

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

Bakalářská práce

**Vliv teploty vody na toxicitu volného amoniaku  
pro ryby a na množství amoniaku produkovaného  
rybami**

(Influence of water temperature on toxicity of free  
ammonia for fish and on amount of ammonia  
produced by fish)

**Autor:** Jozef Mecko

**Vedoucí diplomové/bakalářské práce:** Ing. Jana Máchová

**Konzultant diplomové/bakalářské práce:** Ing. Olga Valentová

**Studijní program a obor:** Rybářství

**Forma studia:** Prezenční

**Ročník:** 3.

České Budějovice, 2011

## Prohlášení

Prohlašuji tímto, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že, v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 27. dubna 2011

.....

Podpis

## Poděkování

Rád bych poděkoval své vedoucí Ing. Janě Máchové za odborné vedení a cenné rady a velkou ochotu, se kterou mi pomáhala při zpracování mé bakalářské práce.

Dále Ing. Olze Valentové za metodické vedení a odbornou pomoc. Děkuji také všem pracovníkům Laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie FROV JU ve Vodňanech, především Prof. MVDr. Zdeňce Svobodové, DrSc., MVDr. Elišce Sudové, Ph.D., doc. Ing. Josefovi Velíškovi, Ph.D. a RNDr. Richardovi Fainovi za pomoc a čas, který mi poskytli při přípravě podmínek pro mou práci.

Tato práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru VÚRH JU  
č. MSM6007665809 a národního dotačního programu MZe č.2A.e.1a.

i

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

Jméno a příjmení: **Jozef MECKO**  
Osobní číslo: **V10B038P**  
Studijní program: **B4103 Zootechnika**  
Studijní obor: **Rybářství**  
Název tématu: **Vliv teploty vody na toxicitu volného amoniaku pro ryby  
a na množství amoniaku produkovaného rybami**  
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

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

Cíl práce: Cílem práce je stanovení akutní toxicity volného amoniaku pro ryby v závislosti na teplotě vody a stanovení produkce amoniaku rybami v závislosti na teplotě vody  
Metodický postup:

Byl proveden test akutní toxicity na *Poecilia reticulata* podle ČSN EN ISO 7346-2 a stanovení akutní letální toxicity látek pro ryby.

Dále byl proveden test na vylučování amoniaku kaprem obecným při různých teplotách vody. Ryby byly rozděleny po dvou kusech do nádrží a teplota vody byla v nádržích udržována na dvou úrovních.

Následující test byl prováděn obdobným způsobem s tím rozdílem, že rybám byl aplikován do trávicího traktu sondou škrobový gel s přísadkou  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Kontrolním rybám byl aplikován škrobový gel bez přísadky  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Byla sledována koncentrace amoniaku ve vodě a rybám byla odebrána krev na stanovení hematokritových a biochemických hodnot.

Na základě těchto hodnot bude vyhodnocena produkce amoniaku jednoho druhu ryby v závislosti na teplotě vody.

Rozsah grafických prací: 4 - 7 tabulek a grafů  
Rozsah pracovní zprávy: 20 - 30 stran  
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:


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

Máchová, J., Peňáz, M., Kouřil, J., Hamáčková, J., Macháček, J., Groch, L., 1983. Vliv různých hodnot pH a zvýšené koncentrace amoniaku na růst a ontogenetický vývoj plůdku kapra. [The effect of different pH values and increased ammonia concentrations on the growth and ontogenetic development of carp fry]. Buletin VÚRH Vodňany, 19(3): 3-14.

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

Svobodová, Z., Máchová, J., Kroupová, H., Smutná, M., Groch, L., 2007. Ammonia autointoxication of common carp: case studies. Aquaculture International, 15 (3-4):277-286. (IF 2006 = 0.943)

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Jana Máchová**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický  
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Olga Valentová**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický  
Datum zadání bakalářské práce: **30. listopadu 2010**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2012**

u. z.   
prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD  
Z. Svoboda  
389 25 Vodňany (2)

  
doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.  
ředitel

V Českých Budějovicích dne 14. ledna 2011

# Obsah

1 Úvod.....	9
2 Teoretická část.....	10
2.1 AMONIAK.....	10
2.1.1 Výskyt amoniaku v povrchových vodách.....	10
2.1.2 Výskyt amoniaku v odpadních vodách.....	10
2.1.3 Etiologie.....	10
2.1.4 Mechanismus účinku.....	11
2.1.5 Akutní a chronická toxicita pro ryby.....	12
2.1.6 Autointoxikace.....	13
2.1.7 Klinické příznaky otravy ryb amoniakem.....	13
2.1.8 Patologickomorfologický obraz otravy ryb amoniakem.....	14
2.1.9 Diagnostika.....	14
2.1.10 Prevence.....	15
2.2 TESTY TOXICITY NA VODNÍCH ORGANISMECH.....	15
2.2.1 Biologické testy toxicity.....	15
2.2.2 Testy akutní toxicity.....	16
2.2.3 Akutní a chronická toxicita pro ryby.....	17
3 Experimentální část.....	19
3.1. METODIKA.....	20
3.1.1 Test akutní toxicity na živoroďce duhové ( <i>Poecilia reticulata</i> ).....	20
3.1.2. Vylučování amoniaku kaprem obecným při různých teplotách vody.....	22
3.1.3 Vylučování amoniaku kaprem obecným při různých teplotách vody a různé naplněnosti zažívacího traktu.....	23
3.2 VÝSLEDKY.....	24
3.2.1 Test akutní toxicity na <i>Poecilia reticulata</i> .....	24
3.2.2 Vylučování amoniaku kaprem obecným při různých teplotách vody.....	24
3.2.3 Vylučování amoniaku rybami, kterým byl do zažívacího traktu aplikován škrobový gel s obsahem NH <sub>4</sub> Cl a biochemické analýzy krevní plazmy ryb.....	28
3.3 DISKUZE.....	33
4 Závěr.....	35
5 Literatura.....	36
6 Přílohy.....	41

# 1 Úvod

Amoniak, organické látky a deficit kyslíku patří k nejčastějším příčinám poškození a úhynu ryb. Zdrojem zvýšených koncentrací amoniaku mohou být komunální odpadní vody, bodové a plošné zemědělské znečištění (zde se jedná o amoniak organického původu) nebo průmyslové odpadní vody z plynáren, koksáren a generátorových stanic, mrazíren, splachy průmyslových hnojiv (amoniak anorganického původu). **(Svobodová, 2008).**

Ve své bakalářské práci jsem se proto zaměřil na sledování negativního vlivu amoniaku na organismus ryb a dále na produkci amoniaku rybami (hlavního metabolického produktu ryb) při různých teplotách vody. Sledování jsem prováděl formou laboratorních pokusů na akvariijní rybě – živorodce duhové (*Poecilia reticulata*) a kapru obecném (*Cyprinus carpio*). Měření jsem prováděl na Jihočeské univerzitě, Fakultě rybářství a ochrany vod ve Vodňanech, v laboratoři vodní toxikologie a nemoci ryb.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Amoniak

#### 2.1.1 Výskyt amoniaku v povrchových vodách

Koncentrace amoniakálního dusíku většinou nepřevyšují  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  ( $\text{NH}_4^+$ ). Vzrůst koncentrace můžeme zaznamenat v profilech pod zaústěním městských odpadních vod, nebo některých průmyslových odpadních vod. Např. průměrná koncentrace amoniakálního dusíku ve vltavské vodě v profilu České Budějovice byla v letech 1994/95  $0,208 \text{ mg.l}^{-1}$  a podle očekávání vzrostla pod Prahou na průměrnou koncentraci  $1,035 \text{ mg.l}^{-1}$  (Pitter, 1999).

#### 2.1.2 Výskyt amoniaku v odpadních vodách

Koncentrace amoniaku v odpadních vodách se pohybují v desítkách  $\text{mg.l}^{-1}$ . Zdrojem jsou především fekálie (moč) a rozklad dusíkatých organických látek. Obsah je značně variabilní, protože již v kanalizaci dochází k různým biologickým transformacím sloučenin dusíku.

Vysoké koncentrace amoniakálního dusíku lze zjistit v některých průmyslových odpadních vodách a v odpadech ze zemědělství. Například odpady ze silážování obsahují až  $400 \text{ mg.l}^{-1}$  a močůvka až  $7000 \text{ mg.l}^{-1}$ . Odpadní vody z nízkoteplotní karbonizace uhlí obsahují asi jednotky gramů v litru (Pitter, 1999).

#### 2.1.3 Etiologie

Zvýšené koncentrace amoniaku jsou v našich podmínkách jednou z nejčastějších příčin poškození a úhynu ryb. Znečištění recipientů amoniakem může být organického původu (komunální odpadní vody, bodové a plošné zemědělské znečištění) nebo anorganického původu (průmyslové odpadní vody z plynáren, koksáren a generátorových stanic, mrazíren, splachy průmyslových hnojiv). Amoniak je rovněž konečným produktem dusíkatého metabolismu sladkovodních ryb.

Ve vodě nebo v biologických tekutinách se amoniak nachází jednak ve formě molekulární – nedisociované – pro ryby toxické ( $\text{NH}_3$ ) a jednak ve formě amonného



iontu – disociované pro ryby relativně málo toxické ( $\text{NH}_4^+$ ). Vzájemný poměr těchto dvou forem závisí na hodnotě pH vody a na její teplotě (**Svobodová, 2008**).

Při sledování kvality vody v recipientech a v rybochovných zařízeních se stanovuje koncentrace veškerého amoniaku. Z hlediska toxikologického působení je třeba znát koncentraci nedisociovaného, toxického amoniaku ( $\text{NH}_3$ ). Tato koncentrace se zjišťuje z naměřených hodnot veškerého amoniaku. ( $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$ ), teploty (T) a hodnoty pH vody podle vzorce:

$$\text{NH}_3 = \frac{\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3}{10^{(10,07 - 0,033 T - \text{pH})} + 1}$$

anebo z tab. č.1 sestavené podle uvedeného vzorce (**Svobodová a kol., 1987**).

**Tab.1.** Procentické zastoupení volného amoniaku v závislosti na pH a teplotě vody (**Pitter, 1999**):

pH	Teplota					
	0°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C
7,0	0,082	0,12	0,175	0,26	0,37	0,55
8,0	0,82	1,19	1,73	2,51	3,62	5,21
9,0	7,60	10,73	14,95	20,45	27,32	35,46
10,0	45,12	54,59	63,74	71,99	78,98	84,60
11,0	89,16	92,32	94,62	96,26	97,41	98,21

Toxicita amoniaku je vedle teploty a hodnoty pH vody ovlivněna koncentrací kyslíku rozpuštěného ve vodě. Se snižující se koncentrací kyslíku ve vodě stoupá toxicita amoniaku (**Vámos, 1974**).

#### 2.1.4 Mechanismus účinku

Z hlediska toxického účinku je důležité, že stěna buněk je poměrně nepropustná pro amonný iont -  $\text{NH}_4^+$ , zatímco molekulární amoniak  $\text{NH}_3$  proniká přes tkáňové bariéry velmi a je tedy pro ryby jedovatý. Zvláštní afinitu má amoniak k mozku a nervové soustavě. Proto v průběhu otravy ryb amoniakem vystupují do popředí nervové poruchy (**Svobodová, 2008**).

Za normálního stavu existuje na tkáňových bariérách acidobazická rovnováha. Při jejím porušení ta strana, na níž je hodnota pH nižší, zachytává molekulární amoniak.

Tím je možno vysvětlit jednak přechod molekulárního amoniaku z vody přes žaberní epitel do krve a jednak přechod z krve do tkání. Amoniak narušuje energetický metabolismus nervových buněk. Navazuje se na kyselinu  $\alpha$ -ketoglutarovou z Krebsova citrátového cyklu a snižuje tak tvorbu ATP. Navíc vzniká pro nervovou buňku toxický glutamin, který je dalším zdrojem toxického amoniaku a současně je prekursorem kyseliny gama-aminomáselné (GABA), která je inhibičním neurotransmiterem. Předpokládá se rovněž, že příčinou toxického účinku amoniaku je depolarizace neuronů, k níž dochází náhradou draslíku ( $K^+$ ) iontem  $NH_4^+$ . Depolarizace neuronů pak vede ke zvýšené aktivaci NMDA receptorů (N-metyl-D-aspartátových receptorů) a následně k nekróze buněk (**Smutná, 2001; Svobodová, 2008**).

