

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Fakulta rybářství a ochrany vod**

Ústav akvakultury a ochrany vod

Laboratoř řízené reprodukce a intenzivního chovu ryb

**Bakalářská práce**

**Aplikace nanobublin ozonu v intenzivní akvakultuře**

**Autor:** Maksim Kononov

**Vedoucí bakalářské práce:** Ing. Markéta Dvořáková Prokešová, Ph.D.

**Konzultant bakalářské práce:** doc. Ing. Vlastimil Stejskal, Ph.D.

**Studijní program a obor:** B4103 Rybářství

**Forma studia:** Prezenční

**Ročník:** 3.

**České Budějovice, 2023**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....

Maksim Kononov

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval vedoucí mé bakalářské práce Ing. Markétě Dvořákové Prokešové, Ph.D. za metodické vedení, odbornou pomoc, poskytnuté rady a trpělivost. Zároveň tímto děkuji doc. Ing. Vlastimilu Stejskalovi, Ph.D. za konzultaci práce.

Dále bych chtěl poděkovat technickým pracovníkům Laboratoře řízené reprodukce a intenzivního chovu ryb – Ing. Janu Matouškovi a Ing. Pavlu Šablaturovi za technické zajištění a pomoc s přípravou experimentů.

Velké díky patří také mé rodině za psychickou a finanční podporu při studiu.

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
Fakulta rybářství a ochrany vod  
Akademický rok: 2021/2022

**ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**  
(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Maksim KONONOV**  
Osobní číslo: **V20B022P**  
Studijní program: **B4103 Zootechnika**  
Studijní obor: **Rybářství**  
Téma práce: **Aplikace nanobublin ozónu v intenzivní akvakultuře**  
Zadávající katedra: **Ústav akvakultury a ochrany vod**

**Zásady pro vypracování**

Cílem bakalářské práce je zpracovat literární rešerši shrnující dostupné poznatky o využití ozónu a aplikace nanobublin zejména v oblasti akvakultury. Zároveň bude posouzen vliv různých koncentrací nanobublin ozónu na odchov raných stádií vybraných druhů ryb prostřednictvím experimentální činnosti v prostorech komerční líhny. Následně budou vyhodnoceny výsledky a porovnány s dostupnou literaturou. Student se bude aktivně podílet na přípravě pokusu, vzorkování a zpracování dat.

Experimentální činnost bude testována inovativní technologie – aplikace nanobublin ozónu (tj. bublinek plynu o průměru < 1 μm, které se vyznačují unikátními fyzikálními vlastnostmi – např. skupenstvím na rozhraní plynu a kapaliny, perzistencí ve vodě až 24 hodin, velkým specifickým povrchem, záporným nábojem) v podmínkách intenzivní akvakultury. Bude testováno celkem 4-6 koncentrací nanobublin ozónu ve 3-4 opakováních na ranou ontogenezi a odchov raných stádií vybraných hospodářsky významných druhů ryb (např. pstruh duhový). Raná stádia (tj. embrya, larvy, popř. juvenilové) budou nasazena v jednotném počtu do experimentálních akvárií (50-100 ks), kde budou chována v průtočném systému. S ohledem na ověření účinnosti dezinfekce vody ozónem bude pro odchov použit rybníční, či říční zdroj vody. Podmínky odchovu (teplota, pH, koncentrace kyslíku a N-látky) budou během experimentu pravidelně monitorovány.

Zpočátku bude nutné zajistit nepřetržitý provoz sestavy zařízení potřebných pro produkci nanobublin ozónu ve vodě (tzn. koncentrátor kyslíku, generátor ozónu a generátor nanobublin), který bude testován v akvarijní místnosti ÚAOV v Českých Budějovicích. Následně bude sestava přístrojů včetně experimentálních akvárií převezena a instalována v prostorech komerční líhny. Po zprovoznění sestavy a napojení systému na zdroj vody bude nastaveno 4-6 různých koncentrací (tj. skupin) nanobublin ozónu (250-950 mV), jichž bude docíleno mícháním nanobublinami obohacené vody s čistou vodou ze zásobních nádrží. Do experimentálních akvárií pak budou nasazena raná stádia ryb a bude pozorována účinnost dezinfekce vody (různých koncentrací nanobublin ozónu) na vývoj ryb, líhnutí, míru přežití, výskyt malformací, čistotu vody atd. Po ukončení experimentu student zpracuje data, která podrobí statistické analýze a zpracuje do grafické podoby (tabulky a grafy). Data následně porovná s dostupnou vědeckou literaturou v diskusi a shrne poznatky této studie. Výsledky práce bude prezentovat odborné komisi při státní závěrečné zkoušce.

Rozsah pracovní zprávy: **25-50 stran**  
Rozsah grafických prací: **10-30 tabulek a grafů**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

**Seznam doporučené literatury:**

Ben-Atia, I., Lutzky, S., Barr, Y., Gamsiz, K., Shtupler, Y., Tandler, A., Koven, W., 2007. Improved performance of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, larvae after ozone disinfection of the eggs. *Aquaculture Research* 38 (2): 166-173.  
Dien, L. T., Linh, N. V., Sangpo, P., Senapin, S., St-Hilaire, S., Rodkhum, C., Dong, H. T., 2021. Ozone nanobubble treatments improve survivability of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with a pathogenic multi-drug-resistant *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases* 44 (9): 1435-1447.

Ghomi, M. R., Esmaili, A., Vossoughi, G., Keyvan, A., Nazari, R. M., 2007. Comparison of ozone, hydrogen peroxide and removal of infected eggs for prevention of fungal infection in sturgeon hatchery. *Fisheries Science* 73 (6): 1332-1337.

Bregnballe, J., 2015. A Guide to Recirculation Aquaculture. FAO and EUROFISH, 95 p.

Jhunkeaw, C., Khongcharoen, N., Rungrueng, N., Sangpo, P., Panphut, W., Thapinta, A., Senapin, S., St-Hilaire, S., Dong, H. T., 2021. Ozone nanobubble treatment in freshwater effectively reduced pathogenic fish bacteria and is safe for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 534 (15): 736286.

Linh, N. V., Dien, L. T., Panphut, W., Thapinta, A., Senapin, S., St-Hilaire, S., Rodkhum, C., Dong, H. T., 2021. Ozone nanobubble modulates the innate defense system of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus agalactiae*. *Fish and Shellfish Immunology* 112: 67-73.

Meegoda, J. N., Hewage, S. A., Batagoda, J. H., 2018. Stability of Nanobubbles. *Environmental Engineering Science* 35 (11): 1216-1227.

Powell, A., Scolding, J., 2016. Direct application of ozone in aquaculture systems. *Reviews in Aquaculture* 10 (2): 424-438.

Stiller, K. T., Kolarevic, J., Lazado, C. C., Gerwins, J., Good, C., Summerfelt, S. T., Mota, V. C., Espmark, A. M. O., 2020. The Effects of Ozone on Atlantic Salmon Post-Smolt in Brackish Water-Establishing Welfare Indicators and Thresholds. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 5109.


Thi Phan, K. K., Truong, T., Wang, Y., Bhesh, B., 2020. Nanobubbles: Fundamental characteristics and applications in food processing. *Trend in Food Science and Technology* 95: 118-130.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Markéta Prokešová, Ph.D.**  
Ústav akvakultury a ochrany vod


Konzultant bakalářské práce: **Ing. Vlastimil Stejskal, Ph.D.**  
Ústav akvakultury a ochrany vod

Datum zadání bakalářské práce: **21. ledna 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **2. května 2023**

  
**prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.**  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD  
Zátiší 728/II  
389 26 Vodňany (2)

  
**Ing. Jan Kašpar**  
ředitel

V Českých Budějovicích dne 25. února 2022

## Obsah

1. Úvod .....	9
2. Literární přehled .....	11
2.1 Pstruh duhový ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ).....	11
2.1.1 Rozšíření druhu .....	11
2.1.2 Biologie druhu .....	11
2.1.3 Produkce v akvakultuře .....	12
2.1.4 Umělý odchov a požadavky na kvalitu vody.....	12
2.1.5 Umělá reprodukce .....	14
2.1.6 Umělý odchov a vývoj raných stádií.....	14
2.2 Čištění a úprava kvality vody v akvakultuře.....	17
2.2.1 Znečištění vody v rybochovných objektech .....	17
2.2.2 Recirkulační akvakulturní systémy .....	18
2.2.3 Metody čištění vody v RAS.....	19
2.2.3.1 Mechanická filtrace.....	19
2.2.3.2 Biologická filtrace.....	20
2.2.4 Metody dezinfekce vody v RAS .....	21
2.2.4.1 Chlorace vody .....	21
2.2.4.2 Dezinfekce vody UV zářením .....	21
2.2.4.3 Ozonizace vody.....	22
2.3 Ozon.....	22
2.3.1 Chemická struktura ozonu .....	22
2.3.2 Vlastnosti ozonu.....	22
2.3.3 Toxicita ozonu .....	23
2.3.4 Destrukce ozonu.....	24
2.3.5 Dezinfekce ozonem.....	24
2.3.6 Aplikace ozonu v akvakultuře .....	25

2.3.7	Produkce ozonu.....	26
2.3.8	Měření ozónu.....	27
2.3.9	Zařízení pro směšování ozonu s vodou .....	28
2.4	Technologie nanobublin.....	28
2.4.1	Definice makro-, mikro- a nanobublin .....	28
2.4.2	Vlastnosti nanobublin.....	29
2.4.3	Produkce nanobublin.....	31
2.4.4	Aplikace nanobublin v průmyslových odvětvích .....	32
2.4.5	Použití nanobublin ozonu při čištění odpadních vod .....	32
2.4.6	Aplikace nanobublin v akvakultuře .....	33
3.	Materiál a metodika .....	35
3.1	Testování zařízení pro produkci nanobublin ozonu.....	35
3.2	Rybí líheň Mydlovary .....	36
3.3	Design experimentálního systému .....	36
3.4	Odběry vzorků během experimentů.....	38
3.4.1	Měření jiker .....	38
3.4.2	Sledování míry líhnutí a přežití jedinců .....	39
3.4.3	Měření a zpracování vzorků ryb .....	39
3.4.4	Mikrobiologické analýzy.....	40
3.4.5	Zpracování a analýza dat.....	40
4.	Výsledky .....	41
4.1	Vytřené jikry.....	41
4.2	Míra líhnutí.....	41
4.3	Míra mortality v čase .....	44
4.4	Resorbce žloutkového váčku.....	47
4.5	Objem žloutkového váčku.....	50
4.6	Celková délka těla.....	53

4.7	Mikrobiologické analýzy.....	57
5.	Diskuze .....	62
6.	Závěr .....	67
7.	Seznam použité literatury .....	68
8.	Abstrakt.....	81
9.	Abstract.....	82



## 1. Úvod

Akvakultura je celosvětově nejrychleji rostoucí odvětví živočišné výroby, tento růst je však závislý na dostupnosti kvalitní vody. Jedním ze způsobů, jak efektivněji využívat dostupnou vodu pro akvakulturu, je používání recirkulačních akvakulturních systémů (tzv. RAS), které umožňují odchov ryb v kontrolovaných podmínkách od vytřených jiker přes plůdek po tržní ryby. Z důvodu opakovaného použití vody v rámci intenzivního chovu ryb v RAS je potřeba vhodného čištění a dezinfekce odchovné vody.

Mnoho současných problémů na celém světě je spojeno s nedostatkem čisté pitné vody např. 1,2 miliardy lidí nemá dostatek nezávadné pitné vody a mají s tímto spojené zdravotní potíže kvůli šíření patogenů atd. Obavy o veřejné zdraví jsou proto stále častěji důvodem úsilí vynakládaného na čištění vod. Procesy úpravy vody jsou ale důležité také pro optimalizaci produkce v akvakultuře, protože účinně a rychle odstraňují nežádoucí látky i mikroorganismy. Proces čištění vody však nesmí mít škodlivý vliv na chovanou rybu obsádku ani životní prostředí.

V akvakultuře může dezinfekce vody přispět ke stabilnější produkci všech věkových kategorií ryb, zejména často je využívána u raných stádií (tj. embryí a larev), která jsou nejvíce senzitivní vůči vnějším podmínkám prostředí, jako jsou teplota vody, koncentrace kyslíku, pH, biologické či chemické znečištění vody apod. Nejběžnějšími způsoby čištění vody v RAS jsou mechanické, biologické a chemické čištění. Pro dezinfekci vody v akvakultuře jsou nejčastěji používány metodami dezinfekce vody ozařováním ultrafialovým zářením (UV) a ozonizace ( $O_3$ ). Ačkoliv je UV záření široce používáno, zákal vody a růst řas nebo bakterií na UV lampách může jeho účinnost značně omezit. Ozonizace je vhodná metoda dezinfekce vody, neboť  $O_3$  je extrémně silný oxidant a používá se k inaktivaci patogenních mikroorganismů za účelem prevence šíření nemocí přenášených vodou. Kromě toho se  $O_3$  ve vodném roztoku samovolně rozkládá a rychle se přeměňuje na kyslík, což nemá za následek škodlivé účinky na životní prostředí a nezanechává žádná rezidua. Ozon rozpuštěný ve vodě je však nestabilní a rychle vyprchává, z toho důvodu je jeho zbytkové působení v pitné vodě omezeno.

Ke zlepšení kvality vody v akvakulturních systémech, jako je RAS, je zapotřebí účinnější nechemické technologie úpravy vody. V poslední době se rozvíjí výzkum využívající technologie tzv. nanobublin (NB), které mají specifické vlastnosti a jejich použití může přinést mnoho výhod (např. ekonomický přínos, delší doba výskytu plynu v prostředí ve srovnání s běžnými aplikacemi, zlepšený přenos hmoty v mezifázi

plyn-kapalina atd.) a významně přispět k praktickým aplikacím v mnoha průmyslových odvětvích, jako jsou potravinářství, zemědělství, polymery, biomedicína ad.

Důvody, proč technologie nanobublin ozonu ( $O_3NB$ ) začala být nedávno používána pro čištění odpadních vod, jsou např. vysoká stabilita NB, velký specifický povrch vůči objemu NB, vysoký vnitřní tlak, vznik volných radikálů a tvorba kyslíku jako konečného produktu. Technologie  $O_3NB$  je zároveň perspektivní metodou pro dezinfekci odchovné vody v akvakultuře, a to zejména v RAS.

Vědecké důkazy o prospěšnosti  $O_3NB$  jsou však limitovány, zejména co se týká účinnosti dezinfekce vody, kvality vody a možných toxických účinků na různé druhy ryb a jejich věkové kategorie. Tyto mezery ve znalostech poukazují na potřebu dalšího poznání účinnosti aplikace  $O_3NB$  v akvakultuře.

Cílem této bakalářské práce proto bylo experimentálně ověřit účinky různých koncentrací  $O_3NB$  na ranou ontogenezi (embryonální a larvální periodu) pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), jakožto významného druhu pro intenzivní akvakulturu, v prostorech rybí líhně Mydlovary napájené rybníční (tzn. organicky znečištěnou) vodou.

## **2. Literární přehled**

### **2.1 Pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*)**

#### **2.1.1 Rozšíření druhu**

Pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) patří mezi lososovité ryby do čeledi Salmonidae. Tento druh je původem z oblasti severního Tichomoří, kde se vyskytuje od pobřeží a povodí řek v Kalifornii přes Aljašku až do povodí řek Kamčatky (Kottelat a Freyhof, 2007). V druhé polovině 19. století byl postupně introdukován ze Severní Ameriky na všechny kontinenty s výjimkou Antarktidy (Kouřil a kol., 2008). Do České republiky byl dovezen v roce 1888 z Německa (Dubský a kol., 2003). První pokusy vysazování do volných vod nebyly úspěšné. Z tohoto důvodu se začal rozvíjet jeho chov v rybnících a menších průtočných nádržích (Pokorný a kol., 1998).

#### **2.1.2 Biologie druhu**

Pstruhu duhovému vyhovují prudce tekoucí vody, kde se zdržuje u břehů. V době náletové potravy se vyskytuje u hladiny. V údolních nádržích a jezerech se pohybuje hlavně v pelagiálu (Adámek, 2012). V tekoucích vodách má největší význam bentická potrava jako larvy jepic, pošvatek, pakomárů atd (Pokorný a kol., 1998). U větších jedinců se v potravě objevují drobné rybky. Příjem potravy omezuje při poklesu teploty vody pod 5 °C (Kottelat a Freyhof, 2007).

Pohlavní dospělost nastupuje u části jedinců již ve druhém roce (zvláště u mlíčáků), většinou však až ve třetím roce života. Pstruh duhový se rozmnožuje na jaře, většinou od března do května při teplotě vody 8–10 °C (Dubský a kol., 2003). Existují také formy s podzimním výtěrem (Kouřil a kol., 2008). V přírodních podmínkách se tře na tvrdé písčité až štěrkovité dno (Dubský a kol., 2003).

Relativní plodnost činí 2000–2500 jiker a absolutní plodnost dosahuje 1000–3000 jiker (Kouřil a kol., 2008). Jikry jsou žlutooranžově až oranžově zbarvené. Průměrná velikost se pohybuje v rozmezí 4–4,5 mm (Pokorný a kol., 1998).

Inkubační doba jiker je 350–410 denních stupňů (d°) (Dubský a kol., 2003). Růst je poměrně rychlý (Hardy a kol., 2000). V prvním roce života dosahuje roček velikosti kolem 10 až 15 cm a ve druhém roce 20 až 30 cm při hmotnosti 300 g (Dubský a kol., 2003).

### 2.1.3 Produkce v akvakultuře

V roce 2020 dosáhla celosvětová produkce akvakultury rekordních 122,6 milionu tun/rok. Celkový podíl vodních živočichů byl 87,5 milionu tun, z toho podíl ryb byl 57,5 milionu tun a řasy tvořily 35,1 milionu tun. Světová produkce živočišných druhů v akvakultuře v roce 2020 vzrostla o 2,7 % ve srovnání s rokem 2019, což je historicky nejnižší míra meziročního růstu za více než 40 let (FAO, 2022).

Odhaduje se, že v roce 2020 evropská produkce akvakultury činila 2,6 milionu tun, což představuje mírný nárůst (2,8 %) oproti roku 2019. Mořské studenomilné druhy se na celkové produkci podílejí 70 %, sladkovodní druhy 14 % a mořské druhy 16 %. Hlavním producentem v Evropě zůstává Norsko, na které připadá 58 % celkové produkce. Země, které produkují více než 100 000 tun ročně, jsou Turecko, Velká Británie a Řecko. Hlavními druhy chovaných ryb jsou losos obecný (*Salmo salar*), pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), okoun říční (*Perca fluviatilis*), mořan zlatý (*Sparus aurata*) a kapr obecný (*Cyprinus carpio*), které v roce 2020 tvořily 95 % evropské produkce (FEAP, 2021).

V rámci světové produkce akvakultury patří pstruhovi duhovému 13. místo v pořadí chovaných druhů v roce 2020, kdy roční produkce pstruha duhového činila 739,5 tisíc tun (FAO, 2022). V roce 2020 byla Česká republika 10. v pořadí států s produkcí pstruha duhového. V rámci ČR se pstruh duhový patří na 2. místě mezi produkovanými rybami s produkcí cca 699 tun/rok (FEAP, 2021).

### 2.1.4 Umělý odchov a požadavky na kvalitu vody

Pstruh duhový má výhodu v tom, že je ve srovnání s ostatními druhy lososovitých ryb méně náročný na požadavky prostředí a prostor (Pokorný a kol., 1998). Doporučená teplota pro chov pstruha duhového je uváděna kolem 12 až 16 °C s tím, že optimální teplota vody je kolem 15 °C (Kouřil a kol., 2008). Horní akceptovatelnou teplotou vody pro přežití je 25 °C (Kottelat a Freyhof, 2007).

Optimální a přijatelné koncentrace kyslíku ve vodě se liší v závislosti na aktuálním vývojovém stádiu ryb a teplotě vody. Za optimum se považuje, když obsah kyslíku v odchovné vodě se blíží nasycení (90 až 100 %) a v odtoku z odchovné nádrže kolem 60 % (Pokorný a kol., 1998). Kouřil a kol. (2008) uvádí, že v chovu lososovitých ryb by koncentrace CO<sub>2</sub> neměly překročit 10 mg.l<sup>-1</sup> u plůdku a 20 mg.l<sup>-1</sup> u dospělců.

V případě nasycení vody dusíkem jsou za prahové hodnoty považovány koncentrace do 115 % u starších ryb, 105 % pro ročka a 103 % pro váčkový plůdek (Pokorný a kol., 1998). Při odchovu ryb je nutné pravidelně monitorovat také koncentrace sloučenin dusíku (volný amoniak, dusitany a dusičnany). Obsah volného amoniaku ( $\text{NH}_3$ ) ve vodě je podmíněn teplotou a pH vody. Jako bezpečná koncentrace  $\text{NH}_3$  pro plůdek pstruha se uvádí hodnota do  $0,006 \text{ mg.l}^{-1}$  a pro starší ryby  $0,0125 \text{ mg.l}^{-1}$  (Kouřil a kol., 2008). Dusitany ( $\text{NO}_2^-$ ) jsou pro ryby vysoce toxické, a to zvláště pro plůdek, zejména při odchovu v recirkulačních akvakulturních systémech (RAS). Vzhledem k tomu, že toxicita  $\text{NO}_2^-$  závisí na koncentraci chloridů ( $\text{Cl}^-$ ) ve vodě, poměr mezi ( $\text{NO}_2^-$ ) a ( $\text{Cl}^-$ ) 17:1 se uvádí jako bezpečný pro lososovité ryby. Letální koncentrace  $\text{NO}_2^-$  mohou být až kolem  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  při dostatečném obsahu chloridů ve vodě (Pokorný a kol., 1998). Dusičnany ( $\text{NO}_3^-$ ) jsou velmi slabě toxické pro ryby, ale dlouhodobá koncentrace  $\text{NO}_3^-$  v rozsahu 354–443  $\text{mg.l}^{-1}$  způsobuje inhibici růstu pstruha duhového, proto koncentrace  $\text{NO}_3^-$  nesmí dlouhodobě překročit  $332 \text{ mg.l}^{-1}$  (Davidson a kol., 2014).

S hodnotou pH úzce souvisí toxicita některých látek např. kovů. Optimální rozmezí pH pro pstruha je 6,5–8,5. Kritické hodnoty jsou pod 6,0 a nad 8,5 (Kouřil a kol., 2008). Při postupné adaptaci v optimálních podmínkách pstruh duhový může přežít hodnoty pH kolem 5,0 nebo nad 10,0 (Pokorný a kol., 1998).

Významným negativním faktorem v chovu lososovitých ryb je organické znečištění vody, proto je potřeba mít v chovu co nejmenší organické zatížení vody. Největší pozornost by měla být věnována především RAS objektům (Kouřil a kol., 2008). Kontrolování organického zatížení se provádí na základě chemické spotřeby kyslíku (CHSK) a biochemické spotřeby kyslíku ( $\text{BSK}_5$ ). Horní hranice CHSK v chovu lososovitých ryb je  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  a  $\text{BSK}_5$  je  $4 \text{ mg.l}^{-1}$  (Pokorný a kol., 1998).

V chovu lososovitých ryb osvětlení, intenzita světla a světelný režim mají důležitý význam. Při správné regulaci světelného režimu lze dosáhnout oddálení, nebo naopak urychlení času výtěru až o čtyři měsíce (Kouřil a kol., 2008). Další možností je metoda konstantního světelného režimu v poměru 18 hodin světla a 6 hodin tmy po skončení výtěrového období. Díky této metodě dochází k dozrání pohlavních produktů a schopnosti nového výtěru už po šesti měsících. Přitom nedochází k negativnímu vlivu na plodnost generačních ryb a velikost, kvalitu a vybarvení jiker (Pokorný a kol., 1998). Osvětlení zároveň podporuje příjem potravy a je významným faktorem pro plůdek a ročka

z hlediska intenzifikace chovu. Negativní účinek je však v tom, že jikry a plůdek jsou světloplaché, přímé světlo může poškodit jejich vývoj (Kouřil a kol., 2008).

Pro přísun kyslíku a odstranění organického znečištění je důležitý přísun čisté vody. V intenzivních chovech je potřeba mít výměnu celého objemu vody v chovné jednotce jedenkrát za 1–2 hodiny (Pokorný a kol., 1998). Nesprávná rychlost proudění vody může mít negativní vliv na produkční výsledky. Pro pstruha duhového do hmotnosti těla kolem 1 g je optimální rychlost proudění vody v rozsahu mezi 0,03–0,06 m.min<sup>-1</sup>, zatímco pro ryby nad 1 g je doporučováno 0,6–1,8 m.min<sup>-1</sup> (Kouřil a kol., 2008).

### **2.1.5 Umělá reprodukce**

System recirkulační líhně pro lososovité ryby s využitím mimo sezonních výtěrů generačních ryb může zásobovat odchovy pravidelným a dostatečným množstvím juvenilních ryb v průběhu celého roku (Buřič a Kouřil, 2012).

Kouřil a kol. (2008) popisuje několik základních pravidel pro umělý výtěr. Při manipulacích s rybou je potřeba držet rybu ve vlhké tkanině. Před výtěrem otřít do sucha břišní partie ryby a misky, do kterých se budou jikry vytírat, je také nezbytné udržet čisté a suché. Při výtěru ryba musí být nízko nad miskou, aby bylo zamezeno poškození jiker, a musí být vytřeny všechny jikry z břišní dutiny ryby.

Německá (suchá) metoda umělého výtěru se používá u většiny lososovitých ryb (Pokorný a kol., 1998). Princip spočívá ve výtěru několika samic (jikernaček) do jedné misky. Následně přímo na jikry se vytírá sperma (mlíčí) samců (mlíčáků) a promíchává se s jikrami. Následně se do směsi gamet přilívá voda, čímž dojde k aktivaci spermií. Doporučená výška vody nad jikrami by měla být maximálně 1 cm, jinak se snižuje procento oplození jiker. Poté se jikry znovu promíchávají a nechají se v klidu po dobu 2–3 minut, aby spermie vnikly do jikry (Kouřil a kol., 2008). Vzhledem k tomu, že ovariální plazma prodlužuje životnost spermií, výsledkem této metody je míra oplození až 95 % (Pokorný a kol., 1998). Pak je voda slita a odstraněno zbylé mlíčí, stejně jako neoplozené jikry. Takto oplozené jikry jsou přemístěny na inkubační přístroje, kde dojde k jejich inkubaci (Lusk a kol., 1987).

### **2.1.6 Umělý odchov a vývoj raných stádií**

U lososovitých ryb je rozměr zralých jiker nepřímě vztažen k plodnosti daného druhu, z toho vyplývá, že čím větší plodnost ryby, tím menší je průměr zralých jiker

(Kouřil a kol., 2008). Jikra má animální pól obsahující buněčné jádro a vegetativní pól, kde se nachází žloutek (Pokorný a kol., 1998). Na povrchu jikry lze pozorovat póry o velikosti 1  $\mu\text{m}$ , které pokračují v úzkých kanálcích. Na animálním pólu jikry se nachází mikropyle, kterým proniká spermie do jikry (Hoitsy a kol., 2012). Jikra je obklopena silnou mnohobuněčnou membránou, chorionem s blanitým obalem se složitou lamelární strukturou, která v následujících hodinách po oplození čím dál tím více bobtná (Terner, 1986).

Spermie se skládá z hlavičky (1,7–2,0  $\mu\text{m}$ ) a ocásku o délce 25–35  $\mu\text{m}$ . Aktivní fáze života spermie ryb začíná, když je spermie aktivována vodou a trvá přibližně 40–50 sekund u pstruha duhového (Hoitsy a kol., 2012). Po proniknutí první spermie se otvor mikropyle jikry uzavře, ale to platí i v případě, že v blízkosti jikry nejsou přítomny žádné spermie do několika minut po začátku bobtnání jikry. Membrána je od vlastní buňky oddělena perivitelinovým prostorem, který se 20–60 minut po oplodnění zaplní tekutinou. Tato perivitelinová tekutina umožňuje embryu volně rotovat uvnitř obalu (Hoitsy a kol., 2012).

Jikry pstruha duhového nejsou lepkavé, ale mohou se přilnout k podkladu nebo ke stěnám inkubátoru, dokud zcela nenabobtnají (Pokorný a kol., 1998). V období bobtnání se objem jikry zvětší o 12–20 % (Hoitsy a kol., 2012). Během daného období jsou jikry velmi citlivé (Kouřil a kol., 2008).

U pstruha duhového embryonální vývoj (tj. perioda od oplození jiker po vylíhnutí larev) probíhá po dobu 61 dnů při teplotě vody 6 °C. V důsledku splynutí pohlavních buněk (gamet) vzniká nová buňka, která se jmenuje zygota. Po vzniku zygoty začíná její dělení (rýhování), kdy vznikají dceřiné buňky. Z takových buněk vzniká embryo (Pokorný a kol., 1998). V tomto úseku ontogeneze probíhá vývoj jedince velmi rychle. Proces rýhování probíhá přibližně dvě hodiny (Kouřil a kol., 2008). Rýhování je podmíněno množstvím žloutku v jikře. Za žloutek se považuje rezerva živin uvnitř jikry, která je charakteristická hustou nažloutlou tekutinou obsahující protein globulin a kapičky tuku (Pokorný a kol., 1998). Tyto tukové kapénky se shromažďují na horním pólu jikry, čímž udržují zárodečný disk ve správné poloze (Hoitsy a kol., 2012).

Další fází vývoje ryb je období klidu, jenž probíhá od cca 48 hodin po oplození. Během období klidu jsou lososovité ryby velmi citlivé na vnější vlivy a otřesy. Zvláště nebezpečná je perioda v intervalu 70–100 d° při teplotě vody 10–12 °C (Kouřil a kol.,

2008). V daném období je velmi nebezpečné manipulovat s rybami např. transportovat embrya, odsávat kal, měnit průtok vody atd. (Pokorný a kol., 1998).

Fáze klidu končí stádiem očních bodů. Období očních bodů je charakteristické černými očními body, tj. pigmentovanými základy očí embrya. Stádium očních bodů se považuje za nejméně citlivé na otřesy, proto je možné transportovat embrya i vybírat neoplozené a poškozené (bílé) jikry či uhynulá embrya (Kouřil a kol., 2008). U pstruha duhového stádium očních bodů trvá přibližně po dobu jednoho týdne od 200 do 250 d°. V tomto období se naposledy vybírají bílé jikry a uhynulá embrya (Pokorný a kol., 1998).

