřená během dodatečného pokusu společně s vypočtenými hodnotami produkce amoniakálního dusíku na 1 kg hmotnosti ryb je uvedena v Příloze 5. Graf produkce amoniakálního dusíku na 1 kg hmotnosti ryb je uveden níže (Graf 7).



Graf 7: Kumulativní produkce amoniakálního dusíku na 1 kg hmotnosti ryb v průběhu dodatečného pokusu – průměrné hodnoty ± směrodatné odchylky (voda ve sklenicích sk. 1 byla bez vzduchování, ve sklenicích sk. 2 byla vzduchována).

*) statistická významnost rozdílu $P < 0,05$

***) statistická významnost rozdílu $P < 0,01$

Po dobu, než se zavedlo vzduchování do vody ve sklenicích sk. 1, se produkce amoniakálního dusíku rybami ve sk. 1 a sk. 2 stále více odlišovala (větší byla u vzduchovaných ryb). Po zavedení vzduchování do vody se produkce amoniakálního dusíku rybami ve sk. 1 začala zvyšovat a na konci pokusu byla téměř vyrovnaná.

5 Diskuze

V dostupné literatuře se objevuje mnoho prací zabývajících se exkrecí amoniaku v závislosti na teplotě (např. Wood, 2001), salinitě (např. Pérez-Robles a kol., 2012) nebo pH (např. Bower a Bidwell, 1978). Amoniak společně s rozpuštěným kyslíkem je spojován především s toxicitou amoniaku pro ryby, kde se opakovaně zdůrazňuje, že s klesajícím nasycením vody kyslíkem se zvyšuje toxicita amoniaku (Thurston a kol., 1981; Wajsbrodt a kol., 1991).

Pouze Rosso a kol. (2006) upozorňují na vliv rozdílného nasycení vody kyslíkem na vylučování amoniaku rybami (společně s dalšími ionty). Tito autoři při svém experimentu použili jako testovací organismy juvenilní jihoamerických sumecků (*Rhamdia quelen*) a prokázali, že po převedení ryb z normoxických podmínek ($6 \text{ mg.l}^{-1} \text{ O}_2$) do hypoxických podmínek ($2,5 \text{ mg.l}^{-1} \text{ O}_2$) vylučovaly tyto ryby v průběhu první hodiny srovnatelné množství amoniaku jako ryby ponechané v normoxických podmínkách. V průběhu dalších 24 hodin ale došlo u ryb převedených do hypoxických podmínek k výraznému poklesu vylučování amoniaku ve srovnání s rybami v normoxických podmínkách. Také při našem hlavním pokusu vykazovaly ryby hodinu po převedení do hypoxických podmínek srovnatelnou produkci amoniaku a to přesto, že koncentrace kyslíku v našem pokusu byla v hypoxických podmínkách výrazně nižší ($< 1 \text{ mg.l}^{-1} \text{ O}_2$). Důvodem mohla být skutečnost, že pro tento pokus byly použity ryby jiného původu, které přes čtrnáctidenní aklimatizaci nepřijímaly spontánně a rovnoměrně předkládanou potravu. Nerovnoměrný příjem krmiva se pravděpodobně projevil na nedostatečné prokazatelnosti výsledků tohoto pokusu. Naproti tomu v dodatečném pokusu, kde byly jako testovací organismy použity ryby, které spontánně přijímaly krmivo, byl již po 1 hodině po převedení ryb do hypoxických podmínek zaznamenán statisticky významný rozdíl v produkci amoniaku ($P < 0,05$). Tento rozdíl se v průběhu dalšího trvání pokusu ještě zvýraznil a rozdíl byl statisticky vysoce významný ($P < 0,01$). Značné rozdíly v produkci amoniaku byly prokázány také v předběžných pokusech. Tyto pokusy byly prováděny s rybami stejnými jako v dodatečném pokusu (tedy s rybami, které spontánně a rovnoměrně přijímaly předkládanou potravu), ale byly prováděny pouze v jednom opakování, takže nebylo možné provést jejich statistické vyhodnocení.

V dodatečném pokusu bylo rybám držným v hypoxických podmínkách opětovně zavedeno do vody vzduchování, čímž se během deseti minut zvýšila koncentrace kyslíku ve vodě na hodnotu vyšší než 8 mg.l^{-1} . Produkce amoniaku se začala zvyšovat a v závěru pokusu již dosáhla hodnot srovnatelných s kontrolou. To dokazuje, že produkce amoniaku rybami úzce souvisí s výší koncentrací kyslíku rozpuštěného ve vodě a také reverzibilitnost stavu, kdy jsou ryby dočasně vystaveny hypoxii a poté dojde k úpravě kyslíkových poměrů.

