

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybnářství a ochrany vod

Ústav akvakultury a ochrany vod

## Diplomová práce

# Využitie odpadovej vody z RAS pre produkciu mikrobiálneho proteínu

**Autor:** Bc. Patrik Sadloň

**Vedúci diplomovej práce:** Ing. Jan Mráz, Ph.D.

**Konzultant diplomovej práce:** Ing. Roman Lunda

**Študijný program a odbor:** Zemědělská specializace, Rybnářství a ochrana vod

**Forma štúdia:** Prezenčná

**Ročník:** 2.

České Budějovice, 2017

## Čestné prehlásenie

Prehlasujem, že svoju diplomovú prácu som vypracoval samostatne len s použitím prameňov a literatúry uvedených v zozname citovanej literatúry. Prehlasujem, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platnom znení, súhlasím so zverejnením svojej diplomovej práce, a to v neskrátenej podobe. Zverejnenie prebieha elektronickou cestou vo verejne prístupnej časti databáze STAG prevádzkovej Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jej internetových stránkach, a to so zachovaním môjho autorského práva k odovzdanému textu tejto kvalifikačnej práce. Súhlasím ďalej s tým, aby rovnakou elektronickou cestou boli v súlade s uvedeným ustanovením zákona č. 111/ 1998 Sb. zverejnené posudky školiteľa a oponentov práce i záznam o priebehu a výsledku obhajoby kvalifikačnej práce. Taktiež súhlasím s porovnaním textu mojej kvalifikačnej práce s databázou kvalifikačných prác Theses.cz prevádzkovanou Národným registrom vysokoškolských kvalifikačných prác a systémom odhalovania plagiátů.

V Českých Budějovicích 5. 5. 2017

.....  
Patrik Sadloň

## **Pod'akovanie**

Ďakujem svojmu vedúcemu Ing. Janovi Mrázovi, Ph.D. za odborné vedenie a konzultácie spojené s mojou diplomovou prácou. Ďalej by som chcel poďakovať svojmu konzultantovi Ing. Romanovi Lundovi, akademickým pracovníkom Laboratoře výživy: Mgr. Zuzane Linhartovej, Ph.D. a Ing. Petrovi Dvořákovi Ph.D. za cenné rady a pomoc s monitoringom vody v akváriovej miestnosti ako aj technikovi Ing. Vítězslavovi Pličkovi za jeho čas a pomoc. Ďakujem aj svojim priateľom a rodine, ktorá ma podporovala po celú dobu môjho štúdia na fakulte.

*Patrik Sadloň*

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Patrik SADLOŇ**  
Osobní číslo: **V15N012P**  
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**  
Studijní obor: **Rybářství a ochrana vod**  
Název tématu: **Využití odpadní vody z RAS pro produkci mikrobiálního proteinu**  
Zadávací katedra: **Ústav akvakultury a ochrany vod**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cílem diplomové práce bude vypracovat literární rešerši zaměřenou na problematiku produkce, kvality a možností využití odpadní vody z RAS a v praxi ověřit možnosti využití této vody pro produkci mikrobiálního proteinu.

V rámci vypracování DP bude v první řadě zpracována literární rešerše zaměřená na problematiku produkce, kvality a možností využití odpadní vody z RAS. Hlavní kapitoly budou zaměřeny na Kvalitu odpadní vody z RAS, Ekologické a ekonomické dopady jejího vypouštění, Možnosti jejího využití, Využití odpadní vody pro produkci mikrobiálního proteinu.

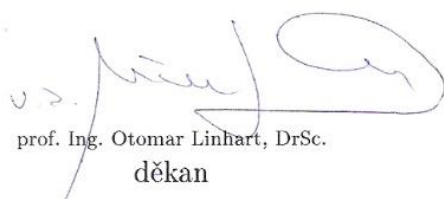
Hlavní náplní práce bude praktické sestavení modelového systému pro využití odpadní vody z RAS pro produkci mikrobiálního proteinu a ověření jeho fungování. Sledován bude především chemismus vody, rozvoj mikroflóry a reakce systému v závislosti na různých podmínkách a technologických zásazích. Zjištěná data budou porovnána s dostupnou literaturou. Na závěr bude provedeno komplexní zhodnocení sledovaného systému a budou navržena opatření pro jeho vylepšení.

Práce bude probíhat v laboratořích ÚAOV.

Práce bude finančně podporována projektem CENAKVA, cíl kvalita rybího masa.

Rozsah grafických prací: **podle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy: **50 - 70 stran**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury: **viz příloha**

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jan Mráz, Ph.D.**  
Ústav akvakultury a ochrany vod  
Konzultant diplomové práce: **Ing. Roman Lunda**  
Ústav akvakultury a ochrany vod  
Datum zadání diplomové práce: **11. prosince 2015**  
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2017**

  
prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.  
děkan

L.S.

  
Ing. Jan Mráz, Ph.D.  
ředitel

V Českých Budějovicích dne 8. ledna 2016

## Příloha zadání diplomové práce

### Seznam odborné literatury:

- Avnimelech, Y., 2012. *Biofloc Technology, A practical Guidebook*. 2d ed., World Aquaculture Society. 272 p.v
- Azim, M.E., Little, D.C., Bron, J.E., 2008. Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C:N ratio in feed and the implications for fish culture. *Bioresource Technology* 99: 3590-3599.
- Azim, M.E., Little, D.C., 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 283: 29-35.
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture* 356: 351-356.
- Ekasari J., Rivandi D.R., Firdausi A.P., Surawidjaja E.H., Zairin M., Bossier P., De Schryver P., 2015. Biofloc technology positively affects Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae performance. *Aquaculture* 441: 72-7.
- Furtado P.S., Campos B.R., Serra F.P., Klosterhoff M., Romano L.A., Wasielesky W., 2015a. Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared with biofloc technology (BFT). *Aquaculture International* 23(1): 315-27.
- Furtado P.S., Poersch L.H., Wasielesky W., 2015b. The effect of different alkalinity levels on *Litopenaeus vannamei* reared with biofloc technology (BFT). *Aquaculture International* 23(1): 345-58.
- Schrader, K.K., Green, B.W., Perschbacher, P.W., 2011. Development of phytoplankton communities and common off-flavours in a biofloc technology system used for the culture of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture Engineering* 45: 118-126.
- Valle B.C.S., Dantas E.M., Silva J.F.X., Bezerra R.S., Correia E.S., Peixoto S.R.M., Soares R.B.. 2015. Replacement of fishmeal by fish protein hydrolysate and biofloc in the diets of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture Nutrition* 21(1): 105-12.
- Wang G., Yua E., Xie J., Yu D., Li Z., Luo W., Qiu L., Zheng Z., 2015. Effect of C/N ratio on water quality in zero-water exchange tanks and the biofloc supplementation in feed on the growth performance of crucian carp, *Carassius auratus*. *Aquaculture* 443: 98-104.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Literárny prehľad .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Bioflok .....</b>	<b>10</b>
2.1.1	Flokulácia.....	12
2.1.2	Zloženie .....	12
2.1.3	Organizmy .....	15
2.1.3.1.	Krevety.....	15
2.1.3.2.	Tilapia .....	16
<b>2.2</b>	<b>Faktory ovplyvňujúce bioflok .....</b>	<b>16</b>
2.2.1	Premiešavanie vody .....	18
2.2.2	Rozpustený kyslík.....	18
2.2.3	Zdroj uhlíka.....	18
2.2.4	Dávkovanie organického uhlíka .....	19
2.2.5	Teplota .....	20
2.2.6	pH.....	20
2.2.7	Osvetlenie .....	20
<b>2.3</b>	<b>Ekonomické výhody BFT .....</b>	<b>21</b>
2.3.1	Zníženie FCR.....	21
2.3.2	Obsah proteínu.....	21
<b>2.4</b>	<b>Prevenia ochorení v BFT .....</b>	<b>22</b>
2.4.1	Probiotiká.....	23
2.4.2	Prebiotiká.....	23
<b>3</b>	<b>Materiál a metodika .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Modelový RAS.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2</b>	<b>Využitie odpadovej vody z RAS.....</b>	<b>27</b>
<b>3.3</b>	<b>BFT reaktor .....</b>	<b>27</b>
<b>3.4</b>	<b>Model čistiarne odpadových vôd (ČOV).....</b>	<b>28</b>
<b>3.5</b>	<b>Porovnanie uhlíkatých zdrojov .....</b>	<b>30</b>
<b>3.6</b>	<b>Test odozvy systému na pridanie uhlíkatého substrátu.....</b>	<b>31</b>
<b>3.7</b>	<b>Prvotný krmný pokus s použitím bioflok biomasy v krmive .....</b>	<b>31</b>
3.7.1	Sledované produkčné ukazovatele.....	32

<b>3.8</b>	<b>Sledované hodnoty .....</b>	<b>33</b>
3.8.1	Teplota, pH, kyslík.....	33
3.8.2	Zlúčeniny N .....	34
3.8.3	FVI.....	35
<b>3.9</b>	<b>Štatistika.....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Odpadová voda z RAS.....</b>	<b>36</b>
4.1.1	Analýza biologickej čistiteľnosti .....	36
4.1.2	Rozbor vody.....	37
<b>4.2</b>	<b>BFT reaktor .....</b>	<b>38</b>
4.2.1	Sledovanie BFT reaktoru .....	38
4.2.2	Nutričné zloženie biofloku.....	39
<b>4.3</b>	<b>Model čistiarne odpadových vôd .....</b>	<b>42</b>
<b>4.4</b>	<b>Porovnanie uhlíkatých zdrojov .....</b>	<b>43</b>
4.4.1	Fyzikálne chemické parametre vody .....	44
4.4.2	Analýza biofloku.....	49
<b>4.5</b>	<b>Test odozvy BFT systému na prídanie uhlíkatého substrátu.....</b>	<b>51</b>
<b>4.6</b>	<b>Prvotný krmný pokus s použitím bioflok biomasy v krmive .....</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>Diskusia .....</b>	<b>53</b>
<b>5.1</b>	<b>Odpadová voda.....</b>	<b>53</b>
<b>5.2</b>	<b>BFT reaktor .....</b>	<b>53</b>
<b>5.3</b>	<b>Model čistiarne odpadovej vody .....</b>	<b>56</b>
<b>5.4</b>	<b>Porovnanie uhlíkatých substrátov .....</b>	<b>57</b>
<b>5.5</b>	<b>Test odozvy systému.....</b>	<b>60</b>
<b>5.6</b>	<b>Prvotný krmný pokus s použitím bioflok biomasy v krmive .....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>Záver .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Zoznam použitej literatúry.....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>Zoznam príloh.....</b>	<b>76</b>
<b>9</b>	<b>Prílohy .....</b>	<b>77</b>
<b>10</b>	<b>Abstrakt.....</b>	<b>82</b>
<b>11</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>83</b>



# 1 Úvod

Recirkulačné akvakultúrne systémy sa vyznačujú vysokými obsádkami rýb a s tým je spojené aj veľké množstvo spotrebovaného krmiva. Ryby približne dve tretiny dusíku a fosforu obsiahnutého v potrave vylúčia a tie sú následne odstránené biologickou a mechanickou filtráciou. Je to neekonomické hospodárenie so živinami, ktoré v niektorých prípadoch prispieva k znečisťovaniu a zhoršovaniu kvality našich vôd. Preto treba hľadať spôsoby, ktorými by sme dokázali využiť väčší podiel látok z predkladaných krmív alebo znížili zaťaženie životného prostredia.

Jednou z možností na riešenie tohto problému by mohla byť aj technológia bioflok. Neskonzumované krmivo a metabolizmom vylúčené dusíkaté látky využijú baktérie k tvorbe novej biomasy, dochádza k tvorbe vločiek (anglicky flocc), ktoré môžu byť skonzumované rôznymi organizmami. Výsledkom toho je zníženie krmného koeficientu alebo fakt, že môžeme využívať krmivá s nižším obsahom proteínu. Bioflok nemusí byť umiestnený len v odchovných nádržiach. Baktérie sa môžu nachádzať aj na konci systému, v podobe reaktoru, a slúžiť k čisteniu odtekajúcej vody a prípadne aj ako zdroj biomasy k výrobe krmných zmesí.

Cieľom tejto diplomovej práce bolo stanovenie obsahu živín odpadovej vody z RAS, následné overenie možnosti jej čistenia za pomoci modelu čistiarne OV využívajúcej heterotrofné baktérie, experimentálne porovnať vplyv použitého uhlíkatého substrátu v počiatočnej fáze kultivácie baktérií a overenie použitia bioflok v krmive.

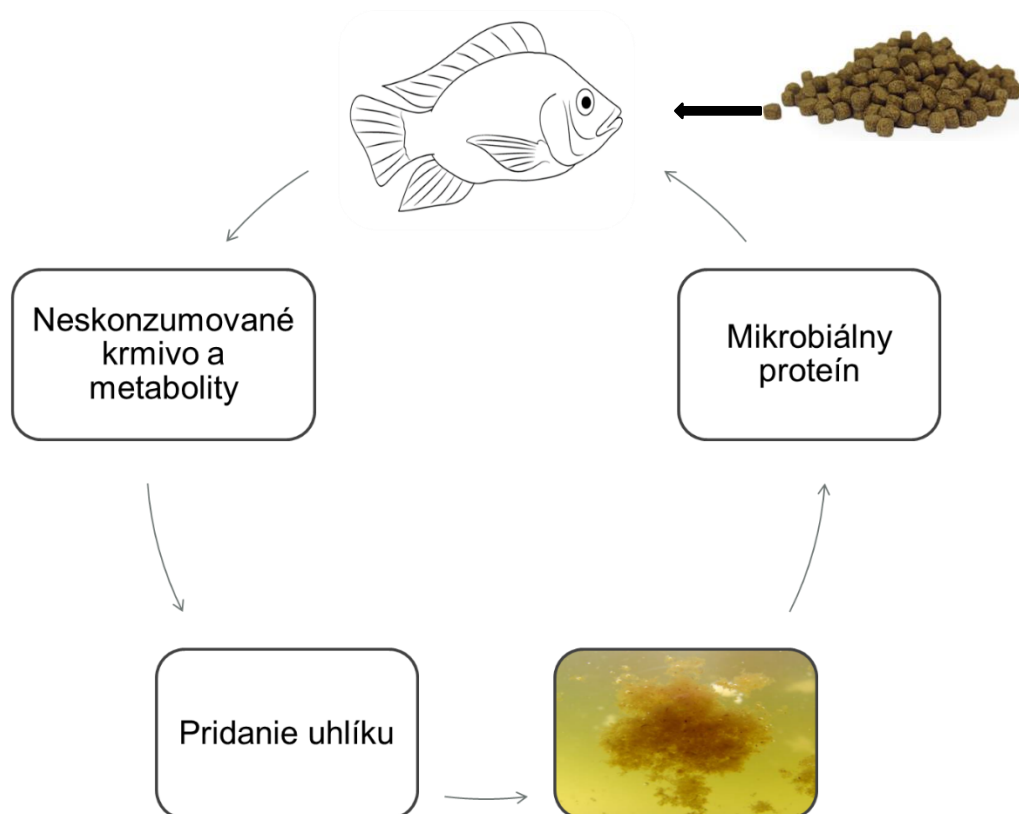
## 2 Literárny prehľad

### 2.1 Bioflok

Chované ryby zvyčajne využijú 20 – 25 % proteínu k syntéze proteínov. Zvyšok je využitý ako zdroj energie, vylúčený vo forme amoniaku a výkalov alebo zostáva v podobe neprijatej potravy. To môže viesť k zníženiu kvality vody (Piedrahita, 2003; Crab a kol., 2007). Vysoké koncentrácie amoniakálneho dusíka a dusitanov vo vode spôsobujú choroby alebo smrť chovaných organizmov (Yang a Qiu, 2006). Množstvo amoniaku vo vode môžeme znížiť jej čiastočnou výmenou, biofiltráciou, aeráciou alebo zmenšením kŕmnej dávky či obsádky (Thompson a kol., 2002). Ďalšou z metód je technológia biofloku (BFT) (Wang a kol., 2015), znázornená na obrázku 1. Tá je podľa Avnimelecha (1999) podmienená nulovou alebo minimálnou výmenou vody a posilnením rastu heterotrofných baktérií. Tie využívajú dusíkaté odpadové látky a zároveň slúžia ako potrava pre chované druhy (Avnimelech, 1999; De Schryver a kol., 2008). Za optimálnych podmienok je rýchlosť rastu heterotrofných baktérií na jednotku substrátu až desaťkrát vyššia v porovnaní s nitrifikačnými baktériami (Hargreaves, 2006) a spotreba kyslíka na premenu amoniaku na mikrobiálny proteín je nižšia (Avnimelech, 2006; Ebeling a kol., 2006).

Pomer uhlíka a dusíka (C:N) je vo väčšine mikrobiálnych bunkách 4 - 5. Keď sú baktérie kŕmené substrátom s väčšinovým podielom uhlíka a malým alebo minimálnym množstvom dusíka sú nútené prijímať dusík z okolitej vody, aby mohli produkovať proteín potrebný pre rast (Avnimelech, 2012). Udržanie optimálneho pomeru C:N je tak zásadné pre tvorbu a produkciu biofloku (Avnimelech, 2006). Goldman a kol. (1987) zistili, že pre optimálny rast heterotrofných baktérií potrebujeme minimálny pomer C:N 10 a Avnimelech (2012) udáva hodnotu 15 - 25.

Podľa Schneidera a kol. (2005), ak je pomer C:N vo vode dobre vybalansovaný, odpadové dusíkaté látky budú prevedené do bakteriálnej biomasy. V prípade použitého krmiva treba brať do úvahy, že so zvyšujúcim sa obsahom proteínu klesá pomer C:N, ako je uvedené v tabuľke 1 (De Schryver a kol., 2008; Avnimelech, 2012). Ak je v krmive málo C, pridaním karbohydrátov dôjde k stimulácii heterotrofných baktérií a tvorbe mikrobiálneho proteínu (Avnimelech, 1999).



**Obrázok 1:** Cyklus dusíka v bioflok systéme. Podávané krmivo je čiastočne pretransformované do biomasy rýb a čiastočne vylúčené v podobe amoniaku a nestrávených zvyškov. Pridanie zdroja uhlíka spolu s dusíkatými odpadovými látkami vedie k vzniku mikrobiálneho proteínu - biofloku, ktorý je konzumovaný chovanými organizmami.

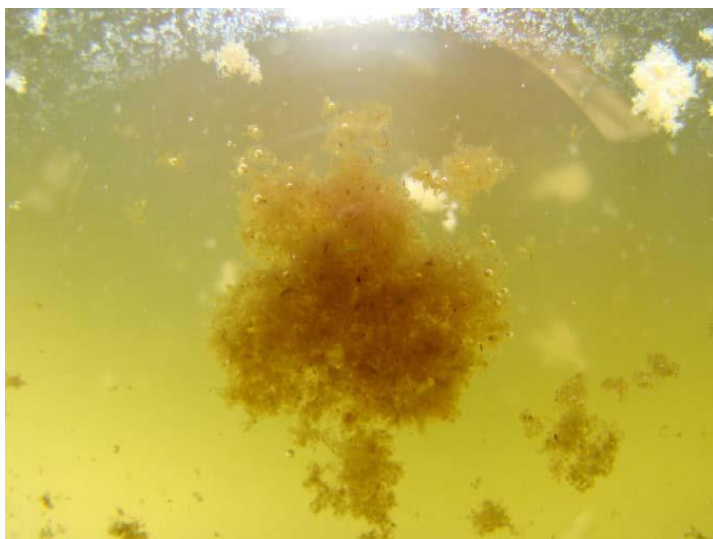
**Tabuľka 1:** Pomer C:N v krmive s rozdielnym obsahom proteínu (Avnimelech, 2012).

Obsah proteínu v krmive (%)	Pomer C:N
15	21,5
20	16,1
25	12,9
30	10,8
35	9,2
40	8,1

### 2.1.1 Flokulácia

Flokulácia mikrobiálnych spoločenstiev je zložitý proces. Dochádza tu ku kombinácii fyzikálnych, chemických a biologických javov, ale presné mechanizmy zostávajú stále nepoznané (Hantula a Bamford, 1991; Liu a fang, 2003). Crab a kol. (2009) uvádzajú, že pridaním vápnika do systému môžeme tento proces urýchliť.

Mikrobiálne vločky (obrázok 2) sa skladajú z heterogénnej zmesi vláknitých baktérií, častíc, koloidov, organických polymérov, kationov, mŕtvych buniek (Jorand a kol., 1995) a môžu dosiahnuť veľkosti až 1000  $\mu\text{m}$  (Chu a Lee, 2004). Madigan a Martinko (2006) uvádzajú, že veľkosť jednotlivých buniek sa pohybuje rádovo v 1  $\mu\text{m}$ . Vločky sú nepravidelného tvaru, rôznych rozmerov, sú ľahko stlačiteľné a dobre prepúšťajú vodu (až 99% pórovitosť) (Chu a Lee, 2004). Množstvo baktérií by podľa Avnimelecha (2012) malo byť  $10^6 - 10^9$  v 1  $\text{cm}^3$ .



**Obrázok 2:** Formovanie biofloku v nádrži (Prajith, 2011).

### 2.1.2 Zloženie

Pridanú hodnotu, ktorú bioflok prináša do akvakultúry je jeho potenciál využitia ako pridaného zdroja potravy. V súčasnosti sú najpoužívanejšími zložkami krmiva pre vodné organizmy rybia múčka a olej, ktoré podľa Watanabe (2002) poskytujú základné nutričné požiadavky vďaka ich optimálnemu zloženiu. Na vyprodukovanie jedného kilogramu rýb kŕmenými komerčne dostupnými kŕmivými zmesami musí byť z mora vylovených 1 – 5 kg rýb (Naylor a kol., 2000). Avnimelech (2006) a Hari a kol. (2006) tvrdia, že je to neudržateľný spôsob výroby potravín,

ktorý môže byť nahradený produkciou novej biomasy z nevyužitých živín. Tá bude potom slúžiť ako alternatívny zdroj potravy (Wang, 2003). Nutričné zloženie vložiek je preto z ekonomického a produkčného pohľadu veľmi dôležité (Watanabe, 2002). Väčšina chovateľov využíva kompletne kŕmne zmesi obsahujúce proteín (18 - 50 %), lipidy (10 - 25 %), sacharidy (15 - 20 %), popol (<8,5 %), fosfor (<1,5 %), vodu (<10 %) a stopové množstvá minerálov a vitamínov (Craig a Helfrich, 2002). Zloženie vyprodukovaných vložiek by malo byť podobné. Vysoký obsah proteínu, polynenasýtených mastných kyselín (PUFA) a lipidov sú najdôležitejšími parametrami určujúce využiteľnosť bioflokuly ako krmiva v akvakultúre.

Nutričné zloženie sa líši v závislosti od podmienok prostredia, zdroja uhlíka, salinity, hustoty obsádky, svetelnej intenzity, zloženia baktérií a iných (Kuhn a Lawrence, 2012), ako je znázornené v tabuľke 2 a rovnakú závislosť nachádzame aj v tabuľke 3, ktorá znázorňuje zloženie niektorých mastných kyselín. Z tabuľky 2 je taktiež zreteľné, že aj za použitia rovnakého substrátu môže byť zloženie odlišné.

**Tabuľka 2:** Zloženie bioflokuly v sušine podľa rozdielnych zdrojov (BNLV – bezdusíkaté látky výtlačkové).

Proteín (%)	BNLV (%)	Lipidy (%)	Vláknina (%)	Popol (%)	Substrát
49,0	36,4	1,13	12,6	13,4	Cukor <sup>1</sup>
30,4	29,1	0,5	0,8	39,2	Melasa, pšeničné otruby <sup>2</sup>
18,2 - 29,3	22,8 - 29,9	0,4 - 0,7	1,5 - 3,5	43,7 - 51,8	Melasa, pšeničné otruby <sup>3</sup>
28,0 - 30,4	18,1 - 22,7	0,5 - 0,6	3,1 - 3,2	35,8 - 39,6	Melasa, pšeničné otruby <sup>4</sup>
38,8	25,3	<0,1	16,2	24,7	sacharóza <sup>5</sup>
18,4 - 26,3	20,2 - 35,7	0,3 - 0,7	2,1 - 3,4	34,5 - 41,5	Melasa, pšeničné otruby <sup>6</sup>

1: (Kuhn a kol., 2009), 2: (Emerenciano a kol., 2012a), 3: (Emerenciano a kol., 2012d),

4: (Emerenciano a kol., 2012b), 5: (Kuhn a kol., 2010), 6: (Emerenciano a kol., 2012c)

**Tabuľka 3:** Zloženie vybraných mastných kyselín bioflokulu v biomase za využitia rôznych typov organického uhlíka a vody.

