

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

Bakalářská práce

## **Akutní toxicita dusitanů pro jeseterovité ryby**

**Autor:** Vojtěch Bulíček

**Vedoucí bakalářské práce:** Ing. Jana Máchová, Ph.D.

**Konzultant bakalářské práce:** MVDr. Zuzana Richterová

**Studijní program:** Zootechnika

**Studijní obor:** Rybářství

**Forma studia:** prezenční

**Ročník:** 3

České Budějovice, 2012

### **Prohlášení**

Prohlašuji, 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 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.

Datum

V Českých Budějovicích dne 30. 4. 2012

.....

Vojtěch Bulíček

## **Poděkování**

Dovoluji si tímto poděkovat Ing. Janě Máchové, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce. Za všechny užitečné rady a čas, který mi věnovala v průběhu celého měření a zpracování mé bakalářské práce.

Dále bych rád poděkoval Iloně Prokopové za všechny čas a pomoc, který mi věnovala v průběhu celého měření mé bakalářské práce.

Dále bych rád poděkoval MVDr. Zuzaně Richterové za všechny rady a pomoc při zpracování mé bakalářské práce

Děkuji také celému kolektivu laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie VÚRH JU se sídlem ve Vodňanech za všechny čas a pomoc, který mi věnovali v průběhu celého měření mé bakalářské práce.

V neposlední řadě bych rád poděkoval svým rodičům, kteří mě podporovali celé tři roky studia.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
Fakulta rybářství a ochrany vod  
Akademický rok: 2010/2011

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

Jméno a příjmení: **Vojtěch BULÍČEK**  
Osobní číslo: **V09B061P**  
Studijní program: **B4103 Zootechnika**  
Studijní obor: **Rybářství**  
Název tématu: **Akutní toxicita dusitanů pro jeseterovité ryby**  
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 dusitanů pro 2 druhy jeseterovitých ryb.

**Metodický postup:** Budou provedeny testy akutní toxicity na 2 druzích jeseterovitých ryb, stanoveny hodnoty LC50 a bude porovnána citlivost jednotlivých druhů ryb vůči dusitanům. Metodicky bude postupováno podle ČSN EN ISO 7346-2.

Rozsah grafických prací: 10 tabulek a grafů

Rozsah pracovní zprávy: 20 - 30 stran

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod, 1996. Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby /*Brachydanio rerio* Hamilton - Buchanan (*Teleostei*, *Salmonidae*)/ část 2: Obnovovací metoda. ČNI Praha 16 s.

Kroupová, H., Máchová, J., Svobodová, Z., 2005. Nitrite influence on fish - a review. *Vet. Med. - Czech*, 50. 461 - 471.

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

Svobodová, Z., Máchová, J., Kroupová, H., 2008. Otravy ryb. In: Veterinární toxikologie v klinické praxi, Ed. Svobodová, Z., Profi Press, 201-217.

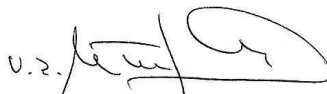
Vedoucí bakalářské práce: Ing. Jana Máchová, Ph.D.

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant bakalářské práce: MVDr. Zuzana Richterová

Datum zadání bakalářské práce: 30. listopadu 2010

Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2012

  
prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD  
Zatiší 728/II  
389 25 Vodňany (2)

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

V Českých Budějovicích dne 14. ledna 2011

# Obsah

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 ÚVOD.....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>2 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>                                       | <b>9</b>  |
| <b>2.1 JESETEROVITÉ RYBY (<i>ACIPENSERIDAE</i>).....</b>            | <b>9</b>  |
| 2.1.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA.....                                 | 9         |
| 2.1.2 JESETER MALÝ ( <i>ACIPENSER RUTHENUS</i> ).....               | 10        |
| 2.1.3 JESETER SIBIŘSKÝ ( <i>ACIPENSER BAERII</i> ).....             | 11        |
| <b>2.2 SLOUČENINY DUSÍKU A JEHO PŘEMĚNY.....</b>                    | <b>12</b> |
| 2.2.1 PŮVOD.....  | 12        |
| 2.2.2 FORMY VÝSKYTU DUSÍKU.....                                     | 13        |
| 2.2.3 NITRIFIKACE.....  | 13        |
| 2.2.4 DENITRIFIKACE.....  | 14        |
| <b>2.3 AMONIAKÁLNÍ DUSÍK.....</b>                                   | <b>15</b> |
| <b>2.4 DUSIČNANY.....</b>   | <b>16</b> |
| <b>2.5 DUSITANY.....</b>  | <b>16</b> |
| <b>2.6 VLV DUSITANŮ NA RYBY.....</b>                                | <b>18</b> |
| 2.6.1 PŘÍJEM A MECHANIZMUS ÚČINKU DUSITANŮ NA RYBY.....             | 18        |
| 2.6.2 TOXICITA DUSITANŮ PRO RYBY A FAKTORY, KTERÉ JI OVLIVŇUJÍ..... | 19        |
| <b>2.7 TESTY TOXICITY NA VODNÍCH ORGANIZMECH....</b>                | <b>21</b> |
| <b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>                                  | <b>24</b> |
| <b>3.1 MATERIÁL A METODIKA.....</b>                                 | <b>24</b> |
| 3.1.1 MATERIÁL A POMŮCKY.....                                       | 24        |
| 3.1.2 METODIKA TESTU AKUTNÍ TOXICITY NA RYBÁCH.....                 | 25        |
| <b>3.2 VÝSLEDKY.....</b>  | <b>27</b> |
| 3.2.1 PLATNOST TESTU.....   | 27        |
| 3.2.2 VÝSLEDKY TESTU NA JESETERU MALÉM.....                         | 28        |
| 3.2.3 VÝSLEDKY TESTU NA JESETERU SIBIŘSKÉM.....                     | 30        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4. DISKUZE.....</b>                    | <b>33</b> |
| <b>5. ZÁVĚR.....</b>                      | <b>35</b> |
| <b>6. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY.....</b> | <b>36</b> |
| <b>7. SEZNAM DEFINIC A ZKRATEK.....</b>   | <b>38</b> |
| <b>8. PŘÍLOHY.....</b>                    | <b>39</b> |
| <b>9. ABSTRAKT.....</b>                   | <b>52</b> |

# 1 ÚVOD

Dusitany zpravidla doprovázejí ve vodách dusičnany a amoniak. V nezatížených povrchových a podzemních vodách dusitany nikdy nedominují, neboť se vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, protože podléhají nitrifikaci. Dusitany jsou toxické především pro vodní živočichy, kteří je aktivně přijímají z okolní vody a kumulují je v tělních tekutinách. Naproti tomu suchozemští živočichové (včetně člověka), přijímají dusitany a dusičnany v potravě a v pitné vodě (přijímané dusičnany jsou v gastrointestinálním traktu redukovány na dusitany) (Kroupová a kol., 2005). Negativní účinky dusitanů na ryby jsou velmi dobře dokumentovány v literatuře (např. Lewis a Morris, 1986; Kosaka a Tyuma, 1987; Williams a Eddy, 1986; Jensen, 2003 in Kroupová a kol., 2005; Máchová a kol., 2009).

Zvýšené koncentrace dusitanů působí problémy především ve vodách s intenzivním chovem ryb a recirkulačních systémech. Právě v recirkulačních systémech může dojít k hromadění dusitanů ve vodě (Svobodová a kol., 2007).

Předložená práce je zaměřena na sledování toxických účinků dusitanů na jeseterovité ryby. Cílem práce bylo sledovat vliv dusitanů na chování a mortalitu ryb a stanovit a porovnat hodnoty LC50 pro dva druhy jeseterovitých ryb. Sledování jsem provedl formou testů akutní toxicity, a to na jeseteru malém (*Acipenser ruthenus*) a jeseteru sibiřském (*Acipenser baerii*). Testy byly provedeny ve spolupráci s Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, v laboratoři vodní toxikologie a ichthyopatologie VÚRH Vodňany.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 JESETEROVITÉ RYBY (*ACIPENSERIDAE*)

#### 2.1.1 Základní charakteristika

**Systematické zařazení** (Gela a kol., 2008):

Třída: Ryby – *Osteichthyes*

Podtřída: Paprskoploutví – *Actinopterygii*

Nadřád: Chrupavčití – *Chondrostei*

Čeleď: Jeseteroví – *Acipenseridae*

Rod: Jeseter - *Acipenser*

**Hlavní znaky** (Hanel, 1998)

- protáhlé tělo
- téměř úplně chrupavčitá kostra
- poměrně dlouhý rypec s typicky spodními ústy
- nesouměrná ocasní ploutev
- střevo se spirálovitou řasou

**Velikost**

- 70 – 730 cm

Většina jeseterů žije v moři a na tření táhne do řek. Ve sladkých vodách žije trvale jen několik druhů. Patří sem i hospodářsky cenné druhy, které poskytují kvalitní maso a pravý kaviár, který se připravuje z jejich jiker. Pro jesetery je typických pět řad kostěných štítků (1 hřbetní, 2 na bocích a 2 břišní). Mají vytvořen rozměrný plynový měchýř. Na spodní straně rypace jsou čtyři vousky. Dospělé ryby ztrácejí zuby. Některé druhy dosahují obřích, až sedmimetrových rozměrů. V této čeledi je popsáno 24 druhů (Hanel, 1998).

### 2.1.2 Jeseter malý (*Acipenser ruthenus*)

Jeseter malý je netažný sladkovodní druh jesetera (v části Kaspického moře žije i v brakické vodě) s protáhlým tělem, dolním rtem rozpolceným, s vousky na průřezu okrouhlými, krátkými, na vnitřní straně zpravidla obrvenými. Natažené vousky dosahují k přednímu okraji úst. Ocasní ploutev je nesouměrná (heterocerkní). Hřbetní štítky mají dlouhý, dozadu obrácený hrot, který přesahuje základnu dalšího sousedního štítku. Boční štítky jsou kosočtvercového tvaru a částečně se překrývají. Zbarvení je na hřbetní straně šedohnědé nebo zelenohnědé, břišní žlutavé nebo špinavě hnědé, někdy narůžovělé. Hřbetní a řitní ploutev rezavě červená, ostatní popelavě šedé. Boční a břišní štítky jsou bělavé, hřbetní žlutavé. V době tření se u pohlavně zralých ryb na hlavě objevuje bělavý povlak (Hanel, 2001). Jeseter malý dorůstá velikosti 70 až 120 cm a dosahuje hmotnosti 6 až 16 kg. Pohlavně samci dospívají ve 3 až 5 roce života, samice ve 4 až 7 roce života. Tření probíhá na jaře v proudnici řeky. Plodnost jedné samice je až 100 000 jiker (Hanel, 1998). Ryby se mohou dožívat až 25 let.

#### **Meristické znaky:**

- 11 – 18 břišních štítků
- 10 – 17 hřbetních štítků
- 56 – 71 bočních štítků
- 14 – 26 žaberních tyčinek
- 25 – 45 fulker (fulkry jsou zvláštní ganoidní šupiny pokrývající horní lalok ocasní ploutve)

Obr. 1: Jeseter malý



### 2.1.3 Jeseter sibiřský (*Acipenser baerii*)

Jeseter sibiřský má obvykle krátký, zploštělý a zaoblený rypec (někdy se však mohou objevit jedinci s ostřejším zakončením rypce). Na těle mezi kostěnými štítky nalezneme malé hvězdičkovité destičky nebo zrnkovité kožní osifikace. Vousky jsou hladké nebo slabě obrvené. Žaberní tyčinky vějířovité, každá se třemi zdvojenými výrůstky (Hanel, 2001). Zbarvení je velmi proměnlivé: od světle šedé po tmavě hnědou na hřbetě a bocích, od čistě bílé po žlutavou na břiše. Délka může přesahovat 2 metry, hmotnost 200 až 210 kilogramů.

#### **Meristické znaky (Hanel, 2001):**

- 9 – 13 břišních štítků
- 11 – 17 hřbetních štítků
- 39 – 50 bočních štítků
- 31 – 38 žaberních tyčinek
- 25 – 41 fulker

Obr. 2: Jeseter sibiřský



## 2.2 SLOUČENINY DUSÍKU A JEHO PŘEMĚNY

Dusík spolu s fosforem patří mezi nejdůležitější makrobiogenní prvky. Patří do skupiny tzv. nutrientů, které jsou nezbytné pro rozvoj mikroorganizmů (Pitter, 2009).

### 2.2.1 Původ

Sloučeniny dusíku mohou být organického nebo anorganického původu. Sloučeniny dusíku v biosféře neovlivněné antropogenní činností jsou převážně biogenního původu, vznikají rozkladem organických dusíkatých látek rostlinného a živočišného původu. Významným zdrojem dusíku antropogenního původu jsou splaškové odpadní vody, neboť člověk vylučuje za den 11 – 23 g celkového dusíku. Tato hodnota se označuje jako specifická produkce dusíku. Uváděná hodnota se liší v závislosti na vybavenosti bytu a nejčastěji se počítá se specifickou produkcí 12 g na 1 obyvatele za den. (Pitter, 2009). Dalším významným zdrojem dusíku jsou odpady ze zemědělství (hnojení dusíkatými látkami, odpady z živočišné výroby). Dusíkaté látky se vyskytují i v atmosféře (oxidy dusíku NO, N<sub>2</sub>O a NO<sub>2</sub> obecně NO<sub>x</sub> a amoniakální dusík NH<sub>3</sub>). Jejich reakcemi vznikají v atmosférických vodách dusitany a dusičnany.

