

Mendelova univerzita v Brně
Ústav biologie obratlovců AV ČR v.v.i.

Ověřená technologie

TECHNOLOGIE R18/2018

**Možnost využití značení štik pomocí Alizarinové červeně
a způsob terénní detekce značených ryb**

Ing. Karel Halačka, CSc.
Ing. Eva Poštulková
prof. Dr. Ing. Jan Mareš
Ing. Lukáš Vetešník, PhD.

Brno

2018

Ověřená technologie je realizačním výstupem výzkumného projektu MZe ČR NAZV QJ1620240 Aplikace biomanipulací s využitím "topdown" efektu s cílem omezit negativní dopady zemědělství na eutrofizaci vodárenských nádrží. Uvedený projekt přispěl k rozvoji výzkumných organizací podílejících se na řešení projektu – Mendelovy univerzity v Brně a ÚBO AV ČR v.v.i.

Podíl autorů:

Ing. Karel Halačka, CSc.¹ 25 %, Ing. Lukáš Vetešník, Ph.D.¹ 25 %,

Ing. Eva Poštulková² 25%, prof. Dr. Ing. Jan Mareš² 25 %

Adresa autorů:

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

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

Mendelova univerzita v Brně

ISBN 978-80-7509-574-9

Obsah

1.	Cíle technologie	4
2.	Popis technologie	4
3.	Oblast výzkumu	4
4.	Úvod k problematice	4
4.1.	Značení (značkování)	4
4.2.	ARS	5
4.3.	Štika obecná	5
5.	Okruhy ověření	6
5.1.	Vývoj ploutevních paprsků a jejich osifikace	6
5.2.	Barvení – schopnost navázání barviva na cílový orgán a letalita barvicí lázně	7
5.3.	Schopnost detekovat barvivo	7
5.4.	Doba čitelnosti značení	7
5.5.	Způsob detekce	7
6.	Výsledky	8
6.1.	Vývoj ploutevních paprsků ocasní ploutve a jejich osifikace	8
6.2.	Aplikace barviva	10
6.3.	Schopnost detekovat barvivo	10
6.4.	Doba čitelnosti značení	11
6.5.	Způsob detekce	11
7.	Závěry	12
8.	Novost postupů	12
9.	Ekonomické aspekty	13
10.	Popis uplatnění technologie	14
11.	Seznam literatury	15

1. Cíle technologie

Cílem technologie je seznámení celého spektra rybářských subjektů, tj. chovatelů ryb, uživatelů rybářských revírů, producentů násadového materiálu s možnostmi značení štiky pomocí alizarinové červeně (Alizarin Red S, ARS), aplikované ve formě koupele. Jedná se o typ hromadného značení ryb menších rozměrů (stáří 0+, max. 1+; velikost obvykle v rozmezí 3 – 10 cm). Pro účinné značení je potřeba stanovit minimální velikost ryb, resp. fázi jejich vývoje, kdy osifikace kosterní tkáně umožňuje její barvení. Na značení navazuje potřeba nalézt vhodný způsob jeho detekce nevyžadující nákladné vybavení či nutnosti odběru vzorku tkáně (ploutevnických paprsků) nebo dokonce usmrcení jedince.

2. Popis technologie

V letech 2017 - 2018 byla provedena optimalizace postupu a ověřování metody značení raných stádií štiky obecné (*Esox lucius*) s použitím alizarinové červeně na experimentálním rybochovném zařízení Mendelovy univerzity v Brně, Ústavu biologie obratlovců AV ČR, v.v.i. a rybochovném zařízení MRS z.s., p.s. Oslavany. Testován byl stupeň osifikace ploutevnických paprsků ocasní ploutve štik, vlastní aplikace ARS (čas, koncentrace), doba možného rozpoznání značení v závislosti na růstu ryb a způsob detekce zbarvení použitelný přímo v terénu při odchytu ryb.

