

# DUSITANY V RECIRKULAČNÍM SYSTÉMU RYBÍ FARMY PRAVÍKOV

## *Nitrites in recirculation system of Pravikov fish farm*

R. KOPP, A. ZIKOVÁ, T. BRABEC, Š. LANG, T. VÍTEK, J. MAREŠ

### **Abstract**

Nitrite is an intermediate stage in the oxidation of ammonium to nitrate. Elevated nitrite concentration in water is a potential threat to freshwater fish since nitrite is actively taken up via the gills in competition with chloride and causing elevation of methaemoglobin levels. The aim of this study was to solve the problem caused by elevated nitrite concentration by adding sodium chloride. Higher concentration of nitrite ( $0.3$  and  $0.4 \text{ mg.l}^{-1} \text{ N-NO}_2$ ) caused mild symptoms of trout health damage. Mean value of methaemoglobin levels in blood of rainbow trout varied from 15% to 50%. The toxicity of nitrite decreased after addition of sodium chloride ( $20 \text{ kg.day}^{-1}$  for 11 days). Later on the biofilter started to work properly and because of the decrease of nitrite concentration there was no need to add furthermore sodium chloride.

Dusitanový dusík je přirozenou součástí povrchových vod. Vzhledem ke své chemické a biochemické nestálosti se obvykle vyskytuje v malých koncentracích, protože v oxických podmínkách je rychle nitrifikačně transformován na dusičnany, v anoxických podmínkách je biologicky denitrifikován až na elementární dusík. Řádově vyšší koncentrace dusitanového dusíku se vyskytují ve splaškových vodách a odpadních vodách ze strojírenských závodů (Pitter, 2009).

Zvýšené koncentrace dusitanů se mohou vyskytovat ve vodách s intenzivním chovem hospodářsky významných druhů ryb (Svobodová a kol. 2005). Velmi často se vyskytují v recirkulačních systémech, zejména bezprostředně po zahájení provozu nebo v důsledku nerovnováh v procesu nitrifikace (Kamstra a kol. 1996). Během nitrifikace dochází k biochemické oxidaci amoniakálního dusíku na dusitany a následně až na dusičnany. Pokud druhá fáze nitrifikace neprobíhá dostatečně rychle, 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. 2005). Mezi hlavní faktory, které ovlivňují rychlost nitrifikace, patří pH, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, počet nitrifikačních bakterií a přítomnost látek inhibujících nitrifikaci (Russo a Thurson, 1991).

Problémy s dusitany ve sladké vodě spočívají v tom, že mají určitou afinitu k iontové výměně chloridových a hydrogenuhličitanových iontů. Pokud jsou dusitany přítomny ve vyšších koncentracích ve vodě, pak ryba přijímá dusitany na úkor chloridů. Zvýšení koncentrace chloridů ve vodě tak chrání ryby před příjmem dusitanů a jejich toxickými

účinky (Jensen, 2003). Dusitany pronikají do krevní plazmy, dále do červených krvinek, kde se vážou na barvivo hemoglobin za vzniku methemoglobinu. Zvýšená koncentrace methemoglobinu v krvi se projevuje hnědým zbarvením krve a žaber. Methemoglobin nemá schopnost přenášet kyslík, a tím se snižuje kapacita krve pro transport kyslíku (Cameron, 1971).

Koncentrace methemoglobinu, které se u ryb projevují úhynem, případně zabraňují normálnímu chování ryb, se liší podle druhu ryb a jsou silně ovlivněny okolními podmínkami. Nejcitlivější jsou lososovité ryby, kde rozdíly mezi jednotlivými druhy jsou minimální. Výrazné rozdíly v citlivosti jsou mezi teplomilnými rybami. Velmi odolný vůči dusitanům je okounek pstruhový, který tvoří větší množství methemoglobinu v krvi až při velmi vysokých koncentracích dusitanů (Palachek a Thomasso, 1984).

## **Materiál a metodika**

Odchovné zařízení firmy BioFish s.r.o. v Pravíkově je založeno na dánské technologii recirkulačního zařízení pro intenzivní chov lososovitých ryb. V systému je 12 produkčních žlabů napojených na biofiltr o celkové kapacitě vody přibližně 1000 m<sup>3</sup>. Systém umožňuje kombinovat přítok vody z více zdrojů (potok, vrt, rybník) a vhodně tak upravovat životní podmínky chovaných ryb. Standardně je systém dotován vodou z potoka, s celkovou výměnou vody přibližně za 48 hodin.

