

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH
Zemědělská fakulta
Katedra rybářství a myslivosti**

Studijní program: M4101 Zemědělské inženýrství
Studijní obor: Rybářství

Diplomová práce

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

Vedoucí diplomové práce
Prof. MVDr. Zdeňka Svobodová, DrSc.

Autor
Martin Podlesný

2008

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Martin PODLESNÝ**

Studijní program: **M4101 Zemědělské inženýrství**

Studijní obor: **Rybářství**

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

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

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

Cílem práce je provedení subchronického testu toxicity na pstruhu duhovém se subletálními koncentracemi dusitanů a zhodnocení jejich vlivu na vybrané biochemické ukazatele (např. celková bílkovina, koncentrace glukózy, močoviny, amoniaku a případně dalších ukazatelů). K biochemickým analýzám bude využit analyzátor krve VETTEST 8008. Test subchronické toxicity bude prováděn podle ČSN ISO 10229 Jakost vod - Stanovení subchronické toxicity látek pro sladkovodní ryby - Metoda vyhodnocení účinků látek na růstovou rychlost pstruha duhového [*Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Teleostei, Salmonidae)]: Obnovovací metoda a OECD Guideline for Testing of Chemicals 215 Fish, Juvenile Growth Test, 2000.

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

Seznam odborné literatury:

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


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

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

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

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

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení ④
Studentská 13
370 05 České Budějovice**


prof. Ing. Magdalena Hrabánková, CSc.
děkanka

L.S.


doc. Ing. Jan Trávníček, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 23. března 2006

Prohlášení

Prohlašuji tímto, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně a použil jsem pramenů, které cituji a uvádím v seznamu literatury.

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

V Českých Budějovicích 25.4. 2008

.....

Martin Podlesný

Poděkování

Dovoluji si poděkovat Prof. MVDr. Zdeňce Svobodové, DrSc. za vedení diplomové práce.

Chtěl bych dále poděkovat Ing. Haně Kroupové, Ph.D. a Ing. Janě Máchové za odborné vedení, cenné rady a pomoc v průběhu celého měření a zpracování mé diplomové práce.

Děkuji také celému kolektivu oddělení vodní toxikologické a nemocí ryb VÚRH JU se sídlem ve Vodňanech za pomoc a čas, který mi věnovali v průběhu této práce.

Diplomová práce byla provedena v rámci řešení výzkumného záměru VÚRH JU ve Vodňanech č. MSM 6007665809.

SOUHRN

Cílem této práce bylo posouzení vlivu dusitanů na ryby na základě změn vybraných biochemických ukazatelů. Sledování bylo prováděno formou testů akutní toxicity na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*) a sumci velkém (*Silurus glanis*) a subchronické toxicity (růstový test) na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*).

Teoretická část je zaměřena na toxikologii vodních živočichů a na hodnocení toxicity látek a přípravků pro vodní organismy. Dále jsou zde uvedeny bližší informace o dusitanech, konkrétně o jejich výskytu a zdrojích ve vodním prostředí, o mechanismu jejich příjmu a toxickém působení na ryby, včetně faktorů, které jejich toxicitu ovlivňují. V praktické části je uvedena metodika a výsledky testů akutní toxicity na pstruhu duhovém a sumci velkém a subchronického testu na pstruhu duhovém.

Na základě výsledků testů akutní toxicity byly stanoveny hodnoty 96hLC50 pro pstruha duhového (96hLC50 = 11,2 mg.l⁻¹ NO₂⁻) a pro sumce velkého (96hLC50 = 15,3 mg.l⁻¹ NO₂⁻). Subchronický test toxicity, při kterém byl pstruh duhový vystaven po dobu 28 dnů dusitanům v koncentracích od 0,01 až 3,0 mg.l⁻¹ NO₂⁻, prokázal zvýšení koncentrace glukózy a snížení koncentrace draslíku v krevní plasmě u všech pokusných ryb. Nejvyšší koncentrace dusitanů (3,0 mg.l⁻¹ NO₂⁻) vyvolala 42 % inhibici růstu a 65 % mortalitu ryb. Kumulace dusitanů v krevní plasmě pokusných ryb byla prokázána po expozici dusitanům v koncentracích 0,6 až 3,0 mg.l⁻¹ NO₂⁻.

Klíčová slova: dusitany, ryby, biochemické ukazatele, růstový test, test akutní toxicity, *Oncorhynchus mykiss*, *Silurus glanis*

SUMMARY

The aim of this thesis was to assess the effects of long-term nitrite exposure on mortality, growth rate and blood biochemistry in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Furthermore, acute toxicity tests with nitrite were performed on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sheatfish (*Silurus glanis*).

The theoretical part focuses on aquatic toxicology including toxicity evaluation of substances and preparations for water organisms. Detailed information on nitrite are summarized there, namely information on nitrite occurrence and sources in aquatic environment and the mechanism of their uptake and toxic influence on fish including factors influencing their toxicity. The practical part consists of methodology and results of acute toxicity tests on rainbow trout and sheatfish and sub-chronic test on rainbow trout.

According to the acute toxicity tests results, 96hLC50 values were estimated at 11.2 mg.l⁻¹ NO₂⁻ for rainbow trout and 15.3 mg.l⁻¹ NO₂⁻ for sheatfish. Sub-chronic exposure of rainbow trout to nitrite concentrations ranging from 0.01 to 3.0 mg.l⁻¹ lasting 28 days caused an increase of glucose concentration and a decrease of potassium concentration in the blood plasma among all experimental fish compared to control. Elevated nitrite levels were found in the plasma of the fish exposed to concentrations of 0.6 mg.l⁻¹ NO₂⁻ and greater. The plasma nitrite levels did not reach those applied in any experimental group in the present study. At highest nitrite concentration (3.0 mg.l⁻¹ NO₂⁻), 42 % growth inhibition and 65 % mortality among fish was noticed. On the basis of growth rate inhibition data, the values of NOEC and LOEC were estimated at 0.01 mg.l⁻¹ and 0.2 mg.l⁻¹ NO₂⁻, respectively.

Keywords: nitrite, fishes, biochemical parameters, growth rate, acute toxicity test, *Oncorhynchus mykiss*, *Silurus glanis*

OBSAH

1 ÚVOD	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 TOXIKOLOGIE A TESTY TOXICITY	11
2.1.1 PŘEDMĚT TOXIKOLOGIE A VYMEZENÍ POJMŮ.....	11
2.1.2 ÚČINEK A OSUD TOXICKÝCH LÁTEK V ORGANISMU	11
2.1.3 TESTY TOXICITY	13
2.1.4 PRINCIP TESTŮ TOXICITY.....	13
2.1.5 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ TESTŮ TOXICITY	15
2.1.6 SLEDOVÁNÍ A HODNOCENÍ ÚČINKŮ CIZORODÝCH LÁTEK NA RYBY.....	15
2.2 SLOUČENINY DUSÍKU A JEJICH PŘEMĚNY	19
2.2.1 HLAVNÍ FORMY VÝSKYTU DUSÍKU VE VODÁCH.....	19
2.2.2 CHEMICKÉ A BIOCHEMICKÉ PŘEMĚNY DUSÍKU	19
2.3 DUSITANY	21
2.3.1 VÝSKYT DUSITANŮ VE VODÁCH.....	21
2.3.2 LEGISLATIVA	22
2.3.3 MECHANISMUS PŘIJMU DUSITANŮ RYBAMI	22
2.3.4 ÚČINKY DUSITANŮ NA RYBY.....	23
2.3.5 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TOXICITU DUSITANŮ PRO RYBY	26
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1 TEST AKUTNÍ TOXICITY NA SUMCI VELKÉM (<i>Silurus glanis</i>)	29
3.1.1 VÝSLEDKY.....	31
3.2 TEST SUBCHRONICKÉ TOXICITY NA PSTRUHU DUHOVÉM (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	32
3.2.1 VÝSLEDKY.....	41
4 DISKUSE	45
5 ZÁVĚR	47
6 LITERATURA	48
7 PŘÍLOHY	53

DEFINICE A ZKRATKY

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

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

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

Kontrola: ředící voda s testovacími organismy bez testovaného vzorku.

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

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

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

LC: letální koncentrace.

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

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

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

LOEC: nejnížší koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky (lowest observed effect concentration).

NOEC: nejvyšší koncentrace testovaného vzorku nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky (no observed effect concentration).

NPK: nejvyšší přípustná koncentrace (NPK) látek je koncentrace látky a jejich metabolitů ve vodách, která při stálém působení nevyvolá negativní účinky na hydrochemický režim recipientu a na mikroorganismy, primární produkci recipientu, planktonní potravní organismy a ryby.

1 ÚVOD

Dusitany jsou přirozenou součástí koloběhu dusíku v přírodě. Jejich zvýšené koncentrace ve vodě však představují problém, protože dusitany jsou velmi toxické pro vodní živočichy (Lewis a Morris, 1986). Zatímco u suchozemských živočichů se jedná o příjem potravou (a především vodou), vodní živočichové dusitany přijímají aktivně z okolní vody a kumulují je v tělních tekutinách.

Zvětšující se potřeba intenzivního chovu ryb v kontrolovaných podmínkách, spojená s omezenou zásobou vodních zdrojů, vedla k výstavbě odchoven ryb, které recirkulují až 95 % vody. Amoniak, jako hlavní produkt látkové výměny ryb, se odstraňuje pomocí biologických fluidních filtrů nitrifikací na dusičnany, které jsou pro ryby relativně bezpečné. Právě nerovnováha v procesu nitrifikace, která může být způsobena nejrůznějšími faktory, vede často k nárůstu koncentrace dusitanů. Zvýšené koncentrace dusitanů jsou jednou z významných a častých příčin poškození a úhynu ryb v těchto rybochovných objektech (Wedemeyer a Yasutake, 1978).

Ve své diplomové práci jsem se proto zaměřil na sledování negativních účinků dusitanů na ryby. Sledování jsem prováděl formou akutních testů toxicity na rybách sumci velkém (*Silurus glanis*) a pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*) a formou subchronického testu na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*). Měření jsem prováděl ve spolupráci s Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, na oddělení vodní toxikologie a nemoci ryb VÚRH Vodňany.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 TOXIKOLOGIE A TESTY TOXICITY

2.1.1 PŘEDMĚT TOXIKOLOGIE A VYMEZENÍ POJMŮ

Toxikologie je nauka, která se zabývá vzájemným působením chemických látek a živého organismu a proto vychází z biologických a chemických disciplín. Toxikologie se člení na jednotlivá odvětví, zejména:

- popisná toxikologie - popis poškození organismu.
- predikční toxikologie - odhad toxicity ze struktury látky.
- klinická toxikologie - diagnosa a léčení otrav.
- průmyslová toxikologie - otravy v průmyslu, jejich léčba a prevence.
- ekotoxikologie - působení škodlivých látek na ekosystém.
- toxikologie agrochemikálií - pesticidů, hnojiv, apod.

Toxicita je schopnost chemických látek působit na živé organismy nepříznivě (toxicky).

Toxická látka je chemická látka vykazující nepříznivé (toxické) účinky.

Toxin je termín, který se obvykle používá pro toxické látky produkované živými organismy.

Otrava je poškození životních funkcí organismu v důsledku působení toxické látky. Projeví-li se otrava bezprostředně po jednorázové dávce látky, mluvíme o akutním účinku. Při projevu po dlouhodobém styku s látkou, mluvíme o chronickém účinku. Akutní a chronické účinky vyvolané stejnou látkou se mohou navzájem značně lišit (Horák et al., 2004).

2.1.2 ÚČINEK A OSUD TOXICKÝCH LÁTEK V ORGANISMU

Podle mechanismu působení látek rozlišujeme:

- přímý toxický účinek - látka působí pouhou svou přítomností na kritickém místě v organismu.
- biochemický účinek - látka reaguje s cílovou molekulou (receptorem), ovlivní nějaký biochemický děj a tím některou životní funkci buňky, či organismu.
- imunotoxický účinek – látka způsobí změny imunitního systému projevující se snížením imunity nebo nepřiměřenou reakcí.

- mutagenitu – látka způsobí změny genetické informace vedoucí ke změně vlastností následujících generací.
- karcinogenitu – látka způsobí změnu genetické informace vedoucí ke zhoubnému nádorovému bujení.
- teratogenitu – látka způsobí poškození plodu vedoucí k narození defektního jedince.
- orgánový účinek – látka toxicky působí na určitý orgán (neurotoxické, hepatotoxické, nefrotoxické, pneumotoxické látky).

Působení biologického systému a cizorodé látky je vzájemné. Látka působí na organismus, ale i biologický systém působí na cizorodou látku, chemicky ji přeměňuje. Osud látky v organismu můžeme rozdělit do čtyř fází (Horák et al., 2004):

- vstup – absorpce.
- přenos – distribuce.
- metabolické přeměny – biotransformace.
- vylučování – exkrece (biotransformace a vylučování = eliminace).

Účinek látky závisí na koncentraci a dávce. Předpoklad závislosti mezi dávkou a odpovědí organismu, účinkem, je základním konceptem toxikologie. Pod jistou prahovou hodnotou dávky se zpravidla žádný účinek neobjeví. Při jejím překročení účinek s dávkou stoupá. Mnohem bezprostředněji než na dávce závisí účinek na koncentraci látky a na místě účinku (Horák et al., 2004).

Podle doby působení látek rozlišujeme:

- akutní toxicitu – kdy se toxický účinek projevuje po několika hodinách i minutách.
- chronickou toxicitu – která se projevuje po týdnech až měsících. Chronická toxicita se ale může projevit např. až u následných vývojových generací jako problémy s plodností, degenerace na potomcích atd.
- přechodnou kategorií mezi toxicitou akutní a chronickou je subchronická toxicita.

2.1.3 TESTY TOXICITY

Testy toxicity se provádějí **na úrovni buněk a tkání, na úrovni jedinců** (organismů) a **na úrovni společenstev** (biocenóz). Testy na úrovni buněk a tkání jsou dobře reprodukovatelné a používají se pro objasnění poznatků získaných při pokusech na organismech. Na úrovni biocenóz se sleduje toxický účinek v přírodě či na modelu, což umožňuje sledovat účinky testované látky na ekosystém jako celek. Tyto testy jsou velmi náročné, a proto se většina testů provádí na úrovni organismů, které tvoří přechod mezi testy na buněčných kulturách a na společenstvech (Svobodová et al., 2000).

Toxické působení látek na živé systémy můžeme zkoumat *in vitro* („ve zkumavce“) nebo na živých zvířatech, *in vivo*. Zvíře, jako součást živé přírody, je totiž nejdokonalejším modelem pro toxikologické experimenty (Horák et al., 2004).

2.1.4 PRINCIP TESTŮ TOXICITY

Cílem testů toxicity je zjištění **letální koncentrace LC50, střední účinné (efektivní) koncentrace EC50** nebo **inhibiční koncentrace IC50**. LC50 je koncentrace letální pro 50 % testovaných organismů (v testech na rybách). EC50 je efektivní koncentrace, která vyvolá 50 % úhyn testovaných organismů (v testech na zástupcích zooplanktonu). IC50 je koncentrace, která způsobí 50 % inhibici růstu ve srovnání s kontrolou (např. v testech na zelených řasách). Při hodnocení toxicity testovaného vzorku pro organismus je samozřejmě důležitá nejen koncentrace látky, ale také doba jejího působení. Proto je také doba působení (expozice) dána metodikou příslušného testu toxicity a uvádí se ve výsledku.

Při zjišťování hodnot LC50, EC50 a IC50 se vychází z koncentrací, ve kterých došlo k více než nulové a méně než stoprocentní mortalitě, imobilizaci či inhibici růstu. Proto je při provádění testů velmi důležité zvolit správný rozsah koncentrací. Toxické koncentrace se mohou pohybovat řádově v desetinách mg na litr, ale také v tisících mg na litr. Pro zjištění správného rozsahu koncentrací se provádějí následující testy (Svobodová et al., 2000):

- Limitní test, při kterém se zjišťuje reakce testovaných organismů na koncentraci 100 mg.l⁻¹ testovaného vzorku. Jestliže v daném testu neuhyne žádný z testovacích organismů, další testy se nevyžadují.

