



Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Aplikace nanobublin ozónu v akvakultuře

M. Prokešová, M. Kononov, V. Stejskal, M. Ševc,
V. T. Trang, P. T. Giang, E. Sivaramasamy





Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Aplikace nanobublin ozónu v akvakultuře

M. Prokešová, M. Kononov, V. Stejskal, M. Ševc, V. T. Trang,
P. T. Giang, E. Sivaramasamy

Vodňany, 2024



Tato technologie byla vytvořena v rámci projektu „Nanobubliny jako účinný prostředek pro aplikaci ozónu a kyslíku v akvakultuře“ (TAČR TM02000037) se státní podporou Technologické agentury ČR v rámci Programu Delta 2.



č. 203

ISBN 978-80-7514-198-9

OBSAH

1.	ÚVOD	7
1.1.	Dezinfekce vody v akvakultuře	7
1.2.	Technologie nanobublin	9
2.	CÍLE	13
3.	MÍSTA OVĚŘOVÁNÍ TECHNOLOGIE	14
4.	POPIS TECHNOLOGIE A VÝSLEDKY	15
4.1.	Experiment 1 – produkce nanobublin	15
4.1.1.	Technologický postup	15
4.1.2.	Výsledky	17
4.2.	Experiment 2 – rybniční voda po ošetření nanobublinami ozónu	20
4.2.1.	Technologický postup	20
4.2.2.	Výsledky	21
4.3.	Experiment 3 – Efekt nanobublin ozónu na raný odchov pstruha duhového	25
4.3.1.	Technologický postup	25
4.3.2.	Výsledky	31
5.	EKONOMICKÝ PŘÍNOS TECHNOLOGIE	37
6.	UPLATNĚNÍ TECHNOLOGIE V PRAXI	38
7.	SEZNAM LITERATURY	39
8.	PODĚKOVÁNÍ	42

1. ÚVOD

1.1. Dezinfekce vody v akvakultuře

Celosvětově je akvakultura považována za základní odvětví produkce potravin, neboť poskytuje udržitelnou zdravou výživu miliardám lidí a zároveň obživu milionům z nich (Short a kol., 2021). V posledních desetiletích bylo toto odvětví konfrontováno s různými vzájemně propojenými problémy, které do značné míry ovlivnily růst akvakultury. Mezi ně patří např. environmentální rizika související s kvalitou a množstvím dostupné vody, genetickou rozmanitostí, výskytem a kontrolou chorob (FAO, 2018; Kowalska a kol., 2020). K vyřešení většiny z uvedených rizik může významně přispět využití účinné dezinfekce vody. Kvalita vody totiž přímo ovlivňuje zdraví i celkovou produkci chovaných vodních organismů.

Dezinfekce vody má největší význam zejména v odchovech raných stadií ryb, tj. embryí a larev, která jsou nejvíce vnímavá vůči vnějším podmínkám prostředí. Raný vývoj ryb je charakterizován zvýšenou náchylností vůči stresorům a patogenům v důsledku oslabené fyziologické obranyschopnosti. Kvalita vnějšího prostředí má proto značný vliv na vývoj ryb. Podmínky prostředí (teplota vody, koncentrace kyslíku, pH, biologické či chemické znečištění vody atd.) ovlivňují nejen růst a míru přežití, ale také celkovou prosperitu ryb. Kromě toho je ovlivňuje i výskyt patogenů (jako jsou bakterie, viry a paraziti), které mohou dokonce bránit úspěšnému odchovu ryb. Dezinfekce vody pomáhá zmírňovat uvedená rizika snížením množství patogenů ve vodě, což vede ke zlepšení kvality chovného prostředí.

V současnosti jsou nejběžnějšími způsoby čištění vody v akvakultuře mechanická filtrace, biologické a chemické čištění, ozařování vody ultrafialovým zářením (UV) či aplikace ozónu (O_3 , tzv. ozonizace vody), případně jejich kombinace (Liltved, 2003; Kouřil a kol., 2013).

Mikrosítové mechanické filtry se používají k minimalizaci hromadění nerozpuštěných látek a biologické filtry pak pro odstranění amonných iontů a biologické zátěže v recirkulačních akvakulturních systémech (RAS), nejedná se však o mechanismy pro dezinfekci vody (Summerfelt a kol., 1994). Pokud se organické látky neodstraní z vody včas, mohou vyvolat nežádoucí deficity kyslíku, inhibovat nitrifikaci a zvyšovat riziko výskytu patogenů (Chen a kol., 1993).

Chemické ošetření (např. přípravky na bázi chlóru, jódu, peroxidu vodíku) poskytuje vysokou dezinfekční účinnost, ale existuje často konflikt mezi doporučenou chemickou koncentrací pro požadavky chovaných druhů a koncentrací potřebnou pro dosažení účinné dezinfekce (Moreno-Andrés a kol., 2020). Dalším úskalím této metody je riziko poškození plastových

či kovových součástí RAS. V některých odchovných systémech lze použít tzv. bypassy pro chemické ošetření části recirkulované vody. Tím je minimalizována doba kontaktu chemikálie s chovanými organismy a sníženo riziko poškození prospěšných mikroorganismů v systému, ale kvalita vody je zlepšena. Účinnost chemického ošetření ovšem závisí na vícero faktorech, jako jsou průtoky, délka ošetření, pH, organické znečištění a typ použité chemikálie.

Mikroorganismy lze také inaktivovat fyzikální dezinfekcí vody pomocí UV záření. Výhodami dezinfekce UV zářením je absence reziduí ve vodě ve srovnání s chemickým ošetřením, nezávislost účinnosti na teplotě vody a minimální vliv na chuť, pach a chemické složení vody (Gullian a kol., 2012; Stejskal a kol., 2018). Primárními úskalími tohoto konvenčního způsobu však je jejich vysoká cena (materiál, energie), omezená účinnost, relativně krátká provozní životnost a potenciální toxicita rtuti emitované UV-C lampami (Song a kol., 2016). Intenzita UV je kalkulována dle výkonu lampy, plochy osvitu a výšky vodního sloupce, kontaktního času a zákalu vody (Stejskal a kol., 2018).

Další možností dezinfekce vody je sterilizace ozónem (O_3), který je vysoce reaktivním oxidačním činidlem, jehož molekula se po reakci rozpadá na kyslík (tzn. z O_3 na O_2). Koncentrace O_3 je nejčastěji vyjadřována v $mg.l^{-1}$ nebo pomocí oxidačně-redukčního potenciálu (ORP, mV). Kromě deaktivace patogenů má aplikace ozónu další pozitivní účinky, jako je navýšení koncentrace kyslíku, snížení organického zatížení, zlepšení celkové kvality (např. průhlednosti) vody, vyšší efektivita ve srovnání s chemickým ošetřením, zlepšení flokulace jemných suspendovaných látek do větších shluků snadněji odstranitelných pomocí mechanické filtrace, dále schopnost redukce iontů (př. mangan, železo) a látek způsobujících zemitou pachů rybiho masa (př. geosmin a 2-methylisoborneol) (Stejskal a kol., 2018).

Nevýhodami použití O_3 jsou náklady na pořízení ozonizátoru a spotřeba elektrické energie, ale i závislost reakční rychlosti na teplotě vody, koncentraci znečištění a chemickém složení vody (Stejskal a kol., 2018). Nevýhodou bývají i silné korozivní účinky O_3 , pro dlouhodobé aplikace je proto vhodnější použití materiálů s vysokou odolností vůči oxidačním účinkům O_3 (např. chlorovaný polyvinylchlorid, silikon, nerezavá ocel, teflon a další; Oxidation Technologies, LLC., 2023). Další nevýhodou použití je toxicita zbytkového O_3 pro ryby a žádoucí bakterie biologického filtru, ale také riziko pro lidi při úniku tohoto nebezpečného plynu do ovzduší v uzavřeném prostoru (Stejskal a kol., 2018). Pro člověka nesmí expozice O_3 překročit $0,1 \text{ mg.m}^{-3}$ a nejvyšší přípustná koncentrace je $0,2 \text{ mg.m}^{-3}$ (Nařízení vlády č. 361/2007 Sb.). Člověk je však schopný detekovat již koncentrace $0,02\text{--}0,05 \text{ mg.l}^{-1}$ (Lekang, 2020). V případě ryb je uváděna limitní koncentrace (LC50, 96 h) $<1 \text{ mg.l}^{-1}$ (nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1907/2006). Jako bezpečné koncentrace O_3

pro vodní organismy jsou pak uváděny hodnoty v rozmezí 300–425 mV (Powell a Scolding, 2016). Vyšší koncentrace O_3 (ORP nad 500–600 mV) pak mohou být toxické, neboť při nich dochází ke zvýšené oxidaci organických látek včetně kůže a žaber ryb (Lekang, 2020). Nejen přímé vystavení vodních organismů O_3 , ale i výsledným oxidantům vytvořených v ozonizované mořské vodě, může být pro vodní organismy letální. Oplozené rybí jikry však vykazují určitou míru tolerance k rozpuštěnému O_3 , což jim umožňuje tolerovat různé koncentrace (Gonçalves a Gagnon, 2011). Ozonizovaná voda se osvědčila také pro eliminaci patogenů spojených s krmením živé potravy při raném odchovu ryb (Liltved, 2003).

V místě spotřeby je ozón obvykle produkován ze vzduchu nebo stlačeného kyslíku pomocí generátorů (tzv. ozonizátorů), následně je mísen s přítokovou vodou pomocí směšovacích zařízení, protéká odchovem vodních organismů a poté prochází jednotkami pro destrukci reziduí ozónu (např. odplynění, katalýza UV zářením 250–260 nm, filtry s aktivním uhlím). V odchovech ryb může být aplikován buď kontinuálně nebo v několika dávkách (nejčastěji 3–4 h po krmení) dle spotřeby krmiva (obecně 10–15 g $O_3 \cdot kg^{-1}$ krmiva) (Stejskal a kol., 2018).

Další možností dezinfekce vody jsou kombinace výše uvedených ošetření (např. UV záření a ozón, UV záření a chemické ošetření), čímž je zvýšen dezinfekční účinek ve srovnání s individuálními ošetřeními přítokové či odtékající vody z odchovů ryb (Liltved, 2003).

S ohledem na nedostatky a rizikovost výše uvedených metod je zapotřebí dále optimalizovat a vyvíjet nové účinnější technologie pro dezinfekci vody.

1.2. Technologie nanobublin

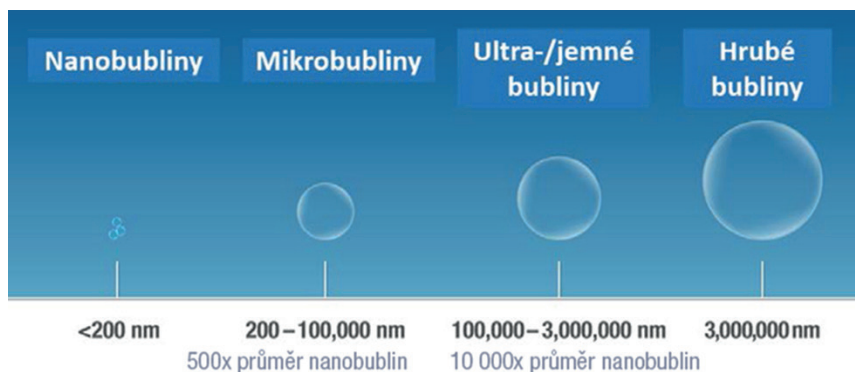
V posledních letech byly zkoumány inovativní způsoby dezinfekce vody v akvakultuře. Jedním z možných postupů je technologie ozónových nanobublin (O_3NB). Jedná se o aplikaci ultra-jemných bublin, které mohou být generovány z různých plynů (např. ozón, vzduch, kyslík, oxid uhličitý, dusík, vodík) pomocí technických zařízení, tzv. generátorů nanobublin (Obr. 1).

Nanobubliny (NB) jsou bubliny o velikosti průměru do 200 nm (Seridou a Kolagerakis, 2021). V ultra-čisté vodě mohou být NB různých plynů stabilní i po dobu několika dnů. Ve slané vodě ($1 \text{ mmol} \cdot l^{-1}$) bývá však stabilita NB výrazně snížena (Ushikubo a kol., 2010; Zhou a kol., 2021). Zatímco běžné bubliny rychle (v řádu vteřin až minut) stoupají k povrchu kapaliny, kde prasknou, NB postupně bobtnají a praskají uvnitř kapaliny (Temesgen a kol., 2017). Porovnání velikostí a vlastností NB ve srovnání s mikro-, submikro- a makro- bublinami je znázorněno na Obr. 2 a 3.

