

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

KATEDRA RYBÁŘSTVÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**VYUŽITÍ BIOTESTŮ NA JIKRÁCH HALANČÍKA *ORYZIAS LATIPES*
PRO SCREENINGOVÉ STANOVENÍ TOXICITY VOD S VÝSKYTEM
SINICOVÝCH VODNÍCH KVĚTŮ**

Studijní program: M4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Rybářství

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Zdeněk Adámek, CSc.

Autor:

Jiří Sikora

2008

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Katedra rybářství
Akademický rok: 2004/2005

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jiří SIKORA**

Studijní program: **M4101 Zemědělské inženýrství**

Studijní obor: **Rybářství**

Název tématu: **Využití biotestů na jikrách halančíka *Oryzias latipes* pro screeningové stanovení toxicity vod s výskytem sinicových vodních květů**

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

Zaměření práce: K vyhodnocení vlivu škodlivých účinků metabolitů sinic, přítomných ve vodách s výskytem vodních květů, bude rozpracována metodika screeningového stanovení na jikrách halančíka *Oryzias latipes*. Jikry budou po dobu embryonálního vývoje vystaveny působení filtrovaných přírodních vzorků vod s výskytem vodních květů. Screeningové embryotoxikologické testy budou zaměřeny na vyhodnocení použitelnosti základních kritérií - líhivosti, délky embryonálního vývoje, výskytu deformit a anomálií apod. pro potřeby hygienických požadavků na veřejné využívání povrchových vod.

Rozsah práce: 20 - 30 stran
Rozsah příloh: 10 grafů
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

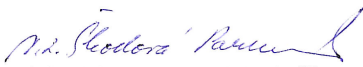
- Adámek Z., 1999: Biologie halančíka *Oryzias latipes* a metodika jeho chovu pro toxikologické testy. In: Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí, Soláň: 77-82.
Maršálek B., Keršner V., Marvan P. (Eds), 1996: Vodní květy sinic. Natio Flos-Aquae, Brno, 142 s.
Maršálek B., Halousková O. (Eds): Cyanobakterie. Ekomonitor, Brno, 177s.

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Zdeněk Adámek, CSc.
Katedra rybnářství

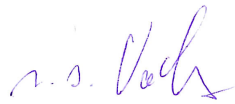
Datum zadání diplomové práce: 10. února 2005
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2007

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

L.S.


prof. Ing. Magdalena Hrabánková, CSc.

děkanka



doc. Ing. Petr Hartvich, CSc.

vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 15. března 2005

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

Datum: 25. dubna 2008

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval především vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Zdeňkovi Adámkovi, CSc. za spolupráci, trpělivost, velkou ochotu a odbornou pomoc poskytovanou mi při zpracování této diplomové práce. Nemalý dík patří též všem pracovníkům oddělení akvakultury a hydrobiologie VÚRH JU Vodňany za pomoc při realizaci praktických částí výzkumu. Za přípravu potřebných vzorků bych také rád poděkoval pracovníkům Centra pro cyanobakterie a jejich toxiny v Brně.

Touto cestou také děkuji celé mé rodině a přítelkyni Martině za trvalou podporu během celého studia.

ABSTRAKT

Využití biotestů na jikrách halančíka *Oryzias latipes* pro screeningové stanovení toxicity vod s výskytem sinicových vodních květů.

Sinicový vodní květ a jeho nepříznivé průvodní jevy v nádržích jsou již několik let známé. Výzkum se snaží najít odpovědi na to, jak se tohoto dnešního fenoménu zbavit a nové studie prokazují řadu nepříznivých vlivů spojených s výskytem vodního květu. Tato práce se skládá ze dvou částí. V první části je vyhodnocen nejvhodnější metodický postup pro screeningové testy použité v druhé části. Oplodněné jikry ryby *Oryzias latipes* byly inkubovány v 6 testech v rozdílných počtech (1 až 6) za standardních podmínek v ISO vodě. V testech byla zjišťována líhnivost a délka embryonálního vývoje a výsledky aplikovány na screeningové testy provedené v druhé části práce. Druhá část práce je zaměřena na zjištění potencionálních toxických účinků vod se sinicovým vodním květem. Oplozené jikry *Oryzias latipes* nasazené v 6. (cca 3 hod.) až 8. (cca 4 hod.) stádiu byly po dobu embryonálního vývoje vystaveny třem vzorkům biomas sinicových vodních květů z volných vod se známým druhovým složením (**vz.1:** *Woronichinia naegeliana*, *Microcystis aeruginosa*, *M. flos-aquae*, *Anabaena sigmaidea*; **vz. 2:** *M. aeruginosa*, *Woronichinia naegeliana*; **vz. 3:** *M. aeruginosa*, *Aphanisomenon flos-aquae*) a obsahem microcystinů – LR, YR a RR. V průběhu testu byla sledována líhnivost, délka embryonálního vývoje, letální a subletální efekty. Průběh byl prováděn dle OECD 212. Testy byly provedeny ve dvou koncentracích (A= 40, B= 200 mg sušiny na litr). Byly zjištěny prokazatelné rozdíly oproti kontrolní skupině v líhnivosti, délce embryonálního vývoje a v některých případech i indukci deformit.

Klíčová slova: *Oryzias latipes*, sinicový vodní květ, embryonální vývoj, cyanotoxiny, microcystin, embryotoxikologie;

ABSTRACT

The application of biotests on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs for the screening assessment of cyanobacterial water blooms toxicity.

Cyanobacterial water blooms and their adverse effects in reservoirs are known for the years. The research tries to find the answer, how to get of this phenomenon and the new studies show the harmful impacts associated with water blooms occurrence. This thesis has two parts. In the first part there is described an optimal methodological process for screening tests used in subsequently. Fertilized fish eggs of *Oryzias latipes* were incubated in 6 tests with different numbers (from 1 to 6) with standard conditions in ISO water. In the tests, hatching performance and duration of embryonic development were investigated and the results were applied on screening tests. The other part of the thesis is aimed on the proof of potential toxic effects of water with cyanobacterial water bloom. The fertilized eggs of *Oryzias latipes* were embedded into the test in stage 6 (about 3 hours) to 8 (about 4 hours). Three samples of cyanobacterial biomass from free waterbodies with known species composition (sample 1: *Woronichinia naegeliana*, *Microcystis aeruginosa*, *M. floss- aquae*, *Anabaena sigmaidea*; sample 2: *M. aeruginosa*, *Woronichinia naegeliana*; sample 3: *M. aeruginosa*, *Aphanisomenon floss- aquae*) and microcystin – LR, YR and RR contents were tested. The hatching performance, duration of embryonic development, lethal and sublethal effects were monitored during the tests. The tests were performed according to the OECD 212 and carried out in two concentrations (A= 40, B= 200 mg dry matter of biomass per litre). There were detected significant differences in hatching performance, duration of embryonic development and in some cases also in induction of deformities between the control group and the tested groups.

Key words: *Oryzias latipes*, cyanobacterial water bloom, embryonic development, cyanotoxins, microcystin, embryotoxicology;

OBSAH:

1. ÚVOD.....	13
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	14
2.1. JAPONSKÁ MEDAKA	14
2.1.1. Modelový organizmus – <i>Oryzias latipes</i>	14
2.1.2. Popis druhu	14
2.1.3. Systematické zařazení	15
2.1.4. Rozšíření.....	16
2.1.5. Pohlavní dimorfismus	17
2.1.6. Ekologie.....	17
2.1.7. Chov.....	18
2.1.8. Enzym líhnutí, jeho syntéza, sekrece a účinky na chorion	19
2.1.9. Přirozená mortalita v průběhu embryonálního vývoje halančíků	23
2.2. SINICE, JEJICH TOXINY A VODNÍ KVĚT	25
2.2.1. Trofie	25
2.2.2. Eutrofizace	25
2.2.2.1. Příčiny eutrofizace	26
2.2.2.2. Následky eutrofizace	27
2.2.3. Sinice - cyanobakterie	28
2.2.3.1. Charakteristika	28
2.2.3.2. Stavba buňky	29
2.2.4. Sinicový vodní květ.....	31
2.2.5. Nejčastější rody způsobující sinicové vodní květy v České republice	32
2.2.6. Vybrané druhy sinic a jejich charakteristika	34
2.2.6.1. <i>Microcystis aeruginosa</i>	34
2.2.6.2. <i>Microcystis flos-aquae</i>	34
2.2.6.3. <i>Woronichinia naegeliana</i>	34
2.2.6.4. <i>Anabaena sigmaidea</i>	35
2.2.6.5. <i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	35
2.2.7. Cyanotoxiny.....	37
2.2.7.1. Rozdělení cyanotoxinů	37
2.2.7.2. <i>Microcystiny</i>	39
2.2.7.3. <i>Nodularin</i>	41
2.2.7.4. <i>Anatoxiny</i>	41
2.2.7.5. <i>Saxitoxin (Aphanotoxin)</i>	42
2.2.7.6. <i>Cylindrospermopsin</i>	42
2.2.7.7. <i>Lipopolysacharidy</i>	43
2.2.8. Vliv <i>microcystinů</i> na embrya <i>Oryzias latipes</i>	46
3. MATERIÁL A METODIKY	48
3.1. TESTOVÁNÍ PARAMETRŮ SE ZMĚNOU POČTU JIKER.....	48
3.1.1. Generační ryby a metodika jejich chovu	48
3.1.2. Výtěr generačních ryb	49
3.1.3. Odběr jiker.....	50
3.1.4. Design testů líhivosti a délky embryonálního vývoje	51
3.1.5. Příprava inkubační vody a její složení	51
3.1.6. Metodika přípravy živé potravy.....	52

3.1.7. <i>Použité statistické metody</i>	53
3.2. METODIKA TESTOVÁNÍ SINICOVÝCH BIOMAS	53
3.2.1. <i>Generační ryby a metodika chovu</i>	53
3.2.2. <i>Design testů</i>	54
3.2.3. <i>Testované vzorky biomas</i>	54
3.2.4. <i>Průběh testů</i>	55
3.2.5. <i>Použité statistické metody</i>	56
4. VÝSLEDKY	58
4.1. VÝSLEDKY NÁVRHU METODICKÉHO POSTUPU	58
4.1.1. <i>Experiment A: jedna jikra v testovacích komorách</i>	58
4.1.2. <i>Experiment B: dvě jikry v testovacích komorách</i>	60
4.1.3. <i>Experiment C: tři jikry v testovacích komorách</i>	62
4.1.4. <i>Experiment D: čtyři jikry v testovacích komorách</i>	64
4.1.5. <i>Experiment E: pět jiker v testovacích komorách</i>	66
4.1.6. <i>Experiment F: šest jiker v testovacích komorách</i>	68
4.1.7. <i>Souhrnné porovnání dosažených výsledků v pokusech A až F</i>	70
4.2. VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ SINICOVÝCH BIOMAS	74
4.2.1. <i>Líhivost</i>	74
4.2.2. <i>Délka emryonálního vývoje</i>	77
4.2.3. <i>Začátek a konec líhnutí</i>	78
4.2.4. <i>Deformity a anomálie</i>	79
4.2.5. <i>Stádium úhynu</i>	82
4.2.6. <i>Sledování přežití larev do stádia přechodu na vnější výživu</i>	83
5. DISKUSE.....	84
6. ZÁVĚR	89
7. LITERATURA.....	90

1. ÚVOD

Přemnožené sinice (cyanobakterie) představují v dnešní době ve vodních nádržích vážný ekologický problém spočívající z pohledu ochrany přírody v narušování stability vodních ekosystémů a z pohledu ochrany zdraví obyvatel možnostmi expozice metabolity sinic nebo nemožností využití vodního zdroje v období jejich přemnožení (rekreační, vodárenské aj. využití).

Tento stav je důsledkem dlouhodobých a rozsáhlých změn v krajině zapříčiněných lidskou činností. Jednou z nejhlavnějších příčin je značné zvýšení přísunu živin do vodních ekosystémů, které v konkurenčním boji dokáží právě sinice lépe využít.

Uvolňování cyanotoxinů do vodního ekosystému je závažným problémem vyskytujícím se po boku přemnožení sinic a ovlivňujícím stavy vodních organismů. V posledních letech se začínají vědecké studie zabývat účinky sinic nebo jejich frakcí na vodní organismy a jejich ranná vývojová stadia s cílem zjistit jaký druh sinic nebo metabolit představuje reálná rizika pro jejich zdárný vývoj. Z hlediska zranitelnosti organismu v průběhu jeho života je to právě období embryonálního vývoje, které je nejvíce zranitelné a případné letální nebo subletální efekty by tak mohly mít významný negativní dopad na další generace.

Pro potřeby praxe jsou zapotřebí jednoduché a rychlé metody zjištění možného potenciálního rizika konkrétních sinicových biomas. Těmto požadavkům vyhovují screeningové embryotoxikologické testy neodhalující sice přímé biochemické ani druhové složení sinicových biomas, zato však přináší cenné poznatky o komplexním působení a dopadech na organismus testovaného živočicha a pomocí nich včas učinit rozhodnutí či opatření týkající se například naložení s vodním zdrojem.

Cíle této práce jsou:

- Vypracování optimálního metodického postupu pro využití při embryotoxikologických testech prováděných na japonské medace – *Oryzias latipes*.
- Vypracování screeningových embryotoxikologických testů na rybě *Oryzias latipes* za účelem zjištění potenciálních negativních dopadů přírodních vzorků vod s obsahem sinicových vodních květů se zaměřením na vyhodnocení:
 - Líhivosti
 - Délky embryonálního vývoje
 - Výskytu deformit a anomálií

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Japonská medaka

2.1.1. Modelový organizmus – *Oryzias latipes* (Temminck and Schlegel, 1846)

Oryzias latipes – japonská medaka neboli halančík rýžovištní je drobná ryba patřící mezi oviparní, neanuální, sladkovodní ryby „halančíky“ čeledi *Adrianichthyidae*. Velikost dospělých ryb se pohybuje mezi 2 – 4 cm (Kirchen a West, 1969). Stavba těla je typu *Epiplatys*, ale zavalitější (Vítek a Kadlec, 2001).

Medaka je využívána jako akvarijní ryba, ale její stěžejní uplatnění je nepochybně v oblasti laboratorní experimentální práce a zvláště v posledních letech je patrný nárůst zájmu o její využití v embryotoxikologii v souvislosti se zvýšeným tlakem na uplatnění zásad animal welfare (Adámek, 1999).

2.1.2. Popis druhu (Oshima, 1919)

Hlava: poměr délky těla / délka hlavy činí 4; poměr délky těla / šířka hlavy činí 4,5; poměr délky těla / šířka v místě ocasního násadce činí 9.5; poměr délky hlavy / průměru oka je 2,5; poměr délky hlavy / délka interorbitální mezery činí 2; poměr délky hlavy / délka rypce činí 4;

Ploutevní vzorec: D6, A18, P9, V5

V postranní čáře je 31 šupin.

Tělo se kaudálním směrem bilaterálně zplošťuje. Nejvyšší je v mediální části těla před urogenitální papilou. Hlava svrchu zploštělá. Interorbitální mezera široká. Rypec je kratší nežli průměr oka, zepředu široce zaoblený. Široká tlamka má přední postavení. Spodní čelist mírně přečnívající přes horní. Na každé čelisti jsou dvě řady ostrých zubů. Zuby v zadní řadě jsou menší. Na prvním žaberním oblouku 13 krátkých a špičatých žaberních tyčinek. Oči velmi velké s předním až horním zorným polem. Hřbetní ploutev je krátká, nacházející se kaudálně od transverzální roviny těla. Její báze je nad zadními dvěma třetinami ploutve anální. Její výška je rovna vzdálenosti mezi špičkou rypce a zadním okrajem očnice. Prsní ploutve jsou ve středové linii těla těsně za hlavou. Břišní ploutve jsou na ventrální části trupu a jejich konce dosahují až k řitnímu otvoru. Báze řitní ploutve je velice dlouhá. Zadní konec řitní ploutve dosahuje stejné úrovně

v kolmici, jako nejdelší přední paprsek ploutve hřbetní. Ocasní ploutev je rovně zakončena, může zde být náznak mírného vykrojení. Celý trup je pokryt cykloidními šupinami s výjimkou hlavy a hrdelní části.

Zbarvení

Divoká populace: horní část těla tmavě hnědavá, spodní část těla stříbřitá. Od týlu až k bázi hřbetní ploutve se táhne černý proužek. Boční strany těla jsou jemně kouřové. Horní část hlavy tmavě hnědá. Okraje šupin rovněž tmavé. Paprsky břišních a řitní ploutve jsou nepatrně černě tečkované. Peritoneum je černé.

2.1.3. Systematické zařazení

Aktuální systematické zařazení dle Eschmeyera (2004)

Nadtřída	<i>Osteichthyes</i>
Třída	<i>Actinopterygii</i>
Podtřída	<i>Neopterygii</i>
pom. Podtřída	<i>Teleostei</i>
Nadřád	<i>Acanthopterygii</i>
Řád	<i>Beloniformes</i>
Podřád	<i>Adrianichthyoidei</i>
Čeleď	<i>Adrianichthyidae</i>
Podčeleď	<i>Oryziinae</i>
Rod	<i>Oryzias</i>
Druh	<i>Oryzias latipes</i> (Temminck and Schlegel, 1846)

Obsah pojmu halančík, kam byl historicky halančík rýžovištní řazen, se postupně měnil a ani dnes není u různých autorů zcela shodný. Je to dáno novými pohledy na zařazování druhů do systému. Například Rosen v roce 1964 rozdělil halančíky do pěti čeledí a to podle způsobu rozmnožování. Další, kdo vytvořil jiný systém, byla Parentiová v roce 1981, která považovala způsob rozmnožování z hlediska systematického za druhotný. Založila jej na stavbě kostry. Nejnověji pak byla zpracována systematika ryb Eschmeyerem v letech 1998 až 2000. Ten principiálně vychází ze systému Parentiové (Vítek a Kadlec, 2001).

Koncem devadesátých let došlo v systematice halančíků k velmi závažným změnám. Jejich výsledkem jsou nová vědecká pojmenování asi 1/3 druhů, která

vycházejí z několika revizí. Nejvýznamnější jsou Costova revize (Costa, 1998), Huberova revize (Huber, 2000) a seznam druhů dle Lazary (Lazara, 2000).

Jak je to tedy s „halančíkem“ rýžovištním? Podle původního zařazení právě dle Rosena z roku 1964 spadala podčeleď *Oryziatinae* do čeledi *Cyprinodontidae* a řádu *Atheriniformes*. Připadal tedy k čeledi halančíkovití.

Podle nového systému dle Eschmeyera 1998 - 2000 je vyřazen z řádu *Cyprinodontiformes*. Spadá do nového **řádu** *Beloniformes*,

čeledi *Adrianichthyidae*,

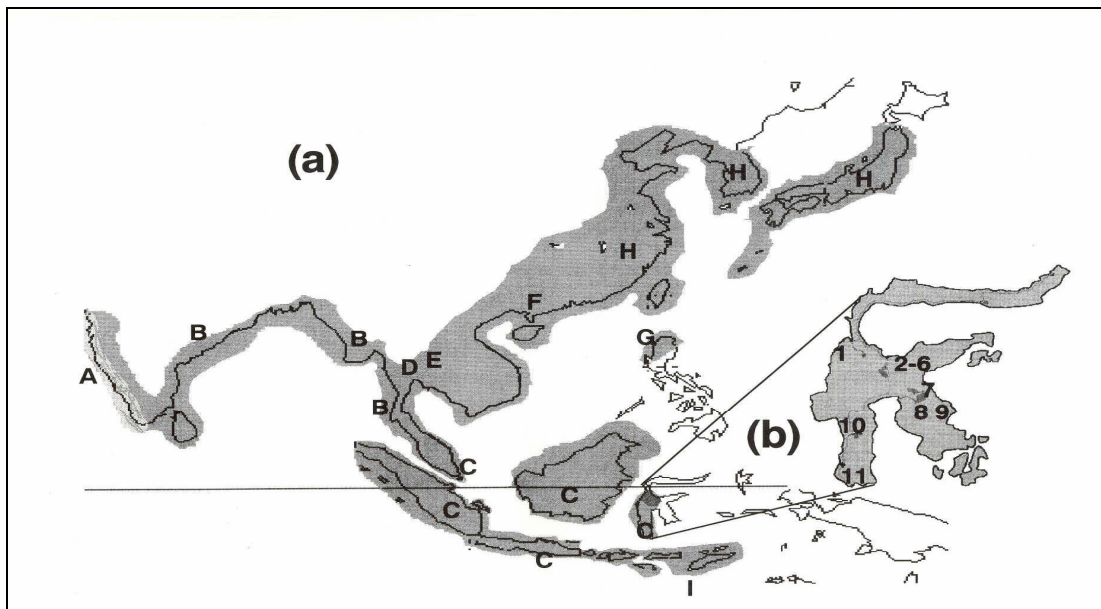
podčeledi *Oryziinae*.

Je ovšem zapotřebí říci, že v evropské chovatelské praxi jsou právě „rýžové ryby“ nadále považovány za halančíky (Vítek a Kadlec, 2001).

2.1.4. Rozšíření

Rod *Oryzias* je rozšířen od Indie a Indonésie přes Filipíny, Koreu až po Japonsko a Čínu (Vítek a Kadlec, 2001).

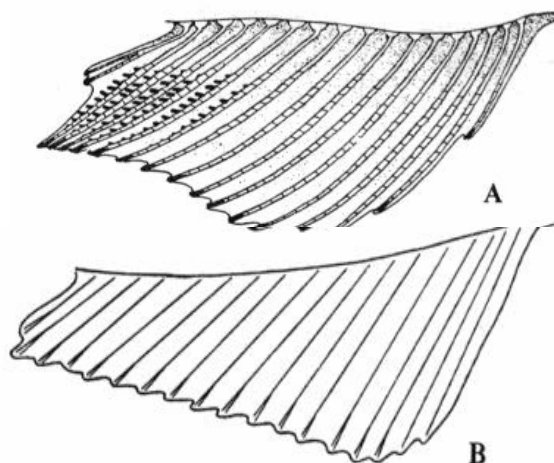
Samotný druh *Oryzias latipes* žije v Japonsku, Koreji a Číně (Temminck a Schlegel, 1846). V Japonsku se nenachází na ostrově Hokkaido. Nachází se též na Tajvanu (Naruse, 1996). Areál rozšíření je znázorněn na obrázku 1.



Obr. 1: Areál rozšíření *Oryzias latipes* – označen H, (Naruse, 1996, upraveno)

2.1.5. Pohlavní dimorfismus

Průměrná celková délka a hmotnost samic v pozorování generačních ryb v pokusu prováděném na VÚRH JU ($n = 111$) činila $30,6 \pm 3,1$ (21-36) mm a 411 ± 92 (262-630) mg. Samci ($n=73$) byli poněkud větší a dosahovali v průměru $31,6 \pm 3,1$ (24-36) mm a 436 ± 68 (274-541) mg. Tento rozdíl však nebyl signifikantní ($P > 0,05$), (Adámek, 1999). Kromě velikostních rozdílů je sekundární pohlavní diference patrná i morfologicky. Projevuje se na řitní a hřbetní ploutvi. Jejich okraje nejsou u samců celistvé, u starších ryb jakoby roztržené. Na obou ploutvích jsou patrné zářezy mezi posledními dvěma paprsky, které slouží k vzájemnému přichycení ryb při tření (Kirchen a West, 1969). Také se uvádí, že je možné pohlaví odlišit podle objemnosti břicha. Adámek (1999) však uvádí, že tato metoda nemusí být vždy spolehlivá, obzvláště po nakrmení ryb. Zbarvení divoké formy je nenápadné a velmi podobné pro obě pohlaví, avšak v laboratorních podmínkách byla vyšlechtěna celá řada barevných mutací. Rozdíly u řitní ploutve obou pohlaví jsou znázorněny na obrázku 2.



Obr. 2: Vzhled řitních ploutví medaky, A–samec, B–samice (Egami, 1975, upraveno)

2.1.6. Ekologie

Oblíbeným biotopem této ryby jsou rýžová pole, odtud anglický název „ricefish“ (rýžová ryba). Obývá však i různé stojaté a pomalu tekoucí, hlavně prosluněné potoky a řeky. Žijí v malých skupinách připomínající svým chováním tetrovité ryby (Vítek a Kadlec, 2001). *O. latipes* je tolerantní k určité salinitě, protože jeho habitatem jsou i přílivové oblasti a tůň v Koreji a na japonském ostrově Kyushu (Yamamoto, 1975).

2.1.7. Chov

Teplota a kyslík

Z hlediska chovatelského jsou medaky velmi odolné ryby již včetně ranných vývojových stádií. Přežívají i velmi nízké koncentrace rozpuštěného kyslíku a široký teplotní rozsah. Podle literárních údajů snášejí jikry poklesy teplot až na 7°C, vzrůst nad 30°C po dobu delší jak 24 hodin je však letální i pro dospělé (Kirchen a West, 1969).

Výtěr

Výtěr medak se může provádět buď ve společné nádrži, nebo v malých vytíracích nádržkách o objemu okolo 1 až 2 litrů. Pokud vytíráme v malých vytíračkách, dáváme do jedné jednoho samce na dvě samice, nebo i vyrovnaný poměr pokud jsme si jisti, že samec není příliš agresivní.

Typickou vlastností halančíků je, že neodkládají celou snůšku jiker najednou, ale kladou postupně několik jiker denně, takže třetí období bývá relativně dlouhé a u mnohých druhů trvá prakticky po celou dobu dospělosti. To je typické chování právě u *Oryzias latipes* (Vítek a Kadlec, 2001).

Samice produkují v jednotlivých reprodukčních obdobích až 3000 i více jiker. Za normální světelné periody dochází k výtěru při rozednávání. Jikry lze snadno odebírat a zároveň znát poměrně přesně jejich stáří v hodinách (Egami, 1959). Samice kladou obvykle 10 – 30 jiker (1 – 70) o průměru 1-1,5 mm v jedné dávce (Kirchen a West, 1969). Rugh (1962) došel k mírně odlišným výsledkům: samička klade 1 – 80 jiker denně (průměr 20 – 30) tj. za celé třetí období naklade okolo 500 – 800 jiker. Samičí plodnost je přímo úměrná velikosti těla. U samců tento vztah neplatí.

Za přirozených podmínek je diurnální fotoperiodicita primárním řídicím faktorem výtěru a její význam je větší než je tomu v případě teploty. Dokladují to výsledky sledování provedené Adámkem (1999): při zkrácení délky světelné části dne pod 11 hodin se reprodukce zastavuje bez ohledu na teplotu. V rámci dostatečné délky trvání světelné periody nad 11 hodin je však intenzita reprodukce stimulována zvýšenou teplotou. Podle Kirchena a Westa (1969) lze při teplotách 25 – 28°C dosáhnout kontinuální produkce jiker.

Povrch neanuální jikry je pokryt shlukem kořínkovitých, lepivých vláken, která jsou velmi dlouhá a pružná. Povrch chorionu je poset drobnými póry o průměru kolem 0,001 mm, přičemž na mm² jich připadá 10 000 – 20 000 (Vítek a Kadlec, 2001).

Žloutek raných jiker je lehce nažloutlá, téměř bezbarvá kapalina s olejovými kapénkami těsně pod jikernými obaly. Tyto drobné kapky se postupem raného embryonálního vývoje shlukují v jednu velkou kapénku na ventrální části embrya (Kirchen a West, 1969).

Jikry mají zcela transparentní obal s početnými vlákénky. Ta jsou spletena do vláken, upínajících celý chomáček jiker do vejcovodu samice. Takto zůstávají jikry u samice po dobu minimálně několika hodin. Po určité časové prodlevě se samice pokouší setřít jikry do drobnolistých rostlin, nebo do připravených umělých vytíracích substrátů. Pokud však nemá možnost se do nich vytřít (nepřítomnost žádného substrátu), zbaví se jich přímo ve vodním sloupci a ty se pak vyvíjejí na dně (Adámek, 1999).

2.1.8. Enzym líhnutí, jeho syntéza, sekrece a účinky na chorion

Studie enzymu líhnutí medaky, *Oryzias latipes*, má přibližně šedesátiletou historii. To je přibližně polovina celé historie studií zkoumajících enzym líhnutí na rybách. První zmínky o tomto enzymu u dvojdyšné ryby pocházejí z roku 1900. Medaka posloužila pro výzkum enzymu jako nejvíce studovaný modelový organizmus a vzniklé studie položily některé významné koncepty na poli vývojové biologie, buněčné biologie a hlavně principu biologie líhnutí (Yamagami, 1997).

Odkud pochází enzym líhnutí?

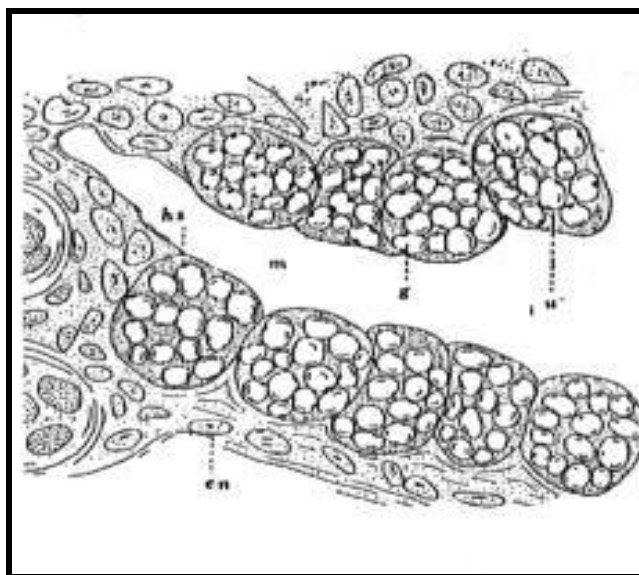
Pro anglický název buněk, které jsou zodpovědné za sekreci enzymu líhnutí, jen stěží najdeme český ekvivalent. Proto v následujícím textu použiji zkratku **HGC**, která je odvozena z anglického „Hatching Gland Cells“ (pozn. autora).

První výzkumy začal v oblasti líhnutí medak Ishida (1944). Zkoumal morfologické změny na jikerných obalech vlivem působení enzymu líhnutí a vývoj žlaznatých buněk odpovědných za líhnutí. Udává, že embrya v období před vykulením mají mnoho žláz obsahujících granuly s enzymem pro líhnutí. Tyto žlázy jsou jednobuněčné a holokrinní povahy. Prokázal, že nezralé zárodečné buňky těchto budoucích HGC značně migrují v těle embrya během vývoje. Konečná místa, kde jsou HGC obecně lokalizovány v období před vylíhnutím embrya, jsou přední a hřbetní část těla. U medak je ovšem tato skutečnost poněkud odlišná a ojedinelá. Dostí velké HGC jsou většinou lokalizovány na vnitřním povrchu pharyngeální (hltanové) dutiny. HGC v hypotonickém roztoku zvětšují svůj obsah, rozrušují se a uvolňují granula, která se následně rozpouští a uvolňují líhnoucí enzym (Ishida, 1944). Dále zmiňuje, že HGC

jsou endodermálního původu (Ishida, 1944 in Yamagami, 1997). HGC mnoha jiných druhů ryb jsou většinou původem ektodermální (Yanai, 1966 in Yamagami, 1997).

Granuly s enzymem

HGC obsahují granuly obsahující enzym pro narušení chorionu. Granuly mají dvojitou strukturu, vnitřní a vnější (Yamagami, 1997). Rozdílnost v barvení těchto dvou struktur popisuje i Ishida (1944). Granuly v HGC jsou znázorněny na obrázku 3.



Obr. 3: Schématické znázornění HGC se sekrečními granuly (Ishida, 1944, upraveno)
g – sekreční granuly, hs - HGC buňka

Složení enzymu líhnutí medaky

Yasumasu *et al.* (1988) in Yamagami (1997), frakcionoval enzymatický roztok z HGC a zjistil skutečnost, že jsou v něm obsaženy dvě různě aktivní složky. První s vysokou choriolytickou aktivitou (zprůhledňující) "clearing" a druhá s nízkou choriolytickou aktivitou. Tyto složky byly pojmenovány zkratkami **HCE** (high choriolytic enzyme) tj. enzym s vysokou choriolytickou aktivitou a **LCE** (low choriolytic enzyme) tj. enzym s nízkou choriolytickou aktivitou. HCE se dále skládá ze dvou isomerů, HCE1 a HCE2 (Yasumasu *et al.*, 1989a). HCE a LCE společně kooperují při lyzování chorionu viz kapitola: Působení enzymu líhnutí na chorion medaky (Yasumasu *et al.*, 1988 in Yamagami, 1997).

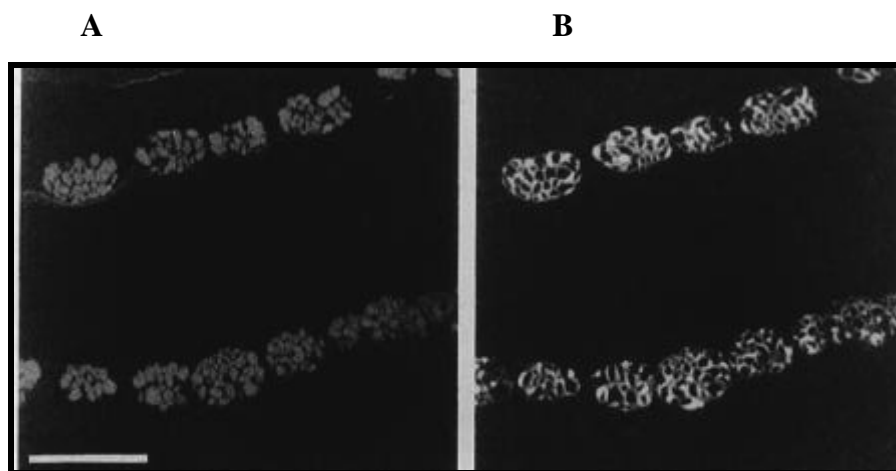
Fyzikální, chemické a enzymologické vlastnosti HCE a LCE jsou velmi podobné. Oba enzymy jsou Zn-proteázy s podobnou pH závislostí a s podobnou molekulovou

hmotností (24 kDa HCE a 25,5 kDa LCE) a oba jsou základní proteiny (Yasumasu *et al.*, 1989a, b).