### 2.1.5 Akutní a chronická toxicita pro ryby

Nedisociovaný amoniak je látka pro ryby silně až velmi silně jedovatá. Hodnota  $LC_{50}$  zjištěná v testu akutní toxicity se u kaprovitých ryb pohybuje v rozmezí 1 – 1,5  $mg.l^{-1} NH_3$ , u lososovitých ryb v rozmezí 0,5 – 0,8  $mg.l^{-1} NH_3$ . Minimální letální koncentrace ( $LC_5$ ) amoniaku u kaprovitých ryb je v rozmezí 0,6 – 0,8  $mg.l^{-1} NH_3$ . Po působení koncentrace 0,2  $mg.l^{-1} NH_3$  po dobu 150 hodin na plůdek kapra obecného byly ještě zjištěny závažné histologicko-patologické změny zejména na respiračním epitelu žaber (**Svobodová a kol., 1987**). Při zvyšujících se hodnotách pH a teploty vody dochází ke změně přítomného amoniaku vázaného ve formě solí na volný amoniak (neionizovaný). Pro ryby je toxický právě volný amoniak, jehož nepříznivý účinek závisí na dalších faktorech, např. na koncentraci rozpuštěného kyslíku ve vodě a individuální odolnosti ryb (**Vámos, 1974**).

Koncentrace v rozmezí 0,14 až 0,40  $mg.l^{-1} NH_3$ , která působila na plůdek kapra obecného v období 4-26 dnů po vykulení, způsobila zřetelné zaostávání ve vývoji, vedla k narušení vývoje ploutevního aparátu (především břišních ploutví) a ke snížení pigmentace pokožky (ztráta výběžků a zmenšení melanoforů) (**Máchová a kol., 1983**). Nejvyšší přípustná koncentrace amoniaku ( $NH_3$ ) pro ryby kaprovité je 0,05  $mg.l^{-1}$ , pro ryby lososovité 0,0125  $mg.l^{-1}$  (**SVOBODOVÁ A KOL., 1987**). Na základě literárních údajů o pstruhu lze říci, že jikry vykazují vůči působení volného amoniaku vyšší odolnost ve srovnání s váčkovým plůdkem (**Alabaster a Lloyd, 1980**).

### 2.1.6 Autointoxikace

Jednou z častých příčin havarijních úhynů ryb je rovněž autointoxikace amoniakem. Hlavní zdroj amoniaku v těle ryb představuje deaminace aminokyselin, probíhající hlavně v játrech, ledvinách, svalovině a ve střevě ryb (SMUTNÁ, 2001). Amoniak je hlavním produktem dusíkatého metabolismu u většiny sladkovodních ryb. Pokud nastane nerovnováha mezi produkcí a exkrecí amoniaku žábry, může dojít k výraznému zvýšení koncentrace amoniaku v krvi ryb a následně k jejich otravě vlastním metabolitem (autointoxikaci) a k úhynu. Porucha vylučování amoniaku může být způsobena různými vnitřními i vnějšími faktory. Případy autointoxikace amoniakem jsou většinou spojeny s náhlým poklesem teploty vody (o 5-8°C) nebo koncentrace kyslíku (z přesycení na 20-40 % nasycení), když mají ryby plný trávicí trakt. V těchto případech dochází k výraznému snížení intenzity metabolismu včetně činnosti Krebsova citrátového cyklu, což vede k deficitu mediátoru (kyselina  $\alpha$ -ketoglutarová) transportujícího amoniak do žaber s následným zvýšením koncentrace amoniaku v krvi a k autointoxikaci (Svobodová, 2008).

### 2.1.7 Klinické příznaky otravy ryb amoniakem

Při otravě amoniakem ryby zpočátku jeví mírný neklid, zvyšuje se frekvence pohybu skřelí, ryby se zvedají k hladině, u kaprovitých lze pozorovat nouzové dýchání a zvyšující se neklid. Pohyby ryb se postupně zrychlují, pohyby skřelí jsou nepravidelné a nastupuje fáze excitace. Ryby silně reagují na podněty z vnějšího prostředí, ztrácejí rovnováhu, vyskakují nad hladinu a je možno pozorovat tonicko-klonické křeče svaloviny. Ryby se položí na bok, mají křečovitě rozevřenou tlamu a skřele. Poté následuje krátké období zdánlivého zotavení. Ryba zaujme normální polohu a jeví mírný neklid. Tato fáze je vystřídána novou silnou excitací, zblednutím povrchu těla a následným úhynem ryb (Svobodová, 2008).

Při autointoxikaci amoniakem se ryby shromažďují u stěn nádrží nebo ve stinných částech rybníků. Nepřijímají krmivo. Chvillemi je možno pozorovat prudší trhavé pohyby, ryba vyskočí nad hladinu a přitom dochází ke křečím svaloviny. V pokročilém stádiu dochází ke ztmavnutí povrchu těla, ke snížení nebo úplné ztrátě únikových reakcí a následuje úhyn (Svobodová, 2008).

### 2.1.8 Patologickomorfologický obraz otravy ryb amoniakem

Kůže ryb otrávených amoniakem je světlé barvy, silně a velmi silně zahleněná. V některých případech je možno pozorovat drobné krváceninky, zejména při bázi ploutví a také v přední oční komoře. Žábry jsou silně překrvené a silně zahleněné, u ryb z prostředí s vysokými koncentracemi amoniakem dochází ke krvácení ze žaber. Hlen na kůži a žábrách je matný. Orgány tělní dutiny jsou překrvené, parenchymatózní orgány jeví dystrofické změny **(Svobodová, 2008)**.

Při autointoxikaci amoniakem je povrch těla tmavší barvy. Typické jsou změny na žábrách, tj. silné překrvení, tmavě červené zbarvení a silný edém žaber. Po poranění žábry velmi silně krvácejí. Následuje nekróza respiračního epitelu, jeho odlupování ze žaber, někdy dochází až k úplnému obnažení pilířů žaberních lístků **(Svobodová, 2008)**.

### 2.1.9 Diagnostika

Diagnostika otrav ryb amoniakem se provádí pomocí fyzikálně-chemické analýzy vody. Stanovuje se koncentrace celkového amoniaku ( $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ ) a příslušná hodnota pH vody a její teplota. Z hlediska toxického působení je třeba znát koncentraci nedisociovaného toxického amoniaku ( $\text{NH}_3$ ). Tato koncentrace se vypočítává z výše uvedených hodnot podle tab. č.1, kde je uveden podíl toxického amoniaku v procentech naměřených hodnot celkového amoniaku v závislosti na pH a teplotě vody.

U živých ryb s příznaky otravy je možno diagnostiku provést analýzou krevní plazmy na obsah amoniaku. Při otravě se koncentrace amoniaku zvyšuje pětikrát až desetkrát. Stejně tato koncentrace stoupá při autointoxikaci. Analýza krevní plazmy je rozhodujícím důkazem pro diagnózu otravy a autointoxikace amoniakem. Fyziologická koncentrace amoniaku však velmi kolísá v závislosti na teplotě vody, ročním období, naplnění trávicího traktu a kvalitě požitého krmiva (množství dusíkatých látek). V zimě se pohybuje v rozmezí 50-100  $\mu\text{mol/l}$ , v letním období od 500 do 800  $\mu\text{mol/l}$  **(Svobodová, 2008)**.

### **2.1.10 Prevence**

Spočívá v zabránění znečištění vodního prostředí amoniakem. V případě prevence autointoxikace je nutné zabránit náhlému poklesu teploty vody či koncentrace kyslíku ve vodě (Svobodová, 2008).

## **2.2 Testy toxicity na vodních organismech**

### **2.2.1 Biologické testy toxicity**

Pro hodnocení ekotoxikologických vlastností látek jsou používány biologické testy toxicity, biotesty, bioassays, laboratorní zkoušky toxicity. Význam biologických testů spočívá v postižení souhrnu účinků všech přítomných komponent v testovaném roztoku na testovaný materiál (organismus, kultura, tkáň, buňka). Testy toxicity slouží ke zjištění možného toxického vlivu látek na biocenózu vodních toků. Umožňují rychlé a dostatečné zhodnocení odpadů, na jejichž základě lze případně odhadnout negativní účinek těchto látek. Testy podávají i informace o biologické aktivitě a schopnosti toxických látek procházet biomembránami, jsou založené na fyziologických pochodech, biochemických změnách, fotosyntéze a dýchání. Bioassays, nebo-li testy na biologickém materiálu, mají hlavní cíl, a to stanovit hraniční koncentrace, ve kterých je možný život vybraných testovacích organismů. Testy na organismech vodního prostředí jsou vhodné pro hodnocení nově vyvinutých a do praxe zaváděných chemických látek, odpadů na skládky, havárií průniku odpadních vod do povrchových či podzemních zdrojů (Ambrožová, 2001, Máchová a kol., 1994).

Testy toxicity se provádějí na třech úrovních, a to:

- a) na úrovni buněk a tkání
- b) na úrovni jedinců (organismů)
- c) na úrovni společenstev (biocenóz) **(Svobodová a kol., 1994)**

Testy na úrovni buněk a tkání se 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 obdržených *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, avšak jedná se o testy, které jsou ve vodní toxikologii nejvíce využívány **(Svobodová a kol., 2003; Svobodová a kol., 2000)**.

### 2.2.2 Testy akutní toxicity

Mezi nejznámější a nejrozšířenější v laboratorní praxi patří standardní laboratorní testy akutní toxicity. Ve světě existuje celá řada ekotoxikologických metodik. Jako velice perspektivní se jeví snaha rozšířit do co největšího počtu zemí jednotnou metodiku a jednotné hodnocení toxicity látek. V jednotlivých zemích světa byly standardizovány různé metodiky umožňující porovnání výsledků mezi laboratořemi. Mezi nejrozšířenější patří metodiky ISO a OECD. Z důvodů porovnatelnosti výpovědní hodnoty jednotlivých testů a použitých organismů, se neprovádí testování látky pouze na jednom, ale alespoň na třech druzích vodních organismů. Toto paralelní testování se označuje jako základní baterie testů, založené na poznatku o stavbě a propustnosti buněčné stěny u různých organismů, např. destruent, producent a konzument. Baterie testů využívá rozdílného charakteru skladby buněčné stěny bakteriálního, rostlinného a živočišného typu buňky. Nejpoužívanější baterií testů akutní toxicity jsou testy na bakteriích (bioluminiscenční bakterie *Vibrio fischeri*), testy toxicity na řasách (chlorokokální druh *Desmodesmus subspicatus*), testy toxicity na semenech (krátkodobý

test klíčivosti na semenech hořčice bílé *Sinapis alba*), bezobratlých (testy toxicity na koryšcích, např. perloočka *Daphnia magna* STRAUS) a testy toxicity na rybách (obvykle akvarijní ryбка *Poecilia reticulata* či *Brachydanio rerio*) (ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, 2007).

### 2.2.3 Akutní a chronická toxicita pro ryby

Cílem testů toxicity je stanovení hodnot LC<sub>50</sub>, NOEC, LOEC. Za účelem stanovení těchto hodnot jsou využívány standartizované metody akutních a prolongovaných testů toxicity podle OECD (Organization for Economic Co-operation of Development), případně ISO (International Organization for Standardization)

OECD má v současné době standardizované následující testy (Svobodová a Máchová, 2003):

- 203 – Test akutní toxicity na rybách – výsledkem je hodnota 96hLC<sub>50</sub>
- 204 – Prolongovaný test toxicity na rybách (14 denní) – výsledkem jsou hodnoty 14dLC<sub>50</sub>, NOEC a LOEC
- 210 – Test na raných vývojových stádiích ryb (embryonální test toxicity) – výsledkem jsou hodnoty NOEC a LOEC
- 212 – Krátkodobý test toxicity na embryích a na váčkovém plůdku ryb (embryonální test toxicity) – výsledkem jsou hodnoty NOEC a LOEC
- 215 – Růstový test toxicity na juvenilních rybách (28 denní) – výsledkem jsou hodnoty NOEC a LOEC

Při provádění testů na obratlovcích 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.

