

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Fakulta rybářství a ochrany vod

## **Bakalářská práce**

**2013**

**Roman Franěk**

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

**Bakalářská práce**  
**Hematologické změny u ryb vystavených dusitanům**

**Autor:** Roman Franěk

**Vedoucí bakalářské práce:** MVDr. Eliška Zusková, Ph.D

**Konzultant bakalářské práce:** Ing. Hana Kocour Kroupová, Ph.D

**Studijní program a obor:** B4103 Zootechnika, Rybářství

**Forma studia:** Prezenční

**Ročník:** 3.

**České Budějovice, 2013**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě. 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 uvedenými ustanoveními 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 dne 9. května 2013

.....

Roman Franěk

Na tomto místě bych rád poděkoval MVDr. Elišce Zuskové, PhD., za vedení bakalářské práce, cenné připomínky a rady, bez kterých bych se neobešel. Děkuji také dalším pracovníkům Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech, za ochotu a pomoc při práci v laboratoři. Velké poděkování patří mým rodičům, kteří mě po celou dobu studia podporují.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
Fakulta rybnářství a ochrany vod  
Akademický rok: 2011/2012

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Roman FRANĚK**  
Osobní číslo: **V10B012P**  
Studijní program: **B4103 Zootechnika**  
Studijní obor: **Rybnářství**  
Název tématu: **Hematologické změny u ryb vystavených dusitanům**  
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický**

### Zásady pro vypracování:

Cílem práce je posoudit hematologické změny u ryb dlouhodobě vystavených environmentálním koncentracím dusitanů. Pozornost bude věnována zejména změnám červených krvinek a změnám základních hematologických parametrů krve, jako jsou: koncentrace hemoglobinu, hematokrit, počet červených a bílých krvinek, střední objem erytrocytu, hemoglobin erytrocytu a střední barevná koncentrace.

Metodický postup: Vybraný druh ryb bude vystaven po dobu 14 dnů environmentálním koncentracím dusitanů. Bude odebrána krev a stanoveny vybrané hematologické parametry krve, které budou následně porovnány s kontrolními skupinami bez expozice. Na podkladě výsledků bude popsán vliv dané koncentrace dusitanů na hematologické ukazatele.

Rozsah grafických prací: 2 - 5 stran  
Rozsah pracovní zprávy: 20 - 30 stran  
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná  
Seznam odborné literatury:


Kroupová H. 2007: A study of the effects of nitrite on fish and possible ways to reduce its negative impact. Ph.D. thesis, USB RIFCH, Vodňany, 110 p.  
Treves-Brown KM. 2000: Applied Fish Pharmacology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 310 pp.  
Svobodová Z. a kol. 2007: Nemoci sladkovodních a akvariálních ryb. 4. vyd. Informatorium, Praha, 264 s.  
Svobodová Z., Máchová J., Kroupová H. 2008: Otravy ryb. In: Svobodová, Z. (Ed.): Veterinární toxikologie v klinické praxi, Profi Press, 201-217.  
Svobodova Z., Pravda D., Palackova J. 1991: Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb. Edice metodik VURH Vodňany, 22 - 31.  
Svobodová Z., Gelnarová J., Justýn J., Krupauer V., Máchová J., Šimanov L., Valentová V., Vykusová B., Wohlgemuth E. 1987: Toxikologie vodních živočichů. Vydavatelství MZVŽ a CSR, Praha, 231s.  
Řehulka J. 2006: Hematologická a biochemická charakteristika krve ryb při zdravotních poruchách a změnách výživy. Habilitační práce ([http://oldwww.upol.cz/fileadmin/user\\_upload/PrF-dokumenty/Vedecka\\_rada/Habilitace\\_a\\_profesury/Rehulka\\_Jiri/hab.prace-Rehulka.pdf](http://oldwww.upol.cz/fileadmin/user_upload/PrF-dokumenty/Vedecka_rada/Habilitace_a_profesury/Rehulka_Jiri/hab.prace-Rehulka.pdf))

Vedoucí bakalářské práce: MVDr. Eliška Zusková, Ph.D.  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický  
Konzultant bakalářské práce: Ing. Hana Kroupová, Ph.D.  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání bakalářské práce: 2. prosince 2011  
Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2013

  
prof. Ing. Otomar Línhart, DrSc.  
děkan

L.S.

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

V Českých Budějovicích dne 3. února 2012

# Obsah

1. Úvod .....	8
2. Literární přehled .....	10
2.1. Dusík .....	10
2.1.1. Formy výskytu dusíku .....	10
2.1.2. Biochemické a chemické přeměny dusíku .....	11
2.2. Dusitany .....	11
2.2.1. Výskyt dusitanů ve vodách.....	11
2.2.2. Dusitany v rybochovných systémech .....	12
2.3. Toxicita dusitanů.....	15
2.3.1. Mechanismus toxicity dusitanů .....	15
2.3.2. Faktory ovlivňující toxicitu dusitanů.....	16
2.3.3. Vliv dusitanů na ryby .....	21
2.4. Hodnocení toxicity pro vodní organismy.....	26
3. Materiál a metodika .....	28
3.1 Test na pstruhu duhovém ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) .....	28
3.2. Test na tilápii nilské ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	30
3.3. Hodnocení erytrocytů.....	32
3.3.1. Mikroskopie a snímání erytrocytů.....	32
3.3.2. Měření erytrocytů .....	33
3.3.3. Hodnocení erytrocytů pstruha duhového pomocí snímků z TEM .....	35
3.3.4. Statistické vyhodnocení.....	35
4. Výsledky .....	36
4.1. Test na pstruhu duhovém ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) .....	36
4.1.1. Vizuelní hodnocení erytrocytů pod mikroskopem .....	36
4.1.2. Měření erytrocytů .....	37
4.1.3. Pozorování erytrocytů na snímcích vytvořených TEM.....	39
4.1.4. Stanovení ukazatelů červeného krevního obrazu .....	41
4.2. Test na tilápii nilské ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	44
4.2.1. Vizuelní hodnocení erytrocytů pod mikroskopem .....	44
4.2.2. Měření erytrocytů .....	44
4.2.3. Stanovení ukazatelů červeného krevního obrazu .....	46
5. Diskuze .....	47

5.1. Test na pstruhu duhovém .....	47
5.2. Test na tilápii nilské .....	49
5.3. Porovnaní vlivu dusitanů na pstruha duhového a tilápii nilskou .....	50
6. Závěr .....	52
7. Seznam použité literatury .....	54
8. Seznam obrázků, tabulek a grafů .....	64
9. Abstrakt.....	65
10. Abstract.....	66



# 1. Úvod

Mnou vybrané téma jsem si zvolil především z toho důvodu, že jsem si po jeho přečtení dokázal bez většího hledání a zjišťování představit, o co v práci půjde. Důvodem bylo také to, že bych se o oblast toxikologie chtěl dále zajímat.

Dusitany patří mezi sloučeniny, kterým je třeba v chovu ryb, zvláště v uzavřených recirkulačních systémech, věnovat zvýšenou pozornost. Základní mechanismus působení dusitanů je již poměrně dobře popsán. Začíná vlastním aktivním příjmem dusitanů přes žábry, kde dochází k jejich kumulaci a prostřednictvím krve k distribuci do tkání v organismu. To se následně projevuje množstvím fyziologických účinků, které negativně ovlivňují organismus ryb a mají vliv na zhoršení celkového zdravotního stavu. Důsledkem působení dusitanů může být poškození různého rozsahu, ale i úhyn jedinců. Stále však nejsou dostatečně objasněny všechny účinky na rybí organismus. Mnohdy lze ve vybraných pracích dohledat u sledovaných ukazatelů téměř opačná zjištění, zejména u hematologických ukazatelů. Ale nejde jen o působení dusitanů. Z celkového hlediska ichthyohematologie ještě nejsou údaje kompletně utříděny, případně jsou velmi kusé (Tripathi a kol., 2004). Dalším problémem u dusitanů jsou faktory, které ovlivňují jejich toxicitu. Vliv chloridů je již delší dobu zřejmý a dobře prozkoumaný, ale stále jsou zde faktory, u kterých je problematické určit jejich podíl na toxicitě, protože je ve vodním prostředí nelze izolovat od ostatních tak, aby bylo umožněno přesné stanovení jejich vlivu. Jedním z těchto faktorů je hodnota pH (Lewis a Moris, 1986; Kroupová a kol., 2005). Na druhou stranu bylo v poslední době dosaženo nových, poměrně významných zjištění v oblasti ovlivnění toxicity dusitanů. Mezi ně patří vliv huminových kyselin (Meinelt a kol., 2010) a vliv parciálního tlaku kyslíku (Jensen a Hansen, 2011) na toxicitu dusitanů.

Cílem bakalářské práce bylo posoudit vliv dusitanů na hematologické ukazatele u dvou druhů ryb. Pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) zastupoval z hlediska vnímavosti vůči dusitanům citlivější druhy ryb. O jeho citlivosti svědčí i použití v biomonitorovacích zařízeních (Randák a kol., 2011). Naopak tilápie nilská (*Oreochromis niloticus*) reprezentovala spíše méně vnímavé druhy ryb. Zároveň jde ale o druh, který je často chován ve speciálních rybochovných objektech (Pokorný, 2004), kde mohou nastat problémy s dusitany (Pitter, 2009).

Vliv dusitanů byl vyhodnocen na podkladě změn erytrocytů po expozicích různým koncentracím dusitanů. Výsledky u pokusných skupin byly následně porovnány

s kontrolními neexponovanými skupinami ryb. Hodnocení bylo provedeno měřením erytrocytů a jejich jader. Několik autorů již popsalo smrštění erytrocytů po dusitanové expozici (Williams a kol., 1993; Martinez a Souza, 2002), ale vliv dusitanů na velikostní změny jader dosud popsán nebyl. Pro detailnější prozkoumání vlivu dusitanů na erytrocyty bylo u pstruha duhového použito snímání řezů erytrocytů elektronovým mikroskopem. Cílem celé práce bylo podrobněji prozkoumat vliv dusitanů na ryby.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Dusík

Dusík je bezbarvý plyn bez zápachu, který je málo rozpustný ve vodě. V atmosféře je zastoupen téměř ze 75 % (Pokorný, 2004). Z celkového množství plynů ve vodě je dusík zastoupen z 63 % (Hartman a kol., 2005). Patří mezi nejdůležitější makrobiogenní prvky. Uplatňuje se ve všech biologických procesech, které probíhají v povrchových, podzemních a odpadních vodách (Pitter, 2009).

#### 2.1.1. Formy výskytu dusíku

Dusík se ve vodním prostředí vyskytuje v několika formách (Lucas a Southgate, 2003):

- rozpuštěný plynný  $N_2$  (z atmosféry)
- rozpuštěný plynný  $NH_3$  (především jako odpadní produkt metabolismu živočichů)
- amonné ionty,  $NH_4^+$
- dusitanové ionty,  $NO_2^-$
- dusičnanové ionty,  $NO_3^-$
- v celé řadě organických molekul, živých tkáních a v neživé organické hmotě

Mezi hlavní zdroje dusíku ve vodě patří dusík z atmosféry, dusík uvolněný výluhy z půdy a dusík uvolněný mineralizací organických látek, které se ve vodním prostředí nacházejí (Hartmann a kol, 2005). Během celého ročního období dusík vstupuje do procesů, které v běžně oživené vodě probíhají. Díky tomu jeho množství v průběhu roku kolísá (Pitter, 2009).

Celkový dusík ( $N_{\text{celk}}$  nebo TN) se dále dělí na anorganicky vázaný dusík ( $N_{\text{anorg}}$ ) a organicky vázaný dusík ( $N_{\text{org}}$ ). Anorganicky vázaný dusík je ve vodě zastoupen ve třech formách – amoniakální, dusitanové a dusičnanové. Suma anorganického dusíku ve vodách je významným ukazatelem jejich znečištění. Organický dusík je obsažen v aminokyselinách a z nich tvořených dalších produktů (peptidů, polypeptidů a následně bílkovin), v aminech, nebo také v heterocyklických dusíkatých sloučeninách, které jsou součástí pro život nezbytných nukleových kyselin (Pitter, 2009).

### **2.1.2. Biochemické a chemické přeměny dusíku**

Vedle stabilních forem dusíku (molekulární dusík, dusičnany a amoniakální dusík) lze ve vodách najít formy méně stabilní, jako právě jsou dusitany. Tyto nestabilní formy podléhají biochemickým přeměnám v závislosti na faktorech, kterými jsou oxidačně redukční potenciál a hodnota pH.

Mezi možné chemické přeměny dusíku patří redukce elementárního dusíku na dusík amoniakální a redukce dusičnanů na elementární dusík. Mezi biochemické přeměny patří fixace dusíku (redukce elementárního dusíku na dusík amoniakální), nitrifikace (oxidace amoniakálního dusíku až na dusičnany) a denitrifikace (redukce dusičnanů na elementární dusík) (Pitter, 2009).

## **2.2. Dusitany**

Dusitany, nazývané také jako nitrity nebo soli kyseliny dusité (Pokorný, 2004), jsou anionty, které se přirozeně vyskytují ve vodách (Lewis a Morris, 1986). Díky svojí labilitě (snadno dochází k jejich oxidaci nebo redukci na jiné dusíkaté sloučeniny) se ve vodě vyskytují v malém množství, kde zpravidla doprovázejí dusičnany a amoniakální dusík (Svobodová a kol., 1987). Vznikají jako meziproduct bakteriální nitrifikace, což je biochemická oxidace amoniakálního dusíku a denitrifikace, při které probíhá biochemická redukce dusičnanů. Jejich další přeměna závisí na obsahu kyslíku, kdy jsou za aerobního stavu rychle transformovány nitrifikací na dusičnany, které jsou za oxických podmínek stabilní. V anaerobních podmínkách z nich denitrifikací vzniká elementární dusík a oxid dusný (Pitter, 2009).

### **2.2.1. Výskyt dusitanů ve vodách**

Uváděné koncentrace dusitanů v povrchových vodách se obvykle pohybují v řádech desetin až tisícín  $\text{mg.l}^{-1}$ . Pitter (2009) uvádí koncentrace dusitanů naměřené v pěti různých povrchových tocích v roce 2000, v rozmezí od  $0,02 \text{ mg.l}^{-1}$  (Vltava – Vyšší Brod) do  $1,35 \text{ mg.l}^{-1}$  (Bílina). Při porovnání určitých období lze zaznamenat snížení koncentrací dusitanů v povrchových vodách, kdy byl v letech 1994 – 1999 obsah dusitanů ve vodách v rozmezí  $0,43 – 0,54 \text{ mg.l}^{-1}$ . V průběhu dalších let 2000 – 2005 bylo zaznamenáno mírné snížení koncentrací dusitanů v povrchových vodách na hodnoty  $0,26 – 0,43 \text{ mg.l}^{-1}$  (ČHMÚ, 2007 In: Kroupová, 2007).

V legislativě jsou dusitany uvedeny jako nebezpečné závadné látky (Příloha č. 1 zákona č. 254/2001 Sb.) a v odst. 4 a 6 § 39 vodního zákona (254/2001 Sb.) jsou uvedena odpovídající opatření při nakládání s nimi. Požadavek pro koncentraci dusitanového dusíku je stanoven v příloze č. 3 k nařízení vlády č. 61/2003 Sb., ukazatelé vyjadřující stav vody ve vodním toku, normy environmentální kvality a požadavky na užívání vod. Podle tohoto nařízení platí limity pro vody lososové  $0,09 \text{ N-NO}_2^-$  v  $\text{mg.l}^{-1}$  ( $0,295 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ ) a pro vody kaprové  $0,14 \text{ N-NO}_2^-$  v  $\text{mg.l}^{-1}$  ( $0,46 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ ).

### **2.2.1.1 Zdroje dusitanů ve vodách**

Dusitany lze z hlediska znečištění vodního prostředí rozdělit stejně jako u dalších látek na bodové a plošné. Mezi bodové zdroje znečištění patří rybochovné systémy, septiky, průmyslové odpadní vody (výroba kovů, barev, papírenský průmysl), čistírny odpadních vod, ale může jím být i nerovnováha mezi druhy nitrifikačních bakterií. Mezi plošné zdroje patří rostlinná a živočišná výroba, exhalace při provozu automobilů, výluhy ze skládek odpadů atd. (Russo, 2006).

Díky výše zmíněné nestálosti má přítomnost dusitanů indikační význam, kdy například náhlé zvýšení koncentrací v podzemních vodách může být důsledkem fekálního znečištění, při kterém je amoniakální dusík nitrifikován na dusitany. U zvýšených koncentrací dusitanů by bylo možné také uvažovat o znečištění průmyslového původu. V úvahu by připadaly úniky odpadních vod ze strojírenských závodů, kde se podle Pittera (2009) nacházejí desítky až stovky  $\text{mg.l}^{-1}$  dusitanů.

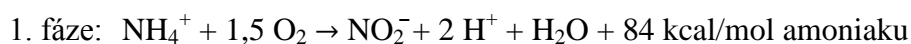
### **2.2.2. Dusitany v rybochovných systémech**

Zvýšené koncentrace dusitanů (až jednotky  $\text{mg.l}^{-1}$ ) se vyskytují v intenzivních chovech ryb, kde je využívána recirkulace vody (Pitter, 2009; Stoskopf, 1993; Svobodová a kol., 2005a). Hlavním zdrojem dusitanů v těchto systémech je amoniak, který je hlavním odpadním produktem metabolismu ryb (Mazik a kol., 1991; Brown, 1993). Samotný amoniak pak může být ve své volné formě  $\text{NH}_3$ , která se uvolňuje z kationtu  $\text{NH}_4^+$ , silně toxický v závislosti na teplotě a pH vody (Pokorný a kol., 2003). Dalším zdrojem dusitanů může být i redukce dusičnanů na dusitany při dezinfekci vody UV zářením (Pitter, 2009), které je používáno v akvakultuře (Kouřil a kol., 2008). Ve správně fungujícím recirkulačním systému však zpravidla k hromadění dusitanů ve

vodě nedochází, právě díky jejich bezprostřední oxidaci na dusičnany (Svobodová a kol., 2003)

Oxidaci neionizovaného amoniaku na dusitany zajišťují bakterie rodů *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* a *Nitrosovibrio*. Bakterie oxidující dusitany na dusičnany náleží do rodů *Nitrobacter*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira* a *Nitrospina* (Kouřil a kol., 2008). Rod *Nitrobacter* je Stoskopfem (1993) uváděn jako velmi citlivý, především ve vztahu ke změnám teplot (z toho následně plyne i nebezpečí narušení funkce filtru při poklesu teploty).

Rovnice reakce oxidace amoniaku až na dusičnany podle Kouřila a kol. (2008):



Pokud druhá fáze nitrifikace neprobíhá dostatečně rychle a efektivně, dochází v systému k hromadění dusitanů, které bývají pro svou toxicitu příčinou zhoršení zdravotního stavu ryb a mnohdy i jejich masového úhynu (Svobodová a kol., 2005a).

Snížená účinnost filtrů může být zapříčiněna několika možnými faktory:

- Vysokou obsádkou ryb, kdy může dojít k hromadění metabolitů v systému (Svobodová a kol., 2003).
- Nedostatečným rozvojem nitrifikačních bakterií na biologických filtrech bezprostředně po zahájení provozu (Svobodová a kol., 2005a).
- Zničením nitrifikačních bakterií po provedeném léčebném zásahu antibiotiky (Svobodová a kol., 2005a; Kouřil a kol., 2008).
- Inhibicí nitrifikace, která může být způsobena poklesem pH, snížením teploty, snížením obsahu kyslíku rozpuštěného ve vodě, vysokou koncentrací amoniaku, rozpuštěným chlórem ve vodě, nebo zvýšeným obsahem nerozpuštěných látek, kdy pak heterotrofní bakterie narostou na biologických filtrech rychleji, a navíc budou nitrifikačním bakteriím spotřebovávat kyslík rozpuštěný ve vodě (Kouřil a kol., 2008).