V záznamech Mezinárodního katalogu enzymů (International Enzyme Catalogue) je HCE zaneseno pod názvem choriolysin H (EC 3. 4. 24. 67) a LCE pod názvem choriolysin L (EC 3. 4. 24. 66).

V líhnoucím séru medaky byla objevena ještě třetí proteáza (pravděpodobně poslední). V aminokyselinové sekvenci je spíše podobná HCE nežli LCE. Je obsažena v sekrečních granulech společně s HCE i LCE. Její rozdílnost vůči oběma předchozím proteázám je v poloze optimálního pH, které leží na kyselém pólu. Není v dnešní době jasné, zdali tato proteáza má souvislost s aktivací proenzymu HCE a nebo proenzymu LCE (Yasumasu *et al.*, 1996).

HCE a LCE byly lokalizovány v sekrečních granulech společně, ovšem v rozdílné polohové distribuci. HCE je v centru granuly a LCE je na její periferii (Yasumasu *et al.*, 1992). Na obrázku 4A a 4B jsou znázorněny ty samé granuly s odlišením polohy HCE a LCE.

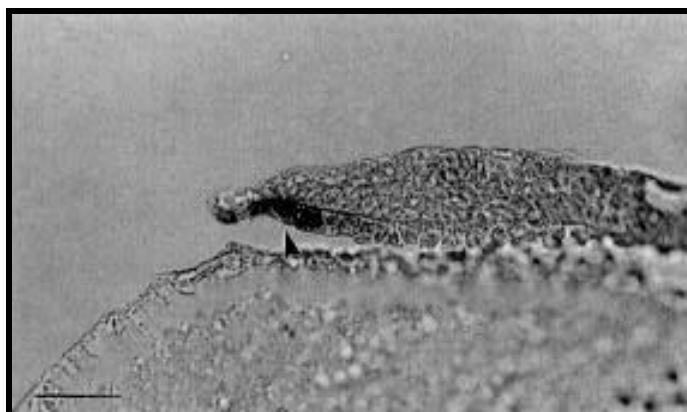


Obr. 4: Sekreční granuly s odlišením struktury HCE a LCE. Bar, 25 μ m (Yamagami, 1997, upraveno). A – poloha HCE v granule, B – poloha LCE v granule

Syntéza líhnoucího enzymu

První syntéza HCE a LCE začíná v embryích ve fázi utváření čoček. Enzymatické proteiny se hromadí již v raných embryích, zatímco enzym pro líhnutí je využit až v poslední fázi embryonálního vývoje (Yasumasu *et al.*, 1992). Yamamoto in Yamagami (1997) udává, že primitivní endoplazmatické retikulum se formuje nejprve v ne zcela vyvinutých HGC lokalizovaných na ventrální straně oblasti předního mozku

v období embryonálního vývoje zárodku mající 9 somitů a sekreční granula se začínají objevovat v HGC v období 15 somitů. V pozdní gastrule (90% epibolie) nastává první exprese genu pro tvorbu enzymu v malém počtu buněk lokalizovaných na frontálním konci embryonální osy, viz obrázek 5. Tyto buňky jsou budoucí HGC putující v průběhu vývoje vnitřní ektodermální vrstvou přes oblast žaber až do konečného umístění na vnitřní straně hltanu (Yamagami, 1997).



Obr. 5: Exprese genu *HCE23* pro tvorbu enzymu líhnutí (šipka) sledovaná v hypoblastu pozdní gastruly medaky. Bar, 50 μm (Inohaya *et al.*, 1995, upraveno)

Sekrece enzymu líhnutí

Ještě než začne samotné lyzování chorionu enzymem, musí dojít k jeho sekreci z HGC do perivitellinního prostoru. Tato sekrece nastává těsně před samotným líhnutím embrya na konci embryonálního vývoje. HGC jsou kryté tenkou blankou hexagonálních epiteliálních buněk hltanu. Spojení epiteliálních buněk s HGC je situováno pouze na apikální vrchol HGC. Uvnitř buněk HGC se v počátku líhnutí začínají sekreční granula shlukovat a splnou v jednu velkou sekreční vakuolu obsahující enzymatický roztok. Membrána této vakuoly pak splyne s buněčnou membránou HGC ve vrcholové části a proběhne exocytóza, při níž se vyplaví enzym (Yamamoto *et al.*, 1979). Schoots *et al.*, (1983) popisuje tento proces jako apoptózu, při níž buňka HGC uvolní enzym a poté zcela zaniká. Embryo ve fázi líhnutí vykonává intenzivní pohyby skřelovými víčky a tím podporuje sekreci enzymů uvolňujících se z HGC v hltanu (Ishida, 1944). Další práce výslovně nebo nepřímou potvrzují, že vysoký parciální tlak kyslíku má za následek zpomalení líhnutí embryí a naopak (Trifonova, 1937; Milkman, 1954; Yamagami, 1970; Hagenmaier, 1972; Taylor *et al.*, 1977; Yamagami *et al.*, 1983 in Yamagami, 1997). DiMichele and Taylor (1980, 1981) také potvrzují souvztažnost mezi dýcháním

a líhnutím. Navrhují hypotézu, že stimulace dýchací aktivity může mít za následek sekreci enzymu líhnutí, řízenou přes nervovou soustavu. Schoots *et al.* (1982) udává, že sekreci enzymu z HGC u medaky navozuje hormon podvěsku mozkového, prolactin. Tuto teorii potvrzuje Ball (1981), který tvrdí, že hormon prolactin kontroluje sekreci enzymu líhnutí a že sekrece prolactinu je pod kontrolou hypotalamického dopaminového systému.

Působení enzymu líhnutí na chorion medaky

Enzym líhnutí hydrolyzuje jikerné obaly (chorion) tvořené glykoproteiny (Yamagami, 1972). HCE se pevně navazuje na *zonu radiatu internu* (vnitřní vrstva chorionu), způsobuje významné zduření této vrstvy a částečně ji hydrolyzuje (Yasumasu *et al.*, 1989a,c). Toto popisuje i Ohi a Ogawa (1968, 1970) in Yamagami (1997). Chorion se tak stává naprosto transparentní a vypadá jako by byl zcela rozpuštěn (clearing phenomenon). Poté nastupuje na řadu LCE, který jen stěží lyzuje předem nenarušenou *zonu radiatu internu*, ale po předchozí spoluúčasti HCE narušený chorion efektivně rozpustí (Yasumasu *et al.*, 1989b). Nutno podotknout, že takováto choriolytická kooperace nebyla zatím zjištěna u jiného rybího druhu, ačkoliv HCE je z pohledu aminokyselinových sekvencí velmi podobná například proteázám salmonidů zapříčiňující lyzování jejich chorionu (Inohaya *et al.*, 1997 in Yamagami, 1997).

2.1.9. Přirozená mortalita v průběhu embryonálního vývoje halančků

Embryonální vývoj halančků je studován již více jak 100 let. Jedno z překvapujících zjištění bylo, že mortalita během embryonálního vývoje je vůči ostatním kostnatým rybám větší. Mortalita se u halančků pohybuje ve velkém rozsahu a to od 5 do 98%. Naproti tomu u ostatních kostnatých ryb je kolem 5% (Vítek a Kadlec, 2001).

Mortalita embryí s ohledem na fázi vývoje

Z celkového počtu jiker *Nothobranchius guentheri* uhynulých do momentu líhnutí tvoří (Vítek a Kadlec, 2001):

1. 53,7% jikry neoplozené nebo zahynuté při oplození
2. 42,9% úhyn během blastogeneze
3. 1,7% úhyn v průběhu embryogeneze
4. 1,7% úhyn během organogeneze

Příčiny úhynu

Oplození: oplození je složitý fyziologický proces, během kterého často dochází k úhynu jikry. K oplození musí dojít během několika minut po vypuzení jikry z těla samice. Chorion jikry pak přibližně během 6 hodin ztuhne.

Blastogeneze: druhá nejrizikovější fáze embryonálního vývoje je blastogeneze. Anomálie v této fázi může být: 1. prosté zastavení vývoje bez morfologických změn, které přejde ve smrt jikry, 2. zastavení vývoje zapříčiněná morfologickou změnou v jikře. U neanuálů (medaka) nastává hynutí často v období, kdy anuálové vcházejí do první diapauzy.

Embryogeneze: nejkritičtější stadia jsou vznik definitivního agregátu a páteřního kanálu.

Organogeneze: úmrtnost jiker nízká. Kritická stadia jsou vývoj kosterní a srdečně – cévní soustavy.

Líhnutí: kritická fáze. Pokud embrya nemají dostatečný impuls, může nastat zpoždění líhnutí, které pokud trvá příliš dlouho, vede ke vzniku tzv. „neplavců“ („Belly-sliders“), nebo k úhynu. „Neplavci“ („skokani“) jsou larvy, které nemají naplněný plynový měchýř a nemohou normálně plavat. Obvykle během několika dní hynou, jen výjimečně se „uzdraví“ a začnou normálně plavat (Vítek a Kadlec, 2001).

2.2. Sinice, jejich toxiny a vodní květ

2.2.1. Trofie

Trofie neboli úživnost charakterizuje určitý hydrochemický režim a s ním související biologii vodního ekosystému. Je určena především množstvím základních živin, které jsou udržovány v koloběhu. Hledisko úživnosti bylo v hydrobiologii nejprve použito při klasifikaci jezer, kde se její krajní přirozené stupně – **oligotrofie** a **eutrofie** – projevují výrazně odlišným průběhem křivky rozpuštěného kyslíku v době letní stagnace. Později byly doplněny další stupně trofie (**mezotrofie**, **polytrofie**, **hypertrofie**) a toto hledisko se použilo i pro klasifikaci ostatních nádrží a tekoucích vod (Přikryl, 1998). V tabulce 1 jsou ukazatele použitelné pro zařazení vod do základních trofických stupňů.

Tab. 1. Ukazatele trofie vodních nádrží (Přikryl, 1998)

Trofie	Oligotrofie	Mezotrofie	Eutrofie	Slabá hypertrofie	Silná hypertrofie
P celkový (µg/l)	< 15	15 – 50	50 – 200	200 – 800	> 800
Chlorofyl <i>a</i> (µg/l)	< 3	3 – 7	7 – 30	30 – 500	> 500
Průhlednost (m)	> 5	2 - 5	0,5 - 2	0,2 – 0,5	< 0,2

2.2.2. Eutrofizace

Slovo eutrofizace pochází z řečtiny, vzniklo složením slova *eu* (hojný) a slova *trophí* (potrava nebo živná látka) (Šafarčíková, Pešata, 2006). Eutrofizace povrchových vod je složitý proces neustálého obohacování vod minerálními živnými látkami a s tím spojený nárůst intenzity biologických pochodů (Štěpánek a Červenka, 1974). Kočí *et al.* (2000) popisují tento jev jako soubor přírodních a uměle vyvolaných procesů, které vedou ke zvyšování obsahu anorganických živin ve stojatých a tekoucích vodách.

Tato skutečnost má za následek postupné zvyšování trofické úrovně nádrží a toků do stavu eutrofie a v četných případech toto stádium překračuje až do stádia hypertrofie.

Pokud bychom tedy uvažovali o zvyšování trofické úrovně eutrofní nádrže, mělo by se mluvit spíše o hypertrofizaci (Marvan a Maršálek, 1996).

2.2.2.1. Příčiny eutrofizace

Příčiny eutrofizace můžeme rozdělit na **přírozené procesy** - „**přírozená eutrofizace**“ vznikající přírozenou cestou zvyšování množství živin ve vodním ekosystému a procesy způsobené lidskou činností - **antropogenní procesy** „**umělá eutrofizace**“ vznikající především intenzivní zemědělskou činností, vypouštěním průmyslových odpadních vod, používáním polyfosforečnanů v pracích a čistících prostředcích a zvýšenou produkcí komunálních odpadních vod a odpadů fekálního charakteru (Kočí *et al.*, 2000).

Tyto procesy zvyšují v tocích a následně nádržích především množství **dusíku (N)** a **fosforu (P)**. Přírodním zdrojem fosforu je zvětrávání minerálů (apatit) a hornin (Pitter, 1990). Fosfor je nejčastěji limitující živinou ve vnitrozemských sladkých vodách mírného pásma (Wetzel, 1983). Antropogenní zdroje mohou zvyšovat přírodní koncentrační pozadí P v tocích i o několik řádů. Nejdůležitějším antropogenním zdrojem P jsou komunální odpadní vody vypouštěné do toků a povrchové splachy, případně i průsaky ze zemědělské půdy (Hejzlar *et al.*, 2001).

Dusík se na rozdíl od fosforu z podloží neuvolňuje a jeho odtok je řízen procesy probíhajícími v půdě. Koncentrace N v přírodním odtoku z půdy jsou závislé zejména na přísunu atmosférickou depozicí a na schopnostech vegetace a půdních organismů dusík využívat a zabudovávat do biomasy a půdní organické hmoty. Lidská činnost dokáže koncentrace N v odtoku z povodí, obdobně jako je tomu u fosforu, významně zvyšovat. Dusík je přítomen v komunálních odpadních vodách, ale hlavně uniká ve formě dusičnanového N ze zemědělských půd (Hejzlar *et al.*, 2001). Ve většině údolních nádrží v ČR je N v nadbytku a hodnoty N/P převyšují kritickou hodnotu 16 (Redfieldův poměr N/P=16) (Hejzlar *et al.*, 1994).

2.2.2.2. *Následky eutrofizace*

Eutrofizace či hypertrofizace s sebou přináší nepříznivé průvodní jevy. Jedním z hlavních důsledků je vysoká podpora primární produkce, podpořená právě zvýšenou nabídkou živin, kterou dle Marvana a Maršálka (1996) ve svůj prospěch mohou využít k dominantnímu postavení v ekosystému :

1. drobné planktonní řasy vytvářející opticky homogenní suspenzi neboli **vegetační zbarvení**. Tyto druhy staví na vysoké hodnotě maximální specifické růstové rychlosti.
2. větší koloniální sinice (někdy i řasy) vytvářející **vodní květ** (kap. 2.2.4.). Toto označení se používá pro označení hromadného výskytu těch druhů, které mají schopnost shromážďovat se při hladině. Někdy se ovšem tento pojem rozšiřuje na všechny planktonní druhy sinic s plynovými měchýřky, jejichž specifická hmotnost biomasy je menší než 1 kg.m^{-3} .
3. **bentické sinice a rozsivky**. Vláknité sinice těchto bentických společenstev se chovají velmi podobně jako sinice vytvářející vodní květ. Při hromadném rozvoji a intenzivní fotosyntéze se vlivem nahromadění kyslíkových bublin mezi vlákna trhají ode dna a pokrývají hladinu.
4. **litorální vláknité řasy** , které často přetrvávají v biotopu po delší období než předchozí kategorie. Nádrže takto zasažené úměrně k jejich rozvoji inklinují k potlačení drobného fytoplanktonu i sinic.
5. **vyšší vodní vegetace**. Tento jev je do určité míry únosný a vítaný. Negativně působí zejména druhy *Lemna* a *Spirodela*.

Pro zaměření této práce je stěžejní druhá skupina neboli větší koloniální sinice vytvářející **sinicový vodní květ**.

2.2.3. Sinice - cyanobakterie

Český název sinice pochází z termínu “sinný” = modrý. To je v podstatě překlad “latinského” názvu, z řeckého cyanos = modrý (Kaštovský *et al.*, 2003).

2.2.3.1. Charakteristika

Sinice jsou velmi drobné a velmi jednoduché autotrofní prokaryotické organismy. Jejich velikost se většinou pohybuje okolo 1 – 10 μm . Jsou evolučně nesmírně staré. Podle fosilních nálezů měly na Zemi sinice významný podíl na vytvoření atmosféry s obsahem kyslíku. Objevily se v prekambriu před 3,5 – 2,5 miliardami let a před 2 miliardami let se staly dominující skupinou organismů na Zemi (Maršálek, 2002).

Jsou schopné žít téměř ve všech biotopech na zeměkouli. Žijí ve sladkovodním i mořském planktonu, v nárostech, v půdě, na smáčených stěnách, uvnitř kamenů a podobných stanovištích. Typické je pro ně osazování všech extrémních biotopů, s výjimkou extrémně kyselých lokalit (Kaštovský *et al.*, 2003).

Nalézají se v Antarktidě, horkých vřídlech, jako symbionti v lišejnících v čistém horském prostředí, ale i v odpadních, zamořených či radioaktivních vodách. Jsou schopny jak přijmu organických látek jako heterotrofní bakterie, tak i asimilace ze světla a minerálních živin jako rostliny. Jsou tedy schopné žít fotoautotrofně, mixotrofně nebo heterotrofně (Maršálek, 2004).

Neexistují jednotné odhady četnosti jejich taxonů, ale pohybují se v řádu minimálně 200 rodů a několik tisíc druhů.

Rozmnožování je jedinečně nepohlavní. Dělení buněk probíhá zaškrcováním plazmatické membrány (Kaštovský *et al.*, 2003).

2.2.3.2. Stavba buňky

Stavba buněk je velmi jednoduchá. Jako prokaryota nemají jádro, mitochondrie, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum ani vakuoly. Nejnápadnějším útvarem uvnitř buňky sinice jsou **thylakoidy**. Jsou to ploché váčky s fotosyntetickým aparátem. V membráně thylakoidu jsou obsaženy chlorofyl a (někdy i b, c či d), α - i β - karoten a xanthofyly (echinenon, myxoxanthofyl, zeaxanthin). Na povrchu thylakoidálního váčku se nachází **fykobilizómy**. Jsou to drobné útvary, které obsahují specifická barviva, zvaná fykobiliny (fykobiliproteiny). Tyto fykobiliny jsou 3. Dva z nich jsou modré pigmenty (c-fykocyanin a allofykocyanin) a jeden je červený (c-fykoerythrin). Tyto pigmenty plní funkci světlosběrné antény. Značná citlivost tohoto typu světlosběrné antény umožňuje fotosyntézu sinic při velmi nízké hladině osvětlení (hluboko pod hladinou vody, v půdě, uvnitř kamenů, v jeskyních). Poměr fykoerythrinu a fykocyaninu určuje vlastní barvu sinicové buňky. Jejich poměr však nemusí být stabilní a často se mění podle momentálních okolních podmínek. Genetickou informaci sinic nese tzv. **genofor**. Je to složitě vinutá kruhová molekula DNA. Může být jedna nebo několik. Tato molekula je bez histoproteinů. Je na plazmatickou membránu připevněná pomocí RNA a bílkovin. Jako u všech prokaryot není DNA oddělena od ostatní protoplazmy jadernou membránou (Kaštovský *et al.*, 2003).

Buňka je obalena pevnou **buněčnou stěnou**, která je tvořena peptidoglykany: mureinem a kyselinou diaminopimelovou. Stěna vykazuje gramnegativní reakci. Je ze čtyř vrstev a mezi dvěma z nich byla u některých sinic nalezena vrstva klouzavých mikrofibril, umožňujících drkání. Povrch stěny bývá obklopen **extracelulárními polysacharidy** (Maršálek, 2004), které jsou často vícevrstevné a občas intenzívně zbarvené scytoneminem nebo jiným karotenoidem (Kaštovský *et al.*, 2003). Pod povrchem stěny je **plazmatická membrána**. Je sídlem dýchacích enzymů a patrně z ní se odškrucují thylakoidy. V buňce jsou přítomny ještě **karboxyzómy**, což jsou drobná tělíčka ve tvaru mnohostěnu obsahující enzym rubisco. Dále jsou v protoplasmě **škrobová zrna** obsahující sinicový škrob (α 1,4 glukán), **polyfosfátové granule** a **cyanofycinová zrnka** (polymerovaný arginin s kys. asparagovou) (Kaštovský *et al.*, 2003).

Dle Kaštovského *et al.* (2003) mají sinice několik struktur, které jsou specifické právě jen pro ně. Jsou to:

1. **Aerotopy**

Jedná se o válcovité struktury ve tvaru mnohostěnu. V buňce je jich většinou přítomno mnoho. Na příčném průřezu připomínají včelí plást. Jejich stěna je složená z glykoproteinů a je propustná pro všechny plyny rozpuštěné ve vodě. Směs těchto plynů uvnitř aerotopů sinice nadlehčuje a umožňuje jim snadno splývat ve vodním sloupci. Sinice si je mohou tvořit a dezorganizovat v závislosti na abiotických faktorech prostředí a tím regulovat svoji polohu ve vodním sloupci. Jsou typické zejména pro druhy tvořící **sinicové vodní květy** (Kaštovský *et al.*, 2003).

2. **Heterocyty**

Jsou to tlustostěnné buňky, větší než jsou buňky vegetativní. V optickém mikroskopu se jejich obsah jeví jako prázdný, avšak probíhá v nich fotosystém I. Vznikají z vegetativních buněk. Za účasti nitrogenázy se v nich fixuje vzdušný dusík, vzniká amoniak, ten je vázaný jako glutamin a v této formě je transportován do sousedních buněk. (Kaštovský *et al.*, 2003).

3. **Akinety**

Vznikají z jedné nebo více vegetativních buněk a bývají větší než heterocyty (Kaštovský *et al.*, 2003). Jsou naplněné zásobními látkami a uzavřené membránou (někdy strukturovanou) na všechny strany. Slouží k přežití nepříznivých podmínek (Fott, 1967).

2.2.4. Sinicový vodní květ

Druhy sinic tvořící vodní květy jsou koloniálního nebo vláknitého typu, charakteristické schopností vytvářet v buňkách plynové měchýřky (které ve vegetativní fázi chybí jen zřídka a přechodně) sdružené paralelně do charakteristických shluků – aerotopů (kapitola 2.2.3.2.) uvnitř buněk. Kolonie, vlákna a shluky vláken jsou obvykle v době vegetačních maxim makroskopicky patrné ve vodě jako drobný zelenavý prach, vločky různého tvaru, nebo drobné, kulovité útvary. Druhy schopné tvořit vodní květy jsou známy především z čeledí *Microcystaceae* (*Chroococcales*) a *Nostocaceae* (*Nostocales*), méně často z čeledí *Merismopediaceae* (*Woronichinia*), *Phormidiaceae* (*Planktothrix*, *Trichodesmium*), *Oscillatoriaceae* (některé druhy rodu *Lyngbya*) a *Rivulariaceae* (*Gloeotrichia*) (Komárek, 1996). Přehled rodů a druhů planktonních sinic vyvolávající vodní květy a vyskytující se na území České republiky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2. Přehled rodů a příslušných druhů sinic způsobujících vodní květ a vyskytujících se na území ČR (sestaveno dle Komárka, 1996)

Rod	N	Druhy známé z ČR
<i>Anabaena</i>	75	<i>affinis</i> , <i>circinalis</i> , <i>crassa</i> , <i>danica</i> +, <i>flos-aquae</i> , <i>lemmermannii</i> , <i>macrospora</i> +, <i>mendotae</i> , <i>perturbata</i> , <i>planctonica</i> , <i>reniformis</i> *, <i>sigmoidea</i> , <i>smithii</i> , <i>solitaria</i> +, <i>spiroides</i> , <i>viguieri</i>
<i>Anabaenopsis</i>	18	<i>arnoldii</i> +, <i>elenkinii</i> , <i>milleri</i> +
<i>Aphanizomenon</i>	13	<i>elenkinii</i> *, <i>flexuosum</i> +, <i>flos-aquae</i> , <i>gracile</i> , <i>issatschenkoi</i> , <i>klebahnii</i> , <i>yezoense</i> +
<i>Arthrospira</i>	4	
<i>Cylindrospermopsis</i>	8	<i>raciborskii</i> *
<i>Gloeotrichia</i>	2	<i>echinulata</i> *
<i>Katagnymene</i>	5	
<i>Lyngbya</i>	3	
<i>Microcystis</i>	19	<i>aeruginosa</i> , <i>botrys</i> *, <i>firma</i> *, <i>flos-aquae</i> , <i>ichthyoblade</i> , <i>natans</i> *, <i>novacekii</i> , <i>smithii</i> *, <i>viridis</i> , <i>wesenbergii</i>
<i>Nodularia</i>	4	
<i>Nostoc</i>	1	<i>planctonicum</i> +
<i>Oscillatoria</i>	1	
<i>Planktothrix</i>	18	<i>agardhii</i> , <i>cryptovaginata</i> *, <i>mougeotii</i> +, <i>planctonica</i> +, <i>rubescens</i> *, <i>suspensa</i> +
<i>Raphidiopsis</i>	6	<i>mediterranea</i> *
<i>Trichodesmium</i>	9	
<i>Woronichinia</i>	4	<i>naegeliana</i>

Vysvětlivky k tab. 2.:

N – počet popsáných planktonních druhů

+ - vzácné, ale pravidelně se vyskytující druhy

* - výskyt příležitostný a přechodný nebo druh invazní

2.2.5. Nejčastější rody způsobující sinicové vodní květy v České republice

Dle Šejnohové a Maršálka (2006), kteří vycházejí z celostátního monitoringu vodních květů sinic prováděného průběžně po celé ČR od roku 1994, je nejvíce frekventovaný rod *Microcystis* (60%). Dalšími často se vyskytujícími rody, ale již s menšími frekvencemi výskytu než *Microcystis*, jsou vláknité typy *Anabaena*, *Aphanizomenon* a *Planktothrix*. V posledních letech přibývá stále více záznamů o nálezech rodu *Woronichinia*.

Rod *Microcystis* ÚTZ. ex LEMM. 1907 nom.cons.

Tento rod náleží do kokálních sinic. Krom klidových stádií je výhradně planktonní. Patří mezi nejdůležitější rody vytvářející sinicové vodní květy. Je rozšířen po celém světě s výjimkou cirkumpolárních oblastí a roste ve všech typech sladkých eutrofních vod ve vysoké frekvenci. Areály rozšíření jsou široké, některé druhy lze označit za kosmopolitní. Druhy r. *Microcystis* jsou významné z hlediska velké produkce biomasy, ale také produkcí toxických látek – cyanotoxinů (kap. 2.2.7.) (Komárek, 1996).

Velikost buněk je závislá na druhu. Pohybuje se od 3 – 10 μm. Buňky jsou sdruženy do mikro- nebo makroskopických slizových kolonií, vytvářející na hladině tzv. práškovitý vodní květ. U rodu *Microcystis* nejsou přítomny heterocyty ani akinety (kap. 2.2.3.2.) (Šejnohová a Maršálek, 2006).

Rod *Anabaena* BORY ex BORN. et FLAH. 1886

Rod náleží k vláknitým sinicím. Vlákna má buď přímá nebo zkroucená. Vodní květy tvoří výhradně druhy z podrodu *Dolichospermum*. Vlákna jsou ve slizových obalech (u některých planktonních druhů mohou chybět). U planktonních druhů jsou bezbarvé a rozplývavé. Trichomy jsou uniseriální, nevětvené, izopolární, přímé nebo nepravidelně zprohýbané. Vegetativní buňky jsou kulovité, soudečkovité až cylindrické. U planktonních druhů, žijících v jednotlivých vláknech, se vyskytují aerotopy.

Heterocyty jsou na trichomu ve větším počtu ovšem oddáleně od sebe. Akinety se vyvíjejí interkalárně po obou stranách heterocytů nebo oddáleně od nich.

Z území ČR je známo 16 planktonních druhů, které tvoří nebo se podílejí na vodních květech (Komárek, 1996).

Rod *Aphanizomenon* MORR. ex BORN. et FLACH. 1886

Druh náležící k vláknitým sinicím. Vlákna jsou volně plovoucí, jednotlivá nebo u několika druhů sdružená do různě velkých, někdy rozpadavých svazečků což je mezidruhově specifické. Svazečky jsou mikro- až makroskopické (až 2 cm dlouhé) s paralelně uloženými vlákny bez slizu nebo s jen nepatrným slizem kolem trichomů. Vegetativní buňky jsou cylindrické nebo soudečkovité, bledě nebo intenzivně modrozelené s aerotopy po celé vegetační období. Tento rod vytváří heterocyty, které ovšem mohou chybět u populací žijících v prostředí bohatém na dusík. Akinety se vyvíjejí po splnutí několika vegetativních buněk.

Rod obsahuje pouze planktonní druhy, často tvořící silné vodní květy (Komárek, 1996).

Rod *Planktothrix* ANAG. et KOM. 1988

Tento rod tvoří volně plovoucí, nevětvená, přímá nebo nepravidelně zprohýbaná až 4 mm dlouhá vlákna. Při masovém rozvoji se mohou sdružovat do malých chomáčků. Trichomy jsou vždy bez heterocytů a akinet. Šířka trichomů je 3,2 až 10 (15?) μm . U většiny druhů chybějí ve vegetativním stádiu pochvy. Slizové obaly chybějí. V trichomu je vždy alespoň část buněk vyplněna aerotopy (Komárek, 1996).

Rod *Woronichinia* ELENK. 1933

Do tohoto rodu náleží kokální sinice, rostoucí ve volně plovoucích, sférických koloniích. Kolonie jsou více méně kulovité, nepravidelně oválné, někdy protažené, mírně laločnaté. Jsou obklopeny slizovým obalem, nepřesahujícím příliš obvodovou vrstvu buněk. V centru kolonie se nachází systém radiálních, trvale nerozvětvených slizových stopek. Buňky jsou rozmístěny více méně radiálně v periferní vrstvě po obvodu kolonie (Komárek, 1996).

2.2.6. Vybrané druhy sinic a jejich charakteristika (dle Komárka, 1996)

2.2.6.1. *Microcystis aeruginosa* (KÜTZ.) KÜTZ 1846

Microcystis aeruginosa (obr. 6.–C,D) vytváří nepravidelné slizovité kolonie velké až 900 μm (8 mm). Kolonie jsou ze začátku mikroskopické a kulovité, později prodloužené a laločnaté. Ve stáří jsou makroskopické vytvářející zřetelné otvory a složené z dílčích kolonií. Buňky jsou kulovitěho tvaru s průměrem (3)4–6(9,4) μm . Obsahují četné aerotopy a jsou před dělením slabě protažené. Sliz obklopující buňky je bezbarvý, nestrukturovaný, rozplývavý na okrajích, s nepříliš širokým lemlem kolem buněk.

Jde o velice polymorfní druh, hojný v eutrofních nádržích tvořící mohutné vodní květy. Je kosmopolitně rozšířen s výjimkou polárních a subpolárních oblastí. Jsou známé četné toxické populace a kmeny.

2.2.6.2. *Microcystis flos-aquae* (WITTR.) KIRCHN. 1898

Tvoří mikroskopické kolonie (obr. 6.-A), které jenom zřídka dosahují makroskopicky patrných rozměrů. Zprvu jsou více méně kulovité, později nepravidelně zaoblené, kompaktní, bez zřetelných otvorů a laloků. Sliz je bezbarvý, na okrajích nezřetelný, přesahující okraj jen nepatrně (max. do 1 μm). Kulovité buňky obsahují aerotopy a dosahují velikosti (2,5)3,5-4,8(5-6?) μm v průměru.

Jedná se o běžný druh vyskytující se v mezotrofních a eutrofních nádržích. Většinou je součástí fytoplanktonních společenstev vodních květů a jenom vzácně tvoří vodní květ samostatně. Je rozšířen především v mírném pásmu.

2.2.6.3. *Woronichinia naegeliana* (UNGER) ELENK. 1933

Vytváří mikroskopické a volně plovoucí kolonie (obr. 6.- B), které jsou sféroidní, nepravidelně kulovité a v obrysu ledvinité či mírně laločnaté. Rozměr kolonií je až 180 (275?) μm v průměru. V centru kolonie se nachází systém slizových stopek tvořící radiální slizovou strukturu. Kolem kolonií je vinut bezbarvý a rozplývavý slizový obal. Kolem jednotlivých buněk jsou také patrné vlastní úzké slizové obaly. Buňky mají oválný nebo opakvejčitý tvar, modrozelený protoplast a četné aerotopy. Velikost 5-7 x (1,5) 2,5-3,5 μm .

Jedná se o běžný druh eutrofních rybníků, přehradních nádrží a jezer. V případě masového výskytu tvoří práškovitý vodní květ.

2.2.6.4. *Anabaena sigmaidea* NYG. 1949

Anabaena sigmaidea (obr. 6.–E) tvoří jednotlivá, volně plovoucí vlákna. Vlákna se často rozpadají na menší segmenty, jsou nepravidelně zkroucená nebo esovitě zprohýbaná. Nejsou na nich patrné slizové obaly. Zřídka tvoří klubíčkovité kolonie. Šířka závitů se pohybuje okolo 20 – 37 μm . Buňky jsou vždy mírně podlouhlé, elipsoidní nebo soudečkovité 1,5 – 2(3?) x delší než široké, obsahující hnědavé aerotopy. Velikost buněk se pohybuje okolo 4-8,5 x (2,5)3-4(5) μm . Heterocyty mají kulovitý až elipsoidní tvar o rozměrech 5-7,5 x 4-5(7) μm . Akinety vznikají interkalárně, většinou jednotlivě a oddáleně od heterocytů. Jejich velikost je (10,8?) 16-21,5 x 7-8,5 μm .

