

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení: **Petra Dvořáková**

Studijní program: M 4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Rybářství

Název tématu: **Ekotoxikologické hodnocení přípravků vybraných pro potenciální využití v rybářské a akvaristické praxi**

**Zásady pro vypracování:**  
(v zásadách pro vypracování uveďte cíl práce a metodický postup)

Cílem práce je posouzení vybraných přípravků, které by svými vlastnostmi mohly vhodně doplnit a obohatit škálu přípravků používaných v rybářské a akvaristické praxi. V současné době existuje velmi málo přípravků a léčebných prostředků, které je dovoleno používat do vodního prostředí. Řada preparátů, které se minulosti osvědčily jako antiparazitika, antimykotika apod. jsou dnes zakázány. Z toho důvodu je třeba hledat přípravky, které by alespoň částečně nahradily ty dříve používané a současně byly šetrné k rybám a celému vodnímu ekosystému. Prvním krokem, který je třeba při hledání nových preparátů učinit, je stanovení jejich akutní toxicity. Z toho důvodu budou prováděny testy akutní toxicity s vybranými preparáty na rybách a dalších vodních organizmech, aby se z potenciálního využití vyloučily ty přípravky, které by představovaly neúměrné riziko pro vodní ekosystémy.

Z hlediska akutní toxicity pro ryby a další vodní organizmy budou otestovány 2 přípravky. Metodicky bude postupováno podle platných standardně operačních postupů, které byly zpracovány akreditovanou toxikologickou laboratoří VÚRH JU Vodňany. Tyto postupy vycházejí z norem OECD a ISO pro testy akutní toxicity na zástupcích vodních organizmů.

Rozsah grafických prací: 5 – 15 tabulek grafů

Rozsah průvodní zprávy: 35 - 40 stran

Seznam odborné literatury:

- SVOBODOVÁ, Z., MACHOVÁ, J., VESELY, V., MODRÁ, H., SVOBODA, M., a kol., 2003. Veterinární toxikologie. Praktická cvičení, část I. (Veterinary Toxicology. Practical exercises, part I). VFU Brno, 179s.
- Svobodová, Z., Machová, J., Beklová, M., Čupáková, Š., Minks, J., 2000. Ekotoxikologie – praktická cvičení, část I. Ediční středisko VFU Brno, 2000. 70 str.
- OECD Guideline for Testing of Chemicals 201 Alga, Growth Inhibition Test. 1984, 14 pp.
- OECD Guideline for Testing of Chemicals 203 Fish, Acute Toxicity Test, 1992, 9 pp.
- ČSN EN ISO 28692 Jakost vod. Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum* (ISO 8692:1989). ČNI Praha, 1995, 12 s.
- ČSN EN ISO 6341 Jakost vod. Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) – Zkouška akutní toxicity. ČNI Praha, 1997, 16 s.
- ČSN EN ISO 7346-1 Jakost vod. Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby /*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)/. Část I: Statistická metoda. ČNI Praha, 1999, 16 s.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Jana Máchová

Konzultant:

Ing. Jindřiška Čížková

Datum zadání diplomové práce:

únor 2004

Termín odevzdání diplomové práce:

30. 4. 2006

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUĎEJOVICÍCH  
ZEMĚDELSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 13  
370 05 České Budějovice

doc. Ing. Petr Hartvich, CSc.

Vedoucí katedry

doc. Ing. Magdalena Hrabánková, CSc.

Děkan

V Českých Budějovicích dne


10. 3.

2004

## Prohlášení

Prohlašuji tímto, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně a za použití pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

Ve Vodňanech 10. dubna 2006

  
.....  
Podpis

### **Poděkování**

Ráda bych chtěla touto cestou vyjádřit poděkování Ing. Janě Máchové za odborné vedení cenné rady a nevšední ochotu, se kterou se mi věnovala v průběhu celého měření a zpracování mé diplomové práce.

Dále děkuji také všem pracovníkům oddělení vodní toxikologie a nemocí ryb VÚRH JU se sídlem ve Vodňanech, především Ing. Jindřišce Čížkové, paní Anně Kocové a Ing. Tomášovi Randákovi za pomoc a čas, který mi věnovali v průběhu této práce.

Měření jsem prováděla ve spolupráci s Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na oddělení vodní toxikologie a nemocí ryb VÚRH JU Vodňany a výsledky práce budou využity ve výzkumném záměru NAZV GF3029 „Harmonizace s EU v uplatňování principů farmakovigilance v akvakulturních chovech v ČR“.

## Ekotoxikologické hodnocení přípravků vybraných pro potenciální využití v rybářské a akvaristické praxi

Cílem práce bylo posouzení 4 léčebných přípravků: NaCl, KMnO<sub>4</sub>, BioCare SPC a formaldehyd, z hlediska jejich akutní toxicity pro organismy vodního prostředí a inhibičních účinků na růst kořene hořčice bílé. Pro posouzení těchto vlastností byly použity testy akutní toxicity na následujících organismech. Ryby *Poecilia reticulata*, *Oncorhynchus mykiss*, perloočky *Daphnia magna*, zelené sladkovodní řasy *Desmodesmus subspicatus* a hořčice bílá *Sinapis alba*. Na základě provedených testů byly stanoveny hodnoty 96hLC50 pro ryby, 48hEC50 pro perloočky a 72hIC50 pro řasy a růst kořene hořčice bílé.

Podle těchto hodnot byly léčebné přípravky zařazeny do odpovídajících skupin podle toxicity.

Výsledky provedených testů a pokusů prokázaly: **NaCl** je látka, která byla zařazena do skupiny látek škodlivých pro organismy. **KMnO<sub>4</sub>** je látka, která byla zařazena do skupiny látek vysoce toxických pro organismy. **BioCare SPC** je látka, která byla zařazena do skupiny látek toxických pro organismy. **Formaldehyd** je látka, která byla zařazena do skupiny látek toxických pro organismy.

**Klíčová slova:** akutní toxicita, *Poecilia reticulata*, *Oncorhynchus mykiss*, *Daphnia magna*, *Desmodesmus subspicatus*, *Sinapis alba*, NaCl, formaldehyd, BioCare SPC, KMnO<sub>4</sub>

## Eco-toxicological assessment of preparations chosen for potential use in fishery and aquaristical use

The aim of the study was to assess four therapeutic preparations: sodium chloride, potassium permanganate (KMnO<sub>4</sub>), BioCare SPC and formaldehyde, thanks for their acute toxicity for organisms in a water environment and inhibitive effects on the growth of the roots of white mustard. For the assessment of these properties tests of acute toxicity on the following test organisms were used: fish *Poecilia reticulata*, *Oncorhynchus mykiss*, *Daphnia magna*, green fresh water algae *Desmodesmus subspicatus* and white mustard *Sinapis alba*. On the basis of the tests that were carried

determined: 96hLC50 for fish, 48hEC50 for daphnia and 72hIC50 for algae and the growth of white mustard roots.

According to these values, the therapeutic preparations was integrated into the corresponding groups by toxicity.

The results of the acute toxicity tests and laboratory experiments showed:

**Sodium chloride** is preparation, which was classified in the group of substances harmful for organisms. **Potassium permanganate (KMnO<sub>4</sub>)** is preparation, which was classified in the group of substances highly toxic for organisms. **BioCare SPC** is preparation, which was classified in the group of substances toxic for organisms. **Formaldehyde** is preparation, which was classified in the group of substances toxic for organisms.

**Keywords:** acute toxicity, *Poecilia reticulata*, *Oncorhynchus mykiss*, *Daphnia magna*, *Desmodesmus subspicatus*, *Sinapis alba*, NaCl, formaldehyde, BioCare SPC, KMnO<sub>4</sub>

# OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>11</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>12</b>
2.1 TESTY TOXICITY .....	12
2.2. VYUŽITÍ TESTŮ TOXICITY .....	14
2.2.1. Využití testů akutní toxicity .....	14
2.2.2. Využití testů chronické toxicity .....	15
2.2.3. Normy používané v oblasti vodní toxikologie .....	15
2.3. CHOVY RYB A MOŽNOSTI LÉČBY.....	17
2.4. LÉČEBNÉ KOUPELE VYUŽÍVANÉ V RYBÁŘSKÉ PRAXI ..	19
2.4.1. Obecná pravidla .....	19
2.4.2. Léčebné koupele .....	21
2.4.3. Stručná charakteristika testovaných látek .....	21
2.4.2.1. Manganistan draselný .....	21
2.4.2.2. Formaldehyd .....	22
2.4.2.3. Chlorid sodný .....	23
2.4.2.4. BioCare SPC .....	24
<b>3. MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>27</b>
3.1. CHARAKTERISTIKA TESTOVANÝCH LÁTEK .....	27
3.1.1. Manganistan draselný .....	27
3.1.2. Formaldehyd .....	28
3.1.3. Chlorid sodný .....	29
3.1.4. BioCare SPC .....	30
3.2. TESTOVANÉ ORGANISMY .....	31
3.2.1. Ryby .....	31
3.2.2. <i>Daphnia magna</i> .....	31
3.2.3. <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	31
3.2.4. <i>Sinapis alba</i> .....	31
3.3. METODIKY EKOTOXIKOLOGICKÝCH TESTŮ .....	32

3.3.1. Test akutní toxicity na rybách <i>Poecilia reticulata</i> a <i>Oncorhynchus mykiss</i>	32
3.3.2. Akutní imobilizační test na perloočkách <i>Daphnia magna</i>	35
3.3.3. Test inhibice růstu sladkovodních řas <i>Desmodesmus subspicatus</i>	36
3.3.4. Test inhibice růstu kořene <i>Sinapis alba</i>	39
<b>3.4. HODNOCENÍ TESTŮ TOXICITY</b>	<b>41</b>
3.4.1. Test akutní toxicity na rybách <i>Poecilia reticulata</i> a <i>Oncorhynchus mykiss</i>	41
3.4.2. Akutní imobilizační test na perloočkách <i>Daphnia magna</i>	42
3.4.3. Test inhibice růstu sladkovodních řas <i>Desmodesmus subspicatus</i>	42
3.4.3.1. Stanovení hodnoty IC50 pomocí integrálů biomasy	42
3.4.3.2. Stanovení hodnoty IC50 pomocí růstových rychlostí	44
3.4.4. Test inhibice růstu kořene <i>Sinapis alba</i>	45
<b>4. VÝSLEDKY</b>	<b>47</b>
4.1. MANGANISTAN DRASELNÝ	47
4.2. FORMALDEHYD	48
4.3. CHLORID SODNÝ	50
4.4. BIOCARE SPC	51
4.5. SOUHRNNÝ PŘEHLED VÝSLEDKŮ	53
4.5.1. Hodnocení toxicity manganistanu draselného	53
4.5.2. Hodnocení testů toxicity chemické látky formaldehyd	54
4.5.3. Hodnocení testů toxicity chemické látky NaCl	54
4.5.4. Hodnocení testů toxicity přípravku BioCare SPC	55
4.6. HODNOCENÍ TESTŮ NA STANDARDU $K_2Cr_2O_7$	55
<b>5. DISKUZE</b>	<b>56</b>
<b>6. ZÁVĚR</b>	<b>59</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>60</b>
<b>8. PŘÍLOHY</b>	<b>62</b>



## Seznam použitých zkratk a symbolů

<b>A</b>	plocha pod růstovou křivkou, test inhibice růstu sladkovodních řas
<b>c</b>	koncentrace ( $\text{ml.l}^{-1}$ , resp. $\text{mg.l}^{-1}$ )
<b>EC50</b>	koncentrace, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50 % testovacích <i>Daphnia magna</i>
<b>I<sub>Ai</sub></b>	inhibice růstu sladkovodních řas pro danou koncentraci zjištěná na základě porovnání ploch pod růstovými křivkami, je-li $I_{Ai} < 0$ , jedná se o stimulaci růstu (%)
<b>I<sub>i</sub></b>	inhibice růstu kořene hořčice bílé v dané koncentraci, je-li $I < 0$ , jedná se o stimulaci růstu (%)
<b>I<sub>μi</sub></b>	inhibice růstu sladkovodních řas pro danou koncentraci zjištěná na základě porovnání růstových rychlostí, je-li $I_{μi} < 0$ jde o stimulaci růstu
<b>IC50</b>	koncentrace, která způsobí 50% inhibici růstu kořene hořčice bílé ( <i>Sinapis alba</i> ) ve srovnání s kontrolou ve zvoleném časovém úseku, resp. 50% inhibici růstu sladkovodních řas ( <i>Desmodesmus subspicatus</i> )
<b>IC50<sub>A</sub></b>	koncentrace, která způsobí 50% inhibici růstu sladkovodních řas ve srovnání s kontrolou ve zvoleném časovém úseku, vyhodnocená pomocí integrálů biomasy
<b>IC50<sub>μ</sub></b>	koncentrace, která způsobí 50% inhibici růstu sladkovodních řas ve srovnání s kontrolou ve zvoleném časovém úseku, vyhodnocená pomocí růstových rychlostí
<b>LC50</b>	koncentrace vodného výluhu, která způsobí úhyn 50 % testovacích ryb ( <i>Poecilia reticulata</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) ve zvoleném čase
<b>LOEC</b>	nejnižší koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky (lowest observed effect concentration)
<b>N<sub>n</sub></b>	hustota buněk v době $t_n$ (počet buněk v 1 ml), test inhibice růstu sladkov. řas
<b>NOEC</b>	nejvyšší koncentrace testovaného vzorku nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky (no observed effect concentration)
<b>SOP</b>	standardní operační postup
<b>t<sub>n</sub></b>	doba n-tého měření od počátku testu (ve dnech)
<b>μ</b>	rychlost růstu řasové kultury

# 1. ÚVOD

Léčiva, a to jak humánní tak i veterinární, podléhají velmi přísnému režimu povolování podmiňujícímu jejich uvedení na trh. Důvodem je odpovědnost za objektivnost posouzení vztahu mezi přínosy a riziky spojenými s používáním léčiv, tedy za zajištění maximální možné účinnosti při zachování maximální možné bezpečnosti (Škaloud a Šimůnek, 1997).

Touto problematikou se zabývá farmakovigilance. V České republice je budován takový systém veterinární farmakovigilance, který je již využíván ve většině států EU. Veterinární farmakovigilance u ryb vyžaduje zpracování metodických postupů sledováním nežádoucích účinků aplikace veterinárních léčiv na ryby a další vodní organismy. Zvláštní kapitolou celého systému farmakovigilance u ryb je pak hodnocení dopadů používání léčiv na životní prostředí, včetně návrhů postupů a opatření, které povedou k monitorování rizik spojených s léčbou ryb (Škaloud a Šimůnek, 1997).

Nynější problém je harmonizovat s EU oblast farmakovigilance léčebných a pomocných přípravků aplikovaných v podmínkách akvakulturních chovů v ČR a navrhnout jednotné zásady léčebných postupů v chovech ryb. Současná paleta v ČR registrovaných přípravků zahrnuje pouze léčiva s antimikrobiálním účinkem. Proto se jeví jako žádoucí nejen rozšíření výběru léčiv s antimikrobiálním účinkem, nýbrž mít k dispozici léčiva účinná proti dalším onemocněním. Je konstatována potřeba dalších léčivých přípravků pro ryby v České republice s upozorněním na nutnost legálního postupu při jejich uvedení do oběhu – registrace. Na druhé straně by však pro použití u ryb byla žádoucí legalizace použití určitých chemických látek, které nemají charakter typických léčiv. Chybějící přípravky budou nejprve vyhledány mezi přípravky používanými a registrovanými v zemích EU (Škaloud a Šimůnek, 1997).

Ve své diplomové práci jsem se proto zaměřila na posouzení ekotoxicity léčebných přípravků (KMnO<sub>4</sub>, formaldehyd NaCl, BioCare SPC) s cílem zařadit přípravky do tříd toxicity pomocí R vět. Sledování jsem prováděla formou akutní toxicity na rybách (*Poecilia reticulata* a *Oncorhynchus mykiss*), perloočkách (*Daphnia magna*), řasách (*Desmodesmus subspicatus*) a test inhibice růstu kořene kulturní rostliny hořčice bílé (*Sinapis alba*).

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 TESTY TOXICITY

Testy toxicity se provádějí na třech úrovních, a to (Svobodová et al., 1992):

- a) na úrovni buněk a tkání
- b) na úrovni jedinců (organismů)
- c) na úrovni společenstev (biocenóz).

Testy na úrovni buněk a tkání se často používají pro teoretické objasnění poznatků, získaných při pokusech na organismech. Výhodou je jejich dobrá reprodukovatelnost a naopak nevýhodou je značná odlišnost výsledků *in-vitro* od výsledků obdržných *in-vivo*. Na úrovni biocenóz se sleduje toxický účinek v přírodě či na modelu, nevýhodou je fakt, že toxický účinek se nemusí projevit vždy stejně, různé reakce na určitý druh, narušení potravních řetězců. Většina testů se provádí na úrovni organismů. U těchto testů se můžeme setkat s potížemi s reprodukovatelností (Svobodová et al., 2003, Svobodová et al., 2000).

Testy toxicity dělíme podle doby trvání na testy **akutní** a **chronické toxicity**.

Testy **akutní toxicity** se provádějí po dobu 48 – 96 hodin. Tyto testy se používají například pro testování odpadů určených pro skládkování, výluhů skládek a dále pro testování nově vyráběných a do praxe zaváděných látek. Výsledkem těchto testů jsou hodnoty **xhLC (EC, IC50)**, kde

x - je počet hodin expozice

LC50 - letální koncentrace pro 50 % testovacích organismů – v testech na rybách

EC50 - efektivní koncentrace, která vyvolá 50% úhyn, či imobilizaci testovacích

organismů - v testech na zástupcích zooplanktonu

IC50 - inhibiční koncentrace, tj. koncentrace, která způsobí 50% inhibici růstu ve srovnání s kontrolou – v testech na zelených řasách, kořenu hořčici bílé a na okřehku.

V testech **chronické toxicity** jsou organismy vystavovány testované látce po dobu 90 dnů. Poté se účinky látky na organismech vyhodnotí a výsledkem testů chronické toxicity je

- NPK hodnota (nejvyšší přípustná koncentrace) tj. koncentrace, která nepoškozuje organismy ani při dlouhodobém působení

- NOEC – nejvyšší koncentrace testovaného vzorku nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky

- LOEC – nejnižší koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky.

Při zjišťování hodnot LC50, EC50 a IC50 se vychází z koncentrací, ve kterých došlo k účinkům nižším než nulové a méně než stoprocentní mortalitě, imobilizaci či inhibici růstu. Z tohoto důvodu je možno provést nejdříve tzv. **limitní test**, při kterém se zjišťuje toxicita testovacích organismů na koncentraci 100 mg.l<sup>-1</sup> testovaného vzorku. Když při tomto testu neuhyne žádný z testovacích organismů, provede se **ověřovací test** s vyšším počtem organismů. V opačném případě nastupuje **předběžný test**. Předběžný test se provádí s menším počtem testovacích organismů – např. 3 – 5 ks ryb nebo 10 ks dafnií v každé koncentraci a nasazuje se široké rozmezí koncentrací testované látky. Na základě výsledků předběžného testu se volí užší rozsah koncentrací účinkem pro tzv. **základní test**. Do základního testu se nasazuje větší počet testovacích organismů, např. 7 – 10 ryb nebo 20 dafnií do každé koncentrace i kontroly. Z výsledků základního testu se potom vypočítává hodnota LC, EC, IC50 (Svobodová et al., 2000).

Při testech toxicity se provádí v určitých časových intervalech tzv. **vnitřní kontrola**. Jedná se vlastně o základní test, v němž je testovanou látkou **standard**. Jako standard je v ČR i v zahraničí využíván dichroman draselný (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> p.a.). Provedení testu se provádí podle standardem a porovnání takto získané hodnoty LC50 (EC50, IC50) s obecně platnými hodnotami umožňuje laboratoři kontrolu správnosti postupu i citlivosti použitých testovacích organismů (Svobodová et al., 2000).

Vedle vnitřní kontroly má každá ekotoxikologická laboratoř možnost **vnější kontroly**, a to formou účasti na tzv. okružních testech toxicity chemické látky, odpadku nebo odpadu (Svobodová et al., 2000). Okružní testy organizuje např. VÚV Praha (VÚV Praha).

**Ekotoxicita** je označována, podle Zákona č. 185/2001 Sb. o odpadech a Zákona č. 170/2003 Sb. o chemických látkách a chemických přípravcích, jako vlastnost, která se projevuje účinkem na základě souboru toxikologických testů, které se provádějí vodným výluhem z tří vodních organismech a semenech kulturní rostliny.

Hodnocení chemických látek a přípravků včetně pesticidů se v současné době provádí podle Zákona č. 356/2003 Sb. o chemických látkách a přípravcích. Cílem této klasifikace je upozornit uživatele na nebezpečí plynoucí z přítomnosti a následujících efektů látek, přípravků a odpadů v ekosystému. Testované látky a přípravky se označují z hlediska speciálních rizik následujícími **R větami**:

- R50:** vysoce toxické pro vodní organismy       $LC(EC, IC) 50 \leq 1 \text{ mg.l}^{-1}$   
**R51:** toxické pro vodní organismy       $1 \text{ mg.l}^{-1} < LC(EC, IC) 50 < 10 \text{ mg.l}^{-1}$   
**R52:** škodlivé pro vodní organismy       $10 \text{ mg.l}^{-1} < LC(EC, IC) 50 \leq 100 \text{ mg.l}^{-1}$

Rozhodující pro zařazení látky nebo přípravku do třídy toxicity je zjištěná hodnota  $LC(EC, IC)50$  pro nejcitlivější druh testovacích organismů. Zařazení se provádí podle nejnižší zjištěné hodnoty  $LC(EC, IC)50$  (Svobodová et al., 2000).