Pokud jde o množství vyloučeného amoniaku, lze konstatovat, že výsledky získané z mých pokusů jsou poněkud vyšší než výsledky, které uvádí ve své práci Máchová a kol. (2010). Tito autoři sledovali produkci znečištění rybami pocházejícími z rozdílných podmínek odchovu (extenzivního – kde měly ryby k dispozici pouze přirozenou potravu a z odchovu, kde byly ryby přikrmované pšenicí nebo granulami na rostlinném základě a po celou dobu měly k dispozici i přirozenou potravu). Dále tito autoři uvádějí produkci amoniakálního dusíku rybami za 24 hodin v přepočtu na 1 kg hmotnosti ryb ve výši $55 \text{ mg.den}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ u nepřikrmovaných ryb, $95 \text{ mg.den}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ u ryb přikrmovaných pšenicí a $115 \text{ mg.den}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ u ryb přikrmovaných granulami. Resp., v přepočtu produkce amoniakálního dusíku za hodinu se jedná o hodnoty $2,3 \text{ mg.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$, $4,0 \text{ mg.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ a $4,8 \text{ mg.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$. Produkci amoniakálního dusíku rybami uvádí také Stejskal a kol. (2009). Tito autoři sledovali produkci amoniaku okounem říčním a uvádějí hodnoty ve výši $120 - 360 \text{ mg.den}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ (tj. $5 \text{ až } 15 \text{ mg.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$) u ryb, které byly před zahájením pokusu krmeny a $50 \text{ mg.den}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ (tj. $2,1 \text{ mg.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$) u ryb, které nebyly 2 dny před zahájením pokusu krmeny.

Produkce amoniakálního dusíku zjištěná v předběžném pokusu 1 činila u ryb v normoxických podmínkách $25 \text{ mg.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$, v předběžném pokusu 2 to bylo $35 \text{ mg.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$, v hlavním pokusu $13,3 \text{ mg.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ a v dodatečném pokusu $15,7 \text{ mg.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$. Mírně vyšší hodnoty produkce amoniakálního dusíku za hodinu na 1 kg ryb, které jsem zjistila v mých pokusech, pravděpodobně souvisí s obdobím, za které byla produkce amoniakálního dusíku vypočítána. Zatímco produkce amoniakálního dusíku v přepočtu na hodinu a kilogram ryb uváděné Stejskalem a kol. (2009) a Máchovou a kol. (2010) vycházejí z produkce amoniakálního dusíku za den na 1 kg hmotnosti ryb, v případě mých pokusů se jedná o podstatně kratší časové úseky (2 – 7 hodin), kdy lze přepokládat vyšší produkci amoniakálního dusíku než v dalším období.

Rozdílné oxické podmínky, kterým byly ryby v mých pokusech vystaveny, měly také vliv na některé hematologické a biochemické ukazatele. Např. v krevní plazmě ryb vystavených hypoxickým podmínkám byla zjištěna průměrná koncentrace amoniaku $255,17 \pm 27,99 \mu\text{mol.l}^{-1}$, což byla hodnota zhruba o 50 % vyšší než u ryb z normoxických podmínek ($167,50 \pm 33,35 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Jak potvrdilo statistické vyhodnocení, byl tento rozdíl vysoce statisticky významný ($P < 0,01$). To dokazuje, že amoniak jako hlavní metabolický produkt dusíkatých látek byl z těla ryb, které byly drženy v hypoxických podmínkách, vylučován ve výrazně menší míře, než tomu bylo u ryb držných v normoxických podmínkách. Zjištěné hodnoty se jeví jako poněkud nižší ve srovnání s údaji Svobodové a kol. (2008), která uvádí průměrné fyziologické koncentrace amoniaku v zimním období $50 - 100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a v letním období $500 - 800 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Je pravděpodobné, že mnou zjištěné nižší hodnoty souvisejí s nevyrovnaným příjmem krmiva pokusnými rybami, jak již bylo uvedeno výše. Dále byl zjištěn velký statisticky významný rozdíl ($P < 0,01$) v koncentraci glukózy mezi skupinou ryb v hypoxii a skupinou ryb v normoxii. Zatímco průměrná koncentrace glukózy zjištěná u ryb z normoxických podmínek činila $3,98 \pm 0,72 \text{ mmol.l}^{-1}$ a odpovídala hodnotám, které jsou uváděny jako běžné u nestresovaných ryb ($1,3 - 6,9 \text{ mmol.l}^{-1}$, Kolářová a Velíšek, 2012). Průměrná koncentrace glukózy v krevní plazmě ryb držných v hypoxických podmínkách byla téměř třikrát vyšší a činila $11,04 \pm 1,74 \text{ mmol.l}^{-1}$, což odpovídá hodnotám uváděným pro ryby ve stresu ($10 - 30 \text{ mmol.l}^{-1}$, Kolářová a Velíšek, 2012).

Zjištěný počet leukocytů odpovídal širokému rozmezí hodnot uváděných pro kapra ($10 - 80 \text{ G.l}^{-1}$, Svobodová a kol., 2012). Mezi skupinami ryb z hypoxického a normoxického prostředí byl zjištěn statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$), kde počet leukocytů u ryb z hypoxie byl 2,5krát vyšší než počet leukocytů u ryb z normoxie. To nasvědčuje tomu, že stres vyvolaný hypoxií vedl k vyplavení leukocytů ze sleziny (Svobodová, 2015). Rozdílné koncentrace kyslíku vyvolaly také výrazný nárůst hematokritové hodnoty - $0,44 \pm 0,06 \text{ l.l}^{-1}$ u ryb v hypoxických podmínkách ve srovnání s hodnotou $0,27 \pm 0,02 \text{ l.l}^{-1}$ zjištěnou u ryb v normoxických podmínkách (rozdíl byl statisticky vysoce významný rozdíl - $P < 0,01$). Hodnoty hematokritu zjištěné u ryb z normoxie v podstatě odpovídaly rozmezí hodnot, které uvádí ve své práci Svobodová a kol. (2012) - tj. $0,28 - 0,40 \text{ l.l}^{-1}$. Naproti tomu hodnoty hematokritu zjištěné u ryb v hypoxických podmínkách toto rozpětí mírně převyšují.