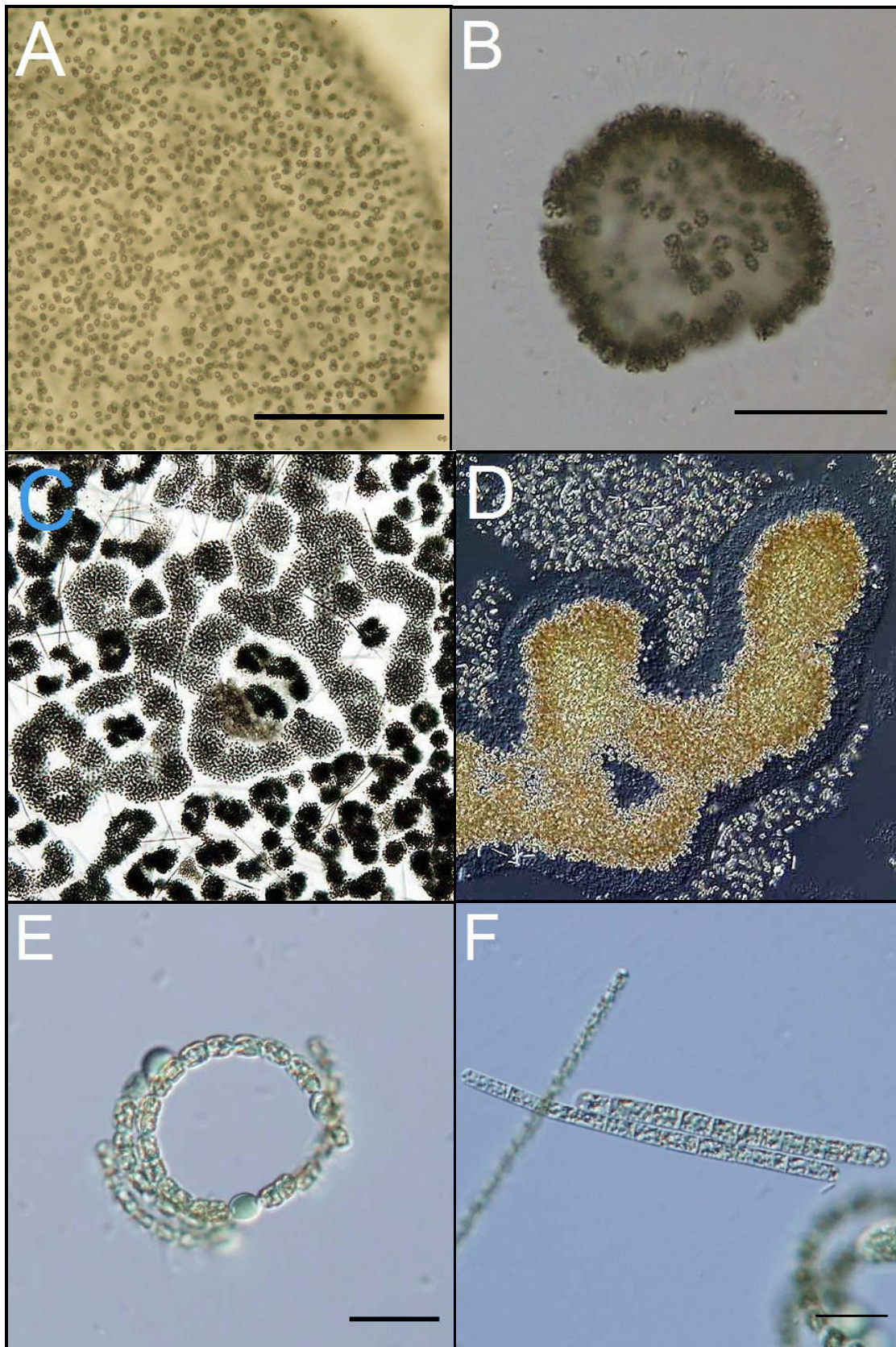
Je častou součástí sinicových vodních květů eutrofních a hypertrofních nádrží. Zřídka se vyskytuje v čisté populaci.

2.2.6.5. *Aphanizomenon flos-aquae* [L.] RALFS ex BORN. et FLACH. 1888

Jedná se o vláknitou sinici (obr. 6.-F) s vlákny sdruženými paralelně do podlouhlých makroskopických kolonií o délce (2)5-15(20) mm. Kolonie jsou volně plovoucí olivové barvy a mají pohyblivé trichomy, které se pohybují v kolonii plazivým pohybem. Trichomy jsou cylindrické, slabě zaškrcované na přepážkách. Na koncích trichomů jsou buňky protažené. Vegetativní buňky jsou cylindrického až soudečkovitého tvaru, uprostřed trichomu izodiametrické, velké (4)5,7-12,1 x 4,4-6,5(8) μm . Obsahují četné aerotopy, které však nejsou přítomny u koncových buněk trichomu. Heterocyty vznikají jednotlivě interkalárně po 1(3) na jednom trichomu. Dlouze cylindrické akynety vznikají pouze v určitých fázích vegetačního cyklu vzdáleně od heterocytů.

Roste většinou v planktonu menších eutrofních nádrží, řidčeji v přehradách. Za vhodných podmínek velké průhlednosti vody a silného světelného příkonu může vyvolat husté monokulturní vodní květy.

Obr. 6. Převzato od A: (Kaštovský, 2007a); B: (Kaštovský, 2007b); C: (Anonym, 2003); D: (Anonym, 2004); E: (Zapomělová, 2007a); F: (Zapomělová, 2007b), mírně upraveno



Obr. 6: Vybrané druhy způsobující vodní květy.(A- *M. flos-aquae*, bar = 100 μm ; B- *W. naegeliana*, bar = 50 μm ; C, D – *M. aeruginosa*, zvětšení (c)- 40x, (d)- 300x; E- *A. sigmoidea*, bar = 20 μm ; F- *A. flos-aquae*, bar = 20 μm ;))

2.2.7. Cyanotoxiny

Pokud sinice žijí autotrofně či heterotrofně vytvářejí celou škálu biologicky aktivních látek. Mezi jedny z nejsledovanějších látek v posledních letech patří cyanotoxiny. Cyanotoxiny jsou látky sekundárního metabolismu a nejsou tedy využívány pro jeho primární metabolické procesy. Pokud porovnáme toxicitu přírodních toxinů (tab. 3.), zjistíme, že cyanotoxiny jsou více toxické než toxiny vyšších rostlin a hub, ale méně toxické než toxiny bakteriální (Maršálek a Turánek, 1996).

Funkce a využití těchto metabolitů není dodnes zcela jasná. Tyto sekundární metabolity jsou velmi různorodé jak z pohledu chemické struktury tak svého působení (Carmichael, 1992).

Z hlediska terminologického jsou nazývány v některých studiích jako „**endotoxiny**“ microcystiny (Elleman *et al.*, 1978), saxitoxiny (Kay, 1991; Gentile a Maloney, 1969). Frank *et al.* (2000) a Zurawell *et al.* (2005) popisují také hepatotoxické a neurotoxické cyanotoxiny jako endotoxiny. Toto označení používají zřejmě z důvodů, že tyto toxiny nejsou aktivně vylučované z buňky cyanobakterie, ovšem v imunologické terminologii označení „**endotoxin**“ náleží pouze **lipopolysacharidům (LPS)** gramnegativních bakterií. Označení endotoxin je tedy adekvátní při pojmenování cyanobakteriální buněčné stěny (viz dále), jelikož cyanobakterie náleží ke gramnegativním bakteriím. Ostatní cyanobakteriální toxiny (microcystiny, cylindrospermopsin, saxitoxiny, anatoxiny atd. viz dále) by měly být označovány jako **exotoxiny** (Stewart *et al.*, 2006).

2.2.7.1. Rozdělení cyanotoxinů

V současné době se rozdělují cyanotoxiny do dvou hlavních skupin reflektujících jejich **chemickou strukturu** a **biologickou aktivitu** (Maršálek, 2004).

- Dle **chemické struktury** dělíme cyanotoxiny na:
 - Alkaloidy
 - Cyklické a lineární peptidy
 - Lipopolysacharidy
- Dle **biologické aktivity (metod biodetekce)** na:
 - Cytotoxiny
 - Biotoxiny

Nejčastěji jsou ze sinic izolovány cytotoxiny a depsipeptidy vykazující široké spektrum aktivit proti bakteriím, houbám, řasám, prvokům a savcím tkáňovým kulturám. Pokud jde o biotoxiny lze je dále členit podle nejvíce zasažené části organismu, nebo hlavního cílového orgánu či nejcitlivějšího stádia vývoje na neurotoxiny, hepatotoxiny, imunotoxiny a imunomodulanty, mutageny a genotoxiny (Tumor Promoting Factors), cytotoxiny a lipopolysacharidy, dermatotoxiny a **embryotoxiny (negativní vliv prokázán na plodnost, vitalitu a mortalitu embryí a larev ryb a vodních obratlovců i na lidský plod)**. Z výčtu lze usoudit, že cytotoxiny mají letální efekty na jednobuněčné organismy nebo jednotlivé buňky, zatímco biotoxiny mohou usmrtit vícebuněčné organismy. Ve skutečnosti se však tyto dvě skupiny prolínají (Maršálek, 2004; Maršálek a Turánek, 1996).

Tab. 3. Srovnání toxicity přírodních toxinů. Akutní LD_{50} $\mu\text{g.kg}^{-1}$ živé hmotnosti při intraperitoneální injekci myši (dle Maršálka, 2004)

Toxin	Zdroj	Skupina	LD50
aphanotoxin	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	sinice	10
anatoxin –a	<i>Anabaena flos-aquae</i>	sinice	20
microcystin LR	<i>Microcystis aeruginosa</i>	sinice	43
nodularin	<i>Nodularia spumigena</i>	sinice	50
botulin	<i>Clostridium botulinum</i>	bakterie	0,00003
tetan	<i>Clostridium tetani</i>	bakterie	0,0001
kobra	<i>Naja naja</i>	had	20
kurare	<i>Chondrodendron tomentosum</i>	rostlina	500
strychnin	<i>Strychnos mux-vomica</i>	rostlina	2000

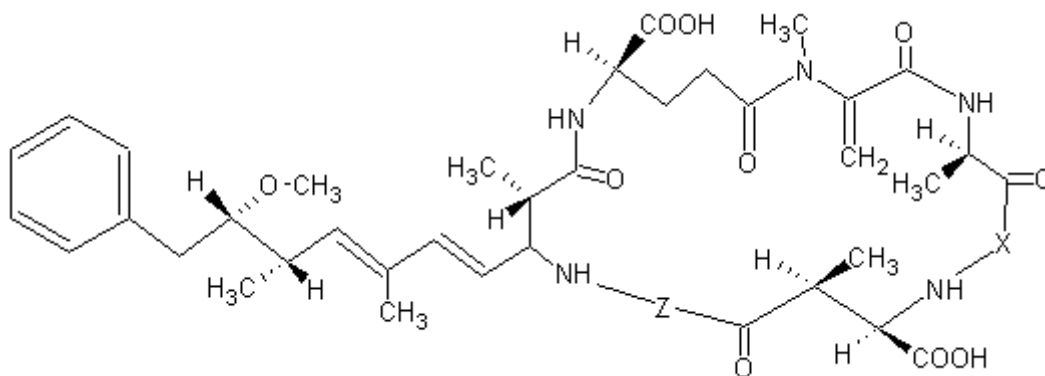
2.2.7.2. *Microcystiny*

Microcystiny jsou jedny z nejvíce prostudovaných látek syntetizované sinicemi. Jedná se o skupinu hepatotoxických cyklických heptapeptidů, poprvé prokázaných u planktonní sinice *Microcystis aeruginosa*. Syntéza těchto hepatotoxinů však byla prokázána i u jiných rodů. Těmito rody jsou například *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis* (Carmichael, 1992).

Struktura a fyzikálně-chemický popis

Obecný vzorec těchto heptapeptidů je: cyklo-(D-alanin1-L-X2-D-MeAsp3-L-Z4-Adda5-D-glutamová kyselina6-Mdha7), kde X a Z jsou různé L-aminokyseliny, MeAsp je D-erythro-B-methylasparagová kyselina, Adda je (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-fenyldeka-4,6-dienová kyselina a Mdha je N-methyldehydroalanin (Bláha *et al.*, 2004). Tento vzorec je znázorněn na obrázku 7.

Intenzivním výzkumem těchto látek bylo identifikováno dodnes 84 strukturních variant s rozdílnou toxicitou (Maršálková a Maršálek, 2006). Jejich molekulová hmotnost se pohybuje mezi 900 až 1100 Da (Sivonen, 1996). Nejčastěji se liší různými aminokyselinami X a Z v pozicích 2 a 4 a také demethylací aminokyselin v pozicích 3 a 7 (Bláha *et al.*, 2004).



Obr. 7: Obecný vzorec microcystinu (Bláha *et al.*, 2004)

Nejběžněji stanovovanými a zřejmě nejčetnějšími isoformami jsou **microcystiny LR, YR a RR**. Tyto zkratky označují aminokyseliny v poloze 2 a 4. V případě microcystinu LR se jedná o leucin – L (poloha X) a arginin – R (poloha Z), v případě microcystinu YR jde o tyrosin – Y a arginin – R a v případě microcystinu RR se jedná o arginin – R v obou pozicích (Bláha *et al.*, 2004; Maršálek *et al.*, 1996).

Z chemického hlediska je většina microcystinů ve vodě dobře rozpustná, netěkavá a vůči rozkladu vysoce stabilní. Vysokou termostabilitu molekule microcystinu dodávají netypické D a L aminokyseliny (Sivonen, 1996).

Principy působení a příznaky intoxikace

Poměrně velká molekula microcystinu je do buňky hepatocytu aktivně transportována žlučovým transportním systémem za spotřeby ATP (Chong *et al.*, 2002). Jako jeden z hlavních toxických účinků microcystinů udává Carmichael (1992) silnou inhibici proteinfosfatů typu PP1, PP2A a PP3, mající za následek hyperfosforylaci proteinů a nekontrolovanou aktivitu proteinkináz. Tyto děje se projeví změnou morfologické struktury hepatocytů a v konečném důsledku zhroucením jejich cytoskeletu. Tato jaterní insuficience může končit smrtí.

Změny na pankreatu jsou nejčastěji vyhodnocovány jako různé typy hepatitid nebo vedou k rakovině jater. Tyto poznatky podnítily výzkum cyklických hepatotoxinů sinic jako "**tumor promoting factors**". Byl prokázán vliv cyanotoxinů na stimulaci procesů vedoucích k rakovině kůže a jater. Microcystiny jsou **embryotoxiny, genotoxiny a mutageny** (Krménčík a Kysilka, 2001).

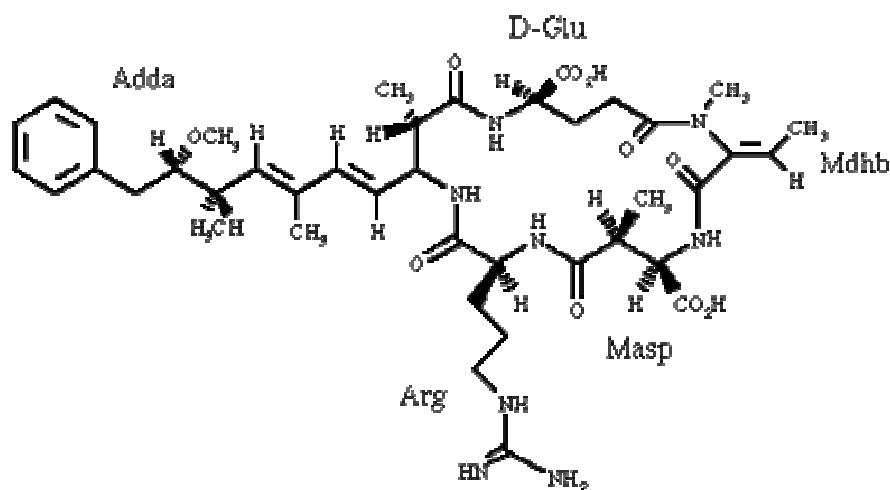
Toxicita

U microcystinu-LR je hodnota akutní LD₅₀ pro myš při intraperitoneální aplikaci (I.P.) toxinu 50–60 µg.kg⁻¹ živé váhy. Letální koncentrace (LD₅₀ - I.P.) některých dalších běžných variant microcystinů (-YR, -LA, -YM) jsou podobné koncentracím microcystinu-LR. U běžně nacházené varianty -RR se ovšem tato hodnota pohybuje přibližně o jeden řád výš (Sivonen and Jones, 1999). Rozdílné efektivní koncentrace microcystinu-LR a microcystinu-RR naznačují, že zde existuje odlišný mechanismus působení relativně podobných hepatotoxinů. Zatímco toxicita microcystinu-RR se vyznačuje především celkovou změnou obsahu proteinů, toxicita microcystinu-LR je typická změnou lysosomálních funkcí a aktivitou sukcinátdehydrogenasy (Pichardo *et al.*, 2005).

U microcystinu LR byla na rybích hepatocytech (PLHC – 1, hepatokarcinom) po 24 hodinové expozici určena hodnota EC₅₀ – 12 µM a u isoformy RR byla hodnota EC₅₀ - > 100 µM (Pichardo *et al.*, 2005). To poukazuje na rozdílnost v toxicitě jednotlivých forem microcystinů.

2.2.7.3. Nodularin

Jedná se o cyklický pentapeptid také s Adda v bočním řetězci, jehož produkce byla prokázána u mnoha sinic často současně s produkcí mikrocytinů a jehož nejvýznamnější mechanismus toxicity je shodný s efekty mikrocytinů – inhibice regulačních enzymů proteinfosfatáz. Letální dávka (LD_{50}) testovaná na myších se pohybuje mezi 50 - 2000 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ živé hmotnosti (I.P.) (Bláha *et al.*, 2004). Nodulariny jsou **TPF** ("tumor promoting factors"), **embryotoxiny**, **genotoxiny** a **mutageny** (Krmencík a Kysilka, 2001).



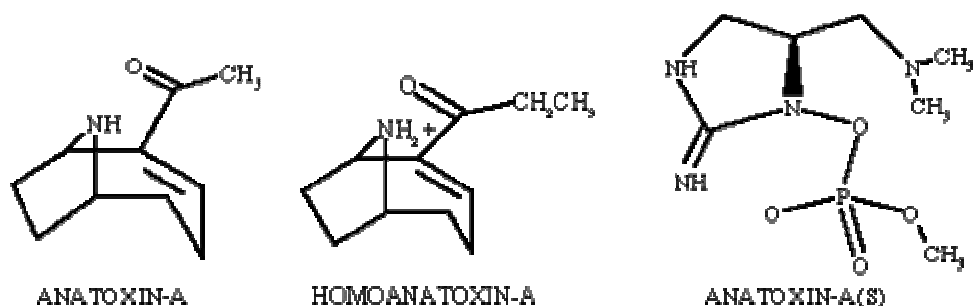
Obr. 8: Nodularin (Anonym, 2007)

2.2.7.4. Anatoxiny

Jedná se o alkaloidní neurotoxiny produkované zejména sinicemi rodu: *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Cylindrospermum* (Bláha *et al.*, 2004), dále jsou uváděny i rody *Trichodesmium*, *Lyngbya* a *Nostoc* (Krmencík a Kysilka, 2001). Mezi nejvýznamnější patří **anatoxin-a**, **anatoxin-a(S)** a **homoanatoxin-a**. Anatoxin-a a homoanatoxin-a způsobují záměnu funkce v pregangliových nervových zakončeních, acetylcholinových receptorech a zvyšují tok Ca iontů do cholinergních nervových zakončení. Anatoxin-a(S) působí jako blokátor cholinesterázy, způsobuje depolarizaci postsynaptických zakončení a ovlivňuje nikotinové, muskarinové i acetylcholinové receptory (Krmencík a Kysilka, 2001).

Letální dávka (LD_{50}) testovaná na myších se pohybuje okolo 20 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ živé hmotnosti (I.P.) pro anatoxin-a(S), 200-250 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ živé hmotnosti (I.P.) pro anatoxin-a a homoanatoxin-a (Maršálková a Maršálek, 2006; Anonym, 2007).

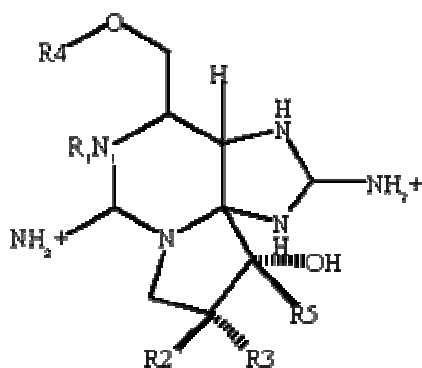
Tyto alkaloidní neurotoxiny jsou velmi termolabilní a jejich destrukce nastává při teplotách nad 40 °C v alkalickém prostředí (Krměčık a Kysilka, 2001).



Obr. 9: Anatoxiny (Anonym, 2007)

2.2.7.5. Saxitoxin (*Aphanotoxin*)

Jedná se o neurotoxický karbamátový alkaloid syntetizovaný sinicemi rodu *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Lyngbya*, *Cylindrospermopsis*. (Maršálková a Maršálek, 2006). Princip účinku saxitoxinu spočívá v blokaci sodíkových kanálů v axonech neuronů. Letální dávka (LD₅₀) je pro myši 10 μg · kg⁻¹ živé hmotnosti (I.P.). Paralytický saxitoxin má stejně jako ostatní neurotoxiny ve vyváženém ekosystému malou stabilitu (Krměčık a Kysilka, 2001).



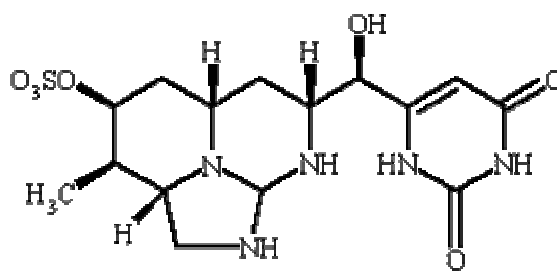
SAXITOXIN - GENERAL STRUCTURE

Obr. 10: Saxitoxin (Anonym, 2007)

2.2.7.6. *Cylindrospermopsin*

Je alkaloidní guanidinový hepatotoxin syntetizovaný rody *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Umezakia*, *Trichodesmium*. Princip účinku je inhibice proteosyntézy a syntézy glutathionu. Toxický dopad má především na játra a ledviny, ale i na tkáň plic, srdce, sleziny, nadledvinek a brzlíku. Je též cytotoxický (Krměčık a Kysilka,

2001). Letální dávka (LD₅₀) pro myš po 5-6 dnech (I.P.) je 200 µg . kg⁻¹ živé hmotnosti (Maršálková a Maršálek, 2006).

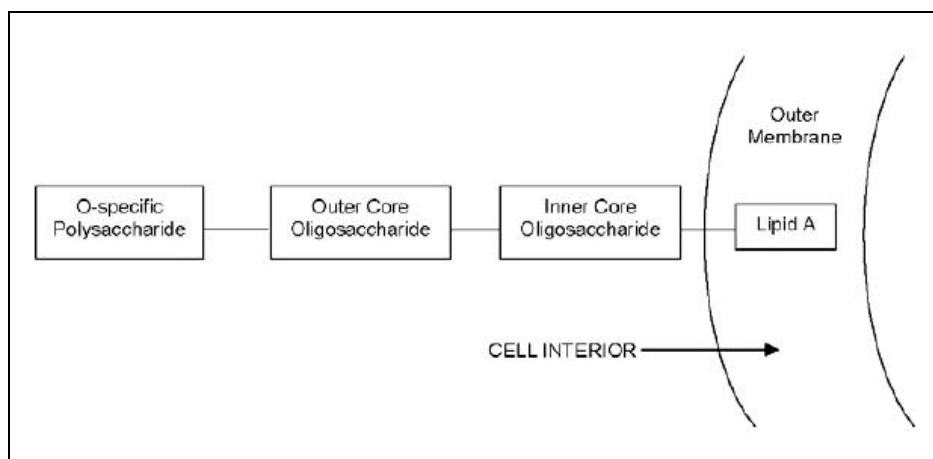


CYLINDROSPERMOPSIN

Obr. 11: *Cylindrospermopsin* (Anonym, 2007)

2.2.7.7. *Lipopolysacharidy*

Buněčné stěny sinic (cyanobakterií) jakožto gramnegativních bakterií jsou tvořeny **lipopolysacharidy (LPS)**. LPS sestávají na vnitřním pólu molekuly z lipidové složky – **lipid A**, vnitřní a vnější částí jádra tvořenou **oligosacharidy** a na vnějším pólu z **O-specifického polysacharidu** (obr. 12.) (Stewart *et al.*, 2006).



Obr. 12: Schématické znázornění obecné struktury LPS (Stewart *et al.*, 2006)

Molekula LPS je ukotvena lipidovou složkou ve vnější části buněčné membrány zatímco na druhém pólu molekuly je specifický O-antigen způsobující biologickou aktivitu (pyrogenitu, letalitu) lipopolysacharidu (Stewart *et al.*, 2006).

Svým složením se cyanobakteriální LPS mírně liší od ostatních gramnegativních heterotrofních bakterií. Cyanobakteriální LPS obsahují glukózu, xylózu, manózu a rhamnózu. Od většiny ostatních gramnegativních bakterií se liší variabilní přítomností

2-keto-3-deoxyoctonátu, heptózy, galaktózy a glukosaminu. Lipidová složka LPS neboli **lipid A** je charakteristický dlouhým řetězcem nasycených a nenasycených mastných kyselin a hydroxy mastných kyselin, které vykazují značnou diverzitu. Narozdíl od lipidu A ostatních heterotrofních gramnegativních bakterií, lipid A z LPS cyanobakterií obvykle postrádá fosfáty. LPS ostatních heterotrofních gramnegativních bakterií obecně neobsahují nenasycené mastné kyseliny. LPS cyanobakterií obsahují relativně velká množství kyseliny olejové, palmitové, linolové a příležitostně i kyseliny linolenové (Keleti a Sykora, 1982).

Endotoxická aktivita a další biologické účinky LPS cyanobakterií z přírodních vzorků vodního květu i z laboratorních kultur byly porovnávány s účinky LPS ostatních gramnegativních bakterií a LPS zelené řasy Bernardovou *et al.* (2007). Výsledky LAL testu (*Limulus* améboeyt lyzát) vypovídají o největší endotoxické aktivitě LPS u cyanobakterií *Aphanizomenon sp.* z přírodních vzorků vod (v porovnání s ostatními cyanobakteriálními LPS). Endotoxickou aktivitu LPS cyanobakterií z laboratorních kultur popisují jako obecně nižší. Dále poukazují na relativně vysokou pyrogenitu (pyrogen = látka mikrobiálního původu zvyšující tělesnou teplotu) LPS všech testovaných sinic.

Výsledky pokusů endotoxické aktivity prováděné Keletim a Sykorou (1982), kteří izolovali LPS od sinic *Anabaena flos-aquae* UTEX 1444, *A. cylindrica*, *Oscillatoria tenuis* a *O. brevis* jsou znázorněny v porovnání s jinými autory v tabulce 4. Izolované LPS z *A. flos-aquae* nevyvolaly toxický účinek po i.p. injekcí. Podobně i Weise *et al.* (1970) prokázal, že LPS izolované z *Synechococcus* PCC (*A. nidulans*) není toxický pro myši. Zatímco LPS od *Oscillatoria brevis* a *A. cylindrica* po i.p. injekcí vykazaly endotoxickou aktivitu. Jejich výsledky naznačují, že cyanobakteriální endotoxiny mají přibližně **10 x** nižší toxicitu než ostatní heterotrofní gramnegativní bakterie (např. *Salmonella sp.*) Také uvádí, že všechny LPS testovaných cyanobakterií byly pozitivní v LAL testu.

Tab. 4. Toxické účinky cyanobakteriálních LPS při intraperitoneální injektaci myši vztažené na 1 kg živé hmotnosti

Cyanobakterie	Letální efekt	Zdroj
<i>Anacystis nidulans</i>	Netoxická při dávce 10 mg/kg	Weise <i>et al.</i> , 1970
<i>Phormidium spp.</i>	Netoxická při dávce 333 mg/kg	Mikheyskaya <i>et al.</i> , 1977
<i>Schizothrix calcicola</i>	Netoxická při dávce 200 mg/kg	Keleti <i>et al.</i> , 1979
<i>Anabaena flos-aquae</i> UTEX 1444	Netoxická při dávce 250 mg/kg	Keleti a Sykora, 1982
<i>Anabaena cylindrica</i> UTEX 1611	LD ₅₀ 130 mg/kg	Keleti a Sykora, 1982
<i>Oscillatoria brevis</i>	LD ₅₀ 190 mg/kg	Keleti a Sykora, 1982
<i>Microcystis aeruginosa</i> 006	LD ₅₀ approx 45 mg/kg	Raziuddin <i>et al.</i> , 1983
<i>Microcystis aeruginosa</i> NRC-I	LD ₅₀ 40 mg/kg	Raziuddin <i>et al.</i> , 1983
<i>Spirulina platensis</i> Lb 1475/4a	LD ₁₀₀ 425 mg/kg	Tornabene <i>et al.</i> , 1985

Oběcně se autoři (Bernardová *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 2006; Keleti a Sykora, 1982;) shodují, že biologické reakce sinicových LPS jsou slabší nežli endotoxiny ostatních gramnegativních bakterií. Avšak Best *et al.* (2002), kteří zkoumali též toxický potenciál izolovaných LPS sinic dospěli k závěru, že redukuje aktivitu glutathion S-transferasy (GSTs) u embryí ryby *Danio rerio*. Uvádějí, že sinicové LPS redukovaly mikrozomální a volný GSTs v *in vivo* pokusech ve větší míře nežli LPS *Escherichia coli* nebo *Salmonella typhimurium*. Takové snížení by mohlo mít velký vliv na detoxikační schopnost organismu vyrovnat se například s expozicí dalších toxinů sinic jako například microcystinů apod. kvůli sníženému využití glutathionu (GSH) pro tyto detoxikační reakce.

Lipopolysacharidy sinic nedosahují takových toxických účinků jako ostatní sinicové toxiny avšak ve vodách jsou při přemnožení sinic v období vodních květů ve velmi velkých koncentracích a mohou být tedy toxikologicky významné (Bláha *et al.*, 2004).

2.2.8. Vliv microcystinů na embrya *Oryzias latipes*

Pokusy provedené Jacquetem *et al.* (2004) na embryích ryby *Oryzias latipes*, kterým byl injektován microcystin –LR přímo do intracelulárního prostoru ve stádiu jedné buňky (stádium 1) a také do žloutku embryí ve stádiích 19 (pozdní neurula) a nebo 25 (počátek jaterního vývoje), vykazovaly zajímavé závěry. Při injektaci jiker ve stádiu jedné buňky množstvím 100 pl roztoku s koncentrací microcystinu –LR 10 a 1 µg/ml po deseti dnech dosáhlo líhnutí o 88% menší úspěšnosti než kontrolní skupina. Snižováním koncentrace (až na 100 pg/ml) mělo za následek snížení přežití o 85 až 44% oproti kontrole. Nižší koncentrace již přežití neovlivnily. Byla také ovlivněna délka vývoje jikry, která byla u těchto jiker při injektaci 10 a 1 µg/ml snížena v průměru o dva dny oproti kontrolní skupině. Použitím koncentrací 10 a 1 µg/ml injektovaných do jiker ve stádiu 19 autoři udávají ještě negativnější dopady než v předešlém případě. Projevilo se snížením líhivosti o 90 – 96% oproti kontrole. Délka inkubace se zkrátila o dva až tři dny u koncentrací do 100 pg/ml MC –LR. Injektace embryí v 25. stádiu mělo taktéž negativní dopady, ale ne již takové intenzity jako při injektování ve stádiu 19.

Z anatomicko-patologických sledování udávají zjevné hepatobiliární poškození, hypertrofii, jaterní hemoragii a nekrózy v pozdních vývojových stádiích. Ve většině případů zdvojnásobení velikosti jaterní tkáně.

Na výsledky práce Jacqueta *et al.* (2004) navazuje studie Huynh-Delerma *et al.* (2005), kteří zkoumali histopatologické změny na trávicím ústrojí a přilehlých orgánech po injektování embryí v 19. stádiu vývoje dávkou 0,2 pg MC - LR/žloutek embrya. Autoři udávají tyto údaje:

- **Dopad na žloutkový váček a plynový měchýř:** u injektovaných embryí po vylíhnutí je téměř celá tělní dutina vyplněna žloutkovým váčkem. U kontrolní skupiny zaujímá žloutkový váček přibližně 1/3 objemu dutiny. Plynový měchýř není ve většině případů naplněn. To naznačuje, že microcystin – LR je zodpovědný za inhibici vstřebávání žloutkového váčku a zároveň negativně ovlivňuje vývoj a naplnění plynového měchýře.

- **Dopad na jícen:** zde autoři udávají absenci pohárkových buněk v jícnu oproti kontrolní skupině. Pozorují oddělování a degeneraci epiteliálních buněk a u všech injektovaných kusů menší vrásnění epitelu jícnu než je sledováno u kontroly.

- **Dopad na žaludek a střevo:** u ošetřených embryí udávají zmenšování a mizení klků epiteliálního povrchu od žaludku až po rektum.
- **Dopad na pankreas:** ve všech případech pozorovali zmenšení velikosti pankreatu spojené též s nepřítomností či destrukcí acinárních jednotek. Ve všech částech pankreatu destrukturalizace a ztráta středových kanáلكových buněk.
- **Dopad na játra:** zde autoři popisují opačný jev než například Jacquet *et al.* (2004) a to silné zmenšení velikosti jaterní tkáně. Oproti kontrole méně zjevné tubulo-sinusoidální uspořádání.

