



EVROPSKÁ UNIE
Evropský námořní a rybářský fond
Operační program Rybářství



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

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

TECHNICKÁ ZPRÁVA PILOTNÍHO PROJEKTU

Název projektu:

**Optimalizace provozu RAS dánského typu
zajišťující zvýšenou a kvalitní produkci
lososovitých ryb**

Registrační číslo pilotního projektu: CZ.10.2.101/2.1/0.0/18_013/0000773



EVROPSKÁ UNIE
Evropský námořní a rybářský fond
Operační program Rybářství



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

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

Příjemce:

Obchodní firma nebo název: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod

Adresa: Branišovská 1645/31a, 370 05 České Budějovice

IČ: 60076658

Registrační číslo projektu: CZ.10.2.101/2.1/0.0/18_013/0000773

Název projektu: Optimalizace provozu RAS dánského typu zajišťující zvýšenou a kvalitní produkci lososovitých ryb.

Jméno a příjmení osoby, která je oprávněna vědecký subjekt zastupovat:

prof. PhDr. Bohumil Jiroušek, Dr.

Partner projektu:

Název nebo obchodní jméno: BioFish s.r.o

Adresa: Horní Paseka 40, 584 01

IČ: 60930527

Jméno a příjmení osoby, která je oprávněna příjemce dotace zastupovat:

Ing. Petr Tůma

Zpracovatel technické zprávy projektu:

Název nebo obchodní jméno: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod

Adresa: Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany

IČ: 60076658

Místo a datum zpracování technické zprávy: Vodňany, 31. 1.2021

Jména a příjmení osob, které zpracovaly technickou zprávu:

doc. Ing. Tomáš Polícar, Ph.D.

MVDr. Jitka Kolářová

Jméno a příjmení osoby, která je oprávněna zpracovatele technické zprávy zastupovat:

prof. PhDr. Bohumil Jiroušek, Dr.



EVROPSKÁ UNIE
Evropský námořní a rybářský fond
Operační program Rybářství



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

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

Souhlas s publikací technické zprávy:

Souhlasím se zveřejněním této technické zprávy pilotního projektu v rámci opatření 2.1. v rámci Operačního programu Rybářství 2014-2020 na internetových stránkách Ministerstva zemědělství a s využíváním výsledků této technické zprávy všemi subjekty z odvětví rybářství.

1. Příjemce dotace (veřejnoprávní subjekt):

prof. PhDr. Bohumil Jiroušek, Dr.

2. Partnera projektu (podnik akvakultury):

Ing. Petr Tůma

3. Zpracovatele technické zprávy:

prof. PhDr. Bohumil Jiroušek, Dr.



Obsah

1 Cíl	6
1.1 Co bylo cílem pilotního projektu	6
1.2 V čem tkví inovativnost testované technologie	6
1.3 Proč je nutná inovace, která byla předmětem testování	7
2 Úvod	7
3 Průběh a harmonogram řešených aktivit v rámci projektu	8
4 Optimalizace denního provozu produkčního systému RAS 1 a porovnání míry přežití a produkce ryb v průběhu tří let (2017–2019)	9
4.1 Materiál a metodika	9
4.2 Výsledky	13
4.2.1 Vliv nového managementu chovu na míru kumulativního a absolutního přežití ryb	13
4.2.2 Vliv nového managementu chovu na absolutní roční produkci ryb	23
4.3 Závěr	23
5 Návrh nového uzavřeného RAS pro odchov juvenilních ryb do kusové hmotnosti 5–10 gramů	24
5.1 Materiál a metodika	24
5.2 Výsledky	25
5.2.1 Navržená technologie pro chov ryb	25
5.2.2 Navržená technologie pro filtraci vody a udržení parametrů její optimální kvality pro chov	26
5.3 Závěr	30
6 Optimalizace intenzivního chovu pstruha duhového při využití umělého krmiva s vyšším obsahem vitamínu C, A a E	30
6.1 Materiál a metodika	30
6.1.1 Příprava odchovných systémů, experimentálních skupin a nasazení ryb pstruha duhového	31
6.1.2 Management krmení a obohacení krmiv o vitamíny	31
6.1.3 Průběh experimentu	32
6.1.4 Sledování míry růstu, kondice a přežití ryb	32
6.1.5 Průběžné monitorování zdravotního stavu ryb	33
6.1.6 Posouzení stavu poškození ploutví	33
6.1.7 Posouzení poškození ledvin	35
6.1.8 Diagnostika PKD (proliferativní onemocnění ledvin) pomocí real-time PCR	36
6.1.9 Stanovení hematologického profilu nativní krve ryb	36
6.1.10 Stanovení biochemického profilu krve ryb	36
6.1.11 Stanovení biomarkerů oxidativního stresu	37
6.1.12 Stanovení obsahu vitamínů ve vybraných tkáních ryb a použitých krmivech	38