Následující preventivní opatření přispívají k minimalizaci rizik spojených s úhyny v recirkulačních systémech:

- Nasazování takové obsádky ryb, která odpovídá kapacitě recirkulačního systému s tím, že nasazení ryb je podmíněno dostatečným zapracováním biologických filtrů (Svobodová a kol., 2003).
- Provádění průběžné kontroly v podobě stanovení prvků, které mají význam z hlediska toxicity dusitanů – koncentrace kyslíku, amoniaku, dusitanů, dusičnanů, chloridů a hmotnostní poměr chloridů a dusitanů (Svobodová a kol., 2003).
- Při případných léčebných zásazích, kdy je nutné použít antibiotika ve formě koupelí, je tuto proceduru nutno provádět mimo recirkulační systém (Svobodová a kol., 2003).
- Zajištění dostatečného prokysličování vody. Při vysokých koncentracích amoniaku snížit pH vody pod 7. Při vysokých koncentracích dusitanových iontů zvýšit koncentraci chloridů o 50 až 100 mg.l<sup>-1</sup>, případně podpořit oživení biologického filtru aktivovaným kalem z dobře fungující ČOV (Svobodová a kol., 2003).
- Krmit ryby přiměřenou krmnou dávkou (Svobodová a kol., 2005a).
- Při již zjištěné otravě dusitany uvádí Brown (1993) použití metylenové modře, která napomáhá zpětné přeměně methemoglobinu zpět na hemoglobin. Přidaná methylenová modř slouží jako donor elektronu pro NADPH methemoglobin reduktázu (Saleh a McConkey, 2012). Zároveň je ale třeba tento zásah provádět stejně jako u antibiotik mimo recirkulaci z toho důvodu, že by mohlo dojít k poškození biologického filtru (Brown, 1993) a následnému vzrůstu obsahu amoniaku (Treves-Brown, 2000).
- Použití huminových kyselin, které snižují toxicitu dusitanů i amoniaku (Meinelt a kol., 2010).

## 2.3. Toxicita dusitanů

### 2.3.1. Mechanismus toxicity dusitanů

Hlavním principem toxického účinku dusitanů je přeměna hemoglobinu na hnědě zbarvený methemoglobin, který není schopen vázat a transportovat kyslík (EIFAC, 1984). To je způsobeno postupem dusitanů přes žaberní aparát do krve a červených krvinek (Cameron, 1971).

Sladkovodní ryby žijí na rozdíl od mořských ryb v prostředí, které má nižší koncentraci solí než jejich organismus. Do jejich těla trvale proniká voda, které se musí zbavovat, a naopak ionty solí musí ryby aktivně přijímat, jelikož mají tendenci z těla unikát. Jejich moč je tedy hypoosmotická. Hlavním místem ztráty sodíkových a chloridových iontů je kůže, která je pro vodu propustná (Dubský a kol., 2003).

Příjem potřebných iontů je zprostředkován žábry, které jsou hlavním orgánem zajišťujícím osmoregulaci. Další zdrojem nedostatkových iontů je potrava ryb a zpětné vstřebávání iontů v ledvinných kanálcích. (Maetz, 1971)

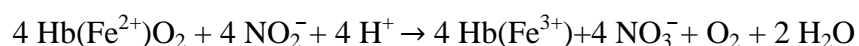
Chloridové buňky zajišťují výměnu  $\text{Na}^+$  za  $\text{H}^+$  nebo za  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{Cl}^-$  za  $\text{HCO}_3^-$  (Dubský a kol., 2003). Tímto mechanismem je kompenzováno vylučování chloridových iontů kůží. Problém je v tom, že dusitany mají schopnost proniknout do organismu přes chloridové buňky žaberního epitelu, kde mají afinitu k výměně chloridových a hydrogenuhličitanových iontů. V případě vyšších koncentrací dusitanů ve vodě dochází podle výše uvedeného mechanismu k určité kompetici, kdy dusitany jsou aktivně přijímány na úkor chloridů. (Jensen, 2003; Kopp a kol., 2009).

Po resorpci dusitanů dochází k otravě (toxikóze), která je zapříčiněna vlastním účinkem jedy a reakcí organismu na jeho působení (Lucký, 1978). Podle afinity dusitanů k červeným krvinkám je lze považovat za oběhové a krevní jedy. Působí centrálně (skrze vazomotorické centrum) i periferně a také poškozují cévy. Dusitany způsobují cyanózu a mění krevní barvivo hemoglobin na derivát methemoglobin (Piskač a kol., 1985).

Po výše zmíněném prostupu dusitanů do krve a erytrocytů dochází k reakcím s hemoglobinem za vzniku jeho dalších derivátů a také za vzniku sloučenin dusíku.

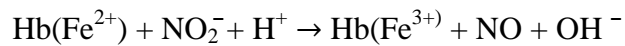
Tyto reakce jsou vyjádřeny rovnicemi podle Jensena a Rohde (2010):

- Reakce oxyhemoglobinu s dusitanem za vzniku methemoglobinu a dusičnanu.

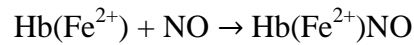




- Reakce hemoglobinu a dusitanu za vzniku methemoglobinu a oxidu dusnatého.



- Reakce hemoglobinu s oxidem dusným za vzniku nitrosylhemoglobinu.



### 2.3.1.1. Diagnostika otravy dusitany

Typickým patomorfologickým nálezem je hnědé zbarvení krve a žaber (Svobodová a kol., 2008). Tento jev může být pozorován při koncentracích dosahujících hladiny 20 – 30% obsahu methemoglobinu v krvi (Brown, 1993; Stoskopf, 1993). Jako další součást diagnostiky otravy dusitany se provádí analýza vody, kdy se zjišťuje obsah chloridů a dusitanů a na základě poměru mezi  $\text{Cl}^-$  a  $\text{N-NO}_2^-$  tzv. chloridové číslo (Svobodová a kol., 2008). Určitým anamnestickým vodítkem může být i místo chovu ryb, především jedná-li se o recirkulační systém. Otrávené ryby projevují nespecifické změny chování, které jsou uvedeny dále v textu.

### 2.3.1.2. Mechanismus detoxikace

Vodní živočichové jsou schopni detoxikovat dusitany oxidací na dusičnany. Část detoxikace probíhá v játrech a část v červených krvinkách, které obsahují enzym methemoglobin-reduktázu (Doblender a Lackner, 1996) redukující methemoglobin na hemoglobin. K odbourávání dusitanů slouží také cytochrom b5-reduktáza (Saleh a McConkey, 2012). Normální hladiny hemoglobinu v krvi lze dosáhnout po převedení ryb do „bezdusitanové“ vody za cca 24 – 72 hodin (Svobodová a kol., 1992; Knudsen a Jensen, 1997; Kroupová a kol., 2006b).

### 2.3.2. Faktory ovlivňující toxicitu dusitanů

Stejně jako u dalších toxických látek, tak i u dusitanů je jejich toxicita ovlivněna řadou faktorů (Svobodová a kol., 2007). Letální koncentrace dusitanů se pohybují v rozmezí 0,3 – 300  $\text{mg.l}^{-1}$   $\text{NO}_2^-$  (Svobodová a kol., 2008). Toxické účinky jsou tedy velmi rozdílné a závislé především na obsahu chloridů, vápníku, ale i jiných sloučenin ve vodě (Svobodová a kol., 2008; Lucký, 1986). Právě kvůli vysoké závislosti toxicity dusitanů lze považovat za korektní ty testy, u kterých jsou známy i ostatní parametry

vody, jako je koncentrace chloridů a poměr mezi chloridy a dusitanovým dusíkem (EIFAC, 1984; Lucký, 1986).

## Chloridy

Nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím toxicitu dusitanů je koncentrace chloridů ve vodě (Svobodová a kol., 2008; EIFAC, 1984). Mezi chloridovými a dusitanovými ionty existuje na chloridových buňkách kompetice. V případě vyšší koncentrace chloridů ve vodě jsou chloridové buňky přednostně obsazovány chloridy a vstřebávání dusitanů je sníženo. Proto je při posuzování toxicity dusitanů pro ryby nutné znát nejen koncentraci dusitanů, ale i koncentraci chloridů (Svobodová a kol., 2008). Poměr mezi dusitany a chloridy je uváděn jako chloridové číslo. Pro maximální ochranu pstruha duhového by tento poměr měl být vyšší než 17 (Svobodová a kol., 1987). Bath a Eddy (1980) uvádějí jako ideální poměr mezi  $\text{Cl}^-$  a  $\text{N-NO}_2^-$  15. Kopp a kol. (2012) doporučuje udržovat v recirkulačním systému pro chov pstruha duhového koncentraci chloridů nejméně na hodnotě  $15 \text{ mg.l}^{-1}$ . Tato koncentrace by měla předejít výrazným problémům s dusitany až do koncentrací kolem  $0,5 \text{ mg.l}^{-1} \text{ N-NO}_2^-$ , a nebo by měla prodloužit dobu, kdy nedojde k výrazným ztrátám a vyšší koncentrace dusitanů ještě řešitelné úpravou obsahu chloridů ve vodě.

Stoskopf (1993) uvádí pro výpočet potřebné koncentrace chloridů k ochraně ryb před dusitany tento vzorec:

$$\text{Potřebné } \text{Cl}^{-1} \text{ v } \text{mg.l}^{-1} = (5 * \text{NO}_2^-) - (\text{Cl}^-)$$

Kde  $\text{NO}_2^-$  je koncentrace dusitanů naměřená ve vodě v  $\text{mg.l}^{-1}$  a  $\text{Cl}^-$  je koncentrace chloridů naměřená ve vodě.

**Tab. č. 1.** Minimální hodnoty chloridů, které jsou obecně považovány za bezpečné při různých koncentracích dusitanů. Podle Brown (1993).

potřebné chloridy v $\text{mg.l}^{-1}$	Obsah dusitanů ve vodě v $\text{mg.l}^{-1}$	
	Lososovité	Kaprovité
1	0,01	0,02
5	0,05	0,10
10	0,09	0,18
20	0,12	0,24
40	0,15	0,30

Welker a kol. (2011) zaznamenal částečné snížení mortality díky přidání NaCl do krmiva v průběhu testů toxicity na sumečku tečkovaném (*Ictalurus Punctatus*). Díky přidání NaCl do krmiva Welker a kol. (2012) popisuje efekt přidání při 5 a 10 týdenní expozici dusitanům ( $69 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ ) na zvýšení přírůstku u tilápie nilské (*Oreochromis niloticus*) oproti rybám, které nebyly krmeny krmivem s 6% přídavkem NaCl. Vliv na mortalitu byl zanedbatelný, což je ale nejspíše dáno tím, že tilápie nilská patří k rybám odolnějším vůči dusitanům.

### **Kationty a další ionty**

Toxicitu dusitanů rovněž snižují hydrogenuhličitany, vápník a další ionty, ale jejich účinnost je v porovnání s chloridy menší (Svobodová a kol., 1987). Účinek vápníku spočívá především ve snížení propustnosti žaberního aparátu. To vede ke snížení transportu vody a elektrolytů mezi vnějším prostředím a krevní plazmou (Stoskopf, 1993). Crawford (1975) uvádí vliv obsahu vápníku na snížení toxicity dusitanů ve vztahu k mortalitě pro lososa jak ve slané, tak i sladké vodě. Obsah vápníku však neměl žádný vliv na podíl methemoglobinu v krvi.

### **pH vody**

Samostatný vliv pH vody na toxicitu dusitanů lze velmi problematicky určit, jelikož jsou ve vodě přítomny i další ionty (Lewis a Morris, 1986).

Pozitivní vliv vyšších hodnot pH na menší obsah dusitanů v hemolymfě a na vyšší obsah oxyhemocyaninu u krevety *Penaeus monodon* uvádějí Chen a Cheng (2000). Ochranný efekt byl zaznamenán až při pH 9,8 což je hodnota, která se blíží horní přípustné hranici pro kaprovité ryby (10,8), resp. již přesahuje přípustné hodnoty pro ryby lososovité (9,2) (Svobodová a kol., 1987). V chovu ryb je ale toto opatření téměř neaplikovatelné a velmi nebezpečné. Zvýšení pH by mohlo spolu s vyšší teplotou zapříčinit zvýšení koncentrace nedisociovaného amoniaku, který je pro ryby prudce toxický (Pitter, 2009). Díky tomu se jeví manipulace s pH za účelem ovlivnění toxicity dusitanů nepříliš použitelná. Toxicitu dusitanů by bylo možné ovlivnit i snížením pH na hodnotu 3,35, kdy dochází k vyrovnání poměru  $\text{HNO}_2$  a  $\text{NO}_2^-$  (Pitter, 2009). Ale zde opět nastává problém nebezpečnosti takto nízkého pH pro ryby, které je pro lososovité i kaprovité ryby v hodnotách, kdy již dochází k poškození a úhynu (Svobodová a kol., 2007).

## Teplota vody

Vliv nižších teplot na snížení toxicity dusitanů zaznamenali Funmilola a Kundirat (2011), kdy u keříčkovce červenolemého (*Clarias gariepinus*) byla zaznamenána nižší mortalita při teplotě 27 °C oproti 35 °C. Kroupová a kol., (2006a) také uvádí u kapra obecného (*Cyprinus carpio*) pozitivní vliv nižší teploty na koncentraci dusitanů v plazmě, kdy při teplotě 14 °C byla hodnota dusitanů v krvi poloviční na rozdíl od koncentrace dusitanů při 20 °C. Tyto výsledky všeobecně odpovídají tomu, že s vyšší teplotou roste i toxicita, jak uvádí Svobodová a kol. (2007). Ale jsou popsány i pokusy, kde je možné říci, že existuje určitý rozsah teplot, ve kterém nejsou ryby tolik postiženy toxickými účinky dusitanů. Tento jev uvádějí Alcaraz a Espina (1995), kdy ve studii na juvenilním amuru bílém (*Ctenopharyngodon idella*) při třech různých teplotách, byla zaznamenána menší toxicita u větších ryb (7,6 g) při teplotě 29 °C než při 24 °C a 31 °C. Je možné, že tato teplota může být pro biochemické a enzymatické reakce, které se týkají odbourávání dusitanů, výhodnější. Naopak je uvedena menší toxicita dusitanů u ryb o hmotnosti 0,02 g při teplotě 24 °C než při 29 °C a 31 °C. To ukazuje na to, že různé hmotnostní kategorie ryb mají různé teplotní preference.

## Obsah kyslíku ve vodě

Kyslík také může ovlivňovat toxicitu dusitanů, jelikož dusitany snižují kyslíkovou transportní kapacitu krve, tudíž mají vyšší požadavky na kyslík ve vodě (Kroupová a kol., 2005; Svobodová a kol., 1987). V rozporu s těmito poznatky popisují Jensen a Hansen (2011) pozitivní vliv nižšího parciálního tlaku kyslíku ve vodě, kdy dochází k nižší míře negativního ovlivnění různých ukazatelů, které jsou u exponovaných ryb typické (např. obsah hemoglobinu, methemoglobinu, nitrosilhemoglobinu, ale i nižší obsah dusitanů ve svalové tkáni ryb). To může znamenat, že příjem dusitanů je značně závislý na tlaku kyslíku ve vodě, ale také to může souviset se sníženou aktivitou syntázy oxidu dusnatého a zvýšenou schopnost tkání využít dusitany během hypoxie.

## Druh a věk ryb

Obecně platí, že mořské ryby jsou více tolerantní k dusitanům než ryby sladkovodní. Z nejvíce odolných sladkovodních ryb lze jmenovat okounka pstruhového (*Micropterus salmoides*) z čeledi okounkovitých (*Centrarchidae*), u kterého byla zaznamenána hodnota 96hLC50 140,2 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Palachek a Tomasso, 1984a), 48hLC50 882 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Kroupová a kol., 2012). Mezi další odolné čeledi

patří ještě okounovití (*Percidae*) a štikovití (*Esocidae*). Mezi méně odolné čeledi patří lososovití (*Salmonidae*), sumečkovití (*Ictaluridae*) a kaprovití (*Cyprinidae*). U těchto čeledí mohou koncentrace dusitanů nižší než  $1,7 \text{ mg.l}^{-1}$  způsobit, za předpokladu nízkých koncentrací chloridů v prostředí akutní methemoglobinémii (Stoskopf, 1993). Russo (2006) považuje za nejvíce citlivé ryby lososovité a naopak za nejodolnější čeled' okounovitých.

Vzhledem k věku ryb jsou za odolnější pokládány mladší ročníky (Lewis a Morris, 1986; Kroupová a kol., 2005). Významný rozdíl mezi hodnotami 96hLC50 uvádí Voslářová a kol. (2006) u dánia pruhovaného (*Danio rerio*) ve stáří 20 – 25 dnů v porovnání s jedinci starými 2 – 3 měsíce.

### **2.3.3. Vliv dusitanů na ryby**

Změny způsobené dusitany mají největší dopad na dýchání, kdy vlivem poškození žaberního aparátu a snížením transportní kapacity krve pro kyslík dochází k dušení ryb. Tento jev je zhoršen i patologickými změnami na játrech a ledvinách, které se z dlouhodobějšího hlediska projevují v podobě různých problémů, jako je snížení růstu, zhoršení produkčních ukazatelů atd. (Korwin-Kossakowski a Ostaszewska, 2003). Lze očekávat i větší citlivost vůči teplotám, které danému druhu nevyhovují (Watenpaugh a kol., 1985). V důsledku celkového oslabení a poškození organismu jsou chované ryby náchylnější na onemocnění (Hanson a Grizzle, 1985).

#### **2.3.3.1. Vliv dusitanů na chování ryb**

Vyšší obsah methemoglobinu v krvi (70-80%) je doprovázen změnou chování ryb, která je pozorována jako malátnost. Při dalším zvýšení obsahu methemoglobinu v krvi ryby ztrácejí orientaci a schopnost reagovat (Svobodová a kol., 1987), často jsou pozorovány i křeče (Svobodová a kol., 2007), které předcházejí ztrátě reflexů a následnému úhynu (Svobodová a kol., 2008). Další pozorované změny chování ryb popisují autoři obvykle jako apatii, pomalý příjem krmiva, nepravidelné plavání, dezorientaci, narážení do stěn nádrže, ztrátu únikového reflexu a rovnováhy, polehávání na dně, nouzové dýchání a nepravidelné dýchací pohyby (Das a kol., 2004; Funmilola a Kudirat, 2012; Zhang, 2012; Ekwe a kol., 2012; Brown, 1993; Kroupová a kol., 2008).

#### **2.3.3.2. Vliv dusitanů na růst ryb a další produkční ukazatele**

Negativní vliv dusitanů se v rybochovném zařízení může projevit jednak přímo úhynem chovaných jedinců, ale i řadou vedlejších zdravotních komplikací, jako jsou snížený růst až ztráta hmotnosti (Svobodová a kol., 2005a). Jako zvláště citlivá se jeví raná stádia ryb, u kterých pak mohou mít exponovaní jedinci ve srovnání s kontrolou poloviční hmotnost (Voslářová a kol., 2008).