## 2.2. VYUŽITÍ TESTŮ TOXICITY

### 2.2.1. VYUŽITÍ TESTŮ AKUTNÍ TOXICITY

Při hodnocení akutní toxicity chemických látek, přípravků a odpadů, případně odpadních vod se zjišťují hodnoty  $LC50$  (letální koncentrace pro 50 % testovaných organismů - v testech na rybách), hodnoty  $EC50$  (efektivní koncentrace, která vyvolá 50% úhyn či imobilizaci testovacích organismů - v testech na zástupcích zooplanktonu a efektivní koncentrace, která snižuje o 50 % luminiscenci emitovanou mořskými bakteriemi) a hodnoty  $IC50$  (inhibiční koncentrace, která způsobí 50% inhibici růstu ve srovnání s kontrolou - v testech na zelených řasách, hořčici bílé a na okřešku). Při hodnocení toxicity testovaného vzorku je pro organismus důležitá nejen koncentrace látky, ale také doba jejího působení (Svobodová et al., 2000).

Doba působení je dána metodikou příslušného testu toxicity a uvádí se ve výsledku. V testech na baktériích je doba trvání testu 15 min a výsledkem je hodnota  $15\text{min}EC50$ , analogicky pro zelené řasy trvá test 72 hodin a výsledkem je hodnota  $72\text{h}IC50$ , pro dafnie se stanovuje  $48\text{h}EC50$ , pro ryby  $96\text{h}LC50$ , pro semena hořčice bílé  $72\text{h}IC50$  a pro okřehek menší  $168\text{h}IC50$  (Svobodová et al., 2000).

## 2.2.2. VYUŽITÍ TESTŮ CHRONICKÉ TOXICITY

Cílem testů toxicity je stanovení hodnot LC50, NOEC, LOEC. Za účelem stanovení těchto hodnot jsou využívány standardizované metody akutních a prolongovaných testů toxicity podle OECD (Organization for Economic Cooperation of Development), případně ISO (International Organization for Standardization).

Dlouhodobé testy toxicity (3 – 6 měsíců) se provádějí za účelem stanovení nejvyšších přípustných koncentrací (NPK) látek a přípravků z hlediska chovu ryb (Čítek et al., 1997).

Při laboratorních testech je třeba pracovat 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.

## 2.2.3. NORMY POUŽÍVANÉ V OBLASTI VODNÍ TOXIKOLOGIE

OECD Guideline for Testing of Chemicals 201 Alga, Growth Inhibition Test. 1984, 14 pp.

OECD Guideline for Testing of Chemicals 202 *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. (Draft Updated Guideline, July 1999)

OECD Guideline for Testing of Chemicals 203 Fish, Acute Toxicity Test, 1992, 9 pp.

OECD Guideline for Testing of Chemicals 204 Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-day Study. 1984, 9 pp.

OECD Guideline for Testing of Chemicals 210 Fish, Early-life Stage Toxicity Test. 1992, 18 pp.

OECD Guideline for Testing of Chemicals 211 *Daphnia* sp. Reproduction Test. Revised draft document, 1998

OECD Guideline for Testing of Chemicals 212 Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages. 1998

OECD Guideline for Testing of Chemicals 215 Fish, Juvenile Growth Test (Draft New Guideline, August 1999)

OECD Guideline for Testing of Chemicals , *Lemna* sp. Growth Inhibition Test (Draft New Guideline, June 1999)

- ISO 6341 Water Quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). International Organization for Standardization, 1982, 9 pp.
- ISO 7346/1 Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish */Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)/ - Part 1: Static method. International Organization for Standardization, 1984, 9 pp.
- ISO 7346/2 Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish */Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)/ - Part 2: Semi-Static method, International Organization for Standardization, 1984, 9 pp.
- ISO 7346/3 Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish */Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)/ - Part 3: Flow-through method. International Organization for Standardization, 1984, 9 pp.
- ČSN EN ISO 8692 Jakost vod. Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas (idt ISO 8692:2004). ČNI Praha, 2005, 17 s.
- ČSN EN ISO 6341 Jakost vod. Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) – Zkouška akutní toxicity. ČNI Praha, 1997, 16 s.
- ČSN EN ISO 7346-1 Jakost vod. Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby */Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)/. Část 1: Statická metoda. ČNI Praha, 1999, 16 s.
- ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod. Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby */Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)/. Část 2: Obnovovací metoda. ČNI Praha, 1999, 16 s.
- ČSN EN ISO 7346-3 Jakost vod. Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby */Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)/. Část 3: Průtočná metoda. ČNI Praha, 1999, 16 s.
- ČSN EN 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)/. ČNI Praha, 1996, 20 s.
- ČSN EN ISO 1138-2 Jakost vod – Stanovení inhibičního vlivu vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) – Část 2: Metoda se sušenými bakteriemi. ČNI Praha, 1999, 17 s.

TNV 75 7741 Mikrometoda stanovení toxicity a trofického potenciálu řasovým testem.  
HYDROPROJEKT a.s., Praha, 1997, 15 s.

### 2.3. CHOVY RYB A MOŽNOSTI LÉČBY

Chovy ryb lze rozdělit na chovy zájmové (akvariijní a okrasné ryby) a chovy produkční, spadající do kategorie chovů potravinových zvířat (potravinové ryby). U potravinových zvířat nelze aplikovat léčivo, u kterého nebyl stanoven MRL (maximální reziduální limit). U ryb se ochranná lhůta (OL) vyjadřuje v denních stupních (stupňodnech). Jeden stupeň je představován průměrnou teplotou 1 °C po dobu jednoho dne (24 hodin) – např. 100 stupňodnů = 10 dní při průměrné teplotě vody 10 °C. Pokud nelze ochrannou lhůtu určit, přiřazuje se danému přípravku nejdelší ochranná lhůta: 500 stupňodnů. U potravinových ryb lze aplikovat pouze léčivé přípravky, které jsou registrované (Kolářová, Nepejchalová, 2005).

Pro registraci veterinárních léčivých přípravků je nutné respektovat následující právní normy (Kolářová, Nepejchalová, 2005):

Základním předpisem Evropské unie je Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to veterinary medicinal product (Directive, 2001) (Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2001/82/ES o kodexu Společenství týkajícího se veterinárních léčivých přípravků). Tato směrnice je v současné době implementovaná do české legislativy a vychází z ní zákon č. 79/1997 Sb. o léčivech (Zákon č. 79, 1997), ve znění pozdějších předpisů, a vyhlášky, které se k němu vztahují.

Vyhláška č. 288/2004 Sb. (Zákon č. 79, 1997), kterou se stanoví podrobnosti o registraci léčivých přípravků, jejich změnách, prodloužení, o klasifikaci léčivých přípravků pro výdej, převodu registrace, vydávání povolení pro souběžný dovoz, předkládání a navrhování specifických léčebných programů s využitím neregistrovaných humánních léčivých přípravků, o způsobu oznamování a vyhodnocování nežádoucích účinků léčivého přípravku, včetně náležitostí periodicky aktualizovaných zpráv o bezpečnosti, a způsob a rozsah oznámení o použití neregistrovaného léčivého přípravku (registrační vyhláška o léčivých přípravcích), ve znění pozdějších předpisů, u které v současné době probíhá novelizace.



Vyhláška č. 472/2000 Sb. (Zákon č. 79,1997), kterou se stanoví správná klinická praxe a bližší podmínky klinického zkoušení, ve znění pozdějších předpisů.

Vyhláška č. 504/2000 Sb. (Zákon č. 79, 1997), kterou se stanoví správná laboratorní praxe v oblasti léčiv, ve znění pozdějších předpisů.

Vyhláška č. 325/2003 Sb. (Zákon č. 79, 1997), kterou se stanoví pravidla pro používání léčivých přípravků při poskytování veterinární péče, včetně souvisejícího předepisování a výdeje léčivých přípravků a požadavků pro vedení záznamů o těchto činnostech a náležitosti oznámení o nakládání s látkami nebo přípravky, včetně podmínek pro vedení a uchovávání záznamů o těchto činnostech. Tato vyhláška stanovuje pravidla použití veterinárních a humánních léčivých přípravků v terapii zvířat, pokud není pro účely poskytování veterinární péče k dispozici veterinární přípravek registrovaný podle § 23 zákona pro danou indikaci a pro daný druh a kategorii zvířat.

Veterinární lékař může použít jako léčivo první volby přípravek registrovaný pro daný druh zvířete. Léčiva určená k aplikaci u ryb jsou v současné době v ČR přípravky: Flumiquil 50% plv. ad. us. vet. (flumequin – OL: 80 stupňodnů; Ceva Animal Health Sk), Rupin special gran. ad. us. vet. (oxytetracyklin – OL: 378 stupňodnů; Univit, s. r. o., CZ) a centralizovanou procedurou registrovaný hormonální veterinární léčivý přípravek Gonazon koncentrát pro přípravu injekčního roztoku pro jikernačky lososovitých ryb (Azagly – nafarelin acetate – OL: bez ochranných lhůt, Intervet International B. V.).

Další možností veterinárního lékaře je použít léčivý přípravek určený pro jiný druh zvířete či pro jinou indikaci nebo léčivo humánní. Pokud takovýto přípravek bude použit pro chov tržních ryb, je potřeba dodržet „standardní“ ochrannou lhůtou, tzn. Nejméně 500 stupňodnů. Totéž platí také pro případ použití léčiva připraveného dle receptu „magistra-liter“. V této souvislosti je třeba připomenout, že odpovědnost za použití této skupiny léčiv na sebe bere veterinární lékař. Proto je doporučeno v takových případech použít formulář „souhlas s neregistrovaným použitím léčivého přípravku“ (Hera et al., 2004).

Veterinární lékař může k léčbě ryb využít přípravky registrované pro ryby v zahraničí. V tomto případě musí žádat Státní veterinární správu ČR o povolení dovozu daného přípravku a to při každém jednotlivém dovozu (Kolářová, Nepejchalová, 2005).

Pro preventivní zásahy, zejména v chovech lososovitých ryb, jsou v rámci EU registrovány také vakcíny proti nejčastějším bakteriálním infekcím: furunkulóza (*Aeromonas salmonicida*), vibrióza (*Vibrio anguillarum*), hemoragicko-septikemické

onemocnění označované jako „Hitra disease“ nebo „Cold water vibriosis“ (*Vibrio salmonicida*) (Kolářová, Nepejchalová, 2005).

## **2.4. LÉČEBNÉ KOUPELE VYUŽÍVANÉ V RYBÁŘSKÉ PRAXI**

### **2.4.1. OBECNÁ PRAVIDLA**

Léčivem rozumíme léčivé látky nebo jejich směsi anebo léčivé přípravky určené k podání zvířatům, včetně homeopatik; přičemž léčivými látkami se rozumí látky přírodního nebo syntetického původu, zpravidla s farmakologickým, či imunologickým účinkem nebo ovlivňující organismus, které slouží k prevenci, léčení a mírnění chorob, určení diagnózy a k ovlivnění fyziologických funkcí (Škaloud a Šimůnek, 1997).

Léčebně působící látky a přípravky se využívají především na tlumení ektoparazitálních, plísňových a bakteriálních onemocnění povrchu těla a žaber. V některých případech lze léčebné koupele po vstřebání účinných látek kůží a žabrami využít i k tlumení původců vnitřních nemocí. Léčebné koupele se podle délky trvání rozdělují na (Čítek et al.,1997):

- a) ponořovací
- b) krátkodobé
- c) dlouhodobé

Ponořovací koupele trvají nejdéle 5 minut. Při tomto typu koupele se používají poměrně vysoké koncentrace účinných látek. Krátkodobá koupel trvá 5 minut až 2 hodiny, dlouhodobá koupel trvá 2 hodiny až několik dní. Tyto koupele využívají nižší účinné koncentrace léčebných prostředků po delší dobu působení. Mezi dlouhodobé koupele patří i ošetření celých chovných nádrží a rybníků léčebnými prostředky (Čítek et al.,1997).

Při provádění léčebných koupelí musí být dodržena řada obecných zásad, jejich cílem je maximalizovat účinnost koupelí a minimalizovat ztráty.

## **K obecným zásadám patří** (Čítek et al., 1997):

Soustavně sledovat zdravotní stav obsádky, aby mohla být v případě potřeby pohotově zvolena nejúčinnější léčebná koupel (ryby s pokročilým stupněm onemocnění jsou velmi oslabené, a proto dochází při koupelích k vysokým ztrátám. Kontrola zdravotního stavu se provádí 1 – 2krát týdně, podle stáří ryb, v rybničním zařízení 1krát měsíčně).

Na základě výsledků vyšetření je stanoven druh léčebné koupele. Většina léčebných preparátů je pro ryby ve vyšších koncentracích toxická, a proto je třeba dodržovat přesný postup koupele. Dávku léčebného prostředku pro provedení koupele je třeba přesně vypočítat, aby byla dodržena doporučená koncentrace koupelí. Pro tyto účely se zjišťuje tzv. terapeutický index, což je poměr letální koncentrace pro původce a letální koncentrace pro ryby. Jeho hodnota by neměla být menší než 4, optimum je 10. Léčiva se přidávají do vody předem rozpuštěná, koncentrovaný roztok se rozstříká na hladinu.

Fyzikálně chemické vlastnosti vody ovlivňují účinnost léčebných prostředků i jejich toxicitu vůči rybám. Nejvýznamnější je teplota vody, hodnota pH, koncentrace organ. látek, KNK do pH 4,5, suma Ca + Mg a další. Zvýšená teplota vody zvyšuje účinnost, ale i toxicitu všech léčebných prostředků. Zvýšená koncentrace organických látek snižuje účinnost a toxicitu např.  $\text{KMnO}_4$ .

Před provedením všech druhů léčebných koupelí je nutné provést tzv. zkoušku snášenlivosti. To znamená provést na několika rybách biologický pokus, při němž se ověřují účinky léčebné koupele pro danou rybí obsádku za daných podmínek. Zkouška snášenlivosti je zvláště potřebná např. před provedením léčebných koupelí u akvarijských ryb. Citlivost jednotlivých druhů těchto ryb k doporučovaným léčivům je velmi rozdílná.

Před ponořovací nebo krátkodobou koupelí se ryby 24 hod před koupelí nekrmí. Při dlouhodobých několikadenních koupelích se ryby přikrmují.

V okamžiku zahájení koupele se začne měřit čas a pozoruje se chování ošetřovaných ryb. V případě výrazných změn v chování ryb ukončíme lázeň v kratším časovém limitu. Při některých léčebných koupelích dojde obvykle i k úhynu nejvíce napadených jedinců. Tyto kusy je nutné ihned z koupelového roztoku odstranit. Při několikadenních koupelích se účinnost léčiva postupně snižuje. Proto je třeba nádrž s roztokem léčiva obnovovat.

Ověření účinnosti provedených léčebných koupelí se provádí makroskopicky a mikroskopicky po přelovení ryb do čisté vody.

Obecným požadavkem je nepoužívat léčebné koupele tržních ryb 14 dnů před jejich dodáním na trh. Ochrannou lhůtu před konzumací ryb určí veterinární specialista.

## 2.4.2. LÉČEBNÉ KOUPELE U RYB

Tab. 1. *Přehled nejdůležitějších chemických látek a přípravků používaných k léčebným koupelím ryb (Čítek et al., 1997).*

LÉČEBNÉ KOUPELE		
Ponořovací	Krátkodobé	dlouhodobé
Lyzol	NaCl	Malachitová zeleň
Vápenné mléko	Formaldehyd	Trichlorfon (Soldep, Masoten, Neguvon)
KMnO <sub>4</sub>	Malachitová zeleň	Akriflavin
Čpavek a trypaflavin	Malachitová zeleň a formaldehyd	Metronidazol (Entizol)
Malachitová zeleň	Oxychlorid mědi (Kuprikol 50)	NaCl
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	KMnO <sub>4</sub>	Formaldehyd
	Antibiotika, sulfonamidy	KMnO <sub>4</sub>
	Chloramin B	Antibiotika
	Sladká voda *)	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O
		Levamisol
		Praziquantel
		Chlorové vápno

\*) užívá se v mořské akvaristice (doba trvání koupele 15 – 20 minut)

## 2.4.3. STRUČNÁ CHARAKTERISTIKA TESTOVANÝCH LÁTEK

### 2.4.3.1. Manganistan draselný (KMnO<sub>4</sub>)

**Použití a příprava:** Manganistan draselný se používá ve formě (Čítek et al., 1997):

- *ponořovacích koupelí* (1 g.l<sup>-1</sup> po dobu 30 až 45 sekund)

- **krátkodobých koupelí** ( $0,1 \text{ g.l}^{-1}$  5 až 10 minut;  $0,01 \text{ g.l}^{-1}$  po dobu 60 až 90 minut)
- **dlouhodobých koupelí** ( $0,3$  až  $0,6 \text{ mg.l}^{-1}$  po dobu 12 hodin – manipulační rybníky), doporučují se k protiplísňovému, antiparazitálnímu (při nálezů protozoóz) a antibakteriálnímu ošetření ryb.

K léčení eudiplozoonózy kapra se osvědčila koupel v manganistanu draselném v koncentraci  $1 \text{ g.l}^{-1}$  po dobu 2,5 minuty. Léčebné koncentrace manganistanu draselného jsou velmi blízké letálním koncentracím pro ryby, a proto se musí ošetření provádět zvláště uvažovaně, zejména u akvariálních ryb. Proto je zde nezbytné provést zkoušku snášenlivosti. V létě při vyšší teplotě vody jsou koupele pro ryby nebezpečné. Při manipulaci s generačními rybami se často používá lokální ošetření místa poranění tamponem namočeným v roztoku manganistanu draselného (Čítek et al., 1997).

Manganistan draselný je látka středně až silně jedovatá pro ryby, zjištěná letální koncentrace pro kapra byla  $40 \text{ mg.l}^{-1}$ , pro okouna říčního  $6 \text{ mg.l}^{-1}$  (Svobodová et al., 1987).

### 2.4.3.2. Formaldehyd

**Použití:** Formaldehyd je distribuován ve formě 36 až 38% vodného roztoku. K antiparazitárnímu ošetření ryb se používá pouze čirý roztok bez usazenin paraformaldehydu (bílá usazenina na dně). Při vlastním provádění koupele je třeba z činitelů ovlivňujících účinnost a toxicitu koupele vzít v úvahu především teplotu vody. Současně je velmi důležité dbát na bezpečnost pracovníků provádějících léčebnou koupel. Formaldehyd byl zařazen mezi kancerogenní látky. Ošetření tržních ryb formaldehydovou koupelí se provádí nejpozději 14 dní před jejich dodáním na trh. Formaldehyd se používá většinou ve formě krátkodobých koupelí, a to při nálezů druhů *Cryptobia*, *Ichthyobodo*, *Chilodonella*, *Trichodina*, *Trichodinella*, *Dactylogyrus*, *Gyrodactylus*, *Silurodiscooides* a při povrchovém zaplísnění (Čítek et al., 1997).

**Příprava:** Formaldehydová lázeň se připravuje s přihlédnutím k teplotě vody (používá 36 až 38% vodný roztok formaldehydu):

<  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$  se v koncentraci  $0,25 \text{ ml.l}^{-1}$

$10$  až  $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$  v koncentraci  $0,20 \text{ ml.l}^{-1}$

> 15 °C v koncentraci 0,17 ml.l<sup>-1</sup> (doba působení je 30 až 60 minut).

Pro ošetření raných stádií plůdku kaprovitých ryb a sumce se doporučuje koncentrace 0,25 ml.l<sup>-1</sup> a délka koupele 30 minut při teplotě vody 25 °C. Formaldehydové dlouhodobé solné koupele se používají ve stejném případě jako dlouhodobé solné koupele, a to 36 až 38% vodný roztok formaldehydu v koncentraci 0,025 až 0,030 ml.l<sup>-1</sup>. Aplikuje se jednorázově do přítoku, délka lázně není časově omezena (Čítek et al., 1997).

### 2.4.3.3. Chlorid sodný (NaCl)

**Použití:** V rybářství se běžně využívá k antiparazitárním zásahům při odchovu ryb od raných stádií až do tržní velikosti. Je to umožněno nejen jeho dostupností a cenovou výhodností, ale také poměrně dobrým antiparazitárním účinkem a relativní neškodností pro člověka. Protože rozdíl mezi letálními koncentracemi NaCl pro ryby a pro parazity není příliš vysoký, je třeba při ošetření ryb přesně dodržovat obecné zásady, především pokyny pro provádění testu snášenlivosti koupelí. Pro aplikaci solné koupele se zásadně nepoužívají pozinkované nádoby (Čítek et al., 1997).

Kuchyňská sůl se používá většinou ve formě krátkodobých koupelí, a to účinně při nálezu druhů rodů *Cryptobia*, *Ichthyobodo*, *Chilodonella*, *Trichodina*, *Trichodinella*, s nižší účinností při nálezu druhů rodů *Dactylogyrus*, *Gyrodactylus*, *Piscicola*, *Argulus* a při povrchovém zaplísnění (Čítek et al., 1997).

**Příprava:** Solná lázeň se připraví rozpuštěním 10 až 30 g NaCl v 1 litru vody, doba trvání koupele je 15 až 30 minut. Solná koupel se může, pokud je to třeba, u většiny druhů ryb opakovat. U vývojových stádií plůdku ryb se při teplotě vody 20 až 25 °C osvědčila koupel v NaCl o koncentraci 10 g.l<sup>-1</sup> po dobu 30 minut. V chovu kaprovitých ryb se používá NaCl v koncentraci 20 g.l<sup>-1</sup> po dobu 15 minut k ošetření slabšího plůdku. Tato koupel se používá i pro ošetření lososovitých ryb. U silnějšího plůdku a u vyšších ročníků kaprovitých ryb se používá lázeň o koncentraci 30 g.l<sup>-1</sup> po dobu 25 až 30 minut. Kuchyňská sůl se také používá ve formě dlouhodobé koupele při výskytu chilodonelózy u ryb držných v sádkách nebo v manipulačních rybníčcích v podzimním nebo jarním období, a to v koncentraci 1 až 2 g.l<sup>-1</sup> po dobu 1 až 2 dnů. Účinek solných koupelí se při teplotách vody pod 5 °C podstatně snižuje (Čítek et al., 1997).