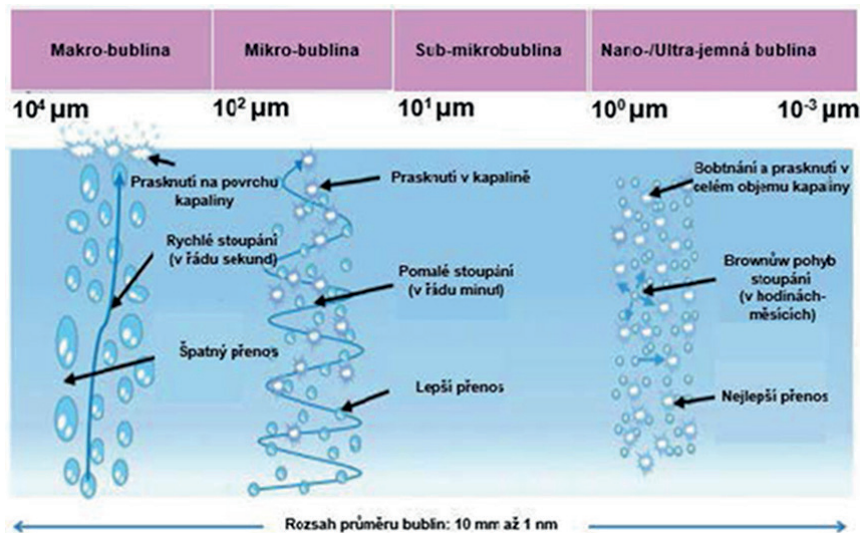
Hlavními vlastnostmi NB (Obr. 4) jsou vysoká stabilita, dlouhodobá perzistence ve vodním prostředí, velký povrch a míra povrchové adsorpce, vysoký vnitřní tlak, záporný elektrický náboj, vznik volných radikálů a produkce kyslíku jako finálního produktu reakce (Meegoda a kol., 2018; Farid a kol., 2022; Linh a kol., 2022). Díky nižšímu vztlaku NB nemají tendence rychle stoupat a brzy prasknout v kapalném prostředí. Dále vysoký poměr specifického povrchu NB vůči objemu a vysoký vnitřní tlak usnadňují proces přenosu plynu v kapalině, čímž zrychlují míru potenciálních chemických reakcí a s tím související efektivitu dezinfekce (Gurung a kol., 2016; Linh a kol., 2022).



Obr. 1. Generátor nanobublin aQua+ 075, AquaPro Solutions Pte. Ltd., Singapur (AquaPro Solutions, 2023).



Obr. 2. Velikostní rozmezí makro-, mikro-, submikro- a nano- bublin (FERENCE, 2020).



Obr. 3. Vlastnosti makro-, mikro-, submikro- a nano- bublin (Seridou a Kolagerakis, 2021).

Díky jedinečným fyzikálně-chemickým vlastnostem mohou být NB různých plynů úspěšně aplikovány v mnoha odvětvích, např. k čištění odpadních vod, zlepšení růstu rostlin a čištění membrán, v lékařství, potravinářském, automobilovém a stavebním průmyslu (Seki a kol., 2017; Seridou a Kolagerakis, 2021; Zhou a kol., 2021).

Široké spektrum možností efektivního využití NB plynů (O_2 a O_3) v akvakultuře je znázorněno na Obr. 5. Aplikace NB může být vhodná například pro snižování koncentrace dusíku a fosforu ve vodním prostředí, což může vést ke snížení růstu nežádoucích řas ve vodě, čímž pomáhá k zachování kvality vody a prevenci eutrofizace (Atkinson a kol., 2019; Pal a kol., 2022). Dále bylo zjištěno, že využitím NB bylo zvýšeno množství prospěšných bakterií a minimalizovány nežádoucí kaly v odchovech ryb a krevet (Foundas a kol., 2022; Xu a kol., 2022). Antimikrobiální vlastnosti NB byly využity i pro eliminaci anaerobních a patogenních mikroorganismů, což vedlo ke snížení nepříjemných pachů během odchovu (Agarwal a kol., 2011). Kromě toho se použití NB aerace osvědčilo v rybníční akvakultuře, kdy bylo pozorováno nejen zlepšení kvality vody, ale i vodních ekosystémů díky zvýšenému výskytu larev vodního hmyzu, který je častou potravou různých druhů ryb (Xu a kol., 2022). Tyto poznatky vyzdvihují potenciál NB pro udržitelné hospodaření s vodou.

Vlastnosti

Hydrofobní

Nabitý povrch

Vysoký vnitřní tlak

Tvrdý povrch

Vysoká účinnost přenosu plynu



Chování

Neutrální vztlak

Stabilní a dlouhodobé

Oxidační

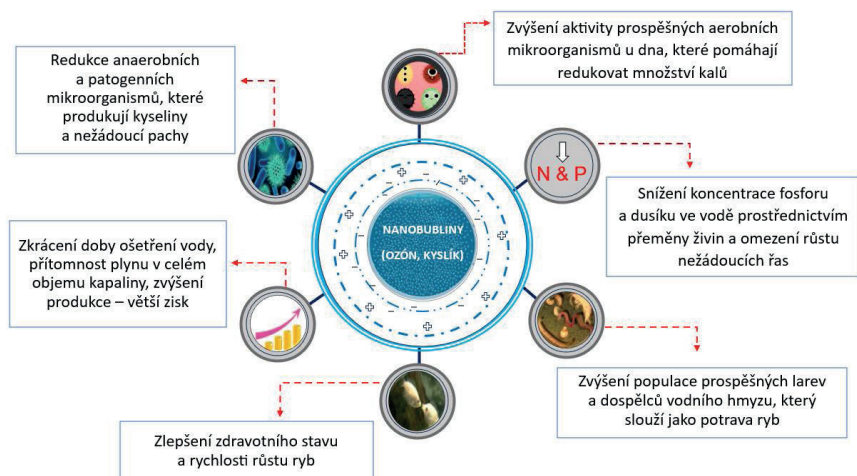
Elektrochemicky aktivní

Snižuje povrchové napětí

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

Aplikace O_3NB se nabízí např. pro eliminaci odolných mikro-polutantů ve vodním prostředí, oxidaci léčiv v pitné vodě a sanaci antibiotik v odpadních vodách díky jejich silné oxidační schopnosti. Molekulární O_3 by mohl tyto znečišťující látky nejen přímo oxidovat, ale také působit jako prekursor k vytvoření reaktivního hydroxylového radikálu ($\bullet OH$) (Fan a kol., 2021). O_3NB se zdají být také velmi účinné při redukci širokého spektra patogenů (Seridou a Kalogerakis, 2021). Několik výzkumných studií již dokonce úspěšně otestovalo účinek O_3NB na sladkovodní i mořské druhy ryb (Jhunkeaw a kol., 2021) a krevety (Imaizumi a kol., 2018) proti jejich potenciálním patogenům, jako je např. *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas veronii* (Jhunkeaw a kol., 2021; Linh a kol., 2021), *Aeromonas hydrophila* (Dien a kol., 2021) a *Vibrio parahaemolyticus* (Nghia a kol., 2021).

V poslední době se technologie O_3NB začala testovat také u ryb a jejich chovného prostředí. Schopnost integrace mikro- a nano- bublin s ozonizací vyvolala značnou pozornost, což vedlo k rostoucímu objemu výzkumu testujícího dopad této technologie napříč různými inženýrskými a biologickými obory, aplikacemi čištění odpadních vod a zejména v akvakultuře (Seridou a Kalogerakis, 2021). Bylo totiž zjištěno (*in vitro*), že již pětiminutová aplikace O_3NB (ORP 830–926 mV) vede k eliminaci více než 99 % bakterií přítomných v bakteriemi infikované kohoutkové vodě (Dien a kol., 2022).



Obr. 5. Široké spektrum možností pro efektivní použití technologie nanobublin v akvakultuře. Schéma E. Sivaramasamy.

2. CÍLE

Cílem předložené technologie bylo otestování vlivu nanobublin ozónu (O_3NB) na mikrobiologické složení chovné vody jejich přímou aplikací do rybniční (přírodně organicky znečištěné) vody během raného odchovu pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) v komerční rybí líhni. Dalším cílem bylo ověřit, zda s použitím této technologie mohou být využity i neoptimální zdroje vody pro produkci lososovitých ryb (s ohledem na omezené množství vhodných vodních zdrojů a v posledních letech snižující se stavy průtoků podzemních i povrchových vod). Technologie zahrnuje výsledky testování produkce a koncentrace O_3NB pomocí sestavy třech generátorů (tj. kyslíku, ozónu a nanobublin), dále zahrnuje výsledky efektivnosti aplikace O_3NB na snížení mikrobiologické zátěže vody a efekty dvou metod ošetření během raného odchovu (s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců, či nikoliv) v kombinaci s různými koncentracemi O_3NB (rozsah ORP 192–610 mV) na pstruha duhového.

3. MÍSTA OVĚŘOVÁNÍ TECHNOLOGIE

Ověřování technologie bylo realizováno na dvou pracovištích. Testování produkce a koncentrace O_3NB bylo uskutečněno v experimentálních prostorech Ústavu akvakultury a ochrany vod (dále ÚAOV) v Českých Budějovicích (Obr. 6), zatímco experimenty související s raným odchovem pstruha duhového byly realizovány na rybí líhni v Mydlovarech (Obr. 7), která je zásobena rybníčním zdrojem vody z Mydlovarského rybníka.



Obr. 6. Testování produkce a koncentrace O_3NB bylo uskutečněno v experimentálních prostorech Ústavu akvakultury a ochrany vod v Českých Budějovicích (vlevo nahoře je generátor nanobublin, vpravo dole koncentrátor kyslíku a generátor ozónu) (Foto M. Dvořáková Prokešová).



Obr. 7. Experimentální systém pro testování efektu čtyř koncentrací O_3NB na odchov raných stádií na Rybí líně Mydlovary s rybničním (tzn. přirozeně organicky znečištěným) zdrojem vody (Foto M. Dvořáková Prokešová).

4. POPIS TECHNOLOGIE A VÝSLEDKY

4.1. Experiment 1 – produkce nanobublin

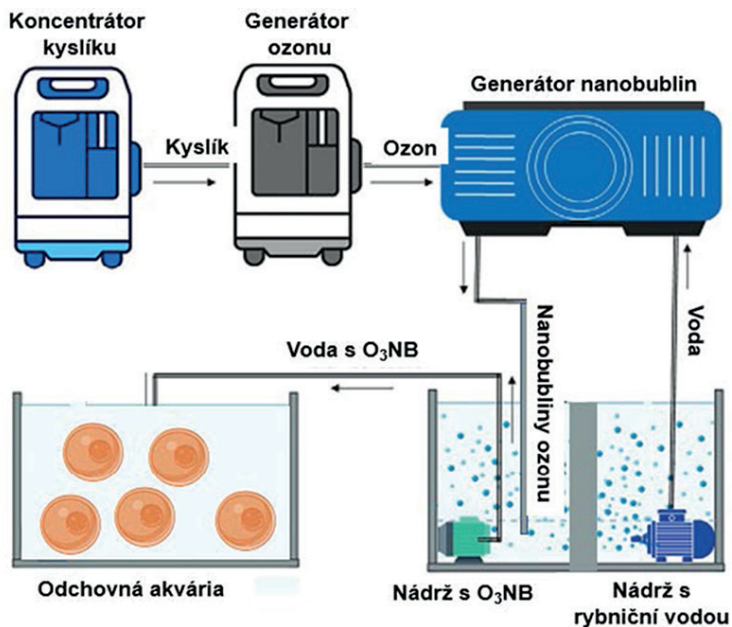
4.1.1. Technologický postup

Byla testována produkce O_3NB ve vodě pomocí sestavy třech generátorů:

- 1) koncentrátor kyslíku s produkcí $2-10 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ při koncentraci $90 \pm 3 \%$ (OX-10A, Oxytek Medical Technology Co. Ltd., Čína),
- 2) generátor ozónu produkující $10 \text{ g } O_3 \cdot \text{h}^{-1}$ ze suchého vzduchu (Annihilator OT10, Ozontech, s.r.o., Česká republika),
- 3) generátor nanobublin produkující NB o průměru do 200 nm při maximální průtokové kapacitě $1\,000 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ (aQua+ 075, AquaPro Solutions Pte. Ltd., Singapur).

Sestava třech přístrojů byla zkušebně zprovozněna v akvarijní místnosti ÚAOV v Českých Budějovicích. Přístroje byly propojeny v pořadí – koncentrátor kyslíku, generátor ozónu a generátor NB. První přístroj zkoncentroval kyslík, který byl generátorem ozónu přetvořen na ozón (O_3), z něhož generátor nanobublin vytvořil O_3NB obohacenou vodu do zásobní nádrže (Obr. 8). Sestava zařízení byla zapojena do časovací zásuvky tak, aby spínala produkci

O_3NB každých 30 min. h^{-1} po dobu celého experimentu. S ohledem na možné riziko úniku toxického O_3 do vzduchu byla měřena jeho koncentrace pomocí přenosného detektoru se zvukovým alarmem s rozsahem měření 0–10 ppm a přesností 0,01 ppm (Weihai JXCT Electronic Technology Co., Ltd., Čína). Během experimentů nebyla nadlimitní koncentrace O_3 ve vzduchu detekována, koncentrace byla vždy v bezpečném rozmezí pro obsluhu.