Odchovný systém byl napuštěn 5.7.2009. Již 21.7.2009 byly nasazeny první ryby do systému (11.000 ks Pd) a systém byl postupně dosazován: 28.7.2009 (25.000 ks Pd), 5.8.2009 (25.000 ks Pd) a 20.8.2009 (20.000 ks Pd).

Hydrochemické parametry v chovném systému byly kromě denního provozního měření zajišťovaného obsluhou, prováděny periodicky pracovníky oddělení rybářství a hydrobiologie MZLU v Brně. Kontinuální měření hydrochemických parametrů probíhalo v termínu 11. a 12.8.2009. Základní fyzikální parametry (nasycení vody kyslíkem, pH, vodivost a teplota vody) byly stanovovány pomocí přístroje CyberScan PCD 650 (Eutech Instruments, USA). Další uvedené chemické parametry byly stanovovány standardními postupy (Horáková, 2007).

Pro potvrzení toxického působení dusitanů byla 12.8.2009 od 12 ks pstruha duhového odebrána krev do heparinizovaných injekčních stříkaček a stanovena hladina methemoglobinu

v krvi ryb. Odběr krve a stanovení hodnoty methemoglobinu bylo prováděno dle metodiky (Svobodová a kol. 1986).

## Výsledky

Průměrné hodnoty sledovaných fyzikálně-chemických parametrů na rybí farmě Pravíkov jsou uvedeny v tabulce č. 1. Od počátku srpna se začala zvyšovat koncentrace dusitanového dusíku v odchovném systému rybí farmy Pravíkov, která díky nízké koncentraci chloridů ve vodě začala ovlivňovat nasazenou obsádku ryb. Zvyšující se denní úhyn ryb vedl k nutnosti tuto situaci řešit zvýšením chloridového čísla a tím ke snížení toxického vlivu dusitanů. To bylo realizováno dodáním chloridu sodného do systému. Od 11.8.2009 do 21.8.2009 bylo denně do přítokové části ke žlabům přidáváno 20 kg NaCl (celkem 220 kg), což zvýšilo koncentraci chloridů ve vodě více než na dvojnásobek (viz tab. 2). Zlepšení fyzikálně-chemických poměrů v odchovném systému vedla k zastavení úhynu ryb, koncentrace dusitanů ve vodě se díky zapracování biofiltru začala snižovat, takže již 20.8. 2009 mohly být do systému dosazeny další ryby.

V ranních hodinách 12.8.2009 jsme odebrali krev 12 jedincům Pd ke stanovení hladiny methemoglobinu v krvi ryb. Průměrná hodnota byla 15% a maximální až 50% methemoglobinu.

Tabulka 1: Fyzikálně-chemické parametry na rybí farmě Pravíkov v průběhu sledovaného období (průměrné hodnoty, rozpětí hodnot).

| Datum    | teplota | kyslík | pH   | Vod.               | N <sub>cel.</sub>  | P <sub>cel.</sub>  | N-NH <sub>4</sub>  | N-NO <sub>2</sub>  | P-PO <sub>4</sub>  | N-NO <sub>3</sub>  |
|----------|---------|--------|------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|          | °C      | %      |      | mS.m <sup>-1</sup> | mg.l <sup>-1</sup> | mg.l <sup>-1</sup> | mg.l <sup>-1</sup> | mg.l <sup>-1</sup> | mg.l <sup>-1</sup> | mg.l <sup>-1</sup> |
| 13.7.09  | 19,3    | 92     | 7,24 | 11,2               | 1,7                | 0,060              | 0,06               | 0,006              | 0,008              | 1,7                |
| 11.8.09  | 18,4    | 88     | 7,29 | 10,4               | 5,3                | 0,196              | 0,84               | 0,362              | 0,080              | 3,7                |
| 12.8.09  | 18,0    | 90     | 7,25 | 12,0               | 4,0                | 0,108              | 0,53               | 0,362              | 0,080              | 3,7                |
| 1.9.09   | 15,1    | 89     | 6,77 | 11,7               | 6,2                | 0,225              | 0                  | 0,027              | 0,102              | 6,1                |
| 22.9.09  | 14,4    | 75     | 6,26 | 13,8               | 10,5               | 0,446              | 0                  | 0,035              | 0,254              | 10,1               |
| 5.10.09  | 10,5    | 81     | 6,53 | 12,6               | 9,2                | 0,396              | 0                  | 0,020              | 0,270              | 6,1                |
| 26.10.09 | 7,2     | 89     | 7,28 | 13,0               | 5,6                | 0,265              | 0,04               | 0,025              | 0,198              | 5,4                |