#### 2.4.3.4. BioCare SPC (firemní materiály)

**Použití a příprava:** Dezinfekční přípravek, který se používá v chovech ryb. Lze jej proto použít k prevenci parazitálních onemocnění ryb, ke snížení bakteriálního a parazitálního zatížení vody a k vyčištění vody od látek, které mohou dráždit žábry, jako například od řas a různých částic. BioCare SPC se dodává v granulované formě a proto nepráší a nedráždí oči ani dýchací orgány (granule jsou nelepivé).

Bio Care SPC zvyšuje obsah kyslíku ve vodě a proto jej lze použít i v situacích, kdy je vyšší organické zatížení vody, například v létě. Dávkování přípravku však při vyšších teplotách musí být upraveno. Zvýšená dodávka kyslíku je žádoucí především v situacích kdy žábry ryb jsou silně poškozené, například v důsledku napadení parazity. Prokysličením vody je rovněž potřebné pokud je během procesu dezinfekce průtok vody dočasně zastaven.

Při stanovení dávek přípravku je nutné vzít v úvahu tyto faktory:

- kvalitu vody (čím vyšší znečištění, tím vyšší dávky)
- teplotu vody (čím vyšší teplota, tím nižší dávky)
- zdravotní stav ryb (nižší dávky při prevenci, vyšší při propuknutí onemocnění)

Nelze proto přesně určit paušální dávky přípravku. Doporučuje se přizpůsobit dávky konkrétním podmínkám příslušného chovu.

#### **Použití přípravku BioCare SPC při prevenci onemocnění plůdku:**

Při odlovu plůdku se zpravidla používá čistá voda a proto je dávkování dezinfekčního přípravku relativně menší a to i při nižších teplotách. Velmi dobré preventivní účinky má aplikace 40 – 60 g přípravku na m<sup>3</sup> vody 2 – 3krát týdně. Nedoporučuje se používat přípravek ve dvou po sobě jdoucích dnech (nebezpečí zduření žaber).

#### **Použití přípravku BioCare SPC při prevenci parazit. onemocnění většiny ryb:**

Parazitě, bakterie a plísňe často napadají žábry ryb chovaných v zemních rybníčkách i betonových žlabech. Žaberní a tím i dýchací problémy bývají rovněž způsobeny podrážděním řasami, organickými částicemi ve vodě apod. Použití přípravku BioCare SPC v těchto situacích znamená zlepšení kvality vody její dezinfekcí, a tím i

odstraněním mikroorganismů a dále odstraněním části organického znečištění vody. Vedlejším efektem rozkladu přípravku ve vodě je vytváření kyslíku, které má pozitivní vliv především při léčbě ryb trpících dýchacími problémy.

Dávkování závisí na teplotě a kvalitě vody, často se v letním období (teplota vody 12 – 18 °C) doporučuje dávka 50 – 100 g.m<sup>-3</sup>. Při poklesu teploty vody se dávka zvyšuje. Efekt použití přípravku BioCare SPC při léčbě onemocnění způsobených parazity *Ichthyophthirius multifiliis* a *Gyrodactylus*.

*Gyrodactylus* – parazit je během 18 hodin kompletně eliminován při použití koncentrace 80 g.m<sup>-3</sup> (při použití poloviční koncentrace je účinnost 92 %).

*Ichthyophthirius multifiliis* – použitá koncentrace přípravku 63 g.m<sup>-3</sup> vody prokázala mimořádně dobrý a rychlý efekt (během jedné hodiny) na theronty, tj. mimo tělo žijící stádium. Určitý efekt byl rovněž zjištěn po několika hodinách při použití koncentrace 13 g.m<sup>-3</sup>. Přípravek bohužel nepůsobí na tornonty – tj. cystální stádium parazitů. Doporučený postup aplikace vychází ze skutečnosti, že se v praxi často na dně rybníčků nachází početné cysty, z nichž se průběžně uvolňují aktivní stadia parazitů. Theronty hledající po uvolnění z cyst svého hostitele, je nutné paralizovat právě v tomto stádiu. Relativně nízké koncentrace přípravku se aplikují každý den tak dlouho, dokud cysty uvolňují theronty. Délka této doby závisí na teplotě vody. Při vyšších teplotách to může být týden, při nižších teplotách déle.

### **Konkrétní příklad z praxe - popis dezinfekce zemního rybníčku s chovem pstruha duhového**

Zemní rybníček 250 m<sup>3</sup> byl dezinfikován při teplotě vody 16 stupňů. Průtok vody byl zastaven po dobu 24 minut. Dávka přípravku 7 kg (tj. 28 g.m<sup>-3</sup>) byla rovnoměrně aplikována po celém povrchu rybníčku. Pro ilustraci změn hladiny kyslíku bylo prováděno měření obsahu kyslíku. Pozorované změny. Během několika minut po aplikaci přípravku byly ze dna rybníčka na povrch vyplaveny na povrch uhynulé ryby. V průběhu prvních minut se obsah kyslíku snížil (v důsledku zastavení průtoku vody), po 10 – 12 minutách se objevily na mnoha místech kyslíkové bubliny. Obsah kyslíku začal stoupat a po cca 20 minutách dosáhl vrcholu, tj. o cca 1,4 mg.l<sup>-1</sup> více, než před zastavením průtoku.



**Tab. 2. Použití dezinfekčních prostředků na bázi peroxidu vodíku**

	ZEMNÍ RYBNÍČKY	BETONOVÉ ŽLABY (MENŠÍ PRŮTOK)	BETONOVÉ ŽLABY (VĚTŠÍ PRŮTOK)
Voda s vyšším obsahem organických částic, řas atd. (10 – 12 stupňů) – standardní voda na pstruhařství	Asi 100 g.m <sup>-3</sup>	Nižší koncentrace tj. 50 – 75 g.m <sup>-3</sup>	Neexistuje obecné doporučení, snažit se snížit průtok vody
Během zimy	Zvýšená koncentrace. Onemocnění mají často méně dramatický průběh. Menší frekvence aplikace může znamenat stejně dobrý výsledek. Prodloužit dobu aplikace.		
Během léta	Snížit koncentraci a náhradou zvýšit frekvenci aplikací (pokud je to nutné).		
Studniční voda nebo voda z vrtů, nebo obecně čistá voda	Snížit koncentraci, neboť voda je čistá. Nesnižovat koncentraci příliš, pokud je teplota vody hodně nízká!		
Preventivní aplikace (před zjištěním patogenů)	Zhruba 10 – 20 % běžné dávky jedenkrát za týden.		

## 3. MATERIÁL A METODIKA

### 3.1. CHARAKTERISTIKA TESTOVANÝCH LÁTEK

#### 3.1.1. Manganistan draselný ( $\text{KMnO}_4$ )

Manganistany se odvozují od kysličníku manganistého  $\text{Mn}_2\text{O}_7$ , který vystupuje jako anhydrid kyseliny. Manganistany patří do solí oxokyselin. V roztocích jsou přítomny fialové ionty  $[\text{MnO}_4]^-$  (ionty manganistanové, sedmimocný mangan). Největší význam z manganistanů má manganistan draselný, ročně se ho vyrobí několik desítek tun (Greenwood et al., 1993).

**Fyzikální a chemické vlastnosti:** V základním pevném složení tvoří manganistan draselný lesklé purpurově červené, tmavé, téměř černé, hnědavé hranoly. Rozkládá se při teplotě pod  $240^\circ\text{C}$ . Ve vodě je středně rozpustný (za obyčejné teploty málo přes 1/3 molu v 1 litru). Intenzivně červenofialový roztok má charakteristické absorpční spektrum (Remy, 1972).

Manganistan draselný je s chloristanem draselným izomorfní a poskytuje s ním plynulou řadu směsných krystalů. Roztoky manganistanu jsou vnitřně nestálé a v kyselém roztoku probíhají pomalu. V neutrálních nebo slabě alkalických roztocích v temnu je rozklad neměřitelně pomalý. Rozklad je však katalyzován světlem, takže standardní roztoky manganistanu se mají uchovávat v tmavých láhvích (Remy, 1972).

**Biologické účinky:** Manganistan draselný může způsobit poleptání pokožky, ale toxický je pouze při požití.

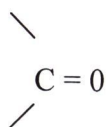
**Použití:** Manganistan draselný má rozsáhlé použití jako oxidační činidlo jak v analytické, tak i v preparativní chemii. V preparativní organické chemii je manganistan draselný oblíbeným oxidačním činidlem. Slouží při výrobě sacharinu a kyseliny benzoové. Jinak slouží k odstraňování organických znečištěnin z látek, např. empyreumatických složek ze surové kyseliny octové (Remy, 1972). Oxidační vlastnosti manganistanu se také využívají v pyrotechnice (anonym, online).

Manganistan draselný je oblíbeným dezinfekčním prostředkem. Velmi často se uplatňuje v laboratoři k promývání plynů. Tomuto účelu slouží také v technice, např. při čištění kysličníku uhličitého ve výrobě minerálních vod. Jeho dezinfekční účinky se dále používají při úpravě pitné vody, kde se nahrazuje chlor, oproti němuž má mnohé přednosti. Předně nedodává vodě nežádoucí příchut' a kromě toho jeho účinkem vzniká

MnO<sub>2</sub>, který působí jako koagulační prostředek k odstranění koloidních nečistot (Greenwood et al., 1993). Likviduje plísně.

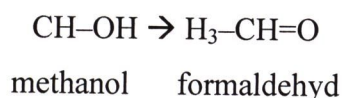
### 3.1.2. Formaldehyd (methanal, formalín)

Formaldehyd patří do karbonylových sloučenin, nověji označované jako oxosloučeniny, které obsahují alespoň jednu karbonylovou skupinu (oxoskupinu):



Podle substituentu vázaného na zbývající valence formaldehyd můžeme dále zařadit do skupiny zvané aldehydy (Kalač, 1996).

**Formaldehyd** se vyrábí oxidací methanolu a používá se ve formě 30 – 40% vodného roztoku (formalín).



**Fyzikální vlastnosti** jsou určovány přítomností polární karbonylové skupiny a jejím poměrem k nepolární části molekuly. V karbonylu existuje posun elektronů, který je zdrojem mezimolekulárních přitažlivých sil. Ty sice nedosahují účinnosti vodíkových můstků, ale ve srovnání s uhlovodíky zřetelně ovlivňují teploty varu a tání (b. v. – 21°C, b. t. – 91°C). Rozpustnost je určována počtem karbonylových skupin a jejich poměrem vůči uhlíkovému řetězci. Značná polarita molekul formaldehydu způsobuje velmi dobrou rozpustnost ve vodě, s rostoucí molekulovou hmotností rozpustnost ve vodě klesá (Kalač, 1996).

**Biologické účinky** nižších aldehydů jsou dráždivé a tlumivé na ústřední nervstvo. Formaldehyd má mimořádně silné dráždivé účinky (Kalač, 1996).

Technické roztoky formaldehydu (30 až 40% formalin) obsahují současně dost methanolu a mravenčí kyseliny. Formaldehyd při inhalační expozici dráždí oči a horní cesty dýchací, z plic se vstřebává. Jeho výrazný zápach však působí varovně. Roztoky i páry formaldehydu poškozují kůži. Po požití dochází k těžkým nekrosám v ústech,

jícnu, žaludku i ve střevech, protože formaldehyd sráží bílkoviny. Dále dochází ke křečím, bolesti a ke krvavému zvracení (Kácl, 1959).

**Chemické vlastnosti:** Aldehydy i ketony jsou velmi reaktivní sloučeniny. Karbonylová skupina je značně polarizována. To umožňuje iontové adiční reakce.

Pro biologické materiály je však častější reakce aldehydů a ketonů s aminy, resp. s aminoskupinami jiných látek. Na těchto reakcích je založena konzervační a dezinfekční účinnost formaldehydu. Při teplotách skladování pod asi 10 °C formaldehyd polymerizuje a usazuje se jako pevný paraformaldehyd. Tím koncentrace roztoku značně klesá. Zahřátím či přidáním minerální kyseliny však paraformaldehyd snadno depolymerizuje. Jako konzervační látka potravin a krmiv se již formaldehyd nepoužívá vzhledem k mutagenním účinkům (Kalač, 1996).

### 3.1.3. Chlorid sodný (NaCl)

Chlorid sodný vyskytující se v přírodě ve velikém množství, je zřídka ve formě čisté. U alkalických chloridů jde o soli silných zásad se silnou kyselinou, reagují jejich vodné roztoky neutrálně. Dále se znatelně hydrolyzují přehřátou vodní párou.

NaCl se v přírodě vyskytuje kromě v mořské vodě, která průměrně obsahuje 2,7 % NaCl, dále jako kamenná sůl ve velikých ložiscích o mocnosti 1000 a více metrů (Remy, 1972).

**Získávání:** kuchyňská sůl se získává hlavně třemi metodami (Remy, 1972):

1. dolováním kamenné soli
2. rozpouštěním kamenné soli v hlubině a odpařováním získané solanky, částečně také z přírodních solanek
3. z mořské vody samovolným odpařováním tzv. solných zahrad, ve velmi studených krajích vymrazováním.

Kamenná sůl je znečištěna hlavně síranem vápenatým a hořečnatým. Určitého vyčištění lze dosáhnout již ručním vybíráním kousků anhydritu a sádrovce z hrubě rozdrčené soli. Dále se čistí tavením nebo omýváním čistou solankou (Remy, 1972).

**Fyzikální a chemické vlastnosti:** NaCl je bezbarvá krystalická látka (b. t. 801 °C, b.v. 1413 °C). Čistý chlorid sodný není hygroskopický. Známé vlhnutí jedlé soli na vlhkém vzduchu je způsobeno nečistotami, které v ní zbyly. Chlorid sodný krystalizuje

v bezbarvých krychlích, hustoty  $2,17 \text{ g.cm}^{-3}$ . Při teplotě tání je již zřetelně těkavý. Rozpustnost chloridu sodného se jen málo mění s teplotou (Březina et al., 1968).

**Biologické vlastnosti:** Zajišťuje isotonicitu krevní plazmy, denní spotřeba člověka je 3 – 4 g (Kácl, 1959).

**Použití:** Kromě potravinářského využití má též průmyslové využití. V technice je chlorid sodný výchozí látkou pro přípravu téměř všech ostatních sodných sloučenin. Kamenná sůl tvoří základ průmyslu kyseliny chlorovodíkové a síranů, výroby sody, chloru a hydroxidu sodného. Mimo to slouží k mnoha průmyslovým a řemeslnickým účelům, např. k vylučování mýdla, k vysolování organických barviv, k chloračnímu pražení, při některých metalurgických pochodech a v koželužství k nasolování kůží, ke zhotovování chladících směsí (Remy, 1972).

### 3.1.4. BioCare SPC

Chemický vzorec této látky je  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}_2$ . BioCare SPC, chemicky hydrogen peruhličitan sodný, je přípravek využívající působení peroxidu vodíku. Peroxid vodíku je chemická látka, která se rozkládá během reakce na vodu a kyslík. Během tohoto procesu dezinfikuje vodu a reaguje s organickým materiálem ve vodě (Smith, 2005).

**Biologické účinky:** Nebezpečný v případě, že dojde ke kontaktu s kůží nebo zasáhne oči. Citlivá pokožka reaguje vytvořením popálenin, či vředů. Dále nebezpečný při požití, či vdechnutí (Smith, 2005).

**Fyzikální a chemické vlastnosti:** Hydrogen peruhličitan se používá ve formě bílých pevných krystalů. Molekulární hmotnost této látky je  $157,01 \text{ g.mol}^{-1}$ . Rozpustnost ve vodě je nízká, ale stoupá s teplotou vody. Špatná rozpustnost je ve formaldehydu. BioCare SPC je dále velice reaktivní látka, reaguje hlavně s kyselinami, dále ještě reaguje s organickými látkami a kovy (Smith, 2005).

**Použití:** Peroxid vodíku je látka nacházející se v přirozené formě v životním prostředí. V menších množstvích se rovněž přidává např. do mléka nebo do medu k zamezení rozkladným procesů. Dále je součástí dezinfekčních prostředků na bázi peroxidu vodíku (Smith, 2005).

## 3.2. TESTOVACÍ ORGANISMY

### 3.2.1. Ryby

#### *Poecilia reticulata*

Ryby použité k testům akutní toxicity byly pohlavně diferencované, v rozmezí délek těla 15 - 25 mm, ve věku 3 až 4 měsíců. Ryby se používaly v přirozeném poměru pohlaví (1:1). Samice neměly zřetelnou zárodečnou skvrnu. Ryby se do jednotlivých testovacích nádob vybíraly náhodně.

#### *Oncorhynchus mykiss*

Ryby byly použity k testování v rozmezí délek těla 9 – 13 cm, o průměrné hmotnosti  $24 \pm 5$  g. Ryby byly do jednotlivých testovacích nádrží vybírány náhodně.

### 3.2.2. *Daphnia magna*

K testu byly použity *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*), ve stáří do 24 hodin, nejméně třetí generace, získaná cyklickou partenogenezí za podmínek zdravého prosperujícího chovu.

### 3.2.3. *Desmodesmus subspicatus*

Testovacím organismem byla planktonní sladkovodní řasa *Desmodesmus subspicatus* = *Scenedesmus subspicatus* Chodat. V testech bylo pracováno s kulturou ze sbírky autotrofních organismů botanického ústavu AVČR v Třeboni.

### 3.2.4. *Sinapis alba*

K testu byly použity přebraná semena hořčice bílé (*Sinapis alba*) s klíčivostí minimálně 90%, střední velikosti (1,5 až 2,5 mm), okrově žlutá.

### 3.3. METODIKY EKOTOXIKOLOGICKÝCH TESTŮ

#### 3.3.1. Test akutní toxicity na rybách *Poecilia reticulata* a *Oncorhynchus mykiss*

##### Princip testu

Ryby *Poecilia teticulata*, *Oncorhynchus mykiss* byly vystaveny po dobu 96 hod. účinkům různých koncentrací testované látky rozpuštěné v ředící vodě a současně byly nasazeny testovací organismy do ředící vody bez testované látky – kontrola. V intervalu 24 hod. byl kontrolován stav ryb a zaznamenával se počet uhynulých jedinců v jednotlivých koncentracích a v kontrole. Ze získaných hodnot byly užitím probitové analýzy vypočítány střední letální koncentrace 96hLC50. V souvislosti s doporučenými koncentracemi a délkami expozice terapeutických koupelí byla sledována mortalita i v menších časových intervalech.

Testy byly prováděny 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.

##### Podmínky testu

#### A) Test akutní toxicity na rybách *Poecilia reticulata*

- **Teplota:**  $21 \pm 2$  °C
- **Délka expozice:**  $96 \pm 2$  hodin
- **Objem lázně:** 1000 ml v předběžném testu, 2000 ml v základním testu (*Poecilia reticulata*)
- **Ředící voda:** v testech byla použita voda připravená podle ISO 7346
- **Výměna lázně:**  $48 \pm 2$  hodinách
- **Osvětlení:** 12 hodin denně
- **Počet testovacích organismů (ryb):** 3 kusy v jedné koncentraci v předběžném testu, 7 kusů v jedné koncentraci v základním testu
- **Počet paralelních stanovení:** jeden paralelní test
- **Bez aerace:** v potravinářských sklenicích (*Poecilia reticulata*)
- **Ostatní podmínky:** bez krmení

## B) Test akutní toxicity na rybách *Oncorhynchus mykiss*

- **Teplota:**  $16 \pm 2$  °C
- **Délka expozice:**  $96 \pm 2$  hodin
- **Objem lázně:** 20 litrů v předběžném testu, 20 litrů v základním testu
- **Ředící voda:** - **vodovodní** (základní parametry: pH = 8,3; KNK<sub>4,5</sub> = 1,2 mmol l<sup>-1</sup>; CHSK<sub>Mn</sub> = 1,1 mg.l<sup>-1</sup>; NH<sub>4</sub><sup>+</sup> < 0,05 mg.l<sup>-1</sup>; NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 9,7 mg.l<sup>-1</sup>)  
- **voda rybníční** (základní parametry: pH = 8,3; KNK<sub>4,5</sub> = 0,8 mmol.l<sup>-1</sup>; CHSK<sub>Mn</sub> = 8,7 mg.l<sup>-1</sup>; NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = 0,05 mg.l<sup>-1</sup>; NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 8,0 mg.l<sup>-1</sup>)
- **Výměna lázně:**  $48 \pm 2$  hodinách
- **Osvětlení:** 12 hodin denně
- **Počet testovacích organismů (ryb):** 3 kusy v jedné koncentraci v předběžném testu, 7 kusů v jedné koncentraci v základním testu
- **Počet paralelních stanovení:** jeden paralelní test
- **S aerací:** v akváriích
- **Ostatní podmínky:** bez krmení

**Pomůcky a zařízení:** oximetr, pHmetr, analytické váhy, laboratorní váhy s přesností na 0,1 mg, odměrné baňky, pipety, skleněné nálevky, kádinky, sítky a pomůcky pro odlov a přenášení ryb, potravinářské sklenice (*Poecilia reticulata*), akvária (*Oncorhynchus mykiss*)

### Pracovní postup

Adaptace ryb: před testem byly ryby aklimatizovány po dobu 48 hodin na osvětlení a teplotu vody, ryby nebyly krmeny 24 hod před zahájením testu

### Provedení předběžného a základního testu

Předběžný test obsahoval řadu koncentrací testované látky, volených v širokém rozpětí. Do jednotlivých koncentrací testované látky se nasazovalo po 3 kusech ryb. Stejným způsobem byla nasazena kontrola. Zhruba po 48 hodinách byly ryby přeloveny do čerstvě připravených, vytemperovaných roztoků testované látky. V průběhu trvání předběžného testu byla sledována a zaznamenávána mortalita a chování ryb. Na začátku testu a ve 24 hodinových intervalech byla měřena teplota a pH lázně a koncentrace



rozpuštěného kyslíku. Po ukončení testu byla změřena délka těla (od tlamy ke kořeni ocasu). Na základě výsledků tohoto testu byly voleny koncentrace pro základní test.