Zvýšená hematokritová hodnota odpovídá zvětšení velikosti erytrocytů, které se běžně dostavuje při vystavení organismu deficitu kyslíku (Hosseini a kol., 2011). Hodnoty středního objemu erytrocytů byly sice vyšší u ryb vystavených hypoxii ve srovnání s hodnotami zjištěnými u ryb z normoxie, avšak rozdíl nebyl statisticky významný. Důvodem jsou pravděpodobně rozkolísané hodnoty počtu erytrocytů zjištěných u obou skupin ryb. Dále byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($P < 0,01$) v hodnotě střední barevné koncentrace, což souvisí se zvýšenou hodnotou hematokritu zjištěnou u ryb z hypoxických podmínek. U ostatních sledovaných parametrů (hemoglobin, hemoglobin erytrocytu) nebyly mezi skupinami zjištěny statisticky významné rozdíly.

6 Závěr

Z výsledků provedených pokusů vyplývá, že u ryb vystavených hypoxickým podmínkám:

- 1) Došlo ke snížení produkce amoniakálního dusíku a k navýšení jeho koncentrace v krevní plazmě
- 2) Došlo ke zvýšení koncentrace glukózy v krevní plazmě a nárůstu počtu leukocytů v krvi (důsledek stresu vyvolaného nedostatkem kyslíku)
- 3) Došlo ke zvýšení hematokritové hodnoty (důsledek zvětšení objemu erytrocytů)

Provedenými pokusy byl jednoznačně prokázán vliv výše koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě na schopnost ryb zbavovat se hlavního metabolitu – amoniaku. Jak se dále prokázalo, tento proces je vratný a po zlepšení kyslíkových poměrů se schopnost ryb vylučovat amoniak vrací.

7 Použitá literatura

- Ballantyne, J. S., 2001. Amino acid metabolism. In: Wright, P., Anderson, P., Fish Physiology 20: 77-107.
- Bhatnagar, A., Devi, P., 2013. Water quality guidelines for the management of pond fish culture. International journal of environmental science 3 (6): 1980-2009.
- Blinová, L., 2009. Voda. Tlačové štúdio Váry, Trnava, 40 s.
- Bower, C. E., Bidwell, J. P., 1978. Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH, and salinity. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 35 (7): 1012-1016.
- Bronmark, C., Hansson, L. A., 2005. The biology of lakes and ponds. Oxford University Press, Oxford, 285 pp.
- Buttner, J. K., Soderberg, R. W., Terlizzi, D. E., 1993. An introduction to water chemistry in freshwater aquaculture [online]. Northeastern regional aquaculture center, fact sheet 170, University of Massachusetts [cit. 2015-02-24]. Dostupné na WWW: <http://www.aces.edu/dept/fisheries/education/ras/publications/water_quality/wqchemntr onrac170.pdf>.
- ČSN 83 0530. Chemický a fyzikální rozbor povrchové vody. Stanovení amoniaku a amonných solí. ÚNMZ, Praha, 1. 10. 1980.
- Davis, J. C., 1975. Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life with emphasis on Canadian species: a review. Journal of fisheries research board Canada 32 (12): 2295-2332.
- Dong, X., Zhang, X., Qin, J., Zong, S., 2013. Acute ammonia toxicity and gill morphological changes of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in normal versus supersaturated oxygen. Aquaculture Research 44 (11): 1752-1759.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., Choe, K. P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiological Reviews 85 (1): 97-177.
- Figuroa-Lucero, G., Hernández-Rubio, M. C., Gutiérrez-Ladrón de Guevara, M. J., 2012. Acute toxicity of ammonia on *Macrobrachium tenellum* (smith) larvae. Revista internacional de contaminación ambiental 28: 145-150.