Mastná kyselina	% zastúpenie z celkového množstva mastných kyselín					
	Typ	Sladkovodný			Morský	
Miesto odberu	Bioreaktor			Bioreaktor		Nádrž s tilapiami
Zdroj C	Acetát	Glycerol	Glukóza	Glycerol	Glukóza	Pšeničná múka
C14:0	0,61	0,88	0,73	0,75	1,65	2,02 - 2,48
C15:0	0,92	0,37	0,49	0,45	0,46	0,7 - 0,77
C16:0	13,42	24,94	24,38	15,49	17,20	17,88 - 19,1
C16:1	24,41	5,43	8,13	2,69	4,37	7,15 - 7,74
C17:0	0,31	0,59	0,33	1,19	0,38	-
C18:0	3,05	5,87	9,75	10,96	10,69	6,24 - 7,27
C18:1 n-7	9,15	4,40	4,39	7,33	7,35	11,05 - 11,28
C18:1 n-9	10,98	27,88	29,26	21,07	22,02	8,51 - 10,08
C18:2 n-6	30,51	27,88	17,88	38,24	32,41	15,38 - 16,68
C18:3 n-3	0,24	0,73	3,25	0,37	0,54	0,65 - 0,73
C20:0	0,00	0,15	0,33	0,86	0,90	0,87 - 1,44
C20:1 n-9	0,31	0,15	0,16	0,03	0,16	0,74 - 0,8
C20:3 n-6	0,92	0,15	0,11	0,07	0,41	0,4 - 0,46
C20:4 n-6	4,27	0,44	0,33	0,10	0,46	3,11 - 3,55
C20:5 n-3	0,61	0,16	0,41	0,21	0,52	0,39 - 0,46
C22:6 n-3	0,31	0,00	0,08	0,17	0,49	0,74 - 0,77
SFA	18,30	32,79	36,00	29,71	31,27	30,2 - 34,92
MUFA	44,84	37,85	41,94	31,12	33,90	28,1 - 29,38
n-3 PUFA	1,16	0,89	3,74	0,75	1,55	1,38 - 1,91
n-6 PUFA	35,69	28,46	18,32	38,42	33,28	23,5 - 25,81
Podľa	1			2		3

1: (Crab a kol., 2010a), 2: (Ekasari a kol., 2010), 3: (Azim a Little, 2008).

### 2.1.3 Organizmy

Za najvhodnejšie organizmy pre BFT označuje Azim a Little (2008) detritovorné krevety a tilapie živiace sa filtrovaním potravy. Bakteriálne vločky boli v 80tych rokoch minulého storočia po prvýkrát využité v chove tilapií a v Belize o 10 rokov neskôr k chovu kreviet. Optimálne množstvo usadených vločiek (flock volume index, FVI) sa podľa Hargreavesa (2013) pre krevety pohybuje v rozmedzí 10 - 15 ml.l<sup>-1</sup> a pre tilapiu 25 - 50 ml.l<sup>-1</sup> ako je znázornené na obrázku 3. Avnimelech (2011) odporučuje pri poklese objemu vločiek pridať zdroj uhlíka a pri objeme nad 50 zvýšiť odstránenie kalov.



**Obrázok 3:** Imhofove kónusy na meranie biofloku ako častíc, ktoré sa usadia po 10 - 50 minútach (Hargreaves, 2013).

#### 2.1.3.1. Krevety

Komerčne chované krevety a garnáty:

Kreveta bielonohá (*Litopenaeus vannamei*)

Kreveta čierna (*Penaeus monodon*)

Kreveta banánová (*Fenneropenaeus merguensis*)

Kreveta obrovská (*Macrobrachium rosenberii*)

### 2.1.3.2. Tilapia

Tilapia patrí medzi druhy s celosvetovo najvyššou produkciou. Jej chov nie je zložitý a dokáže sa prispôbiť širokému spektru prírodných podmienok (Mjoun a kol., 2010). Väčšine tilapií nevadí vyššia salinita vody, aj keď ich tolerancia sa líši podľa druhov. Najmenej tolerantná voči salinite je T. nílka (18 ppt), ostatné druhy prežívajú aj pri salinite 36 ppt (El-Sayed, 2006). Podľa Rossa (2000) je optimálny rast dosiahnutý ak hladina rozpusteného kyslíka nepoklesne pod  $3 \text{ mg.l}^{-1}$ . Teplotu, ako faktor ovplyvňujúci metabolizmus, je doporučené držať v rozsahu  $22 - 29 \text{ }^\circ\text{C}$ . Rast sa spomaľuje pri poklese pod  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  a väčšina tilapií neprežije pokles teploty pod  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  (Mjoun a kol., 2010). Tolerancia k hodnote pH je široká,  $3,7 - 11$ . Ross (2000) za optimum uvádza pH  $7 - 9$ . Optimálna koncentrácia amoniaku by mala byť pod hodnotou  $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$  (El-Sherif a kol., 2008).

Najrozšírenejšie chované druhy:

Tilapia nílka (*Oreochromis niloticus*)

Tilapia mozambická (*Oreochromis mossambicus*)

Tilapia modrá (*Oreochromis aureus*)

## 2.2 Faktory ovplyvňujúce bioflok

Zachovanie optimálnych fyzikálno-chemických parametrov vody chovanej obsádky priamo ovplyvňuje jej rast a výťažok z jednotky objemu. To je dôležité, lebo Pérez-Rostro a kol. (2014) označujú bioflok v rybných podmienkach za akýsi jednoduchý a kompletný umelý ekosystém, ktorý pozostáva z obsádky jedného či viacerých druhov organizmov, mikrorias a baktérií. Účelom takéhoto ekosystému je ucelené využitie energie a biotransformácia produktov udržiavajúcich kvalitu vody a poskytujúcich prírodné živiny bez negatívneho ovplyvnenia priľahlých vodných tokov.

Pre aplikáciu bioflok systému je dobré mať vedomosti, ako podporiť tvorbu vločiek v aktivovanom kale. De Schriver a kol. (2008) uvádza, že údaje v tabuľke č. 4 môžu vyžadovať úpravu, nakoľko nižšie opisované parametre sú vzájomne prepojené a menia sa.



**Tabuľka č 4:** Prehľad hlavných parametrov ovplyvňujúcich vodu v BFT, štruktúru vločiek a ako s nimi možno manipulovať (upravené podľa De Schryver a kol., 2008).

<b>Parameter</b>	<b>Ovplyvnenie biofloku</b>	<b>Možnosti manipulácie</b>	<b>Vzťahuje sa na</b>
Intenzita premiešavania	- Štruktúra a veľkosť vločiek	- Výber na základe výkonu ( $W/m^3$ ) - Vzduchovacie zariadenie	- Množstvo rozpusteného kyslíka
Zdroj organického uhlíka (napr. glukóza, acetát, škrob, glycerol)	- Chemické zloženie vločiek - Zloženie vločiek (vláknité alebo vločky vytvárajúce baktérie)	- Druh org. uhlíka	- Dávkovanie organického uhlíka - Množstvo rozpusteného kyslíka
Dávkovanie organického uhlíka	- Chemické zloženie vločiek - Zloženie vločiek (vláknité alebo vločky vytvárajúce baktérie)	- Kŕmenie (kontinuálne/ v určitých intervaloch)	- Množstvo rozpusteného kyslíka
Rozpustený kyslík	- Zloženie vločiek (vláknité alebo vločky vytvárajúce baktérie) - Štruktúra vločiek	- Výber na základe výkonu - Vzduchovacie zariadenie - Produkcia vločiek	- Intenzita premiešavania - Zdroj org. uhlíka - Dávkovanie org. uhlíka
Teplota	Štruktúra vločiek	- Pridanie tepla	- Množstvo rozpusteného kyslíka
pH/ ionty	Stabilita vločiek	- Pridanie kyseliny/zásady	- Alkalitu - Vodivosť

### **2.2.1 Premiešavanie vody**

Intenzita premiešavania vody a veľkosť vločiek je závislá na zvolenom prevzdušňovacom zariadení (Chaignon a kol., 2002). Spotreba elektrickej energie v akvakultúre sa väčšinou pohybuje od 0,1 do 10 W.m<sup>-3</sup> (Boyd, 1998) a vo vysoko intenzívnych systémoch môže dosiahnuť až 100 W.m<sup>-3</sup>. Pri vyššej intenzite premiešavania dochádza k zmenšeniu priemernej veľkosti vločiek, pretože dochádza k ich rozbiťaniu na menšie, ako dokazuje aj výskum Biggsa a Lanta (2000).

### **2.2.2 Rozpustený kyslík**

Zmena v intenzite premiešavania, okysličovacím zariadením alebo výkonom priamo ovplyvní hladinu rozpusteného kyslíka. Ten je nevyhnutný pre metabolickú aktivitu vločiek, ale tiež má vplyv na ich štruktúru (Wilén a Balmer, 1999). Využitie a energetická výťažnosť krmiva metabolizmom mikrobov je nižšia v anaeróbnom prostredí ako za oxických podmienok (Reddy a kol., 1986). Väčšie a kompaktnšie vločky pri vyšších koncentráciách zaznamenali Wilén a Balmer (1999), aj keď to nemusí byť jednoznačná súvislosť. Martins a kol. (2003) to dáva za následok vláknitým baktériám, ktoré majú afinitu ku kyslíku. Jeho nižšia koncentrácia podľa Colta (2006) vedie k väčšiemu množstvu vločiek, no nesmie byť príliš veľké, aby nedochádzalo k ich stratám sedimentáciou alebo zanášaním žiabier. Torrains (2005) udáva, že nízka hladina kyslíka vedie k zníženiu príjmu krmiva a tým aj prírastku chovaných druhov.

### **2.2.3 Zdroj uhlíka**

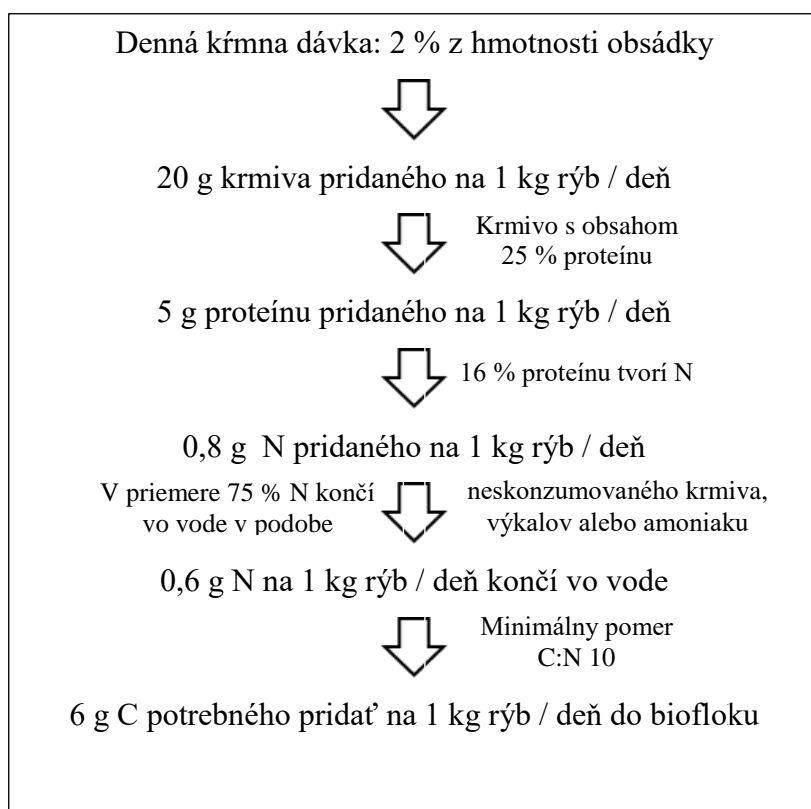
Bioflok poskytuje pridanú hodnotu vo výžive chovaných druhov. Viaceré štúdie však poukazujú na to, že kvalita vody a výživové vlastnosti sú do značnej miery ovplyvnené zdrojom uhlíka, ktorý bol použitý (Crab, 2010; Crab a kol., 2010a).

Pridávanie organického uhlíka je spojené s poklesom hladiny rozpusteného kyslíka vplyvom aeróbného mikrobiálneho metabolizmu. To môže viesť k (sub)letálnym následkom u citlivých druhov (Landman a kol., 2005). V takýchto prípadoch Avnimelech (1999) odporučuje kultiváciu heterotrofických baktérií v externej nádrži. Vločky z vedľajšej nádrže môžu byť presmerované do odchovných nádrží ako zdroj potravy, ale bez stresu z rozdielnych hladín kyslíka.

## 2.2.4 Dávkovanie organického uhlíka

Spôsob, akým je organický uhlík dávkovaný, je dôležitým faktorom. Vlákňité baktérie majú výhodu pri nízkych koncentráciách substrátu, to je spôsobené ich vyšším pomerom povrchu tela k objemu. Nevlákňité baktérie nedokážu vyrastať von z vložky a aj preto sú vystavené nižším koncentráciám uhlíka (Martins a kol., 2003). Organický uhlík môže byť pridávaný v malých dávkach, v podstate nepretržite alebo vo väčších dávkach, v pravidelných časových intervaloch. Salehizadeh a Van Loosdrecht (2004) označujú druhý spôsob za režim hostiny alebo nedostatku, ktorý vedie k prechodnému prístupu k substrátu. Mikrobiálna biomasa je nútená ukladať rezervy v podobe poly- $\beta$ -hydroxybutyrátu (PHB) v období nadbytku, aby tak mohla preklenúť periódu s nedostatkom živín. Za účelom tvorby PHB, ktorý poskytuje ďalšiu pridanú hodnotu pre bioflok (viď kapitola 2.4.2.) sa preto neodporúča kontinuálna aplikácia substrátu.

**Výpočet dávkovania** (upravené podľa Crab a kol., 2012):



### **2.2.5 Teplota**

Vplyv teploty na bioflok je podľa Wilena a kol. (2000) zložitý. Ten vo svojich pokusoch zistil, že pri nižších teplotách (4 °C) dochádza k rozpadu vločiek (deflokulácii) v porovnaní s vyššími teplotami (18 - 20 °C) vplyvom nízkej mikrobiálnej aktivity. Krishna a Van Loosdrecht (1999) pozorovali zväčšovanie objemu vločiek pri teplote 30 - 35 °C vplyvom zvýšenej produkcie extracelulárnych polysacharidov. Vo svojej práci tiež poukazujú na fakt, že bioflok pri 15°C obsahuje až o 75 % viac PHB ako vločky v 35°C prostredí. Na základe toho možno predpokladať, že optimálne podmienky pre rast heterotrofných baktérií sú 20 - 25 °C. Netreba ale zabúdať na fakt, že teplota ovplyvňuje množstvo rozpusteného kyslíka, rýchlosť rastu, koeficient konverzie krmiva a mortalitu chovaných organizmov (Boyd, 1998).

### **2.2.6 pH**

Hodnota pH by sa podľa Pérez-Rostro a kol. (2014) mala pohybovať v rozmedzí 6,5 - 9. Zmeny v pH určujú podľa Mikkelsena a kol. (1996) stabilitu bioflok systému, keďže so zvyšujúcim sa pH sa zvyšuje aj citlivosť k rozpadnutiu. Avnimelech (2012) označil tilapiu nílsku za ideálny druh do biofloku. VanGinneken a kol. (1997) uvádzajú, že sa dokáže prispôbiť pH 4 a Watanabe a kol. (2002) označili za extrémne hodnoty 5 a 11.

### **2.2.7 Osvetlenie**

Dalo by sa povedať, že BFT využíva dva systémy. Prvý je vystavený prirodzenému svetlu a predstavuje vonkajšie rybníky a nádrže, ako aj tie, ktoré sú umiestnené v skleníkoch. Premiešavanie rias a baktérií vedie k "zelenému" biofloku. Niektoré systémy sa nachádzajú v uzavretých budovách bez prístupu slnečného žiarenia. Využívajú tak len baktérie a pracujú s "hnedou" vodou. Zafarbenie vonkajších BFT je spojené aj s množstvom predkladaného krmiva. Kým pri dávke 100 - 200 kg.ha<sup>-1</sup> je voda zelená, zvýšenie na 300 - 500 kg.ha<sup>-1</sup> spôsobí hnedozelené sfarbenie a kŕmenie nad 600 kg.ha<sup>-1</sup> má za následok hnedé zafarbenie a bolo by potrebné pridať aeráciu (Hargreaves, 2013).

## 2.3 Ekonomické výhody BFT

Všetky organizmy, ktoré prijímajú potravu z nižšej trofickej úrovne ju premieňajú na energiu slúžiacu k pohybu a dosiahnutiu hmotnosti a rastu nových buniek (Avnimelech, 2012). Kontrola dusíkatých látok manipuláciou pomeru C:N je podľa Avnimelecha (1999) praktická a finančne nenáročná metóda kontroly anorganického dusíka vo vode.

BFT poskytuje udržateľnú akvakultúru tým, že redukuje vplyv na okolité prostredie a množstvo potrebnej vody k odchovu. Bioflok je viac ako len doplnkový zdroj živín, pretože poskytuje aj ekonomické výhody (Peréz-Rostro a kol., 2014).

### 2.3.1 Zníženie FCR

Konzumácia biofloku rybami a krevetami zlepšuje ich rýchlosť rastu (Wasiolesky a kol., 2006) a znižuje FCR spojovaný s ekonomikou chovu (Burford a kol., 2003). Avnimelech (2011) uvádza, že využitie BFT v chove kreviet môže znížiť FCR až o 30 %. Burford a kol. (2003) vo svojom pokuse zistili, že zloženie potravy *L. vannamei* v chove s využitím biofloku môže byť viac ako 29 %.

Avnimelech (2011) a Emerenciano a kol. (2013) uvádzajú, že v chove tilapií môže byť FCR znížené o minimálne 20 % v porovnaní s konvenčným chovom. Avnimelechovi (1999) sa podarilo s krmivom s obsahom 20 % proteínu a obohateného o uhlík v porovnaní s kontrolou (obsah 30 % proteínu) znížiť koeficient konverzie krmiva (FCR) o viac ako 20 %, znížiť koeficient konverzie proteínu (PCR) o 50 %, čo taktiež viedlo k zníženiu nákladov na vyprodukovanie 1 kg rýb o viac ako 30 %.

### 2.3.2 Obsah proteínu

Všetky druhy rýb potrebujú rovnaké množstvo proteínu na jednotku hmotnosti, ale herbivorné a omnivorné druhy využívajú rastlinné proteíny a oleje lepšie (Naylor a kol., 2000). Bioflok v porovnaní s konvenčnými systémami môže ušetriť až 30 % nákladov na čistení vody a zároveň potenciálny zisk z krmiva je vyšší, pretože chované organizmy podľa Avnimelecha (2012) prijímajú proteín dvakrát, raz s krmivom a potom v podobe mikrobiálneho proteínu.

Krmivá z nízkym obsahom proteínu alebo krmivá s alternatívnym zdrojom proteínu (sójová a pšeničná múka, rastlinný olej, melasa) boli úspešne aplikované v BFT, ako to dokazuje aj výskum Azima a Little (2008) vo vnútorných nádržiach s tilapiou. Ich pokus nepreukázal žiadny rozdiel v raste a produkcii v BFT systéme s využitím krmiva s obsahom proteínu 35 % a 24 %. U oboch skupín v porovnaní s kontrolou, nádrže bez BFT a krmivo s obsahom proteínu 35 %, bolo zistené o 30 % nižšie FCR (analýza mastných kyselín je uvedená v tabuľke č.3).

Emerenciano a kol. (2013) uvádzajú, že v krmive pre krevety môže byť nahradených až 40 % rybej múčky bioflokovou bez toho, aby to ovplyvnilo rast a kvalitu vody. Bauer a kol. (2012) vo svojom pokuse zistili, že nahradenie rybej múčky múčkou z mikrobiálnych vložiek a sójových proteínov v objeme 0 %, 25 %, 50 %, 75 % a 100 % nemalo žiadny vplyv na prežitie, SGR, FCR či PER.

Zvyšujúca sa spotreba rybej múčky viedla k hľadaniu po lacnejších a udržateľných proteínových zložkách, ktoré by mohli nahradiť rybiu múčku v krmivách pre akvakultúru (Salze a kol., 2010). Podľa Bauera a kol. (2012) by to mohli byť práve sójový proteín a múčka z mikrobiálnych vložiek, na ktorú by sa podľa Kuhna a kol. (2009) malo prihliadať vzhľadom k jej nutričnému zloženiu a relatívne nízkej cene v porovnaní s ostatnými zdrojmi proteínu.

## **2.4 Prevencia ochorení v BFT**

Bioflok poskytuje dve základné služby. Čistí vodu od zvyškov potravy (Hargreaves, 2013) a zlepšuje využiteľnosť živín a imunitu chovaných organizmov (Avnimelech, 1999; Azim a Little, 2008; Crab a kol., 2009, 2012; Wang a kol., 2015).

Rozvoj akvakultúry je spojovaný s rozmachom a rozšírením mnohých ochorení, prevažne bakteriálneho pôvodu, ktoré spôsobujú vysoké straty v chove (Kurath, 2008). Rozličné pomocné látky, vrátane probiotík a prebiotík, ktoré majú priaznivý účinok na hostiteľa, boli v akvakultúre využité v boji proti chorobám ako doplnok na zlepšenie rastu, zvýšenie prírastku hmotnosti a niekedy aj ako antimikrobiálne látky (Irianto a Austin, 2002).

### 2.4.1 Probiotiká

Probiotiká sú živé mikrobiálne kultúry, ktoré užitočne ovplyvňujú hostiteľa tým, že zlepšujú vyváženosť jeho črevnej mikroflóry (Khan a Naz, 2013), inhibujú patogény a stimulujú imunitný systém (Nayak, 2010). V súčasnosti máme probiotické produkty, ktoré obsahujú druhy *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. a *Carnobacterium* spp. (Cruz a kol., 2012).

Singh a kol. (2011) udávajú, že dôležité kritérium pre výber probiotického druhu je, aby nebol patogénom a nemal toxické vlastnosti. Schopnosť prežiť cestu gastrointestinálnym traktom, prichytiť sa a kolonizovať epitel čreva, je dôležité pri úspešnom tlmení a kompetitívnom vylúčení patogénu (Maury a kol., 2014). Dôležitá je aj stabilizácia črevnej mikroflóry (Parvez a kol., 2006), ako aj produkcia antimikrobiálnych látok, ako bakteriocín proti patogénom (Kral a kol., 2012).

Vonkajším prejavom, ako pôsobí bioflok voči patogénom, sa zdá byť kompetícia o miesto, substrát a živiny. Napríklad dusík, vyžadovaný heterotrofnými baktériami aj *Vibrio sp.*, limituje ich rast. Vplyv taktiež môžu mať rozdielne zdroje uhlíka, svetelná intenzita či inhibičné látky vylučované BFT, ale o tom sú len limitované informácie (Emerenciano a kol., 2013).

### 2.4.2 Prebiotiká

Prebiotiká sú nestráviteľné zložky potravín, ktoré priaznivo ovplyvňujú hostiteľa tak, že stimulujú rast a (alebo) aktivitu jednej či viacerých baktérií v hrubom čreve. Môže tak dochádzať k zmene v zložení črevnej mikroflóry vplyvom zvýšenia počtu jedinečných baktérií (Akhter a kol., 2015). Vplyvom prospešných komenzálnych baktérií, ktoré kvasia, sú tvorené vedľajšie produkty prospešné pre zdravie hostiteľa (Choque-Delgado a kol., 2011). Prebiotiká sú využité ako zdroj energie pre črevné baktérie a podľa Songa a kol. (2014) ich môžeme označiť za funkčné sacharidy.

Bioflok nemusí byť považovaný za dôležitý len z hľadiska nutričného (De Schryver a kol., 2008), ale podľa Defoirdta a kol. (2007) môže byť dôraz kladený aj na produkt vytvárajúci zásoby, PHB. Je to biologicky odbúrateľný polymér, z triedy polyesterov, patriaci medzi polyhydroxyalkanoáty (PHA) (Sinha a kol., 2008). Defoirdt a kol. (2007) vo svojich pokusoch s PHB preukázali jeho preventívnu alebo liečebnú ochranu *A. franciscana* pred infekciou rodu *Vibrio*. PHB je syntetizovaný a kumuluje sa v prostredí s rast limitujúcimi faktormi (dusík, fosfát, síra, kyslík, horčík)

a zároveň s prebytkom uhlíka (Salehizadeh a Van Loosdrecht, 2004). Antibakteriálny účinok PHA ešte podľa Sinha a kol. (2008) nie je dobre pochopený. Nakoľko by sa mohli správať podobne ako mastné kyseliny s krátkym reťazcom (short chain fatty acids, SCFAs), mechanizmus ich účinku môže byť rôzny:

- zníženie pH - zatiaľ čo klesá hodnota pH, zvyšuje sa antibakteriálna aktivita (Ricke, 2003)
- spomalenie rastu patogénu pôsobením na štruktúru a permeabilitu bunečnej membrány, ako aj nestabilitou rovnováhy vnútorných protónov, znížením ATP a vyčerpaním bunečnej energie (Russel, 1992)
- regulácia prejavu virulencie od nižšej úrovne na vyššiu a pozitívne ovplyvňovanie črevnej mikroflóry zvierat (Teitelbaum a Walker, 2002).