3. Oblast výzkumu

Ověření technologie: výtěr a odchov sledovaných jedinců - rybochovném zařízení MRS z.s., p.s. Oslavany; barvení jedinců pomocí ARS, chov sledovaných ryb - experimentální rybochovné zařízení Mendelovy univerzity v Brně; studium osifikace, testování detekčního zařízení - Ústavu biologie obratlovců AV ČR, v.v.i.

4. Úvod

4.1. Značení (značkování)

Značkování ryb je technika umožňující objektivní individuální či hromadnou identifikaci jedinců. Využívá se zejména v chovatelské praxi, terénním sledování, v provozních podmínkách i v rámci výzkumu. Běžně je využíváno pro monitoring migraci ryb, hodnocení jejich růstu, odlišení vysazovaných jedinců, označení jednotlivých linií nebo skupin ryb v jejich chovu, rozlišení ryb různého původu při jejich společném chovu v různých nádržích apod. Volba způsobu značení, zejména využití individuálního nebo skupinového značení, způsob značení etc., vychází konkrétních požadavků.

Volby konkrétního způsobu nebo typu je pak ovlivněna řadou faktorů nebo požadavků. Mezi hlavní faktory patří:

- minimalizace stresové zátěže značeného jedince jak při aplikaci tak i po ní
- druh a velikost značených jedinců
- náročnost aplikace finanční, časová a potřeba speciálních aplikátorů
- možnost nebo potřebnost skupinového či individuálního rozlišení jedinců
- úspěšnost a trvanlivost značení
- náročnost následné detekce označení

4.2. ARS

V rámci řešení projektu byla ověřována a optimalizována metoda využití alizarinové červeně (ARS) pro hromadné značení raných stádií různých druhů ryb, určených pro následný chov v experimentálních i přirozených podmínkách, a pro vysazování do tekoucích vod. Jedná se o poměrně, alespoň v České republice, nový způsob značení vycházející ze schopnosti alizarinové červeně vázat se na vápenité struktury v organismech (kost, šupina, otolit). K detekci se využívá fluorescenčních vlastností barviva, s čímž souvisí nutnost určitého speciálního vybavení (standardně fluorescenční mikroskop). Barvení se aplikuje formou koupele ryb v roztoku barviva. Čas aplikace je obvykle v rádech hodin, omezujícím faktorem je zejména cena dané chemikálie a potřebný objem lázně. Lze využít jen jako hromadné barvení.

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.

V úvodních sledováních byla stanovena toxicita různé koncentrace použitého preparátu na vybrané druhy ryb, ověřován efekt přídatku chloridu sodného na navázání barviva na osifikované tkáně, doba expozice i koncentrace použitého preparátu. Dále byla hodnocena i detekovatelnost barvení v závislosti na rychlosti růstu vybraných druhů ryb (Halačka a kol., 2018).

4.3. Štika obecná

Cílem bylo ověřit možnosti značení pomocí ARS u štiky obecné, která patří k druhům ryb, u nichž je realizován umělý výtěr a vysazování jak do volných vod, tak do chovatelských zařízení. K hlavním charakteristickým vlastnostem štiky z pohledu odchovu a využití značení patří:

4.3.1. kanibalismus – projevuje se již od velikosti několika cm, vyvolává tak nutnost vysazovat jedince již v této velikosti, a to v závislosti na možnosti chovatele zajistit

dostatečné množství potravy pro snížení nebo eliminaci výskytu kanibalismu. U menší velikosti ryb však ještě dochází k vývoji kosterního aparátu a nedostačné osifikaci tkání, což zhoršuje efekt barvení, navíc ke kanibalismu může docházet i během barvení.