Základní test obsahoval 6 (7) různých koncentrací testované látky v rozmezí stanoveném na základě výsledků předběžného testu. Do jednotlivých koncentrací testované látky bylo nasazeno po 7 kusech ryb. Dále bylo postupováno stejným způsobem jako v předběžném testu.

### **Kontrola podmínek testu**

Na začátku testu, po 24, 48, 72 hodinách a na konci testu byla měřena teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Kontrola chování organismů byla prováděna v časových úsecích 24, 48, 72 a 96 hodin. Po ukončení testu byla změřena délka těla (od hlavy ke kořeni ocasu) a 10 % v testu použitých ryb bylo zaznamenáno do pracovního protokolu.

### **Platnost testu (validation) dle ČSN EN ISO 7346-2**

Výsledky byly považovány za platné, jestliže byla splněna následující kritéria:

- koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovacích roztocích a v kontrole během celého testu neklesla pod 60 % nasycení
- o koncentraci zkoušené látky není známo (nebo se nepředpokládá), že by během zkoušky významně poklesla
- mortalita kontrolních ryb nepřekročila 10 % nebo 1 ryba na nádrž
- zjištěná hodnota 24hLC50 standardu byla ve shodě s výsledky odpovídajícími pro tento standard.

Test akutní toxicity na rybách byl proveden podle standardního operačního postupu SOP 01, který vychází z normativních postupů ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby /*Brachydanio rerio* Hamilton Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)/ Část 2: Obnovovací metoda a OECD 203 Fish, Acute Toxicity Test.

### 3.3.2. Akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna*

#### Princip testu

Perloočky byly vystaveny po dobu 48 hodin účinku různých koncentrací testované látky. Současně byly nasazeny testovací organismy do vody bez testované látky – kontrola. V intervalu 24 hodin byl kontrolován stav perlooček a zaznamenávání uhynulí a imobilizovaných jedinců v jednotlivých koncentracích a v kontrole. Vzhledem k tomu, že makroskopicky lze mortalitu a imobilizaci perlooček odlišit jen obtížně, je nadále používán pouze výraz imobilizace. Ze získaných hodnot byla stanovena střední efektivní koncentrace EC50 v časovém úseku 48 hodin (48hEC50).

#### Podmínky tetu:

- **Teplota:**  $20 \pm 2$  °C
- **Délka expozice:** 48 hodin
- **Ředící voda:** k přípravě ředící vody se použila destilovaná nebo demineralizovaná voda s konduktivitou do  $1 \text{ mS}\cdot\text{m}^{-1}$
- **Množství testovaného roztoku:** minimálně 5 ml na jedince při dodržení výše sloupce vody (roztoku) minimálně 30 mm
- **Počet testovaných organismů (dafnií):** 10 kusů v jedné nádobě, 20 kusů v jedné koncentraci (2 nádoby pro jednu koncentraci)
- **Ostatní podmínky:** bez aerace, bez krmení, bez osvětlení

**Pomůcky a zařízení:** kádinky o objemu cca 150 ml, soustava třídicích sítok, odměrné válce 100 ml, pipety s balónkem, odměrné baňky (100 ml), Pasteurovy pipety nebo tenkostěnné skleněné trubičky se světlostí 2 až 4 mm, pH metr, oximetr, analytické váhy

#### Pracovní postup

##### Provedení předběžného a základního testu

Nejprve byl proveden předběžný test a na základě předběžného testu byly voleny koncentrace do základního testu. Do testovacích i kontrolních nádob s polovičním objemem ředící vody (50 ml) než je konečný objem testovaného roztoku (tj. 100 ml) bylo nasazeno 10 kusů dafnií ve stáří do 24 hod. Při nasazování dafnií do testovacích i kontrolních nádob bylo postupováno takto: Do připravených kádinek s 50 ml ředící

### 3.2. Akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna*

#### Princip testu

Perloočky byly vystaveny po dobu 48 hodin účinku různých koncentrací testované látky. Současně byly nasazeny testovací organismy do vody bez testované látky – kontrola. V intervalu 24 hodin byl kontrolován stav perlooček a zaznamenávání uhynulí a imobilizovaných jedinců v jednotlivých koncentracích a v kontrole. Vzhledem k tomu, že makroskopicky lze mortalitu a imobilizaci perlooček odlišit jen obtížně, je nadále používán pouze výraz imobilizace. Ze získaných hodnot byla stanovena střední efektivní koncentrace EC50 v časovém úseku 48 hodin (48hEC50).

#### Podmínky testu:

- **Teplota:**  $20 \pm 2$  °C
- **Délka expozice:** 48 hodin
- **Ředící voda:** k přípravě ředící vody se použila destilovaná nebo demineralizovaná voda s konduktivitou do  $1 \text{ mS} \cdot \text{m}^{-1}$
- **Množství testovaného roztoku:** minimálně 5 ml na jedince při dodržení výše sloupce vody (roztoku) minimálně 30 mm
- **Počet testovaných organismů (dafnií):** 10 kusů v jedné nádobě, 20 kusů v jedné koncentraci (2 nádoby pro jednu koncentraci)
- **Ostatní podmínky:** bez aerace, bez krmení, bez osvětlení

**Pomůcky a zařízení:** kádinky o objemu cca 150 ml, soustava třídících sítěk, odměrné válce 100 ml, pipety s balónkem, odměrné baňky (100 ml), Pasteurovy pipety nebo tenkostěnné skleněné trubičky se světlostí 2 až 4 mm, pH metr, oximetr, analytické váhy

#### Pracovní postup

##### Provedení předběžného a základního testu

Nejprve byl proveden předběžný test a na základě předběžného testu byly voleny koncentrace do základního testu. Do testovacích i kontrolních nádob s polovičním objemem ředící vody (50 ml) než je konečný objem testovaného roztoku (tj. 100 ml) bylo nasazeno 10 kusů dafnií ve stáří do 24 hod. Při nasazování dafnií do testovacích i kontrolních nádob bylo postupováno takto: Do připravených kádinek s 50 ml ředící

vody byly pomocí skleněné trubičky přenášeny dafnie (10 ks). Dafnie byly opatrně vypouštěny pod hladinu, aby nedošlo k zavzdušnění. Po napočítání dafnií byla do kádinky doplněna testovaná látka v 50 ml ředící vody. Testovaná látka byla dávkována formou připraveného vodného roztoku tak, aby výsledná koncentrace odpovídala její požadované koncentraci. Do kontrolní kádinky bylo přidáno 50 ml ředící vody bez přídavku testované látky.

### **Kontrola podmínek testu a testovacích organismů**

Na začátku testu, po 24 hodinách a na konci testu byla měřena teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Kontrola organismů byla prováděna v časových úsecích 24 a 48 hodin. Byli spočítáni mobilní jedinci v každé testovací nádobě. Jedinci, kteří nebyli schopni se rozplavat za 15 s po mírném zamíchání roztoku, byli považováni za imobilizované, i kdyby ještě pohybovali tykadly.

### **Platnost testu (validace) dle ČSN ISO 6341**

Výsledky byly považovány za platné, jestliže byla splněna následující kritéria:

- koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovacích roztocích na konci testu byla větší nebo rovna  $2 \text{ mg.l}^{-1}$
- imobilizace kontrolních organismů byla menší nebo rovna 10 %
- zjištěná hodnota 24hEC50 dichromanu draselného byla v rozsahu od  $0,6 \text{ mg.l}^{-1}$  do  $1,7 \text{ mg.l}^{-1}$ .

Akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna* byl proveden podle standardně operačního postupu SOP 02, který vychází z normativních postupů ČSN ISO 6341 jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) a OECD 202 Part I – the 24h EC 50 acute immobilisation test.

### **3.3.3. Test inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus***

#### **Princip**

Zelené sladkovodní řasy *Desmodesmus subspicatus* byly po několik generací kultivovány v definovaném živném roztoku (tento roztok byl ředící vodou), který obsahoval testovanou látku v určité koncentraci. Řasy byly inkubovány po dobu 72 hodin. V průběhu inkubace byly řasové suspence několikrát denně přelovovány.

Jedenkrát za 24 hodin byla měřena hustota buněk. Účinek testované látky na řasovou kulturu se projevil jako inhibice (snížení růstu nebo růstové rychlosti ve vztahu k růstu kontrolních kultur) a potom bylo vyhodnoceno 72hIC50. V některých případech účinek testované látky se projevil jako stimulační (zvýšení růstu nebo růstové rychlosti ve vztahu k růstu kontrolních kultur), v tom případě výpočet 72hIC50 nebyl proveden. Pokud testovaná látka působila stimulačně pouze v nízkých koncentracích a vyšší koncentrace působila inhibičně, vyhodnocovalo se IC50 za použití koncentrací, kde byla prokázána inhibice růstu.

#### **Podmínky testu:**

- **Teplota:**  $25 \pm 2$  °C
- **Osvětlení:** kontinuální, 6000 lux, max. 10 000 lux
- **Délka expozice:** 72 hod
- **Množství testovaného roztoku:** 25 ml ve 100ml Erlenmayerových baňkách
- **Ředící voda:** živný roztok podle mezinárodní normy ČSN EN ISO 8692 (viz Příloha)
- **Počáteční koncentrace řasové suspenze:**  $10\,000 \pm 2000$  buněk v 1 ml
- **Počet paralelních testů:** 2
- **Ostatní podmínky:** bez aerace, promíchávání řasové suspenze minimálně 3krát denně

**Pomůcky a zařízení:** termoluminostat, kultivační nádoby – Erlenmayerovy baňky stejného typu o objemu (250) ml, parafilm na uzavření baněk, světelný mikroskop, Burkerova počítací komůrka, autokláv pro sterilizaci živných medií, pipety s balónkem, odměrné baňky, pHmetr, analytické váhy

#### **Pracovní postup**

##### **Provedení předběžného a základního testu**

##### **Řasové inokulum a příprava inokula**

Řasové inokulum bylo pro tyto testy odebíráno z exponenciálně rostoucí inokulační kultury, která se připravila následujícím způsobem: k cca 100 ml živného roztoku (připraveného smícháním 1 objemového dílu zásobního roztoku živin s 8 díly vody) se přidala zásobní řasová kultura tak, aby výsledná koncentrace řasové suspenze byla cca 10 000 buněk v 1 ml. Inokulační kultura byla udržována po dobu 3 dnů za podmínek

testu (předkultivace byla provedena v temoluminostatu) a poté byla použita pro přípravu inokula do testu. Udržování kmenové kultury bylo provedeno na šikmém 15% agaru ve standardním živném mediu, na nepřímém denním světle při laboratorní teplotě, přeočkovávala se 1krát za 2 měsíce a dále zásobní kultury ve 250 ml Erlemnayerových baňkách se 100 ml standardního živného media, za stejných podmínek jako udržovací kmenová kultura. Příprava inokula byla provedena tak, že řasová suspenze v živném roztoku inokulační kultura se nechala usadit, horní čirá vrstva živného roztoku se slila. Tím se řasová suspenze zahustila a v počítací komůrce se stanovila její hustota. Výpočtem byl určen objem řasové suspenze, kterým se inokulovala koncentrační řada a kontrola. .

### **Výpočet potřebného objemu inokula**

V počítací komůrce byla stanovena hustota inokulační kultury z předkultivace. Testovací i kontrolní roztoky byly naočkovány stejným množstvím řasové suspenze tak, aby po naočkování bylo ve všech testovacích i kontrolních kulturách 10 000 buněk v 1 ml. Výpočet množství inokulační suspenze  $x$  přidávané k testovanému roztoku  $V$  bylo provedeno následujícím způsobem:

$$x = \frac{V \cdot c}{a}, \text{ kde}$$

$x$  = byl potřebný objem inokula v ml

$c$  = byla požadovaná hustota řasové kultury na začátku testu (10 000 buněk v 1ml)

$V$  = bylo množství testovaného roztoku v ml

$a$  = byla hustota inokulační kultury (počet buněk v 1 ml)

Stanovený objem řasové suspenze  $x$  byl dávkován do připravené koncentrační řady a do kontroly. Pokusné i kontrolní baňky se uzavřely parafilmem a umístily do termoluminostatu.

### **Kontrola podmínek testu a růstu řas**

Na začátku testu a ve 24 hodinových intervalech byla měřena teplota a hodnota pH roztoků. Dále ve 24 hodinových intervalech byla zjištěna řasová suspenze počítáním buněk v Bürkerově počítací komůrce.

### **Platnost testu (validace) dle ČSN EN 8692**

Výsledky byly považovány za platné, jestliže byla splněna následující kritéria:

- hustota buněk u kontrolního vzorku se musel v průběhu 72 hodin zvýšit více než 67krát
- pH v kontrolním vzorku se neměla změnit během testu o více než 1,5 jednotky
- zjištěná hodnota 72hIC50 dichromanu draselného byla ve shodě s výsledky odpovídajícími pro tento standard.

Test inhibice růstu sladkovodních řas byl proveden podle standardního operačního postupu SOP 03, který vychází z normativních postupů OECD 201 a ČSN EN 8692 Jakost vod - Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených, OECD 201 Alga Growth Inhibition Test.

### **3.3.4. Test inhibice růstu kořene *Sinapis alba***

#### **Princip**

Semena hořčice bílé byly vystaveny po dobu 72 hodin účinku různých koncentrací testované látky rozpuštěné ve standardně připravené ředící vodě, současně byly nasazeny po dobu 72 hodin semena do ředící vody bez přítomnosti testované látky – kontrola. Po 72 hodinách působení bylo v jednotlivých koncentracích i v kontrole stanoveno počet vyklíčených semen a změřila se délka kořenů.

#### **Podmínky testu:**

- **Teplota:**  $20 \pm 2$  °C
- **Množství roztoku:** cca 5 ml na jednu Petriho misku o průměru 120 – 140 mm (množství roztoku bylo závislé na velikosti misky na kvalitě filtračního papíru)
- **Počet testovacích semen:** 30 semen na jedné Petriho misce
- **Délka expozice:** 72 hodin
- **Ředící voda:** byla připravena z demineralizované vody dle ČSN ISO 6341
- **Počet paralelních stanovení:** 1 paralelní stanovení
- **Ostatní podmínky:** inkubace ve tmě

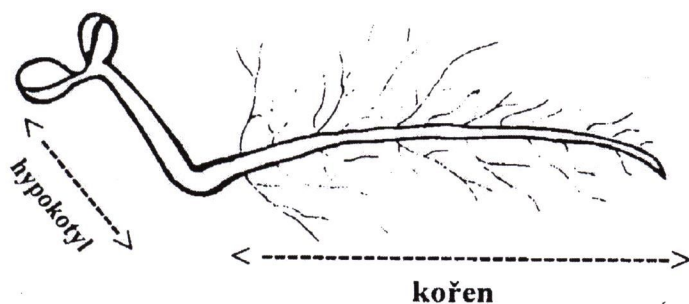
**Pomůcky a zařízení:** Petriho misky, filtrační papír hrubší pórovitosti, pinzeta, pipety s balónkem, odměrné baňky, milimetrové měřítko, nůžky, termostat, analytické váhy

### **Pracovní postup**

#### **Předběžný a základní test**

Nejprve byl proveden předběžný test a na základě předběžného testu byly voleny koncentrace pro základní test. Pro předběžný a základní test bylo nasazeno 30 semen na jednu Petriho misku. Při nasazení testu byl použit objem 50 ml každé koncentrace.

Na dno Petriho misky byla vložena 1 vrstva filtračního papíru, na který byl nadávkován pipetou testovaný roztok v množství 5 ml, tak aby byl filtrační papír dostatečně vlhká, ale nestála na něm voda. Na zvlhčený filtrační papír byla pinzetou pokládána přebraná semena hořčice bílé, misky byly přikryty víčkem a uloženy do termostatu. Po 72 hodinách inkubace byly misky vyjmuty z termostatu a u jednotlivých vyklíčených semen byla měřena délka kořene s přesností na 1 mm (Obr. 1.). Současně byla nasazena a kultivována kontrola.



**Obr. 1. Měření délky kořene hořčice bílé**

#### **Platnost testu (validace)**

Výsledky byly považovány za platné, jestliže byla splněna následující kritéria:

- v kontrole muselo být dosaženo minimální klíčivosti 90 %
- zjištěná hodnota 72hIC50 dichromanu draselného byla ve shodě s výsledky odpovídajícími pro tento standard



Test inhibice růstu kořene hořčice bílé byl proveden podle standardního operačního postupu SOP 04, který vychází z postupu podle Metodického pokynu č. 6 odboru odpadů MŽP ke stanovení ekotoxicity odpadů (věstník MŽP č. 6/2003).

### **3.4. HODNOCENÍ TESTŮ TOXICITY**

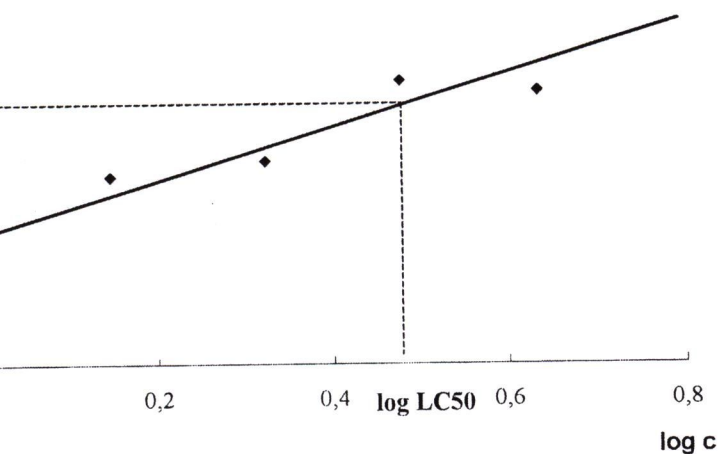
#### **3.4.1. Test akutní toxicity na rybách *Poecilia reticulata* a *Oncorhynchus mykiss***

Vyhodnocení bylo provedeno pomocí probitové analýzy tj. analýzy kvantálních dat, určených relativní četností uhynulých jedinců v závislosti na koncentraci, resp. na jejím logaritmu, přičemž esovitá regresní křivka aproximovala distribuční funkci normálního rozložení.

Probitová analýza byla provedena pomocí počítačového programu, který umožnil jednoduché a rychlé vyhodnocení a stanovení LC50, nebo graficky.

Při použití grafické metody bylo potřeba nejméně 5 hodnot, tj. 5 koncentrací, kde došlo k úhynu 5 až 95 % ryb. Koncentrace testované látky, ve kterých došlo k 5 až 95 % mortalitě ryb, se vyjádřila v logaritmických hodnotách ( $\log c$ ). Mortalita ryb byla vyjádřena v procentech a tyto hodnoty byly převedeny podle tabulky (Příloha - Tab. XXVIII.) na probity. Získané hodnoty byly vyneseny do souřadnicového systému, kde nezávisle proměnnou bylo  $\log c$  a závisle proměnnou probitové hodnoty.

Vynesenými body byla proložena přímka. Z průsečíku této přímky a souřadnice probitové hodnoty 5 (tj. 50 %) se spustila kolmice na osu x. Odečetla se příslušná hodnota  $\log c$  a jejím odlogaritmováním se získala LC50 (Obr. 2.).



cké vyhodnocení výsledků testů akutní toxicity a stanovení hodnoty

### í imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna*

byly vyhodnoceny stejným způsobem jako předchozí, místo hodnoty  
noveno EC50.

### inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus*

testů byly hodnoceny pomocí počítačového programu, který umožnil  
rychlé vyhodnocení a stanovení IC50, nebo graficky.

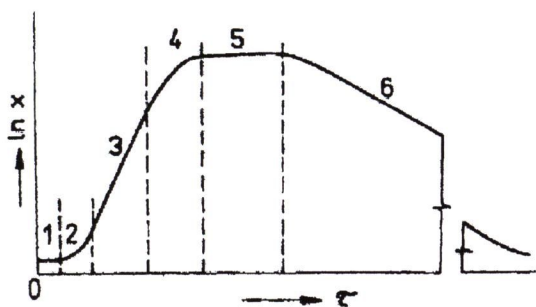
IC50 byla vyhodnocena dvěma základními způsoby:

ení hodnoty IC50 pomocí integrálů biomasy  $IC50_A$

ení hodnoty IC50 pomocí růstových rychlostí  $IC50_\mu$

### vení hodnoty IC50 pomocí integrálů biomasy

pro výpočet hodnoty IC50 byly růstové křivky řasové kultury sestrojené  
koncentrace, které se porovnávaly s kontrolou. Stanovení inhibice růstu  
na porovnání ploch pod růstovými křivkami řasové kultury v kontrole a  
vzorcích (integrály biomasy).