## 2.2.2 Formy výskytu dusíku

Dusík se ve vodě vyskytuje v různých oxidačních stupních, v iontové i neiontové formě (Pitter, 2009)

-III amoniakální dusík ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$ ), kyanatany ( $\text{OCN}^-$ ), kyanidy ( $\text{CN}^-$ )

-I hydroxylamin ( $\text{NH}_2\text{OH}$ )

0 elementární dusík ( $\text{N}_2$ )

+I oxid dusný ( $\text{N}_2\text{O}$ )

+III dusitanový dusík ( $\text{N-NO}_2^-$ )

+V dusičnanový dusík ( $\text{N-NO}_3^-$ )

Ve vodách se stanovuje celkový dusík ( $\text{N}_{\text{celk.}}$ ), který se dále dělí na anorganicky a organicky vázaný dusík ( $\text{N}_{\text{anorg.}}$  resp.  $\text{N}_{\text{org.}}$ ).

$$\text{N}_{\text{celk.}} = \text{N}_{\text{anorg.}} + \text{N}_{\text{org.}}$$

Mezi hlavní formy anorganicky vázaného dusíku patří amoniakální, dusitanový a dusičnanový dusík. Další možnou anorganickou formou jsou volné kyanidy, kyanatany, kyanokomplexy a aminokomplexy.

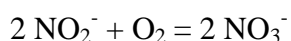
Organicky vázaný dusík se ve vodách vyskytuje ve formě bílkovin a jejich rozkladných produktů (peptidů a aminokyselin), močoviny, alifatických a aromatických aminů, aminosacharidů, heterocyklických dusíkatých sloučenin apod., včetně dusíkatých látek vznikajících rozkladem biomasy mikroorganismů. Sloučeniny dusíku jsou ve vodách málo stabilní a podléhají v závislosti na oxidačně-redukčním potenciálu a hodnotě pH zejména biochemickým přeměnám. K těmto biochemickým přeměnám patří např. nitrifikace a denitrifikace.

## 2.2.3 Nitrifikace

Nitrifikace je biochemická oxidace amoniakálního dusíku na dusitany a posléze na dusičnany probíhající v oxických podmínkách. Nitrifikace je způsobena hlavně chemolitotrofními (autotrofními) organizmy a někdy i organizmy organotrofními. Chemolitotrofní nitrifikační bakterie využívají  $\text{CO}_2$  jako zdroj uhlíku pro tvorbu nové biomasy a jako zdroj energie oxidací amoniakálního dusíku (Pitter, 2009).

Na nitrifikaci se podílí dva rody nitrifikačních bakterií a to *Nitrosomonas* a *Nitrobacter*. Tyto bakterie jsou v přírodě velmi rozšířeny, hromadí se v dnových sedimentech, v půdě a v nerozpuštěných látkách ve vodě. Nitrifikace proto probíhá ve vodách v oxických podmínkách obvykle velmi snadno. Bakterie rodu *Nitrosomonas* se podílí na prvním stupni nitrifikace, oxidaci amoniakálního dusíku na dusitaný. *Nitrosomonas* má menší růstovou rychlost než bakterie rodu *Nitrobacter*, které se podílí na druhém stupni nitrifikace, oxidaci dusitanů na dusičnany. Růstová rychlost nitrifikačních bakterií je závislá na teplotě vody. Nejrychleji probíhá nitrifikace v rozmezí od 20°C do 30°C. Při nižších teplotách vody rychlost nitrifikace značně klesá. Při teplotách pod 5°C je již rychlost nitrifikace velmi malá, ale při biologickém čištění odpadních vod dochází k inhibici nitrifikace již mnohem dříve, a to již při teplotách vody 12°C a nižších. Další významným faktorem, který ovlivňuje průběh nitrifikace, je hodnota pH. Optimální hodnota pH se pohybuje v rozmezí 7 až 8,5. Při hodnotách pH přibližně pod 6,5 a nad 9,0 dochází k inhibici nitrifikace. Významný vliv na nitrifikaci má také koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě. Úplná nitrifikace probíhá pouze při dostatečně vysoké koncentraci rozpuštěného kyslíku ve vodě. Při koncentraci pod 1 mg l<sup>-1</sup> může docházet k hromadění dusitanů ve vodě (Pitter, 2009).

Jak již bylo uvedeno, proces nitrifikace probíhá ve dvou stupních, které lze znázornit následujícími rovnicemi (Pitter, 2009):



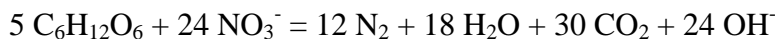
Jak je patrné z uvedených rovnic, při nitrifikaci dochází k uvolňování vodíkových iontů, které okyselují prostředí. Tím se snižuje KNK<sub>4,5</sub> a při nedostatečné tlumivé kapacitě vody může významně klesnout i hodnota pH.

## 2.2.4 Denitrifikace

V anoxických podmínkách může dojít k redukci dusičnanů a dusitanů na elementární dusík nebo oxidy dusíku. Tento proces se nazývá denitrifikace. Konečným akceptorem elektronů je dusík v oxidačním stupni III nebo V. Stejně jako nitrifikace probíhá i denitrifikace ve vodách poměrně snadno, pokud jsou dodrženy anoxické podmínky (Pitter, 2009). Na rozdíl od nitrifikace je pro denitrifikaci nutný organický

substrát jako zdroj energie. Jde obvykle o organické látky obsažené v odpadní vodě nebo kalu (Pitter, 2009).

Denitrifikaci lze schematicky popsat těmito rovnicemi (Pitter, 2009):



Na rozdíl od nitrifikace se při denitrifikaci uvolňují hydroxidové ionty, proto při denitrifikaci dochází k alkalizaci prostředí a při nízké tlumivé kapacitě vody může dojít k výraznému zvýšení její hodnoty pH (Pitter, 2009).

## 2.3 AMONIAKÁLNÍ DUSÍK

Amoniakální dusík je primárním produktem rozkladu většiny organických dusíkatých látek živočišného a rostlinného původu. Proto antropogenním zdrojem amoniakálního dusíku organického původu jsou především splaškové odpadní vody, odpady ze zemědělských výroby a kalová voda z anaerobní stabilizace čistírenských kalů (Pitter, 2009). Antropogenním zdrojem amoniakálního dusíku anorganického původu jsou především dusíkatá hnojiva, která se do vod dostávají splachem ze zemědělsky obdělávané půdy. Amoniakální dusík je významný indikátor fekálního znečištění povrchových vod. Amoniak je konečným produktem dusíkatého metabolismu ryb. Vyskytuje se ve dvou základních formách, a to jako dusík nedisociovaný  $\text{NH}_3$  (pro ryby toxický) a disociovaný  $\text{NH}_4^+$  (pro ryby relativně netoxický). Vzájemný poměr těchto dvou forem závisí na hodnotě pH a na teplotě vody (viz tab. 1). Volný molekulární  $\text{NH}_3$  je těkavý, a proto jej lze z vody odstranit provzdušňováním. Amoniakální dusík je ve vodách za oxických podmínek nestálý a velmi snadno podléhá biochemické oxidaci tzv. nitrifikaci (Pitter, 2009).

Jako minerály se jednoduché amonné soli v přírodě nevyskytují. Výjimku tvoří minerál struvit  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Pitter, 2009).

Tab. 1: Závislost podílu nedisociovaného amoniaku na teplotě a hodnotě pH v procentech celkového amoniakálního dusíku: (Pitter, 2009)

| Teplota/°C | pH 6,5 | pH 7,0 | pH 7,5 | pH 8,0 | pH 8,5 | pH 9,0 |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 0          | 0,0261 | 0,0826 | 0,261  | 0,820  | 2,55   | 7,64   |
| 5          | 0,0395 | 0,125  | 0,394  | 1,23   | 3,80   | 11,1   |
| 10         | 0,0589 | 0,186  | 0,586  | 1,83   | 5,65   | 15,7   |
| 15         | 0,0865 | 0,273  | 0,859  | 2,67   | 7,97   | 21,5   |
| 20         | 0,125  | 0,396  | 1,24   | 3,82   | 11,2   | 28,4   |
| 25         | 0,180  | 0,566  | 1,77   | 5,38   | 15,3   | 36,3   |
| 30         | 0,254  | 0,799  | 2,48   | 7,46   | 20,3   | 44,6   |

## 2.4 DUSIČNANY

Dusičnany se vyskytují téměř ve všech vodách a patří mezi čtyři hlavní anionty. Za oxických podmínek jsou stabilní, za anoxických podmínek však podléhají biologické denitrifikaci za vzniku elementárního dusíku. Jejich koncentrace v přírodních vodách vzrůstá v důsledku vzrůstajícího počtu obyvatel a zemědělské činnosti (Pitter, 2009).

V minerálech jsou dusičnany obsaženy jen velmi zřídka. Dusičnany vznikají hlavně sekundárně při nitrifikaci amoniakálního dusíku a jsou konečným stupněm rozkladu dusíkatých organických látek v oxickém prostředí (Pitter, 2009). Dále se dusičnany do vody dostávají splachy ze zemědělsky obhospodařované půdy dusíkatými hnojivy. Dusičnany v atmosférických vodách jsou anorganického původu a jsou příčinou zvyšujících se koncentrací dusičnanů v povrchových vodách. (Pitter, 2009).

## 2.5 DUSITANY

Dusitany zpravidla doprovázejí ve vodách dusičnany a amoniakální dusík. Dusitany jsou chemicky a biochemicky velmi nestálé, proto se ve vodě vyskytují ve velmi malých koncentracích. V oxických podmínkách dusitany podléhají nitrifikaci a v anoxických podléhají denitrifikaci. Ve velmi čistých vodách bývají dusitany přítomné jen ve stopových koncentracích (Pitter, 2009). Běžné koncentrace v povrchových vodách nepřesahují 0,1 mg.l<sup>-1</sup> (viz tab. 2). Současná legislativa (nařízení vlády č. 61/2003 Sb. ve znění pozdějších předpisů) stanovuje jako přípustné znečištění povrchových vod koncentraci dusitanů NO<sub>2</sub><sup>-</sup> nejvýše 0,6 mg.l<sup>-1</sup> pro vody lososové a



nejvýše 0,9 mg.l<sup>-1</sup> pro vody kaprové (Kroupová a kol., 2005). Vyšší koncentrace dusitanů se vyskytují ve splaškových odpadních vodách, i přes 1 mg.l<sup>-1</sup>. Ještě vyšší koncentrace dusitanů lze nalézt v některých odpadních vodách ze strojírenských závodů, např. v odpadních vodách z povrchové a tepelné úpravy kovů a obrábění, v odpadních vodách odtékajících z některých lázní v kalárnách a z lázní používaných pro oxidaci železných předmětů, tzv. černění. V dílčích odpadních vodách z těchto provozů lze prokázat stovky mg.l<sup>-1</sup> dusitanového dusíku a ve směsi všech odpadních vod daného závodu i desítky mg.l<sup>-1</sup>, což již může podstatně ovlivnit jejich vlastnosti a celkovou dusíkovou bilanci (Pitter, 2009). Zvýšené koncentrace dusitanů (řádově jednotky, ale i desítky mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) se mohou vyskytovat ve vodách s intenzivním chovem ryb. Zvýšené koncentrace se také velmi často objevují v recirkulačních systémech, zejména bezprostředně po zahájení provozu nebo v důsledku nedostatečné funkce biologických filtrů, ve kterých probíhá proces nitrifikace (Svobodová a kol., 2007; Svobodová a kol., 2008). Pokud v biologických filtrech nejsou ideální podmínky pro nitrifikaci, může docházet k hromadění dusitanů ve vodě.

Tab. 2: Průměrné koncentrace amoniakálního, dusitanového, dusičnanového a celkového anorganického dusíku v některých řekách ČR (Pitter, 2009):

| Řeka- profil             | $\rho$ (N <sub>amon</sub> )<br>[mg.l <sup>-1</sup> ] | $\rho$ (N-NO <sub>2</sub> )<br>[mg.l <sup>-1</sup> ] | $\rho$ (N-NO <sub>3</sub> )<br>[mg.l <sup>-1</sup> ] | $\rho$ (N <sub>anorg</sub> )<br>[mg.l <sup>-1</sup> ] | c (N <sub>anorg</sub> )<br>[mmol.l <sup>-1</sup> ] |
|--------------------------|--|--|--|---|--|
| Berounka – nad Plzní     | 0,350  | 0,053  | 5,33   | 5,733   | 0,409 5  |
| Berounka – Bukovec       | 1,252  | 0,112  | 5,23   | 6,594   | 0,471 0  |
| Berounka – Lahovice      | 0,378  | 0,037  | 5,40   | 5,815   | 0,415 4  |
| Svratka – Vír            | 0,304  | 0,023  | 5,74   | 6,067   | 0,433 4  |
| Svratka – pod Brnem      | 3,588  | 0,133  | 4,65   | 5,371   | 0,383 6  |
| Svratka – Židlochovice   | 2,950  | 0,179  | 5,23   | 8,359   | 0,597 0  |
| Otava – Sušice           | 0,147  | 0,004  | 1,15   | 1,301   | 0,092 9  |
| Otava – Střelské Hoštice | 0,164  | 0,012  | 1,50   | 1,676   | 0,119 7  |
| Otava – Písek            | 0,276  | 0,043  | 2,49   | 2,809   | 0,200 6  |
| Jizera – Horní Sytová    | 0,138  | 0,008  | 1,25   | 1,396   | 0,099 7  |
| Jizera – Nový Vestec     | 0,327  | 0,046  | 3,41   | 3,783   | 0,270 2  |

Dusitany jsou odvozeny od kyseliny dusité  $\text{HNO}_2$ , která patří mezi středně silné kyseliny a disociuje podle rovnice:



Ve vodách s hodnotami pH nad 5 zcela převažují dusitanové ionty nad nedisociovanou kyselinou. Při hodnotě pH 3,35 jsou obě formy existence zastoupeny v molárním poměru 1:1 (Pitter, 2009).

Jako minerály se dusitany nevyskytují. Pokud jsou ve vodě přítomny, vznikají buď biochemickou oxidací amoniakálního dusíku (nitrifikací) nebo biochemickou redukcí dusičnanů (denitrifikací).