4.3.2. rychlý růst – barvivo (ARS) se naváže na existující kalcifikované části kosterní soustavy, během růstu tak zůstává barvivo jen na těchto místech a při výrazném zvětšení tělesných rozměrů již nelze původní, obarvenou část kostí dobře detekovat. Vzhledem k rychlému růstu štiky lze tedy předpokládat dobu čitelnosti kratší než u jiných druhů s nižší intenzitou růstu či nedosahujících obecně velkých rozměrů

4.3.3. přirozená reprodukce – štika je v našich vodách široce rozšířena a je schopna přirozené reprodukce. Z pohledu jejího vysazování tak vyvstává potřeba objektivně a bezpečně odlišit značené jedince v nádrži, posoudit úspěšnost přirozené reprodukce a následně optimalizovat intenzitu vysazování.

5. Okruhy ověření

5.1. Vývoj ploutevnických paprsků a jejich osifikace

ARS se váže na kalcifikovanou tkáň. Protože se štika často vysazuje v několika týdnech stáří, kdy kosterní soustava se stále vyvíjí, byl sledován vývoj paprsků v ocasní ploutvi.

Při odchovu štiky na rybářském zařízení v Oslavanech byli odebíráni jedinci 6-ti věkových skupin:

stáří /dny od vykolení/	TL		
	Ø	min	max
11	8	7	9
17	11	10	12
23	13	11	17
27	15	11	20
30	26	14	53
33	51	30	70

Pro vývojovou studii byli jedinci fixováni 4% roztokem formaldehydu a poté projasněni a barveni pomocí Alcianové modři (která se váže na chrupavčitou, tedy neosifikovanou tkáň) a Alizarinové červeně ke zvýraznění chrupavky, resp. kostí (osifikovaných tkání).

5.2. Barvení – schopnost navázání barviva na cílový orgán a letalita barvicí lázně.

Pro testování byla vybrána nejpoužívanější koncentrace ARS, tj. 150 mg.l⁻¹ v časech jedna hodina, aplikovaná na štiky různých věkových skupin (viz 5.1.).

U skupiny 6. byla vyzkoušena i doba aplikace po dobu tří hodin.

Během a po aplikaci barviva byl sledován možný úhyn jedinců.

5.3. Schopnost detekovat barvivo

Klíčovým faktorem při použití barvicích technik s využitím ARS je absence fluorescenčního pozadí sledované tkáně/materiálu. Protože fluorescence v dané vlnové délce není ojedinělá (rostlinná tkaniva, plankton, aj.) je třeba vždy praktického ověření v jednotlivých případech.

5.4. Doba čitelnosti značení

Důležitým faktorem při používání značení je doba čitelnosti značení, tj. po jaké době či při jakém nárůstu velikosti lze tkáň obarvenou ARS detekovat. Během růstu ryby dochází i k zesílení a prodloužení ploutevních paprsků, které byly cílovým orgánem při barvení. To může být postupně příčinou ztráty čitelnosti zbarvení. Ke sledování byla vybrána skupina 20 štik stáří 43 dnů po vykulení (Ø TL 9 cm). Barveny byly lázní ARS o koncentraci 150 ml.l⁻¹ po dobu 1 hodiny. Následně byly individuálně umístěny do klecí (z důvodu kanibalismu) do společné nádrže a sledována byla změna čitelnosti značení při jejich růstu po dobu 3 měsíců (Ø SL 27 cm). Ke krmení byly použity živé ryby vhodné velikosti.

5.5. Způsob detekce

Principem metody je schopnost alizarinu vázat se ve vodném roztoku na vápník v osifikovaných elementech rybího těla (kosti, šupiny, otolity), kde ji lze následně detekovat pomocí excitace světelným zdrojem o vlnové délce 530-560 nm (zelená) vyvolávající světelnou emisi o vlnové délce 580 nm (ohnivě-červená).

Vzhledem k potřebě detekovat značenou tkáň:

a/ u živých ryb

b/ v terénu

c/ cenově přístupným vybavením

byla hledána ekvivalentní náhrada za fluorescenční mikroskop.