**Obr. 3 : Růstová křivka**

- $\tau$  - doba
- $x$  - počet živých buněk v 1 ml
- 1 - lag - fáze
- 2 - fáze zrychlujícího se růstu
- 3 - exponenciální fáze růstu
- 4 - fáze zpomalujícího se růstu
- 5 - stacionární fáze růstu
- 6 - fáze odumírání

**Obr. 3. Růstová křivka vyjadřuje závislost hustoty řasové kultury na čase, má několik úseků (obr. 3).**

Řasové inokulum pro test byl odebírán exponenciálně z rostoucí inokulační kultury. Exponenciální fáze růstu byla charakterizována tím, že buňky měly nejkratší generační dobu, která byla během této fáze konstantní. Když jsme přenesly buňky z exponenciální fáze růstu do nového kultivačního média o stejném složení, pokračovaly v rozmnožování se stejnou generační dobu, tj. bez zřetelné lag - fáze (Obr. 3) (Šilhalová, 1995).

Plocha **A** pod růstovou křivkou byla vypočítána pro každou testovanou kulturu z následující rovnice:

$$A = \frac{(N_1 - N_0) \times t_1}{2} + \frac{(N_1 + N_2 - 2N_0) \times (t_2 - t_1)}{2} + \dots + \frac{(N_{n-1} + N_n - 2N_0) \times (t_n - t_{n-1})}{2}$$

$t_1$  = doba prvního měření od počátku testu (ve dnech)

$t_n$  = doba n-tého měření od počátku testu (ve dnech)

$N_0$  = jmenovitá počáteční hustota buněk (počet buněk v 1 ml)

$N_1$  = změřená hustota buněk v čase  $t_1$  (počet buněk v 1 ml)

$N_n$  = změřená hustota buněk v době  $t_n$  (počet buněk v 1 ml)

Z vypočtených hodnot **A** pro každou testovanou koncentraci a kontrolní vzorek se vypočítala inhibice (případně stimulace) růstu  $I_{Ai}$  v % pro každou testovanou koncentraci z následující rovnice:

$$I_{A_i} = \frac{(A_c - A_i) \times 100}{A_c} \quad (\%), \text{ kde}$$

$I_{A_i}$  = inhibice pro danou koncentraci zjištěná na základě porovnání ploch pod růstovými křivkami, je-li  $I < 0$  jedná se o stimulaci růstu

$A_i$  = průměrná plocha pro danou koncentraci

$A_c$  = průměrná plocha pro kontrolní vzorek

Získané hodnoty inhibice růstu  $I_{A_i}$  byly vyneseny do grafu proti koncentraci, při které došlo k inhibici,  $I_{A_i} = f(\log c)$ . Body byla proložena přímkou. Z průsečíku této přímky a souřadnice inhibice 50 % byla spuštěna kolmice na osu x a byl odečten logaritmus  $IC_{50}$ . Odlogaritmováním bylo získáno  $IC_{50_A}$ .

### 3.4.3.2. Stanovení hodnoty $IC_{50}$ pomocí růstových rychlostí

Výpočet inhibice růstu může být také založen na porovnání růstových rychlostí  $\mu$  řasové kultury v testovacích roztocích a v kontrole:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n}, \text{ kde}$$

$N_n$  = hustota buněk naměřená v závěru testu (počet buněk v 1 ml)

$N_0$  = hustota buněk na počátku testu (počet buněk v 1 ml)

$t_n$  = doba trvání testu (dny)

Z vypočtených hodnot pro každou testovanou koncentraci a kontrolní vzorek byla vypočítána inhibice (případně stimulace)  $I$  v % pro každou testovanou koncentraci z následující rovnice:

$$I_{\mu_i} = \frac{(\mu_c - \mu_i) \times 100}{\mu_c} \quad (\%), \text{ kde}$$

$I_{\mu_i}$  = inhibice pro danou koncentraci zjištěná na základě porovnání růstových rychlostí, je-li  $I_i < 0$ , jedná se o stimulaci růstu

$\mu_i$  = růstová rychlost řasové kultury v testované koncentraci

$$I_{A_i} = \frac{(A_c - A_i) \times 100}{A_c} \quad (\%), \text{ kde}$$

$I_{A_i}$  = inhibice pro danou koncentraci zjištěná na základě porovnání ploch pod růstovými křivkami, je-li  $I <$  jedná se o stimulaci růstu

$A_i$  = průměrná plocha pro danou koncentraci

$A_c$  = průměrná plocha pro kontrolní vzorek

Získané hodnoty inhibice růstu  $I_{A_i}$  byly vyneseny do grafu proti koncentraci, při které došlo k inhibici,  $I_{A_i} = f(\log c)$ . Body byla proložena přímkou. Z průsečíku této přímky a souřadnice inhibice 50% byla spuštěna kolmice na osu x a byl odečten logaritmus  $IC_{50}$ . Odlogaritmováním bylo získáno  $IC_{50A}$ .

### 3.4.3.2. Stanovení hodnoty $IC_{50}$ pomocí růstových rychlostí

Výpočet inhibice růstu může být také založen na porovnání růstových rychlostí  $\mu$  řasové kultury v testovacích roztocích a v kontrole:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n}, \text{ kde}$$

$N_n$  = hustota buněk naměřená v závěru testu (počet buněk v 1 ml)

$N_0$  = hustota buněk na počátku testu (počet buněk v 1ml)

$t_a$  = doba trvání testu (dny)

Z vypočtených hodnot pro každou testovanou koncentraci a kontrolní vzorek byla vypočítána inhibice (případně stimulace)  $I$  v % pro každou testovanou koncentraci z následující rovnice:

$$I_{\mu_i} = \frac{(\mu_c - \mu_i) \times 100}{\mu_c} \quad (\%), \text{ kde}$$

$I_{\mu_i}$  = inhibice pro danou koncentraci zjištěná na základě porovnání růstových rychlostí, je-li

$I_i < 0$ , jedná se o stimulaci růstu

$\mu_i$  = růstová rychlost řasové kultury v testované koncentraci

$\mu_c$  = růstová rychlost řasové kultury v kontrole

Hodnota  $IC_{50\mu}$  byla odečtena z grafu  $I_i = f(\log c)$  stejným způsobem jako u předchozího stanovení.

### 3.4.4. Test inhibice růstu kořene *Sinapis alba*

Výsledky testů byly vyhodnoceny pomocí počítačového programu, který umožnil rychlé a pohodlné zpracování a určil hodnoty  $IC_{50}$ , nebo graficky.

Základem pro hodnocení inhibičních (stimulačních) účinků testované látky na *Sinapis alba* byla průměrná délka kořene zjištěná v testovacích miskách ve srovnání s průměrnou délkou kořene v kontrole. Počet nevyklíčených semen bylo uvedeno do protokolu a do průměru byla tato semena započítána jako nulová délka kořene. Semena, která vyklíčila, ale nevytvořila kořen, se do průměru započítávala rovněž jako nulová. Hodnota  $IC_{50}$  byla počítána pro každé paralelní stanovení zvlášť, výsledná hodnota byla průměrem uvedených hodnot. Jednotlivé hodnoty  $IC_{50}$  se neměly lišit o více než 30 %. Jestliže působila testovaná látka stimulačně,  $IC_{50}$  se nevyhodnocovalo.

#### Grafický postup:

#### Výpočet průměrné délky kořene *Sinapis alba*

$$\bar{L} = \frac{\sum L_i}{n}, \text{ kde}$$

$\bar{L}$  = byla průměrná délka kořene ve zvolené koncentraci (mm)

$L_i$  = délka i-tého kořene ve zvolené koncentraci (mm)

$n$  = bylo počet semen ve zvolené koncentraci

Stejným způsobem se vypočítala průměrná délka kořene v kontrole  $L_c$  (mm).

#### Výpočet inhibice růstu kořene v testované látce oproti kontrole:

$$I_i = \frac{\bar{L}_c - \bar{L}_v}{\bar{L}_c} \times 100$$

$I_i$  = inhibice růstu kořene (%) v dané koncentraci, je-li  $I < 0$ , jednalo se o stimulaci růstu

$\bar{L}_c$  = průměrná délka kořene v kontrole (mm)

$\bar{L}_v$  = průměrná délka kořene v testované koncentraci (mm)

Získané hodnoty inhibice růstu kořene  $I_i$  byly vyneseny do grafu proti koncentraci, při které došlo k inhibici:  $I_i = f(\log c)$ . Body byla proložena přímkou, z průsečíku této přímky a souřadnice inhibice 50% byla spuštěna kolmice na osu x a bylo odečteno a následně odlogaritmováno IC50.

## 4. VÝSLEDKY

Výsledky všech testů byly vyhodnoceny pomocí počítačového programu **EKOTOX**

### 5.1.

Vyhodnocení jednotlivých testů je uvedeno v Tabulkách 2 – 19.

Další průběh a vyhodnocení jednotlivých testů je uvedeno v Příloze (Tab. I. – XXVII.). Též grafické vyhodnocení jednotlivých testů je uvedeno v Příloze (Obr. I. – XIV.).

### 4.1. $\text{KMnO}_4$

**Tab. 2.** Mortalita ryb a výsledek testu akutní toxicity na *Oncorhynchus mykiss*

Koncentrace [ $\text{mg.l}^{-1}$ ]	Mortalita za 96 hod.	
	ks	%
1	0	0
2	0	0
3	6	86
5	7	100
10	7	100
100	7	100

$$\underline{96\text{hLC50} = 2,9 \text{ mg.l}^{-1}}$$

**Tab. 3.** Mortalita ryb a výsledek testu akutní toxicity na *Poecilia reticulata*

Koncentrace [ $\text{mg.l}^{-1}$ ]	Mortalita za 96 hod	
	ks	%
0,1	0	0
0,5	0	0
1	3	100
1,5	3	100
2,0	3	100
5,0	3	100

$$\underline{96\text{hLC50} = 0,5 - 1 \text{ mg.l}^{-1}}$$



**Tab. 4.** Inhibice růstu a výsledek testu inhibice růstu na *Desmodesmus subspicatus* pomocí integrálů biomasy a rychlosti růstu

Koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	Průměrná hustota buněk			Inhibice [%]	
	1. den	2.den	3.den	Podle integrálů biomasy	Podle rychlosti
Kontrola	52500	247500	822500	-	-
0,1	52500	217500	895000	-0,9	-1,9
0,2	42500	237500	975000	-7,9	-3,9
0,3	20000	42500	155000	80,3	38,4
0,4	17500	55000	87500	83,7	51,6

$$\underline{72\text{hIC}_{50_A} = 0,31 \text{ mg.l}^{-1}}$$

$$\underline{72\text{hIC}_{50_\mu} = 0,37 \text{ mg.l}^{-1}}$$

**Tab. 5.** Inhibice růstu kořene *Sinapis alba* a výsledek testu

Koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	Inhibice [%]	Průměrná délka kořene [cm]
10	0,0	3,43
20	0,0	3,18
50	0,0	3,19
100	3,43	2,91
200	3,10	2,92

$$\underline{72\text{hIC}_{50} > 200 \text{ mg.l}^{-1}}$$

## 4.2. Formaldehyd

**Tab. 6.** Mortalita ryb a výsledek testu akutní toxicity na *Oncorhynchus mykiss*

Koncentrace [ml.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita za 96 hod.	
	ks	%
0,1	3	43
0,2	7	100
0,3	7	100
0,4	7	100
0,5	7	100
1	7	100

$$\underline{96\text{hLC}_{50} = 0,1 - 0,2 \text{ ml.l}^{-1}}$$

**Tab. 7.** Mortalita ryb a výsledek testu akutní toxicity na *Poecilia reticulata*

Koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita za 96 hod	
	ks	%
100	0	0
200	7	100
300	7	100
500	7	100
700	7	100
1000	7	100

$$\underline{96hLC50 = 100 - 200 \text{ mg.l}^{-1}}$$

**Tab. 8.** Imobilizace a výsledek testu akutní toxicity na *Daphnia magna*

Koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	Imobilizace [%]
5	0
10	15
20	50
50	100
100	100

$$\underline{48hEC50 = 19,5 \text{ mg.l}^{-1}}$$

**Tab. 9.** Inhibice růstu a výsledek testu inhibice růstu na *Desmodesmus subspicatus* pomocí integrálů biomasy a rychlosti růstu

Koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	Průměrná hustota buněk			Inhibice [%]	
	1. den	2.den	3.den	Podle integrálů biomasy	Podle rychlosti
Kontrola	27500	147500	720000	-	-
2	35000	180000	867500	-22,3	-4,4
3	27500	147500	415000	29,9	12,9
5	7500	35000	90000	87,8	48,8
7	15000	15000	47500	94,4	63,8
10	12500	12500	20000	98,1	84,1

$$\underline{72hIC50_A = 4,2 \text{ mg.l}^{-1}}$$

$$\underline{72hIC50_{\mu} = 5,9 \text{ mg.l}^{-1}}$$

**Tab. 10.** Inhibice růstu kořene *Sinapis alba* a výsledek testu

Koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	Inhibice [%]	Průměrná délka kořene [cm]
50	0,0	1,98
100	4,3	1,79
200	30,0	1,31
500	69,7	0,57
1000	95,9	0,08

$$\underline{72hIC50 = 323 \text{ mg.l}^{-1}}$$

### 4.3.NaCl

**Tab. 11.** Mortalita ryb a výsledek testu akutní toxicity na *Poecilia reticulata*

Koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita za 96 hod.	
	ks	%
200	0	0
500	0	0
1000	0	0
2000	0	0
5000	0	0
7000	0	0
10 000	0	0

$$\underline{96hLC50 > 10\ 000 \text{ mg.l}^{-1}}$$

Hodnotu LC50 nelze přesně stanovit, chemická látka NaCl v nejvyšší koncentraci 10 000 mg. l<sup>-1</sup> nevykazuje toxické účinky.

**Tab. 12.** Imobilizace a výsledek testu akutní toxicity na *Daphnia magna*

Koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	Imobilizace [%]
1000	0
2000	0
3000	0
4000	35
5000	85

$$\underline{48hEC50 = 4320 \text{ mg.l}^{-1}}$$

**Tab. 13.** Inhibice růstu a výsledek testu inhibice růstu na *Desmodesmus subspicatus* pomocí integrálů biomasy a rychlosti růstu

Koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	Průměrná hustota buněk			Inhibice [%]	
	1. den	2.den	3.den	Podle integrálů biomasy	Podle rychlosti
Kontrola	47500	245000	972500	-	-
5	27500	200000	1092500	0,7	-2,6
7	45000	177500	862500	16,6	2,7
10	42500	190000	1122500	-2,0	-3,2
50	27500	252500	1055000	-3,8	-1,8
100	25000	212500	1002500	5,3	-0,7

Hodnotu IC50 nelze stanovit, chemická látka NaCl v nejvyšší koncentraci 100 ml.l<sup>-1</sup> nevykazuje toxické účinky,

#### 4.4. BioCare SPC

**Tab. 14.** Mortalita ryb a výsledek testu akutní toxicity na *Oncorhynchus mykiss* (vodovodní voda)

Koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita za 96 hod.	
	ks	%
60	0	0
80	0	0
100	0	0
130	0	0
160	0	0
200	1	14
300	7	100
500	7	100

$$\underline{96hLC50 = 221 \text{ mg.l}^{-1}}$$

**Tab. 15.** Mortalita ryb a výsledek testu akutní toxicity na *Oncorhynchus mykiss* (rybníční voda)

Koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita za 96 hod	
	ks	%
100	0	0
200	1	14
300	1	14
500	7	100
700	7	100

$$\underline{96hLC50 = 274 \text{ mg.l}^{-1}}$$

**Tab. 16.** Mortalita ryb a výsledek testu akutní toxicity na *Poecilia reticulata*

Koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita za 96 hod	
	ks	%
100	0	0
200	0	0
250	7	100
300	7	100
400	7	100
500	7	100

$$\underline{96\text{hLC}_{50} = 200 - 250 \text{ mg.l}^{-1}}$$

**Tab. 17.** Imobilizace a výsledek testu akutní toxicity na *Daphnia magna*

Koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	Imobilizace za 48 hod [%]
1	0
5	10
7,5	55
10	70
25	100

$$\underline{48\text{hEC}_{50} = 7 \text{ mg.l}^{-1}}$$

**Tab. 18.** Inhibice růstu a výsledek testu inhibice růstu na *Desmodesmus subspicatus* pomocí integrálů biomasy a rychlosti růstu

Koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	Průměrná hustota buněk			Inhibice [%]	
	1. den	2.den	3.den	Podle integrálů biomasy	Podle rychlosti
Kontrola	45000	270000	1082500	-	-
0,1	32500	125000	630000	46,3	11,7
0,2	37500	195000	847500	24,1	5,3
0,5	27500	202500	830000	25,5	5,8
1	20000	177500	887500	25,9	4,3
5	15000	210000	812500	27,1	6,2
10	10000	32500	110000	91,5	49,6

$$\underline{72\text{hIC}_{50\text{A}} = 4 \text{ mg.l}^{-1}}$$

$$\underline{72\text{hIC}_{50\mu} = 12 \text{ mg.l}^{-1}}$$

Tab. 19. Inhibice růstu kořene *Sinapis alba* a výsledek testu

Koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	Průměrná délka kořene [cm]	Inhibice [%]
200	2,19	0,0
500	1,97	9,4
1000	1,61	25,7
5000	0,25	88,5
10000	0,01	99,6

$$\underline{72\text{hIC}_{50} = 1627 \text{ mg.l}^{-1}}$$

## 4.5. SOUHRNNÝ PŘEHLED VÝSLEDKŮ

Rozhodující pro zařazení látky nebo přípravku do třídy toxicity je zjištěná hodnota LC(EC, IC)50 pro nejcitlivější druh z testovaných organismů (zařazení se provádí podle nejnižší zjištěné hodnoty LC(EC, IC)50).

### 4.5.1. Hodnocení toxicity manganistanu draselného (KMnO<sub>4</sub>)

Testovací organismus	výsledek testu	Odpovídající R-věta
<i>Poecilia reticulata</i>	96hLC50 = 1 – 2 mg.l <sup>-1</sup>	<b>R50</b> = vysoce toxické pro vodní organismy (na základě dosud provedených testů, bude upraveno po dokončení testů na <i>Daphnia magna</i> )
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96hLC50 = 2,9 mg.l <sup>-1</sup>	
<i>Daphnia magna</i>	*)	
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	72hIC50 <sub>μ</sub> = 0,37 mg.l <sup>-1</sup>	
	72hIC50 <sub>A</sub> = 0,31 mg.l <sup>-1</sup>	
<i>Sinapis alba</i>	72hIC50 < 200 mg.l <sup>-1</sup>	

Z výsledků je patrná výrazná toxicita KMnO<sub>4</sub> pro *Demodesmus subspicatus*, naproti tomu nejméně citlivě reagoval *Sinapis alba*. Hodnoty 96hLC50 pro *Poecilia reticulata* a *Oncorhynchus mykiss* jsou řádově shodné a pohybují se v jednotkách mg.l<sup>-1</sup>.

\*) Výsledky testu na *Daphnia magna* nebyly validovány pro velký úhyn testovacích organismů v kontrole, tyto testy bude nutno zopakovat. Na celkové hodnocení přípravku však tyto výsledky nebudou mít vliv, neboť hodnoty 72hIC50 jsou nižší než 1 mg.l<sup>-1</sup>. Díky tomuto výsledku již byl uvedený přípravek zařazen mezi látky vysoce toxické pro vodní organismy.

#### 4.5.2. Hodnocení testů toxicity chemické látky formaldehyd

Testovací organismus	výsledek testu	Odpovídající R-věta
<i>Poecilia reticulata</i>	96hLC50 = 100 - 200 mg.l <sup>-1</sup>	<b>R51</b> = toxické pro vodní organismy
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96hLC50 = 100 - 200 mg.l <sup>-1</sup>	
<i>Daphnia magna</i>	48hEC50 = 19,5 mg.l <sup>-1</sup>	
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	72hIC50 <sub>μ</sub> = 5,9 mg.l <sup>-1</sup>	
	72hIC50 <sub>A</sub> = 4,2 mg.l <sup>-1</sup>	
<i>Sinapis alba</i>	72hIC50 = 322,7 mg.l <sup>-1</sup>	

Na základě zjištěných výsledků je patrná vyšší toxicita formaldehydu pro *Desmodesmus subspicatus*, hodnota 72hIC50 je v jednotkách mg.l<sup>-1</sup>. Naproti tomu toxicita pro *Daphnia magna* je o 1 řád nižší a ještě nižší akutní toxicitu vykazuje tento přípravek pro ryby: hodnoty 96hLC50 pro *Poecilia reticulata* a *Oncorhynchus mykiss* jsou zde řádově shodné a pohybují se ve stovkách mg.l<sup>-1</sup>. Řádově stejná toxicita byla zjištěna pro *Sinapis alba*.

#### 4.5.3. Hodnocení testů toxicity chemické látky NaCl

Testovací organismus	výsledek testu	Odpovídající R-věta
<i>Poecilia retikulata</i>	96hLC50 > 10 000 mg.l <sup>-1</sup>	-
<i>Daphnia magna</i>	48hEC50 = 4320 mg.l <sup>-1</sup>	
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	-	
	-	
<i>Sinapis alba</i>	72hIC50 = 10 000mg.l <sup>-1</sup> *)	

\*) Koncentrace 10 000 mg.l<sup>-1</sup> vyvolala 52% inhibici růstu kořene

Na základě dosud zjištěných výsledků je patrná nízká akutní toxicita této chemické látky. Hodnoty 96hLC50, 48hEC50 a 72hIC50 pro *Sinapis alba* se pohybují řádově v tisících až desetitisících mg .l<sup>-1</sup>. (pro celkové hodnocení je třeba ještě provést testy na *Desmodesmus subspicatus*).