Ako bolo zmienené vyššie, heterotrofné baktérie, ale aj iné mikroorganizmy, napr. *Bacillus sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Pseudomonas sp.*, obsahujú poly- $\beta$ -hydroxybutyrát (PHB) (Sinha a kol., 2008). U PHB sa predpokladá, že sa rozkladá v žalúdku (Yu a kol., 2005; Defoirdt a kol., 2007) a má podobné antibakteriálne vlastnosti ako mastné kyseliny s krátkym reťazcom, SCFAs (Emerenciano a kol., 2013). Tie za obzvlášť zaujímavé považujú De Schryver a kol. (2008), keďže prevencia a kontrola ochorení viedla v posledných rokoch k značnému zvýšeniu používania liečiv a tým aj k rezistencii patogénov (Yousefian a Amiri, 2009).



## 3 Materiál a metodika

### 3.1 Modelový RAS

V budove Fakulty rybárství a ochrany vod, Na Sádkách, sa v akvarijnej miestnosti nachádza recirkulačný systém slúžiaci k výuke a pokusom (obrázok 4). Celkový objem je približne 16 m<sup>3</sup> a k odchovu rýb je využitých približne 8 000 l vody v 10 kruhových nádržiach, vyrobených z polypropylénu. Systém sa ďalej skladá z mechanického filtra (veľkosť ôk 60 µm), skrúpaného biofiltra (elementy AQ - 14KLL, z HDPE), retenčných nádrží, prečerpávacej nádrže, rozvodov vody, vzduchu a ďalších zariadení. Biofilter tvorí 80 kusov záhradníckych prepravných debničiek, objem elementov by mal predstavovať 2 720 l s celkovou plochou 2143 m<sup>2</sup>. Filter je navrhnutý s dvakrát väčšou kapacitou kvôli ochrane systému.



**Obrázok 4:** Modelový RAS systém v budove Na Sádkách (foto: autor).

V RAS boli chované dva teplomilné druhy: tilapia nílska a sumček africký (*Clarias gariepinus*). Dávka krmiva bola 1,5 - 4 % hmotnosti biomasy obsádky. Pre sumčeka bolo využité krmivo Clarias BQ a pre tilapiu COPPENS Pearl EF v odpovedajúcej veľkosti. Zloženie krmiva je uvedené v tabuľke 5. Od septembra boli ryby kŕmené jedenkrát denne záchovnou dávkou.

Straty vody v systéme mohli byť podľa množstva dopĺňanej vody 500 až 800 l za deň (cca 3 - 5 %). Odpadová voda z mechanického filtra sa s kalom akumulovala v nádrži A (obrázok 5), kde kal čiastočne sedimentoval a čiastočne flotoval a voda pretekala do nádrže B. Táto voda (cca 45 l) sa jedenkrát denne prečerpávala do modelu čističky odpadových vôd. Po zvyšok dňa sa voda zbavená sedimentáciou väčšiny nerozpustených látok vracala naspäť do časti RASu, odkiaľ je pred čistená voda prečerpávaná k biologickej filtrácii.

**Tabuľka 5:** Zloženie krmiva chovaných rýb, Clarias BQ (BQ), Pearl EF (EF).

Analytické zložky (%)					
	BQ	EF		BQ	EF
hrubý proteín	45	37	hrubý popol	8,8	9,6
hrubé oleje a tuky	12	10	vlhkosť	8	
hrubá vláknina	1,4	3,9	vápnik	1,1	2,3
Nutričné aditíva					
	BQ	EF		BQ	EF
vitamín A (E 672) (U.kg <sup>-1</sup> )	15 000	10 000	meď (E4) (mg.kg <sup>-1</sup> )	3	4,9
vitamín D3 (E 671) (U.kg <sup>-1</sup> )	2 300	2 600	železo (E1) (mg.kg <sup>-1</sup> )	24	73
vitamín E (E 700) (mg.kg <sup>-1</sup> )	200	200	mangán (E5) (mg.kg <sup>-1</sup> )	0,3	
vitamín C (mg.kg <sup>-1</sup> )	150	150	zinok (E6) (mg.kg <sup>-1</sup> )	31	25



**Obrázok 5:** Nádrž k separácii nerozpustených látok (A) a k akumulácii odpadovej vody (B) (foto: autor).

## 3.2 Využitie odpadovej vody z RAS

S cieľom zistenia kvality odpadovej vody z RAS a jej zloženia boli dňa 11. 08. 2016 odobrané a zaslané dve vzorky do spoločnosti ASIO, spol. s. r. o., zaoberajúca sa čistením, úpravou vody a čistením vzduchu. Na prijatých vzorkách bola najskôr vykonaná vstupná analýza a sedimentačný test. Sedimentácia bola vykonaná v laboratórnych podmienkach. Vzorka vody o objeme 1,5 l bola preliata do kadičky o objeme 2 000 ml, kde sa následne pozorovala sedimentácia, prípadne spontánna flotácia kalu. Vzorka použitá k analýze vody bola odobratá po 60 minútach.

K stanoveniu dusíkatých látok, živinového zloženia, minerálov a kovov bola vzorka vody odoslaná do spoločnosti AGRO-LA, spol. s.r.o. Pre porovnanie sa odobrali aj vzorky vody z chovných nádrží a vody využívanej k dopĺňaniu systému.

## 3.3 BFT reaktor

V akvarijnej miestnosti v budove Na Sádzkách sa nachádza nádrž o objeme 1,5 m<sup>3</sup>, ktorá bola naplnená cca 1 300 l vody a slúži ako model BFT. Obsádku nádrže tvorila tilapia nílska (cca 20 kg) a jej denná krmná dávka bola 1,5 % hmotnosti biomasy. Do systému sa ďalej pridávalo 100 g pšeničnej múky a jedlá sóda podľa potreby.

Keď FVI presiahol hodnotu 110 ml.l<sup>-1</sup> (odporúčané hodnoty udávané pre tilapiu sú 20 – 50 ml.l<sup>-1</sup>) a kyslík sa dostal pod úroveň 50 % nasýtenia pristúpilo sa k odčerpaniu kalu, kým FVI nekleslo na 20 - 50. Za týmto účelom bola využívaná modifikovaná 50 l nádoba. Voda z chovnej nádrže sa prečerpávala do nádoby znázornenej na obrázku 6. K tomu sa využívalo čerpadlo NEW JET 1200. V tomto kýbli bez vzduchovania dochádzalo k sedimentácii ako v Imhoffovom kónuse. Kal bol následne prepustený do debničky, ktorej dno tvoril uhel. Tu dochádzalo k odstráneniu prebytočnej vlhkosti a kal bolo možné následne zmraziť.

Vzorky tohto kalu boli poslané na rozbor aminokyselín, ťažkých kovov a nutričného zloženia do spoločnosti AGRO-LA, spol. s.r.o. Nepresnosť všetkých výsledkov je vyjadrená ako rozšírená neistota koeficientom  $k = 2$ , pre hladinu významnosti 95 %. Uvedené hodnoty nezahrňujú chybu, ktorá mohla vzniknúť pri vzorkovaní.



**Obrázok 6:** Systém využívaný k odčerpávaniu kalu z BFT (foto: autor).

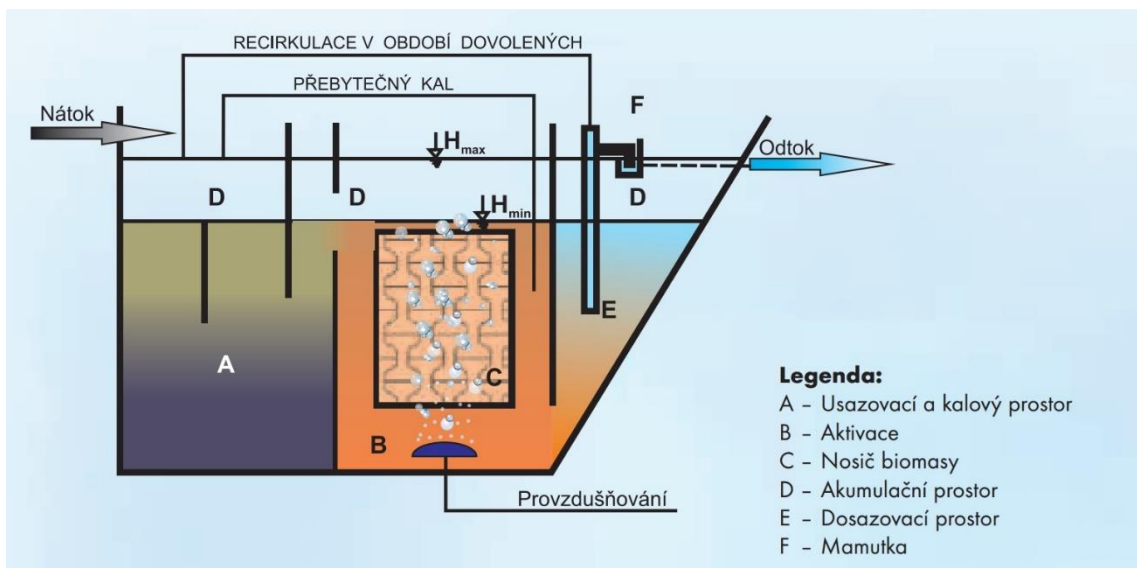
### 3.4 Model čistiarne odpadových vôd (ČOV)

Model čistiarne (obrázok 7) je zostavený podľa vzoru čistiarne odpadových vôd AS -VARIOcomp K (obrázok 8) od spoločnosti ASIO, spol. s. r. o., ale neobsahoval nosič biomasy. Model ČOV je vyrobený z polypropylénu a jeho objem je približne 250 litrov.

Odpadová voda priteká do egalizačného (usadzovacieho) priestoru, kde látky v nej obsiahnuté sú podrobené anaeróbnemu rozkladu. Voda následne preteká do aktivačnej časti. Na dne nádrže sa nachádza prevzdušňovací systém napojený na vzduchovacie zariadenie. Aktivovaná zmes následne vteká do dosadzovacej časti. Vyčistená voda vo vrchnej časti odteká do odtokového žľabu. Sedimentujúce vločky prepadávajú otvorom v spodnej časti späť do aktivačnej časti. Výhodou tohto systému je veľký akumulčný priestor, ktorý zabezpečuje rovnomerný odtok vody.



**Obrázok 7:** Model čistiarne odpadových vôd (foto: autor).



**Obrázok 8:** Čistiareň odpadových vôd AS -VARIOcomp K (Int. odkaz 1).

### 3.5 Porovnanie uhlíkatých zdrojov

Cieľom tohto pokusu bolo porovnať 4 uhlíkaté zdroje: pšeničná múka, monohydrát dextróza (glukóza), octan sodný a glycerol, ktoré by mohli byť využité pri čistení odpadovej vody z RAS. Kultivačný pokus prebiehal v akvarijnej miestnosti v budove ZR Na Sádzkach. 12 nádob o objeme 50 l bolo rozdelených na 4 skupiny: múka, glukóza, octan, glycerol a označené a – c (obrázok 9). Východiskový objem pre náš experiment bol určený na 45 l. 25 l objemu tvorila pitná voda a 20 l voda z RAS (inokulum). K vzduchovaniu boli použité 2 zariadenia od firmy AirMac (DBMX80, 88 W).

Krmná dávka bola stanovená na 5 g krmiva Pearl EF. K dosiahnutiu pomeru C:N 15 a obsahu C v substráte sa pridávalo 5 g múky, 5 g glukózy, 7 g octanu a 15 ml glycerolu. K udržaniu stabilného pH sa pridávalo 1,25 g jedlej sódy (dávka 250 g na 1 kg aplikovaného krmiva). K vážaniu boli využívané laboratórne váhy KERN 440-35A s presnosťou na 2 desatinné miesta.

Dĺžka pokusu bola stanovená na 28 dní. Hodnoty ako pH, teplota vody a obsah kyslíka boli merané každé ráno pred aplikáciu krmiva a substrátu. FVI bolo merané každé 3 dni a obsah dusíkatých látok raz za týždeň.

13. 12. 2016 bol na vybraných reaktoroch ešte vykonaný dodatočný pokus a v stredu 14. 12. bolo vo všetkých skupinách vypnuté vzduchovanie po dobu 2 hodín. Vrchná, čistá vrstva vody bola odpustená do kanalizácie. Zvyšná voda s vločkami bola za jednotlivé opakovania zmiešaná do jednej nádoby, do ktorej bolo opätovne zavedené vzduchovanie aby došlo k homogenizácii a zamedzilo sa anoxickým podmienkam. Nasledujúci deň sa vyplo vzduchovanie. Po niekoľkých hodinách sa odčerpala z vrchu voda, určil približný objem vločiek a odobrali vzorky na analýzu a k vyhotoveniu fotiek za pomoci mikroskopu Olympus SZX16 v programe Quick photo camera. Bioflok k analýze bol odobraný do uzatvárateľných 5l nádob a následne zmrazený.



**Obrázok 9:** Usporiadanie nádob pri hlavnom pokuse (foto: autor).

### **3.6 Test odozvy systému na pridanie uhlíkatého substrátu**

Deň po ukončení pokusu s porovnávaním substrátov, t. j. 13. 12. 2016, bol na štyroch reaktoroch označených písmenom „ a “ vykonaný dodatočný pokus na zistenie času potrebného na spracovanie pridaného amoniakálneho roztoku. Do všetkých skupín bolo pridané rovnaké množstvo vodného roztoku amoniaku a príslušné množstvo substrátu. Pre tento pokus bol použitý vyšší pomer C:N a to 25. Po 5 minútach od pridania (T: 0) došlo k prvému odberu vody. K ďalšiemu vzorkovaniu dochádzalo pravidelne každú hodinu.

### **3.7 Prvotný kŕmny pokus s použitím bioflok biomasy v krmive**

K experimentu bolo použitých 2 700 ks (+ 1 000 ks rezerva) juvenilných amurov bielych (*Ctenopharyngodon idella*) z odchovu Klatovského rybárství a.s. Veľkosť rýb pri výlove bola  $2,4 \pm 0,6$  g. Ryby boli následne prevezené a odchovávané cca 30 dní v karanténnom objete rybej liahne BaHa – Mydlovary, odkiaľ boli transportované do RAS systému v budove ZR Na Sádzkách. Pred nasadením a v priebehu odchovu boli vykonávané preventívne kúpele vo formaldehyde ( $0,02 \text{ ml.l}^{-1}$ ) a NaCl ( $10 \text{ g.l}^{-1}$ ).

Mikrobiálny proteín bol získaný z modelového BFT reaktoru za pomoci jednoduchšej sedimentácie (vid' kapitola 3.3), vysušený v sušiarne (80 °C, min 24 h.), následne vákuovo zabalený a zmrazený. Po získaní dostatočného množstva sa vzorky sušeného biofloku primiešali do zošrotovaného krmiva Pearl EF v množstve 25 % alebo 50 % a boli dostatočne premiešané. Táto zmes bola následne mierne navlhčená a studenou extrudáciou, za pomoci extrudéru Soga, s pohonom IEC 60034-1, boli vyrobené nové pelety o veľkosti 2 mm, ktoré sa 24 h sušili v sušiarne a potom vákuovo zabalili. Približné zloženie použitých krmív vypočítané na základe informácie od dodávateľa a analýzy BFT je uvedené v tabuľke 6.

Ryby boli rozdelené do troch skupín v troch opakovaníach, každá 300 ks, podľa použitého krmiva. Skupina 1 obsahovala prímies 50 % BFT, skupina 2 obsahovala 25 % BFT, skupina 3 bola kŕmená komerčne vyrábaným krmivom bez pridaného BFT a slúžila ako kontrola. Kŕmna dávka tvorila 3 % hmotnosti obsádky a bola rozdelená do 3 menších dávok.

Experiment bol predčasne ukončený z dôvodu ochorenia chovaných sumčiekov a nevyhnutnej dezinfekcie celej miestnosti, vrátane RAS.

**Tabuľka 6:** Predpokladané zloženie krmiva na základe nutričného zloženia Pearl EF a biofloku.

<b>Zložka</b>	<b>EF + 0 % BFT</b>	<b>EF + 25 % BFT</b>	<b>EF + 50 % BFT</b>
proteín	37	36,3	35,7
lipidy	10	9,0	8,1
vláknina	3,9	5,0	6,0
popol	9,6	13,2	16,8
BNLV	39,5	36,5	33,4

### **3.7.1 Sledované produkčné ukazovatele**

Štandardná dĺžka tela (SL) – meraná od hrotu ryepca po koniec chvostového násadca v mm.

Priemerná kusová hmotnosť – hmotnosť jednotlivých rýb v skupine v g.

Prežitie – percento rýb odlovených na konci experimentu.

Koeficient konverzie krmiva (FCR) – vyjadruje spotrebované krmivo na 1 kg prírastku obsádky.

Špecifická rýchlosť rastu (SGR) – denný prírastok hmotnosti rýb za sledované obdobie.



$$FCR = \frac{F}{W_t - W_0}$$

$$SGR = \frac{(\ln W_t - \ln W_0)}{t} \times 100 [\%.deň^{-1}]$$

F – spotreba krmiva

$W_t$  – hmotnosť na konci obdobia

$W_0$  – hmotnosť na začiatku obdobia

t – dĺžka sledovaného obdobia v dňoch

### 3.8 Sledované hodnoty

#### 3.8.1 Teplota, pH, kyslík

K meraniu základných fyzikálno-chemických parametrov ako pH, teplota vody a obsah kyslíka v percentách bol použitý multimeter HI 98194 od HANNA instruments znázornený na obrázku 10.



**Obrázok 10:** Multimeter HI 98194 (foto: autor).

### 3.8.2 Zlúčeniny N

K určovaniu koncentrácií amoniaku, dusitanov a dusičnanov boli využité prístroje HI 83200 Multiparameter Photometer (obrázok 11) a HI 83203 Aquaculture Photometer od firmy HANNA instruments.

Všetky vzorky bolo nutné pred analýzou prefiltrovať a nariediť. Sfarbenie vody a nerozpustené látky by mohli spôsobiť nepresné výsledky. K meraniu koncentrácií **amoniaku** sa používala funkcia Ammonia LR (Low Range - nízky rozsah). Pri tomto nastavení meria fotometer v rozsahu 0,00 – 3,00 mg.l<sup>-1</sup> s presnosťou ± 0,04 mg.l<sup>-1</sup>. K tomuto testu sa využívajú činidlá HI 93700A-0 a HI 93700B-0. Test trvá 3 minúty a 30 sekúnd. Prístroj nepozná teplotu a pH vody, preto je nutné pracovať s hodnotami NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Tie prenásobíme riedením, ktoré sme vykonali a následne hodnotou 0,78; čo odpovedá prepočtu NH<sub>4</sub><sup>+</sup> na N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>+NH<sub>3</sub> (TAN). Z výslednej hodnoty a tabuľky závislosti obsahu NH<sub>3</sub> v percentách celkového amoniaku na pH a teplote vody vieme dopočítať koncentráciu NH<sub>3</sub> v našom vzorku.

K stanoveniu **dusitanov** sme používali metódu Nitrite LR. Tá umožňuje zistiť koncentráciu v rozsahu 0,00 – 1,15 s presnosťou ± 0,06 mg.l<sup>-1</sup>. K testu sa využíva reaktant HI 73707-0 a výsledok získame za 6 minút.

**Dusičnany** zistíme metódou s názvom Nitrate. Prístroj meria rozsah koncentrácie 0,0 – 30,0 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup> s presnosťou 0,5 mg.l<sup>-1</sup>. K stanoveniu potrebujeme reaktant HI 73728-0. Test trvá 4 minúty a 30 sekúnd.

Návody a pracovné postupy možno stiahnuť v českej podobe na stránkach: [www.hanna-instruments.cz](http://www.hanna-instruments.cz) po vyhľadani príslušného prístroja.



Obrázok 11: HI 83200 Multiparameter Photometer, kyveta a reakčné činidlá (foto: autor).

### **3.8.3 FVI**

Objem usadených vločiek, označovaný aj ako Flock volume index (FVI) bol meraný za pomoci Imhoffovho kónusa. Do kónusa sa naleje 1 l vody a následne sa umiestni do stojana. S tým sa po dobu 20 minút nijako nemanipuluje, aby častice a baktérie mohli sedimentovať. Po tejto dobe by malo byť možné na stupnici odčítať koncentráciu látok v nádrži v ml.l<sup>-1</sup>.

## **3.9 Štatistika**

Všetky dáta boli spracované za pomoci programu MS Excel 2013. Hodnoty sú uvedené ako priemer  $\pm$  smerodajná odchýlka. Rozdiely v meraniach medzi jednotlivými skupinami boli vyhodnotené pomocou jednofaktorovej ANOVY s následným Post-hoc, Tukey HSD testom. Za signifikantnú bola pri všetkých porovnávaniach hodnota  $p < 0,05$ . Analýzy boli vykonané za pomoci programu STATISTICA 12.

## 4 Výsledky

### 4.1 Odpadová voda z RAS

#### 4.1.1 Analýza biologickej čistiteľnosti

Analýza bola vykonaná pre nasledujúce vzorky:

- Vzorka 1 – Odpadová voda s obsahom sedimentu a flotátu, homogenizovaná
- Vzorka 1 po prostej sedimentácii a spontánnej flotácii 60 min
- Vzorka 2 - Odpadová voda s obsahom sedimentu, bez flotátu, homogenizovaná
- Vzorka 2 po prostej sedimentácii a spontánnej flotácii 60 min

Výsledky vstupnej analýzy sú uvedené v tabuľke 7. Ďalšie vzorky boli odobraté až po sedimentačnom teste. Po 60 minútach bol všetok kal zo vzorku 2 sedimentovaný na dne. U prvého vzorku bolo pozorované malé množstvo flotovaného kalu.

Tabuľka 7: Vstupná analýza základných parametrov odpadovej vody.

Označenie	pH	CHSK <sub>Cr</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	BSK <sub>5</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	N-NH <sub>4</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>3</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	N <sub>celk.</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	NL (mg.l <sup>-1</sup> )
Vzorka 1	6,72	21 684	8 000	19,0	37,9	505	14 632
Vzorka 2	5,72	15 302	5 700	25,6	85,2	491	7 520

Zoznam použitých metód je uvedený v prílohe 3.

Po sedimentácii došlo u **vzorky 1** k separácii 96 % nerozpustených látok (NL). Došlo tak k odstráneniu 80 % celkového dusíka, 84 % CHSK<sub>Cr</sub> a 76 % BSK<sub>5</sub>. Sedimentovaný kal obsahoval 93 % organických látok a 4,9 % sušiny.

Vo **vzorke 2** bolo sedimentáciou odstránených 87 % nerozpustených látok. Celkový dusík bol odstránený z 59 %, CHSK<sub>Cr</sub> zo 60 % a BSK<sub>5</sub> z 58 %. 28,9 % organických látok a 3,8 % sušiny bolo obsiahnutých v sedimentovanom kale. Kompletné výsledky sa nachádzajú v prílohe 1 a 2 spolu so zoznamom použitých metód.

#### 4.1.2 Rozbor vody

V tabuľke 8 je uvedená analýza rozboru vody z recirkulačného systému, odpadovej vody z mechanického filtra a vody používanej k dopĺňaniu systému (vodovodná voda). Uvedené výsledky môžu obsahovať chybu 5 % a nezahrňujú chybu, ktorá mohla vzniknúť pri vzorkovaní.

**Tabuľka 8:** Vyhodnotenie rozboru vody: RAS (voda z odchovnej nádrže RAS), ČOV (odpadová voda z mechanického filtra), Prítok (voda k dopĺňaniu).

