

14/2021
Metodika

ZNAČENÍ PSTRUHA DUHOVÉHO POMOCÍ ALIZARINU

Ing. Karel Halačka, CSc.
prof. Dr. Ing. Jan Mareš
Ing. Eva Poštulková, Ph.D.
Ing. Ondřej Malý



Certifikovaná metodika 14/2021

ZNAČENÍ PSTRUHA DUHOVÉHO POMOCÍ ALIZARINU

Ing. Karel Halačka, CSc.
prof. Dr. Ing. Jan Mareš
Ing. Eva Poštulková, Ph.D.
Ing. Ondřej Malý

Brno, 2021

Metodiky vznikla za finanční podpory projektu NAZV QK21010030 Globalizace, moderní technologie a změna klimatu jako zdroje nových možností a ohrožení pro chovný management lososovitých ryb

Podíl autorů:

Ing. Karel Halačka, CSc.⁽¹⁾ 60 %

prof. Dr. Ing. Jan Mareš⁽²⁾ 30 %

Ing. Eva Poštulková, Ph.D.⁽²⁾ 5 %

Ing. Ondřej Malý⁽²⁾ 5 %

Adresa autorů:

⁽¹⁾ Ústav biologie obratlovců Akademie věd ČR, v. v. i.,
Květná 8, Brno 603 65

⁽²⁾ Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav zoologie,
rybářství, hydrobiologie a včelařství, Oddělení rybářství a hydrobiologie,
Zemědělská 1, 613 00 Brno

Oponenti:

Ing. Václav Habán (oponent z praxe)

Moravský rybářský svaz, z.s. se sídlem Soběšická 1325/83, 614 00 Brno

Ing. Lukáš Mareš (oponent za státní správu)

Ministerstvo zemědělství ČR, Oddělení rybářství a včelařství,
Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

Osvědčení o uznání certifikované metodiky MZE-64416/2021-16232:

Certifikovaná metodika ze dne 22. 11. 2021

Vydalo: Ministerstvo zemědělství, Odbor státní správy lesů, myslivosti
a rybářství, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

Smlouva o uplatnění metodiky:

Moravský rybářský svaz, z. s. se sídlem Soběšická 1325/83, 614 00 Brno

Obsah

1. Cíl metodiky	4
2. Vlastní popis metodiky	4
3. Metody testování	5
3.1. Změna chemismu	5
3.2. Růst paprsků ocasní ploutve a jejich osifikace	5
3.3. Aplikace barviva	5
3.3.1. Standardní varianty aplikace	6
3.3.2. Rozšíření standardních variant, doba čitelnosti	6
3.3.3. Vliv výrazného prodloužení doby aplikace, resp. zvýšení koncentrace	6
4. Výsledky	7
4.1. Změna chemismu	7
4.2. Paprsky ocasní ploutve	7
4.3. Aplikace barviva	8
4.3.1. Standardní varianty	9
4.3.2. Rozšíření standardních variant	10
4.3.3. Extrémní varianty doby aplikace a koncentrace	11
5. Metodická doporučení	12
6. Novost metodiky a ekonomické i neekonomické aspekty	12
7. Popis uplatnění metodiky	13
8. Poděkování	13
9. Literatura	14
9.1. Seznam použité související literatury	14
9.2. Seznam publikací předcházející metodice	14

1. Cíl metodiky

Cílem metodiky je ověření využití Alizarinové červeně /ARS/ ke značení jedinců pstruha duhového.

Značení ryb pomocí alizarinu je, alespoň v České republice, poměrně nový a nevyužívaný způsob značení. Vychází ze schopnosti alizarinové červeně vázat se na kalcifikované struktury v organismu (kost, šupina, otolít). K detekci se využívá fluorescenčních vlastností barviva, s čímž souvisí nutnost určitého speciálního vybavení (zdroj excitačního paprsku /pro ARS je doporučeno světlo o vlnové délce 530 až 560 nm/ a příslušný filtr). Barvení se aplikuje formou koupele ryb v roztoku barviva. Čas aplikace je obvykle v řádech hodin při koncentraci desetiny gramu na litr vody. Jak je uvedeno výše, ARS se váže na všechny kalcifikované tkáně v organismu. Vzhledem k tomu, že tato technologie je zaměřena na praktické využití značení v terénu bez nutnosti usmrcení jedince či odběru vzorků tkáně, byla směřována na ploutevní paprsky ocasní ploutve u živých ryb.