Obr. 8. Schéma zapojení sestavy zařízení pro zkušební produkci O_3NB (upraveno schéma od Dien a kol., 2021).

Průměr a velikostní zastoupení NB ve vodě bylo změřeno NTA analýzou (angl. Nanoparticle Tracking Analysis) pomocí přístroje NanoSight NS300 (Malvern Instruments Ltd., UK). Dále bylo mícháním O_3NB obohacené vody (0, 50, 75 a 100 ml) s čistou vodou (100, 50, 25 a 0 ml) dosaženo různých koncentrací O_3NB (O_3 , $mg.l^{-1}$) a počtů bublin (částic. ml^{-1}) ve 100 ml vzorcích vody. Koncentrace ozónu ve vzorcích vody (objem 10 ml) byla měřena pomocí spektrofotometru s LCK310 kyvetovými testy (DR 2800, Hach Lange, USA), zatímco počet částic byl stanoven pomocí NTA analýzy.

Po zdárném zprovoznění a ověření produkce O_3NB byla sestava přístrojů včetně experimentálních akvárií a ostatních inkubačních pomůcek převezena a instalována v prostorech Rybí líhně Mydlovary (viz experimenty 2 a 3).

4.1.2. Výsledky

Pomocí NTA analýzy (Obr. 9) bylo prokázáno, že O_3NB obohacená voda (produkovaná výše uvedenou sestavou generátorů) obsahuje mnohem vyšší koncentrace nanočástic ($8,8\times$ více) výrazně menšího průměru (téměř $2\times$) v porovnání s čistou kohoutkovou vodou.

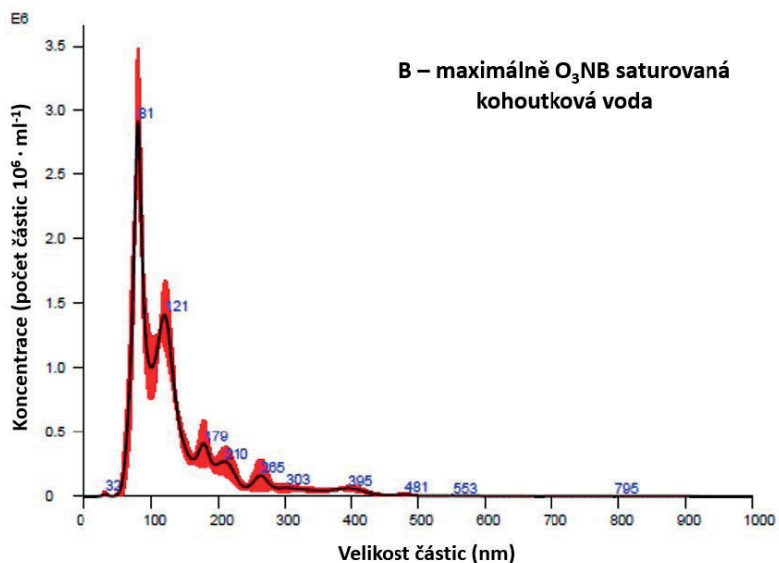
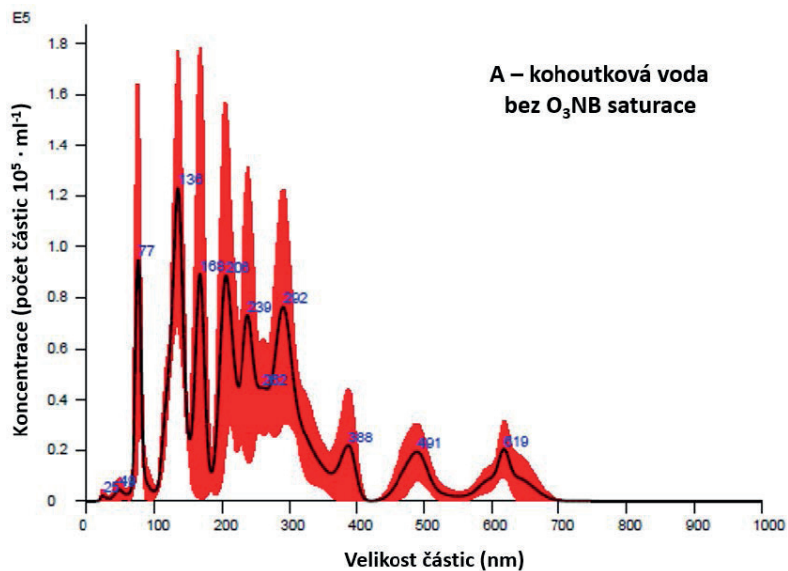
Kohoutková voda obsahovala nanočástice o průměrné velikosti $260,3 \pm 23,6$ nm. Koncentrace nanočástic obsažených ve vzorcích byla $1,7e^{07} \pm 2.1e^{06}$ částic.ml⁻¹. Celkem 90 % změřených částic mělo průměr $411,2 \pm 75,1$ nm, 50 % částic mělo velikost $241,3 \pm 13,9$ nm a jen 10 % mělo velikost $112,4 \pm 11,2$ nm.

Zatímco maximálně O_3NB obohacená voda (tj. $1,68\text{mg } O_3.l^{-1}$) obsahovala více ($1,5e^{08} \pm 4.6e^{06}$ částic.ml⁻¹) menších nanočástic o průměrné velikosti $136,2 \pm 0,8$ nm. Celkem 90 % změřených nanočástic mělo průměrnou velikost $241,9 \pm 10,6$ nm, 50 % mělo $111,7 \pm 3,1$ nm a pouze 10 % uvedených částic mělo průměr $74,7 \pm 2,2$ nm.

Koncentrace a velikostní zastoupení nanočástic ve vzorcích kohoutkové vody vs. maximálně O_3NB saturované vody zobrazuje Obr. 10 A-B.

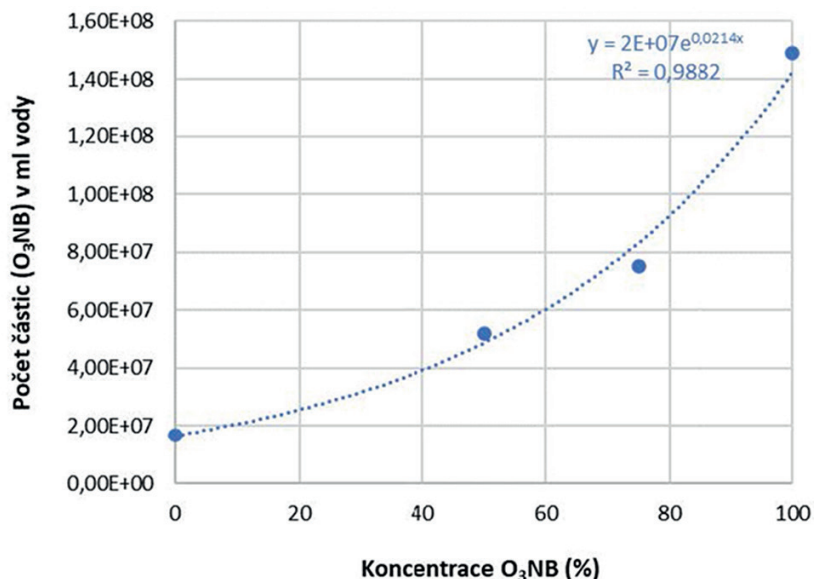


Obr. 9. Koncentrace a velikosti nanočástic ve vzorcích vody byly změřeny NTA analýzou pomocí přístroje NanoSight NS300 (Malvern Instruments Ltd., UK) (Foto M. Dvořáková Prokešová).

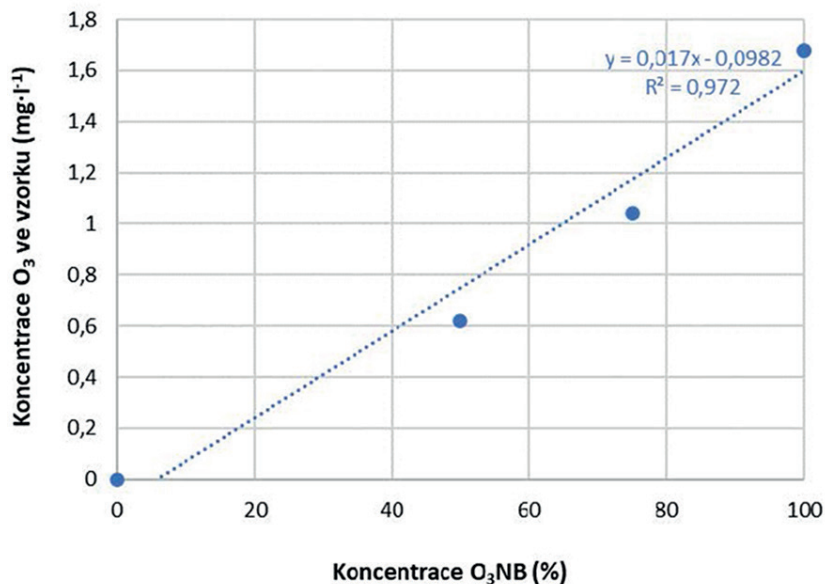


Obr. 10. Velikost (nm) a koncentrace částic (bublin v ml) vody v čisté kohoutkové vodě (A) a maximálně O_3NB saturované O_3NB vodě (B, původem z generátoru nanobublin aQua+ 075) měřená pomocí NTA analýzy (NanoSight NS300, Malvern Instruments Ltd., UK).

Dále bylo zjištěno, že vzorky s různými koncentracemi O_3NB obohacené vody (0, 50, 75 a 100 %) vykazovaly odlišné koncentrace ozónu (O_3 , $mg.l^{-1}$) a počty bublin (částic. ml^{-1}) ve vzorcích. Průměrný počet bublin ve vzorcích se exponenciálně zvyšoval (od $2,0e^{07}$ do $1,4e^{08}$) se zvyšující se koncentrací O_3NB (0–100 %, viz Obr. 11). Koncentrace O_3 v těchto vzorcích vzrůstala lineárně (od 0,0 do $1,7 mg.ml^{-1}$) se zvyšující se koncentrací O_3NB ve vzorcích (0–100 %, viz Obr. 12).



Obr. 11. Počet bublin (částic. ml^{-1}) ve vzorcích vody s různými O_3NB koncentracemi (0, 50, 75 a 100 %) vyprodukovaných generátorem nanobublin (aQua+ 075) měřené pomocí NTA analýzy (NanoSight NS300).



Obr. 12. Koncentrace ozónu (mg.ml⁻¹) ve vzorcích vody s různými O₃NB koncentracemi (0, 50, 75 a 100 %) vyprodukovaných generátorem nanobublin (aQua+ 075) měřené LCK310 kyvetovými testy (DR 2800, Hach Lange, USA).