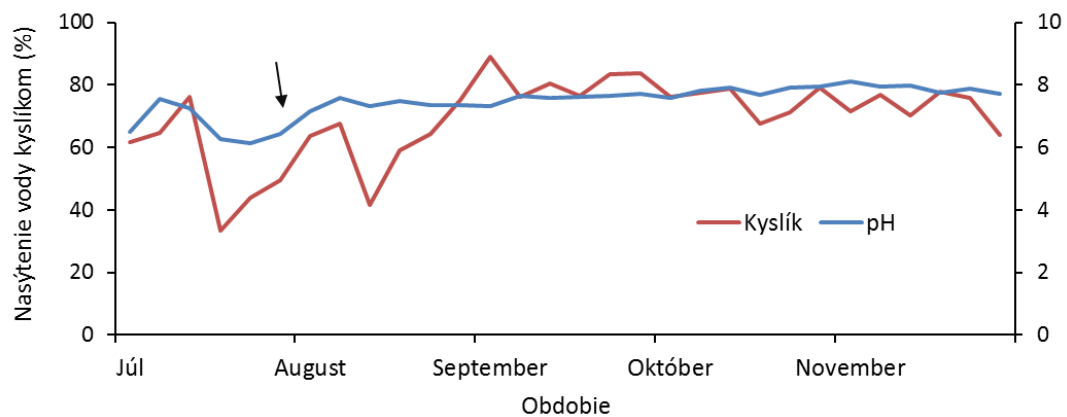
Názov	RAS	ČOV	Prítok	Jednotka	Použitá metóda
amónne ióny (NH <sub>4</sub> )	1,32	0,98	<0,10	mg.l <sup>-1</sup>	(A) SOP 6
TAN	1,03	0,76	<0,08	mg.l <sup>-1</sup>	(A) SOP 6
dusičnany (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	521	453	<5,00	mg.l <sup>-1</sup>	(A) SOP 11
dušík dusičnanový (N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	118	102	<1,13	mg.l <sup>-1</sup>	(A) SOP 11
celkový dusík	133	125	<1,00	mg.l <sup>-1</sup>	(A) SOP 431
bór (B)	0,047	0,118	<0,003	mg.l <sup>-1</sup>	(SA) 168
draslík (K)	78,6	77,6	2,22	mg.l <sup>-1</sup>	(A) SOP 22
fosfor (P)	1,45	2,64	<0,02	mg.l <sup>-1</sup>	(A) SOP 19
fosforečnany	4,44	8,08	<0,10	mg.l <sup>-1</sup>	(A) SOP 20
horčík (Mg)	10,9	11,2	2,99	mg.l <sup>-1</sup>	(A) SOP 21
mangán (Mn)	<0,050	<0,050	<0,050	mg.l <sup>-1</sup>	(A) SOP 38-1
meď (Cu)	0,023	0,018	<0,010	mg.l <sup>-1</sup>	(A) SOP 38-1
sodík (Na)	68,4	68,5	8,14	mg.l <sup>-1</sup>	(A) SOP 22
vápnik (Ca)	115	118	31,1	mg.l <sup>-1</sup>	(A) SOP 21
zinok (Zn)	0,029	0,063	0,034	mg.l <sup>-1</sup>	(A) SOP 38-1
železo (Fe)	<0,050	0,078	<0,050	mg.l <sup>-1</sup>	(A) SOP 38-1

Zoznam použitých metód je uvedený v prílohe 4.

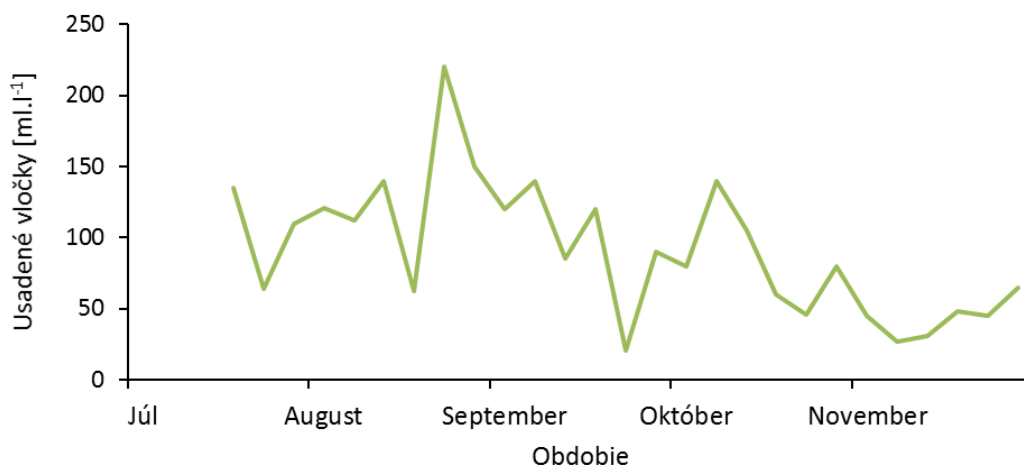
## 4.2 BFT reaktor

### 4.2.1 Sledovanie BFT reaktoru

V grafe 1 je znázornený vývoj obsahu kyslíka a pH počas sledovania. Od augusta sa pristúpilo k pravidelnému odčerpávaniu kalu jedenkrát týždenne a od septembra 2 – 3 krát týždenne ako je vidieť v poklesoch usadených vločiek v grafe 2. Tento kal bol mrazený a následné mohol byť využitý k ďalším analýzám či pokusom.



**Graf 1:** Vývoj saturácie vody kyslíkom na hlavnej osi a hodnoty pH na ose vedľajšej. Čiernou šípkou je znázornené obdobie pravidelného pridávania jedlej sódy (250g jedlej sódy na 1 kg aplikovaného krmiva).



**Graf 2:** Vývoj FVI (ml.l<sup>-1</sup>) v Imhoffovom kónuse počas sledovaného obdobia.

#### 4.2.2 Nutričné zloženie biofloku

V tabuľke 9 sa nachádzajú výsledky živinového zloženia a obsahu dusíkatých látok. Pre porovnanie sú tu uvedené aj niektoré nutričné požiadavky pre tilapiu podľa FAO (Int. odkaz 2). Z tabuľky je zrejmé, že za obdobie približne 3 mesiacov došlo k zvýšeniu obsahu popola, tuku a vlákniny na úkor nižšieho obsahu BNLV, zatiaľ čo obsah dusíkatých látok zostal nezmenený. Zistený bol aj pokles množstva dusičnanov vyskytujúcich sa v systéme. Vzorka odoslaná na analýzu s označením august obsahovala 3,5 % sušiny, pomer C:N 5,12 a jej pH bola 5,7. Pomer C:N vo vzorke november bol 6,36; obsah sušiny bol 4,7 % a pH 7.

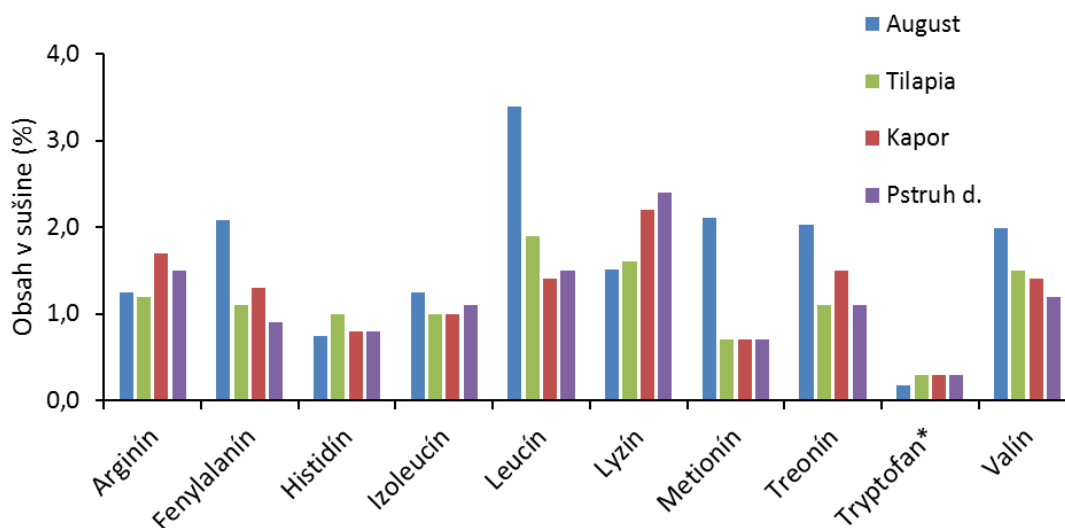
**Tabuľka 9:** Živinové zloženie v 100% sušine: A – august, N – november, T - tilapia.

Názov	A	N	T	Jednotka	Nepresnosť	Metóda
dusíkaté látky	35,9	34,3	> 30	%	±7 %	(A) SOP 55-1
popol (zvyšok po žíhaní)	16,3	24		%	±5 %	(A) SOP 39-2
tuk (po hydrolýze)	2,54	6,14	10 -15	%	±7 %	(A) SOP 52
vláknina	3,83	8,18	8 - 10	%	±7 %	(A) SOP 53
BNLV	41,43	27,38	< 40	%		
organické, spalit. látky (Cox, uhlík organický)	83,7	76		%	±15 %	(N) SOP 84
dusík celkový	8,17	5,97		%	±15 %	(N) SOP 55-3
stráviteľná energia *	3100	2830	3200	kcal.kg <sup>-1</sup>	-	-

Zoznam použitých metód je uvedený v prílohe 4.

\*Koeficienty stráviteľnosti pre kapra, podľa Steffensa (1989).

Výsledky stanovenia obsahu aminokyselín (AK) v bioflok biomase v porovnaní s optimálnymi hodnotami esenciálnych mastných kyselín pre tilapiu, kapra (*Cyprinus carpio*) a pstruha dúhového (*Oncorhynchus mykiss*) v sušine sú podľa National Research Council (2011) v grafe 3.



**Graf 3:** Zloženie esenciálnych AK odčerpaného kalu z biofloku (august).

\*Takto označená skúška nie je akreditovaná. Bola vykonaná za rovnakých podmienok ako akreditované testy.

Z výsledkov analýzy obsahu ťažkých kovov v tabuľke 10 je vidieť, že medzi vykonanými odbermi došlo hlavne k zvýšeniu obsahu kadmia a niklu, zatiaľ čo u vanádu bol pozorovaný pokles obsahu. Dáta, u ktorých nie je vyjadrená neistota boli pod hodnotou stanoviteľnosti. Obsah medi, zinku je uvedený v tabuľke 11.

**Tabuľka 10:** Obsah ťažkých kovov v 100% sušine.

Názov	August	November	Jednotka	Neistota	Metóda
arzén (As)	0,2	0,2	mg.kg <sup>-1</sup>		(A) SOP 40
berýlium (Be)	0,17	0,29	mg.kg <sup>-1</sup>	±20 %	(A) SOP 40
chróm (Cr)	17,3	16,5	mg.kg <sup>-1</sup>	±20 %	(A) SOP 38-3
kadmium (Cd)	0,46	0,81	mg.kg <sup>-1</sup>	±20 %	(A) SOP 38-3
kobalt (Co)	5,1	5,03	mg.kg <sup>-1</sup>		(A) SOP 88
nikel (Ni)	7,24	9,67	mg.kg <sup>-1</sup>	±20 %	(A) SOP 38-3
olovo (Pb)	2,04	2,01	mg.kg <sup>-1</sup>		(A) SOP 38-3
ortuť (Hg)	0,053	0,054	mg.kg <sup>-1</sup>	±15 %	(A) SOP 23
vanád (V)	13,4	9,67	mg.kg <sup>-1</sup>	±20 %	(A) SOP 40

Zoznam použitých metód je uvedený v prílohe 4.



Výsledky obsahu minerálnych látok v bioflok biomase v porovnaní s optimálnymi hodnotami pre tilapiu (T), kapra (K) a pstruha dúhového (Pd) v sušine sú podľa National Research Council (2011) v tabuľke 11. Všetky minerálne látky sa nachádzajú v nadbytku a s výnimkou draslíku a železa je u nich možné pozorovať trend kumulácie v čase.

**Tabuľka 11:** Obsah minerálnych látok v 100% sušine. Makromineraly sú vyjadrené v % a mikromineraly v mg.kg<sup>-1</sup>.

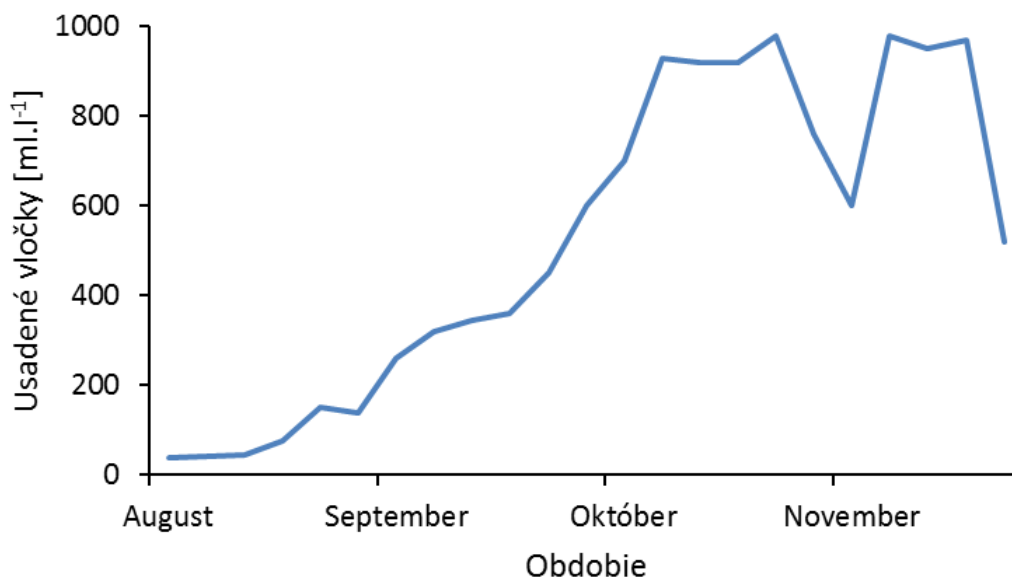
Názov		August	November	T	K	Pd	Neistota	Metóda
Makromineraly	draslík (K)	0,72	0,465	0,2-0,3	NT	NT	±20 %	(N) SOP 41
	fosfor (P)	2,36	3,31	0,4	0,7	0,7	±20 %	(N) SOP 43-1
	horčík (Mg)	0,223	0,376	0,06	0,05	0,05	±15 %	(N) SOP 41
	sodík (Na)	0,747	1,327	0,15	NT	NR	±20 %	(N) SOP 41
	vápnik (Ca)	4,31	7,49	0,7	0,34	NR	±10 %	(N) SOP 41
Mikromineraly	mangán (Mn)	214	346	7	12	12	±20 %	(N) SOP 38-4
	meď (Cu)	118	142	5	3	3	±20 %	(A) SOP 38-3
	zinok (Zn)	585	911	20	15	15	±20 %	(A) SOP 38-3
	železo (Fe)	6430	5050	85	150	NT	±20 %	(N) SOP 38-4

NR- vyžadované v potrave, ale nestanovené. NT- netestované .

Zoznam použitých metód je uvedený v prílohe 4.

### 4.3 Model čistiarne odpadových vôd

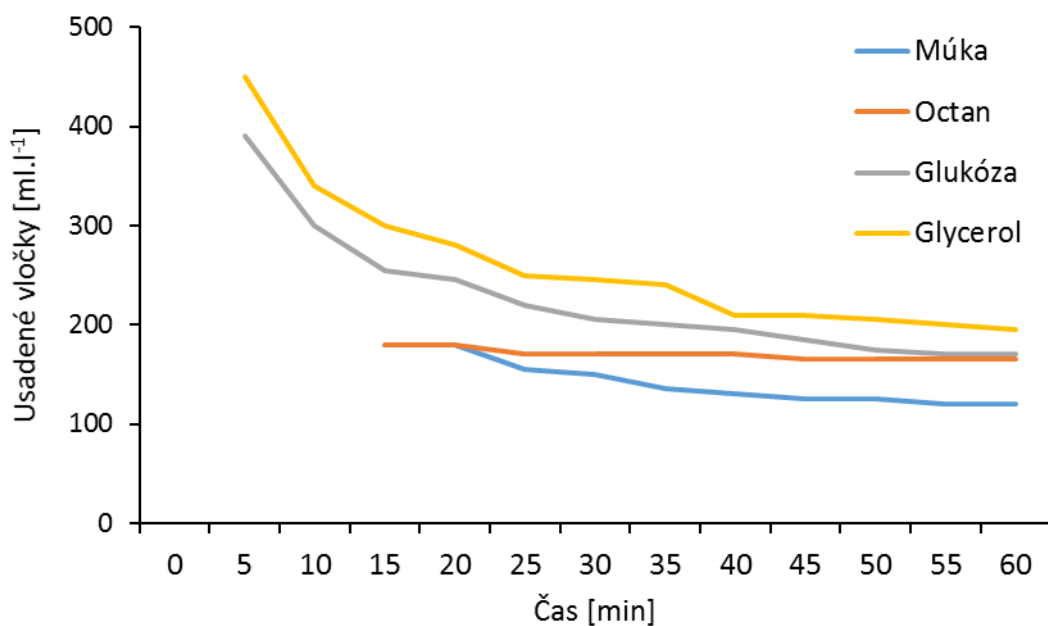
Tento model denne vyčistil približne 45 l odpadovej vody z RAS, ktorá bola následne opäť využitá k doplneniu RAS. Hodnoty percentuálneho nasýtenia kyslíkom v jednotlivých sekciách sa pohybovali v rozmedzí  $8,9 \pm 7,6$  (egalizačný priestor),  $89,2 \pm 11,8$  (aktivačný priestor) a  $20,1 \pm 16,2$  (dosadzovací priestor). Hodnota pH sa v modeli pohybovala v rozmedzí  $7,3 \pm 0,6$  (egalizačný priestor),  $7,6 \pm 0,6$  (aktivačný priestor) a  $7,9 \pm 0,7$  (dosadzovací priestor). Po celú dobu bolo taktiež možné pozorovať zvyšujúci sa trend množstva usadených vločiek (graf 4). Do čističky bola prečerpávaná voda s obsahom nerozpustených látok  $300 - 800 \text{ ml.l}^{-1}$  a procesom čistenia došlo k ich 100% odstráneniu. Vstupné hodnoty TAN boli  $19,0 - 25,6 \text{ mg.l}^{-1}$ . Voda opúšťajúca priestor čistiarne OV obsahovala do  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  TAN, došlo tak k 90 – 95% efektívnosti čistenia.



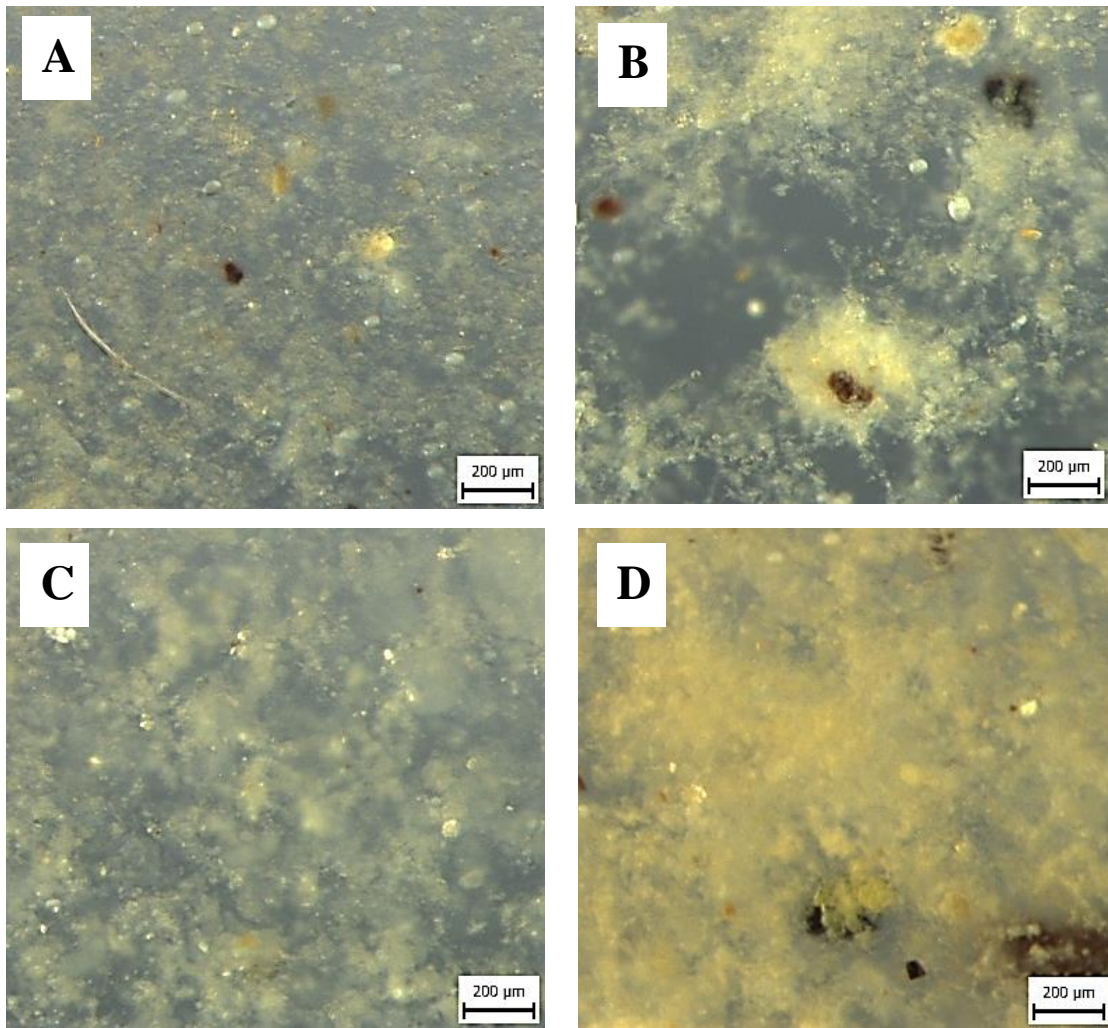
**Graf 4:** Vývoj FVI ( $\text{ml.l}^{-1}$ ) v Imhoffovom kónuse počas sledovaného obdobia v aktivačnom priestore modela čistiarne odpadových vôd.

#### 4.4 Porovnanie uhlíkatých zdrojov

Vločky na obrázku 12, múka a octan boli svojou štruktúrou menšie v porovnaní s vločkami, ktoré tvorila glukóza alebo glycerol. Tie boli na prvý pohľad väčšie. Rozdiely v štruktúre vločiek bolo taktiež možné pozorovať pri meraní FVI. Menšie vločky múky a octanu sa držali dlhšiu dobu vo vodnom stĺpci ako glukóza a glycerol, ktoré síce sedimentovali skôr, ale tiež mohli ovplyvniť výsledok merania FVI ako je znázornené v grafe 5. Obrázky a tabuľky z tohto pozorovania sú v prílohe 5.



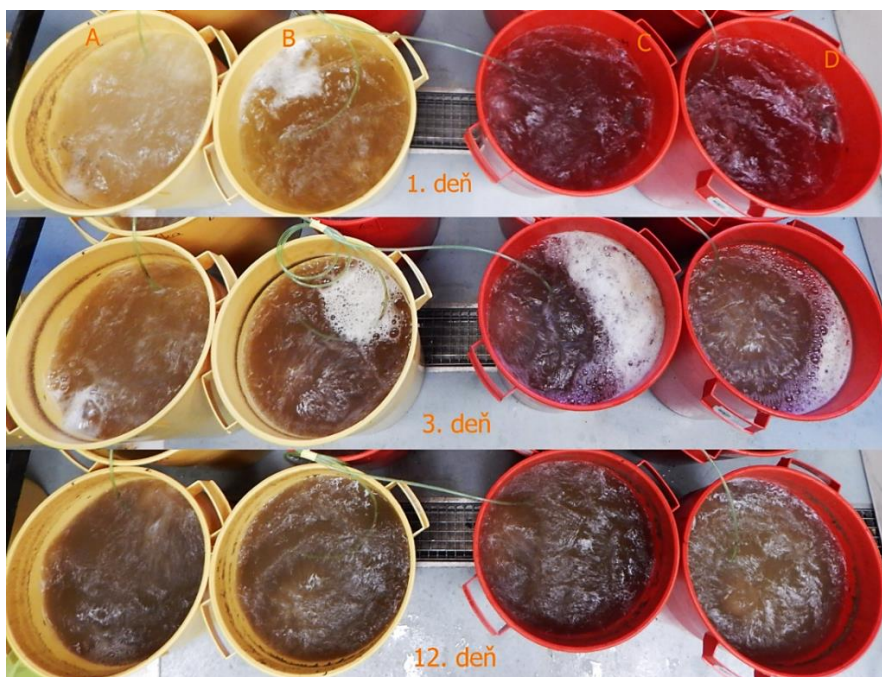
**Graf 5:** Rozdiely v usadzovaní biofloku na bázy rozdielnych uhlíkatých zdrojov v Imhoffovom kónuse po dobu 60 minút.