6. Výsledky

6.1. Vývoj ploutevních paprsků ocasní ploutve a jejich osifikace

Obr. 1.: 11 dní; 8 mm TL – před započítím vývoje ploutevních paprsků



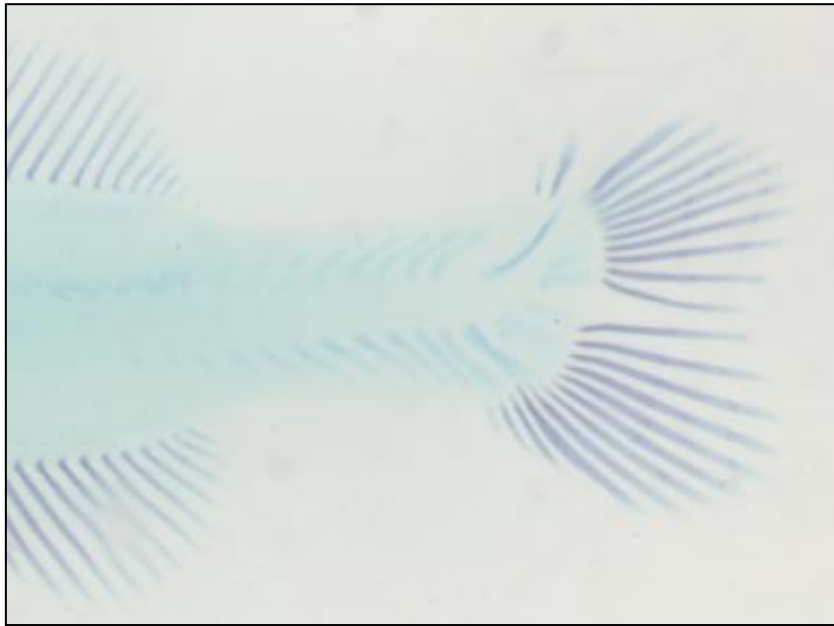
Obr. 2.: 17 dní; 11 mm TL – počátek vývoje ploutevních paprsků



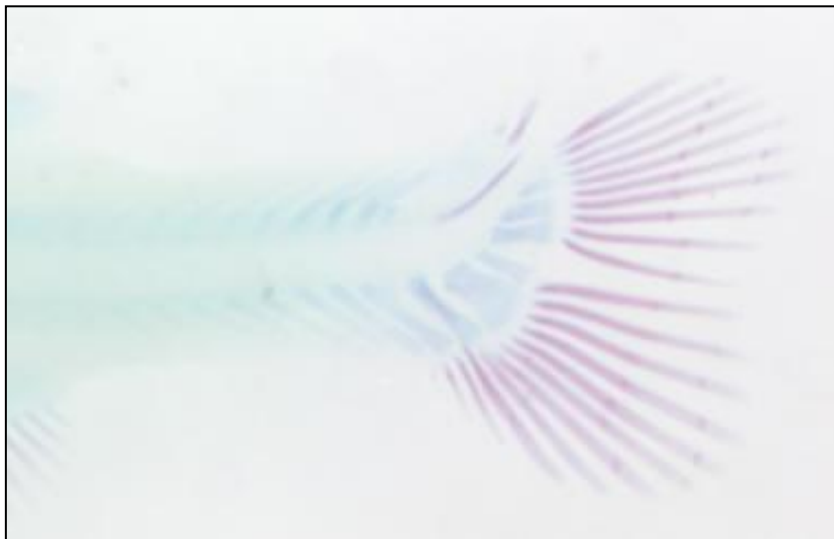
Obr. 3.: 23 dní; 13 mm TL – počátek osifikace paprsků postupuje dorzálně