| TOC                | CHSK <sub>Cr</sub> | CHSK <sub>Mn</sub> | KNK                  | Cl <sup>-</sup>    | Ca <sup>2+</sup>   | SO <sub>4</sub>    | Fe <sub>cel.</sub> |
|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| mg.l <sup>-1</sup> | mg.l <sup>-1</sup> | mg.l <sup>-1</sup> | mmol.l <sup>-1</sup> | mg.l <sup>-1</sup> | mg.l <sup>-1</sup> | mg.l <sup>-1</sup> | mg.l <sup>-1</sup> |
| 18,5               | 29,2               | 10,02              | 0,39                 | 7,06               | 8,3                | 19                 | 0,14               |
| 17,8-19,5          | 14,7-46,0          | 8,30-11,16         | 0,31-0,51            | 4,83-13,65         | 7,2-10,0           | 11-24              | 0,10-0,21          |

## Diskuze

Citlivost k dusitanům se velmi liší v závislosti na druhu ryb. Nejcitlivější jsou lososovité ryby, výrazné rozdíly v citlivosti jsou mezi teplomilnými rybami (Kroupová a kol. 2005a, 2005b). Hlavní faktor ovlivňující toxicitu dusitanů je jednoznačně koncentrace chloridů ve vodě. Hmotnostní poměr  $\text{Cl}^-$  a  $\text{N-NO}_2$  (chloridové číslo) by v případě chovu pstruha duhového měl být nad hodnotou 17 (Svobodová a kol. 1987). V našem případě se před přidáním  $\text{NaCl}$  toto číslo pohybovalo pod touto hranicí (v rozpětí 13-15 viz tab. 2).

Hodnota chloridového čísla při úhynu ryb za příznaků methemoglobinémie se pohybuje v poměrně širokém rozpětí. Chloridové číslo v případě úhynu sumců bylo v rozmezí 13-28, línů 11-19. V případě poškození zdravotního stavu tilapií bez příznaků otravy byl tento poměr v rozmezí 50-150 (Svobodová a kol. 2001, 2005). Toxicitu dusitanů ovlivňují i další faktory např. teplota vody, obsah rozpuštěného kyslíku věk a velikost ryb aj. Podrobný přehled o účincích dusitanů na ryby jsou uvedeny v publikacích Kroupová a kol. (2005a, 2005b).

Tabulka 2: Změny obsahu chloridů, dusitanového dusíku a chloridového čísla při přidavku soli v průběhu 24 hodin (11-12.8.2009) na rybí farmě Pravíkov

| ČAS   | $\text{Cl}^-$<br>mg/l | $\text{N-NO}_2$<br>mg/l | chloridové číslo<br>$\text{Cl} / \text{N-NO}_2$ | přídavek $\text{NaCl}$<br>kg |
|-------|-----------------------|-------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------|
| 8:45  | 4,9                   | 0,320                   | 15                                              |                              |
| 14:45 | 4,8                   | 0,366                   | 13                                              | 4                            |
| 15:45 | 6,3                   | 0,379                   | 17                                              |                              |
| 16:45 | 7,0                   | 0,364                   | 19                                              | 6                            |
| 17:45 | 11,5                  | 0,364                   | 32                                              |                              |
| 18:45 | 11,0                  | 0,363                   | 30                                              | 5                            |
| 21:00 | 14,0                  | 0,360                   | 39                                              | 5                            |
| 23:00 | 17,6                  | 0,399                   | 44                                              |                              |
| 3:00  | 15,7                  | 0,429                   | 37                                              |                              |
| 7:00  | 13,1                  | 0,406                   | 32                                              |                              |
| 10:00 | 12,1                  | 0,412                   | 29                                              |                              |