**Obrázok 12:** Vločky biofloku, zdroj C: múka (A), glukóza (B), octan (C) a glycerol (D).

#### 4.4.1 Fyzikálne chemické parametre vody

Prvý deň zahájenia pokusu došlo k zmene **zafarbenia** len u múky. U ďalších skupín došlo z výraznej zmeny zafarbenia až na 3. deň, ako je vidieť na obrázku 13. Po prvom týždni voda ešte mierne stmavla a po zvyšok pokusu si držala podobné zafarbenie.

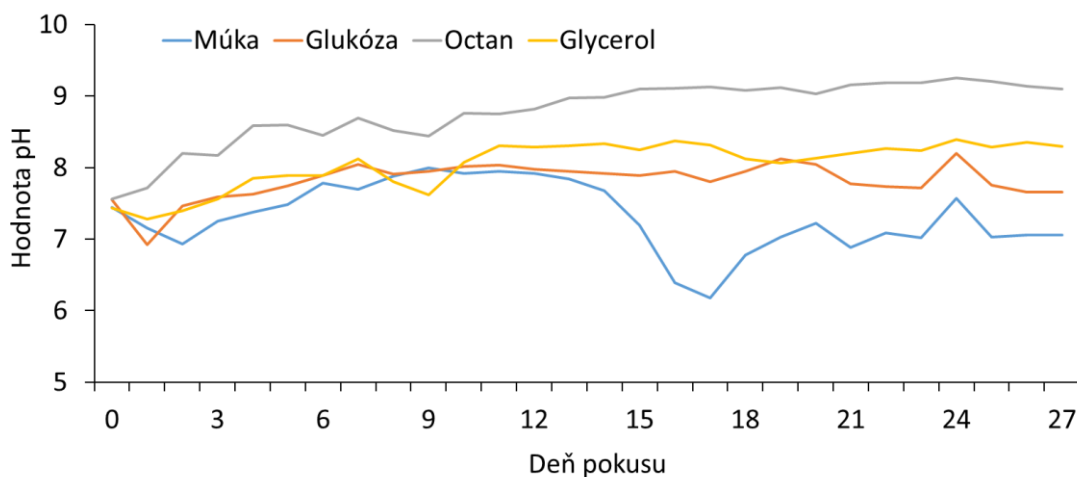


**Obrázok 13:** Rozdiely v zmene zafarbenia vody počas testovania rozdielnych uhľíkatých zdrojov (A: múka, B: glukóza, C: octan, D: glycerol).

**Teplota** vody v reaktoroch sa po celú dobu pokusu pohybovala v rozmedzí  $20,36 \pm 0,52$  °C. V reaktoroch neboli použité žiadne tepelné zariadenia a teplota bola ovplyvnená teplotou v akvárijnej miestnosti.

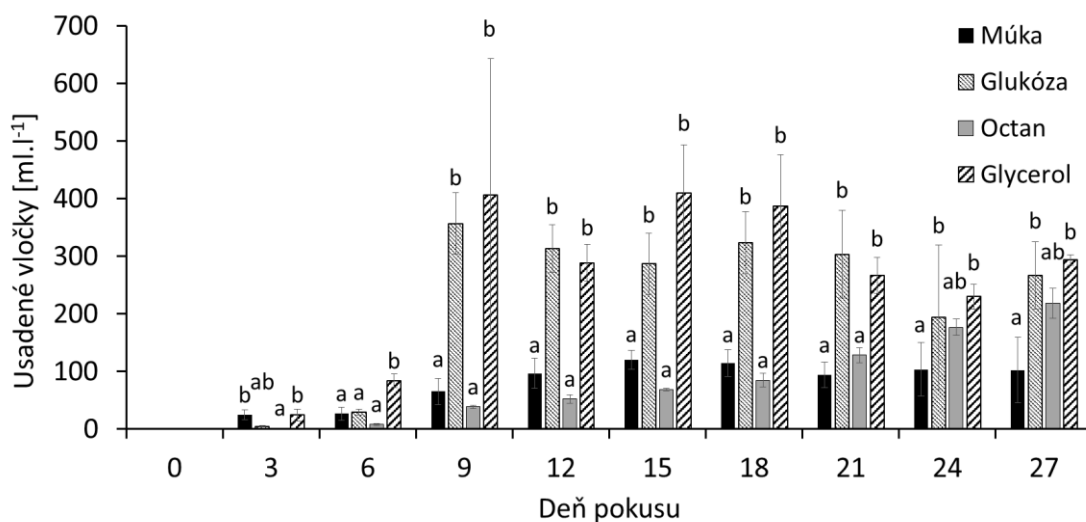
Obsah **kyslíka** vo vode bol  $5,81 \pm 0,86$  mg.l<sup>-1</sup> (múka),  $5,97 \pm 0,85$  mg.l<sup>-1</sup> (glukóza),  $5,94 \pm 0,82$  mg.l<sup>-1</sup> (octan) a  $5,75 \pm 0,87$  mg.l<sup>-1</sup> (glycerol). Vzduchovacie kamienky boli kontrolované, prípadne čistené každý deň podľa potreby. Po dobu pokusu nedošlo k anoxickým podmienkam.

Krivky hodnôt **pH** sú znázornené v grafe 6. U skupiny s označením Octan sa od 5. dňa upustilo k aplikácii sódy, aby tak došlo k poklesu pH. To sa nepodarilo a táto hodnota naďalej stúpala. pH u glukózy a glycerolu presiahlo 10. deň hodnotu 8 a taktiež sa pozastavila aplikácia jedlej sódy. Toto obdobie trvalo až do konca pokusu. U múky nebola sóda aplikovaná len 10 – 14. deň, kedy došlo k značnému poklesu.



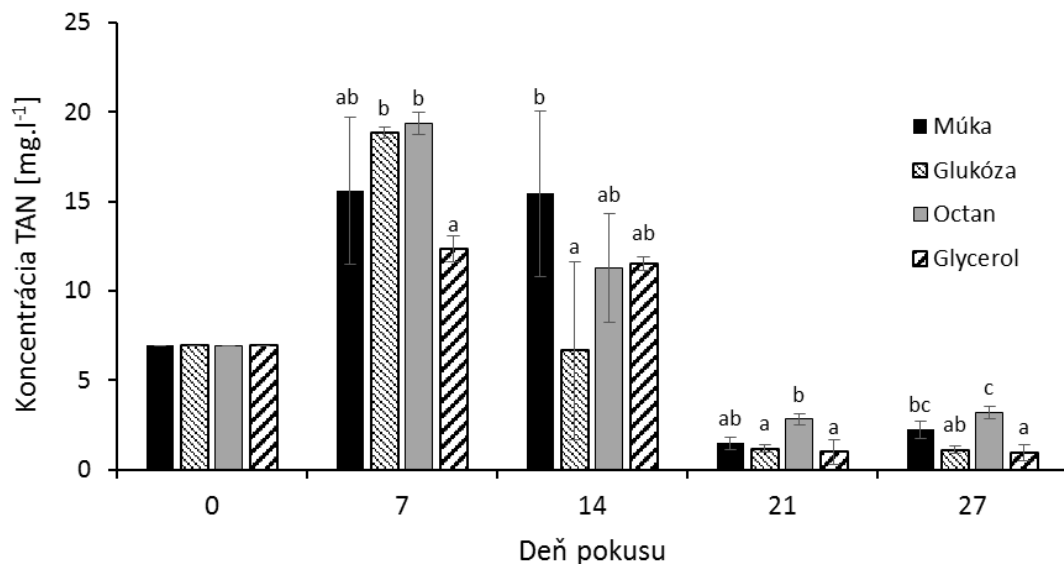
**Graf 6:** Graf priemernej hodnoty pH (hlavná osa) vody v BFT reaktoroch využívajúce rozdielne zdroje uhlíka. Na vedľajšej ose dávka aplikovanej jedlej sódy.

Priemerné množstvo vložiek (**FVI**), ktoré sa usadili v Imhoffovom kónuse je znázornené v grafe 7. V počiatočnej fáze bol rozvoj pomalý a vo všetkých opakovaníach podobný. Po 9 dňoch kultivácie došlo u glukózy a glycerolu k rozsiahlemu nárastu biomasy. Je tu signifikantný rozdiel v porovnaní s ďalšími dvoma skupinami ( $p < 0,05$ ). Múka sa kultivovala pomaly a od 21 dňa sa začali vytvárať rozdiely v FVI pre jednotlivé opakovania.



**Graf 7:** Graf FVI ( $\text{ml.l}^{-1}$ ) v BFT reaktoroch využívajúce rozdielne zdroje uhlíka. Skupiny s rovnakými indexmi nie sú štatisticky odlišné. Priemerná hodnota  $\pm$  smerodajná odchýlka ( $n = 3$ ).

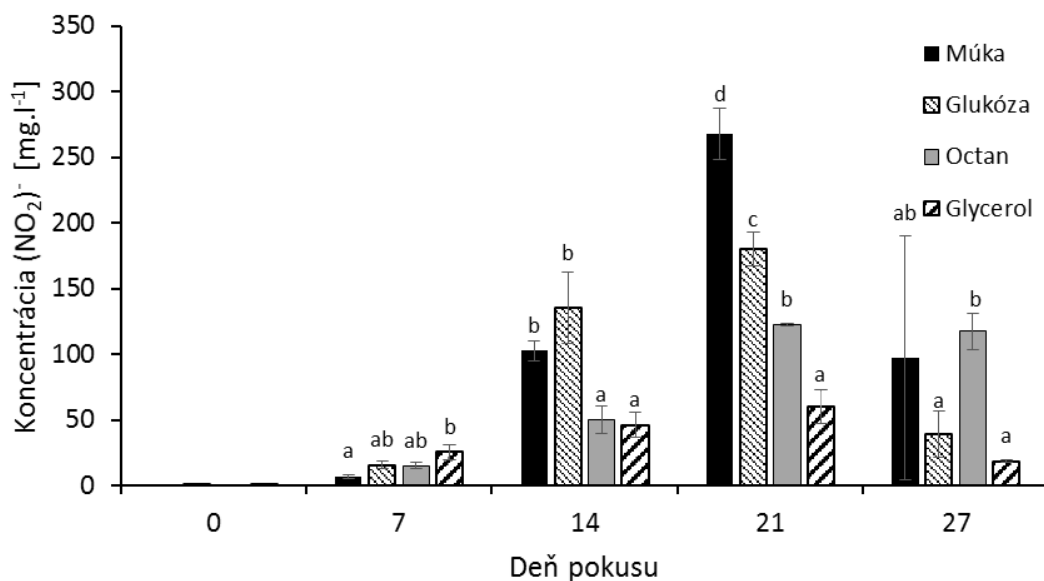
S rozkladajúcim sa krmivom došlo po prvom týždni k nárastu celkového amoniakálneho dusíka (TAN) ako je znázornené v grafe 8. Za ďalších 7 dní došlo u všetkých skupín, s výnimkou múky, k výraznému poklesu. Posledný deň pokusu boli namerané koncentrácie  $2,24 \pm 0,51 \text{ mg.l}^{-1}$  u múky,  $1,12 \pm 0,18 \text{ mg.l}^{-1}$  u glukózy,  $3,2 \pm 0,34 \text{ mg.l}^{-1}$  u octanu a  $0,99 \pm 0,45 \text{ mg.l}^{-1}$  u glycerolu.



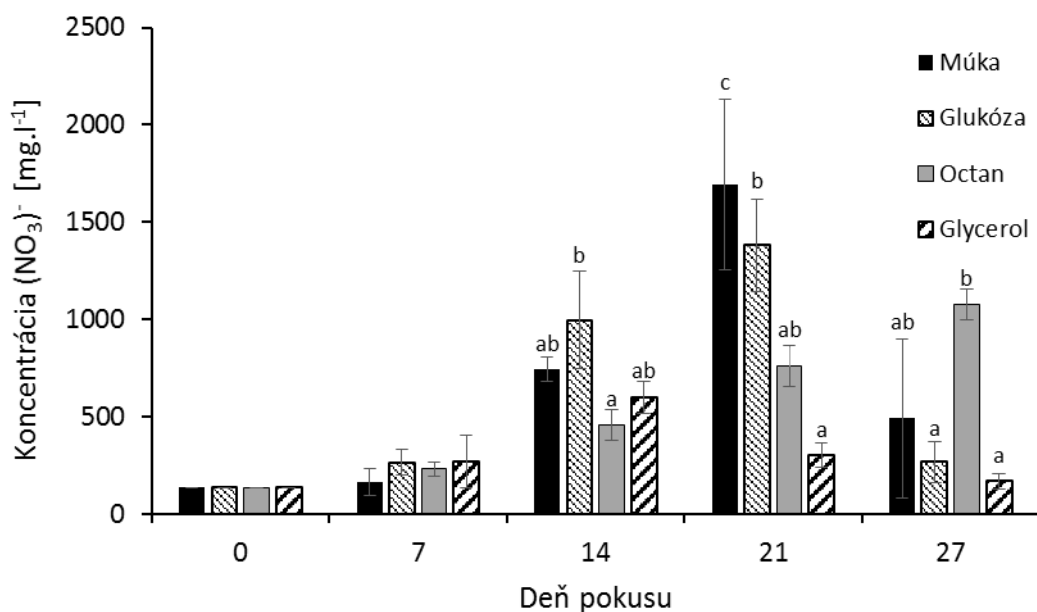
**Graf 8:** Obsah celkového amoniakálneho dusíka  $\text{N-NH}_4^++\text{NH}_3$  (TAN). Skupiny s rovnakými indexmi nie sú štatisticky odlišné. Priemerná hodnota  $\pm$  smerodajná odchýlka ( $n = 3$ ).

Koncentrácie obsahu **dusitanov** (graf 9) dosiahli najvyššie hodnoty 21. deň. V nasledujúcich 6 dňoch došlo u glukózy a glycerolu k značnému poklesu obsahu dusitanov. U octanu došlo k minimálnemu poklesu a u múky došlo k veľkým rozdielom v rámci skupiny.

Vývoj koncentrácií **dusičnanov** v grafe 10 bol veľmi podobný s vývojom dusitanov v grafe 8. Glycerol dosiahol najvyššiu koncentráciu dusičnanov v 14. deň pokusu a múka s glukózou v 21. deň. V nasledujúcom priebehu pokusu došlo u vyššie zmienených skupín k poklesu koncentrácií. Namerané hodnoty u octanu mali po celú dobu kultivácie stúpajúcu tendenciu.



**Graf 9:** Obsah dusitanov ( $\text{NO}_2^-$ ) vo vode. Skupiny s rovnakými indexmi nie sú štatisticky odlišné. Priemerná hodnota  $\pm$  smerodajná odchýlka ( $n = 3$ ).



**Graf 10:** Obsah dusičnanov ( $\text{NO}_3^-$ ) vo vode. Skupiny s rovnakými indexmi nie sú štatisticky odlišné. Priemerná hodnota  $\pm$  smerodajná odchýlka ( $n = 3$ ).



#### 4.4.2 Analýza biofloku

Hmotnosť "kalu" odoslaná na analýzu bola 2849 g pre múku, 4255,7 g pre glukózu, 4204,5 g pre octan a 4464 g pre glycerol. Z celkového objemu vody za skupinu (cca 135 l) bol usadený objem vložiek približne 11 l u múky a glukózy, 16 l u octanu a glycerolu.

V tabuľke 12 jasne vidieť obsahu dusíkatých látok, BNLV a organických, spáliteľných látok je výrazne nižší u octanu než u ostatných skupín a taktiež tu nájdeme najvyšší obsah popolu. Vzorok kalu glycerolu obsahovali najvyššie množstvo tukov. Hodnoty ostatných sledovaných parametrov sú relatívne podobné.

Obsah sušiny pre múku, glukózu, octan a glycerol bol 1,32; 1,29; 0,83 a 1,03. Pomer C:N bol zistený 5,80 u múky, 4,69 u glukózy, 3,06 u octanu a 4,81 u glycerolu.

**Tabuľka 12:** Živinové zloženie v sušine podľa použitého uhlíkatého substrátu: M – múka, Glu – glukóza, O – octan, Gly – glycerol.

Názov	Substrát				Jednotka	Nepresnosť	Metóda
	M	Glu	O	Gly			
dusíkaté látky	35,7	42	24,5	42,4	%	±7 %	(A) SOP 55-2
popol (zvyšok po žíhaní)	22,6	19,1	58,8	15,7	%	±5 %	(A) SOP 39-2
tuk (po hydrolýze)	1,85	1,43	2,48	6,99	%	±7 %	(A) SOP 52
vláknina	4,77	6,6	1,89	2,46	%	±7 %	(A) SOP 53
BNLV	33,76	29,58	11,5	32,45	%		-
organické, spáliteľné látky (Cox, uhlík organický)	77,4	80,9	41,2	84,3	%	±15 %	(N) SOP 84
dusík celkový	6,67	8,62	6,73	8,78	%	±15 %	(N) SOP 55-3
stráviteľná energia *	2768	2840	1586	3402	kcal.kg <sup>-1</sup>	-	-

Zoznam použitých metód je uvedený v prílohe 4.

\*Koefficienty stráviteľnosti pre kapra, podľa Steffensa (1989).

Obsah arzénu, kobaltu, olova a vanádu bol po mesačnej kultivácii pod hodnotou stanoviteľnosti, ako je vidieť v tabuľke 13. Najviac sa za túto dobu naakumulovali chróm, kadmium a nikel. Posledné dva zmienené boli nájdené v najväčšom množstve v kale zo skupiny octan. Obsah berýlia a ortuti bol medzi skupinami vyrovnaný. Obsah medi a zinku je uvedený v tabuľke 14.

**Tabuľka 13:** Obsah ťažkých kovov v sušine podľa použitého uhlíkatého substrátu: M – múka, Glu – glukóza, O – octan, Gly – glycerol.

Názov	Substrát				Jednotka	Neistota	Metóda
	M	Glu	O	Gly			
arzén (As)	<0,21	<0,20	<0,21	<0,20	mg.kg <sup>-1</sup>		(A) SOP 40
berýlium (Be)	0,28	0,28	0,28	0,26	mg.kg <sup>-1</sup>	±20 %	(A) SOP 40
chróm (Cr)	8,88	6,27	3,37	5,62	mg.kg <sup>-1</sup>	±20 %	(A) SOP 38-3
kadmium (Cd)	1,83	1,48	5,22	1,23	mg.kg <sup>-1</sup>	±20 %	(A) SOP 38-3
kobalt (Co)	<5,15	<5,10	<5,17	<5,02	mg.kg <sup>-1</sup>		(A) SOP 88
nikel (Ni)	7,35	6,35	14,9	5,94	mg.kg <sup>-1</sup>	±20 %	(A) SOP 38-3
olovo (Pb)	<2,06	<2,04	<2,07	<2,01	mg.kg <sup>-1</sup>		(A) SOP 38-3
ortuť (Hg)	0,127	0,099	0,081	0,116	mg.kg <sup>-1</sup>	±15 %	(A) SOP 23
vanád (V)	<1,03	<1,02	<1,03	<1,00	mg.kg <sup>-1</sup>		(A) SOP 40

Zoznam použitých metód je uvedený v prílohe 4.

Všetky namerané hodnoty minerálnych látok v sušine presahujú nutričné požiadavky pre tilapiu podľa National Research Council (2011), ako je vidieť v tabuľke 14. Obsah makrominerálov je medzi skupinami veľmi podobný. Výnimkou je iba sodík, ktorý v porovnaní s ostatnými skupinami dosahuje minimálne 10násobne vyšších hodnôt u octanu.

V prípade mikrominerálov možno pozorovať, že použitý uhlíkatý substrát má vplyv na kumuláciu týchto prvkov. Najvyšší obsah u všetkých prvkov bol zistený u skupiny múka a naopak najnižšie hodnoty boli stanovené u skupiny glycerol s výnimkou železa, kde jeho nižší obsah bol zistený u octanu.

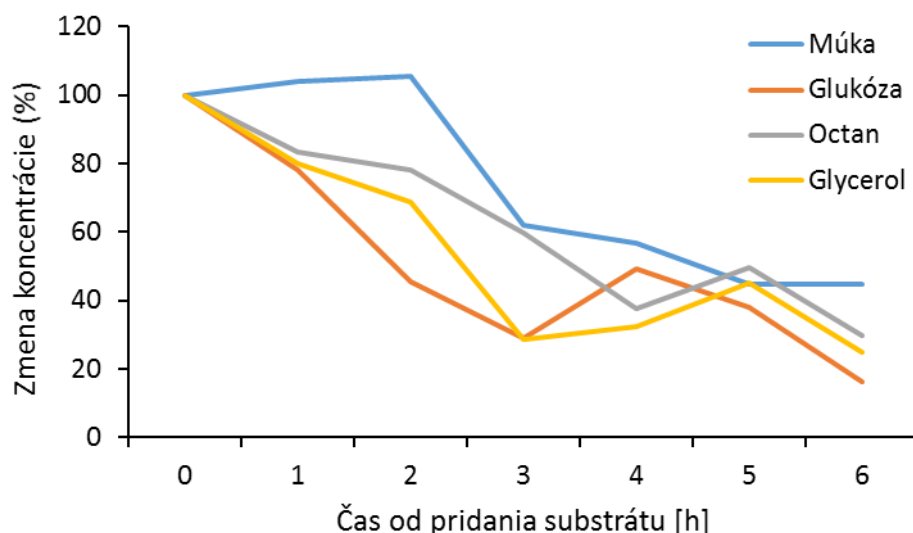
**Tabuľka 14:** Obsah minerálnych látok v sušine podľa použitého uhlíkatého substrátu: M – múka, Glu – glukóza, O – octan, Gly – glycerol. Makrominерály sú vyjadrené v % a mikrominерály v mg.kg<sup>-1</sup>.

Názov	Substrát				Tilapia	Jednotka	Neistota	Metóda
	M	Glu	O	Gly				
draslík (K)	0,39	0,82	0,59	0,93	0,2-0,3	%	±20 %	(N) SOP 41
fosfor (P)	3,61	3,01	2,19	2,18	0,4	%	±20 %	(N) SOP 43-1
horčík (Mg)	0,34	0,33	0,32	0,26	0,06	%	±15 %	(N) SOP 41
sodík (Na)	0,76	0,94	11,98	0,92	0,15	%	±20 %	(N) SOP 41
vápnik (Ca)	7,12	5,48	8,13	4,64	0,7	%	±10 %	(N) SOP 41
mangán (Mn)	186	152	122	111	7	mg.kg-1	±20 %	(N) SOP 38-4
meď (Cu)	116	65	28,9	48,6	5	mg.kg-1	±20 %	(A) SOP 38-3
zinok (Zn)	2950	1810	697	1970	20	mg.kg-1	±20 %	(A) SOP 38-3
železo (Fe)	5010	3940	2680	2940	85	mg.kg-1	±20 %	(N) SOP 38-4

Zoznam použitých metód je uvedený v prílohe 4.

#### 4.5 Test odozvy BFT systému na pridanie uhlíkatého substrátu

Rýchlosť, s akou jednotlivé systémy odbúrali TAN, je možné vidieť v grafe 11. V grafe je jasne vidieť, že najvyššie hodnoty TAN boli dosiahnuté tesne po pridaní vodného roztoku amoniaku a postupne klesali.



**Graf 11:** Graf poklesu TAN (koncentrácia v T:0 = 100 %) po 6 hodinách od pridaní zdroja C.

#### 4.6 Prvotný kŕmny pokus s použitím bioflok biomasy v kŕmive

Pokusom, so zakomponovaným bioflokom v množstve 0 %, 25 % a 50 % v kŕmnej zmesi, sa nepodarilo preukázať žiadny signifikantne významný rozdiel ( $p < 0,05$ ) medzi skupinami u sledovaných produkčných ukazovateľov. Výsledky sledovaných parametrov sú uvedené v tabuľke 15. Kŕmny koeficient sa pohyboval okolo hodnoty 1,4 a SGR okolo 1,26. Ryby v dôsledku predčasného ukončenia pokusu nestihli dosiahnuť dvojnásobku svojej počiatočnej hmotnosti.

**Tabuľka 15:** Výsledky 30 denného odchovu amura bieleho v kontrolovaných podmienkach. Priemerná hodnota  $\pm$  smerodajná odchýlka ( $n = 33$ ).