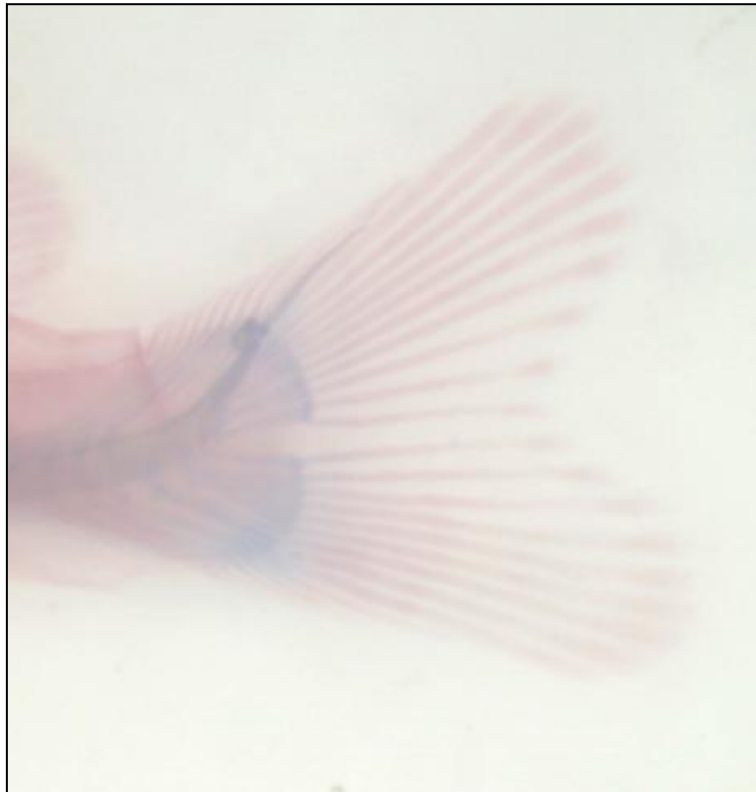
Obr. 4.: 27 dní; 15 mm TL – paprsky vyvinuté, tkáň chrupavčitá s částečnou osifikací



Obr. 5.: 30 dní; 26 mm TL – pokračuje osifikace paprsků



Obr. 6.: 33 dní; 51 mm TL



V době vysazování štiky se velikost jedinců obvykle pohybuje okolo cca 3 cm, tj. částečně ještě v období neukončeného vývoje (osifikace) ploutevních paprsků. I vzhledem k čitelnosti značení v určitém rozsahu zvětšení velikosti lze, pokud to umožňuje naplnění cílů značení, doporučit značení jedinců od cca 5 cm.

6.2. Aplikace barviva

Aplikace po dobu jedné hodiny se jevila jako dostatečná, nebylo patrné výrazné zvýšení intenzity barvení při delším pobytu v lázni.

Úhyn ryb v souvislosti s aplikací barviva nebyl zaznamenán.

6.3. Schopnost detekovat barvivo

Ploutevní paprsky štiky bohužel vykazují určitou úroveň přirozené fluorescence. Je proto poměrně obtížné objektivně rozlišit značené a neznačené jedince v období bezprostředně po aplikaci na základě vyšší intenzity fluorescence. Během růstu paprsků se však objeví v kaudální části paprsků zřetelná linie, oddělující nově dorostlou, slaběji fluoreskující část. Zatím co délka obarvené kranální části paprsků zůstává neměnná, délka nové kaudální části se zvětšuje úměrně se zvětšující se velikostí těla jedince. Objektivní rozlišení značených jedinců je tedy vhodné až po cca 10-20% zvětšení velikosti těla.

6.4. Doba čitelnosti značení

Linie mezi barvenou, výrazně „zářící“ kraniální částí paprsků a nově dorůstající kaudální je zřetelná, i po 3 měsících po barvení při zvýšení velikosti těla na cca 300%, a to zejména ve ventrální části ploutve.