Vylíhnutí (vykulení) váčkového plůdku (larev) se uvádí jako konec inkubace embryí (Kouřil a kol., 2008) a zároveň je považováno za konec embryonální periody života ryb (Kamler, 2002). Před vylíhnutím se embrya začínají intenzivně pohybovat, tím dojde k protrhnutí obalu jikry. K uvolňování plůdku dochází ocasem napřed (Hoitsy a kol., 2012). Intenzita líhnutí je závislá na teplotě vody. Například při 10 °C nastává líhnutí pstruha duhového za 310 d°. Nezbytné je odstraňování jikrných obalů, jinak by mohlo dojít k udušení plůdku (Kouřil a kol., 2008).

Po vykulení začíná klidová fáze odchovu (tj. larvální perioda ontogeneze), která končí naplněním plynového měchýře a rozplaváním plůdku (zatímco larvální perioda končí úplnou resorpcí žloutkového váčku). Vylíhli jedinci mají velký žloutkový váček, z něhož se živí (tzn. období endogenní výživy) do přechodu na vnější krmění (tzn. období exogenní výživy). Žloutkový váček může tvořit 2/3–3/4 celkové hmotnosti jedince (Hoitsy a kol., 2012; Kamler, 2002). Velikost žloutkového váčku je závislá na jikernačce, která ukládá živiny do jiker v průběhu jejich dozrávání (Pokorný a kol., 1998). Zpočátku vylíhlé larvy zůstávají ležet na dně, ale v průběhu několika dnů dochází ke zvýšení jejich aktivity a rozplavání plůdku (Hoitsy a kol., 2012).

Aktivní fáze odchovu začíná po strávení (resorpci) cca 1/2–2/3 žloutkového váčku. V dané fázi je pozorován rychlý nárůst pohybové aktivity a začátek potravního reflexu (Kouřil a kol., 2008). Dochází k postupnému přechodu z endogenní na exogenní výživu (tzn. období mixogenní výživy) (Kamler, 2002). Toto období je velmi krátké a z pohledu ontogeneze a chovu neméně důležité a náročné. Cílem rozkrmování plůdku je rozvinout potravní reflex, tím vytvořit optimální předpoklad pro intenzivní růst v dalších fázích odchovu (Kouřil a kol., 2008).

Inkubace jiker (inkubační doba) je období vývoje zárodka (embrya) v jikře a vyjadřuje se pomocí denních stupňů (d°). Denní stupně jsou součtem nebo násobkem



průměrných denních teplot po potřebný počet dní od oplození jiker do vylíhnutí larev. Faktory ovlivňující délku inkubační doby jsou jak biotické (druh, velikost jiker, věk ryby atp.), tak abiotické (teplota vody, obsah kyslíku, intenzita světla atd.) (Kamler, 2002; Pokorný a kol., 1998).

K inkubaci oplozených jiker se používají inkubační láhve a přístroje. Existuje několik druhů inkubačních láhví (např. Zugská, Chasseova a Kannengieterova láhev) a inkubačních přístrojů (horizontální a vertikální inkubátory – kalifornský, Rückelův a Rückel-Vackův aparát) (Kouřil a kol., 2008). Inkubační láhve jsou nejčastěji vyrobeny ze skla, plexiskla či z průhledného plastu, zatímco inkubační přístroje bývají vyrobeny z různých materiálů např. laminát, kov, plasty a jejich kombinace (Pokorný a kol., 1998). Přívod vody u většiny typů těchto inkubačních aparátů bývá zespona, tím jikry mírně nadnáší (Kouřil a kol., 2008). Použití vyjmenovaných inkubačních přístrojů má své výhody a nevýhody např. jednou z nevýhod inkubačních láhví se spodním přítokem vody je, že není možno odebírat neoplozené a uhynulé jikry v průběhu inkubace. U pstruha duhového se nasazuje 30–40 tisíc jiker do jedné Zugské láhve (objem 9 l) s možností inkubace až do období líhnutí plůdku (Pokorný a kol., 1998). Po ukončení inkubace jiker nastává další náročná fáze chovu, kterou je odchov vylíhnutého plůdku (larev), kdy ryby jsou přesunuty do zařízeních různého typu (např. průtočné žlaby, bazény a kolíčky) (Kouřil a kol., 2008).

U počátečních stádiích inkubace jiker lososovitých ryb se doporučuje zvolit přítok vody  $3 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$  a před začátkem líhnutí plůdku změnit průtok na  $7\text{--}8 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$  (Pokorný a kol., 1998). Optimální parametry vody pro pstruha duhového byly uvedeny výše v kapitole 2.1.4. V průběhu inkubace u pstruha duhového se míra líhnutí larev pohybuje kolem 70 až 90 %. Během inkubace jiker a odchovu plůdku musí být zajištěna pravidelná kontrola z důvodu udržování stálého průtoku kvalitní vody, odstraňování sedimentu, uhynulých embryí a jikrných obalů při/po líhnutí, vedení evidence líhnutí a častého krmení ryb (Pokorný a kol., 1998).

## **2.2 Čištění a úprava kvality vody v akvakultuře**

### **2.2.1 Znečištění vody v rybochovných objektech**

V intenzivních odchovech může být welfare ryb nižší v důsledku vysokých obsádek, stresu při manipulaci nebo poklesu kvality vody, proto lze očekávat vyšší výskyt onemocnění ryb, zvláště u raných stádií ryb. Nárůst množství organických

i anorganických látek ve vodě v důsledku chovu ryb (krmení a metabolismu ryb) je příznivým prostředím pro rozvoj bakterií a ostatních mikroorganismů ve vodě. Při několikanásobném namnožení těchto mikroorganismů dochází k negativním účinkům (např. rozvoji nemocí a plísní, mortalitě ryb) na chovanou rybí obsádku, což často vede k ekonomickým ztrátám. Následkem zvýšené koncentrace suspendovaných látek je vyšší přežití původců mnohých onemocnění (Liltved, 2003). Správná hygiena prostředí, stejně jako pravidelné čištění odchovných nádrží a potrubí, je nezbytná pro zajištění zdraví ryb (Lawson, 2002).

Patogenní bakterie mohou vyvolat onemocnění ryb. Uvedené organismy se objevují nejčastěji při trvalém vysokém bakteriálním zatížení vody. Objevují se i u stresovaných ryb nebo při špatném zdravotním stavu atd. v důsledku snížené imunity ryb. Můžeme pozorovat jak vnější projevy (změna chování, rozpad ploutví, léze, otevřené rány atp.), tak i vnitřní (zánět střeva, změna barvy sleziny, zduření ledvin aj.) (Svobodová a kol., 2007).

Další skupinou organismů způsobujících zdravotní rizika ryb jsou plísně. Nejznámějšími rody jsou *Saprolegnia* nebo *Achlya*. Podobně jako bakterie obývají převážně znečištěné vody. Nenapadají hostitele aktivně, ale v období oslabení imunity, eventuální nekrózy a zranění povrchu ryb, které jsou živnou půdou pro plísně. Zvláštní pozornost by měla být věnována žábrám plůdku lososovitých ryb, aby nedošlo k přidušení ryb, což by mohlo vést ke katastrofickým ztrátám (Buřič a Kouřil, 2012).

K redukování ekonomických ztrát v intenzivním chovu ryb je zapotřebí dodržovat zoohygienu a omezit kontaminace vodního prostředí infekcemi. Voda obíhající v RAS obsahuje pestrou škálu mikroorganismů různého původu, proto možnost výskytu patogenních organismů není zanedbatelná. V chovných objektech s vysokou obsádkou ryb se škůdci rychle množí a mohou vyvolat zdravotní problémy ryb, je proto nutné chovnou vodu dezinfikovat. Při optimalizaci dezinfekce vody v RAS je nutno brát v úvahu zkušenosti z úpravy pitné vody a čištění odpadních vod (Pokorný a kol., 1998).

### **2.2.2 Recirkulační akvakulturní systémy**

V průběhu několika desítek let došlo k masivnímu rozvoji recirkulačních technologií (Warrer-Hansen, 2015) jako důsledek technického pokroku a dalších faktorů, jakými jsou ekologické nároky na životní prostředí, kvalita vody, zamezení vstupu různých nemocí a predátorů aj. (Kouřil, 2013).

Recirkulační akvakulturní systémy (dále RAS) můžeme charakterizovat jako technologie zajišťující vícenásobné využití vody v chovných zařízeních (Vachta a kol., 2015). Během několikanásobného oběhu vody v RAS dochází ke znečištění vody v důsledku fyziologických a metabolických procesů ryb. Tím, že RAS nejsou náročné na vydatnost zdroje přítokové vody a vzhledem k minimální výměně vody, musí být dodržováno hygienické zabezpečení chovů a eliminace negativních účinků vlivem znečištění (Lawson, 2002). Při průtoku vody RAS je voda neustále přečišťována od různých nerozpustných (zbytky krmiv, exkrementy a sedimenty) i rozpustných látek (amoniak, oxid uhličitý, dusitany, dusičnany atd.) pomocí mechanických a biologických filtrů, čímž se přemění její kvalita na původní úroveň (Stejskal a kol., 2020).

Jeden z hlavních problémů nastává při intenzivní aplikaci krmiv, což v důsledku rozkladných procesů vede k poklesu obsahu rozpuštěného kyslíku ve vodě, který však lze navýšit pomocí aerace či oxygenace (Kouřil a kol., 2013). Dezinfekce vody může být provedena metodami jako je ozonizace, ozařování ultrafialovým světlem (UV), chlorací, aplikace léčebných látek například formaldehyd, peroxid vodíku, kyselina peroctová, chlornan atd (Kolářová a kol. 2020). Další technologické prvky RAS poskytují optimální podmínky prostředí pro určitou roční sezónu. Jedná se o různá tepelná čerpadla, ohříváče či chladiče, které se používají k odpovídajícímu nastavení teploty vody (Velíšek a kol., 2015). Oběh vody v systému je zajištěn pomocí vodních čerpadel různé konstrukce. Vzhledem k finanční náročnosti, nejen uvedených technických prvků, se konstrukce RAS organizuje různými způsoby především s cílem zvýšení ekonomické spolehlivosti a snížení energetických požadavků (Mareš a kol., 2013).

## **2.2.3 Metody čištění vody v RAS**

### **2.2.3.1 Mechanická filtrace**

Zpočátku je třeba nerozpuštěné látky klasifikovat na skupiny podle jejich fyzikálních vlastností (Stejskal a kol., 2020). Jednou ze skupin jsou sedimentující látky, které v klidné vodě odpadávají na dno přibližně do 20 minut a druhou skupinou jsou suspendované (nesedimentující) látky (Ebeling a Timmons, 2012; Kouřil a kol., 2013; Stejskal a kol., 2020). Při odstranění látek o velikosti částic 50–75 µm dochází ke správné funkci RAS (Stejskal a kol., 2020). Existuje několik způsobů (včetně jejich kombinací) pro odstranění nerozpuštěných látek z RAS např. různé sedimentační nádrže, separátory anebo mechanické filtry různých typů (Kouřil a kol., 2013; Stejskal a kol., 2020).

Nejčastěji se v systémech používají bubnové mechanické filtry s mikrosítami (Cripps a Bergheim, 2000). Princip spočívá v průtoku vody filtrem, kde dochází k zachycení nežádoucích částic z vody podle zvolené velikosti ok mikrosíta, zatímco vyčištěná voda pokračuje nadále v RAS. Nečistoty z mikrosíta bubnového filtru jsou odstraněny průplachem vysokotlakými tryskami buď periodicky, nebo pomocí signálu hladinového čidla. Jejich masivní využití souvisí s možností výměny mikrosít, což umožňuje nastavit rozměr zachycovaných částic (Losordo a kol., 1999; Policar a kol., 2020). Hlavní nevýhodou použití mechanických bubnových filtrů je vysoká pořizovací cena a značná spotřeba vody při čištění (Stejskal a kol., 2020).

### 2.2.3.2 Biologická filtrace

Biologická filtrace je další nezbytnou součástí čištění vody v RAS. Ne všechny organické látky jsou totiž odstraněny v mechanickém filtru, nejmenější částice projdou spolu s rozpuštěnými sloučeninami, jako jsou fosforečnany, toxické dusitany, amoniak (Bregnballe, 2015; Kouřil a kol., 2013; Stejskal a kol., 2020), které jsou produkovány metabolismem ryb a v důsledku rozkladu krmiv ve vodě (Kouřil a kol., 2013; Masser a kol., 1992; Stejskal a kol., 2020).

Biologický filtr umožňuje přeměnu toxických látek (amoniaku a dusitanů) na méně toxické dusičnany. Daný proces se nazývá nitrifikace a probíhá ve dvou fázích (Stejskal a kol., 2020). V první fázi (tzv. nitritace) je amoniak oxidován na dusitany hlavně díky bakteriím rodu *Nitrosomonas*. Ve druhé fázi (tzv. nitrataci) jsou dusitany oxidovány na dusičnany převážně pomocí bakterií rodu *Nitrobacter*. Většinou oba stupně probíhají těsně za sebou, proto nedochází k hromadění toxických dusitanů ve vodě. Proces nitrifikace probíhá pouze za oxických podmínek, to vede k velké spotřebě kyslíku. Z tohoto důvodu je ve filtru instalována technologie provzdušňování (Bregnballe, 2022; Kouřil a kol., 2013; Masser a kol., 1992; Policar a kol., 2018; Stejskal a kol., 2020; Vachta a kol., 2015).

V biofiltru nitrifikační bakterie vedou konkurenční boj o kyslík a prostor s heterotrofními bakteriemi a dalšími mikroorganismy. Nežádoucí organismy rozkládají organické látky a spotřebovávají kyslík z vody. Proto je zapotřebí, aby voda přitékající do biofiltrů obsahovala co nejméně nerozpuštěných látek (Kouřil a kol., 2013). Proces nitrifikace inhibuje nejen koncentrace kyslíku, ale také nízká teplota vody, nízká/vysoká hodnota pH, vysoká salinita, přítomnost antibiotik atd. (Bregnballe, 2022; Kouřil a kol.,

2013; Stejskal a kol., 2020). Většina RAS používá bakterie fixované na povrch substrátů. Proto se pro rychlý a efektivní provoz biologického filtru používá různých médií s velkou plochou povrchu např. ve tvaru čoček, mřížek a kuliček. V současnosti existuje celá řada typů biofiltrů např. zkrápěné, fluidní, ponořené a tlakové filtry (Bregnballe, 2022; Kouřil a kol., 2013; Lekang, 2020; Stejskal a kol., 2020).

#### **2.2.4 Metody dezinfekce vody v RAS**

Dezinfekce vody pro akvakulturu má zásadní význam, jako prevence zavlečení a šíření infekčních onemocnění. Zdroj vody bez patogenů je pro úspěch v akvakultuře nezbytný (Kasai a kol., 2002). Mikrosítové mechanické filtry se používají k minimalizaci hromadění pevných látek a biologické filtry pak pro odstranění dusíkatých látek v RAS, nejsou však dostačujícími mechanismy pro dezinfekci vody (Summerfelt a kol., 1994). Pokud se organické látky neodstraní včas z vody, mohou vyvolat nežádoucí deficity kyslíku, inhibovat nitrifikaci a zvyšovat riziko výskytu patogenů (Chen a kol., 1993). Metody nebo procesy, které mohou zlepšit kvalitu vody, zničit patogeny a případně zvýšit produkci a snížit některé provozní náklady při odchovu ryb v RAS jsou chlorace, UV záření a ozonizace, případně jejich kombinace (Kouřil a kol., 2013; Liltved, 2003).

##### **2.2.4.1 Chlorace vody**

Chlorování (chlorace) je nejčastějším způsobem dezinfekce komunálních a jiných odpadních vod už několik desítek let (Wang, 2006). Účinnost dezinfekce chlorem je však ovlivňována faktory prostředí, jakými jsou např. teplota, pH, suspendované látky, organické sloučeniny a druh cílového organismu (Lawson, 2002). Při používání chloru v akvakultuře je potřeba brát v úvahu, že chlor je toxický pro ryby (Liltved a kol., 1995). Po chloraci se často doporučuje provzdušňování vody po dobu 24–48 hodin (Lawson, 2002).

##### **2.2.4.2 Dezinfekce vody UV zářením**

Ošetření vody ultrafialovým světlem (UV) probíhá pomocí elektromagnetického záření o vlnových délkách, které poškozují DNA organismů (Bregnballe, 2022). Tato technologie se používá např. ve vodárenství, akvakultuře a RAS technologiích (Timmons a Ebeling, 2013). Důležitými faktory pro výpočet dávky UV jsou výkon lampy, plocha osvětlení, sloupec vody, doba kontaktu a kvalita vody (Stejskal a kol., 2020). Výhodou

použití UV je, že nezanechává žádná toxická rezidua (Gullian a kol., 2012) a nemá vliv na chuť, pach a chemické složení vody. Negativní stránkou jsou však vyšší provozní náklady (Stejskal a kol., 2020).

#### **2.2.4.3 Ozonizace vody**

Další účinnou metodou dezinfekce pitných a odpadních vod je ozonizace, která se provádí již více než sto let. Ozonizace se uplatňuje také v akvakultuře, a to jak v průtočných systémech, tak i RAS (Summerfelt a Hochheimer, 1997). Stala se tak předmětem rostoucího zájmu výzkumu a komerčního využití v akvakultuře (Powell a Scolding, 2016). Vlastnosti ozonu, technologie pro produkci a měření ozonu či výhody a nevýhody aplikace v akvakultuře jsou podrobněji popsány v následující kapitole 2.3.

### **2.3 Ozon**

#### **2.3.1 Chemická struktura ozonu**

Ozon ( $O_3$ ) je tříatomový alotrop kyslíku, v němž jsou atomy kyslíku spojeny nestabilní vazbou. Ozon je velmi reaktivní, neboť volně vázaný atom kyslíku se rychle odtrhne a reaguje s většinou molekul organických a anorganických látek. Ozon je tedy silným oxidačním činidlem, druhým nejsilnějším na světě po fluoru (Lawson, 2002; NCBI, 2023; Powell a Scolding, 2016).

#### **2.3.2 Vlastnosti ozonu**

Vzhledem k relativně vysokým nákladům na produkci ozonu (ale také kyslík) je důležité zajistit jeho účinný přenos do vody (Summerfelt a Hochheimer, 1997). Ve srovnání s kyslíkem je ozon přibližně  $13\times$  rozpustnější ve vodě (Rice a Netzer, 1984). Celková rychlost přenosu ozonu z plynné do kapalně fáze a následná rychlost rozkladu ozonu závisí na rychlosti reakce ozonu s látkami obsaženými ve vodě a na účinnosti použitého zařízení pro přívod ozonu do vody (Stejskal a kol., 2020; Summerfelt, 2003; Summerfelt a Hochheimer, 1997). Typ a množství složek ve vodě určuje rychlost reakce ozonu. Rychlá reakce s anorganickými a organickými látkami, které lze oxidovat, udržuje nízkou koncentraci ozonu v prostředí, tím se zvyšuje rychlost přenosu ozonu. Protože přenos a reakce probíhají postupně, může se jedna z nich stát limitující pro rychlost dezinfekce vody (Bablon a kol., 1991). Teplota je přímo úměrná rychlosti chemické reakce a urychluje oxidaci, a tím i účinky ozonu v daném časovém období

(Powell a Scolding, 2016). Neméně důležitý chemický faktor, který je třeba vzít v úvahu pro efektivní dávkování ozonu, je pH. Bylo pozorováno, že rychlost oxidace ozonu se zvyšuje při hodnotách pH nad 8–9 (Ershov a Morozov, 2009; Staehelin a Hoigne, 1985).

Dalšími způsoby, jak navýšit účinnost ozonu, jsou zvětšení kontaktní plochy mezi plynem i kapalinou a zdržení plynu ve vodě. Kontaktní plochu lze zvětšit zmenšením velikosti bublinek či kapek, protože menší bublinky nebo kapky mají větší poměr plochy vůči jejich objemu. Vzhledem k tomu, že spotřeba ozonu bude nižší, vzroste tím jeho i čas zdržení ozonu ve vodě. Efektivitu přenosu ozonu je tedy možné navýšit pomocí technických zařízení, které minimalizují průměr bublinek nebo kapiček (Stejskal a kol., 2020; Summerfelt a Hochheimer, 1997).

### 2.3.3 Toxicita ozonu

Na druhou stranu, pokud se nadbytek zbytkového ozonu zůstávajícího ve vodě nedostatečně kontroluje, může způsobit významné poškození nebo dokonce hromadný úhyn chovaných ryb. Chronická expozice ozonu může vést ke změně redoxní homeostázy, což nakonec způsobí stav oxidačního stresu. Kromě toho se ozon přímo poškozuje na slizniční povrchy, zejména žábry (Bullock a kol., 1996; Good a kol., 2011; Policar a kol., 2020; Reiser a kol., 2011; Stiller a kol., 2020).

Pro vodní organismy je ozon toxický již při nízkých koncentracích (Langlais a kol., 1991; Leynen a kol., 1998; Summerfelt a kol., 2004; Wedemeyer a kol., 1979). Wedemeyer a kol. (1979) ve své publikaci uvádí 96hodinové LC50 9,3 mg.l<sup>-1</sup> a jako prahovou hodnotu zmiňují již 0,008 mg.l<sup>-1</sup> pro pstruha duhového o velikosti těla 10–13 cm.

Plynný ozon je ale toxický i pro člověka. Normy stanovené pro bezpečnost a ochranu zdraví při práci povolují pouze maximální jednorázovou expozici cca 3 mg.l<sup>-1</sup> po dobu kratší než 10 minut a přibližně 1 mg.l<sup>-1</sup> po dobu osmi hodin (OHSA, 1993). Na druhou stranu existují i tzv. ozonoterapie (Elvis a Ekta, 2011).

Ozon vykazuje agresivitu nejen k živým organismům, ale i k RAS komponentům, především měkkým plastům ve formě korozivních účinků. Z tohoto důvodu je potřeba volit materiály, které jsou vůči těmto projevům odolné (Stejskal a kol., 2020). Stejskal a kol. (2020) zároveň uvádí jako vhodný materiál pro uzavírací kohouty a těsnění používat teflon a pro směšovací zařízení zvolit nerezovou ocel. Škodlivým účinkem může

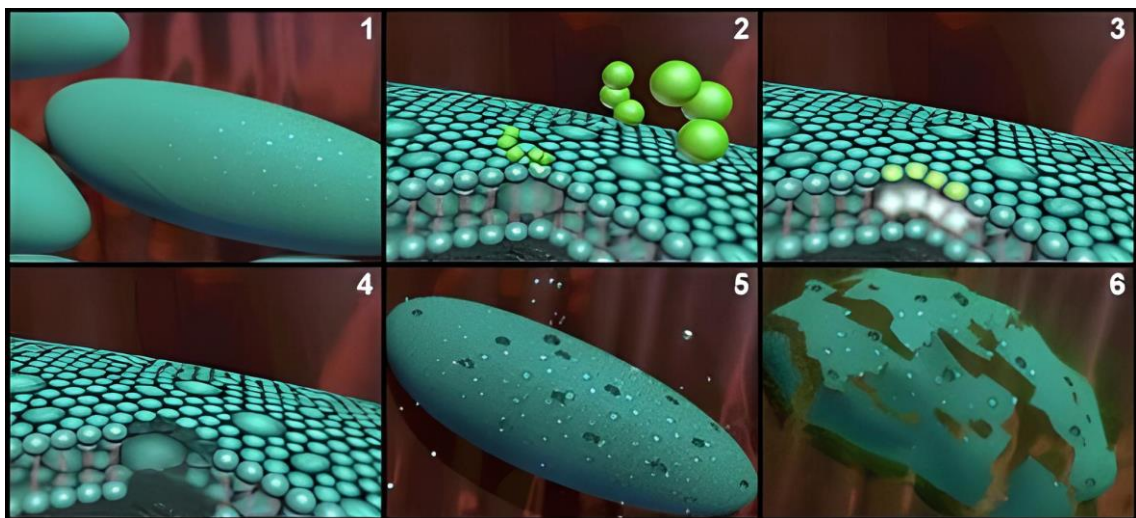
být i poškození biologického filtru, zejména nitrifikačních bakterií na mediích, což vede ke zvýšení dusíkatých látek ve vodě (Brazil a kol., 1996).

### 2.3.4 Destrukce ozonu

Prevenčí vůči zvýšeným koncentracím ozonu je jeho odstranění neboli destrukce. V akvakultuře se běžně používá destrukce pomocí UV záření, které katalyzuje přeměnu  $O_3$  na  $O_2$  při vlnových délkách od 250 do 260 nm (Cryer, 1992; Hunter a kol., 1998; Rodriguez a Gagnon, 1991; Stejskal a kol., 2020; Summerfelt a kol., 2004). Velice častou metodou je odstranění ozonu pomocí granulovaného aktivního uhlí (Owsley, 1991; Policar a kol., 2020; Summerfelt, 2003). Dalšími metodami mohou být např. vyublání/vyvětrání ozonu vzduchem (Summerfelt a kol., 2008) a katalytická destrukce (Mat-Kuling, 2023). Také je třeba předcházet volnému úniku ozonu do prostředí, proto je důležité správně zvolit místo instalace ozonové jednotky. V RAS je vhodné umístit ozonové jednotky na přítokové vodě do systému, odtokové vodě ze systému, před chovnými nádržemi nebo před biofiltrem (Stejskal a kol., 2020).

### 2.3.5 Dezinfekce ozonem

Vzhledem k toxicitě ozonu a jeho rychlému rozpadu (reakci) ve vodě je ozon schopen účinně inaktivovat řadu mikroorganismů, díky čemuž je vhodný pro redukci mikrobů v akvakultuře (Bablon a kol., 1991; Longley, 1986). Účinek ozonu na bakterie je znázorněn na obrázku č. 1.



**Obr. č. 1.** Účinek ozonu na bakterie: 1 – zdravá bakteriální buňka; 2 – při bližším přiblížení se molekula ozonu (zelená) dostane do kontaktu s buněčnou stěnou; 3 – při kontaktu molekuly



ozonu s buněčnou stěnou dochází k reakci zvané oxidační výbuch, při níž se v buněčné stěně vytvoří malá díra; 4 – nově vytvořený otvor v buněčné stěně bakterie; 5 – bakterie začne ztrácet svůj tvar, zatímco molekuly ozonu pokračují ve vytváření otvorů v buněčné stěně; 6 – po tisících srážkách ozonu během pouhých několika sekund již bakteriální stěna nedokáže udržet svůj tvar a buňka odumírá (AgriOzein, 2023).

Už ošetření pomocí  $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  ozonu po dobu 10 minut vede k usmrcení viru infekční hematopoetické nekrózy (Owsley, 1991). Liltved a kol. (1995) zaznamenali inaktivaci 99,99 % čtyř druhů bakterií (*Aeromonas salmonicida salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida* a *Yersinia ruckeri*) a viru infekční pankreatické nekrózy v destilované vodě při zbytkové koncentraci ozonu  $0,15\text{--}0,20 \text{ mg.l}^{-1}$  a časovém úseku 180 sekund. Ozon byl úspěšně použit také k odstranění mikrořas (Richard, 1993), to má velký význam např. pro líhně a řasové biotechnologie (Huang a kol., 2016; Cheng a kol., 2003; Powell a Scolding, 2016).

Pro destrukce bakterií *Escherichia coli* a *Enterococcus faecalis* se doporučuje koncentrace ozonu mezi  $0,4$  a  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  v čisté vodě (Block, 1982). Kinman (1972) prokázal, že při zdržení ozonu v systémech s čistou vodou stačí 15 sekund pro zničení 100 % přítomných mikrobů. Gesto a kol. (2022) ve své publikaci uvádí, že po jednom týdnu se aktivita bakterií snížila o 91 % v systémech ošetřených ozonem. Policar a kol. (2018) zjistili, že při odchovu sumce velkého (*Silurus glanis*) a candáta obecného (*Sander lucioperca*) v RAS při použití ozonu dochází ke snížení pravděpodobnosti výskytu bakteriální i parazitární infekce a k poklesu kontaminace vody koliformními bakteriemi.

### **2.3.6 Aplikace ozonu v akvakultuře**

Ozon lze aplikovat kontinuálně jako sérii ošetření, nebo v jedné dávce na den (Hunter, 2000; Rakness, 2005). Použití ozonu je ve většině případů spojeno se strategií krmení. Totiž tři až čtyři hodiny po krmení ryb dosahuje amoniak, rozpuštěné organické látky a další odpadní produkty maximálních koncentrací (Hunter, 2000).

Denní dávka ozonu by měla odpovídat  $27\text{--}29 \text{ g O}_3$  na kg krmiva (Summerfelt a kol., 2009). Podobné dávkování bylo zjištěno ve studii (Spiliotopoulou a kol., 2018).

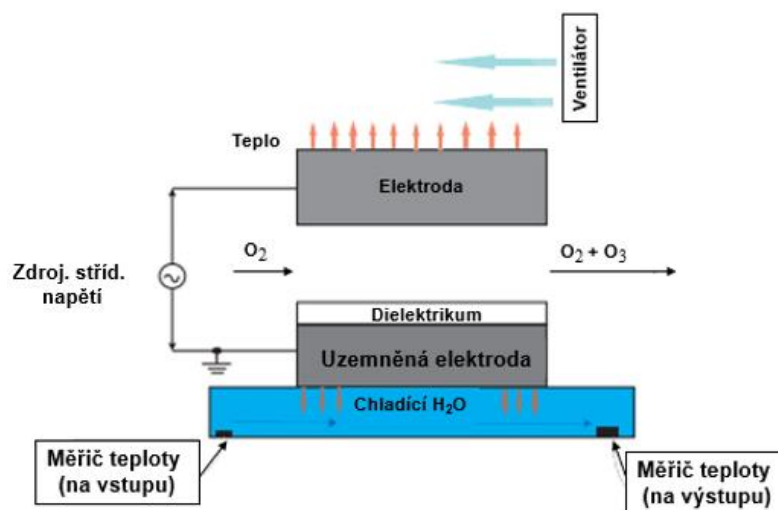
K výhodám použití ozonu v akvakultuře patří také odstraňování organických molekul. Například vysokomolekulárních látek jako jsou geosmin a 2-methylisborneol odpovědné za pachut' masa ryb pocházejících z RAS, tyto látky  $\text{O}_3$  rozkládá na nízkomolekulární látky nezpůsobující tuto pachut' (Westerhoff a kol., 2006).