Dané barvení lze využít jako hromadné značení skupiny ryb. Kromě identifikace značených jedinců je možné následně využít i ke sledování růstu (přírůstek nové tkáně). K omezujícím faktorům aplikace patří zejména potřebný objem lázně a cena potřebného množství dané chemikálie, čas aplikace, zajištění potřebné minimální hladiny nasycení vody kyslíkem a účinnost navázání barviva na osifikované tkáně. Doba čitelnosti je závislá zejména na růstu jedince, tj. relativně se zmenšujícím objemem značené tkáně. Vzhledem ke způsobu aplikace je tato metoda uplatnitelná i u jedinců malých rozměrů, kde značení jiným způsobem není možné.

Cílovou skupinou uživatelů dané metodiky jsou zejména chovatelé ryb, uživatelé rybářských revírů, ichtyologové, osoby činné v ochraně přírody či veterinární praxi.

2. Vlastní popis metodiky

Pro efektivní využití značení/aplikaci je potřeba u jednotlivých druhů ryb znát určité parametry, k nimž patří zejména: tolerance k roztoku barviva, účinnost aplikace barviva (čas a koncentrace roztoku), doba čitelnost a minimální velikost jedinců (průběh osifikace).

V rámci dané metodiky byla ověřována a optimalizována metoda využití alizarinové červeně (ARS) pro hromadné značení pstruha duhového.

Testování bylo realizováno na rybochovném zařízení BioFish s.r.o. (test 3.2.), experimentálním rybochovném zařízení Mendelovy univerzity v Brně (test 3.1.; 3.3.1. a 3.3.3.), a Pstruhařství Skalní mlýn s.r.o. (test 3.3.2.). Testován byl: vliv

na chemismus (pH, vodivost, nasycení vody kyslíkem); postup osifikace ploutevních paprsků ocasní ploutve po vykulení; čitelnost značení při použití různých časů aplikace a koncentrací alizarinové červeně (Alizarinová červeně S /ARS/). Vzhledem k tomu, že použití daného značení je vhodné zejména pro malé jedince ryb o velikosti do cca 20 cm (tj. kde značení jiným způsobem je komplikované či zcela nemožné), byla studie směřována na věkovou kategorii 0+.

Na základě výsledků bylo možné vytvořit metodické doporučení pro značení jedinců pstruha duhového pomocí ARS.

3. Metody testování

3.1. Změna chemismu

Sledovány byly změny vybraných potencionálních parametrů vody potencionálně ovlivnitelné přidáním alizarinové červeně a současně významné pro vodní organismy: pH, vodivost a nasycení vody kyslíkem. Vyjma kontroly bylo testováno 6 různých koncentrací (od 75 do 1000 mg/l), což dostatečně zahrnuje rozsah používaných barvicích roztoků (obvyklá koncentrace je 150 mg/l).

3.2. Růst paprsků ocasní ploutve a jejich osifikace

Sledován byl stupeň osifikace paprsků ocasní ploutve u pstruha duhového po vykulení. Ryby (embrya) byly v jednodenním intervalu po dobu 18-ti dní fixovány do formaldehydu, projasněny pomocí tetraboritanu sodného a hydroxidu draselného. Alcianová modř a alizarinová červeně byla použita k obarvení chrupavky, resp. kalcifikované tkáně (HELLAND, S., 1988).

3.3. Aplikace barviva

Standardně se značení pomocí ARS realizuje 1 (až 2) hodinovým umístěním ryb do roztoku o koncentraci 150 mg/l alizarinové červeně. Testován byl možný rozdíl efektivity značení při různých koncentracích a časech aplikace. Sledována byla čitelnost značení na ocasní ploutvi (ploutevních paprscích) s využitím, zejména u menších jedinců, binokulární lupy. K detekci značení byl použit jako zdroj excitačního paprsku zelený laser (ukazovátka o výkonu 2 W s vlnovou délkou 532 nm), brýle filtrující záření o vlnové délce 190 až 540 nm avšak umožňující průchod emisnímu světlu o vlnové délce 580 nm (HALAČKA a MAREŠ, 2019). Čitelnost byla vyjádřena pomocí stupnice: 0 – nečitelné; 1 – značení málo zřetelné, nejednoznačné, pouze části některých paprsků; 2 – poměrně dobře zřetelné, není v celé ploše ploutve; 3 – značení výrazné, ostré linie mezi značenou a neznačenou tkání. Sledovány byly i případné změny v chování ryb či jejich mortalita.