6.5. Způsob detekce

Detekce ARS se skládá ze dvou částí:

6.5.1. Vyvolání fluorescence

Standardně se tak děje speciálním zdrojem, který je součástí daného fluorescenčního mikroskopu. Pro ARS je doporučena vlnová délka 530 – 560 nm. Použili jsme proto laserové ukazovátko s vlnovou délkou 532 nm o výkonu 50 mW (výrobce OXLasers).

6.5.2. Odfiltrování zdrojového světla

V případě fluorescenčního mikroskopu plní tuto funkci speciální filtry. V našem případě byly nahrazeny ochrannými brýlemi pro práci s laserem, zabraňující průchodu světla o vlnové délce 190-540 nm ale umožňující pozorovat světlo o vlnové délce 580 nm (dodavatel SOH, Praha), což je emisní hodnota pro danou excitaci ARS.

Při nasvícení objektu, v našem případě ploutevnických paprsků, výše uvedeným laserovým zdrojem bylo možné při použití ochranných brýlí pozorovat emisi světla v místech nabarvených ARS.

Obr. 7.: Vybavení k detekci ARS



7. Závěry

Na základě ověření způsobu barvení, čitelnosti zbarvení a zařízení k detekci lze konstatovat následující:

- ARS k barvení štik lze použít – standardně v lázni o koncentraci 150 mg.l^{-1} po dobu 1 hodiny
- k pozorování značení lze úspěšně využít ocasní ploutev živých jedinců za předpokladu využití výrazného přechodu intenzity fluorescence v místě nově dorůstající kaudální části paprsků; tato linie je patrna i u ryb dosahujících 2-3 násobné velikosti oproti rozměrům v době barvení
- alternativní zařízení ke sledování tkání barvených ARS, sestávající ze zeleného laseru a brýlí s vhodnou filtrační charakteristikou lze úspěšně použít jako náhradu jiných, speciálních přístrojů.

8. Novost postupů

S rozvojem technologie řízené reprodukce a odchovu raných stádií ve speciálních zařízeních, resp. počátečních odchovu ryb před vysazením do přirozených podmínek je nezbytné pro rozlišení vysazovaných jedinců od jedinců pocházejících z reprodukce přirozené uměle odchované ryby označit. Dalším důvodem značení ryb je sledování jejich migrace pro optimalizaci techniky vysazování, sledování rychlosti růstu oproti přirozené populaci, případně zhodnocení efektu vysazování (úroveň přežití) takto odchovaných ryb. V uvedených případech není zapotřebí individuální a poměrně finančně náročné značkování vysazených ryb. Navíc se zpravidla jedná o juvenilní jedince s velmi malou velikostí. Řada standardních značení je komplikovaná a pro rybu stresující. Externí značky pro mladé věkové kategorie využít nelze. Zpravidla se pro skupinové značení malých ryb používá amputace některé z ploutví. Využití koupele v roztoku látek, které se ukládají v tkáních ryb a je za určitých podmínek, optimálně bez usmrcení ryby, možné je identifikovat, přináší nové možnosti ve značení ryb. Ověřená technologie použití preparátu ARS k hromadnému barvení juvenilních ryb je v podmínkách ČR nová, postupně jsou ověřovány možnosti jejího využití pro jednotlivé druhy ryb.

Značení štiky pomocí Alizarinu již byla popsána (Skov, 2001, Gronkjaer 2004), využito však bylo jednak cenově výrazně náročnější formy Alizarin complexon, zejména však byla detekce zaměřena na otolity, což znamená nutnost usmrcení sledovaných jedinců a náročné zpracování sledovaných vzorků (výbrusy) a využitím nákladného laboratorního vybavení zahrnujícího fluorescenční mikroskop.

Naše technologie se soustředila na ověření možnosti širokého praktického využití, nenáročného na vybavení, rychlou detekci v terénu a nevyžadující usmrcení jedince ani odběr vzorků.