Organické pevné látky, které jsou menší než přibližně 20  $\mu\text{m}$ , se hůře odstraňují pomocí běžných sedimentujících a mechanických filtračních procesů, takže se mohou hromadit v RAS, zejména v systémech s nízkou výměnou vody (Chen a kol., 1993; McMillan a kol., 2003). Aplikace ozonu zlepšuje mikro-flokulaci velmi jemných částic a jejich agregaci do větších shluků, které jsou pak lépe odstranitelné mechanickou filtrací (Krumins a kol., 2001; Stejskal a kol., 2020; Summerfelt a kol., 1996).

Snížení obsahu amoniaku a dusitanů ve vodě je v RAS velkým problémem, použitím ozonu však lze přímo snížit jejich koncentrace. Ozon může oxidovat jak amoniak, tak i dusitany (Brazil, 1996; Summerfelt a kol., 1996; Summerfelt a Hochheimer, 1997). Ozon redukuje také obsah těžkých kovů, jako jsou železo a mangan (Langlais a kol., 1991; Rice a kol., 1981).

### 2.3.7 Produkce ozonu

Pro bezpečnou a úspěšnou ozonizaci je velmi důležitá konstrukce ozonového generátoru (da Silva, 2006). Ozon je nestabilní plyn a nemůže být skladován po dlouhou dobu, proto musí být vyráběn na místě (Lekang, 2020). Existuje celá řada technologií výroby ozonu např. fotochemicky pomocí UV záření, elektrolýza, korónový výboj (da Silva a Wilson, 2006). Příprava ozonu pomocí dielektrického bariérového výboje (korónový výboj) je nejběžnější metodou používanou v průmyslu (Okpala a kol., 2015). Princip korónového výboje je znázorněn na obrázku č. 2.



**Obr. č. 2.** Princip korónového výboje spočívající v průchodu suchého vzduchu nebo kyslíku z vnějšího zdroje mezi elektrodami, kde elektrický výboj rozbíjí molekuly kyslíku, tímto vytváří ozon (Wedemeyer, 1996).

Při průchodu plynu mezi elektrodami jsou elektrony přitahovány ke kladně nabitě anodě, hromadí se a způsobí mikro-výboj. Ionizační vlna vyvolá porušení vazby kyslíků a vzniká atomární kyslík (Rakness, 2005). Dochází k reakci ( $O\bullet + O_2$ ) a vzniká ozon (da Silva, 2006). Vzduchem plněný generátor produkuje plyn s koncentrací ozonu 1–4 hm. % (obvykle 1–2,5 hm. %) a kyslíkem plněný generátor produkuje 6–16 hm. % (většinou 8–12 hm. %). Proces probíhá v trubici, která má šířku 0,3–3 mm v závislosti na obsahu kyslíku v plynu. Materiál vhodný pro komoru je z jedné strany keramický nebo skleněný, z druhé strany je elektroda z nerezové oceli. Obecně generátory pracují za atmosférického tlaku plynu (Vrajová, 2008). Nevýhodou je, že značné množství elektrické energie přiváděné do generátoru se ztrácí jako teplo, a proto v závislosti na ozonizátoru je vždy nutné chlazení vzduchem nebo dokonce vodou (Wedemeyer, 1996). Pouze malé množství dodané energie (5–10 %) je využito pro výrobu ozonu (Gebauer a kol., 1992).

Generátory ozonu jsou obvykle provozovány s využitím suchého vzduchu nebo suchého kyslíku bez nečistot. V obou případech by měl být rosný bod udržován pod  $-60\text{ }^\circ\text{C}$ , protože to snižuje obsah vodní páry na několik ppm. Vlhkost přívodního plynu má nepříznivý vliv na tvorbu ozonu (Kogelschatz, 2003).

### **2.3.8 Měření ozónu**

Široce používanou metodou pro měření ozonu ve vodě je oxidačně redukční potenciál (ORP) (Powell a Scolding, 2016). ORP měří rovnováhu mezi koncentracemi a schopností látek vázat nebo uvolňovat elektrony, tzn. je měřením síly oxidačního nebo redukčního činidla. Senzor ORP se umísťuje v systému RAS v místě, kde je ozon zcela spotřebován (Bullock a kol., 1997). Účinek ozonu je měřen nepřímo rozdílem hodnot ORP před a po ošetření ozonem, protože ozon rychle oxiduje redukující látky (Wenk a kol., 2013).

Hodnoty ORP v rozmezí 300 až 425 mV ORP jsou pro ryby, korýše a měkkýše bezpečné (Powell a Scolding, 2016). Pokud ORP dosáhne nad 500–600 mV, může být pro ryby toxické, protože oxiduje všechny organické látky včetně povrchů ryb, jako jsou žábry (Lekang, 2020).

### **2.3.9 Zařízení pro směšování ozonu s vodou**

Při sestavení ozonoizačního dezinfekčního zařízení je důležitý vstříkovací systém, který přivádí ozon do vody, a také systém, co umožňuje dostatečnou dobu zdržení ozonu ve vodě mezi jednotlivými dávkami (Lekang, 2020). Toto je dané hlavně z ekonomického hlediska, protože náklady na výrobu ozonu a kyslíku jsou relativně vysoké (Summerfelt a Hochheimer, 1997).

Rychlost přenosu ozonu do vodní fáze a následná rychlost rozkladu ozonu závisí na účinnosti kontaktního systému a na rychlosti reakce ozonu se vzduchem a složkami ve vodě (Summerfelt, 2003). K dispozici je řada technických řešení reaktorů s různou konstrukcí pro přenos ozonu do vody (Summerfelt a Hochheimer, 1997). Mezi konstrukce patří statický mixér, bublinkový kontaktor, vstříkovací systém, věžový kontaktor a membránový kontaktor. Každá konstrukce má své výhody a nevýhody, ale mezi důležité aspekty při výběru generátoru patří zejména účinnost přenosu ozonu a konstrukce z materiálů odolných vůči ozonu (Stejskal a kol., 2020).

Zařízení pro přenos ozonu, které mají kontinuální plynnou fázi, jako jsou rozprašovací kolony, plněné kolony a vícestupňové nízko-hladinové oxygenátory, poskytují účinný přenos, ale velmi krátké období pro reakci. Technologie přenášející ozon, které mají kontinuální kapalnou fázi, jako jsou směšovací válce/kužely, U-trubice, aspirátory, bublinkové difuzory a statický mixér ozonu, zajišťují přenos ozonu a potřebný reakční čas (Summerfelt a Hochheimer, 1997).

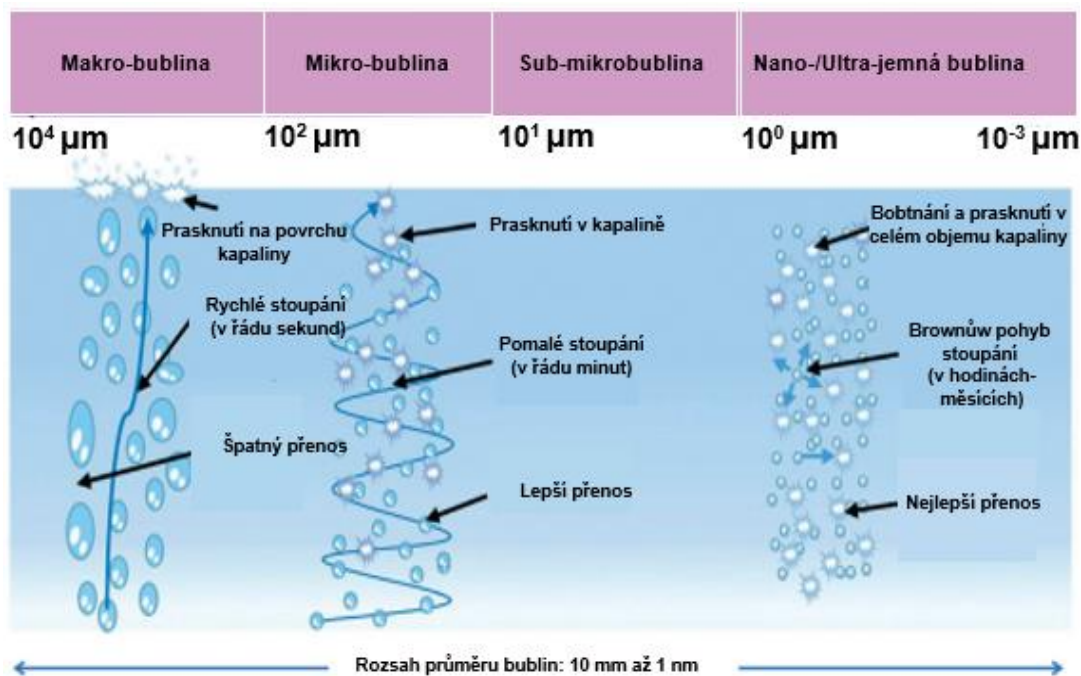
## **2.4 Technologie nanobublin**

### **2.4.1 Definice makro-, mikro- a nanobublin**

Temesgen a kol. (2017) uvádí, že neexistuje jasná definice průměru bublin o různé velikosti, ale Linh a kol. (2021) definují makrobubliny jako bubliny o velikosti od 100  $\mu\text{m}$  do 2 mm. Vlastnost takových bublin ale je, že rychle stoupají k povrchu kapaliny, kde brzy prasknou (Temesgen a kol., 2017). Ačkoliv se autoři zatím neshodli na velikostních hranicích mikrobublin, většina z nich navrhovala minimální velikost kolem 10  $\mu\text{m}$ , zatímco maximální uváděná velikost byla 100  $\mu\text{m}$ . Mikrobubliny stoupají k hladině pomaleji (v řádu minut) než makrobubliny a prasknou ve vodním sloupci (Temesgen a kol., 2017).

Seridou a Kolagerakis (2021) popisují, že v mnoha studiích se nanobubliny (NB) klasifikují jako bubliny menší než 0,2  $\mu\text{m}$ . Na rozdíl od makro- a mikrobublin časem

bobtnají a později praskají po celém objemu kapaliny. Ve vodném roztoku mohou NB zůstat stabilní po dobu několika dnů až měsíců (Temesgen a kol., 2017). Porovnání vlastností NB s makro-, mikro- a submikro-bublinami znázorňuje obrázek č. 3.



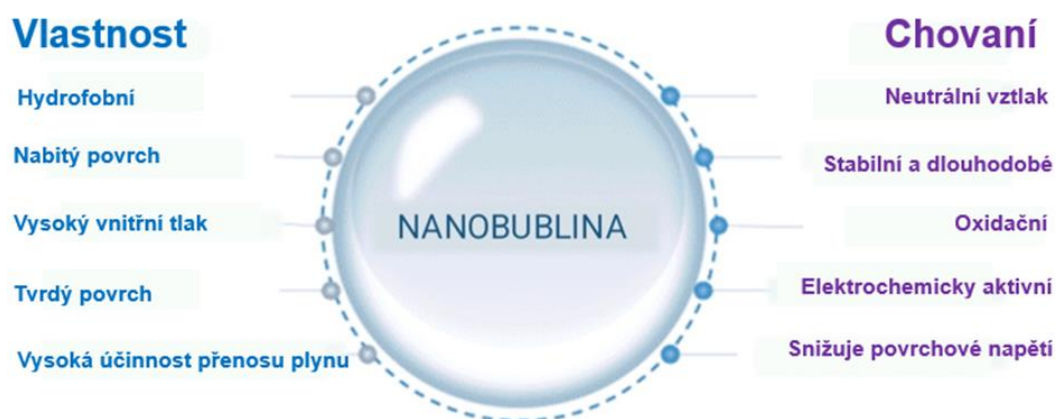
**Obr. č. 3.** Velikostní rozmezí a vlastnosti makro-, mikro-, submikro- a nano- (ultra-jemných) bublin (Seridou a Kolagerakis, 2021).

#### 2.4.2 Vlastnosti nanobublin

Hlavními vlastnostmi NB jsou vysoká stabilita a dlouhá doba perzistence v prostředí po jejich aplikaci (Meegoda a kol., 2018). Další důležitou vlastností NB je vysoký poměr jejich specifického povrchu vůči objemu a vysoký vnitřní tlak. Tyto vlastnosti usnadňují proces přenosu hmoty v mezifázi plyn-kapalina a podporují chemické reakce. Dále NB mají nižší vztlak, a proto nemají tendenci rychle stoupat a brzy prasknout v prostředí (Gurung a kol., 2016).

Zeta potenciál je fyzikální vlastnost, kterou vykazují jakákoliv částice, a používá se k měření velikosti elektrostatického odpuzování nebo přitahování mezi částicemi a bublinami, vzhledem k tomu je důležitým ukazatelem stability NB ve vodním prostředí (Fan a kol., 2010). Bubliny s vysokým zeta potenciálem mají kolem sebe vysoce nabitě částice, které brání agregaci částic v důsledku elektrického odpuzování (Wu a kol., 2015). Pokud mají všechny bublinky nebo částice v suspenzi zeta potenciál na vysoké absolutní

hodnotě, pak se předpokládá, že jsou stabilní (Gurung a kol., 2016). Na hodnoty zeta potenciálu má vliv teplota, neboť při zvýšení teploty zeta potenciál klesá. Meegoda a kol. (2018) ve svém výzkumu přispěli k tomu, že nanobubliny ozonu ( $O_3NB$ ) vykazují nejvyšší velikost záporné hodnoty zeta potenciálu, pak následoval kyslík, vzduch a dusík. Pokud je absolutní hodnota zeta potenciálu NB vyšší než 30 mV, jsou mnohem stabilnější než NB s hodnotou nižší než 30 mV (Ushikubo a kol., 2010). Kyslíkové NB mají při pH 5,7–6,2 hodnotu zeta potenciálu v rozmezí -17 až -20 mV, zatímco při pH 6,2–6,4 měly zeta potenciál mezi -34 až -45 mV (Uchida a kol., 2016). Kromě toho se při vysokých hodnotách pH roztoku vytvářely bubliny menších rozměrů a při kyselých hodnotách pH byly bubliny větší a nestabilní. Přehled fyzikálně-chemických vlastností NB je přehledně znázorněn na obrázku č. 4.



**Obr. č. 4.** Fyzikálně-chemické vlastnosti nanobublin (van Beijnen a Yan, 2021).

Nanobubliny mohou produkovat volné radikály kolapsem bublinek v důsledku akumulace mezifázových iontů na rozhraní plyn-kapalina (Liu a kol., 2014). Bublinky v mikroměřítku mohou mít příznivý vliv na tvorbu hydroxylových ( $OH^-$ ) radikálů během ozonizace (Chu a kol., 2008). Standardní hodnota redoxního potenciálu  $OH^-$  radikálů je kolem 2,80 V, ale u  $O_3$  je přibližně 1,77–2,07 V (Takahashi a kol., 2012). Z tohoto důvodu lze lépe odstraňovat organické polutanty (Thi Phan a kol., 2020). Dalším pozitivem  $OH^-$  jsou mikrobicidní účinky (Seridou a Kolagerakis, 2021).

Rozpuštění ozonu pomocí NB bylo přibližně o 50 % vyšší po 5minutové aplikaci ve srovnání s klasickým míchacím čerpadlem s většími bublinami (He a kol., 2015). Batagoda a kol. (2018) uvádí ve své publikaci, že množství ozonu rozpuštěného za tři

minuty při použití běžného difuzoru bylo 42–28 mg.l<sup>-1</sup> a množství ozonu rozpuštěného ve vodě při použití nanodifuzoru bylo 52–79 mg.l<sup>-1</sup>. Kim a kol. (2021) dále uvádí, že poločas rozpadu NB ozonu byl 23× vyšší než v případě makrobublin ozonu.

### 2.4.3 Produkce nanobublin

Existuje několik způsobů výroby NB, jako je kavitace, elektrolýza, sonochemie s využitím ultrazvuku, membrány s nanopóry (Thi Phan a kol., 2020). Kavitace je jednou z neznámějších technik používaných k vytváření malých bublinek (Wu a kol., 2012). Ke vzniku NB kavitací dochází, když homogenní kapalná fáze projde fázovou změnou v důsledku náhlého snížení tlaku pod určitou kritickou hodnotu (Thi Phan a kol., 2020). Na základě mechanismu lze kavitaci rozdělit do čtyř různých typů – hydrodynamická, akustická, optická a částicová kavitace (Fan a kol., 2010).

Produkce NB je složitý fyzikálně-chemický proces, který závisí na různých faktorech např. koncentraci elektrolytu, typu a koncentraci rozpuštěného plynu v roztoku, jakož i typu a koncentraci povrchově aktivních látek (Thi Phan a kol., 2020). Kim a kol. (2012) uvádí, že tlak má významný vliv na velikost generovaných bublin, protože ovlivňuje velikost bublin a objemovou koncentraci. Řada studií pozorovala, že vyšší tlak vede k nárůstu hustoty plynu, a to má za následek menší velikost bublin (Thi Phan a kol., 2020). Při hodnotách tlaku nad 355 kPa bylo pozorováno, že se velikost bublin nezměnila (Kim a kol., 2012). Navýšení teploty vede ke zvýšení tlaku páry a snížení rozpustnosti plynu, který je hlavním zdrojem nukleace bublin. Čím vyšší teplota, tím nižší rychlost vzniku kavitace (Fan a kol., 2010). Se zvyšující se teplotou roztoku ale nedošlo k žádné významné změně velikosti NB kyslíku o počáteční velikosti  $179 \pm 82$  nm (Meegoda a kol., 2018).

Pro produkce NB je typ plynu také důležitým parametrem. Existuje vztah mezi rychlostí nukleace bublin a množstvím rozpuštěného plynu ve vodě. Zvýšením rozpustnosti plynu se snižuje pevnost, tvarová stabilita a povrchové napětí bublin. Při použití plynu s vyšší rozpustností v kapalině dochází k většímu množství bublin (Rooze a kol., 2013). Typ plynu také ovlivňuje velikost NB. Největší průměrná velikost bublin byla zjištěna u plynu ozonu, pak kyslíku, vzduchu a dusíku (Meegoda a kol., 2018). Větší stabilita nanobublin, lze dosáhnout pomocí povrchově aktivních látek například tenzidů na mezifázi plyn-voda (Wu a kol., 2012). Dalším faktorem ovlivňujícím produkci NB může být velikost a typ hadice přivádějící plyn (Cheng, 2017).

#### **2.4.4 Aplikace nanobublin v průmyslových odvětvích**

Aplikace ozonu ve formě nanobublin je poměrně nová technologie v akvakultuře (Linh a kol., 2021). Proto mikro- a nanobubliny ozonu podnítily široký zájem a rostoucí počet vědeckých prací, které se zabývají zkoumáním účinků mikro- a NB ozonu v mnoha oblastech, jako je inženýrství a čištění odpadních vod atd. (Seridou a Kolagerakis, 2021).

Technologie NB ozonu ( $O_3NB$ ) se zdá být vhodným doplňkem léčby infekčních onemocnění dutiny ústní v humání medicíně. Voda s  $O_3NB$  totiž deaktivuje gram pozitivní i gram negativní bakterie, přitom tento způsob nevykazuje žádnou cytotoxicitu vůči lidským dásňovým fibroblastům na rozdíl od běžných ústních vod (Furuichi a kol., 2013).

Dále Amamcharla a kol. (2017) popisují, že vstříkáváním NB do mléka před ultrafiltračním zpracováním lze snížit viskozitu mléka a zvýšit odstranění nebilkovinových složek z mléčného systému.

Technologii  $O_3NB$  lze použít i pro skladování ozonu. Bylo zjištěno, že  $O_3NB$  skladované při  $4\text{ }^\circ\text{C}$  si zachovaly více než 90 % ozonu po týdnu a více než 65 % po měsíci skladování ozonu. Kromě toho zbytková koncentrace ozonu skladovaného při  $4\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu jednoho roku byla dostatečná k usmrcení bakterie *Mycobacterium smegmatis* během 15 minut, ale *E. coli* nebyla zcela usmrcena ani po 60minutové expozici (Seki a kol., 2017).

#### **2.4.5 Použití nanobublin ozonu při čištění odpadních vod**

Technologie  $O_3NB$  může být účinnější alternativou také pro dezinfekci pitné vody. Díky tomu, že rozpouštění  $O_3NB$  ve vodě je vyšší než u běžného ozonu, dávka potřebná proti kontaminantům nebo patogenům je nižší (Seridou a Kolagerakis, 2021).

Batagoda a kol. (2018) uvádí ve své publikaci, že instalace  $O_3NB$  generátoru může být výhodná pro úpravny vody z ekonomických důvodů, neboť provoz  $O_3NB$  generátoru by mohl snížit celkové náklady (ve své studii uvažovali spotřebu elektrické energie v  $\text{kW}\cdot\text{h}^{-1}$  a ozonu v  $\text{m}^3\cdot\text{min}^{-1}$ ) na provoz ve srovnání s použitím běžného generátoru ozonu, tím by mohlo být ušetřeno až 375 tis. dolarů ročně.

Další studie zkoumala přístup s využitím NB a tradiční metody oxidace ozonem pro čištění odpadních vod s vysokým obsahem amoniaku. Díky vyšší schopnosti rozpouštění a delší době zdržení  $O_3NB$  se při úpravě vody podařilo lépe odstranit



amoniak, a to o 82,5 % ve srovnání s makro-bublinami O<sub>3</sub>, kdy odstranění amoniaku činilo 44,2 % (Wu a kol., 2022).

Organické mikropolutanty, jako jsou pesticidy, farmaceutické výrobky a výrobky osobní péče, ve vodních systémech představují riziko pro životní prostředí a lidské zdraví. Za účelem vyhodnocení integrované ozonizace byla sledována účinnost odstraňování a kinetika rozkladu modelového mikropolutantu 4-chlorfenolu při použití O<sub>3</sub>NB. Odstranění 4-chlorfenolu pomocí O<sub>3</sub>NB bylo 6,9× účinnější ve srovnání s O<sub>3</sub> makro-bublinami (Fan a kol., 2021).

Destrukce bakterií *E. coli* byla nejefektivnější při použití O<sub>3</sub>NB produkovaných hydrodynamickou kavitací, kdy byla se koncentrace *E. coli* (105 CFU/ml) snížila na nulu (0 CFU/mL) během 45 minut, zatímco při běžné O<sub>3</sub> aplikaci koncentrace *E. coli* dosáhla nulové hodnoty (0 CFU/mL) až po 60 minutách (Karamah a kol., 2018).

#### **2.4.6 Aplikace nanobulin v akvakultuře**

V akvakultuře je aplikace O<sub>3</sub>NB a kyslíku (O<sub>2</sub>NB) poměrně novou technologií, která je využívána především pro dezinfekci vody, ale i pro efektivnější využití kyslíku (O<sub>2</sub>) vodními organismy (Linh a kol., 2021).

V minulosti bylo realizováno několik vědeckých studií testujících využití NB při chovu vodních korýšů a ryb. Například Kurita a kol. (2017) uvedli, že při 25minutovém ošetření vody pomocí O<sub>3</sub>NB zaznamenali pokles počtu parazitických planktonních korýšů o 63 % ve srovnání s neošetřenou (kontrolní) skupinou. Výhodou je, že ošetření pomocí O<sub>3</sub>NB bylo bezpečné pro mořské okurky (*Apostichopus japonicas*) a pro mořské ježky (*Strongylocentrotus intermedius*), kteří jsou nejčastěji infikováni těmito patogenními korýši v japonských akvakulturních systémech.

Další případ aplikace O<sub>3</sub>NB za účelem dezinfekce byl testován u krevety bělonohé (*Litopenaeus vannamei*) na přítomnost bakterie *Vibrio parahaemolyticus* způsobující hepatopankreatickou nekrózu. Negativní účinek na krevety vykazovala hodnota O<sub>3</sub>NB ORP 970 mV. V případě, že O<sub>3</sub>NB byly zředěny, toxický účinek se snížil o 50 % a došlo ke zlepšení míry přežití krevet ve srovnání s kontrolní skupinou bez ošetření O<sub>3</sub>NB, kde došlo ke 100% mortalitě (Imaizumi a kol., 2018).

Vysoké koncentrace určitých patogenních bakterií ve vodě obvykle vedou k propuknutí bakteriálních onemocnění u chovaných ryb. Proto byl zkoumán vliv O<sub>3</sub>NB na snížení koncentrací patogenních bakterií ryb ve sladké vodě i vliv na zdraví tilapie

nilské (*Oreochromis niloticus*). Při 10minutovém O<sub>3</sub>NB ošetření snížilo *Streptococcus agalactiae* a *Aeromonas veronii* bakteriální zátěž o 96,1 % a 97,9 % (v uvedeném pořadí). Dvě 10minutová O<sub>3</sub>NB ošetření pak snížila tuto bakteriální zátěž až na 99,9 %, a to v obou případech. Po druhém a třetím O<sub>3</sub>NB ošetření (při koncentraci kolem ORP 860 mV) byly však pozorovány abnormální příznaky na žábrách u všech vyšetřovaných ryb. Dalšími dominantními příznaky bylo zčervenání na bázi ploutví, nepravidelné plavání a přilnutí bublinek k povrchu těla. Tyto bubliny ale zmizely po několika minutách pohybu ryb (Jhunkeaw a kol., 2021).

Dále bylo testováno využití aplikace O<sub>3</sub>NB na bakteriální infekci *Aeromonas* sp., která patří mezi nejčastější patogeny ve sladkovodní akvakultuře (Hayatgheib a kol., 2020). Například Dien a kol. (2021) uvedli, že tilapie nilské vystavené *Aeromonas hydrophila* a následně ošetřené pomocí O<sub>3</sub>NB měly 70 a 75% přežití ve srovnání s 15 a 25% přežitím ryb, které nebyly ošetřeny O<sub>3</sub>NB. Ve skupině s O<sub>3</sub>NB se bakteriální zátěž snížila v prvním pokusu o 35,6, 23,3 a 20,2 % a ve druhém pokusu o 23,9, 21,1 a 15,9 %. Naproti tomu bakteriální zátěž ve skupině bez O<sub>3</sub>NB se v prvním pokusu zvýšila o 13,4, 13,1 a 27,1 % a ve druhém pokusu o 15,6, 19,8 a 27,9 % za stejné časové období.

Aplikace O<sub>3</sub>NB po 5 až 10 minutách účinně likvidovaly fágy ve vodě, přičemž odpovídající hodnoty ORP se pohybovaly v rozmezí 829,9 ± 60,53 až 925,75 ± 18,46 mV a zničeno bylo 99,99 % fágů (Dien a kol., 2022).

Ošetření pomocí O<sub>3</sub>NB bylo testováno i v rybníční vodě. Bylo dosaženo 55–82% snížení CHSK a pozorováno 63–91% snížení BSK, také došlo k snížení celkového množství pevných látek na 83–99 %. Hladina rozpuštěného kyslíku byla zvýšena v rozmezí 42–88 % (Pal a kol., 2022).

Aplikace O<sub>3</sub>NB může zlepšit také míru přežití ryb během bakteriálních infekcí. Linh a kol. (2021) totiž zjistili, že krátkodobé (10minutové) O<sub>3</sub>NB ošetření, vyvolalo významnou přibližně dvou až šesti násobnou regulaci několika genů vrozeného obranného systému tilapie nilské souvisejících s imunitou, včetně genů prozánětlivých cytokinů a genů pro heat-shock proteiny. Tyto geny hrají důležitou roli při aktivaci imunitního systému a usnadňují časné reakce na infekce (Abo-Al-Ela, 2018). K regulaci těchto genů došlo ve všech zkoumaných orgánech za 15 minut po O<sub>3</sub>NB ošetření a trvalo 12–24 hodin v žábrách, ledvinách a slezině. Míra přežití skupiny s O<sub>3</sub>NB ošetřením byla výrazně vyšší než u neošetřených kontrolních skupin.

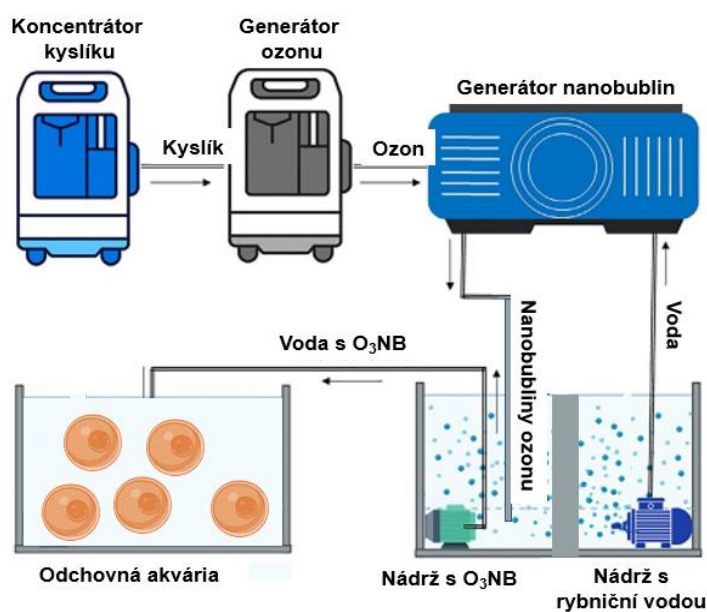
### 3. Materiál a metodika

#### 3.1 Testování zařízení pro produkci nanobublin ozonu

Na začátku bylo nutné otestovat a zajistit nepřetržitý provoz sestavy zařízení potřebných pro produkci nanobublin ozonu ( $O_3NB$ ) ve vodě:

- 1) koncentrátor kyslíku produkující  $2-10 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$  kyslíku při koncentraci  $90 \pm 3 \%$  (OX-10A, Oxytek Medical Technology Co. Ltd., Čína),
- 2) generátor ozonu produkující  $10 \text{ g } O_3 \cdot \text{h}^{-1}$  ze suchého vzduchu (ANNIHILATOR OT10, OZONTECH, s.r.o., Česká republika)
- 3) a generátor nanobublin (NB) produkující  $O_3NB$  o průměru do 200 nm (aQua+ 075, AquaPro Solutions Pte. Ltd., Singapur).