<b>Parametre</b>	<b>BFT 0 %</b>	<b>BFT 25 %</b>	<b>BFT 50 %</b>
Počiatočná SL (mm)	56,04 $\pm$ 3,71	57,18 $\pm$ 4,24	56,71 $\pm$ 2,33
Konečná SL (mm)	64,43 $\pm$ 5,22	61,46 $\pm$ 6,13	63,27 $\pm$ 5,77
Počiatočná hmotnosť (g)	2,53 $\pm$ 0,29	2,53 $\pm$ 0,29	2,53 $\pm$ 0,29
Konečná hmotnosť (g)	3,73 $\pm$ 0,74	3,65 $\pm$ 0,69	3,74 $\pm$ 0,56
Prežitie (%)	88,78 $\pm$ 0,57	85,33 $\pm$ 2,12	84,33 $\pm$ 0,72
FCR	1,39 $\pm$ 0,23	1,49 $\pm$ 0,27	1,38 $\pm$ 0,31
SGR (%.deň <sup>-1</sup> )	1,29 $\pm$ 0,16	1,22 $\pm$ 0,21	1,30 $\pm$ 0,18

## 5 Diskusia

### 5.1 Odpadová voda

Odpadová voda z RAS obsahuje veľké množstvo nerozpustených látok v podobe flotátu či sedimentu, ako je zrejmé z výsledkov vstupnej analýzy. Sledované parametre  $\text{CHSK}_{\text{Cr}}$ ,  $\text{BSK}_5$  a NL sú vyššie u vody s obsahom sedimentu a flotátu ako vo vzorke, u ktorej došlo k predčisteniu v podobe odstránenia flotátu. Obe vzorky však obsahujú vysoké koncentrácie organického znečistenia a bez predchádzajúcej úpravy nie sú vhodné k čisteniu v konvenčnom systéme. Odstránením sedimentu došlo k poklesu nerozpustených a dusíkatých látok. Vzorky po sedimentácii sú podľa spoločnosti ASIO, spol. s.r.o. vhodné k biologickému čisteniu.

Odpadová voda z modelového RAS obsahovala cca  $20 \text{ mg.l}^{-1}$  TAN. V tej dobe neboli použité všetky odchovné nádrže a preto by koncentrácie namerané v tejto vode mohli byť ešte vyššie. Napríklad Sharrer a kol. (2010) využívali k experimentom s MBR taktiež odpadovú vodu z mechanického filtra (bez predchádzajúcej úpravy), ale koncentrácie TAN boli približne 3 – 6 krát vyššie v porovnaní s hodnotami v tabuľke 8. Crab a kol. (2012) uvádzajú, že voda bohatá na živiny môže byť privedená do oddeleného BFT reaktoru aj priamo z odchovných nádrží. Následným pridaním uhlíka naštartujeme rast kultúry a voda môže byť následne vrátená do RAS systému, prípadne kultúra využitá ako zdroj potravy. Z výsledkov v tabuľke 8, ale aj rozboru usadených výkalov pstruha dúhového podľa Naylora a kol. (1999) je zrejmé, že voda, ktorá by inak skončila v kanalizácii alebo vodnom prostredí je bohatá na živiny a môže byť podľa Emerenciano a kol. (2013) využitá v akvaponických či BFT systémoch.

### 5.2 BFT reaktor

Ako je vidieť v grafe 1, bioflok reaktor môže byť pomerne nestabilný, ale pravidelným pridávaním jedlej sódy v správnom množstve a udržovaním hodnoty FVI pomocou separácie vložiek dochádza k stabilizácii a zlepšeniu chovného prostredia.

Analýza živinového zloženia by sa dala prirovnať k zloženiu komerčných kŕmnych zmesí a obsah proteínu a lipidov je podobný ako uvádzajú Azim a Little (2008)

či Ekasari a kol. (2010). Množstvo stráviteľnej energie môže byť ovplyvnené manipuláciou s BFT reaktorom. Náš výpočet ukázal o 3 alebo 11,5 % nižšiu hodnotu v porovnaní s požiadavkami tilapie. Pridaním malého množstva karbohydrátov alebo tuku, ktoré by zvýšili množstvo energie, by tak mohol byť bioflok dostatočným potravným zdrojom pre tilapiu. V tom sú zahrnuté energetické a niektoré živinové nutričné požiadavky.

Zloženie aminokyselín a ich biologická dostupnosť určuje kvalitu krmiva. Aminokyseliny sú stavebným prvkom proteínov a rozdeľujú sa podľa nutričných požiadavkou a schopnosti organizmu ich syntetizovať na esenciálne (nenahraditeľné, EAA) a neesenciálne (nahraditeľné, NEAA). EAA si organizmus nedokáže syntetizovať vôbec alebo len v nedostačujúcom množstve a preto musia byť prijímané v potrave (Mente a kol., 2002). Nutričné zloženie biofloku ako aj obsahu EAA je podľa Ekasariho a kol. (2014) ovplyvnené aj veľkosťou vložiek. Vložky o veľkosti väčšej ako 100  $\mu\text{m}$  mali vyšší obsah dusíku, proteínu, lipidov a zároveň nižší obsah EAA v porovnaní s vložkami menšími ako 48  $\mu\text{m}$ . Ako je vidieť v grafe 3 odseparovaný bioflok obsahuje 7 z 10 EAA nevyhnutných vo výžive tilapie v dostatočnom množstve a u zvyšných troch sa nejedná o veľký nedostatok. V našich podmienkach patria medzi bežne chované druhy kapor a pstruh dúhový, kde bioflok obsahuje v prebytočnom množstve 6 z 10 EAA. Výsledky Hussaina a kol. (2014) ukazujú, že bioflok využívajúci ako zdroj uhlíku kukuričnú múku má vyšší obsah aminokyselín v porovnaní s ryžovou múkou a ryžovými otrubami. Pri výbere substrátu, ale podľa Salehidazeha a Van Loosdrechta (2004) treba prihliadať na lokálnu dostupnosť. Obsahom aminokyselín sa v biofloku sa ešte zaoberal Tacon (2000), Emerenciano a kol. (2013) a Logan a kol. (2010), ktorí tvrdia, že jednobunečný proteín má podobné zloženie ako rybia múčka.

Ťažké kovy môžu byť baktériami adsorbované na svoj povrch alebo zabudované do vložiek. Tieto mechanizmy sú podľa Streekrihnana a Tyagiho (2004) zodpovedné za naviazanie 80 – 90 % celkového obsahu ťažkých kovov vo vode. Z tabuľky 10 je zrejmé, že v BFT dochádza ich naviazaniu a následnej kumulácii. Tento proces je podľa Dhokpande a kol. (2014) možné využiť k odstráneniu ťažkých kovov za pomoci aktivovaného kalu, ale po dosiahnutí koncentrácie nad hladinou toxicity dochádza k inhibícii biologických procesov (Sin, 2001). Podľa Carberryho a Englandeho (1983) sú pre aeróbne biologické procesy najtoxickejšie meď, nikel

a zinok s koncentraciami 1 mg.l<sup>-1</sup> (toxicitu ovplyvňuje obsah nerozpustených a organických látok), 2,5 mg.l<sup>-1</sup> a 10 mg.l<sup>-1</sup>. Podľa poslednej analýzy tieto kovy obsahoval BFT kal v koncentráciách 6,69 mg.kg<sup>-1</sup>, 0,46 mg.kg<sup>-1</sup> a 43 mg.kg<sup>-1</sup>. Zinok v koncentrácii nad 10 mg.l<sup>-1</sup> je podľa Madonihho a kol. (1996) toxický pre väčšinu mikroorganizmov v aktivovanom kale. Aj keď je zinok považovaný za najmenej toxický, kumuluje sa vo vyšších koncentráciách a preto nesmie byť braný na ľahkú váhu. V novšom experimente uvádza Oviedo a kol. (2002), že kadmium je ešte toxickejšie ako meď. K zabráneniu toxických účinkov ťažkých kovov navrhuje Abdel-Tawwab a kol. (2007) aplikáciu vápenatých iontov, ktoré taktiež výrazne zlepšujú formovanie vločiek (Luo a kol., 2013). Okrem ťažkých kovov, dochádza heterotrofnými baktériami aj ku kumulácii minerálnych látok. Tento záver potvrdzujú aj výsledky analýzy v tabuľke 11, kde sú minimálne požiadavky tilapie, kapra a pstruha mnohonásobne prekračované.

Podľa Zhu a kol. (2010) sa zvyšuje tlak na nájdenie hlavného alternatívneho zdroja rybej múčky a oleja ako dôležitých a drahých zložiek v rybom krmive. Rastlinné zložky sa používajú kvôli ich dostupnosti a relatívne priaznivému zloženiu aminokyselín (Hardy, 2010). Použitie proteínu na rastlinnej báze ale vedie k niekoľkým problémom, ako napríklad výskyt patologicko morfológické zmeny, znížená stráviteľnosť, chuťnosť a limitácia niektorých aminokyselín (Hassaana a kol., 2015). Jednou z možných náhrad je podľa Kuhna a kol. (2009) použitie múčky z biofloku, ktorá splňuje nutričné požiadavky. Touto problematikou sa zaoberali aj Bauer a kol. (2012), ktorý zistili, že kompletne nahradenie rybej múčky múčkou z biofloku je možné u krevety *Litopenaeus vannamei* bez toho, aby to štatisticky ovplyvnilo sledované hodnoty.

Ovplyvnením parametrov ako je teplota vody, použitý uhlíkatý substrát, spôsob jeho aplikácie (De Schryver a kol., 2008), pravidelnou výmenou vody a omladzovaním kultúry (Avnimelech, 2012) môžeme ovplyvniť chemické zloženie biofloku. Je preto potrebný ďalší výskum, za akých podmienok je BFT kal vhodný ako prídavok do krmných zmesí pre komerčné použitie a prípadne nastaviť legislatívne normy, aby sa zabránilo kumulácii niektorých prvkov nedostatočnou výmenou vody.

### 5.3 Model čistiarne odpadovej vody

Jednou z možností využitia biofloku pri čistení vody podľa Kuhna a Lawrence (2012) je SBR (ang. Sequence Batch Reactor) alebo MBR (ang. Membrane Batch Reactor). V prípade SBR je “špinavá“ odpadová voda prečerpávaná do reaktoru, v ktorom sa nachádza bioflok z predchádzajúceho cyklu. Nasleduje premiešavacia fáza, trvajúca niekoľko hodín až dní (Avnimelech, 2012) v závislosti na rozklade použitého substrátu. Potom je premiešavanie ukončené, bioflok sa nechá usadiť väčšinou 45 – 120 minút a nasleduje odčerpanie čistej vody. MBR pracuje podobne, ale namiesto usadzovania využíva filter alebo membránu (Kuhn a Lawrence, 2012).

Model na obrázku 7 je zostavený tak, aby obsahoval všetky časti čistiarne odpadových vôd. Aj keď SBR využíva odlišnú technológiu, proces separácie vložiek a čistej vody je podobný ako v našom modeli. S výnimkou MBR sa taktiež jedná o jediný spôsob čistenia vody, ktorý sa dá nájsť v spojitosti s bioflokom.

Keďže odpadová voda z RAS, ktorá bola prečerpávaná do modelu ČOV obsahovala 300 – 800 ml.l<sup>-1</sup> nerozpustených látok. Túto vodu bolo potrebné podrobiť anaeróbnemu rozkladu v prvej časti ČOV. Naakumulovaná voda postupne pritekala do časti s najvyšším nasýtením kyslíkom. Tu dochádzalo k premiešavaniu a k vlastnému odstraňovaniu dusíkatých látok. Takto vyčistená voda pritekala do dosadzovacieho priestoru, kde sa usadzoval bioflok. Čistá voda, odtekajúca do akumuláčnej nádrže, obsahovala približne 3 ml.l<sup>-1</sup> vložiek, 1 mg.l<sup>-1</sup> TAN a mohla byť prečerpávaná späť do RAS. SBR má podľa Kuhna a Lawrence (2012) schopnosť odstrániť viac ako 90 % amoniaku, dusitanov, dusičnanov a viac ako 95 % nerozpustených látok. To potvrdzujú aj výsledky DeSchryvera a Verstaete (2009). SBR využívajúci glycerol bol po 32 dňoch prevádzky schopný odstrániť až 71 % zlúčenín dusíku a po 50 dňoch až 98 %. V prípade Sharrera a kol. (2010) bola anaeróbna časť zaradená za aeróbnu. V jeho modeli dochádzalo k takmer 100% odstráneniu nerozpustených látok a až 98% odstráneniu celkového dusíku.

V porovnaní s bežnými metódami ako je biofilter, BFT podporuje odstraňovanie dusíka aj pri vyššom množstve organickej hmoty a zvýšenej biologickej spotrebe kyslíka (Avnimelech, 2012). Ďalšou výhodou BFT je podľa Craba a kol. (2007) aj 10 násobne rýchlejšia rast v porovnaní s nitrifikačnými baktériami v biofiltre.



## 5.4 Porovnanie uhľikátých substrátov

V novom BFT sa nachádzajú heterotrofné a nitrifikačné baktérie a podľa Avnimelecha (2012) by sa mal systém vyvinúť za niekoľko dní. Táto práca sa zamerala práve na počiatočnú fázu vývoja biofloku pri použití rozdielnych zdrojov uhľíka. Pokus ukázal, že parametre kvality vody ako **teplota** a **kyslík** nie sú výrazne ovplyvňované použitým substrátom. Pridanie uhľíka do vody ale môže spôsobiť dočasné zníženie hladiny kyslíka a metabolizmu baktérií v dôsledku rozkladu organickej hmoty (De Schryver a Verstraete, 2009). Takéto zmeny by mohli mať negatívny vplyv na chované organizmy, ale využitím externých reaktorov sa tomu dá zabrániť. Množstvo kyslíka vo vode môžeme spojiť s intenzitou vzduchovania, ktorá má podľa Avnimelecha (2012) vplyv na štruktúru vločiek.

Pridávanie jedlej sódy v dávke 0,25 kg na 1 kg aplikovaného krmiva je bežne používaná metóda k udržaniu stabilného **pH** a alkality ( $100 - 150 \text{ mg.l}^{-1}$ ) v systéme (Hargreaves, 2013). Nami vypočítaná dávka 1,25 g jedlej sódy spôsobovala postupné zvyšovanie pH, a preto musela byť priebežne upravovaná. Najväčšie problémy so stabilizáciou boli u skupiny múka, kde dochádzalo k väčšiemu kolísaniu ako u ostatných skupín. Za porovnanie stojí modelový BFT systém, kde pridávanie sódy v rovnakom pomere spôsobilo stabilizáciu pH. Objem nádrže, dĺžka kultivácie, intenzita vzduchovania, ale aj prítomnosť iných organizmov preto môže mať vplyv na pH v BFT reaktore. Použitie octanu sodného sa ukázalo za nie vhodne zvolený substrát, lebo jeho pridávaním pravdepodobne dochádzalo k postupnému zvyšovaniu pH. K rovnakému záveru došiel aj Liang a kol. (2014). Crab a kol. (2010a) uvádzajú ako možný zdroj uhľíka octan (anglicky acetate), ale nezmieňujú sa o žiadnych problémoch s pH. Taktiež aj De Schryver a Verstraete (2009) vo svojom pokuse používali octan sodný (sodium acetate), ale k úprave pH používali ďalšie 2 pufre. U glukózy a glycerolu dochádzalo taktiež k zvyšovaniu pH, no po znížení dávky sódy došlo k ich stabilizácii po zvyšok pokusu.

S prvou zmenou sfarbenia vody bolo možné pozorovať aj začiatky vznikajúcej kultúry baktérií. Ako je vidieť v grafe 5 či prílohe 5 jednoduchého testu **FVI**, menšie vločky u múky a octanu sedimentovali pomalšie v porovnaní z ďalšími dvomi skupinami. Príliš skoré či oneskorené odčítanie hodnoty by tak mohlo spôsobovať chyby v meraní. Aby sa predišlo tomuto problému, väčšina autorov je za zjednotenie postupu

a udáva za dostatočný čas 20 minút (Crab, 2010; Avnimelech, 2012; Hargreaves, 2013). Z grafu 5, ale aj fotiek vyhotovených v mikroskope vyplýva, že použitý substrát má vplyv na štruktúru vločiek a rýchlosť ich sedimentácie. Hollender a kol. (2002) tvrdí, že zdroj uhlíka ďalej ovplyvňuje typ a množstvo proteínov, ktoré ukladajú energiu. Pri výbere substrátu sa môže uvažovať podľa dostupnosti, rozložiteľnosti, efektivity využitia baktériami a hlavne ceny (Salehidazeh a Van Loosdrecht, 2004). Zdroje uhlíka využité v tejto práci neboli vyberané na základe ceny, ale podľa doporučení v dostupnej literatúre a často využívaných substrátov pri kultivácii BFT. Použitá pšeničná múka je bežne dostupná surovina v potravinách a jej cena sa pohybuje okolo 10 Kč.kg<sup>-1</sup>. Monohydrát dextróza (glukóza, resp. hroznový cukor) bola dodaná od spoločnosti FICHEMA s.r.o. v 25kg balení za 1006 Kč, čo predstavuje 40,24 Kč za kilogram substrátu. Octan sodný a glycerol dodala spoločnosť Penta s.r.o. Balenie octanu vyšlo na 401,72 Kč.kg<sup>-1</sup> a glycerolu (100%) na 239,5 Kč.l<sup>-1</sup> (79,83 Kč.l<sup>-1</sup>, keď započítame riedenie).

Najvyššie koncentrácie **TAN** boli namerané 7. deň po zahájení pokusu. V nasledujúcich dvoch týždňoch došlo k výraznému poklesu TAN a zároveň od 14. dňa boli namerané aj zvýšené koncentrácie dusitanov a dusičnanov. 21. deň boli namerané maximálne koncentrácie dusitanov s následným poklesom ku koncu kultivácie. Pri tej istej analýze boli zistené aj maximá dusičnanov: 1695,33 ± 438,22 mg.l<sup>-1</sup> u múky a 1380,67 ± 239,22 mg.l<sup>-1</sup> u glukózy. U glycerolu bola nameraná najvyššia koncentrácia už 14. deň a to 601,0 ± 83,46 mg.l<sup>-1</sup>. U týchto skupín došlo k poklesu koncentrácií na 492,67 ± 408,6 mg.l<sup>-1</sup> pre múku, 267,5 ± 105,9 mg.l<sup>-1</sup> glukózu a 169,33 ± 39,38 mg.l<sup>-1</sup> pre glycerol pri konečnej analýze. Výnimkou bol octan, kde koncentrácia stúpala až do konca kultivácie na hodnotu 1077,0 ± 77,57 mg.l<sup>-1</sup>. Podobne ako táto práca, aj Luo a kol. (2013) sa snažili o vyčistenie kalu z RAS za pomoci bioflok reaktoru. V jednom zo svojich experimentov poukázal s použitím 0,5 g KNO<sub>3</sub> a 10 g glukózy na pokles koncentrácie N – NO<sub>3</sub><sup>-</sup> zo 72,41 ± 1,34 mg.l<sup>-1</sup> na 0,1 ± 0,02 mg.l<sup>-1</sup> za 5 hodín.

Pokles koncentrácie **dusičnanov** je v akvakultúre veľmi často spojovaný s denitrifikáciou a anaeróbnym prostredím. Publikácie Liu a kol. (2015), He a kol. (2016) a Ruan a kol. (2016) poukazujú na fakt, že využitím heterotrofných baktérií môže dochádzať k odstráneniu dusičnanov či “aeróbnej denitrifikácii“, ako tento proces niektorí autori označujú. He a kol. (2016) vo svojej práci taktiež

uvádzajú aj názvy niektorých baktérií, ktoré sú schopné odstraňovať amoniakálny, dusitanový a dusičnanový dusík s využitím rôznych zdrojov uhlíka, ale podľa Yao a kol. (2013) môžu byť inhibované teplotou pod 20 °C. Denitrifikácia heterotrofnými baktériami vyžaduje čas, a preto nemôže dôjsť k odstráneniu 100 % TAN. De Schryver a Verstraete (2009) experimentálne dokázali, že odstránenie zlúčenín dusíka za pomoci bioflokú sa pohybuje v rozmedzí 77 – 98 %. Využitiu rozdielnych substrátov sa zaoberali aj Ray a Lotz (2014), ktorí porovnávali heterotrofné systémy na báze sacharózy, melasy a glycerolu s chemoautotrofným systémom. Ich pokus prebiehal 8 týždňov a ku kumulácii dusičnanov došlo len u chemoautotrofných baktérií.

Podobne ako táto práca, aj Crab a kol. (2010a) a Wei a kol. (2016) poukazujú na fakt, že zdroj uhlíka ovplyvňuje **zloženie** bioflokú, ako je vidieť v tabuľkách 1 – 14. Podľa Craba a kol. (2010b) použitý substrát stimuluje špeciálne baktérie, protozoa, riasy a tak ovplyvňuje zloženie organizmov, ako aj samotného bioflokú. Experimenty s krmivom poukazujú aj na vplyv na dostupnosť, chuťnosť a stráviteľnosť bioflokú kultivovaného s rozdielnym zdrojom uhlíka (Crab a kol., 2010a; Crab a kol., 2010c).

Skupiny, do ktorých bola pridávaná múka, glukóza a glycerol vykazujú vyšší obsah dusíkatých látok v sušine 35,7 – 42,4 % oproti octanu, kde bol obsah dusíkatých látok pomerne nízky 25,5 %. Obsah proteínu v komerčných krmivách sa podľa Craiga a Helfricha (2002) pohybuje v rozmedzí 20 – 40 % a obsah popolu by nemal presiahnuť 8,5 % v sušine. Zistený obsah popolu v tabuľke 12 presahuje túto hodnotu u všetkých skupín. Vyšší obsah popolu znižuje stráviteľnosť ostatných látok v krmive a vedie k zníženiu rastu (Craig a Helfrich, 2002). Aby sa zabránilo kumulácii, bolo by vhodné používať krmivá z nižším obsahom popolu. Ďalším faktorom by mohlo byť pravidelné omladzovanie kultúry a zefektívnenie separácie za pomoci membrán či jemnejšieho filtra. BNLV sú jedným zo zdrojov energie v krmive (Craig a Helfrich, 2002). Ich nutričná hodnota pre ryby je rozdielna a podľa National Research Council (2011) je väčšia pre ryby herbivorné a omnivorné. Bioflok poskytuje prídavnú hodnotu popri pridávanom krmive, ale je nevyhnutné, aby chovaný druh bol schopný bioflok prijať a stráviť (Crab, 2010). Množstvo stráviteľnej energie bolo u všetkých skupín, s výnimkou glycerolu, nižšie ako sú požiadavky pre tilapiu. Na základe vykonaných analýz nutričného zloženia sa octan javí ako nevhodný uhlíkatý zdroj k tvorbe BFT pre tilapiu. Ako najlepšie vychádzala biomasa kŕmená glycerolom, ktorá pokrývala

všetky nutričné požiadavky tilapie. U múky a glukózy chýba malé množstvo stráviteľnej energie a bolo by potrebné ich doplniť o ďalší zdroj stráviteľnej energie.

Rozbor biomasy ukázal, že obsah **minerálnych látok a ťažkých kovov** nemusí byť ovplyvnený použitým substrátom, aj keď octan vykazoval vyššie hodnoty naakumulovaného niklu a kadmia z použitého krmiva v porovnaní s ostatnými skupinami. Obsah minerálnych látok vo všetkých prípadoch, s výnimkou draslíka, niekoľkonásobne prevyšoval nutričné požiadavky tilapie podľa National Research Council (1993). Veľký rozdiel v obsahu sodíka u octanu v porovnaní s ostatnými skupinami bol pravdepodobne spôsobený použitým substrátom, octanom sodným.

Aby sa predišlo kumulácii ťažkých kovov alebo minerálnych látok je potreba vykonávať pravidelné odstraňovanie časti baktérií. Hargreaves (2013) uvádza, že bioflok môže pracovať pri malej výmene vody 0,5 - 1 % za deň. Pre porovnanie Kuhn a Lawrence (2012) k udržaniu mladého biofloku, v ktorom prevládajú heterotrofné baktérie a nenachádza sa veľké množstvo húb, odporúčajú odstrániť až 10 % baktérií, čo by malo za následok priemerný vek kultúry 10 dní. Pri vyššej obmene kultúry je predpoklad, že by nedochádzalo ku kumulácii v takej miere a získaný materiál by mohol slúžiť ako alternatívny zdroj proteínu.