Výsledky experimentů sledující toxicitu dusitanů u pstruha duhového ukazují jeho vysokou citlivost i při nižších koncentracích ve vodě (Jensen, 2003). Wedemeyer a Yasutake (1978) zjistili, že při koncentraci  $0,06 \text{ mg.l}^{-1}$   $\text{N-NO}_2$  ve vodě, není u pstruha duhového omezena rychlost růstu, ani další fyziologické funkce i po dobu 6 měsíců, a to při koncentraci  $2,3 \text{ mg.l}^{-1}$   $\text{Cl}^-$ . Kroupová a kol. (2008) uvádějí subchronickou koncentraci dusitanů  $0,3 \text{ mg.l}^{-1}$   $\text{N-NO}_2$ , při koncentraci chloridů  $10 \text{ mg.l}^{-1}$   $\text{Cl}^-$  jako bezpečnou pro přežití pstruha duhového.

Avšak již při koncentraci  $0,003 \text{ mg.l}^{-1} \text{ N-NO}_2$  byly pozorovány změny v koncentraci glukózy a draslíku, rovněž byly pozorovány změny žaberního epitelu (hyperplazie, edém).

Koncentrace dusitanů, které byly dosaženy v případě našeho sledování, se pohybovaly mezi  $0,3$  až  $0,4 \text{ mg.l}^{-1} \text{ N-NO}_2$ , ale při koncentraci chloridů kolem  $5 \text{ mg.l}^{-1}$ . Při této koncentraci dusitanů ve vodě již byly u části rybí populace pozorovány změny v chování (apatie, malátnost, pohyb ryb u hladiny, omezení příjmu krmiva) a zvýšil se úhyn ryb.

Hladina methemoglobinu v krvi ryb dosahovala (po 18 hod. od prvního přidání chloridu sodného) průměrných hodnot kolem 15% a maximální až 50%. Rybí krev běžně obsahuje měřitelné množství methemoglobinu i v nepřítomnosti dusitanů, neboť methemoglobin vzniká také samovolně, i když velmi pomalu. Publikované údaje uvádí normální hodnoty methemoglobinu v krvi pstruha duhového od 0,9 do 3,6% (Cameron, 1971). Přítomnost methemoglobinu v krvi ryb v koncentraci do 10% nemůže být u ryb považována za něco výjimečného nebo dokonce patologického (Kroupová a kol. 2005b).

V případě našeho sledování byla u pěti jedinců Pd hodnota methemoglobinu vyšší než 10%, což lze jednoznačně přisoudit vysoké koncentraci dusitanů. Kdyby nebyl do systému přidáván chlorid sodný, daly by se očekávat vyšší koncentrace methemoglobinu. Díky zvýšení počtu chloridových buněk již nebyl rybou dusitanový iont přijímán a enzym reduktáza tak mohl účinně snížit hladinu methemoglobinu v organizmu.

Na začátku září již v biofiltru dobře fungovaly i nitrifikační bakterie, což způsobilo výrazné snížení hodnot dusitanů (viz. Tab. 1). Při koncentracích v řádu setin miligramů na litr nejsou dusitany pro ryby nebezpečné ani při velmi nízkých koncentracích chloridů. V dalším období nelze očekávat problémy s vyššími koncentracemi dusitanového dusíku, ty by nastaly pouze v případě havárie (likvidace mikroorganismů v biofiltru) nebo při dlouhodobé odstávce systému a opětovném zapracovávání biofiltru. Zabránit v tomto případě ohrožení obsádky pstruha duhového toxickému působení dusitanů lze doplňováním chloridu sodného do systému a udržování tak vyšších koncentrací chloridů ve vodě.

### **Poděkování:**

Prezentované výsledky byly získány za podpory projektu NAZV QI91C001 „Optimalizace podmínek intenzivního chovu lososovitých ryb v podmínkách České republiky s využitím dánské technologie se zaměřením na kvalitu produkovaných ryb“ a Výzkumného záměru č. MSM6215648905 „Biologické a technologické aspekty udržitelnosti řízených ekosystémů a jejich adaptace na změnu klimatu“ uděleného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky. Poděkování kolektivu pracovníků VFU pod vedením Prof. Svobodové za stanovení methemoglobinu v krvi ryb.