- Francis-Floyd, R., 2003. Dissolved Oxygen for Fish Production [online]. IFAS Extension FA 27, University of Florida [cit. 2015-02-24]. Dostupné na WWW: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FA/FA00200.pdf>>.
- Hillaby, B. A., Randall, D. J., 1979. Acute ammonia toxicity and ammonia excretion in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of the Fisheries Research Board of Canada 36 (6): 621-629.
- Horáková, M., Janda, V., Koller, J., Kollerová, L., Koubíková, J., Palatý, J., Pokorná, D., Kujalová, H., Schejbal, P., Smrčková, Š., Strnadová, N., Sýkora, V., 2007. Analytika vody. Vydavatelství VŠCHT Praha, Praha, 335 s.
- Horáková, M., Lischke, P., Grünwald, A., 1989. Chemické a fyzikální metody analýzy vod. Nakladatelství technické literatury, Praha, 392 s.
- Hosseini, P., Vahabzade, H., Bourani, M. S., Kazemi, R., 2011. The effects of salinity stress on hematocrit and hemoglobin in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). International Conference on Medical, Biological and Pharmaceutical Sciences, Pattaya, pp. 487-489.
- Ip, Y. K., Chew, S. F., Leong, I. A., Jin, Y., Lim, C. B., Wu, R. S., 2001a. The sleeper *Bostrichthys sinensis* (family Eleotridae) stores glutamine and reduces ammonia production during aerial exposure. Journal of Comparative Physiology B 171 (5): 357-367.
- Ip, Y. K., Chew, S. F., Randall, D. J., 2001b. Ammonia toxicity, tolerance and excretion. In: Wright P., Anderson P., Fish Physiology 20: 109-148.
- Ip, Y. K., Lem, C. B., Chew, S. F., Wilson, J. M., Randall, D. J., 2001c. Partial amino acid catabolism leading to the formation of alanine in *Periophthalmodon schlosseri* (mudskipper): a strategy that facilitates the use of amino acids as an energy source during locomotory activity on land. Journal of Experimental Biology 204 (9): 1615-1624.
- Jarboe, H. H., 1995. Diel dissolved oxygen consumption and total ammonia nitrogen production by fingerling channel catfish following feeding at different times. The Progressive Fish-Culturist 57 (2): 156-160.
- Kolářová, J., Velíšek, J., 2012. Stanovení a vyhodnocení biochemického profilu krve ryb. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV, Vodňany, 54 s.

- Kopp, R., Lang, Š., Ziková, A., Mareš, J., 2008. Změny spotřeby kyslíku a exkrece amoniakálního dusíku u tilapie nilské (*Oreochromis niloticus*) v závislosti na množství proteinu v krmivu. In: Kopp, R., XI. Česká ichtyologická konference, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, s. 121-125.
- Kutty, M. N., 1972. Respiratory quotient and ammonia excretion in *Tilapia mossambica*. *Marine Biology* 16 (2): 126-133.
- Lee, J., Park, D. W., Park, I., Cho, S. H., 2012. Effect of water temperature and post-feeding period on postprandial ammonia excretion and oxygen consumption by larval Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) fed rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 12: 253-258.
- Lloyd, R., 1961. Effects of dissolved oxygen concentrations on the toxicity of several poisons to rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Richardson). *Journal of Experimental Biology* 38 (2): 447-455.
- Máchová, J., Svobodová, Z., 2014. Teplota vody. In: Velíšek, J. (Eds.), *Vodní toxikologie pro rybáře*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV, Vodňany, s. 151-160.
- Máchová, J., Valentová, O., Faina, R., Svobodová, Z., Kroupová, H., Mráz, J., 2010. Znečištění produkované kaprem obecným z různých podmínek odchovu. *Bulletin VÚRH Vodňany* 46 (1): 31-38.
- Marcaggi, P., Coles, J. A., 2001. Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. *Progress in Neurobiology* 64 (2): 157-183.
- Nařízení vlády č. 61/2003 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech, ve znění platném k 28. 2. 2003.
- Pérez-Robles, J., Re, A. D., Giffard-Mena, I., Díaz, F., 2012. Interactive effects of salinity on oxygen consumption, ammonium excretion, osmoregulation and Na⁺/K⁺-ATPase expression in the bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842). *Aquaculture Research* 43 (9): 1372-1383.
- Pitter, P., 1999. *Hydrochemie*. Vydavatelství VŠCHT, Praha, 568 s.
- Randall, D. J., Tsui, T. K., 2002. Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin* 45 (1-12): 17-23.

- Rattner, B. A., Heath, A. G., 2003. Environmental factors affecting kontaminant toxicity in aquatic and terrestrial vertebrates. In: Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton, A. G., Cairns, J., Handbook of ecotoxicology. Lewis Publishers, USA, pp. 679-699.
- Rosso, F. L., Bolner, K. C. S., Baldisserotto, B., 2006. Ion fluxes in silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. Neotropical Ichthyology 4 (4): 435-440.
- Rossouw, N., 2003. Dissolved oxygen [online]. Rhodes University [cit. 2015-02-24]. Dostupné na WWW:
<http://www.ru.ac.za/static/institutes/iwr/software/reserve/wqdss/Dissolved_Oxygen_V00.htm>.
- Saha, N., Dutta, S., Bhattacharjee, A., 2002. Role of amino acid metabolism in an air-breathing catfish, *Clarias batrachus* in response to exposure to a high concentration of exogenous ammonia. Comparative Biochemistry and Physiology B - Biochemistry & Molecular Biology 133 (2): 235-250.
- Smutná, M., Svobodová, Z., Vorlová, L., 2001. Vznik a pohyb amoniaku ve vnitřním prostředí ryb. In: Sborník z konference Ochrana zdraví ryb. VÚRH JU Vodňany, s. 97-112.
- Stejskal, V., Kouřil, J., Valentová, O., Hamáčková, J., Polícar, T., 2009. Size-related oxygen consumption and ammonia excretion of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) reared in a recirculating system. Aquaculture Research 41 (1): 135-142.
- Svobodová, Z., 2015. Ústní sdělení [28. 4. 2015].
- Svobodová, Z., Gelnarová, J., Justýn, J., Krupauer, V., Máchová, J., Simanov, L., Valentová, V., Vykusová, B., Wohlgemuth, E., 1987. Toxikologie vodních živočichů. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 232 s.
- Svobodová, Z., Máchová, J., 2014. Amoniak. In: Velíšek, J. (Eds.), Vodní toxikologie pro rybáře. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV, Vodňany, s. 180-191.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Kroupová, H., 2008. Otravy ryb. In: Svobodová, Z. (Ed.), Veterinární toxikologie v klinické praxi. Profi Press, Praha, s. 201-217.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Kroupová, H., Smutná, M., Groch, L., 2007. Ammonia autointoxication of common carp: case studies. Aquaculture International 15 (3): 277-286.