Testování bylo realizované v rámci 3 následujících okruhů, které byly zaměřeny na různé faktory.

3.3.1. Standardní varianty aplikace

Testovány byly 4 varianty koncentrací roztoku alizarinové červeně a doby aplikace u skupiny pstruha duhového o počáteční velikosti 3 cm (SL): 75 mg/l po dobu 1 hodiny, 150 mg/l po dobu 1 a 2 hodin a 300 mg/l po dobu 1 hodiny. Kontrola čitelnosti byla provedena 41 dní po aplikaci, průměrná velikost ryb 6 cm.

3.3.2. Rozšíření standardních variant, doba čitelnosti

U skupiny ryb o počáteční průměrné velikosti 9 cm (SL) bylo testováno 7 různých variant koncentrací a doby barvení: 75 g/l po dobu 1 a 3 hodiny, 150 g/l po dobu 1, 2 a 3 hodin a 300 g/l po dobu 0,5 a 1 hodiny. Kontrola byla provedena za 44 a 73 dní po aplikaci (velikost 12; resp. 13 cm).

3.3.3. Vliv výrazného prodloužení doby aplikace, resp. zvýšení koncentrace

Skupina ryb o počáteční velikosti 6 cm (SL). Testováno celkem 5 variant koncentrací a doby aplikace: 150 mg/l po dobu 1 a 24 hodin; 350 mg/l po dobu 1 a 24 hodin a 750 mg/l po dobu 10 minut. Kontrola byla provedena 41 dní po aplikaci (průměrná velikost ryb 11 cm).

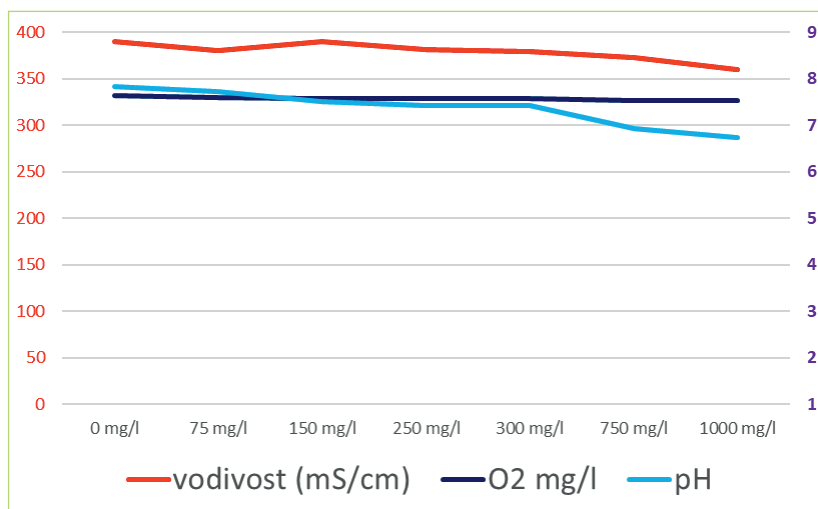
4. Výsledky

4.1. Změna chemismu

I když se vzrůstající koncentrací alizarinové červeně došlo k určité změně hodnot pH (7,8 → 6,7), vodivosti (390 → 360) a množství rozpuštěného kyslíku (7,6 → 7,5), jsou tyto změny i při vysokých koncentracích (1 g/l) nízké a nemohou znamenat nebezpečí pro ryby během značení (Graf 1).