## 5.5 Test odozvy systému

V dodatočnom pokuse bola snaha zistiť, do akej miery je odozva systému ovplyvnená použitým substrátom. Ich rozpustnosť je demonštrovaná v prílohe 6, kde už po pár minútach bola glukóza a octan úplne rozpustené. U múky dochádzalo k jej nalepovaniu na steny kadičky pri miešaní a následnému usadzovaniu na jej dne. V prípade reaktorov bolo taktiež možné pozorovať čiastočnú flotáciu múky na pene, ktorá sa inak nachádzala aj u ostatných skupín. V grafe 12 je vidieť, že u substrátov dobre rozpustných vo vode došlo k poklesu koncentrácie TAN už po prvej hodine. V porovnaní s múkou im to trvalo o 2 hodiny menej. Podobný experiment vykonal aj Avnimelech (2012) u múky. V jeho pokuse pri pomere C:N 20 došlo k miernemu poklesu TAN až po 4 hodinách. Nie je vylúčené, že aj množstvo aplikovaného substrátu bude mať vplyv na pokles TAN v reaktoroch. Pokus s glukózou a elimináciou TAN vykonal Luo a kol. (2013). V ich práci s použitím  $\text{NH}_4\text{Cl}$  došlo k poklesu TAN pod  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  po 5 hodinách a zároveň eliminácii dusičnanov za 4 hodiny.

## 5.6 Prvotný krmný pokus s použitím bioflok biomasy v krmive

Bioflok je systém sústreďujúci sa na efektívnejšie využitie živín vstupovaných do systémov s minimálnou či nulovou výmenou vody (Faizullah a kol., 2015) a okrem recyklácie živín slúži aj k udržovaniu kvality vody a k prevencii onemocnení (Caldini a kol., 2015). Niekoľko štúdií potvrdilo, že konzumácia biofloku krevetami či rybami zlepšuje rast chovaných organizmov, znižuje FCR a náklady na krmivo (Emerenciano a kol., 2013). V tomto prípade pokus so zakomponovaným sušeným bioflokom v objeme 25 % a 50 % do krmiva amura nepreukázal žiadny signifikantný rozdiel ( $p < 0,05$ ) u sledovaných parametrov v porovnaní s kontrolnou skupinou. Z výsledkov priemernej hmotnosti rýb, SGR a FCR je zrejmé, že ryby vo všetkých skupinách vykazovali podobnú rýchlosť rastu. Najdegerami a kol. (2015) u plôdika kapra obyčajného (*Cyprinus carpio*) zistili, že nahradenie krmiva 25 % a 50 % bioflokom vedie k zníženiu SGR a zvýšeniu histopatologických lézií oproti kontrolnej skupine a skupine s obsahom 75 % biofloku v krmive. U poslednej skupiny došlo podľa autora k zvýšeniu kvality a kvantity pečňových buniek. Určite by bolo zaujímavé otestovať aj krmivo so 75% základom biofloku a na základe týchto výsledkov by sa dalo určiť, do akej miery je nahradenie majoritnej zložky bioflokom efektívne. Faizullah a kol. (2015) a Wang a kol. (2015) porovnávali chov karasa (*Carassius auratus*) v normálnych podmienkach a v BFT. Faizullah a kol. (2015) zistili lepší rast karasa v bioflok systéme (C:N 15) v porovnaní s kontrolou. Za rovnakých podmienok Wang a kol. (2015) nezistili žiadny signifikantný rozdiel ( $p < 0,05$ ), ale pri pomere C:N 20 a 25 bolo zistené štatisticky významne vyššie SGR a FCR. Využitím BFT u kaprovitých rýb sa zaoberal aj Zhao a kol. (2014), konkrétne u kapra, tolstolobika bieleho (*Hypophthalmichthys molitrix*) a tolstolobca pestrého (*Aristichthys nobilis*) v rybníku. Tento spôsob odchovu je v našich klimatických podmienkach možné realizovať len v letných mesiacoch a z toho dôvodu asi nebude využitý k produkčným účelom. Pokus Zhao a kol. (2014) nepreukázal lepší rast rýb v BFT, to ale mohlo byť spôsobené podávaním rovnakého množstva krmiva rybám v kontrole, ale aj skupinám, kde bol pridávaný substrát k dosiahnutiu vyššieho C:N. Tolstolobik a tolstolobec ale vykazovali signifikantne lepší rast ( $p < 0,05$ ) v BFT pri pomere C:N 19 v porovnaní kontrolou. Ďalšou z možností, ktorú testoval Caldini a kol. (2015) na tilapii, je podávanie mokrého biofloku. Ryby, u ktorých bolo nahradených 25 %

dávky krmiva mokrým bioflokem, vykazovali rovnaké rastové vlastnosti ako kontrolná skupina a zároveň lepšie ako skupina, kde bolo nahradených 25 % sušeným bioflokem.

Výsledky nami vykonaného pokusu mohli byť taktiež ovplyvnené kvalitou pridávaného biofloku. Ten bol po odseparovaní a čiastočnom odstránení vody sušený minimálne 24 hodín pri teplote 80 °C. Vysoká teplota mala zahubiť prípadné patogény, ale teploty nad 40 °C taktiež prispievajú k denaturácii. Z toho dôvodu by bolo vhodné v budúcnosti využívať nižšie teploty k sušeniu biofloku.

V tabuľke 6 je vidieť, že nutričné zloženie nami použitých krmných zmesí je veľmi podobné. Aj keď nahradenie časti krmiva bioflokem neurýchlilo rast chovaných organizmov, s určitosťou ale došlo k zníženiu nákladov na krmivo a 1 kg prírastku oproti rybám kŕmených výlučne zmesami od výrobcu a to až o 50 %. Prebiehajúci experiment bol predčasne ukončený po jednom mesiaci. Dôvodom bolo ochorenie iných chovaných rýb, nutnosť zastaviť prebiehajúce pokusy a vykonať dôkladnú dezinfekciu celej miestnosti a systému. Aj napriek nedokázanému vplyvu na produkčné ukazovatele mohlo dôjsť k pôsobeniu krmiva na metabolizmus experimentálnych rýb. Pozitívny či negatívny efekt by bolo pravdepodobne možné pozorovať po dlhšej dobe. Za zmienku určite stojí histologické vyšetrenie čriev, pečene či odpoveď organizmu na stres.

Bioflok, podľa Ju a kol. (2008), môže poskytnúť zdroj výživy, bioaktívnych zložiek a niekoľko zatiaľ neobjavených efektov. Napríklad podľa Xu a Pana (2012), bioflok vykazuje pomerne vysokú aktivitu proteázy a amylázy, čo vedie k zlepšeniu trávenia a využitia krmiva. Nie je preto správne porovnávať zloženie krmných zmesí a biofloku len na základe obsahu proteínu či lipidu, ale treba brať do úvahy aj nutričnú hodnotu a vplyv na rast a imunitu chovaných druhov (Liang a kol., 2014).

## 6 Záver

Odpadová voda z recirkulačných akvakultúrnych systémov obsahuje veľké množstvo nevyužitých živín, ktoré končia v kanalizácii alebo sú vypúšťané do vodného prostredia. V modeli čistiarne odpadových vôd na báze bioflokou sa podarilo dokázať, že táto voda môže byť znovu použitá. Náš model slúžil k vyčisteniu cca 50 l vody a koncentrovaného sedimentu z mechanického filtra za deň, ale pravdepodobne by zvládol aj väčší objem, resp. vyššie zaťaženie.

Porovnanie uhlíkatých substrátov pomerne dobre ukázalo, že zvolený zdroj uhlíka ovplyvňuje nie len nutričné zloženie, ale aj kultúru baktérií. Aj napriek relatívne vyrovnaným podmienkam medzi skupinami, čo sa týka teploty a prísunu živín, hodnota pH predstavuje ďalší faktor ovplyvňujúci vývoj bioflokou. Z dôvodu postupného zvyšovania hodnoty pH preto neodporúčame využitie octanu sodného ako zdroj uhlíku bez pridania pufru pH. Glycerol častokrát vykazoval lepšie výsledky oproti ostatným skupinám, ale spolu s octanom predstavujú relatívne drahé substráty. Na druhú stranu múka, najlacnejší použitý substrát, je dobre dostupná a v BFT často používaná. Jej nevýhodou je, že nie je dobre rozpustná vo vode. Taktiež boli u tejto skupiny mierne problémy so stabilizáciou pH, ale v porovnaní s modelovým BFT systémom, tu taký problém nebol. Ako najlepšia sa ukázala byť glukóza. Je síce mierne drahšia ako múka, ale je dobre rozpustná vo vode a C je tak rýchlejšie dostupný pre baktérie. Biomasa bioflokou využívajúceho glukózu taktiež obsahuje v sušine vyššie percentuálne zastúpenie dusíkatých látok, vlákniny a menej tuku a popola v porovnaní s múkou a octanom. Zloženie glycerolu bolo veľmi podobné, rozdiely boli vo vyššom obsahu tuku a mierne nižšom obsahu popola a vlákniny. Z hľadiska nutričného sa najlepšie javila biomasa využívajúca glycerol a najhoršie využívajúca octan. Zvyšným skupinám chýba k plnohodnotnému nutričnému zloženiu krmiva pre tilapiu malé množstvo stráviteľnej energie.

Pri prevádzke bioflok reaktoru treba dbať na vek kultúry a jej zloženie, aby sme sa vyhli možným komplikáciám. Niektoré naakumulované látky totiž negatívne ovplyvňujú baktérie. Pri nevykonávaní pravidelnej výmeny vody a následnej konzumácií baktérií rybami môže dochádzať k ukladaniu týchto nežiadúcich látok v tkanivách chovaných organizmov.

Experiment s využitím biofloku v krmive ukázal jeho schopnosť znížiť produkčné náklady pri zachovaní rovnakej rýchlosti rastu. Možnosť zabudovania biofloku do krmných zmesí poskytuje priestor pre ďalší výskum, nakoľko poskytuje optimálne nutričné zloženie pre mnoho druhov rýb.



## 7 Zoznam použitej literatúry

- Abdel-Tawwab, M., Mousa, M.A.A.A., Ahmad, M.H., Sakr, S.F.M., 2007. The use of calcium pre-exposure as a protective agent against environmental copper toxicity for juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 264: 236 - 246.
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A.M., Mohsin, M., 2015. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 45 (2): 733 – 741.
- Avnimelech, Y., 1999. Carbon and nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176: 227–235.
- Avnimelech, Y., 2006. Bio-filters: the need for a new comprehensive approach. *Aquacultural Engineering*, 34: 172 – 178.
- Avnimelech, Y., 2011. Tilapia production using biofloc technology. *Aquacultural Engineering Society*, 66-68.
- Avnimelech, Y., 2012. *Biofloc Technology- A Practical Guide Book*, Second edition. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 273 pp.
- Azim, M.E., Little, D.C., 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 283: 29 – 35.
- Bauer, W., Prentice-Hernandez, C., Tesser, M.B., Wasielesky, W., Poersch, L.H.S. 2012. Substitution of fishmeal with microbial floc meal and soy protein concentrate in diets for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 342: 112 – 116.
- Biggs, C.A., Lant, P.A., 2000. Activated sludge flocculation: on-line determination of floc size and the effect of shear. *Water Research*, 34 (9): 2542 – 2550.
- Boyd, C.E., 1998. Pond water aeration systems. *Aquacultural Engineering*, 18(1): 9 – 40.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R.H., Pearson, D.C., 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a highintensity, zero-exchange system. *Aquaculture*, 232: 525 – 537.

- Caldini, N. N., Cavalcante, D. H., Rocha Filho, P. R. N., Carmo e Sá, M. V., 2015. Feeding Nile tilapia with artificial diets and dried bioflocs biomass. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 37 (4): 335 – 341.
- Carberry, J.B., Englande, A.J., 1983. *Sludge Characteristics and Behavior*. Nato Science Series, Elsevier Springer Netherlands, 441 pp.
- Chaignon, V., Lartiges, B.S., El Samrani, A., Mustin, C., 2002. Evolution of size distribution and transfer of mineral particles between flocs in activated sludges: an insight into floc exchange dynamics. *Water Research*, 36 (3): 676 – 684.
- Choque-Delgado, G.T., Tamashiro, W.M.S.C., Marostica Jr, M.R., Moreno, Y.M.F., Pastore, G.M., 2011. The putative effects of prebiotics as immunomodulatory agents. *Food Research International*, 44 (10): 3167 - 3173.
- Chu, C.P., Lee, D.J., 2004. Multiscale structures of biological flocs. *Chemical Engineering Science* 59 (8–9): 1875 – 1883.
- Colt, J., 2006. Water quality requirements for reuse systems. *Aquacultural Engineering*, 34 (3): 143 – 156.
- Crab, R., 2010. *Bioflocs technology: an integrated system for the removal of nutrients and simultaneous production of feed in aquaculture*. PhD thesis, Ghent University.
- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, 270: 1 – 14.
- Crab, R., Boon, N., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2010b. Different organic carbon sources shape the nutritional properties and the microbial community composition of bioflocs. *Aquaculture*, Submitted.
- Crab, R., Chielens, B., Wille, M., Bossier, P., Verstraete, W., 2010a. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquacultural Engineering*, 41: 559 – 567.
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture* 356: 351 - 356.
- Crab, R., Ekasari, J., Defoirdt, T., Verstraete, W., Bossier, P., 2010c. The effect of bioflocs on the survival and growth of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, Submitted.

- Crab, R., Kochva, M., Verstraete, W., Avnimelech, Y., 2009. Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia. *Aquacultural Engineering*, 40: 105 – 112.
- Craig, S., Helfrich, L.A., 2002. *Understanding Fish Nutrition, Feeds and Feeding*. Virginia Cooperative Extension, Yorktown (Virginia), 420: 4 pp.
- Cruz, P.M., Ibanez, A.L., Hermosillo, O.A.M., Saad, H.C.R., 2012. Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiology*, Article ID 916845, 13 pp.
- De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W., 2008. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277: 125 - 137.
- De Schryver, P., Verstraete, W., 2009. Nitrogen removal from aquaculture pond water by heterotrophic nitrogen assimilation in lab-scale sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, 100: 1162 – 1167.
- Defoirdt, T., Halet, D., Vervaeren, H., Boon, N., Van de Wiele, T., Sorgeloos, P., Bossier, P., Verstraete, W., 2007. The bacterial storage compound poly- $\beta$ -hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Environmental Microbiology*, 9 (2): 445 – 452.
- Dhokpande, S., Kaware, J., Kulkarni, S., 2014. Activated Sludge for Heavy Metal Removal – A Review. *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology*. 2 (7).
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257: 346 – 358.
- Ekasari, J., Angela, D., Waluyo, S.H., Bachtiar, T., Surawidjaja, E.H., Bossier, P., DeSchryver, P., 2014. The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. *Aquaculture* 426 – 427: 105 – 111.
- Ekasari, J., Crab, R., Verstraete, W., 2010. Primary nutritional content of bio-flocs cultured with different organic carbon sources and salinity. *HAYATI Journal of Biosciences*, 17: 125 - 130.
- El-Sayed, A.M. 2006. Tilapia culture in salt water: Environmental requirements, nutritional implications and economic potentials. Eighth Symposium on Advances in Nutritional Aquaculture, Nuevo Leon, Mexico. November 15–17.

- El-Sherif, M.S., El-Feky, A.M., 2008. Effect of ammonia on Nile Tilapia (*O.niloticus*) performance and some hematological and histological measures. Eighth International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Cairo, Egypt, October 12-14: 513 - 530.
- Emerenciano, M., Cuzon, G., Goguenheim, J., Gaxiola, G., Aquacop., 2011. Floc contribution on spawning performance of blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture Research*, 44 (1): 75 – 85.
- Emerenciano, M., Ballester, E.L.C., Cavalli, R.O., Wasielesky, W., 2012a. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquaculture Research*, 43: 447 - 457.
- Emerenciano, M., Cuzon, G., Arévalo, M., Gaxiola, G., 2012b. Biofloc technology applied to intensive broodstock farming of pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* (Part II): spawning performance, biochemical composition and fatty acid profile of eggs. *Aquaculture Research*, (submitted).
- Emerenciano, M., Cuzon, G., Arévalo, M., Miquelajauregui, M.M., Gaxiola, G., 2012c. Effect of short-term fresh food supplementation on reproductive performance, biochemical composition and fatty acid profile of *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared under biofloc conditions. *Aquaculture International*, (submitted).
- Emerenciano, M., Cuzon, G., Paredes, A., Gaxiola, G., 2012d. Biofloc technology applied to intensive broodstock farming of pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* (Part I): growout, water quality, microorganisms profile and proximate analysis of biofloc. *Aquaculture Research*, (submitted).
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., Cuzon, G., 2013. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. *Biomass Now- Cultivation and Utilization* 301-328.
- Faizulah, M., Rajagopalsamy, C. B. T., Ahilan, B., Francis, T., 2015. Impact of biofloc technology on the growth of goldfish young ones. *Indian Journal of Science and Technology*, 8: 13pp.
- FAO, 2004. The state of world fisheries and aquaculture 2004. FAO, Rome.
- Goldman, J. C., Caron, D. A., Denmett, M. R., 1987. Regulation of gross growth efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C:N ratio. *Limnology and Oceanography*, 32: 1239 – 1252.

- Hantula, J., Bamford, D.H., 1991. The efficiency of the protein-dependent flocculation of *Flavobacterium* sp s sensitive to the composition of growth-medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36: 100 – 104.
- Hardy, R.W., 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research*, 41: 770 – 776.
- Hargreaves, J.A., 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 34: 344 – 363.
- Hargreaves, J.A., 2013. *Biofloc Production Systems for Aquaculture*. Southern Regional Aquaculture Center, 4503.
- Hari, B., Kurup, B.M., Varghese, J.T., Schrama, J.W., Verdegem, M.C.J., 2006. The effect of carbohydrate addition on water quality and the nitrogen budget in extensive shrimp culture systems. *Aquaculture*, 252 (2–4): 248 – 263.
- Hassaana, M.S., Soltan, M.A., Abdel-Moez, A.M., 2015. Nutritive value of soybean meal after solid state fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Animal Feed Science and Technology*, 201: 89 – 98.
- He, T., Li, Z., Sun, Q., Xu, Y., Ye, Q., 2016. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Pseudomonas tolaasii* Y-11 without nitrite accumulation during nitrogen conversion. *Bioresource Technology*, 200: 493 – 499.
- Irianto, A., Austin, B., 2002a. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* 25: 633 – 642.
- Jorand, F., Zartarian, F., Thomas, F., Block, J.C., Bottero, J.Y., Villemin, G., Urbain, V., Manem, J., 1995. Chemical and structural (2d) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Water Research*, 29 (7): 1639 – 1647.
- Ju, Z., Forster, I., Conquest, L., Dominy, W., 2008. Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp floc or floc fractions to a formulated diet. *Aquaculture Nutrition*, 14: 533 – 543.
- Khan, R. U., Naz, S., 2013. The applications of probiotics in poultry production. *World's Poultry Science Journal*, 69 (3): 621 – 632.
- Kral, M., Angelovicova, M., Mrazova, L., 2012. Application of probiotics in poultry production. *Animal Science Biotechnology*, 45 (1): 55 – 57.

- Krishna, C., Van Loosdrecht, M.C.M., 1999. Effect of temperature on storage polymers and settleability of activated sludge. *Water Research*, 33 (10): 2374 – 2382.
- Kuhn, D.D., Boardman, G.D., Lawrence, A.L., Marsh, L., Flick, G.J., 2009. Microbial flocs generated in bioreactors is a superior replacement ingredient for fishmeal or soybean meal in shrimp feed. *Aquaculture*, 296: 51 – 57.
- Kuhn, D.D., Lawrence, A.L., Boardman, G.D., Patnaik, S., Marsh, L., Flick, G.J., 2010. Evaluation of two types of bioflocs derived from biological treatment of fish effluent as feed ingredients for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 303: 28 – 33.
- Kuhn DD, Lawrence A (2012) Ex-situ biofloc technology. In: Avnimelech Y, editor. *Biofloc Technology - a practical guide book*, 2nd ed., The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 217 - 230.
- Kurath, G., 2008. Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. *Revue Scientifique Technique (Technical Office of Epizootics)*, 27: 175 – 196.
- Landman, M.J., Van Den Heuvel, M.R., Ling, N., 2005. Relative sensitivities of common freshwater fish and invertebrates to acute hypoxia. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 39 (5): 1061 – 1067.
- Liang, W., Luo, G., Tan, H., Ma, N., Zhang, N., Li, L., 2014. Efficiency of biofloc technology in suspended growth reactors treating aquacultural solid under intermittent aeration. *Aquacultural Engineering*, 59: 41 – 47.
- Liu, Y., Hu, T., Song, Y., Chen, H., Lv, Y., 2015. Heterotrophic nitrogen removal by *Acinetobacter* sp. Y1 isolated from coke plant wastewater. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 120 (5): 549 – 554.
- Logan, A.J., Lawrence, A., Dominy, W., Tacon, A.G.J., 2010. Single-cell proteins from food byproducts provide protein in aquafeed. *Global Advocate*, 13: 56 - 57.
- Luo, G.Z., Avnimelech, Y., Pan, Y.F., Tan, H.X., 2013. Inorganic nitrogen dynamics in sequencing batch reactor using biofloc technology to treat aquaculture sludge. *Aquacultural Engineering*, 52: 73 – 79.
- Luo, G., Liang, W., Tan, H., Yao, Ch., Zhang, N., Lu. L., 2013. Effects of calcium and magnesium addition on the start-up of sequencing batch reactor using biofloc technology treating solid aquaculture waste. *Aquacultural Engineering*, 57: 32 – 37.

- Madigan, M.T., Martinko, J.M., 2006. Brock Biology of Microorganisms, 11th ed. Pearson Prentice Hall (Pearson Education, Inc), Upper Saddle River (New Jersey). 992 pp.
- Martins, A.M.P., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., 2003. Effect of dissolved oxygen concentration on sludge settleability. Applied Microbiology and Biotechnology, 62 (5–6): 586 – 593.
- Maurya, P., Mogra, R., Bajpai, P., 2014. Probiotics: an approach towards health and disease. Trends in Biochemical Science, 7 (20): 3107 – 3113.
- Mente, E., Coutteau, P., Houlihan, D., Davidson, I., Sorgeloos, P., 2002. Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: effects of dietary protein source. The Journal of Experimental Biology 205 (20): 3107 – 3122.
- Mikkelsen, L.H., Gotfredsen, A.K., Agerbaek, M.L., Nielsen, P.H., Keiding, K., 1996. Effects of colloidal stability on clarification and dewatering of activated sludge. Water Science Technology, 34: 449 - 457.
- Mjoun, K., Rosentrater, K.A., Brown, M.L., 2010. Tilapia: Environmental Biology and nutritional requirements. North Central Agricultural Research Laboratory, USDA Agricultural Research Service Michael L. Brown, Department of Wildlife and Fisheries Sciences, South Dakota State University, 7 pp.
- Najdegarami, E.H., Bakhshi, F., Lakami, F.B., 2015. Effect of biofloc on growth performance, digestive enzyme activities and liver histology of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings in zero-water exchange system. Fish Physiology and Biochemistry, 42 (2): 457 – 465.
- National Research Council (U.S.). Committee of Animal Nutrition, 1993. Nutrient requirements of Fish. Washington, D.C. National Academies Press, 128 pp.
- National Research Council (U.S.). Committee on the Nutrient Requirements of Fish and Shrimp, 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington, D.C., National Academies Press, 392 pp.
- Nayak, S.K., 2010. Probiotics and immunity: a fish perspectives. Fish and Shellfish Immunology, 29: 2 – 14.

- Naylor, R.L., Goldburg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M., 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405: 1017 - 1024.
- Naylor, S.J., Moccia, R.D., Durant, G.M., 1999. The Chemical Composition of Settleable Solid Fish Waste (Manure) from Commercial Rainbow Trout Farms in Ontario, Canada. *North American Journal of Aquaculture*, 61: 21 – 26.
- Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S., Kim H.Y., 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 1171 – 1185.
- Peréz-Rostro, C.I., Pérez-Fuentes, J.A., Hernández-Vergara, M.P. 2014. Biofloc, a Technical Alternative for Culturing Malaysian Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. In: Hernandez-Vergara M., Perez-Rostro C. I. (eds), *Sustainable aquaculture techniques*, 87-104
- Piedrahita, R.H., 2003. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture*, 226: 35 – 44.
- Prajith, K.K., 2011. Application of Biofloc Technology (BFT) in the nursery rearing and farming of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (deMan). Ph.D. Thesis, Faculty of Marine Sciences, Cochin University of Science and Technology, Kochi, 213 ppt.
- Ray, A.J., Lotz, J.M., 2014. Comparing a chemoautotrophic-based biofloc system and three heterotrophic-based systems receiving different carbohydrate sources. *Aquacultural Engineering*, 63: 54 – 61.
- Reddy, K.R., Feijtel, T.C., Patrick, W.H., 1986. Effect of soil redox conditions on microbial oxidation of organic matter. In: Chen, Y., Avnimelech, Y. (Eds.), *The role of organic matter in modern agriculture*, Martinus Nijhoff Pub., Dordrecht, The Netherlands, 117 - 156.
- Ricke, S.C., 2003. Perspectives on the use of organic acids and shortchain fatty acids as antimicrobials. *Poult Sci* 82:632-639.
- Ross, L.G., 2000. Environmental physiology and energetics. In: Beveridge, M.C.M., Mc Andrew, B.J. (Eds.) *Tilapias: Biology and Exploitation*, Fish and Fisheries Series 25, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 89-128.
- Russel, J.B., 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *Journal of Applied Bacteriology*, 73: 363 - 370.