4.2. Experiment 2 – rybniční voda po ošetření nanobublinami ozónu

4.2.1. Technologický postup

Pro zhodnocení dezinfekčních účinků O₃NB na kvalitu odchovné vody byly použity mikrobiologické analýzy. Na rybí líhni v Mydlovarech byly nabrány vzorky rybniční O₃NB saturované vody (každý o objemu 50 ml ve třech opakováních) o koncentraci 0, 25, 50, 75 a 100 % a byly nabrány také vzorky vody ze zásobních žlabů (tj. rybniční a O₃NB saturovaná voda, která sloužila pro potřeby experimentu 3). Poté byly tyto vzorky zamrazeny při -80 °C. Před mikrobiologickými analýzami byly vzorky vody rozmrazeny. DNA byla extrahována dle modifikovaného protokolu Godona a kol. (1997). Následovala purifikace izolované DNA pomocí komerčního kitu (NucleoSpin gDNA Cleanup kit, Macherey-Nagel, Německo). Byla provedena sekvenační amplifikace 16S rRNA genomu (V3–V4 úseku) pomocí koncových primerů dle metodiky Klindworthové a kol. (2013). Výsledný soubor fragmentů DNA byl podroben

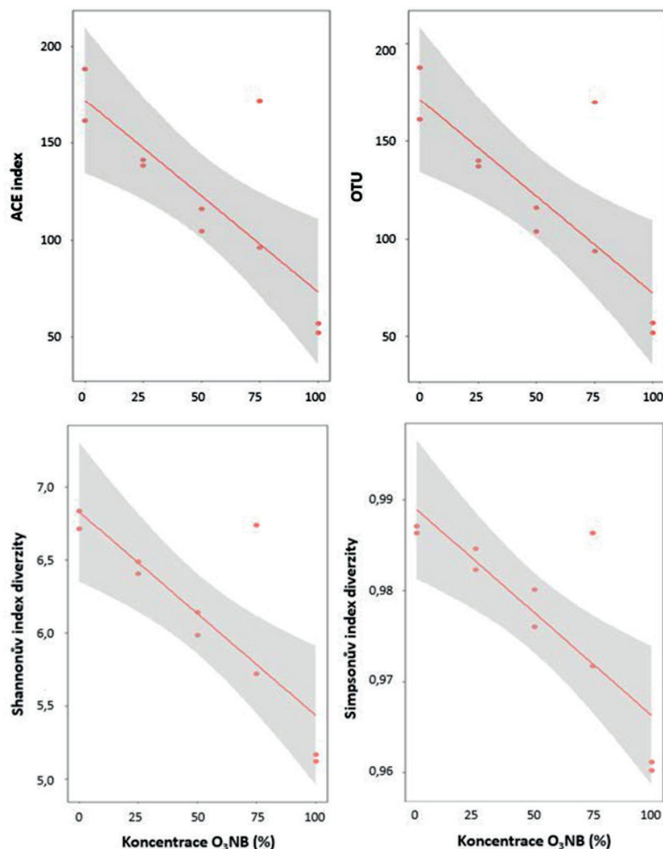
sekvenaci na přístroji MiSeq (Illumina, USA) s režimem čtení 250 bp z obou konců. Výsledná čtení byla zpracována programem FastQC pro kontrolu a trimování kvality úseků. Výsledky byly dále zpracovány pomocí softwaru QIIME 2 (Bolyen a kol., 2019).

Statistické zhodnocení dezinfekčních účinků různých O_3NB koncentrací bylo realizováno v prostředí R-studia (v. 4.0.3, Rstudio, Inc.). Jednotlivé vzorky vody byly považovány za nezávislá opakování. Hladina významnosti $P < 0,05$ byla považována za signifikantní. Když data splňovala podmínku normality (Shapiro-Wilkův test) a homogenity (Cochranův test), byla k určení průkazných rozdílů mezi skupinami použita ANOVA. Pokud však jedna z těchto podmínek nebyla splněna, následoval neparametrický Kruskal-Wallisův test. Pro zhodnocení rozdílů mezi testovanými skupinami po předešlé ANOVA analýze byl použit Tukeyův HSD test, zatímco po Kruskal-Wallisově testu bylo použito mnohonásobné porovnání průměrného pořadí všech skupin.

4.2.2. Výsledky

Mikrobiologické analýzy ukázaly, že diverzita mikroorganismů ve vodě, která byla hodnocená prostřednictvím mikrobiologických ukazatelů ACE (angl. Abundance-based Coverage Estimator), OTU (angl. Operational Taxonomic Unit), Shannonův a Simpsonův index, negativně korelovala ($P < 0,05$) se zvyšující se koncentrací O_3NB ve vodě (0–100 %) (viz Obr. 13). Alfa-diversita mikroorganismů (tj. druhová diverzita mikroorganismů uvnitř vzorku) ve vodě ošetřené různými koncentracemi O_3NB se statisticky nelišila ($P > 0,05$) mezi skupinami (viz Obr. 14), ačkoliv byl pozorován snižující se trend se zvyšující se koncentrací O_3NB ve vodě.

Diverzita mikroorganismů (hodnocena na úrovni kmenů, čeledí a rodů) přítomných ve vzorcích vody se částečně lišila mezi testovanými skupinami v závislosti na O_3NB saturaci (0–100 %). Diverzita mikroorganismů se ve všech koncentracích (0–100 %) shodovala v celkem šesti kmenech (Obr. 15 A), 18 čeledích (Obr. 15 B) a 22 rodech (Obr. 15 C).



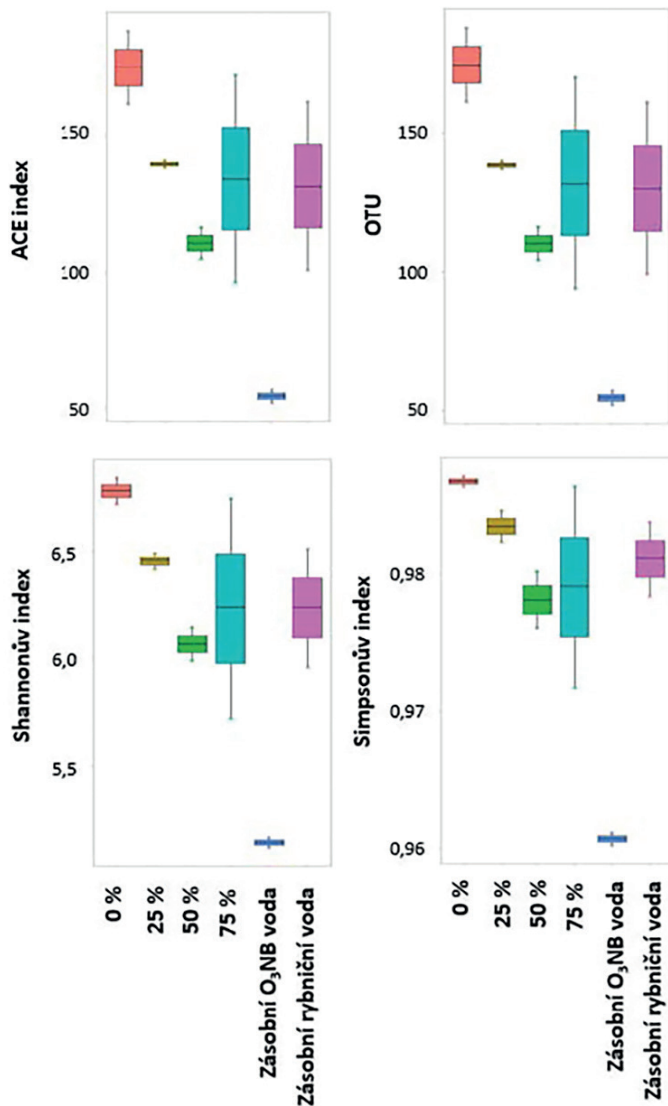
Obr. 13. Korelace diversity mikroorganismů (hodnoceno pomocí mikrobiologických indexů – ACE^a, OTU^b, Shannonův^c a Simpsonův^d) ve vzorcích rybníční vody ošetřené různými koncentracemi O_3NB : 0 % (~192 mV), 25 % (~277 mV), 50 % (~392 mV), 75 % (~610 mV) a 100 % (tj. maximálně O_3NB saturovaná voda, ~917 mV).

^aACE (angl. Abundance-based Coverage Estimator) index vyjadřuje výši druhové diversity ve vzorku (čím vyšší diversity, tím vyšší je hodnota indexu).

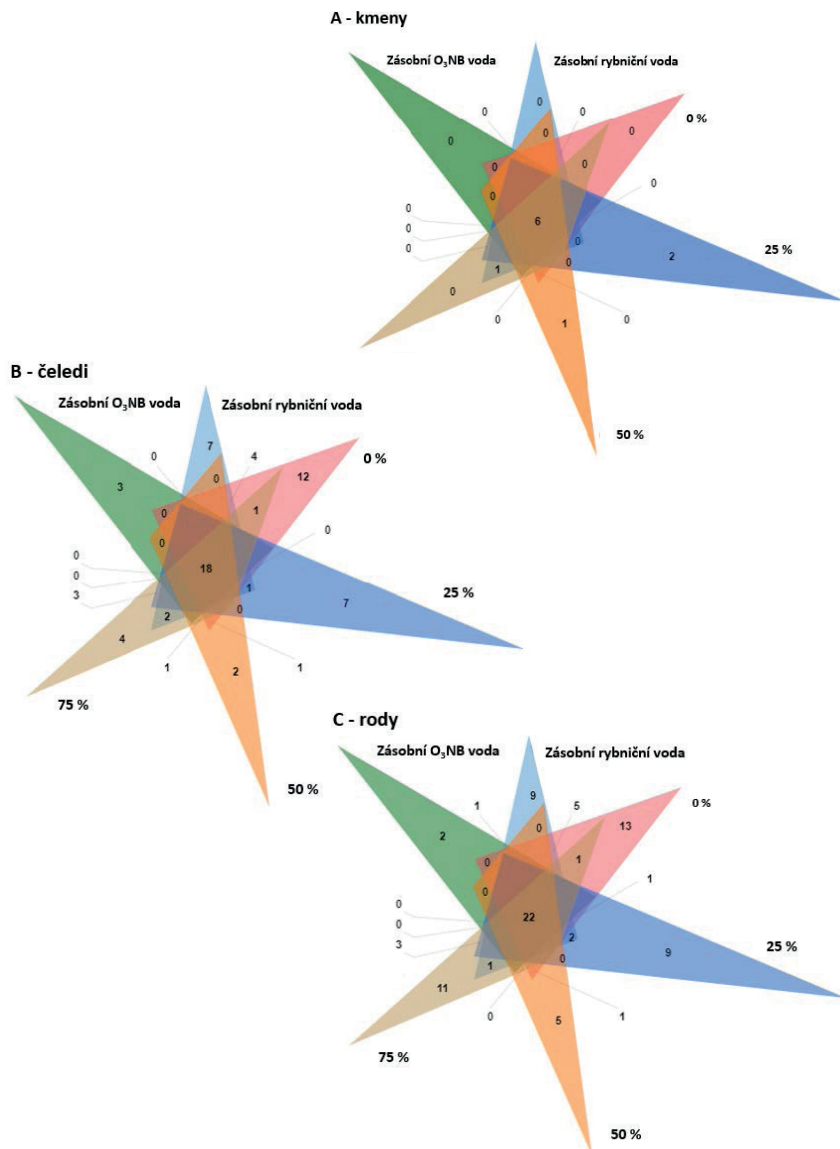
^bOTU (angl. Operational Taxonomic Unit) je počet identifikovaných taxonů ve vzorku (dle přítomnosti specifických sekvencí DNA pro daný taxon).

^cShannonův index diversity hodnotí entropii a druhovou bohatost vzorku (čím větší je diversity, tím vyšší je hodnota indexu).

^dSimpsonův index diversity (dosahuje hodnot 0–1) vyjadřuje pravděpodobnost, s níž dvě náhodně vybrané bakterie patří ke stejnému taxonu (nulová diversity = 1, vysoká diversity = 0).



Obr. 14. Alfa-diverzita mikroorganismů ve vodě (hodnoceno pomocí mikrobiologických indexů – ACE, OTU, Shannonův a Simpsonův) ve vzorcích rybníční vody ošetřené různými koncentracemi O₃NB – 0 % (~192 mV), 25 % (~277 mV), 50 % (~392 mV), 75 % (~610 mV) a také ve vzorcích vody ze zásobních žlabů (tj. rybníční a maximálně O₃NB nasycená voda).



Obr. 15. Vennův diagram diverzity mikroorganismů na úrovni kmenů (A), čeledí (B) a rodů (C) ve vzorcích rybníční vody ošetřené různými koncentracemi O_3NB – 0 % (ORP ~192 mV), 25 % (ORP ~277 mV), 50 % (ORP ~392 mV), 75 % (ORP ~610 mV) a také ve vzorcích vody ze zásobních žlabů (tj. rybníční a maximálně O_3NB saturovaná voda).

4.3. Experiment 3 – Efekt nanobublin ozónu na raný odchov pstruha duhového

4.3.1. Technologický postup

Inkubační systém a monitoring odchovu

Na Rybí líhni v Mydlovarech (Mydlovary, Česká republika) byl následně realizován experiment testující dva odlišné způsoby odchovu (N – bez odstraňování neoplozených jiker a uhynulých jedinců a S – s pravidelným odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců) a zároveň čtyři různé O_3NB koncentrace ve vodě (kontrolní, nízká, střední a vysoká koncentrace O_3NB , značené čísly 1–4). Dle použité O_3NB koncentrace a způsobu odchovu bylo vytvořeno celkem 8 skupin, které byly označeny kombinací čísla (1–4) a písmene (N, nebo S):

- 1N – kontrolní skupina bez O_3NB ošetření (ORP 192 ± 40 mV), bez odstraňování neoplozených jiker a uhynulých jedinců;
- 1S – kontrolní skupina bez O_3NB ošetření (ORP 192 ± 40 mV), s pravidelným odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců;
- 2N – skupina s nízkou O_3NB koncentrací (ORP 277 ± 104 mV), bez odstraňování neoplozených jiker a uhynulých jedinců;
- 2S – skupina s nízkou O_3NB koncentrací (ORP 277 ± 104 mV), s pravidelným odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců;
- 3N – skupina se střední O_3NB koncentrací (ORP 392 ± 134 mV), bez odstraňování neoplozených jiker a uhynulých jedinců;
- 3S – skupina se střední O_3NB koncentrací (ORP 392 ± 134 mV), s pravidelným odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců;
- 4N – skupina s vysokou O_3NB koncentrací (ORP 610 ± 122 mV), bez odstraňování neoplozených jiker a uhynulých jedinců;
- 4S – skupina s vysokou O_3NB koncentrací (ORP 610 ± 122 mV), s pravidelným odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců.