Jako následek expozice dusitanům bylo zjištěno i zhoršení produkčních ukazatelů. Šlo o snížení specifické rychlosti růstu, hodnoty přírůstku u jednotky krmiva a zvýšení spotřeby krmiva na kilogram přírůstku (Kroupová a kol., 2010; Voslářová a kol., 2008; Siikavuopio a Saether, 2006; Frances, 1998; Kroupová a kol., 2008). Tyto změny lze zaznamenat již po několika týdnech expozice. Voslářová a kol. (2008) uvádí snížení

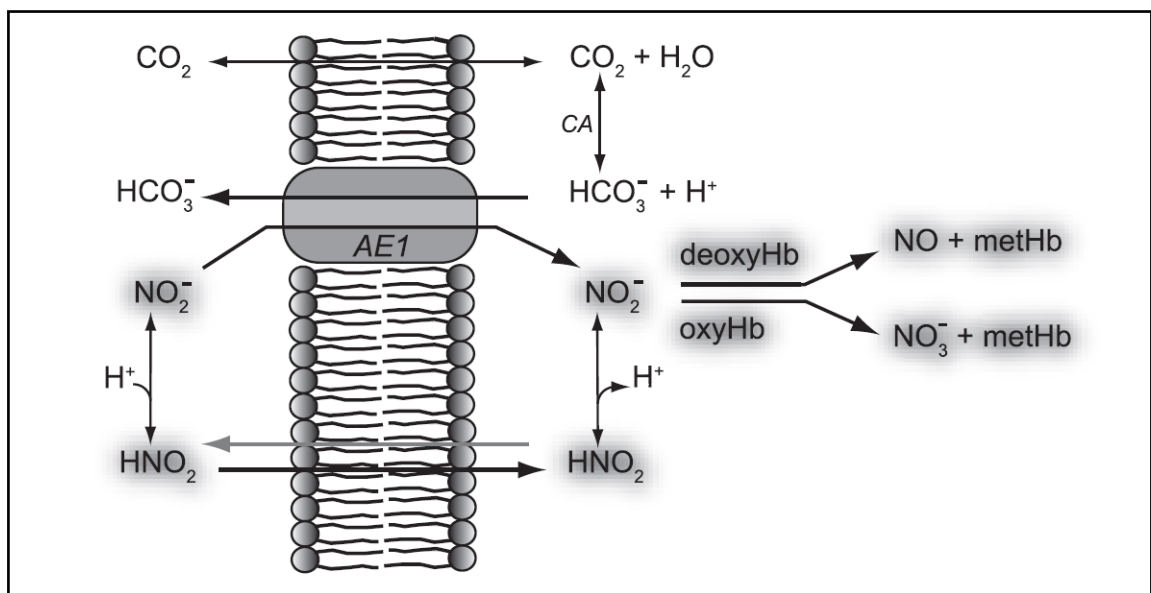
hmotnosti po 28 dnech expozice dánia pruhovaného (*Danio rerio*) ve vodě obsahující 15 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Svobodová a kol. (1992) zaznamenala snížení růstu při takových koncentracích dusitanů, u kterých dochází k navýšení obsahu methemoglobinu v krvi na 20 – 40 %. Ale vzhledem k širokému rozpětí letálních koncentrací (0,3 – 300 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Svobodová a kol., 2008) a možnosti ovlivnit toxicitu dusitanů dalšími faktory, lze očekávat i značnou proměnlivost vlivu dusitanů na růst a další produkční ukazatele.

Dusitany ovlivňují i vývoj embryí. Kroupová a kol. (2010) zaznamenala výskyt vyššího počtu malformací (poruchy vývoje páteře, deformace a otok žloutkového váčku, deformace očí, atd.) u kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Teratogenní vliv dusitanů u dánia pruhovaného (*Danio rerio*) popisuje Simmons a kol. (2012), který zaznamenal zvýšený výskyt ryb s nenaplněným plynovým měchýřem, edémem žloutkového váčku a kraniofaciálními malformacemi.

### 2.3.3.3. Vliv dusitanů na hematologické a biochemické parametry

#### Vliv dusitanů na erythrocyty

Bylo prokázáno, že dusitany, které se kumulují v těle ryb, poškozují erythrocyty. Z pokusů na savcích vyplývá, že dusitany jsou mimo jiné i zdrojem oxidu dusnatého. Při příjmu dusitanů červenými krvinkami dochází v hypoxickém prostředí k vnitrobuněčné reakci s hemoglobinem, za vzniku oxidu dusnatého (Jensen a Rohde, 2010).



**Obr. č. 1.** Schéma Jensena a Rohde (2010), které znázorňuje příjem dusitanů skrze erythrocytální membránu a následnou oxidaci hemoglobinu.

Dusitany z krevní plazmy (vlevo) pronikají do cytosolu erytrocytu buďto aktivním kotransportem za  $\text{HCO}_3^-$  přes anex (anion exchanger) (AE1), nebo prostou difúzí přes lipidovou dvouvrstvu ve formě  $\text{HNO}_2$ . Při prostupu dusitanů přes anex je také během Jacobs-Stewartova cyklu katalyzována reakce hydrogenuhličitanu s vodíkovým protonem za vzniku oxidu uhličitého a vody. Katalyzátorem je anhydráza kyseliny uhličité (CA). Oxid uhličitý opouští buňku lipidovou dvouvrstvou. Po vstupu do buňky reagují dusitany s hemoglobinem za vzniku methemoglobinu. Během této reakce jsou spotřebovávány nitrobuněčné dusitany, což následně vede k rychlému doplňování dusitanů z vnějšího prostoru. Erytrocytální příjem dusitanů je tedy řízen rychlostí reakce. Během těchto reakcí vzrůstá následkem zvýšené rychlosti oxidace hemoglobinu spotřeba nitrobuněčného kyslíku a klesají hodnoty pH (Jensen a Rohde, 2010).

Gladwin a kol. (2004) popsal mechanismus redukce dusitanů na NO, kdy samotný hemoglobin funguje v podstatě jako dusitan reduktáza. Vzniklý oxid dusnatý pak rychle reaguje se superoxidem ( $\text{O}_2^-$ ) za vzniku vysoce reaktivního peroxydusitanu (ONOO<sup>-</sup>). Pokud koncentrace peroxydusitanů přesáhnou možnosti detoxikačního mechanismu, může dojít k oxidativnímu poškození erytrocytů, tj. denuraci důležitých proteinů včetně hemoglobinu, komponentů membrán erytrocytů apod. (Romero a kol., 2006), ale i k oxidaci dalších hemových proteinů (Jensen, 2003).

Důsledkem působení dusitanů je smrštění erytrocytů (Williams a kol., 1993; Martinez a Souza, 2002), které souvisí se zvýšenou extracelulární hladinou draslíku. Dusitany totiž aktivují vyplavování draslíku především z kosterního svalstva a erytrocytů (Jensen a kol., 1987). Ztrátu draslíku z erytrocytů uvádí i Knudsen a Jensen (1997), a to jako 1/6 z celkového intracelulárního obsahu draslíku. Autoři popisují vyplavení největšího množství draslíku z buněk již během prvního dne, kdy při pokusech zvýšené hladiny draslíku s menšími odchylkami koreluje se zvýšením obsahu dusitanů v plazmě (Jensen a kol., 1987). Tímto způsobem může dojít ke smrštění erytrocytů, ale i k dalším buněčným poškozením, kterými jsou rozpad erytrocytů, poškození erytrocytální membrány s následnou dysplazií a jadernou pyknózou (Korwin-Kossakowski a Ostaszewska, 2003). V souvislosti se smrštěním erytrocytů bylo zaznamenáno i snížení obsahu intracelulární vody (Madison a Wang 2006). Mezi další pozorované změny patří zvýšený výskyt nekrotických buněk (Korwin-Kossakowski a Ostaszewska, 2003).

Mikroskopickým vyšetřením byl po dusitanové expozici zaznamenán zvýšený počet erytrocytů protáhlého tvaru s depolarizovaným jádrem a projasněnou



cytoplazmou (Drastichová a kol., 2006; Svobodová a kol., 2005b). Jako příčina projasnění cytoplazmy bývá v souvislosti s otravami udávána nízká koncentrace hemoglobinu v erytrocytech, která je způsobena poklesem syntézy hemoglobinu (Klaassen, 2001). Terminálním důsledkem celkového působení dusitanů na erytrocyty může být až hemolytická anémie (Scarano a Saroglia, 1984).

### **Změny ukazatelů červeného krevního obrazu**

Typickými změnami vyvolanými dusitany je snížení počtu erytrocytů, pokles hematokritu, hemoglobinu a naopak zvýšení methemoglobinu (Svobodová a kol., 2005b; Kroupová a kol., 2006b; Park a kol., 2006, Drastichová a kol., 2006). Pokles počtu červených krvinek by mohl být způsoben předčasným stárnutím erytrocytů v důsledku zvýšených energetických nároků na činnost detoxikačních enzymů včetně methemoglobin reduktázy (Kroupová, 2007; Zusková a kol., 2013).

Krev ryb obsahuje běžně do 10 % methemoglobinu. Pokud obsah methemoglobinu nepřesáhne 50 %, dochází k nízké nebo minimální mortalitě (Lucas a Southgate, 2003; Svobodová a kol., 2008). Toleranci až k 50 % obsahu methemoglobinu v krvi uvádí i EIFAC (1984). Hodnoty převyšující 20 % obsahu methemoglobinu v krvi by však již měly být pokládány za varující (Svobodová a kol., 2008).

Po dusitanové expozici bylo zjištěno zvýšení střední barevné koncentrace (MCHC) (Drastichová a kol., 2006; Svobodová a kol., 2005b; Knudsen a Jensen, 1997; Aggergaard a Jensen, 2001), což je spolu s poklesem hematokritu následkem snížení objemu erytrocytů (Madison a Wang, 2006). Další změny v hodnotách středního objemu erytrocytu (MCV) a hemoglobinu erytrocytu (MCH) jsou při porovnání různých výsledků velmi proměnlivé (Avilez a kol., 2004; Drastichová a kol., 2006; Svobodová a kol., 2005b)

U leukocytů dochází po expozici ryb dusitanům k snížení jejich počtu (Ajani a kol., 2007; Svobodová a kol., 2005b). Tyto snížené hodnoty všeobecně souvisí s celkovým zhoršením zdravotního stavu v důsledku stresem indukovanému snížení nespecifické imunity (Dubský a kol., 2003).

### **Změny biochemických parametrů a iontů krevní plazmy**

Po dusitanové expozici dochází ke zvýšení koncentrace glukózy v plazmě (Kroupová a kol., 2008; Ciji a kol., 2012). Tento jev je zdůvodňován tak, že organismus mobilizuje své energetické zásoby, aby byl schopen útěku z nepříznivého prostředí.

Zvýšení je ale pouze přechodné, po určité době dochází k vyčerpání energetických zásob, a proto dochází k návratu na původní hodnoty (Ajani a kol., 2007). Podobným způsobem lze zdůvodnit i zvýšení koncentrace kortisolu, který zvyšuje pohotovost organismu při stresových reakcích (Ajani a kol., 2007; Ciji a kol., 2012).

Další změnou je nárůst plazmatické koncentrace draslíku, který je vyplavován z kosterního svalstva a erytrocytů (Jensen, 2003; Knudsen a Jensen, 1997). K hyperkalémii dochází již po 30 – 60 minutách expozice (Huertas a kol., 2002; Kroupová a kol., 2006a; Avilez a kol., 2004).

Snížení obsahu chloridů v plazmě lze zdůvodnit vlastním mechanismem otravy, kdy dusitany nahrazují chloridy a dochází k příjmu dusitanů na úkor chloridů (Jensen, 2003; Kopp a kol., 2009). Snížený obsah chloridů je popsán mnoha autory (Kroupová a kol., 2006a; Gisbert a kol., 2004; Ciji a kol., 2012). Tímto mechanismem dochází ke zvýšení koncentrace (akumulaci) dusitanů v krevní plazmě (Madison a Wang, 2006; Kroupová a kol., 2008; Knudsen a Jensen, 1997; Vedel a kol., 1998), která dosahuje několikanásobných hodnot oproti koncentracím dusitanů ve vodě. Avilez a kol. (2004) uvádí, že koncentrace dusitanů po expozici byla v krevní plazmě třicetkrát vyšší než ve vodě.

#### **2.3.3.4. Vliv na oběhovou soustavu a respiraci ryb**

Rychlou odezvou na zvýšené koncentrace dusitanů ve vodě je zvýšení srdeční a ventilační činnosti, která kompenzuje snížený obsah kyslíku v krvi (Aggergaard a Jensen, 2001; Williams a kol., 1993). Při delší expozici (více jak 24h) dochází k silnější methemoglobinémii a zvýšení ventilační činnosti již není dostatečné pro udržení aerobního metabolismu. Začíná převládat metabolismus anaerobní, který se projeví zvýšením obsahu laktátu v krvi (Williams a kol., 1993; Paula-Silva a Pires-Lopes, 2000). V důsledku hypoventilace a následné respirační alkalózy se zvyšuje i pH krve (Aggergaard a Jensen, 2001; Jensen a kol., 1987).

#### **2.3.3.5. Vliv dusitanů na tkáň a orgány ryb**

##### **Změny v játrech a ledvinách**

Vlivem dusitanů dochází k silnému poškození hematopoetické tkáně jater a ledvin. Histologicky se v tkáních projevuje nekróza, která je doprovázena celkovou atrofií orgánů. V játrech lze pozorovat zvýšený výskyt hepatocytů s pyknotickým jádrem (Korwin-Kossakowski a Ostaszewska, 2003). Jako v dalších tkáních, tak i v játrech mají

dusitany schopnost se akumulovat (Huertas a kol., 2003). V důsledku poškození hlavních krvevorných orgánů lze z dlouhodobějšího hlediska očekávat změny hematologických ukazatelů.

### **Změny v žaberním aparátu**

Histologický nález na žábrách zahrnuje především hypertrofii epitelálních, chloridových a hlenových (slizových) buněk, které způsobují zvýšenou produkci hlenu (Gisbert a kol., 2004; Korwin-Kossakowski a Ostaszewska, 2003; Park a kol., 2007). U žaberních lístků bylo pozorováno jejich vzájemné spojení (částečná fúze) (Wuertz a kol., 2013). Dále byl zaznamenán zvýšený počet hypertrofických, hyperplastických a nekrotických chloridových buněk a následně celkový edém žaber (Kroupová a kol., 2008; Svobodová et al., 2005b). Na žábrách ryb také dochází ke kumulaci dusitanů (Margiocco a kol., 1983; Huertas a kol., 2002).

## **2.4. Hodnocení toxicity pro vodní organismy**

Ekotoxicita jednotlivých chemických látek, chemických přípravků, včetně pesticidů, a odpadů se posuzuje podle výsledků toxicity na rybách a ostatních vodních organismech. Standardizace testů je prováděna mezinárodními organizacemi ISO (International Organization for Standardization) a OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Metodiky OECD uvádějí následující testy toxicity na rybách (Svobodová a kol., 2007):

- č. 203 test akutní toxicity – výsledkem je koncentrace, která vyvolá 50% úhyn ryb v průběhu 96 hodinového testu (96hL50);
- č. 204 prolongovaný test toxicity; 14ti denní – výsledkem je koncentrace která vyvolá 50% úhyn ryb v průběhu 14ti denního testu (14dLC50), dále koncentrace, která nezpůsobuje poškození ryb (NOEC) a nejnižší účinná koncentrace (LOEC);
- č. 205 růstový test na juvenilních rybách; 28denní – výsledkem je stanovení nejnižší účinné koncentrace (LOEC) a koncentrace, která nezpůsobuje poškození ryb (NOEC).
- č. 210 test na raných vývojových stádiích (embryonální test) – výsledkem je stanovení nejnižší účinné koncentrace (LOEC) a koncentrace, která nezpůsobuje poškození ryb (NOEC);

- č. 212 krátkodobý test na embryích a vajíčkovém plůdku – výsledkem je stanovení nejnižší účinné koncentrace (LOEC) a koncentrace, která nezpůsobuje poškození ryb (NOEC);

#### **Vybrané definice a zkratky používané při hodnocení toxicity na rybách**

- **Adaptace ryb:** přizpůsobení ryb podmínkám testu;
- **Koncentrace látky:** hmotnost látky rozpuštěné v ředící vodě a doplněné do 1 litru ředící vodou ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ );
- **Kontrola:** ředící voda s testovacími organismy bez testovaného vzorku;
- **Ředící voda:** pitná voda, která je zbavena chlóru;
- **LC:** letální koncentrace;
- **LC50:** koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá 50% úhyn testovacích ryb;
- **48hLC50:** koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá 50% úhyn testovacích ryb v časovém úseku  $48 \pm 2$  hodin (Svobodová a kol., 2000).

### 3. Materiál a metodika

V průběhu testů se postupovalo podle zákona č. 246/1992 Sb., Na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů a podle vyhlášky č. 419/2012 Sb., O ochraně pokusných zvířat.

#### 3.1 Test na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*)

##### Materiál a pomůcky

- **Testovací organismus:** pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), o průměrné hmotnosti  $72,3 \pm 14,0$  g
- **Ředící voda:** odstátá vodovodní voda ( $10 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cl}^-$ )
- **Chemikálie:**  $\text{NaNO}_2$  (p.a.)
- **Přístroje a zařízení:** pHmetr, oximetr, laboratorní váhy s přesností na 0,1 mg
- **Laboratorní nádobí:** odměrné baňky, pipety, skleněné nálevky, kádinky
- **Ostatní pomůcky:** sítky a pomůcky pro odlov a přenášení ryb, akvária o objemu 200 litrů

##### Podmínky testu – fyzikálně chemické parametry

- Teplota  $14,3 - 15,2$  °C
- Obsah rozpuštěného kyslíku ve vodě  $> 68$  %
- pH  $7,2 - 7,9$
- $\text{KNK}_{4,5}$   $1,2 \text{ mmol.l}^{-1}$
- $\text{CHSK}_{\text{Mn}}$   $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$
- Celkový amoniak  $0,04 \text{ mg.l}^{-1}$
- $\sum \text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$   $14 \text{ mg.l}^{-1}$
- $\text{Cl}^-$   $10 \text{ mg.l}^{-1}$
- $\text{PO}_4^{3-}$   $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$

##### Design testu

- Délka expozice:  $48 \pm 2$  hodin
- Objem lázně: 40 litrů v předběžném testu, 150 litrů v základním testu
- Výměna lázně: po dobu testu nebyla lázeň měněna
- Osvětlení: 12 hodin denně

- Počet testovacích organismů: 3 kusy v každé koncentraci předběžného testu, 7 kusů v jedné koncentraci základního testu
- Počet paralelních stanovení: jeden paralelní test
- Aerace: v akváriích
- Ostatní podmínky: bez krmení

## **Pracovní postup**

### **Adaptace ryb**

Ryby použité při testech byly po dobu 48 hodin aklimatizovány ve vodovodní vodě o teplotě  $14 \pm 1$  °C, po tuto dobu nebyly ryby krmeny.

### **Předběžný test**

Bylo použito 7 koncentrací testované látky, které byly voleny v širokém rozpětí: 3,3; 6,7; 16,7; 33,3; 50,0; 66,7; a 133,3 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (ve formě NaNO<sub>2</sub>). Do jednotlivých koncentrací testované látky o objemu 40 l se nasazovalo po 3 kusech ryb. Stejným způsobem se nasazovala kontrola. V průběhu trvání předběžného testu se sledovala a zaznamenávala mortalita a chování ryb. Na začátku testu a ve 24 hodinových intervalech se měřila teplota a pH lázně a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Na základě výsledků tohoto testu se volily koncentrace pro základní test.

### **Vyhodnocení 48hLC50**

Na podkladě provedení předběžného testu, byla stanovena pomocí probitové analýzy hodnota 48hLC50 na 24 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

### **Základní test**

Byla zvolena 1/3 zjištěné hodnoty 48hLC50, což bylo 8 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Této koncentraci byly ryby exponovány po dobu 48 hodin.

### **Získání krve pro hematologická vyšetření**

Po vylovení ryb z vody byla rybám odebrána krev z ocasní cévy. Odebraná krev byla stabilizována 40 IU heparinu na 1 ml krve. Po odběru byly ryby usmrceny ranou do hlavy.