## 2.6 VLIV DUSITANŮ NA RYBY

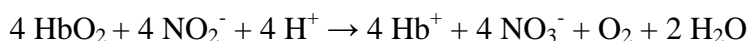
### 2.6.1 Příjem a mechanismus účinku dusitanů na ryby

Sladkovodní ryby a koryšci jsou hyperosmotičtí vůči prostředí ve kterém žijí, a proto aktivně přijímají ionty žábrami, aby se vyrovnávala ztráta močí a pasivním odtokem z žaber. Aktivní příjem iontů je spojen s tzv. chloridovými buňkami žaber (Maetz, 1971). Dusitanové ionty se vstřebávají do organismu především přes tyto chloridové buňky žaber (Svobodová a kol., 2007). Mezi ionty chloridů a dusitanů existuje kompetice na chloridových buňkách. Problém s dusitany ve sladké vodě pramení z toho, že  $\text{NO}_2^-$  má určitou afinitu k iontové výměně  $\text{Cl}/\text{HCO}_3^-$ , takže v případě vyšší koncentrace chloridů ve vodě jsou chloridové buňky obsazeny a vstřebávání dusitanů je sníženo. Teorie o nahrazení části příjmu chloridů dusitany je dále podpořena faktem, že ryby s vysokou rychlostí příjmu chloridů žábrami (pstruh duhový, okoun říční, štika obecná) jsou více citlivé k dusitanům než ryby s nízkou rychlostí příjmu (úhoř říční, kapr obecný, lín obecný) (Williams a Eddy, 1986 in Kroupová a kol., 2005). Proto se pro posouzení toxicity pro ryby doporučuje sledovat hmotnostní poměr koncentrací chloridů a  $\text{N-NO}_2^-$  (Svobodová a kol., 2007).

Dusitany se v krvi vážejí na hemoglobin za vzniku methemoglobinu, čímž se snižuje transportní kapacita krve pro kyslík. Zvýšené množství methemoglobinu v krvi

je doprovázeno hnědým zbarvením krve a žaber (Svobodová a kol., 1992). Pokud množství methemoglobinu v krvi nepřesáhne 50 % z celkového množství hemoglobinu, nedochází zpravidla k úhynu ryb. Úhyny jsou zjišťovány až při množství methemoglobinu nad 80%. Ryby jsou malátné, ztrácejí orientaci, často jsou zjišťovány i křeče svaloviny jako důsledek poškození nervové soustavy v důsledku nedostatečného zásobení kyslíkem (Svobodová a kol., 2007).

Zjednodušené schéma vzniku methemoglobinu (Kosaka a Tyuma, 1987):



Červené krvinky ryb obsahují enzym reduktázu, který přeměňuje methemoglobin na hemoglobin. Tímto způsobem lze dosáhnout normální hladiny hemoglobinu během 24-48 hodin, jsou-li ryby převedeny do vody bez přítomnosti dusitanů (Svobodová a kol., 1992). Dále bylo zjištěno, že dusitany nahromaděné v krvi a tkáních jsou postupně oxidovány na téměř netoxické dusičnany, které jsou pak vylučovány močí a žlučí (Kroupová a kol., 2005).

### **2.6.2 Toxicita dusitanů pro ryby a faktory, které ji ovlivňují**

Toxicita dusitanů pro ryby je velmi rozdílná. Letální koncentrace se pohybují v rozmezí 0,3 až 300 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup> v závislosti na mnoha vnitřních a vnějších faktorech (druh a věk ryb, kvalita vody a další) (Svobodová a kol., 2007). Rozdílnost citlivosti vybraných druhů ryb vůči dusitanům dokumentuje tabulka 3.

Tab. 3: Toxicita dusitanů (hodnoty 96hLC50 jsou uvedeny v mg.l<sup>-1</sup> N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) pro vybrané druhy ryb (Lewis a Morris, 1986)

| Druh  | Ca <sup>2+</sup><br>(mg.l <sup>-1</sup> ) | Alkalita<br>(CaCO <sub>3</sub><br>mg.l <sup>-1</sup> ) | Teplota<br>(°C) | pH  | 96hLC50<br>(20 mg.l <sup>-1</sup><br>Cl) |
|---|---|--|-----------------|-----|--|
| <b>Studenomilné</b>                                   |   |  |                 |     |  |
| Pstruh duhový<br><i>Oncorhynchus mykiss</i>           | 50  | 177  | 10              | 7,8 | 6,63                                     |
| Losos<br><i>Oncorhynchus tshawytscha</i>              |   | 20   | 13              | 7,2 | 4,7                                      |
| <b>Teplomilné</b>                                     |   |  |                 |     |  |
| <b><i>Ictaluridae</i></b>                             |   |  |                 |     |  |
| Sumeček skvrnitý<br><i>Ictalurus punctatus</i>        | 80  | 190  | 32              | 7,9 | 6,4                                      |
| Sumeček černý<br><i>Ictalurus melas</i>               |   |  |                 |     | > 52                                     |
| <b><i>Cyprinidae</i></b>                              |   |  |                 |     |  |
| Sřevle černoskvrná<br><i>Semotilus atromaculatus</i>  | 27  | 98   | 18              | 8,3 | > 63                                     |
| Kapr obecný <i>Cyprinus carpio</i>                    |   |  |                 |     | > 52                                     |
| <b><i>Castomidae</i></b>                              |   |  |                 |     |  |
| <i>Catostomus commersoni</i>                          |   |  |                 |     | > 100                                    |
| <i>Carpoides cyprinus</i>                             |   |  |                 |     | > 100                                    |
| <b><i>Centrarchiidae</i></b>                          |   |  |                 |     |  |
| Okounek pstruhový<br><i>Micropterus salmoides</i>     | 80  | 190  | 23              | 7,9 | 140                                      |
| Slunečnice velkoploutvá<br><i>Lepomis macrochirus</i> |   |  | 30              | 7,2 | 108                                      |
| <b>Taxony z jiných čeledí</b>                         |   |  |                 |     |  |
| <i>Oreochromis aureus</i>                             | 80  | 190  | 23              | 7,9 | 15                                       |
| Candátek kozlíkovitý<br><i>Percina caprodes</i>       |   |  |                 |     | > 9                                      |
| Koljuška říční <i>Culaea incostans</i>                |   |  |                 |     | > 9                                      |
| <i>Cottus bardi</i>                                   | 53  | 177  | 13              | 8,1 | > 106                                    |

## 2.7 TESTY TOXICITY NA VODNÍCH ORGANIZMECH

Testy toxicity na organizmech vodního prostředí mají svou nezastupitelnou roli při hodnocení nově vyvinutých a do praxe zaváděných chemických látek a přípravků včetně pesticidů i při klasifikaci odpadů určených ke skladování. Cílem testů toxicity je hodnotit potenciální nebezpečí pro vodní ekosystém jako celek (Svobodová a kol., 1986; Svobodová a kol., 2000). Právě proto je nutno volit testovací organizmy tak, aby zastoupily celou trofickou úroveň (producenti, konzumenti, destruenti). K hodnocení ekologického rizika chemických látek a přípravků včetně pesticidních látek jsou vyžadovány výsledky testů akutní toxicity na řasách, dafniích a na rybách (Svobodová a kol., 2000).

Testy toxicity se provádějí v podstatě na třech úrovních (Svobodová a kol., 1992):

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

Toxické působení látek na živé systémy můžeme zkoumat *in vitro* „ve zkumavce“ nebo na živých zvířatech „*in vivo*“. Zvíře, jako součást živé přírody, je totiž nejdokonalejším modelem pro toxikologické experimenty (Horák a kol., 2004). Většina toxikologických dat pochází z testování na živých zvířatech.

Toxické působení látek v testech *in vitro* můžeme zkoumat na poměrně jednoduchých živých systémech. Mohou to být (Horák a kol., 2004):

- jednoduché organizmy- prvoci, bičíkovci, bakterie, řasy, sinice, červi, klíčící semena rostlin
- buněčné preparáty- bílé krvinky, jaterní buňky (hepatocyty), jaterní plátky, nádorové buňky

Testy toxicity se také mohou dělit podle délky expozice na:

- akutní testy
- chronické testy

## **Akutní testy**

Akutními testy se sledují účinky, které se projeví v krátké době po jednorázovém podání látky. Provedení testu závisí na typu látky, předběžných informacích o toxicitě a požadavcích na přesnost (Horák a kol., 2004). V průběhu testu se kontroluje a zaznamenává stav a chování testovaných organismů a odstraňují se uhynulí jedinci (Svobodová a kol., 2000). Výsledkem testu akutní toxicity jsou obvykle hodnoty LC50, EC50 a IC50, to jsou koncentrace, které vyvolají mortalitu, jiný efekt (např. imobilizaci) nebo inhibici růstu testovacích organismů za určitou dobu působení (obvykle 24 až 96 hodin) u 50 % testovaných organismů.

## **Chronické testy**

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 dlouhodobé expozici.
- NOEC (nejvyšší koncentrace testovaného vzorku nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky)
- LOEC (nejnižší koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky)

Přechodnou kategorií mezi testy akutní a chronické toxicity jsou testy subchronické toxicity.

## **Posloupnost testů toxicity**

Rozsah testů, jejich uspořádání a hodnocení je dáno cílem, pro který jsou prováděny. Při hodnocení **akutní toxicity** chemických látek, přípravků a odpadů, případně odpadních vod se zjišťují hodnoty LC50, hodnoty EC50 a hodnoty IC50 (Svobodová a kol., 2000). Před uvedenými symboly se obvykle uvádí časový údaj o délce trvání testu (např. 96h).

Při zjišťování hodnot LC50, EC50 a IC50 se vychází z koncentrací, ve kterých došlo k více než nulové a méně než stoprocentní mortalitě, imobilizaci či inhibici růstu. Proto je při provádění testů velmi důležité zvolit správný rozsah koncentrací (Svobodová a kol., 2000). Nejprve se provádí tzv. limitní test, při kterém se zjišťuje

reakce testovaných organismů na koncentraci  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  testovaného vzorku. Pokud v limitním testu žádný testovaný organismus neuhyne, další testy se nevyžadují. V opačném případě se provádí předběžný test. Předběžný test se provádí s malým počtem testovacích organismů (3-5 ks ryb nebo 10 ks dafnií v každé koncentraci) na široké škále koncentrací testované látky (např. od  $0,01$  do  $100 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Na základě výsledků předběžného testu se volí rozsah koncentrací testované látky pro základní test. Při provádění základního testu se do jednotlivých koncentrací testované látky nasazuje větší počet testovacích organismů (min. 7-10 ks ryb), stejný počet se nasazuje do kontroly. Z výsledku základního testu se vypočítává hodnota IC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub>, LC<sub>50</sub> (Svobodová a kol., 2000).

Při provádění **dlouhodobých testů toxicity** (chronické a subchronické testy toxicity) se stanovují hodnoty LOEC (lowest observed effect concentration) a NOEC (no observed effect concentration).

Důležitou součástí každého testu toxicity je **kontrola**, která se provádí se stejnými organismy ve stejných podmínkách. Kontrolní organismy se nasazují do ředící vody bez přítomnosti testované látky. Ředící voda musí vyhovovat fyziologickým potřebám testovacích organismů. Současně tato voda nesmí ovlivňovat toxicitu testované látky (Svobodová a kol., 2000). Toxikologická laboratoř je povinna provádět v určitých časových intervalech tzv. **vnitřní kontrolu**. Jedná se vlastně o základní test, v němž je testovanou látkou **standard**. Jako standard se u nás i v zahraničí používá dichroman draselný ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  p.a.). V naší republice se dále používá jako standard p-nitrofenol (p.a.) a heptahydrát síranu zinečnatého ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  p.a.). Provedení testu se standardem a porovnání takto získané hodnoty LC ( EC či IC)<sub>50</sub> s obecně platnými hodnotami umožňuje laboratoři tzv. vnitřní kontrolu správnosti postupu i citlivosti použitých testovacích organismů (Svobodová a kol., 2000).

# 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 3.1 MATERIÁL A METODIKA

### 3.1.1 Materiál a pomůcky

**Testovaná látka:** dusitan sodný  $\text{NaNO}_2$  p.a., který sloužil jako zdroj dusitanů

**Testovací organismus:**

- Jeseter malý
- Jeseter sibiřský

Oba druhy ryb byly získány z Genetického rybářského centra VÚRH JU Vodňany. Průměrná velikost a hmotnost byla u jesetera malého 16,1 cm a 15,38 g. U jesetera sibiřského 17,6 cm a 17,26 g.

**Ředící voda:** jako ředící voda byla použita odstátá vodovodní voda následujících parametrů:

- pH 7,2
- $\text{KNK}_{4,5}$  0,5  $\text{mmol.l}^{-1}$
- $\text{CHSK}_{\text{Mn}}$  2,2  $\text{mg.l}^{-1}$
- $\Sigma\text{Ca+Mg}$  14,0  $\text{mg.l}^{-1}$
- $\text{N-NH}_4^+$  0,03  $\text{mg.l}^{-1}$
- $\text{N-NO}_3^-$  5,2  $\text{mg.l}^{-1}$
- $\text{N-NO}_2^-$  0,01  $\text{mg.l}^{-1}$
- $\text{Cl}^-$  11,0  $\text{mg.l}^{-1}$
- $\text{SO}_4^{2-}$  51,5  $\text{mg.l}^{-1}$
- $\text{P-PO}_4^{3-}$  0,01  $\text{mg.l}^{-1}$

**Přístroje a pomůcky:** pHmetr a oximetr (multifunkční přístroj MultiLine P4 firmy WTW), analytické váhy (Mettler AE 200), spektrofotometr (Spectonic 20 Genesys), lihový teploměr, laboratorní nádobí (kádinky, skleněné tyčinky, stříčka, váženka, pipety), skleněné nádrže o objemu 30 litrů, sítky na přelovování ryb



### 3.1.2. Metodika testu akutní toxicity na rybách

Testy akutní toxicity byly provedeny podle mezinárodně platné normy 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.

#### Princip testů

Ryby jsou vystaveny po dobu 96 hodin testované látce v odstupňovaných koncentracích. V průběhu testu je pozorováno chování a mortalita ryb. Na základě zjištěné mortality ryb v jednotlivých koncentracích se pomocí probitové analýzy vypočtou koncentrace LC50 za dobu 24 až 96 hodin (24 - 96hLC50).