Graf 1.:

Změny vodivosti, nasycení kyslíkem a pH roztoku alizarinové červeně při různých koncentracích

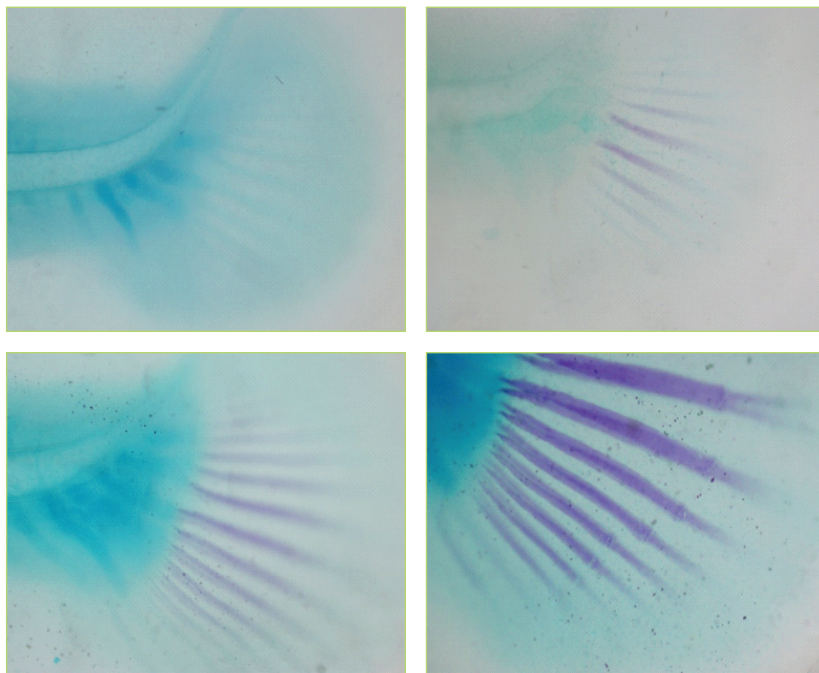


4.2. Paprsky ocasní ploutve

Proces vzniku ocasních paprsků a jejich kalcifikace postupuje výrazně již v prvních dnech po vykolení. Již po 14 dnech je prakticky všechny ploutevní paprsky ocasní ploutve kompletně osifikované a bylo by možné využít značení alizarinovou červení (Obr. 1). Je však třeba brát v úvahu, že čitelnost značení se během následného růstu ryby snižuje a obvykle je nelze detekovat při dosažení cca dvojnásobné velikosti, tj. u ryb této velikosti (cca 2 cm) bude jen krátkodobé.

Obr. 1.:

Postupná osifikace ploutevnických paprsků pátý, sedmý, desátý a čtrnáctý den po vykulení



4.3. Aplikace barviva

U žádných z použitých variant značení nebyly pozorovány změny v chování ryb, také nebyl zaznamenán úhyn. Zbarvení, tj. navázání barviva, bylo na rozdíl od našich pozorování u jiných druhů ryb (např. bolen, candát) ostrůvkovité, což se projevilo se zejména při postupně se snižující čitelnosti, kdy bylo omezeno jen na části ploutevnických paprsků. Oproti jiným druhům byla zjištěna i nižší intenzita zbarvení a rychlejší degradace. Možným vysvětlením je silnější hlenová vrstva na povrchu těla pstruha duhového. Je tady nutno počítat s kratší dobou čitelnosti, tj. týdny, resp. měsíce, případně zvýšení koncentrace barviva nebo spíše prodloužení času aplikace.

4.3.1. Standardní varianty

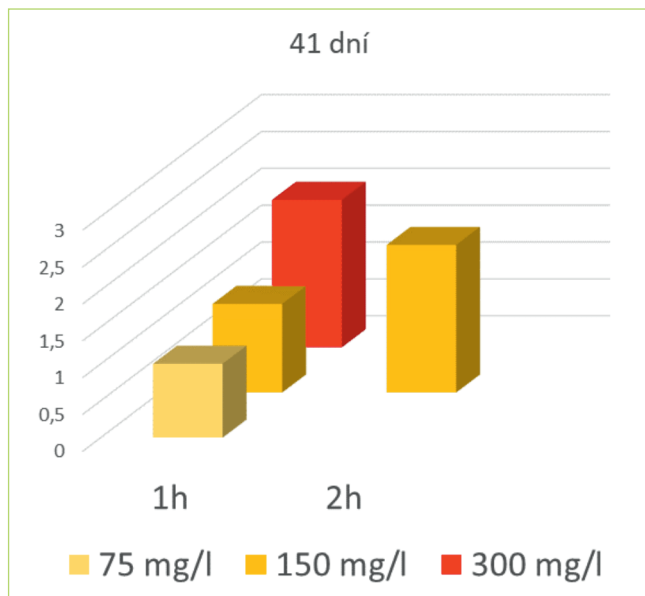
Značení bylo poměrně dobře čitelné při hodinové expozici roztokem o koncentraci 300 mg/l nebo dvouhodinové o koncentraci 150 mg/l. Při kratším čase či nižších koncentracích již čitelnost nebyla dostatečná (Graf 2).