## Hematologická vyšetření

V odebrané krvi byl stanoven počet erytrocytů (počítací metodou v Bürkerově komůrce), množství hemoglobinu (kyanohemoglobinovou metodou), hematokritová hodnota (odtředěním krve v kapilárách) methemoglobinu (spektrofotometricky). Veškerá stanovení byla provedena podle Jednotných metod hematologického vyšetřování ryb (Svobodová a kol., 1986).

Pro mikroskopické vyšetření erytrocytů byly zhotoveny krevní nátěry, a to tak, že kapak čerstvě odebrané krve byla na podložním sklíčku rozetřena rozetřevým sklíčkem. Od každé ryby byly zhotoveny dva nátěry, které se obarvily dle Pappenheima (Svobodová a kol., 1986).

## 3.2. Test na tilápii nilské (*Oreochromis niloticus*)

### Materiál a pomůcky

- **Testovací organismus:** tilápie nilská (*Oreochromis niloticus*) o průměrné hmotnosti  $233,4 \pm 49,2$  g
- **Ředící voda:** odstátá vodovodní voda ( $10 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cl}^-$ )
- **Chemikálie:**  $\text{NaNO}_2$  (p.a.)
- **Přístroje a zařízení:** pHmetr, oxymetr, laboratorní váhy s přesností na 0,1 mg
- **Laboratorní nádobí:** odměrné baňky, pipety, skleněné nálevky, kádinky
- **Ostatní pomůcky:** sítky a pomůcky pro odlov a přenášení ryb, akvária o objemu 200 litrů

### Podmínky testu – fyzikálně chemické parametry

- Teplota  $20,2 - 22,4$  °C
- Obsah rozpuštěného kyslíku ve vodě  $> 63$  %
- pH 7,2-7,9
- $\text{KNK}_{4,5}$   $1,1 \text{ mmol.l}^{-1}$
- $\text{CHSK}_{\text{Mn}}$   $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$
- Celkový amoniak  $0,02 \text{ mg.l}^{-1}$
- $\sum \text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$   $14 \text{ mg.l}^{-1}$
- $\text{Cl}^-$   $10 \text{ mg.l}^{-1}$
- $\text{PO}_4^{3-}$   $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$

## Design testu

- Délka expozice:  $48 \pm 2$  hodin
- Objem lázně: 40 litrů v předběžném testu, 150 litrů v základním testu
- Výměna lázně: po dobu testu nebyla lázeň měněna
- Osvětlení: 12 hodin denně
- Počet testovacích organismů: 3 kusy v každé koncentraci předběžného testu, 7 kusů v jedné koncentraci základního testu
- Počet paralelních stanovení: jeden paralelní test
- Aerace: v akváriích
- Ostatní podmínky: bez krmení

## Pracovní postup

### Adaptace ryb

Ryby, které byly použity k testům, byly po dobu 48 hodin ve vodovodní vodě o teplotě  $20,2 - 25,4$  °C, po tuto dobu nebyly ryby krmeny.

### Předběžný test

Bylo použito 7 koncentrací testované látky, které byly voleny v širokém rozpětí: 0,7; 3,3; 6,7; 33,3; 50,0; 66,7 a 133,3  $\text{mg.l}^{-1}$   $\text{NO}_2^-$  (ve formě  $\text{NaNO}_2$ ). Do jednotlivých koncentrací testované látky o objemu 40 l se nasazovalo po 3 kusech ryb. Stejným způsobem se nasazovala kontrola. V průběhu trvání předběžného testu se sledovala a zaznamenávala mortalita a chování ryb. Na začátku testu a ve 24 hodinových intervalech se měřila teplota a pH lázně a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Na základě výsledků tohoto testu se volily koncentrace pro základní test.

### Vyhodnocení 48hLC50

Na podkladě provedení předběžného testu, byla stanovena pomocí probitové analýzy hodnota 48hLC50 na  $33 \text{ mg.l}^{-1} \text{NO}_2^-$ .

### Základní test

Byla zvolena 1/3 zjištěné hodnoty 48hLC50, což bylo  $11 \text{ mg.l}^{-1} \text{NO}_2^-$ . Této koncentraci byly ryby exponovány po dobu 48 hodin.



## **Získání krve pro hematologická vyšetření**

Po vyjmutí ryb z lázně jim byla odebrána krev z ocasní cévy, odebraná krev byla stabilizována 40 IU heparinu na 1 ml krve. Po odběru krve byly ryby usmrceny.

## **Hematologická vyšetření**

Podle Jednotných metod hematologického vyšetřování ryb (Svobodová a kol., 1986) byl stanoven počet erytrocytů (RBC) (počítací metodou v Bürkerově komůrce), množství hemoglobinu (Hb) (kyanohemoglobinovou metodou) a hematokritová hodnota (PCV) (odstředěním krve v kapilárách).

Pro vyšetření erytrocytů byly zhotoveny krevní nátěry, které se obarvily dle Pappenheima (Svobodová a kol., 1986). Od každé ryby byly zhotoveny vždy dva nátěry.

## **3.3. Hodnocení erytrocytů**

### **3.3.1. Mikroskopie a snímání erytrocytů**

Morfologie krevních buněk kontrolní populace ryb a její změny u ryb po otravě dusitany byly sledovány prostřednictvím mikroskopu s nainstalovaným digitálním fotoaparátem (Olympus BHS, Olympus BX60) propojeným se stolním počítačem s OS Windows XP. Softwarem QuickPHOTO MICRO 2.3 byl promítán živý obraz na monitor, který se snímal a ukládal ve formátu JPG.

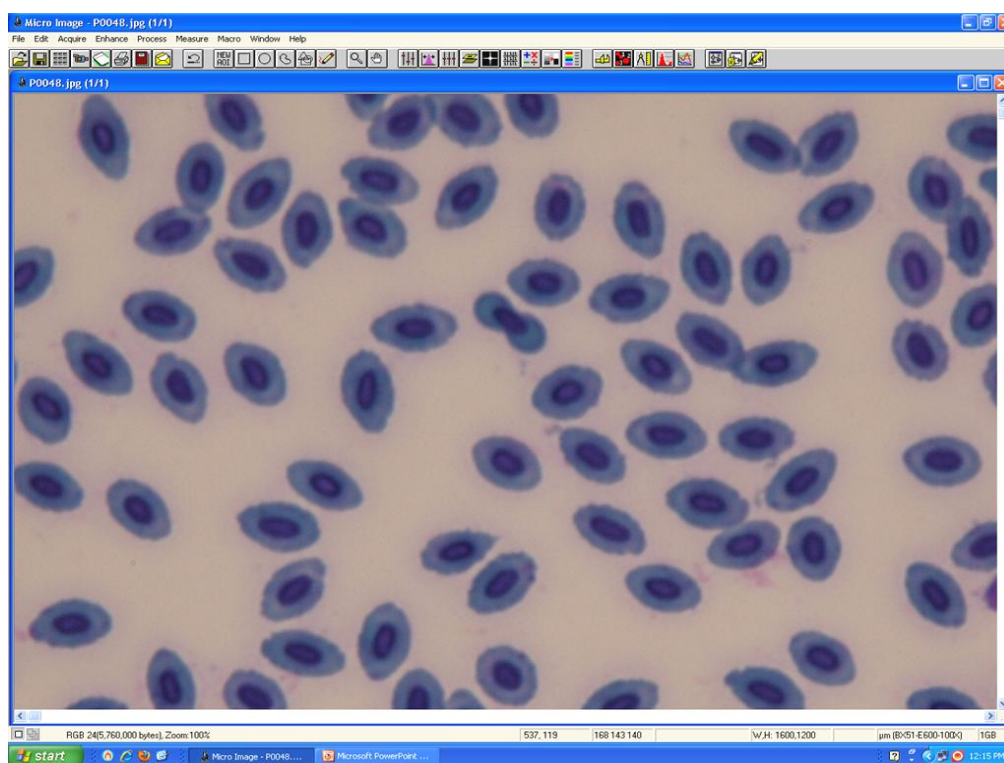
Vlastnímu snímání obrazu fotoaparátem předcházelo nastavení mikroskopu za účelem maximálního vyniknutí ohraničení erytrocytů a jader erytrocytů tak, aby následné měření bylo přesné. Pro snímání byl zvolen objektiv se stonásobným zvětšením. V případě použití imerzního objektivu byla na sklíčko aplikována kapka imerzního oleje.

Po vložení krevního nátěru pod mikroskop bylo provedeno zaostření a následné prohlédnutí nátěru podle schématu, které uvádí Svobodová a kol., (1986). Byly sledovány změny v zabarvení cytoplazmy, tvaru krvinek, změny polohy jádra v erytrocytu, výskytu rozpadlých a bezjaderných erytrocytů. Snímání erytrocytů bylo prováděno objektivem se stonásobným zvětšením, obvykle na kraji krevního nátěru, kde byla menší koncentrace erytrocytů. Ve středových částech preparátu byly totiž erytrocyty různě seskupené v řadách a kruzích, což znemožňovalo jejich přesné měření.

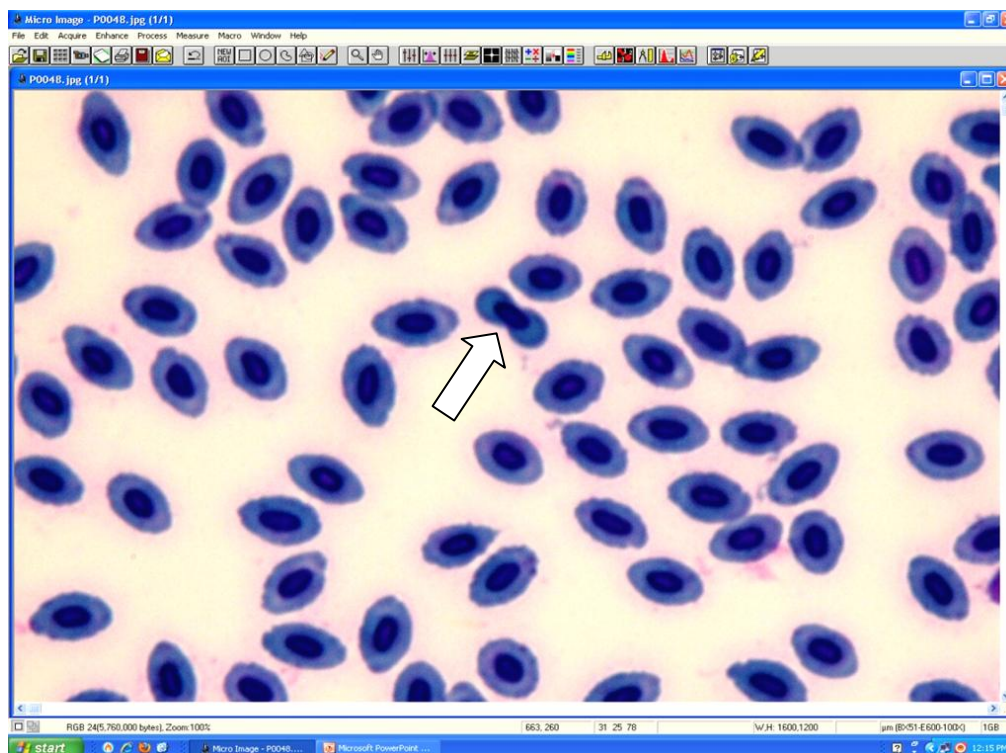
Každý krevní nátěr byl snímán v deseti různých místech v závislosti na jeho kvalitě a na rozmístění a počtu erytrocytů. Nedeformované erytrocyty byly následně měřeny.

### 3.3.2. Měření erytrocytů

Dalším krokem bylo měření erytrocytů zachycených digitálním fotoaparátem pomocí programu MICRO IMAGE 4.0. Samotnému měření erytrocytů předcházelo nastavení kalibrace, která odpovídala použitému zvětšení na mikroskopu. V případě neúplně zřetelných přechodů mezi jádrem a cytoplazmou erytrocytu byla požita změna kontrastu a jasu. Tuto změnu bylo možné provést manuálně, nebo automatickou funkcí, kterou program umožňoval. Zlepšení obrazu bylo poměrně zřetelné (viz obr. č. 2 a 3).

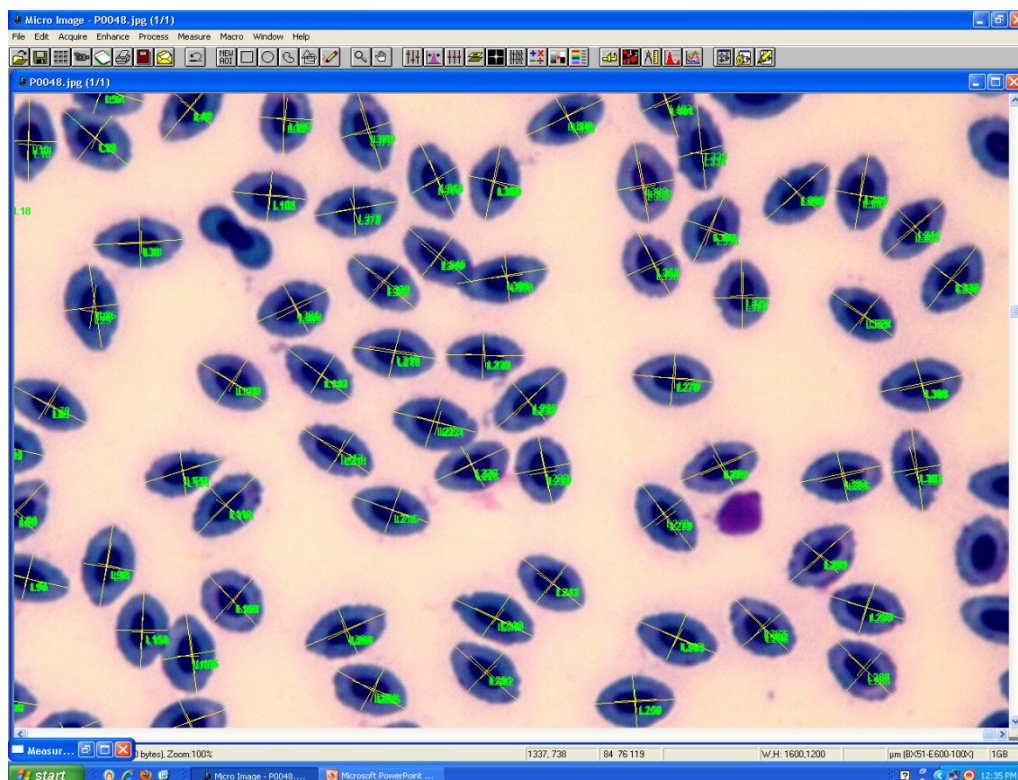


Obr. č. 2. Snímek krevního nátěru před úpravou.



**Obr. č. 3.** Snímek krevního nátěru po úpravě s označením deformovaného erythrocytu.

Měření erythrocytů bylo prováděno manuálně pomocí funkce Measurement. K měření byly erythrocyty vybírány náhodně s výjimkou těch erythrocytů, které byly silně deformované a jinak poškozené, jako například erythrocyt označený šipkou na obrázku č. 3. U měřených erythrocytů se zjišťovala délka erythrocytu, šířka erythrocytu, délka jádra a šířka jádra. Vždy tak, aby u měřeného erythrocyty byly zjištěny všechny čtyři rozměry. U každé ryby bylo měřeno 100 erythrocytů. Po změření jednotlivých snímků byly naměřené hodnoty exportovány do programu Microsoft Excel, kde byly označeny pro snazší zpracování písmeny a, b, c, d – podle měřeného parametru. Pro statistické zpracování byly pro každou buňku vypočítány poměry jader (délka/šířka) a celé krvinky (délka/šířka), aby se vyloučila chyba způsobená možnou slabší jednostrannou deformací krvinek vzniklou při zpracování preparátu.



Obr. č. 4. Měření erytrocytů v programu MICRO IMAGE 4.0.

### 3.3.3. Hodnocení erytrocytů pstruha duhového pomocí snímků z TEM

Detailnější sledování změněných erytrocytů pstruha duhového bylo zajištěno prostřednictvím elektronové mikroskopie, která byla hrazena formou služby v laboratoři elektronové mikroskopie Biologického centra Akademie věd České republiky – Parazitologického ústavu. Pro tento účel byla ve vzorcích krve změřena osmotická koncentrace za použití osmometru Wescor. Následně byly vzorky krve naředěny fyziologickým roztokem o shodné osmotické koncentraci, jaká byla naměřena u krevní plazmy. Dále byly vzorky krve zpracovány technikou podle Pšeničky a kol. (2009).

### 3.3.4. Statistické vyhodnocení

Vyhodnocení výsledků bylo provedeno v programu Statistica 7.0 (StarSoft ČR). Data byla nejprve pomocí Kolmogorov-Smirnova testu testována na normalitu a následně byla pomocí Barlettova testu ověřena hypotéza o homogenitě variací. V případě prokázání normality dat a homogenity variací byla použita dvoucestná variace (ANOVA) a následně bylo použito mnohonásobné porovnání skupin pomocí Tukey testu. V případě nesplnění podmínek bylo pro porovnání použito neparametrického Kruskal-Wallisova testu.



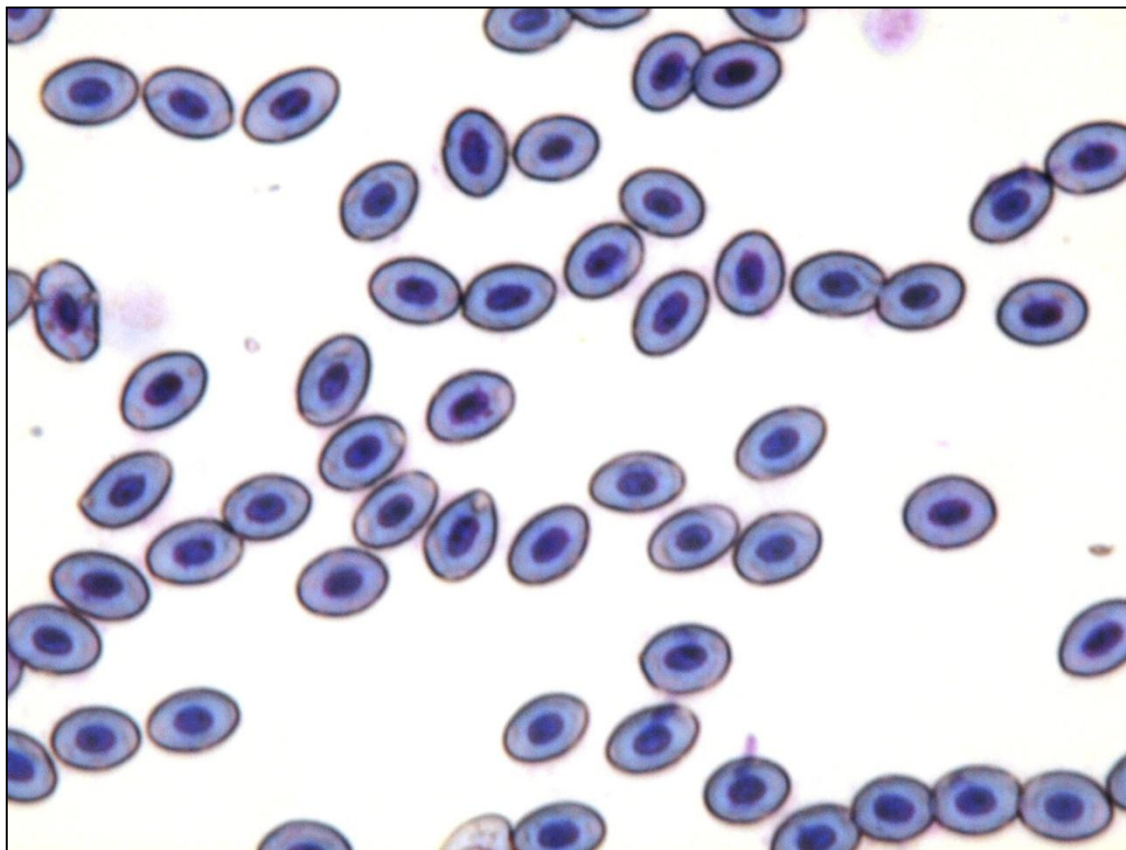
## 4. Výsledky

### 4.1. Test na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*)

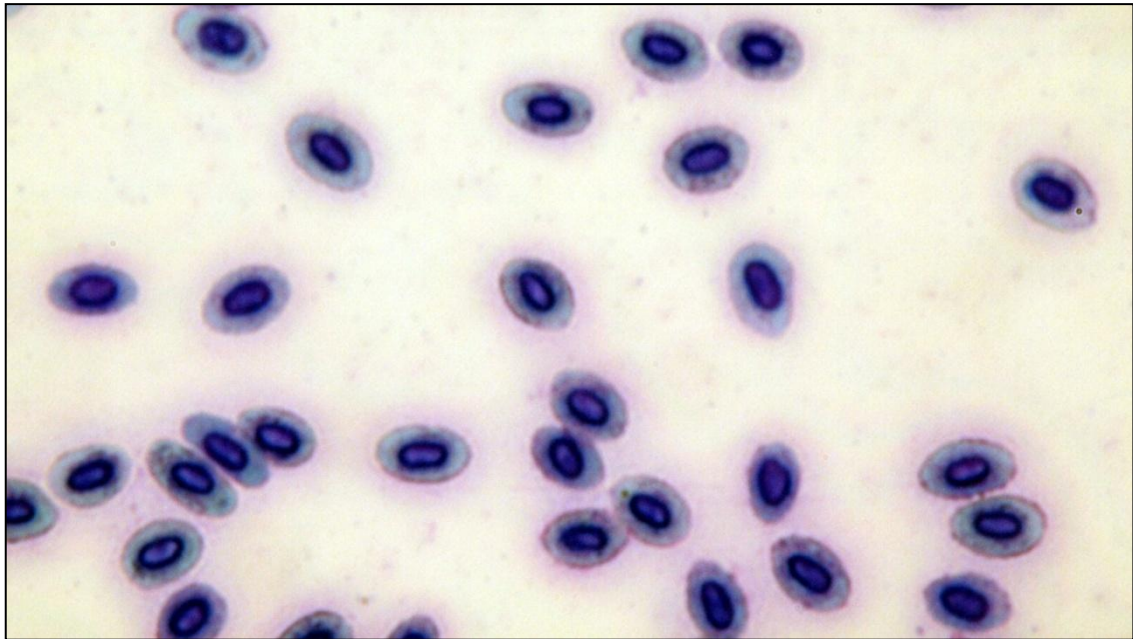
V průběhu testu nebyla u žádné skupiny zaznamenána viditelná změna chování, ani mortalita ryb.