- Svobodová, Z., Máchová, J., Veselý, V., Modrá, H., Svoboda, M., a kol., 2003. Veterinární toxikologie. Praktická cvičení část I. VFU Brno, Brno, 179 s.
- Svobodová, Z., Lloyd, R., Máchová, J., Vykusová, B., 1993. Water quality and fish health. EIFAC technical paper 54, FAO, Rome, 59 pp.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Modrá, H., 2012. Metody hematologického vyšetřování ryb. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV, Vodňany, 38 s.
- Swann, L. D., 1997. A Fish Farmer's Guide to Understanding Water Quality [online]. Aquaculture Extension Fact Sheet AS-503, Illinois and Indiana [cit. 2015-02-24]. Dostupné na WWW:
<<http://www.indianasoybean.net/images/stories/Workshops/WaterQuality/File%20B%20Water%20Quality.pdf>>.
- Thurston, R., Philips, G. R., Russo, R. C., Hynkins, S. M., 1981. Increased toxicity of ammonia to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) resulting from reduced concentrations of dissolved oxygen. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science 38: 983-988.
- Tölgyessy, J., Betina, V., Frank, V., Fuska, J., Lesný, J., Moncmanová, A., Palatý, J., Piatrik, M., Pitter, P., Prousek, J., 1989. Chémia, biológia a toxikológia vody a ovzdušia. VEDA, vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava, 536 s.
- Tsui, T. K. N., Randall, D. J., Hanson, L., Farrell, A. P., Chew, S. F., Ip, Y. K., 2004. Dogmas and controversies in the handling of nitrogenous wastes: ammonia tolerance in the oriental weather loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Journal of Experimental Biology 207 (12): 1977-1983.
- Valentová, O., Máchová, J., Svobodová, Z., 2014. Kyslík. In: Velišek, J. (Eds.), Vodní toxikologie pro rybáře. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV, Vodňany, s. 169-179.
- Wajsbrodt, N., Gasith, A., Krom, M. D., Popper, D. M., 1991. Acute toxicity of ammonia to juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* under reduced oxygen levels. Aquaculture 92: 277-288.
- Weihrauch, D., Wilkie, M. P., Walsh, P. J., 2009. Ammonia and urea transporters in gills of fish and aquatic crustaceans. Journal of Experimental Biology 212 (11): 1716-1730.

- Wicks, B. J., Randall, D. J., 2002. The effect of sub-lethal ammonia exposure on fed and unfed rainbow trout: the role of glutamine in regulation of ammonia. *Comparative biochemistry and physiology A - Molecular & Integrative Physiology* 132 (2): 275-285.
- Wilkie, M. P., 2002. Ammonia excretion and urea handling by fish gills: present understanding and future research challenges. *Journal of Experimental Zoology* 293 (3): 284-301.
- Wilkie, M. P., Wood, C. M., 1996. The adaptations of fish to extremely alkaline environments. *Comparative Biochemistry and Physiology B - Biochemistry & Molecular Biology* 113 (4): 665-673.
- Wilkie, M. P., Wright, P. A., Iwama, G. K., Wood, C. M., 1993. The physiological responses of the Lahontan cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki henshawi*), a resident of highly alkaline Pyramid Lake (pH 9.4), to challenge at pH 10. *Journal of Experimental Biology* 175: 173-194.
- Wilson, J. M., Randall, D. J., Donowitz, M., Vogl, A. W., Ip, A. K., 2000. Immunolocalization of ion-transport proteins to branchial epithelium mitochondria-rich cells in mudskipper (*Periophthalmodon schlosseri*). *Journal of Experimental Biology* 203 (15): 2297-2310.
- Wood, C. M., 1993. Ammonia and urea metabolism and excretion. In: Ewans, D. H. (Ed.), *Physiology of fishes*. CRC Press, Boca Raton, pp. 379-425.
- Wood, C. M., 2001. Influence of feeding, exercise, and temperature on nitrogen metabolism and excretion. In: Wright P., Anderson P., *Fish Physiology* 20: 201-238.
- Wright, P. A., Fyhn, H. J., 2001. Ontogeny of nitrogen metabolism and excretion. *Fish Physiology* 20: 149-200.

8 Seznam příloh

Příloha 1: Koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě a hodnoty pH v průběhu předběžných pokusů.

Příloha 2: Koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě v průběhu hlavního pokusu, průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka.

Příloha 3: Koncentrace amoniakálního dusíku ve vodě a celková produkce amoniakálního dusíku v přepočtu na 1 kg hmotnosti ryb v průběhu hlavního pokusu, průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka.