Sestava třech přístrojů byla zkušebně zprovozněna v akvarijní místnosti Ústavu akvakultury a ochrany vod v Českých Budějovicích (ÚAOV v ČB, Česká republika). Přístroje byly propojeny v tomto pořadí – koncentrátor kyslíku, generátor ozonu a NB generátor, kdy první přístroj vyprodukoval kyslík, který byl generátorem ozonu přetvořen na ozon, z něhož NB generátor vytvořil  $O_3NB$  do zásobní nádrže s čistou vodou (viz Obrázek č. 5). Generátor NB byl zapojen do časovací zásuvky tak, aby každodenně spínal funkci po dobu 30 min/h. Po zdárném zprovoznění produkci  $O_3NB$  byla sestava přístrojů včetně experimentálních akvárií a inkubačních pomůcek převezena a instalována v prostorech Rybí líhně Mydlovary (Mydlovary, Česká republika).



**Obr. č. 5.** Schéma zapojení sestavy zařízení pro zkušební produkci  $O_3NB$  (upraveno schéma dle Dien a kol., 2021).

### 3.2 Rybí líheň Mydlovary

Rybí líheň Mydlovary je zásobena dvěma různými zdroji vody. Hlavní zdroj vody je přiveden z Mydlovarského rybníku a záložní zdroj vody z rybníku Bezdrev. Voda je z rybníků čerpána a přiváděná podzemním potrubím. V případě potřeby je ve velmi omezeném rozsahu pouze lokálně používán elektrický ohřev vody.

Odchovná hala je členěna do čtyřech částí s možností přívodu vody aluminiovými otevřenými žlaby umístěnými pod stropem. Z nich jsou pak jednotlivě napájeny všechny instalované nádrže (různých typů a velikostí) včetně zařízení pro inkubaci jiker. V odchovné hale je celkově umístěno zhruba 40 nádrží o objemu od 0,15 do 15 m<sup>3</sup>, poté 50 Zugských inkubačních láhví o objemu 10 l a menší počet dalších inkubačních přístrojů včetně stojanů s inkubačními žlaby, které byly použity pro experimentální účely této bakalářské práce od 23. 2. 2022 do 11. 5. 2022. Součástí objektu jsou i dvě venkovní kruhové smaltované nádrže, každá o objemu 5 m<sup>3</sup> a jedna velká betonová nádrž o objemu přibližně 100 m<sup>3</sup>. Objekt je vybaven rozvodem tlakového vzduchu do všech typů nádrží. Část celého systému vnitřních nádrží a betonové venkovní nádrže (část slouží jako biologický filtr) je propojena do jednoho recirkulačního systému (RAS).

### 3.3 Design experimentálního systému

Pro experimentální účely této bakalářské práce byl použit stojan s šesti plastovými inkubačními žlaby (objem každého žlabu 200 l) umístěnými ve třech patrech po dvou kusech. Dva žlaby horního patra byly použity pro zásobu rybníční a O<sub>3</sub>NB nasycené vody. Rybníční voda byla přiváděna do levé zásobní nádrže (horního žlabu). Odtud ji čerpal generátor O<sub>3</sub>NB a přiváděl do zásobní nádrže s produkcí O<sub>3</sub>NB. Následně z každé zásobní nádrže (tj. s rybníční a O<sub>3</sub>NB nasycenou vodou) byla voda gravitačně vedena plastovým potrubím do inkubačního žlabu umístěného ve druhém patře stojanu, kde byla umístěna odchovná akvária (32 akvárií, objem 2 l). Do každého akvária byla přivedená jak rybníční, tak O<sub>3</sub>NB nasycená voda. Přítok vody (l.min<sup>-1</sup>) do každého akvária byl regulován pomocí plastových kohoutů/uzávěrů pro docílení různých O<sub>3</sub>NB koncentrací.

Po zprovoznění sestavy zařízení pro produkci O<sub>3</sub>NB a napojení systému na zdroj vody v Rybí líhni Mydlovary byly realizovány celkem dva současně probíhající experimenty. První experiment značený N (bez odstraňování neoplozených jiker a uhynulých jedinců po dobu celého experimentu) a druhý experiment značený S (s pravidelným odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců po dobu celého

experimentu). Tyto experimenty testovaly nejen dva různé způsoby ošetření během inkubace a odchovu raných stádií, ale také efekt různých koncentrací O<sub>3</sub>NB ve vodě na ranou ontogenezi pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) od oplození jiker (FE) do úplné resorpce žloutkového vaku (RE), tj. embryonální a larvální perioda života ryb (Kamler, 2002).

Během obou experimentů (N i S) byly testovány celkem čtyři O<sub>3</sub>NB koncentrace (tzn. 4 skupiny):

- kontrolní skupina bez O<sub>3</sub>NB ošetření – značena 1N / 1S (ORP 192 ± 40 mV, této koncentrace bylo dosaženo průtokem O<sub>3</sub>NB vody 0 ml.min<sup>-1</sup> doplněné rybníční vodou na celkový průtok vody 250 ml.min<sup>-1</sup>),
- skupina s nízkou O<sub>3</sub>NB koncentrací – značena 2N / 2S (ORP 277 ± 104 mV, této koncentrace bylo dosaženo průtokem O<sub>3</sub>NB vody 50 ml.min<sup>-1</sup> doplněné rybníční vodou na celkový průtok vody 250 ml.min<sup>-1</sup>),
- skupina se střední O<sub>3</sub>NB koncentrací – 3N / 3S (ORP 392 ± 134 mV, této koncentrace bylo dosaženo průtokem O<sub>3</sub>NB vody 100 ml.min<sup>-1</sup> doplněné rybníční vodou na celkový průtok vody 250 ml.min<sup>-1</sup>)
- a skupina s vysokou O<sub>3</sub>NB koncentrací – 4N / 4S (ORP 610 ± 122 mV, této koncentrace bylo dosaženo průtokem O<sub>3</sub>NB vody 200 ml.min<sup>-1</sup> doplněné rybníční vodou na celkový průtok vody 250 ml.min<sup>-1</sup>).

Na začátku experimentu bylo čerstvě vytřeno mlíčí a jikry pstruha duhového pocházející z jihočeské rybí farmy (Vladimír Šefl, Bušanovice). Jikry dvou generačních ryb byly uměle vytřeny zvlášť do suchých misek a umístěny do polystyrenového boxu pro zajištění bezpečného převozu. Mlíčí dvou samců bylo vytřeno separátně do plastových zkumavek a umístěno do polystyrenového boxu na ledu. Následně byly jikry s mlíčím převezeny během dvou hodin na rybí líheň, kde byly jikry oplozeny suchou metodou. Dále pak byly jikry nasazeny do inkubačních akvárií dvou experimentů.

Všechny výše uvedené skupiny (tzn. 1–4 N / S) každého z experimentů byly testovány ve čtyřech opakováních (akvária A, B, C, D). Do každého z akvárií s písmenem A–C bylo nasazeno pomocí počítačí lopatky 100 oplozených jiker pro hodnocení míry přežití a líhnutí. Zatímco do akvárií D bylo nasazeno pomocí počítačí lopatky vždy 200 oplozených jiker pro odběry vzorků a sledování ontogenetického vývoje ryb, zejména významných ontogenetických bodů – líhnutí (H) a úplná resorpce žloutkového

váčku (RE). Celkově bylo nasazeno 4000 oplozených jiker do 32 akvárií (tj. sečteno dohromady za oba pokusy). Během obou experimentů (N a S) byla pozorována účinnost O<sub>3</sub>NB dezinfekce vody na míru líhnutí larev, délku těla ryb, objem žloutkového váčku, průběh resorbce žloutkového váčku, míru přežití jedinců a kvalitu odchovné vody (tzn. množství mikroorganismů ve vodě).

Podmínky odchovu, jako jsou teplota vody (°C), pH, koncentrace kyslíku (%) a O<sub>3</sub>NB (ORP, mV) byly pravidelně monitorovány a zaznamenávány během obou experimentů, a to 2–3× týdně pro jednotlivá inkubační akvária i zásobní nádrže s rybníční a O<sub>3</sub>NB obohacenou vodou. Měření koncentrací O<sub>3</sub>NB bylo prováděno na základě oxidačně redukčního potenciálu (ORP). Pro měření fyzikálně-chemických parametrů vody (teplota, pH, koncentrace kyslíku a O<sub>3</sub>NB) byl použit manuální multimetr HQ40d (Hach Lange, Německo) s možností pravidelné kalibrace.

Průměrná teplota měřená dataloggerem Minikin (EMS, Brno) ve žlabu s experimentálními akvárii byla  $7,92 \pm 2,63$  °C v průběhu obou experimentů. Nejnižší teplota 4,23 °C byla naměřena začátkem experimentů (4. 3. 2022), naopak nejvyšší teplota 15,53 °C byla naměřena na konci pokusů (11. 5. 2022). Během obou experimentů průměrná hodnota pH byla  $7,50 \pm 2,55$ . Průměrná koncentrace kyslíku byla  $144,47 \pm 45,97$  %. Koncentrace kyslíku byly spojeny s O<sub>3</sub>NB ošetřením (skupina 1 S/N –  $91,93 \pm 3,09$  %; 2S/N –  $145,35 \pm 39,03$  %; 3S/N –  $163,33 \pm 34,89$  % a 4 S/N –  $192,15 \pm 18,42$  %).

Každý týden byly inkubační žlaby a akvária čištěny od sedimentů. Pravidelně byla čištěna také odtoková a inkubační síta experimentálních akvárií a přítokové ventily.

Během obou experimentů (N a S) byla rybám předkládána vnější potrava – startérové krmivo INICIO PLUS G o velikosti pelet 0,6 mm (BioMar SAS, Francie) od 14. dne po vylíhnutí, kdy ryby aktivně vyhledávaly potravu.

### **3.4 Odběry vzorků během experimentů**

#### **3.4.1 Měření jiker**

Před oplozením byly náhodně vytřené jikry zváženy (mg) na kapesních vahách (rozlišení 0,1 g) Korona 79444 Anja (Koronaelectric GmbH, Německo). Celkem bylo váženo 20 neoplozených jiker ve třech opakováních. Následně byla spočítána průměrná hmotnost jedné vytřené jikry.

Dále u zvážených jiker bylo provedeno focení jiker s měřítkem pomocí digitálního USB mikroskopu Flex 66144 (Reflecta GmbH, Německo) a měření delšího a kratšího průměru jiker (mm) pomocí softwaru ImageJ (NIH, USA). Poté byly spočítány průměrné hodnoty a byl stanoven objem jikry ( $\text{mm}^3$ ) pomocí následujícího vzorce (Kamler, 2008):

$$(\pi/6) \times R_{\max} \times R_{\min}^2,$$

kde  $R_{\max}$  je delší průměr jikry (mm) a  $R_{\min}^2$  je kratší průměr jikry ( $\text{mm}^2$ ). Zvážené a změřené jikry nebyly oplozeny, ani nasazeny do experimentálních akvárií z důvodu manipulace, která by mohla zkreslit výsledky studie.

### **3.4.2 Sledování míry líhnutí a přežití jedinců**

Kontrola experimentu probíhala 2–3× týdně. Během kontroly byly zdravé jikry/embrya a jedinci počítáni, následně byly počty zaznamenány do protokolů. V případě prvního experimentu N byly špatné (bílé) jikry a uhynulí jedinci ponecháni v akváriích, zatímco během druhého experimentu S byly uhynulé jikry a embrya odstraňovány pomocí plastové pinzety po celou dobu experimentu.

### **3.4.3 Měření a zpracování vzorků ryb**

Během experimentů bylo jedenkrát týdně prováděno focení (digitální mikroskop) a měření ryb (ImageJ) od vylíhnutí po úplnou resorpci žloutkového váčku. V den focení jedinců bylo vždy z každého vzorkovacího akvária s písmenem D (experimentu N i S) náhodně odebráno 20 jedinců/skupinu (pozn. pokud byly jedinci přítomni/přežili v dané  $\text{O}_3\text{NB}$  koncentraci). Odlov probíhal šetrně pomocí malé sítky. Postupně byly vyloveny a nafoceny ryby ze všech skupin. Pro zajištění šetrné manipulace s rybami byl každý z těchto 20 jedinců/skupinu po vylovení (před focením) umístěn do misky s anestetikem (hřebíčkový olej v koncentraci  $30 \mu\text{l.l}^{-1}$  vody. Následně probíhalo focení každého jedince jednotlivě pomocí digitálního mikroskopu. Po vyfocení byly ryby vráceny zpět do původních akvárií. Každá fotografie byla zpracována v softwaru ImageJ, kdy byly rybám měřeny následující parametry – celková délka těla (TL, mm, tj. vzdálenost mezi špičkou rypce a kolmicí vztyčenou od nejvzdálenějšího okraje narovnané ocasní ploutve), délka těla (SL, mm, tj. vzdálenost mezi špičkou rypce a ocasním násadcem), dále byl měřen delší a na něj kolmý kratší průměr žloutkového váčku ( $Y_{sL}$  a  $Y_{sD}$ ). Následně byl vypočítán objem žloutkového váčku ( $Y_{sV}$ ,  $\text{mm}^3$ ) dle výše uvedeného vzorce použitého pro výpočet objemu jikry.

#### **3.4.4 Mikrobiologické analýzy**

V průběhu experimentu byly odebrány vzorky vody – zásobní rybníční voda, zásobní O<sub>3</sub>NB voda a voda ze skupin 1–4 (tři opakování, objem 50 ml/vzorek) pro mikrobiologické analýzy (Turínská univerzita, Itálie). Před vlastními analýzami byly vzorky zamrazeny při -80 °C. Poté byly vzorky rozmrazeny a následovala extrakce DNA a sekvenování 16S rRNA amplikonu. Získaná data byla zpracována pomocí bioinformatické platformy pro studium mikrobiomu (Qiime 2, USA).

#### **3.4.5 Zpracování a analýza dat**

Data, která byla získána v průběhu experimentů, byla podrobena statistické analýze pomocí softwaru Statistica 12 (StatSoft, Inc.) a prostředí RStudia (RStudio, Inc.). Pokud data splnila podmínku homogenity a normality, byla testována pomocí jednocestné ANOVY s následným post-hoc Tukey testem pro stanovení signifikantních rozdílů ( $P < 0,05$ ). Pokud data nespĺnila jednu z uvedených podmínek, byla testována pomocí neparametrického Kruskal-Wallis testu s následným mnohonásobným porovnáním.

Poté byly z vytvořeny přehledné grafy pomocí tabulkového procesoru Microsoft Excel (Microsoft, USA) shrnující výsledky této bakalářské práce. Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka (SD).



## 4. Výsledky

Během této práce byly realizovány celkem dva experimenty testující efekt různých koncentrací nanobublin ozonu ( $O_3NB$ ) od 192 do 610 mV ORP na ranou ontogenezi pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Jmenovitě se jednalo o tyto skupiny 1–4: 1 –  $192 \pm 40$  mV, 2 –  $277 \pm 104$  mV, 3 –  $392 \pm 134$  mV a 4 –  $610 \pm 122$  mV).

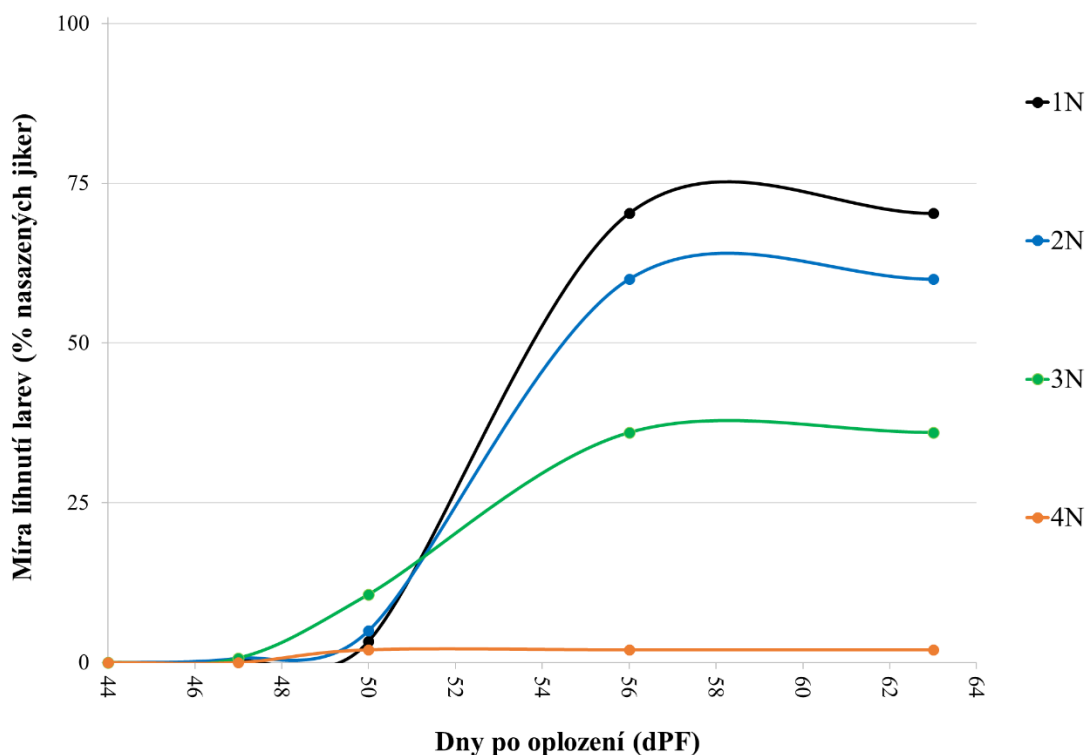
Tyto dva současně probíhající experimenty se lišily ve způsobu ošetření během inkubace a odchovu raných stádií. V prvním experimentu (N, skupiny 1–4 N) nebyly odstraňovány neoplozené jikry a uhynulí jedinci po dobu celého experimentu, na rozdíl od druhého experimentu s pravidelným odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců (S, skupiny 1–4 S). Experimenty trvaly od oplození jiker do úplné resorpce žloutkového vřívku, za stěžejní ontogenetické body byly považovány – oplození jiker (FE), líhnutí larev (H) a úplná resorpce žloutkového vřívku (RE).

### 4.1 Vytřené jikry

Na začátku experimentů byly vytřené neoplozené jikry zváženy (mg) a byl změřen delší a kratší průměr jiker (mm). Průměrná hmotnost jedné jikry byla  $78,33 \pm 7,64$  mg. Průměrná kratší délka jikry ( $R_{min}$ ) byla  $5,42 \pm 0,43$  mm. Průměrná delší délka jikry ( $R_{max}$ ) byla  $5,65 \pm 0,47$  mm. Průměrný objem jikry byl  $88,47 \pm 18,73$  mm<sup>3</sup>.

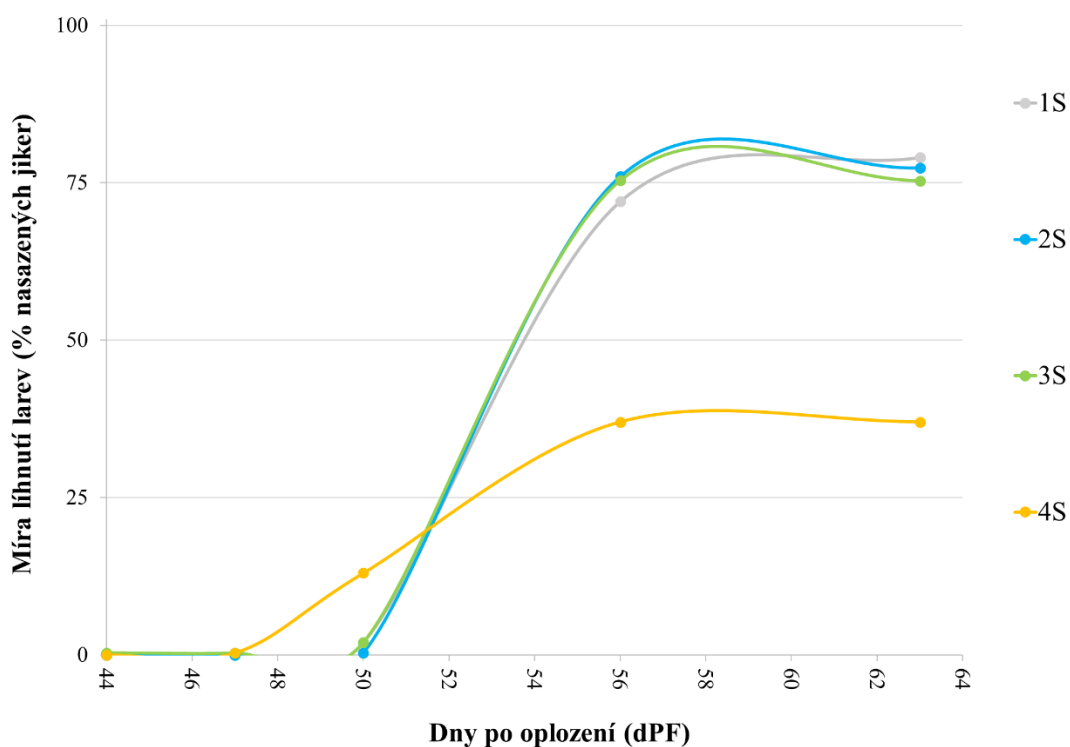
### 4.2 Míra líhnutí

Během prvního experimentu (N) bylo pozorováno nejvíce vylíhnutých jedinců (více než 50 % nasazených jiker) ve skupinách 1N a 2N (tj. ORP  $192 \pm 40$  a  $277 \pm 104$  mV). Nižší míra líhnutí (téměř 40 %) byla zaznamenána ve skupině 3N (tj. ORP  $392 \pm 134$  mV). Zatímco ve skupině 4N s nejvyšší koncentrací  $O_3NB$  (tj. ORP  $610 \pm 122$  mV) byla zjištěna nejnižší míra líhnutí jedinců (do 5 %). Graf č. 1 znázorňuje průběh líhnutí ryb během experimentu N (dPF – dny po oplození jiker).



**Graf. č. 1.** Průběh líhnutí ryb (% nasazených jiker, průměr) v závislosti na koncentraci nanobublin ozonu ve vodě (čtyři skupiny s různými koncentracemi nanobublin ozonu, O<sub>3</sub>NB: ORP 1N – 192 ± 40, 2N – 277 ± 104, 3N – 392 ± 134 a 4N – 610 ± 122 mV) během prvního experimentu (N – bez odstraňování neoplozených jiker a uhynulých jedinců) v čase (44–63 dPF).

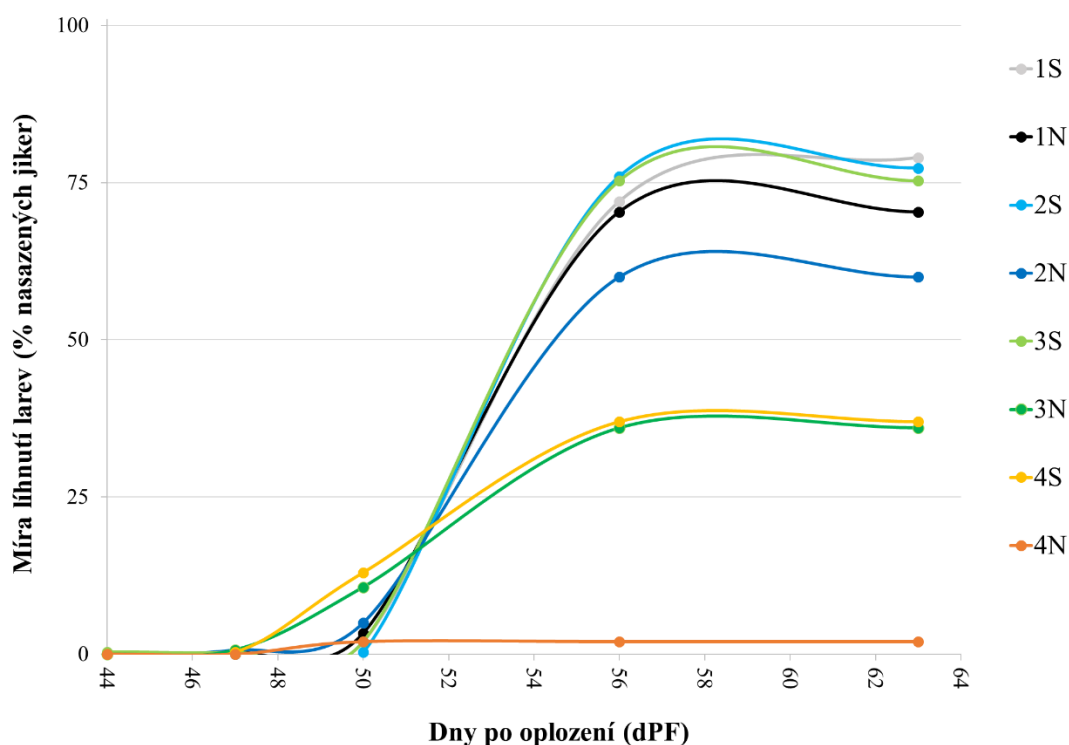
Během druhého experimentu (S), kde byly odstraňovány neoplozené jikry a uhynulí jedinci, bylo pozorováno nejvíce vylíhnutých jedinců (kolem 75 % nasazených jiker) ve skupinách 1S, 2S a 3S (tj. ORP 192 ± 40 až 392 ± 134 mV). Zatímco ve skupině 4S s nejvyšší koncentrací O<sub>3</sub>NB (tj. ORP 610 ± 122 mV) byla zjištěna nejnižší míra líhnutí jedinců (méně než 40 %). Graf č. 2 znázorňuje průběh líhnutí ryb během experimentu S.



**Graf. č. 2.** Průběh líhnutí ryb (% nasazených jiker, průměr) v závislosti na koncentraci  $O_3NB$  (čtyři skupiny s různými koncentracemi nanobublin ozonu,  $O_3NB$ : 1S –  $192 \pm 40$ , 2S –  $277 \pm 104$ , 3S –  $392 \pm 134$  a 4S –  $610 \pm 122$  mV) během druhého experimentu (S – s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců) v čase (44–63 dPF).

Při porovnání obou experimentů (N a S) bylo zjištěno, že míra líhnutí byla vyšší ve všech testovaných skupinách s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců (S, skupiny 1–4 S).

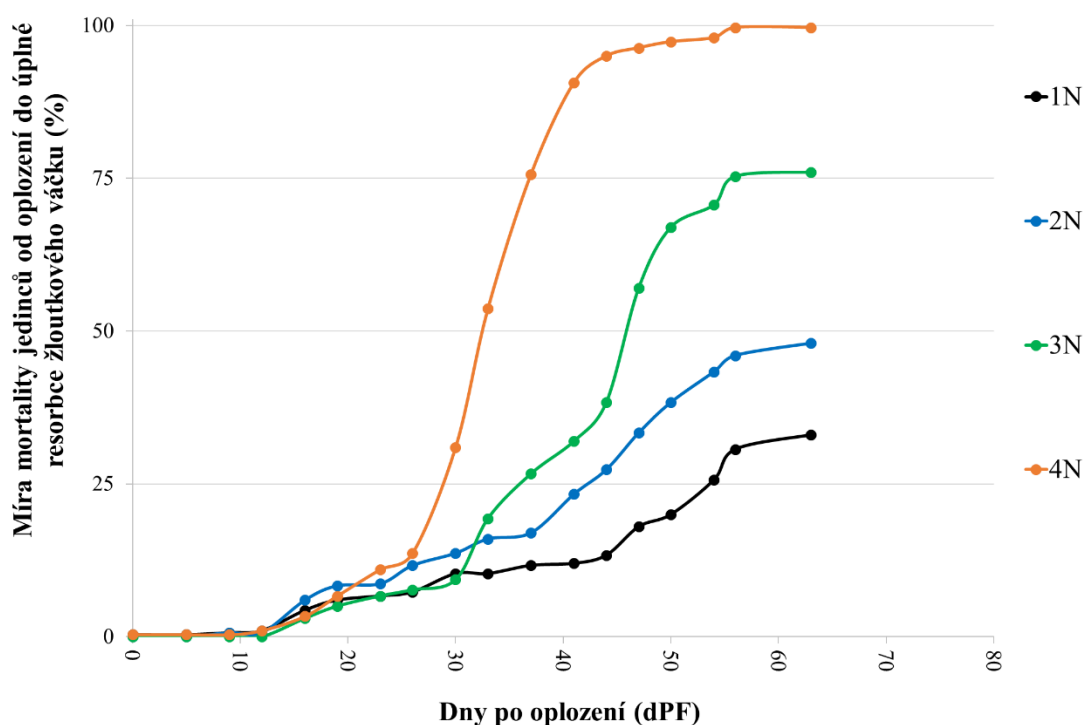
Nejvyšší míra líhnutí (kolem 75 %) byla pozorována ve skupinách 1S, 2S a 3S (ORP  $192 \pm 40$  až  $392 \pm 134$  mV), pak kolem 60–70 % ve skupinách 1N a 2N (ORP  $192 \pm 40$  až  $277 \pm 104$  mV), výrazně nižší míra líhnutí (méně než 30–40 %) byla zaznamenána ve skupinách 4S a 3N (ORP  $392 \pm 134$  až  $610 \pm 122$  mV), zcela nejnižší míra líhnutí (méně než 5 %) byla však pozorována ve skupině 4N (ORP  $610 \pm 122$  mV) (viz Graf. č. 3).



**Graf. č. 3.** Průběh líhnutí ryb (% nasazených jiker, průměr) v závislosti na koncentraci nanobublin ozonu ve vodě (čtyři skupiny s různými koncentracemi nanobublin ozonu,  $O_3NB$ : ORP N/S –  $192 \pm 40$ , 2N/S –  $277 \pm 104$ , 3N/S –  $392 \pm 134$ , 4N/S –  $610 \pm 122$  mV) během dvou experimentů (N – bez vybírání a S – s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců) v čase (44–63 dPF).