Autoři udávají, že již malé množství (0,2 pg MC-LR/jedince) dramaticky ovlivňuje resorpci žloutkového vřčku a rozvoj poruch ve vývoji orgánů zažívacího traktu. Nemá však již takový dopad na velikost a tělesnou hmotnost líhnoucích se larev.

Jednou z dalších studií je práce Lecoze *et al.* (2008), kteří sledovali účinky cyanobakteriálního hrubého extraktu izolovaného ze dvou rozdílných monokultur sinice *Planktothrix agardhii* pasážovaných v laboratoři. První testovanou byla monokultura PMC 75.02, ve které byly stanoveny dva typy microcystinů (MC-dMeLR a MC-YR). Ve druhé monokultuře PMC 87.02 nebyly microcystiny detekovány. Jako v předešlých pracích injektovali tyto hrubé extrakty přímo do žloutku embryí v 19. stádiu vývoje. Zjistili dosti podstatné rozdíly v účincích obou monokultur. U monokultury PMC 75.02 stanovili $EC_{50} = 7,8 \mu\text{g/ml}$ hrubého extraktu. Tento extrakt zmenšil přežití embryí při koncentraci 10 – 50 $\mu\text{g/ml}$ o 81 – 56% oproti kontrole. Vliv na uspíšení líhnutí však udávají menší nežli Jacquet *et al.* (2004) u čistých microcystinů LR. Dále pozorovali změny na játrech a zažívacím traktu. S použitím extraktů z monokultury PMC 87.02 určili hodnotu $EC_{50} = 460 \mu\text{g/ml}$ hrubého extraktu. Předčasné líhnutí nepozorovali. Tyto výsledky napovídají, že v extraktech to jsou právě produkované microcystiny, které jsou podstatnou částí zodpovědné za mortalitu a malformace.

3. MATERIÁL A METODIKY

3.1. Testování parametrů se změnou počtu jiker

3.1.1. Generační ryby a metodika jejich chovu

Generační ryby byly získány z laboratorního chovu ústavu zoologie Technische Universität Dresden v Německu a to ve stádiu jiker v očních bodech. Tyto byly dále odchovány až do fáze pohlavní zralosti. Práce probíhaly v řízených podmínkách akvaristické laboratoře Biologické fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích od února 2006 do prosince 2006. Ze získaných jiker ve stádiu očních bodů byla odchována homogenní skupina ryb použitá pro získávání jiker pro testy líhivosti a délky embryonálního vývoje. Generační hejno bylo tvořeno rybami linie Q2d-rR.YHNI. Jeho typickými exteriérovými vlastnostmi jsou takřka absolutní absence melanoforů a přítomnost oranžovo-červených chromatoforů u samců, umožňující jejich vizuální odlišení od samic (mimo jiné sekundární pohlavní znaky). Hejno čítalo 13 generačních jedinců, konkrétně 4 samice a 9 samců o průměrné velikosti 3,5 cm. Tyto ryby byly ve stáří jednoho a půl roku. Odchov do pohlavní dospělosti byl prováděn v akváriu o rozměrech 600 x 400 x 400 mm a objemu 100 l a to až do chvíle prvních výtěrů, kdy bylo přistoupeno k výtěru po párech. Akvárium k odchovu generačních ryb bylo vybavené 150 W termostatickým topným tělesem, teploměrem, molitanovým filtrem poháněným vzduchem, vzduchovacím kamenem, zářivkovým osvětlením a nainstalovaným trsem rostliny *Vesicularia dubyana*.

Jako hlavní krmivo byl použit mražený zooplankton druhu **Cyklops** od firmy Mrva Jiří, Nové sídliště 176, 267 21 Trmaň, kterým se krmilo jednou denně. Jako další varianta bylo zvoleno kompletní krmivo od firmy Sera[®] Heinsberg D 52518, Německo. **Sera[®] microgran** s tímto složením: rybí moučka, pšeničná moučka, moučka z kopřivy, moučka z řasy *Spirulina*, moučka z mořských řas, moučka z mořských krevet, moučka z mořského krilu. Podrobné údaje o obsahu vitamínů a živin jsou obsaženy v tabulce 5 a v tabulce 6.

Tab. 5. Přidané vitamíny na 1 kg krmiva Sera[®] microgran

Přidaný vitamín	množství	jednotka
A	29 980	UI
D ₃	1 500	UI
E (D, L - α- tocopheryl acetáte)	60	UI
B ₁	31	mg
B ₂	90	mg
C (L – ascorbyl-2-polyphosphate)	551	mg

Tab. 6. Garantovaný obsah živin v krmivu Sera[®] microgran

Složka živin	%
bílkoviny	min. 48,5
tuky	min. 6,9
hrubá vláknina	max. 2,3
vlhkost	max. 5,5
popeloviny	max. 9,2

Teplota byla udržována na 25 °C ± 1 °C termostatem. Osvětlení zajistila zářivková trubice Philips o délce 590 mm, průměru 26 mm a výkonu 20 W emitující bílé světlo a to po dobu 15 hodin. Po dobu 9 hodin byla pomocí samočinných spínacích hodin zajištěna tma. Tato diurnální perioda zajistila indukci tření. Výměna vody se prováděla 2 x do týdne a to ¼ obsahu akvária vytemperovanou a odstátou vodou. Molitanový filtr poháněný vzduchem byl v provozu kontinuálně po celou dobu stejně jako vzduchování. V okamžiku, kdy se samicím objevily na urogenitální papile první vytřené jikry, byly ryby dány k individuálnímu, kontinuálnímu výtěru po párech.

3.1.2. Výtěr generačních ryb

Výtěr byl realizován ve 4 výtěrových akváriích o rozměrech 340 x 160 x 160 mm. Tato akvária byla umístěna do jednoho centrálně vytápěného akvária o rozměrech 600 x 400 x 400 mm, ve kterém se udržovala teplota 25 °C termostatickým topným tělesem. Cirkulaci vody zajišťovalo silné vzduchování. Tím byla docílena stálost a rovnoměrnost

teploty vody po celou dobu výtěru ve všech výtěrových akváriích. Uvnitř každého akvária byl nainstalován trs drobnolisté vodní rostliny *Vesicularia dubyana* sloužící jako výtěrový podklad pro samice medak zajištěný u dna, dále pak vzduchovací kámen. Fotoperiodou 15 hodin světlo x 9 hodin tma byl i nadále stimulován výtěr ryb. Objem vody v každém z výtěrových akvárií činil 6 litrů. Do každého z nich byl nasazen 1 pár ryb připravených ke tření. V průběhu nasazování jednotlivých párů byly ryby mezi sebou prostřídány. Čištění a kontrola akvárií byla prováděná v období odběrů jiker denně. Nasazeným rybám byla podávána *Artemia salina* jednou denně.

3.1.3. Odběr jiker

Odběry jiker a kontrola samic byly prováděny v ranních hodinách, kdy nejčastěji docházelo k výtěru a samice měly povětšinou shluk jiker zavěšený ve vejcovodu pomocí početných vláček (viz příloha 5B). Podle toho v jaké pozici se vyskytovaly vytřené jikry se přistoupilo ke konkrétnímu odběru. Pokud měla samice jikry uchyceny ve vejcovodu, přistoupilo se před odběrem k narkotizaci. K tomuto účelu byl použit hřebíčkový olej (Clove Leaf Oil, Purity Australia Pty. Ltd., Austrálie) v objemu 1 kapka na 50 ml vody v Petriho misce. Samice, vylovená pomocí akvaristického zvonu, byla dána do narkotizační lázně na dobu 10 sekund, poté přelovena do Petriho misky s čistou vodou, kde byl vykonán odběr jiker a následně vrácena do výtěrového akvária. V případě, že již byly jikry odloženy na dně akvária, byly odebrány pomocí pipety s širším hrdlem. Poslední variantou, většinou několik hodin po výtěru, bylo zavěšení jiker na přiloženou rostlinu *Vesicularia dubyana*. V tomto případě byla rostlina vyjmuta z akvária, vložena do Petriho misky a pod binolupou pomocí jemné zahnuté preparační jehly každá jikra samostatně odebrána. I v předchozích dvou případech bylo s jikrami manipulováno stejně, tzn., že bylo manipulováno s každou jikrou samostatně. Takto odebrané jikry byly připraveny ke kontrole a následnému použití v testu.

Po vykonaném odběru jiker od samic nebo z vytíracího akvária byla každá jikra nasazovaná do testu zkontrolována pod binolupou při zvětšení 4 x 10 jestli není zjevně poškozena a vložena do komory.

3.1.4. Design testů líhnivosti a délky embryonálního vývoje

Do testů byly nasazovány pouze oplozené jikry v 6. (cca 3 hod.) až 8. (cca 4 hod.) stádiu embryonálního vývoje (viz příloha 5 a 4). Do jedné komory se vkládala embrya o stejném stáří. Embrya byla inkubována v objemu 10 ml inkubačního média na komoru.

Líhnivost a délka embryonálního vývoje byly zjišťovány pomocí šesti experimentů. Testování probíhalo na umělohmotných testovacích plotnách o rozměrech 250 x 200 x 30 mm, které měly 30 testovacích komor každá o objemu 10 ml. Plotny byly v průběhu experimentů umístěny v akváriu se stabilně udržovanou teplotou 25 °C ± 1°C. Jednotlivé pokusy A až F se lišily počtem nasazených jiker do jedné komory. V experimentu A byly oplozené jikry v komorách samostatně, v experimentu B po dvou, v dalších pak následovně až do F, kde bylo do komor umístěno šest jiker. V experimentu A bylo nasazeno 30 testovacích komor, exp. B 18 komor, exp. C 12 komor, exp. D 30 komor, exp. E 22 komor a exp. F 18 komor. Doby trvání testů byly závislé na vylíhnutí posledních jedinců v testu. V průběhu testů byla denně kontrolována teplota (viz příloha 1). Testy byly prováděny statickou metodou bez výměny inkubačního média. Jako inkubační médium byla použita standardizovaná voda pro použití v embryotoxikologických testech. Postup její přípravy a složení viz kapitola 3.1.5. - Příprava inkubační vody a její složení. Jikry byly vystaveny osvětlení po dobu 15 hodin denně, zbylých 9 hodin byly inkubovány ve tmě. Kontrola vylíhlých a uhynulých jedinců, stejně jako doba uběhlá od nasazení do vykolení byla kontrolována a zaznamenávána denně. Uhynulí či vylíhlí jedinci byli z komor odebíráni.

Sledovány byly:

- Líhnivost v závislosti na počtu jiker v jedné komoře
- Délka embryonálního vývoje v závislosti na počtu jiker

3.1.5. Příprava inkubační vody a její složení

Ředící voda se připravuje podle normy ISO 7346 pro testy toxicity na sladkovodních rybách.

Příprava zásobních roztoků:

Zásobní roztok č. 1: 11,76 g CaCl₂·2H₂O (p.a.) se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou.

Zásobní roztok č. 2: 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (p.a.) se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou.

Zásobní roztok č. 3: 2,59 g NaHCO_3 (p.a.) se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou.

Zásobní roztok č. 4: 0,23 g KCl (p.a.) se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou.

Na 1 litr ředící vody se dávkuje 25 ml každého zásobního roztoku. Do odměrné baňky o objemu 1 l se nalije část destilované vody, nadávkuje se zásobní roztoky a objem se doplní destilovanou vodou po rysku. Takto připravená voda se 24 hodin sytí vzdušným kyslíkem (aerace). Poté se nechá dalších 24 hodin odstát a zkontroluje se hodnota pH, která by se měla pohybovat v rozmezí $7,8 \pm 0,2$. Případná úprava pH se provádí roztokem 1M - NaOH nebo 1M - HCl. Takto připravená zředovací voda se před použitím v testu nemusí dále upravovat. Pro snazší manipulaci je také možné připravit desetkrát koncentrovanější zásobní roztoky a dávkami 25 ml těchto roztoků připravit 10 l zředovací vody.

3.1.6. Metodika přípravy živé potravy

Pro kontinuální dozrávání jikernaček a pokud možno každodenní odběr jiker bylo zapotřebí dostatek kvalitní potravy. Pro tyto účely byla inkubována trvalá vajíčka žábřonožky solné *Artemia salina*. Inkubace byla prováděna ve vodní lázni sestavené z menšího akvária o rozměrech 400 x 250 x 250 mm naplněného 10 mm pod okraj vodou ohřivanou termostatickým topným tělesem na 26 °C a promíchávanou proudem vzduchu ze vzduchovacího kamene. Víko akvária bylo opatřeno dvěma otvory uzpůsobenými k fixaci dvou kónických lahví o objemu 1,5 litru pro samotné líhnutí žábřonožek. V každé z nich byla instalována hadička s přívodem vzduchu bez vzduchovacího kamene pro tvorbu velkých bublin a turbulentního prostředí. K aktivaci a vývoj vajíček bylo instalováno světlo. Do každé z lahví se nalil 1 litr upravené inkubační vody a 2,5 g vajíček žábřonožky solné. Nasazování na lahve se provádělo s odstupem jednoho dne mezi sebou pro kontinuální líhnutí nauplií. (doba líhnutí přibližně 24 – 48 hod.). Po dokončení inkubace se nechaly žábřonožky 15 minut bez aerace, aby mohly být odsáty a zkrmovány. Pro přípravu inkubační vody byla použita několik dní odstátá a vytemperovaná voda na teplotu 26 °C, do které bylo přidáno 10 g kuchyňské soli bez jodu na 1 litr vody.

Trvalá vajíčka artemií byla použita od firmy Inve Aquaculture Nutrition, Hoogveld 91, B-9200 Dendermonde, Belgium, původem z U.S.A. Informace o obsahu živin jsou v následující tabulce 7.

Tab. 7. Obsah živin u použitých trvalých vajíček *Artemia salina*

Složka živin	%
Bílkoviny	54
Tuky	11
Popeloviny	8
Vlhkost	8

3.1.7. Použité statistické metody

Pro vyhodnocení výsledků byly použity programy Microsoft® Office Excel 2003 a StatSoft, Inc. (2001) STATISTICA Cz [Softwarový systém na analýzu dat] verze 6.

Pro porovnání rozdílů v líhivosti zjištěných v pokusech s jednou až s šesti jikrami v komorách byl použit χ^2 -test. K porovnání homoskedasticity souborů dat byl použit Levenův test homogenity rozptylů. K následnému vyhodnocení rozdílů středních hodnot byl použit Kruskal - Wallisův neparametrický test.

3.2. Metodika testování sinicových biomas

3.2.1. Generační ryby a metodika chovu

Testy zaměřené na zjištění potencionální negativních efektů vod s obsahem sinicových vodních květů na embryonální vývoj ryby *Oryzias latipes* byly provedeny v experimentální laboratoři VURH JU ve Vodňanech a to v období od 1.12.2007 do 15.2.2008.

Původ generačních ryb, jejich chov, charakteristika, krmení, teplota, doba osvětlení, odběr jiker a příprava a složení standardní vody jsou shodné s předešlou metodikou viz kapitola 3.1.

Výtěr ryb byl proveden hromadně ve společném akváriu, ve kterém bylo nasazeno 8 samic a 16 samců. Jikry byly odebírány v ranních hodinách po výtěru metodou popsanou v předešlé metodice viz kapitola 3.1.3.

3.2.2. Design testů

Testováno bylo šest vzorků (1A, 2A, 3A, 1B, 2B, 3B) a kontrola (K) ve stejném počtu opakování inkubovaná pouze ve standardní inkubační vodě (ISO) použité k ředění biomas. Počet opakování od každého vzorku bylo 12 (každá komora o čtyřech jikrách) tj. 48 sledování na vzorek.

3.2.3. Testované vzorky biomas

V pokusu byly testovány tři vzorky biomas sinic vodních květů (**1, 2, 3**) odebrané ze dvou nádrží v ČR s odlišným druhovým složením a obsahem microcystinů LR, YR a RR viz tabulka 8.

Odběr a příprava základních koncentrací vzorků byly provedeny pracovníky Centra pro cyanobakterie a jejich toxiny, Kamenice 126/3, 625 00 Brno (RECETOX). Celkové surové biomasy sinic skladované při -18 °C byly homogenizovány procesem sonifikace pomocí ultrazvukového dezintegrátoru (Bandelin Sonoplus HD2070) a základní koncentrace opět zamrazeny na -18 °C a dopraveny do VURH JU ve Vodňanech. Zde byly vzorky skladovány při -18 °C a podle potřeby rozmrazeny a ředěny na konečné koncentrace. Vzorky připravené k použití viz příloha 6C. Před ředěním a aplikací testovaného média do testu byla provedena temperace na 25 °C a homogenizace na přístroji Vortex po dobu 10 minut.

Pro testování byly ředěny dvě koncentrace **A = 40 mg** sušiny biomas sinic /l,
B = 200 mg sušiny biomas sinic/l
s příslušným obsahem microcystinů viz tabulka 9.

Tab. 9. Obsah sušiny a jednotlivých variant microcystinů v konkrétních vzorcích

Vzorek	1A	2A	3A	1B	2B	3B
konc.suš.biom. (mg/l)	40	40	40	200	200	200
MC LR (µg/l)	14,84	3,236	14,812	74,2	16,18	74,06
MC YR (µg/l)	2,36	0	3,264	11,8	0	16,32
MC RR (µg/l)	6,404	0	48,732	32,02	0	243,66
suma MC (µg/l)	23,6	3,2	66,8	118	16,18	334,02

3.2.4. Průběh testů

Pokus se v základních parametrech řídí standardem OECD 212.

- přežití oplodněných jiker v kontrole min. 80%
- přežití vylíhlých larev z kontroly do stádia přechodu na vnější výživu min. 80%
- obsah rozpuštěného O₂ v testovaných komorách musí být v rozmezí 60 – 100%
- teplota nesmí přesáhnout 25 °C ± 1,5 °C během testu u jiker a 23 ± 2 °C u vylíhlých larev.

Odebrané a zkontrolované jikry byly nasazeny do testu v 6. (cca 3 hod.) až 8. (cca 4 hod.) stádiu embryonálního vývoje (viz příloha 4). Jednotlivá embryonální stádia byla porovnávána pomocí manuálu González-Doncel *et al.* (2005). Test probíhal až do vylíhnutí či úhynu poslední jikry z celého testu (20 dní).

U nasazených jiker byly sledovány:

- líhnivost,
- délka embryonálního vývoje,
- začátek a konec líhnutí,
- deformity a anomálie u vylíhlých jedinců,
- stádium úhynu u uhynulých jedinců,
- přežití larev do stádia přechodu na vnější výživu a případné odchylky od normálního chování u vylíhlých jedinců

Testy byly provedeny semistatickou metodou. Výměna testovaných médií byla prováděna u koncentrací 40 mg/l jednou za 48 hodin a u koncentrací 200 mg/l jednou za 24 hodin. Toto rozvržení vychází ze sledování průběhu kyslíku v předběžném testu (viz příloha 3).

Kontrola jiker byla prováděna dvakrát denně vždy ve stejnou dobu a zároveň s druhou kontrolou bylo vyměněno testovací médium. Uhynulé jikry byly odstraněny a vylíhlé larvy zkontrolovány pod binolupou, vyfotografovány a přemístěny do ISO vody pro další sledování.

Experiment byl prováděn ve sterilních testovacích plotnách značky NunclonTM Surface Steril. (R) od firmy NuncTM Brand Products (viz příloha 6E). Plotny o šesti

komorách, každá s objemem 10 ml byly vloženy do inkubátoru (viz příloha 6A), ve kterém byla po celou dobu vývoje monitorována teplota (viz příloha 2) v intervalu jedné hodiny pomocí registračního teploměru. Teplota v inkubátoru byla pomocí termostatu udržována na $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Hodnoty pH, tvrdost a rozpuštěný kyslík byly kontrolovány vždy při výměně média. Světelné podmínky zajišťovalo automatické osvětlení osvětlující jikry 15 hodin denně. Zbýlých 9 hodin byly jikry inkubovány za tmy.

Pozorování jiker a vylíhlých larev bylo prováděno na binolupě Olympus SZ 40 (viz příloha 6D) a fotografováno v sestavě s fotoaparátem Olympus C-5060 wide zoom.

3.2.5. Použité statistické metody

Pro vyhodnocení výsledků byly použity programy Microsoft® Office Excel 2003 a StatSoft, Inc. (2001) STATISTICA Cz [Softwarový systém na analýzu dat] verze 6. Pro porovnání rozdílů v líhivosti a výskytu deformit byl použit χ^2 -test. K porovnání shody rozptylů souborů dat byl použit F- test. K následnému vyhodnocení rozdílů středních hodnot byl použit Studentův t- test.

Tab.8. Podrobná specifikace vzorků biomasy 1, 2 a 3

Číslo biomasy	Lokalita	Povodi	Datum odběru	Rozvoj květu sinic na nádrži	Taxonomie - souhrnná charakteristika	MC-LR (µg/g sušiny)	MC-YR (µg/g sušiny)	MC-RR (µg/g sušiny)	Suma MC (µg/g sušiny)
1	Nechranice	Ohře	31.07.04	20-30%	90 % sinic (<i>Woronichinia naegeliana</i> 15%, <i>Microcystis flos-aquae</i> 45%, <i>M. aeruginosa</i> 25%, <i>Anabaena sigmoides</i> 15%) Chlfa (9.9.04) 17.7 µg/l	371,0	59,0	160,1	590,0
2	Nechranice	Ohře	11.09.04	50-70%	95 % sinic (<i>M. aeruginosa</i> 41%, <i>Woronichinia naegeliana</i> 41%) Chlfa (6.9.04) 10,4 µg/l	80,9	0,0	0,0	80,9
3	Újezd	Ohře	31.07.04	70-100%	95 % sinic (<i>M. aeruginosa</i> 75%, <i>Aphanisomenon flos-aquae</i> 25%) Chlfa (29.7.04) 65.7 µg/l	370,3	81,6	1218,3	1670,1

4. VÝSLEDKY

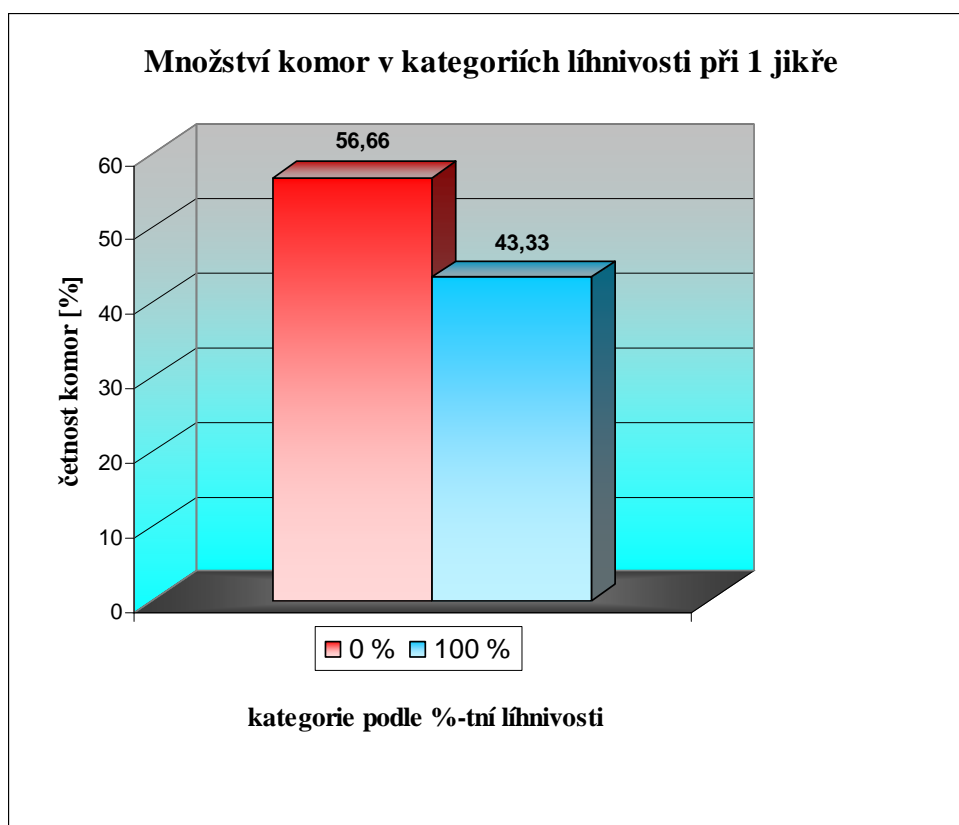
4.1. Výsledky návrhu metodického postupu (pokusy A až F se změnou počtu jiker na komoru)

4.1.1. Experiment A: jedna jikra v testovacích komorách

Líhivost

Tab. 10. Výsledky testu líhivosti při nasazení po jedné jikře v komoře

Líhivost při 1 jikře				
		Vylíhlé	Uhynulé	Celkem
	Počet embryí (ks)	13	17	30
	%	43,33	56,66	100
	Komor			30

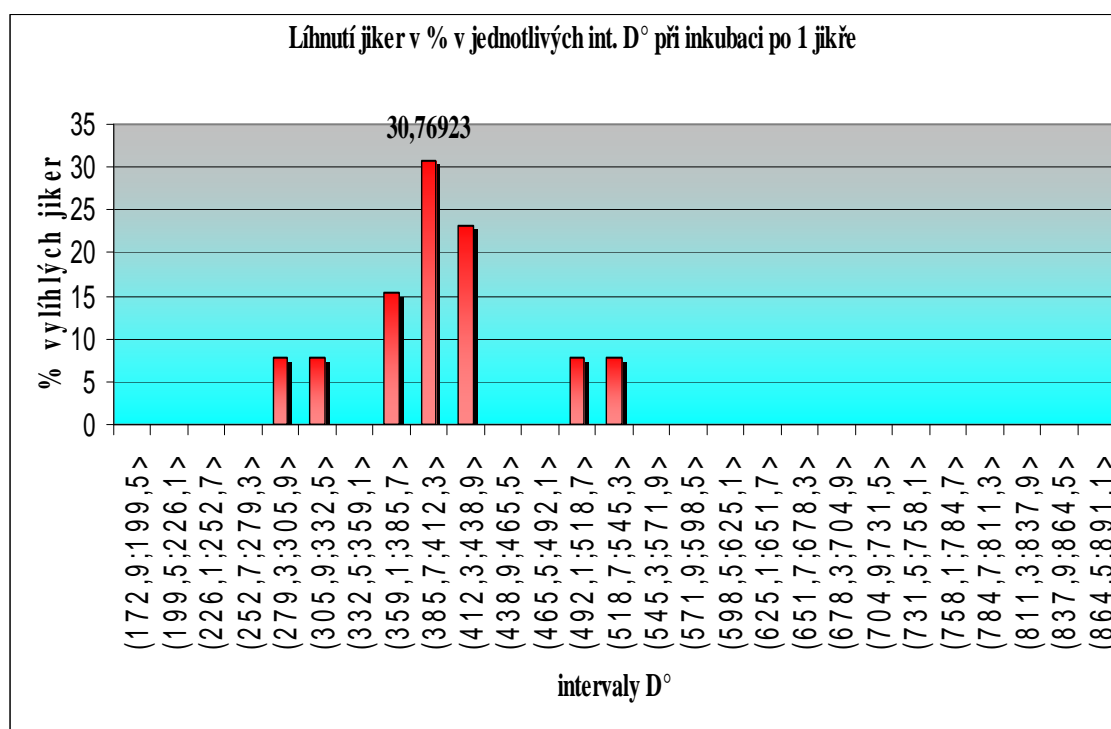


Obr. 12: Grafické znázornění procentuelní četnosti komor v definovaných kategoriích líhivosti při nasazení jedné jikry do komory

Délka embryonálního vývoje

Tab. 11. Výsledky délky embryonálního vývoje při nasazení po jedné jikře

Dnů	D°	Četnost abs.	Četnost rel.
12	297,96	1	7,6923077
13	322,79	1	7,6923077
14	347,62	0	0
15	372,45	2	15,384615
16	397,28	4	30,769231
17	422,11	3	23,076923
18	446,94	0	0
19	471,77	0	0
20	496,6	1	7,6923077
21	521,43	1	7,6923077



Obr. 13: Grafické znázornění rozložení líhnutí jiker nasazených po jedné jikře

V tabulkách 10, 12, 14, 16, 18 a 20 jsou tabelovány výsledky ze sledování líhivosti pro jednotlivé pokusy A až F. Na obrázcích 12, 14, 16, 18, 20 a 22 je graficky znázorněno procentuelní množství komor z celkového množství, které dosáhly příslušných hodnot úspěchu či neúspěchu v líhivosti. Následovně jsou v tabulkách 11, 13, 15, 17, 19 a 21 tabelovány výsledky délky embryonálního vývoje pro testy A až F

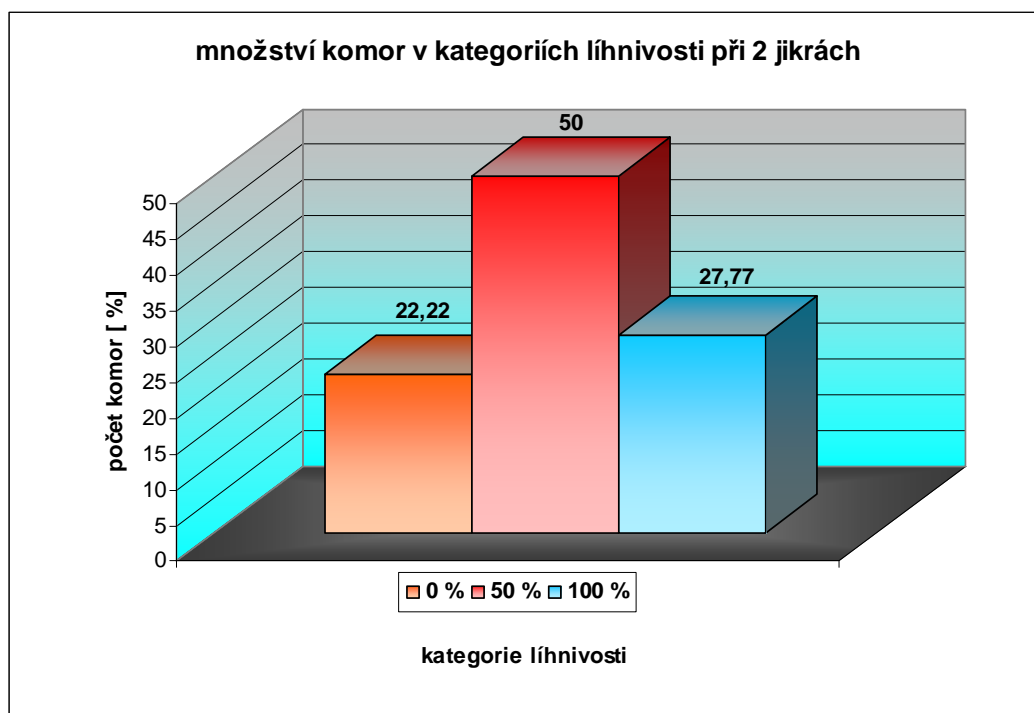
a na obrázcích 13, 15, 17, 19, 21, 23 je graficky znázorněno procentuelní množství jiker vylíhlých ve stanovených intervalech taktéž pro testy A až F.