6.1.13 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení	38
6.2 Výsledky	38
6.2.1 Dosažená rychlost růstu a přežití odchovaných ryb včetně konverze živin	38
6.2.2 Vyhodnocení kondičních parametrů a tělesných indexů odchovaných ryb.....	39
6.2.3 Průběžné sledování zdravotního stavu ryb	40
6.2.4 Posouzení stavu a poškození ploutví.....	41
6.2.5 Vyhodnocení stavu a poškození ledvin a diagnostiky PKD prostřednictvím real-time PCR .	43
6.2.6 Posouzení hematologických parametrů nativní krve	44
6.2.7 Posouzení biochemických parametrů v krevní plazmě	45
6.2.8 Posouzení úrovně oxidativního stresu	47
6.2.9 Stanovení obsahu vitamínů A, C a E v tkáních ryb	49
6.3 Závěr.....	51
7 Vliv pravidelné ozonizace vody a využití krmiva s vyšším obsahem vitamínu C, A a E za účelem eliminace výskytu onemocnění PKD a ektoparazitárních infekcí, a vylepšení produkčních ukazatelů intenzivního chovu pstruha duhového ve venkovním RAS dánského typu	52
7.1 Materiál a metodika	53
7.1.1 Příprava odchovných systémů, experimentálních skupin a nasazení ryb pstruha duhového	53
7.1.2 Management krmení a obohacení krmiv o vitamíny	53
7.1.3 Průběh experimentu.....	54
7.1.4 Sledování míry růstu, kondice a přežití ryb	54
7.1.5 Průběžné monitorování zdravotního stavu ryb.....	54
7.1.6 Posouzení stavu poškození ploutví.....	54
7.1.7 Posouzení poškození ledvin.....	55
7.1.8 Diagnostika PKD pomocí real-time PCR.....	55
7.1.9 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení	55
7.2 Výsledky	55
7.2.1 Dosažená rychlost růstu a přežití odchovaných ryb včetně konverze živin	55
7.2.2 Vyhodnocení kondičních parametrů a tělesných indexů odchovaných ryb.....	56
7.2.3 Průběžné sledování zdravotního stavu ryb	57
7.2.4 Posouzení stavu a poškození ploutví.....	58
7.2.5 Vyhodnocení stavu a poškození ledvin	62
7.3 Závěry	63
8 Závěr realizovaného projektu.....	64
9 Seznam další doprovodná fotodokumentace	66



1 Cíl

1.1 Co bylo cílem pilotního projektu

Cílem projektu bylo pomocí technologických inovací zvýšit efektivitu a rentabilitu intenzivního chovu pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) chovaného ve venkovních (dánských) či uzavřených recirkulačních akvakulturních systémech (RAS). Snahou projektu bylo díky dílčím technologicko-chovatelským inovacím aplikovaným v rybářské praxi produkčního podniku BioFish s.r.o. minimalizovat vážná onemocnění pstruha duhového, zlepšit fyziologický a kondiční stav, posílit imunitní systém, zajistit vysoké přežití a růst odchovávaných ryb včetně zajištění vysoké konverze předkládaných živin. Díky zmíněnému projektu může dojít v budoucnosti v rybářské praxi k zvýšení produkce tržních ryb pstruha duhového, která může být v budoucnosti na český potažmo evropský trh dodávána kontinuálně ve vyrovnaném množství a vysoké kvalitě.

Pstruh duhový je považován za vysoce kvalitní rybí druh na celém evropském trhu. Díky řešení tohoto projektu došlo k podpoře jeho zvýšené produkce v ČR, která má v budoucnosti přispět také ke zvýšení konkurenceschopnosti českého produkčního rybářství v rámci celé Evropy a následně také potencionálně zvýšit spotřebu a konzum tržních ryb v ČR.

1.2 V čem tkví inovativnost testované technologie

Řešení projektu bylo zaměřeno na využití jednotlivých dílčích technologicko-chovatelských inovací intenzivního v chovu pstruha duhového produkovaného ve venkovních či uzavřených RAS. V průběhu projektu došlo k využití, otestování a ověření následujících inovačních postupů, které se týkaly: denního měření kvality vody a stabilizace vysoké kvality vodního prostředí v odchovném systému, aplikace látky s anti parazitárním účinkem (formaldehydu) do odchovného systému v případě výskytu patogenních ektoparazitů, aplikace krátkodobé koupele přípravku Chloramin T v odchovných nádržích při výskytu bakteriální infekce žaber ryb, navržení vnitřního RAS pro produkci juvenilních ryb určených k dalšímu odchovu, využití umělých krmiv s vyšším obsahem vitamínů C, A a E a ozonizace vody v odchovném systému s cílem zvýšit efektivitu, rentabilitu, objem a kvalitu produkce násadových či tržních ryb pstruha duhového v rámci intenzivních chovů v ČR. V rámci řešení projektu se jednalo o inovaci intenzivního chovu pstruha duhového, která byla založená na nových vědomostech a profesních zkušenostech přinášející budoucí prosperitu a zvyšující konkurenceschopnost českému produkčnímu rybářství. Řešení projektu navázalo na již realizované pilotní (inovační) projekty, které byly doplněny a inovovány díky nově získaným odborným výsledkům a zkušenostem:

- projekt č. CZ.1.25/3.4.00/09.00532 Ověření technologie dánského recirkulačního systému pro intenzivní chov pstruha duhového, který jako první projekt v ČR testoval a ověřoval provoz RAS dánského typu k produkci pstruha duhového včetně hodnocení funkčnosti biologické filtrace, úpravy a udržení dobré kvality vody v daném odchovném systému s cílem dosáhnout vyrovnaného růstu a přežití odchovávaných ryb a efektivní produkce tržních ryb.
- projekt č. CZ.1.25/3.4.00/09.00537 Technologie chovu lososovitých druhů ryb s využitím nových preventivních a terapeutických postupů, který testoval a ověřoval poloprovozní využití kyseliny peroctové v chovu sivena amerického (*Salvelinus fontinalis*) s cílem eliminovat zaplísnění jiker při jejich inkubaci, zaplísnění generačních ryb v povýťerovém



období a onemocnění odchovávaného plůdku v letním období vyvolaná patogenními ektoparazity.

1.3 Proč je nutná inovace, která byla předmětem testování

Současné intenzivní chovy pstruha duhového využívající RAS technologii se v ČR velmi často potýkají s problémem dlouhodobě udržet vysokou kvalitu vody v chovném produkčním systému, který by byl současně prostý jakýchkoliv patogenů. Díky tomuto problému potom dochází ke zvýšené mortalitě, sníženému růstu a horší zdravotní kondici chovaných ryb. Následně pak v chovech dochází k snížené konverzi živin, snížené produkci ryb a také snížené kvalitě produkovaných ryb, která je často velmi rozkolísaná v čase. Produkční podniky, ve kterých se vyskytnou zmíněné technologicko-chovatelské problémy, se potom vyznačují velmi neefektivním chovem a nízkou produkcí ryb, která způsobuje nízkou rentabilitu daných chovů. Z těchto důvodů byla realizace tohoto projektu vysoce žádoucí pro stávající a popřípadě i budoucí chovatele využívající intenzivní chovy pstruha duhového s RAS technologií po celé České republice. Realizace projektu a jeho výsledky vytvořily nové podmínky pro zkvalitnění a zefektivnění procesu intenzivní a kontinuální produkce pstruha duhového. Snahou realizovaného projektu bylo u produkčních podniků v budoucnosti dosáhnout vyšší, kvalitnější, stabilnější, efektivnější a rentabilnější produkce pstruha duhového v průběhu celého rok, což může přispět k zvyšování konkurenceschopnosti české produkční akvakultury.

2 Úvod

Většina států současné Evropské unie se potýká s nedostatečnou a nevyrovnanou produkcí kvalitních tržních ryb, která je stále ve větším měřítku produkována intenzivní akvakulturou využívající technologii RAS. Avšak Česká republika je v EU určitou výjimkou, jelikož cca 19 000 tun tržních ryb zahrnující především cca 17 500 tun kapra obecného (*Cyprinus carpio*) je každoročně vyprodukováno klasickým rybníčním chovem. Je pravdou, že tento jednostranný způsob produkce tržních ryb je v současné ČR čím dál více doplňován intenzivním chovem lososovitých ryb (hlavně pstruhem duhový), který dosahoval v letech 2014–2018 stoupající tendence roční produkce na úrovni 690–1100 tun (Mareš a kol., 2019). Největšími problémy současného intenzivního chovu pstruha duhového využívající RAS je v ČR častý výskyt protozoárních ektoparazitů, především kožovce rybího (*Ichthyophthirius multifiliis*) a čepelenky rybí (*Chilodonella piscicola*). Z endoparazitárních infekcí se v některých chovech vyskytuje proliferativní onemocnění ledvin (PKD-Proliferative Kidney Disease) jehož původcem je rybomorka *Tetracapsuloides bryosalmonae*. Těžko řešitelným problémem jsou bakteriální infekce žaber a kůže odchovávaných ryb, které jsou nejčastěji způsobovány bakteriemi rodu *Aeromonas* a *Flavobacter*. Dalším technologicko-chovatelským problémem je snížená kvalita vody v produkčních systémech (např. vyšší koncentrace odpadních látek metabolismu dusíku jako je: amoniak a dusitany) a zhoršená zoohygiena chovu způsobující vyšší organické a bakteriální zatížení vody. V souvislosti s takto vzniklými podmínkami v daných chovech dochází ke zhoršenému kondičnímu a zdravotnímu stavu ryb, které způsobují narušený imunitní systém organismu. Takovéto odchovávané ryby pstruha duhového se vyznačují sníženým přežitím, růstem, konverzí živin a dochází k snížené produkci ryb, která významně snižuje efektivitu daných chovů a celkovou rentabilitu a konkurenceschopnost rybářských produkčních podniků (Palíková a kol., 2013; 2016).