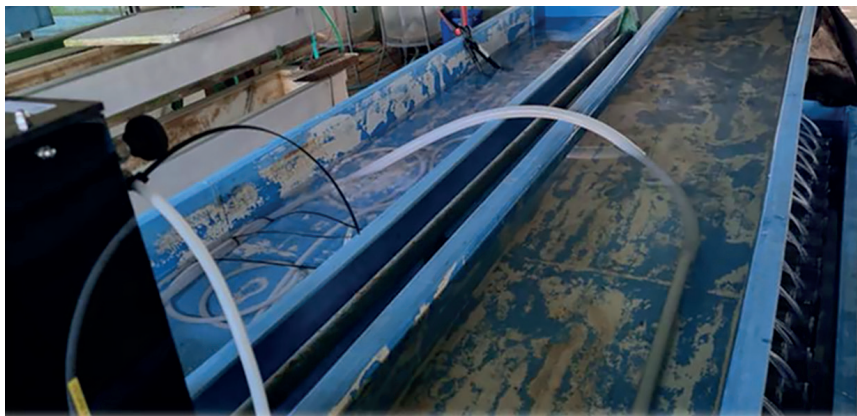
Všechny uvedené skupiny byly testovány ve čtyřech opakováních (aparáty pro líhnutí A–D) na raný vývoj pstruha duhového od oplození jiker do kompletní resorpce žloutkového vaku, tj. během embryonální a larvální periody života ryb (Kamler, 2002).

Pro účely experimentu byl sestaven průtočný inkubační systém využívající třípatrový kovový stojan se šesti plastovými inkubačními žlaby (každý o objemu 200 l), umístěných po dvou ve třech patrech nad sebou (viz Obr. 16). Dva žlaby horního patra byly použity pro vytvoření zásobní rybníční (0% O_3NB

koncentrace) a maximálně O_3NB obohacené vody (100% O_3NB koncentrace) (viz Obr. 17). Následně byla voda z těchto zásobních nádrží gravitačně vedena plastovým potrubím směrem ke žlabům druhého patra, kde bylo umístěno celkem 32 aparátů pro líhnutí (plexisklová akvária) s perforovanými vložkami, kde probíhala inkubace jiker a odchov raných stadií pstruha duhového. Do každého z akvárií byla přivedena voda z obou zásobních nádrží pomocí plastového potrubí a hadiček s možností regulace přítoku ($< 500 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) pro docílení různých O_3NB koncentrací mícháním zásobní vody (tj. rybníční a O_3NB max. saturované vody). Z odchovných akvárií a žlabů pak voda gravitačně stékala do žlabů spodního patra, odkud odtékala pryč z inkubačního systému.



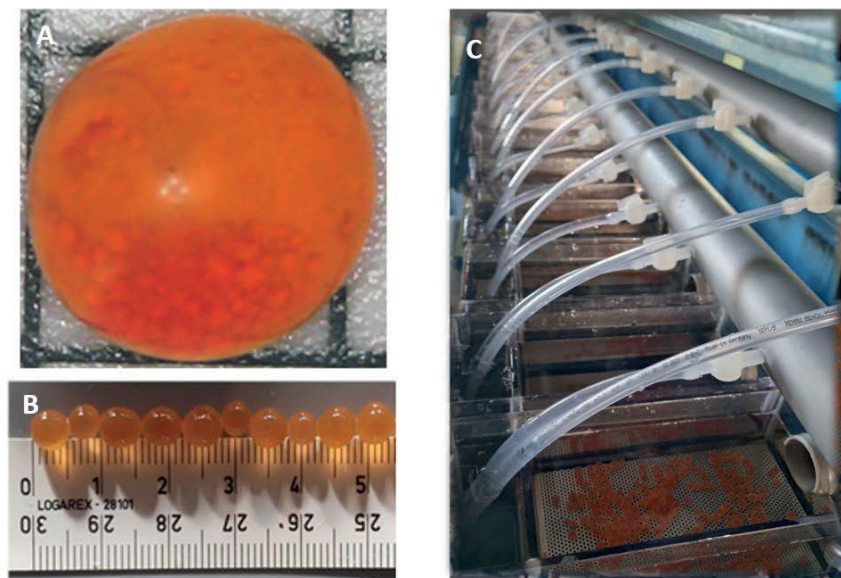
Obr. 16. Kovový stojan s šesti plastovými žlaby umístěnými ve třech patrech (horní patro – žlaby se zásobní vodou, uprostřed – žlaby s inkubačními akvárii, spodní patro – odtokové žlaby) (Foto M. Dvořáková Prokešová).



Obr. 17. Žlaby se zásobní rybniční (vpravo) a maximálně O_3NB saturovanou vodou (vlevo) (Foto M. Dvořáková Prokešová).

Následoval výtěr generačních ryb pstruha duhového (dvě samice a dva samci), jejichž gamety (jikry a spermie) byly odděleně vytřeny do suchých plastových nádob na recirkulační rybí farmě (Vladimír Šefl, Bušanovice, Česká republika). Během dvou hodin od výtěru byly gamety přepraveny v polystyrénových boxech (spermie na ledu) na Rybí líheň Mydlovary s rybničním zdrojem vody, kde byl již instalován experimentální inkubační systém.

Na začátku experimentu byly jikry ($n = 4\,000$ o průměrné hmotnosti $78,3 \pm 7,6$ mg a velikosti $5,7 \pm 0,5$ mm) oplozeny pomocí suché metody (tzn. gamety byly nejprve smíchány v jedné míse a následně aktivovány vodou z inkubačního systému). Poté byly jikry promyty od zbylého mlíčí a nasazeny do celkem 32 inkubačních aparátů. Celkem bylo nasazeno vždy 100 jiker do aparátů značených A–C (100 jiker/akvárium, 2 jikry/cm²), které sloužily pro pozorování míry přežití a líhnutí (Obr. 18 A–C). Zatímco 200 jiker bylo vždy nasazeno do aparátů označených písmenem D (200 jiker/akvárium, 1 jikra/cm²), odkud byli vzorkováni jedinci pro stanovení morfometrických parametrů a monitorování vývoje ryb od oplození do úplné resorpce žloutkového váčku.



Obr. 18. A – oplozená jikra pstruha duhového, B – 10 jiker pstruha duhového na měřítku a C – inkubační akvária po nasazení oplozených jiker (tj. zahájení experimentu) (Foto M. Dvořáková Prokešová).

Během experimentu byl pravidelně monitorován průběh odchovu a vývoje ryb, včetně mortality jedinců v jednotlivých aparátech. Teplota vody byla měřena v hodinových intervalech pomocí dataloggerů Minikin (Environmental Measuring Systems s. r. o., Česká republika). Vzhledem k tomu, že rybníční zdroj vody je značně ovlivňován počasím, teplota vody vystoupala z počátečních 4,2 na 15,5 °C během realizace experimentu v březnu – květnu 2022. Průměrná teplota vody byla $7,9 \pm 2,6$ °C. Další odchovné podmínky, jako jsou hodnota pH, koncentrace kyslíku (%) a koncentrace O_3NB (ORP, mV), byly 2–3× týdně monitorovány pomocí přenosného multimetru HQ40d (Hach Lange GmbH, Německo) v inkubačních aparátech i zásobních nádržích s rybníční a O_3NB nasycenou vodou. Průměrná hodnota pH byla $7,5 \pm 2,6$, efekt O_3NB na hodnotu pH nebyl zpozorován. Koncentrace O_3NB měla vliv na max. koncentraci kyslíku ve vodě v jednotlivých skupinách (1–4), která byla v průměru $144,5 \pm 46,0$ % (1N a S – $91,9 \pm 3,1$ %; 2N a 2S – $145,4 \pm 39,0$ %; 3N a 3S – $163,3 \pm 34,9$ %; 4N a 4S – $192,2 \pm 18,4$ %) v době sepnutí funkce celé sestavy generátorů. Dále byly 1× týdně odstraňovány sedimenty ze dna zásobních žlabů a inkubačních akvárií. Zároveň byly čištěny přítokové hadičky, kohouty a odtoková síta inkubačních aparátů.

Během experimentu byly ryby krmeny suchým startérovým krmivem značky INICIO Plus G s velikostí pelet 0,6 mm (BioMar SAS, Francie) dvakrát denně (9:00 a 14:00) obsluhou od okamžiku, kdy ryby ve všech skupinách začaly aktivně vyhledávat potravu (14 dní po vylíhnutí). Denní krmná dávka byla předkládána rybám *ad libitum*.

Odběr vzorků a analýzy

Během experimentu byla efektivita použitých způsobů odchovu (N a S) v kombinaci se čtyřmi O₃NB koncentracemi (1–4) posuzována jako úspěšný raný vývoj a odchov pstruha duhového během embryonální a larvální periody života.

Nejprve bylo 20 neoplozených jiker zváženo (mg) ve třech opakováních (tj. celkem 60 ks) pomocí kapesních vah s přesností 0,1 g (Korona 79444 Anja, Koronaelectric GmbH, Německo) pro stanovení průměrné hmotnosti jedné jikry. Tyto jikry byly dále vyfotografovány na milimetrovém měřítku pomocí digitálního USB mikroskopu Flex 66144 (Reflecta GmbH, Německo) pro následné měření a určení průměrné velikosti jiker (mm) s použitím softwaru pro analýzu obrazu (ImageJ, NIH, USA). Tyto jikry nebyly dále použity pro potřeby experimentu.

Během pravidelných kontrol experimentu (3× týdně) byly v případě prvního způsobu odchovu (N) neoplozené jikry a uhynulí jedinci ponecháni nadále v experimentu, zatímco u druhého způsobu odchovu (S) byli odstraněni ze všech aparátů pomocí plastových pinzet (Obr. 19). Zároveň byl spočítán a zaznamenán počet živých jedinců (embryí a larev) a vylíhnutých larev v každém z 32 inkubačních aparátů (Obr. 20). Ze záznamů byla později spočítána průměrná míra líhnutí a přežití jedinců:

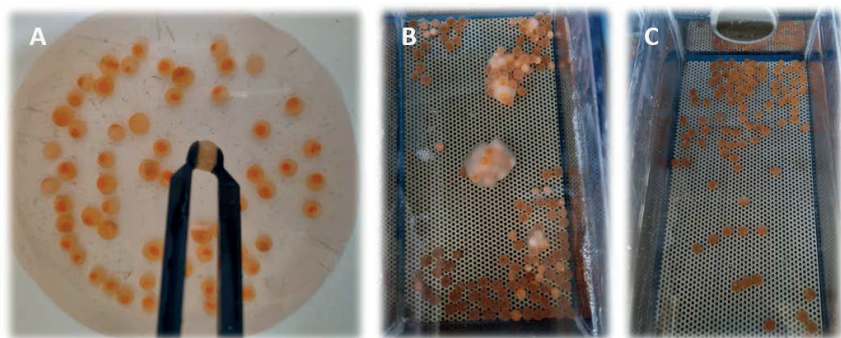
Míra přežití (%) = počet přeživších jedinců × 100 / počet nasazených jedinců

Míra líhnutí (%) = počet vylíhnutých jedinců × 100 / počet nasazených jiker

Během experimentu (1× týdně od vylíhnutí do úplné resorpce žloutkového váčku) byly ryby ($n = 20$ ryb/skupinu, pokud byly v dané skupině přítomny) náhodně vzorkovány z akvárií značených písmenem D, byly ihned anestetizovány (eugenol 30 $\mu\text{l} \cdot \text{l}^{-1}$ vody) a vyfotografovány na milimetrovém měřítku pomocí digitálního USB mikroskopu (Obr. 21). Celková délka těla ryb (mm) byla změřena z fotografií pomocí softwaru ImageJ pro analýzu obrazu, stejně jako parametry žloutkového váčku (šířka a výška, mm). Následně byla stanovena průměrná celková délka těla a byl spočítán průměrný objem žloutkového váčku ryb (mm^3) dle vzorce:

$(\pi/6) \times \text{šířka žloutkového váčku} \times \text{výška žloutkového váčku}^2$ (Blaxter and Hempel, 1963).