4.1.2. Experiment B: dvě jikry v testovacích komorách

Líhivost

Tab. 12. Výsledky testu líhivosti při nasazení po dvou jikrách v komoře

Líhivost při 2 jikrách				
		Vylíhlé	Uhynulé	Celkem
	Počet embryí (ks)	19	17	36
	%	52,77	42,8	100
	Komor			18

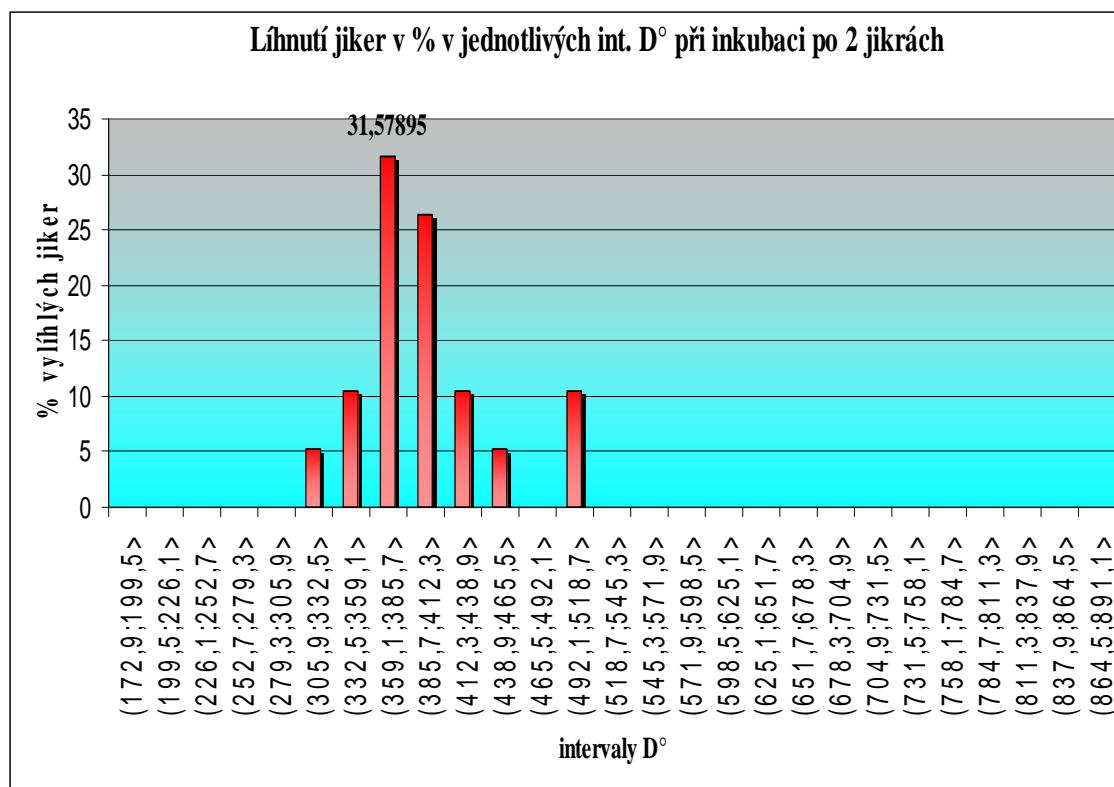


Obr. 14: Grafické znázornění procentuelní četnosti komor v definovaných kategoriích líhivosti při nasazení dvou jiker do komory

Délka embryonálního vývoje

Tab. 13. Výsledky délky embryonálního vývoje při nasazení po dvou jikrách

Dnů	D°	Četnost abs.	Četnost rel.
12	306,84	1	5,263157895
13	332,41	0	0
14	357,98	2	10,52631579
15	383,55	6	31,57894737
16	409,12	5	26,31578947
17	434,69	2	10,52631579
18	460,26	1	5,263157895
19	485,83	0	0
20	511,4	2	10,52631579



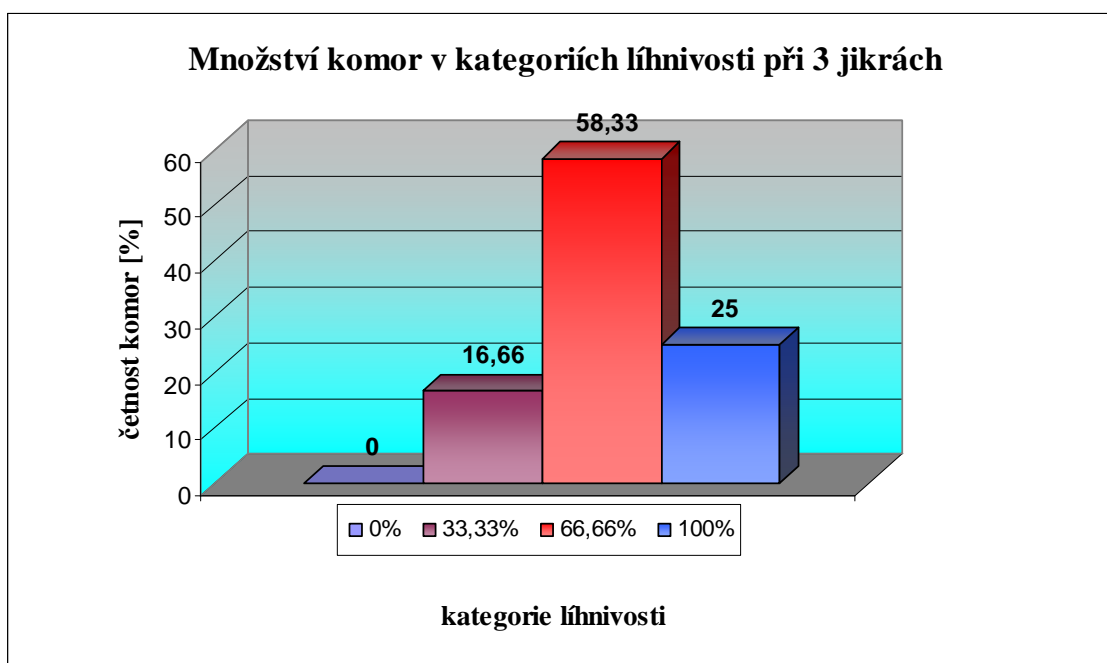
Obr. 15: Grafické znázornění rozložení líhnutí jiker nasazených po dvou jikrách

4.1.3. Experiment C: tři jikry v testovacích komorách

Líhivost

Tab. 14. Výsledky testu líhivosti při nasazení po třech jikrách v komoře

Líhivost při 3 jikrách				
		Vylíhlé	Uhynulé	Celkem
	Počet embryí (ks)	25	11	36
	%	69,44	30,55	100
	Komor			12

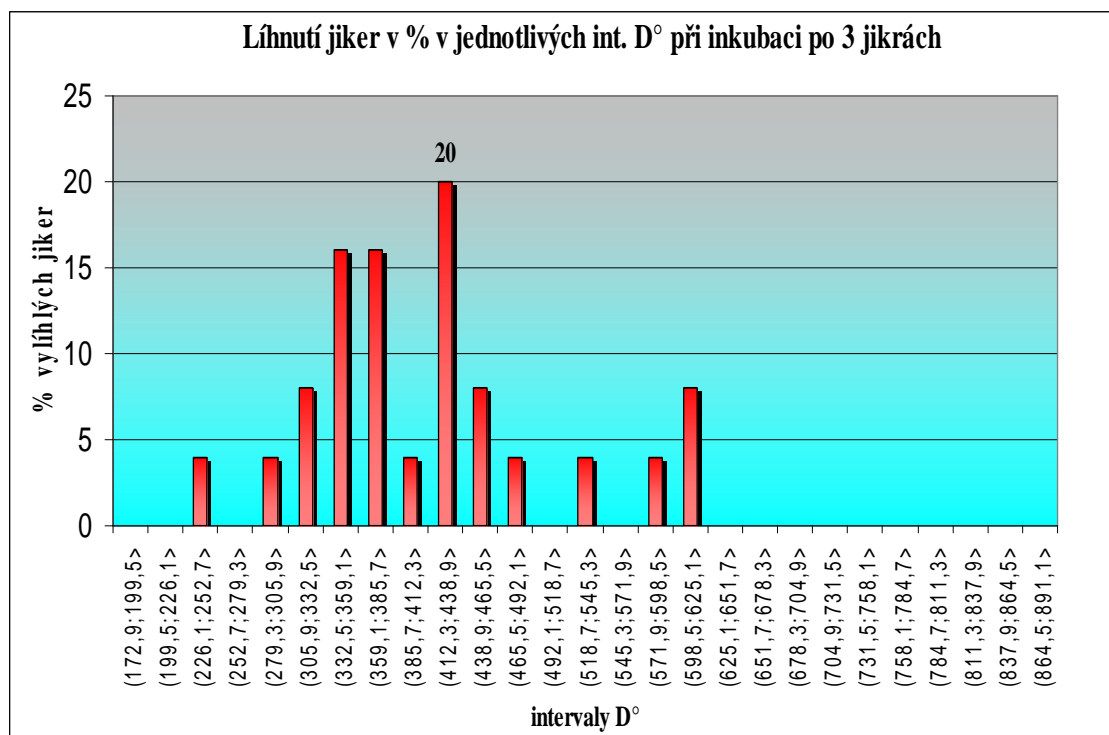


Obr. 16: Grafické znázornění procentuelní četnosti komor v definovaných kategoriích líhivosti při nasazení třech jiker do komory

Délka embryonálního vývoje

Tab. 15. Výsledky délky embryonálního vývoje při nasazení po třech jikrách

Dnů	D°	Četnost abs.	Četnost rel.
9	230,13	1	4
10	255,7	0	0
11	281,27	1	4
12	306,84	0	0
13	332,41	2	8
14	357,98	4	16
15	383,55	4	16
16	409,12	1	4
17	434,69	5	20
18	460,26	2	8
19	485,83	1	4
20	511,4	0	0
21	536,97	1	4
22	562,54	0	0
23	588,11	1	4
24	613,68	2	8



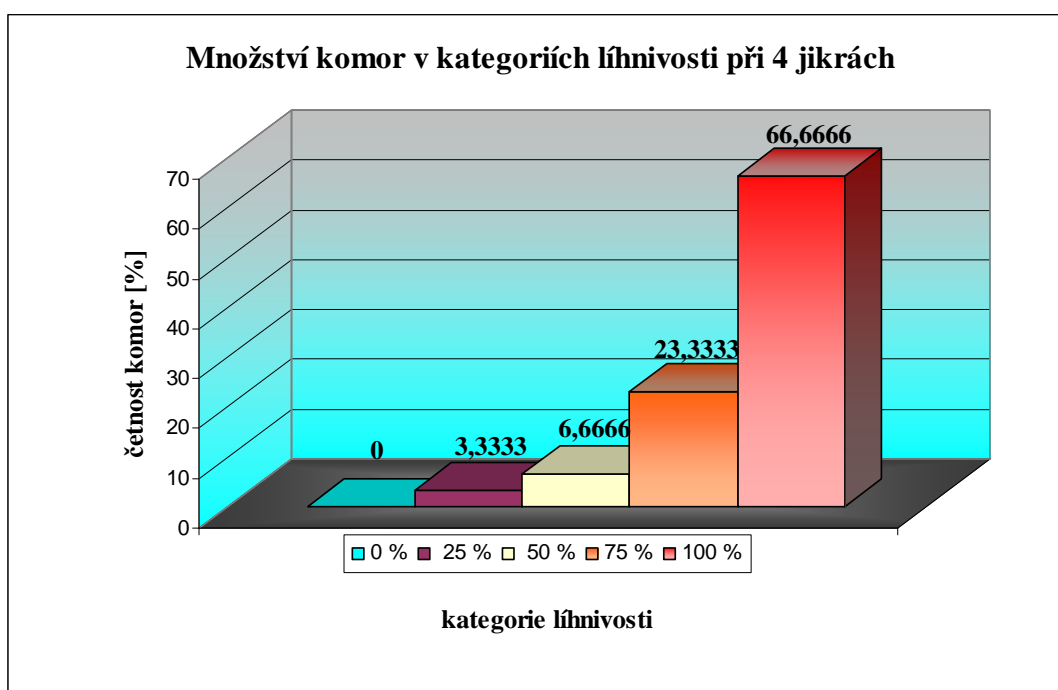
Obr. 17: Grafické znázornění rozložení líhnutí jiker nasazených po třech jikrách

4.1.4. Experiment D: čtyři jikry v testovacích komorách

Líhivost

Tab. 16. Výsledky testu líhivosti při nasazení po čtyřech jikrách v komoře

Líhivost při 4 jikrách				
		Vylíhlé	Uhynulé	Celkem
	Počet embryí (ks)	106	14	120
	%	88,33	11,66	100
	Komor			30

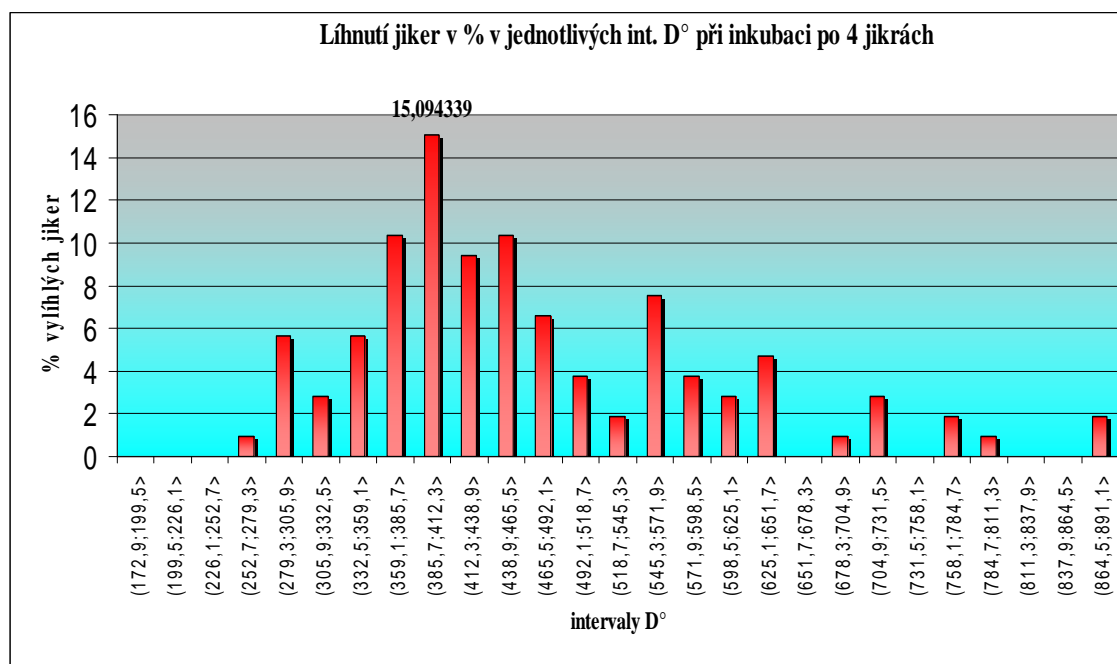


Obr. 18: Grafické znázornění procentuelní četnosti komor v definovaných kategoriích líhivosti při nasazení čtyřech jiker do komory

Délka embryonálního vývoje

Tab. 17. Výsledky délky embryonálního vývoje při nasazení po čtyřech jikrách

Počet dnů	D°	Četnost abs.	Četnost rel.
10	266	1	0,943396226
11	292,6	6	5,660377358
12	319,2	3	2,830188679
13	345,8	6	5,660377358
14	372,4	11	10,37735849
15	399	16	15,09433962
16	425,6	10	9,433962264
17	452,2	11	10,37735849
18	478,8	7	6,603773585
19	505,4	4	3,773584906
20	532	2	1,886792453
21	558,6	8	7,547169811
22	585,2	4	3,773584906
23	611,8	3	2,830188679
24	638,4	5	4,716981132
25	665	0	0
26	691,6	1	0,943396226
27	718,2	3	2,830188679
28	744,8	0	0
29	771,4	2	1,886792453
30	798	1	0,943396226
31	824,6	0	0
32	851,2	0	0
33	877,8	2	1,886792453



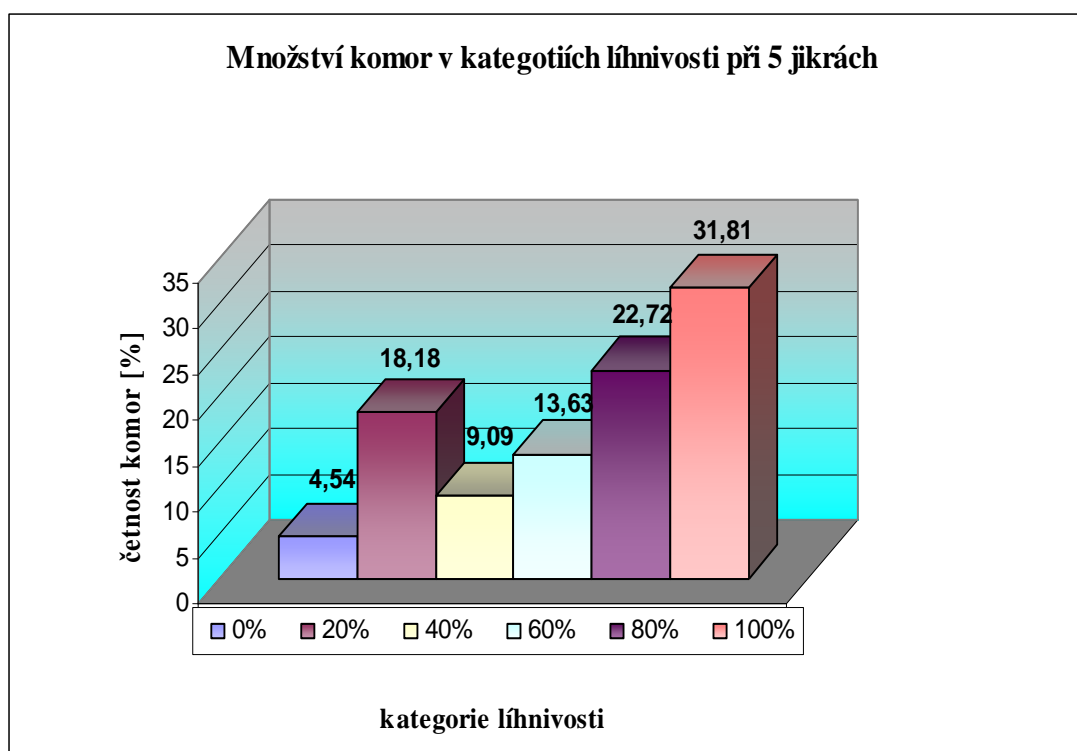
Obr. 19: Grafické znázornění rozložení líhnutí jiker nasazených po čtyřech jikrách

4.1.5. Experiment E: pět jiker v testovacích komorách

Líhivost

Tab. 18. Výsledky testu líhivosti při nasazení po pěti jikrách v komoře

Líhivost při 5 jikrách				
		Vylíhlé	Uhynulé	Celkem
	Počet embryí (ks)	72	38	110
	%	65,45	34,55	100
	Komor			22

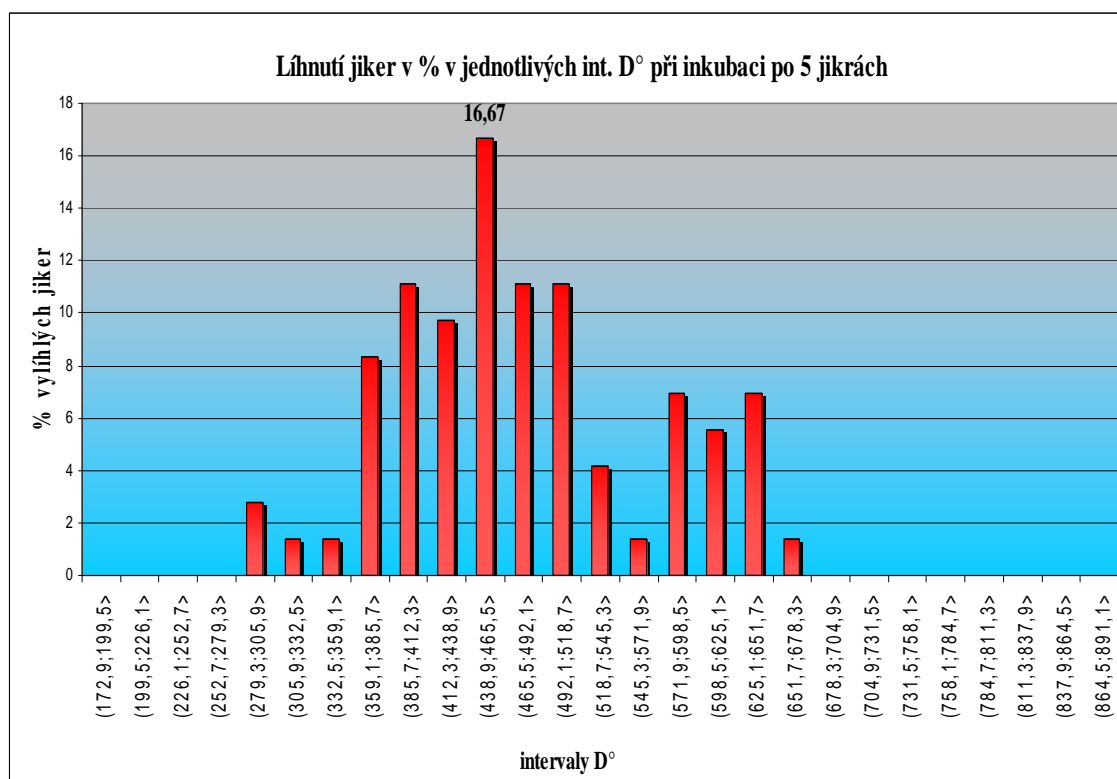


Obr. 20: Grafické znázornění procentuelní četnosti komor v definovaných kategoriích líhivosti při nasazení pěti jiker do komory

Délka embryonálního vývoje

Tab. 19. Výsledky délky embryonálního vývoje při nasazení po pěti jikrách

Dnů	D°	Četnost abs.	Četnost rel.
11	286,55	2	2,7777778
12	312,6	1	1,3888889
13	338,65	1	1,3888889
14	364,7	6	8,3333333
15	390,75	7	9,7222222
16	416,8	7	9,7222222
17	442,85	11	15,2777778
18	468,9	5	6,9444444
19	494,95	9	12,5
20	521	6	8,3333333
21	547,05	2	2,7777778
22	573,1	4	5,5555556
23	599,15	4	5,5555556
24	625,2	2	2,7777778
25	651,25	4	5,5555556
26	677,3	1	1,3888889



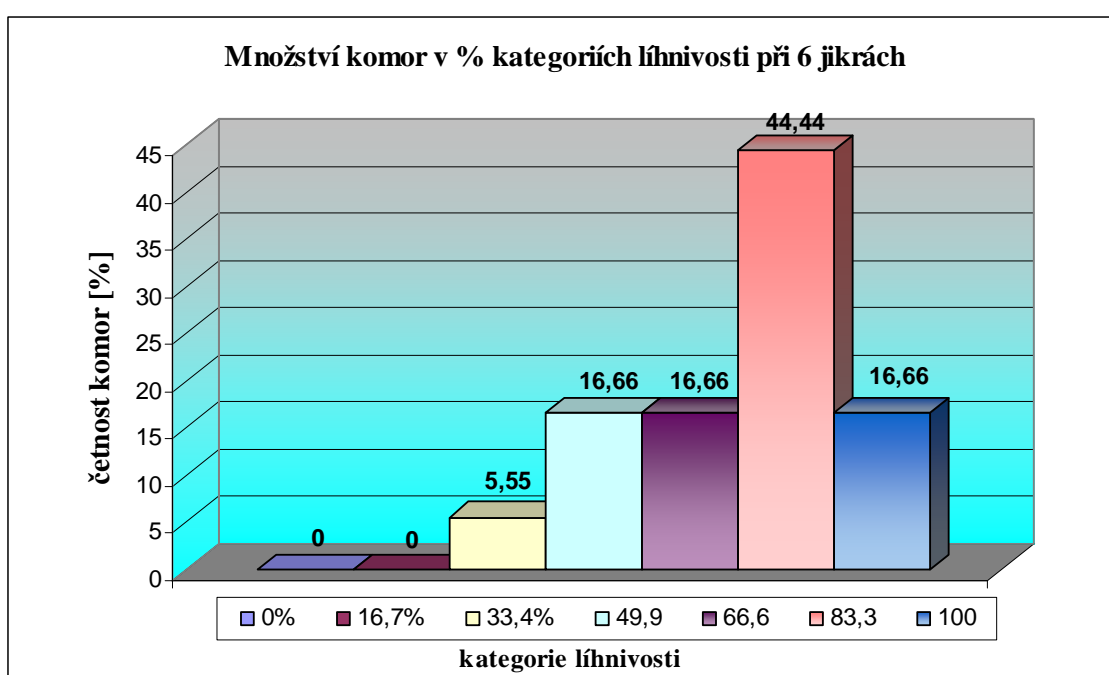
Obr. 21: Grafické znázornění rozložení líhnutí jiker nasazených po pěti jikrách

4.1.6. Experiment F: šest jiker v testovacích komorách

Líhivost

Tab. 20. Výsledky testu líhivosti při nasazení po šesti jikrách v komoře

Líhivost při 6 jikrách		Vylíhlé	Uhynulé	Celkem
	Počet embryí (ks)	81	27	108
	%	74,96	25,04	100
	Komor			18

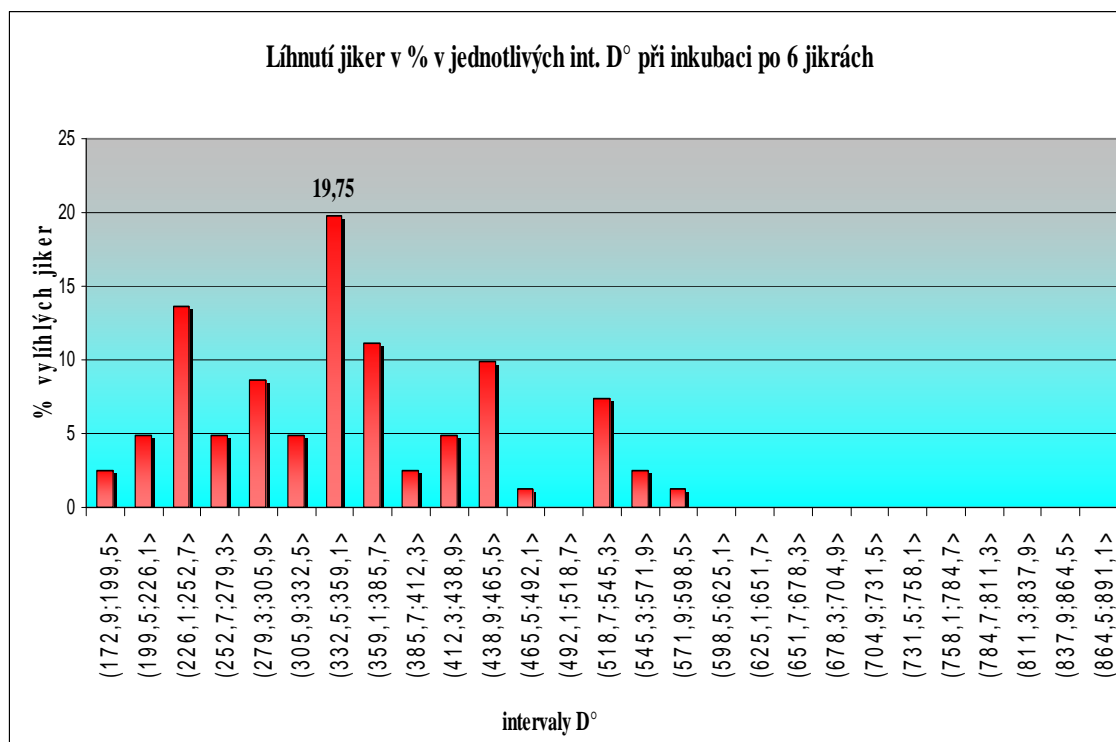


Obr. 22: Grafické znázornění procentuelní četnosti komor v definovaných kategoriích líhivosti při nasazení šesti jiker do komory

Délka embryonálního vývoje

Tab. 21. Výsledky délky embryonálního vývoje při nasazení po šesti jikrách

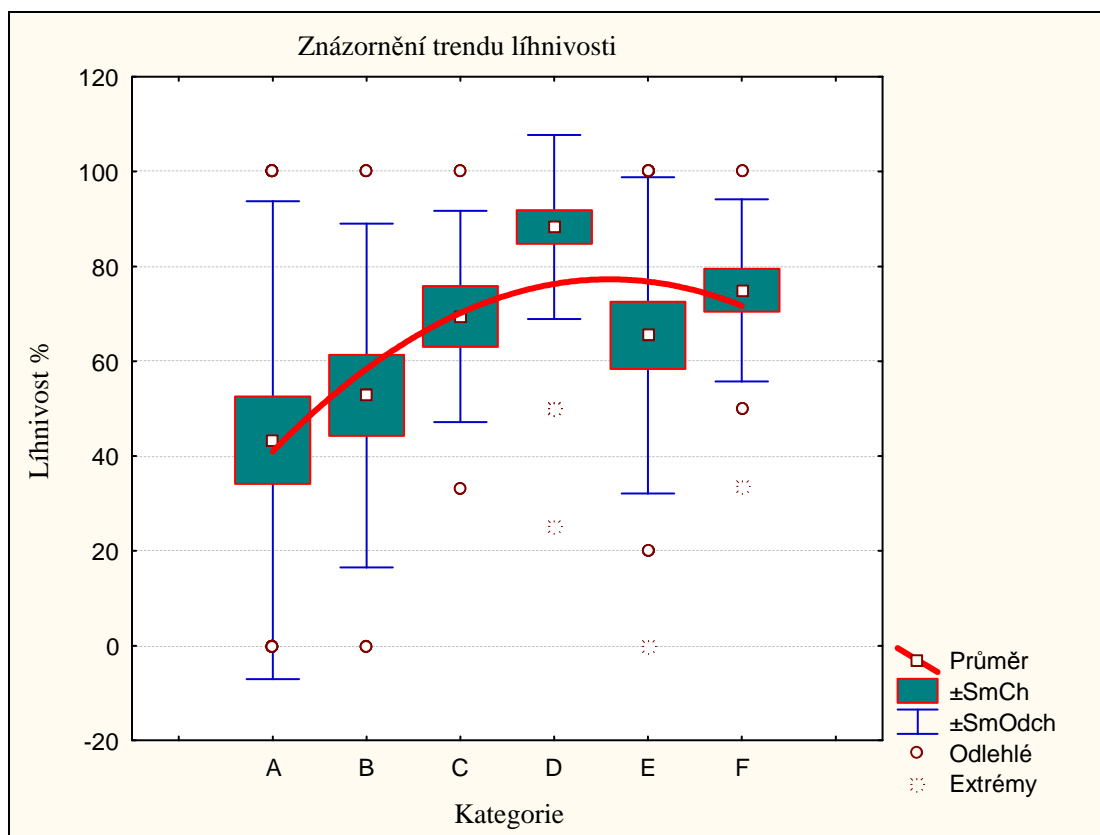
Dnů	D°	Četnost abs.	Četnost rel.
7	182,35	2	2,4691358
8	208,4	4	4,9382716
9	234,45	11	13,5802469
10	260,5	4	4,9382716
11	286,55	7	8,64197531
12	312,6	4	4,9382716
13	338,65	16	19,7530864
14	364,7	9	11,1111111
15	390,75	2	2,4691358
16	416,8	4	4,9382716
17	442,85	8	9,87654321
18	468,9	1	1,2345679
19	494,95	0	0
20	521	6	7,40740741
21	547,05	2	2,4691358
22	573,1	1	1,2345679



Obr. 23: Grafické znázornění rozložení láhnutí jiker nasazených po šesti jikrách

4.1.7. Souhrnné porovnání dosažených výsledků v pokusech A až F

Líhivost



Obr. 24: Grafické znázornění trendu úspěšnosti líhnutí v závislosti na počtu jiker v komoře

Tab. 22. Souhrnná tabulka s výsledky testů líhivosti pro všechny pokusy A až F

Jiker v komoře	Jiker v testu	Test.komor	Líhivost [%]
1	30	30	43,33
2	36	18	52,77
3	36	12	69,44
4	120	30	88,33
5	110	22	65,45
6	108	18	74,96

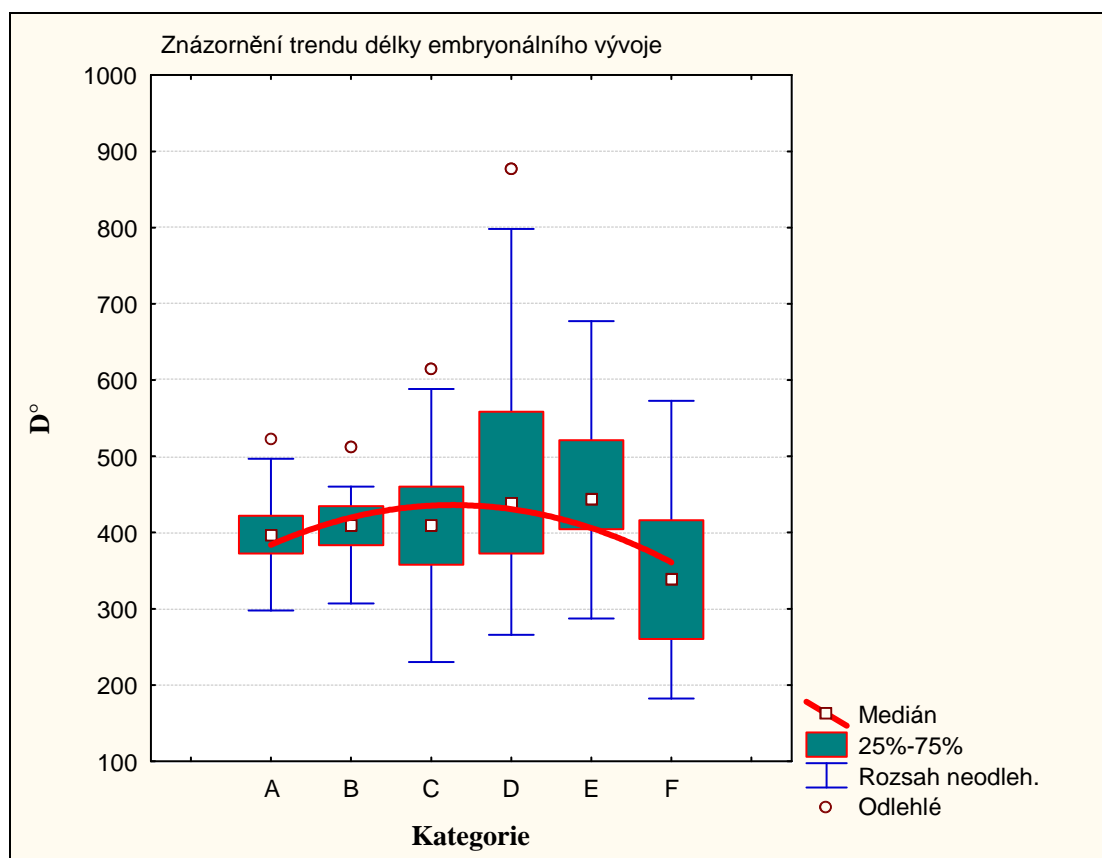
V tabulce 23 jsou tabelovány výsledky χ^2 – testu pro porovnání rozdílů v líhivosti se zvýrazněním hodnot vykazujících významný nebo velmi významný rozdíl.