- Ruan, Y.J., Deng, Y.L., Guo, X.S., Timmons, M.B., Lu, H.F., Han, Z.Y., Ye, Z.Y., Shi, M.M., Zhu, S.M., 2016. Simultaneous ammonia and nitrate removal in an airlift reactor using poly(butylene succinate) as carbon source and biofilm carrier. *Biosecure Technology*, 216: 1004 – 1013.
- Salehizadeh, H., Van Loosdrecht, M.C.M., 2004. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*, 22 (3): 261 – 279.
- Salze, G., Mclean, E., Battle, P.R., Schwarz, M.H., Craig, S.R., 2010. Use of soy protein concentrate and novel ingredients in the total elimination of fish meal and fish oil in diets for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 298: 294 – 299.
- Schneider, O., Sereti, V., Eding, E.H., Verreth, J.A.J., 2005. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquaculture Engineering*, 32: 379 – 401.
- Sin, N. S., 2001. Effects of trace zinc, copper and chromium on organic adsorption capacity and organic removal in activated sludge. PhD thesis, The Hong Kong Polytechnic University.
- Singh, K., Kallali, B., Kumar, A., Thaker, V., 2011. Probiotics: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S287-S290
- Song, S.K., Beck, B.R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H.D., Ringø, E., 2014. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 40 (1): 40 – 48.
- Steffens, W., 1989. *Principals of fish nutrition*. Halsted Press, New York: 384 pp.
- Streekrihnan, T.R., Tyagi, R.D., 2004. Metal Removal From Sewage Sludge: Bioengineering and Biotechnological Applications. *Heavy Metal Stress in Plants*, 392 – 408.
- Syngai, G.G., Gopi, R., Bharali, R., Dey, S., Lakshmanan, G.M.A., Ahmed, G., 2015. Probiotics – the versatile functional food ingredients. *Journal of Food Science and Technology*, 53 (2): 921 – 933.
- Tacon, A. G. J., 2000. Shrimp feeds and feeding regime in zero exchange outdoor tanks. *Global Aquaculture Advance*, 3 (2): 15 – 16.
- Teitelbaum, J.E., Walker, W.A., 2002. Nutritional impact of pre and pro-biotics as protective gastrointestinal organisms. *Annual Review of Nutrition*, 22: 107 - 138.

- Thompson, F.L., Abrea, P.C., Wasielesky, W., 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*, 203: 263 - 278.
- Torrans, E.L., 2005. Effect of oxygen management on culture performance of channel catfish in earthen ponds. *North American Journal of Aquaculture*, 67 (4): 275 – 288.
- van Ginneken, V.J.T., van Eersel, R., Balm, P., Nieveen, M., van den Thillart, G., 1997. Tilapia are able to withstand long-term exposure to low environmental pH, judged by their energy status, ionic balance and plasma cortisol. *Journal of Fish Biology*, 51 (4): 795 – 806.
- Wang, J.K., 2003. Conceptual design of a microalgae-based recirculating oyster and shrimp system. *Aquacultural Engineering*, 28 (1–2): 37 – 46.
- Wang, G., Yu, E., Xie, J., Yu, D., Li, Z., Luo, W., Qiu, L., Zheng, Z., 2015. Effect of C/N ratio on water quality in zero-water exchange tanks and the biofloc supplementation in feed on the growth performance of crucian carp, *Carassius auratus*. *Aquaculture*, 443: 98 – 104.
- Wasielesky, W. Jr., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258: 396 – 403.
- Watanabe, T., 2002. Strategies for further development of aquatic feeds. *Fish Science*, 68: 242 - 252.
- Wilén, B.M., Balmer, P., 1999. The effect of dissolved oxygen concentration on the structure, size and size distribution of activated sludge flocs. *Water Research*, 33 (2): 391 – 400.
- Wilén, B.M., Nielsen, J.L., Keiding, K., Nielsen, P.H., 2000. Influence of microbial activity on the stability of activated sludge flocs. *Colloids and Surfaces Biointerfaces*, 18 (2): 145 – 156.
- Xu, W.-J., Pan, L.Q., 2012. Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. *Aquaculture*, 356 – 357: 147 – 152.
- Yang, S.P., Qiu, D.Q., 2006. Water quality in the high-density shrimp culturing ponds. *Fisheries Science*, 25: 459 – 462.
- Yao, S., Ni, J., Ma, T., Li, C., 2013. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2. *Bioresources Technology*, 139: 80 – 86.

- Yousefian, M., Amiri, M. S., 2009: A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. *African Journal of Biotechnology*, 8: 7313 – 7318.
- Yu, J., Plackett, D., Chen, L.X.L., 2005. Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly [(R) -3-hydroxybutyrate] under acidic and alkaline conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 89: 289 - 299.
- Zhu, X.Z., Liu, Y.J., Tian, L.X., Mai, K.S., Zheng, S.X., Pan, Q.J., Cai, M.C., Zheng, C.Q., Zhang, Q.H., Hu, Y., 2010. Effects of dietary protein and lipid levels on growth and energy productive value of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities. *Aquaculture Nutrient*, 16: 392 – 399.

### **Internetové odkazy:**

1. Čistiareň odpadových vôd AS-VARIOcomp K, dostupné z: <http://www.asio.cz/cz/as-variocomp-k>  
(vzhladnuté 12. 10. 2016)
2. Nile tilapia - Nutritional requirements, dostupné z:  
<http://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/nile-tilapia/nutritional-requirements/en/>  
(vzhladnuté 19. 4. 2017)

## **8 Zoznam príloh**

**Príloha č. 1:** Tabuľka základných parametrov vzoriek vody po sedimentácii.

**Príloha č. 2:** Tabuľka analýzy straty žíhaním a obsahu sušiny.

**Príloha č. 3:** Zoznam použitých metód (ASIO):

**Príloha č. 4:** Zoznam použitých metód (AGRO-LA).

**Príloha č. 5:** Rozdiely v sedimentácii za 1 hodinu.

**Príloha č. 6:** Rozdiel rozpustnosti u použitých substrátov.

## 9 Prílohy

**Príloha 1:** Tabuľka základných parametrov vzoriek vody po sedimentácii.

Označenie	pH	CHSK <sub>Cr</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	BSK <sub>5</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	N-NH <sub>4</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>3</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	N <sub>celk.</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	NL (mg.l <sup>-1</sup> )
Vzorka 1 po sedimentácii	6,78	3 446	1 920	17,3	35,7	103	557
Miera odstránenia (%)		84	76	9	6	80	96
Vzorka 2 po sedimentácii	5,77	6 053	2 350	25,6	82,4	198	938
Miera odstránenia (%)		60,4	58,8	0	3,3	59,7	87,5

**Príloha 2:** Tabuľka analýzy straty žíhaním a obsahu sušiny.

Označenie	Zvyšok po žíhaní (mg.l <sup>-1</sup> )	Strata žíhaním-organika (mg.l <sup>-1</sup> )	Strata žíhaním-organika (%)	Sušina (%)	Strata žíhaním (%)
Vzorka 1	4 181	10 452	71,4	-	-
Vzorka 2	1 660	5860	77,9	-	-
Vzorka 1 po sedimentácii	39	517	93,0	4,93	72,32
Vzorka 2 po sedimentácii	667	271	28,9	3,83	73,54

**Príloha 3:** Zoznam použitých metód (ASIO):

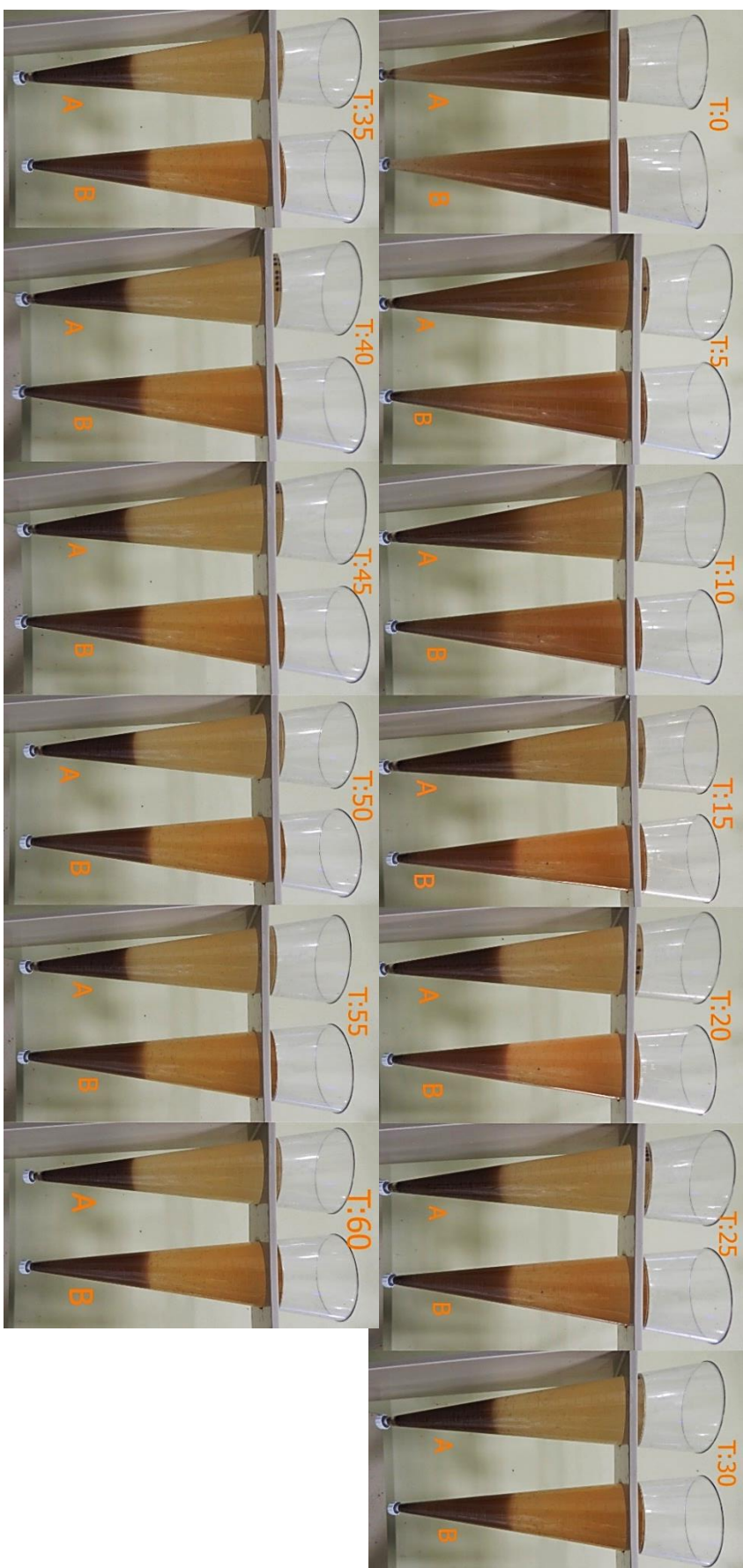
- pH: elektrochemická metóda, ČSN ISO 10523
- CHSK: ČSN ISO 15705
- BSK: respirometrická metóda založená na meraní podtlaku v uzavretom systéme
- N-NH<sub>4</sub>: spektrofotometricky, ČSN ISO 7150-1
- N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: spektrofotometricky, ČSN 75 7455
- N<sub>celk.</sub>: viazaný dusík je oxidovaný peroxidom na dusičnany a tie sú stanovené fotometricky metódou s 2,6-dimethylfenolom.
- Nerozpustené látky sušené a žíhané: gravimetricky, ČSN EN 872 a metóda filtrácie filtrom zo sklenených vlákien ČSN 75 7350
- Sušina: gravimetricky, ČSN EN 12880, strata žíhaním ČSN EN 12879

#### **Príloha 4:** Zoznam použitých metód (AGRO-LA).

- (A) SOP 6: ČSN ISO 7150-1
- (A) SOP 11: ČSN ISO 7890-1, ČSN 75 7455
- (A) SOP 19: ČSN EN ISO 6878
- (A) SOP 20: ČSN EN ISO 6878
- (A) SOP 21: ČSN ISO 7980
- (A) SOP 22: ČSN ISO 9964-3
- (A) SOP 23: ČSN 75 7440
- (A) SOP 38-1: ČSN 757385, ČSN EN 1233, ČSN EN ISO 12020, ČSN ISO 8288, ČSN EN ISO 5961
- SOP 38-3: ČSN EN 1233, ČSN EN ISO 5961
- (N) SOP 38-4: ČSN EN 1233, ČSN EN ISO 5961
- (A) SOP 39-2: ČSN ISO 11465
- (A) SOP 40: ČSN EN ISO 15586
- (N) SOP 41: JPP ZK I kap. 7, JPP AR kap. 3, ČSN 46 7092-12, ČSN 46 7092-14, ČSN 46 7092-15
- (N) SOP 43-1: JPP ZK I kap. 7, JPP AR kap. 3, ČSN 46 7092-11
- (A) SOP 44: JPP AP I kap. 2.3, ČSN ISO 10523, ČSN ISO 10390
- (A) SOP 52: PLZK, DL a P I kap. 3.1
- (A) SOP 53: JPP MRCH P HKO I kap. 15, ČSN ISO 6541
- (A) SOP 55-2: PLZK,DL a P I kap. 2.1, JPP AR kap. 3
- (A) SOP 55-3: JPP AP III kap 2.1.4
- (N) SOP 55-3: JPP AP III kap 2.1.4, Kjeldahl
- (N) SOP 84: JPP ÚKZÚZ Brno
- (A) SOP 88: ČSN ISO 8288, ČSN 75 9335, ČSN EN 13657, ČSN EN ISO 15587-1, ČSN EN ISO 15587-2, Pracovní manuál GBS
- (A) SOP 431: ČSN EN 12260
- (SA) 168: SOP OV 201.01 (ČSN EN ISO 11885)

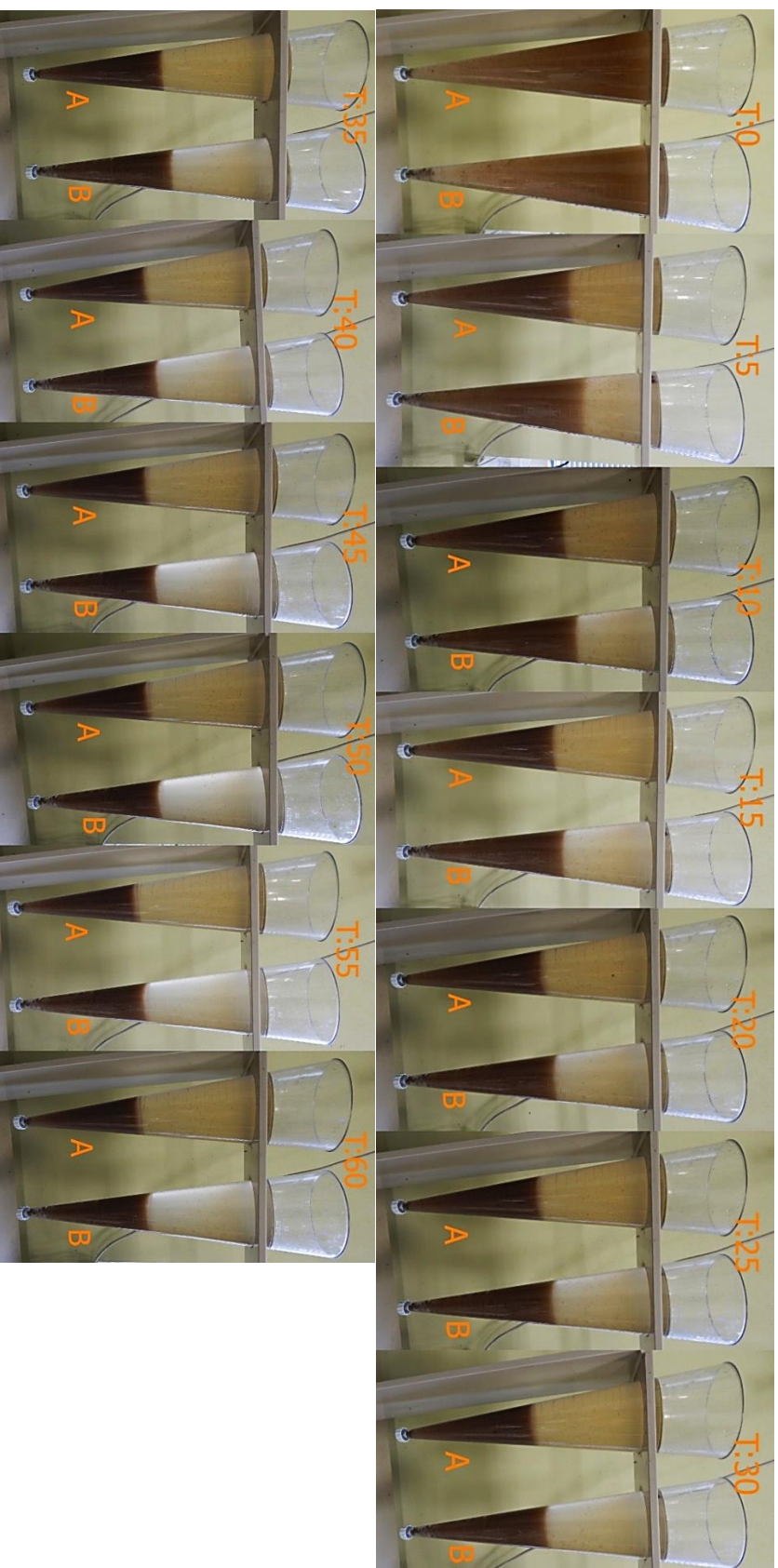
Pozn.: (A) metódy podliehajúce akreditácii ČIA, (N) metódy nepodliehajúce akreditácii ČIA, (SA) akreditovaná subdodávka.

**Príloha 5:** Rozdiely v sedimentácii za 1 hodinu.



	T:0	T:5	T:10	T:15	T:20	T:25	T:30	T:35	T:40	T:45	T:50	T:55	T:60
A				180	180	155	150	135	130	125	125	120	120
B				180	180	170	170	170	170	165	165	165	165

Tabuľka množstva pozorovaných usadených vločiek po dobu 60 minút u glukózy (A) a glycerolu (B).



	T:0	T:5	T:10	T:15	T:20	T:25	T:30	T:35	T:40	T:45	T:50	T:55	T:60
A		450	340	300	280	250	245	240	210	210	205	200	195
B		390	300	255	245	220	205	200	195	185	175	170	170

Tabuľka množstva pozorovaných vločiek po dobu 60 minút u glukózy (A) a glycerolu (B).



**Príloha 6:** Rozdiel rozpustnosti u použitých substrátov.

- A: navážený substrát v laboratórných kadičkách (7 g pšeničnej múky a glukózy, 7,5 g octanu sodného, 15 ml 33% glycerolu).
- B: 5 minút po pridaní pitnej vody.
- C: zamiešanie po pridaní pitnej vody.
- D: 3 minúty po zamiešaní.



## 10 Abstrakt

### **Využitie odpadovej vody z RAS pre produkciu mikrobiálneho proteínu.**

Cieľom tejto diplomovej práce bolo stanovenie obsahu živín odpadovej vody z RAS, overenie možnosti jej čistenia za pomoci modelu čistiarne OV využívajúcej heterotrofné baktérie, experimentálne porovnať vplyv použitého uhlíkatého substrátu v počiatočnej fáze kultivácie baktérií a overenie použitia bioflok v krmive. Voda k analýze bola odobraná z odchovných nádrží, odpadu z mechanického filtra a vodovodnej vody dopĺňajúcej systém. Model čistiarne OV (podľa modelu AS- VARIOcomp K), bol rozdelený do 3 častí (usadzovacia, aktivačná a dosadzovacia) a následne naplnený vodou zo stávajúceho BFT systému. K experiment porovnávania uhlíkatých substrátov boli použité 4 skupiny: múka, glukóza, octan a glycerol, každá v 3 opakovaniach. Kultivácia prebiehala 28 dní, na konci bolo stanovené nutričné zloženie jednotlivých BFT systémov. Analýzy vody preukázali, že OV z mechanického filtra je bohatá na živiny a obsahuje veľké množstvo nerozpustených látok. Takáto voda nie je bez predchádzajúcej úpravy vhodná k čisteniu v konvenčnom systéme. Model čistiarne OV vyčistil denne cca 50 l vody z vortexu, ktorá bola prečerpaná späť do RAS. Pravdepodobne by zvládol aj väčší objem. Kultivácia baktérií využívajúce rozdielne zdroje uhlíka je v počiatočnej fáze veľmi podobná s nástupom nitrifikačných baktérií v biofiltri. Dokázalo sa, bioflok je taktiež schopný odstraňovať z vody dusičnany. Najvyššia nameraná koncentrácia medzi skupinami bola  $1695 \pm 438 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_3^-$  a v priebehu 6 dní došlo k poklesu na  $493 \pm 409 \text{ mg.l}^{-1}$ . Priemerné FVI na konci kultivácie pre múku, glukózu, octan a glycerol boli  $102 \pm 57$ ;  $267 \pm 59$ ;  $219 \pm 26$  a  $293 \pm 9 \text{ ml.l}^{-1}$ . Experiment porovnávajúci uhlíkaté substráty taktiež ukázal, že nutričné zloženie bioflok je podobné so zložením komerčných krmív. Heterotrofné baktérie sú v čase taktiež schopné kumulovať ťažké kovy a minerálne látky. Pokusom, so zakomponovaným bioflokom v množstve 0 %, 25 % a 50 % v krmnej zmesi, nepreukázal žiadny signifikantne významný rozdiel ( $p < 0,05$ ) medzi skupinami juvenilných amurov bielych (*Ctenopharyngodon idella*) na prežitie, FCR a SGR.

**Kľúčové slová:** bioflok, zdroj uhlíku, nutričné zloženie, kvalita vody, krmny pokus

## 11 Abstract

### **Usage of wastewater from RAS for microbial protein production.**

The aim of this diploma thesis was to analyse waste water quality from RAS, verification of its possible cleaning in a model of wastewater treatment plant using heterotrophic bacteria, experimentally compare the influence of used carbon source in the initial phase of bacteria cultivation and evaluation of biofloc usage in fish feed. Analysed water was obtained from rearing tanks, sewage water from mechanical filtration and tap water for filling the system. Wastewater treatment plant (built according to AS – VARIOcomp K model) was divided into 3 parts (primary settling, activated part, secondary settling) and then filled with water from running BFT system. For carbon source comparing experiment 4 groups were used: flour, glucose, acetate and glycerol, each in 3 replications. Cultivation took 28 days and at the end the nutritional composition of each BFT system was evaluated. Water analyses showed that sewage water from mechanical filtration is nutrient rich and contain big amount of undissolved solids. This water is not suitable for purification in conventional system without pre-treatment. The model of water treatment plant purified approximately 50 l of water from vortex per day which was pumped back into RAS. Probably it would be capable of purifying bigger volume. Bacteria cultivation using different carbon sources is very similar to start-up of nitrifying bacteria in biofilter at the beginning. It was proved that biofloc is also capable of removing nitrates from water. The biggest measured concentration among groups was  $1695 \pm 438 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_3^-$  and in 6 days it decreased to  $493 \pm 409 \text{ mg.l}^{-1}$ . The average FVI for flour, glucose, acetate and glycerol were  $102 \pm 57$ ;  $267 \pm 59$ ;  $219 \pm 26$  and  $293 \pm 9 \text{ ml.l}^{-1}$  at the end of cultivation. Experiment comparing carbon sources also proved that nutritional composition of biofloc is similar to composition of commercial feed. Heterotrophic bacteria are also capable to cumulate heavy metals and mineral matter over time. Experiment with added biofloc to feed in amount 0 %, 25 % and 50 % did not show any statistically significant differences ( $p < 0,05$ ) on survival rate, FCR and SGR between the groups of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*).

**Key words:** biofloc, carbon source, nutritional composition, water quality, feed trial