#### Podmínky testů

- **Délka expozice:** 96 hodin
- **Objem lázně:** 20 l
- **Výměna lázně:** po 48 hodinách
- **Teplota vody:** 18 +/- 2 °C
- **Nasycení vody kyslíkem:** O<sub>2</sub> > 60 %
- **Osvětlení:** 12 hodin denně
- **Počet testovaných ryb:** 3 ks v jedné koncentraci při předběžném testu a 7 ks v jedné koncentraci při základním testu
- **Ostatní podmínky:** aerace, bez krmení

#### Vlastní provedení testů

Testy byly provedeny ve dvou stupních:

- 1) Předběžný test
- 2) Základní test

Koncentrace testované látky (dusitanů) byla ověřována po 48 hodinách testu před výměnou testované lázně. Dusitany byly stanoveny spektrofotometricky po reakci s kyselinou sulfanilovou a N-(1-naftyl)-ethylendiamindihydrochloridem (NED-hydrochloridem).

Postup: k 50 ml odebraného vzorku bylo přidáno 2,5 ml roztoku kyseliny sulfanilové, směs byla promíchána, po 10 minutách stání při laboratorní teplotě byl přidán NED-hydrochlorid a směs byla opět promíchána. Po dalších 20 minutách byla spektrofotometricky změřena intenzita vzniklého růžového zabarvení při vlnové délce 520 nm proti slepému stanovení. Koncentrace dusitanů byly potom odečteny z kalibrační přímky.

### **Předběžný test**

Do pokusných skleněných nádrží o objemu 30 litrů bylo připraveno po 20 litrech roztoků dusitanu sodného o koncentracích 10, 25, 50, 100 mg.l<sup>-1</sup>. Do takto připravených lázní byly nasazeny 3 ks náhodně vybraných ryb. (obr. 3). Stejným způsobem byla nasazena i kontrola. Na začátku testu a každých následujících 24 hodin byly ve všech nádržích měřeny a zaznamenávány hodnoty pH, teploty a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Po 48 hodinách byly ryby přeloveny do předem připravených nádrží s nově připravenými roztoky dusitanu sodného. V průběhu celého testu se sledovala a zaznamenávala mortalita ryb. Uhynulé ryby byly z nádrží odstraňovány. Po 96 hodinách byl test ukončen. Na základě výsledků předběžného testu se zvolily koncentrace pro test základní.

Obr. 3: Předběžný test na jeseteru malém a jeseteru sibiřském



## **Základní test**

Na základě výsledků předběžných testů byly zvoleny koncentrace pro základní test, a to:

- Pro jesetera malého: 5, 10, 15, 20, 25, 30 mg.l<sup>-1</sup>
- Pro jesetera sibiřského: 5, 10, 25, 40, 60 mg.l<sup>-1</sup>

Do takto připravených lázní bylo nasazeno 7 ks náhodně vybraných ryb. Stejný počet ryb byl nasazen i do kontroly. Na začátku testu a každých následujících 24 hodin se měřila a zaznamenávala hodnota pH, teplota a hladina rozpuštěného kyslíku ve všech nádržích. Po 48 hodinách byly ryby přeloveny do předem připravených nádrží s nově nadávkovanou koncentrací dusitanu sodného. V průběhu celého testu byla sledována a zaznamenávána mortalita ryb. Uhynulé ryby byly z nádrží odstraňovány. Po 96 hodinách byl test ukončen. Na základě zjištěné mortality ryb v jednotlivých koncentracích byly pomocí probitové analýzy vypočteny letální koncentrace LC50 za dobu 24 až 96 hodin (24 - 96hLC50). K výpočtům byl použit softwarový program EKOTOX 5.1.

## **Platnost testů (validace) dle ČSN EN ISO 7346-2**

Výsledky jsou 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

## **3.2 VÝSLEDKY**

### **3.2.1 Platnost testu**

Před vyhodnocením testů bylo zkontrolováno dodržení kritérií daných normou ČSN EN ISO 7346-2. V průběhu testů nedošlo v žádném případě k úhynu kontrolních organismů, nasycení vody kyslíkem nepokleslo pod 60 % a koncentrace testované látky před výměnou lázně se nelišila od nominální koncentrace o více než 10 %. To znamená, že požadovaná kritéria validace byla splněna a dosažené výsledky jsou platné.

### 3.2.2 Výsledky testu na jeseteru malém

#### Výsledky předběžného testu

V předběžném testu činil rozsah koncentrací  $\text{NaNO}_2$  10 – 100  $\text{mg.l}^{-1}$ .

Výsledky sledování základních parametrů kvality vody v průběhu testu jsou uvedeny v příloze (tabulka I).

*Klinické příznaky otravy:* v průběhu prvních 24 hodin trvání testu nejevily ryby v koncentracích 10 a 25  $\text{mg.l}^{-1}$  žádné změny chování ve srovnání s kontrolou, ve vyšších koncentracích (50 a 100  $\text{mg.l}^{-1}$ ) vykazovaly ryby příznaky poškození (jejich pohyb byl malátný a ve srovnání s kontrolou vykazovaly zrychlené dýchání). V průběhu následujících 72 hodin trvání testu nejevily ryby žádné změny chování ve srovnání s kontrolou pouze v koncentraci 10  $\text{mg.l}^{-1}$ , ve vyšších koncentracích (25, 50 a 100  $\text{mg.l}^{-1}$ ) vykazovaly ryby příznaky poškození. Mortalita pokusných ryb v průběhu předběžného testu je uvedena v tabulce 4.

*Patoanatomický obraz otravy:* kůže uhynulých ryb byla světlejší ve srovnání s kontrolou, žábry byly hnědé barvy. Při pitvě uhynulé ryby byl pozorován nástřik cév vnitřních orgánů a hnědá barva krve (viz obr. 4). Patoanatomický obraz otravy byl při všech testech stejný.

Obr. 4: Kontrolní pitva uhynulého pokusného jesetera (nahore) v porovnání s jeseterem z kontroly (dole).



Tab. 4: Mortalita pokusných ryb v průběhu předběžného testu na jeseteru malém (do každé koncentrace byly nasazeny 3 kusy ryb)

| Koncentrace mg.l <sup>-1</sup> NaNO <sub>2</sub> | Mortalita do 24 hodin (ks) | Mortalita do 48 hodin (ks) | Mortalita do 72 hodin (ks) | Mortalita do 96 hodin (ks) |
|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0 mg.l <sup>-1</sup> (kontrola)                  | 0                          | 0                          | 0                          | 0                          |
| 10 mg.l <sup>-1</sup>                            | 0                          | 0                          | 0                          | 0                          |
| 25 mg.l <sup>-1</sup>                            | 0                          | 1                          | 2                          | 3                          |
| 50 mg.l <sup>-1</sup>                            | 1                          | 3                          | 3                          | 3                          |
| 100 mg.l <sup>-1</sup>                           | 2                          | 3                          | 3                          | 3                          |

Na základě výsledků předběžného testu byly zvoleny koncentrace pro základní test v rozsahu od 5 až 30 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>.

### Výsledky základního testu

V základním testu činil rozsah koncentrací NaNO<sub>2</sub> 5 – 30 mg.l<sup>-1</sup>. Výsledky sledování základních parametrů kvality vody v průběhu testu jsou uvedeny v příloze (tabulka II).

*Klinické příznaky otravy:* v průběhu prvních 24 hodin trvání testu nejevily ryby v koncentracích 5 mg.l<sup>-1</sup> a 10 mg.l<sup>-1</sup> žádné změny chování ve srovnání s kontrolou, ve vyšších koncentracích (15, 20, 25 a 30 mg.l<sup>-1</sup>) vykazovaly ryby příznaky poškození (jejich pohyb byl malátný a ve srovnání s kontrolou vykazovaly zrychlené dýchání). V průběhu následujících 72 hodin trvání testu nejevily ryby žádné změny chování ve srovnání s kontrolou pouze v koncentraci 5 mg.l<sup>-1</sup>, ve vyšších koncentracích (10, 15, 20, 25 a 30 mg.l<sup>-1</sup>) vykazovaly ryby příznaky poškození. Mortalita pokusných ryb v průběhu základního testu je uvedena v tabulce 5.

Tab. 5: Mortalita pokusných ryb v průběhu základního testu na jeseteru malém (do každé koncentrace bylo nasazeno 7 kusů ryb)

| Koncentrace mg.l <sup>-1</sup> NaNO <sub>2</sub> | Mortalita za 24 hodin |     | Mortalita za 48 hodin |     | Mortalita za 72 hodin |     | Mortalita za 96 hodin |     |
|--|-----------------------|-----|-----------------------|-----|-----------------------|-----|-----------------------|-----|
|  | ks                    | %   | ks                    | %   | ks                    | %   | ks                    | %   |
| 0 mg.l <sup>-1</sup> (kontrola)                  | 0                     | 0   | 0                     | 0   | 0                     | 0   | 0                     | 0   |
| 5 mg.l <sup>-1</sup>                             | 0                     | 0   | 0                     | 0   | 0                     | 0   | 0                     | 0   |
| 10 mg.l <sup>-1</sup>                            | 0                     | 0   | 2                     | 29  | 3                     | 43  | 3                     | 43  |
| 15 mg.l <sup>-1</sup>                            | 1                     | 14  | 6                     | 86  | 6                     | 86  | 6                     | 86  |
| 20 mg.l <sup>-1</sup>                            | 4                     | 57  | 5                     | 71  | 5                     | 71  | 6                     | 86  |
| 25 mg.l <sup>-1</sup>                            | 7                     | 100 | 7                     | 100 | 7                     | 100 | 7                     | 100 |
| 30 mg.l <sup>-1</sup>                            | 6                     | 86  | 6                     | 86  | 7                     | 100 | 7                     | 100 |

Na základě mortality pokusných ryb byly probitovou analýzou vypočteny hodnoty LC50, které jsou uvedeny v tabulce 6, včetně hodnot, které odpovídají přepočtu na dusitany ( $\text{NO}_2^-$ ) a dusitanový dusík ( $\text{N-NO}_2^-$ )

Tab. 6: Přehled hodnot LC50  $\text{NaNO}_2$  a jejich na  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{N-NO}_2^-$  pro jesetera malého

| Vyjádření | $\text{NaNO}_2$         | $\text{NO}_2^-$          | $\text{N-NO}_2^-$       |
|-----------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 24hLC50   | 18,5 $\text{mg.l}^{-1}$ | 12,33 $\text{mg.l}^{-1}$ | 3,75 $\text{mg.l}^{-1}$ |
| 48hLC50   | 13,1 $\text{mg.l}^{-1}$ | 8,73 $\text{mg.l}^{-1}$  | 2,66 $\text{mg.l}^{-1}$ |
| 72hLC50   | 11,9 $\text{mg.l}^{-1}$ | 7,93 $\text{mg.l}^{-1}$  | 2,41 $\text{mg.l}^{-1}$ |
| 96hLC50   | 11,6 $\text{mg.l}^{-1}$ | 7,73 $\text{mg.l}^{-1}$  | 2,35 $\text{mg.l}^{-1}$ |

K výpočtu uvedených hodnot byl použit program EKOTOX 5.1. Příslušné grafy jsou uvedeny v příloze (obr. I až IV).

### 3.2.3 Výsledky testu na jeseteru sibiřském

#### Výsledky předběžného testu

V předběžném testu činil rozsah koncentrací  $\text{NaNO}_2$  10 – 100  $\text{mg.l}^{-1}$ . Výsledky sledování základních parametrů kvality vody v průběhu testu jsou uvedeny v příloze (tabulka III).

*Klinické příznaky otravy:* v průběhu prvních 48 hodin trvání testu nejevily ryby v koncentracích 10 a 25  $\text{mg.l}^{-1}$  žádné změny chování ve srovnání s kontrolou, ve vyšších koncentracích (50 a 100  $\text{mg.l}^{-1}$ ) vykazovaly ryby příznaky poškození (jejich pohyb byl malátný a ve srovnání s kontrolou vykazovaly zrychlené dýchání). V průběhu následujících 48 hodin trvání testu nejevily ryby žádné změny chování ve srovnání s kontrolou pouze v koncentraci 10  $\text{mg.l}^{-1}$ , ve vyšších koncentracích (25, 50 a 100  $\text{mg.l}^{-1}$ ) vykazovaly ryby příznaky poškození. Mortalita pokusných ryb v průběhu předběžného testu je uvedena v tabulce 7.

Tab. 7: Mortalita pokusných ryb v průběhu předběžného testu na jeseteru sibiřském (do každé koncentrace byly nasazeny 3 kusy ryb)

| Koncentrace<br>mg.l <sup>-1</sup> NaNO <sub>2</sub> | Mortalita do<br>24 hodin (ks) | Mortalita do<br>48 hodin (ks) | Mortalita do<br>72 hodin (ks) | Mortalita do<br>96 hodin (ks) |
|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 0 mg.l <sup>-1</sup><br>(kontrola)                  | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             |
| 10 mg.l <sup>-1</sup>                               | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             |
| 25 mg.l <sup>-1</sup>                               | 0                             | 0                             | 0                             | 1                             |
| 50 mg.l <sup>-1</sup>                               | 1                             | 2                             | 2                             | 3                             |
| 100 mg.l <sup>-1</sup>                              | 0                             | 2                             | 3                             | 3                             |

Na základě výsledků předběžného testu byly zvoleny koncentrace pro základní test v rozsahu od 5 až 60 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>.

### Výsledky základního testu

V základním testu činil rozsah koncentrací NaNO<sub>2</sub> 5 – 60 mg.l<sup>-1</sup>. Výsledky sledování základních parametrů kvality vody v průběhu testu jsou uvedeny v příloze (tabulka IV).

*Klinické příznaky otravy:* v průběhu prvních 48 hodin trvání testu nejevily ryby v koncentracích 5, 10 a 25 mg.l<sup>-1</sup> žádné změny chování ve srovnání s kontrolou, ve vyšších koncentracích (40 a 60 mg.l<sup>-1</sup>) vykazovaly ryby příznaky poškození (jejich pohyb byl malátný a ve srovnání s kontrolou vykazovaly zrychlené dýchání). V průběhu následujících 48 hodin trvání testu nejevily ryby žádné změny chování ve srovnání s kontrolou v koncentracích 5 a 10 mg.l<sup>-1</sup>, ve vyšších koncentracích (25, 40 a 60 mg.l<sup>-1</sup>) vykazovaly ryby příznaky poškození. Mortalita pokusných ryb v průběhu předběžného testu je uvedena v tabulce 8.