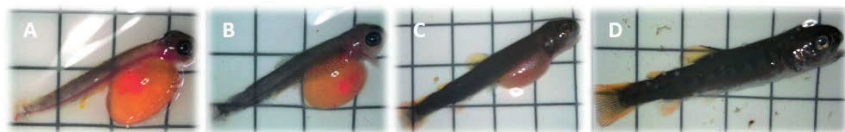
Statistické vyhodnocení efektů dvou odlišných způsobů odchovu (N a S) a zároveň čtyř různých O_3NB koncentrací ve vodě (1–4 bylo realizováno pomocí softwaru Statistica 12.0 (StatSoft CR s.r.o., Česká republika). V případě míry líhnutí a přežití byly jednotlivé aparáty (A–C) považovány za nezávislá opakování. V případě zhodnocení morfometrických parametrů ryb (celková délka těla a objem žloutkového váčku) byly vyfotografování jedinci (vzorkování z aparátů D) považováni za nezávislá opakování. Když data splňovala podmínku normality (Shapiro-Wilkův test) a homogenity (Cochranův test), byla k určení průkazných rozdílů mezi skupinami použita jednocestná ANOVA. Pokud však jedna z těchto podmínek nebyla splněna, následoval neparametrický Kruskal-Wallisův test. Pro zhodnocení rozdílů mezi testovanými skupinami po předešlé ANOVA analýze byl použit Tukeyův HSD test, zatímco po Kruskal-Wallisově testu bylo použito mnohonásobné porovnání. Ke statistickému zhodnocení efektů dvou proměnných (způsoby odchovu a O_3NB koncentrace) a jejich případné interakce na výše uvedené parametry byla použita dvoucestná ANOVA. Ve všech testech byla hladina významnosti $P < 0,05$ považována za signifikantní. Získaná data jsou níže prezentována jako průměr $\pm$ SD.



Obr. 19. A – vyjímání bílých jiker pstruha duhového plastovou pinzetou z inkubačních aparátů do misky, B – inkubační akvárium s jikrami pstruha duhového během způsobu odchovu bez odstraňování a C – inkubační akvárium během způsobu odchovu s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců (Foto M. Dvořáková Prokešová).



Obr. 20. A – pstruh duhový v inkubačním aparátu během způsobu odchovu bez odstraňování neoplozených jiker a uhynulých jedinců ~14 dní po vylíhnutí a B – počítání přeživších jedinců (vyfocení na bílém tácu a následným spočítáním z fotografie) (Foto M. Dvořáková Prokešová).



Obr. 21. A – pstruh duhový těsně po vylíhnutí (tj. největší objem žlutkového váčku), B – pstruh duhový 7 dní po vylíhnutí (tj. menší objem žlutkového váčku), C – pstruh duhový 14 dní po vylíhnutí (tj. více než polovina žlutkového váčku je vstřebána) a D – pstruh duhový 21 dní po vylíhnutí (zcela vstřebaný žlutkový váček) (Foto M. Dvořáková Prokešová).

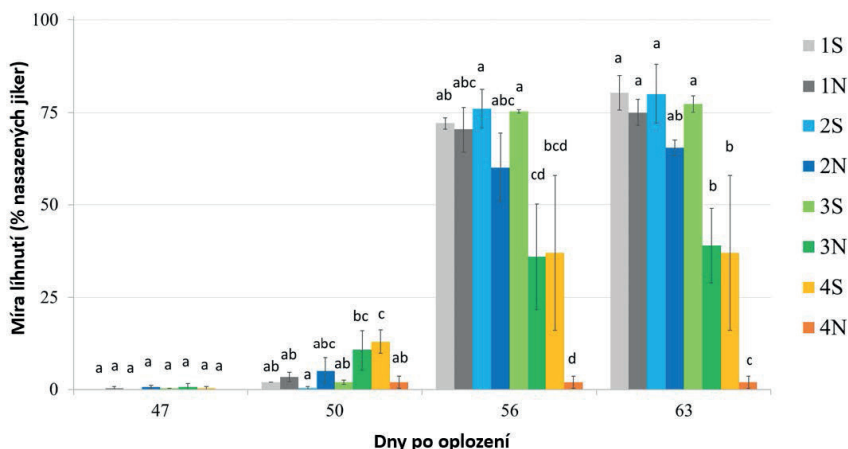
4.3.2. Výsledky

Míra líhnutí

Ve většině z testovaných skupin (1N, 2N, 3N, 3S a 4S) začalo líhnutí pstruha duhového po 47 dnech od oplození (Obr. 22). Statistické rozdíly ($P < 0,05$) mezi skupinami byly pozorovány po 50 až 63 dnech. Souhrnně vzato, míra líhnutí byla významně ovlivněna ($P < 0,05$) jak oběma metodami odchovu (N – bez odstraňování a S – s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců), tak i čtyřmi O_3NB koncentracemi (nulová/kontrolní až vysoká O_3NB koncentrace). Způsob odchovu s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců (S) zlepšil míru líhnutí (přibližně o 1/3) ryb v porovnání se způsobem bez odstraňování neoplozených jiker a uhynulých jedinců (N). Zároveň míra líhnutí byla vyšší (přibližně 3×) v O_3NB skupinách s nízkou až střední koncentrací O_3NB ve srovnání s vysokou O_3NB koncentrací. Celkově se

míra líhnutí významně lišila ($P < 0,05$) i v čase, kdy došlo k navýšení míry líhnutí z 5 na 54 % mezi 50–56 dny po oplození. Dále byl potvrzen interakční efekt ($P < 0,05$) způsobu odchovu (N a S) a O_3NB ošetření na míru líhnutí.

Koncem líhnutí (při 63 dní po oplození) byla nejvyšší míra líhnutí (okolo 80 %) pozorována ve skupinách s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců (S) při nulové až střední O_3NB koncentraci (tj. skupiny 1S, 2S a 3S), nižší míra líhnutí byla pak ve skupinách bez odstraňování neoplozených jiker a uhynulých jedinců (S) při nulové a nízké O_3NB koncentraci (1–2N, míra líhnutí 67–75 %), míra líhnutí < 40 % byla ve skupině s odstraňováním (S) při vysoké koncentraci O_3NB (tj. skupina 4S) a skupině bez odstraňování při středně vysoké koncentraci O_3NB (tj. skupina 3N), zatímco nejnižší míra líhnutí (< 5 %) byla zaznamenána ve skupině bez odstraňování (N) při vysoké O_3NB koncentraci (tzn. skupina 4N).

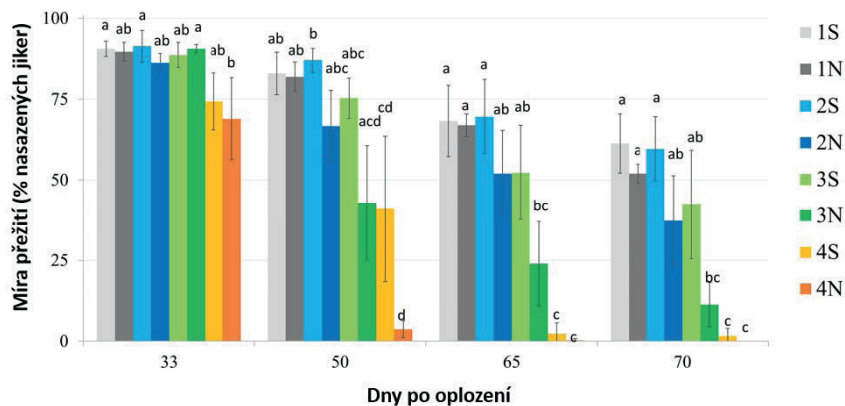


Obr. 22. Míra líhnutí pstruha duhového (% nasazených jiker, průměr $\pm$ SD) v závislosti na dvou metodách ošetření (N – bez odstraňování a S – s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců) a čtyřech O_3NB koncentracích ve vodě (1 – kontrolní/nulová, 2 – nízká, 3 – střední a 4 – vysoká) během 47–63 dní po oplození. Výsledky byly podrobeny statistické analýze (jednocestná ANOVA s následným Tukey HSD testem) pro určení významných rozdílů mezi skupinami v jednotlivé dny odchovu (uvažovány zvlášť). Pokud byla hladina významnosti $< 0,05$, byly statistické rozdíly mezi skupinami vyznačeny pomocí horních indexů ($^{a-d}$) nad sloupci v grafu.

Míra přežití

Míra přežití pstruha duhového byla významně ($P < 0,05$) ovlivněna oběma metodami odchovu (N – bez odstraňování a S – s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců) včetně čtyř koncentrací O_3NB ve vodě nulová/kontrolní až vysoká O_3NB koncentrace) (Obr. 23). Souhrnně vzato, S-metoda zlepšila přežití přibližně o 1/3 v porovnání s N-ošetřením. Zároveň míra přežití byla až 3× navýšena v O_3NB skupinách s nulovou a nízkou koncentrací O_3NB a 2× ve skupině se střední koncentrací O_3NB v porovnání s vysokou O_3NB koncentrací. Vysoké koncentrace (~ 610 mV) působily na ryby vesměs negativně a často docházelo k přichycení většího množství O_3NB k embryím, která byla nadnášena k hladině téměř po celou dobu inkubace. Míra přežití se signifikantně lišila ($P < 0,05$) i v čase, kdy poklesla z 85 na 60 % mezi 33–50 dny po oplození a později až na 42–33 % mezi 65–70 dny po oplození. Dále byl potvrzen interakční efekt ($P < 0,05$) chovných metod (N a S) a O_3NB ošetření na míru přežití ryb.

Koncem experimentu (při 70 dnech po oplození) byla signifikantně nejvyšší míra přežití (okolo 60 %) pozorována ve skupinách s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců (S) při nulové a nízké koncentraci O_3NB (tj. skupiny 1N/S a 2S), nižší míra přežití ryb (okolo 40 %) pak byla ve skupině bez odstraňování neoplozených jiker a uhynulých jedinců při nízké koncentraci O_3NB a ve skupině s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců při střední koncentraci O_3NB (tj. skupiny 2N a 3S), nižší míra přežití (okolo 10%) byla ve skupině bez odstraňování neoplozených jiker a uhynulých jedinců při střední koncentraci O_3NB (tj. skupina 3N) a zcela nejnižší míra přežití (< 5 %) byla ve skupinách s nejvyšší koncentrací O_3NB bez ohledu na způsob odchovu (tj. skupiny 4N a 4S).



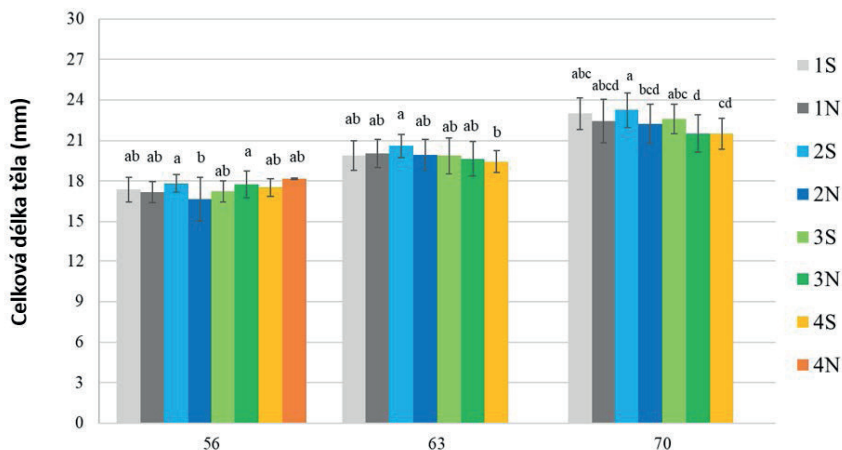
Obr. 23. Míra přežití pstruha duhového (% nasazených jiker, průměr $\pm$ SD) v závislosti na dvou metodách ošetření (N – bez odstraňování a S – s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců) a čtyřech O₃NB koncentracích ve vodě (1 – kontrolní/nulová, 2 – nízká, 3 – střední a 4 – vysoká) během 33–70 dní po oplození. Výsledky byly podrobeny statistické analýze (jednocestná ANOVA s následným Tukey HSD testem) pro určení významných rozdílů mezi skupinami v jednotlivé dny odchovu (uvažovány zvlášť). Pokud byla hladina významnosti $< 0,05$, byly statistické rozdíly mezi skupinami vyznačeny pomocí horních indexů (^{a-d}) nad sloupci v grafu.

Zhodnocení růstu

Během této studie byla celková délka těla pstruha duhového průkazně ovlivněna ($P < 0,05$) jak oběma metodami odchovu (N – bez odstraňování a S – s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců), tak i čtyřmi O₃NB koncentracemi (nulová/kontrolní až vysoká O₃NB koncentrace) (Obr. 24). Souhrnně vzato, S-metoda měla pozitivní efekt na celkovou délku těla ryb v porovnání s N-ošetřením. Zároveň nejdelší celková délka těla byla zaznamenána v nízké koncentraci O₃NB (tj. skupina 2), zatímco nejkratší celková délka těla byla ve skupinách se střední a vysokou koncentrací O₃NB (tj. skupiny 3 a 4), přičemž nulová koncentrace O₃NB (tj. skupina 1) se nelišila od ostatních testovaných skupin. Celková délka těla se lišila ($P < 0,05$) také v čase, kdy vzrostla ze 17,4 na 21,6 mm mezi 56–63 dny po oplození a později až na 25,0 mm při 70 dnech po oplození. Dále byl potvrzen i interakční efekt ($P < 0,05$) chovných metod (N a S) a O₃NB ošetření na celkovou délku těla.