Výchozí metodikou pro test akutní toxicity na akvarijních rybách druhů *Poecilia reticulata* a *Brachydanio rerio* je soubor ISO norem: ČSN EN ISO 7346-1 (Statická metoda), ČSN EN ISO 7346-2 (Obnovovací metoda) a ČSN EN ISO 7346-3 (Průtočná metoda). Cílem testu je stanovení toxicity vodou vyluhovatelných látek z odpadu na ryby. Testovacím materiálem je akvarijní ryba *Poecilia reticulata* (živorodka duhová) či *Brachydanio rerio* (danio pruhovaný), které lze nahradit druhem *Pimephales promelas*.

Při testech je potřeba pracovat v souladu se zněním Zákona č.246/1992 Sb. Na ochranu zvířat proti týrání a dále Vyhlášky Mze ČR č.311/1997 Sb. O chovu a využití pokusných zvířat **(Říhová Ambrožová, 2007)**.

Test probíhá při teplotě  $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , bez aerace a bez krmení organismů. Zředovací vodou je pracovní roztok solí použitý v požadovaném objemu 100 ml na jednoho jedince. Počet testovaných organismů v jedné koncentraci je 3 až 10 kusů (v jedné sérii testu je vhodné nasadit vždy stejný počet). Test probíhá za uvedených standardizovaných podmínek po dobu 48 hodin, dle metodik ISO se prodlužuje až na 96 hodin. V průběhu testu se zaznamenává chování, případně úhyny ryb, měří se pH, koncentrace rozpuštěného kyslíku a teplota. Obvykle se testy provádějí ve dvou stupních, a to jako předběžný test s rozpětím deseti koncentrací, po pěti kusech ryb v každé koncentraci. Na základě zjištěných výsledků se volí koncentrace pro základní test, který se provádí ve třech paralelních stanoveních (10 koncentrací po 10 kusech ryb). V průběhu testu se sledují úhyny ryb v jednotlivých koncentracích, z nichž se vypočítá hodnota střední letální koncentrace 96hLC<sub>50</sub> pro každé paralelní stanovení a do výsledků se uvede průměrná hodnota z těchto stanovení. Hodnoty zjištěné LC<sub>50</sub> by se neměly vzájemně lišit o více než 30 %. Zjištění efektivní koncentrace je založeno na procentuální inhibici I<sub>i</sub> v jednotlivých koncentracích v porovnání s kontrolou (pouze pracovní roztok s nasazenými organismy). Zjištěné hodnoty I<sub>i</sub> se převedou na pravděpodobnostní (probitové) jednotky a tyto jednotky se spolu s odpovídajícími koncentracemi převedenými na logaritmy použijí pro sestavení grafu, kde na ose x jsou logaritmy koncentrací a na ose y probitové jednotky. Lineární regresí se zjistí hodnota letální koncentrace LC<sub>50</sub>. **(Říhová Ambrožová, 2007)**.



## **3 Experimentální část**

### **Cíl Práce**

- 1) Stanovení akutní toxicity volného amoniaku pro ryby v závislosti na teplotě vody
- 2) Stanovení produkce amoniaku rybami v závislosti na teplotě vody a naplněnosti zažívacího traktu.

## 3.1. Metodika

### 3.1.1 Test akutní toxicity na živorodce duhové (*Poecilia reticulata*)

Test akutní toxicity na *Poecilia reticulata* byl proveden podle ČSN EN ISO 7346-2 Stanovení akutní letální toxicity látek pro ryby. Pokusné ryby byly vystaveny koncentrační řadě amoniaku, který byl dávkován ve formě chloridu amonného. Přehled o dávkování chloridu amonného do jednotlivých nádrží s rybami je uveden v tab. č.2. Aby bylo dosaženo požadované koncentrace volného amoniaku, byla hodnota pH vody upravována roztokem hydrogenuhličitanu sodného a hydroxidu sodného na hodnoty pH 9 – 9,3.

#### Podmínky testu:

- **objem lázně:** 3 litry
- **počet ryb v nádrži:** 3 ks
- **teplota vody:** 20 °C (pokus A) a 25 °C (pokus B)
- **ředicí voda:** vodovodní
- **provzdušňování:** bez aerace
- **délka expozice:** 48 hodin
- **výměna lázně:** po 24 hodinách
- **krmivo:** ryby nebyly během testu krmeny

**Tab. č. 2.** Koncentrace chloridu amonného použité v testu akutní toxicity a odpovídající koncentrace celkového a toxického amoniaku

Č. nádrže	K	1	2	3	4	5
Nominální koncentrace NH <sub>4</sub> Cl (mg.l <sup>-1</sup> )	0	2	5	10	20	30
Nominální koncentrace celkového amoniaku NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	0	0,68	1,70	3,40	6,79	10,19
Hodnota pH upravována na pH 9 – 9,3 (procentický podíl volného amoniaku při teplotě 20 °C je cca 37 %, při teplotě 25 °C 47 %)						
Teoretická koncentrace celkového amoniaku N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	pmd <sup>*)</sup>	0,53	1,32	2,64	5,28	7,92
Teoretická koncentrace volného amoniaku při 20 °C (mg.l <sup>-1</sup> N-NH <sub>3</sub> )	pmd <sup>*)</sup>	0,25	0,63	1,26	2,51	3,77
Teoretická koncentrace volného amoniaku při 25 °C (mg.l <sup>-1</sup> N-NH <sub>3</sub> )	pmd <sup>*)</sup>	0,32	0,80	1,60	3,19	4,79

\*pod mezí detekce

### Kontrola kvality vody v průběhu testu akutní toxicity

V průběhu testu byly ve 2 až 5 hodinových intervalech měřeny následující parametry kvality vody: pH, teplota vody, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace celkového amoniaku: Výsledky měření, které dokladují, jakým skutečným koncentracím volného amoniaku byly ryby během testu vystaveny, jsou uvedeny v tab. č.10 – 15 v příloze této práce.

**Hodnoty pH a rozpuštěného kyslíku** byly měřeny elektrochemicky (měřicím přístrojem firmy WTW Multiline P4)

**Teplota vody** byla měřena lihovým teploměrem

**Koncentrace celkového amoniaku** byly stanoveny kolorimetricky: k 50 ml odebraného vzorku vody bylo přidáno 0,5 ml Seignettovy soli a 0,5 ml Nesslerova činidla. Po 10 minutách byla stanovena intenzita vzniklého zabarvení fotometricky pomocí spektrofotometru Helios Epsilon při vlnové délce 412 nm proti slepému vzorku. Výše koncentrace byla odečtena z kalibrační přímky.

Na základě zjištěných hodnot byla upravována hodnota pH v jednotlivých lázních roztokem hydroxidu sodného a hydrogenuhličitanu sodného na požadovanou hodnotu 9 – 9,3.

### 3.1.2. Vylučování amoniaku kaprem obecným při různých teplotách vody

40 kusů kapra obecného (*Cyprinus carpio*) K<sub>2-3</sub> o průměrné hmotnosti 625,6 g.ks<sup>-1</sup> bylo odchyceno na rybníku VÚRH JU Vodňany. Ryby byly převedeny do nádrží s pitnou vodou o teplotě 20 – 21 °C a ponechány po dobu 4 dnů bez aplikace krmiva. Při adaptaci ryb na pokusné podmínky došlo k poruše vzduchování a polovina ryb uhynula. Z toho důvodu byly následující pokusy prováděny s menším počtem ryb, než bylo původně zamýšleno.

Ryby byly rozděleny po dvou kusech do 4 nádrží o objemu 200 litrů vody. Teplota vody byla ve 2 nádržích udržována na 25 °C pomocí termostatovaných topných těles (nádrže 1A, 1B). Teplota vody v dalších dvou nádržích byla udržována na 17 °C pomocí ledové tříště v igelitových sáčkách (nádrže 2A, 2B). V průběhu pokusu byly odebírány vzorky vody na stanovení koncentrace amonných iontů, pH, teploty a nasycení vody kyslíkem (metody stanovení byly stejné jako v případě testu akutní toxicity na *Poecilia reticulata* – kap.3.1.1.) Produkce amoniaku rybami byla stanovena na základě koncentrace amoniaku zjištěné ve vodě, ve které byly ryby chovány a dále přepočtena na produkci amoniaku vztaženou na 1 kg hmotnosti ryb za den.

Po 48 hodinách byl test ukončen, rybám byla odebrána krev z *vena caudalis* na stanovení hematokritové hodnoty. Vyšetření bylo prováděno podle **Svobodové a kol., (1991)**. V krevní plasmě byly stanoveny vybrané biochemické parametry (koncentrace amonných iontů, kyseliny močové, močoviny a glukózy). Vzhledem k malému množství krve, které se podařilo rybám odebrat, byly uvedené parametry stanoveny ve směsných vzorcích krevní plasmy vždy 2 ryb z jedné skupiny. Tyto analýzy byly prováděny na přístroji VetTest, který pracuje na principu tzv. suché analýzy.

### 3.1.3 Vylučování amoniaku kaprem obecným při různých teplotách vody a různé naplněnosti zažívacího traktu

Ryby (12 kusů) o průměrné kusové hmotnosti  $606 \text{ g.ks}^{-1}$  byly umístěny po dvou kusech do šesti 200 litrových nádrží s pitnou vodou o teplotě odpovídající teplotě vody v rybníku ( $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Po 6 dnech byl šesti pokusným rybám aplikován škrobový gel s přídavkem chloridu amonného v množství, které odpovídalo  $300 \text{ mg}$  amonných iontů ve  $100 \text{ ml}$  gelu (tato koncentrace odpovídá obsahu amoniaku ve špatně skladovaném krmivu bohatém na dusíkaté látky) a šesti kontrolním rybám byl aplikován škrobový gel bez přídavku chloridu amonného. Ihned po aplikaci byly kontrolní i pokusné ryby přendány do akvárií s rozdílnými teplotami vody, a to  $25^{\circ}\text{C}$  (skupina 1 – 1A – kontrola, 1B - pokus),  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (skupina 2 – 2A – kontrola, 2B - pokus) a  $15^{\circ}\text{C}$  (skupina 3 – 3A – kontrola, 3B - pokus). Přehled o jednotlivých skupinách ryb je uveden v tab. č.:3. Nejnižší teplota byla udržována pomocí průtokového chladiče, teplota  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  odpovídala teplotním poměrům v laboratoři a teplota  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  byla dosažena ohřevem pomocí akvaristického termostatovaného tělesa. Voda v nádržích byla během pokusu mírně provzdušňována.

V průběhu následujících 24 hodin byly sledovány koncentrace amoniaku ve vodě a v časových intervalech 3, 5 a 24 hodin od aplikace škrobového gelu byla rybám odebírána krev na stanovení hematokritové hodnoty. Po 24 hodinách byla rybám odebrána krev, která byla odstředěna a získaná plasma byla uchovávána v mrazicím boxu při teplotě  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Poté byly v plasmě stanoveny vybrané biochemické parametry (koncentrace amonných iontů, kyseliny močové, močoviny a glukózy) stejným způsobem jako v předešlém testu.

Tab. č.3. Rozdělení kapra obecného do pokusných a kontrolních nádrží

Skupina	Teplota ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\text{NH}_4^+$
IA (kontrolní)	25	NE
IB (pokusná)	25	ANO
IIA (kontrolní)	20	NE
IIB (pokusná)	20	ANO
IIIA (kontrolní)	15	NE
IIIB (pokusná)	15	ANO

## 3.2 Výsledky

### 3.2.1 Test akutní toxicity na *Poecilia reticulata*

Výsledky průběžných kontrol vybraných parametrů kvality vody a výpočet koncentrace volného amoniaku v průběhu testu jsou uvedeny v tab. č.11. – 20. v příloze.