Tab. 23. Výsledky porovnání rozdílů v líhivosti mezi soubory A až F pomocí χ^2 – testu (N-nesignifikantní; A-signifikantní; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)

	A	B	C	D	E	F
A		N (p=0,444)	A * (p=0,032)	A ** (p=0,000)	A * (p=0,027)	A ** (p=0,001)
B			N (p=0,146)	A ** (p=0,000)	N (p=0,173)	A * (p=0,012)
C				A ** (p=0,006)	N (p=0,659)	N (p=0,512)
D					A ** (p=0,000)	A ** (p=0,008)
E						N (p=0,123)
F						

Velmi významně (na hladině významnosti $\alpha - 0,01$) se odlišoval pokus se čtyřmi (D) jikrami na komoru s líhivostí **88,33%** a to od všech ostatních pokusů (A, B, C, E, F). Dále byl prokázán velmi významný rozdíl ($\alpha - 0,01$) v líhivosti mezi pokusy s jednou (A - **43,33%**) a se šesti (F - **74,96%**) jikrami na komoru. Dále byl prokázán významný rozdíl v líhivosti (na hladině významnosti $\alpha - 0,05$) mezi pokusy s jednou (A - **43,33%**) a třemi (C - **69,44%**) jikrami a jednou (A) a pěti (E - **65,45%**) jikrami. Významně se také odlišovaly pokusy s použitím dvou (B - **52,77%**) jiker a šesti (F - **74,96%**) jiker na komoru. Rozdíly v líhivosti v ostatních kombinacích nebyly signifikantní.

Délka embryonálního vývoje



Obr. 25: Grafické znázornění a srovnání délky embryonálního vývoje všech skupin

V experimentu A se 50% ze všech jiker lýchlo v rozmezí 372 – 422 D°. Interval, ve kterém se vylíhlo nejvíce jiker (30, 7%) byl (385,7; 412,3>. Střední hodnota tohoto intervalu je 399 D°.

V experimentu B se 50% ze všech jiker lýchlo v rozmezí 383 – 434 D°. Modální interval byl (359,1; 385,7> se střední hodnotou 372,4 D°, ve kterém se vylíhlo 31,5% jiker.

V experimentu C se 50% všech jiker lýchlo v rozmezí 357 – 460 D°. Nejčetnějším intervalem byl (412,3; 438,9> se střední hodnotou 425,6 D°, v němž se vylíhlo 20% nasazených jiker.

V experimentu D se vylíhlo 50% ze všech jiker v rozmezí 372 – 558 D°. Nejčetnějším intervalem pro tento pokus byl (385,7; 412,3> se střední hodnotou 399 D°, ve kterém se vylíhlo 15,09% nasazených jiker.

V experimentu E se vylíhlo 50% ze všech jiker v rozmezí 404 – 520 D°. Nejčtenějším intervalem byl (438,9; 465,5> se střední hodnotou 452,2 D°, ve kterém se vylíhlo 16,6% ze všech nasazených jiker.

V experimentu F se vylíhlo 50% ze všech jiker v rozmezí 260 – 416 D°. Interval, ve kterém se vylíhlo nejvíce jiker byl (332,5; 359,1> se střední hodnotou 345,8 D°. Vylíhlo se v něm 19,7% jiker.

Statisticky prokazatelný rozdíl (hladina významnosti $\alpha = 0,05$) je mezi téměř všemi soubory. Signifikantní rozdíl nebyl potvrzen pouze mezi experimenty A a B a dále mezi soubory B a C, což lze vidět na výřezu Kruskal – Wallisova testu vícenásobného porovnání na obrázku 26.

Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.): D° (data na D°)						
Nezávislá (grupovací) proměnná : Kategorie						
Kruskal-Wallisův test: H (5, N= 316) =72,60484 p =,0000						
Závislá: D°	1 jikra R:141,92	2 jikry R:143,97	3 jikry R:151,66	4 jikry R:188,12	5 jiker R:200,71	6 jiker R:90,395
1 jikra		1,000000	0,038813	0,000000	0,000000	0,000037
2 jikry	1,000000		1,000000	0,000000	0,000000	0,001202
3 jikry	0,038813	1,000000		0,000000	0,000000	0,035966
4 jikry	0,000000	0,000000	0,000000		0,000008	0,000000
5 jiker	0,000000	0,000000	0,000000	0,000008		0,000000
6 jiker	0,000037	0,001202	0,035966	0,000000	0,000000	

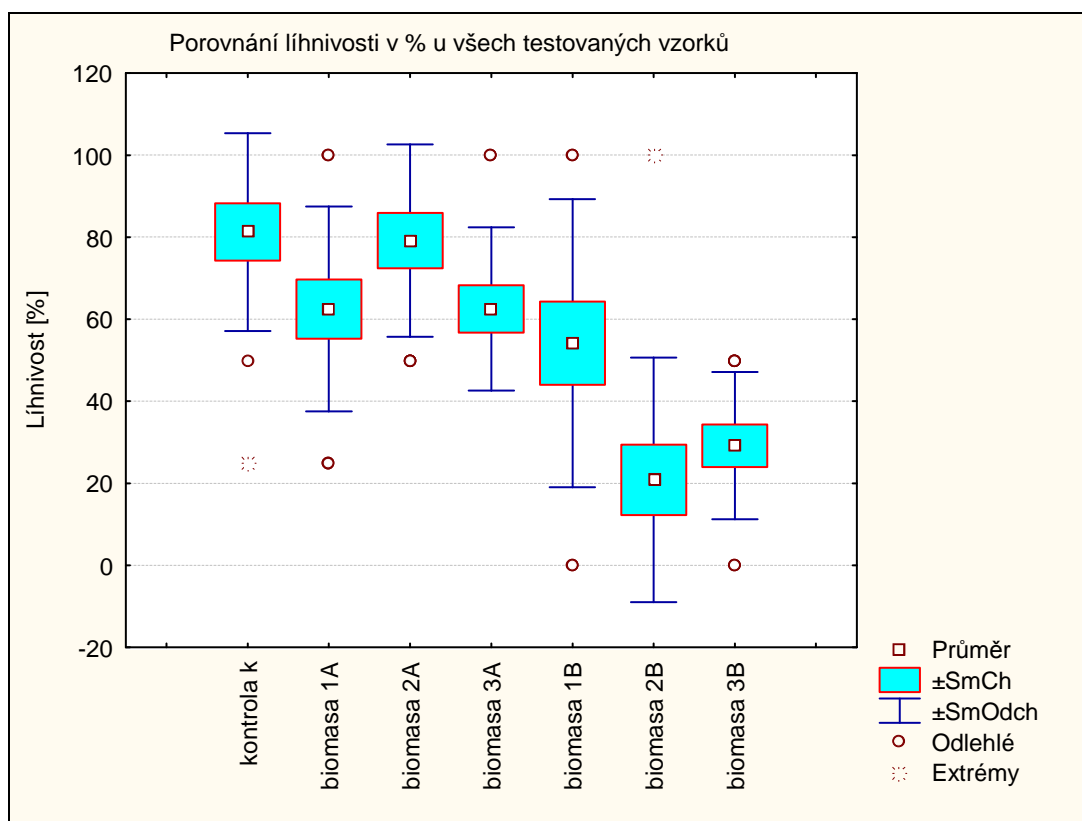
Obr. 26: Výsledky K-W testu pro porovnání středních hodnot délky embryonálního vývoje mezi soubory A až F.

4.2. Výsledky testování sinicových biomas

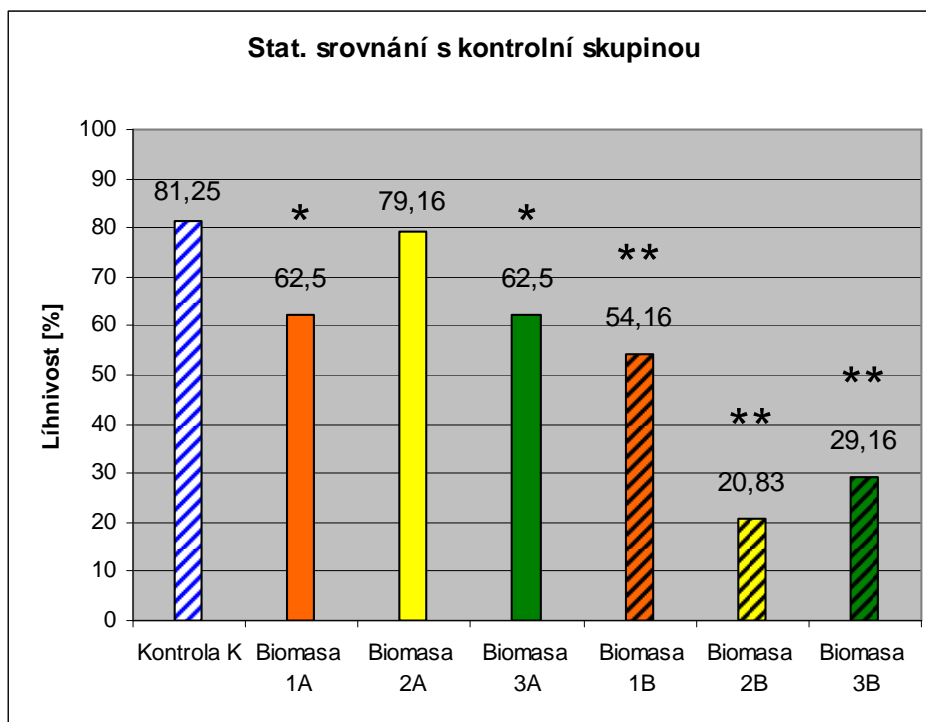
4.2.1. Líhňivost

Tab. 24. Popisné statistické údaje pro líhňivost (hodnoty jsou v % líhňivosti, N platných je počet opakování)

Proměnná	Popisné statistiky (data pro líhňivost)							
	N platných	Průměr	Medián	Modus	Četnost modu	Minimum	Maximum	Sm. odch.
kontrola k	12	81,25000	87,50000	100,0000	6	25,00000	100,0000	24,13268
1A	12	62,50000	62,50000	Vícenás.	4	25,00000	100,0000	25,00000
2A	12	79,16667	87,50000	100,0000	6	50,00000	100,0000	23,43592
3A	12	62,50000	50,00000	50,00000	8	50,00000	100,0000	19,94310
1B	12	54,16667	62,50000	75,00000	4	0,00000	100,0000	35,08647
2B	12	20,83333	12,50000	0,000000	6	0,00000	100,0000	29,83541
3B	12	29,16667	25,00000	25,00000	6	0,00000	50,0000	17,94351

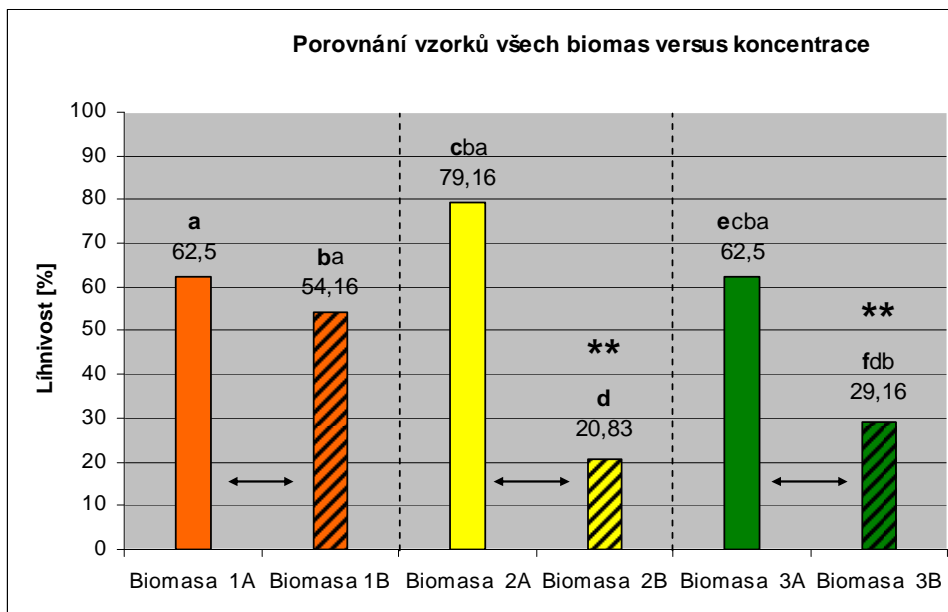


Obr. 27: Grafické porovnání líhňivosti všech vzorků biomas a kontroly



Obr. 28: Znárodnění líhivosti v porovnání s kontrolní skupinou. Pozn.: Hodnoty označené * jsou významně rozdílné na hladině významnosti $\alpha = 0,05$; hodnoty označené ** jsou významně rozdílné na hladině významnosti $\alpha = 0,01$

Líhivost v **kontrolní skupině** činila **81,25%**. U testovaných biomas **1A** a **3A** o koncentraci 40 mg biomasy/l byl vůči kontrolní skupině zaznamenán pokles líhivosti shodně na **62,5%**. Tento pokles byl signifikantní na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. U **biomasy 2A** byl také zaznamenán pokles avšak ten se neukázal jako významný. Líhivost pro biomasu **2A** činila **79,16%**. Srovnání biomas sinic **1B**, **2B** a **3B** s 5 x vyšší koncentrací (200 mg/l) oproti kontrolní skupině ukázalo velmi významné snížení líhivosti a to na hladině významnosti $\alpha = 0,01$. Pro **biomasu 1B** činila líhivost **54,16%**, pro **biomasu 2B** činila **20,83%** a pro **3B** činila **29,16%**. Graficky znázorněno na obrázku 27 a 28.



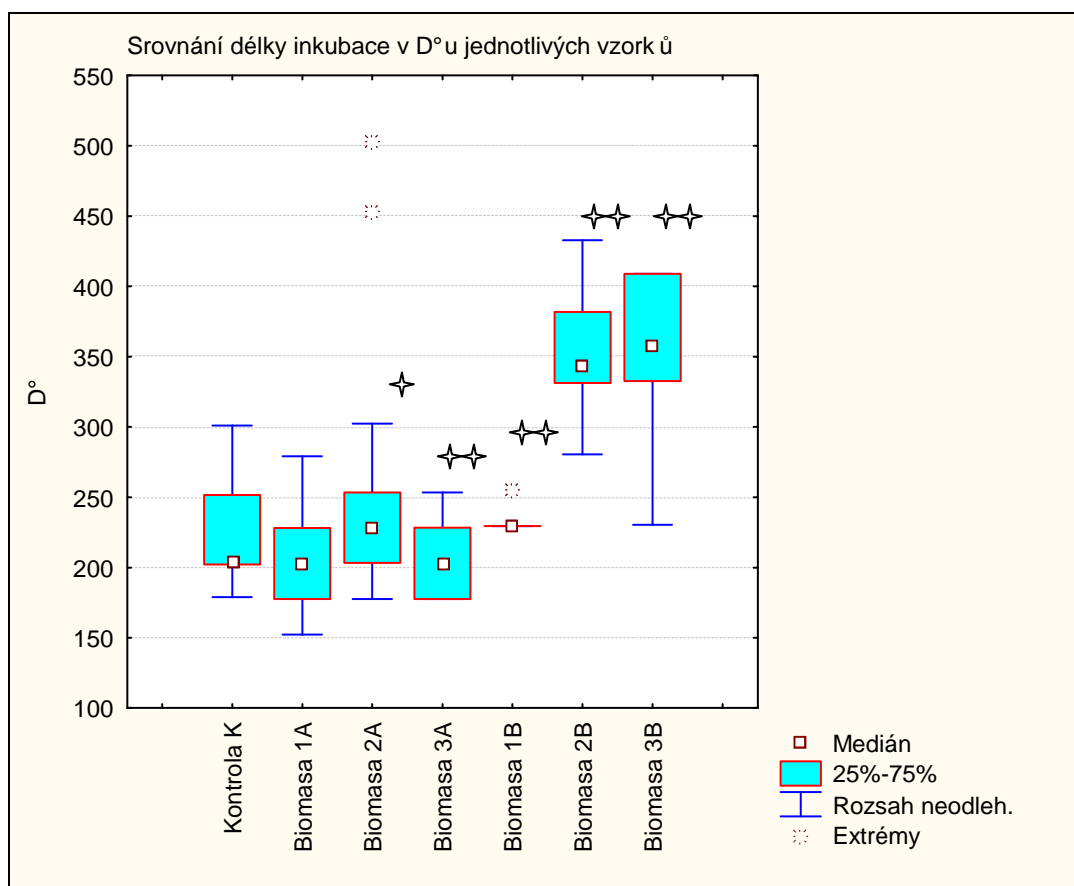
Obr. 29: Srovnání rozdílů všech biomas vůči sobě a porovnání účinku nižší koncentrace biomasy oproti vyšší koncentraci stejné biomasy. Pozn.: Hodnoty označené stejným písmenem nejsou významně rozdílné; hodnoty označené ** jsou významně rozdílné na hladině významnosti $\alpha = 0,01$ (porovnání nižší a vyšší koncentrace)

Při porovnání vlivu účinku větší koncentrace oproti nižší u biomas **1**, **2** a **3** (viz obrázek 29) bylo dosaženo těchto výsledků. U **biomasy 1** se zvýšením koncentrace na pětinašobek projevilo snížení líhňivosti, avšak statisticky nevýznamné. U **biomasy 2** se projevilo snížení líhňivosti u vyšší koncentrace velmi rapidně (na hl. význ. $\alpha = 0,01$). U **biomasy 3** se projevilo snížení líhňivosti u vyšší koncentrace oproti nižší také na hladině významnosti $\alpha = 0,01$. Při provedení srovnání všech koncentrací **1A**, **2A**, **3A**, **1B**, **2B**, **3B** vůči sobě se od všech biomas krom **3B** významně odlišovala **biomasa 2B**. Dále se **biomasa 3B** projevila snížením líhňivosti oproti všem biomasám s nižší koncentrací (40 mg biomasy/l) tj. **1A**, **2A**, **3A**.

4.2.2. Délka embryonálního vývoje

Tab. 25. Popisné statistické údaje pro délku embryonálního vývoje (data jsou v D°)

Proměnná	Popisné statistiky (data D° z toxicity)									
	N platných	Průměr	Medián	Modus	Četnost modu	Minimum	Maximum	Spodní kvartil	Horní kvartil	Sm. odch.
Kontrola	39	219,9228	204,3687	202,0311	8	178,8627	301,0173	202,0311	251,6183	28,47059
1A	30	211,3501	203,0052	228,0691	10	152,2345	278,9849	177,6716	228,0691	35,99530
2A	38	251,7667	228,3594	228,3594	14	177,7130	502,4948	203,2539	253,3817	83,81219
3A	30	201,3457	202,9862	177,7130	8	177,5266	253,3817	177,7130	228,3594	23,87390
1B	26	231,4982	229,5415	229,5415	24	229,5415	254,9793	229,5415	229,5415	6,91263
2B	10	351,6207	344,2292	381,8352	3	280,4585	432,9094	331,3339	381,8352	44,39455
3B	14	354,3808	358,2047	Vícenás.	4	230,3088	408,9351	332,6214	408,9351	59,08829



Obr. 30: Grafické znázornění délky embryonálního vývoje všech testovaných biomas a kontrolní skupiny. Pozn.: Hodnoty označené * jsou významně rozdílné na hladině významnosti α - 0,05; hodnoty označené ** jsou významně rozdílné na hladině významnosti α - 0,01

U **kontrolní skupiny** průměrná délka embryonálního vývoje činila $220 \text{ D}^\circ \pm 28,5 \text{ D}^\circ$. Středních 50% hodnot se pohybovalo v rozsahu $202 - 252 \text{ D}^\circ$. Pro testovanou **biomasu 1A** činila průměrná délka vývoje $211 \text{ D}^\circ \pm 36 \text{ D}^\circ$. Středních 50% hodnot se pohybovalo v rozsahu $178 - 228 \text{ D}^\circ$. U **biomasy 2A** byla průměrná délka vývoje $252 \text{ D}^\circ \pm 84 \text{ D}^\circ$ a středních 50% hodnot se pohybovalo v rozsahu $203 - 253 \text{ D}^\circ$.

U **biomasy 3A** činila průměrná délka embryonálního vývoje $201 D^\circ \pm 24 D^\circ$ a středních 50% hodnot se nacházelo mezi hodnotami **178 – 228 D°**. U **biomasy 1B** byla průměrná délka vývoje $231 D^\circ \pm 7 D^\circ$. Jikry v tomto vzorku se líhly velmi synchronizovaně a 100% hodnot se nacházelo v rozmezí **230 – 255 D°**. U **biomasy 2B** byla průměrná délka vývoje $352 D^\circ \pm 44 D^\circ$ a středních 50% hodnot se nacházelo mezi **331 – 382 D°**. Pro testovanou **biomasu 3B** činila průměrná délka vývoje $354 D^\circ \pm 59 D^\circ$. Středních 50% hodnot se pohybovalo v rozsahu **333 – 409 D°**. Další podrobnější údaje jsou znázorněny v tabulce 25.

Statistické porovnání jednotlivých vzorků oproti kontrolní skupině ukázaly tyto výsledky: **Biomasa 1A** neprokázala rozdíl v délce inkubace jiker oproti kontrolní skupině (s pravděpodobností 73%). U **biomasy 2A** bylo potvrzeno prodloužení délky embryonálního vývoje oproti kontrolní skupině a to na hladině významnosti α - 0,05 (s 98,4% pravděpodobností). U **biomasy 3A** byla naopak potvrzena opačná hypotéza a to snížení délky vývoje oproti kontrole a to na hladině významnosti α - 0,01 (s pravděpodobností 99,7%). U biomas se zvýšenou koncentrací (**1B, 2B, 3B**) bylo prokázáno prodloužení doby embryonálního vývoje oproti kontrole na hladině významnosti α - 0,01 (s 99% pravděpodobností pro 1B, a 99,99% pravděpodobností pro 2B a 3B). Grafické znázornění je na obrázku 30.

4.2.3. Začátek a konec líhnutí

Tab. 26. Začátek a konec líhnutí u jednotlivých biomas a kontrolní skupiny

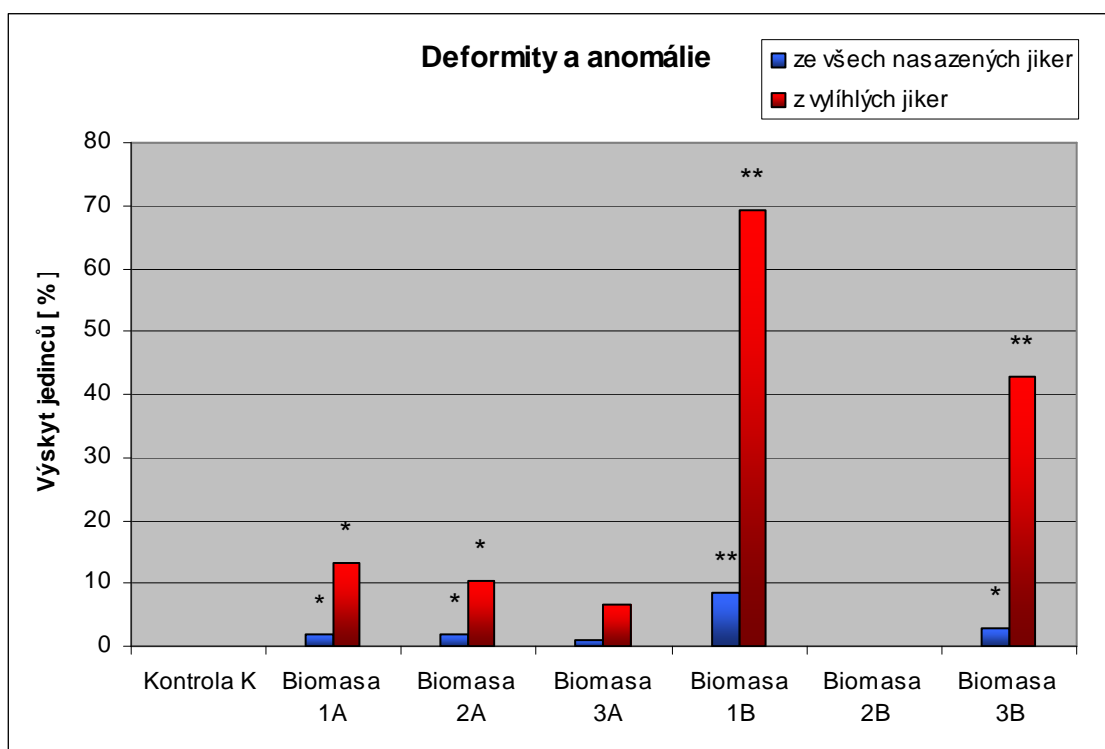
Vzorek	Začátek líhnutí D°/dny	Konec líhnutí D°/dny
Kontrola K	178,86 / 7	301 / 12
Biomasa 1A	152,2 / 6	279 / 11
Biomasa 2A	177,71 / 7	502,49 / 20
Biomasa 3A	177,52 / 7	253,38 / 10
Biomasa 1B	229,54 / 9	254,97 / 10
Biomasa 2B	280,45 / 11	432,90 / 17
Biomasa 3B	230,30 / 9	408,93 / 16

Z tabulky 26 je zřejmé, že jikry ve vzorku **1A** se začaly líhnout o něco dříve než kontrola. Stejně tak je patrné výrazné oddálení líhnutí u vzorků **1B, 2B** a **3B**. U **biomasy 2A** probíhala inkubace až 20 dní avšak pouze u ojedinělé jikry.

4.2.4. Deformity a anomálie

Tab. 27. Údaje o vylíhlých jikrách a procentu deformovaných jedinců u jednotlivých vzorků

Vzorek	Nasazené	Vylíhlé	Uhynulé	Deformované [ks]	Výskyt deformit [% z nasazených]	Výskyt deformit [% z vylíhlých]
Kontrola K	48	39	9	0	0	0
Biomasa 1A	48	30	18	4	1,92	13,33
Biomasa 2A	48	38	10	4	1,92	10,53
Biomasa 3A	48	30	18	2	0,96	6,67
Biomasa 1B	48	26	22	18	8,64	69,23
Biomasa 2B	48	10	38	0	0	0
Biomasa 3B	48	14	34	6	2,88	42,86



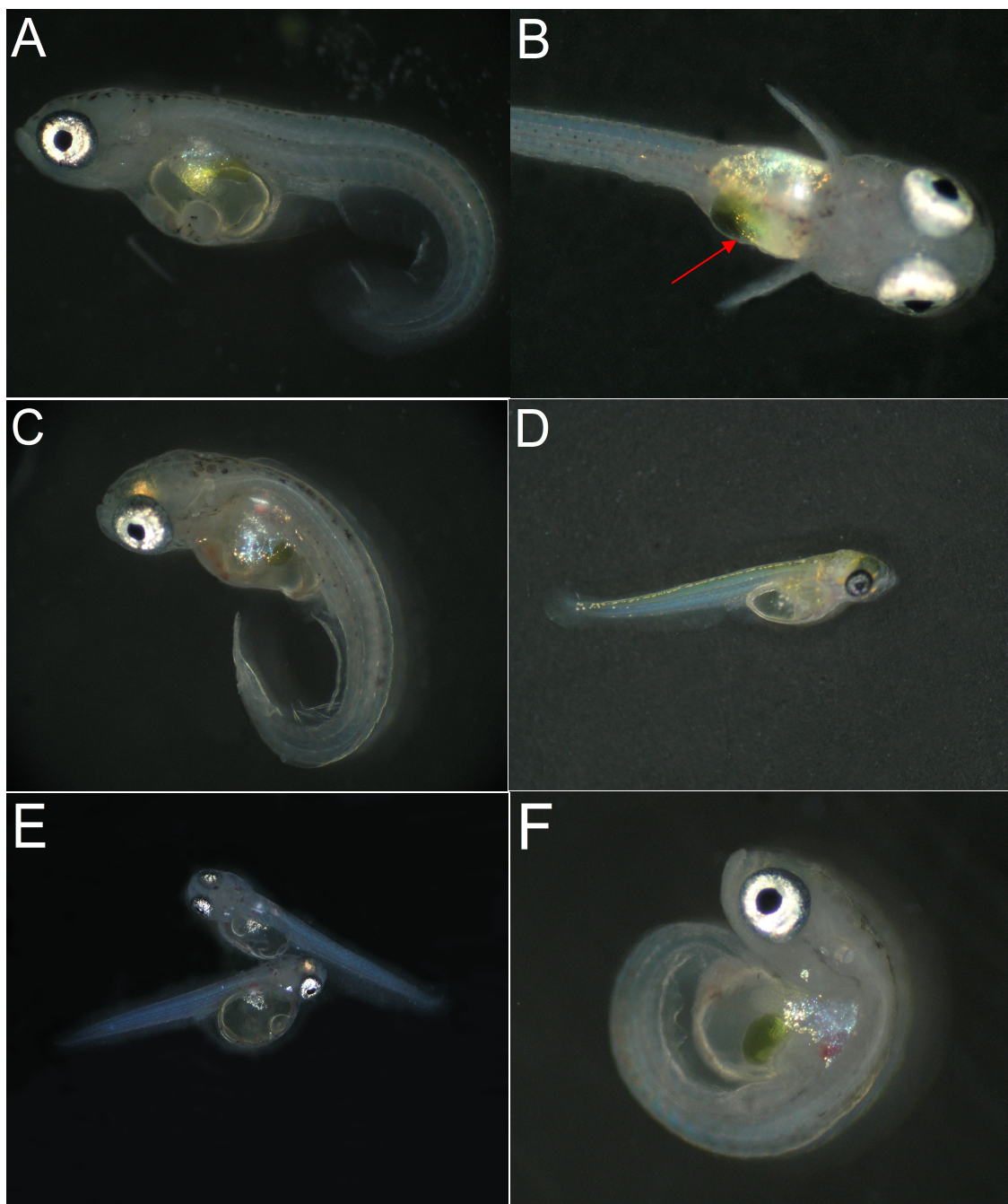
Obr. 31: Procentuelní výskyt deformovaných jedinců vztážený k počtu vylíhlých kusů, ale i k celkovému počtu nasazených jiker. Pozn.: Hodnoty označené * jsou významně rozdílné oproti kontrole na hladině významnosti $\alpha = 0,05$; hodnoty označené ** jsou významně rozdílné na hladině významnosti $\alpha = 0,01$

U **kontrolní** skupiny nebyl zaznamenán žádný výskyt deformit či jiných anomálií. V **biomase 1A** se vylíhlo 13,33% jedinců s některou anomálií. V **biomase 2A** se vylíhlo 10,53% jedinců s anomálií. V **biomase 3A** to bylo 6,67% anomálií vztážené k vylíhlým kusům. V **biomase 1B** byl patrný velký nárůst deformit a to u 69,23% vylíhlých kusů. V **biomase 2B** nebyl pozorován výskyt deformit či anomálií, nutno

však zmínit vysokou letalitu u této testované biomasy, která činila 79,1%. U **biomasy 3B** se vyskytly deformace či jiné anomálie u **42,86%** vylíhlých jedinců.

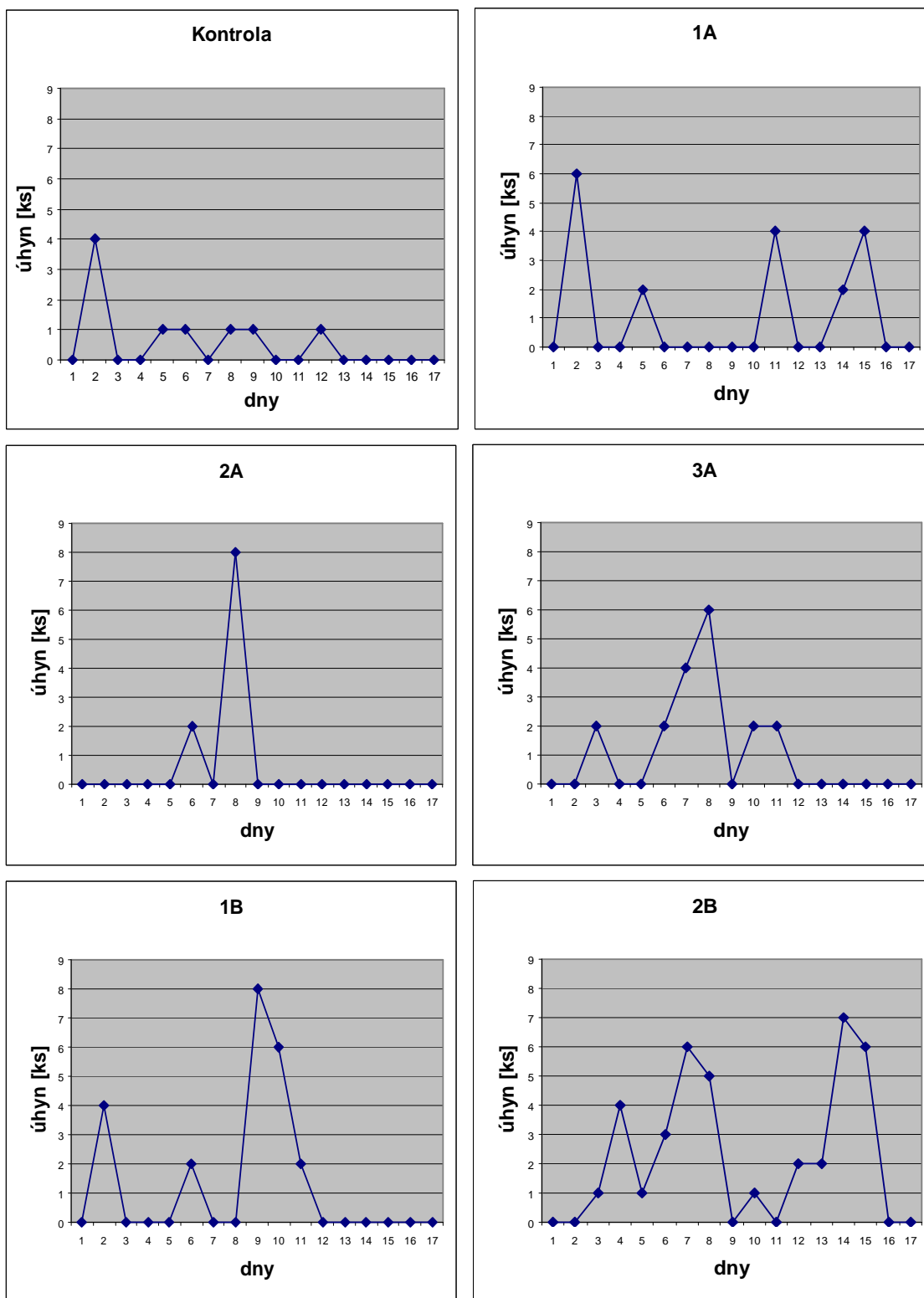
V porovnání s kontrolní skupinou byl potvrzen signifikantní nárůst procenta deformovaných jedinců u biomasy 1A a 2A na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. U biomasy 3A nebyl rozdíl signifikantní. Velmi významný nárůst výskytu deformit byl potvrzen u biomasy 1B a 3B ($\alpha = 0,01$). U biomasy 2B nebyl zaznamenán výskyt deformit či anomálie, viz obrázek 31.