Tab. 8: Mortalita pokusných ryb v průběhu základního testu na jeseteru sibiřském (do každé koncentrace bylo nasazeno 7 kusů ryb)

| Koncentrace<br>mg.l <sup>-1</sup> NaNO <sub>2</sub> | Mortalita za<br>24 hodin |    | Mortalita za<br>48 hodin |    | Mortalita za<br>72 hodin |    | Mortalita za<br>96 hodin |    |
|---|--------------------------|----|--------------------------|----|--------------------------|----|--------------------------|----|
|   | ks                       | %  | ks                       | %  | ks                       | %  | ks                       | %  |
| 0 mg.l <sup>-1</sup><br>(kontrola)                  | 0                        | 0  | 0                        | 0  | 0                        | 0  | 0                        | 0  |
| 5 mg.l <sup>-1</sup>                                | 0                        | 0  | 0                        | 0  | 0                        | 0  | 0                        | 0  |
| 10 mg.l <sup>-1</sup>                               | 0                        | 0  | 0                        | 0  | 0                        | 0  | 0                        | 0  |
| 25 mg.l <sup>-1</sup>                               | 0                        | 0  | 0                        | 0  | 0                        | 0  | 1                        | 14 |
| 40 mg.l <sup>-1</sup>                               | 1                        | 14 | 1                        | 14 | 1                        | 14 | 3                        | 43 |
| 60 mg.l <sup>-1</sup>                               | 2                        | 29 | 6                        | 86 | 6                        | 86 | 6                        | 86 |

Na základě mortality pokusných ryb byly probitovou analýzou vypočteny hodnoty LC50, které jsou uvedeny v tabulce 9, včetně hodnot, které odpovídají přepočtu na dusitany ( $\text{NO}_2^-$ ) a dusitanový dusík ( $\text{N-NO}_2^-$ ).

Tab. 9: Přehled hodnot LC50  $\text{NaNO}_2$  a jejich přepočet  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{N-NO}_2^-$  pro jesetera sibiřského

| Vyjádření | $\text{NaNO}_2$         | $\text{NO}_2^-$          | $\text{N-NO}_2^-$        |
|-----------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 24hLC50   | 67,6 $\text{mg.l}^{-1}$ | 45,06 $\text{mg.l}^{-1}$ | 13,72 $\text{mg.l}^{-1}$ |
| 48hLC50   | 48,6 $\text{mg.l}^{-1}$ | 32,4 $\text{mg.l}^{-1}$  | 9,86 $\text{mg.l}^{-1}$  |
| 72hLC50   | 48,6 $\text{mg.l}^{-1}$ | 32,4 $\text{mg.l}^{-1}$  | 9,86 $\text{mg.l}^{-1}$  |
| 96hLC50   | 39,8 $\text{mg.l}^{-1}$ | 26,53 $\text{mg.l}^{-1}$ | 8,08 $\text{mg.l}^{-1}$  |

K výpočtu uvedených hodnot byl použit program EKOTOX 5.1. Příslušné grafy jsou uvedeny v příloze (obr. V až VIII).

Na základě zjištěných výsledků se jeví jeseter sibiřský jako více odolný vůči působení dusitanů. U obou druhů ryb je zřejmé, že hodnota LC50 se snižovala s rostoucí dobou expozice.



## 4. DISKUZE

Hodnoty 24, 48,72 a-96hLC50 dusitanu sodného zjištěné na základě testu akutní toxicity pro jesetera malého dosáhly hodnot 18,5, 13,1, 11,9 a 11,6 mg.l<sup>-1</sup>, což odpovídá koncentraci dusitanového dusíku (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 3,8, 2,7, 2,4 a 2,35 mg.l<sup>-1</sup>. Odpovídající hodnoty LC50 dusitanu sodného dosáhly u jesetera sibiřského výše 67,6, 48,6, 48,6 a 39,8 mg.l<sup>-1</sup>, což odpovídá koncentraci dusitanového dusíku dusitanů (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 13,7, 9,9, 9,9 a 8,1 mg.l<sup>-1</sup>.

Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že obecně známá rozdílná vnímavost různých druhů ryb vůči dusitanům se projevuje i v rámci jednoho druhu ryb různých rodů. V literatuře existuje poměrně velké množství údajů o toxicitě dusitanů pro ryby. Ale vzhledem ke všeobecně známé těsné závislosti vnímavosti ryb vůči dusitanům na koncentraci chloridů ve vodě, jsem porovnával své výsledky pouze s údaji, kde byla koncentrace chloridů ve vodě srovnatelná s koncentrací chloridů v ředící vodě, kterou jsem používal ve svých testech (11 mg.l<sup>-1</sup> Cl<sup>-</sup>). Např. Lewis a Morris (1986) uvádí pro pstruha duhového a lososa při 20 mg.l<sup>-1</sup> Cl<sup>-</sup> hodnoty 96hLC50 6,6 a 4,7 mg.l<sup>-1</sup> N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Srovnatelná citlivost je uváděna u sumečka skvrnitého (96hLC50 při 20 mg.l<sup>-1</sup> Cl<sup>-</sup> 6,4 mg.l<sup>-1</sup> N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Jak vyplývá z přehledu, který výše uvedení autoři uvádějí, tyto ryby patří k těm citlivějším druhům a vezmu-li v úvahu nižší koncentraci chloridů v ředící vodě při mých pokusech, mohu konstatovat, že citlivost jesetera malého a jesetera sibiřského je srovnatelná těmito (citlivějšími) druhy ryb. Naopak vyšší odolnost ve srovnání s jeseterem malým a jeseterem sibiřským vůči dusitanům vykazují druhy ryb, jako jsou střevele černoskvřinná (96hLC50 > 63 mg.l<sup>-1</sup> N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), sumeček černý (96hLC50 > 63 mg.l<sup>-1</sup> N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) nebo kapr obecný (96hLC50 > 52 mg.l<sup>-1</sup> N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Lewis a Morris, 1986

Výsledky mé práce také ukazují, že toxicita dusitanů pro oba dva druhy ryb se zvyšuje s délkou expozice (hodnoty LC50 se snižují). Podobné závěry uvádí ve své práci i (Lewis a Morris, 1986)

Toxicitou dusitanů pro ryby se také zabývali ve své práci (Máchová a kol., 2009). Tito autoři prováděli testy toxicity na 3 rozdílných hybridech jeseterovitých ryb. Jednalo se o oktaploidního jesetera sibiřského (8n x 8n – zjištěná hodnota 48hLC50 činila 16 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), dále o jeho hexaploidního hybrida s tetraploidním jeseterem malým (8n x 4n – zjištěná hodnota 48hLC50 činila 20 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) a o jeho

dekaploidního hybridu s dodekaploidním jeseterem sibiřským ( $8n \times 12n$ , kde zjištěná hodnota  $48hLC50$  činila  $47 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ ). Při porovnání těchto hodnot s výsledky, které jsem zjistil pro jesetera malého a jesetera sibiřského ( $48hLC50$   $8,7 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$  a  $32,4 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ ) se jeví jako nejvíce citlivý jeseter malý, zatímco jeseter sibiřský vykazuje srovnatelnou citlivost s dodekaploidním jeseterem sibiřským.

## 5. ZÁVĚR

1) Na základě výsledků testů akutní toxicity na jeseteru malém (*Acipenser ruthenus*)

byly stanoveny střední letální koncentrace dusitanů 24hLC50 – 96hLC50:

$$24\text{hLC50} = 12,33 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$$

$$48\text{hLC50} = 8,73 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$$

$$72\text{hLC50} = 7,93 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$$

$$96\text{hLC50} = 7,73 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$$

2) Na základě výsledků testů akutní toxicity na jeseteru sibiřském (*Acipenser baerii*)

byly stanoveny střední letální koncentrace dusitanů 24hLC50 – 96hLC50:

$$24\text{hLC50} = 45,06 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$$

$$48\text{hLC50} = 32,4 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$$

$$72\text{hLC50} = 32,4 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$$

$$96\text{hLC50} = 26,53 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$$

3) Na základě získaných výsledků testů akutní toxicity byla konstatována vyšší citlivost jesetera malého vůči dusitanům ve srovnání s citlivostí jesetera sibiřského.

## 6 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

Gela, D., Rodina M., Linhart O., 2008. Řízená reprodukce jeseterů (Acipenser). Edice metodik, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech. ISBN: 978-80-85887-62-4.

Hanel, L., 1998. Svět zvířat VIII. Ryby 1. Albatros Praha. ISBN: 80-00-00599-9.

Hanel, L., 2001. Naše ryby a rybaření. Nakladatelství Brázda, s.r.o., Praha. ISBN: 80-209-0292-9.

Horák, J., Linhart, I., Klusoň P., 2004. Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN: 978-80-7080-548-0.

ISBN: 80-7080-548-X.

Jensen, F.B., 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A*, 135: 9-24. ISSN: 1095-6433.

Kosaka, H., Tyuma, I., 1987. Mechanism of autocatalytic oxidation of oxyhemoglobin by nitrite. *Environmental Health Perspect.* 73: 147-151. ISSN: 0091-6765.

Kroupová, H., Máchová, J., Svobodová, Z., 2005. Nitrite in aquatic environment and its influence on fish. *Veterinární Medicina* 11: 461-471.

Lewis, W.M., Morris, D.P., 1986. Toxicity of Nitrite to Fish: A Review. *Transactions of the American Fisheries Society* 115: 183-195. ISSN: 0002-8487.

Máchová, J., Velíšek, J., Kroupová, H., Sudová, E., Beránková, P., Flajšhans, M., Gela, D., 2009. Acute toxicity of nitrite and its effects on some biochemical parameters of sturgeons. In Abstracts of the 46<sup>th</sup> Congress of the European Society of Toxicology, EUROTOX 2009, Dresden, Germany, *Toxicology Letters*, 189: S191. ISSN: 0378-4274.

Maetz, J., 1971. Fish gills: mechanism of salt transfer in fresh water and sea water. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Science* 262: 209-249. ISSN: 0962-8436.

Pitter, P., 2009. Hydrochemie. Vydavatelství VŠCHT Praha. ISBN: 978-80-7080-701-9.

Svobodová, Z. a kol., 1987. Toxikologie vodních živočichů. SZN, Praha. MTZ O 21 87 R 703048.

Svobodová, Z., Máchová, J., Vykusová, B., 1992. Havarijní a dlouhodobé znečištění povrchových vod. VÚRH, Vodňany. ISBN: 80-901087-1-7.

Svobodová, Z., Máchová, J., Beklová, M., Cupáková, Š., Minks, J., 2000. Ekotoxikologie praktická cvičení, část I. Ústav veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN: 80-85114-95-X.

Svobodová, Z. a kol., 2007. Nemoci sladkovodních a akvarijských ryb. Informatorium, Praha. ISBN: 978-80-7333-051-4.

Svobodová, Z., Máchová, J., Kroupová, H., 2008. Otrava ryb. In: Veterinární toxikologie v klinické praxi, Ed. Svobodová, Z., Profi Press. ISBN: 978-80-86726-27-4.

Williams, E.M., Eddy, F.B., 1986. Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. J.Comp. Physiol. B 156:867 – 872.

## 7 SEZNAM DEFINIC A ZKRATEK

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

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

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

**Kontrola:** ředící voda s testovacími organizmy bez testovaného vzorku.

**LC:** letální koncentrace.

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

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

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

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

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

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

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

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

# 8 PŘÍLOHY

## Seznam tabulek

### Test akutní toxicity na jeseteru malém

**Tab. I** - sledování základních parametrů kvality vody v průběhu předběžného testu na jeseteru malém

**Tab. II** - sledování základních parametrů kvality vody v průběhu základního testu na jeseteru malém

### Test akutní toxicity na jeseteru sibiřském

**Tab. III** - sledování základních parametrů kvality vody v průběhu předběžného testu na jeseteru sibiřském

**Tab. IV** - sledování základních parametrů kvality vody v průběhu základního testu na jeseteru sibiřském

## Seznam obrázků a grafů

### Test akutní toxicity na jeseteru malém

**Obr. I** – Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém, výsledná hodnota  $24hLC50 = 18,5 \text{ mg.l}^{-1}$

**Obr. II** – Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém, výsledná hodnota  $48hLC50 = 13,1 \text{ mg.l}^{-1}$

**Obr. III** – Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém, výsledná hodnota  $72hLC50 = 11,9 \text{ mg.l}^{-1}$

**Obr. IV** – Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém, výsledná hodnota  $96hLC50 = 11,6 \text{ mg.l}^{-1}$

### Test akutní toxicity na jeseteru sibiřském

**Obr. V** – Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru sibiřském, výsledná hodnota  $24hLC50 = 67,6 \text{ mg.l}^{-1}$

**Obr. VI** – Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru sibiřském, výsledná hodnota  $48hLC50 = 48,6 \text{ mg.l}^{-1}$

**Obr. VII** – Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru sibiřském, výsledná hodnota  $72hLC50 = 48,6 \text{ mg.l}^{-1}$

**Obr. VIII** – Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru sibiřském, výsledná hodnota  $96hLC50 = 39,8 \text{ mg.l}^{-1}$