Příloha 4: Koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě v průběhu dodatečného pokusu, průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka.

Příloha 5: Koncentrace amoniaku ve vodě a celková produkce amoniaku v přepočtu na 1 kg hmotnosti ryb v průběhu dodatečného pokusu, průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka.

Příloha 6: Ryby ve sklenicích při předběžném pokusu 1 (Foto autor).

Příloha 7: Ryby ve sklenicích při předběžném pokusu 2 (Foto autor).

Příloha 8: Akvária v hlavním pokusu s nevzduchovanou vodou a s polystyrénem obaleným v igelitu na hladině (Foto autor).

Příloha 9: Spektrofotometr Spectronic 20 Genesys (Foto autor).

Příloha 10: pHmetr a oximetr - multifunkční přístroj MultiLine P4 firmy WTW (Foto autor).

Příloha 11: Odběr krve z ocasní cévy (Foto autor).

Příloha 12: Odečítání hodnot hematokritu na hematokritovém měřidle (Foto J. Máchová).

9 Přílohy

Příloha 1: Koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě a hodnoty pH v průběhu předběžných pokusů.

	Doba trvání pokusu (h)	Předběžný pokus 1		Předběžný pokus 2	
		Koncentrace rozpuštěného kyslíku (mg.l^{-1})	pH	Koncentrace rozpuštěného kyslíku (mg.l^{-1})	pH
Sklenice č. 1	0	8,48	8,0	8,43	8,0
	1	0,65	7,2	2,66	7,4
	2	0,40	7,1	0,65	7,1
Sklenice č. 2	0	8,48	8,0	8,43	8,0
	1	0,72	7,1	5,70	7,4
	2	0,39	7,0	2,43	7,1
Sklenice č. 3	0	8,48	8,0	8,43	8,0
	1	5,12	7,2	6,50	7,4
	2	4,46	7,1	6,40	7,3

Příloha 2: Koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě v průběhu hlavního pokusu – průměrné hodnoty \pm směrodatné odchylky.

Doba trvání pokusu (h)	Průměrná koncentrace rozpuštěného kyslíku (mg.l^{-1})	
	Skupina 1	Skupina 2
0	$9,55 \pm 0,05$	$9,70 \pm 0,06$
0,5	$3,48 \pm 0,83$	$8,65 \pm 0,50$
1	$1,46 \pm 0,54$	$9,26 \pm 0,39$
1,5	$0,89 \pm 0,20$	$9,33 \pm 0,38$
2	$0,79 \pm 0,07$	$9,18 \pm 0,38$
2,5	$0,76 \pm 0,04$	$9,08 \pm 0,35$
3	$0,76 \pm 0,06$	$9,46 \pm 0,35$

Příloha 3: Koncentrace amoniakálního dusíku ve vodě a celková produkce amoniakálního dusíku v přepočtu na 1 kg hmotnosti ryb v průběhu hlavního pokusu – průměrné hodnoty ± směrodatné odchytky.

Doba trvání pokusu (h)	Koncentrace N-NH ₄ ⁺ (mg.l ⁻¹)		Produkce N-NH ₄ ⁺ na 1 kg hmotnosti ryb (mg)	
	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 1	Skupina 2
0	0,10 ± 0,00	0,11 ± 0,01	2,63 ± 0,43	2,68 ± 0,51
1	0,83 ± 0,29	0,76 ± 0,35	22,04 ± 8,05	18,45 ± 8,30
1,5	0,96 ± 0,26	1,09 ± 0,47	25,50 ± 7,06	25,86 ± 9,85
2	0,94 ± 0,09	1,33 ± 0,19	25,01 ± 3,14	32,56 ± 4,08
3	1,30 ± 0,27	1,65 ± 0,24	34,74 ± 8,31	40,28 ± 4,48

Příloha 4: Koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě v průběhu dodatečného pokusu – průměrné hodnoty ± směrodatné odchytky.

Doba trvání pokusu (h)	Skupina 1	Skupina 2
	Průměrná koncentrace rozpuštěného kyslíku (mg.l ⁻¹)	Průměrná koncentrace rozpuštěného kyslíku (mg.l ⁻¹)
0	5,79 ± 0,62	9,01 ± 0,51
0,5	1,32 ± 0,37	7,76 ± 0,37
1	1,21 ± 0,18	9,11 ± 0,23
2	1,03 ± 0,18	8,02 ± 0,25
3	1,09 ± 0,26	7,68 ± 0,36
3,5	0,99 ± 0,17	7,90 ± 0,38
4,5	1,02 ± 0,18	7,67 ± 0,34
4,6	8,20 ± 0,49	7,52 ± 0,29
5	9,10 ± 0,14	7,38 ± 0,50
6	7,08 ± 0,41	7,36 ± 0,45
7	7,17 ± 0,21	7,62 ± 0,31

Příloha 5: Koncentrace amoniaku ve vodě a celková produkce amoniaku v přepočtu na 1 kg hmotnosti ryb v průběhu dodatečného pokusu – průměrné hodnoty ± směrodatné odchylky.