- Předběžný test navazuje na limitní test, jestliže v něm došlo k úhynům. Provádí se s malým počtem testovacích organismů (např. 3 - 5 ks ryb nebo 10 ks dafnií v každé koncentraci) a nasazuje se v širokém rozmezí koncentrací testované látky (např. od 0,01 do 100 mg.l⁻¹).
- Základní test se provádí s užším rozsahem koncentrací, který se volí na základě výsledků předběžného testu. Do základního testu se nasazuje větší počet testovacích organismů, např. 7 – 10 ks ryb nebo 20 ks dafnií do každé koncentrace. Z výsledků základního testu se potom vypočítává hodnota LC(EC, IC)50.

Při provádění dlouhodobých testů toxicity (testy subchronické a chronické toxicity, nebo testy na raných vývojových stádiích ryb) se vyhodnocují hodnoty **LOEC** a **NOEC**. LOEC (lowest observed effect concentration) vyjadřuje nejnižší koncentraci testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky a NOEC (no observed effect concentration) vyjadřuje nejvyšší koncentraci testovaného vzorku nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky (Příkryl et al., 1983; Máchová et al., 1994).

Součástí každého toxikologického testu je kontrola, která se provádí za stejných podmínek a se stejnými organismy jako pokus. Kontrolní testovací organismy se nasazují do ředicí vody bez přítomnosti testované látky. Tímto způsobem se ověřuje kondice a zdravotní stav testovacích organismů a podmínky testu.

Jako ředicí voda pro testy toxicity se používá voda známých fyzikálně-chemických vlastností. Voda musí vyhovovat fyziologickým potřebám testovacích organismů, nesmí obsahovat zbytkový chlor, ani rezidua jiných toxických látek. Současně tato voda nesmí výrazně ovlivňovat toxicitu testované látky (např. nežádoucí je vysoký obsah vápníku a hořčiku apod.). Složení ředicí vody je součástí jednotlivých metodik testů toxicity.

Toxikologická laboratoř je povinna provádět v určitých časových intervalech tzv. vnitřní kontrolu. Jedná se o základní test, v němž je testovanou látkou standard. Jako standard je u nás i v zahraničí využíván dichroman draselný (K₂Cr₂O₇ p.a.). V naší republice se dále jako standard využívá p-nitrofenol (p.a.) a heptahydrát síranu zinečnatého (ZnSO₄.7H₂O p.a.). Provedení testu se standardem a porovnání takto získané hodnoty LC(EC, IC)50 s obecně platnými hodnotami umožňuje laboratoři kontrolu správnosti postupu i citlivosti použitých testovacích organismů (Svobodová et al., 2000).

Většina toxikologických testů je standardizována na mezinárodní úrovni, což umožňuje porovnávání výsledků získaných v různých laboratořích. Nejrozšířenější jsou

metodiky ISO (International Organization for Standardization) a metodiky OECD (Organization for Economic Cooperation of Development). Správnost a shodnost provádění jednotlivých metodik se prověřuje mezilaboratorním porovnáním zkoušek – tzv. vnější kontrola.

2.1.5 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ TESTŮ TOXICITY

Zákon č. 356/2003 Sb. o chemických látkách a chemických přípravcích v současné době rozlišuje testované látky z hlediska jejich rizikovosti a pro jejich charakteristiku využívá standardní věty označující specifickou rizikovost (tzv. R-věty): **R50/53 Vysoce toxický pro vodní organismy**, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí - LC(EC, IC)50 méně nebo rovno 1 mg.l^{-1} , **R51/53 Toxický pro vodní organismy**, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí - LC(EC, IC)50 od 1 mg.l^{-1} do 10 mg.l^{-1} včetně, **R52/53 Škodlivý pro vodní organismy**, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí - LC(EC, IC)50 od 10 mg.l^{-1} do 100 mg.l^{-1} včetně.

2.1.6 SLEDOVÁNÍ A HODNOCENÍ ÚČINKŮ CIZORODÝCH LÁTEK NA RYBY

Konečným rezervoárem cizorodých látek antropogenního původu je vodní prostředí. Z toho důvodu je prvořadá pozornost věnována právě metodám vlastního sledování a hodnocení vlivu těchto látek na zástupce organismů vodních ekosystémů, především na ryby. Vlastní sledování a hodnocení účinků cizorodých látek na ryby zahrnuje především:

- stanovení hodnot LC50 (případně LC5), NOEC (no observed effect concentration), LOEC (lowest observed effect concentration).
- posouzení hematologického profilu ryb.
- posouzení biochemického profilu krve, dalších tělních tekutin a tkání ryb.
- posouzení histopatologického profilu tkání ryb.
- posouzení procesu akumulace cizorodých látek případně jejich metabolitů.

Za účelem stanovení výše uvedených hodnot jsou využívány standardizované metody akutních a prolongovaných testů toxicity:

a) podle OECD:

- 203 – Test akutní toxicity na rybách – výsledkem je hodnota 96hLC50.
- 204 – Prolongovaný test toxicity na rybách (14 denní) – výsledkem jsou hodnoty 14dLC50, NOEC a LOEC.
- 210 – Test na raných vývojových stádiích ryb (embryolarvální test toxicity) – výsledkem jsou hodnoty NOEC a LOEC.
- 212 – Krátkodobý test toxicity na embryích a na váčkovém plůdku ryb (embryonální test toxicity) – výsledkem jsou hodnoty NOEC a LOEC.
- 215 – Růstový test toxicity na juvenilních rybách (28 denní) – výsledkem jsou hodnoty NOEC a LOEC.

b) podle ČSN EN ISO:

- ČSN EN ISO 7346-1 Jakost vod. Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby. Část 1: Statická metoda.
- ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod. Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby. Část 2: Obnovovací metoda.
- ČSN EN ISO 7346-3 Jakost vod. Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby. Část 2: Průtočná metoda.
- ČSN EN ISO 10229 Jakost vod. Stanovení subchronické toxicity látek pro sladkovodní ryby. Metoda vyhodnocení účinků látek na růstovou rychlost pstruha duhového.

Pro provádění testů toxicity na rybách je nutné dodržovat zásady Zákona č.77/2004 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a dále Vyhlášky MZe ČR č.311/1997 Sb. o chovu a využití pokusných zvířat.

HEMATOLOGICKÉ ZMĚNY PO PŮSOBENÍ CIZORODÝCH LÁTEK

Změny hodnot hematologických ukazatelů lze pozorovat především po akutním působení cizorodých látek. S výjimkou některých hemolytických jedů (např. saponiny) a dusitanů se jedná ve většině případů o nespecifické změny. Změny lze pozorovat v červeném a v bílém krevním obraze. V červené krevním obraze lze pozorovat zvýšení

nebo snížení koncentrace hemoglobinu, změnu počtu erytrocytů a hematokritové hodnoty, zvětšení středního objemu erytrocytu (MCV), snížení střední barevné koncentrace (MCHC) a v bílém krevním obraze snížení nebo zvýšení počtu leukocytů, zejména lymfocytů. Mezi specifické změny patří např. methemoglobinemie vyvolaná dusitany (Svobodová a Máchová, 2003).

BIOCHEMICKÉ ZMĚNY TĚLNÍCH TEKUTIN A TKÁNÍ PO PŮSOBENÍ CIZORODÝCH LÁTEK

Změny hodnot biochemických ukazatelů lze pozorovat jak po akutním, tak po dlouhodobém působení cizorodých látek. Změny jsou sledovány pomocí následujících parametrů (Folmar, 1993): koncentrace iontů (K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+}), glukózy (GLUC), laktátu (LACT), celkové bílkoviny (TP), cholesterolu (CHOL), amoniaku (NH_3), močoviny (UREA) a kyseliny močové (URIC), enzymů ALT (alanin aminotransferáza), ALP (alkalická fosfatáza), AST (aspartát aminotransferáza), CK (kreatinkináza) a LDH (laktát dehydrogenáza), dále triglyceridů, kreatinu, vitellogeninu, některých hormonů (inzulín, růstový hormon, prolaktin, thyroxin, trijodothyronin, kortisol, testosteron, 11-ketotestosteron, estradiol, gonadotropin) a dalších.

Účinky cizorodých látek na biochemický profil krve, dalších tělních tekutin a tkání ryb lze charakterizovat následujícím způsobem (Svobodová a Máchová, 2003):

- **specifický účinek jednotlivých cizorodých látek.** Typickým příkladem je snížení aktivity acetylcholinesterázy v mozku a v krvi po působení organofosfátů. Stejný účinek vykazují karbamáty a také některé skupiny cyanotoxinů. Podobně úzce specifický účinek vykazuje olovo, které inhibuje syntézu hemu ve třech krocích. V prvním kroku inhibuje ALA-dehydratázu a následkem toho je po krátkodobém či dlouhodobém účinku olova prokazováno zvýšené množství kyseliny 5-aminolevulové (ALA) v krevní plazmě nebo v moči. Velmi specifickým parametrem (biomarkerem) působení PAU je 1-hydroxypyren stanovovaný ve žluči. Jedná se o konečný metabolit polycyklických aromatických uhlovodíků, vznikající v játrech v procesu detoxikace. 1-hydroxypyren je v podstatě konjugát, který se vylučuje žlučí. Při otravě ryb volným amoniakem a po autointoxikaci se stanovuje amoniak v krevní plazmě ryb, neboť dochází k pěti až desetinásobnému zvýšení obsahu ve srovnání s fyziologickými hodnotami.

- **specifický účinek skupiny cizorodých látek** na určitý biochemický parametr (biochemický marker). Jedná se ve většině případů o biochemické markery podílející se na detoxikaci cizorodých látek. Příkladem jsou metallothioneiny, které zastávají významnou funkci detoxikace v procesu metabolismu toxických kovů. Základními detoxikačními markery v metabolismu organických polutantů je cytochrom P450 a konjugační enzymy (např. GST). Cytochrom P450 působí v první fázi a konjugační enzymy v druhé fázi detoxikace řady organických polutantů (PCB, dioxiny, dibenzofurany, PAU, organochlorové pesticidy aj.). Jak metallothioneiny, tak cytochrom P450 a konjugační enzymy, mají rovněž funkci indikační a stanovují se v játrech. Velmi frekventovaným biochemickým markerem je v současné době vitellogenin stanovovaný v krevní plazmě a v játrech samců. Indikuje kontaminaci xenoestrogenními látkami (PCB, PAU, DDT a jeho metabolity, zejména DDE, ftaláty, tributylcín, aj. degradační produkty tenzidů). Xenoestrogenní látky indukují v játrech samců tvorbu vitellogeninu.

- **nespecifický účinek cizorodých látek** na biochemický profil krve ryb. Změny hodnot biochemických parametrů jsou zjišťovány především po akutním působení polutantů. V první fázi působení dochází k primární stresové odezvě charakterizované především změnami v hormonální aktivitě (např. zvýšení koncentrace kortizolu v krevní plazmě). Následuje sekundární stresová reakce, ve které dochází především k významnému zvýšení koncentrace plazmatické glukózy. Tato reakce je doprovázena dalšími změnami např. v hodnotách laktátu, LDH a celkových bílkovin v krevní plazmě. Poškození parenchymatických orgánů (zejména jater) cizorodými látkami je charakterizováno zvýšenou aktivitou enzymů v krevní plazmě. Při poškození permeability buněk těchto tkání dochází k uvolnění enzymů, zejména transamináz ALT a AST do plazmy. Podobně při poškození svaloviny (zejména při křečích) dochází k uvolňování kreatinkinázy do krevní plazmy. Většina cizorodých látek zasahuje i do metabolismu elektrolytů a to může mít za následek např. významné snížení koncentrace vápníku a zvýšení koncentrace fosforu v krevní plazmě ryb po působení sloučenin kadmia.

2.2 SLOUČENINY DUSÍKU A JEJICH PŘEMĚNY

2.2.1 HLAVNÍ FORMY VÝSKYTU DUSÍKU VE VODÁCH

Dusík se vyskytuje ve vodách v různých oxidačních stupních. Mezi hlavní **formy dusíku** patří (Pitter, 1999):

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

Sloučeniny dusíku jsou anorganického a organického původu. Mezi hlavní anorganické formy patří amoniakální, dusitanový a dusičnanový dusík. Organicky vázaný dusík je ve formě bílkovin a jejich rozkladných produktů (peptidy, aminokyseliny, močovina atd.). Sloučeniny dusíku přirozeně vznikají rozkladem organických dusíkatých látek rostlinného a živočišného původu. Významným zdrojem dusíkatých látek je také antropogenní činnost, odpady ze zemědělství a průmyslové odpadní vody, které bývají na dusitany velmi bohaté. V atmosféře se rovněž vyskytují sloučeniny dusíku (oxidy dusíku a NH_3) a jejich reakcemi (NO a NO_2) vznikají v atmosférických vodách dusitany a dusičnany.

Dusitany a dusičnany patří k tzv. oxidovaným formám dusíku a jejich suma se označuje jako celkový oxidovaný dusík:

$$\text{celkový oxidovaný dusík} = \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$$

2.2.2 CHEMICKÉ A BIOCHEMICKÉ PŘEMĚNY DUSÍKU

Sloučeniny dusíku jsou ve vodách málo stabilní a jejich výskyt a poměr závisí na oxidačně-redukčním potenciálu a hodnotě pH. Dusičnany jsou stabilní při relativně vysokých hodnotách oxidačně-redukčního potenciálu, avšak v anoxických podmínkách mohou podléhat redukci na elementární dusík. K redukci dusičnanů až na amoniakální dusík je zapotřebí značně záporných hodnot oxidačně-redukčního potenciálu. Na druhé straně dusitany ve vodě mezi sloučeninami dusíku většinou nedominují díky svojí chemické nestálosti (Pitter, 1999).

Koloběh dusíku je složitým systémem dějů, mezi které patří například biologická fixace, amonifikace, nitrifikace a denitrifikace.

Nitrifikace je oxidace amoniaku na dusitany (nitritace) a dusitanů na dusičnany (nitratice) v oxických podmínkách. Je způsobena především litotrofními autotrofními a vyjímečně i organotrofními organismy. Chemolitotrofní nitrifikační bakterie využívají CO₂ jako zdroj uhlíku a zdrojem energie je oxidace amoniakálního dusíku. Rozlišují se dva hlavní rody nitrifikačních bakterií: *Nitrosomonas* a *Nitrobacter*. Rod *Nitrosomonas* se podílí na prvním stupni oxidace, na dusitany, a má menší růstovou rychlost než rod *Nitrobacter*, který se podílí na oxidaci dusitanů na dusičnany (Pitter, 1999).

Denitrifikace je redukce dusičnanů a dusitanů na elementární dusík nebo oxidy dusíku v anoxických podmínkách. Biochemická redukce je způsobena organotrofními (heterotrofními) striktně i fakultativně anaerobními mikroby (např. rody *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*). Pro průběh denitrifikace je nutný organický substrát jako zdroj energie (Pitter, 1999).

Přímo atmosférický dusík využívají organismy se schopností **biologické fixace**, umožněné enzymem nitrogenázou, která převádí dusík na amonné soli, glutamin a inkorporuje ho do biomasy. Biologickou fixaci provádějí symbiotičtí a volně žijící aerobní, anaerobní a fototrofní vazači atmosférického dusíku (aerobní a anaerobní bakterie, sinice). Z fototrofních vazačů vodního prostředí se jedná především o zástupce sinic např. rody *Anabaena* a *Aphanizomenon* (Ambrožová, 2001).

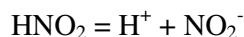
Organicky vázaný dusík mineralizují chemotrofní bakterie na amoniak procesem **deaminace**. Uvolněný amoniak dále využívají bakterie, řasy a nitrifikační bakterie (Ambrožová, 2001).

2.3 DUSITANY

2.3.1 VÝSKYT DUSITANŮ VE VODÁCH

FORMY VÝSKYTU

Dusitany jsou odvozeny od kyseliny dusité HNO_2 , která patří mezi středně silné kyseliny a disociuje podle rovnice:



Ve vodách s hodnotami pH nad 5 zcela převažují ionty NO_2^- nad nedisociovanou kyselinou HNO_2 . Při hodnotě pH 3,35 jsou HNO_2 a NO_2^- v látkovém poměru 1:1. Z hlediska provádění různých bilancí je výhodné vyjadřovat koncentraci dusitanů jako dusitanový dusík (N-NO_2^-). Pro přepočty se využívají vztahy (Pitter, 1999):

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

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

VÝSKYT VE VODÁCH

Dusitany zpravidla doprovázejí ve vodách dusičnany a formy amoniakálního dusíku. Vzhledem ke své chemické a biochemické nestálosti se vyskytují ve velmi malých koncentracích. V přírodních vodách jsou v oxických podmínkách rychle transformovány nitrifikací na dusičnany. Na druhé straně v anoxických podmínkách mohou být redukovány denitrifikací na elementární dusík, resp. N_2O . Proto lze dusitany často prokázat jako meziproduct chemických a biochemických přeměn sloučenin dusíku. Ve velmi čistých vodách bývají přítomny jen ve stopových množstvích. V nezatížených povrchových a podzemních vodách se vyskytují také ve velmi nízkých koncentracích.