Z provedeného měření vyplývá, že ryby v jednotlivých nádržích byly po dobu testu vystaveny volnému amoniaku v maximálních koncentracích, které jsou pro jednotlivé nádrže uvedeny v tab.č. 4.

**Tab. č.4.** Rozdělení *Poecilia reticulata* do pokusných nádrží s koncentracemi volného amoniaku

Nádrž	K	1	2	3	4	5
Teplota vody 20°C						
Koncentrace N-NH <sub>3</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	pmd*)	0,24	0,45	0,90	1,83	2,75
Teplota vody 25°C						
Koncentrace N-NH <sub>3</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	pmd*)	0,17	0,46	0,90	1,82	3,76

\*pod mezí detekce

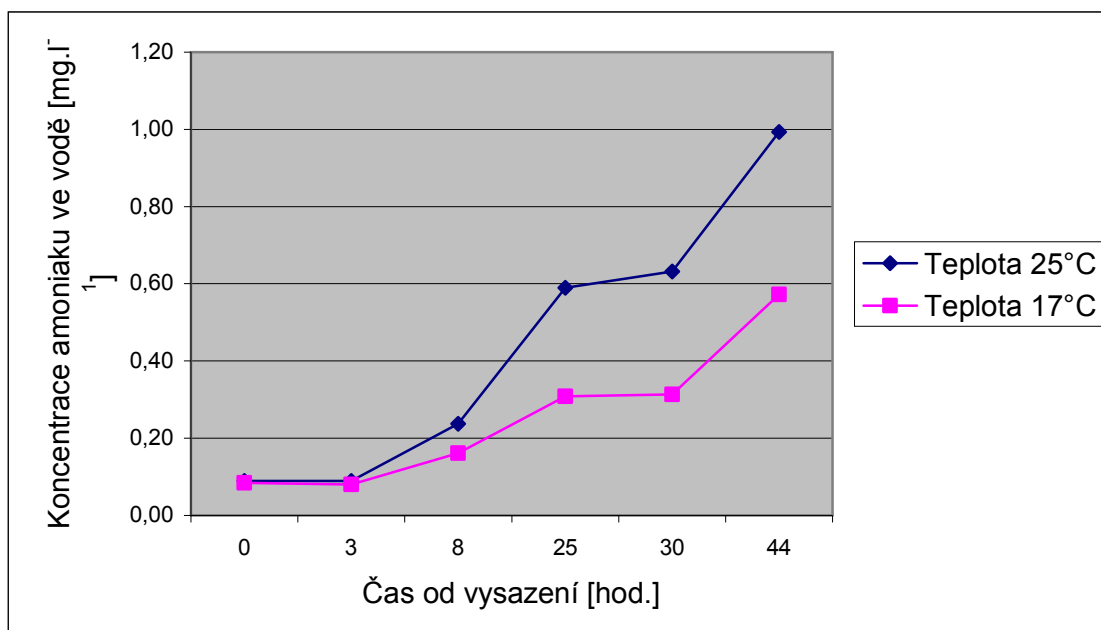
### Mortalita pokusných ryb

V průběhu 48 hodinového trvání testu nedošlo k úhynu žádného z testovacích organismů, a to ani v nejvyšší testované koncentraci, kde se koncentrace volného amoniaku pohybovala v rozmezí do 1,93 mg.l<sup>-1</sup> N-NH<sub>3</sub>, což odpovídá koncentracím – 2,34 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>.

Vzhledem k tomu bylo od dalšího testování upuštěno s tím, že *Poecilia reticulata* vykazuje extrémně vysokou toleranci vůči volnému amoniaku, a proto není pro takový test vhodným testovacím organismem.

### 3.2.2 Vylučování amoniaku kaprem obecným při různých teplotách vody

Koncentrace amoniaku zjištěné ve vodě po 2, 7, 17, 21 a 48 hodinách trvání pokusu jsou uvedeny v grafu č.1.

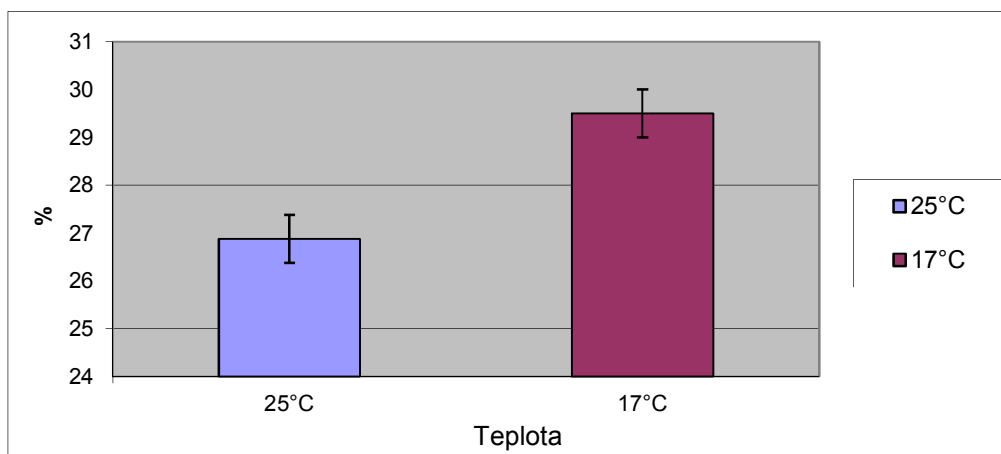


**Graf č.1.** Koncentrace amoniaku ve vodě v  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{N}\cdot\text{NH}_4^+$  - amoniak byl produkován rybami s prázdným zažívacím traktem při rozdílných teplotách vody

Výsledky hematokritové hodnoty krve jsou uvedeny v tab. č.5 a v grafu č.2. a výsledky biochemického vyšetření krevní plazmy ryb jsou uvedeny v tab. č.6.

**Tab. č.5.** Hematokrit kapra obecného při různých teplotách (průměrné hodnoty ze dvou paralelních stanovení)

Kapr ze skupiny	Teplota vody	Hematokrit
1A	25 °C	26
1A		27
1B		29,5
1B		25
2A	17 °C	29
2A		29
2B		29
2B		31



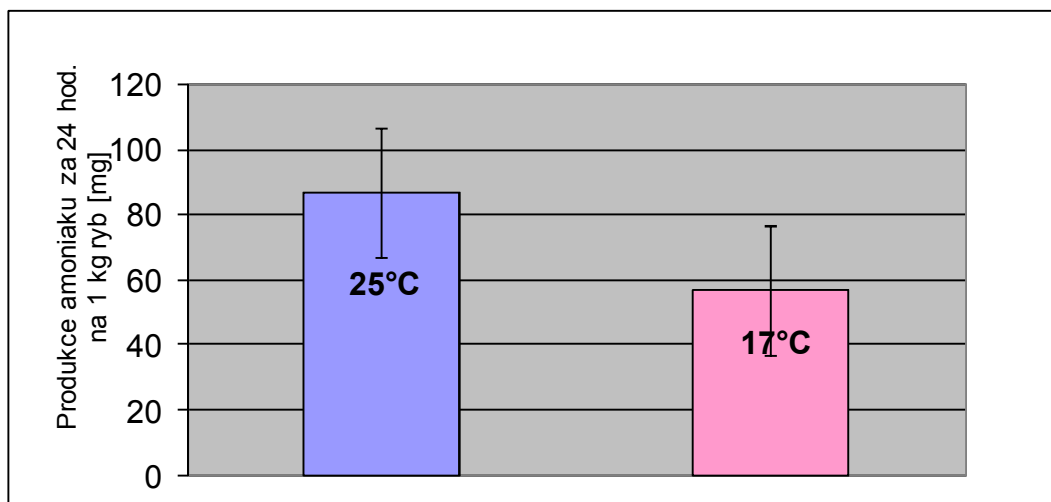
**Graf. č.2.** Hematokrit v krvi kapra obecného drženého při rozdílných teplotách vody na konci pokusu sledování produkce amoniaku rybami s prázdným zažívacím traktem

**Tab. č.6.** Biochemické parametry v krevní plasmě u kapra obecného s prázdným zažívacím traktem drženého 48 hodin při rozdílných teplotách vody

Ukazatel	Teplota vody (°C)	Amoniak ( $\mu\text{mol/l}$ )	Močovina ( $\text{mmol/l}$ )	Kyselina močová ( $\mu\text{mol/l}$ )	Glukóza ( $\text{mmol/l}$ )
Skupina I A	25 °C	417	1,2	1,285	5,805
Skupina I B		443,5	1,45	1,325	5,865
Skupina II A	17 °C	450,5	1,4	1,295	5,94
Skupina II B		472	1,2	1,23	5,85

Jak je zřejmé z grafu č.1, průměrné koncentrace amoniaku ve vodě zjištěné při teplotě 25 °C byly v průběhu testu vyšší než při teplotě 17 °C. Největší rozdíl v koncentraci amoniaku byl zaznamenán v závěru testu. Při přepočtu produkce amoniaku na 1 kg hmotnosti ryb za den jsem zaznamenal, že při teplotě vody 25 °C byla průměrná produkce amoniaku o téměř 50 % vyšší ve srovnání s produkcí zjištěnou u ryb držených ve vodě o teplotě 17 °C (graf č. 3.).





**Graf. č.3.** Průměrná produkce amoniaku kaprem obecným v mg za 24 hodin na 1 kg hmotnosti ryb

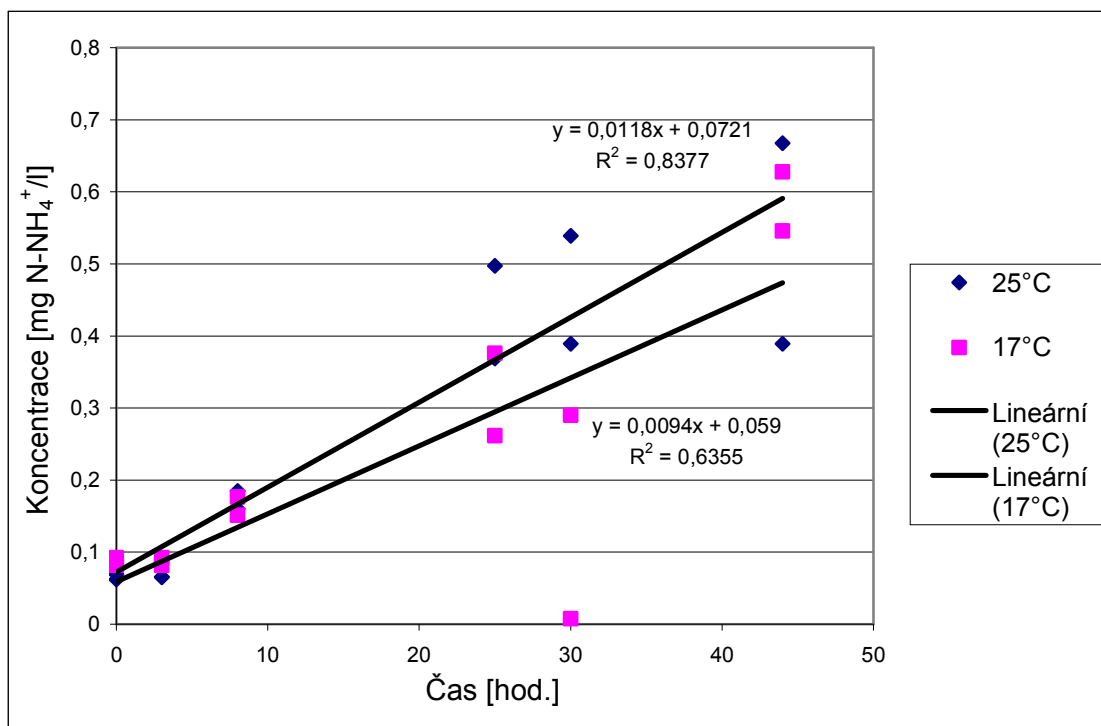
### Výsledky biochemického vyšetření krevní plasmy

Průměrná koncentrace amoniaku zjištěná v krevní plasmě ryb, držených při teplotě 17 °C činila 461,25  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , mírně nižší průměrná hodnota byla zjištěna u ryb držených při teplotě 25 °C - 430,25  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Zjištěný rozdíl však nebyl statisticky významný (viz následující odstavec). Srovnatelná hladina amoniaku v krevní plasmě obou skupin ryb svědčí o tom, že ryby, které mají prázdný zažívací trakt, jsou schopny amoniak vylučovat při obou zvolených teplotách tak, aby se jeho hladina v krvi udržovala na poměrně nízké úrovni. Hladina amoniaku zjištěná u obou skupin ryb je na mírně nižší úrovni, než je rozpětí fyziologických hodnot uváděné v práci **Svobodová a kol. (1987)** pro letní období. (500 – 800  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Nízké hodnoty amoniaku naměřené u obou skupin ryb jsou zřejmě důsledkem prázdného zažívacího traktu ryb.