Graf 2.:

Rozdíly v čitelnosti značení na paprscích

(0 - nečitelné, 1 - málo zřetelné, 2 - dobře zřetelné, 3 - výrazné)

ocasní ploutve při využití různých koncentrací ARS a časech aplikace



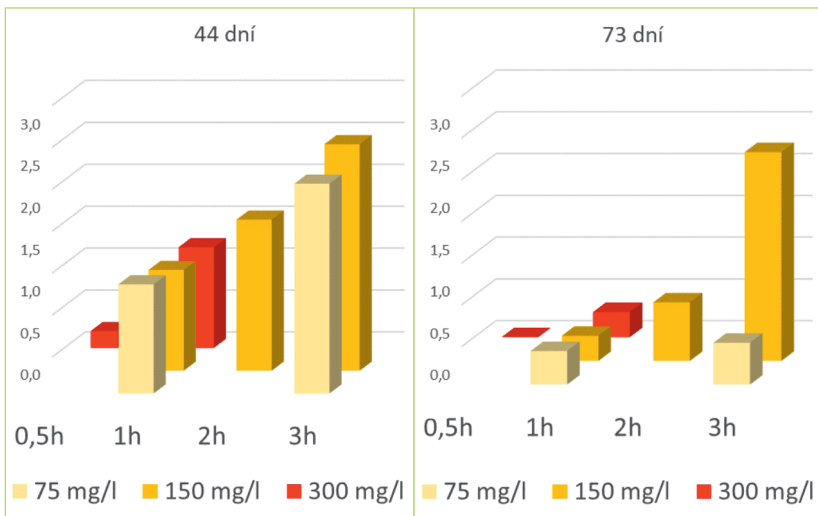


4.3.2. Rozšíření standardních variant

Doba aplikace barviva kratší, než jedna hodina se ukázalo jako nedostatečné i přes použití nejvyšší koncentrace. Při detekci po 44 dnech se jako dostatečné ukázala dvouhodinová expozice v roztoku o koncentraci 150 mg/l, lepší výsledek však poskytlo prodloužení expozice na 3 hodiny. Při detekci po 73 dnech se již jako jediný vhodný způsob značení jevila varianta zahrnující tříhodinovou expozici v roztoku o koncentraci 150 mg/l (Graf 3).

Graf 3.:

Srovnání rozdílů v čitelnosti značení na paprscích ocasní ploutve při využití různých koncentrací ARS a časech aplikace ve dvou termínech od značení

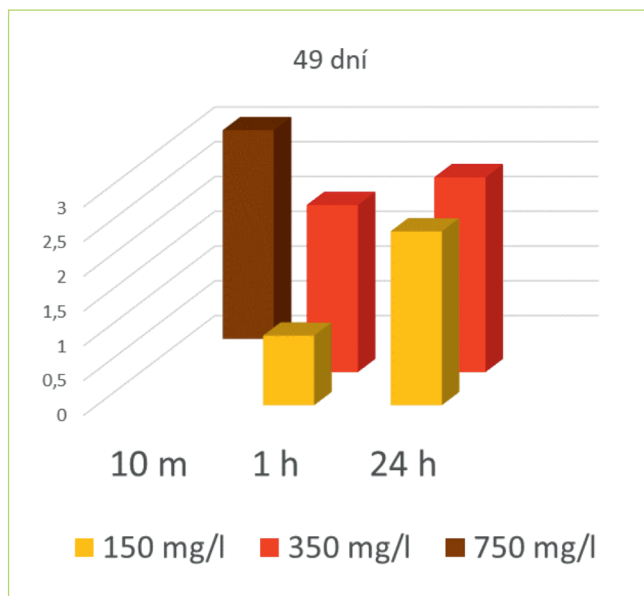


4.3.3. Extrémní varianty doby aplikace a koncentrace

Aplikace roztoku o koncentraci 150 mg/l po dobu 1 hodiny se ukázala jako nedostatečná. Zvýšení koncentrace a zejména výrazné prodloužení doby aplikace značně zvýšilo kvalitu značení. Jako velmi dobré se ukázalo krátkodobé barvení vysoce koncentrovaným roztokem (750 mg/l). U ryb umístěných do roztoku o takto vysoké koncentraci byla postupně patrna změna chování (zrychlená frekvence dýchání a plavání při hladině, proto byl jejich pobyt v lázni omezen pouze na deset minut. Ani u těchto ryb však nebyl zaznamenán úhyn, využití této varianty značení však bude vyžadovat zvýšenou pozornost a korekci podle konkrétních podmínek (teplota vody, velikost ryb apod.) (Graf 4).