Koncentrace dusitanů řádově v desetínách mg.l^{-1} lze zjistit např. v železnatých a rašelinných vodách a v atmosférických vodách po bouřkové činnosti. Větší koncentrace dusitanů se vyskytují ve splaškových odpadních vodách, i přes 1 mg.l^{-1} . Ještě vyšší koncentrace lze nalézt v některých odpadních vodách ze strojírenských závodů (např. odpadní vody z povrchové a tepelné úpravy kovů). Z těchto provozů lze v odpadních vodách prokázat až stovky mg.l^{-1} (Pitter, 1999).

Zvýšené koncentrace dusitanů (řádově jednotky, ale i desítky mg.l^{-1}) se mohou vyskytovat ve vodách v intenzivních chovech ryb. Zvýšené koncentrace se velmi často objevují v recirkulačních systémech, zejména bezprostředně po zahájení provozu nebo v důsledku nedostatečné funkce biologických filtrů, ve kterých probíhá proces nitrifikace.

Proces nitrifikace je využíván ke snížení koncentrace amoniaku, který je hlavním produktem dusíkatého metabolismu ryb (Svobodová et al., 2007).

2.3.2 LEGISLATIVA

LEGISLATIVA EU

Hlavním legislativním nástrojem ES upravujícím vypouštění dusitanů do vodního prostředí je Směrnice Rady 76/464/EHS o znečištění způsobeném určitými nebezpečnými látkami, vypouštěnými do vodního prostředí. Podle této směrnice náleží dusitany do Seznamu II, který obsahuje látky, které mají zhoubný účinek na vodní prostředí.

NÁRODNÍ LEGISLATIVA

Hlavním legislativním nástrojem v ČR upravujícím zastoupení dusitanů ve vodním prostředí je Nařízení vlády č. 229/2007 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech. Toto nařízení stanovuje emisní standardy pro koncentrace dusitanů v odpadních vodách vypouštěných z vybraných průmyslových odvětví, imisní standardy pro koncentrace dusitanů v povrchových vodách. Pro lososové vody je stanovena cílová hodnota $0,3 \text{ mg.l}^{-1}$ a pro kaprové vody $0,45 \text{ mg.l}^{-1}$.

Dusitany jsou v příloze č. 1 Zákona č. 254/2001 Sb., o vodách, v platném znění, uvedeny jako nebezpečná závadná látka (látky mající nepříznivý vliv na kyslíkovou rovnováhu).

2.3.3 MECHANISMUS PŘÍJMU DUSITANŮ RYBAMI

PŘÍJEM DUSITANŮ SLADKOVODNÍMI RYBAMI

Sladkovodní ryby a korýši jsou hyperosmotičtí vůči prostředí ve kterém žijí, a proto aktivně přijímají ionty žábrami, aby vyrovnali jejich ztrátu močí a pasivním odtokem kůží. Aktivní příjem iontů je spojen s tzv. chloridovými buňkami žaber (Maetz, 1971). Dusitanové ionty se vstřebávají do organismu ryb právě přes tyto buňky (Svobodová et al., 2007).

Problémy s dusitany u sladkovodních organismů pramení ze skutečnosti, že NO_2^- má určitou afinitu k iontové výměně $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ v žábrech. V přítomnosti dusitanů v okolní vodě je část příjmu Cl^- nahrazena příjmem NO_2^- (ryba přijímá dusitany na úkor chloridů).

Teorie společného mechanismu příjmu NO_2^- a Cl^- je také podporována skutečností, že ryby s vyšší intenzitou příjmu Cl^- iontů přes žábry (např. pstruh duhový, štika obecná, okoun říční) jsou vnímavější k dusitanům, než druhy s nízkou intenzitou příjmu (úhoř říční, kapr obecný, lín obecný) (Williams a Eddy, 1986; Williams a Eddy, 1988). Tato fakta vysvětlují, proč zvýšené koncentrace Cl^- v okolní vodě chrání ryby před příjmem dusitanů (Bath a Eddy, 1980) a jejich toxickými účinky (Perrone a Meade, 1977). Přidávání chloridů do vody je skutečně významná metoda ochrany sladkovodních ryb před dusitany.

PŘÍJEM DUSITANŮ MOŘSKÝMI RYBAMI

Dusitany jsou obecně méně toxické v mořské vodě než ve sladké. Souvisí to s vysokou koncentrací chloridů v mořské vodě a s rozdílnou osmoregulací ryb žijících v mořské a sladké vodě. Mořské ryby z nadřádu kostnatých jsou hypoosmotické vzhledem k prostředí a čelí problémům pasivního přechodu Cl^- a Na^+ přes žábry. Ryby ztrácí vodu celým povrchem těla, přijímají mořskou vodu, vylučují malé množství moči a přes žaberní aparát vylučují aktivním transportem ionty Na^+ a Cl^- (Evans et al., 1999). Pití mořské vody na druhé straně otvírá možnost pro absorpci dusitanů přes střevní epitel. Koncentrace dusitanů v přední části střeva se podobá té v okolní vodě, ale v zadních částech střeva se postupně snižuje. Příjem dusitanů střevní cestou odpovídá dvou třetinám z celkového příjmu rybou (Grosell a Jensen, 2000). Zbývající část dusitanů je přijímána přes žábry (Evans et al., 1999).

2.3.4 ÚČINKY DUSITANŮ NA RYBY

VLIV DUSITANŮ NA IONTOVOU ROVNOVÁHU

Dusitany způsobují vyplavování draslíku z kosterního svalstva a z červených krvinek, což se projevuje zvýšením koncentrace draselných iontů v krevní plasmě (Jensen et al., 1987). Vyplavování draselných iontů z červených krvinek způsobuje jejich smršťování, které je spojeno se snížením afinity hemových funkčních skupin ke kyslíku (Jensen, 1990), dále vede ke snížení rozpustnosti hemoglobinu a následně i ke strukturnímu poškození erytrocytů (Jensen et al., 1987). Významné zvýšení koncentrace extracelulárního draslíku bylo pozorováno například u kapra obecného (Jensen et al., 1987), platýse velkého (Grosell a Jensen, 2000), vnímavějších jedinců pstruha duhového (Stormer et al., 1996; Vedel et al., 1998) a u jesetera sibiřského (Huertas et al., 2002).

Zvýšení extracelulární koncentrace draslíku má nepříznivý vliv na činnost srdce a může následně způsobit i jeho selhání. Naopak snížení intracelulární koncentrace draslíku může negativně ovlivňovat funkci svalů a svalový metabolismus (Jensen, 2003). Dusitany dále vyvolávají např. hyponatremii (pokles koncentrace iontu Na^+), hypochloremii (snížení koncentrace chloridů) (Jensen et al., 1987) a inhibici příjmu chloridů z okolní vody (Williams a Eddy, 1986).

Vliv dusitanů na koncentraci ostatních iontů není tak významný, jejich koncentrace zůstávají nezměněné nebo dochází k mírnému snížení nebo zvýšení. (Jensen et al., 1987; Stormer et al., 1996; Grosell a Jensen, 2000).

VLIV DUSITANŮ NA TRANSPORT KYSLÍKU KRVÍ

Přechod dusitanů do červených krvinek vede k oxidaci funkčního hemoglobinu (Fe^{2+}) na methemoglobin (Fe^{3+}), který nemůže vázat kyslík (Kiese, 1974; Kosaka a Tyuma, 1987; Jensen, 1990). Zvýšená koncentrace methemoglobinu proto způsobuje snížení koncentrace kyslíku v krvi (Jensen et al., 1987).

Pokud je ryba v klidu, může snést relativně vysokou úroveň methemoglobinu, protože má velmi nízkou spotřebu kyslíku. Je-li ryba postižená methemoglobinemií nucena k aktivitě, může uhynout na anoxii (Huey, 1980). Pokles obsahu O_2 v krvi vytváří problémy se zajištěním dostatečného přísunu O_2 do tkání ryby. V důsledku tkáňové hypoxie pak může docházet k histopatologickým změnám v některých orgánech (např. v játrech, slezině) (Arillo et al., 1984). Další komplikace vycházejí z přílivu dusitanů do různých tkání (Margiocco et al., 1983), kde reagují s myoglobinem (Nichols a Weber, 1989; Doeller a Wittenberg, 1991) a cytochomy (Paitian et al., 1985) a způsobují poruchu buněčného transportu kyslíku a výměny látek.

Celkový nedostatek kyslíku vede také ke zrychlenému dýchání ryb. Pstruh duhový a kapr obecný, vystavený dusitanům, vykazovali postupné zvýšení frekvence dýchání (Aggergaard a Jensen, 2001).

VLIV NA KARDIOVASKULÁRNÍ FUNKCE

Dusitany ovlivňují kardiovaskulární systém. Odpovědí na sníženou schopnost přenosu O_2 v krvi je zrychlená srdeční činnost. Dalším faktorem, který může zvýšit činnost srdce, je zvýšená koncentrace extracelulárního draslíku (Nichols a Weber, 1989). Dusitany jsou navíc i při nízkých koncentracích v plazmě zdrojem biologicky využitelného oxidu dusnatého, který je dobře známým vasodilatátorem (Aggergaard a Jensen, 2001).

ZMĚNY BIOCHEMICKÝCH PARAMETRŮ KREVNÍ PLASMY RYB PO OTRAVĚ DUSITANY

Tab. 1. Přehled změn biochemických parametrů vyvolaných po otravě dusitany.

Parametr	Druh ryby									
	<i>Clarias lazera</i>	<i>Lagodon rhomboides</i>		<i>Ictalurus punctatus</i>	<i>Brycon cephalus</i>			<i>Lates calcalifer</i>		
Konc. NO ₂ ⁻ (mg.l ⁻¹)	2,8 – 3,2	1,3	20	2	0,2	0,4	0,6	98,5	164,2	262,7
Na ⁺ (mmol.l ⁻¹)	ø	ø	ø	ø	↑	↑	↑	↑	↑	↑
K ⁺ (mmol.l ⁻¹)	ø	ø	ø	ø	↑	↑	↑	o	o	o
Ca ²⁺ (mmol.l ⁻¹)	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	o	o	o
Cl ⁻ (mmol.l ⁻¹)	ø	ø	ø	ø	↑	↑	↑	↑	↑	↑
glukóza (mmol.l ⁻¹)	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	↓	↓	↓
laktát (mmol.l ⁻¹)	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	↑	↑	↑
proteiny (g.l ⁻¹)	ø	ø	ø	ø	↑	↓	↑	o	o	↑
amoniak (mmol.l ⁻¹)	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	↑	↑	↑
močovina (mmol.l ⁻¹)	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	↑	↑	↑
ALT, AST (U.l ⁻¹)	↑	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
ALP (U.l ⁻¹)	ø	↑	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
cholesterol (mmol.l ⁻¹)	ø	ø	↓	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
kortizol (µmol.l ⁻¹)	ø	ø	ø	↑	ø	ø	ø	ø	ø	ø
triglyceridy (mmol.l ⁻¹)	ø	ø	↓	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
Konc. Cl⁻	ø	~ 11,5 g.l ⁻¹		~ 10 mg.l	0,294 mg.l ⁻¹			~ 19 g.l ⁻¹		
Délka expozice	2-5 měs.	48 h		24 h	24 h			4 dny		
Autor	Michael et al., 1987	Folmar et al., 1993		Tomasso et al., 1981	Avilez et al., 2004			Woo a Chiu, 1997		

Pozn.: Změny biochemických parametrů jsou uvedeny vzhledem ke kontrolní skupině ryb, ↑↓ - zvýšení nebo snížení hodnoty, o – beze změny, ø - parametr nebyl sledován.

ENDOKRINNÍ PORUCHY

Skutečnost, že oxid dusnatý může být produkován z dusitanů, otvírá možnost, že dusitany mohou zasahovat do několika procesů, které jsou ovlivňovány tímto lokálním hormonem, včetně rozšíření cév, neurotransmise (přenos impulsu z neuronu na neuron) a

imunitní funkce. Produkce oxidu dusnatého z dusitanů byla pozorována za nízkého pH, hypoxie a za vysokého obsahu NO_2^- (Zweier et al., 1999).

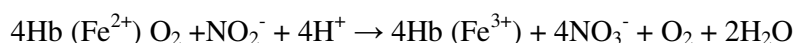
VLIV DUSITANŮ NA VYLUČOVACÍ SOUSTAVU

Během expozice dusitanům pravděpodobně dochází i ke změnám v metabolismu a vylučování dusíku u ryb. Zda se však tento vliv projeví, závisí pravděpodobně na stupni otravy dusitany (Jensen, 2003). Konkrétně k určitému zvýšení množství amoniaku vyloučeného žábry a močí dochází během otravy dusitany u pstruha duhového (Zachariasen, 2001).

DETOXIKACE DUSITANŮ

Červené krvinky ryb obsahují enzym reduktázu, který přeměňuje methemoglobin na hemoglobin (Camron, 1971; Huey a Beitinger, 1982). Díky tomuto procesu po přenesení ryb do čisté vody obsah methemoglobinu v krvi dosáhne fyziologických hodnot během 24 až 72 hodin (Huey et al., 1980; Knudsen a Jensen, 1997), pokud není otrava dusitany již v pozdním stádiu.

Vodní živočichové jsou schopni detoxikovat dusitany oxidací na netoxické dusičnany (Jensen, 1996; Doblender a Lackner, 1996; Stormer et al., 1996; Doblender a Lackner, 1997). Schopnost detoxikace je závislá na nasycení hemoglobinu kyslíkem. Okysličené červené krvinky pstruha detoxikují dusitany na dusičnany, zatímco anoxické červené krvinky ne (Doblender a Lackner, 1997). Mechanismus oxidace dusitanů na dusičnany (přeměna hemoglobinu na methemoglobin) probíhá dle rovnice:



Každá molekula hemoglobinu se může účastnit několika oxidačně-redukčních cyklů a tím může pomoci snížit nepříznivý účinek dusitanů. Část detoxikace se také uskutečňuje v játrech. Jaterní buňky pstruha duhového mají schopnost oxidovat dusitany na dusičnany (Doblender a Lackner, 1996).

2.3.5 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TOXICITU DUSITANŮ PRO RYBY

Toxicita dusitanů pro ryby je rozdílná. Letální koncentrace se pohybují v rozmezí 0,3 až 300 mg.l^{-1} NO_2^- v závislosti na mnoha vnitřních a vnějších faktorech (Svobodová et al., 2007). Mezi nejdůležitější faktory ovlivňující toxicitu dusitanů pro ryby patří kvalita vody (pH, teplota, koncentrace kationů, anionů a kyslíku), druh a věk ryb, individuální citlivost, délka expozice a další (Svobodová et al., 1992).

DRUH RYB

Citlivost k dusitanům se velmi liší podle druhu ryb. Nejcitlivější ze studovaných čeledí jsou lososovití, rozdíly mezi jednotlivými druhy jsou minimální. Výrazné rozdíly v citlivosti jsou mezi teplomilnými rybami. Velmi odolný vůči dusitanům je např. okounek pstruhový (*Micropterus salmoides*) (Palachnek a Tomaso, 1984).

VĚK A VELIKOST RYB

Mnoho studií ukázalo, že mladší věková stádia jsou méně citlivá k toxickým účinkům dusitanů než starší a dospělí jedinci. Tyto rozdíly mohou být pravděpodobně způsobeny rozdílnou aktivitou methemoglobin reduktázy u mladých a dospělých jedinců (Kiese, 1974). Rozdílná citlivost plůdku a dospělých jedinců může být dále vysvětlena i tím, že rybí plůdek nemá ještě plně vyvinut žaberní aparát a dýchá především kůží. Například mladý losos o hmotnosti do 2,5 až 4,0 g přijímá kyslík až z 96 % kůží. Kyslík přijímaný kůží je schopen u mladých jedinců lépe proniknout do vnitřních tkání než u dospělých (Rombough a Moroz, 1990).