#### 4.1.1. Vizuální hodnocení erytrocytů pod mikroskopem

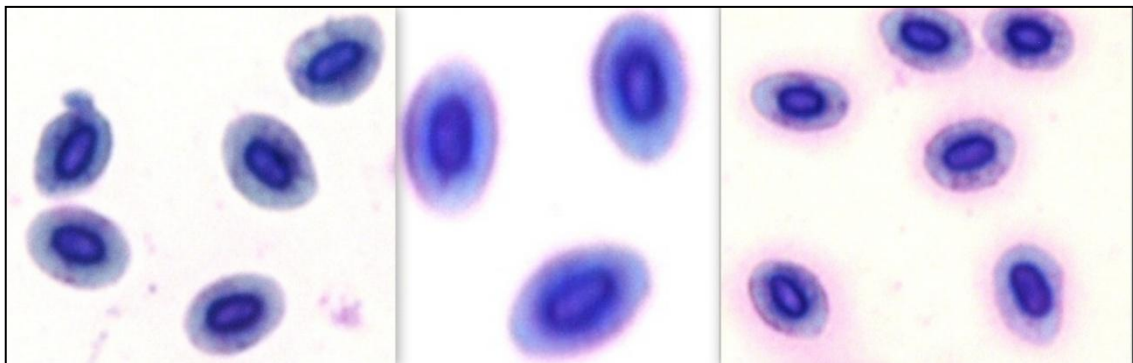
Na krevních nátěrech byla zaznamenána zřetelná změna probarvení jader kontrolní a exponované skupiny. Ryby vystavené dusitanům měly v některých nátěrech nekonstantně probarvená jádra. Tento jev je dobře patrný při porovnání obrázku č. 5 s obrázkem č. 6 a 7.



**Obr. č. 5.** Konstantně probarvená jádra pstruha duhového v kontrolní skupině.



**Obr. č. 6.** Erythrocyty exponovaného pstruha duhového s tmavým prstencem kolem jádra a neprobarveným středem.



**Obr. č. 7** Změny v zabarvení jader erytrocytů u exponovaných pstruhů duhových.

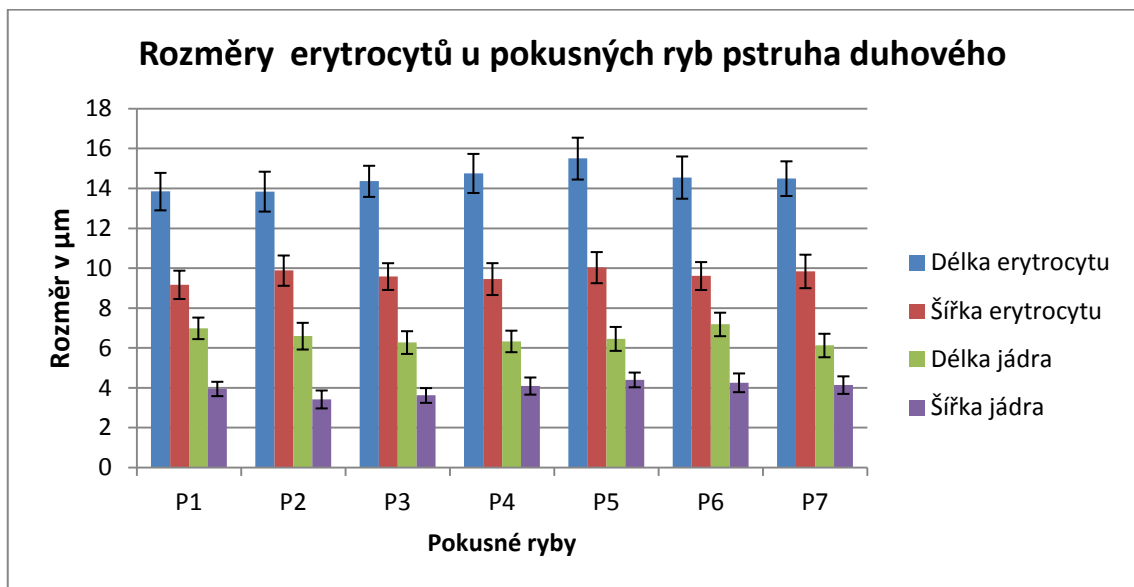
#### **4.1.2. Měření erytrocytů**

Byl stanoven poměr mezi délkou a šířkou erytrocytu ( $DE/\check{S}E$ ) a poměr mezi délkou a šířkou jádra erytrocytu ( $DJ/\check{S}J$ ). Z těchto hodnot bylo nejmarkantnější snížení poměru mezi délkou a šířkou jádra erytrocytu, jak je patrné z tabulky č. 2. Bylo tedy zjištěno signifikantní ( $p < 0,05$ ) zmenšení jader. Rozměry celých krvinek byly ve srovnání s kontrolní skupinou stejné.

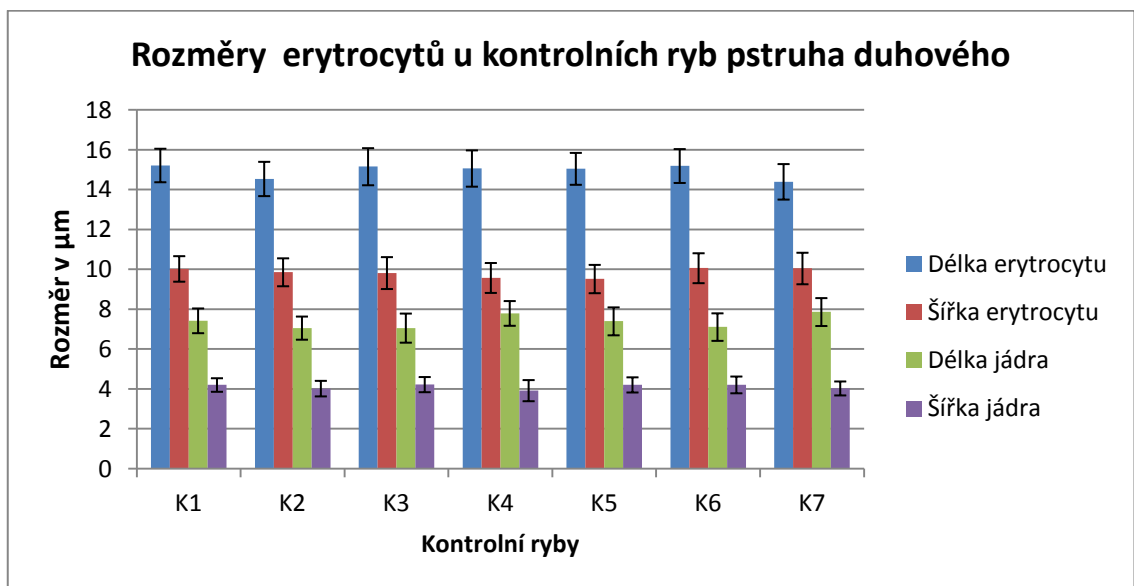
**Tab. č. 2.** Poměry naměřených hodnot u exponované a kontrolní skupiny pstruha duhového.

Skupina ryb	DE/ŠE	DJ/ŠJ
Exponovaná skupina	1,50 <sup>a</sup>	1,65 <sup>a</sup>
Kontrolní skupina	1,52 <sup>a</sup>	1,79 <sup>b</sup>

Odlišná písmena<sup>(a,b)</sup> vyjadřují statisticky průkazný rozdíl v naměřených poměrech v rámci jednotlivých sloupců (ANOVA  $p < 0,05$ )



**Graf č. 1.** Průměrné naměřené rozměry erytrocytů u pokusné skupiny ( $8 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ ) pstruha duhového.



**Graf č. 2.** Průměrné naměřené rozměry erytrocytů u kontrolní skupiny pstruha duhového.

### 4.1.3. Pozorování erytrocytů na snímcích vytvořených TEM

U erytrocytů snímaných transmisním elektronovým mikroskopem byly pozorovány buňky vřetenovitého tvaru s velkým, centrálně umístěným heterochromatickým jádrem. Jádra erytrocytů exponovaných ryb vykazovala mírné odchlípení od okolní cytoplazmy, resp. byla smrštěná, kdy vznikl různě velký prázdný prostor (Obr. č. 8). Tento jev se vyskytoval pouze u exponované skupiny. Erytrocyty u ryb z kontrolní skupiny měly jádra těsně obklopena cytoplazmou (Obr. č. 9 a 10). Výskyt organel v cytoplazmě byl velmi sporadický. V cytoplazmě, bylo pozorováno několik různých typů váček. Četnost těchto změn je uvedena v tab. č. 3.

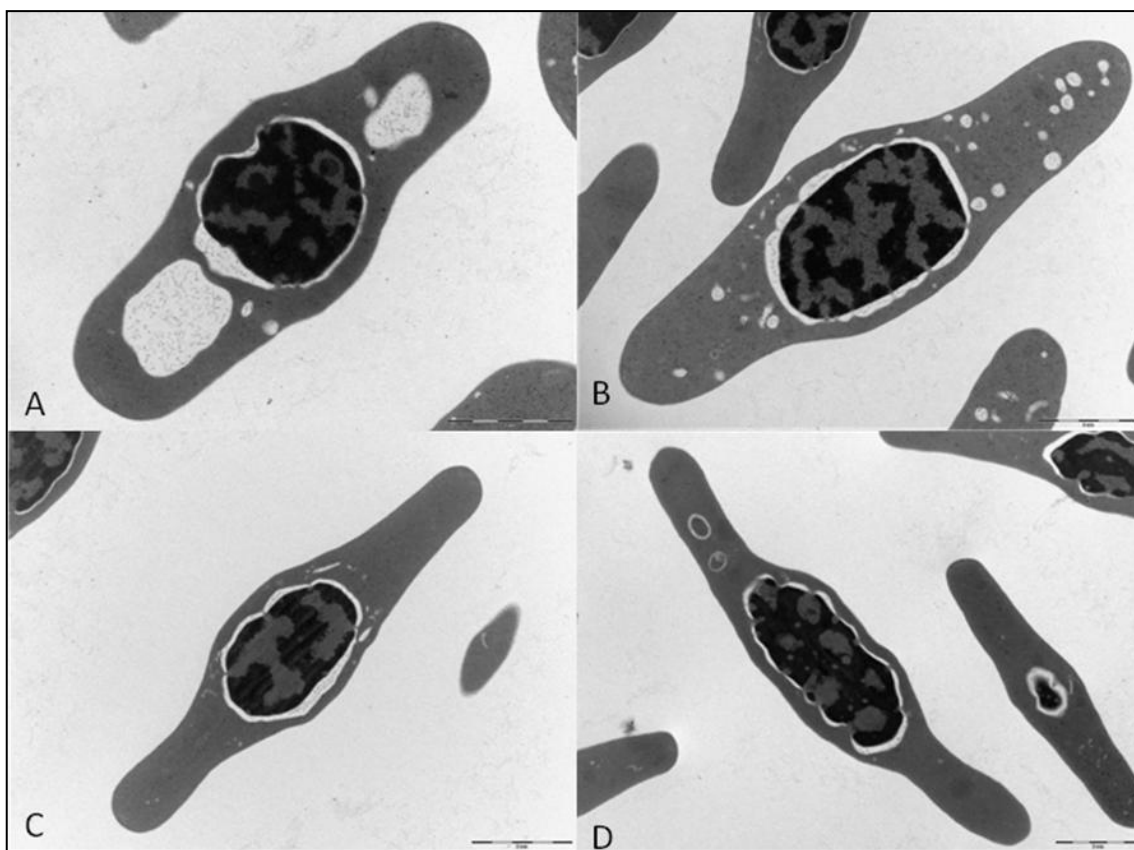
Na základě pozorování erytrocytů u pstruhů duhových exponovaných dusitanům byly charakterizovány čtyři typy různých tvarových abnormalit (Obr. č. 8).

- **A typ** – erytrocyt s bilaterálními velkými váčky v cytoplazmě s jádrem, které mělo kulatý průřez
- **B typ** – erytrocyt s jádrem oválnějšího tvaru, větším počtem malých mikrokanálek v cytoplazmě, které byly kruhového průřezu
- **C typ** – užší erytrocyt s mikrokanálky, který neměl v cytoplazmě téměř žádné váčky.
- **D typ** – na průřezu podobný jako typ C, ale s elongovanějším jádrem, s téměř žádnými váčky ani mikrokanálky v cytoplazmě.

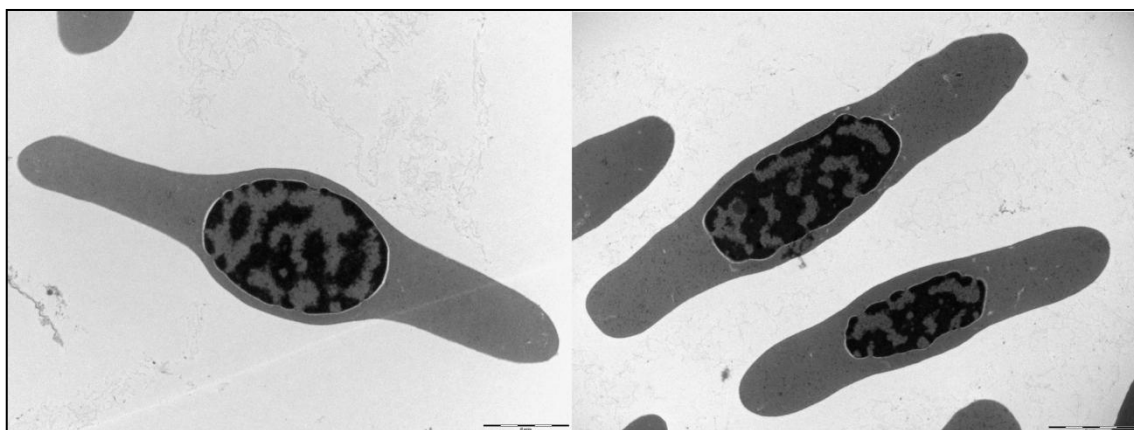
**Tab. č. 3.** Četnost vybraných změn v ultrastruktuře erytrocytů (%).

Typ změny	Pokusná skupina (%)	Kontrolní skupina (%)
bilaterální velké váčky	1,3	0,4
vyšší počet váček v cytoplazmě	6,7	0,2
intracytoplazmatické mikrokanálky	5,2	1,3
mikrokanálky kruhového průřezu	6,1	5,8

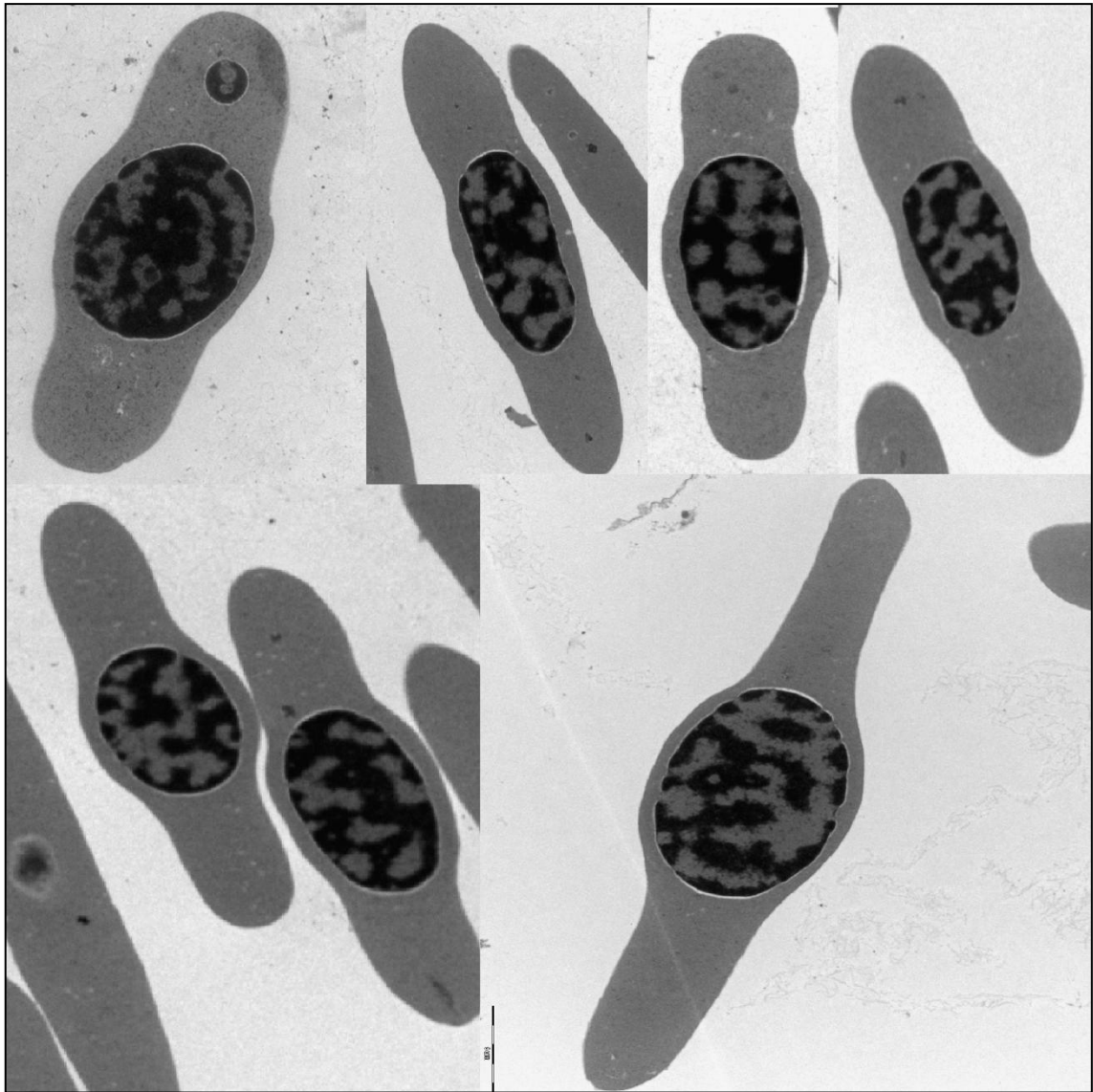




**Obr. č. 8.** Ultrastruktura čtyř různých typů erytrocytů u pokusných pstruhů duhových.



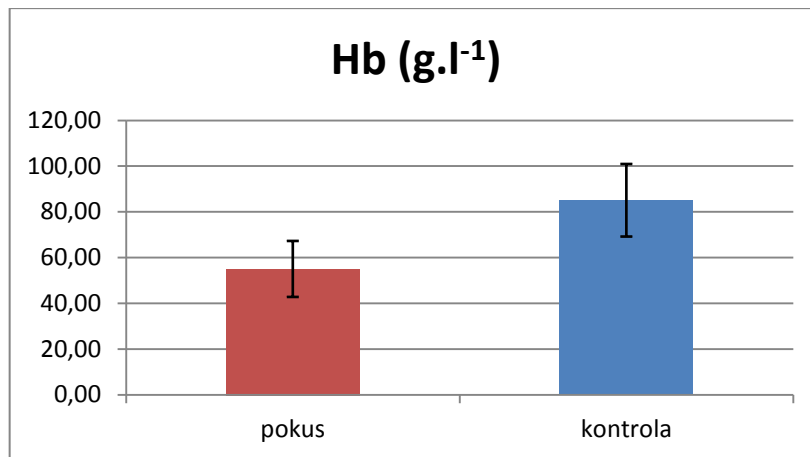
**Obr. č. 9.** Ultrastruktura erytrocytů pstruhů duhových z kontrolní skupiny.