Graf 4.:

Rozdíly v čitelnosti značení na paprscích ocasní ploutve při využití různých koncentrací ARS a časech aplikace



5. Metodická doporučení

Značení lze použít u pstruha duhového již krátce po vykulení (cca 14 dní), neboť ploutevní paprsky jsou již dostatečně vyvinuty, resp. kalcifikovány. Je však třeba počítat s reálnou čitelností do doby kdy jedinec naroste do cca dvojnásobné velikosti, což bude u ryb v této velikosti otázkou několika týdnů.

Nebyl prokázán negativní vliv barviva na jedince pstruha duhového (mortalita) ani změna chemismu (pH, vodivost, nasycení vody kyslíkem) v rámci standardních koncentrací a časů aplikace. Prakticky je tedy potřeba se při aplikaci zaměřit pouze na zabezpečení standardní aerace odpovídající množství/koncentraci značených ryb.

Pokud je předpokládána doba detekce značení do cca 4-5 týdnů, lze použít standardní dobu aplikace a koncentraci roztoku (1 hodina; 150 mg/l), lepších a jistějších výsledků však dosáhneme při zdvojnásobení těchto hodnot. Pro potřebu rozlišit jedince i 2-3 měsíce po značení je nutné zvýšení doby aplikace na 3 hodiny. V případě dostatku času a kapacity barvicí nádrže lze úspěšně využít i dlouhodobou lázeň o standardní (či poněkud zvýšené) koncentraci. Na druhou stranu, v případě nedostatku času či kapacity nádrží, lze uvažovat o krátkodobé lázni koncentrovaným roztokem. Tento způsob bude náročnější na manipulaci, případně cenu roztoku.

Pokud je potřeba sledovat jedince po delší období, lze samozřejmě uvažovat i o „přeznačení“.

6. Novost metodiky a ekonomické i neekonomické aspekty

Daná metodika rozšiřuje okruh použití značení pomocí ARS o další druh ryby, tj. pstruha duhového.

Pstruh duhový patří spolu s kaprem k nejvýznamnějším druhům produkčních konzumních ryb. Kromě odchovu v rybářských zařízeních je vysazován i do volných vod za účelem sportovního rybolovu. I z toho důvodu je problematika jeho produkčních parametrů či zdravotního stavu intenzivně sledována. V této souvislosti lze přepokládat zájem o možnost poměrně levného a snadného značení (a to i velmi početných skupin) jedinců za účelem například porovnání intenzity růstu či vnímavosti k onemocnění. Poskytne se takto například předpoklad pro objektivní porovnání různých skupin ryb odchovem v téže nádrži. Také možnost sledovat přírůstek daného jedince může přispět k optimalizaci chovu či výběru konkrétních forem. Spektrum využití rozšiřuje i například možnost sledování migrací vysazovaných ryb.

Daná metoda je z praktických důvodů (objem barvicí lázně) vhodná zejména pro hromadné značení ryb menší velikosti do cca 10–15 cm. Jedná se tak o velikostní kategorii ryb, kterou lze dalšími obvyklými metodami (například pomocí elastomer) značit jednak obtížně a ve větším množství časově náročně.

Kromě přispění k optimalizaci odchovu a výběru forem lze tedy jako ekonomický přínos prezentovat i rozdíl nákladů ve srovnání s dalšími způsoby značení a jejich pracovní náročnosti. Náklady na obarvení uvedenou metodou je na úrovni 1,– Kč na 1 ks ryby a délka koupele je 1–2 hodiny, přičemž je možno současně obarvit několik set až tisíc ryb v závislosti na velikosti použitých nádrží. Tradiční značení odstřížením ploutve je bez nákladů a produktivitou 700–1000 ks ryb za hodinu, bez hodnocení šetrnosti zákroku. Použití elastomerů je limitováno minimální velikostí ryb a nutností pořídit dodávané balení barvicí látky (cena 1 ml v závislosti na objednaném množství se pohybuje v rozpětí 20–45 \$, spolu s dalšími poplatky a potřebným vybavením je třeba počítat s náklady na označení jedné ryby několik korun.