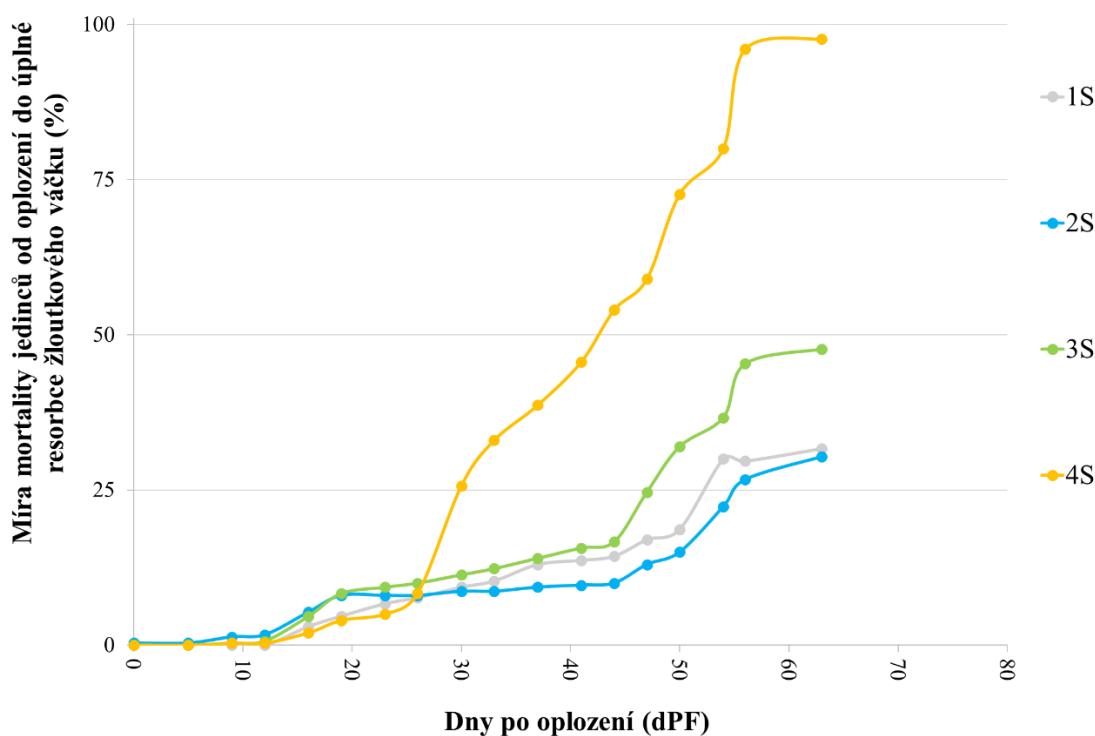
### 4.3 Míra mortality v čase

Během prvního experimentu (N), kde nebyly odstraňovány neoplozené jikry a uhynulí jedinci, byla nejvyšší míra mortality (více než 75 % nasazených jiker) pozorována ve skupinách 4N a 3N (tj. ORP  $610 \pm 122$  mV a  $392 \pm 134$  mV). Nižší míra mortality (kolem 50 %) byla zaznamenána ve skupině 2N (tj. ORP  $277 \pm 104$  mV). Zatímco ve skupině 1N s nejnižší koncentrací  $O_3NB$  (tj. ORP  $192 \pm 40$  mV) byla zjištěna nejnižší míra mortality jedinců (okolo 30 %). Graf č. 4 znázorňuje míru mortality ryb v čase (dPF – dny po oplození jiker) během experimentu N.



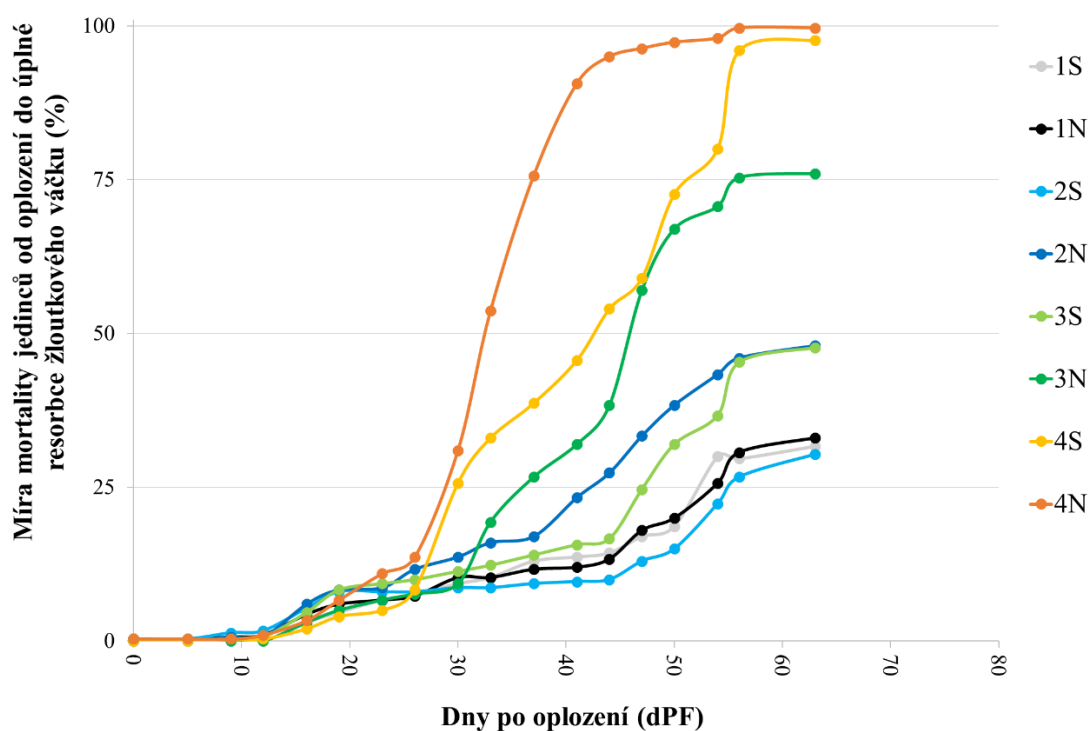
**Graf. č. 4.** Míra mortality ryb (% nasazených jiker, průměr) v závislosti na koncentraci nanobublin ozonu ve vodě (čtyři skupiny s různými koncentracemi nanobublin ozonu,  $O_3NB$ : ORP 1N –  $192 \pm 40$ , 2N –  $277 \pm 104$ , 3N –  $392 \pm 134$  a 4N –  $610 \pm 122$  mV) během prvního experimentu (N – bez vybírání neoplozených jiker a uhynulých jedinců) v čase (0–63 dPF).

Během druhého experimentu (S), kde byly odstraňovány neoplozené jikry a uhynulí jedinci, byla nejvyšší míra mortality jedinců (téměř 100 %) pozorována ve skupině 4S s nejvyšší koncentrací  $O_3NB$ . Zatímco ve skupinách 1S, 2S a 3S byla pozorována výrazně nižší míra mortality (méně než 50 % nasazených jiker) (tj. skupiny s koncentrací  $O_3NB$ : ORP  $192 \pm 40$  až  $392 \pm 134$  mV). Nejnižší míra mortality (kolem 30 %) byla pozorována ve skupině 2S s druhou nejnižší koncentrací  $O_3NB$  ( $277 \pm 104$  mV ORP). Graf č. 5 znázorňuje průběh míry mortality ryb v čase (dPF) během experimentu S.



**Graf. č. 5.** Míra mortality ryb (% nasazených jiker, průměr) v závislosti na koncentraci nanobublin ozonu ve vodě (čtyři skupiny s různými koncentracemi nanobublin ozonu, O<sub>3</sub>NB: ORP 1S – 192 ± 40, 2S – 277 ± 104, 3S – 392 ± 134 a 4S – 610 ± 122 mV) během druhého experimentu (S – s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců) v čase (0–63 dPF).

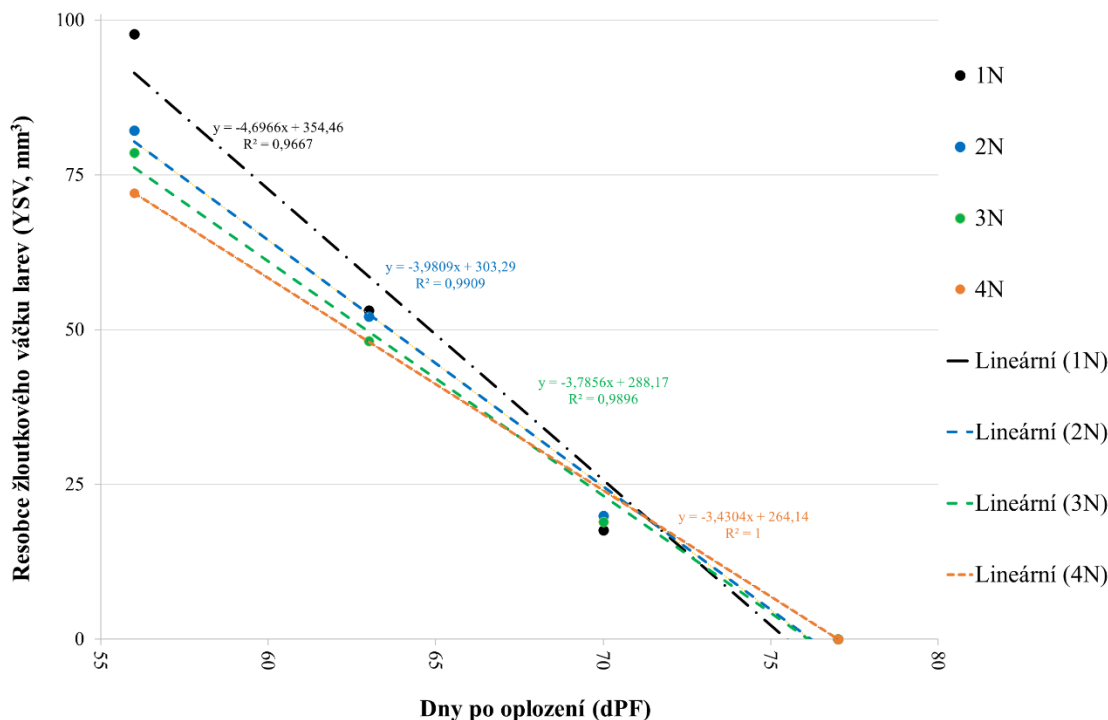
Při porovnání obou experimentů (N a S) bylo zjištěno, že míra mortality ryb byla výrazně vyšší ve všech testovaných skupinách během prvního experimentu (1–4N), tedy bez vybírání neoplozených jiker a uhynulých jedinců. Nejvyšší míra mortality ryb (vyšší než 75 %) byla pozorována ve skupinách 3N a 4N (tj. ORP 392 ± 134 až 610 ± 122 mV), ale také ve skupině 4S druhého experimentu (tzn. ve skupině s nejvyšší koncentrací O<sub>3</sub>NB experimentu S – s vybíráním uhynulých jedinců). Nižší míra mortality (kolem 50 %) pak byla zaznamenána ve skupinách 2N a 3S (tj. ORP 277 ± 104 a 392 ± 134 mV). Výrazně nejnižší míra mortality (srovnatelně okolo 30 %) byla ve skupinách 1S, 1N a 2S (tj. ORP 192 ± 40 až 277 ± 104 mV). Zcela nejnižší míra mortality však byla pozorována ve skupině 2S (tj. ORP 277 ± 104 mV s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců) (viz Graf. č. 6).



**Graf. č. 6.** Míra mortality ryb (% nasazených jiker, průměr) v závislosti na koncentraci nanobublin ozonu ve vodě (čtyři skupiny s různými koncentracemi nanobublin ozonu, O<sub>3</sub>NB: ORP 1N/S – 192 ± 40, 2N/S – 277 ± 104, 3N/S – 392 ± 134, 4N/S – 610 ± 122 mV) během dvou experimentů (N – bez vybírání a S – s vybíráním neoplozených jiker a uhynulých jedinců) v čase (0–63 dPF).

#### 4.4 Resorbce žloutkového vřčku

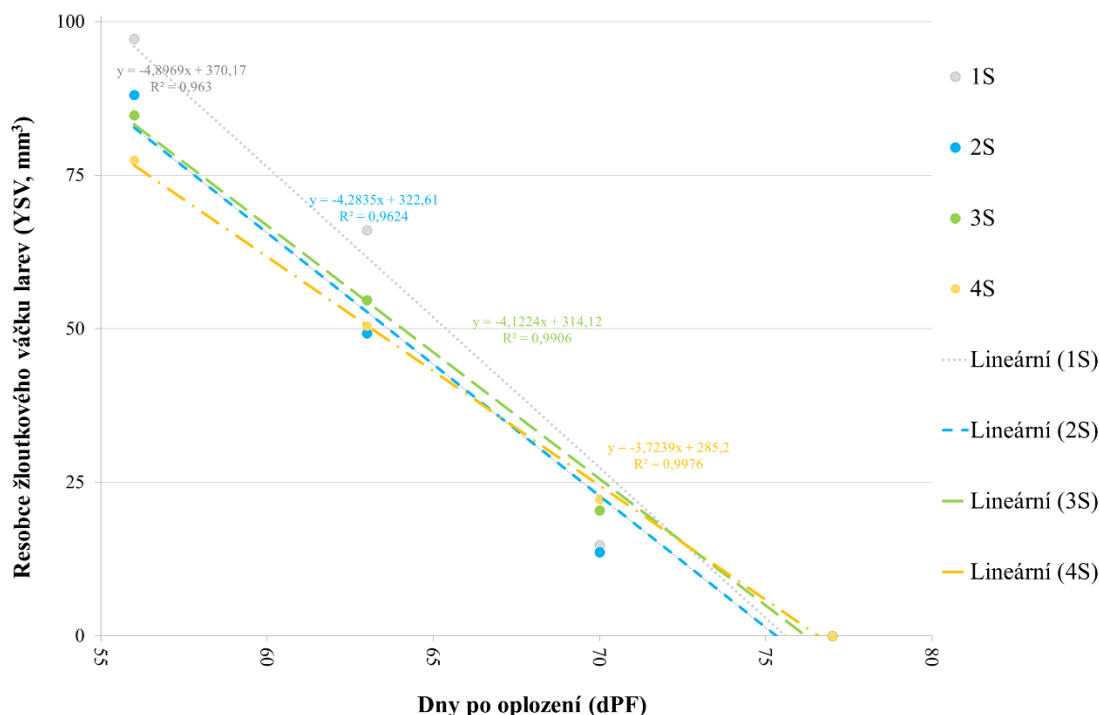
Během prvního experimentu (N), kde nebyly vybírány neoplozené jikry a uhynulí jedinci, byl pozorován průběh resorbce žloutkového vřčku larev. Při líhnutí objem žloutkového vřčku (YSV, mm<sup>3</sup>) ryb negativně koreloval se zvyšující se koncentrací O<sub>3</sub>NB (ORP 192 ± 40 až 610 ± 122 mV). Úplné resorpce žloutkového vřčku bylo dosaženo nejrychleji ve skupině 1N (ORP 192 ± 40 mV), ačkoliv při vylíhnutí měly ryby v této skupině největší YSV (97,8 mm<sup>3</sup>). Pomalejší resorbce žloutkového vřčku pak byla zaznamenána u ryb ve skupinách 2N a 3N (ORP 277 ± 104 až 392 ± 134 mV). Nejpomaleji však ryby resorbovaly žloutkový vřček ve skupině 4N (ORP 610 ± 122 mV). Graf č. 7 znázorňuje průběh resorbce žloutkového vřčku v čase od vylíhnutí ryb do úplné resorbce žloutkového vřčku.



**Graf. č. 7.** Průběh resorbce žloutkového váčku larev (YSV, mm<sup>3</sup>, průměr) v závislosti na koncentraci nanobublin ozonu ve vodě (čtyři skupiny s různými koncentracemi nanobublin ozonu, O<sub>3</sub>NB: ORP 1N – 192 ± 40, 2N – 277 ± 104, 3N – 392 ± 134 a 4N – 610 ± 122 mV) během prvního experimentu (N – bez vybírání neoplozených jiker a uhynulých jedinců) v čase (56–77 dPF).

Během druhého experimentu (S), kde byly vybírány neoplozené jikry a uhynulí jedinci, byl také pozorován průběh resorbce žloutkového váčku larev. Při líhnutí objem žloutkového váčku (YSV, mm<sup>3</sup>) larev také negativně koreloval se zvyšující se koncentrací O<sub>3</sub>NB (ORP 192 ± 40 až 610 ± 122 mV). Úplné resorbce žloutkového váčku bylo dosaženo nejrychleji ve skupině 2S (ORP 277 ± 104 mV). Pomalejší resorbce žloutkového váčku pak byla zaznamenána u ryb ve skupině 1S (ORP 192 ± 40 mV), ačkoliv ryby v této skupině měly při líhnutí největší YSV (97,2 mm<sup>3</sup>). Nejpomaleji však ryby resorbovaly žloutkový váček ve skupinách s nejvyššími O<sub>3</sub>NB koncentracemi (3S a 4S, ORP 392 ± 134 a 610 ± 122 mV). Graf č. 8 znázorňuje průběh resorbce žloutkového váčku v čase (dPF) od vylíhnutí ryb do úplné resorbce žloutkového váčku.

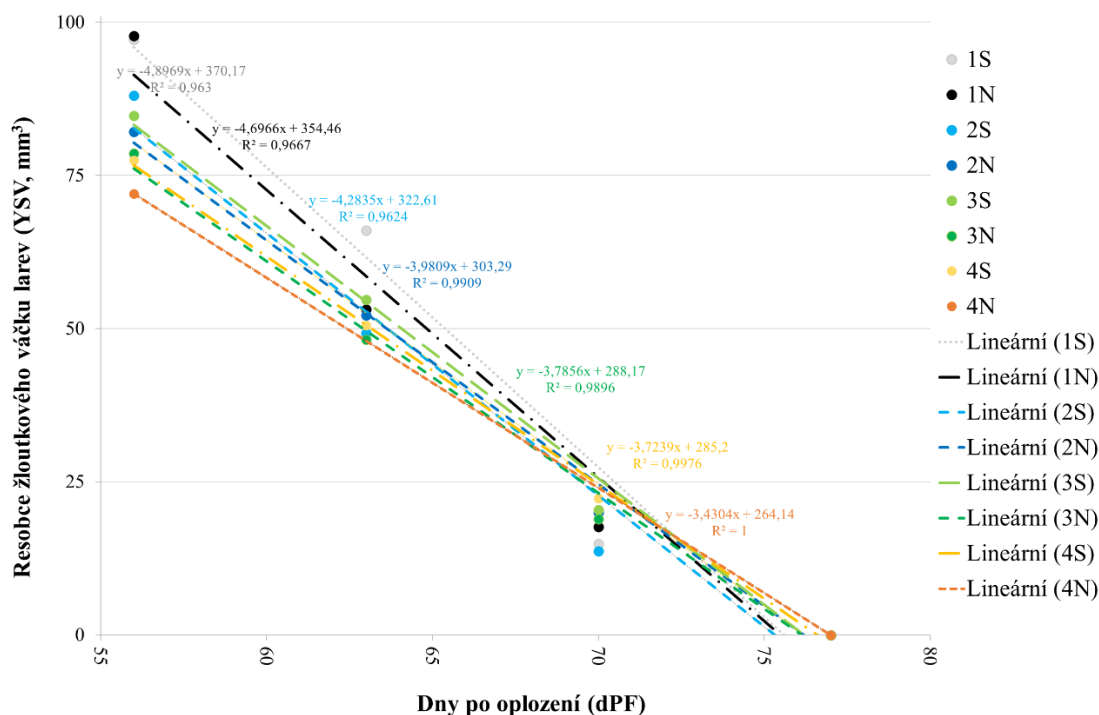




**Graf. č. 8.** Průběh resorbce žloutkového váčku v čase (YSV, mm<sup>3</sup>, průměr) v závislosti na koncentraci nanobublin ozonu ve vodě (čtyři skupiny s různými koncentracemi nanobublin ozonu, O<sub>3</sub>NB: ORP 1S – 192 ± 40, 2S – 277 ± 104, 3S – 392 ± 134 a 4S – 610 ± 122 mV) během druhého experimentu (S – s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců) v čase (56–77 dPF).

Během obou experimentů (N a S) bylo zjištěno, že při líhnutí objem žloutkového váčku ryb negativně koreloval se zvyšujícími se koncentracemi O<sub>3</sub>NB. Při líhnutí byl největší YSV (97,8 a 97,2 mm<sup>3</sup>) zaznamenán v kontrolních skupinách 1N/S (ORP 192 ± 40 mV). Menší YSV (82,2, 88,1 a 84,8 mm<sup>3</sup>) byl pak pozorován ve skupinách 2N/S a 3S (ORP 277 ± 104 a 392 ± 134 mV). Výrazně menší YSV (78,6 a 77,5 mm<sup>3</sup>) byl zaznamenán ve skupinách 3N a 4S (ORP 392 ± 134 mV a 610 ± 122 mV). Zcela nejmenší YSV (72 mm<sup>3</sup>) při líhnutí měla skupina 4N (ORP 610 ± 122 mV).

Nejkratší doba od vylíhnutí do úplné spotřeby žloutkového váčku byla dosažena ve skupinách 1S a 2S (ORP 192 ± 40 mV a 277 ± 104 mV). Poté byla pozorovaná nejkratší délka ve skupinách 1N a 3N (ORP 192 ± 40 mV a 392 ± 134 mV). Delší doba spotřeby žloutkového váčku byla zaznamenána ve skupinách 2N a 3S (277 ± 104 mV a 392 ± 134 mV). Nejdelší doba spotřeby byla dosažena ve skupinách 4N/S (610 ± 122 mV) (viz Graf. č. 9).

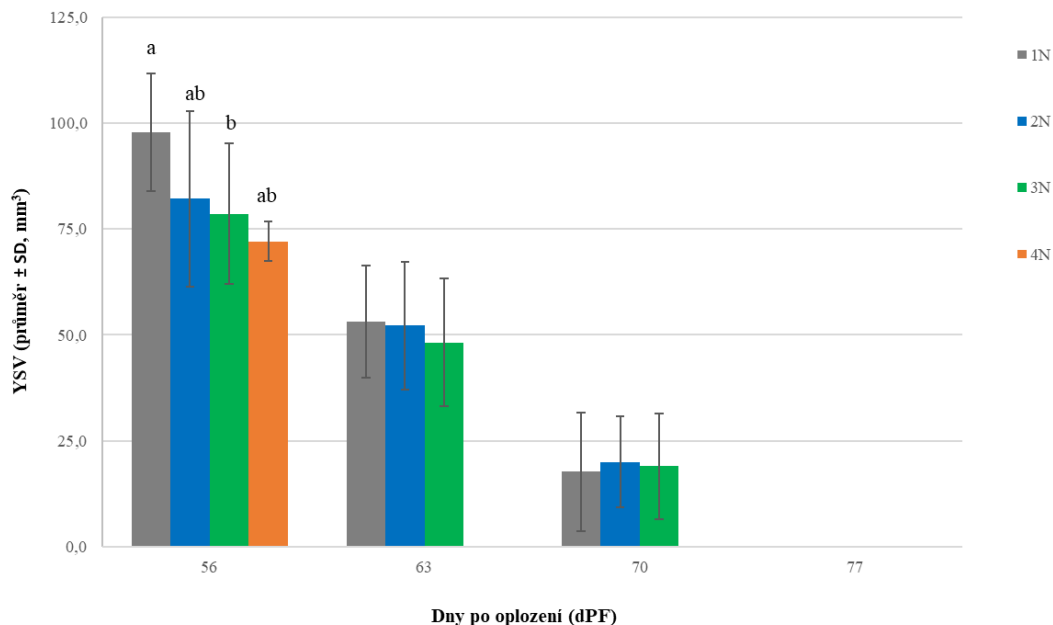


**Graf. č. 9.** Průběh resorbce žloutkového vaku v čase (YSV, mm<sup>3</sup>, průměr) v závislosti na koncentraci nanobublin ozonu ve vodě (čtyři skupiny s různými koncentracemi nanobublin ozonu, O<sub>3</sub>NB: ORP 1N/S – 192 ± 40, 2N/S – 277 ± 104, 3N/S – 392 ± 134, 4N/S – 610 ± 122 mV) během dvou experimentů (N – bez vybírání a S – s vybíráním neoplozených jiker a uhynulých jedinců) v čase (56–77 dPF).

#### 4.5 Objem žloutkového vaku

Během prvního experimentu (N), kde nebyly vybírány neoplozené jikry a uhynulí jedinci, byl pozorován objem žloutkového vaku (YSV, mm<sup>3</sup>) ryb při 56, 63, 70 a 77 dPF.

Při líhnutí (kolem 56. dPF) se YSV signifikantně lišil ( $P < 0,05$ ) mezi testovanými skupinami. YSV negativně koreloval se zvyšující se koncentrací O<sub>3</sub>NB ve vodě. Signifikantně největší YSV byl pozorován ve skupině 1N (ORP 192 ± 40 mV). Menší srovnatelný YSV byl zaznamenán ve skupinách 2N a 4N, zatímco signifikantně nejmenší YSV byl ve skupině 3N. V 63. a 70. dPF se YSV ryb signifikantně nelišil ( $P > 0,05$ ) mezi testovanými skupinami 1–3N. YSV byl kolem 50 mm<sup>3</sup> při 63 dPF a kolem 20 mm<sup>3</sup> při 70 dPF (viz Graf č. 13). Do 63. dPF uhynuly ryby ve skupině 4N, stejně tak do 77. dPF uhynuli všichni jedinci ve skupině 3N, proto nejsou tyto skupiny v dané dny znázorněny na grafu níže.

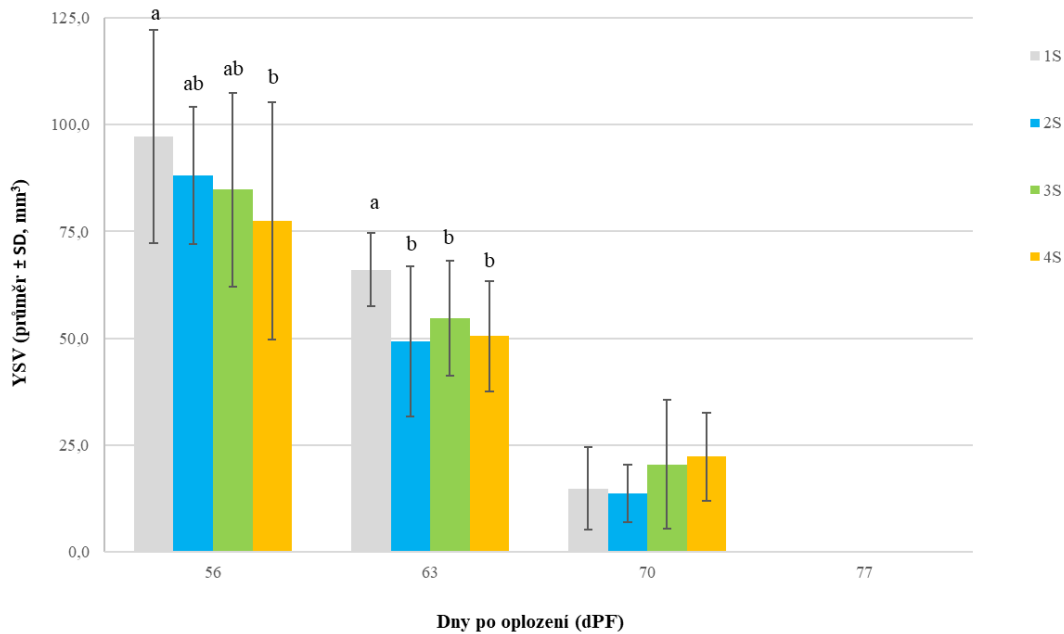


**Graf. č. 13.** Objem žloutkového vřetku (YsV, mm<sup>3</sup>, průměr ± SD) v závislosti na koncentraci nanobublin ozonu ve vodě (čtyři skupiny s různými koncentracemi nanobublin ozonu, O<sub>3</sub>NB: ORP 1N – 192 ± 40, 2N – 277 ± 104, 3N – 392 ± 134 a 4N – 610 ± 122 mV) během prvního experimentu (N – bez vybírání neoplozených jiker a uhynulých jedinců) v čase (56–77 dPF).

Pozn. rozdílné indexy a–d nad sloupci grafu značí, že v daný experimentální den byl pozorován signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) mezi testovanými skupinami.

Během druhého experimentu (S), kde byly vybírány neoplozené jikry a uhynulí jedinci, byl pozorován objem YSV ryb při 56, 63, 70 a 77 dPF.

V 56. dPF se YSV signifikantně lišil ( $P < 0,05$ ) mezi testovanými skupinami. Signifikantně největší YSV vykazovala skupina 1S (ORP 192 ± 40 mV), poté skupiny 2S (277 ± 104 mV) a 3S (392 ± 134 mV ORP), ty se však vzájemně nelišily od ostatních skupin. Signifikantně nejmenší YSV byl pozorován ve skupině 4S. V 63. dPF se YSV signifikantně lišil ( $P < 0,05$ ) mezi testovanými skupinami. Signifikantně největší YSV byl ve skupině 1S (ORP 192 ± 40 mV). Ostatní skupiny 2S až 4S (ORP 277 ± 104 až 610 ± 122 mV) se mezi sebou vzájemně nelišily. V 70. dPF se YSV signifikantně nelišil ( $P > 0,05$ ) mezi testovanými skupinami (viz Graf č. 14).



**Graf. č. 14.** Objem žloutkového váčku (YsV, mm<sup>3</sup>, průměr ± SD) v závislosti na koncentraci nanobublin ozonu ve vodě (čtyři skupiny s různými koncentracemi nanobublin ozonu, O<sub>3</sub>NB: ORP 1S – 192 ± 40, 2S – 277 ± 104, 3S – 392 ± 134 a 4S – 610 ± 122 mV) během druhého experimentu (S – s vybíráním neoplozených jiker a uhynulých jedinců) v čase (56–77 dPF).

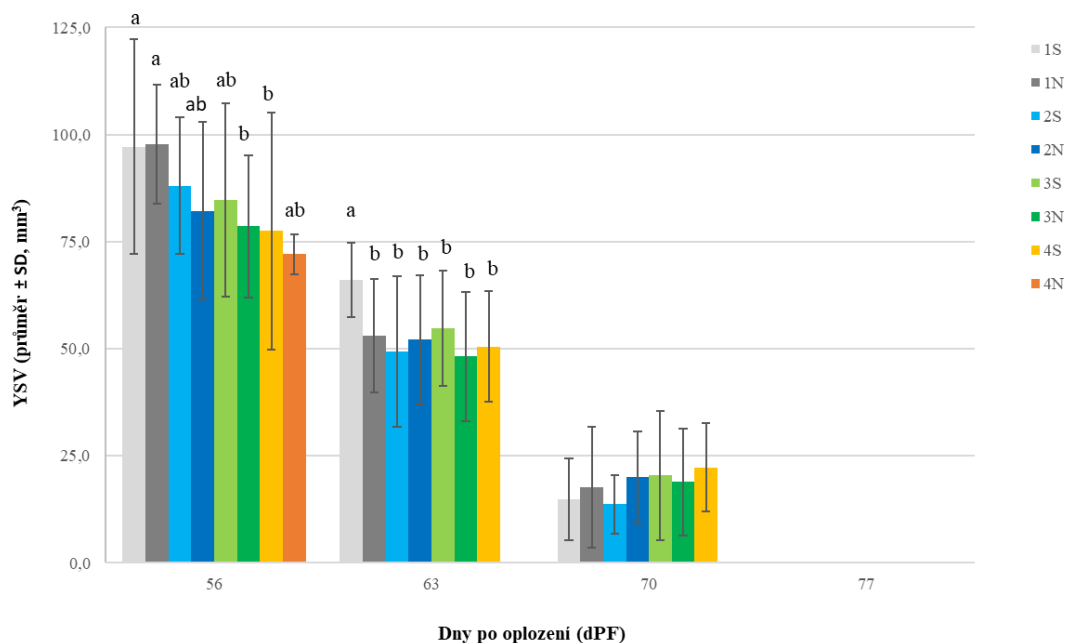
Pozn. rozdílné indexy a–d nad sloupci grafu značí, že v daný experimentální den byl pozorován signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) mezi testovanými skupinami.