INDIVIDUÁLNÍ CITLIVOST

Citlivost ryb vůči dusitanům může být u některých druhů výrazně individuální. Rozdíly v citlivosti mezi jedinci se vyskytují u pstruha duhového. Citlivější jedinci jsou více postiženi fyziologickými poruchami a vykazují dřívější mortalitu (Stormer et al., 1996, Aggergaard a Jensen, 2001). Tato individuální citlivost může být vysvětlena v rozdílném počtu chloridových buněk žaber a v rozdílné velikosti exponovaného povrchu mezi těmito citlivějšími a odolnějšími jedinci (Aggergaard a Jensen, 2001).

DÉLKA EXPOZICE

- Krátkodobá expozice: Pro maximální akumulaci dusitanů v rybách postačuje pouze 24 – 48 hodinová expozice (Huey et al., Eddy et al., 1983). Tomu odpovídají poznatky autorů Lewis a Morris (1986), kteří uvádějí, že hodnota LC50 zjištěná za 24 až 96 hodin se příliš nemění (klesá jen velmi pomalu). Z toho vyplývá, že relativní doba expozice pro krátkodobé testy toxicity je 24 až 96 hodin jako v případě jiných toxických látek.
- Dlouhodobá expozice: Toxické účinky při expozici delší než 96 hodin je možno kvantifikovat pomocí sledování úhynů ryb, rychlosti růstu, poškození tkání a vlivu na biochemické a hematologické ukazatele. Několik studií prokázalo, že se LC50 dusitanů po 8 dnech expozice asymptoticky blíží přibližně 60 % 96hLC50. Maximální

koncentrace dusitanů, při které nebyl zaznamenán žádný úhyn, je v podstatě stejná při devadesáti šestihodinové jako při osmidenní expozici a pohybuje se v rozmezí od 30 do 50 % 96hLC50 (Russo et al., 1974).

KVALITA VODY

- **Chloridy:** Nejvýznamnějším faktorem ovlivňující toxicitu dusitanů je koncentrace chloridů ve vodě. Mezi ionty chloridů a dusitanů existuje kompetice na chloridových buňkách. V případě vyšší koncentrace chloridů ve vodě jsou chloridové buňky obsazeny a vstřebávání dusitanů je sníženo. Pro posouzení toxicity dusitanů pro ryby se proto doporučuje sledovat hmotnostní poměr koncentrace chloridů a N-NO_2^- . Podle doporučení EIFAC by v chovu lososovitých ryb tento poměr neměl klesnout pod 17 a v chovu ostatních ryb pod 8 (EIFAC, 1984).
- **Ostatní aniony a kationy:** Bylo zjištěno, že bromidy, které jsou chloridům chemicky podobné, dokáží potlačit toxický vliv dusitanového dusíku téměř stejně účinně jako chloridy (Eddy et al., 1983). Určitý vliv mají také hydrogenuhličitany a dusičnany, ale nejsou tak efektivní jako chloridy a bromidy (Lewis a Morris, 1986). Vysoké koncentrace vápníku snižují ztrátu chloridů žábami a tím se také snižuje příjem dusitanů (Krous et al., 1982).
- **Kyslík:** Koncentrace kyslíku může ovlivnit toxicitu dusitanů, protože dusitany snižují kapacitu krve pro transport kyslíku. Nedostatečný obsah kyslíku ve vodě může tedy ještě zhoršit zdravotní stav ryb. Pokus provedený se sumci prokázal, že koncentrace 5 mg.l^{-1} nebyla v přítomnosti dusitanů dostačující, ačkoliv sumci běžně tolerují i koncentrace nižší (Bowser et al., 1983).
- **pH:** Vliv koncentrace H^+ iontů na toxicitu dusitanů je stále velmi nejasný. Pro manipulaci s pH se totiž používají pufrы, které mění aniontové pozadí, takže je potom obtížné vyjádřit samotný vliv pH. Dalším problémem je používání rozsahu pH, který je mimo normální rozsah schopnosti adaptace ryb (Lewis a Morris, 1986). Zdá se, že pro běžné hodnoty pH vyskytující se v přírodě, kdy byl vliv různého aniontového pozadí vzat v úvahu, je vliv samotných hodnot pH na toxicitu malý.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 TEST AKUTNÍ TOXICITY NA SUMCI VELKÉM

(*Silurus glanis*)

CÍL TESTU

Cílem testu akutní toxicity na sumci velkém bylo:

- sledovat vliv dusitanů na chování a přežívání ryb.
- získat hodnoty LC50 pro tyto ryby.

METODIKA TESTU

Na sumci velkém byl proveden test:

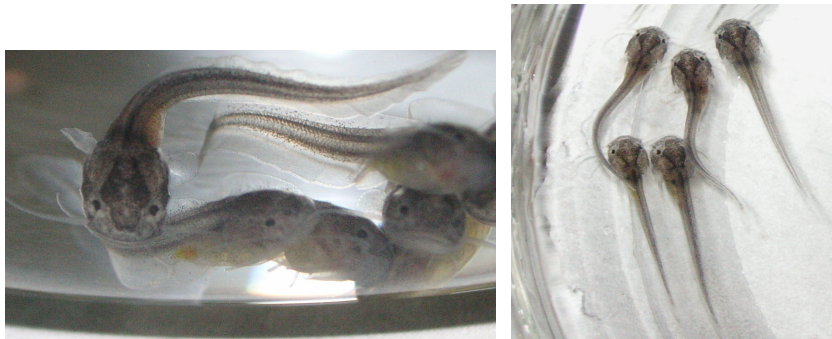
- Test akutní toxicity. Test byl prováděn podle norem **ČSN EN ISO 7346-2** Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby – Obnovací (semistatická metoda) a **OECD** Guideline for Testing of Chemicals 203 Fish, Acute Toxicity Test.

Princip testu

Test spočívá ve sledování chování a mortality ryb v odstupňovaných koncentracích testované látky po dobu 96 hodin. Na základě získaných hodnot mortality ryb v jednotlivých koncentracích a v kontrole v průběhu testu se probitovou analýzou vypočítají letální koncentrace LC50 za dobu 96 hod (96hLC50).

Přístroje, pomůcky a materiál

- Testovací organismus: sumec velký *Silurus glanis* (Teleostei, Siluridae), v rozmezí délek 12 – 14 mm (Obr. 1). Ryby byly do jednotlivých testovacích nádrží vybírány náhodně.



Obr. 1 Sumec velký (*Silurus glanis*)

- Ředící voda: jako ředící voda byla použita odstátá vodovodní voda, která měla následující vlastnosti: pH 7,2 ; $\text{KNK}_{4,5}$ 0,5 mmol.l^{-1} ; CHSK_{Mn} 2,2 mg.l^{-1} ; $\Sigma\text{Ca+Mg}$ 14,0 mg.l^{-1} ; N-NH_4^+ 0,03 mg.l^{-1} ; N-NO_3^- 5,2 mg.l^{-1} ; N-NO_2^- 0,01 mg.l^{-1} ; Cl^- 11,0 mg.l^{-1} ; SO_4^{2-} 51,5 mg.l^{-1} ; P-PO_4^{3-} 0,01 mg.l^{-1} .
- Přístroje a pomůcky: oximetr, pH metr, laboratorní nádobí, analytické a laboratorní váhy, síťky a další pomůcky pro manipulaci s rybami.
- Chemikálie: dusitaný byly aplikovány do lázní ve formě dusitanu sodného (NaNO_2 p.a.).

Podmínky testu

- Délka expozice: 96 hod.
- Délka adaptační fáze: 48 hod před pokusem.
- Objem lázně: 200 ml.
- Výměna lázně: po 48 hod.
- Osvětlení: 12 hodin denně.
- Teplota vody: $t = 23 \pm 2$ °C.
- Nasycení vody kyslíkem: $\text{O}_2 > 60$ %.
- Počet testovaných ryb: 20 ks v jedné koncentraci v základním testu.

Průběh testu

Test akutní toxicity byl proveden třemi paralelními testy (A, B a C):

- Základní test: dvacet náhodně vybraných ryb bylo umístěno do kádinek o objemu 200 ml. Pokusné ryby byly vystaveny sedmi koncentracím dusitanů ve formě NaNO_2 na dobu 96 hod (Tab. 2).

Tab. 2 Koncentrace dusitanů použité v testu akutní toxicity na sumci velkém.

Číslo nádrže	1	2	3	4	5	6	7	K
Koncentrace NaNO_2 (mg.l^{-1})	15	30	45	75	120	150	225	-
Koncentrace NO_2^- (mg.l^{-1})	10	20	30	50	80	100	150	-

Vyhodnocení výsledků

Na základě získaných hodnot mortality v jednotlivých koncentracích v průběhu základního testu byly výsledky vyhodnoceny probitovou analýzou. K výpočtům byl použit program EKO-TOX 5.1 (INGEO Liberec).

3.1.1 VÝSLEDKY

Klinické příznaky otravy: ryby *Silurus glanis* po styku s lázní dusitanů vyjížděly k hladině, poté se shromažďovaly u dna, kde zůstávaly bez pohybu. V nádržích s nižší koncentrací testované látky se vyskytovaly úhyny v nižším počtu než ve stoupající koncentrační řadě. Ve vyšších koncentracích byly ryby neklidné, vyjížděly k hladině, reagovaly křečovitými záchvěvy těla. Poté ryby hynuly břichem vzhůru nebo v boční poloze na dně zkušební nádoby (Obr. 2). Záznamy úhynů ryb a výsledky paralelních testů A – C jsou uvedeny v příloze (Tab. 1 – 3, Obr. 1 – 3).



Obr. 2 Úhyny ryb *Silurus glanis*

Bližší podmínky průběhu paralelních testů A, B a C jsou uvedeny v příloze (Tab. 4 – 6). V kontrolních nádržích nebyla v průběhu testů zjištěna mortalita ryb ani výrazné změny v chování.

Z výsledků mortality ryb *Silurus glanis* v testu akutní toxicity byla vypočtena hodnota letální koncentrace **96hLC50** = 15,3 mg.l⁻¹ NO₂⁻.

3.2 TEST SUBCHRONICKÉ TOXICITY NA PSTRUHU

DUHOVÉM (*Oncorhynchus mykiss*)

CÍL TESTU

Cílem testu subchronické toxicity na rybách pstruha duhového bylo:

- sledovat změnu růstové rychlosti ryb vystavených různým koncentracím dusitanů po dobu 28 dní.
- stanovit hodnotu nejvyšší koncentrace dusitanů, při níž nebyl pozorovaný žádný účinek na růstovou rychlost (NOEC) při expozici trvající 28 dní.
- stanovit hodnotu nejnižší koncentrace testovaného vzorku, při které byl pozorován účinek na růstovou rychlost (LOEC) při expozici trvající 28 dní.
- stanovit vliv dlouhodobé expozice ryb subletálním koncentracím dusitanů na biochemické ukazatele krevní plasmy.
- porovnat získané informace o působení zvolených koncentrací dusitanů s cílovými hodnotami koncentrací dusitanů v povrchových vodách uváděnými v naší tehdy platné legislativě (nařízení vlády č. 229/2007 Sb.) a evropské legislativě (směrnice EU č. 78/659/EHS).

METODIKA TESTU

Test subchronické toxicity byl proveden ve dvou krocích, kdy v první fázi - v testu akutní toxicity - byly stanoveny koncentrace vhodné pro následující test subchronické toxicity:

- 1) Test akutní toxicity. Test byl prováděn podle norem **ČSN EN ISO 7346-2** Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby – Obnovovací (semistatická metoda) a **OECD** Guideline for Testing of Chemicals 203 Fish, Acute Toxicity Test.
- 2) Test subchronické toxicity (růstový test). Test byl prováděn podle norem **ČSN 10229** Jakost vod – Stanovení subchronické toxicity látek pro sladkovodní ryby – Metoda vyhodnocení účinku látek na růstovou rychlost pstruha duhového *Oncorhynchus mykiss* (Teleostei, Salmonidae) – Obnovovací (semistatická) metoda a **OECD** Guideline for Testing of Chemicals 215 Fish, Juvenile Growth Test.

Testy toxicity byly prováděny v toxikologické laboratoři VÚRH JU Vodňany akreditované Českým institutem pro akreditaci, o.p.s. pro testy akutní toxicity na vodních

organismech. Testování bylo prováděno v souladu se zněním Zákona č. 77/2004 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a dále Vyhlášky MZe ČR č.311/1997 Sb. o chovu a využití pokusných zvířat.

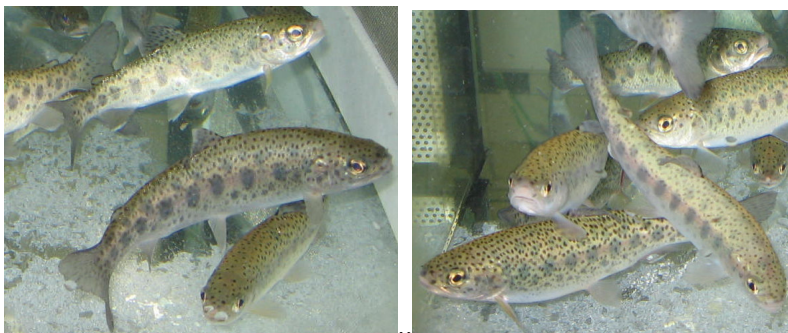
TEST AKUTNÍ TOXICITY

Princip testu

Test spočívá ve sledování chování a mortality ryb v odstupňovaných koncentracích testované látky po dobu 96 hod. Ryby se nasazují do ředící vody s rozpuštěnou testovanou látkou a současně se nasazuje kontrola, kdy se ryby nasazují do ředící vody bez testované látky. Na základě získaných hodnot mortality ryb v jednotlivých koncentracích a kontrole v průběhu testu se probitovou analýzou vypočítá střední letální koncentrace 96hLC50 pro dusitany.

Přístroje, pomůcky a materiál

- Testovací organismus: pstruh duhový *Oncorhynchus mykiss* (Teleostei, Salmonidae) (Obr. 3). Počáteční hmotnost ryb byla $19 \pm 0,3$ g. Pstruh byl vybrán k testu jako zástupce lososovitých ryb, které jsou obecně velmi citlivé k nepříznivým podmínkám prostředí.



Obr. 3. Pstruh duhový *Oncorhynchus mykiss*

- Ředící voda: jako ředící voda byla použita odstátá vodovodní voda, která měla následující vlastnosti: pH 7,2; $\text{KNK}_{4,5}$ 0,5 mmol.l^{-1} ; CHSK_{Mn} 2,2 mg.l^{-1} ; $\Sigma\text{Ca+Mg}$ 14,0 mg.l^{-1} ; N-NH_4^+ 0,03 mg.l^{-1} ; N-NO_3^- 5,2 mg.l^{-1} ; N-NO_2^- 0,01 mg.l^{-1} ; Cl^- 11,0 mg.l^{-1} ; SO_4^{2-} 51,5 mg.l^{-1} ; P-PO_4^{3-} 0,01 mg.l^{-1} .

- Chemikálie: dusitany byly aplikovány do lázní ve formě dusitanu sodného (NaNO₂ p.a.).
- Přístroje a pomůcky: oximetr, pH metr, laboratorní nádobí, analytické a laboratorní váhy, zkušební nádrže, sítky a další pomůcky pro manipulaci s rybami.

Podmínky testu

- Délka expozice: 96 hod.
- Délka adaptační fáze: 48 hod před pokusem.
- Objem lázně: 20 litrů.
- Výměna lázně: po 24 hod.
- Osvětlení: 12 hodin denně.
- Teplota vody: 14 – 15,5 °C.
- Nasycení vody kyslíkem, O₂ > 60 %.
- Počet testovaných ryb: 3 ks v jedné koncentraci v předběžném testu, 7 ks v jedné koncentraci v základním testu.
- Krmení ryb: během aklimatizační fáze a během pokusu nebyly ryby krmeny.

Průběh testu

Test akutní toxicity byl proveden ve dvou stupních, oběma testům předcházela adaptace ryb:

- 1) předběžný test.
 - 2) základní test.
- Předběžný test: do sedmi odstupňovaných koncentrací dusitanů (Tab. 3) se nasazovalo po 3 kusech náhodně vybraných ryb. Stejným způsobem se nasazovala i kontrola. Po 24 hodinách se ryby přelovovaly do nově připravených vytemperovaných roztoků testované látky. Na počátku testu a následně každých 24 hodin se měřila teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. V průběhu trvání předběžného testu se sledovala a zaznamenávala mortalita a chování ryb. Na základě výsledků se volily koncentrace testované látky pro základní test.