**Tab. I** - sledování základních parametrů kvality vody v průběhu předběžného testu na jeseteru malém

| Číslo nádrže | Koncentrace NaNO <sub>2</sub> | Teplota (°C)          |      |      |      |      | Kyslík (% nasycení) |      |      |      |      | pH   |      |      |      |      |
|--------------|-------------------------------|-----------------------|------|------|------|------|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|              |                               | Datum a hodina měření |      |      |      |      |                     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|              |                               | 27.3                  | 28.3 | 29.3 | 30.3 | 31.3 | 27.3                | 28.3 | 29.3 | 30.3 | 31.3 | 27.3 | 28.3 | 29.3 | 30.3 | 31.3 |
|              |                               | 0 h                   | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 0 h                 | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 0 h  | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
| 1            | 10 mg.l <sup>-1</sup>         | 16,0                  | 17,0 | 19,7 | 18,9 | 19,1 | 101                 | 97   | 96   | 95   | 95   | 7,4  | 8,1  | 8,5  | 9,1  | 9,3  |
| 2            | 25 mg.l <sup>-1</sup>         | 16,0                  | 17,0 | 19,5 | 18,7 |      | 99                  | 97   | 96   | 95   |      | 7,4  | 8,3  | 8,6  | 9,0  |      |
| 3            | 50 mg.l <sup>-1</sup>         | 16,0                  | 17,0 | 19,6 |      |      | 101                 | 97   | 96   |      |      | 7,5  | 8,2  | 8,6  |      |      |
| 4            | 100 mg.l <sup>-1</sup>        | 16,0                  | 17,0 | 19,7 |      |      | 101                 | 97   | 97   |      |      | 7,5  | 8,2  | 8,7  |      |      |
| Kontrola     | 0 mg.l <sup>-1</sup>          | 16,0                  | 17,0 | 20,0 | 18,9 | 19,0 | 98                  | 94   | 92   | 91   | 89   | 7,6  | 7,9  | 8,3  | 9,0  | 9,1  |



**Tab. II - sledování základních parametrů kvality vody v průběhu základního testu na jeseteru malém**

| Číslo nádrže | Koncentrace NaNO <sub>2</sub> | Teplota (°C)          |      |      |      |      | Kyslík (% nasycení) |      |      |      |      | pH  |      |      |      |      |
|--------------|-------------------------------|-----------------------|------|------|------|------|---------------------|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|
|              |                               | Datum a hodina měření |      |      |      |      |                     |      |      |      |      |     |      |      |      |      |
|              |                               | 2.4                   | 3.4  | 4.4  | 5.4  | 6.4  | 2.4                 | 3.4  | 4.4  | 5.4  | 6.4  | 2.4 | 3.4  | 4.4  | 5.4  | 6.4  |
|              |                               | 0 h                   | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 0 h                 | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 0 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
| 1            | 5 mg.l <sup>-1</sup>          | 16,3                  | 16,9 | 17,2 | 18,3 | 17,1 | 100                 | 95   | 92   | 84,5 | 86   | 7,6 | 7,7  | 7,8  | 7,7  | 7,9  |
| 2            | 10 mg.l <sup>-1</sup>         | 17,0                  | 17,5 | 18,6 | 17,8 | 17,4 | 99                  | 96   | 93   | 90   | 89   | 7,6 | 7,8  | 7,8  | 8,0  | 8,0  |
| 3            | 15 mg.l <sup>-1</sup>         | 17,2                  | 17,6 | 18,6 | 17,8 | 17,4 | 101                 | 95   | 93   | 90   | 90   | 7,6 | 7,6  | 7,8  | 8,0  | 8,0  |
| 4            | 20 mg.l <sup>-1</sup>         | 17,1                  | 17,6 | 18,6 | 18,3 | 17,9 | 100                 | 97   | 95   | 90   | 89   | 7,6 | 7,7  | 7,8  | 8,0  | 8,0  |
| 5            | 25 mg.l <sup>-1</sup>         | 17,2                  | 17,7 |      |      |      | 99                  | 94   |      |      |      | 7,6 | 7,8  |      |      |      |
| 6            | 30 mg.l <sup>-1</sup>         | 17,1                  | 17,4 | 18,2 | 18,6 |      | 100                 | 95   | 93   | 94   |      | 7,6 | 7,7  | 7,9  | 8,1  |      |
| Kontrola     | 0 mg.l <sup>-1</sup>          | 17,2                  | 17,8 | 18,8 | 18,4 | 17,9 | 100                 | 94   | 88   | 84   | 83   | 7,6 | 7,7  | 7,8  | 7,8  | 7,8  |

**Tab. III - sledování základních parametrů kvality vody v průběhu předběžného testu na jeseteru sibiřském**

| Číslo nádrže | Koncentrace NaNO <sub>2</sub> | Teplota (°C)          |      |      |      |      | Kyslík (% nasycení) |      |      |      |      | pH   |      |      |      |      |
|--------------|-------------------------------|-----------------------|------|------|------|------|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|              |                               | Datum a hodina měření |      |      |      |      |                     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|              |                               | 27.3                  | 28.3 | 29.3 | 30.3 | 31.3 | 27.3                | 28.3 | 29.3 | 30.3 | 31.3 | 27.3 | 28.3 | 29.3 | 30.3 | 31.3 |
| 0 h          | 24 h                          | 48 h                  | 72 h | 96 h | 0 h  | 24 h | 48 h                | 72 h | 96 h | 0 h  | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |      |      |
| 1            | 10 mg.l <sup>-1</sup>         | 15,0                  | 18,0 | 18,7 | 17,9 | 18,2 | 101                 | 97   | 95   | 94   | 93   | 7,7  | 7,9  | 8,6  | 8,7  | 8,9  |
| 2            | 25 mg.l <sup>-1</sup>         | 15,0                  | 18,0 | 18,6 | 17,8 | 18,1 | 100                 | 96   | 94   | 93   | 92   | 7,6  | 8,0  | 8,7  | 8,8  | 9,0  |
| 3            | 50 mg.l <sup>-1</sup>         | 14,0                  | 18,0 | 18,5 | 17,9 |      | 100                 | 96   | 95   | 93   |      | 7,7  | 8,0  | 8,8  | 8,9  |      |
| 4            | 100 mg.l <sup>-1</sup>        | 15,0                  | 18,0 | 18,6 | 18,2 |      | 101                 | 97   | 96   | 94   |      | 7,8  | 8,0  | 8,8  | 8,9  |      |
| Kontrola     | 0 mg.l <sup>-1</sup>          | 15,0                  | 18,0 | 18,4 | 18,9 | 18,7 | 99                  | 93   | 92   | 90   | 88   | 7,6  | 7,6  | 8,6  | 8,3  | 8,4  |

**Tab. IV** - sledování základních parametrů kvality vody v průběhu základního testu na jeseteru sibiřském

| Číslo nádrže | Koncentrace NaNO <sub>2</sub> | Teplota (°C)          |      |      |      |      | Kyslík (% nasycení) |      |      |      |      | pH  |      |      |      |      |
|--------------|-------------------------------|-----------------------|------|------|------|------|---------------------|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|
|              |                               | Datum a hodina měření |      |      |      |      |                     |      |      |      |      |     |      |      |      |      |
|              |                               | 5.4                   | 6.4  | 7.4  | 8.4  | 9.4  | 5.4                 | 6.4  | 7.4  | 8.4  | 9.4  | 5.4 | 6.4  | 7.4  | 8.4  | 9.4  |
|              |                               | 0 h                   | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 0 h                 | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 0 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
| 1            | 5 mg.l <sup>-1</sup>          | 17,7                  | 18,5 | 17,0 | 16,5 | 18,5 | 85                  | 84   | 83   | 81   | 77   | 7,7 | 7,8  | 7,9  | 8,1  | 8,2  |
| 2            | 10 mg.l <sup>-1</sup>         | 17,5                  | 18,3 | 17,9 | 18,1 | 18,4 | 89                  | 88   | 85   | 82   | 81   | 7,7 | 7,9  | 8,0  | 8,0  | 8,1  |
| 3            | 25 mg.l <sup>-1</sup>         | 17,8                  | 18,4 | 18,3 | 18,1 | 18,5 | 87                  | 87   | 85   | 83   | 82   | 7,7 | 7,9  | 8,0  | 8,1  | 8,1  |
| 4            | 40 mg.l <sup>-1</sup>         | 20,1                  | 18,9 | 18,5 | 18,4 | 18,5 | 88                  | 88   | 85   | 84   | 83   | 7,7 | 8,0  | 8,1  | 8,1  | 8,2  |
| 5            | 60 mg.l <sup>-1</sup>         | 19,3                  | 18,9 | 18,6 | 18,5 | 18,5 | 85                  | 87   | 86   | 84   | 83   | 7,6 | 8,0  | 8,2  | 8,2  | 8,3  |
| Kontrola     | 0 mg.l <sup>-1</sup>          | 18,2                  | 18,6 | 17,0 | 16,5 | 18,2 | 86                  | 86   | 84   | 83   | 82   | 7,7 | 7,9  | 8,0  | 8,0  | 8,0  |

**Testovaná látka: NaNO<sub>2</sub>**

**Obř. I** – Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém, výsledná hodnota 24hLC50= 18,5 mg.l<sup>-1</sup>

**Vstupní hodnoty:**

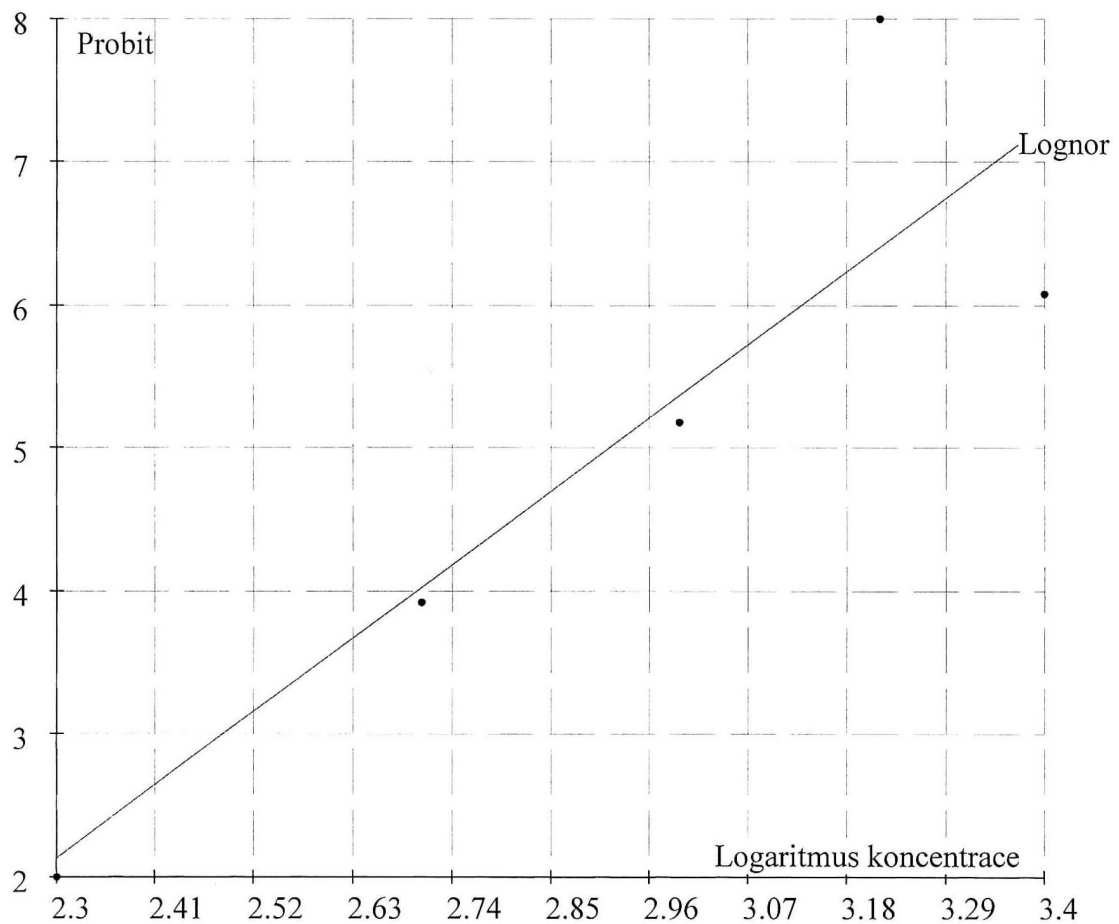
**základní test**

| Koncentrace<br>mg/l | Mortalita<br>% |
|---------------------|----------------|
| 10                  | 0.0            |
| 15                  | 14.0           |
| 20                  | 57.0           |
| 25                  | 100.0          |
| 30                  | 86.0           |

**24hLC50 = 18.5 mg/l s 95% intervalem spolehlivosti (-6.9 , +5.0)**

LC0 = 9.7 mg/l

LC100 = 35.2 mg/l



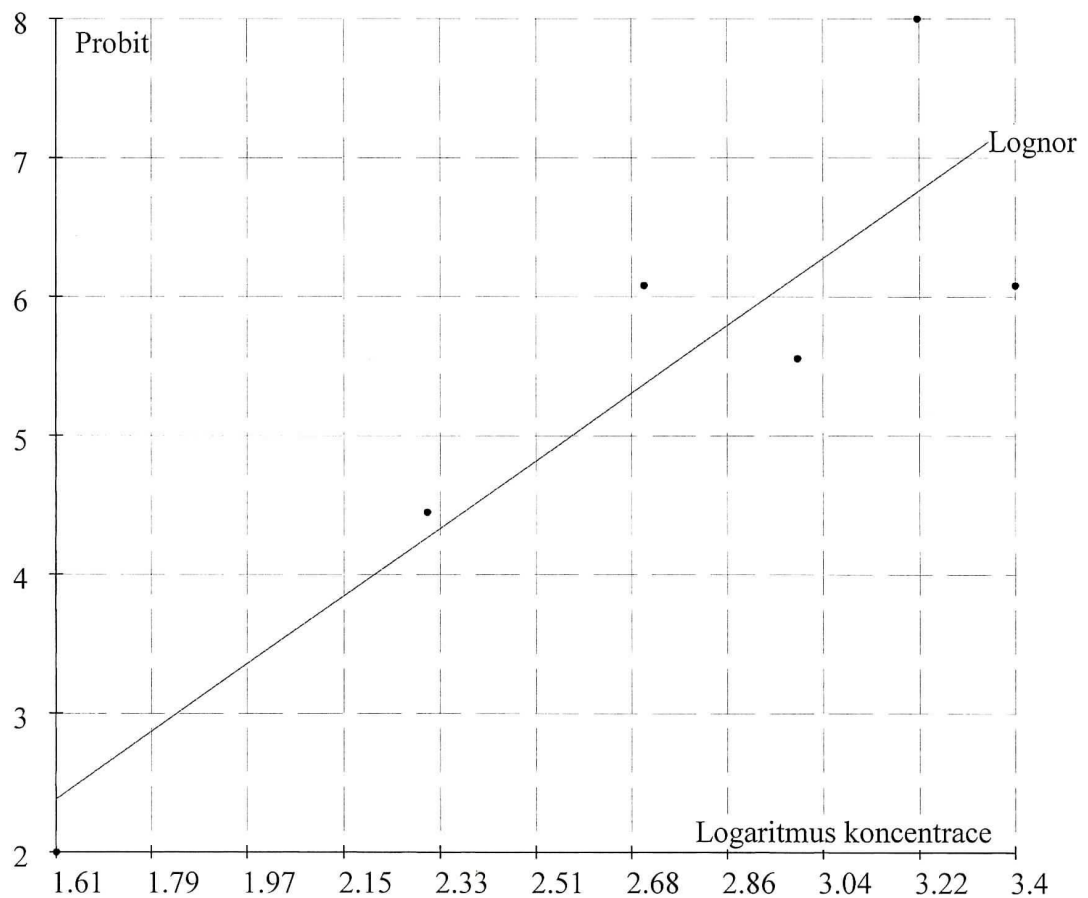
**Testovaná látka: NaNO<sub>2</sub>**

**Obr. II** – Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém, výsledná hodnota 48hLC50= 13,1 mg.l<sup>-1</sup>

| Vstupní hodnoty:    |                | základní test |
|---------------------|----------------|---------------|
| Koncentrace<br>mg/l | Mortalita<br>% |               |
| 5                   | 0.0            |               |
| 10                  | 29.0           |               |
| 15                  | 86.0           |               |
| 20                  | 71.0           |               |
| 25                  | 100.0          |               |
| 30                  | 86.0           |               |