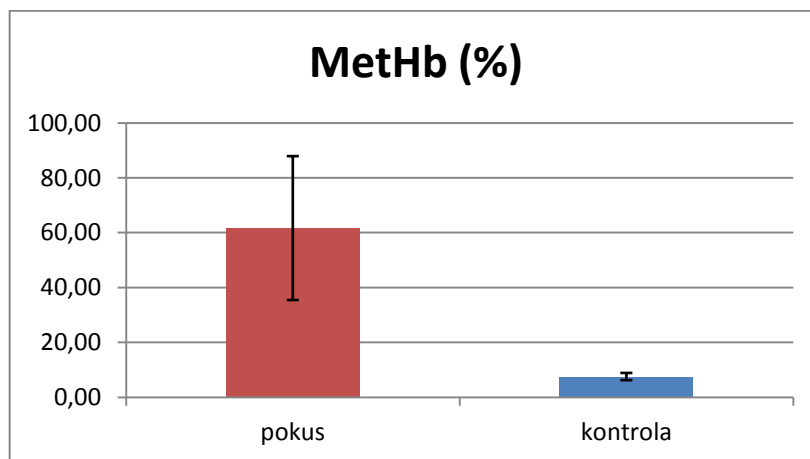
**Obr. č. 10.** Ultrastruktura erytrocytů pstruhů duhových z kontrolní skupiny.

#### **4.1.4. Stanovení ukazatelů červeného krevního obrazu**

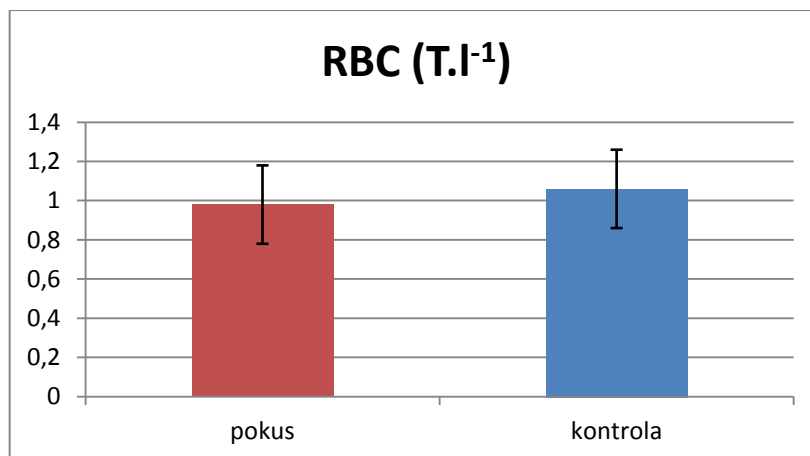
Signifikantní rozdíl měřených hodnot v krvi ryb z pokusné skupiny byl zaznamenán u množství hemoglobinu ( $p < 0,01$ ) a obsahu methemoglobinu ( $p < 0,01$ ) v krvi. Hodnoty hematokritu a počtu červených krvinek byly stejné s kontrolní skupinou.



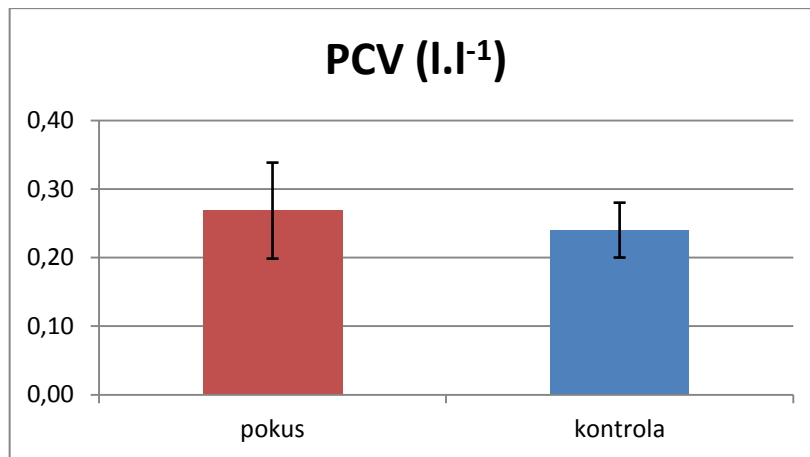
**Graf č. 3.** Hodnoty hemoglobinu v pokusné a kontrolní skupině pstruha duhového.



**Graf č. 4.** Obsah methemoglobinu v krvi pstruha duhového u pokusné a kontrolní skupiny.



**Graf č. 5.** Počet erytrocytů v pokusné a kontrolní skupině pstruha duhového.



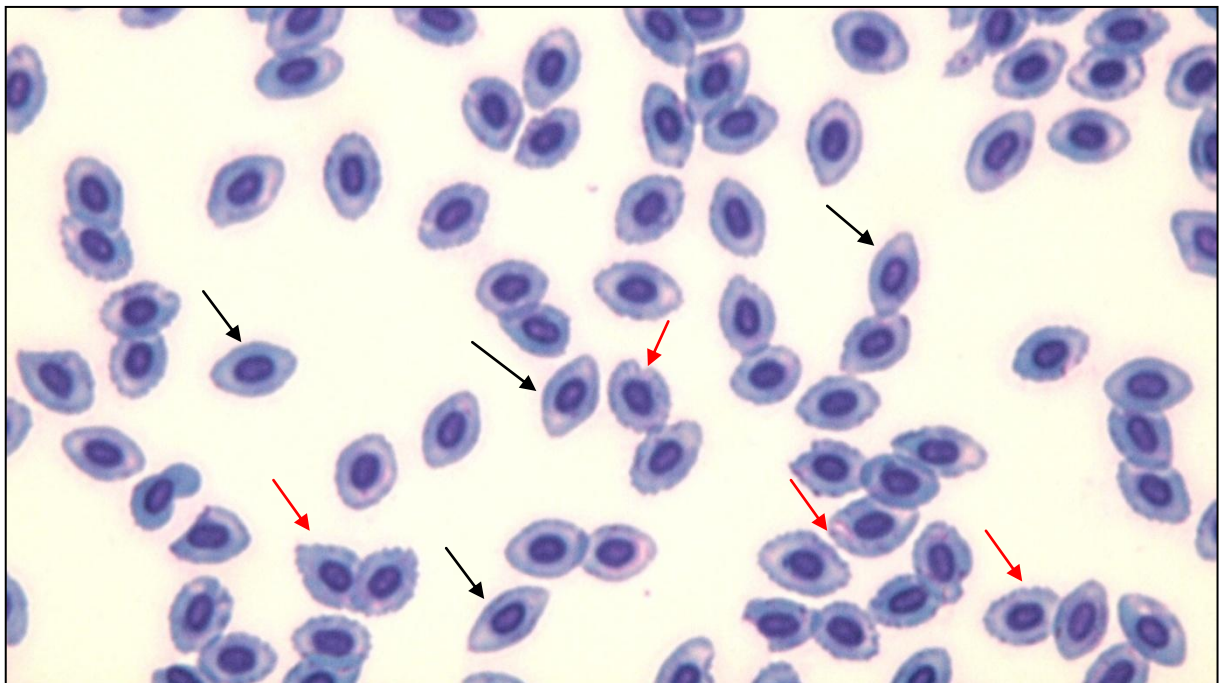
**Graf č. 6.** Hematokritové hodnoty v pokusné a kontrolní skupině pstruha duhového.

## 4.2. Test na tilápii nilské (*Oreochromis niloticus*)

V průběhu testu nebyla u žádné skupiny zaznamenána změna chování, ani mortalita ryb.

### 4.2.1. Vizuální hodnocení erytrocytů pod mikroskopem

U erytrocytů byly zaznamenány změny především v různém probarvení jader, výskytu erytrocytů, které měly silně zúžené oba dva konce a také erytrocyty s poškozenou membránou. Veškeré uvedené změny však byly pozorovány jak u pokusné, tak i u kontrolní skupiny ryb.



**Obr. č. 11.** Krevní nátěr tilápie nilské z kontrolní skupiny s výskytem erytrocytů silně vřetenovitého tvaru (černé šípky), poškozením membrány po obvodu erytrocytů (červené šípky) a různým stupněm probarvení jader erytrocytů.

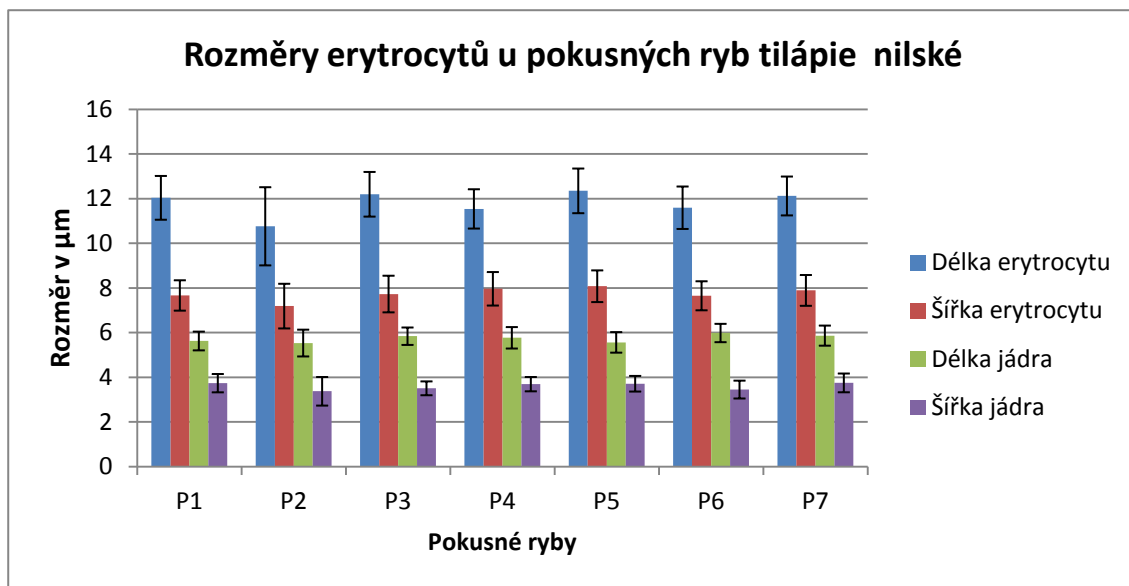
### 4.2.2. Měření erytrocytů

Porovnání poměrů mezi délkou a šířkou erytrocytů a mezi délkou a šířkou jader neprokázalo statisticky významný rozdíl mezi skupinami.

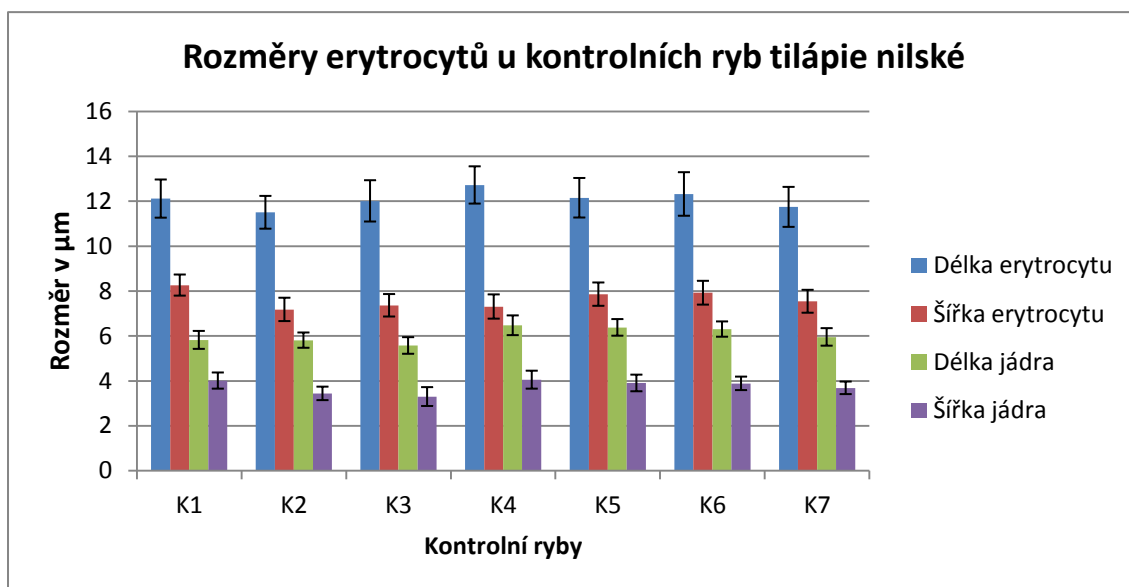
**Tab. č. 4.** Poměry naměřených hodnot u pokusné a kontrolní skupiny tilápie nilské.

Skupina ryb	DE/ŠE	DJ/ŠJ
Pokusná skupina	1,52 <sup>a</sup>	1,59 <sup>a</sup>
Kontrolní skupina	1,58 <sup>a</sup>	1,61 <sup>a</sup>

Stejná písmena <sup>(a)</sup> vyjadřují statisticky neprůkazný rozdíl v naměřených poměrech v rámci jednotlivých sloupců.



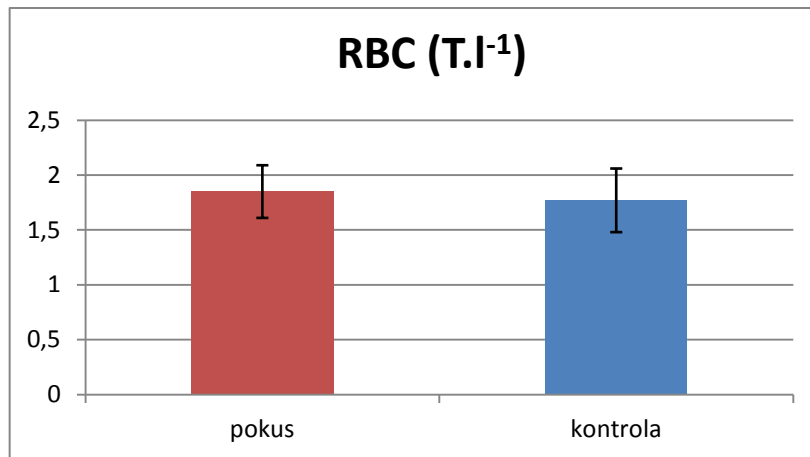
**Graf č. 7.** Průměrné naměřené rozměry erytrocytů u pokusné skupiny ( $11 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ ) tilápie nilské.



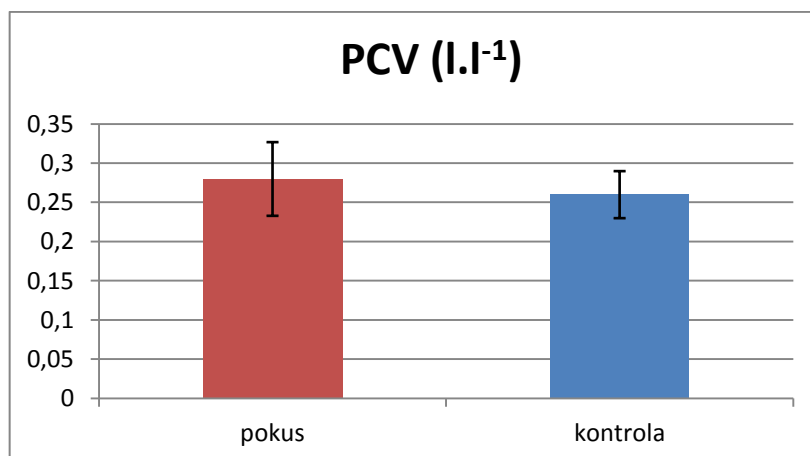
**Graf č. 8.** Průměrné naměřené rozměry erytrocytů u kontrolní skupiny tilápie nilské.

### 4.2.3. Stanovení ukazatelů červeného krevního obrazu

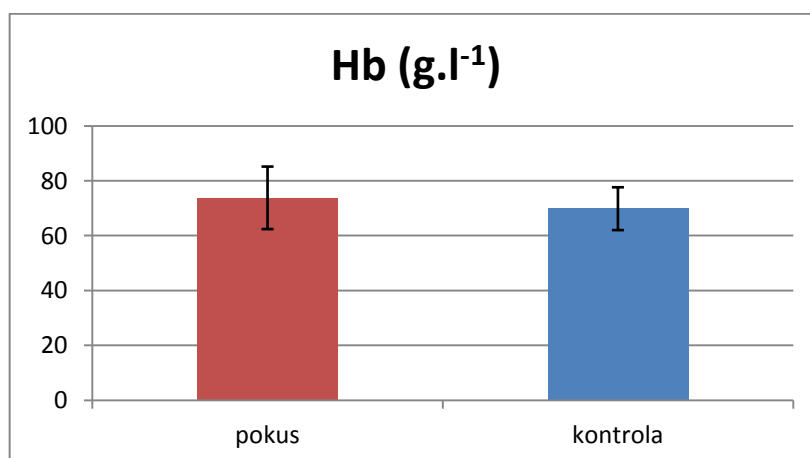
U žádného ze stanovovaných ukazatelů (RBC, Hb, PCV) nebyla zaznamenána statisticky významná změna ( $p < 0,05$ ) oproti kontrolní skupině.



Graf č. 9. Počet erytrocytů v pokusné a kontrolní skupině tilápie nilské.



Graf č. 10. Hematokritové hodnoty v pokusné a kontrolní skupině tilápie nilské.