Tab. 3 Koncentrace dusitanů použité v předběžném a základním testu.

Číslo nádrže	1	2	3	4	5	6	7	K
Koncentrace NaNO ₂ (mg.l ⁻¹)	5	10	25	50	100	200	300	-
Koncentrace NO ₂ ⁻ (mg.l ⁻¹)	3,3	6,7	16,7	33,3	66,7	133,3	200	-

- Základní test: sedm náhodně vybraných ryb bylo umístěno do akvárií o objemu 20 litrů. Pokusné ryby byly vystaveny sedmi koncentracím dusitanů po dobu 96 hod. Dále test probíhal stejným způsobem jako předběžný test.

Vyhodnocení výsledků

Na základě zjištěné mortality ryb v jednotlivých koncentracích v průběhu základního testu byly výsledky vyhodnoceny probitovou analýzou. K výpočtům byl použit program EKO-TOX 5.1 (INGEO Liberec).

TEST SUBCHRONICKÉ TOXICITY

Princip testu

Podstatou testu je sledování změn růstové rychlosti pokusné populace pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) vystavené testované látce po dobu 28 dnů. Pokusné ryby jsou náhodně vybírány z populace jednotného původu. V průběhu testu se sleduje chování ryb, příjem krmiva, mortalita a na začátku, uprostřed a na konci testu hmotnost ryb v jednotlivých koncentracích testované látky. Současně se nasazuje kontrola, kdy se ryby nasazují do ředící vody bez testované látky. Na základě zjištěných rozdílů hmotnosti ryb na počátku a na konci testu se vypočítá rychlost a inhibice růstu ryb v jednotlivých koncentracích, které se porovnávají s kontrolou. Na základě zjištěných hodnot se probitovou analýzou vypočítají koncentrace NOEC a LOEC.

Přístroje, pomůcky a materiál.

- Testovací organismus: pstruh duhový *Oncorhynchus mykiss* (Teleostei, Salmonidae). Počáteční hmotnost ryb byla $19 \pm 0,3$ g. Uvedená počáteční hmotnost ryb byla zvolena tak, aby ryby v kontrolní skupině po 28 dnech dosáhly přírůstku hmotnosti

alespoň o 50 % a zároveň, aby bylo možné v závěru testu odebrat dostatečné množství krve na stanovení vybraných biochemických parametrů.

- Ředící voda: viz akutní test.
- Chemikálie: dusitany byly aplikovány do lázní ve formě dusitanu sodného (NaNO_2 p.a.).
- Přístroje a pomůcky: oximetr, pH metr, laboratorní nádobí, analytické a laboratorní váhy, síťky a další pomůcky pro manipulaci s rybami.

Podmínky testu

- Délka expozice: 28 dní.
- Délka adaptační fáze: 14 dnů před pokusem.
- Objem lázně: 100 litrů.
- Výměna lázně: po 24 hod.
- Osvětlení: 12 hodin denně.
- Teplota vody: t 14 – 15,5 °C.
- Nasycení vody kyslíkem: $\text{O}_2 > 70 \%$.
- Počet testovaných ryb: 20 ks ryb v jedné nádrži.
- Krmení ryb: denně.

Ryby, které byly použity k testu, byly chovány po dobu 14 dní pře zahájením testu ve 200 l akváriích v ředící vodě, nepřetržitě probublávané vzduchem, v podmínkách jakosti vody, režimu krmení a osvětlení, podobných jako při zkoušce.

V průběhu adaptační fáze a základní zkoušky byli pstruzi krmeni komerční dietou pro plůdek lososovitých ryb Biomar (47 % proteinu, 26 % tuku) každých 24 h množstvím 2,5 % celkové tělesné hmotnosti.

Průběh testu

Subchronický test byl proveden obnovovací metodou s výměnou lázně po 24 hodinách. Dvacet pokusných ryb bylo umístěno do 100 l nádrží a vystaveno po dobu 28 dnů koncentrační řadě dusitanů ve dvou opakováních pro každou koncentraci. V tabulce 4 jsou uvedeny koncentrace dusitanů, které byly zvoleny na základě výsledků testu akutní toxicity na pstruhu duhovém a doplněné o cílové hodnoty koncentrací dusitanů v

povrchových vodách dle směrnice EU (pro lososové vody $0,01 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$) a naší legislativy (pro lososové vody $0,6 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ – podle nařízení vlády č. 61/2003 Sb.).

Tab. 4 Koncentrace dusitanů použité v testu subchronické toxicity na pstruhu duhovém.

Skupina ryb	P1	P2	P3	P4	P5	K
Koncentrace NaNO_2 (mg.l^{-1})	0,015	0,15	0,9	1,5	4,5	-
Koncentrace NO_2^- (mg.l^{-1})	0,01	0,1	0,6	1,0	3,0	-

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

Požadovaných koncentrací dusitanů bylo dosaženo dávkováním NaNO_2 do vody. Koncentrace dusitanů byly denně kontrolovány a naměřené hodnoty se nelišily od stanovených hodnot pro tento test o víc než 10 %. Zkušební lázně byly mírně provzdušňovány. Nasycení vody kyslíkem a pH bylo měřeno denně. Teplota vody v jednotlivých nádržích byla zaznamenávána ve 4 hodinových intervalech registračním teploměrem RT – F52 (Qi Analytical, Czech Republic).

Během pokusu bylo zaznamenáváno chování ryb, jejich ochota přijímat krmivo a počet uhynulých ryb. Jednotlivé ryby byly váženy (s přesností na 0.1 g) na začátku testu a po 14 denní expozici. Po 28 denní expozici byla sedmi kusům ryb z každé nádrže odebrána krev na stanovení biochemického profilu plasmu a koncentrace dusitanů v krevní plasmě. Krev byla odebírána z *v. caudalis*. Poté byly ryby zabity přetnutím míchy, označeny a jednotlivě zváženy. Dále byly odebírány vzorky svaloviny na stanovení koncentrace dusitanů.

Biochemická vyšetření

Vzorky krve byly stabilizovány s 40 IU heparinu na 1 ml krve. Krevní plazma byla odstředěna (10 min – $12\,000\times g$) při $4\text{ }^\circ\text{C}$. Byly odebrány vzorky svalové tkáně přibližně 1 g pro analýzu koncentrace dusitanů. Vzorky byly až do analýzy uloženy v $-80\text{ }^\circ\text{C}$, aby se zabránilo oxidaci dusitanů.

K biochemickým analýzám krevní plasmy ryb byl využit analyzátor krve VETTEST 8008 a COBAS EMIRA (část analýz byla prováděna v Analytické laboratoři VFU Brno). Byly měřeny následující parametry: koncentrace iontů (draslík, sodík, chloridy), glukózy (GLUC), laktátu (LACT), celkové bílkoviny (TP), cholesterolu (CHOL), amoniaku (NH_3), močoviny (UREA), kyseliny močové (URIC), enzymů ALT (alanin aminotransferáza), ALP (alkalická fosfatáza), AST (aspartát aminotransferáza), CK (kreatin kináza).

Mikrometoda stanovení dusitanů v krevní plasmě a svalovině ryb

- Přístroje: spektrofotometr Specord 210 (1 cm kyveta), centrifuga (15 000 ot./min).
- Chemikálie: roztok kyseliny sulfanilové, roztok „Cleve’s acid“ (kyselina 1-naftylamin-7-sulfonová), zásobní roztok dusitanu sodného, roztok standardu, roztok síranu zinečnatého.

- Postup: odebrané vzorky plasmy a svaloviny byly analyzovány při 4 °C. Stanovení bylo provedeno v následujících krocích:
 - deproteinizace – 0,1 ml krve (0,1 g svaloviny) bylo převedeno do 1,5 ml zkumavky obsahující 0,6 ml roztoku síranu zinečnatého. Dále bylo přidáno 0,4 ml dvakrát destilované vody a roztok byl důkladně promíchán (přístroj Vortex-Genie). Dále bylo přidáno 0,1 ml 4 % (w/v) vodného roztoku hydroxidu sodného, směs promíchána a následně chlazena (na ledu) po dobu jedné hodiny. Sražené bílkoviny byly odstraněny pomocí centrifugy (2 min při 15 000 ot./min).
 - barevná reakce – 0,6 ml takto vzniklého roztoku (viz. výše) bylo převedeno do zkumavky (100/10) obsahující 0,4 ml dvakrát destilované vody, roztok byl důkladně promíchán, poté bylo přidáno 0,1 ml roztoku kys. sulfanilové. Roztok byl následně ponechán 15 minut na ledu (proběhla diazotace). Poté bylo přidáno 0,1 ml roztoku „Cleve’s acid“ a roztok byl nechán 60 min při pokojové teplotě (proběhla kopulační reakce). Přítomnost dusitanů ve vzorku se projevila vznikem komplexu červeno-fialového zbarvení. Intenzita zbarvení byla měřena spektrofotometrem při 520 nm.
 - příprava kalibrační přímky – několik alikvotních podílů roztoku standardu (až do 0,5 ml) bylo převedeno do mikrozkumavek obsahujících 0,6 ml roztoku síranu zinečnatého. Dále se postupovalo stejným způsobem jako při analýze vzorků (viz výše). Jako slepý roztok byla použita dvakrát destilovaná voda.

Vyhodnocení výsledků

Koncentrace dusitanů v plasmě a svalovině

Koncentrace dusitanů ve vzorcích plasmy se odečítaly z kalibrační křivky, která byla získána proměřením sady standardních roztoků o známé koncentraci. Zjištěné hodnoty absorbancí standardních roztoků byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci dusitanů.

Průměrná specifická rychlost růstu ryb (r)

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

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

kde r = průměrná specifická míra růstu pro nádrž.

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

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

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

Inhibice specifické růstové rychlosti (I)

Inhibice specifické růstové rychlosti v % pro jednotlivé nádrže byla stanovena jako podíl mezi rozdílem průměrné specifické rychlosti růstu kontroly a experimentální skupiny a průměrné specifické rychlosti růstu v kontrole po 28 dnech expozice, násobený stem:

$$I (\%) = \frac{r (\text{kontrola}) - r (\text{skupina})}{r (\text{kontrola})} \cdot 100$$

kde I = inhibice specifické růstové rychlosti experimentálních skupin ryb po 28 dnech expozice.

r (kontrola) = průměrná specifická růstová rychlost v kontrole.

r (skupina) = průměrná specifická růstová rychlost v experimentální skupině.

Vyhodnocení hodnot LOEC a NOEC

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

Statistické vyhodnocení testu

Na konci testu byly vyhodnoceny rozdíly v hmotnosti ryb v jednotlivých nádržích (koncentracích) a rozdíly v biochemických ukazatelích exponovaných ryb. Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí softwarového programu Statistica 6.1 (StatSoft ČR). Data byla nejprve pomocí Kolmogorov-Smirnova testu testována na normalitu a následně byla pomocí Bartlettova testu ověřována hypotéza o homogenitě variancí. V případě, že byla prokázána normalita dat a homogenita variancí, byla dále použita jednocestná analýza variance (ANOVA) a následně mnohonásobné porovnání skupin pomocí Dunnettova testu. V případě, že podmínky nebyly splněny, bylo porovnání provedeno pomocí neparametrického Kruskal-Wallisova testu.

3.2.1 VÝSLEDKY

TEST AKUTNÍ TOXICITY

Hodnoty letálních koncentrací získaných v testu akutní toxicity na pstruhu duhovém jsou uvedeny v tabulce 5.

Tab. 5 Hodnoty LC50 v $\text{mg.l}^{-1} \text{NO}_2^-$ získaných z testů na pstruhu duhovém.

24hLC50	48hLC50	72hLC50	96hLC50
31,9	25,1	11,9	11,2

Záznam mortality ryb pstruha duhového a bližší podmínky v průběhu základního testu jsou uvedeny v příloze (Tab. 7 a 9).

TEST SUBCHRONICKÉ TOXICITY

Mortalita ryb byla zaznamenána pouze v nejvyšší koncentraci (3 mg.l^{-1}) dusitanů, kde uhynulo 65 % pokusných ryb.

V tabulce 6 jsou uvedeny hodnoty specifické růstové rychlosti a celkového přírůstku ryb v jednotlivých skupinách. Průměrné hmotnosti ryb v průběhu a na konci testu v jednotlivých koncentracích jsou uvedeny v příloze (Tab. 8). Na základě inhibice růstu ryb byly vypočítány koncentrace NOEC a LOEC:

$$\text{NOEC (28dLC0)} = 0,01 \text{ mg.l}^{-1} \text{NO}_2^-$$

$$\text{LOEC (28dLC10)} = 0,2 \text{ mg.l}^{-1} \text{NO}_2^-$$

Tab. 6 Specifická růstová rychlost a celkový přírůstek ryb v jednotlivých skupinách v závislosti na koncentraci dusitanů ve vodě.

Skupina	K	P1	P2	P3	P4	P5
Koncentrace NO_2^- (mg.l^{-1})	–	0,01	0,1	0,6	1,0	3,0
Prům. specif. míra růstu (r)	2,1	2,1	2,1	2,2	1,8	1,2
Přírůstek (%)	79	78	81	81	67	42
Inhibice (%)	-	1	-	-	13	42

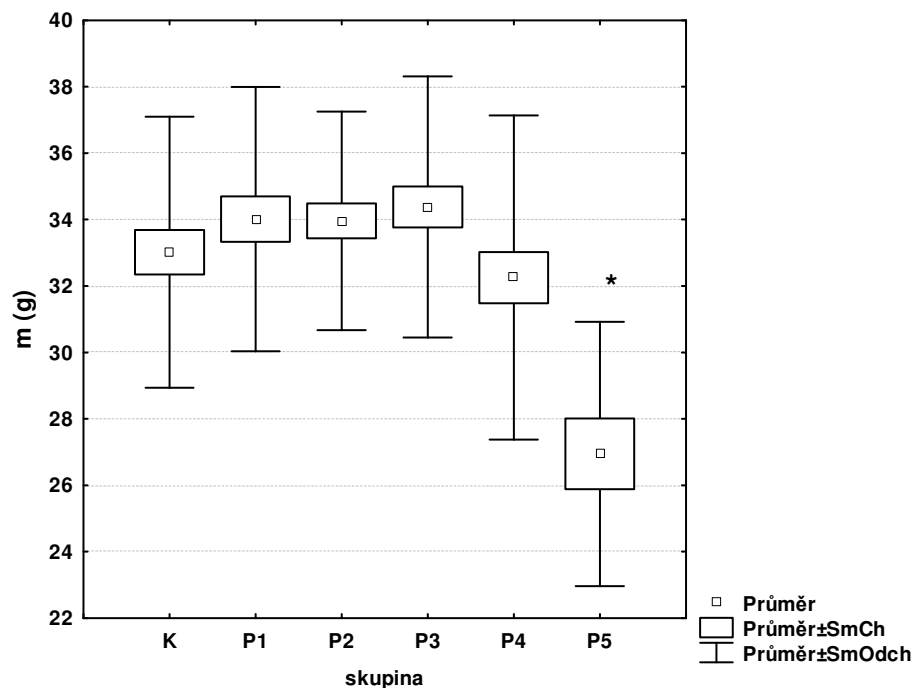
Pozn.: K – kontrolní skupina, P1 – P5 – pokusné skupiny.