**48hLC50 = 13.1 mg/l s 95% intervalem spolehlivosti (-6.0 , +4.1)**

LC0 = 4.3 mg/l  
LC100 = 39.6 mg/l



## Testovaná látka NaNO<sub>2</sub>

**Obr. III** – Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém, výsledná hodnota 72hLC<sub>50</sub> = 11,9 mg.l<sup>-1</sup>

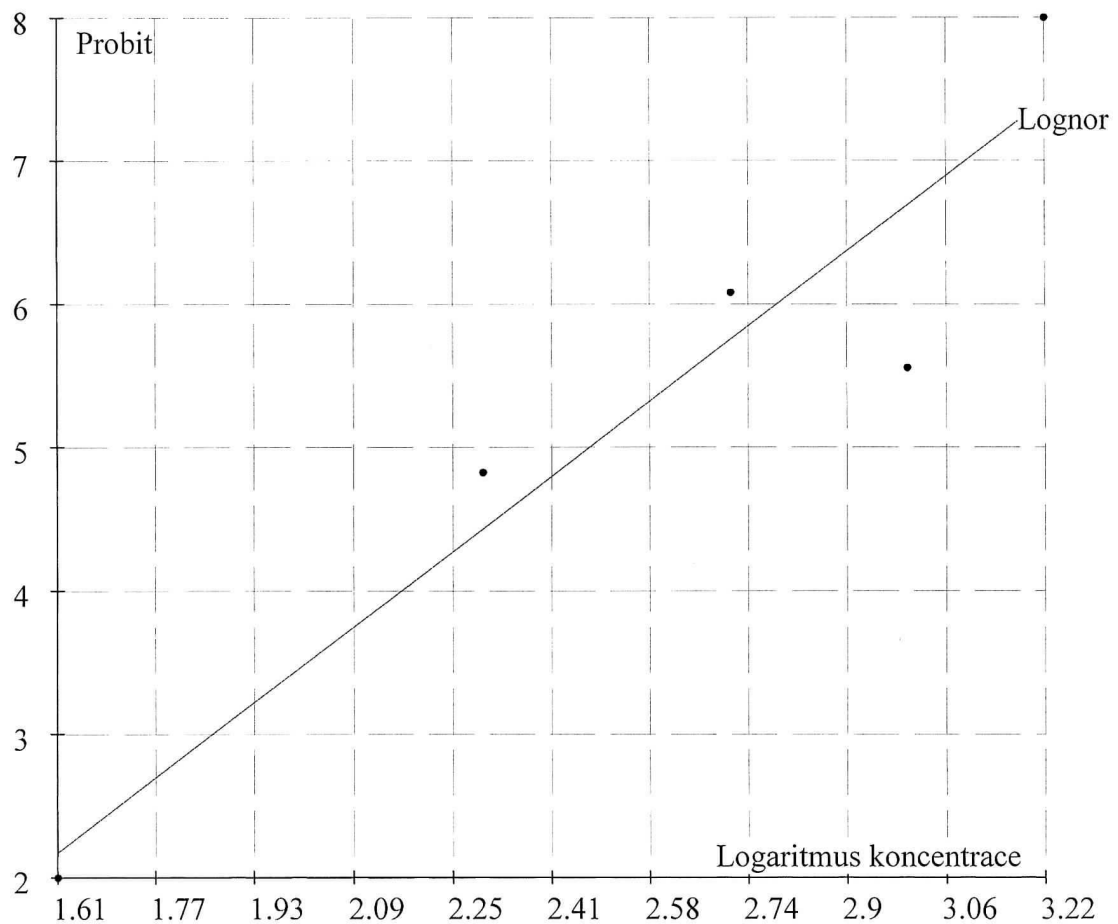
### Vstupní hodnoty: základní test

| Koncentrace<br>mg/l | Mortalita<br>% |
|---------------------|----------------|
| 5                   | 0.0            |
| 10                  | 43.0           |
| 15                  | 86.0           |
| 20                  | 71.0           |
| 25                  | 100.0          |

**72hLC<sub>50</sub> = 11.9 mg/l** s 95% intervalem spolehlivosti (-4.7, +3.4)

LC<sub>0</sub> = 4.7 mg/l

LC<sub>100</sub> = 29.9 mg/l



## Testovaná látka NaNO<sub>2</sub>

**Obr. IV** – Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru malém, výsledná hodnota 96hLC50= 11,6 mg.l<sup>-1</sup>

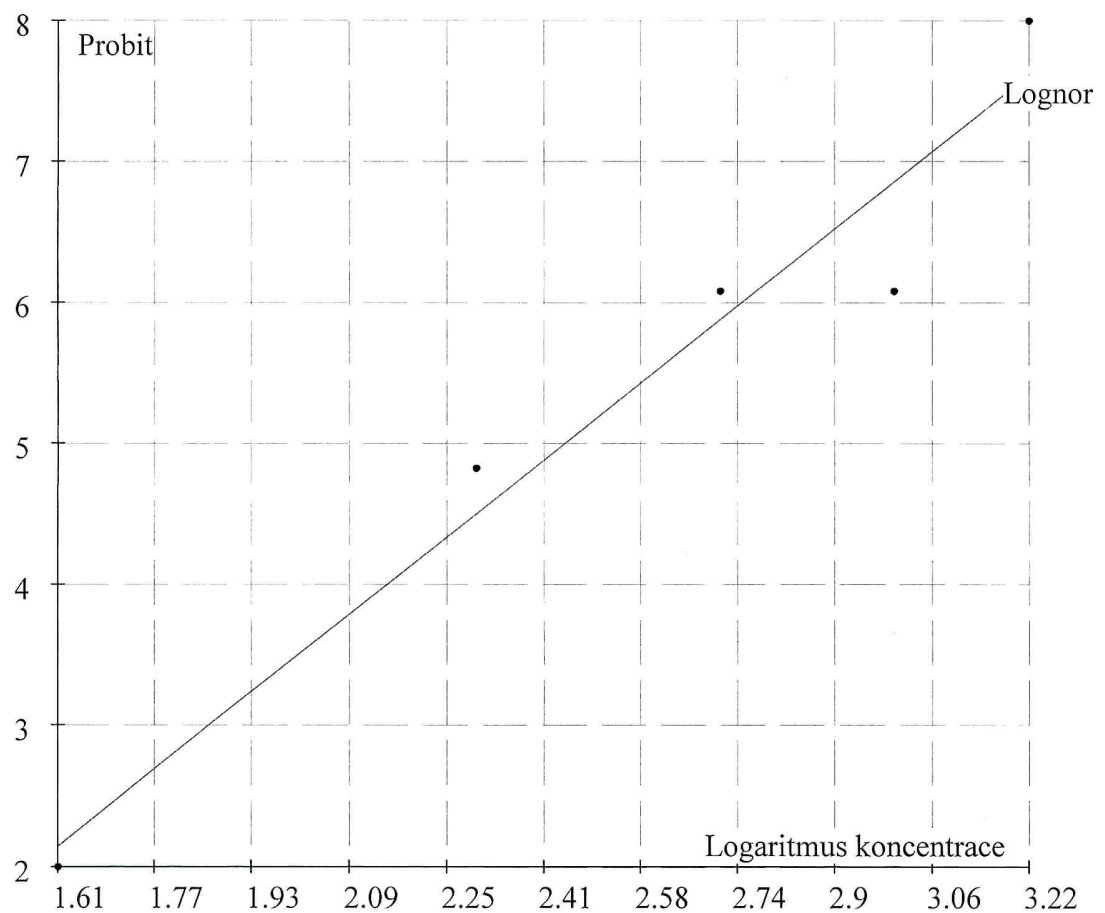
**Vstupní hodnoty:** **základní test**

| Koncentrace<br>mg/l | Mortalita<br>% |
|---------------------|----------------|
| 5                   | 0.0            |
| 10                  | 43.0           |
| 15                  | 86.0           |
| 20                  | 86.0           |
| 25                  | 100.0          |

**96hLC50 = 11.6 mg/l** s 95% intervalem spolehlivosti (-3.0 , +2.4)

LC0 = 4.8 mg/l

LC100 = 28.0 mg/l



## Testovaná látka NaNO<sub>2</sub>

**Obr. V** – Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru sibiřském, výsledná hodnota 24hLC50= 67,6 mg.l<sup>-1</sup>

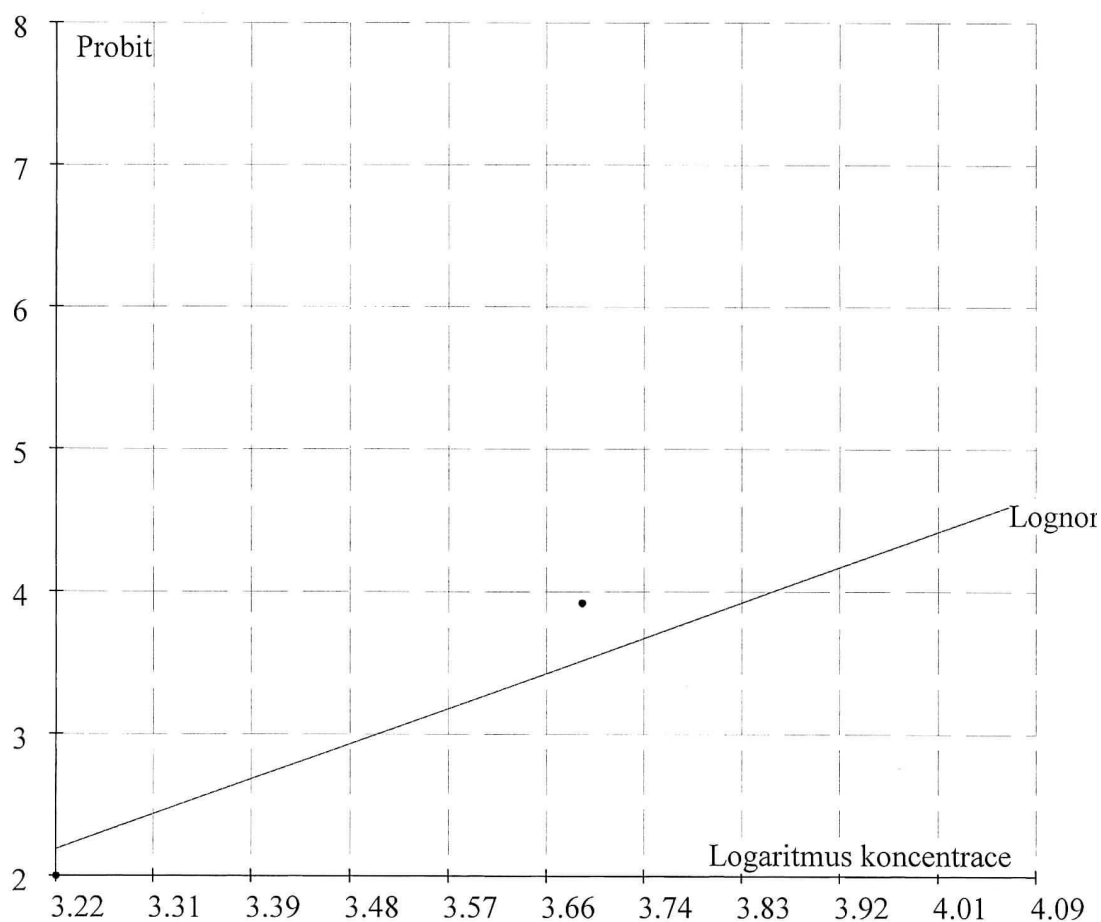
### Vstupní hodnoty: základní test

| Koncentrace<br>mg/l | Mortalita<br>% |
|---------------------|----------------|
| 25                  | 0.0            |
| 40                  | 14.0           |
| 60                  | 29.0           |

**24hLC50 = 67.6 mg/l** s 95% intervalem spolehlivosti (-538.1 , +60.0)

LC0 = 23.4 mg/l

LC100 = 195.1 mg/l





## Testovaná Látka NaNO<sub>2</sub>

**Obr. VI** – Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru sibiřském, výsledná hodnota 48hLC50= 48,6 mg.l<sup>-1</sup>