Graf č. 11. Obsah hemoglobinu v krvi tilápií nilských z pokusné a kontrolní skupiny.

## **5. Diskuze**

### **5.1. Test na pstruhu duhovém**

#### **Vizuální hodnocení erytrocytů**

Oproti změnám uváděným Drastichovou a kol. (2006) a Svobodovou a kol. (2005b), které popisují různé patologické změny v podobě depolarizace jádra, projasnění cytoplazmy a zvýšeného výskytu rozpadlých erytrocytů, nebyly u exponovaných pstruhů duhových pozorovány žádné změny. Nepřítomnost těchto změn mohla být způsobena tím, že Svobodová a kol. (2005b) a Drastichová a kol. (2006) exponovaly ryby vyššími koncentracemi dusitanů ( $67\text{mg.l}^{-1}\text{NO}_2^-$ ), a tudíž nižší koncentrace ( $8\text{mg.l}^{-1}\text{NO}_2^-$ ) a kratší expozice pstruha duhového v našem testu neměla dostatečný účinek na krvinky, aby způsobila výše zmíněné změny. U jader erytrocytů docházelo k určitým rozdílům v jejich zabarvení. V některých nátěrech měly jádra konstantní barvu, ale v jiných byly zřetelné různé barevné změny. Mezi ně patřilo zesvětlování barvy směrem ke středu jádra, ohraničení jádra tmavým pruhem, za kterým mělo jádro velmi projasněnou barvu, která v některých případech byla téměř totožná s barvou cytoplazmy erytrocytu. Uvedené změny v zabarvení jader erytrocytů by mohly souviset stejně jako projasnění cytoplazmy erytrocytu s poklesem intenzity tvorby hemoglobinu (Klaassen, 2001) a projevíly se změnou barvitelnosti jako patologický efekt, jak uvádí Pecka (2006).

#### **Měření erytrocytů**

Měření jednotlivých rozměrů erytrocytů a jejich následné porovnání s kontrolou prokázalo vliv expozice dusitanů na smrštění jader erytrocytů. O čemž svědčí i výsledky ze stanovení poměru mezi délkou a šířkou jádra v kontrolní a exponované skupině. Poměr u exponované skupiny byl nižší, to znamená, že změna velikosti byla především u délky jader erytrocytů. Toto smrštění je uváděno, jako důsledek aktivace transportu draslíku z erytrocytů (Knudsen a Jensen, 1987; Jensen a kol., 1997). Další vliv na smrštění erytrocytů mohla mít i ztráta obsahu vody, kterou ve své práci popisují Madison a Wang (2006).

#### **Snímky z elektronového mikroskopu**

Elektronovou mikroskopií byla zjištěna zvýšená četnost některých změn v erytrocytech exponovaných pstruhů duhových oproti rybám v kontrole. Míra výskytu



cytoplazmatických mikrokanálek, které byly na průřezu kruhové, se nelišila od kontroly. Je možné uvažovat o tom, že dusitaný neměly na tento typ změny žádný vliv.

Přítomnost velkých bilaterálních váčků v erythrocytech byla v exponované skupině zvýšená o 0,7 %. Tato změna již může mít vliv na funkci erythrocytů, hlavně díky svému rozsahu. Na řezu je patrné, že zabírá poměrně velkou část cytoplazmy. Toto poškození by mohlo způsobit oslabení pevnosti buňky z toho důvodu, že jde vlastně o prázdný prostor. V úvahu taky může připadat narušení osmotické funkce. Vzhledem k velmi nízkému procentu četnosti těchto změn v porovnání s počtem nepostižených erythrocytů nemají pravděpodobně tyto změny významný vliv na organismus ryby.

V případě změn, které byly charakterizovány zvýšením počtu váčků a mikrokanálek v cytoplazmě, byl již zjištěn významnější rozdíl mezi kontrolou a exponovanými rybami. Tyto změny lze připisovat vlivu dusitanů, které v erythrocytu reagují s methemoglobinem (Jensen a Rohde, 2010) a dochází jednak k denuraci proteinů (Romero a kol., 2006; Jensen, 2003), dále mohou narušovat hladinu draslíku v buňce (Jensen a kol., 1987), ale také může docházet k patologickým změnám, které v souhrnu vedou k celkovému rozpadu erythrocytů (Korwin-Kossakowski a Ostaszewska, 2003). Dále je také možné uvažovat o negativním ovlivnění životního cyklu a metabolismu takto postižených erythrocytů. Ale i přes možný vliv dusitanů se také může jednat o běžný výskyt rozdílných vakuol uvnitř erythrocytu, jak například uvádějí Reinhart a Chien (1988). Ale ani u těchto změn nelze úplně určit míru, kterou ovlivňují rybí organismus, jelikož opět jde ve srovnání se zbylým počtem nepoškozených erythrocytů o nízká procenta.

Výskyt odchlípení cytoplazmy od jádra u exponované skupiny byl pravděpodobně vyvolán v důsledku smrštění jader, které bylo prokázáno měřením. Tento jev je způsoben schopností dusitanů aktivovat vyplavování draslíku z buňky, kdy následně dochází ke smrštění (Jensen a kol., 1997).

Vzhledem k tomu, že ryby jsou obvykle poměrně odolné z hlediska snížení transportní kapacity krve (tolerují až 50% obsah methemoglobinu v krvi) (Lucas a Southgate, 2003; Svobodová a kol., 2008), tak by několika procentní poškození erythrocytů nemělo mít na celkový zdravotní stav. Otázkou zůstává vliv dusitanů na výše zmíněné změny, za předpokladu použití vyšších koncentrací dusitanů, ale i dlouhodobější expozice. U dusitanů je totiž poměrně běžné, že se zvýšenou koncentrací je zvyšován i jejich negativní vliv. Je tedy možné uvažovat o vyšším

výskytu defektů v celkovém počtu erytrocytů exponovaných ryb. Také může být negativně ovlivněna délka jejich životního cyklu, ale i metabolismus.

### **Vyhodnocení ukazatelů červeného krevního obrazu**

Průměrná hodnota hemoglobinu u kontrolní skupiny ( $85,06 \pm 15,87 \text{ g.l}^{-1}$ ) odpovídá rozmezí 60 – 100  $\text{g.l}^{-1}$ , které je považováno dle Svobodové a kol. (1986) a Doubka a kol. (2003) u pstruha duhového za fyziologické. Průměrná hodnota hemoglobinu u exponovaných ryb byla  $55,01 \pm 12,25 \text{ g.l}^{-1}$ , což je jen velmi mírně pod výše uvedeným rozmezím. Zjištěná zvýšená hodnota methemoglobinu v krvi na  $61,69 \pm 26,93 \%$  oproti hodnotě v kontrole, která byla  $7,58 \pm 1,31 \%$  odpovídá změnám uváděnými ostatními autory, kteří taktéž zaznamenali zvýšené hladiny methemoglobinu (Svobodová a kol., 2005b; Kroupová a kol., 2006b; Park a kol., 2006, Drastichová a kol., 2006).

Zjištěné hodnoty hematokritu u kontroly a i exponované skupiny byly mírně nižší oproti rozmezí, které uvádí Svobodová a kol. (1986). Vliv dusitanů na tyto hodnoty tedy zaznamenán nebyl, což lze podložit i tím, že hematokritová hodnota vyjadřuje objem erytrocytů k celkovému objemu krve a měřením erytrocytů byla zjištěna pouze změna velikosti jader, zatímco erytrocyty zůstaly velikostně nezměněné.

Počet erytrocytů se mezi kontrolní a exponovanou skupinou významně nelišil a zjištěné hodnoty jsou v rozmezí, které uvádí Svobodová a kol. (1986), Doubek a kol. (2003), Řehulka a Adamec (2004). Stejný jev, kdy expozice pstruha duhového dusitanům neovlivnila počet erytrocytů, uvádí i Gřunděl (2008).

## **5.2. Test na tilápii nilské**

### **Vizuální hodnocení erytrocytů**

Při prohlížení krevních nátěrů exponované skupiny tilápie nilské bylo možné pozorovat přítomnost různě deformovaných erytrocytů. Jednalo se o různé abnormality tvarů erytrocytů (silné zúžení konců buněk). Bylo také možné pozorovat určité poškození membrány erytrocytů až rozpad cytoplazmatické membrány. Dále se v nátěrech vyskytovaly rozdíly v probarvení jader.

Poškození membrány erytrocytů u ryb exponovaných dusitanům uvádějí Korwin-Kossakowski a Ostaszewska (2003). Toto poškození, které může vést až k ruptuře

membrány, je často příznakem působení toxické látky (Doubek a kol., 2003), kterou dusitany bezesporu jsou.

Proměnlivost v barvě jader by bylo možné stejně jako u pstruha duhového zdůvodnit snížením syntézy hemoglobinu (Klaassen, 2001). Změna tvaru erytrocytů by mohla být způsobena jejich smrštěním v důsledku vyplavování draslíku (Jensen a kol., 1987; Knudsen a Jensen, 1997).

Uvedené změny by u exponovaných ryb přicházely v úvahu, ale vzhledem k tomu, že všechny změny se vyskytly u kontrolní i exponované skupiny, tak je spíše na vině nekvalitní provedení krevních nátěrů ryb.

### **Měření erytrocytů**

Měřením erytrocytů, ale ani porovnáním poměrů mezi jednotlivými rozměry exponované a kontrolní skupiny ryb se neprokázal vliv dusitanů na velikostní změny erytrocytů tilápie nilské. Nepřítomnost změn mohla být způsobena nízkou koncentrací dusitanů, která byla použita při testu, ale také krátkou dobou expozice.

### **Vyhodnocení ukazatelů červeného krevního obrazu**

Nepřítomnost změn hematokritové hodnoty, množství hemoglobinu a počtu erytrocytů by mohlo souviset s tím, že použité tilápie nilské v testu měly nižší individuální citlivost vůči dusitanům. Tento jev uvádí Kroupová a kol. (2005) a Lewis a Morris (1986). Ale například Yidilz a kol.(2006) zaznamenal u tilápie nilské za použití stejně dlouhé expozice při nižších koncentracích změny v hodnotách hematokritu i hemoglobinu. Určitý vliv ale mohla mít velikost ryb, kdy použil menší ryby s hmotností do 60 g.

Zajímavé bylo ale to, že v našem testu se všechny hodnocené hematologické ukazatele u kontrolní i exponované skupiny tilápie nilské pohybovaly na spodní hranici hodnot, které uvádí Doubek a kol. (2003).

## **5.3. Porovnání vlivu dusitanů na pstruha duhového a tilápii nilskou**

Při testech byly použity stejné zlomkové hodnoty, které odpovídaly 48hLC50, tudíž bylo možné očekávat „stejný“ vliv dusitanů na vyhodnocované ukazatele. Vyhodnocení změn erytrocytů a hematologických ukazatelů prokázalo všeobecně vyšší citlivost

lososovitých druhů ryb, mezi které pstruh duhový patří. Naopak u tilápie nilské nedošlo k žádným změnám, což svědčí o její vysoké odolnosti vůči zvýšeným koncentracím dusitanů ve vodě, ale i o větší přizpůsobivosti v nepříznivém prostředí.

## 6. Závěr

V předběžném testu byla pro pstruha duhového zjištěna hodnota 46hLC50 24 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Hodnocení erytrocytů u pstruhů duhových bylo provedené po 48h expozici v koncentraci 8 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (1/3 48hLC50) neprokázalo poškození erytrocytů, projasnění cytoplazmy ani depolarizaci jádra. U exponované skupiny byla zaznamenána proměnlivost v probarvení jader erytrocytů. Měřením jader erytrocytů u pstruhů duhových bylo zjištěno signifikantní (p < 0,05) zmenšení jader po dusitanové expozici, které bylo patrné i na snímcích z elektronového mikroskopu. Další změny v rozměrech erytrocytů nebyly zaznamenány. Snížení hodnot hemoglobinu a zvýšení methemoglobinu se dá považovat z hlediska výsledků dalších autorů za očekávané. Největší pozornost si zaslouží hodnocení ultrastruktury erytrocytů, které prokázalo výskyt různých vakuol a kanálků uvnitř erytrocytů. Pro lepší posouzení vlivu dusitanů na erytrocyty by bylo dobré provést expozice s nižšími koncentracemi, kde by bylo účelem zjistit, jestli i nízké koncentrace způsobují zvýšený výskyt změn uvnitř erytrocytů. Jako protipól pak vystavit ryby vysokým koncentracím dusitanů, kde by bylo cílem zjistit, jestli bude výskyt změn uvnitř erytrocytů vyšší, ale také následným měřením tyto změny lépe kvantifikovat. Změny by bylo možné očekávat i při delší expozici, která by se blížila době životního cyklu erytrocytů, aby na ně dusitany působily po celou dobu, případně i zjistit vliv dusitanů na zkrácení jejich životnosti. Stejně tak by bylo vhodné zjistit rychlost změn uvnitř erytrocytů, zda jde o hodiny či desítky hodin. Zde by mohl posloužit již provedený experiment, který prokázal, že 48 h expozice je pro vyvolání určitého množství změn u pstruha duhového dostačující. Zároveň je také důležité vůbec určit vliv samotných změn zjištěných elektronovým mikroskopem na erytrocyty, a tím opět posunout znalosti působení dusitanů na ryby.

U tilápie nilské byla v předběžném testu zjištěna hodnota 46hLC50 33 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Pro hodnocení jednotlivých parametrů byly ryby vystaveny 1/3 hodnoty 46hLC50 pod dobu 48 hodin. Následná analýza neprokázala žádný vliv použité koncentrace dusitanů na hodnocené ukazatele, tím se potvrdila i odolnost tilápie nilské vůči dusitanům. Bohužel nebylo provedeno snímání erytrocytů elektronovým mikroskopem, které mohlo podpořit zjištěnou odolnost tilápie nilské tím, že by erytrocyty ve své ultrastruktuře nevykazovaly žádné změny. V případě zjištění přítomnosti změn by bylo možné použít

výše zmíněný návrh postupu, jako u pstruha duhového, kterým by se dosáhlo dalšího posunu v celkovém pochopení vlivu dusitanů na ryby.

## 7. Seznam použité literatury

- Aggergaard, S., Jensen, F.B., 2001. Cardiovascular changes and physiological response during nitrite exposure in rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 59, 13–27.
- Ajani, F., Olunkunle, O.A., Agbede, S.A., 2007. Hormonal and Haematological Responses of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) to Nitrite Toxicity. *Journal of Fisheries International* 2 (1): 48-53.
- Alcaraz, G., Espina, s., 1995. Acute toxicity of nitrite in juvenile grass carp modified by weight and temperature. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 55: 473-478.
- Avilez, I.M., Altran, A.E., Aguiar, L.H., Moraes, G., 2004. Haematological responses of the neotropical teleost matrinxã (*Brycon cephalus*) to environmental nitrite. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 139: 135–139.
- Bath, R.N. , Eddy, F.B., 1980. Transport of nitrite across fish gills. *Journal of Experimental Zoology* 214: 119–121.
- Brown, L., 1993. *Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine*. 1st ed. New York: Pergamon Press, xiv, 447 p.
- Cameron, J.N., 1971. Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology A, Comparative Physiology* 40: 743-749.
- Ciji, A., Sahu, N.P., Pal, A.K., Dasugupta, S., Akhtar, M.S., 2012. Alterations in serum electrolytes, antioxidative enzymes and haematological parameters of *Labeo rohita* on short-term exposure to sublethal dose of nitrite. *Fish Physiology and Biochemistry* 38: 1355-1365.
- Crawford, R.E., 1975. Calcium antagonism toward nitrite toxicity in chinook salmon [online]. Dostupné z: <http://www.tws-west.org/transactions/Crawford.pdf>
- ČHMÚ, 2007. Databáze kvality povrchových vod v České republice. Český hydrometeorologický ústav, Praha. In: Kroupová, H., 2007. A study of the effects of the nitrite on fish and possible ways to reduce its negative impact. Ph.D. thesis, USB, RIFCH, Vodňany. 110 p.

- da Costa, O.S.F., Fernandes, M.N., 2002. Chloride cell changes induced by nitrite exposure in an amazonian fish species. *Aquatic Toxicology: Mechanism and Consequences*. Eds. Kennedy, C., Kolok, K., MacKinlay, D., International Congress of Fish Biology, Canada., 51-61.
- Das, P.C., Ayyappan, S., Das, B.K., Jena, J.K., 2004. Nitrite toxicity in Indian major carps: sublethal effect on selected enzymes in fingerlings of *Catla catla*, *Labeo rohita*, and *Cirrhinus mrigala*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 138C: 3-10.
- Doblender, C., Lackner, R., 1996. Metabolism and detoxification of nitrite by trout hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1289: 270-274.
- Doubek, J., Bouda, J., Doubek, M., Füll, M., Knotková, Z., Pejšilová, S., Pravda, D., Scheer, P., Svobodová, Z., Vodička, R., 2003. *Veterinární hematologie*. Brno: Noviko, 464 s.
- Drastichová, J., Velišek, J., Svobodová, Z., 2006 Vliv chloridů na toxické účinky dusitanů na ryby. In: Velišek, J., *Toxikologie ryb a monitoring cizorodých látek*. Dizertační práce, ZF JU, 2006.
- Dubský, K., Šrámek, V., Kouřil, J., 2003. *Obecné rybářství*. Vyd. 1. Praha: Informatorium, 308 s.
- EIFAC., 1984. Water quality criteria for European freshwater fish. Report on nitrite and freshwater fish. EIFAC Technical Paper No. 46, Rome, FAO EIFAC, 19 pp.
- Ekwe, O.O., Nwakpa, J.N., Nweze, B.O., Biochemical effects on methemoglobin and plasma nitrite concentration in three tropical freshwater fishes. *Izean Journal of Applied Sciences* 5 (1).
- Frances, J., Allan, G. F., Nowak, B.F., 1998. The effects of nitrite on the short-term growth of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture*, 163: 63-72.
- Funminola, A., Kudirat, A.O., 2012. Nitrite intoxication of *Clarias gariepinus* at different water temperatures. *International Journal of Fisheries and Aquaculture* Vol.4, pp. 77-80.
- Gisbert, E., Rodríguez, A., Cardona, L., Huertas, M., Gallardo, M.A., Sarasquete, C., Salas-Rabanal, M., Ibarz, A., Sánchez, J., Castelló-Orway, F., 2004. Recovery of Siberian



sturgeon yearlings after an acute exposure to environmental nitrite: changes in the plasma ionic balance  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase activity, and gill histology. *Aquaculture* 239, 141-154.

Gladwin, M.T., Shelhamer, J.H., Schechter, A.N., Pease-Fye, M.E., Waclawin, M.A., Panza, J.P., Ognibene, F.P., Cannon, R.O., 2000. Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, pp. 11482–11487.

Gřunděl, M., 2008. Změny hematologických ukazatelů u ryb v souvislosti se zvýšenými koncentracemi dusitanů ve vodě. Diplomová práce, JU, ZF.

Hanson, L.A., Grizzle, J.M., 1985. Nitrite-induced predisposition of channel catfish to bacterial diseases. *The Progressive Fish-Culturist* 47: 98-121.

Hartman, P., Příkryl, I., Štědranský, E., 2005. *Hydrobiologie*. Vyd. 3. Praha: Informatorium, 359 s.

Huertas, M., Gisbert, E., Rodríguez, A., Cardona, L., Williot, P., Catelló-Orvay, F., 2002. Acute exposure of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) yearlings to nitrite: median-lethal concentration (LC50) determination, haematological changes and nitrite accumulation in selected tissues. *Aquatic Toxicology* 57, 257-266.

Chen, J-C., Cheng, S-Y., 2000. Recovery of *Panaeus monodon* from functional anemia after nitrite exposure to sublethal concentration of nitrite at different pH levels. *Aquatic Toxicology* 73-83.