Hmotnost ryb na konci testu

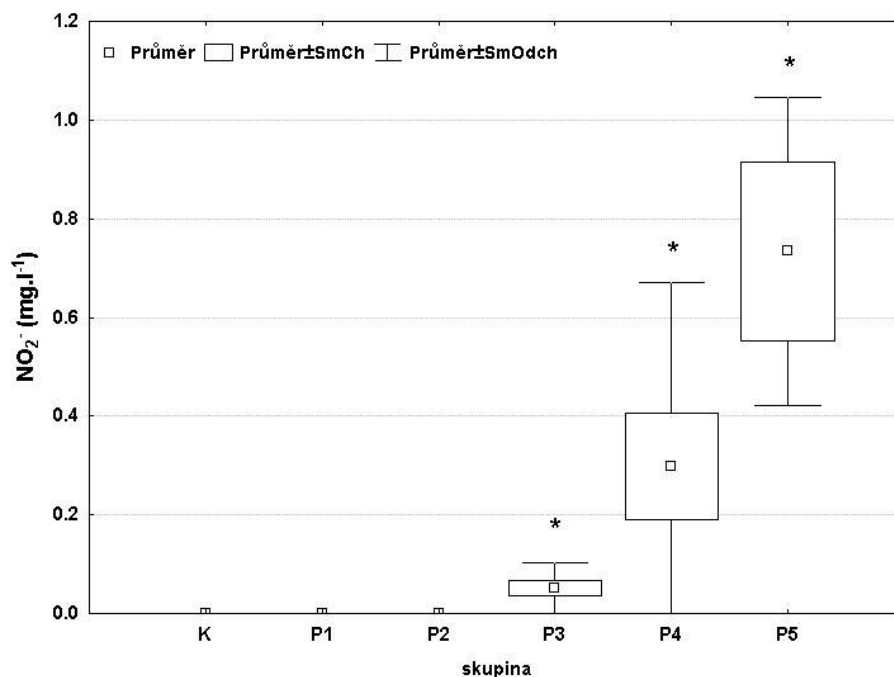
Při statistickém porovnávání jednotlivých pokusných skupin byla v nejvyšší testované koncentraci zaznamenána výrazně nižší hmotnost ryb (Obr. 4). Hmotnosti ryb v ostatních skupinách se od kontroly významně nelišily.

Biochemická vyšetření a koncentrace dusitanů v krevní plasmě a svalovině ryb

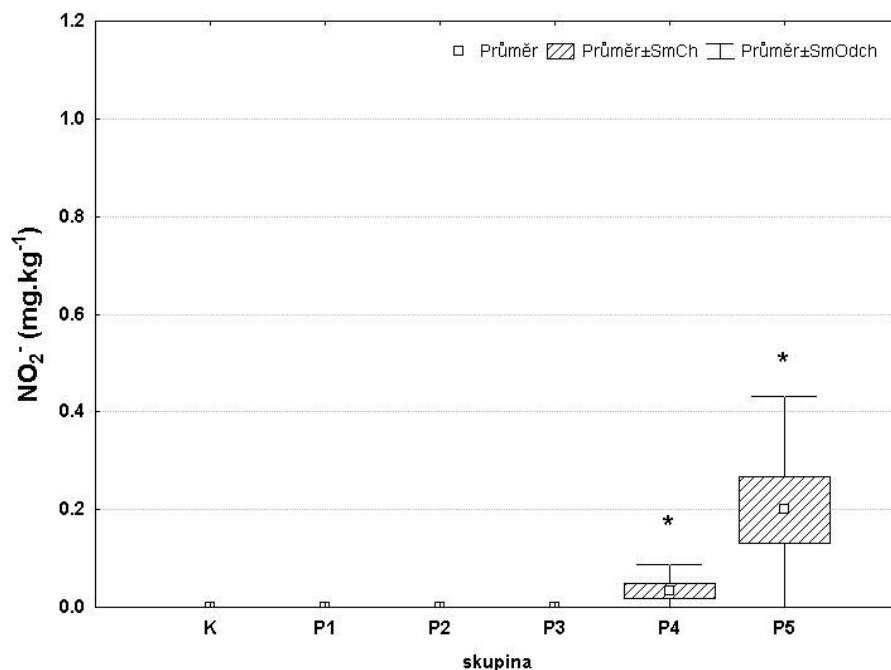
Zvýšené koncentrace dusitanů v krevní plasmě ryb byly naměřeny v pokusných skupinách P3 až P5 (Obr. 5). Ve skupinách P1, P2 a kontrole (K) byly koncentrace dusitanů pod mezí detekce. Dusitany se rovněž kumulovaly ve svalovině ryb, ale v menší míře než v plasmě (Obr. 6). Naproti tomu i v nejnižší koncentraci dusitanů byly zaznamenány změny v koncentraci glukózy (Obr. 7) a draslíku (Obr. 8).



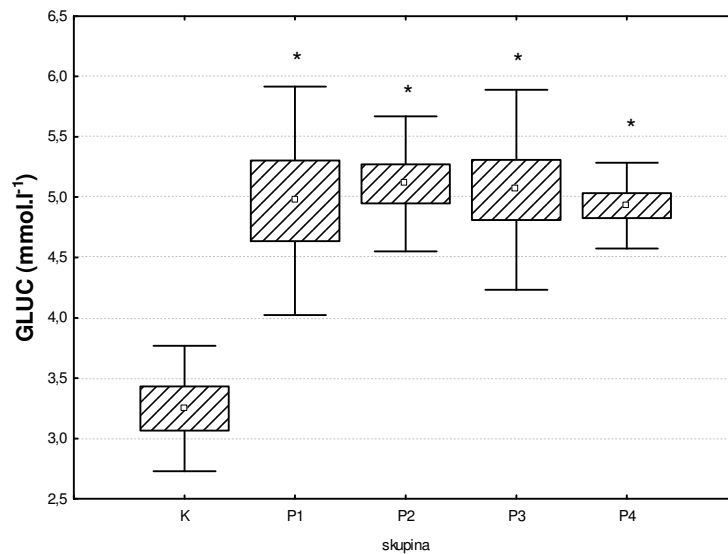
Obr. 4 Hmotnost ryb v jednotlivých skupinách na konci testu subchronické toxicity. K – kontrolní skupina, P1-P5 – pokusné skupiny. Signifikantní rozdíl ($p \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou je označen hvězdičkou.



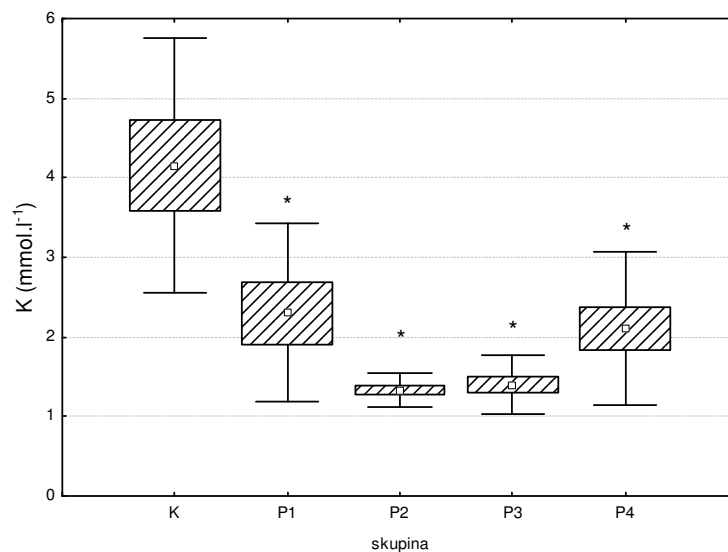
Obr. 5 Koncentrace dusitanů v krevní plasmě pokusných ryb na konci testu subchronické toxicity. K – kontrolní skupina, P1-P5 – pokusné skupiny. Signifikantní rozdíl ($p \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou je označen hvězdičkou.



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



Obr. 7 Koncentrace glukózy (GLUC) v krevní plasmě pokusných ryb na konci testu subchronické toxicity. K – kontrolní skupina, P1-P4 – pokusné skupiny. Signifikantní rozdíl ($p \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou je označen hvězdičkou.



Obr. 8 Koncentrace draslíku (K) v krevní plasmě pokusných ryb na konci testu subchronické toxicity. K – kontrolní skupina, P1-P4 – pokusné skupiny. Signifikantní rozdíl ($p \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou je značen hvězdičkou.

4 DISKUSE

Výsledky akutního a subchronického testu toxicity potvrdily obecně známou vysokou citlivost pstruha duhového ke zvýšeným koncentracím dusitanů. Výsledky testů akutní toxicity na pstruhu duhovém a sumci velkém ($96hLC50 = 11,2 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ a $15,3 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$), které jsme v našich testech zjistili, jsou srovnatelné s údaji uváděnými v literatuře (Lewis a Morris, 1986). Výsledky také naznačily, že nejkritičtějším obdobím v průběhu expozice sumce dusitanům je prvních 24 až 48 hodin. Dokládají to hodnoty letálních koncentrací $LC50$ dusitanů, které se po 24 až 48 hodinách trvání testu již s časem výrazně neměnily. Tuto skutečnost také potvrzují ve své práci Lewis a Morris (1986).

Pro hodnocení vlivu dlouhodobé expozice ryb dusitanům existuje jen málo údajů a navíc uváděné výsledky jsou obtížně vzájemně srovnatelné. Jedná se o výsledky, které byly získány při pokusech na různých druzích ryb, s rozdílnými dobami expozice dusitanům a při rozdílných koncentracích chloridů ve vodě (Wedemeyer a Yasutake, 1978; Kamstra et al., 1996; Frances et al., 1998).

Dlouhodobá expozice pstruha duhového subletálními koncentracemi dusitanů měla vliv na některé biochemické ukazatele. Změny některých parametrů byly zaznamenány i v nejnižší testované koncentraci dusitanů ($0,01 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$). Jednalo se především o zvýšení koncentrace glukózy a snížení koncentrace draslíku v krevní plasmě ryb. Hyperglykémie (zvýšená koncentrace glukózy) je obecně považována za stresový indikátor (Groff a Zinkl, 1999). Z toho vyplývá, že i nízké koncentrace dusitanů, při poměrně nízkých koncentracích chloridů ve vodě, mohou způsobit značný stres. Významné zvýšení koncentrace draslíku v plasmě ryb po otravě dusitany uvádějí ve svých studiích také například Jensen et al. (1987), Stormer et al. (1996), Grosell a Jensen (2000) a Huertas et al. (2002). Zvýšené koncentrace draslíku mohou mít nepříznivý vliv na činnost srdce a funkci nervového systému (Knudsen a Jensen, 1997). V dalších měřených biochemických parametrech (např. sodík, chloridy, laktát, enzymy a další) nebyly prokázány významné rozdíly ve srovnání s kontrolou.

Test subchronické toxicity dusitanů měl vliv také na růstovou rychlost ryb. V nejvyšší testované koncentraci ($3,0 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$) byla zaznamenána výrazně nižší růstová rychlost ryb a rovněž vysoká (65 %) mortalita. Růstová rychlost ryb v ostatních skupinách se od kontroly významně nelišila a nebyla zaznamenána ani mortalita ryb. Jak již bylo výše uvedeno, porovnání našich výsledků s literárními údaji je velmi obtížné, neboť v dostupné literatuře jsme našli jen málo údajů o dlouhodobém působení dusitanů na ryby za

podmínek, které by byly srovnatelné s podmínkami našeho testu. Např. Wedemeyer a Yasutake (1978) ve svém testu na pstruhu duhovém, který byl vystaven po dobu 6 měsíců dusitanům v koncentracích $0,2 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ a nižším, ve vodě s koncentrací $2,3 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cl}^-$, nezaznamenali žádné poškození ryb. Tito autoři však v závěru testu neprováděli žádná biochemická vyšetření a vliv dusitanů na ryby posuzovali pouze na základě růstové rychlosti ryb, mortality a histologického vyšetření. Proto jejich výsledky můžeme považovat za srovnatelné s těmi našimi.

Jedním z cílů pokusu bylo použít získané informace o působení dusitanů v koncentracích, které se běžně vyskytují v našich tocích a intenzivních chovech ryb a k odhadu opodstatněnosti velmi přísných požadavků směrnice EU 78/659/EHS na cílové hodnoty koncentrací dusitanů v povrchových vodách (pro lososové vody $0,01 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$). Výsledné hodnoty NOEC byly rovněž konfrontovány s požadavky dříve platného Nařízení vlády č. 61/2003 Sb. (pro lososové vody $0,6 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$). Jak se ukázalo, zjištěná hodnota NOEC ($0,01 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$) pro pstruha duhového odpovídá přísnějšímu limitu směrnice 78/659/EHS, čímž se potvrdila jeho oprávněnost. Požadavky dříve platného (č. 61/2003 Sb.) i současného (č. 229/2007 Sb.) nařízení vlády jsou výrazně mírnější ($0,6$ a $0,3 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ pro vody lososové) a nutno uvést, že odpovídají průměrné koncentraci dusitanů v povrchových vodách ČR, které se pohybují v rozmezí hodnot $0,15$ až $0,2 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ (Simon, 2001). Na druhé straně je třeba připomenout, že toxicitu dusitanů pro ryby musíme posuzovat i v souvislosti s koncentrací chloridů v povrchových vodách a ty jsou většinou vyšší, než ve vodě, kterou jsme použili v našem testu. Proto ani povrchové vody s vyššími koncentracemi dusitanů nemusí být pro ryby v nich žijící škodlivé, nebo dokonce letální.

5 ZÁVĚR

- 1) Na základě výsledků testů akutní toxicity na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*) a sumci velkém (*Silurus glanis*) byly stanoveny střední letální koncentrace dusitanů 96hLC50 (96hLC50 = 11,2 mg.l⁻¹ NO₂⁻ pro pstruha duhového a 96hLC50 = 15,3 mg.l⁻¹ NO₂⁻ pro sumce velkého).

- 2) Testem subchronické toxicity na pstruhu duhovém bylo prokázáno, že 28 denní expozice ryb dusitanům vyvolala:
 - v koncentraci 3,0 mg.l⁻¹ NO₂⁻ 42 % inhibici jejich růstové rychlosti a 65 % mortalitu.
 - v koncentracích 0,01 až 1,0 mg.l⁻¹ NO₂⁻ zvýšení koncentrace glukózy a snížení koncentrace draslíku v krevní plasmě.
 - v koncentracích 0,6 až 3,0 mg.l⁻¹ NO₂⁻ kumulaci dusitanů v krevní plasmě ryb.
 - v koncentracích 1,0 a 3,0 mg.l⁻¹ NO₂⁻ kumulaci dusitanů ve svalovině ryb.

- 3) Na základě výsledků testu subchronické toxicity byla stanovena hodnota NOEC (0,01 mg.l⁻¹ NO₂⁻), která potvrzuje oprávněnost požadavku směrnice EU 78/659/EHS pro limitní koncentraci dusitanů v povrchových vodách 0,01 mg.l⁻¹ NO₂⁻.

6 LITERATURA

- Aggergaard, S. and Jensen, F.B., 2001. Cardiovascular changes and physiological response during nitrite exposure in rainbow trout. *J. Fish Biol.* 59, pp. 13–27.
- Ambrožová, J., 2003. Aplikovaná a technická hydrobiologie. Vydavatelství VŠCHT, Praha.
- Arillo, A., Gaino, E., Margiocco, C., Mensi, P. and Schenone, G., 1984. Biochemical and ultrastructural effects of nitrite in rainbow trout: liver hypoxia as the root of the acute toxicity mechanism. *Environ. Res.* 34, pp. 135–154.
- Avilez, I. M., Altran, A. E., Aguiar, L. H., Moraes, G., 2004. Hematological responses of the Neotropical teleost matrinxã (*Brycon cephalus*) to environmental nitrite. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology & Pharmacology* (Vol. 139) (No. 1/3) 135-139.
- Bath, R.N. and Eddy, F.B., 1980. Transport of nitrite across fish gills. *J. Exp. Zool.* 214, pp. 119–121.
- Bowser, P.R., Falls, W.W., Van Zandt, J., Collier, N., Phillips, J.D., 1983. Methemoglobinemia in channel catfish: methods of prevention. *Progressive Fish-Culturist* 45, pp. 154-158.
- Cameron, J.N., 1971. Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol., A* 40, pp. 743–749.
- ČSN EN ISO/IEC 17 025 Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří. ČNI Praha 2001: 46 pp.
- ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod, 1999. Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby /*Brachydanio rerio* Hamilton – Buchanan (*Teleostei, Salmonidae*)/. Část 2: Obnovovací metoda. ČNI Praha, 16 s.
- ČSN EN ISO 10229 Jakost vod, 1996. Stanovení subchronické toxicity látek pro sladkovodní ryby – metoda vyhodnocení účinků látek na růstovou rychlost pstruha duhového
- Doblander, C. and Lackner, R., 1996. Metabolism and detoxification of nitrite by trout hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1289, pp. 270–274.
- Doblander, C. and Lackner, R., 1997. Oxidation of nitrite to nitrate in isolated erythrocytes: a possible mechanism for adaptation to environmental nitrite. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, pp. 157–161.