U **biomasy 1A** byly zaznamenány: vodnatelnost žloutkového váčku, nenaplnění plynového měchýře, deformace páteře v ocasní oblasti. U **biomasy 2A** byly zaznamenány: zvětšení hepatopankreatu a žlučového měchýře, deformace páteře v oblasti ocasu a hřbetu. U **biomasy 3A**: nenaplnění plynového měchýře. Ve vzorku **biomasy 1B** se vyskytly deformace typu: vodnatelnost žloutkového váčku a z pozorování chování bylo u některých jedinců patrné spočívání dlouhou dobu na dně a nekoordinované plavání. V **biomase 3B** se objevili jedinci s nenaplněným vzduchovým měchýřem, zvětšeným hepatopankreatem a žlučovým měchýřem. Tyto deformity anomálie jsou vyfoceny na obrázku 32.

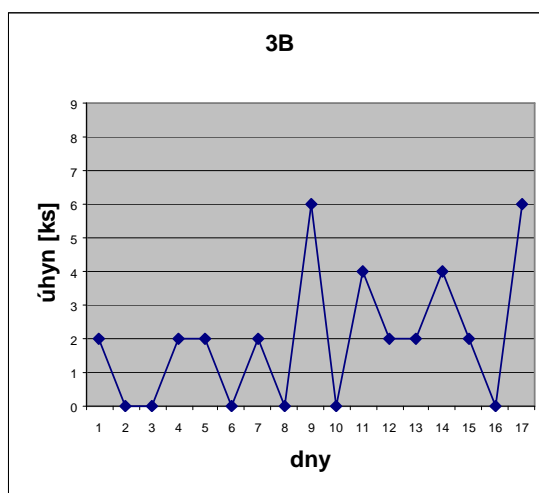


Obr. 32: Deformity: A – deformace ocasní páteře (2A) zvětšení: 4x3; B – zvětšený hepatopankreas a žluč. měch. (1A) zvětšení: 4x3; C – deformace páteře (3A) zvětšení: 4x3; D – jedinec bez naplněného plynového měchýře „skokan“ (1B) zvětšení: 4x1,2; E – vodnatelnost žloutk. vaku (3B) zvětšení: 4x1,2; F – deformace páteře a zvětšení žlučového měchýře (3B) zvětšení: 4x4;

4.2.5. Doba úhynu



Obr. 33: Znáznornění rozložení úhynu v průběhu inkubace v kusech (1.část) - pokračování obrázku na následující straně.



Obr. 33: Znázornění rozložení úhynu v průběhu inkubace v kusech. – dokončení

V případě úhynu jedinců z **kontrolní** skupiny byl nejčetnější úhyn jiker po dvou dnech vývoje embrya. Dále byly sledovány ojedinělé úhyny v průběhu celého líhnutí bez zjevných vychýlení. U **biomasy 1A** jikry uhynuly nejčastěji stejně jako v předešlém případě po dvou dnech inkubace avšak objevují se zde častější úhyny i v období okolo 11., 14. a 15. dne. U **biomasy 2A** nastal velmi evidentní bod úhynu v 8 dni vývoje embryí. U **biomasy 3A** byl zvětšený úhyn sledován také okolo 7 až 8 dne vývoje. Ve vzorcích obsahujících **biomasu 1B** byl zvýšený úhyn sledován okolo druhého dne, ale hlavně v období okolo 9 a 10 dne. **Biomasa 2B** se vyznačovala dvěma zvýšenými obdobími úhynu a to s vrcholy v 7 dni a 14 dni vývoje embryí. **Biomasa 3B** měla mortalitu rozloženou víceméně do celého období vývoje, mírně větší byla v celé druhé polovině inkubace a na jejím konci, kdy mělo dojít k líhnutí larev. Rozložení úhynu je patrné z obrázku 33.

4.2.6. Sledování přežití larev do stádia přechodu na vnější výživu

Sledování ryb do přechodu na vnější výživu bylo prováděno již v ISO vodě a to po dobu 5-ti dnů od vylíhnutí (viz příloha 6B). Jako neživotaschopné se projeví larvy mající jakékoli deformace těla nebo páteře, které hynuly okolo třetího až čtvrtého dne po vylíhnutí (1A a 2A). Dále nepřežily do přechodu na vnější výživu dva jedinci z biomasy 2B se zvětšeným hepatopankreatem. Ostatní jedinci ze všech testovaných skupin přežili do pátého dne po vylíhnutí a začali přijímat potravu.

5. DISKUSE

Pro porovnání výsledků první části práce zaměřené na zjištění líhnivosti a délky embryonálního vývoje v závislosti na počtu jiker vložených do testovacího objemu nebyly nalezeny shodné ani podobné studie porovnávající vzájemné ovlivnění líhnoucích se jiker ryby *Oryzias latipes*.

Pokud jsou jikry inkubovány za přirozených podmínek výsledky naznačují, že jejich rozdílný počet v uzavřeném objemu kultivačního média ovlivňuje úspěšnost líhnutí embryí. V případě objemu 10 ml pro líhnutí medak se ukázalo jako nejlepší variantou použití **čtyř nasazených jiker**. V případě menšího počtu jiker byla úspěšnost prokazatelně menší. To podporuje teorii o vzájemném ovlivnění líhnoucích se jiker enzymem líhnutí uvolňovaném z líhnoucích se embryí (Vítek a Kadlec, 2001). V případě jiker nasazených pouze po jedné se tato skutečnost potvrdila velmi zjevně, mnoho embryí se dostalo až do posledních stádií vývoje, ale nemohly se vykultit a poté uhynuly. U většího počtu jiker nežli čtyři se také projevilo snížení líhnivosti. To mohlo být způsobeno snížením obsahu kyslíku pod únosnou mez vlivem většího počtu embryí, vyčerpáním důležitých iontů z kultivačního média, ale i větším rizikem napadení jiker parazitickými nebo saprofytickými mykózami. Délka embryonálního vývoje byla velmi variabilní a nevykazuje k počtu jiker žádný zjevný trend, ačkoliv při šesti jikrách byla nejspíše vlivem větší synchronizace kulení oproti všem vzorkům kratší. Vysokou rozrůzněnost délky vývoje bez významnějšího vztahu k teplotě potvrzuje například Adámek (1999).

Pro srovnání výsledků z pokusů hodnotících vliv škodlivých účinků metabolitů sinic provedených na jikrách medaky již byly nalezeny alespoň z části podobné studie.

Potencionálně nejméně toxická (3,2 µg MC/l) biomasa „2“ (*M. aeruginosa* 41%, *Woronichinia naegaliana* 41%) v případě použití nižší koncentrace (40 mg/l) komplexní biomasy neměla dopad na líhnivost jiker. V případě potencionálně toxickejších biomas „1“ (23,6 µg MC/l) a „3“ (66,8 µg MC/l) nastalo mírné snížení líhnivosti. Při použití větších koncentrací komplexních biomas (200 mg/l) nastává u všech tří biomas k výraznému snížení líhnivosti jiker, což je vcelku očekávaný výsledek. Zajímavé je však zjištění poklesu napříč všemi testovanými biomasami pokud výsledky porovnáme s údaji zjištěnými při použití nižší koncentrace. Použití větších koncentrací již nevykázalo očekávané poklesy v závislosti na obsahu microcystinů.

Největší snížení se nečekaně projevilo u potencionálně nejméně toxické biomasy „2“ (16,18 µg MC/l). U biomasy „1“ s víceméně středním obsahem microcystinů (118 µg MC/l) klesla líhnivost jen nepatrně v porovnání s použitím nižší koncentrace biomasy. U potencionálně nejtoxičtější (334,02 µg MC/l) biomasy „3“ byl pokles líhnivosti velmi markantní.

Tyto výsledky napovídají, že líhnivost je ovlivněna přítomností microcystinů a v případě nižších dávek biomasy (40 mg/l) odpovídají výsledky údajům z literatury. Pokusy provedené Jacquetem *et al.* (2004) na injektovaných embryích *Oryzias latipes* microcystinem –LR prokázaly závislost přežití embryí na velikosti dávky microcystinu –LR. Zvýšenou kumulativní mortalitu u embryí Kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) v závislosti na obsahu microcystinů (LR, YR, RR) v hrubém extraktu izolovaných ze sinic (*Microcystis aeruginosa*, *M. ichtyoblade* a *Aphanizomenon flos-aquae*) zjistili i Palíková *et al.* (2003).

Dále biomasa „1“ a „3“, které obsahovaly téměř totožný obsah microcystinu –LR vykazaly při použití menší koncentrace komplexní biomasy stejné výsledky. To by nasvědčovalo jen slabému dopadu působení microcystinu –RR na výslednou líhnivost jiker. Otázkou je, proč bylo dosaženo tak negativního výsledku u biomasy „2“ při použití větší koncentrace komplexní biomasy, která ve srovnání s biomasou „1“ a „3“ měla nejmenší obsah microcystinů. Nabízí se odpověď, že při takto zvýšené koncentraci komplexní biomasy zřejmě vystupují do popředí individuální účinky lipopolysacharidů konkrétních druhů sinic. V našem případě tedy znatelně větší dopad sinic *M. aeruginosa* a *Woronichinia naegaliana*, kterých bylo v tomto vzorku procentuelně shodně a dohromady tvořily 100%. To by napovídalo i lepšímu výsledku u biomasy „1“, kde tyto dva druhy zaujímaly 25 a 15% tedy 40% z celku a v případě biomasy „3“ činil tento poměr 75% z celkového obsahu sinic. Je ale taktéž možné, že sinice těchto druhů *M. aeruginosa* a *Woronichinia naegaliana* nebo jedna z nich obsahovaly další neidentifikované toxiny či jiné biologicky aktivní látky.

Z monitorování účinků biomas na délku embryonálního vývoje vyplynulo jednoznačné prodloužení u vyšších koncentrací komplexních biomas, tedy i toxinů. Takovéto oddálení líhnutí potvrzuje u vyšší koncentrace (50 µg MC -LR/l) i Palíková *et al.* (2003). Naopak zkrácení inkubační doby u větších dávek microcystinů potvrzují autoři Lecoz *et al.* (2008) a Jacquet *et al.* (2004), kteří ovšem testovali v prvním

z příkladů hrubý extrakt sinic a v druhém případě čistý microcystin –LR metodou injektace toxinu přímo do žloutkového vaku medak.

V případě použití nižších koncentrací biomas s obsahy microcystinů – LR ve vzorcích od 3,2 do 14,8 $\mu\text{g/l}$ nebyl vyzorován zjevný trend. S délkou embryonálního vývoje úzce souvisí i začátek a konec líhnutí. Ty byly v případě větších koncentrací biomas (200 mg/l) pozdější a v pozdních stádiích vývoje docházelo k většímu procentu úhynu.

Procentuální nárůst deformovaných či anomálních larev byl zaznamenán taktéž spolu s nárůstem koncentrace komplexní biomasy. Ovšem u biomasy „2“ (*M. aeruginosa* a *Woronichinia naegaliana*, MC –LR = 16,8 $\mu\text{g/l}$) byla pozorována vysoká absolutní mortalita a nulové procento deformit u vylíhlých larev (n=10). To nasvědčuje tomu, že microcystiny nebyly hlavní příčinou úhynu embryí v této biomase, jak již bylo zmíněno dříve v souvislosti s líhivostí.

Z pozorovaných deformit byly zaznamenány vodnatelnost žloutkového vaku, nenaplnění plynového měchýře, zvětšení hepatopankreatu a žlučového měchýře, deformace páteře v oblasti ocasu a hřbetu. Z pozorování chování bylo u některých jedinců patrné spočívání dlouhou dobu na dně a nekoordinované plavání. Velmi významný nárůst těchto deformit byl zaznamenán u biomasy „1“ (*Woronichinia naegaliana* 15%, *Microcystis flos-aquae* 45%, *M. aeruginosa* 25%, *Anabaena sigmaidea* 15%) při koncentraci komplexní biomasy 200 mg/l (MC –LR = 74,2 $\mu\text{g/l}$, -YR = 11,8 $\mu\text{g/l}$, -RR = 32,02 $\mu\text{g/l}$) a u biomasy „3“ (*M. aeruginosa* 75%, *Aphanisomenon flos-aquae* 25%) taktéž při koncentraci komplexní biomasy 200 mg/l (MC –LR = 74,06 $\mu\text{g/l}$, -YR = 16,32 $\mu\text{g/l}$, -RR = 243,66 $\mu\text{g/l}$). Nálezy byly shodné s udávanými dopady microcystinu –LR na embrya medak zjištěné Huynh-Delermem *et al.* (2005). Taktéž Palíková *et al.* (2003) udává stejné nálezy na embryích kapra obecného po expozici microcystiny.

Jedním z vytčených dílčích cílů této práce bylo vypracovat návrh optimálního metodického postupu screeningového testu na embryonálních stádiích ryby *Oryzias latipes*. Na základě provedených pokusů se zjištěné informace aplikovaly v dalších krocích při testování sinicových biomas. Výhodnost testování právě na jikrách japonské medaky spočívá hlavně v možnosti získání jiker prakticky v kterémkoliv ročním období pomocí řízené fotoperiody. Další výhody jsou zajisté i malá náročnost chovu, vysoká citlivost a propracovanost biologických a anatomických charakteristik a pro potřeby

embryotoxikologie velmi transparentní jikerné obaly, které velmi usnadňují pozorování orgánů v průběhu testů. Určitou nevýhodou může být v případě potřeby velkých množství jiker najednou jejich nedostatek. Řešením je v takovém případě chov dostatečně velkého generačního hejna.

Druhým z vytčených cílů této práce bylo vyhodnocení potencionálních nebezpečí třech vzorků biomas sinicových vodních květů odebraných z volných vod. Z prezentovaných výsledků je patrné, že vodní květy sinic, které nevykazují toxicitu nebo obsahují jen nepatrné množství toxinů, neznamenají pro embrya ryb takové nebezpečí jako vodní květy obsahující velká množství microcystinů. U těch se negativní dopad potvrdil bez výjimky. Ovšem zásadním zjištěním je fakt, že i netoxické nebo málo toxické druhy (morfodruhy) rodu *Microcystis* a *Woronichinia* při vysokých koncentracích biomasy na litr mají velmi negativní dopad na líhivost jiker. Tento případ vysoké koncentrace může běžně nastat při přemnožení sinic, které mohou být v přímém kontaktu s vytřenými jikrami ryb zejména v litorálních zónách volných vod. Rod *Microcystis* je dnes jedním z nejfrekventovanějších zástupců sinic ve vodním květu v České republice (Šejnohová a Maršálek, 2006).

Vodní květy sinic se vyskytují v českých nádržích závisle na mnoha faktorech, které byly stručně nastíněny v literárním přehledu této práce. Je však jisté, že tento problém postihuje mnoho nádrží s využitím jak rybochovným tak rekreačním či jako zdroj pitné vody pro zásobení obyvatel. V České republice je opakovaně postihováno až 80% nádrží masovým rozvojem sinic a přibližně v 80% z nich je možno detekovat microcystiny. Ty mohou v mezních situacích dosáhnout hodnot okolo 4450 $\mu\text{g/g}$ sušiny biomasy (Maršálek *et al.*, 2001; Maršálek, 2001). Je tedy zřejmé, že ke kontaktu rybích embryí a vodních květů tvořených sinicemi může docházet velmi často a je pravděpodobné, že dochází k negativnímu ovlivnění nových populací líhnoucích se ryb.

Pokusy v této práci byly provedeny na zástupci ryb – japonské medace (*Oryzias latipes*) a podobné dopady na rybí embrya lze očekávat i u našich ryb vyskytujících se v ČR. V České republice se úroveň uvolněného microcystinu pohybuje v nádržích sloužících jako zdroje pitné vody od 0 do 45 $\mu\text{g/l}$, v rekreačních nádržích od 0 do 180 $\mu\text{g/l}$ a v nádržích sloužících k chovu ryb dokonce okolo 225 $\mu\text{g/l}$ (Bláha a Maršálek, 2001). Je nutno podotknout, že v moderní rybářské technologii se generační ryby nenechávají v hlavních rybnících, kterých se převážně tento problém týká, vytřít a výtěr s inkubací jsou vykonávány v rybích líhních.

Proto pro účely rybochovných zařízení (líhni, akvakultur, akvariálních líhni) nelze doporučit čerpání vody z nádrží s masovým rozvojem sinicového vodního květu pro inkubaci jiker a raději využít záložní zdroj vody, tím spíše je-li biomasa již v určitém stádiu rozpadu. Jiná úprava zasažené vody by kromě filtrace v tomto případě byla dosti ekonomicky náročná (ozonizace, UV zařízení, aktivní uhlí). Jedním z řešení je také provedení právě screeningového embryotoxikologického testu k určení toxického potenciálu dané biomasy.

Z pohledu ochrany volně žijících populací ryb a tedy řešení problému výskytu přemnožení sinic v nádržích je situace mnohonásobně složitější a je možno říci, že každá nádrž má své originální řešení, které nemusí pomoci při aplikaci na jinou nádrž. Metod jak odstranit převážně nadlimitní zdroje živin (N, P) je vícero. Společné všem nádržím však zůstává řešení problému od prvopočátku, tedy ochrana celého povodí, recipientu až po samotnou nádrž. Všechny ostatní lokální řešení ve většině případů znamenají pouze krátkodobé zlepšení situace.

6. ZÁVĚR

Z pokusů zjišťujících zda počet jiker ovlivní jejich úspěšnost líhnutí vyplynulo kladné stanovisko. Použití čtyř jiker v testovací komoře mělo oproti menším a větším počtům jiker lepší líhnivost. Délka embryonálního vývoje však k počtu jiker nevykazovala jednoznačné trendy. Mírně kratší byla u většího počtu jiker pospolu. Při použití čtyř jiker byla nejdelší.

Ze screeningového testování účinků sinicových biomas na jikrách japonské medaky zaměřené na zjištění dopadu na líhnivost, délku embryonálního vývoje a vznik deformit a anomálií byly získány tyto výsledky:

Potencionálně méně toxická biomasa v případě použití nižší koncentrace komplexní biomasy (40 mg/l) neměla dopad na líhnivost jiker. V případě potencionálně toxičtějších biomas o stejné koncentraci komplexní biomasy (40 mg/l) nastalo mírné snížení líhnivosti. Při použití větších koncentrací komplexních biomas (200 mg/l) nastává u všech použitých biomas k výraznému snížení líhnivosti.

Použití větších koncentrací biomas (200 mg/l) nevykázalo očekávané poklesy líhnivosti v závislosti na obsahu microcystinů. Největšího snížení bylo dosaženo u potencionálně nejméně toxické biomasy (z hlediska obsahu microcystinů LR, YR, RR), avšak u biomas s vyšší toxicitou bylo snížení taktéž prokazatelné.

Z monitorování účinků biomas na délku embryonálního vývoje vyplynulo jednoznačné prodloužení doby inkubace při použití vyšších koncentrací komplexních biomas, tedy i toxinů. V případě vyšších koncentrací biomas (200 mg/l) byl pozorován pozdější začátek líhnutí a v pozdních stádiích vývoje docházelo k většímu procentu úhynu.

Procentuelní nárůst deformovaných či anomálních larev byl zaznamenán spolu s nárůstem koncentrace komplexní biomasy. U biomasy s nízkou toxicitou při koncentraci sušiny biomasy 200 mg/l byla pozorována vysoká absolutní mortalita a nulové procento deformit.

Z pozorovaných deformit byly zaznamenány vodnatelnost žloutkového váčku, nenaplnění plynového měchýře, zvětšení hepatopankreatu a žlučového měchýře, deformace páteře v oblasti ocasu a hřbetu.

7. LITERATURA

- ADÁMEK, Z., 1999. Biologie halančíka *Oryzias latipes* a metodika jeho chovu pro toxikologické testy. In: Dočkal, P., Maszjarová, E., (Eds.), Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí. JCU VURH, Soláň, pp. 77-82.
- ANONYM, 2003. Laboratory of Phytoplankton Ecology. URL: < http://www.fytoplankton.cz/fytofoto.php?fyto_foto=0159 > [cit. 2007-12-20].
- ANONYM, 2004. Laboratory of Phytoplankton Ecology. URL: < http://www.fytoplankton.cz/fytofoto.php?fyto_foto=0162 > [cit. 2007-12-20].
- ANONYM, 2007. Cyanobacterial Toxins. URL: < <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/cyanotox/toxins.html> > [cit. 2007-8-10].
- BALL, J. N., 1981. Hypothalamic control of the pars distalis in fishes, amphibians, and reptiles. *General and comparative endocrinology*, **44**, 135-170.
- BERNARDOVÁ, K., BABICA, P., MARŠÁLEK, B., BLÁHA, L., 2007. Isolation and endotoxin activities of lipopolysaccharides from cyanobacterial cultures and complex water blooms and comparison with the effects of heterotrophic bacteria and green alga. *Journal of Applied Toxicology*, **28**, 72-77.
- BEST, J. H., PFLUGMACHER, S., WIEGAND, C., EDDY, F. B., METCALF, J. S., CODD, G. A., 2002. Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, **60**, 223-231.
- BLÁHA, L., MARŠÁLEK, B., 2001. Dissolved microcystins in Raw and treated drinking water in the Czech Republic. In: Chorus, I., (Ed.), *Cyanobacterial Toxins*. Springer Verlag, Berlin, pp. 212-217.
- BLÁHA, L., MARŠÁLEK, B., BABICA, P., 2004. Mechanismy toxicity cyanotoxinů a jejich vliv na zdraví obyvatel a vodní ekosystémy. In: Maršálek, B., Halousková, O., (Eds.), *Cyanobakterie*. Ekomonitor, Brno, pp. 44-50.
- CARMICHAEL, W. W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, **72**, 445-459.
- COSTA, J. E. M., 1998. Phylogeny and classification of *Rivulidae* revisited: Origin and evolution of annualism and miniaturization in rivulid fishes (*Cyprinodontiformes: Aplocheiloidea*). *Journal of Computational Biology*, **3**, 33-92.

- ČSN EN ISO 7346-2, 1999. Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae*)] - Část 2: Obnovovací metoda. Český normalizační institut, Praha, 16 s.
- DIMICHELE, L., TAYLOR, M. H., 1980. The environmental-control of hatching in *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Experimental Zoology*, **214**, 181-187.
- DIMICHELE, L., TAYLOR, M. H., 1981. The mechanism of hatching in *Fundulus heteroclitus*: Development and physiology. *Journal of Experimental Zoology*, **217**, 73-79.
- EGAMI, N., 1959. Record of the number of eggs obtained from a single pair of *Oryzias latipes* kept in laboratory aquaria. *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo, Sect. IV.*, **8**, 521-538.
- EGAMI, N., 1975. Secondary Sexual Characters. In: Yamamoto, T., (Ed.), MEDAKA (killifish) : Biology and Strains. Keigaku Pub. Co., Tokyo, pp. 109-125.
- ELLEMAN, T. C., FALCONER, I. R., JACKSON, A. R., RUNNEGAR, M. T., 1978. Isolation, characterization and pathology of the toxin from a *Microcystis aeruginosa* (= *Anacystis cyanea*) bloom. *Australian Journal of Biological Sciences*, **31**, 209-218.
- ESCHMEYER, W. N., 2004. ITIS Standard Report Page: *Oryzias latipes*. URL: < <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt> > [cit. 2008-01-05].
- FOTT, B., 1967. Sinice a řasy. Academia, Praha, 520 s.
- FRANK, A. A., BLYTHE, L. L., SPENCER, P. S., 2000. Aspects of veterinary neurotoxicology. In: Spencer, P. S., Schaumburg, H. H., (Eds.), *Experimental and clinical neurotoxicology*. Oxford University Press, New York, pp. 83-105.
- GENTILE, J. H., MALONEY, T. E., 1969. Toxicity and environmental requirements of a strain of *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs. *Canadian Journal of Microbiology*, **15**, 165-173.
- GONZÁLEZ-DONCEL, M., OKIHIRO, M. S., VILLALOBOS, S. A., HINTON, D. E., TARAZONA, J. V., 2005. A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (*Teleostei, Adrianichthyidae*). *Journal of Applied Ichthyology*, **21**, 39-52.
- HEJZLAR, J., NEDOMA, J., KOPÁČEK, J., 1994. Formy fosforu v procesu eutrofizace údolních nádrží. In: Sládeček, V., (Ed.), *Sborník 10. semináře Aktuální otázky vodárenské biologie, ČVTVS MŽP ČR*, Praha, pp. 29 – 35.

- HEJZLAR, J., ŽALOUĐÍK, J., ROHLÍK, V., 2001. Koncentrace živin (N, P) v tocích v povodí nádrže Lipno a jejich závislost na struktuře krajinného krytu. In: Mánek, J., (Ed.), Sborník z konference Aktuality šumavského výzkumu, Správa NP a CHKO Šumava, Srní, pp. 82 – 86.
- HUBER, J. H., 2000: Killi – Data 2000. Liste actualisée des noms taxonomique, des localités de pêche et des références bibliographiques des poissons Cyprinodontes ovipares (*Atherinomorpha*, *Pisces*). Société Francaise d'Ichtyologie, Paris, p. 538.
- HUYNH-DELERME, C., EDERY, M., HUET, H., PUISEUX-DAO, S., BERNARD, C., FONTAINE, J. J., CRESPEAU, F., DE LUZE, A., 2005. Microcystin-LR and embryolarval development of medaka fish, *Oryzias latipes*. I. Effects on the digestive tract and associated systems. *Toxicon*, **46**, 16-23.
- CHONG, M. W. K., WONG, B. S. F., LAM, P. K. S., SHAW, G. R., SEAWRIGHT, A. A., 2002. Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophyrotomin in primary rat hepatocytes. *Toxicon*, **40**, 205-211.
- INOHAYA, K., YASUMASU, S., ISHIMARU, M., OHYAMA, A., IUCHI, I., YAMAGAMI, K., 1995. Temporal and Spatial Patterns of Gene Expression for the Hatching Enzyme in the Teleost Embryo, *Oryzias latipes*. *Developmental Biology*, **171**, 374-385.
- ISHIDA, J., 1944. Hatching Enzyme in the Fresh-water Fish, *Oryzias latipes*. *Annotationes zoologicae Japonenses*, **22**, 137-154.
- JACQUET, C., THERMES, V., DE LUZE, A., PUISEUX-DAO, S., BERNARD, C., JOLY, J. S., BOURRAT, F., EDERY, M., 2004. Effects of microcystin-LR on development of medaka fish embryos (*Oryzias latipes*). *Toxicon*, **43**, 141-147.
- KAŠTOVSKÝ, J., HAUER, T., LUKAVSKÝ, J., 2003. Oddělení Cyanobacteria - sinice: Sinice a řasy.cz. URL: < <http://www.sinicearasy.cz/pokr/sinice> > [cit. 2008-1-29].
- KAŠTOVSKÝ, J., 2007a. Sinice a řasy. cz – galerie. URL: < <http://galerie.sinicearasy.cz/v/Cyanobacteria/Chroococcales/Microcystis/Microcystis+flos-aque+Krajina.jpg.html> > [cit. 2007-12-20].
- KAŠTOVSKÝ, J., 2007b. Sinice a řasy. cz – galerie. URL: < http://galerie.sinicearasy.cz/v/Cyanobacteria/Chroococcales/Woronichinia/Woronichinia_naegeliana1.jpg.html > [cit. 2007-12-20].

- KAY, R. O., 1991. Microalgae as food and supplement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **30**, 555-573.
- KELETI, G., SYKORA, J. L., 1982. Production and properties of cyanobacterial endotoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, **43**, 104-109.
- KELETI, G., SYKORA, J. L., LIPPY, E. C., SHAPIRO, M. A., 1979. Composition and biological properties of lipopolysaccharides isolated from *Schizothrix calcicola* (Ag.) Gomont (cyanobacteria). *Applied and Environmental Microbiology*, **38**, 471-477.
- KIRCHEN, R. V., WEST, W. R., 1969. The Japanese medaka. Care and development. Manuscript, Carolina Biological Supply Co., Minneapolis, p. 497.
- KOČÍ, V., BURKHARD, J., MARŠÁLEK, B., 2000. Eutrofizace na přelomu tisíciletí. In: Kočí, V., (Ed.) Eutrofizace 2000. VŠCHT - fakulta technologie ochrany prostředí, Praha, pp. 3-13.
- KOMÁREK, J., 1996. Klíč k určování vodních květů sinic v České republice. In: Maršálek, B., Keršner, V., Marvan, P., (Eds.), Vodní květy sinic. *Nadatio Flos Aquae*, Brno, pp. 22-85.
- KRMENČÍK, P., KYSILKA, J., 2001. Jedy sinic (cyanotoxiny). URL: < <http://www.biotox.cz/toxikon/sinice/index.php> > [cit. 2007-8-5].
- LAZARA, K. J., 2000. The killifishes: an annotated checklist, synonymy, and bibliography of Recent oviparous cyprinodontiform fishes. *Journal of the American Killifish Association*, **4**, 315-495.
- LECOZ, N., MALECOT, M., QUIBLIER, C., PUISEUX-DAO, S., BERNARD, C., CRESPEAU, F., EDERY, M., 2008. Effects of cyanobacterial crude extracts from *Planktothrix agardhii* on embryo-larval development of medaka fish, *Oryzias latipes*. *Toxicon*, **51**, 262-269.
- MARŠÁLEK, B., 2001. Toxiny sinic a současná realita v ČR. *Sovak*, **10**, 1-3.
- MARŠÁLEK, B., 2002. Sinice jako producenti biologicky aktivních látek. *Živa*, **5**, 198-200.
- MARŠÁLEK, B., 2004. Místo úvodu - Sinice či Cyanobakterie? In: Maršálek, B., Halousková, O., (Eds.), Cyanobakterie – biologie, toxikologie a možnosti nápravných opatření. *Sdružení Flos Aquae*, Brno, pp. 5-7.
- MARŠÁLEK, B., 2004. Rozdělení cyanotoxinů – legislativa. In: Maršálek, B., Halousková, O. (Eds.), Cyanobakterie. *Ekomonitor*, Brno, pp. 41-43.

- MARŠÁLEK, B., BLÁHA, L., TURÁNEK, J., NECA, J., 2001. Microcystin LR and total microcystins in cyanobacterial blooms in the Czech republic during 1993-1998. In: Chorus, I., (Ed.), Cyanobacterial Toxins. Springer Verlag, Berlin, pp. 56-62.
- MARŠÁLEK, B., KERŠNER, V., MARVAN, P., 1996. Vodní květy sinic. Nadatio Flos-Aquae, Brno, 142 s.
- MARŠÁLEK, B., TURÁNEK, J., 1996. Biologicky aktivní látky produkované sinicemi vodního květu. In: Maršálek, B., Keršner, V., Marvan, P., (Eds.), Vodní květy sinic. Nadatio flos-aquae, Brno, pp. 86-95.
- MARŠÁLKOVÁ, E., MARŠÁLEK, B., 2006. Technologie pro odstraňování cyanotoxinů ve vodárenských procesech. In: Maršálek, B., Feldmannová, M., Maršálková, E., (Eds.), Cyanobakterie 2006. BÚ AV ČR, Brno, pp. 105-108.
- MARVAN, P., MARŠÁLEK, B., 1996. Ekologické souvislosti rozvoje vodních květů sinic. In: Maršálek, B., Keršner, V., Marvan, P., (Eds.), Vodní květy sinic. Nadatio flos-aquae, Brno, pp. 9-19.
- MIKHEYSKAYA, L. V., OVODOVA, R. G., OVODOV, Y. S., 1977. Isolation and characterization of lipopolysaccharides from cell walls of bluegreen algae of the genus *Phormidium*. Journal of Bacteriology, **130**, 1-3.
- NARUSE, K., 1996. Classification and phylogeny of fishes of the genus *Oryzias latipes* and its relatives. The fish biology journal Medaka, Special issue: Development of Medaka biology in Japan – Part 1., **8**, 1-9.
- OECD 212, 1998. OECD Guideline for Testing of Chemicals – Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages, p. 20.
- OSHIMA, M., 1919. Contributions to the study of the fresh water fishes of the island of Formosa. Annals Carnegie Mus., **12**, 169-328.
- PALÍKOVÁ, M., NAVRÁTIL, S., MARŠÁLEK, B., BLÁHA, L., 2003. Toxicity of Crude Extract of Cyanobacteria for Embryos and Larvae of Carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Veterinaria Brno, **72**, 437-443.
- PICHARDO, S., JOS, A., ZURITA, J. L., SALGUERO, M., CAMEAN, A. M., REPETTO, G., 2005. The use of the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1 to compare the toxic effects produced by microcystins LR and RR. Toxicology in Vitro, **19**, 865-873.
- PITTER, P., 1990. Hydrochemie. SNTL, Praha, 565 s.
- PŘIKRYL, I., 1998. Ekologická hydrobiologie. In: Hartman, P., Přikryl, I., Štědranský, E., (Eds.), Hydrobiologie. Informatorium, Praha, pp. 189-225.