Vliv teploty vody nebyl prokázán na ostatní sledované biochemické parametry (kyselina močová, močovina a glukóza), což pravděpodobně opět souvisí s prázdným zažívacím traktem ryb a také s tím, že teploty, kterým byly ryby v průběhu pokusu vystaveny, v podstatě odpovídaly rozpětí teplot 18 – 25 °C, které uvádí **Svobodová a kol. (1987)** jako vhodné pro chov kaprovitých ryb.

### Statistické vyhodnocení výsledků

Pro zjištění vlivu teploty na vylučování amoniaku byly naměřené hodnoty statisticky otestovány regresní analýzou (graf č.4).

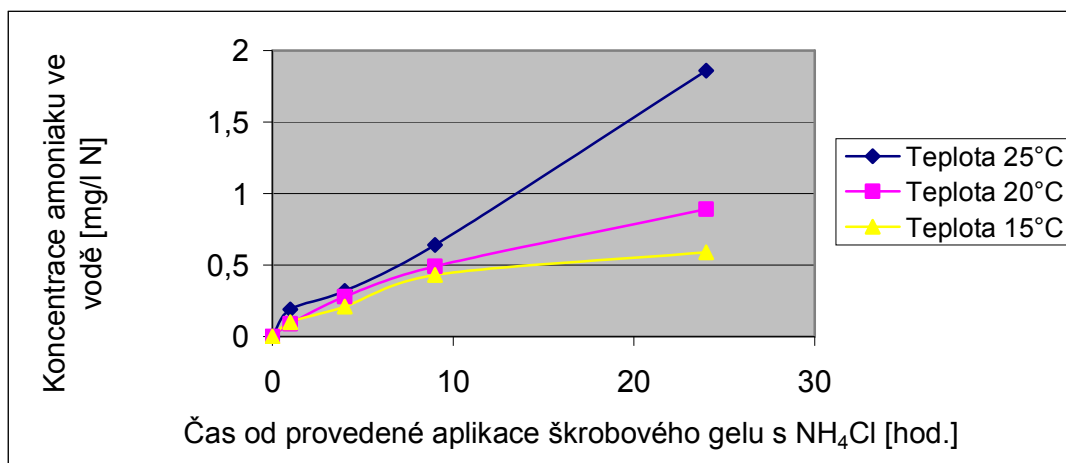


**Graf č.4:** Regresní analýza:

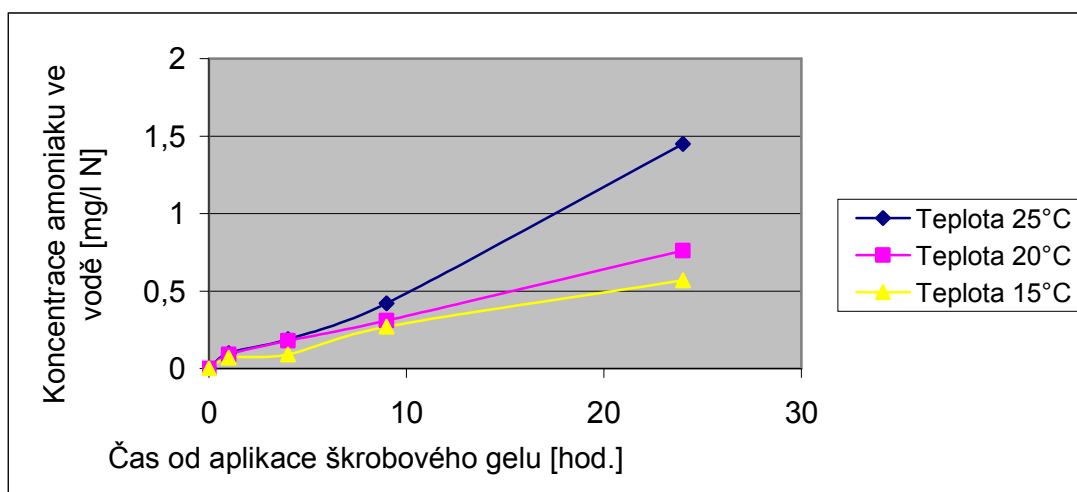
Z grafu č.4 je patrné, že při nižší teplotě má produkce amoniaku pozvolnější nárůst. Tato skutečnost svědčí o omezené schopnosti ryb vylučovat amoniak z krve při nižších teplotách. Vzhledem k relativně velkému rozptylu naměřených hodnot, se nepodařil prokázat signifikantní rozdíl u trendů, které byly zjištěny u obou teplot nádrží.

### 3.2.3 Vylučování amoniaku rybami, kterým byl do zažívacího traktu aplikován škrobový gel s obsahem NH<sub>4</sub>Cl a biochemické analýzy krevní plazmy ryb

Amoniak vylučovaný rybami byl analyzován ve vodě, kde byly ryby umístěny. Koncentrace amoniaku zjištěné ve vodě jsou uvedeny v grafech č.5 a 6.

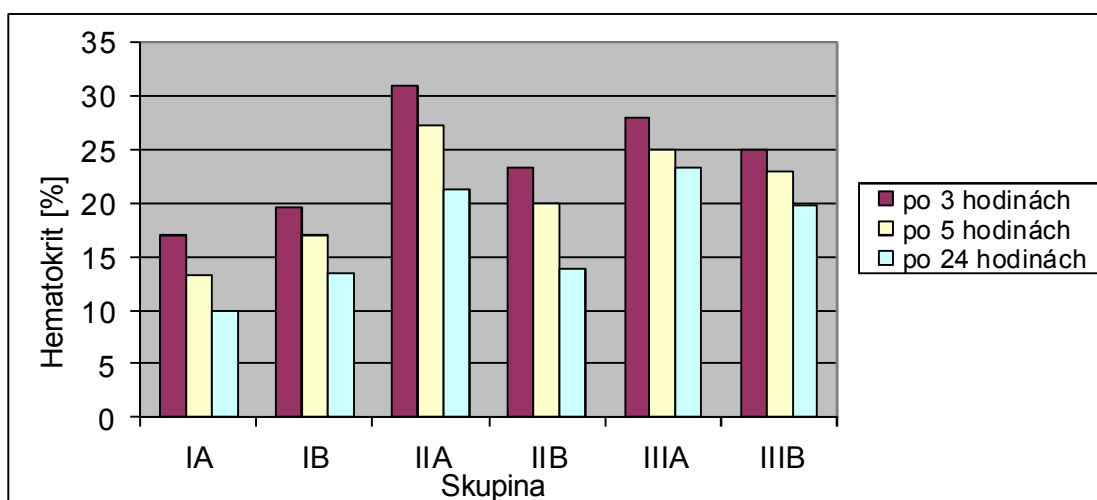


**Graf. č.5.** Koncentrace amoniaku ve vodě v pokusných nádržích s kaprem obecným při různých teplotách vody



**Graf. č.6.** Koncentrace amoniaku ve vodě v kontrolních nádržích s kaprem obecným při různých teplotách vody

Výsledky analýz krve (hematokritové hodnoty) odebrané po 3, 5 a 24 hodinách trvání pokusu jsou uvedeny v grafu č.7. Jak je patrné z uvedeného grafu, hematokritové hodnoty u všech skupin ryb postupně klesaly, což je zřejmě výsledkem odběrů krve, které byly v průběhu testu prováděny.



**Graf. č.7.** Hematokrit při vylučování amoniaku kapra obecného s aplikovaným škrobovým gelem s přidávkou amoniaku (označení I resp. II, resp. III odpovídá teplotám vody 25, resp., 20 resp. 15 °C; ozn. A, resp. B označuje kontrolní, resp. pokusné ryby)

Biochemické parametry zjištěné v krevní plasmě před aplikací škrobového gelu a dále po 3, 5 a 24 hodinách od aplikace škrobového gelu jsou uvedeny v tab. č.7, 8, 9 a 10.

**Tab. č.7.** Biochemické parametry v krevní plasmě u kapra obecného před aplikací škrobového gelu

Ukazatel	Amoniak ( $\mu\text{mol/l}$ )	Močovina ( $\text{mmol/l}$ )	Kyselina močová ( $\mu\text{mol/l}$ )	Glukóza ( $\text{mmol/l}$ )
<b>Před aplikací</b>	506	1,15	1,3	3,75

**Tab. č.8.** Biochemické parametry v krevní plasmě u kapra obecného 3 hodiny po provedené aplikaci škrobového gelu (označení I resp. II, resp. III odpovídá teplotám vody 25, resp., 20 resp. 15 °C; ozn. A, resp. B označuje kontrolní, resp. pokusné ryby)

Ukazatel	Amoniak ( $\mu\text{mol/l}$ )	Močovina ( $\text{mmol/l}$ )	Kyselina močová ( $\mu\text{mol/l}$ )	Glukóza ( $\text{mmol/l}$ )
<b>Skupina I A</b>	532	1,4	1,215	3,95
<b>Skupina I B</b>	532,5	1,15	1,39	3,9
<b>Skupina II A</b>	571,5	1,35	1,26	3,85
<b>Skupina II B</b>	466	1,25	1,47	4,045
<b>Skupina III A</b>	567,5	1,5	1,195	3,75
<b>Skupina III B</b>	540,5	1,6	1,29	4,325

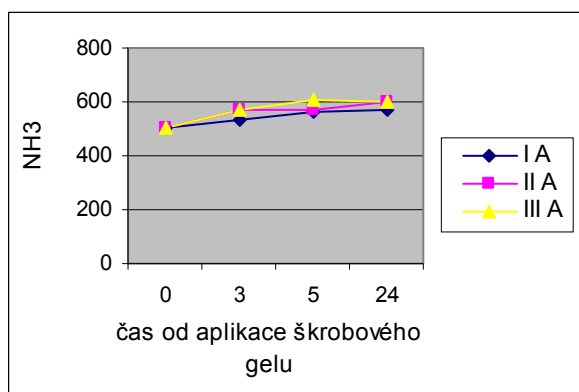
**Tab. č.9.** Biochemické parametry v krevní plasmě u kapra obecného 5 hodin po provedené aplikaci škrobového gelu (označení I resp. II, resp. III odpovídá teplotám vody 25, resp., 20 resp. 15 °C; ozn. A, resp. B označuje kontrolní, resp. pokusné ryby)

Ukazatel	Amoniak ( $\mu\text{mol/l}$ )	Močovina ( $\text{mmol/l}$ )	Kyselina močová ( $\mu\text{mol/l}$ )	Glukóza ( $\text{mmol/l}$ )
Skupina I A	561,5	1,4	1,275	4,055
Skupina I B	535,5	1,45	1,34	4,015
Skupina II A	570,5	1,15	1,24	3,875
Skupina II B	513,5	1,3	1,4	7,03
Skupina III A	610,5	1,25	1,4	4,24
Skupina III B	530	1,1	1,41	7,015

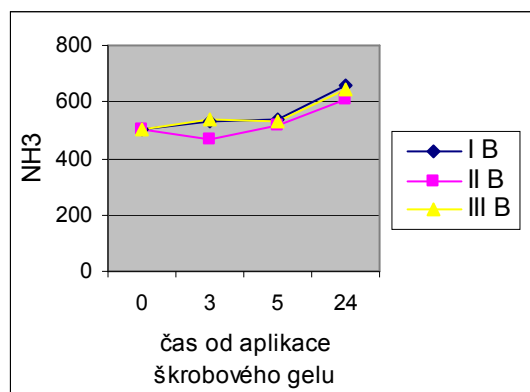
**Tab. č.10.** Biochemické parametry v krevní plasmě u kapra obecného 24 hodin po provedené aplikaci škrobového gelu (označení I resp. II, resp. III odpovídá teplotám vody 25, resp., 20 resp. 15 °C; ozn. A, resp. B označuje kontrolní, resp. pokusné ryby)

Ukazatel	Amoniak [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Močovina [ $\text{mmol/l}$ ]	Kyselina močová [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Glukóza [ $\text{mmol/l}$ ]
Skupina I A	622	1,05	1,57	7,14
Skupina I B	656	1,15	1,70	7,35
Skupina II A	601	1,25	1,71	7,15
Skupina II B	611	1,60	1,72	7,07
Skupina III A	597	1,55	1,66	7,15
Skupina III B	643	1,25	1,78	7,16

Koncentrace amoniaku, kyseliny močové a močoviny v krvi ryb zjištěné 3, 5 a 24 hodin po provedené aplikaci škrobového gelu se v závislosti na teplotě vody příliš nelišily a nevykazovaly ani žádný významný trend. Koncentrace amoniaku v krevní plasmě jsou znázorněny v grafech č.9 a 10.