**Vstupní hodnoty:**

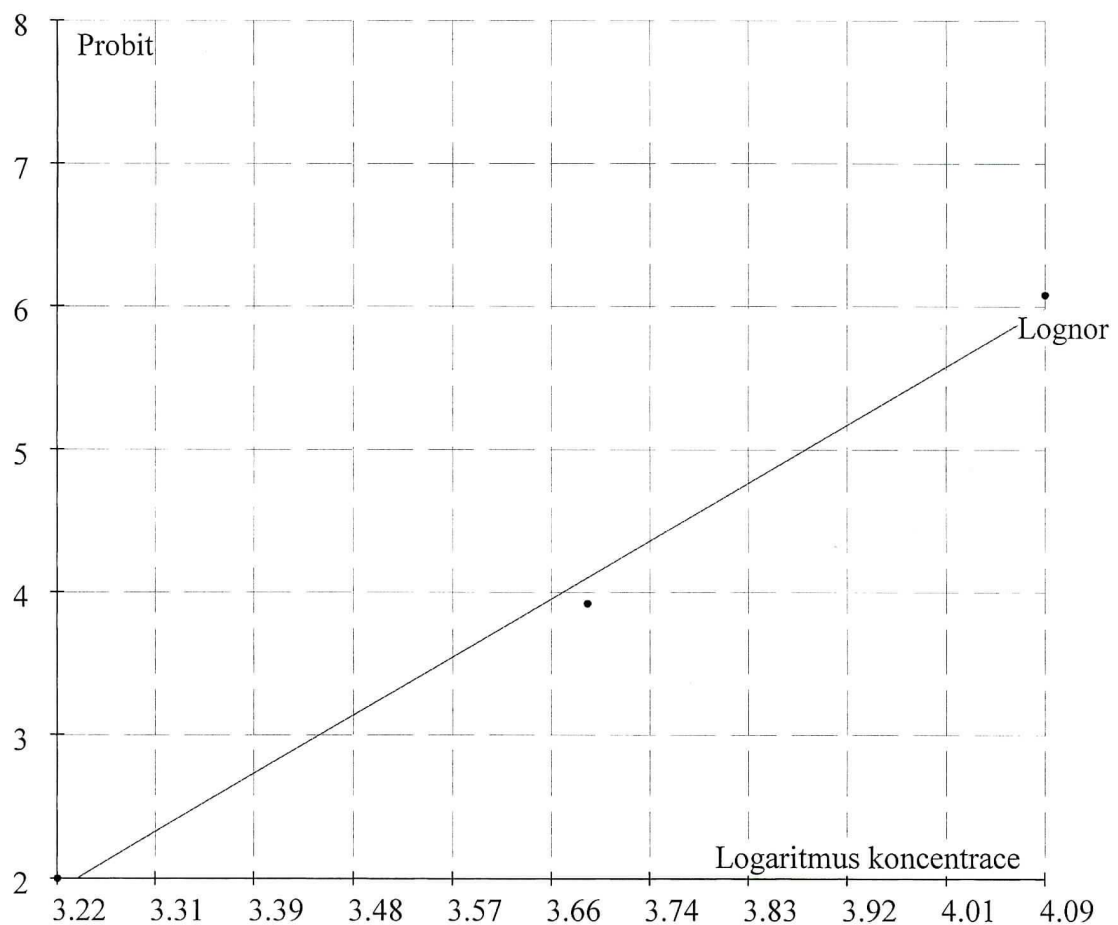
**základní test**

| Koncentrace<br>mg/l | Mortalita<br>% |
|---------------------|----------------|
| 25                  | 0.0            |
| 40                  | 14.0           |
| 60                  | 86.0           |

**48hLC50 = 48.6 mg/l** s 95% intervalem spolehlivosti (-24.2 , +16.2)

LC0 = 25.5 mg/l

LC100 = 92.6 mg/l



## Testovaná látka NaNO<sub>2</sub>

**Obr. VII** – Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru sibiřském, výsledná hodnota 72hLC50= 48,6 mg.l<sup>-1</sup>

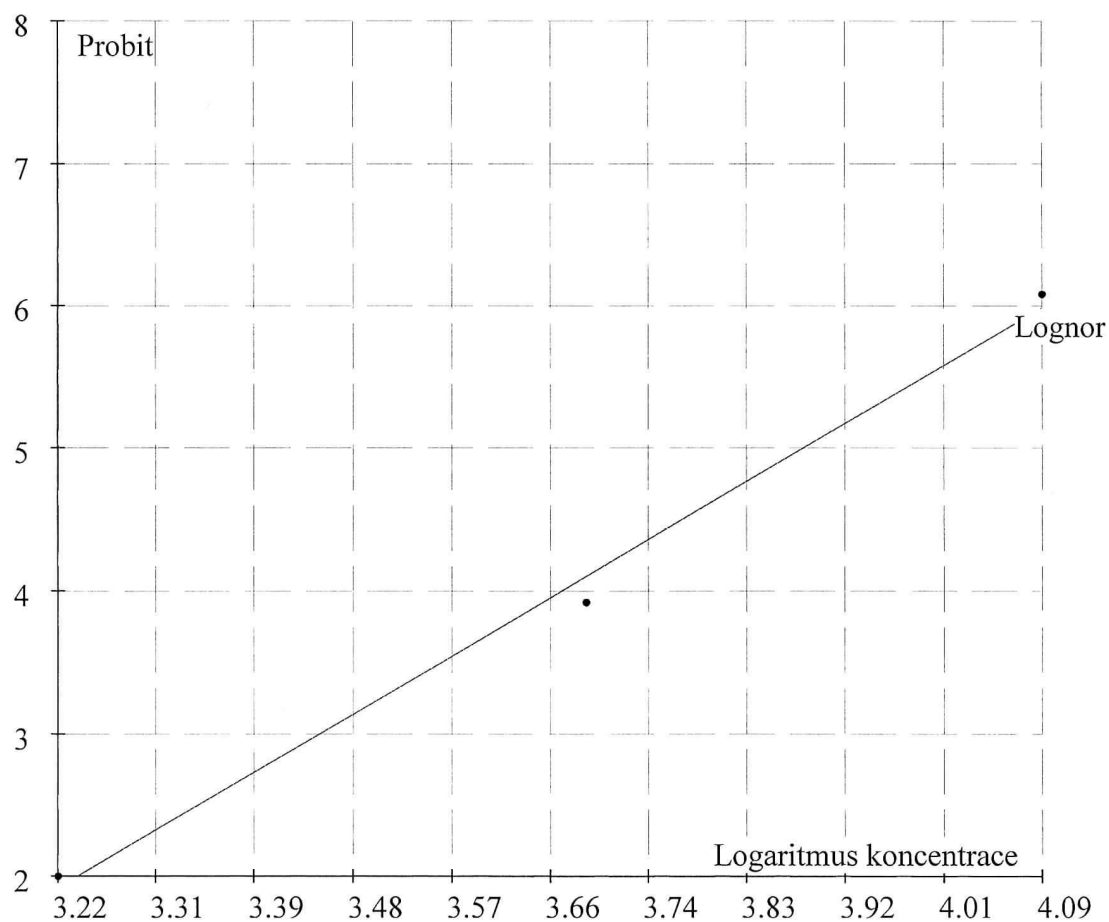
### Vstupní hodnoty: základní test

| Koncentrace<br>mg/l | Mortalita<br>% |
|---------------------|----------------|
| 25                  | 0.0            |
| 40                  | 14.0           |
| 60                  | 86.0           |

**72hLC50 = 48.6 mg/l** s 95% intervalem spolehlivosti (-24.2 , +16.2)

LC0 = 25.5 mg/l

LC100 = 92.6 mg/l



## Testovaná látka NaNO<sub>2</sub>

**Obr. VIII** – Vyhodnocení základního testu akutní toxicity na jeseteru sibiřském, výsledná hodnota 96hLC<sub>50</sub> = 39,8 mg.l<sup>-1</sup>

### Vstupní hodnoty:

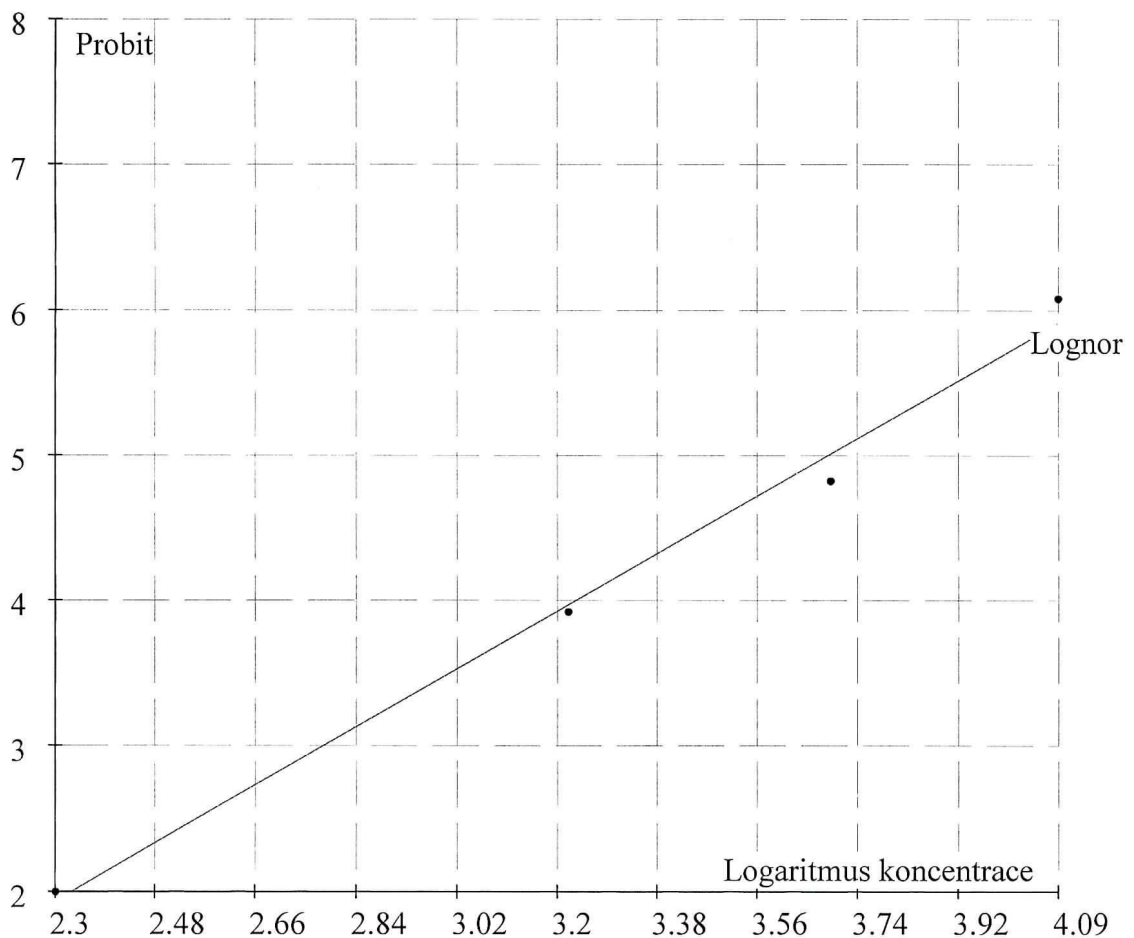
### základní test

| Koncentrace<br>mg/l | Mortalita<br>% |
|---------------------|----------------|
| 10                  | 0.0            |
| 25                  | 14.0           |
| 40                  | 43.0           |
| 60                  | 86.0           |

96hLC<sub>50</sub> = 39.8 mg/l s 95% intervalem spolehlivosti (-9.1 , +7.4)

LC<sub>0</sub> = 10.3 mg/l

LC<sub>100</sub> = 153.8 mg/l



## 9 ABSTRAKT

### **Toxicita dusitanů pro jeseterovité ryby**

Cílem předložené práce bylo posoudit a porovnat akutní toxicitu dusitanů pro dva druhy jeseterovitých ryb, jmenovitě pro jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) a jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*). Akutní toxicita dusitanu sodného byla stanovena podle normy ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod. Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby /*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae*)/.

V průběhu 96 hodinové expozice jesetera malého dusitanu sodnému byl zaznamenán úhyn všech ryb v koncentracích 25 a 30 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>, naproti tomu k žádnému úhynu nedošlo v koncentraci 5 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>. Na základě výsledků testu akutní toxicity byla stanovena střední letální koncentrace 96hLC50 pro tento druh ryby ve výši 11,6 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>. Vyšší rezistenci vůči dusitanům prokázal jeseter sibiřský. V průběhu testu na tomto druhu ryby byl zaznamenán 86% úhyn ryb v koncentraci 60 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>, žádný úhyn nebyl zaznamenán v koncentracích 5 a 10 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub> a výsledná střední letální koncentrace činila 39,8 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>. Výsledky testů akutní toxicity prokázaly téměř čtyřikrát vyšší rezistenci jesetera sibiřského vůči dusitanům ve srovnání s rezistencí jesetera malého.

**Klíčová slova:** Jeseter malý, jeseter sibiřský, 96hLC50, mortalita, koncentrace, základní test, předběžný test, testovací organizmus, dusitan sodný

### **Acute toxicity of nitrite for sturgeons (*Acipenseridae*)**

The aim of my work was to assess and compare the acute toxicity of nitrite for two species of sturgeon fish, namely Sterlet (*Acipenser ruthenus*) and Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). Acute toxicity of sodium nitrite was determined by using the internationally recognized standard ČSN EN ISO 7346-2 Water quality. Determination of acute lethal toxicity of substances to freshwater fish /*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae*)/.

During the 96-hours exposure of Sterlet (*Acipenser ruthenus*) to sodium nitrite total mortality of experimental fish was noticed at the concentrations of 25 and 30 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>, while no mortality was observed at the concentration of 5 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>. On the basis of the acute toxicity test the median lethal concentration 96hLC50 = 11.6 mg.l<sup>-1</sup> of NaNO<sub>2</sub> was determined. Higher resistance to nitrite has shown Siberian sturgeon. During the test on this kind of fish, 86% mortality of experimental fish was noticed at the concentration of 60 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub> and no mortality of fish was observed at the concentrations of 5 and 10 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>. The median lethal concentration for Siberian sturgeon (96hLC50) was 39,8 mg.l<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>. According to these results, Siberian sturgeon is nearly four times more resistant to nitrite compared with Sterlet.

**Keywords:** Sterlet, Siberian sturgeon, 96hLC50, mortality, concentration, the basic test, the preliminary test, experimental organism, sodium nitrite