- Doeller, J.E. and Wittenberg, B.A., 1991. Myoglobin function and energy metabolism of isolated cardiac myocytes: effect of sodium nitrite. *Am. J. Physiol.* 261, pp. H53–H62.
- Eddy, F.B., Kunzlik, P.A. and Bath, R.N., 1983. Uptake and loss of nitrite from the blood of rainbow trout, *Salmo gairdneri Richardson*, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L. in fresh water and in dilute sea water. *J. Fish Biol.* 23, pp. 105–116.
- EIFAC, 1984. Water quality criteria for European freshwater fish. Report on nitrite and freshwater fish. EIFAC Tech. Paper, No. 46, pp. 19.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M. and Potts, W.T.W., 1999. Ionic transport in the fish gill epithelium. *J. Exp. Zool.* 283, pp. 641–652.
- Folmar, L. C., 1993. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 12, pp. 337 – 375.
- Folmar, L.C., S. Bonomelli, T. Moody and J. Gibbon, 1993. Effects of a short-term exposure to three chemical contaminants on the blood chemistry on the pinfish (*Lagodon rhomboides*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*
- Frances, J., Allan, G.L., Nowak, B.F., 1998. The effects of nitrite on the short-term growth of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture* 163, pp. 63-72.
- Groff, J.M., Zinkl, J.G., 1999. Hematology and clinical chemistry of cyprinid fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 2, pp. 741-776.
- Grosell, M. and Jensen, F.B., 2000. Uptake and effects of nitrite in the marine teleosts fish *Platichthys flesus*. *Aquat. Toxicol.* 50, pp. 97–107.
- Horák, J., Linhart, I., Klusoň P., 2004. Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky. 1. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 189 pp.
- Huertas, M., Gisbert, E., Rodríguez, A., Cardona, L., Williot, P. and Castelló-Orvay, F., 2002. Acute exposure of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri, Brandt*) yearlings to nitrite: median-lethal concentration (LC₅₀) determination, haematological changes and nitrite accumulation in selected tissues. *Aquat. Toxicol.* 57, pp. 257–266.
- Huey, D.W., Simco, B.A. & Criswell, D.W., 1980. Nitrite-induced methemoglobinemia in channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society* 105, pp. 558–562.
- Jensen, F.B., Andersen, N.A. and Heisler, N., 1987. Effects of nitrite exposure on blood respiratory properties, acid–base and electrolyte regulation in the carp (*Cyprinus carpio*). *J. Comp. Physiol. B* 157, pp. 533–541.

- Jensen, F.B., 1990. Nitrite and red cell function in carp: control factors for nitrite entry, membrane potassium ion permeation, oxygen affinity and methaemoglobin formation. *J. Exp. Biol.* 152, pp. 149–166.
- Jensen, F.B., 1996. Uptake, elimination and effects of nitrite and nitrate in freshwater crayfish (*Astacus astacus*). *Aquat. Toxicol.* 34, pp. 95–104
- Jensen, L.J., Willumsen, N.J. and Larsen, E.H., 2002. Proton pump activity is required for active uptake of chloride in isolated amphibian skin exposed to freshwater. *J. Comp. Physiol. B* 172, pp. 503–511.
- Jensen, F.B., 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A*, 135:9-24.
- Kamstra, A., Span, J.A. and Van Weerd, J.H., 1996. The acute toxicity and sublethal effects of nitrite on growth and feed utilization of European eel, *Anguilla anguilla* (L.). *Aquacult. Res.* 27, pp. 903–911.
- Kiese, M., 1974. *Methemoglobinemia: A Comprehensive Treatise*, CRC Press, Cleveland, OH.
- Knudsen, P.K. and Jensen, F.B., 1997. Recovery from nitrite-induced methaemoglobinaemia and potassium balance disturbances in carp. *Fish Physiol. Biochem.* 16, pp. 1–10.
- Kosaka, H. and Tyuma, I., 1987. Mechanism of autocatalytic oxidation of oxyhemoglobin by nitrite. *Environ. Health Perspect.* 73, pp. 147–151.
- Krous, S.R., Blazer, V.S., Meade, T.L., 1982. Effects of acclimation time on nitrite movement across the gill epithelia of rainbow trout: the role „chloride cells”. *Progressive Fish-Culturist* 44, pp. 126-130.
- Lewis Jr., W.M. and Morris, D.P., 1986. Toxicity of nitrite to fish: a review. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115, pp. 183–195.
- Máchová, J., Svobodová, Z. & Vykusová, B., 1994. Ekotoxikologické hodnocení vyluhů a tuhých průmyslových odpadů. VÚRH Vodňany, 51 pp.
- Maetz, J., 1971. Fish gills: mechanism of salt transfer in fresh water and sea water. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 262, pp. 209-249.
- Margiocco, C., Arillo, A., Mensi, P. and Schenone, G., 1983. Nitrite bioaccumulation in *Salmo gairdneri* Rich. and hematological consequences. *Aquat. Toxicol.* 3, pp. 261–270.

- Michael, M.I., A.M. Hilmy, N.A. El-Domiaty and K. Wershana, 1987. Serum transaminase activity and histopathological changes and in *Clarias lazera* chronically exposed to nitrite. *Comp. Biochem. Physiol.* 86C, pp. 255-262
- Nařízení vlády č. 229/2007 Sb. ze dne 18. července, kterým se mění nařízení vlády č. 61/2003 Sb. o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech.
- Nichols, J.W. and Weber, L.J., 1989. Oxidation of cardiac myoglobin in vivo by sodium nitrite or hydroxylamine. *Arch. Toxicol.* 63, pp. 484–488.
- OECD Guideline for Testing of Chemicals 203 Fish, Acute Toxicity Test, 1992.
- OECD Guideline for Testing of Chemicals 215 Fish, Juvenile Growth Test, 2000.
- Paitian, N.A., Markossian, K.A. and Nalbandyan, R.M., 1985. The effect of nitrite on cytochrome oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133, pp. 1104–1111.
- Palachek, R.M. and Tomasso, J.R., 1984. Toxicity of nitrite to channel catfish (*Ictalurus punctatus*), tilapia (*Tilapia aurea*), and largemouth bass (*Micropterus salmoides*): evidence for a nitrite exclusion mechanism. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41, pp. 1739–1744.
- Perrone, S.J. and Meade, T.L., 1977. Protective effect of chloride on nitrite toxicity to coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish. Res. Bd. Can.* 34, pp. 486–492.
- Pitter, P., 1999. *Hydrochemie*. Vydavatelství VŠCHT Praha, 568 pp.
- Příkryl, I., Svobodová, Z. & Hanzalová, J., 1983. Numerický postup stanovení LC50 a LC5 v testech akutní toxicity.- *Buletin VÚRH Vodňany* č.4: p. 25 – 30.
- Rombough, P.J., Moroz, B.M., 1990. The scalling and potential importance of cutaneous and branchial surfaces in young chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Exp. Biol.* 154, pp. 1-12.
- Russo, R.C., Smith, C.E., Thurston, R.V., 1974. Acute toxicity of nitrite to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 31, pp. 1653-1655.
- Simon, O., 2001. Klasifikace vod z hlediska možnosti trvalého výskytu ryb a stanovení jejich úseků pro monitoring dle požadavků směrnice 78/659/EHS. Závěrečná zpráva za rok 2001 úkolu č. 4001.01/22 a 4001.02/22, VÚV TGM Praha.
- Stormer, J., Jensen, F.B. and Rankin, J.C., 1996. Uptake of nitrite, nitrate, and bromide in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects on ionic balance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, pp. 1943–1950.

- Svobodová, Z., Máchová, J., Vykusová, B., 1992. Havarijní a dlouhodobé znečištění povrchových vod. VÚRH, Vodňany.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Beklová, M., Cupáková, Š & MINKS, J., 2000. Ekotoxikologie praktická cvičení, část I. Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 72 pp.
- Svobodová, Z., Máchová, J., 2003. Cizorodé látky ve vodním prostředí a problematika sledování jejich účinků. Sb. Referátů z 11. konference Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí, VÚRH JU Vodňany, Aquachemie Ostrava, pp. 275-278.
- Svobodová, Z. a kol., 2007. Nemoci sladkovodních a akvarijských ryb. Informatorium, Praha.
- Tomasso, J.R., K.B. Davis and B.A. Simco, 1981. Plasma corticosteroid dynamics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) exposed to ammonia and nitrite. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 38, pp. 1106-1112.
- Vyhláška MZe ČR č.311/1997 Sb. ze dne 4. prosince o chovu a využití pokusných zvířat.
- Wedemeyer, G.A., Yasutake, W.T., 1978. Prevention and treatment of nitrite toxicity in juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish. Res. Bd Can. 35, pp. 822-827.
- Williams, E.M. and Eddy, F.B., 1986. Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. *J. Comp. Physiol. B* 156, pp. 867-872.
- Williams, E.M. and Eddy, F.B., 1988. Anion transport, chloride cell number and nitrite-induced methaemoglobinaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat. Toxicol.* 13, pp. 29-42.
- Woo, N.Y.S. and Chiu, S.F., 1997. Metabolic and osmoregulatory responses of the sea bass *Lates calcarifer* to nitrite exposure. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 12, pp. 257-264.
- Zachariassen, F., 2001. Intraspecific differences in nitrite tolerance of rainbow trout. The role of gill and kidney. Cand. Scient. Thesis, Institute of Biology, University of Southern Denmark, Odense.
- Zweier, J.L., Samouilov, A. and Kuppusamy, P., 1999. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1411, pp. 250-262.
- Zákon č. 77/2004 Sb. ze dne 21. ledna, kterým se mění zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů
- Zákon č. 254/2001 Sb. ze dne 28. června o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon), v platném znění.

7 PŘÍLOHY

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Záznam mortality ryb v průběhu testu A na rybách *Silurus glanis*.

Tab. 2 Záznam mortality ryb v průběhu testu B na rybách *Silurus glanis*.

Tab. 3 Záznam mortality ryb v průběhu testu C na rybách *Silurus glanis*.

Tab. 4 Podmínky v průběhu testu A na rybách *Silurus glanis*.

Tab. 5 Podmínky v průběhu testu B na rybách *Silurus glanis*.

Tab. 6 Podmínky v průběhu testu C na rybách *Silurus glanis*.

Tab. 7 Záznam mortality ryb *Oncorhynchus mykiss* během základního testu.

Tab. 8 Specifická růstová rychlost a přírůstky ryb *Oncorhynchus mykiss* v jednotlivých skupinách v závislosti na koncentraci dusitanů ve vodě.

Tab. 9 Podmínky v průběhu základního testu na *Oncorhynchus mykiss*.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Vyhodnocení testu akutní toxicity na rybách *Silurus glanis*, paralelní test A.

Obr. 2 Vyhodnocení testu akutní toxicity na rybách *Silurus glanis*, paralelní test B.

Obr. 3 Vyhodnocení testu akutní toxicity na rybách *Silurus glanis*, paralelní test C.

Obr. 4 Paralelní testy akutní toxicity A, B a C na sumci velkém *Silurus glanis*.

Obr. 5 Testovací organismus sumec velký *Silurus glanis*.

Obr. 6 Akvarijní místnost, ve které se prováděly pokusy se pstruhem duhovým.

Obr. 7 Nádrž se pstruhem duhovým.

Obr. 8 Odběr krve z *v. caudalis*.

Tab. 4 Podmínky v průběhu testu A na rybách *Silurus glanis*.

Číslo nádrže	Konc. NO ₂ ⁻ (mg.l ⁻¹)	Teplota (°C)						Kyslík (% nasycení)						pH					
		Datum a hodina měření																	
		3.7.	4.7.	5.7.	5.7.	6.7.	7.7.	3.7.	4.7.	5.7.	5.7.	6.7.	7.7.	3.7.	4.7.	5.7.	5.7.	6.7.	7.7.
0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h		
1	10	23,6	22,8	21,8	23,5	22,4	22,5	88,1	85,2	87,1	96,0	93,9	92,2	7,62	7,80	7,63	7,62	7,88	7,96
2	20	23,5	22,7	21,8	23,5	22,2	22,6	85,2	88,8	88,2	94,5	92,3	92,3	7,61	7,80	7,50	7,63	7,83	7,89
3	30	23,5	23,0	21,6	23,5	22,4	22,5	81,2	72,2	95,1	95,4	82,3	93,2	7,60	7,46	7,66	7,60	7,73	7,8
4	50	23,5	23,1	21,7	23,6	-	-	84,3	89,1	88,5	96,3	-	-	7,55	7,88	7,65	7,60	-	-
5	80	23,4	22,9	21,6	22,9	-	-	88,2	81,6	95,8	97,5	-	-	7,47	7,87	7,70	7,58	-	-
6	100	23,5	22,9	21,7	22,8	-	-	80,1	88,2	99,0	97,3	-	-	7,44	7,87	7,72	7,58	-	-
7	150	23,6	22,8	-	-	-	-	85,9	85,3	-	-	-	-	7,39	7,88	-	-	-	-
K	-	23,7	22,9	22,2	23,6	22,6	22,5	88,0	86,5	83,3	94,0	94,0	92,0	7,58	7,77	7,35	7,72	7,92	7,88

↑

přelovení

↑

↑

Tab. 5 Podmínky v průběhu testu B na rybách *Silurus glanis*.

Číslo nádrže	Konc. NO ₂ ⁻ (mg.l ⁻¹)	Teplota (°C)						Kyslík (% nasycení)						pH					
		Datum a hodina měření																	
		3.7.	4.7.	5.7.	5.7.	6.7.	7.7.	3.7.	4.7.	5.7.	5.7.	6.7.	7.7.	3.7.	4.7.	5.7.	5.7.	6.7.	7.7.
0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h		
1	10	23,8	23,8	22,8	23,4	22,8	22,9	86,1	84,2	84,1	91,2	91,1	91,2	7,66	7,68	7,55	7,51	7,50	7,52
2	20	23,5	23,5	22,8	23,5	22,9	23,0	84,2	87,9	83,3	93,3	92,4	93,4	7,68	7,45	7,51	7,58	7,47	7,41
3	30	23,9	23,4	22,9	23,4	22,8	23,1	88,3	83,2	91,2	91,4	89,4	90,8	7,61	7,58	7,58	7,50	7,40	7,43
4	50	23,5	23,4	23,0	23,6	-	-	83,3	88,2	89,5	90,1	-	-	7,58	7,41	7,45	7,45	-	-
5	80	23,4	23,5	22,9	22,8	-	-	81,2	83,6	94,8	95,5	-	-	7,44	7,55	7,40	7,51	-	-
6	100	23,5	23,1	22,8	22,9	-	-	83,2	84,4	93,1	91,2	-	-	7,47	7,44	7,41	7,48	-	-
7	150	23,7	23,7	-	-	-	-	86,7	88,4	-	-	-	-	7,30	7,38	-	-	-	-
K	-	23,4	23,5	22,9	23,6	22,8	22,9	87,2	86,5	89,9	94,3	92,8	93,1	7,45	7,39	7,50	7,44	7,38	7,51

↑

přelovení

↑

↑

Tab. 6 Podmínky v průběhu testu C na rybách *Silurus glanis*.

Číslo nádrže	Konc. NO ₂ ⁻ (mg.l ⁻¹)	Teplota (°C)						Kyslík (% nasycení)						pH					
		Datum a hodina měření																	
		3.7.	4.7.	5.7.	5.7.	6.7.	7.7.	3.7.	4.7.	5.7.	5.7.	6.7.	7.7.	3.7.	4.7.	5.7.	5.7.	6.7.	7.7.
0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h		
1	10	23,4	23,2	22,9	23,1	23,0	23,1	87,2	87,2	83,2	91,4	92,2	94,1	7,45	7,53	7,51	7,44	7,47	7,41
2	20	23,1	23,1	22,9	23,2	22,9	22,9	88,2	88,9	83,4	92,8	92,4	93,6	7,55	7,41	7,41	7,42	7,43	7,42
3	30	23,2	23,3	22,9	23,4	22,9	23,0	87,1	84,2	92,1	93,1	88,3	91,7	7,48	7,51	7,43	7,51	7,42	7,44
4	50	23,1	23,4	23,0	23,2	-	-	83,4	86,2	88,4	90,8	-	-	7,51	7,43	7,48	7,41	-	-
5	80	23,2	23,6	22,8	23,2	-	-	88,1	88,6	95,1	91,5	-	-	7,43	7,50	7,41	7,53	-	-
6	100	23,8	23,0	-	23,1	-	-	83,4	89,4	-	91,4	-	-	7,44	7,40	-	-	-	-
7	150	23,6	23,1	-	-	-	-	86,8	83,4	-	-	-	-	7,38	7,39	-	-	-	-
K	-	23,2	23,1	23,1	23,2	22,9	23,0	88,4	89,5	90,9	93,4	91,9	94,1	7,40	7,41	7,48	7,42	7,36	7,39

↑
 přelovení

Obr. 1 Vyhodnocení testu akutní toxicity na rybách *Silurus glanis*, paralelní test A

(výstup z programu EKO-TOX 5.1).