Výhodou daného způsobu značení je, že snižuje stresovou zátěž jedinců na n-prosté minimum. Jedinci se v průběhu značení i po něm chovají standardně a není patrné i žádné zvýšení mortality. Navíc koupele ryb jsou standardním a běžným chovatelským zásahem a není potřeba ani speciální vybavení či zaškolení osob, které jej provádí.

7. Popis uplatnění certifikované metodiky

Značení pstruha duhového pomocí alizarinové červeně je obecně uplatnitelné, a to jak z v rámci chovu ryb, tak i v rámci výzkumu. Metodika bude uplatněna například na rybochovném zařízení BioFish s.r.o. či Pstruhařství Skalní mlýn s.r.o., na Ústavu biologie obratlovců v.v.i., Mendelově univerzitě v Brně, Masarykovou univerzitou nebo Veterinární a farmaceutickou univerzitou Brno. Pro uplatnění metodiky byla uzavřena smlouva se společností Moravský rybářský svaz, z. s. se sídlem Soběšická 1325/83, 614 00 Brno.

8. Poděkování

Metodika vznikla za finanční podpory Národní agentury pro zemědělský výzkum Programu: QK – Program aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství na období 2017-2025, ZEMĚ Podprogram 1 - Podpora inovativního zemědělství a lesnictví prostřednictvím pokročilých postupů a technologií, QK21010030 Globalizace, moderní technologie a změna klimatu jako zdroje nových možností a ohrožení pro chovný management lososovitých ryb.



9. Literatura

9.1. Seznam použité související literatury

Baer J., Rösch R., 2008: Mass-marking of brown trout (*Salmo trutta* L.) larvae by alizarin: method and evaluation of stocking. *Journal of Applied Ichthyology*, 24(1): 44–49.

Berdi A.M., 2010: Morphological Development of the Axial Skeletons of *Esox Lucius* and *Esox Masquinongy* (Euteleostei: Esociforms), with Comparisons in Developmental and Mineralization Rates." Master's Theses. Paper 556.

Bezpečnostní list, Alizarin Red S, 2012: [Online] Available et: https://www.applichem.com/fileadm in/datenblaetter/A2290_cs_CZ.pdf. [2016-07-10].

Eckman R., 2003: Alizarin marking of white fish, *Coregonus lavaretus* otoliths during egg incubation. *Fisheries Management and Ecology*, 10(4):233–239.

Gronkjaer P., Skov C., Berg S., 2004: Otolith-based analysis of survival and size-selective mortality of stocked 0+ year pike related to time of stocking. *Journal of Fish Biology*, 64: 1625–1637.

Helland S., 1988: Diagnostic – staining protocol of cartilage and bone, *Wilson Bull, Technique for avian syringes* June, 100(2); 289–293.

Liu Q., Zhanga X.M., Zhanga P.D., Nwafili S.A., 2009: The use of alizarin red S and alizarin complexone for immersion marking Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (T.) *Fisheries Research*, 98(1-3): 67–74.

Lü H., Chen H., Fu M., Peng X., Xi D., Zhang Z., 2015: Experimental evaluation of calcein and alizarin red S for immersion marking grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Japanese Society of Fisheries Science*, 81(4): 653–662.

Puchtler H., Susan N., Meloan S.N., Terry, M.S., 1968: On the history and mechanism of Alizarin and Alizarin Red S stains for Calcium. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 17(2):110–124.

Skov C.H., Koed A., Bastrup-Spohr L., Arlinghaus R., 2011: Dispersal, Growth, and Diet of Stocked and Wild Northern Pike Fry in a Shallow Natural Lake, with Implications for the Management of Stocking Programs, *North American Journal of Fisheries Management*, 31:6, 1177–1186.

9.2. Seznam publikací předcházející metodice

Halačka, K., 2020: Lupa pro detekci biologického materiálu barveného Alizarinovou červení S. Užitný vzor 33 794.