Doba trvání pokusu (h)	Koncentrace N-NH ₄ ⁺ (mg.l ⁻¹)		Produkce N-NH ₄ ⁺ na 1 kg hmotnosti ryb (mg)	
	Sk. 1	Sk. 2	Sk. 1	Sk. 2
0	0,10 ± 0,00	0,12 ± 0,03	3,10 ± 0,65	3,48 ± 0,75
1	0,60 ± 0,20	1,09 ± 0,42	17,51 ± 5,21	29,97 ± 8,21
2	0,97 ± 0,32	1,99 ± 0,44	28,41 ± 9,98	55,47 ± 9,29
3,5	1,24 ± 0,30	3,00 ± 0,63	35,75 ± 7,66	81,91 ± 10,44
4,5	1,70 ± 0,36	3,83 ± 0,96	47,92 ± 4,91	101,53 ± 8,31
5	1,92 ± 0,39	3,58 ± 0,73	54,49 ± 12,97	94,69 ± 13,27
6	2,66 ± 0,40	3,90 ± 0,85	74,39 ± 15,91	101,04 ± 15,85
7	3,41 ± 0,51	4,27 ± 0,67	93,38 ± 17,82	110,13 ± 18,21

Příloha 6: Ryby ve sklenicích při předběžném pokusu 1 (Foto autor).



Příloha 7: Ryby ve sklenicích při předběžném pokusu 2 (Foto autor).



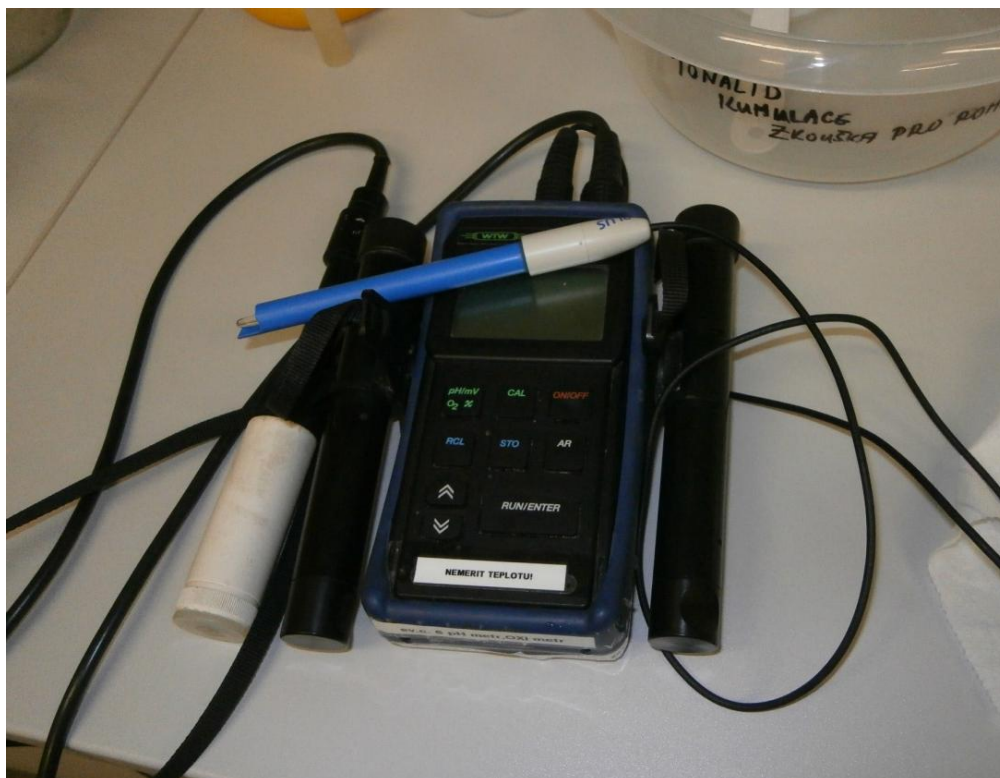
Příloha 8: Akvária v hlavním pokusu s nevzduchovanou vodou a s polystyrénem obaleným v igelitu na hladině (Foto autor).



Příloha 9: Spektrofotometr Spectronic 20 Genesys (Foto autor).



Příloha 10: pHmetr a oximetr - multifunkční přístroj MultiLine P4 firmy WTW (Foto autor).



Příloha 11: Odběr krve z ocasní cévy (Foto autor).



Příloha 12: Odečítání hodnot hematokritu na hematokritovém měřidle (Foto J. Máchová).