Testovaná látka: NaNO₂

Ředící voda: vodovodní

Datum nasazení testu: 3.7. 2006

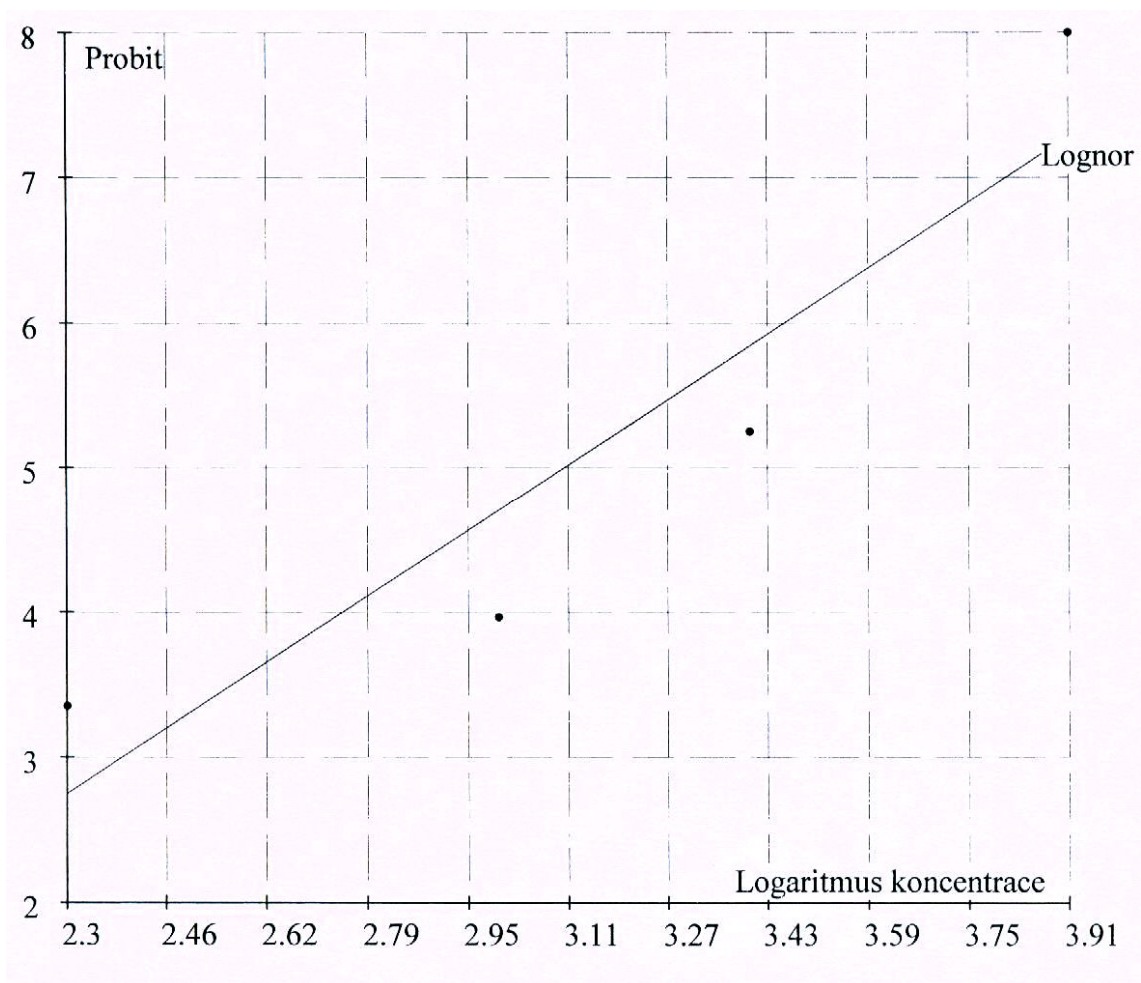
Vstupní hodnoty: základní test

Koncentrace (mg.l ⁻¹)	Mortalita (%)
10	0.0
20	10.0
30	30.0
50	100.0

96hLC50 = 26.6 mg.l⁻¹

LC0 = 11.4 mg.l⁻¹

LC100 = 62.1 mg.l⁻¹



Obr. 2 Vyhodnocení testu akutní toxicity na rybách *Silurus glanis*, paralelní test B

(výstup z programu EKO-TOX 5.1).

Testovaná látka: NaNO_2

Ředicí voda: vodovodní

Datum nasazení testu: 3.7. 2006

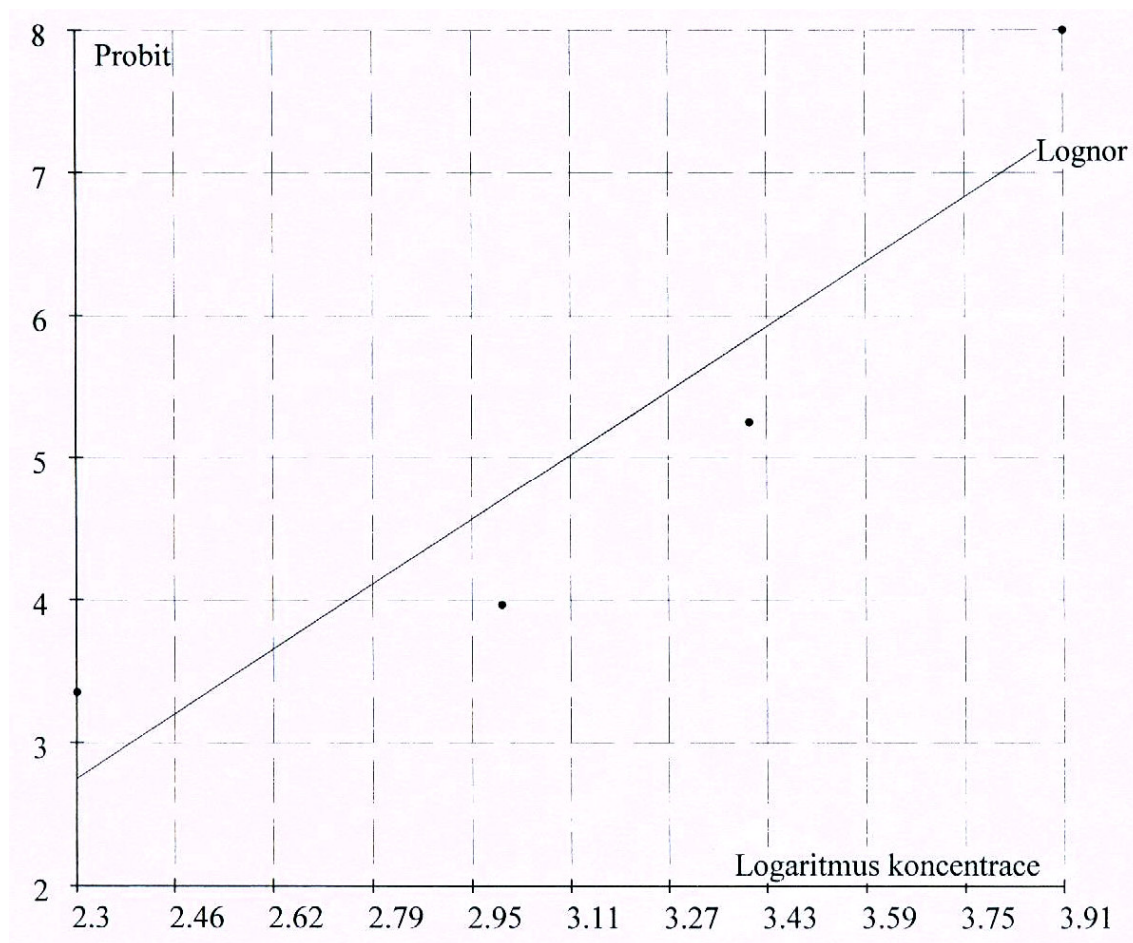
Vstupní hodnoty: základní test

Koncentrace (mg.l^{-1})	Mortalita (%)
10	5.0
20	15.0
30	60.0
50	100.0

96hLC50 = 22.2 mg.l^{-1}

LC0 = 7.7 mg.l^{-1}

LC100 = 64.6 mg.l^{-1}



Obr. 3 Vyhodnocení testu akutní toxicity na rybách *Silurus glanis*, paralelní test C

(výstup z programu EKO-TOX 5.1).

Testovaná látka: NaNO₂

Ředicí voda: vodovodní

Datum nasazení testu: 3.7. 2006

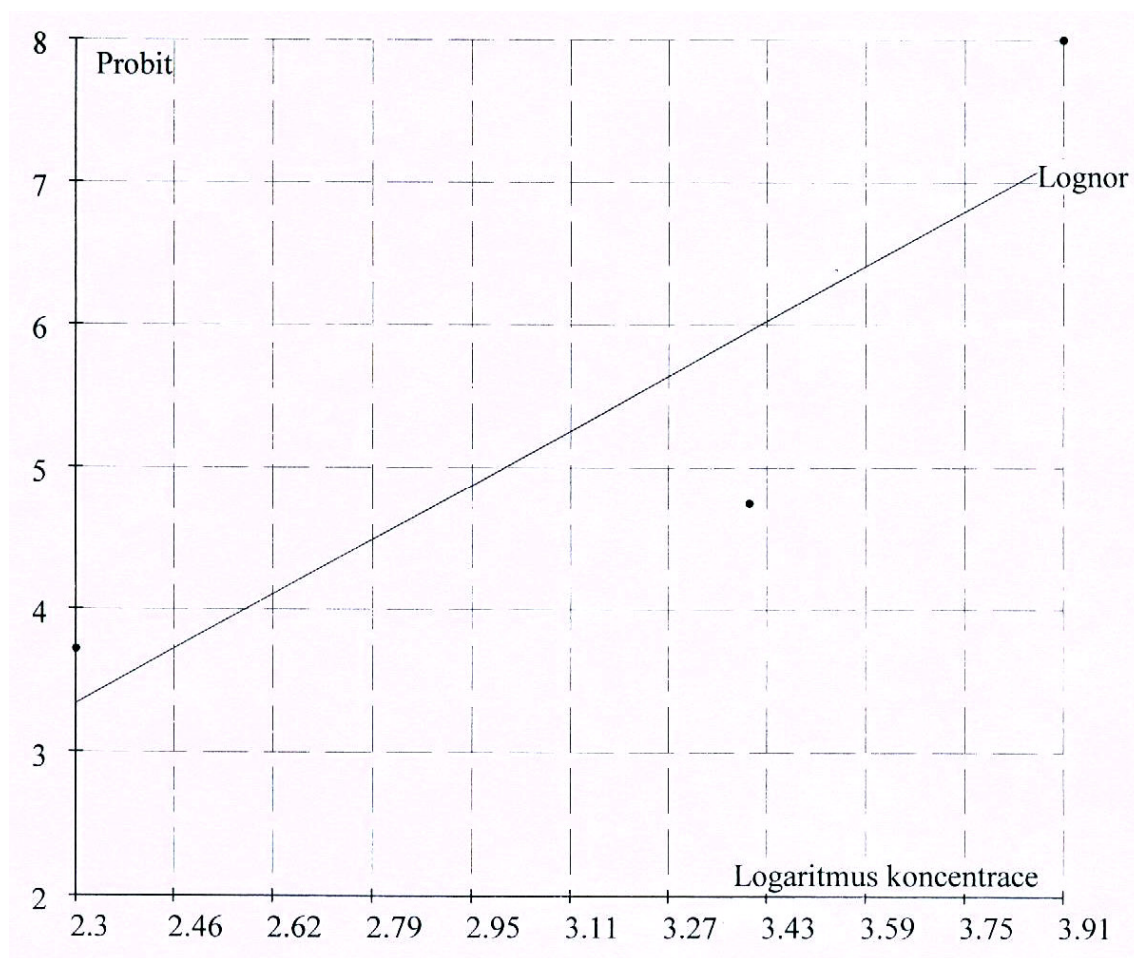
Vstupní hodnoty: základní test

Koncentrace (mg.l ⁻¹)	Mortalita (%)
10	10.0
30	40.0
50	100.0

96hLC50 = 20.1 mg.l⁻¹

LC0 = 5.7 mg.l⁻¹

LC100 = 70.7 mg.l⁻¹



Tab. 7 Záznam mortality ryb *Oncorhynchus mykiss* během základního testu.

Číslo nádrže	Koncentrace NO ₂ ⁻ (mg.l ⁻¹)	Mortalita ryb (Σ %)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
1	3,3	14	14	14	14
2	6,7	0	0	14	14
3	16,7	14	14	43	43
4	33,3	14	43	71	86
5	50	71	86	100	100
6	66,7	71	86	86	100
7	133,3	100	100	100	100
K	-	-	-	-	-

Tab. 8 Specifická růstová rychlost a přírůstky ryb *Oncorhynchus mykiss* v jednotlivých skupinách v závislosti na koncentraci dusitanů ve vodě.

Skupina ryb	kontrola	1	2	3	4	5
NO ₂ ⁻ (mg.l ⁻¹)	-	0,01	0,1	0,6	1,0	3,0
n (Pd, ks)	40	40	40	40	40	40
m ₀ (prům.±SD, g)	18,4±1,0	19,1±1,3	18,8±1,3	19,0±1,3	19,3±1,4	19,0±1,2
m ₁₄ (prům.±SD, g)	24,8±2,5	26,2±2,4	25,4±2,6	25,5±2,7	24,8±3,5	24,8±4,5
m ₂₈ (prům.±SD, g)	33,0±4,1	34,0±4,0	34,0±3,3	34,4±3,9	32,3±4,9	26,9±4,0
r ₁₄	2,10	2,23	2,14	2,09	1,74	1,77
r ₂₈	2,10	2,08	2,14	2,15	1,83	1,23
I ₁₄ (%)	-	-	-	1	17	16
I ₂₈ (%)	-	1	-	-	13	42
Mortalita ₁₄ (%)	0	0	0	0	0	20
Mortalita ₂₈ (%)	0	0	0	0	0	65

Tab. 9 Podmínky v průběhu základního testu na rybách *Oncorhynchus mykiss*.

Číslo nádrže	Konc. NO ₂ ⁻ (mg.l ⁻¹)	Teplota (°C)						Kyslík (% nasycení)						pH					
		0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	48 h	72 h	96 h
1	5	15,5	15,7	15,3	12,2	14,0	15,1	94	92	100	100	97	96	7,59	7,60	7,67	7,93	7,70	7,69
2	10	15,6	15,8	15,4	12,2	14,0	14,9	88	88	95	100	100	98	7,44	7,50	7,68	7,93	7,72	7,71
3	25	15,5	15,8	15,4	12,1	13,9	14,8	91	87	96	100	100	100	7,50	7,55	7,63	7,99	7,84	7,95
4	50	15,6	15,8	15,3	11,9	13,96	14,5	96	93	100	100	100	100	7,63	7,68	7,75	8,04	7,92	8,05
5	75	15,5	15,8	15,3	11,8	-	-	91	94	100	100	-	-	7,53	7,66	7,86	8,08	-	-
6	100	15,6	15,7	15,3	12,1	13,9	-	96	99	100	100	100	-	7,65	7,91	7,87	8,12	7,96	-
7	200	15,6	15,7	-	-	-	-	94	99	-	100	-	-	7,71	7,95	-	-	-	-
K	-	15,5	15,5	15,3	12,5	14,2	15,2	66	85	73	100	95	92	7,24	7,48	7,24	7,24	7,83	7,67

↑
přelovení

↑

↑

Obr. 4 Paralelní testy akutní toxicity A, B a C na sumci velkém.



Obr. 5 Testovací organismus sumec velký.



Obr. 6 Akvariální místnost, ve které se prováděly pokusy se pstruhem duhovým.



Obr. 7 Nádrž se pstruhem duhovým.



Obr. 8 Odběr krve z v. *caudalis*.