#### 4.5.4. Hodnocení testů toxicity přípravku BioCare SPC

Testovací organismus	výsledek testu	Hodnocení látky
<i>Poecilia reticulata</i>	96hLC50 = 200 – 250 mg.l <sup>-1</sup>	<b>R51</b> = toxické pro vodní organismy
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96hLC50 = 221 mg.l <sup>-1</sup> *)	
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96hLC50 = 274 mg.l <sup>-1</sup> **)	
<i>Daphnia magna</i>	48hEC50 = 7 mg.l <sup>-1</sup>	
<i>Desmodesmus</i>	72hIC50 <sub>μ</sub> = 12 mg.l <sup>-1</sup>	
<i>subspicatus</i>	72hIC50 <sub>A</sub> = 4 mg.l <sup>-1</sup>	
<i>Sinapis alba</i>	72hIC50 = 1627 mg.l <sup>-1</sup>	

\*) test proveden za použití vodovodní vody

\*\*\*) test proveden za použití rybníční vody

Z výsledků je patrná vyšší toxicita přípravku BioCare SPC pro *Desmodesmus subspicatus* a *Daphnia magna*, která se pohybuje v jednotkách mg.l<sup>-1</sup>. Hodnoty 96hLC50 pro *Poecilia reticulata* a *Oncorhynchus mykiss* jsou řádově shodné a pohybují se ve stovkách mg .l<sup>-1</sup>. Naproti tomu nejméně citlivě reagovala *Sinapis alba*.

#### 4.6. Hodnocení testů na standardu K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

Testovací organismus	výsledek testu
<i>Poecilia retikulata</i>	96hLC50 = 116 mg.l <sup>-1</sup>
<i>Daphnia magna</i>	48hEC50 = 0,8 mg.l <sup>-1</sup>
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	72hIC50 <sub>μ</sub> = 0,73 mg.l <sup>-1</sup>
	72hIC50 <sub>A</sub> = 0,51 mg.l <sup>-1</sup>
<i>Sinapis alba</i>	72hIC50 = 32 mg.l <sup>-1</sup>

Testy na standardu byly provedeny a vyhodnoceny stejným způsobem jako předchozí zjištěné hodnoty LC (EC, IC) jsou ve shodě s výsledky odpovídající pro tento standard.



## 5. DISKUSE

Výsledky testů akutní toxicity na rybách jsou uváděny ve formě hodnot 96hLC50. K tomuto vyhodnocení je třeba alespoň 3 hodnot mortality, z nichž alespoň 1 je větší než 0 % a menší než 100 %. V případě, že v základním testu byly zaznamenány v koncentrační řadě pouze nulové a stoprocentní mortality, byly hodnoty 96hLC50 vyjádřeny jako rozmezí dvou hodnot – nejvyšší koncentrace s nulovou mortalitou a nejnižší se stoprocentní mortalitou (jedná se o 2 po sobě jdoucí koncentrace).

V případě, že látka vykazovala velmi nízkou akutní toxicitu a ani v nejvyšší zvolené koncentraci nebyl zaznamenán úhyn, byla hodnota 96hLC50 vyjádřena jako vyšší než nejvyšší testovaná koncentrace. Takovým případem je NaCl, kde  $96hLC50 > 10\,000\text{ mg.l}^{-1}$ . Stejný případ nastal u  $KMnO_4$ , kdy byl výsledek  $72hIC50 > 200\text{ mg.l}^{-1}$ .

Testy na zelené řase *Desmocesmus subspicatus* se mohou vyhodnotit dvěma rozdílnými způsoby, na základě porovnání ploch pod růstovými křivkami nebo podle růstových rychlostí. Tyto výsledky byly řádově shodné. Jako určující hodnotu jsem použila výsledky získané na základě porovnání růstových rychlostí, což je v souladu s normou ČSN EN ISO 8692.

Při testování toxicity chemického přípravku BioCare SPC byla použita v testu na *Oncorhynchus mykiss* jako ředící voda, voda rybniční a vodovodní. Rozdíl výsledků testu 96hLC50 pro *Oncorhynchus mykiss* byl zanedbatelný. Domnívám se, že příčinou tohoto malého rozdílu může být velmi nízké organické zatížení použité rybniční vody.

Pokud jde o citlivost jednotlivých testovacích organizmů vůči testovaným chemickým látkám, nejcitlivěji reagovaly *Desmodesmus subspicatus* a *Daphnia magna*, které reagovaly řádově shodně. Naopak nejméně citlivě na tyto látky reagovala semena *Sinapis alba*.

Při porovnání mých výsledků s literárními údaji jsem zjistila, že výsledky, kterých jsem dosáhla ve své práci jsou srovnatelné s údaji Fajer-Avila et al., 2003. Tito autoři uvádějí akutní toxicitu manganistanu draselného pro ryby jako  $72hLC50 = 79\text{ mg.l}^{-1}$ , což je v dobré shodě s hodnotou 96hLC50 zjištěnou pro *Poecilia reticulata* a

*Oncorhynchus mykiss*, a to 100 – 200 mg.l<sup>-1</sup>, které uvádím ve své práci. Výše uvedení autoři uvádějí rovněž hodnoty 24hIC50 pro *Desmodesmus subspicatus* (24hIC50 = 14,7 mg.l<sup>-1</sup>), což je v dobré shodě s mými výsledky (72hIC50<sub>μ</sub> = 12 mg.l<sup>-1</sup> a 72hIC50<sub>A</sub> = 4 mg.l<sup>-1</sup>). Pro *Daphnia magna* uvádějí tito autoři hodnotu 48hEC50 = 5,8 mg.l<sup>-1</sup>, což je opět v poměrně dobré shodě s mým výsledkem (48hEC50 = 19,5 mg.l<sup>-1</sup>).

Pro juvenilní stádia okouna říčního při rozdílné kvalitě vody uvádí Straus (2004) hodnoty 24hLC50 (3 a 4,5 mg.l<sup>-1</sup>) což je ve shodě s mými výsledky - 96hLC50 = 1 - 2 mg.l<sup>-1</sup> pro *Poecilia reticulata* a 2,9 mg.l<sup>-1</sup> pro *Oncorhynchus mykiss*.

V případě NaCl uvádějí Camargo a Tarazona (1991), že nepozorovali negativní účinky NaCl v koncentracích 800 – 1000 mg.l<sup>-1</sup>, kterým byli pstruh duhový a potoční vystaveni po dobu 192 hodin. V testech akutní toxicity, které jsem prováděla, jsem nezaznamenala negativní vliv této látky v koncentraci 10 000 mg.l<sup>-1</sup> na *Poecilia reticulata* při expozici 96 hodin.

Pokud jde o srovnání letálních a terapeutických koncentrací testovaných přípravků, jeví se manganistan draselný, který se v rybářské praxi používá k desinfekci a terapii ryb v koncentracích 0,3 – 0,6 mg.l<sup>-1</sup> jako dvanáctihodinová koupel, jako bezpečný pro ryby. Používaná koncentrace je řádově nižší než 96hLC50, která se pohybuje mezi 1 - 2 mg.l<sup>-1</sup>. K totálnímu úhynu ryb došlo v koncentraci 2 mg.l<sup>-1</sup> již do 24 hodin a další úhyny již nebyly pozorovány. Terapeutický index (poměr koncentrace LC50 a terapeutické koncentrace) zde vychází při odhadu LC50 1,5 mg.l<sup>-1</sup> a používaných koncentrací 0,3 – 0,6 v rozmezí hodnot 2,5 až 5. Tento výsledek je přijatelný, neboť hodnota terapeutického indexu 4 se považuje za bezpečnou.

V případě terapeutických koupelí ve formaldehydu se tato látka používá v koncentracích 25 – 30 mg.l<sup>-1</sup> při dvanáctihodinové expozici nebo v koncentraci 250 mg.l<sup>-1</sup> při expozici 30 - 60 minut. V testu akutní toxicity nebyl zaznamenán v průběhu tříhodinové expozice žádný úhyn ryb v koncentraci 1 000 mg.l<sup>-1</sup>. Z toho vyplývá terapeutický index > 4 a to znamená, že tato koupel je bezpečná pro ryby. Podobně v případě 12 hodinové koupele jsou terapeutické koncentrace pro ryby bezpečné, neboť v testu akutní toxicity nebyl zaznamenán úhyn ryb ani v koncentraci 300 mg.l<sup>-1</sup>, z toho vyplývá terapeutický index větší než 10.

Chlorid sodný se v rybářské praxi využívá k terapii ryb ve formě krátkodobé koupele v koncentracích 10 – 30 g.l<sup>-1</sup> po dobu 15 až 30 minut. V testech akutní toxicity, kdy jsem ryby vystavila po dobu 30 a 60 minut koncentracím 20, 30, 40 a 50 g.l<sup>-1</sup> jsem zjistila, že po dobu 30 min. ryby přežily ve všech koncentracích (terapeutický index je 1,7 až 5), avšak při expozici 60 min došlo k totálnímu úhynu ryb v koncentraci 50 g.l<sup>-1</sup> a 40% úhynu v koncentraci 40 g.l<sup>-1</sup>. Ve zbývajících dvou koncentracích k žádnému úhynu nedošlo. Z toho vyplývá, že krátkodobá koupel v doporučených koncentracích je bezpečná. Naproti tomu by tato koncentrace mohla při dlouhodobějším působení poškodit zooplankton (pro *Daphnia magna* 48hEC50 = 4320 mg.l<sup>-1</sup>).

Přípravek BioCare SPC se v rybářství používá k terapii ryb 60 – 100 mg.l<sup>-1</sup>. V porovnání s mými dosaženými výsledky není tento přípravek v těchto koncentracích toxický pro ryby (96hLC50 = 200 – 250 mg.l<sup>-1</sup>, terapeutický index se pohybuje v rozmezí od 2,5 do 3,75), ale je toxický pro ostatní vodní organismy (48hEC50 = 7 mg.l<sup>-1</sup>, 72hIC50<sub>μ</sub> = 12 mg.l<sup>-1</sup>, 72hIC50<sub>A</sub> = 4 mg.l<sup>-1</sup>). Z toho vyplývá, že by měla být věnována zvýšená pozornost při vypouštění této lázně z bazénů.

Přestože doporučené terapeutické koncentrace výše uvedených preparátů se jeví bezpečné pro ryby, je nutno při přípravě koupele dodržovat zásadu, že každé koupeli by měla předcházet tzv. zkouška snášenlivosti. Tato zkouška spočívá v provedení koupele s malým počtem ryb určených k terapeutickému zásahu a za podmínek identických těm, v kterých bude prováděna konkrétní terapeutická koupel. Teprve na základě zjištění, že ryby terapeutickou koupel dobře snášejí, se může přistoupit k realizaci koupele všech ryb. Hlavním důvodem provedení zkoušky snášenlivosti je ověření, zda aktuální zdravotní stav ryb jim umožní terapeutickou koupel přežít.

Při provádění terapeutických koupelí je třeba také pamatovat na to, že přípravky KMnO<sub>4</sub>, formaldehyd a BioCare SPC vykazují vysokou akutní toxicitu pro ostatní vodní organismy. Z toho důvodu je nutné nekontaminovat použitými preventivními a terapeutickými koupeli recipienty a věnovat likvidaci koupelí náležitou pozornost.

## 6. ZÁVĚR

Na základě výsledků provedených testů akutní toxicity 96hLC50, 48hEC50, 72hIC50 na vodních organismech a hořčici bílé uvádím následující závěry:

1. Chemická látka **KMnO<sub>4</sub>** byla označena rizikovou větou R50, což znamená, že přípravek je vysoce toxický pro vodní organismy. Patnácti až třicetiminutová koupel v manganistanu draselném v doporučených koncentracích 0,3 až 0,6 mg.l<sup>-1</sup> je pro ryby bezpečná. Naproti tomu by tato koncentrace mohla při dlouhodobějším působení poškodit zooplankton.

2. **Formaldehyd** byl označen rizikovou větou R51, což znamená, že přípravek je toxický pro vodní organismy. Koncentrace používaná k terapii ryb jako dvanáctihodinová koupel je 25 – 30 mg.l<sup>-1</sup>. Tato koncentrace je bezpečná pro ryby, avšak mohla by poškodit zooplankton a fytoplankton.

3. **NaCl** nebyl označen rizikovou větou, protože při testech nevykazoval v koncentracích pohybujících se tisících až desetitisících mg.l<sup>-1</sup> akutní toxicitu pro vodní organismy. Z toho vyplývá, že krátkodobá koupel v doporučených koncentracích je pro ryby bezpečná. Naproti tomu by tato koncentrace mohla při dlouhodobějším působení poškodit zooplankton.

4. **BioCare SPC** byl označen rizikovou větou R51, což znamená, že přípravek je toxický pro vodní organismy. V rybářství používaná koncentrace 60 – 100 mg.l<sup>-1</sup> je bezpečná pro ryby, avšak tato koncentrace už je blízká letálním koncentracím pro zástupce zooplanktonu a fytoplanktonu.

5. Přes uvedené zjištění je třeba provést před každou terapeutickou koupelí zkoušku snášenlivosti, aby se ověřila citlivost ryb vůči aplikované látce v souvislosti s aktuálním zdravotním stavem ryb.

## 6. ZÁVĚR

Na základě výsledků provedených testů akutní toxicity 96hLC50, 48hEC50, 72hIC50 na vodních organismech a hořčici bílé uvádím následující závěry:

1. Chemická látka **KMnO<sub>4</sub>** byla označena rizikovou větou R50, což znamená, že přípravek je vysoce toxický pro vodní organismy. Patnácti až třicetiminutová koupel v manganistanu draselném v doporučených koncentracích 0,3 až 0,6 mg.l<sup>-1</sup> je pro ryby bezpečná. Naproti tomu by tato koncentrace mohla při dlouhodobějším působení poškodit zooplankton.

2. **Formaldehyd** byl označen rizikovou větou R51, což znamená, že přípravek je toxický pro vodní organismy. Koncentrace používaná k terapii ryb jako dvanáctihodinová koupel je 25 – 30 mg.l<sup>-1</sup>. Tato koncentrace je bezpečná pro ryby, avšak mohla by poškodit zooplankton a fytoplankton.

3. **NaCl** nebyl označen rizikovou větou, protože při testech nevykazoval v koncentracích pohybujících se tisících až desetitisících mg.l<sup>-1</sup> akutní toxicitu pro vodní organismy. Z toho vyplývá, že krátkodobá koupel v doporučených koncentracích je pro ryby bezpečná. Naproti tomu by tato koncentrace mohla při dlouhodobějším působení poškodit zooplankton.

4. **BioCare SPC** byl označen rizikovou větou R51, což znamená, že přípravek je toxický pro vodní organismy. V rybářství používaná koncentrace 60 – 100 mg.l<sup>-1</sup> je bezpečná pro ryby, avšak tato koncentrace už je blízká letálním koncentracím pro zástupce zooplanktonu a fytoplanktonu.

5. Přes uvedené zjištění je třeba provést před každou terapeutickou koupelí zkoušku snášenlivosti, aby se ověřila citlivost ryb vůči aplikované látce v souvislosti s aktuálním zdravotním stavem ryb.

## 7. LITERARUTA

- Březina, F., Mollin, J., Pastorek, R., Šindelář, Z., 1986: Chemické tabulky anorganických sloučenin, STNL Praha, 344s
- Camargo, Ja., Tarazona, Jv., 1991: Short-term toxicity of fluoride-ion (F<sup>-</sup>) in short-water to rainbow-trout and brown trout, *Chemosphere* 22, (5 – 6): 605-611
- Čítek, J., Svobodová, Z., Tesarčík, J., 1997: Nemoci sladkovodních a akvariálních ryb, Informatorium, Praha, 218s
- Fajer-Avila, E., J., Abdo-de la Parra, I., Aguilar-Zarate, G., Contreras-Arce, R., Zaldivar-Ramirez, J., Betancourt-Lozano, M., 2003: Toxicity of formalin to bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) and its effectiveness to kontrol ectoparasites, *Aquaculture* 223, (1–4): 41-50
- Greenwood, N., N., Earnshaw, A., 1993: Chemie prvků I., II., Informatorium, Praha, 1635s
- Hera, A., Šimůnek J., Bureš J., 2004: Sjednocení formy veterinárních receptů a souladu s neregistrovaným použitím léčivého přípravku. *Veterinářství*. 54:243-244
- Kácl, K., 1959: Organická chemie, Praha, 387s
- Kalač, P., 1996: Organická chemie (základní část), Jihočeská univerzita zemědělská fakulta České Budějovice, 143s
- Kolářová, J., Nepejchalová, L., 2005: Zásady a možnosti léčby v chovech ryb v ČR, *Bulletin VÚRH Vodňany* 41(2), 70-73
- Remy, H., 1972: Anorganická chemie II., STNL Praha, 831s
- Smith, R. sciencelab.com [online].[cit. 2005-10-20].  
[http://www.sciencelab.com/xMSDS-Sodium\\_percarbonate-9927598](http://www.sciencelab.com/xMSDS-Sodium_percarbonate-9927598)
- Straus, D., L., 2004: Comparison of the acute toxicity of potassium permanganate to hybrid striped bass in well water and diluted well water, *Journal of the world aquaculture society* 35, (1): 55 –60
- 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, 70s
- Svobodová, Z., Máchová, J., Veselý, V., Modrá, H., Svoboda, M., a kol, 2003: Veterinární toxikologie – Praktická cvičení část I., Brno, 179s
- Svobodová, Z., Máchová, J., Vykusová, B., 1992: Havarijní a dlouhodobé znečištění povrchových vod, VÚRH, Vodňany

- Svobodová, Z., a kol., 1987: Toxikologie vodních živočichů, Praha SZN
- Šilhanová, L., 1995: Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology, Praha, Victoria publishing
- Škaloud, J., Šimůnek, J., 1997: Léčiva v rybářství, Bulletin VRH 4, 229 –231

## **Seznam zákonů a norem**

- Zákon č. 79/1997 Sb. o léčivech
- Zákon č. 77/2004 Sb. na ochranu zvířat proti týrání
- Vyhláška MZe ČR č. 311/1997 Sb. o chovu a využití pokusných zvířat
- OECD Guideline for Testing of Chemicals 203 Fish, Acute Toxicity Test, 1992, 9 pp.
- OECD Guideline for Testing of Chemicals 202 *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. (Draft Updated Guideline, July 1999)
- OECD Guideline for Testing of Chemicals 201 Alga, Growth Inhibition Test. 1984, 14 pp.
- ČSN EN ISO 7346-1 Jakost vod. Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. Část 1: Statická metoda. ČNI Praha, 1999, 16 s.
- ČSN EN ISO 6341 Jakost vod. Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) – Zkouška akutní toxicity. ČNI Praha, 1997, 16 s.
- ČSN EN ISO 8692 Jakost vod. Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum* (ISO 8692:1989). ČNI Praha, 1995, 12 s.
- Metodický pokyn č. 6 odboru odpadů MŽP ke stanovení ekotoxicity odpadů – věstník MŽP č. 6/2003

## 8. PŘÍLOHY

### *Seznam tabulek:*

#### **KMnO<sub>4</sub>**

**Tab. I.** Výsledky předběžného testu akutní toxicity na *Poecilia reticulata*

**Tab. II.** Výsledky předběžného testu akutní toxicity na *Oncorhynchus mykiss*

**Tab. III.** Výsledky základního testu akutní toxicity na *Oncorhynchus mykiss*

**Tab. IV.** Výsledky předběžného testu inhibice růstu sladkovodních řas na  
*Desmodesmus subspicatus*

**Tab. V.** Výsledky základního testu inhibice růstu sladkovodních řas na *Desmodesmus subspicatus*

#### **Formaldehyd**

**Tab. VI.** Výsledky předběžného testu akutní toxicity na *Poecilia reticulata*

**Tab. VII.** Výsledky základního testu akutní toxicity na *Poecilia reticulata*

**Tab. VIII.** Výsledky předběžného testu akutní toxicity na *Oncorhynchus mykiss*

**Tab. IX.** Výsledky základního testu akutní toxicity na *Oncorhynchus mykiss*

**Tab. X.** Výsledky předběžného testu akutní inhibice na *Daphnia magna*

**Tab. XI.** Výsledky základního testu akutní inhibice na *Daphnia magna*

**Tab. XII.** Výsledky předběžného testu inhibice růstu sladkovodních řas na  
*Desmodesmus subspicatus*

**Tab. XIII.** Výsledky základního testu inhibice růstu sladkovodních řas na  
*Desmodesmus subspicatus*

#### **NaCl**

**Tab. XIV.** Výsledky předběžného testu akutní toxicity na *Poecilia reticulata*

**Tab. XV.** Výsledky předběžného testu akutní inhibice na *Daphnia magna*

**Tab. XVI.** Výsledky základního testu akutní inhibice na *Daphnia magna*

**Tab. XVII.** Výsledky předběžného testu inhibice růstu sladkovodních řas na  
*Desmodesmus subspicatus*

**Tab. XVIII.** Výsledky základního testu inhibice růstu sladkovodních řas na  
*Desmodesmus subspicatus*

#### **BioCare SPC**

**Tab. XIX.** Výsledky předběžného testu akutní toxicity na *Oncorhynchus mykiss*

**Tab. XX.** Výsledky základního testu akutní toxicity na *Oncorhynchus mykiss* (vodovod. voda)



**Tab. XXI.** Výsledky základního testu akutní toxicity na *Oncorhynchus mykiss* (rybniční voda)

**Tab. XXII.** Výsledky předběžného testu akutní toxicity na *Poecilia reticulata*

**Tab. XXIII.** Výsledky základního testu akutní toxicity na *Poecilia reticulata*

**Tab. XXIV.** Výsledky předběžného testu akutní inhibice na *Daphnia magna*

**Tab. XXV.** Výsledky základního testu akutní inhibice na *Daphnia magna*

**Tab. XXVI.** Výsledky předběžného testu inhibice růstu sladkovodních řas na *Desmodesmus subspicatus*

**Tab. XXVII.** Výsledky základního testu inhibice růstu sladkovodních řas na *Desmodesmus subspicatus*

**Tab. XXVIII.** Probitové hodnoty

## ***Seznam obrázků a grafů***

### **KMnO<sub>4</sub>**

**Obr. I.** Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na rybách *Oncorhynchus mykiss*

**Obr. II.** Vyhodnocení základního testu inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus* – podle růstových rychlostí