10 Abstrakt

Vylučování amoniaku rybami za rozdílných oxických podmínek prostředí

Cílem této práce bylo zjistit a porovnat koncentrace amoniakálního dusíku vylučovaného rybami při různém nasycení vody kyslíkem. V Laboratoři vodní toxikologie a ichtyopatologie VÚRH JU ve Vodňanech byly provedeny pokusy (předběžný, hlavní a dodatečný) s okrasnou formou kapra obecného (*Cyprinus carpio* f. *Koi*). Předběžný (orientační) pokus byl proveden se třemi rozdílnými koncentracemi rozpuštěného kyslíku (I. 0,65 – 2,66; II. 2,43 – 5,70; III. 6,40 – 6,50 mg.l⁻¹ O₂) a produkce amoniakálního dusíku rybami za 2 hodiny v přepočtu na 1 kg hmotnosti ryb činila I. 24,61; II. 85,29; III. 70,19 mg N-NH₄⁺. V hlavním pokusu provedeném v šestinásobném opakování byly ryby rovněž vystaveny rozdílným oxickým podmínkám (hypoxie 0,76 – 1,46; normoxie 9,8 – 9,46 mg.l⁻¹ O₂) a zjištěná produkce amoniakálního dusíku po dvou hodinách trvání pokusu v přepočtu na 1 kg hmotnosti ryb činila u ryb v hypoxii 25,01 ± 3,14 mg N-NH₄⁺ a u ryb v normoxii 32,56 ± 4,08 mg N-NH₄⁺. Zjištěný rozdíl byl statisticky významný (P < 0,05). Hematologické a biochemické vyšetření krve ryb v závěru pokusu prokázalo statisticky významné rozdíly v počtu leukocytů, hodnotě hematokritu, koncentraci amoniaku a glukózy. Dodatečný pokus byl proveden v pětinasobném opakování a ryby zde byly vystaveny hypoxii (0,99 – 1,21 mg.l⁻¹ O₂) a normoxii (7,67 – 9,11 mg.l⁻¹). V průběhu pokusu byly zjištěny statisticky významné rozdíly v produkci amoniakálního dusíku (po dvou hodinách u ryb vystavených hypoxii 28,41 ± 9,98 mg a u kontrolních ryb v normoxii 55,47 ± 9,29 mg). Po 4,5 hodinách trvání pokusu se rozdíl ještě zvýšil a činil u ryb v hypoxii 47,92 ± 4,91 mg N-NH₄⁺ a u ryb kontrolních 101,53 ± 8,31 mg N-NH₄⁺. Po zavedení vzduchování se během 10 minut koncentrace kyslíku ve vodě u ryb vystavených hypoxii vyrovnala koncentraci u kontrolních ryb a produkce amoniakálního dusíku se začala zvyšovat. Po následujících 2,5 hodinách byla produkce amoniakálního dusíku u ryb původně vystavených hypoxii (1) a kontrolních ryb (2) srovnatelná (1 – 93,38 ± 17,82 mg; 2 – 110,13 ± 18,21 mg; tyto hodnoty již nebyly statisticky významně rozdílné).

Výsledky pokusu prokázaly, že schopnost ryb vylučovat z těla amoniak úzce souvisí s kyslíkovými poměry ve vodním prostředí.

Klíčová slova: amoniakální dusík, deficit kyslíku, glukóza, erytrocyty, leukocyty, kapr obecný

11 Abstract

Fish excretion of ammonia under different oxygen environmental conditions

The aim of this work was to find out and compare amount of ammonia nitrogen excreted by fish in different oxygen saturation of water. Experiments (preliminary, main and additional) were made with ornamental form of common carp (*Cyprinus carpio f. Koi*) at Laboratory of Aquatic Toxicology and Ichthyopathology RIFCH in Vodňany. The preliminary (orientation) experiment was made in three different dissolved oxygen concentrations (I. 0,65 – 2,66; II. 2,43 – 5,70; III. 6,40 – 6,50 mg.l⁻¹ O₂) and fish production of ammonia nitrogen after 2 hours was I. 24,61; II. 85,29; III. 70,19 mg N-NH₄⁺ per 1 kg of fish weight. The fish were also exposed to different oxygen conditions (hypoxia 0,76 – 1,46; normoxia 9,8 – 9,46 mg.l⁻¹ O₂) in the main experiment which was repeated six times. Detected production of ammonia nitrogen in recalculated to 1 kg fish weight was 25,01 ± 3,14 mg N-NH₄⁺ by the fish in hypoxia and 32,56 ± 4,08 mg N-NH₄⁺ by the fish in normoxia after two hours of experiment duration. Detected difference was statistically significant (P < 0,05). Haematology and biochemical blood examination of fish which were exposed to hypoxia proved statistically significant increasing number of leukocytes, value of haematocrit, concentration of ammonia and glucose was made in the end of experiment. The additional experiment was repeated five times, the fish were exposed to hypoxia there (0,99 – 1,21 mg.l⁻¹ O₂) and the control fish were kept in water with concentration of dissolved oxygen between 7,67 – 9,11 mg.l⁻¹. Statistically significant differences in ammonia nitrogen production were already found out in these groups of fish after two hours of experiment duration and difference increased markedly after 4,5 hours (fish production of ammonia exposed to hypoxia 47,92 ± 4,91 mg.kg⁻¹ and in the control fish 101,53 ± 8,31 mg.kg⁻¹). Production of ammonia by the fish originally exposed to hypoxia almost aligned to production of control fish during 2,5 hours after an aeration had been added to the fish in hypoxia. Production of ammonia nitrogen was 93,38 ± 17,82 mg.kg⁻¹ by the fish originally exposed to hypoxia and 110,13 ± 18,21 mg.kg⁻¹ by the control fish. This difference was not statistically significant yet.

The results of experiment proved that fish ability to excrete ammonia from body is closely connected with oxygen conditions in water environment.

Key words: ammonia nitrogen, oxygen deficit, glucose, erythrocytes, leukocytes, common carp