9. Ekonomické aspekty

Předpokládané ekonomické a další přínosy využití ověřené technologie zahrnuje:

9.1. Možnost značení (značkování) štiky umožňující objektivní identifikaci jedinců. Uplatnění technologie je v celé šíři rybářského hospodaření od chovatelské činnosti, přes terénní sledování po výzkumné aktivity. Konkrétně jde o sledování migrací ryb, jejich růstu, odlišení vysazovaných jedinců (např. vůči jedincům z přirozené reprodukce) označení, resp. evidence ryb v chovu či jejich potomstva atd. Hromadné značení raných stádií formou koupele v preparátu Alizarin Red S umožňuje jednorázové značení poměrně velkého množství ryb v krátkém časovém intervalu. Tento způsob významně snižuje náklady na značení a zvyšuje efektivnost práce ve srovnání s jinými metodami označování ryb. S ohledem na možnost použití pro velmi malé ryby je to navíc jedna z mála možností značení. Ekonomický přínos lze kvantifikovat v rozdílu 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 hodina, 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 \$, dále je třeba počítat s poštovním a celními poplatky, které mohou sumu až zdvojnásobit; označení jedné ryby tedy řádově bude několik korun). Hůře hodnotitelná je obtížnost aplikace a její úspěšnost, kdy koupele ryb jsou standardním a běžným chovatelským zásahem.

9.2. Možnost detekce ryb značených ARS bez nutnosti využití fluorescenčního mikroskopu. Náklady na pořízení mikroskopu s možností fluorescence minimálně 80-100 tis. Kč a navíc se jedná o laboratorní zařízení nevhodné pro práci v terénních podmínkách a pro sledování živých vodních organismů. Námi navrhovaná alternativa odstraňuje všechna tato negativa, přitom cena tohoto vybavení nepřesahuje 1 tis. Kč a představuje tak významnou finanční úsporu a tím dostupnost pro široké spektrum uživatelů a může tak být klíčová pro široké využití tohoto způsobu značení u ryb.

9.3. Možnost využití značených ryb

Jako příklad využití lze uvést optimalizace počtu vysazovaných ryb. Štika patří mezi nejčastěji vysazované druhy ryb, přitom lze na řadě lokalit předpokládat současně i úspěšnou přirozenou reprodukci. Možnost sledování podílu jedinců pocházejících z vysazování a přirozené reprodukce může snížit náklady na vysazování korekcí počtu vysazovaných jedinců.

10. Popis uplatnění technologie

Uplatnění technologie hromadného značení je u všech subjektů s potřebou značení ryb bez potřeby jejich individuálního rozlišení. Jedná se například o odchované ryby vysazované do tekoucích vod pro odlišení ryb pocházejících z přirozené reprodukce. Pro značení ryb vysazených do lokality s možností jejich dalšího monitoringu s ohledem na jejich prostorovou distribuci, rychlost pohybu po nádržích, obsazování lokalit, etc. Dále pro rozlišení dvou skupin ryb odchovávaných ve společné nádrži, apod. Využití je v oblasti hospodaření na tekoucích vodách – producenti násadového materiálu, podniky Povodí, rybářské svazy, výzkumné organizace. Případně u chovatelských subjektů produkující mladší věkové kategorie.

Smlouva o uplatnění ověřené technologie byla uzavřena s Moravským rybářským svazem, z.s., Brno.

11. Seznam 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/fileadmin/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
- 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.
- LIUA, Q., ZHANGA, X. M., ZHANGA, P. D., NWAFILE, 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.
- 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
- 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, Ch., KOED, A., BAASTRUP-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.

Ověřená technologie: **Možnost využití značení štik pomocí ARS pro umožnění jejich následného sledování.**

Halačka Karel, Lukáš Vetešník, Poštulková Eva, Mareš Jan

Tisk: Ediční středisko Mendelovy univerzity v Brně

Vydání: první, 2018

Náklad: 100 ks

Počet stran: 16

ISBN 978-80-7509-574-9