**Obr. III.** Vyhodnocení základního testu inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus* – podle integrálů biomasy

### **Formaldehyd**

**Obr. IV.** Vyhodnocení základního akutního inhibičního testu na *Daphnia magna*

**Obr. V.** Vyhodnocení základního testu inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus* – podle růstových rychlostí

**Obr. VI.** Vyhodnocení základního testu inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus* – podle integrálů biomasy

**Obr. VII.** Vyhodnocení základního testu inhibice růstu kořene *Sinapis alba*

### **NaCl**

**Obr. VIII.** Vyhodnocení základního inhibičního testu na *Daphnia magna*

### **BioCare SPC**

**Obr. IX.** Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na rybách *Oncorhynchus mykiss*  
(vodovod. voda)

**Obr. X.** Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na rybách *Oncorhynchus mykiss*  
(rybníční voda)

**Obr. XI.** Vyhodnocení základního inhibičního testu na *Daphnia magna*

**Obr. XII.** Vyhodnocení základního testu inhibice růstu sladkovodních řas  
*Desmodesmus subspicatus* – podle růstových rychlostí

**Obr. XIII.** Vyhodnocení základního testu inhibice růstu sladkovodních řas  
*Desmodesmus subspicatus* – podle integrálů biomasy

**Obr. XIV.** Vyhodnocení základního testu inhibice růstu kořene *Sinapis alba*

# VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ TESTŮ AKUTNÍ TOXICITY NA VODNÍCH ORGANISMECH A HOŘČICI BÍLÉ

## Testovaná látka: Manganistan draselný (KMnO<sub>4</sub>)

Tab. I. Výsledky předběžného testu akutní toxicity na *Poecilia reticulata*, ředící voda: ISO

Číslo nádrže	Koncentrace [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita ryb				Σ	Celk. %
		24 h	48 h	72 h	96 h		
1	0,1	0	0	0	0	0	0
2	0,5	0	1	0	0	0	0
3	1	0	2	1	-	3	100
4	1,5	2	1	-	-	3	100
5	2,0	3	-	-	-	3	100
6	5,0	3	-	-	-	3	100
K		0	0	0	0	0	0

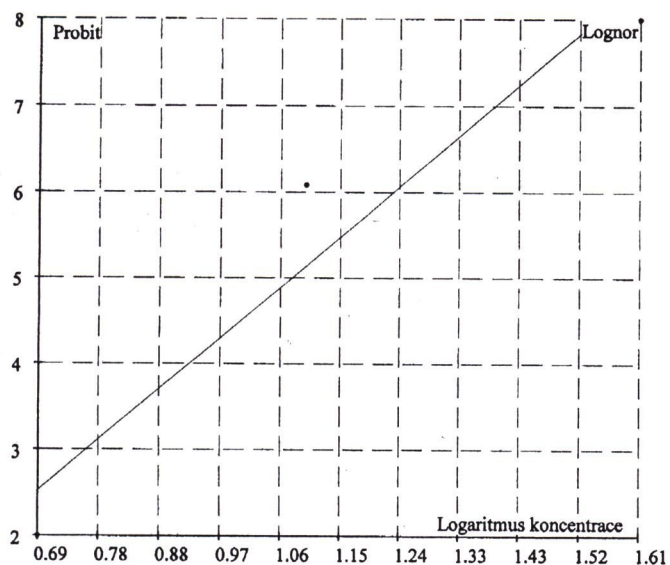
Tab. II. Výsledky předběžného testu akutní toxicity na *Oncorhynchus mykiss*, ředící voda: vodovodní

Číslo nádrže	Koncentrace [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita ryb				Σ	Celk. %
		24 h	48 h	72 h	96 h		
1	0,1	0	0	0	0	0	0
2	0,5	0	0	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0	0	0
4	5	3	-	-	-	3	100
5	10	3	-	-	-	3	100
6	100	3	-	-	-	3	100
K		0	0	0	0	0	0

Tab. III. Výsledky základního testu akutní toxicity na *Oncorhynchus mykiss*, ředící voda: vodovodní

Číslo nádrže	Koncentrace [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita ryb				Σ	Celk. %
		24 h	48 h	72 h	96 h		
1	1	0	0	0	0	0	0
2	2	0	0	0	0	0	0
3	3	2	0	3	1	6	86
4	5	7	-	-	-	7	100
5	10	7	-	-	-	7	100
6	100	7	-	-	-	7	100
K		0	0	0	0	0	0

**Obr. I.** Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na rybách *Oncorhynchus mykiss*,  
 $96hLC50 = 2,9 \text{ mg.l}^{-1}$



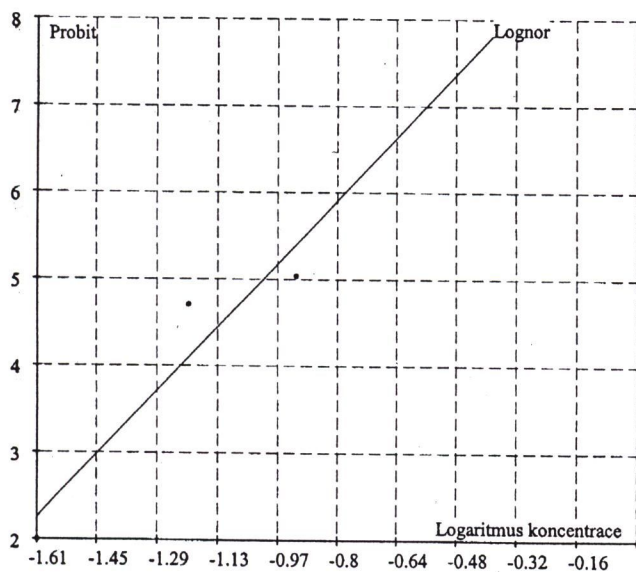
**Tab. IV.** Výsledky předběžného testu inhibice růstu sladkovodních řas na *Desmodesmus subspicatus*, počáteční hustota řasová suspenze: 10 514 buněk v 1 ml, inokulum: 1 877 500, dávka inokula: 0,14 ml

Číslo baňky	Nom. konc. [ $\text{mg.l}^{-1}$ ]	Hustota řasové suspenze (počet buněk ve 100 čtvercích)		
		24 h	48 h	72 h
1	0,1	16	108	466
2	0,5	4	6	8
3	1	5	7	5
4	2	3	7	2
5	5	4	2	3
6	10	2	2	1
K1		26	134	439
K2		25	108	503
K3		17	125	471
K4		20	112	485

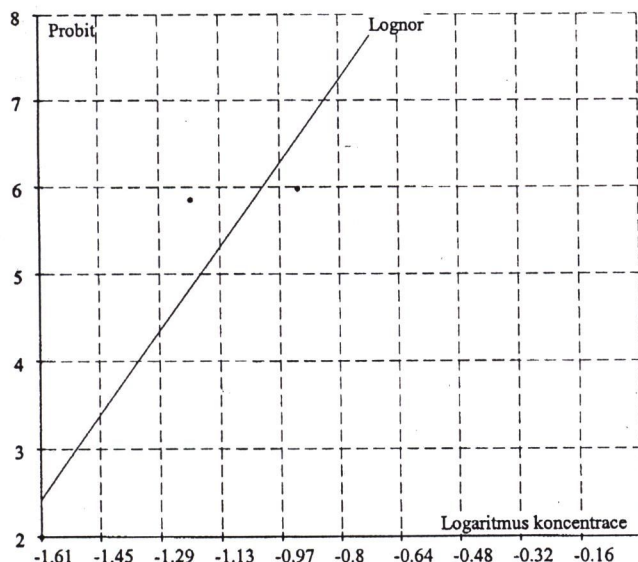
**Tab.V.** Výsledky základního testu inhibice růstu sladkovodních řas na *Desmodesmus subspicatus*, počáteční hustota řasová suspenze: 10 692 buněk v 1 ml, inokulum: 1 485 500, dávka inokula: 0,18 ml

Číslo baňky	Nom. konc. [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Hustota řasové suspenze (počet buněk ve 100 čtvercích)		
		24 h	48 h	72 h
1	0,1	19	84	335
1'	0,1	22	90	381
2	0,2	14	78	330
2'	0,2	20	112	450
3	0,3	8	13	60
3'	0,3	8	20	63
4	0,4	6	24	31
4'	0,4	8	20	38
5	0,5	2	4	4
5'	0,5	5	3	6
K1		15	88	343
K2		39	105	346
K3		18	109	374
K4		20	95	252

**Obr. II.** Vyhodnocení základního testu inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus* – podle růstových rychlostí, použitá ředící voda: ISO 8692, výsledná hodnota:  $72\text{hIC}_{50\mu} = 0,37 \text{ mg.l}^{-1}$



**Obr. III.** Vyhodnocení základního testu inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus* – podle integrálů biomasy, použitá ředící voda: ISO 8692, výsledná hodnota:  $72hIC_{50A} = 0,31 \text{ mg.l}^{-1}$



### Testovaná látka: formaldehyd

**Tab. VI.** Výsledky předběžného testu akutní toxicity na *Poecilia reticulata*, ředící voda: ISO

Číslo nádrže	Koncentrace [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita ryb				Σ	Celk. %
		24 h	48 h	72 h	96 h		
1	0,1	0	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0	0
3	5	0	0	0	0	0	0
4	10	0	0	0	0	0	0
5	50	0	0	0	0	0	0
6	100	0	0	0	0	0	0
7	1000	3	-	-	-	3	100
K		0	0	0	0	0	0

**Tab. VII.** Výsledky základního testu akutní toxicity na *Poecilia reticulata*, ředící voda:  
ISO

Číslo nádrže	Koncentrace [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita ryb				Σ	Celk. %
		24 h	48 h	72 h	96 h		
1	100	0	0	0	0	0	0
2	200	0	0	5	2	7	100
3	300	0	7	-	-	7	100
4	500	7	-	-	-	7	100
5	700	7	-	-	-	7	100
6	1000	7	-	-	-	7	100
K		0	0	0	0	0	0

**Tab. VIII.** Výsledky předběžného testu akutní toxicity na *Oncorhynchus mykiss*, ředící voda: vodovodní

Číslo nádrže	Koncentrace [ ml.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita ryb				Σ	Celk. %
		24 h	48 h	72 h	96 h		
1	0,01	0	0	0	0	0	0
2	0,05	0	0	0	0	0	0
3	0,1	0	0	0	0	0	0
4	0,5	0	3	-	-	3	100
5	1	0	3	-	-	3	100
K		0	0	0	0	0	0

**Tab. IX.** Výsledky základního testu akutní toxicity na *Oncorhynchus mykiss*, ředící voda: vodovodní

Číslo nádrže	Koncentrace [ ml.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita ryb				Σ	Celk. %
		24 h	48 h	72 h	96 h		
1	0,1	0	0	2	1	3	43
2	0,2	1	6	-	-	7	100
3	0,3	7	-	-	-	7	100
4	0,4	7	-	-	-	7	100
5	0,5	7	-	-	-	7	100
6	1	7	-	-	-	7	100
K		0	0	0	0	0	0

Tab. X. Výsledky předběžného testu akutní inhibice na *Daphnia magna*

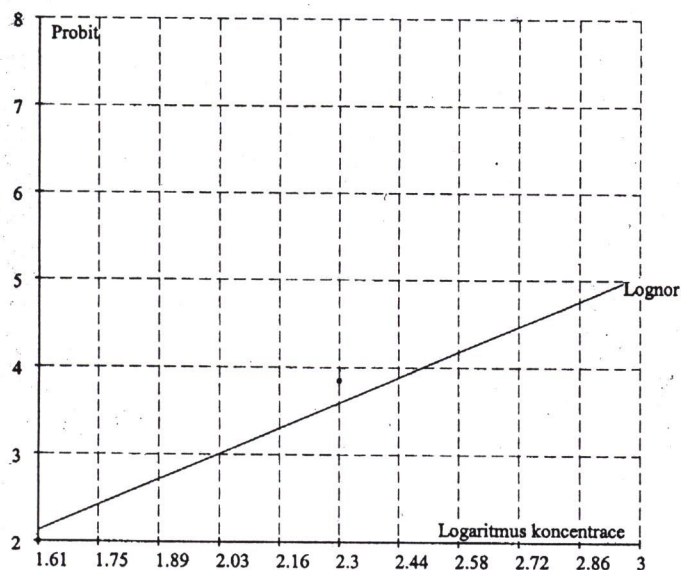
Číslo kádinky	Koncentrace [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita			
		24 hodin		48 hodin	
		ks	celk. %	ks	celk. %
1	0,1	0	0	0	0
2	0,5	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0
4	1,5	0	0	0	0
5	2	0	0	0	0
6	5	2	20	0	20
7	10	2	20	3	30
8	100	10	100	-	-
K1		0	0	0	0
K2		0	0	0	0
K3		0	0	0	0

Tab. XI. Výsledky základního testu akutní inhibice na *Daphnia magna*

Číslo kádinky	Koncentrace [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita			
		24 hodin		48 hodin	
		ks	celk. %	ks	celk. %
1	1	0		0	
1'	1	0	0	0	0
2	2	0		0	
2'	2	0	0	0	0
3	5	0		0	
3'	5	0	0	0	0
4	10	0		1	
4'	10	0	0	2	15
5	20	2		4	
5'	20	3	25	6	50
6	50	8		10	
6'	50	7	75	10	100
7	100	10		-	
7'	100	10	100	-	100
K1		0		0	
K2		0		1	
K3		0	0	0	3



**Obr. IV.** Vyhodnocení základního akutního inhibičního testu na *Daphnia magna*, použitá ředící voda: ISO 6341, výsledná hodnota:  $72hIC_{50} = 19,5 \text{ mg.l}^{-1}$



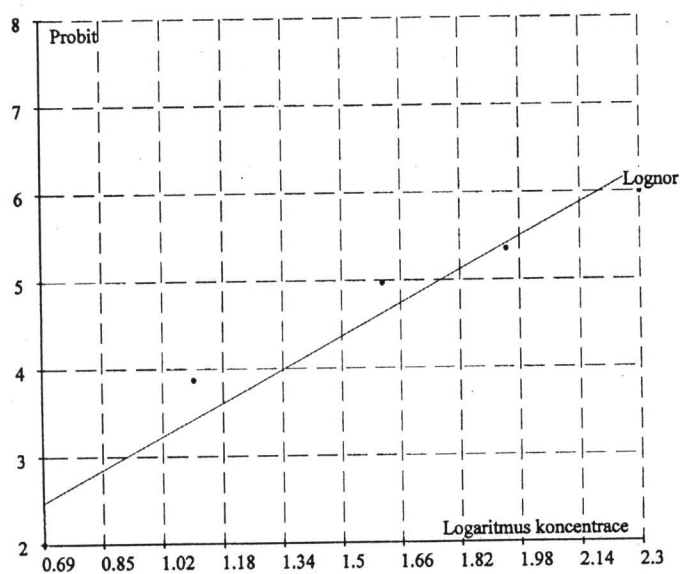
**Tab. XII.** Výsledky předběžného testu inhibice růstu sladkovodních řas na *Desmodesmus subspicatus*, počáteční hustota řasová suspenze: 10 820 buněk v 1 ml, inokulum: 1 352 500, dávka inokula: 0,2 ml

Číslo baňky	Nom. konc. [ $\text{mg.l}^{-1}$ ]	Hustota řasové suspenze (počet buněk ve 100 čtvercích)		
		24 h	48 h	72 h
1	1	23	182	423
2	2	24	179	441
3	5	8	20	81
4	10	2	6	18
5	50	6	2	2
6	100	4	3	2
7	500	4	2	1
K1		23	173	457
K2		28	189	502
K3		29	227	543
K4		23	132	563

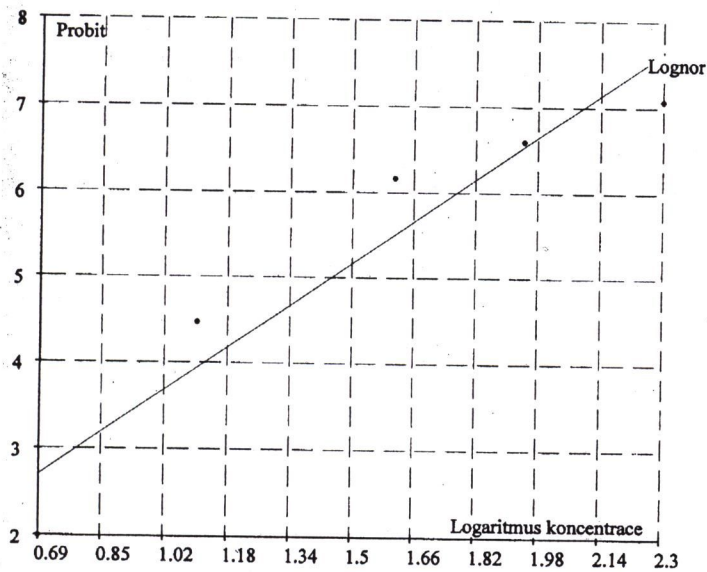
**Tab. XIII.** Výsledky základního testu inhibice růstu sladkovodních řas na *Desmodesmus subspicatus*, počáteční hustota řasová suspenze: 10 143 buněk v 1 ml, inokulum: 1 102 500, dávka inokula: 0,23 ml

Číslo baňky	Nom. konc. [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Hustota řasové suspenze (počet buněk ve 100 čtvercích)		
		24 h	48 h	72 h
1	2	15	82	362
1'	2	14	62	331
2	3	10	57	132
2'	3	12	61	200
3	5	3	16	32
3'	5	3	12	39
4	7	5	5	16
4'	7	6	7	22
5	10	5	4	6
5'	10	4	6	9
K1		12	41	254
K2		11	83	330
K3		9	49	248
K4		13	64	318

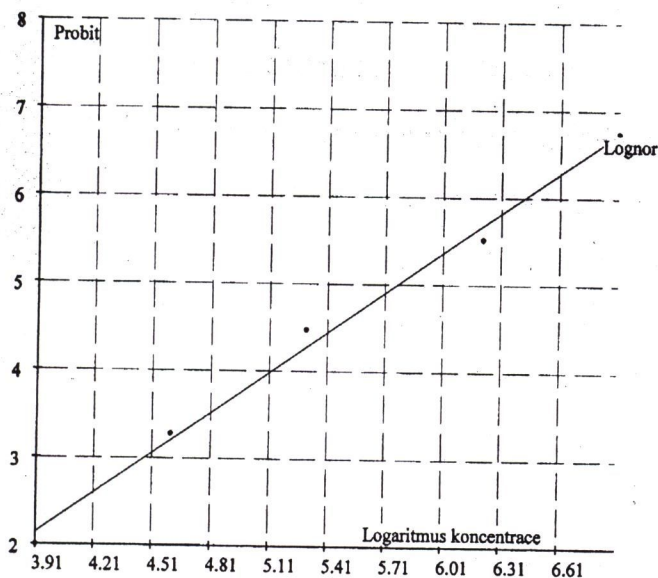
**Obr. V.** Vyhodnocení základního testu inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus* – podle růstových rychlostí, použitá ředící voda: ISO 8692, výsledná hodnota: 72hIC<sub>50</sub> = 5,9 mg.l<sup>-1</sup>



**Obr. VI.** Vyhodnocení základního testu inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus* – podle integrálů biomasy, použitá ředící voda: ISO 8692, výsledná hodnota:  $72hIC_{50A} = 4,2 \text{ mg.l}^{-1}$



**Obr. VII.** Vyhodnocení základního testu inhibice růstu kořene *Sinapis alba*, použitá ředící voda: ISO 6341, výsledná hodnota:  $72hIC_{50} = 323 \text{ mg.l}^{-1}$



## Testovaná látka: NaCl

Tab. XIV. Výsledky předběžného testu akutní toxicity na *Poecilia reticulata*, ředící voda: vodovodní

Číslo nádrže	Koncentrace [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita ryb				Σ	Celk. %
		24 h	48 h	72 h	96 h		
1	200	0	0	0	0	0	0
2	500	0	0	0	0	0	0
3	1000	0	0	0	0	0	0
4	2000	0	0	0	0	0	0
5	5000	0	0	0	0	0	0
6	7000	0	0	0	0	0	0
7	10000	0	0	0	0	0	0
K		0	0	0	0	0	0

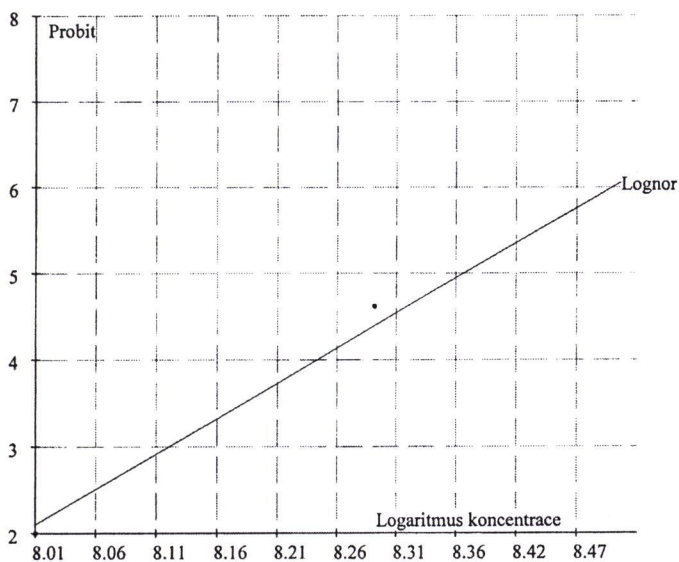
Tab. XV. Výsledky předběžného testu akutní inhibice na *Daphnia magna*