Při porovnání obou experimentů (N a S) bylo zjištěno, že objem žloutkového váčku (YSV, mm<sup>3</sup>) ryb se signifikantně lišil mezi testovanými skupinami ( $P < 0,05$ ) od 56. do 63. dPF. Bylo pozorováno, že YSV negativně koreloval nejen se způsobem ošetření (N a S), ale také se zvyšující se koncentrací O<sub>3</sub>NB ve vodě.

Při líhnutí (v 56. dPF) signifikantně největší YSV byl pozorován ve skupinách 1S/N (192 ± 40 mV). Menší YSV byl naměřen pak ve skupinách 2S/N, 3S a 4N (277 ± 104 až 610 ± 122 mV). Výrazně menší YSV vykazovaly skupiny 3N a 4S (392 ± 134 a 610 ± 122 mV).

V 63. dPF signifikantně největší YSV byl ve skupině 1S (192 ± 40 mV). Nižší YSV bylo zaznamenáno ve všech ostatních skupinách 1N, 2N/S až 4S (192 ± 40 až 610 ± 122 mV), které se mezi sebou signifikantně nelišily. Do 63. dPF uhynuly ryby ve skupině 4N, proto není tato skupina v daný den znázorněna na grafu níže.

Při 70. dPF se YSV signifikantně nelišil ( $P > 0,05$ ) mezi testovanými skupinami, kdy YSV byl kolem  $20 \text{ mm}^3$ . V 77. dPF měly ryby ve všech skupinách resorbovaný žloutkový váček (viz Graf. č. 15).



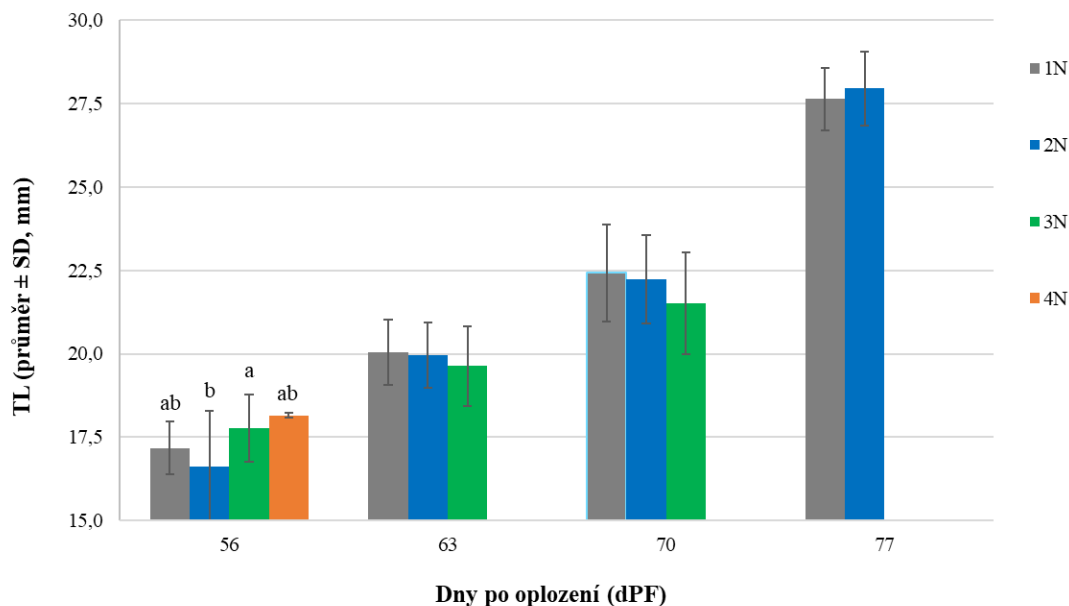
**Graf. č. 15.** Objem žloutkového váčku (YsV,  $\text{mm}^3$ , průměr  $\pm$  SD) v závislosti na koncentraci nanobublín ozonu ve vodě (čtyři skupiny s různými koncentracemi nanobublín ozonu,  $\text{O}_3\text{NB}$ : ORP 1N/S –  $192 \pm 40$ , 2N/S –  $277 \pm 104$ , 3N/S –  $392 \pm 134$ , 4N/S –  $610 \pm 122$  mV) během dvou experimentů (N – bez vybírání a S – s vybíráním neoplozených jiker a uhynulých jedinců) v čase (56–77 dPF).

Pozn. rozdílné indexy a–d nad sloupci grafu značí, že v daný experimentální den byl pozorován signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) mezi testovanými skupinami.

#### 4.6 Celková délka těla

Během prvního experimentu (N), kde nebyly vybírány neoplozené jikry a uhynulí jedinci, byla pozorována celková délka těla (TL, mm) ryb od vylíhnutí do úplné resorbce žloutkového váčku v týdenních intervalech (při 56, 63, 70 a 77 dPF). Při líhnutí (kolem 56. dPF) se TL larev signifikantně lišila ( $P < 0,05$ ) mezi testovanými skupinami. V 56. dPF byla nejdelší TL vylíhnutých larev zaznamenána ve skupině 3N ( $392 \pm 134$  mV), kratší pak ve skupině 1N ( $192 \pm 40$  mV) a 4N ( $610 \pm 122$  mV), zatímco nejkratší TL byla pozorována ve skupině 2N (ORP  $277 \pm 104$  mV). V 63., 70. a 77. dPF se TL larev signifikantně nelišila ( $P > 0,05$ ) mezi testovanými skupinami 1–4N (viz Graf. č. 10). Do 63. dPF uhynuly ryby ve skupině 4N ( $610 \pm 122$  mV ORP), stejně

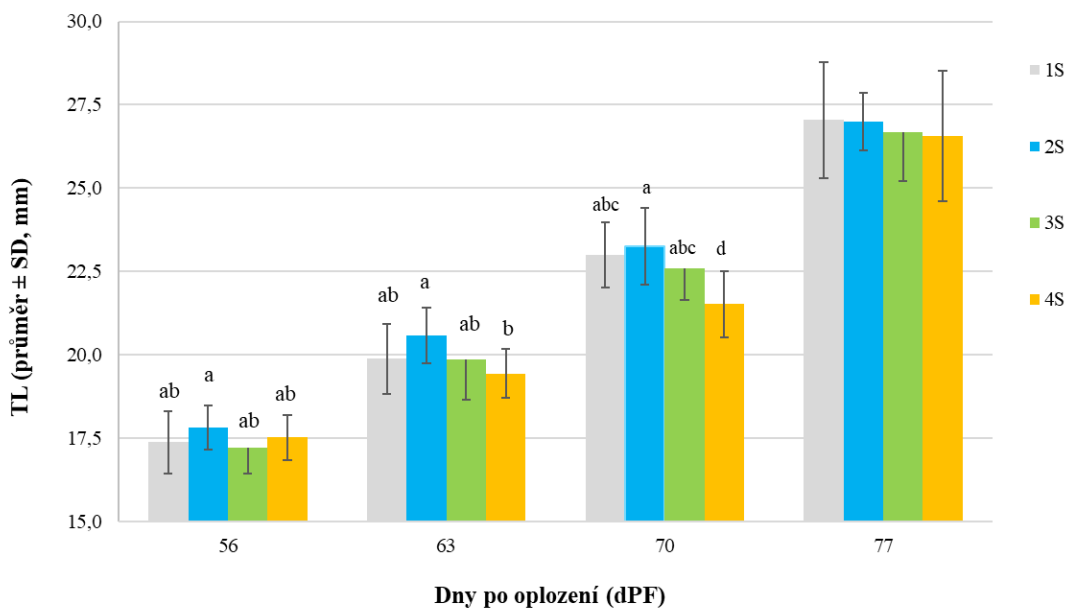
tak do 77. dPF uhynuli všichni jedinci ve skupině 3N ( $392 \pm 134$  mV ORP), proto v dané dny nejsou skupiny znázorněny na grafu níže.



**Graf. č. 10.** Celková délka těla ryb (TL, mm, průměr  $\pm$  SD) v závislosti na koncentraci nanobublin ozonu ve vodě (čtyři skupiny s různými koncentracemi nanobublin ozonu, O<sub>3</sub>NB: ORP 1N –  $192 \pm 40$ , 2N –  $277 \pm 104$ , 3N –  $392 \pm 134$  a 4N –  $610 \pm 122$  mV) během prvního experimentu (N – bez vybírání neoplozených jiker a uhynulých jedinců) v čase (56–77 dPF).

Pozn. rozdílné indexy a–d nad sloupci grafu značí, že v daný experimentální den byl pozorován signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) mezi testovanými skupinami.

Během druhého experimentu (S), kde byly vybírány neoplozené jikry a uhynulí jedinci, byla pozorována celková délka těla (TL, mm) ryb při 56, 63, 70 a 77 dPF. V čase 56., 63. a 70. dPF se TL ryb signifikantně lišila ( $P < 0,05$ ) mezi testovanými skupinami. Při líhnutí (kolem 56. dPF) byla signifikantně nejdelší TL larev zaznamenána ve skupině 2S (ORP  $277 \pm 104$  mV). Kratší TL byla pozorována ve skupinách 1, 3 a 4S (ORP  $192 \pm 40$ ,  $392 \pm 134$  a  $610 \pm 122$  mV), které se od sebe vzájemně signifikantně nelišily ( $P > 0,05$ ). Při 63 a 70 dPF byla nejdelší TL ryb naměřena ve skupině 2S, poté 1S a 3S, které se od sebe vzájemně signifikantně nelišily ( $P > 0,05$ ), zatímco zcela nejkratší TL byla vždy ve skupině 4S s nejvyšší O<sub>3</sub>NB koncentrací. Při 70 dPF se TL ryb nelišila ( $P > 0,05$ ) mezi testovanými skupinami (viz Graf č. 11).



**Graf. č. 11.** Celková délka ryb (TL, mm, průměr ± SD) v závislosti na koncentraci nanobublin ozonu ve vodě (čtyři skupiny s různými koncentracemi nanobublin ozonu, O<sub>3</sub>NB: ORP 1S – 192 ± 40, 2S – 277 ± 104, 3S – 392 ± 134 a 4S – 610 ± 122 mV) během druhého experimentu (S – s vybíráním neoplozených jiker a uhynulých jedinců) v čase (56–77 dPF).

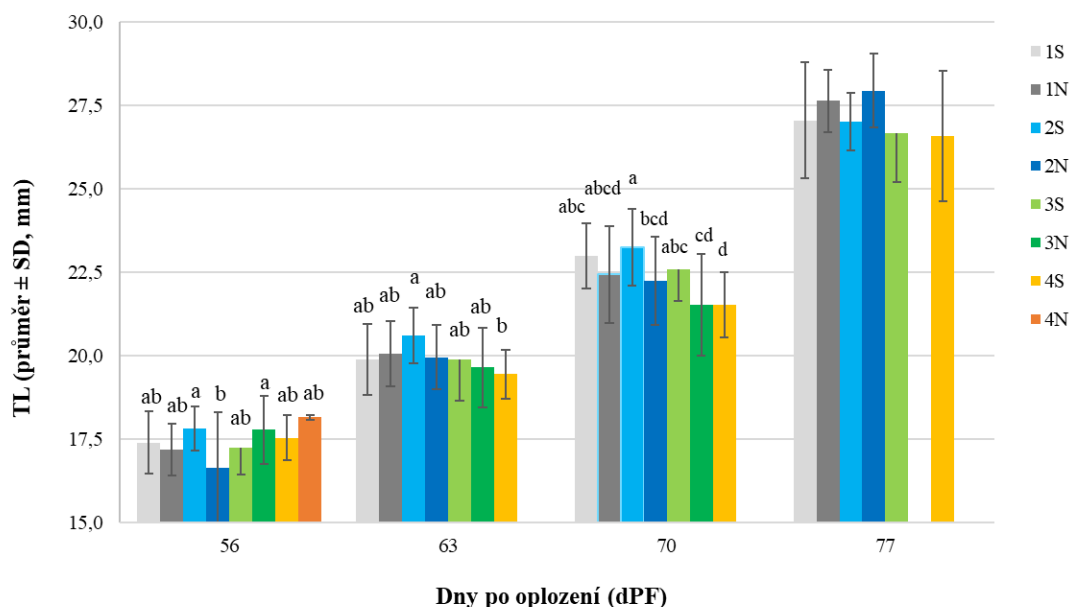
Pozn. rozdílné indexy a–d nad sloupci grafu značí, že v daný experimentální den byl pozorován signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) mezi testovanými skupinami.

Při porovnání obou experimentů (N a S) bylo zjištěno, že celková délka těla ryb (TL, mm) ryb se signifikantně lišila mezi testovanými skupinami ( $P < 0,05$ ) od 56 do 70 dPF. Při líhnutí (kolem 56. dPF) byla signifikantně nejdelší TL naměřena ve skupinách 2S a 3N (ORP 277 ± 104 a 392 ± 134 mV). Kratší TL byla pak ve skupinách 1N a 1S (192 ± 40 mV), 3S (392 ± 134 mV) a 4N/S (610 ± 122 mV). Signifikantně nejkratší TL byla ve skupině 2N (277 ± 104 mV).

Při 63 dPF byla signifikantně nejdelší TL ryb naměřena ve skupině 2S (277 ± 104 mV). Kratší TL byla zaznamenána u skupin 1N/S, 2N a 3N/S, ale nelišila se mezi testovanými skupinami. Signifikantně nejkratší TL ryb byla naměřena u skupiny 4S (610 ± 122 mV ORP), zatímco žádné ryby nepřežily ve skupině 4N do 63. dPF.

V 70. dPF signifikantně nejdelší TL ryb byla ve skupině 2S (277 ± 104 mV). Kratší TL byla pak ve skupinách 1S/N (192 ± 40 mV), 2N (277 ± 104 mV) a 3N/S (392 ± 134 mV), ale nelišila se mezi testovanými skupinami. Zatímco signifikantně nejkratší TL byla zaznamenána ve skupině 4S (ORP 610 ± 122 mV).

Při 77 dPF se TL ryb signifikantně nelišila mezi testovanými skupinami ( $P > 0,05$ ). Do 77. dPF však uhynuli všichni jedinci ve skupině 3N a 4N, proto nejsou tyto skupiny v dané dny znázorněny na Grafu. č. 12.



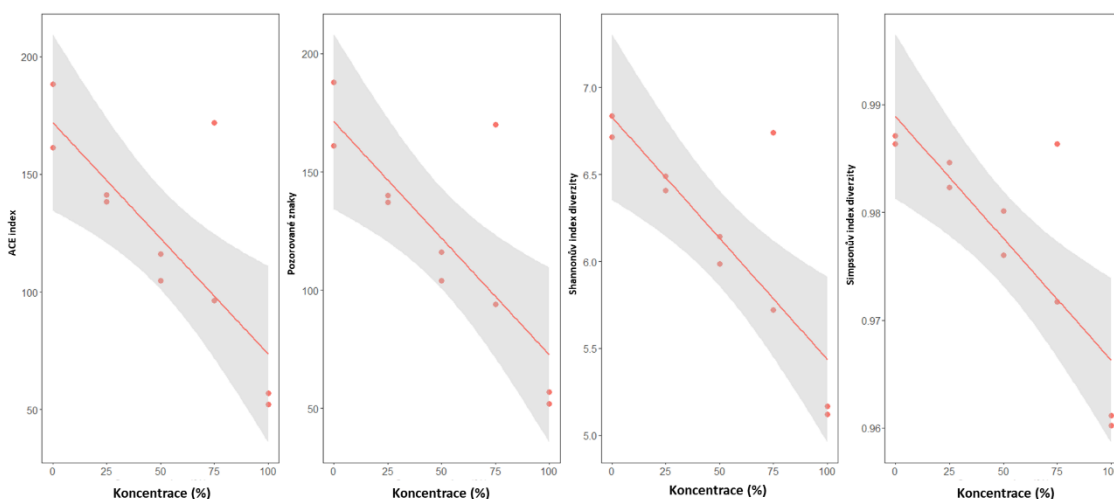
**Graf. č. 12.** Celková délka ryb (TL, mm, průměr ± SD) v závislosti na koncentraci nanobublin ozonu ve vodě (čtyři skupiny s různými koncentracemi nanobublin ozonu,  $O_3NB$ : ORP 1N/S –  $192 \pm 40$ , 2N/S –  $277 \pm 104$ , 3N/S –  $392 \pm 134$ , 4N/S –  $610 \pm 122$  mV) během prvního a druhého experimentu (N – bez vybírání a S – s vybíráním neoplozených jiker a uhynulých jedinců) v čase (56–77 dPF).

Pozn. rozdílné indexy a–d nad sloupci grafu značí, že v daný experimentální den byl pozorován signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) mezi testovanými skupinami.



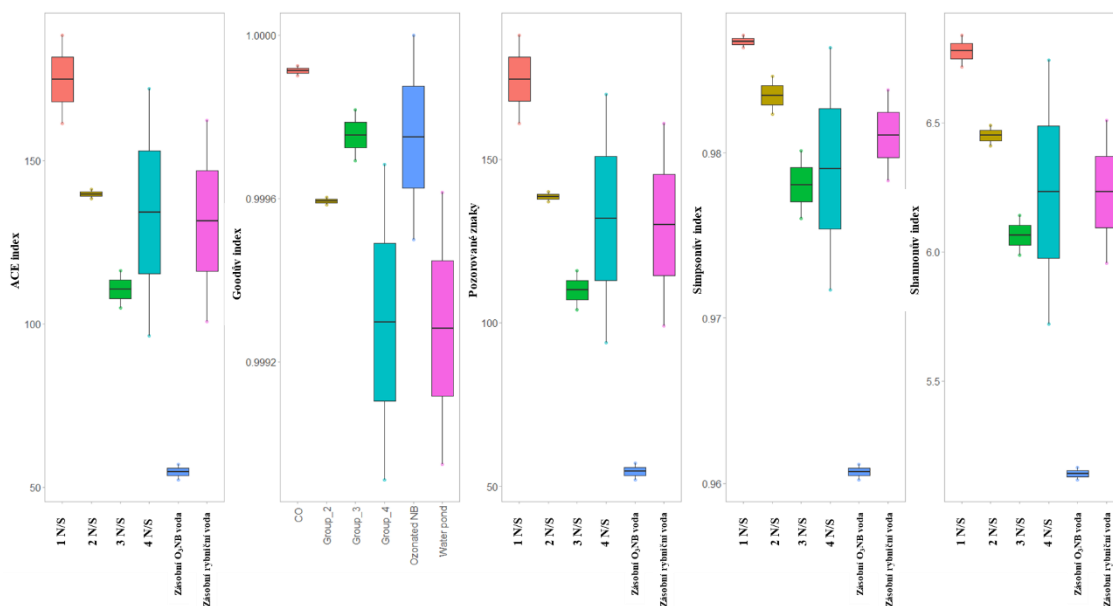
## 4.7 Mikrobiologické analýzy

Během experimentů (N a S) bylo zjištěno, že množství mikroorganismů ve vodě závisí (negativně koreluje) na koncentraci nanobublin ozonu ve vodě. Se zvyšující se koncentrací bylo zaznamenáno snižující se množství mikroorganismů ve vodě (viz Graf č. 16).



**Graf. č. 16.** Korelační graf znázorňuje množství pozorovaných mikroorganismů v závislosti na testované koncentraci nanobublin ozonu ve vodě (pět skupin s různými koncentracemi nanobublin ozonu, O<sub>3</sub>NB (%): rybníční voda a kontrola s 0 % = 192 ± 40 mV, 25 % = 277 ± 104 mV, 50 % = 392 ± 134 mV, 75 % = 610 ± 122 mV a zásobní O<sub>3</sub>NB voda se 100 % = 192 ± 40 mV ORP).

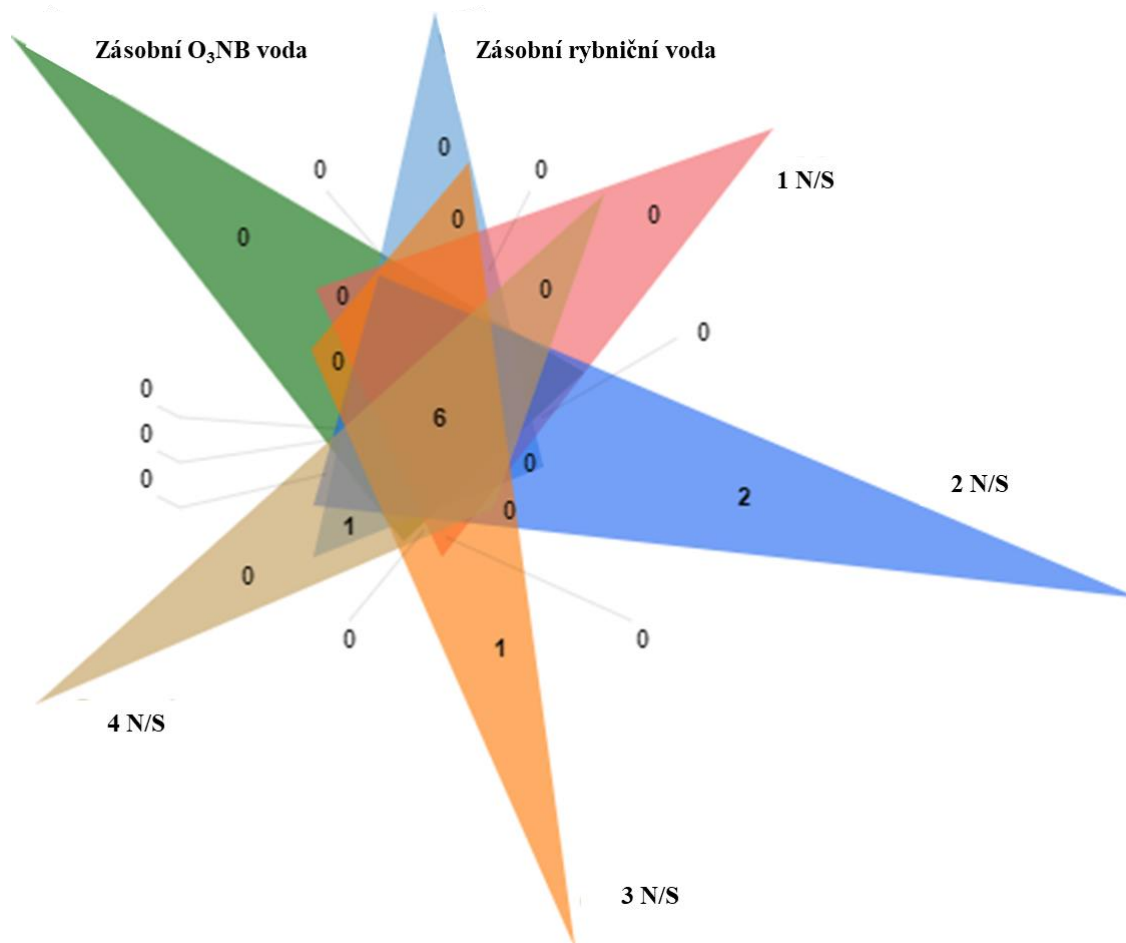
Alfa-diverzita mikroorganismů a mikrobiologické indexy vody ošetřené různou koncentrací O<sub>3</sub>NB se statisticky nelišily ( $P > 0,05$ ) mezi testovanými skupinami (viz Graf č. 17). Ačkoliv nejvyšší hodnoty byly pozorovány ve skupině s rybníční vodou (tj. kontrolní skupině s 0 % O<sub>3</sub>NB), zatímco nejnižší hodnoty byly spíše ve skupině s nejvyšší koncentrací O<sub>3</sub>NB (tj. zásobní voda s maximálním množstvím nanobublin ozonu, toto maximální nasycení bylo uvažováno jako 100 %).



**Graf. č. 17.** Grafy znázorňují alfa-diverzitu mikroorganismů a mikrobiologické indexy v závislosti na testované koncentraci nanobublin ozonu ve vodě (pět skupin s různými koncentracemi nanobublin ozonu,  $O_3NB$  (%): rybníční voda a kontrola s 0 % =  $192 \pm 40$  mV, 25 % =  $277 \pm 104$  mV, 50 % =  $392 \pm 134$  mV, 75 % =  $610 \pm 122$  mV a zásobní  $O_3NB$  voda se 100 % =  $192 \pm 40$  mV ORP).

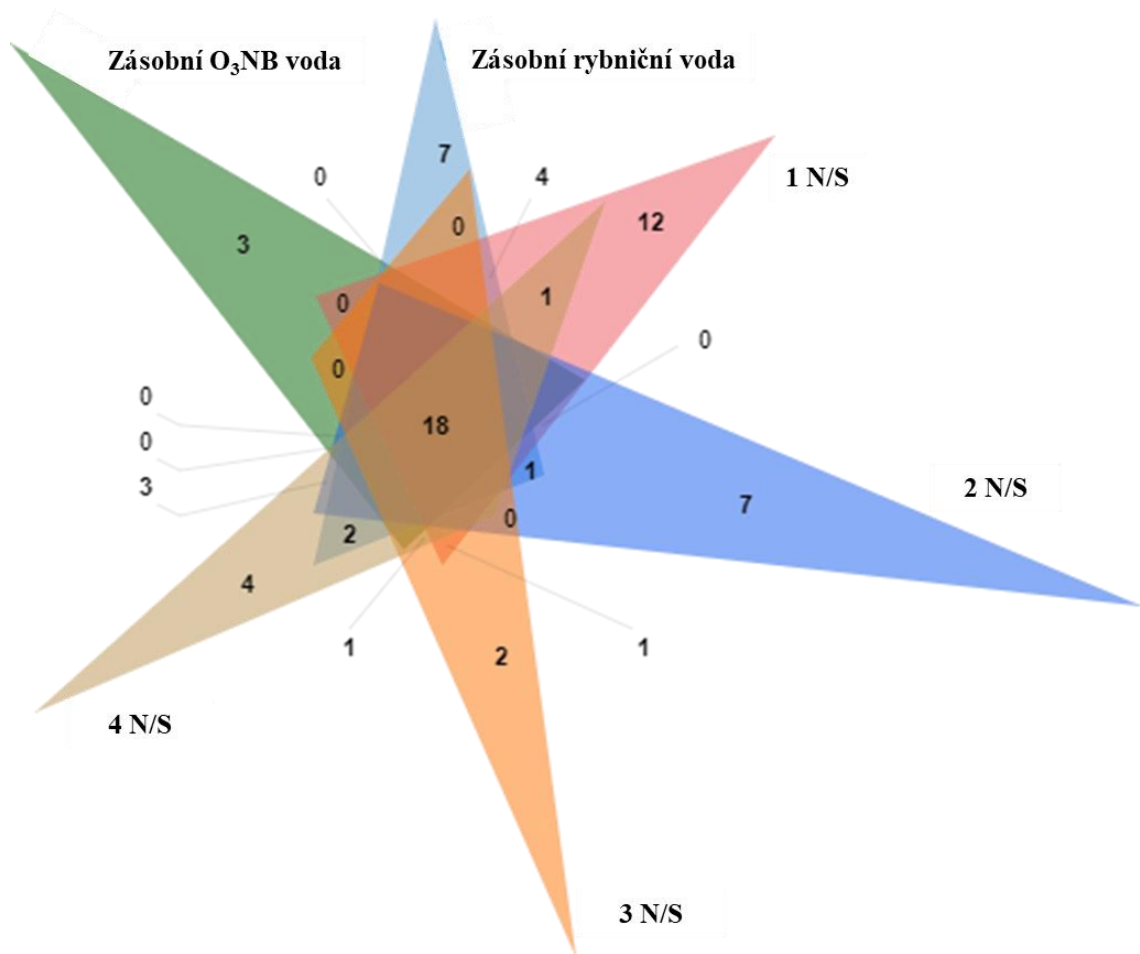
Pozn. nepřítomnost indexů a–d nad sloupci grafu značí, že v daný experimentální den nebyl pozorován signifikantní rozdíl ( $P > 0,05$ ) mezi testovanými skupinami.

Během experimentů (N a S) se diverzita kmenů mikroorganismů přítomných ve vodě částečně lišila mezi testovanými skupinami. Tato diverzita se překrývala šesti druhy v rámci všech testovaných skupin (viz Graf č. 18). Nejvíce kmenů mikroorganismů bylo pozorováno ve skupině 2N/S (ORP  $277 \pm 104$  mV), méně pak ve skupině 3N/S ( $392 \pm 134$  mV) a 4N/S ( $610 \pm 122$  mV), zatímco nejméně kmenů mikroorganismů bylo ve skupině 1N/S ( $192 \pm 40$  mV), zásobní rybníční ( $192 \pm 40$  mV) a zásobní ozonizované vodě ( $610 \pm 122$  mV).