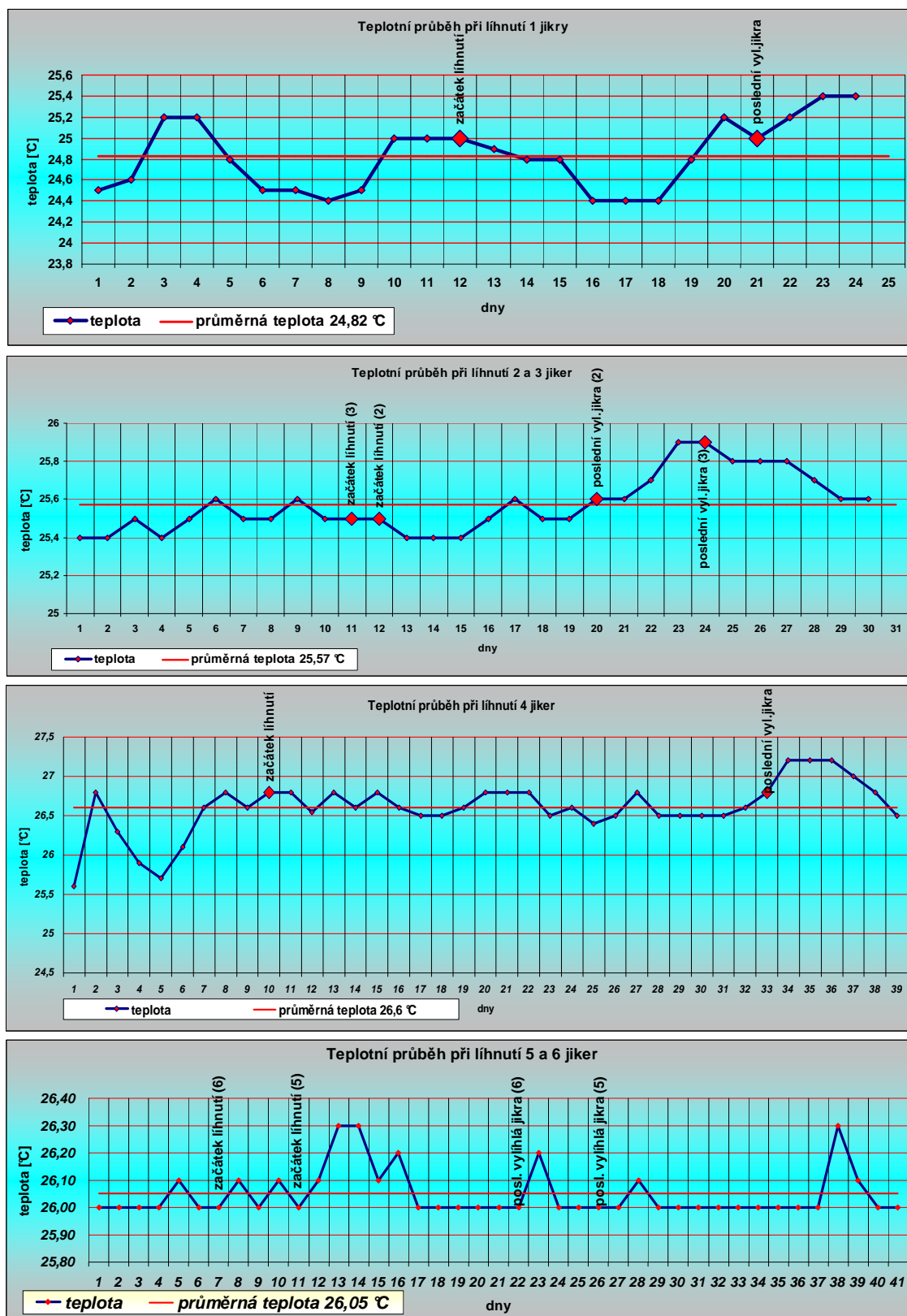
- RAZIUDDIN, S., SIEGELMAN, H. W., TORNABENE, T. G., 1983. Lipopolysaccharides of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. European Journal of Biochemistry, **137**, 333-336.
- RUGH, W. A., 1962. Experimental embryology (techniques and procedures). Burgess Publishing Company. Minneapolis, p. 497.
- SCHOOTS, A. F. M., DEBONT, R. G., VAN EYS, G. J. J. M., DENUC, J. M., 1982. Evidence for a stimulating effect of prolactin on teleostean hatching enzyme secretion. Journal of Experimental Zoology, **219**, 129-132.
- SCHOOTS, A. F. M., EVERTSE P. A. C., DENUC, J. M., 1983. Ultrastructural changes in hatching-gland cells of pike embryos (*Esox lucius* L.) and evidence for their degeneration by apoptosis. Cell and Tissue Research, **229**, 573-589.
- SIVONEN, K., 1996. Cyanobacteria toxins and toxin production. Phycologia, **35**, 12-24.
- SIVONEN, K., JONES, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J., (Eds.), Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring, and management. E & FN Spoon, London, pp. 41-111.
- STEWART, I., SCHLUTER, P. J., SHAW, G. R., 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health – a review. Environmental Health: A Global Access Science Source, **5**:7.
- ŠAFARČÍKOVÁ, S., PEŠATA, M., 2006. Zvýšená hladina živin. In: Hrázský, Z., Šafarčíková, S., (Eds.), Živiny v krajině. Daphne ČR, České Budějovice, 16 s.
- ŠEJNOHOVÁ, L., MARŠÁLEK, B., 2006. *Microcystis* – Dominující rod vodních květů: Nové poznatky v autekologii. In: Maršálek, B., Feldmannová, M., Maršálková, E., (Eds.), Cyanobakterie 2006. Botanický ústav AV ČR, Brno, pp. 7-12.
- ŠTĚPÁNEK, M., ČERVENKA, R., 1974. Problémy eutrofizace v praxi. Avicenum, Praha, 232 s.
- TEMMINCK, C. J., SCHLEGEL H., 1846. Pisces. In: Siebold, P. F., (Ed.), Siebold's Fauna Japonica. Lunduni Batavorum, Leiden, pp. 224-225.
- TORNABENE, T. G., BOURNE, T. F., RAZIUDDIN, S., BEN-AMOTZ, A., 1985. Lipid and lipopolysaccharide constituents of cyanobacterium *Spirulina platensis* (Cyanophyceae, Nostocales). Marine ecology progress series, **22**, 121-125.
- VÍTEK, J., KADLEC, J., 2001. Halančíci. Svět křídel, Cheb, 303 s.
- WEISE, G., DREWS, G., JANN, B., JANN, K., 1970. Identification and analysis of a lipopolysaccharide in cell walls of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. Archiv für Mikrobiologie, **71**, 89-98.

- WETZEL, R. G., 1983. Limnology. W. B. Saunders, Philadelphia, p. 767.
- YAMAGAMI, K., 1972. Isolation of a choriolytic enzyme (hatching enzyme) of the teleost, *Oryzias latipes*. *Developmental Biology*, **29**, 343-348.
- YAMAGAMI, K., 1997. A Short History of the Hatching Enzyme Studies in Medaka. *The Fish Biology Journal Medaka*, **9**, 5-15.
- YAMAMOTO, M., IUCHI, I., YAMAGAMI, K., 1979. Ultrastructural changes of the teleostean hatching gland cell during natural and electrically induced precocious secretion. *Developmental Biology*, **68**, 162-174.
- YAMAMOTO, T., 1975. Systematics and Zoogeography. In: Yamamoto, T., (Ed.), *Medaka, Biology and Strains*. Yugakusya Publ., Tokyo, pp. 17-29.
- YASUMASU, S., IUCHI, I., YAMAGAMI, K., 1989a. Purification and Partial Characterization of High Choriolytic Enzyme (HCE), a Component of the Hatching Enzyme of the Teleost, *Oryzias latipes*. *The Journal of Biochemistry*, **105**, 204-211.
- YASUMASU, S., IUCHI, I., YAMAGAMI, K., 1989b. Isolation and Some Properties of Low Choriolytic Enzyme (LCE), a Component of the Hatching Enzyme of the Teleost, *Oryzias latipes*. *The Journal of Biochemistry*, **105**, 212-218.
- YASUMASU, S., KATOW, S., HAMAZAKI, T. S., IUCHI, I., YAMAGAMI, K., 1992. Two constituent proteases of a teleostean hatching enzyme: Concurrent syntheses and packaging in the same secretory granules in discrete arrangement. *Developmental Biology*, **149**, 349-356.
- YASUMASU, S., KATOW, S., UMINO, Y., IUCHI, I., YAMAGAMI, K., 1989c. A unique proteolytic action of HCE, a constituent protease of a fish hatching enzyme: Tight binding to its natural substrate, egg envelope. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **162**, 58-63.
- YASUMASU, S., SHIMADA, H., INOHAYA, K., YAMAZAKI, K., IUCHI, I., YASUMASU, I., YAMAGAMI, K., 1996. Different exon-intron organizations of the genes for two astacin-like proteases, high choriolytic enzyme (choriolysin H) and low choriolytic enzyme (choriolysin L), the constituents of the fish hatching enzyme. *European journal of biochemistry*, **237**, 752-758.
- ZAPOMĚLOVÁ, E., 2007a. Sinice a řasy. cz – galerie. URL: <
<http://galerie.sinicearasy.cz/v/Cyanobacteria/Nostocales/Anabaena/Anabaena+sigmoidea2.jpg.html>> [cit. 2007-12-20].

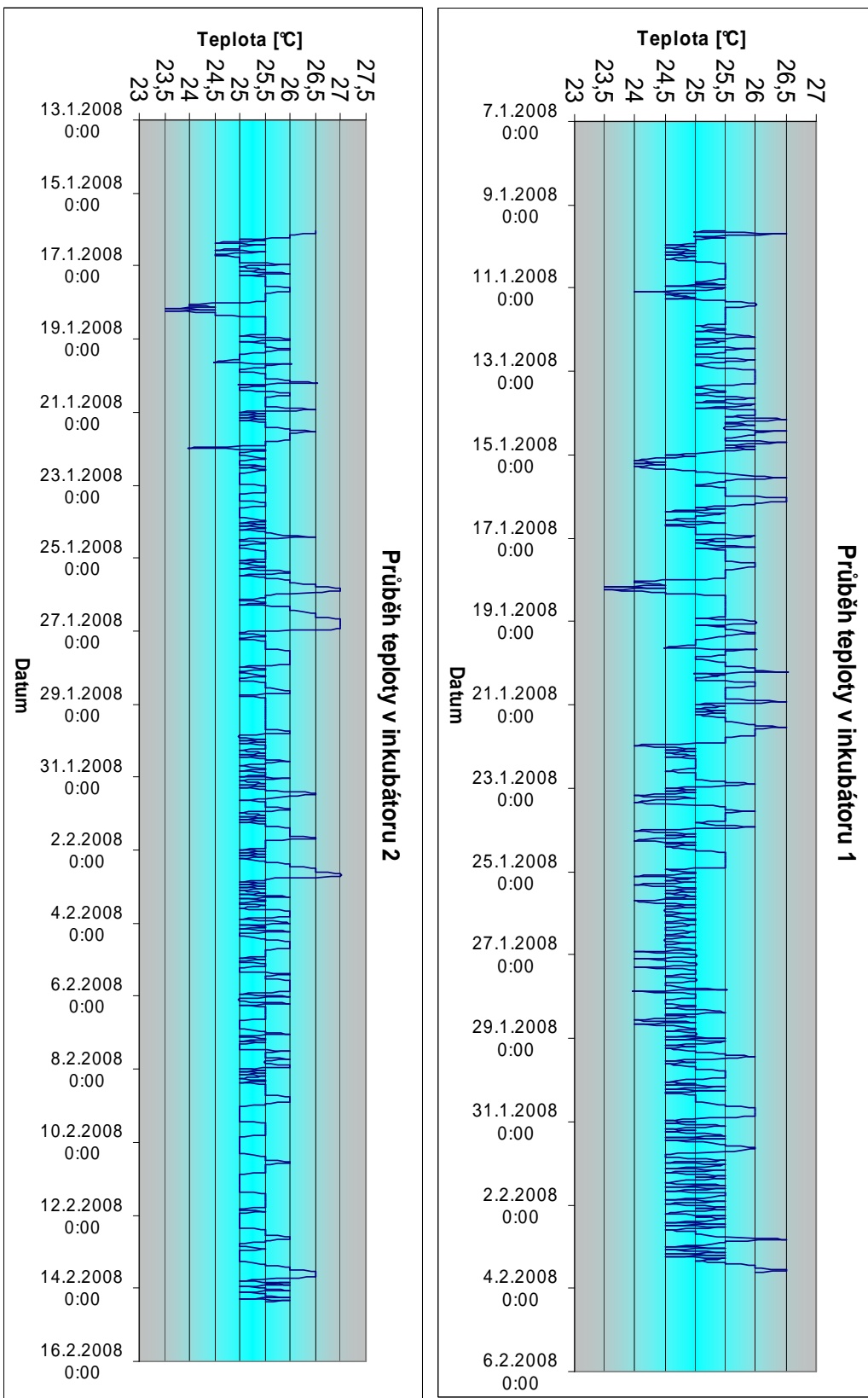
-
- ZAPOMĚLOVÁ, E., 2007b. Sinice a řasy. cz – galerie. URL: <
<http://galerie.sinicearasy.cz/v/Cyanobacteria/Nostocales/Aphanizomenon/Aphanizomenon+flos-aque/Aphanizomenon+flos-aquae.jpg.html> > [cit. 2007-12-20].
- ZURAWELL, R. W., CHEN, H., BURKE, J. M., PREPAS, E. E., 2005. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews*, **8**, 1-37.

PŘÍLOHY

Příloha 1: Grafické znázornění teploty v průběhu inkubace jiker při testování úspěšnosti líhnutí s rozdílným počtem jiker v komoře (1 – 6)



Priloha 2: Grafické znázornění průběhu teplot při inkubaci jiker v inkubátorech při testování biomasy *Sinicoých* vodních květů

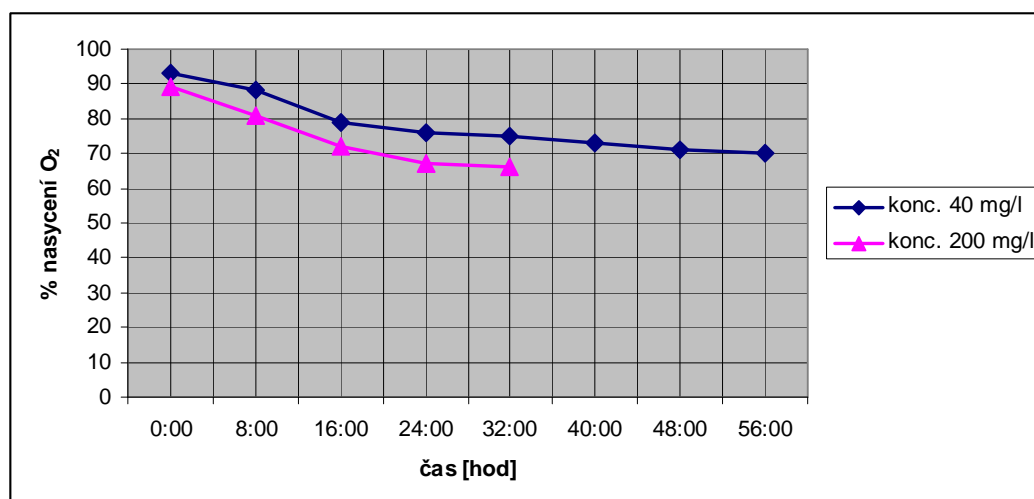


Příloha 3: Předběžný test obsahu rozpuštěného kyslíku ve vzorcích testovaných biomas sinic v závislosti na čase a koncentraci biomasy. (A- tabulka hodnot; B- grafické znázornění)

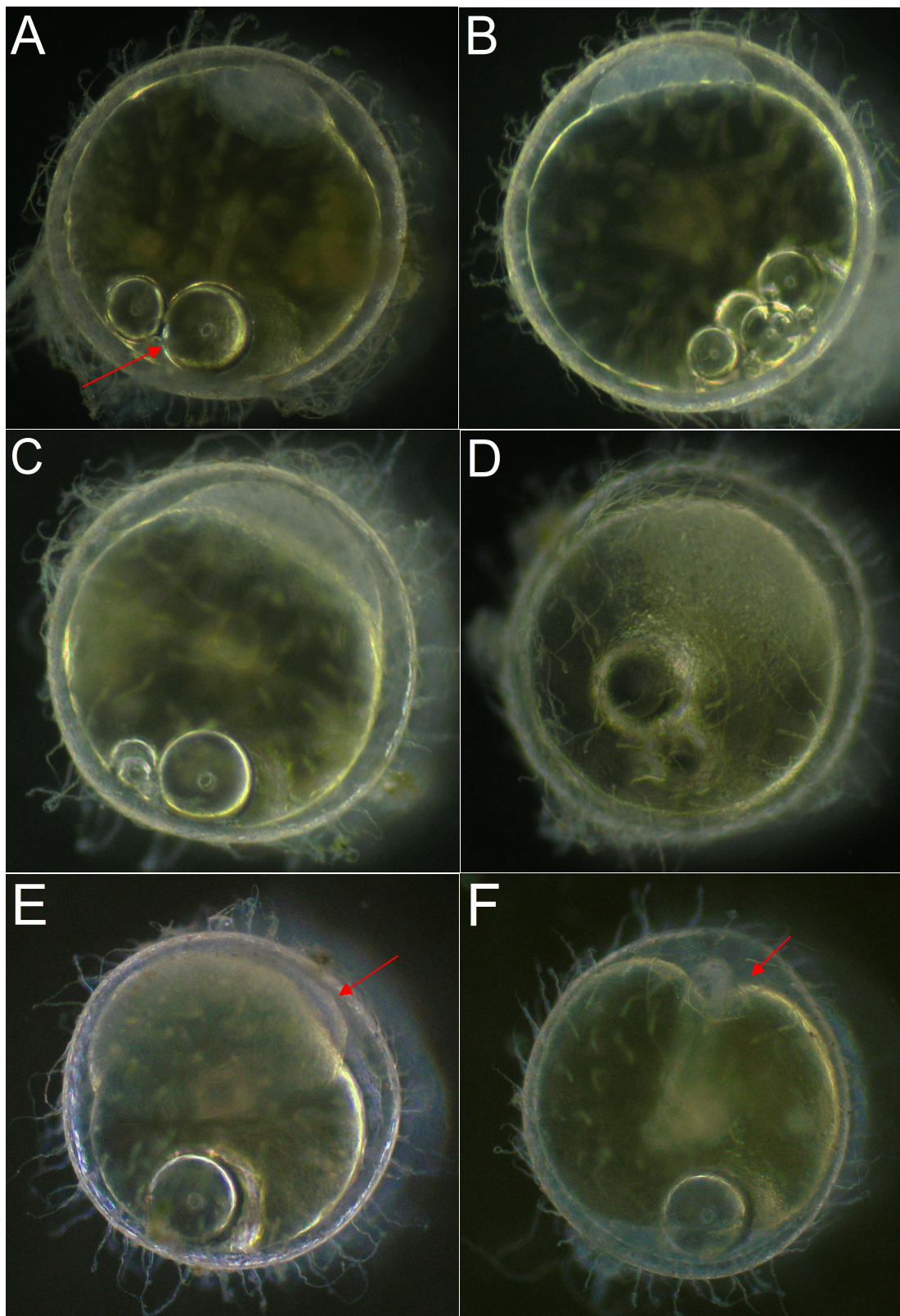
Příloha 3A: Tabelované hodnoty jsou v procentech nasycení O_2 ve vzorku o objemu 10 ml a obsahujícím 4 jikry *Oryzias latipes*; teplota v průběhu testu: 25 °C;

Čas	Nasycení O_2 v % při konc. sušiny 40 mg/l	Nasycení O_2 v % při konc. sušiny 200 mg/l
0:00	93	89
8:00	88	81
16:00	79	72
24:00	76	67
32:00	75	66
40:00	73	neměřeno
48:00	71	neměřeno
56:00	70	neměřeno

Příloha 3B: Grafické znázornění průběhu nasycení O_2 v předběžném testu

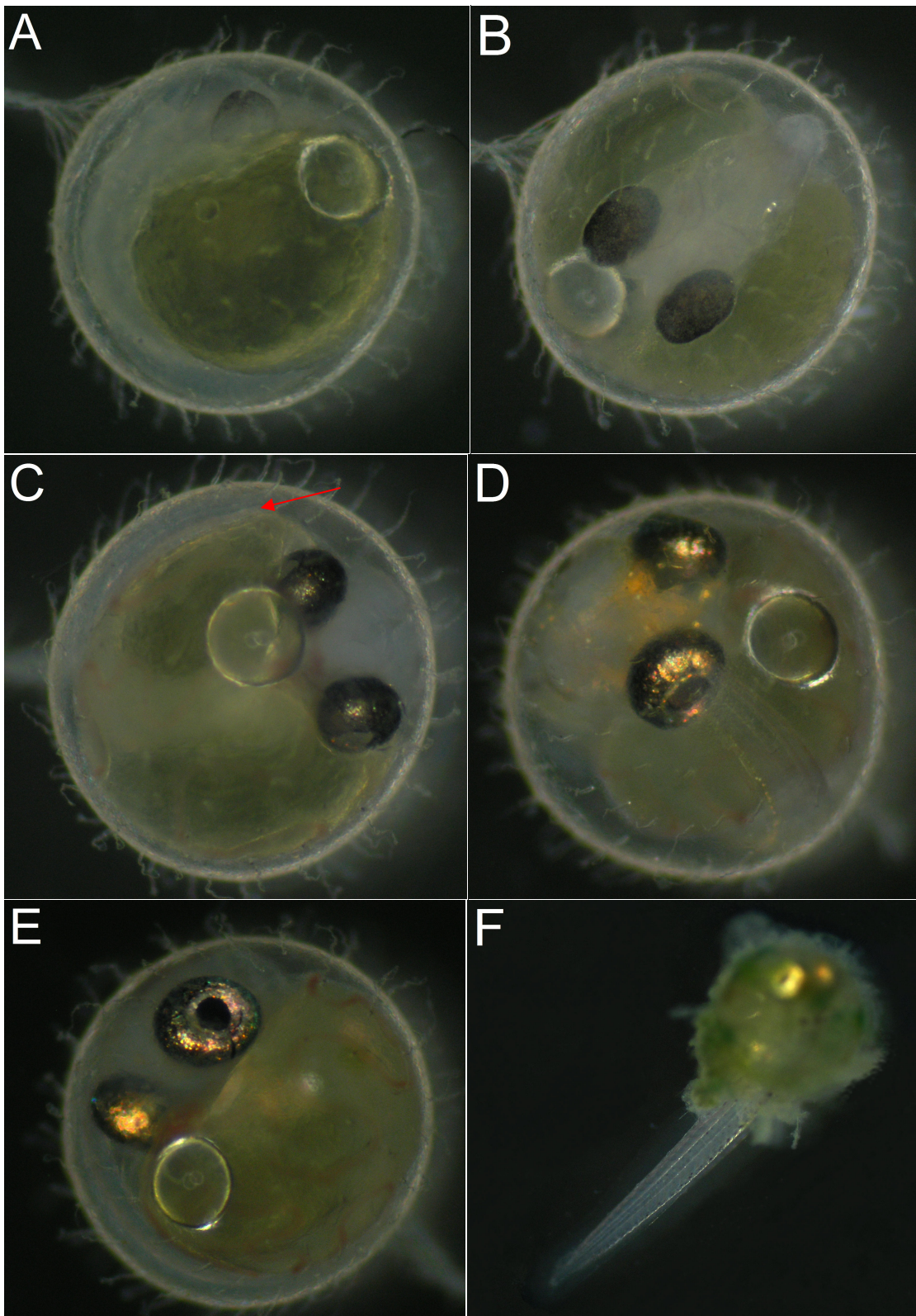


Příloha 4: Fotografická dokumentace vývoje jiker *Oryzias latipes* ve standardní ISO vodě v kontrolní skupině se stručným popisem vybraných stádií, (rozděleno do tří částí);



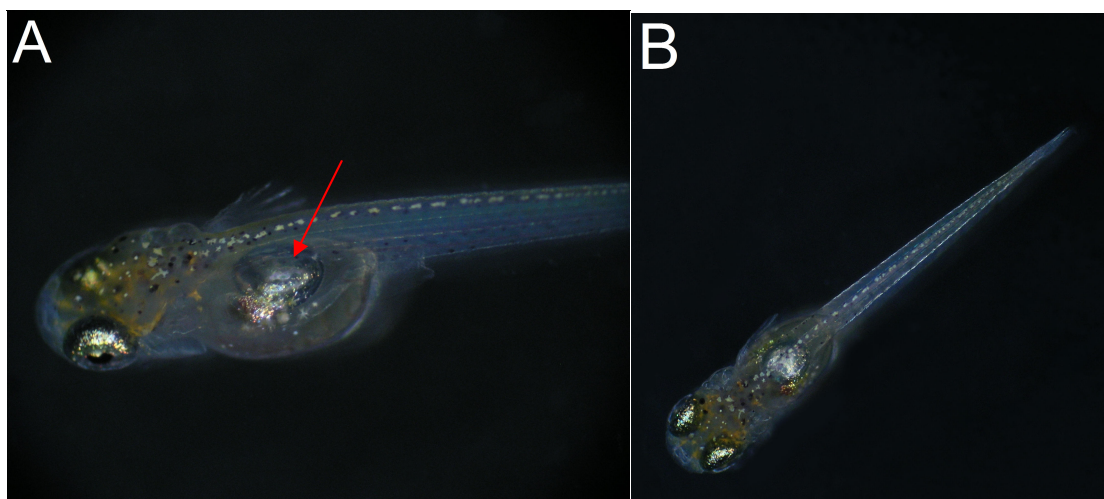
Část 1.: A- Stádium 2: formování embryonálního disku, olejové globule se spojují a přesouvají na vegetativní pól (šipka), 30 min; B- Stádium 7: (32 buněk blastodermu), 3 h 30 min; C a D- Stádium 10: (časná blastula) 6 h 30 min; E- Stádium 15: (střední

*gastrula, 50% epibolie), je vidět tvorba definitivního agregátu embrya (šipka), 17 h; F-
Stádium 20: (5-8 somitů), jsou přítomny základy sluchově rovnovážného ústrojí, tvoří se
oční čočky, šipka označuje hlavovou část embrya, 32 h;*



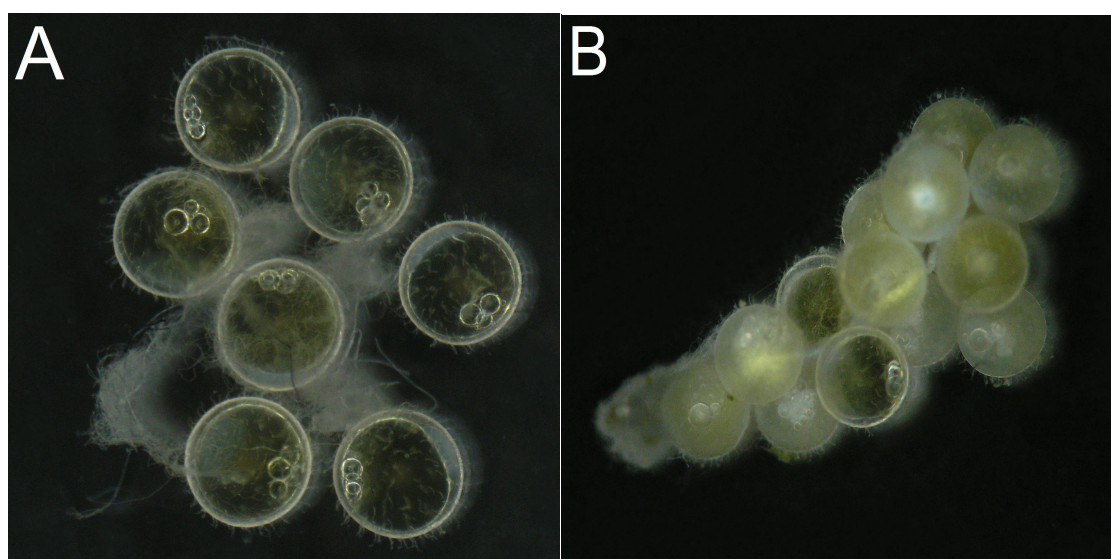
*Část 2.: A- Stádium 25: objevuje se tmavnutí rohovky oka, cirkulace krve ve všech třech
žilách žlutkového váčku, 50 h; B- Stádium 28: tělo pokrývá 2/3 žloutku, pohyby ocasu,*

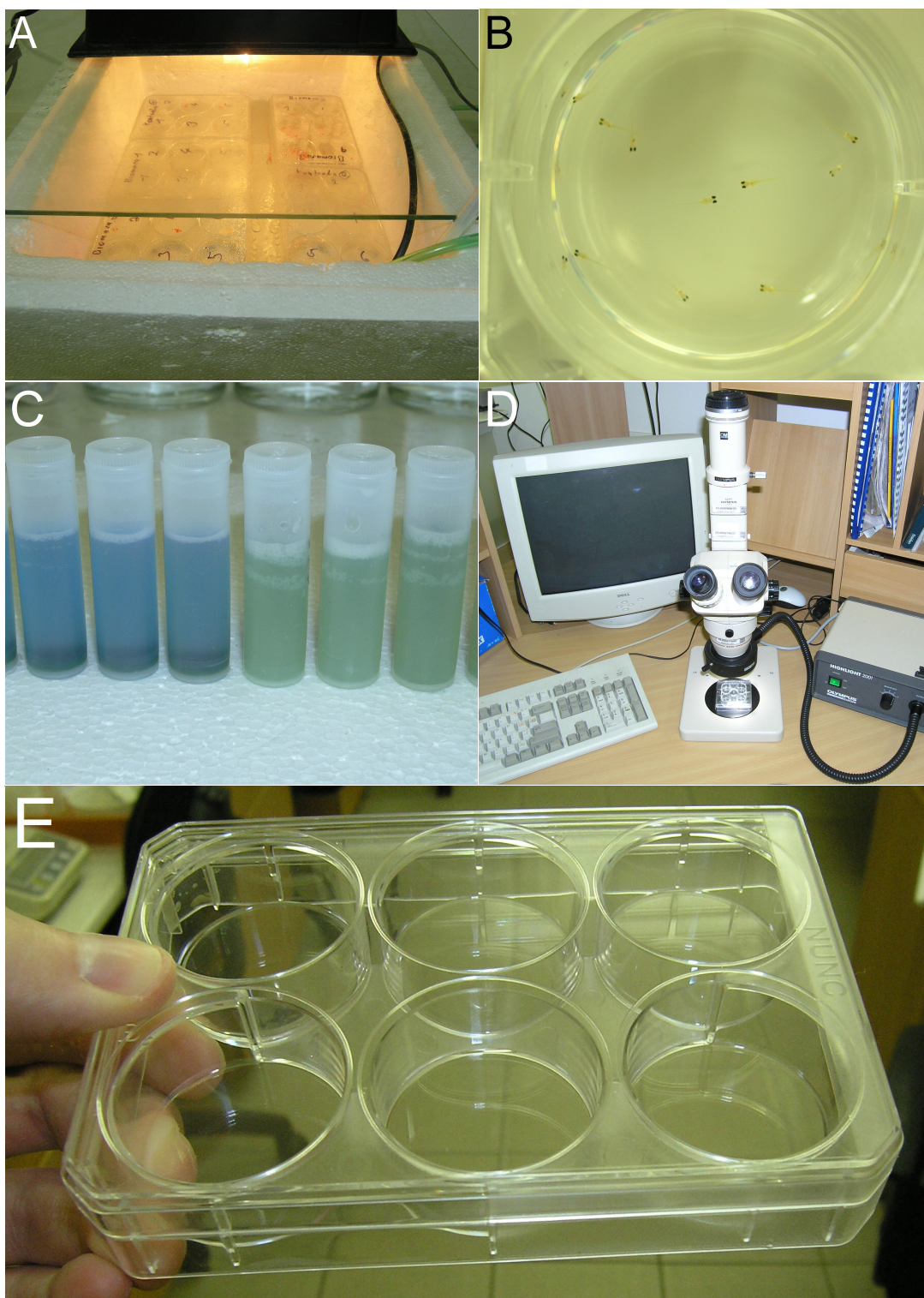
diferenciace srdce, 74 h; C- Stádium 30: objevují se základy žlučového měchýře a jater, šipka- konec ocásku, 90 h; D- Stádium 32: zvětšující se játra zčásti kryjí žlučový měchýř, plynový měchýř je zřetelný jako průzračný měchýřek pod tělem embrya, 120 h; E- Stádium 33: rohovka se zvedá nad čočky, znatelné čichové jamky mezi očima, dobře rozeznatelný plynový měchýř, 145 h; F- Stádium 37: lyzování chorionu a líhnutí, 200 h;



Část 3.: A- Stádium 38: naplnění plynového měchýře (šipka); B- Stádium 38: rozplavání

Příloha 5: Jikry těsně po odběru od samic *Oryzias latipes*. Jikry na fotografii A jsou oplodněné a vhodné k nasazení do testu (čiré zbarvení, shlukování olejových kapének na vegetativním pólu jikry a znatelné zvětšení perivitelinního prostoru); na fotografii B je vyfotografován celistvý chomáček jiker, jikry jsou však téměř všechny neoplozené (mléčné zbarvení a neznatelný perivitelinní prostor) a tedy nevhodné k nasazení do testu.



Příloha 6: Fotodokumentace

A- Inkubátor s vloženými testovacími plotnami; B- vylíhlé larvy sledované do stádia přechodu na vnější výživu; C- biomasy sinic připravené k nadávkování do testu; D- binolupa Olympus SZ 40 použitá pro pozorování embryí; E- použité testovací plotny NunclonTM;