Číslo kádinky	Koncentrace [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita			
		24 hodin		48 hodin	
		ks	celk. %	ks	celk. %
1	100	0	0	0	0
2	200	0	0	0	0
3	300	0	0	0	0
4	500	0	0	0	0
5	1000	0	0	0	0
6	2000	0	0	1	10
7	5000	9	90	10	100
K1		0	0	0	0
K2		0	0	0	0

Tab. XVI. Výsledky základního testu akutní inhibice na *Daphnia magna*

Číslo kádinky	Koncentrace [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita			
		24 hodin		48 hodin	
		ks	celk. %	ks	celk. %
1	1000	0		0	
1'	1000	0	0	0	0
2	2000	0		0	
2'	2000	0	0	0	0
3	3000	0		0	
3'	3000	0	0	0	0
4	4000	0		3	
4'	4000	0	0	4	35
5	5000	0		8	
5'	5000	2	10	9	85
K1		0		0	
K2		0	0	1	2

**Obr. VIII.** Vyhodnocení základního inhibičního testu na *Daphnia magna*, použitá ředící voda: ISO 6341, výsledná hodnota:  $72\text{hIC}_{50} = 4320 \text{ mg.l}^{-1}$



**Tab. XVII.** Výsledky předběžného testu inhibice růstu sladkovodních řas na *Desmodesmus subspicatus*, počáteční hustota řasová suspenze: 10 514 buněk v 1 ml, inokulum: 1 877 500, dávka inokula: 0,14 ml

Číslo baňky	Nom. konc. [ $\text{mg.l}^{-1}$ ]	Hustota řasové suspenze (počet buněk ve 100 čtvercích)		
		24 h	48 h	72 h
1	1	32	99	424
2	5	25	103	466
3	10	15	66	87
4	50	11	25	91
5	100	7	6	6
6	1 000	5	5	3
K1		26	134	439
K2		25	108	503
K3		17	125	471
K4		20	112	485

**Tab. XVIII.** Výsledky základního testu inhibice růstu sladkovodních řas na *Desmodesmus subspicatus*, počáteční hustota řasová suspenze: 10 680 buněk v 1 ml, inokulum: 890 000, dávka inokula: 0,3 ml

Číslo baňky	Nom. konc. [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Hustota řasové suspenze (počet buněk ve 100 čtvercích)		
		24 h	48 h	72 h
1	5	11	72	430
1'	5	11	87	443
2	7	20	73	372
2'	7	16	68	318
3	10	16	83	438
3'	10	18	68	460
4	50	11	105	425
4'	50	12	96	419
5	100	10	82	384
5'	100	9	88	418
K1		26	96	447
K2		17	91	324
K3		18	116	350
K4		15	88	433

### Testovaná látka: BioCare SPC

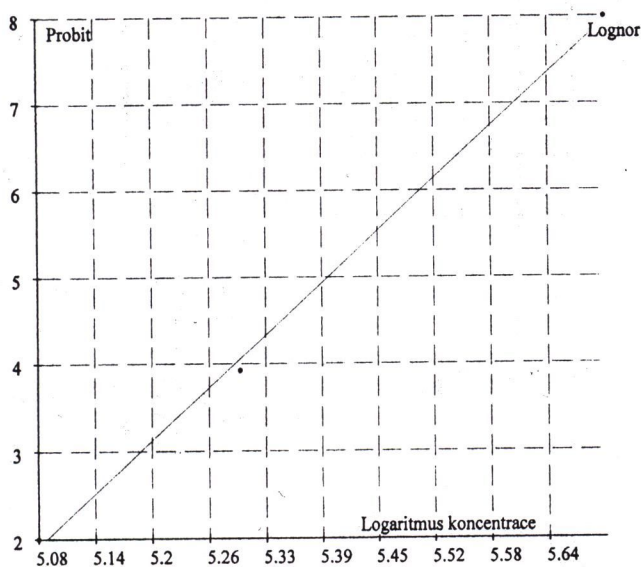
**Tab. XIX.** Výsledky předběžného testu akutní toxicity na *Oncorhynchus mykiss*, ředící voda: vodovodní

Číslo nádrže	Koncentrace [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita ryb				Σ	Celk. %
		24 h	48 h	72 h	96 h		
1	60	0	0	0	0	0	0
2	100	0	0	0	1	1	33
3	200	0	2	0	2	2	66
4	500	0	3	-	-	3	100
5	1000	3	-	-	-	3	100
6	2000	3	-	-	-	3	100
K		0	0	0	0	0	0

**Tab. XX.** Výsledky základního testu akutní toxicity na *Oncorhynchus mykiss*, ředící voda: vodovodní

Číslo nádrže	Koncentrace [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita ryb				Σ	Celk. %
		24 h	48 h	72 h	96 h		
1	60	0	0	0	0	0	0
2	80	0	0	0	0	0	0
3	100	0	0	0	0	0	0
4	130	0	0	0	0	0	0
5	160	0	0	0	0	0	0
6	200	0	1	0	0	1	14
7	300	2	5	-	-	7	100
8	500	7	-	-	-	7	100
K		0	0	0	0	0	0

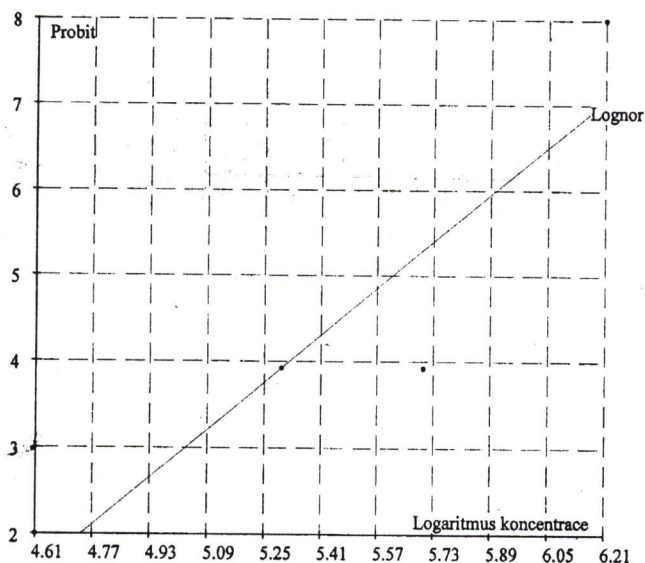
**Obr. IX.** Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na rybách *Oncorhynchus mykiss*, ředící voda: vodovodní, 96hLC50 = 221 mg.l<sup>-1</sup>



**Tab. XXI.** Výsledky základního testu akutní toxicity na *Oncorhynchus mykiss*, ředící voda: rybníční

Číslo nádrže	Koncentrace [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita ryb				Σ	Celk. %
		24 h	48 h	72 h	96 h		
1	100	0	0	0	0	0	0
2	200	0	1	0	0	1	14
3	300	0	0	0	1	1	14
4	500	2	2	3	-	7	100
5	700	6	1	-	-	7	100
K		0	0	0	0	0	0

**Obr. X.** Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na rybách *Oncorhynchus mykiss*, ředící voda: rybníční, 96hLC50 = 274 mg.l<sup>-1</sup>



**Tab. XXII.** Výsledky předběžného testu akutní toxicity na *Poecilia reticulata*, ředící voda: ISO

Číslo nádrže	Koncentrace [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita ryb				Σ	Celk. %
		24 h	48 h	72 h	96 h		
1	50	0	0	0	0	0	0
2	100	0	0	0	0	0	0
3	200	0	0	0	0	0	0
4	500	0	3	-	-	3	100
5	1000	0	3	-	-	3	100
6	5000	3	-	-	-	3	100
K		0	0	0	0	0	0

**Tab. XXIII.** Výsledky základního testu akutní toxicity na *Poecilia reticulata*, ředící voda: ISO

Číslo nádrže	Koncentrace [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita ryb				Σ	Celk. %
		24 h	48 h	72 h	96 h		
1	100	0	0	0	0	0	0
2	200	0	1	0	0	0	0
3	250	4	0	1	2	7	100
4	300	6	1	-	-	7	100
5	400	7	-	-	-	7	100
6	500	7	-	-	-	7	100
K		0	0	0	0	0	0



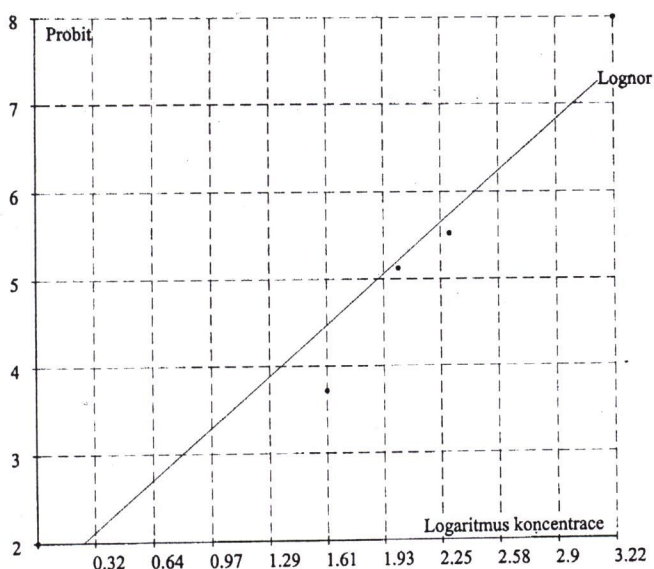
Tab. XXIV. Výsledky předběžného testu akutní inhibice na *Daphnia magna*

Číslo kádinky	Koncentrace [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita			
		24 hodin		48 hodin	
		ks	celk. %	ks	celk. %
1	1	0	0	0	0
2	5	1	10	1	10
3	10	5	50	7	70
4	50	10	100	10	100
5	100	10	100	10	100
6	500	10	100	10	100
7	1000	10	100	10	100
K		0	0	0	0

Tab. XXV. Výsledky základního testu akutní inhibice na *Daphnia magna*

Číslo kádinky	Koncentrace [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Mortalita			
		24 hodin		48 hodin	
		ks	celk. %	ks	celk. %
1	1	0		0	
1'	1	0	0	0	0
2	5	0		0	
2'	5	0	0	2	10
3	7,5	0		6	
3'	7,5	0	0	5	55
4	10	0		8	
4'	10	0	0	6	70
5	25	9		10	
5'	25	10	95	10	100
6	50	10		10	
6'	50	10	100	10	100
K1		0		0	
K2		0	0	0	0

**Obr. XI.** Vyhodnocení základního inhibičního testu na *Daphnia magna*, použitá ředící oda: ISO 6341, výsledná hodnota:  $72\text{hIC}_{50} = 6,7 \text{ mg.l}^{-1}$



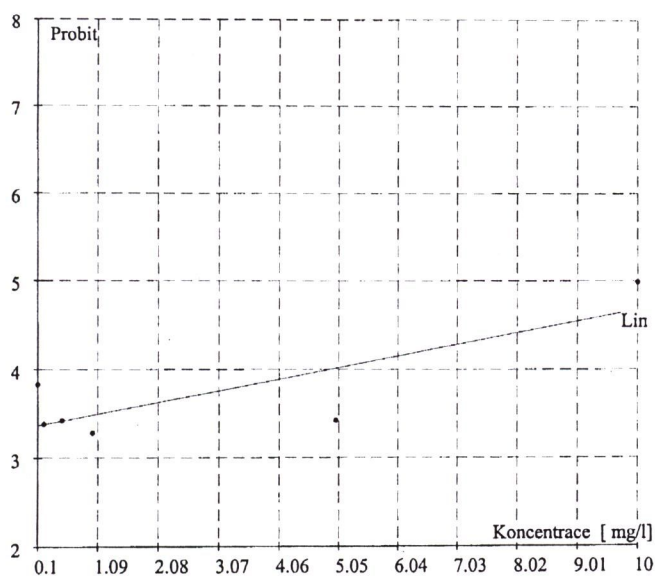
**Tab. XXVI.** Výsledky předběžného testu inhibice růstu sladkovodních řas na *Desmodesmus subspicatus*, počáteční hustota řasová suspenze: 10 620 buněk v 1 ml, inokulum: 1 327 500, dávka inokula: 0,2 ml

Číslo baňky	Nom. konc. [ $\text{mg.l}^{-1}$ ]	Hustota řasové suspenze (počet buněk ve 100 čtvercích)		
		24 h	48 h	72 h
1	1	18	37	103
2	10	5	13	30
3	50	2	6	8
4	100	1	6	5
5	200	1	6	6
K1		18	150	533
K2		19	124	549
K3		25	116	582
K4		21	110	347

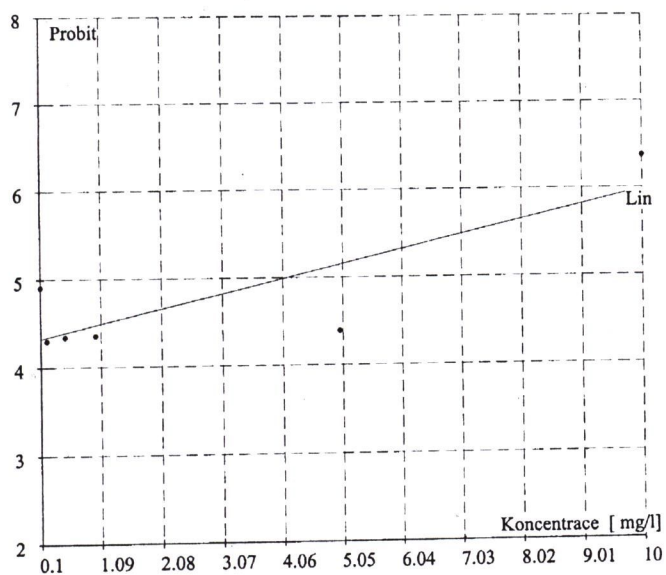
**Tab. XXVII.** Výsledky základního testu inhibice růstu sladkovodních řas na *Desmodesmus subspicatus*, počáteční hustota řasová suspenze: 10 762 buněk v 1 ml, inokulum: 1 076 250, dávka inokula: 0,25 ml

Číslo baňky	Nom. konc. [ mg.l <sup>-1</sup> ]	Hustota řasové suspenze (počet buněk ve 100 čtvercích)		
		24 h	48 h	72 h
1	0,1	14	50	188
1	0,1	12	50	316
2	0,2	16	68	319
2'	0,2	15	87	359
3	0,5	10	78	307
3'	0,5	11	84	356
4	1	8	76	348
4'	1	7	66	362
5	5	6	86	363
5'	5	6	82	288
6	10	5	15	40
6'	10	3	10	48
K1		18	114	511
K2		14	115	445
K3		23	108	426
K4		17	96	350

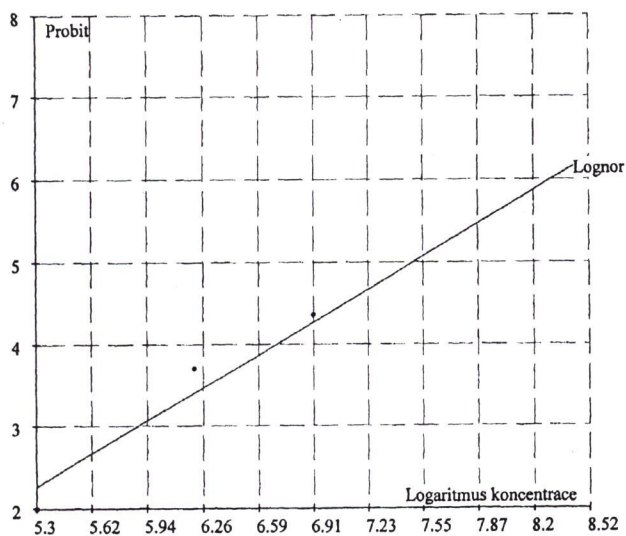
**Obr. XII.** Vyhodnocení základního testu inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus* – podle růstových rychlostí, použítá ředící voda: ISO 8692, výsledná hodnota:  $72hIC_{50\mu} = 12,4 \text{ mg.l}^{-1}$



**Obr. XIII.** Vyhodnocení základního testu inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus* – podle integrálů biomasy, použitá ředící voda: ISO 8692, výsledná hodnota:  $72hIC_{50A} = 4,1 \text{ mg.l}^{-1}$



**Obr. XIV.** Vyhodnocení základního testu inhibice růstu kořene *Sinapis alba*, použitá ředící voda: ISO 6341, výsledná hodnota:  $72hIC_{50} = 1804 \text{ mg.l}^{-1}$



**Tab. XXVIII. Probitové hodnoty**

%	probit y	%	probit y	%	probit y	%	probit y
0,2	2,122	21,0	4,194	51,0	5,025	82,0	5,915
0,4	2,348	22,0	4,228	52,0	5,050	83,0	5,954
0,6	2,488	23,0	4,261	53,0	5,075	84,0	5,994
0,8	2,591	24,0	4,294	54,0	5,100	85,0	6,036
1,0	2,574	25,0	4,326	55,0	5,126	86,0	6,080
1,2	2,743	26,0	4,357	56,0	5,151	87,0	6,126
1,4	2,803	27,0	4,387	57,0	5,176	88,0	6,175
1,6	2,856	28,0	4,417	58,0	5,202	89,0	6,227
1,8	2,903	29,0	4,447	59,0	5,228	90,0	6,282
2,0	2,946	30,0	4,476	60,0	5,253	91,0	6,341
2,5	3,040	31,0	4,504	61,0	5,278	92,0	6,405
3,0	3,123	32,0	4,532	62,0	5,305	93,0	6,476
3,5	3,188	33,0	4,560	63,0	5,332	94,0	6,555
4,0	3,249	34,0	4,588	64,0	5,358	95,0	6,645
4,5	3,305	35,0	4,615	65,0	5,385	95,5	6,695
5,0	3,355	36,0	4,642	66,0	5,412	96,0	6,751
6,0	3,445	37,0	4,668	67,0	5,440	96,5	6,812
7,0	3,524	38,0	4,695	68,0	5,468	97,0	6,881
8,0	3,595	39,0	4,722	69,0	5,496	97,5	6,960
9,0	3,659	40,0	4,747	70,0	5,524	98,0	7,054
10,0	3,718	41,0	4,772	71,0	5,553	98,2	7,096
11,0	3,773	42,0	4,798	72,0	5,583	98,4	7,144
12,0	3,825	43,0	4,824	73,0	5,613	98,6	7,197
13,0	3,874	44,0	4,849	74,0	5,643	98,8	7,257
14,0	3,920	45,0	4,874	75,0	5,674	99,0	7,326
15,0	3,964	46,0	4,900	76,0	5,706	99,2	7,409
16,0	4,006	47,0	4,925	77,0	5,739	99,4	7,512
17,0	4,046	48,0	4,950	78,0	5,772	99,6	7,652
18,0	4,085	49,0	4,975	79,0	5,806	99,8	7,878
19,0	4,122	50,0	5,000	80,0	5,842		
20,0	4,158			81,0	5,878		

## **Příprava ředící vody podle ISO 6341**

Používá se při akutním imobilizačním testu na perloočkách, testu akutní toxicity na rybách a testu inhibice růstu kořene.

### **Příprava zásobních roztoků:**

**Zásobní roztok č. 1:** 11,6 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (p.a.) se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou

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

**Zásobní roztok č. 3:** 2,59 g  $\text{NaHCO}_3$  (p.a.) se rozpustí a doplní do 1 litru destilovanou vodou

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

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

## **Příprava živného roztoku podle mezinárodní normy ISO 8692**

**Zásobní roztok č. 1 – živiny:** (navážky na 1 litr roztoku)

$\text{NH}_4\text{Cl}$  1,5 g

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1,2g

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,8g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,5g

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,16g

**Zásobní roztok č. 2 – Fe-EDTA:** (navážky na 1 litr roztoku)

$\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  80mg

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  100mg

**Zásobní roztok č. 3 – stopové prvky:** (navážky na 1 litr roztoku)

$\text{H}_3\text{BO}_3$  185 mg

MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	415 mg
ZnCl <sub>2</sub>	3mg
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,5 mg
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	7 mg

**Zásobní roztok č. 4 – NaHCO<sub>3</sub> :** (navážky na 1 litr roztoku)

NaHCO <sub>3</sub>	50 g
--------------------	------

K přípravě roztoků se používá destilovaná, redestilovaná nebo demineralizovaná voda s konduktivitou do 1 mS.m<sup>-1</sup>. Zásobní roztoky se sterilizují membránovou filtrací (průměr pórů 0,2 μm) nebo v autoklávu (120 °C, 15 min). Roztoky se skladují při 4 °C ve tmě. Roztok č. 4 se nesterilizuje v autoklávu, ale pouze filtruje přes membránový filtr.

Z uvedených 4 zásobních roztoků se připraví **zásobní živný roztok** následujícím způsobem: do 1 000 ml odměrné baňky se nadávkuje:

- 100 ml roztoku 1
- 10 ml roztoku 2
- 10 ml roztoku 3
- 10 ml roztoku 4

a doplní po rysku destilovanou vodou.

**Zásobní živný roztok** se připravuje vždy čerstvý. Před použitím roztoku se nechá ustavit jeho rovnováha se vzduchem tak, že se přes noc nechá v kontaktu se vzduchem, nebo se po dobu 30 min provzdušuje filtrovaným vzduchem. Po dosažení rovnováhy se změří pH roztoku a pokud je to nutné, upraví se na hodnotu 8,3 ± 0,2 přidávkem kyseliny chlorovodíkové (1 m-HCl) nebo hydroxidu sodného (1m-NaOH).

**Standardní živný roztok** se připravuje desetinasobným ředěním zásobního živného roztoku: do odměrné baňky o objemu 1 000 ml se odměří 100 ml zásobního živného roztoku a doplní se po rysku destilovanou vodou.