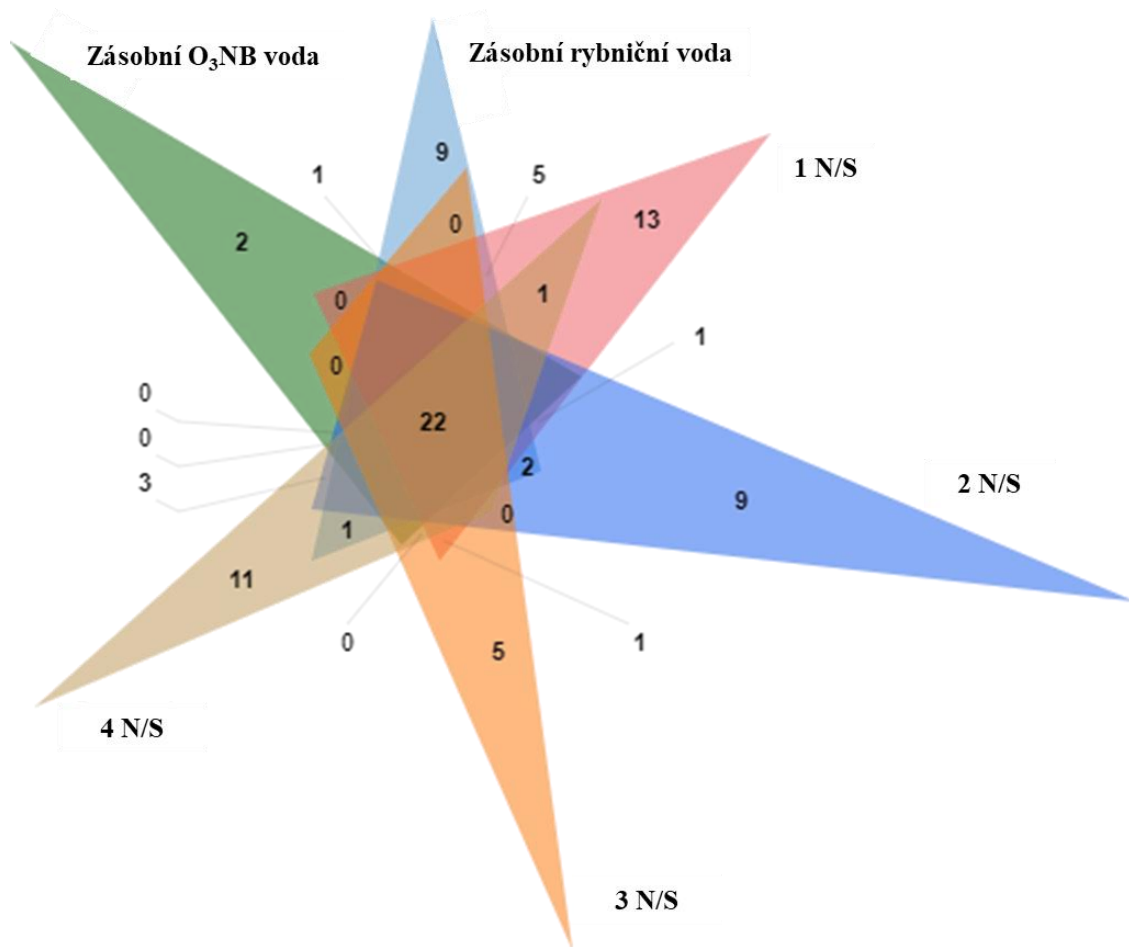
**Graf. č. 18.** Graf (tzv. Vennův diagram) znázorňuje diverzitu kmenů mikroorganismů přítomných ve vodě v závislosti na testované koncentraci nanobublin ozonu ve vodě (pět skupin s různými koncentracemi nanobublin ozonu,  $O_3NB$  (%): rybníční voda a kontrola s 0 % =  $192 \pm 40$  mV, 25 % =  $277 \pm 104$  mV, 50 % =  $392 \pm 134$  mV, 75 % =  $610 \pm 122$  mV a zásobní  $O_3NB$  voda se 100 % =  $192 \pm 40$  mV ORP).

Během experimentů (N a S) se diverzita čeledí mikroorganismů přítomných ve vodě částečně lišila mezi testovanými skupinami. Tato diverzita se překrývala 18 čeleděmi v rámci všech skupin (viz Graf č. 19). Nejvíce čeledí mikroorganismů bylo pozorováno v kontrolní skupině 1N/S (ORP  $192 \pm 40$  mV), méně pak v zásobní rybníční vodě ( $192 \pm 40$  mV) a skupině 2N/S ( $277 \pm 104$  mV), poté ve skupině 4N/S ( $610 \pm 122$  mV), zatímco nejméně čeledí bylo zastoupeno v zásobní ozonizované vodě ( $610 \pm 122$  mV) a skupině 3N/S ( $392 \pm 134$  mV).



**Graf. č. 19.** Graf (tzv. Vennův diagram) znázorňuje diverzitu čeledí mikroorganismů přítomných ve vodě v závislosti na testované koncentraci nanobublin ozonu ve vodě (pět skupin s různými koncentracemi nanobublin ozonu, O<sub>3</sub>NB (%): rybniční voda a kontrola s 0 % = 192 ± 40 mV, 25 % = 277 ± 104 mV, 50 % = 392 ± 134 mV, 75 % = 610 ± 122 mV a zásobní O<sub>3</sub>NB voda se 100 % = 192 ± 40 mV ORP).

Během experimentů (N a S) se diverzita rodů mikroorganismů přítomných ve vodě částečně lišila mezi testovanými skupinami. Tato diverzita se překrývala 22 rody v rámci všech testovaných skupin (viz Graf č. 20). Nejvíce rodů mikroorganismů bylo pozorováno v kontrolní skupině 1N/S (ORP 192 ± 40 mV), méně pak ve skupině 4N/S (610 ± 122 mV), poté 2N/S (277 ± 104 mV), následně v zásobní rybniční vodě (192 ± 40 mV) a skupině 3N/S (392 ± 134 mV), zatímco nejméně rodů mikroorganismů bylo zaznamenáno v ozonizované zásobní vodě (610 ± 122 mV).



**Graf. č. 20.** Graf (tzv. Vennův diagram) znázorňuje diverzitu rodů mikroorganismů přítomných ve vodě v závislosti na testované koncentraci nanobublin ozonu ve vodě (pět skupin s různými koncentracemi nanobublin ozonu, O<sub>3</sub>NB (%): rybníční voda a kontrola s 0 % = 192 ± 40 mV, 25 % = 277 ± 104 mV, 50 % = 392 ± 134 mV, 75 % = 610 ± 122 mV a zásobní O<sub>3</sub>NB voda se 100 % = 192 ± 40 mV ORP).

## 5. Diskuze

Práce se skládá ze dvou experimentů testujících vliv různých koncentrací nanobublin ozonu ( $O_3NB$ ) na ranou ontogenezi pstruha duhového. Každý z experimentů obsahoval čtyři skupiny s různou koncentrací  $O_3NB$  (jmenovitě skupiny: 1 –  $192 \pm 40$ , 2 –  $277 \pm 104$ , 3 –  $392 \pm 134$ , 4 –  $610 \pm 122$  mV). První experiment byl realizován bez odstraňování neoplozených jiker a uhynulých jedinců (N, skupiny 1–4 N) po celou dobu experimentu. Zatímco druhý experiment byl s odstraňováním uhynulých jedinců (S, skupiny 1–4 S). Oba experimenty probíhaly od oplození jiker (FE) do úplné resorbce žloutkového vřívku (RE). Během obou experimentů (N a S) byla pozorována účinnost  $O_3NB$  dezinfekce vody na míru líhnutí larev, délku těla ryb, objem žloutkového vřívku, průběh resorbce žloutkového vřívku, míru přežití jedinců a kvalitu odchovné vody (tzn. množství mikroorganismů ve vodě).

Experiment S ukázal lepší výsledky míry líhnutí ve všech testovaných skupinách ve srovnání s experimentem N. Skupiny 1S, 2S a 3S s koncentrací  $O_3NB$  (ORP  $192 \pm 40$  až  $392 \pm 134$  ORP mV) vykazovaly nejvyšší míru líhnutí (kolem 75 % nasazených jiker). Dále tyto výsledky naznačují, že nejvyšší koncentrace  $O_3NB$  (ORP  $610 \pm 122$  mV) měla negativní účinky na míru líhnutí (kolem 40 % nasazených jiker) pstruha duhového. Z hlediska líhnutí bylo nejvhodnější  $O_3NB$  ošetření v koncentraci ORP  $277 \pm 104$  až  $392 \pm 134$  mV. Uvedené poznatky jsou v souladu s výsledky studie Ghomi a kol. (2007), kteří ve svém experimentu sledovali vliv ošetření  $O_3$  (0,05, 0,1 a 0,15 ppm; tj. ORP 200–300, 300–400 a 400–500 mV; jednotky převedeny dle Çatal a İbanoğlu, 2013) a způsob ošetření jiker (s/bez odstraňování neoplozených či uhynulých embryí) na míru líhnutí jesetera perského (*Acipenser persicus*). Nejvyšší míru líhnutí (76,4 %) zaznamenali u  $O_3$  koncentrace 0,15 ppm (tj. ORP 400–500 mV; jednotky převedeny dle Çatal a İbanoğlu, 2013) s odstraňováním neoplozených či uhynulých embryí. Další výzkum (Forneris a kol., 2003) uvádí nejvyšší míru líhnutí (69,4 %) pstruha obecného potočního (*Salmo trutta fario*) při použití ozonu o koncentraci 0,1 ppm (tj. ORP 300–400 mV; jednotky převedeny dle Çatal a İbanoğlu, 2013). Ben-Atia a kol. (2007) zjistili, že míra líhnutí jiker mořana zlatého (*Sparus aurata*) byla nejvyšší (více než 80 %) v kontrolní skupině a při  $O_3$  ošetření jiker  $0,3 \text{ mg.l}^{-1}$  (tj. ORP 750–800 mV; jednotky převedeny dle Çatal a İbanoğlu, 2013) po dobu 2 a 4 minut, zatímco u jiker vystavených

této O<sub>3</sub> koncentraci po dobu 8 a 16 minut byla míra líhnutí signifikantně nižší ( $36,5 \pm 1,7$  % a  $20,4 \pm 2,0$  %).

V této práci byla vyšší míra mortality zjištěna v experimentu N v porovnání s experimentem S. To znamená, že odstraňování neoplozených a uhynulých jiker zlepšilo míru přežívání embryí i vylíhnutých jedinců. Oplozené jikry/embrya jsou totiž velmi náchylné k zaplísnění, které se může v inkubačním aparátu rychle šířit (Rand a Munden, 1993). Pokud nejsou mrtvé jikry včas odstraněny, dochází k rychlému šíření plísní (Bruno a Wood, 1999). V této studii skupiny 4S a 4N s nejvyšší O<sub>3</sub>NB koncentrací (ORP  $610 \pm 122$  mV) vykazovaly nejvyšší míru mortality (téměř 100 %), naproti tomu u skupiny 2S s O<sub>3</sub>NB koncentrací (ORP  $277 \pm 104$  mV) byla zjištěna nejnižší míra mortality (cca 30 %). Několik studií naznačilo, že hodnoty ORP v rozmezí 300–425 mV jsou pro ryby, korýše a měkkýše bezpečné (Li a kol., 2015; Powell a Scolding, 2018; Stiller a kol., 2020). Dien a kol. (2021) zjistili, že skupina tilapie nilské (*Oreochromis niloticus*), která byla vystavena bakteriální infekci *Aeromonas hydrophila* s následným ošetřením O<sub>3</sub>NB, vykazovala vyšší míru přežití (70–75 %) ve srovnání s kontrolní skupinou (tj. neošetřenou O<sub>3</sub>NB s mírou přežití 15–25 %). Dále popisují, že jedním z faktorů, který mohl rovněž zlepšit míru přežití ryb, může být koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě (O<sub>2</sub>). Dien a kol. (2021) také uvádějí, že vyšší hladina O<sub>2</sub> ve skupinách s O<sub>3</sub>NB (během ošetření ozonem a po něm) může zlepšit zdravotní stav ryb tím, že udržuje nebo zlepšuje normální fyziologické funkce. Ben-Atia a kol. (2007) pozorovali nejvyšší míru přežití jiker mořana zlatého ve skupině s O<sub>3</sub> ošetřením o koncentraci 0,3 mg.l<sup>-1</sup> (tj. ORP 750–800 mV; jednotky převedeny dle Çatal a İbanoğlu, 2013) po dobu 2 minut během 3 a 13 dnů experimentu. Stiller a kol. (2020) zjistili, že jedinci lososa obecného (*Salmo salar*) o kusové hmotnosti kolem 100 g vystavení O<sub>3</sub> koncentraci 425 mV a vyšší (500 mV) vykazovali více než 33 % míru mortality za méně než 10 dnů, ale u ostatních skupin (250–350 mV) nezaznamenali významnou mortalitu. Prokázány byly také nepříznivé účinky O<sub>3</sub> na žaberní histopatologii se zvyšujícími se dávkami O<sub>3</sub> a změny byly výraznější ve skupině vystavené koncentraci O<sub>3</sub> 350 mV a vyšším (425 a 500 mV).

Žloutkový váček je hlavním zdrojem energie a živin pro vyvíjející se embrya a také pro larvy ryb během fáze endogenní výživy (Kamler, 2008). Vylíhlí jedinci vstřebávají živiny ze žloutkového váčku, dokud nejsou schopni začít přijímat vnější potravu (Kouřil a kol., 2008). Vzhledem k tomu je potřeba zajistit co největší rezervu živin. Ta je však podmíněna množstvím živin, které ukládá jikernačka v průběhu dozrávání jiker (Pokorný

a kol., 1998). To znamená, že čím větší velikost jikry, tím více obsahuje živin. Jenže průměr zralých jiker lososovitých druhů ryb se zvyšuje se snižující se plodností (Kouřil a kol., 2008). Z celkové hmotnosti jedince žloutkový váček může tvořit 2/3–3/4 (Hoitsy a kol., 2012; Kamler, 2002). V období od 56. do 70. dPF. se testované skupiny signifikantně lišily ( $P < 0,05$ ) to znamená, že došlo k rozdílnému vlivu u testovaných koncentracích  $O_3NB$  na objem žloutkového váčku (YSV,  $mm^3$ ). Zvyšování koncentrace  $O_3NB$  zřejmě vedlo k oxidaci/rozkladu obalu jikry (např. tuků uvnitř jikry), jehož důsledkem pravděpodobně bylo zmenšení YSV. U kontrolních skupin 1N/S (ORP  $192 \pm 40$  mV), tzn. ve skupinách bez ošetření ozonem, byl pozorován příznivý vliv na YSV, neboť v této skupině vylíhnutí jedinci vykazovali signifikantně největší YSV. Podmínky ve skupině 4N  $O_3NB$  (ORP  $610 \pm 122$  mV) vykazovaly negativní účinky na YSV vylíhnutých jedinců, kdy byl zjištěn signifikantně nejmenší YSV. Při dalším odchovu v 63. dPF signifikantně největší YSV byl zjištěn v podmínkách 1S ( $192 \pm 40$  mV ORP). Do daného období ve skupině 4N (ORP  $610 \pm 122$  mV) uhynuly všechny ryby, to znamená, že tato koncentrace v kombinaci s ošetřením bez odstraňování neoplozených jiker a uhynulých jedinců způsobuje výrazně negativní účinky na míru líhnutí ryb. Celkově z výsledků YSV vyplývá, že objem žloutkového váčku vylíhnutých ryb negativně koreloval se zvyšující se  $O_3NB$  koncentrací. Fry a kol. (2015) popisují, že nebyl zjištěn vliv různých  $O_3$  dávek (0,5–1,0, 1,5–2,0 a 2,5–3,0  $mg.l^{-1}$ ; tj. ORP 860–875, 925–975 a 1025–1075 mV; jednotky převedeny dle Çatal a İbanoğlu, 2013) po dobu 90 s na YSV u larev lososa obecného a pstruha duhového.

Pod pojmem spotřeby žloutkového váčku rozumíme proces vstřebávání živin ze žloutkového váčku (Kamler, 1992). Nejrychleji resorbce žloutkového váčku probíhá u druhů ryb produkujících větší jikry (Kamler, 2008). V této studii byla rychlost spotřeby žloutkového váčku ovlivněna koncentrací  $O_3NB$ . Nejrychlejší spotřeba žloutkového váčku od vylíhnutí do úplné resorbce byla pozorována v  $O_3NB$  skupině 4N (ORP  $610 \pm 122$  mV). K tomu mohlo dojít zřejmě v důsledku větších ztrát energie na udržení homeostáze. Zatímco nejdelší doba spotřeby žloutkového váčku byla dosažena ve skupinách 1N/S (ORP  $192 \pm 40$  mV). Rychlost vstřebávání žloutkového váčku závisí také na teplotě vody (Kamler, 1992). Dalším faktorem, jenž ovlivňuje dobu vstřebávání žloutkového váčku, je osvětlení (např. u lososa obecného, Ryžkov, 1976). Také u keříčkovce červenolemého (*Clarias gariepinus*) bylo zaznamenáno, že v úplné tmě larvy pomaleji vstřebávají žloutkový váček (Appelbaum a Kamler, 2000). Rychlosti



vstřebávání žloutkového váčku může být ovlivněna přítomností toxických látek ve vodním prostředí – např. xenobiotika u pstruha obecného (*Salmo trutta*) urychlila vstřebávání žloutkového váčku (Vuorinen a Vuorinen, 1987). Salinita měla také efekt na rychlost vstřebávání žloutkového váčku. Například vysoká salinita mořské vody snížila rychlost vstřebávání žloutku pakambaly velké (*Scophthalmus maximus*) ve srovnání s brakickou vodou (Quantz, 1985). Dále bylo zjištěno, že i koncentrace kyslíku ve vodě může ovlivnit proces vstřebávání žloutkového váčku. Nízká koncentrace kyslíku např. zpomalila vstřebávání žloutkového váčku u lososa obecného (Hamora a Garside, 1977). Dále bylo zaznamenáno, že i expozice oxidu uhličitému (CO<sub>2</sub>) (1900 µatm) ve srovnání s kontrolou významně neovlivnila rychlost vstřebávání žloutkového váčku tuňáka žlutoploutvého (*Thunnus albacares*), nicméně v posledním měřeném stádiu (tj. 36 hodin po oplození jiker) došlo k významnému snížení rychlosti metabolismu ryb (Heuer a kol., 2023).

Při porovnání obou experimentů (N a S) bylo zjištěno, že celková délka těla ryb byla větší u skupin 1–2 N/S (ORP 192 ± 40 a 277 ± 104 mV). Tzn., že tyto koncentrace O<sub>3</sub>NB nevykazovaly negativní účinky na růst ryb. Davidson a kol. (2011) uvádí, že pstruh duhový vykazoval větší délku těla a lepší konverzi krmiva při organickém zatížení a malé výměně vody, když byla voda ošetřována pomocí O<sub>3</sub> (ORP 250 mV) ve srovnání s kontrolou bez použití O<sub>3</sub>. Bez ohledu na to, že bylo prováděno vybírání odumřelých jiker a uhynulých jedinců, celková délka těla byla kratší ve skupinách s vyšší koncentrací O<sub>3</sub>NB 3–4 N/S (ORP 392 ± 134 a 610 ± 122 mV). To zřejmě vypovídá o negativních účincích těchto vyšších koncentrací O<sub>3</sub>NB na růst ryb. Dle Stiller a kol. (2020) totiž může docházet k poškození žaber vysokými koncentracemi O<sub>3</sub> způsobených změnami v příjmu kyslíku, vylučování CO<sub>2</sub> a regulaci iontů, to vede k vnitřní hypoxii, což má za následek potlačení růstu ryb. Li a kol. (2015) pozorovali, že dlouhodobé působení O<sub>3</sub> (ORP 300–320 mV) negativně ovlivňuje příjem krmiva a rychlost růstu morčáka evropského (*Dicentrarchus labrax*). Další výzkum (Scolding a kol., 2012) uvádí, že při dlouhodobém působení O<sub>3</sub> koncentrace (400 mV) na larvy humra evropského (*Homarus gammarus*) byla zaznamenána nižší hmotnost a kratší délka těla jedinců. Dále Nghia a kol. (2022) popisují, že opakované O<sub>3</sub>NB ošetření vody po dobu 10 min.den<sup>-1</sup> ve srovnání s O<sub>3</sub> ve formě makrobublin po 2 min.den<sup>-1</sup> nemělo vliv na rychlost růstu krevety bělonohé (*Litopenaeus vannamei*) během 21denního experimentu v laboratorních podmínkách.

Během experimentů N a S bylo zjištěno, že množství mikroorganismů ve vodě negativně koreluje s O<sub>3</sub>NB koncentrací (tzn. sníženo se zvyšující se O<sub>3</sub>NB koncentrací). Kontrolní skupina s rybníční vodou (tj. kontrolní skupina s 0% ošetřením O<sub>3</sub>NB) vykazovala nejvyšší hodnoty alfa-diverzity mikroorganismů a mikrobiologických indexů, zatímco nejnižší hodnoty byly pozorovány u skupiny s nejvyšší O<sub>3</sub>NB koncentrací. Souhlasně také Gerrity a kol. (2018) popsali významný pokles alfa-diverzity v biofiltrech čistírny odpadních vod při ozonizaci vody. A např. Suantika a kol. (2001) zaznamenali, že použití O<sub>3</sub> při čištění odpadních vod v uzavřeném RAS pro euryhalinní vířníky (*Brachionus plicatilis*) vedlo ke snížení počtu bakterií v kultivační vodě, ale dokonce také k výraznému navýšení produkce vířníků.

## 6. Závěr

Na základě výsledků této práce lze konstatovat, že koncentrace nanobublin ozonu ( $O_3NB$  v rozsahu  $ORP\ 192 \pm 40$  až  $392 \pm 134\ mV$ ) nejlépe v kombinaci s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců mohou být doporučeny pro odchov raných stádií (embryí a larev) pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), neboť nebyly zjištěny negativní účinky těchto  $O_3NB$  koncentrací na sledované parametry. Bylo však zjištěno, že vysoké  $O_3NB$  koncentrace ( $ORP\ 610 \pm 122\ mV$ ) mohou způsobit značnou míru mortality během inkubace embryí, a to zejména při ošetření bez pravidelného odstraňování neoplozených jiker a uhynulých jedinců, kdy byla pozorována téměř 100% míra mortality již během embryonální periody života ryb.

Při doporučených koncentracích byla míra líhnutí kolem 75 % nasazených jiker, zatímco v nejvyšší koncentraci bez odstraňování neoplozených jiker a uhynulých jedinců byla méně než 5 %. Při vylíhnutí objem žloutkového váčku larev negativně koreloval se zvyšující se  $O_3NB$  koncentrací, tedy ve vysokých koncentracích měly vylíhnuté larvy menší objem žloutkového váčku (tzn. zásoby energie) v porovnání se skupinami v nižších  $O_3NB$  koncentracích. Žloutkový váček nejpomaleji resorbovaly ryby ve skupinách s vyššími  $O_3NB$  koncentracemi. Celková délka těla ryb byla signifikantně ovlivňována  $O_3NB$  koncentrací během obou experimentů. Nejpomalejší růst ryb byl zaznamenán ve skupině s nejvyšší  $O_3NB$  koncentrací ( $ORP\ 610 \pm 122\ mV$ ) v porovnání ostatními skupinami ( $ORP\ 192 \pm 40$  až  $392 \pm 134\ mV$ ). Mikrobiologické analýzy prokázaly snižující se množství mikroorganismů ve vodě se zvyšující se koncentrací  $O_3NB$ .

Tato práce je jednou z mála studií, které otestovali účinky  $O_3NB$  na raná stadia vývoje ryb. Další výzkum této nové technologie v oblasti akvakultury je žádoucí. Budoucí studie by mohly detailněji prozkoumat účinky a efektivitu  $O_3NB$  na různé druhy ryb např. při použití krátkodobých několikaminutových ošetření ryb různými koncentracemi při rozdílném organickém zatížení chovné vody, při infekčních onemocněních ryb apod. Dalším přínosem pro akvakulturu by bylo ověření rentability této technologie v porovnání s jinými běžně používanými metodami dezinfekce vody.

## 7. Seznam použité literatury

- Abo-Al-Ela, H., 2018. An introduction to selected innate immune-relevant genes in fish. *Applied Ecology and Environmental Research* 16: 955-976.
- Adámek, Z., 2012. *Rybářství a rybolov*. Praha: Český rybářský svaz, 376 s.
- AgriOzein, 2023. Effect of Ozone on Bacteria [online] [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: <https://www.agriozein.com/why-ozonation/effect-of-ozone-on-bacteria/>.
- Amamcharla, J., Li, B., Liu, Z., 2017. Use of micro- and nano-bubbles in liquid processing. United States Patent No. 16/071,385. WO 2017/127636 A1. PCT/US2017/014272.
- Appelbaum, S., Kamler, E., 2000. Survival, growth, metabolism and behaviour of *Clarias gariepinus* early stages under different light conditions. *Aquacultural Engineering* 22: 269–287.
- Bablon, G., Bellamy, W. D., Bourbigot, M-M., Daniel, F. B., Dore, M., Erb, F., Gordon, G., Langlais, B., Laplanche, A., Legube, B., Martin, G., Masschelein, W. J., Pacey, G., Reckhow, D. A., Ventresque, C., 1991. Fundamental aspects. In: Langlais, B., Reckhow, D. A., Brink, D. R. (Eds.), *Ozone in Water Treatment: Application and Engineering*. Denver: American Water Works Association Research Foundation, pp. 11–132.
- Batagoda, J., Hewage, S. A., Meegoda, J. N., 2018. Nano-Ozone Bubbles for Drinking Water Treatment. *Journal of Environmental Engineering and Science* 14 (2): 57–66.
- Ben-Atia, I., Lutzky, S., Barr, Y., Gamsiz, K., Shtupler, Y., Tandler, A., Koven, W., 2007. Improved performance of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, larvae after ozone disinfection of the eggs. *Aquaculture Research* 38 (2): 166–173.
- Block, J. C., 1982. Removal of bacteria and viruses by ozonation. In: Masschelein, W. J. (Eds.), *Ozonization manual for water and wastewater treatment*. New York: John Wiley and Sons, pp. 66–68.
- Brazil, B. L., Summerfelt, S. T., Libey, G. S., 1996. Application of ozone recirculating aquaculture systems. In: Libey G., Timmons, M., *Successes and failures in commercial recirculating aquaculture*. New York: Northeast Regional Agricultural Engineering Service, pp. 373–389.
- Bregnballe, J., 2015. *A Guide to Recirculation Aquaculture*. FAO and EUROFISH, 95p.

- Bregnballe, J., 2022. A guide to recirculation aquaculture – An introduction to the new environmentally friendly and highly productive closed fish farming systems. Rome: FAO and Eurofish International Organisation, 107 p.
- Bruno, D. W., Wood, B. P., 1999. *Saprolegnia* and other *Oomycetes*. In: Woo, P. T. K., Bruno, D. W. (Eds.), *Fish Diseases and Disorders, Viral, Bacterial and Fungal Infections*. Wallingford: CAB International, pp. 599–659.
- Bullock, G. L., Summerfelt, S. T., Noble, A., Weber, A., Durant, M. D., Hankins, J. A., 1996. Ozonation of a recirculating rainbow trout culture system I. Effects on bacterial gill disease and heterotrophic bacteria. *Aquaculture* 158: 43–55.
- Buřič, M., Kouřil, J., 2012. Technologie recirkulační líhně pro lososovité ryby. Vodňany: Edice Metodik, FROV JU, č. 136, 34 s.
- Çatal, H., İbanoğlu, Ş., 2013. Effects of Ozonation on Thermal, Structure and Rheological Properties of Rice Starch in Aqueous Solution. *Gıda*: 38. 63-70.
- Cripps, S.J., Bergheim, A., 2000. Solids management and removal for intensive land-based aquaculture production systems. *Aquacultural Engineering* 22: 33–56.
- Cryer, E., 1992. Recent applications of ozone in freshwater fish hatchery systems. In: Blogoslawski, W. J. (Eds.), *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Use of Ozone in Aquatic Systems*, International Ozone Association. Stamford: Pan American Committee, pp. 134–154.
- da Silva, L. M., Wilson, J. F., 2006. Trends and strategies of ozone applications in environmental problems. *Química Nova* 29 (2): pp. 310–317.
- Davidson, J., Good, C., Welsh, C., Summerfelt, S. T., 2011. The effects of ozone and water exchange rates on water quality and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) performance in replicated water recirculating systems. *Aquacultural Engineering* 44 (3): 80–96.
- Davidson, J., Good, C., Welsh, C., Summerfelt, S. T., 2014. Comparing the effects of high vs. low nitrate on the health, performance, and welfare of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) within water recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 59: 30–40.
- Dien, L. T., Linh, N. V., Mai, T. T., Senapin, S., St-Hilaire, S., Rodkhum, C., Dong, H. T., 2022. Impacts of oxygen and ozone nanobubbles on bacteriophage in aquaculture system. *Aquaculture* 551: 737894

- Dien, L. T., Sangpo, P., Senapin, S., St-Hilaire, S., Rodkhum, C., Dong, H. T., 2021. Ozone nanobubble treatments improve survivability of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with a pathogenic multi-drug-resistant *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases* 44 (9): 1435–1447.
- Dubský, K., Kouřil, J., Šrámek, V., 2003. *Obecné rybářství*. Praha: Informatorium, 308 s.
- Ebeling, J. M., Timmons, M. B., 2012. Recirculating Aquaculture Systems. In: Tidwell, J. H., (Eds.), *Aquaculture production systems*. Oxford: Wiley, pp. 245–277.
- Elvis A. M., Ekta J. S, 2011. Ozone therapy: A clinical review. *Journal of natural science, biology, and medicine* 2 (1): 66-70.
- Ershov, B. G, Morozov, P. A., 2009. The Kinetics of Ozone in Water, the Influence of pH and Temperature. *Russian Journal of Physical Chemistry* 83 (8): 1295–1299.
- Fan. M., Tao, D., Honaker, R., Luo, Z., 2010. Nanobubble generation and its application in froth flotation (part I): nanobubble generation and its effects on properties of microbubble and millimeter scale bubble solutions. *Mining Science and Technology* 20 (1): 1–19.
- Fan, W., An, W., Huo, M., Xiao, D., Lyu, T., Cui, J., 2021. An integrated approach using ozone nanobubble and cyclodextrin inclusion complexation to enhance the removal of micropollutants. *Water Research* 196: 117039.
- FAO, 2022. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Rome, FAO, Towards Blue Transformation, 236 p.
- FEAP, 2021. *European Aquaculture Production Report* [online] [cit. 2023-02-20]. Dostupné z: <https://feap.info/wp-content/uploads/2022/03/production-report-v1.1.pdf>.
- Forneris, G., Bellardi, S., Palmegiano, G. B., Saroglia, M., Sicuro, B., Gasco, L., Zoccarato, I., 2003. The use of ozone in trout hatchery to reduce saprolegniasis incidence. *Aquaculture* 221 (1–4): 157–166.
- Fry, J., Casanova, P. J., Hamoutene, D., Lush, L., Walsh, A., Couturier, C., 2015. The Impact of Egg Ozonation on Hatching Success, Larval Growth, and Survival of Atlantic Cod, Atlantic Salmon, and Rainbow Trout. *Journal of Aquatic Animal Health* 27 (1): 57–64.
- Furuichi, A., Arakawa, S., Mano, Y., Morita, I., Tachikawa, N., Yamada, Y., Kasugai, S., 2013. Comparative Analysis of Efficacy of Ozone Nano Bubble Water (NBW3) with Established Antimicrobials. Bactericidal Efficacy and Cellular Response. An in Vitro Study. *Journal of Oral Tissue Engineering* 10: 131–141.