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

Jensen, F.B., Andersen, N.A., Heisler, N., 1987. Effects of nitrite exposure on blood respiratory properties, acid – base and electrolyte regulation in the carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of comparative Physiology B* 157: 533–541.

Jensen, F.B., Hansen, M.N., 2011. Differential uptake and metabolism of nitrite in normoxic and hypoxic goldfish. *Aquatic Toxicology*, 101: 318-325.

- Jensen, F.B., Rohde, S., 2010. Comparative analysis of nitrite uptake and hemoglobin-nitrite reactions in erythrocytes: sorting out uptake mechanisms and oxygenation dependencies. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 298: R972-R982.
- Klaassen, C.D., (ed.), 2001. *Cassarett and Doull's Toxicology: the Basic Science of Poisons*, sixth edition. McGraw-Hill, New York, 1236 pp.
- Knudsen, P.K., Jensen, F.B., 1997. Recovery from nitrite-induced methaemoglobinaemia and potassium balance disturbances in carp. *Fish Physiology and Biochemistry* vol. 16, no. 1, pp. 1-10
- Kopp, R., Lang, Š., Brabec, T., Vitek, T., Mareš, J., 2012. Hydrochemické parametry v recirkulačním systému Dánského typu pro chov lososovitých ryb. In: Hůdová, L., (ed.), *Sborník referátů konference Intenzivní metody chovu ryb a ochrana vod*, Třeboň.
- Kopp, R., Zíková, A., Brabec, T., Lang, Š., Vitek, T., Mareš, J., 2009. Dusitany v recirkulačním systému rybí farmy Pravíkov. In: Kopp, R., 60 let výuky rybářské specializace na MZLU v Brně. 1. vyd. Brno: MZLU Brno.
- Korwin-Kossakowski, M., Ostaszewska, T., 2003. Histopathological changes in juvenile carp *Cyprinus carpio* L. continuously exposed to high nitrite levels from hatching. *Archives of Polish Fisheries* Vol. 11. Fasc. 1, 57-67.
- Kouřil, J., Hamáčková, J., Stejskal, V., 2008. Recirkulační akvakulturní systémy pro chov ryb. *Edice metodik, JU VÚRH, Vodňany*, č. 85, 40 s.
- Kroupová, H., 2007. A study of the effects of nitrite on fish and possible ways to reduce its negative impact. Ph.D. thesis, USB RIFCHB, Vodňany, 110 p.
- Kroupová, H., Máchová, J., Piačková, V., Bláhová, J., Dobšíková, R., Novotný, L., Svobodová, Z., 2008. Effects of subchronic nitrite exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 813-820.
- Kroupová, H., Máchová, J., Piačková, V., Flajšhans, M., Svobodová, Z., Poleszcuk, G., 2006a. Nitrite Intoxication of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) at Different Water Temperatures. *Acta Veterinaria Brno* 75: 561-569.

- Kroupová, H., Máchová, J., Svobodová, Z., 2005. Nitrite influence on fish: a review. *Veterinary Medicine Medicine – Czech* 50 (11): 461-471.
- Kroupová, H., Máchová, J., Svobodová, Z., Piačková, V., Smutná, M., 2006b. The ability of recovery in common carp after nitrite poisoning. *Veterinarní Medicína*, 51, (8): 423- 431.
- Kroupová, H., Prokeš, M., Máchová, S., Penaz, M., Baruš, V., Novotný, L., Máchová, J., 2010. Effect of nitrite on early-life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(3): 535-540.
- Kroupová, H., Stejskal, V., Kouřil, J., Máchová, J., Piačková, V., Zusková, E., 2012. A wide difference in susceptibility to nitrite between Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) and largemouth bass (*Micropterus salmoides* Lac.). *Aquaculture International* pp. 1-7.
- Lewis W.M., Morris D.P., 1986. Toxicity of nitrite to fish: A Review. *Transactions of the American Fisheries Society* 115: 183–195.
- Lucas, J.S., Southgate, P.C., 2003. *Aquaculture: farming aquatic animals and plants*. Ames, Iowa: Fishing News Books, 502 p.
- Lucký, Z., 1986. *Péče o zdraví a prevence chorob ryb*. MZ – Praha Vydavatelství Naše vojsko.
- Madison, B. N., Wang, Y. S., 2006. Haematological responses of acute nitrite exposure in walleye (*Sander vitreus*). *Aquatic toxicology* 79: 16-23.
- Maetz, J., 1971. Fish gills: mechanism of salt transfer in fresh water and sea water. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 262: 209–249.
- Margiocco, C., Arillo, A., Mensi, P., Shenone, G., 1983. Nitrite bioaccumulation in *Salmo gairdneri* Rich. and haematological consequences. *Aquatic Toxicology* 3: 261-270.
- Martinez, C.B.R., Souza, M.M., 2002. Effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 133: 151-160.

- Mazik P.M., Hinman M.L., Winkelmann D.A., Klaine S.J., Simco B.A., 1991. Influence of nitrite and chloride concentrations on survival and haematological profiles of striped bass. *Transactions of the American Fisheries Society* 120: 247-254.
- Meinelt, T., Kroupova, H., Stüber, A., Rennert, B., Wiene, A., Steinberg, C.E.W., 2010. Can dissolved aquatic humic substances reduce the toxicity of ammonia and nitrite in recirculating aquaculture systems? *Aquaculture* 306: 378–383.
- Park, I-N., Lee, J., Hur, J-W., Song, Y-C., Na, H-C., Noh, C. H., 2007. Acute Toxicity and Sublethal Effects of Nitrite on Selected Hematological Parametres and Tissues in Dark-banded Rockfish *Sebastes inermis*. *Journal of the world aquaculture society* Vol. 38: No. 2.
- Paula-Silva, M.D., Pires-Lopes, M., 2000. Nitrite causes hematological disturbances in *Colossoma macropomum* [online]. Dostupné z: <http://www-heb.pac.dfo-mpo.gc.ca/congress/2000/Papers/toxicologypdf/paula-silva.pdf>
- Palachek, R.M., Tomasso, J.R., 1984. Toxicity of nitrite to channel catfish (*Ictalurus punctatus*) tilapia (*Tilapia aurea*), and largemouth bass (*Micropterus salmonides*): evidence for nitrite exclusion mechanism. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 41: 1739-1744.
- Pecka, M., 2006. Laboratorní hematologie v přehledu: fyziologie a patofyziologie krevní buňky. Český Těšín, FINIDR, 304 s.
- Piskač, A., Kačmár, P., Bártík, M., Procházka, Z., Svobodová, Z., Šikula, J., 1985. Veterinární toxikologie. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 256 s.
- Pitter, P., 2009. Hydrochemie. 4. aktualiz. vyd. Praha: VŠCHT, 579 s.
- Pokorný, J., 2004. Velký encyklopedický rybářský slovník. 1. vyd. Plzeň Fraus, 649 s.
- Pokorný, J., Adámek, Z., Šrámek, V., Dvořák, J., 2003. Pstruhařství. 3., přeprac. vyd. Praha: Informatorium.
- Pšenička, M., Vancová, M., Koubek, P., Těšitel, J., Linhart, O., 2009. Fine structure and morphology of sterlet (*Acipenser ruthenus* L. 1758) spermatozoa and acrosin localization. *Animal Reproduction Science* 111: 3–16.

- Randák, T., Žlábek, V., Turek, J., Kolářová, J., 2011. Využití pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) pro účely ekotoxikologického monitoringu kvality vody. Edice metodik, FROV JU, Vodňany č. 111, 25 s.
- Reinhart, W.H., Chien, S., 1988. Red cell vacuoles: their size and distribution under normal conditions and after splenectomy. *American Journal of Hematology* 4: 265-271.
- Romero, N., Denicola, A., Radi, R., 2006. Red blood cells in the metabolism of nitric oxide-derived peroxynitrite. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* 58(10): 572-580
- Russo, R.C., 2006. Nitrite toxicity to fish. *Fish Physiology, Toxicology, and Water Quality*. In: *Proceedings of the Ninth International Symposium, Capri, Italy, April 24-28*.
- Russo, R.C., Thurston, R.V., 1977. The acute toxicity of nitrite to fishes. 118-131. In: Tubb, R.A., *Recent advances in fish toxicology*. Environmental Protection Agency, Ecological Research Series EPA-600/3-77-085, Corvallis, Oregon.
- Řehulka, J., Adamec, V., 2004. Red blood cell Indices for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) Reared in Cage and Raceway Culture. *Acte Veterinaria Brno* 73: 105-114.
- Saleh, M.C., McConkey, S., 2012. NADH – dependent cytochrome b5 reductase and NADPH methemoglobin reductase activity in the erythrocytes of *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry* 38: 1807–1813.
- Scarano, G., Saroglia, M.G., 1984. Recovery of fish from functional and haemolytic anaemia after brief exposure to a lethal concentration of nitrite. *Aquaculture* 43: 421–426.
- Siikavuopio, S.I., Sæther, B.S., 2006. Effects of chronic nitrite exposure on growth in juvenile Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture* 255: 351-356.
- Simmons, A.E., Karimi, I., Talwar, M., Simmons, T.W., 2012. Effects of Nitrite on Development of Embryos and Early Larval Stages of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 9 (4): 200-6.
- Stoskopf, M.K., 1993. *Fish medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders Co., xix, 882 p.

- Svobodová, Z., Máchová J., Poleszczuk G., Hůda J., Hamáčková J., Kroupová, H., 2005a. Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems: three case studies. *Acta Veterinaria Brno* 74:129-137.
- Svobodová, Z., Gelnarová, J., Justýn, J., Krupauer, V., Máchová, J., Šimanov, L., Valentová, V., Wohlgemuth, E., 1987. *Toxikologie vodních živočichů*. Vydavatelství MZVŽ a ČSR, Praha.
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, Z., Veselý, T., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J., 2007. *Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb*. 4. přeprac. vyd. Praha: Informatorium, 264 s.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Beklová, M., Cupáková, Š., Minks, J. 2000. *Ekotoxikologie – praktická cvičení část I. Testy toxicity na organizmech vodního prostředí*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 70 s.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Drastichová, J., Groch, L., Lusková, V., Poleszczuk, G., Velišek, J., Kroupová, H., 2005b. Haematological and biochemical profiles of carp blood following nitrite exposure at different concentrations of chloride. *Aquaculture Research* 36 (12): 1177-1184.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Kolářová, J., Hamáčková, J., 2003. Otravy ryb dusitany v recirkulačních systémech. Studie č. 19. In: *Veterinární toxikologie: praktická cvičení*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 179 s.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Kroupová, H., 2008. Otravy ryb. In: *Veterinární toxikologie v klinické praxi*, Ed. Svobodová, Z., Profi Press, 201-217.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Paláčková, J., 1986. Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb. *Edice metodik, VÚRH Vodňany*, č. 22, 36 s.
- Svobodová, Z., Vykusová, B., Máchová, J., 1992. Havarijní a dlouhodobé znečištění povrchových vod. *Vodňany: Ministerstvo životního prostředí ČR*, 180 s.
- Treves-Brown, K.M., 2000. *Applied Fish Pharmacology*. Kluwer Academic Publishers, Dordecht, Volume 3, 310 pp.

- Tripathi, N.K., Latimer, K.S., Burnley, V.V., 2004. Hematologic reference intervals for koi (*Cyprinus carpio*), including blood cell morphology, cytochemistry, and ultrastructure. *Veterinary Clinical Pathology* 33: No. 2.
- Vedel, N.E., Korsgaard, B., Jensen, F.B., 1998. Isolated and combined exposure to ammonia and nitrite in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on electrolyte status, blood respiratory properties and brain glutamine:glutamate concentrations. *Aquatic Toxicology* 41: 325–342.
- Voslářová E., Pištěková, V., Svobodová, Z., Bedáňová, I., 2008. Nitrite Toxicity to *Danio rerio*: Effects of Subchronic Exposure on Fish Growth. *Acta Veterinaria Brno* 77: 455-460.
- Voslářová, E., Pištěková, V., svobodová, Z., 2006. Nitrite Toxicity to *Danio Rerio*: Effects of Fish Age and Chloride Concentrations. *Acta Veterinaria Brno* 75: 107-113.
- Watenpaugh, D. E., Beitinger, J. L., Huey, D. W., 1985. Temperature tolerance of nitrite exposed channel catfish. *Transactions of the American Fisheries society* 114: 274-278.
- Welker, T.L., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Klesius, P.H., 2011. Susceptibility of hannel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed with dietary sodium chloride to nitrite toxicity. *Aquaculture nutrition* 17: e892-e901.
- Welker, T.L., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Klesius, P.H., 2012. Susceptibility of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with dietary sodium chloride to nitrite toxicity. *Aquaculture International* 20: 159-176.
- Williams, E.M., Glass, M.L., Heisler, N., 1993. Effects of nitrite-induces methaemoglobinaemia on oxygen affinity of carp blood. *Environmental Biology of Fishes* 37: 407-413.
- Wuertz,S., Schulze, S.G.E., Eberhardt, U., Schulz, C., Schroeder, J.P., 2013. Acute and chronic nitrite toxicity in juvenile pike-perch (*Sander lucioperca*) and its compensation by chloride. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* In press.
- Yildiz, H.Y., Köksal, Borazan, G., Benli, C.K., 2006. Nitrite-induce methemoglobinemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Ichthyology* 22, 427-429.

Zhang, L., Xiong, D.-M., Li, B., Zhao, Z.-G., Fang, W., Yang, K. and Fan, Q.-X., 2012. Toxicity of ammonia and nitrite to yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) Journal of Applied Ichthyology 28: 82–86.

Zusková, E., Máchová, J., Velíšek, J., Stará, A., Svobodová, Z., Kroupová, H., 2013. Recovery of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after subchronic nitrite exposure. Acta Veterinaria Brno In press.

Nařízení vlády č. 61/2003 Sb., O ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod.

Vyhláška č. 419/2012 Sb., O ochraně pokusných zvířat.

Zákon č. 254/2001 Sb., O vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon).

Zákon č. 246/1992 Sb., Na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů.



## 8. Seznam obrázků, tabulek a grafů

- Obr. č. 1.** Schéma příjmu dusitanů erytrocytem a následná oxidace hemoglobinu
- Obr. č. 2.** Snímek krevního nátěru před úpravou
- Obr. č. 3.** Snímek krevního nátěru po úpravě
- Obr. č. 4.** Měření erytrocytů v programu MICRO IMAGE 4.0
- Obr. č. 5.** Konstantně probarvená jádra Pstruha duhového v kontrolní skupině
- Obr. č. 6.** Erytrocyty exponovaného pstruha duhového s tmavým prstencem kolem jádra a neprobarveným středem
- Obr. č. 7.** Změny v zabarvení jader erytrocytů u exponovaných Pstruhů duhových
- Obr. č. 8.** Ultrastruktura čtyř různých typů erytrocytů u exponovaných pstruhů
- Obr. č. 9.** Ultrastruktura erytrocytů pstruhů duhových z kontrolní skupiny.
- Obr. č. 10.** Ultrastruktura erytrocytů pstruhů duhových z kontrolní skupiny.
- Obr. č. 11.** Krevní nátěr tilápie Nilské z kontrolní skupiny
- Tab. č. 1.** Minimálních hodnoty chloridů, které jsou obecně považovány za bezpečné při různých koncentracích dusitanů.
- Tab. č. 2.** Poměry naměřených hodnot u jednotlivých skupin pstruha duhového.
- Tab. č. 3.** Četnost vybraných změn v ultrastruktuře erytrocytů.
- Tab. č. 4.** Poměry naměřených hodnot u exponované a kontrolní skupiny tilápie nilské.
- Graf č. 1.** Průměrné naměřené rozměry erytrocytů u exponované skupiny ( $8 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ ) pstruha duhového.
- Graf č. 2.** Průměrné naměřené rozměry erytrocytů u kontrolní skupiny pstruha duhového.
- Graf č. 3.** Hodnoty hemoglobinu v pokusné a kontrolní skupině pstruha duhového.
- Graf č. 4.** Obsah methemoglobinu v krvi pstruha duhového u pokusné a kontrolní skupiny
- Graf č. 5.** Počet erytrocytů v pokusné a kontrolní skupině pstruha duhového.
- Graf č. 6.** Hematokritové hodnoty v pokusné a kontrolní skupině pstruha duhového.
- Graf č. 7.** Průměrné naměřené rozměry erytrocytů u exponované skupiny ( $11 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ ) tilápie nilské.
- Graf č. 8.** Průměrné naměřené rozměry erytrocytů u kontrolní skupiny tilápie nilské.
- Graf č. 9.** Počet erytrocytů v pokusné a kontrolní skupině tilápie nilské.
- Graf č. 10.** Hematokritové hodnoty v pokusné a kontrolní skupině tilápie nilské.
- Graf č. 11.** Obsah hemoglobinu v krvi tilápií nilských z pokusné a kontrolní skupiny.

## 9. Abstrakt

Cílem práce bylo zjistit vliv dusitanů na hematologické ukazatele pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a tilápie Nílské (*Oreochromis niloticus*). Po expozici ryb různým koncentracím dusitanů, byly stanoveny hodnoty 48hLC50. Pro vlastní test byly použity zlomkové koncentrace těchto hodnot. Pro pstruha duhového  $8 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ , pro tilápii nílskou  $11 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$ . Expozice u obou druhů trvala 48 hodin. Z krve ryb byly stanoveny hematologické parametry, z krevních nátěrů se stanovil vliv dusitanů na velikostní změny erytrocytů. Z krve pstruha duhového byl elektronovou mikroskopií stanoven vliv dusitanů na změny v ultrastruktuře erytrocytů. U erytrocytů pstruha duhového bylo zjištěno signifikantní ( $p < 0,05$ ) zmenšení jader. Na snímcích z elektronového mikroskopu bylo prokázáno zvýšené množství změn, především v podobě různých útvarů v cytoplazmě erytrocytů, také bylo viditelné smrštění jader. Bylo zjištěno signifikantní ( $p < 0,01$ ) snížení množství hemoglobinu a signifikantní ( $p < 0,01$ ) zvýšení koncentrace methemoglobinu v krvi u exponované skupiny. U počtu erytrocytů a hematokritové hodnoty nebyly zaznamenány změny. Hodnocení hematologických ukazatelů tilápie nílské neprokázalo žádné velikostní změny u měřených parametrů, změny nebyly zaznamenány u počtu erytrocytů, množství hemoglobinu ani u hematokritové hodnoty.

**Klíčová slova:** dusitany, erytrocyty, hematologické ukazatele, *Oncorhynchus mykiss*, *Oreochromis niloticus*

## 10. Abstract

The aim of the thesis was to determine the effect of nitrite on hematological indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). After the fish were exposed to various concentrations of nitrites were determined 48hLC50. For the main test only fractional concentrations of these values were used. For rainbow trout it was 8 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, for Nile tilapia 11 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. The exposure of both species lasted for 48 hours. From fish blood were made blood smears to determine the influence of nitrite on size changes of erythrocytes and hematological parameters were set also. The effect of nitrite on changes in the ultrastructure of erythrocytes was determined by the electron microscopy. The erythrocyte nuclei of rainbow trout showed significant (p < 0.05) shrinkage. The images of the electron microscope showed an increased amount of changes, especially in the form of various units within the cytoplasm of erythrocytes, was also visible nuclei shrinkage. There was significant (p < 0.01) reduction in the amount of hemoglobin and significant (p < 0.01) increase in the concentration of methemoglobin levels of the exposed groups. In the number of erythrocytes and hematocrit were not detected any changes. Hematological parameters of Nile tilapia did not show any size changes in the measured parameters, no changes were detected in the count of erythrocytes, hemoglobin and hematocrit values.

**Key words:** nitrites, erythrocytes, hematological parameters, *Oncorhynchus mykiss*, *Oreochromis niloticus*