Koncem experimentů (při 70 dnech po oplození) byla nejdelší celková délka těla nadále ve skupině s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců při nízké O₃NB koncentraci (tj. skupina 2S), nejkratší pak byla ve skupině bez

odstraňování (N) při střední O_3NB koncentraci (tj. skupina 3N), zatímco další skupiny (tzn. oba způsoby odchovu při nulové a střední O_3NB koncentraci a způsob odchovu bez odstraňování (N) při nízké koncentraci; tj. skupiny 1N a 1S, 3N a 3S, 2N) se nelišily od ostatních skupin.



Dny po oplození

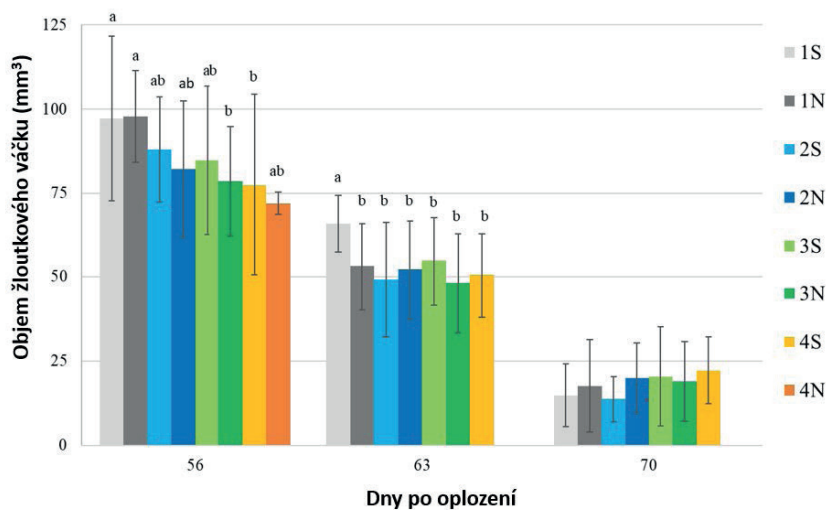
Obr. 24. Celková délka těla pstruha duhového (mm, průměr $\pm$ SD) v závislosti na dvou metodách ošetření (N – bez odstraňování a S – s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců) a čtyřech O_3NB koncentracích ve vodě (1 – kontrolní/nulová, 2 – nízká, 3 – střední a 4 – vysoká) během 56–70 dní po oplození. Výsledky byly podrobeny statistické analýze (jednocestná ANOVA s následným Tukey HSD testem) pro určení významných rozdílů mezi skupinami v jednotlivé dny odchovu (uvažovány zvlášť). Pokud byla hladina významnosti $< 0,05$, byly statistické rozdíly mezi skupinami vyznačeny pomocí horních indexů (^{a-d}) nad sloupci v grafu.

Resorpce žloutkového váčku

Objem žloutkového váčku pstruha duhového byl signifikantně ovlivněn ($P < 0,05$) oběma odchovnými metodami (N, S), zatímco různé koncentrace O_3NB ve vodě neměly vliv ($P < 0,05$) na objem žloutkového váčku ryb (Obr. 25). Souhrnně vzato, ryby odchované pomocí S-metody měly o trochu větší objem žloutkového váčku ve srovnání s N-metodou. Co se týká O_3NB ošetření, tak největší objem žloutkového váčku byl ve skupině s nulovou O_3NB koncentrací (tj. skupina 1), nejmenší ve skupině s nízkou O_3NB koncentrací (tj. skupina 2), zatímco zbývající skupiny se střední a vysokou O_3NB koncentrací (tj. skupiny 3 a 4) se nelišily od ostatních testovaných skupin. Objem žloutkového váčku se

signifikantně lišil ($P < 0,05$) také v čase, kdy významný pokles z 86,6 na 53,5 mm³ byl zaznamenán mezi 56–63 dny po oplození, později až na 18,0 mm³ při 70 dnech po oplození, zatímco při 77 dnech po oplození byl žloutkový váček zcela resorbován. Dále nebyl potvrzen interakční efekt ($P > 0,05$) chovných metod (bez a s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců) a testovaných O₃NB ošetření (nízká až vysoká koncentrace) na objem žloutkového váčku ryb.

Po vylíhnutí (56 dní po oplození) byl objem žloutkového váčku ryb největší a negativně koreloval se zvyšující se O₃NB koncentrací. Později, při 63 dnech po oplození, byl největší ve skupině s odstraňováním (N) při nulové O₃NB koncentraci (tj. skupina 1S) ve srovnání s ostatními testovanými skupinami (1N, 2–3N a S a 4S; kromě skupiny 4N, kde uhynuly všechny ryby ve vzorkovacím aparátu). Koncem experimentů (při 70 dnech po oplození) se objem žloutkového váčku ryb nelišil ($P > 0,05$) mezi testovanými skupinami. A později (při 77 dnech po oplození) byl objem žloutkového váčku již zcela resorbován.



Obr. 25. Objem žloutkového váčku pstruha duhového (mm³, průměr ± SD) v závislosti na dvou metodách ošetření (N – bez odstraňování a S – s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců) a čtyřech O₃NB koncentracích ve vodě (1 – kontrolní/nulová, 2 – nízká, 3 – střední a 4 – vysoká) během 56–77 dní po oplození. Výsledky byly podrobeny statistické analýze (jednocestná ANOVA s následným Tukey HSD testem) pro určení významných rozdílů mezi skupinami v jednotlivé dny odchovu (uvažovány zvlášť). Pokud byla hladina významnosti $< 0,05$, byly statistické rozdíly mezi skupinami vyznačeny pomocí horních indexů (^{a-b}) nad sloupci v grafu.

5. EKONOMICKÝ PŘÍNOS TECHNOLOGIE

Popsaná technologie praktické aplikace nanobublin ozónu (O_3NB) má potenciál zlepšit celkovou efektivitu produkce ryb, a to zejména v odchovech s ne zcela optimálním zdrojem vody (např. organicky znečištěným či s nedostatkovým průtokem, kdy je nutné její opakované použití) a u druhů s vyššími požadavky na kvalitu vody (např. čeleď lososovití).

V porovnání s běžně používanými metodami dezinfekce vody (př. ozonizace, UV a chemické ošetření vody) přináší recentní technologie O_3NB vícero výhod. Unikátní fyzikálně-chemické vlastnosti O_3NB (< 200 nm) totiž poskytují kromě zlepšené kvality vody, zdravotního stavu (tím také produkce ryb) i další ekonomické přínosy. Ušetřených provozních nákladů může být dále dosaženo i díky efektivnějšímu využití O_3 v podobě velkého množství NB (koncentrace 10^6 až $10^7 \cdot \text{ml}^{-1}$), prodloužené životnosti O_3 ve vodním prostředí a navýšení koncentrace O_2 ve vodě (jako vedlejšího produktu rozkladu O_3).

Spotřeba elektrické energie generátory O_3 (tzv. ozonizátory) používanými při chovu ryb závisí na několika parametrech – kapacitě generátoru, použité technologii, provozním měřítku atd. Výkon generátorů O_3 pro aplikace v akvakultuře se může pohybovat od desítek do stovek wattů. Požadavky na napětí se obvykle shodují se standardním elektrickým napájecím napětím (110–230 voltů). Náklady na použití generátoru O_3 jsou určeny množstvím spotřebované energie, které lze vypočítat vynásobením spotřeby energie v kilowatthodinách (kWh) místními náklady na elektřinu za kWh.

Generátory O_2 produkují přibližně 5–10 ppm (objem vody $\leq 5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$), zatímco ozonizátory 0,1–1 ppm (objem vody $\leq 8 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) a v případě generace NB je to 0,1–1 ppm plynu (objem vody $\leq 8 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$). Náklady na provoz generátorů O_2 se pohybují okolo $0,5\text{--}1,0 \text{ Kč} \cdot \text{h}^{-1}$ ($0,2\text{--}0,4 \text{ kWh}$), zatímco u generátorů O_3 kolem $1,2\text{--}2,5 \text{ Kč} \cdot \text{h}^{-1}$ ($0,48\text{--}1,0 \text{ kWh}$) a generátorů NB okolo $2,4\text{--}5,0 \text{ Kč} \cdot \text{h}^{-1}$ ($0,96\text{--}2,0 \text{ kWh}$) při produkci plynu v koncentraci $\sim 0,1$ ppm. Běžná ozonizace využívající dva generátory (O_2 a O_3) tedy stojí v průměru kolem $1,7\text{--}3,5 \text{ Kč} \cdot \text{h}^{-1}$ a produkce O_3NB pomocí třech generátorů (O_2 , O_3 a NB) pak přibližně $4,1\text{--}8,5 \text{ Kč} \cdot \text{h}^{-1}$. Ve srovnání s provozně levnějším dezinfekčním ošetřením pomocí UV záření ($1,2\text{--}3,8 \text{ Kč} \cdot \text{h}^{-1}$ dle velikosti výbojek), při jehož použití je však nutné uvážit, že UV výbojky je potřeba po čase měnit a že je nutné okysličovat vodu na rozdíl od ozonizace a O_3NB (jejichž vedlejším produktem je O_2).

S ohledem na potřebu třech generátorů (O_2 , O_3 a NB generátory) jsou náklady pro produkci O_3NB vyšší v porovnání s běžnou ozonizací (kde jsou potřeba pouze dva generátory (O_2 a O_3), nicméně již nízké dávky O_3NB (jak ukázala i tato studie) byly v námi testovaných podmínkách dostatečné. Navíc O_3 aplikovaný formou NB má potenciál vyšší perzistence plynu ve vodním

prostředí ve srovnání s klasickou aplikací O_3 . Pro dosažení stejně účinné koncentrace tedy stačí i kratší doba provozu sestavy generátorů. Díky tomu by mělo být dosaženo nižších ekonomických nákladů. Ačkoliv počáteční finanční investice pro pořízení tří generátorů je samozřejmě nezbytná pro produkování O_3NB (v případě ozonizace jsou potřeba jen dva generátory).

Dále je nutné vzít v potaz, že technologie O_3NB je poměrně novou metodou dezinfekce vody, a to zejména v akvakultuře, a proto je nutné dále v praxi ověřovat nejen její účinky, ale i ekonomickou návratnost při různých podmínkách odchovu (fyzikálně-chemické parametry vody, různé odchovné systémy apod.).

6. UPLATNĚNÍ TECHNOLOGIE V PRAXI

Tato technologie shrnuje praktické zkušenosti a výsledky studií zaměřených na produkci O_3NB pomocí sestavy třech generátorů, dezinfekční účinky nanobublin ozónu (O_3NB) s ohledem na kvalitu chovné vody a ověření aplikace O_3NB při odchovu raných stadií pstruha duhového v prostorech rybí líhně s rybníčním zdrojem vody.

Bylo zjištěno, že již nízké koncentrace O_3NB (277–392 mV), zejména v kombinaci s odstraňováním neoplozených jiker a uhynulých jedinců, mohou pozitivně ovlivnit míru přežití a líhnutí, stejně jako morfometrické parametry raných stadií pstruha duhového. Zatímco vysoké koncentrace (~610 mV) působily na ryby vesměs negativně, kdy mnohdy docházelo k přichycení většího množství O_3NB k embryím po celou dobu inkubace. Dále byla zaznamenána vyšší mortalita, nižší míra líhnutí a pomalejší růst ryb v těchto skupinách (bez ohledu na způsob čištění inkubačních aparátů).

Dalším z přínosů využití této technologie bylo snížení diversity mikrobiálního znečištění vody, které je velmi významné zejména při odchovu raných stadií ryb (tj. stadií nejcitlivějších vůči vnějším faktorům) a dále v odchovných zařízeních s přirozeně organicky znečištěným zdrojem vody (např. říční a rybníční voda), jako tomu bylo v případě Rybí líhně Mydlovary.

Je však nutné podotknout, že se jedná o novou technologii v akvakultuře, jejíž efekty je potřeba prozkoumat z různých úhlů pohledu, počínaje druhovým a věkovým spektrem ryb, přes fyzikálně-chemické vlastnosti vody, po různé odchovné systémy (např. průtočné systémy, recirkulační akvakulturní systémy, akvaponie a rybníční akvakultura) včetně jejich technických komponentů (biologické filtry, kořenové čistírny apod.).