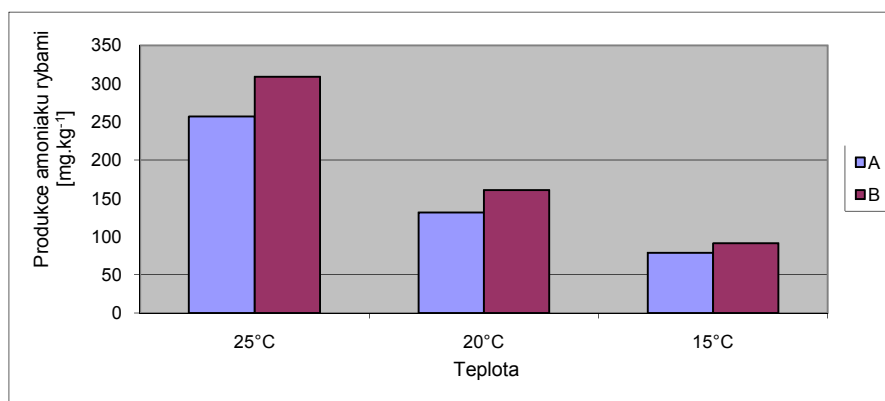
**Graf č.9:** Koncentrace amoniaku v krevní plasmě kapra obecného po 3, 5 a 24 hod. od aplikace škrobového gelu v **kontrolních nádržích**



**Graf č.10:** Koncentrace amoniaku v krevní plasmě kapra obecného po 3, 5 a 24 hod. od aplikace škrobového gelu v **pokusných nádržích**

Produkce amoniaku rybami s aplikovaným škrobovým gelem s přidavkem  $\text{NH}_4\text{Cl}$  byla při všech sledovaných teplotách (15, 20 a 25 °C) v průměru o 19 % vyšší ve srovnání s produkcí amoniaku rybami, kterým byl aplikován čistý škrobový gel.

Výraznější rozdíly však byly zaznamenány ve výši produkce amoniaku rybami při rozdílných teplotách vody. U ryb, kterým byl aplikován škrobový gel s přidavkem chloridu amonného, byla produkce amoniaku 3,6 násobně vyšší při teplotě vody 25 °C a u ryb držných při teplotě vody 20 °C 1,8 násobně vyšší než u ryb držných při teplotě 15 °C. Mírně nižší rozdíly v produkci amoniaku byly zanedbány u ryb, kterým byl aplikován čistý škrobový gel, kde se jednalo o 3,25 a 1,7 násobný nárůst oproti teplotě 15°C. Produkce amoniaku rybami jsou uvedeny v grafu č.11.



**Graf č. 11.** Produkce amoniaku rybami s aplikovaným škrobovým gelem bez přidavku a s přidavkem  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (A – aplikován škrobový gel bez přidavku  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , B aplikován škrobový gel s přidavkem  $\text{NH}_4\text{Cl}$ )

### 3.3 Diskuze

V testu akutní toxicity na *Poecilia reticulata* nedošlo k úhynu žádného z testovacích organismů. Nejvyšší koncentrace volného amoniaku se pohybovala v rozmezí 0,24 do 1,93 mg.l<sup>-1</sup> N-NH<sub>3</sub>. Což odpovídá koncentracím 0,29 – 2,34 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>. To jsou hodnoty vyšší, než odpovídá hodnotám LC<sub>50</sub> pro kaprovité ryby (1 – 1,5 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>). Pro lososovité je hodnota LC<sub>50</sub> a to v rozmezí 0,5-0,8 mg.l<sup>-1</sup>, jak uvádí ve své práci **Svobodová a kol. (1987)**. Výrazně vyšší citlivost uvádí **Alabaster a Lloyd (1980)** pro plůdek pstruha duhového těsně před vstřebáním žloutkového vaku (1dLC<sub>50</sub> = 0,07 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>), což odpovídá obecně vyšší citlivosti tohoto druhu ryb vůči amoniaku i jiným toxickým látkám. Na druhé straně uvedený autor poukazuje na poměrně vysokou toleranci jiker pstruha duhového, kdy jednodenní LC<sub>50</sub> je vyšší než 3,58 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>, ovšem, jikry obvykle vykazují vyšší toleranci vůči nepříznivým podmínkám vnějšího prostředí než plůdek a dospělí jedinci stejného druhu ryb. Proto tuto hodnotu neporovnávám s hodnotou zjištěnou ve svém pokusu.

Pokus, při kterém byla sledována produkce amoniaku kaprem obecným, probíhal při teplotách 17 a 25 °C a ryby měly prázdný zažívací trakt. Produkce amoniaku se při teplotě 25 °C pohybovala okolo 80 mg na 1 kg hmotnosti ryb za den. Při teplotě 17°C 60 mg amoniakálního dusíku za den 1 kg hmotnosti ryby. Naměřené hodnoty velmi dobře korespondují s hodnotami uvedenými **Stejskalem a kol. (2009)**. Uvedený autor sledoval produkci amoniaku okounem říčním chovaným v recirkulačních systémech v závislosti na intenzitě krmení a velikosti ryb. Tento autor uvádí průměrnou produkci amoniakálního dusíku ve výši 120-360 mg za den na 1 kg hmotnosti ryb pro ryby, které byly do zahájení pokusu krmeny, a 50 mg amoniakálního dusíku za den na 1 kg hmotnosti ryb pro ryby, které nebyly dva dny při zahájení krmeny, Uvedený pokus probíhal při průměrné teplotě 23,3 °C.

. Naměřené hodnoty velmi dobře korespondují s hodnotami uvedenými **Stejskalem a kol. (2009)**. Podobně, **Máchová a kol. (2010)** uvádí pro kapry obecné, kterým nebyla po dobu 24 hodin předkládána potrava, produkci amoniaku v rozmezí 70 – 90 mg amoniakálního dusíku na 1 kg hmotnosti ryb za den při 20 °C. To jsou hodnoty, které opět velmi dobře korespondují s mými výsledky.

U pokusu, kdy byl kontrolní skupině ryb aplikován škrobový gel a pokusné skupině škrobový gel s přísadkou NH<sub>4</sub>Cl, byly ryby vystaveny třem rozdílným

teplotám (15, 20 a 25°C). Námi zjištěná produkce amoniakálního dusíku se pohybovala od 79 mg do 257 mg na 1 kg hmotnosti ryb za den u ryb s čistým škrobovým gelem a u ryb s přídatkem NH<sub>4</sub>Cl se produkce pohybovala od 91 mg až do 308 mg na 1 kg hmotnosti ryb za den. Lze tedy konstatovat, že aplikace škrobového gelu s přídatkem i bez přídatku NH<sub>4</sub>Cl se projevila zvýšenou produkcí amoniaku, zvláště při vyšších teplotách vody (25°C).

Srovnatelné hodnoty produkce amoniaku uvádí **Rychlý** a kol. (1977) u pstruha duhového, a to 180 mg amoniakálního dusíku za den na 1 kg hmotnosti ryb, kterým nebyla po dobu 12 dnů před zahájením pokusu předkládána potrava. A výrazně vyšší hodnoty - dokonce 900 mg u ryb, které byly do zahájení pokusu krmeny granulami s obsahem 43 % surových bílkovin.



## 4 Závěr

### 1) Test akutní toxicity na *Poecilia reticulata*

Testem akutní toxicity na *Poecilia reticulata* byla prokázána vysoká rezistence tohoto druhu ryb vůči amoniaku. To **vylučuje její použití jako testovacího organismu při biologických zkouškách toxicity** prováděných při havarijních úhynech ryb s podezřením na kontaminaci amoniakem.

### 2) Produkce amoniaku rybami při různých teplotách vody

**Produkce amoniaku kaprem obecným závisí na teplotě vody – se vzrůstající teplotou roste.** Při teplotě 25 °C ryby vyloučily do vody o téměř 50 % amoniaku vyjádřeného jako produkce za 24 hodin na 1 kg hmotnosti ryb ve srovnání s produkcí ve vodě o teplotě 17 °C. Rozdíl však nebyl statisticky významný.

Průměrné koncentrace amoniaku zjištěné v krevní plasmě ryb, které byly vystaveny teplotám 15, 20 a 25°C byly srovnatelné a pohybovaly se v rozmezí (461,25  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) a svědčí o tom, že ryby, které mají prázdný zažívací trakt, jsou schopny amoniak vylučovat tak, aby se jeho hladina v krvi udržovala na nízké úrovni. Vliv teploty vody nebyl prokázán ani na ostatní sledované biochemické parametry (kyselina močová, močovina a glukóza).

**Produkce amoniaku rybami s aplikovaným škrobovým gelem s přídavkem  $\text{NH}_4\text{Cl}$**  byla při všech sledovaných teplotách (15, 20 a 25 °C) v průměru o 19 % vyšší ve srovnání s produkcí amoniaku rybami, kterým byl aplikován čistý škrobový gel. Výrazné rozdíly byly zaznamenány ve výši produkce amoniaku rybami při různých teplotách., a to jak u pokusné, tak u kontrolní skupiny ryb.

## 5 Literatura

- Alabaster, J. S., Lloyd, R., 1980. Water quality criteria for fresh-water fish. Butterworths, London, 297 pp.
- Máchová, J., Peňáz, M., Kouřil, J., Hamáčková, J., Macháček, J., Groch, L., 1983. Vliv různých hodnot pH a zvýšené koncentrace amoniaku na růst a ontogenetický vývoj plůdku kapra. Buletin VÚRH Vodňany, 3, 3 – 14.
- Máchová, J., Valentová, O., Faina, R., Svobodová, Z., Kroupová, H., Mráz, J., 2010. Znečištění produkové kaprem obecným z různých podmínek odchovu. Bulletin VÚRH Vodňany, 1, 31-38-.
- Pitter, P., 1999. Hydrochemie. VŠCHT Praha, 567 pp.
- Říhová Ambrožová, J., 2007. Biologické testy toxicity. From Encyklopedie hydrobiologie : výkladový slovník [online]. VŠCHT Praha, [cit. 2009-12-03]. Available from www: <[http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-006/ebook.html?p=A008](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=A008)>
- Smutná, M., Svobodová, Z., Vorlová, L., 2001. Vznik a pohyb amoniaku ve vnitřním prostředí ryb. In: Kolářová, J. a kol. (red.). Sborník referátů z konference Ochrana zdraví ryb. VÚRH JU Vodňany, 97-105.
- Svobodová, Z., Pravda D., Paláčková J., 1991. Unified methods of haematological examination of fish. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Vodňany, Methods No. 20, 31 pp.
- Svobodová, Z., 1987. Toxikologie vodních živočichů. SZN Praha, 231 pp.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Kroupová, H., Smutná, M., Groch, L., 2007. Ammonia autointoxication of common carp: case studies. Aquaculture International, 15, 277-286.
- Svobodová, Z., 2008. Otravy ryb. Praha : Profi Press, s. r. o., p. 205-207.
- Vámos, R., Szölogy, G., 1974. Oxigén bösebben nincs ammóniaveszély. Halászat, 20, č 4, p. 124.
- Rychly, J., Marina, B. A., 1977. The ammonia excretion of trout during a 24-hour period. Aquaculture, 11, 173-178
- Stejskal, V., Kouřil, J., Valentová, O., Hamáčková, J., Policar, T., 2009. Size-related oxygen consumption and ammonia excretion of Eurasian perch (*Perca*

*fluviatilis* L.) reared in a recirculating systém. Aquaculture Research, 41, 135-142.