- Gebauer, R., Eggen, G., Hansen, E., Eikebrokk, B., 1992. Oppdrettsteknologi: vannkvalitet og vannbehandling i lukkede oppdrettsanlegg. Tapir Forlag 171–218.
- Gesto, M., de Jesus Gregersen, K. J., Pedersen, P. L., 2022. Effects of ozonation and foam fractionation on rainbow trout condition and physiology in a small-scale freshwater recirculation aquaculture system. *Aquaculture* 557: 11.
- Gerrity, D., Arnold, M., Dickenson, E. R. V., Moser, D. P., Sackett, J. D., Wert, E. C., 2018. Microbial community characterization of ozone-biofiltration systems in drinking water and potable reuse applications. *Water Research* 135: 207-219.
- Ghomi, M. R., Esmaili, A., Vossoughi, G., Keyvan, A., Nazari, R. M., 2007. Comparison of ozone, hydrogen peroxide and removal of infected eggs for prevention of fungal infection in sturgeon hatchery. *Fisheries Science* 73: 1332–1337.
- Good, C., Davidson, J., Welsh, C., Snekvik, K. R., Summerfelt, S. T., 2011. The effects of ozonation on performance, health and welfare of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in low-exchange water recirculation aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 44 (3): 97–102.
- Gullian, M., Espinosa-Faller, F. J., Núñez, A., López-Barahona, N., 2012. Effect of turbidity on the ultraviolet disinfection performance in recirculating aquaculture systems with low water exchange. *Aquaculture Research* 43: 595–606.
- Gurung, A., Dahl, O., Jansson, K., 2016. The fundamental phenomena of nanobubbles and their behavior in wastewater treatment technologies. *Geosystem Engineering* 19 (3): 133–142.
- Hamor, T., Garside, E. T., 1977. Size relations and yolk utilization in embryonated ova and alevins of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in various combinations of temperature and dissolved oxygen. *Canadian Journal of Zoology* 55: 1892–1898.
- Hardy, R. W., Fornshell, G. C. G., Brannon, E. L., 2000. Rainbow trout culture. In: Stickney R. (Eds.), *Fish Culture*. New York: John Wiley and Sons pp. 716-722.
- Hayatgheib, N., Moreau, E., Calvez, S., Lepelletier, D., Pouliquen, H., 2020. A review of functional feeds and the control of *Aeromonas* infections in freshwater fish. *Aquaculture International* 28 (3): 1083–1123.
- He, H., Zheng, L., Li, Y., Song, W., 2015. Research on the Feasibility of Spraying Micro/Nano Bubble Ozonated Water for Airborne Disease Prevention. *Ozone: Science and Engineering* 37: 78–84.

- Heuer, R. M., Wang, Y., Pasparakis, C., Zhang, W., Scholey, V., Margulies, D., Grosell, M., 2023. Effects of elevated CO<sub>2</sub> on metabolic rate and nitrogenous waste handling in the early life stages of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A. Molecular and Integrative Physiology* 280: 111398.
- Hoitsy, G., Woynárovich, A., Moth-Poulsen, T., 2012. Guide to the small scale artificial propagation of trout. Budapest: FAO, 20 p.
- Huang, Y. X., Qin, S. N., Zhang, D. F., Li, L., Mu, Y., 2016. Evaluation of *Chlorella vulgaris* by pressure-assisted ozonation and ultrasonication. *Energies* 9 (3): 173.
- Hunter, J., 2000. Sterilization by Use of Ozone: Correct Airflow Requirements. In: Escobal, P. R. (Eds.), *Aquatic Systems Engineering: Devices and How They Function*. Oxnard: Dimension Engineering Press, pp. 157–166.
- Hunter, G. L., O'Brien, W. J., Hulsey, R. A., Carns, K. E., Ehrhard, R., 1998. Emerging disinfection technologies: medium-pressure ultraviolet lamps and other systems are considered for wastewater applications. *Water Environment and Technology* 10 (6): 40–44.
- Chen, S., Timmons, M. B., Aneshansley, D. J., Bisogni, J. J. Jr., 1993. Suspended solids characteristics from recirculating aquaculture systems and design implications. *Aquaculture* 112: 143–155.
- Cheng, Y. L., Juang, Y. C., Liao, G. Y., Ho, S. H., Yeh, K. L., Chen, C. Y., Chang, J. S., Liu, J. C., Lee, D. J., 2003. Dispersed ozone flotation of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 101: 9092–9096.
- Cheng, W., 2017. Effect of NET-1 siRNA conjugated sub-micron bubble complex combined with low-frequency ultrasound exposure in gene transfection. *Oncotarget* 9 (3): 4150–416.
- Chu, L. B., Yan, S. T., Xing, X. H., Yu, A. F., Sun, X. L., Jurcik, B., 2008. Enhanced sludge solubilization by microbubble ozonation. *Chemosphere* 72 (2): 205–212.
- Imaizumi, K., Tinwongger, S., Kondo, H., Hirono, I., 2018. Disinfection of an EMS/AHPND strain of *Vibrio parahaemolyticus* using ozone nanobubbles. *Journal of Fish Diseases* 41 (4): 725–727.
- Jhunkeaw, C., Khongcharoen, N., Rungrueng, N., Sangpo, P., Panphut, W., Thapinta, A., Senapin, S., St-Hilaire, S., Dong, H. T., 2021. Ozone nanobubble treatment in freshwater effectively reduced pathogenic fish bacteria and is safe for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 534 (15): 736286.



- Kamler, E., 1992. Early Life History of Fish. An Energetics Approach. London: Chapman Hall, 267 p.
- Kamler, E., 2002. Ontogeny of yolk-feeding fish: an ecological perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 12: 79–103.
- Kamler, E., 2008. Resource allocation in yolk-feeding fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 18: 143–200.
- Karamah, E. F., Amalia, F., Ghaudenson, R., Bismo, S., 2018. Disinfection of *Escherichia coli* bacteria using combination of ozonation and hydrodynamic cavitation method with venturi injector. *International Journal on Advanced Science Engineering and Information* 8: 811–817.
- Kasai, H., Yoshimizu, M., Ezura, Y., 2002. Disinfection of water for aquaculture. *Fisheries science* 68 (1): 821-824.
- Kim, S., Kim, Y., Han, M., 2012. Development of novel oil washing process using bubble potential energy. *Marine Pollution Bulletin* 64 (11): 2325–2332.
- Kim, T. K., Kim, T., Lee, I., Choi, K., Zoh, K. D., 2021. Removal of tetramethylammonium hydroxide (TMAH) in semiconductor wastewater using the nano-ozone H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process, *Journal of Hazardous Matererials* 409: 123759.
- Kinman, R. N., 1972. Ozone in water disinfection. In: Evans F. L. (Eds.), *Ozone in water and wastewater treatment*. Michigan: Ann Arbor Science Publishers, pp. 123–143.
- Kogelschatz, U., 2003. Dielectric-Barrier Discharges: Their History, Discharge Physics, and Industrial Applications. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 23 (1): 1–46.
- Kolářová, J., Nepejchalová, L., Policar, T., 2020. Řešení zdravotní problematiky v intenzivních chovech ryb využívajících RAS (recirkulační akvakulturní systém). Vodňany: Edice Metodik, FROV JU, č. 180, 58 s.
- Kottelat, M., Freyhof J., 2007. *Handbook of European freshwater fishes*. Cornol: Kottelat, 646 p.
- Kouřil, J., 2013. Recirkulační akvakulturní systémy. In: Mareš, J., Lang, Š. (Eds.), *Zkušenosti s chovem ryb v recirkulačním systému dánského typu*. Sborník příspěvků z konference. Brno: Mendelova univerzita, s. 14-19.
- Kouřil, J., Hamáčková, J., Stejskal, V., 2013. *Recirkulační akvakulturní systémy pro chov ryb*. 2. vyd. Vodňany: Edice Metodik, FROV JU, č. 85, 40 s.

- Kouřil, J., Mareš, J., Pokorný, J., Adámek, Z., Randák, T., Kolářová, J., Palíková, M., 2008. Chov lososovitých druhů ryb, lipana a síhů. Vodňany: Edice Metodik, VÚRH JU, 141 s.
- Krumins, V., Ebeling, J., Wheaton, F., 2001. Part-day ozonation for nitrogen and organic carbon control in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 24: 231–241.
- Kurita, Y., Chiba, I., Kijima, A., 2017. Physical eradication of small planktonic crustaceans from aquaculture tanks with cavitation treatment. *Aquaculture International* 25 (6): 2127–2133.
- Langlais, B., Reckhow, D. A., Brink, D. R., 1991. *Ozone in Water Treatment: Application and Engineering*. Denver: American Water Works Association Research Foundation, 552 p.
- Lawson, T., 2002. *Fundamentals of Aquacultural Engineering*. 2. vyd. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 355 p.
- Lekang, O. I., 2020. *Aquaculture engineering*. 3. ed. Norway: Wiley-Blackwell, 512 p.
- Leynen, M., Duvivier, L., Girboux, P., Ollevier, F., 1998. Toxicity of Ozone to Fish Larvae and *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41 (2): 176–179.
- Li, X., Przybyla, C., Triplet, S., Liu, Y., Blancheton, J. P., 2015. Long-term effects of moderate elevation of oxidation–reduction potential on European seabass (*Dicentrarchus labrax*) in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 64: 15–19.
- Liltved, H., Hekloen H., Efraimsen. H., 1995. In activation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity. *Aquacultural Engineering* 14: 107–122.
- Liltved, H., 2003. Disinfection of water in aquaculture: factors influencing the physical and chemical inactivation of microorganisms. (Přeložil: BERKA, R. Dezinfekce vody v akvakultuře: faktory ovlivňující fyzikální a chemickou inaktivaci mikroorganismů). Vodňany: Edice Metodik, VÚRH JU, č. 71, 12 s.
- Linh, N. V., Dien, L. T., Panphut, W., Thapinta, A., Senapin, S., St-Hilaire, S., Rodkhum, C., Dong, H. T., 2021. Ozone nanobubble modulates the innate defense system of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus agalactiae*. *Fish and Shellfish Immunology* 112: 67–73.
- Liu, S., Oshita, S., Makino, Y., 2014. Stimulating effect of nanobubbles on the reactive oxygen species generation inside barley seeds as studied by the microscope spectrophotometer. Zurich: International Conference of Agricultural Engineering.

- Longley, K. E., 1986. Wastewater disinfection. Manual of practice No. FD-10. Virginia: Water Environment Federation, 165 p.
- Losordo, T. M., Masser, M. P., Rakocy, J. E., 1999. Recirculating aquaculture tank production systems: a review of component options. Southern Regional Aquaculture Center Publication No. 453.
- Lusk, S., Skácel, L., Sláma, B., 1987. Lipan podhorní. Praha: ČRS, Naše vojsko, 155 s.
- Mareš, J., Kopp R., Lang Š., 2013. Recirkulační systémy „dánského typu“- systém a konstrukce. In: Mareš J., Lang Š. (Eds.), Zkušenosti s chovem ryb v recirkulačním systému dánského typu. Brno: Mendelova univerzita, 95 s.
- Masser, M. P., Rakocy, J., Losordo, T. M., 1992. Recirculating Aquaculture Tank Production Systems, Management of Recirculating Systems. SRAC 452: 1–12.
- Mat-Kuling, 2023. Ozone destruct units [online] [cit. 2023-04-18]. Dostupné z: <https://matkuling.com/equipment/ozone-destruct-units-aquaculture/>.
- Meegoda, J. N., Hewage, S. A., Batagoda, J. H., 2018. Stability Nanobubbles. Environmental Engineering Science 35 (11): 1216–1227.
- McMillan, J. D., Wheaton, F. W., Hochheimer, J. N., Soares, J., 2003. Pumping effect on particle sizes in a recirculating aquaculture system. Aquacultural Engineering 27: 53–59.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information), 2023. PubChem Compound Summary for CID 24823, Ozone [online] [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ozone>.
- Nghia, N. H., Nguyen, N. T., Binh, P. T., May L. T., Huy T. T., Giang P. T., St-Hilaire, S., Van P. T., 2022. Effect of nanobubbles (oxygen, ozone) on the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*), *Vibrio parahaemolyticus* and water quality under lab conditions. Fisheries and Aquatic Sciences 25 (8): 429–440.
- Okpala, O. C. R., Bono, G., Abdulkadir, A., Madumelu, C., 2015. Ozone (O<sub>3</sub>) Process Technology (OPT): An Exploratory Brief of Minimal Ozone Discharge applied to Shrimp Product. Energy Procedia 75: 2427–2435.
- OSHA (Occupational Health and Safety Administration), 1993. Air Contaminants Standard, 29 CFR 1910.1000. US Department of Labor, [online] [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: <http://www.osha.gov/>.

- Owsley, D. E., 1991. Ozone for disinfecting hatchery rearing water. In: Colt, J., White, R. J. (Eds.), American Fisheries Society Symposium. Maryland: Fisheries Bioengineering Symposium. American Fisheries Society, pp. 417–420.
- Pal, P., Joshi, A., Anantharaman, H., 2022. Nanobubble ozonation for waterbody rejuvenation at different locations in India: A holistic and sustainable approach. Results in Engineering 16.
- Pokorný, J., Adámek, Z., Dvořák, J., Šrámek, V., 1998. Pstruhařství. 2. vyd. Praha: Informatorium, 242 s.
- Polícar, T., Kolářová, J., Křišťan, J., 2018. Provozní ověření využití ozonu v intenzivním chovu ryb. Technická zpráva pilotního projektu č. CZ.10.2.101/2.1/0.0/15\_001/0000044. FROV JU, 55 s.
- Polícar, T., Křišťan, J., Hampl, J., Blecha, M., Kolářová, J., 2020. Provozní manuál sloužící k efektivnímu provozu intenzivní akvakultury využívající RAS. Vodňany: Edice Metodik, FROV JU, č. 169, 54 s.
- Powell, A., Scolding, J., 2016. Direct application of ozone in aquaculture systems. Reviews in Aquaculture 10 (2): 424–438.
- Quantz, G., 1985. Use of endogenous energy sources by larval turbot, *Scophthalmus maximus*. Transactions of the American Fisheries Society 114: 558–563.
- Rakness, K. L., 2005. Ozone in drinking water treatment: process design, operation, and optimization. Denver: American Water Works Association, 305 p.
- Rand, T. G., Munden, D., 1993. Involvement of zoospores of *Saprolegnia diclina* in the attachment to and invasion of eggs of brook trout under experimental conditions. Journal of Aquatic Animal Health 5: 233–239.
- Reiser, S., Wuertz, S., Schroeder, J. P., Kloas, W., Hanel, R., 2011. Risks of seawater ozonation in recirculation aquaculture – Effects of oxidative stress on animal welfare of juvenile turbot (*Psetta maxima*, L.). Aquatic Toxicology 105 (3–4): 508–517.
- Rice, R. G., Netzer, A., 1984. Handbook of ozone technology and applications. Ann Arbor Science, 386 p.
- Rice, R. G., Robson, C. M., Miller, G. W., Hill, A. G., 1981. Uses of ozone in drinking water treatment. Journal American Water Works Association 73: 1–44.

- Richard, Y., 1993. The use of ozone and flotation for the treatment of a reservoir water: the Dinan case history. *Ozone: Science and Engineering: The Journal of the International Ozone Association* 15: 465–480.
- Rodriguez, J., Gagnon, S., 1991. Disinfection: liquid purification by UV radiation, and its many applications. *Ultrapure Water* 8 (6): 26–31.
- Rooze, J., Rebrov, E. V., Schouten, J. S., Keurentjes, J. T. F., 2013. Dissolved gas and ultrasonic cavitation – A review. *Ultrasonics Sonochemistry* 20 (1): 1–11.
- Ryzhkov, L. P., 1976. Morpho-physiological peculiarities and transformation of matter and energy in early development of freshwater salmonid fishes. Petrozavodsk, 288 p.
- Scolding, J. W. S., Powell, A., Boothroyd, D. P., Shields, R. J., 2012. The effect of ozonation on the survival, growth and microbiology of the European lobster (*Homarus gammarus*). *Aquaculture* 364: 217–223.
- Seki, M., Ishikawa, T., Terada H., Nashimoto, M., 2017. Microbicidal effects of stored aqueous ozone solution generated by nano-bubble technology. *In Vivo* 31: 579–583.
- Seridou, P., Kalogerakis, N., 2021. Disinfection applications of ozone micro – And nanobubbles. *Environmental Science Nano* 8: 3493–3510.
- Spiliotopoulou, A., Rojas-Tirado, P., Chhetri, R. K., Kamilla, M. S., Kaarsholm, K. M. S., Martin, R., Pedersen, P. B., Pedersen, L. F., Henrik, R., Andersen, H. R., 2018. Ozonation control and effects of ozone on water quality in recirculating aquaculture systems. *Water Research* 133: 289–298.
- Staelin, J., Hoigne, J., 1985. Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reaction. *Environmental Science and Technology* 19: 1206–1213.
- Stejskal, V., Gebauer, R., Matoušek, J., Šebesta, R., Prokešová, M., Mráz, J., Kouřil, J., 2020. Technologie a technické prvky recirkulačních akvakulturních systémů pro chov ryb. Vodňany: Edice Metodik, FROV JU, č. 174, 106 s.
- Stiller, K. T., Kolarevic, J., Lazado, C. C., Gerwins, J., Good, C., Summerfelt, S. T., Mota, V. C., Espmark, A. M. O., 2020. The Effects of Ozone on Atlantic Salmon Post-Smolt in Brackish Water Establishing Welfare Indicators and Thresholds. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 5109.

- Suantika, G., Dhert, P., Rombaut, G., Vandenberghe, J., De Wolf, T., Sorgeloos, P., 2001. The use of ozone in a high density recirculation system for rotifers. *Aquaculture* 201 (1–2): 35–49.
- Summerfelt, S. T. 1996. Engineering design of a water reuse system. In: Summerfelt, R. C. (Eds.), *Walleye Culture Manual*. Iowa: NCRAC Culture Series Ames 101: pp. 277–309.
- Summerfelt, S. T., 2003. Ozonation and UV irradiation—an introduction and examples of current applications. *Aquacultural Engineering* 28: 21–36.
- Summerfelt, S. T., Bebak-Williams, J., Fletcher, J., Carta, A., Creaser, D., 2008. Description of the surface water filtration and ozone treatment system at the Northeast Fishery Center. In: Amaral, S. V., Mathur, D., Taft, E. P. (Eds.), *Advances in Fisheries Bioengineering*. Maryland: American Fisheries Society, Symposium pp. 97–121.
- Summerfelt, S. T., Hankins, J. A., Heinen, J. M., Weber, A. L., Morton, J. D., 1994. Evaluation of the triangle microsieve filter in a water-reuse system. *World Aquaculture*, pp. 45.
- Summerfelt, S. T., Hochheimer, J. N., 1997. Review of ozone processes and applications as an oxidizing agent in aquaculture. *The Progressive Fish-Culturist* 59 (2): 94–105.
- Summerfelt, S. T., Sharrer, M. J., Hollis, J., Gleason, L. E., Summerfelt, S. R., 2004. Dissolved ozone destruction using ultraviolet irradiation in a recirculating salmonid culture system. *Aquacultural Engineering* 32 (1): 209–223.
- Summerfelt, S. T., Sharrer, M. J., Tsukuda, S. M., Gearheart, M., 2009. Process requirements for achieving full-flow disinfection of recirculating water using ozonation and UV irradiation. *Aquacultural Engineering* 40 (1): 17–27.
- Svobodová, Z., 2007. *Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb*. 3. vyd. Praha: Informatorium, 264 s.
- Takahashi, M., Ishikawa, H., Asano, T., Horibe, H., 2012. Effect of Microbubbles on Ozonized Water for Photoresist Removal. *The Journal of Physical Chemistry* 116 (23): 12578–12583.
- Temesgen, T., Bui, T. T., Han, M., Kim, T., Park, H., 2017. Micro and nanobubble technologies as a new horizon for water-treatment techniques: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* 246: 40–51.
- Terner, C. 1986. Evaluation of salmonid sperm motility for cryopreservation. *The Progressive Fish-Culturist* 48: 230–232.

- Thi Phan, K. K., Truong, T., Wang, Y., Bhesh, B., 2020. Nanobubbles: Fundamental characteristics and applications in food processing. *Trends in Food Science and Technology* 95: 118–130.
- Timmons, M. B., Ebeling, J. M., 2013. *Recirculating Aquaculture*, 3rd Ed. Ithaca Publishing Company, 788 pp.
- Uchida, T., Liu, S., Enari, M., Oshita, S., Yamazaki, K., Gohara, K., 2016. Effect of NaCl on the Lifetime of Micro – and Nanobubbles. *Nanomaterials* 6: 31.
- Ushikubo, F. Y., Enari, M., Furukawa, T., Nakagawa, R., Makino, Y., Kawagoe, Y., Oshita, S., 2010. Zeta-potential of Micro- and/or Nano-bubbles in Water Produced by Some Kinds of Gases. *IFAC Proceedings* 43 (26): 283–288.
- Vachta, R., Nusl, P., Smékal, D., Lepič, P., Buřič, M., 2015. *Recirkulační systémy v chovech ryb*. 2. vyd. Vodňany: SRŠ a VOŠ VHE, 223 s.
- van Beijnen, J., Yan, G., 2023. A breath of fresh air: how nanobubbles can make aquaculture more sustainable. *TheFishSite* [online] [cit. 2023-03-05]. Dostupné z: <https://thefishsite.com/articles/a-breath-of-fresh-air-how-nanobubbles-can-make-aquaculture-more-sustainable-dissolved-oxygen>.
- Velíšek, J., Kouba, A., Dvořáková, Z., 2015. Potenciál recirkulačních akvakulturních systémů (RAS) pro české produkční rybářství. *Vodňany: sborník příspěvků z odborného semináře*, 105 s.
- Vrajová, J. 2008. Studium sterilizačních účinků dielektrického bariérového výboje. Pojednání k dizertační práci. 31 s.
- Vuorinen, M., Vuorinen P. J., 1987. Effect of bleached kraft mill effluent on early stages of brown trout (*Salmo trutta L.*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 14: 117–128.
- Wang, L. K., 2006. Water Chlorination and Chloramination. In: Wang, L. K., Hung, Y. T., Shammas, N. K. (Eds.), *Advanced Physicochemical Treatment Processes*. New Jersey: Humana Press, *Handbook of Environmental Engineering*, pp. 403–440.
- Warrer-Hansen, I., 2015. A brief history of RAS. *Fish Farmer* 38: 22–25.
- Wedemeyer, G. A., 1996. *Physiology of Fish in Intensive Culture Systems*. New York: Springer, 232.

- Wedemeyer, G. A., Nelson, N. C., Yasutake, W. T., 1979. Physiological and Biochemical Aspects of Ozone Toxicity to Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 36 (6): 605–614.
- Wenk, J., Aeschbacher, M., Salhi, E., Canonica, S., von Gunten, U., Sander, M., 2013. Chemical oxidation of dissolved organic matter by chlorine dioxide, chlorine, and ozone: effects on its optical and antioxidant properties. Environmental Science and Technology 47 (19): 11147–11156.
- Westerhoff, P., Nalinakumari, B., Pei, P., 2006. Kinetics of MIB and Geosmin Oxidation during Ozonation. Ozone: Science and Engineering 28 (5): 277–286.
- Wu, C., Nasset, K., Masliyah, J., Xu, Z., 2012. Generation and characterization of submicron size bubbles. Advances in Colloid and Interface Science 179–182: 123–132.
- Wu, Y., Tian, W., Zhang, Y., Fan, W., Liu, F., Zhao, J., Wang, M., Liu, Y., Lyu, T., 2022. Nanobubble Technology Enhanced Ozonation Process for Ammonia Removal. Water 14: 1865.
- Wu, C., Wang, L., Harbottle, D., Masliyah, J., Xu, Z., 2015. Studying bubble–particle interactions by zeta potential distribution analysis. Journal of Colloid and Interface Science 449: pp. 399–408.



## 8. Abstrakt

Cílem této bakalářské práce bylo testování účinků různých koncentrací nanobublin ozonu ( $O_3NB$ ), jakožto nové perspektivní metody dezinfekce vody v akvakultuře, na ranou ontogenezi (embryonální a larvální periodu) pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) při odchovu v líhni s rybničním (přirozeně organicky zatíženým) zdrojem vody.

Během této práce byly realizovány dva experimenty s různými koncentracemi  $O_3NB$  od  $192 \pm 40$  do  $610 \pm 122$  mV ORP (skupina 1:  $192 \pm 40$ , 2:  $277 \pm 104$ , 3:  $392 \pm 134$  a 4:  $610 \pm 122$  mV) v kombinaci se dvěma rozdílnými ošetřeními ryb během odchovu (s/bez odstraňování neoplozených jiker a uhynulých jedinců). Během prvního experimentu (N, skupiny 1–4 N) nebyly neoplozené jikry a uhynulí jedinci odstraňováni, na rozdíl od druhého experimentu (S, skupiny 1–4 S). Testování výše uvedených skupin (tj. 1–4 N / S) bylo prováděno ve čtyřech opakováních (akvária A, B, C, D).

Míra líhnutí byla vyšší ve všech testovaných skupinách experimentu S. Nejvyšší míra líhnutí (přibližně 75 %) byla pozorována ve skupinách 1S, 2S a 3S (tj. ORP  $192 \pm 40$  až  $392 \pm 134$  mV ORP). Míra mortality ryb byla výrazně vyšší zejména ve všech skupinách experimentu N. Nejvyšší míra mortality ryb (vyšší než 75 %) byla pozorována ve skupinách 3N a 4N/S (tj. ORP  $392 \pm 134$  až  $610 \pm 122$  mV). Při vylíhnutí objem žloutkového vajíčka ryb negativně koreloval se zvyšující se koncentrací  $O_3NB$  během obou experimentů. Žloutkový vajíček (tj. zásobu energie) rychleji plně resorbovaly ryby chované ve skupinách s nižšími  $O_3NB$  koncentracemi v porovnání s nejvyšším  $O_3NB$  ošetřením, kdy resorbce byla výrazně pomalejší. Celková délka těla ryb byla signifikantně ovlivňována  $O_3NB$  koncentrací během obou experimentů. Nejpomalejší růst ryb byl zaznamenán ve skupině s nejvyšší  $O_3NB$  koncentrací (ORP  $610 \pm 122$  mV) v porovnání ostatními skupinami (ORP  $192 \pm 40$  až  $392 \pm 134$  mV). Výsledky mikrobiologických analýz prokázaly snižující se množství mikroorganismů ve vodě se zvyšující se koncentrací  $O_3NB$ .

Na základě výsledků této studie lze  $O_3NB$  koncentrace v rozmezí ORP  $192 \pm 40$  až  $392 \pm 134$  mV, a to nejlépe v kombinaci s ošetřením S, doporučit pro odchov raných stádií (embryí a larev) pstruha duhového. S ohledem na nedostatek dostupných informací o účincích  $O_3NB$  v akvakultuře je potřeba výzkum testující tuto perspektivní technologii.

**Klíčová slova:** Dezinfekce vody, fyziologické vlastnosti, ontogeneze ryb, pstruh duhový.

## 9. Abstract

The aim of this bachelor thesis was to test the effects of different ozone nanobubble concentrations ( $O_3NB$ ), as a new perspective method of water disinfection in aquaculture, on early ontogeny (the embryonic and larval period) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in a hatchery with a pond water (i.e. organically polluted water) source.

During this work, two experiments with various  $O_3NB$  concentrations ranging from  $192 \pm 40$  to  $610 \pm 122$  mV ORP (group 1:  $192 \pm 40$ , 2:  $277 \pm 104$ , 3:  $392 \pm 134$  a 4:  $610 \pm 122$  mV) in combination with two different husbandry treatments (with/without removal of dead eggs and individuals) were conducted. In the first experiment (N, groups 1–4 N), unfertilized eggs and dead individuals were not collected, in contrast to the second experiment with collection of dead individuals (S, groups 1–4 S). Testing of the above groups (1–4 N/S) was performed in four replicates (aquariums A, B, C, D).

Hatching rate was higher in all tested groups of the experiment S. The highest hatching rate (approximately 75 %) was observed in groups 1S, 2S and 3S (ORP  $192 \pm 40$  to  $392 \pm 134$  mV ORP). Fish mortality rate was higher in all groups tested during the experiment N. The highest fish mortality rate (higher than 75 %) was observed in all groups 3N and 4N/S (ORP  $392 \pm 134$  to  $610 \pm 122$  mV). At hatching, the yolk sac volume negatively correlated with  $O_3NB$  concentration during both experiments. The yolk sac (as an energy source) was faster fully absorbed in fish reared in groups with lower  $O_3NB$  concentration in comparison with the highest  $O_3NB$  treatment, when the absorption was markedly slower. The total body length of fish was significantly affected by  $O_3NB$  concentration during both experiments. The slowest growth was recorded in group with the highest  $O_3NB$  concentration (ORP  $610 \pm 122$  mV) compared to other groups (ORP from  $192 \pm 40$  to  $392 \pm 134$  mV). The microbiological analyses showed decreasing amount of water microorganisms with increasing  $O_3NB$  concentration.

In summary, the  $O_3NB$  concentrations in range ORP  $192 \pm 40$  to  $394 \pm 134$  mV), ideally in combination with treatment S, can be recommended for rearing of early stages (embryos and larvae) of rainbow trout. Further research on  $O_3NB$  in aquaculture is highly required, as there is still a lack of information regarding this perspective technology.

**Keywords:** Physiological properties, fish ontogeny, rainbow trout, water disinfection.