7. SEZNAM LITERATURY

- Agarwal, A., Ng, W.J., Liu, Y., 2011. Principle and applications of microbubble and nanobubble technology for water treatment. *Chemosphere* 84: 1175–1180.
- AquaPro Solutions, 2023. aQua+ NBG Product Features. [online 15. 10. 2023]. Dostupné z: <https://www.aquapro-solutions.com/nanobubble-generator>.
- Atkinson, A.J., Apul, O.G., Schneider, O., Garcia-Segura, S., Westerhoff, P., 2019. Nanobubble technologies offer opportunities to improve water treatment. *Accounts of Chemical Research* 52: 1196–1205.
- Blaxter, J.H.S., Hempel, G., 1963. The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus*). *ICES Journal of Marine Science* 28: 211–240.
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., et al., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37: 852–857.
- Dien, L.T., Sangpo, P., Senapin, S., St-Hilaire, S., Rodkhum, C., Dong, H.T., 2021. Ozone nanobubble treatments improve survivability of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with a pathogenic multi-drug-resistant *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases* 44: 1435–1447.
- Dien, L.T., Linh, N.V., Mai, T.T., Senapin, S., St-Hilaire, S., Rodkhum, C., Dong, H.T., 2022. Impacts of oxygen and ozone nanobubbles on bacteriophage in aquaculture system. *Aquaculture* 551: 737894.
- Fan, W., An, W., Huo, M., Xiao, D., Lyu, T., Cui, J., 2021. An integrated approach using ozone nanobubble and cyclodextrin inclusion complexation to enhance the removal of micropollutants. *Water Research* 196: 117039.
- FAO, 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 – Meeting the sustainable development goals. FAO, Rome, 210 pp.
- Farid, M.U., Choi, P.J., Kharraz, J.A., Lao, J.Y., St-Hilaire, S., Ruan, Y., Lam, P.K.S., An, A.K., 2022. Hybrid nanobubble-forward osmosis system for aquaculture wastewater treatment and reuse. *Chemical Engineering Journal* 435: 135164.
- Ference, Ch., 2020. Small bubbles, big impact: Nanobubbles for effective deep-water oxygenation and algae control. *Waterline* [online 12. 10. 2023]. Dostupné z: <https://www.walpa.org/waterline/december-2020/small-bubbles-big-impact-nanobubbles-for-effective-deep-water-oxygenation-and-algae-control/>.
- Foundas, A., Kosheleva, R.I., Favvas, E.P., Kostoglou, M., Mitropoulos, A.C. and Kyzas, G.Z., 2022. Fundamentals and applications of nanobubbles: A review. *Chemical Engineering Research and Design* 189: 64–86.
- Godon, J.J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F. Moletta, R., 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2802–2813.
- Gonçalves, A.A., Gagnon, G.A., 2011. Ozone application in Recirculating aquaculture system: an overview. *Ozone: Science & Ingeneering* 33: 345–367.
- Gullian, M., Espinosa-Faller, F.J., Núñez, A., López-Barahona, N., 2012. Effect of turbidity on the ultraviolet disinfection performance in recirculating aquaculture systems with low water exchange. *Aquaculture Research* 43: 595–606.

- Gurung, A., Dahl, O., Jansson, K., 2016. The fundamental phenomena of nanobubbles and their behavior in wastewater treatment technologies. *Geosystem Engineering* 19: 133–142.
- Chen, S., Timmons, M.B., Aneshansley, D.J., Bisogni, J.J., 1993. Suspended solids characteristics from recirculating aquacultural systems and design implications. *Aquaculture* 112: 143–155.
- Imaizumi, K., Tinwongger, S., Kondo, H., Hirono, I., 2018. Disinfection of an EMS/AHPND strain of *Vibrio parahaemolyticus* using ozone nanobubbles. *Journal of Fish Diseases* 41: 725–727.
- Jhunkeaw, C., Khongcharoen, N., Rungrueng, N., Sangpo, P., Panphut, W., Thapinta, A., Senapin, S., St-Hilaire, S., Dong, H.T., 2021. Ozone nanobubble treatment in freshwater effectively reduced pathogenic fish bacteria and is safe for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 534: 736286.
- Kamler, E., 2002. Ontogeny of yolk-feeding fish: An ecological perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 12: 79–103.
- Klindworth, A., Priesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41: 1–11.
- Kouřil, J., Hamáčková, J., Stejskal, V., 2013. Recirkulační akvakulturní systémy pro chov ryb. *Edice Metodik, FROV JU Vodňany*, č. 85, 40 s.
- Kowalska, J.D., Kazimierczak, J., Sowińska, P.M., Wójcik, E.A., Siwicki, A.K., Dastych, J., 2020. Growing trend of fighting infections in aquaculture environment – opportunities and challenges of phage therapy. *Antibiotics* 9: 301 s.
- Lekang, O.I., 2020. *Aquaculture engineering* (3. vyd.). Drøbakveien, Wiley & Sons Ltd., 525 pp.
- Linh, N.V., Dien, L.T., Panphut, W., Thapinta, A., Senapin, S., St-Hilaire, S., Rodkhum, C., Dong, H.T., 2021. Ozone nanobubble modulates the innate defense of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus agalactiae*. *Fish & Shellfish Immunology* 112: 64–73.
- Liltved, H., 2003. Dezinfekce vody v akvakultuře – Faktory ovlivňující fyzikální a chemickou inaktivaci mikroorganismů. *Edice Metodik, VÚRH Vodňany*, č. 71, 12 s.
- Linh, N.V., Mai, T.T., Senapin, S., St-Hilaire, S., Rodkhum, C., Dong, H.T., 2022. Impacts of oxygen and ozone nanobubbles on bacteriophage in aquaculture system. *Aquaculture* 551: 737894.
- Meegoda, J.N., Hewage, S.A., Batagoda, J.H., 2018. Stability Nanobubbles. *Environmental Engineering Science* 35: 1216–1227.
- Moreno-Andrés, J., Rueda-Márquez, J.J., Homola, T., Vielma, J., Moríñigo, M.Á., Mikola, A., Levchuk, I., 2020. A comparison of photolytic, photochemical and photocatalytic processes for disinfection of recirculation aquaculture systems (RAS) streams. *Water Research* 181: 115928.

- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006, o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnic Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES. EUR-Lex Access to European Union law [online 07. 02. 2024]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02006R1907-20231201>.
- Nařízení vlády č. 361/2007 Sb., kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví při práci. Příručka pro personální agendu a odměňování zaměstnanců [online 07. 02. 2024]. Dostupné z: https://ppropo.mpsv.cz/narizeni_vlady_361_2007.
- Nghia, N.H., Van, P.T., Giang, P.T., Hanh, N.T., St-Hilaire, S., Domingos, J.A., 2021. Control of *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strain) and improvement of water quality using nanobubble technology. *Aquaculture Research*: 1–13.
- Oxidation Technologies, LLC., 2023. Materials ozone resistance chart. *Oxidation Technologies News* [online 15. 11. 2023]. Dostupné z: <https://www.oxidationtech.com/blog/materials-ozone-resistance-chart/>.
- Pal, P., Joshi, A., Anantharaman, H., 2022. Nanobubble ozonation for waterbody rejuvenation at different locations in India: A holistic and sustainable approach. *Results in Engineering* 16: 100725.
- Powell, A., Scolding, J.W.S., 2016. Direct application of ozone in aquaculture systems. *Reviews in Aquaculture* 10: 424–438.
- Seki, M., Ishikawa, T., Terada H., Nashimoto, M., 2017. Microbicidal effects of stored aqueous ozone solution generated by nano-bubble technology. *In Vivo* 31: 579–583.
- Seridou, P., Kalogerakis, N., 2021. Disinfection applications of ozone micro-and nanobubbles. *Environmental Science – Nano* 8: 3493–3510.
- Short, R.E., Gelcich, S., Little, D.C., Micheli, F., Allison, E.H., Basurto, X., Belton, B., Brugere, C., Bush, S.R., Cao, L., Crona, B., Cohen, P.J., Defeo, O., Edwards, P., Ferguson, C.E., Franz, N., Golden, C.D., Halpern, B.S., Hazen, L., Hicks, C., Johnson, D., Kaminski, A.M., Mangubhai, S., Naylor, R.L., Reantaso, M., Sumaila, U.R., Thilsted, S.H., Tigchelaar, M., Wabnitz, C.C.C., Zhang, W., 2021. Harnessing the diversity of small-scale actors is key to the future of aquatic food systems. *Nature Food* 2: 733–741.
- Song, K., Mohseni, M., Taghipour, F., 2016. Application of ultraviolet light-emitting diodes (UV-LEDs) for water disinfection: A review. *Water Research* 94: 341–349.
- Stejskal, V., Gebauer, R., Matoušek, J., Šebesta, R., Prokešová, M., Mráz, J., Kouřil, J., 2018. Technologie a technické prvky recirkulačních akvakulturních systémů pro chov ryb. *Edice Metodik, FROV JU Vodňany*, č. 174, 106 s.
- Summerfelt, S.T., Hankins, J.A., Heinen, J.M., Weber, A.L., Morton, J.D., 1994. Evaluation of the Triangel™ microsieve filter in a water-reuse system. *World Aquaculture, Book of Abstracts*, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 45 pp.
- Temesgen, T., Bui, T.T., Han, M., Kim, T., Park, H., 2017. Micro and nanobubble technologies as a new horizon for water-treatment techniques: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* 246: 40–51.

- Ushikubo, F.Y., Furukawa, T., Nakagawa, R., Enari, M., Makino, Y., Kawagoe, Y., Shiina, T., Oshita, S., 2010. Evidence of the existence and the stability of nano-bubbles in water. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 361: 31–37.
- Van Beijnen, J., Yan G., 2021. A breath of fresh air: how nanobubbles can make aquaculture more sustainable. Atlantic salmon, shrimp disease [online 13. 10. 2023]. Dostupné z: <https://thefishsite.com/articles/a-breath-of-fresh-air-how-nanobubbles-can-make-aquaculture-more-sustainable-dissolved-oxygen>.
- Xu, Y., Li, L., Lou, S., Tian, J., Sun, S., Li, X., Li, Y., 2022. Effects of nano-aerators on microbial communities and functions in the water, sediment, and shrimp intestine in *Litopenaeus vannamei* aquaculture ponds. *Microorganisms* 10: 1302.
- Zhou, Y., Han, Z., He, C., Feng, Q., Wang, K., Wang, Y., Luo, N., Dodbiba, G., Wei, Y., Otsuki, A., Fujita, T., 2021. Long-term stability of different kinds of gas nanobubbles in deionized and salt water. *Materials* 14: 1808.

8. PODĚKOVÁNÍ

Autoři tímto děkují zejména technickým pracovníkům (Ing. Jan Matoušek, Ing. Pavel Šablatura a Bc. Nguyen Thi Tram) za technické zázemí, M.Sc. Hung Quang Tranovi, Ph.D. za pomoc s mikrobiologickými analýzami vody, manželům M.Sc. Tatyáně Gebauerové, Ph.D. a Ing. Radku Gebauerovi, Ph.D. za pomoc s analýzami vzorků nanobublin a všem dalším studentům a členům ÚAOV za jakoukoliv podporu a spolupráci při realizaci experimentů. Dále bychom na tomto místě chtěli poděkovat Ministerstvu vědy a technologie (MOST) ve Vietnamu za spolupráci na této studii.

Odborný externí oponent

MVDr. Lubomír Pojezdal, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 296/70, 621 00 Brno

Odborný interní oponent

Ing. Miloš Buřič, Ph.D.

*Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod,
Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav
rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, www.frov.jcu.cz*

Ověření a uplatnění technologie v roce 2024

OZONTECH, s.r.o., K Farmě 495, Štípa, 763 14 Zlín

Adresa autorského kolektivu

Ing. Markéta Dvořáková Prokešová, Ph.D. – 50 %

Bc. Maksim Kononov – 15 %

M.Sc. Vu Thi Trang – 5 %

M.Sc. Pham Thai Giang, Ph.D. – 5 %

Doc. Ing. Vlastimil Stejskal, Ph.D. – 10 %

M.Sc. Elayaraja Sivaramasamy, Ph.D. – 10 %

*Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod,
Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Ústav akvakultury
a ochrany vod, Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice, www.frov.jcu.cz*

Martin Ševc – 5 %

OZONTECH, s.r.o., K Farmě 495, Štípa, 763 14 Zlín

*V edici Metodik (technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých
Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany; přidělený editor:
doc. Ing. Antonín Kouba, Ph.D.; redakce: Zuzana Dvořáková; 1. vydání; technologie
ověřena roce 2024; publikace není vydána tiskem, dostupná elektronicky; grafický
design a technická realizace: Jesenické nakladatelství Jena Šumperk.*



Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



ISBN 978-80-7514-198-9