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 pp.

## Seznam tabulek

- Tab. č1.** Procentické zastoupení volného amoniaku v závislosti na pH a teplotě vody
- Tab. č2.** Koncentrace chloridu amonného použité v testu akutní toxicity a odpovídající koncentrace celkového a toxického amoniaku
- Tab. č3.** Rozdělení kapra obecného do pokusných a kontrolních nádrží
- Tab. č4.** Rozdělení *Poecilia reticulata* do pokusných nádrží s koncentracemi volného amoniaku
- Tab. č5.** Hematokrit kapra obecného při různých teplotách (průměrné hodnoty ze dvou paralelních stanovení)
- Tab. č6.** Biochemické parametry v krevní plasmě u kapra obecného s prázdným zažívacím traktem drženého 48 hodin při rozdílných teplotách vody
- Tab. č7.** Biochemické parametry v krevní plasmě u kapra obecného před aplikací škrobového gelu
- Tab. č8.** Biochemické parametry v krevní plasmě u kapra obecného 3 hodiny po provedené aplikaci škrobového gelu (označení I resp. II, resp. III odpovídá teplotám vody 25, resp. 20, resp. 15°C; ozn. A, resp. B označuje kontrolní, resp. pokusné ryby)
- Tab. č9.** Biochemické parametry v krevní plasmě u kapra obecného 5 hodin po provedené aplikaci škrobového gelu (označení I resp. II, resp. III odpovídá teplotám vody 25, resp. 20, resp. 15°C; ozn. A, resp. B označuje kontrolní, resp. pokusné ryby)
- Tab. č10.** Biochemické parametry v krevní plasmě u kapra obecného 24 hodin po provedené aplikaci škrobového gelu (označení I resp. II, resp. III odpovídá teplotám vody 25, resp. 20, resp. 15°C; ozn. A, resp. B označuje kontrolní, resp. pokusné ryby)
- Tab. č.11.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 20 °C – nádrž č. 1 – nominální koncentrace 2 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl
- Tab. č.12.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 20 °C – nádrž č. 2 – nominální koncentrace 5 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl

- Tab. č.13.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 20 °C – nádrž č. 3 – nominální koncentrace 10 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl
- Tab. č.14.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 20 °C – nádrž č. 4 – nominální koncentrace 20 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl
- Tab. č.15.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 20 °C – nádrž č. 5 – nominální koncentrace 30 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl
- Tab. č.16.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 25 °C – nádrž č. 1 – nominální koncentrace 2 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl
- Tab. č.17.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 25 °C – nádrž č. 2 – nominální koncentrace 5 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl
- Tab. č.18.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 25 °C – nádrž č. 3 – nominální koncentrace 10 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl
- Tab. č.19.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 25 °C – nádrž č. 4 – nominální koncentrace 20 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl
- Tab. č.20.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 25 °C – nádrž č. 5 – nominální koncentrace 30 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl

## Seznam obrázků a grafů

- Graf č.1.** Koncentrace amoniaku ve vodě - amoniak byl produkován rybami s prázdným zaživacím traktem při rozdílných teplotách vody
- Graf č.2.** Hematokrit v krvi kapra obecného drženého při rozdílných teplotách vody na konci pokusu sledování produkce amoniaku rybami s prázdným zaživacím traktem
- Graf č.3.** Průměrná produkce amoniaku kaprem obecným v mg za 24 hodin na 1 kg hmotnosti ryb
- Graf č.4.** Regresní analýza
- Graf č.5.** Koncentrace amoniaku ve vodě v *pokusných* nádržích s kaprem obecným při různých teplotách vody
- Graf.č.6.** Koncentrace amoniaku ve vodě v *kontrolních* nádržích s kaprem obecným při různých teplotách vody
- Graf.č.7.** Hematokrit při vylučování amoniaku kapra obecného s aplikovaným škrobovým gelem s přidavkem amoniaku (označení I resp. II, resp. III odpovídá teplotám vody 15, resp. 20, resp. 25°C; ozn. A, resp. B označuje kontrolní, resp. pokusné ryby)
- Graf.č. 9.** Koncentrace amoniaku v krevní plasmě kapra obecného po 3, 5 a 24 hod. od aplikace škrobového gelu v kontrolních nádržích
- Graf.č.10.** Koncentrace amoniaku v krevní plasmě kapra obecného po 3, 5 a 24 hod. od aplikace škrobového gelu v pokusných nádržích
- Graf.č. 11.** Produkce amoniaku rybami s aplikovaným škrobovým gelem s přidavkem a bez přidavku  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- Obr. č.1.** Pokusné nádrže s *Poecilia reticulata*
- Obr. č.2.** *Poecilia reticulata* v jedné z testovacích nádrží
- Obr. č.3.** Akvarijní místnost s nádržemi s kaprem obecným

## 6 Přílohy

**Tab. č. 11.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 20 °C – nádrž č. 1 – nominální koncentrace 2 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl

Hodina odběru	pH	T (°C)	Nasycení vody kyslíkem (%)	Koncentrace celkového amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	Koncentrace volného amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>3</sub> )
8,00 (počátek testu)	9,2	20	75	0,65	0,24
10,00	8,9	20	84	0,62	0,17
10,10	9,3				
12,00	8,8	20	82	0,63	0,12
12,10	9,2				
14,00	8,5	20	79	0,58	0,05
14,10	9,1				
17,00	8,7	20	86	0,64	0,08
17,10	9,4				
20,00	8,4	20	74	0,59	0,04
20,10	9,1				
24,00	8,6	20	80	0,58	0,08
24,10	9,1				
5,00	8,2	20	73	0,55	0,03
5,10	9,2				
8,00	8,7	20	87	0,64	0,08
8,10	9,3				
10,00	8,4	20	79	0,62	0,05
10,10	9,2				
12,00	8,8	20	74	0,59	0,11
12,10	9,4				
14,00	8,6	20	72	0,64	0,08
14,10	9,5				
17,00	8,9	20	81	0,58	0,11
17,10	9,4				
20,00	8,3	20	78	0,62	0,04
20,10	9,1				
24,00	8,4	20	69	0,61	0,05
24,10	9,3				
5,00	8,1	20	73	0,57	0,02
5,10	9,2				
8,00	8,7	20	74	0,56	0,11

**Tab. č. 12.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 20 °C – nádrž č. 2 – nominální koncentrace 5 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl

Hodina odběru	pH	T (°C)	Nasycení vody kyslíkem (%)	Koncentrace celkového amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	Koncentrace volného amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>3</sub> )
8,00 (počátek testu)	9,1	20	72	1,68	0,45
10,00	8,5	20	83	1,64	0,21
10,10	9,2				
12,00	8,6	20	85	1,62	0,21
12,10	9,4				
14,00	8,6	20	80	1,7	0,22
14,10	9,2				
17,00	8,8	20	88	1,67	0,32
17,10	9,3				
20,00	8,5	20	79	1,65	0,22
20,10	9,2				
24,00	8,4	20	81	1,68	0,13
24,10	9,3				
5,00	8,4	20	72	1,65	0,13
5,10	9,6				
8,00	8,5	20	88	1,69	0,22
8,10	9,2				
10,00	8,5	20	78	1,7	0,22
10,10	9,2				
12,00	8,9	20	76	1,62	0,31
12,10	9,3				
14,00	8,3	20	75	1,64	0,08
14,10	9,4				
17,00	8,7	20	83	1,63	0,17
17,10	9,2				
20,00	8,2	20	79	1,68	0,08
20,10	9,1				
24,00	8,8	20	67	1,69	0,32
24,10	9,4				
5,00	8,1	20	72	1,65	0,08
5,10	9,1				
8,00	8,8	20	75	1,63	0,31



**Tab. č. 13.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 20 °C – nádrž č. 3 – nominální koncentrace 10 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl

Hodina odběru	pH	T (°C)	Nasycení vody kyslíkem (%)	Koncentrace celkového amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	Koncentrace volného amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>3</sub> )
8,00 (počátek testu)	9,0	20	74	3,35	0,90
10,00	8,8	20	82	3,32	0,63
10,10	9,1				
12,00	8,7	20	85	3,33	0,63
12,10	9,5				
14,00	8,3	20	85	3,31	0,27
14,10	9,6				
17,00	8,9	20	84	3,28	0,62
17,10	9,1				
20,00	8,4	20	78	3,26	0,26
20,10	9,2				
24,00	8,5	20	82	3,31	0,27
24,10	9,1				
5,00	8,6	20	75	3,38	0,44
5,10	9,1				
8,00	8,5	20	89	3,28	0,42
8,10	9,3				
10,00	8,4	20	76	3,25	0,26
10,10	9,1				
12,00	8,4	20	74	3,34	0,27
12,10	9,2				
14,00	8,6	20	75	3,29	0,43
14,10	9,3				
17,00	8,8	20	82	3,30	0,63
17,10	9,4				
20,00	8,3	20	78	3,35	0,27
20,10	9,1				
24,00	8,7	20	66	3,36	0,64
24,10	9,4				
5,00	8,6	20	71	3,34	0,43
5,10	9,1				
8,00	8,5	20	76	3,34	0,27

**Tab. č. 14.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 20 °C – nádrž č. 4 – nominální koncentrace 20 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl

Hodina odběru	pH	T (°C)	Nasycení vody kyslíkem (%)	Koncentrace celkového amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	Koncentrace volného amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>3</sub> )
8,00 (počátek testu)	9,1	20	71	6,75	1,82
10,00	8,9	20	83	6,78	1,83
10,10	9,2				
12,00	8,6	20	88	6,58	0,86
12,10	9,4				
14,00	8,4	20	84	6,62	0,53
14,10	9,5				
17,00	8,8	20	88	6,64	1,26
17,10	9,2				
20,00	8,6	20	79	6,60	0,86
20,10	9,1				
24,00	8,6	20	80	6,71	0,87
24,10	9,2				
5,00	8,8	20	71	6,59	1,25
5,10	9,2				
8,00	8,7	20	83	6,66	1,27
8,10	9,4				
10,00	8,6	20	78	6,67	0,87
10,10	9,2				
12,00	8,5	20	76	6,62	0,53
12,10	9,1				
14,00	8,7	20	77	6,61	0,86
14,10	9,2				
17,00	8,7	20	80	6,73	0,88
17,10	9,3				
20,00	8,2	20	74	6,74	0,34
20,10	9,3				
24,00	8,8	20	65	6,77	1,29
24,10	9,5				
5,00	8,3	20	76	6,68	0,33
5,10	9,2				
8,00	8,5	20	73	6,70	0,87

**Tab. č. 15.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 20 °C – nádrž č. 5 – nominální koncentrace 30 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl

Hodina odběru	pH	T (°C)	Nasycení vody kyslíkem (%)	Koncentrace celkového amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	Koncentrace volného amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>3</sub> )
8,00 (počátek testu)	9,0	20	74	10,14	2,74
10,00	8,8	20	82	10,18	1,93
10,10	9,3				
12,00	8,8	20	87	10,12	1,92
12,10	9,2				
14,00	8,6	20	83	10,09	1,31
14,10	9,3				
17,00	8,5	20	78	10,11	1,31
17,10	9,3				
20,00	8,7	20	86	10,15	1,93
20,10	9,2				
24,00	8,7	20	78	10,16	1,32
24,10	9,1				
5,00	8,9	20	82	10,17	2,75
5,10	9,1				
8,00	8,6	20	78	10,08	1,31
8,10	9,3				
10,00	8,7	20	74	10,12	1,32
10,10	9,3				
12,00	8,4	20	72	10,07	0,81
12,10	9,2				
14,00	8,9	20	74	10,08	1,92
14,10	9,4				
17,00	8,4	20	81	10,14	0,81
17,10	9,4				
20,00	8,3	20	76	10,12	0,81
20,10	9,2				
24,00	8,9	20	62	10,11	1,92
24,10	9,4				
5,00	8,2	20	75	10,09	0,50
5,10	9,3				
8,00	8,8	20	72	10,18	1,93

**Tab. č. 16.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 25 °C – nádrž č. 1 – nominální koncentrace 2 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl

Hodina odběru	pH	T (°C)	Nasycení vody kyslíkem (%)	Koncentrace celkového amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	Koncentrace volného amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>3</sub> )
8,00 (počátek testu)	9,1	25	85	0,64	0,17
10,00	8,9	25	84	0,61	0,12
10,10	9,2				
12,00	8,7	25	85	0,62	0,12
12,10	9,1				
14,00	8,7	25	86	0,57	0,07
14,10	9,2				
17,00	8,6	25	78	0,65	0,08
17,10	9,2				
20,00	8,8	25	89	0,58	0,11
20,10	9,1				
24,00	8,6	25	78	0,54	0,07
24,10	9,2				
5,00	8,6	25	87	0,56	0,07
5,10	9,2				
8,00	8,7	25	75	0,68	0,13
8,10	9,5				
10,00	8,8	25	76	0,63	0,12
10,10	9,2				
12,00	8,5	25	73	0,59	0,08
12,10	9,1				
14,00	8,2	25	77	0,63	0,03
14,10	9,3				
17,00	8,5	25	82	0,57	0,07
17,10	9,3				
20,00	8,5	25	78	0,61	0,08
20,10	9,1				
24,00	8,8	25	75	0,62	0,12
24,10	9,3				
5,00	8,2	25	69	0,56	0,03
5,10	9,3				
8,00	8,9	25	83	0,59	0,12

**Tab. č. 17.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 25 °C – nádrž č. 2 – nominální koncentrace 5 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl

Hodina odběru	pH	T (°C)	Nasycení vody kyslíkem (%)	Koncentrace celkového amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	Koncentrace volného amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>3</sub> )
8,00 (počátek testu)	9,0	25	78	1,68	0,45
10,00	8,8	25	82	1,64	0,31
10,10	9,1				
12,00	8,6	25	86	1,62	0,21
12,10	9,2				
14,00	8,5	25	87	1,7	0,22
14,10	9,1				
17,00	8,7	25	85	1,67	0,32
17,10	9,3				
20,00	8,9	25	82	1,65	0,31
20,10	9,2				
24,00	8,7	25	69	1,68	0,32
24,10	9,3				
5,00	8,7	25	75	1,65	0,31
5,10	9,3				
8,00	8,6	25	76	1,69	0,22
8,10	9,4				
10,00	8,7	25	77	1,7	0,32
10,10	9,1				
12,00	8,6	25	77	1,62	0,21
12,10	9,2				
14,00	8,3	25	78	1,64	0,13
14,10	9,4				
17,00	8,6	25	86	1,63	0,21
17,10	9,2				
20,00	8,6	25	79	1,68	0,22
20,10	9,2				
24,00	8,9	25	89	1,69	0,46
24,10	9,2				
5,00	8,2	25	72	1,65	0,08
5,10	9,2				
8,00	8,7	25	71	1,63	0,31

**Tab. č. 18.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 25 °C – nádrž č. 3 – nominální koncentrace 10 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl

Hodina odběru	pH	T (°C)	Nasycení vody kyslíkem (%)	Koncentrace celkového amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	Koncentrace volného amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>3</sub> )
8,00 (počátek testu)	9,1	25	74	3,33	0,90
10,00	8,9	25	79	3,30	0,63
10,10	9,2				
12,00	8,7	25	78	3,34	0,43
12,10	9,1				
14,00	8,4	25	85	3,32	0,27
14,10	9,2				
17,00	8,6	25	82	3,29	0,43
17,10	9,2				
20,00	8,8	25	84	3,27	0,62
20,10	9,1				
24,00	8,6	25	68	3,32	0,43
24,10	9,2				
5,00	8,8	25	74	3,38	0,64
5,10	9,2				
8,00	8,7	25	77	3,27	0,62
8,10	9,3				
10,00	8,6	25	76	3,24	0,42
10,10	9,2				
12,00	8,7	25	87	3,36	0,44
12,10	9,1				
14,00	8,4	25	88	3,28	0,26
14,10	9,2				
17,00	8,7	25	85	3,31	0,63
17,10	9,1				
20,00	8,5	25	70	3,36	0,44
20,10	9,1				
24,00	8,8	25	82	3,37	0,64
24,10	9,1				
5,00	8,3	25	79	3,38	0,27
5,10	9,1				
8,00	8,9	25	75	3,39	0,64

**Tab. č. 19.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 25 °C – nádrž č. 4 – nominální koncentrace 20 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl

Hodina odběru	pH	T (°C)	Nasycení vody kyslíkem (%)	Koncentrace celkového amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	Koncentrace volného amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>3</sub> )
8,00 (počátek testu)	9,0	25	82	6,73	1,82
10,00	8,8	25	75	6,75	1,28
10,10	9,1				
12,00	8,5	25	85	6,59	0,86
12,10	9,2				
14,00	8,5	25	69	6,61	0,86
14,10	9,1				
17,00	8,8	25	78	6,59	1,25
17,10	9,1				
20,00	8,7	25	82	6,62	1,26
20,10	9,2				
24,00	8,8	25	83	6,70	1,27
24,10	9,1				
5,00	8,7	25	78	6,60	1,25
5,10	9,3				
8,00	8,4	25	79	6,67	0,53
8,10	9,2				
10,00	8,4	25	70	6,68	0,53
10,10	9,1				
12,00	8,5	25	85	6,61	0,86
12,10	9,2				
14,00	8,3	25	86	6,60	0,53
14,10	9,3				
17,00	8,4	25	88	6,72	0,54
17,10	9,0				
20,00	8,5	25	90	6,70	0,87
20,10	9,2				
24,00	8,4	25	89	6,70	0,54
24,10	9,5				
5,00	8,4	25	87	6,69	0,54
5,10	9,3				
8,00	8,4	25	84	6,71	0,54

**Tab. č. 20.** Výsledky měření vybraných parametrů kvality vody v průběhu testu na *Poecilia reticulata* při teplotě 25 °C – nádrž č. 5 – nominální koncentrace 30 mg.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl

Hodina odběru	pH	T (°C)	Nasycení vody kyslíkem (%)	Koncentrace celkového amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	Koncentrace volného amoniaku (mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>3</sub> )
8,00 (počátek testu)	9,1	25	78	10,15	3,76
10,00	8,9	25	76	10,17	1,93
10,10	9,2				
12,00	8,7	25	88	10,18	1,93
12,10	9,3				
14,00	8,4	25	66	10,08	0,81
14,10	9,3				
17,00	8,7	25	73	10,16	1,93
17,10	9,4				
20,00	8,4	25	80	10,08	0,81
20,10	9,3				
24,00	8,6	25	81	10,17	1,32
24,10	9,2				
5,00	8,5	25	79	10,14	1,31
5,10	9,4				
8,00	8,2	25	77	10,11	0,51
8,10	9,4				
10,00	8,4	25	75	10,14	0,81
10,10	9,4				
12,00	8,3	25	80	10,10	0,80
12,10	9,2				
14,00	8,4	25	82	10,09	0,81
14,10	9,5				
17,00	8,6	25	69	10,17	1,32
17,10	9,2				
20,00	8,6	25	78	10,14	1,32
20,10	9,4				
24,00	8,8	25	82	10,12	1,92
24,10	9,4				
5,00	8,3	25	81	10,08	0,80
5,10	9,4				
8,00	8,6	25	83	10,15	1,32





**Obr. 1.** pokusné nádrže s *Poecilia reticulata*



**Obr. 2.** *Poecilia reticulata* v jedné z testovacích nádrží



**Obr. 3.** Akvarijní místnost s nádržemi s kaprem obecným

## SOUHRN

Cílem práce bylo stanovení akutní toxicity volného amoniaku pro ryby a stanovení produkce amoniaku rybami v závislosti na teplotě vody.

Byl proveden test akutní toxicity na *Poecilia reticulata* podle ČSN EN ISO 7346-2 s cílem stanovení akutní letální koncentrace volného amoniaku pro tento druh ryby. Vzhledem k tomu, že tento druh ryby vykázal vysokou rezistenci vůči volnému amoniaku (bez známek zjevného poškození ryby přežívaly v koncentraci 2,4 mg.l<sup>-1</sup> N-NH<sub>3</sub> po dobu 48 hodin), od dalšího testování bylo upuštěno.

Dále byl proveden test na kapru obecném, který byl přechováván v laboratorních podmínkách a před započítím testu mu nebyla po dobu 4 dnů předkládána potrava. Poté byla v průběhu 48 hodin měřena produkce amoniaku s cílem porovnat jeho množství při dvou rozdílných teplotách vody (17 a 25 °C).

Následně byl těmto rybám aplikován do trávicího traktu sondou škrobový gel s přísadkou NH<sub>4</sub>Cl, kontrolním rybám byl aplikován škrobový gel bez přísadky NH<sub>4</sub>Cl. V průběhu následujících 3, 5 a 24 hodin byla sledována koncentrace amoniaku v krevní plazmě ryb a rovněž produkce amoniaku rybami zachycená ve vodě při třech rozdílných teplotách (15, 20 a 25 °C). V odebraných vzorcích krve byly stanoveny hodnoty hematokritu a vybraných biochemických parametrů (močovina, kyselina močová, glukóza).

Na základě dosažených výsledků byla konstatována vysoká rezistence *Poecilia reticulata* vůči volnému amoniaku a vyhodnocena produkce amoniaku kaprem obecným při rozdílných teplotách vody a rozdílné naplněnosti zažívacího traktu.

Klíčová slova: kapr obecný, *Poecilia reticulata*, krevní plasma, akutní toxicita, letální koncentrace.

## SUMMARY

The aim of the thesis was to determine the acute toxicity of free ammonia to fish and determination of ammonia production by fish depending on water temperature.

The toxicity tests on *Poecilia reticulata* were conducted according to ISO 7346-2 in order to determine the acute lethal concentration of free ammonia for this type of fish.

This kind of fish showed a high resistance to free ammonia (the fish survived at a concentration of  $2.4 \text{ mg.l}^{-1} \text{ N-NH}_3$  for 48 hours without obvious signs of damage) and therefore further testing was abandoned.

Next test was carried out with common carp which was preserved for 4 days without feeding in the laboratory conditions. Afterwards ammonia production was measured at two different water temperatures (17 and 25 °C) in the span of 48 hours.

In the next test these fish were injected with a starch gel with the addition of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  into the digestive tract (control fish were injected starch gel without the addition of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Over the next 3, 5 and 24 hours concentrations of ammonia in the blood plasma of fish as well as production of ammonia by fish was measured at three different temperatures (15, 20 and 25 °C). In the collected blood samples the values of hematocrit and selected biochemical parameters (urea, uric acid, glucose) were measured.

Based on the results high resistance of *Poecilia reticulata* to free ammonia was found. Also evaluated was the ammonia production of common carp at different water temperatures and different digestive tract fullness.

Key words: common carp, *Poecilia reticulata*, plasma, acute toxicity, lethal concentration