Halačka K., 2020: Světelný zdroj pro detekci biologického materiálu barveného Alizarinovou červení S s rozšířeným paprskem. Užitný vzor 33 795.

Halačka K., 2021: Technologie značení sekavců pomocí alizarinu. Ověřená technologie, Počet stran: 12, ISBN 978-80-87189-29-0.

Halačka K., Mareš J., 2019: Detektor barvení nativního biologického materiálu Alizarinovou červení S. Užitný vzor 32 727.

Halačka K., Mareš J., Vetešník L., Blábolil P., 2019: Application of the alizarin red S mass marking technique and its detection in stocked asp (*Leuciscus aspius*). *Biologia* 74:1359–1362; <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00247-6>.

Halačka K., Poštulková E., Kopp R., Mareš J., 2018: Alternativní značení vysazovaných ryb pro umožnění jejich následného sledování. Ověřená technologie R17/2017, MENDELU, Brno, 18 s.

Halačka K., Poštulková E., Kopp R., Mareš J., Vetešník L., 2018. Možnosti značení vysazovaných ryb pomocí ARS - aplikace a detekce. In: Účelové rybí obsádky na vodárenských nádržích: 37–43. ISBN 978-80-7509-573-2.

Halačka K., Vetešník L., Poštulková E., Mareš J., 2018: Ověřená technologie: Možnost využití značení štik pomocí ARS pro umožnění jejich následného sledování: 16 s; ISBN 978-80-7509-574-9.

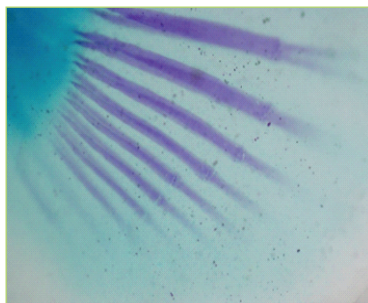
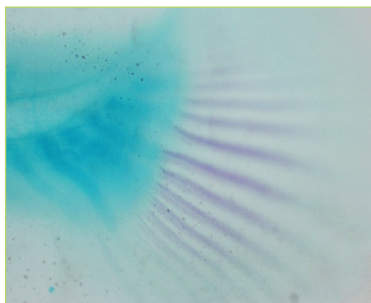
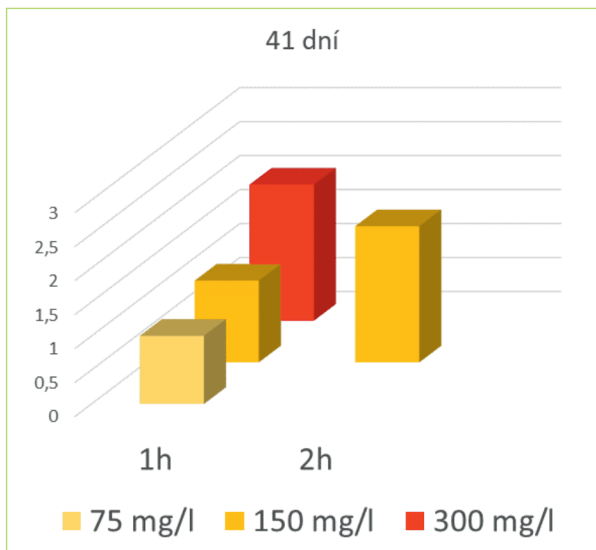
Poštulková E., Mareš J., Halačka K., Kopp R., 2016: Toxic effect of fluorescence pigment on zebra fish (*Danio rerio*). *Proceedings of International Phd Students Conference (Mendel Net) Brno*: 347–351.



Značení pstruha duhového pomocí Alizarinu
Certifikovaná metodika 14/2021

Ing. Karel Halačka, CSc.
prof. Dr. Ing. Jan Mareš
Ing. Eva Poštulková, Ph.D.
Ing. Ondřej Malý

Vydavatel: Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i., Květná 170/8, 603 65 Brno
Grafická úprava a zalomení: Ján Otradovec
Tisk: Computer MCL Brno spol. s. r. o.
Vydání: první, 2021
Počet stran: 18
ISBN 978-80-87189-35-1



Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i.
Květná 8, Brno 603 65
Tel.: +420 543 422 540
E-mail: ubo@ivb.cz

www.ivb.cz