## Literatura:

- CAMERON, J.N. (1971): Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology A, Comparative Physiology* 40:743-749
- HORÁKOVÁ, M. (2007): *Analytika vody*. VŠCHT Praha, 335 s.
- JENSEN, F.B. (2003): Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A*, 135:9-24
- KAMSTRA, A., SPAN, J.A., VAN WEERD, J.H. (1996): The acute toxicity and sublethal effects of nitrite on growth and feed utilization of European eel, *Anguilla anguilla* (L.). *Aquacult. Res.* 27:903-911
- KROUPOVÁ, H., MÁCHOVÁ, J., PIACKOVÁ, V., BLÁHOVÁ, J., DOBŠÍKOVÁ, R., NOVOTNÝ, L., SVOBODOVÁ, Z. (2008): Effect of subchronic nitrite exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71:813-820
- KROUPOVÁ, H., MÁCHOVÁ, J., SVOBODOVÁ, Z. (2005a): Nitrite influence on fish: a review. *Vet. Med. – Czech*, 50, 11:461-471
- KROUPOVÁ, H., MÁCHOVÁ, J., SVOBODOVÁ, Z. (2005b): Dusitany ve vodním prostředí a jejich účinky na ryby – přehled. *Bulletin VURH Vodňany*, 41, 4: 154-170
- PALACHEK, R.M., TOMASSO, J.R. (1984): Toxicity of nitrite to channel catfish (*Ictalurus punctatus*), tilapia (*Tilapia aurea*), and largemouth bass (*Micropterus salmoides*): evidence for a nitrite exclusion mechanism. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41:1739-1744
- PITTER, P. (2009): *Hydrochemie*. VŠCHT Praha. 592 s.
- RUSSO, R.C., THURSON, R.V. (1991): Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to fishes. Pages 58-59 in D.E. BURNE and J.R. TOMASSO, editors. *Aquaculture and water quality*. Word Aquaculture society, Baton Rouge, Louisiana
- SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., POLESZCZUK, G., HŮDA, J., HAMÁČKOVÁ, J., KROUPOVÁ, H. (2005): Nitrite Poisoning of Fish in Aquaculture Facilities with Water-recirculating System. *Acta Vet. Brno*, 74:129-137
- SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., KOLÁŘOVÁ, J., HAMÁČKOVÁ, J. (2001): Otrava ryb dusitany v recirkulačních systémech. *Sborník referátů z 10. Konference Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí*, České Budějovice 20-22.8.2001, 203-209
- SVOBODOVÁ, Z. a kol. (1987): *Toxikologie vodních živočichů*. MZV SZN Praha, 232 s.
- SVOBODOVÁ, Z., PRAVDA, D., PALÁČKOVÁ, J. (1986): Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb. *Edice metodik VÚRH ve Vodňanech*, Vodňany, 36 s.
- WEDEMEYER, G.A., YASUTAKE, W.T. (1978): Prevention and treatment of nitrite toxicity in juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 35:822-827

## Adresy autorů:

Ing. Radovan Kopp, Ph.D., Ing. Andrea Ziková Ph.D., Ing. Tomáš Brabec, Ing. Štěpán Lang, Ing. Tomáš Vítek, Ph.D., Doc. Dr. Ing. Jan Mareš, Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 613 00 Brno, Česká republika, [fcela@seznam.cz](mailto:fcela@seznam.cz), [andrea.zikova@seznam.cz](mailto:andrea.zikova@seznam.cz), [brabto@seznam.cz](mailto:brabto@seznam.cz), [jjjasir@centrum.cz](mailto:jjjasir@centrum.cz), [gabon@centrum.cz](mailto:gabon@centrum.cz), [mares@mendelu.cz](mailto:mares@mendelu.cz), Ing. Radovan Kopp, Ph.D., Centrum pro cyanobakterie a jejich toxiny (Botanický ústav Akademie věd; RECETOX, Masarykova univerzita), Lidická 25/27, 657 20 Brno, Česká republika