Z těchto důvodů cílem a snahou řešení tohoto projektu č. CZ.10.2.101/2.1/0.0/18_013/0000773 s názvem „Optimalizace provozu RAS dánského typu zajišťující zvýšenou a kvalitní produkci lososovitých ryb“ bylo různými technologicko-chovatelskými přístupy, které se týkaly: denního měření kvality vody a stabilizace vysoké kvality vodního prostředí v odchovném systému, aplikace látky s antiparazitárním účinkem (formaldehydu) do chovného systému v případě výskytu ektoparazitů, aplikace krátkodobé koupele v přípravku Chloramin T v odchovných nádržích při výskytu bakteriální infekce žaber ryb, navržení vnitřního RAS k produkci juvenilních ryb určených k dalšímu odchovu, využití umělých krmiv s vyšším obsahem vitamínů C, A a E a ozonizace vody, postupně eliminovat či alespoň omezovat zmíněná parazitární a bakteriální onemocnění pstruha duhového. Další snahou řešeného projektu bylo podporovat a zvyšovat růst, přežití, kondiční a zdravotní stav odchovávaných ryb včetně zvýšené konverze přijímaných živin a dosahovat tak vyšší produkce kvalitních tržních ryb pstruha duhového při lepší ekonomické bilanci chovu.

Použitá literatura:

- Mareš, L., Ženíšková, H., Chalupa, P., Mořický, J., 2019. Situační a výhledová zpráva Ryby. Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství MZe, 42 s.
- Palíková, M., Čížek, A., Navrátil, S., Mareš, J., 2013. Výskyt onemocnění lososovitých ryb v recirkulačním systému dánského typu. Ve: Zkušenosti s chovem ryb v recirkulačním systému dánského typu. Sborník příspěvků (Mareš, L., Lang, Š. Eds.), 79-84.
- Palíková, M., Papežíková, I., Kováčová, V., Jelínková, E., Marková, Z., Navrátil, S., Vojtek, L., Hyršl, P., Mareš, J., 2016. Proliferativní onemocnění ledvin pstruha duhového v podmínkách intenzivního chovu: Patogeneze, druhová vnímavost, terapeutický efekt NaCl. Ve: Zkušenosti s chovem ryb optimalizací prostředí a veterinární péčí v recirkulačních systémech. Sborník příspěvků (Mareš, L., Lang, Š., Marešová M. G. Eds.), 30-35.

3 Průběh a harmonogram řešených aktivity v rámci projektu

V průběhu řešení tohoto pilotního projektu č. CZ.10.2.101/2.1/0.0/18_013/0000773 „Optimalizace provozu RAS dánského typu zajišťující zvýšenou a kvalitní produkci lososovitých ryb“, který byl fyzicky realizován od 1.5.2019 do 31.1.2021, byly celkem realizovány čtyři různé poloprovozní a experimentální aktivity, které měly za cíl zefektivnit a zvýšit objem juvenilní a tržní produkce pstruha duhového v rámci jeho intenzivního chovu využívající venkovní (tzv. dánské) a uzavřené recirkulační akvakulturní systémy (RAS) podniku BioFish nacházející se nedaleko obce Pravíkov. Současně k tomuto projektu byly využity experimentální rybochovné provozy Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Fakulty rybářství a ochrany vod (FROV JU) ve Vodňanech. Zmíněná vědecká instituce a produkční podnik se rovnoměrně zapojily do všech následujících aktivit v rámci řešení tohoto projektu. Na závěr jednotlivých experimentů a potom také souhrnně na konci celého tohoto pilotního projektu byly všechny aktivity a jejich výsledky detailně matematicko-statisticky vyhodnoceny a zpracovány do této technické zprávy.

V první části řešeného projektu došlo k optimalizaci denního provozu produkčního systému podniku BioFish s.r.o. včetně optimalizace denního měření a úpravy kvality vody v odchovných systémech s cílem minimalizovat mortalitu ryb, zlepšit jejich kondiční stav, udržet jejich dobrý zdravotní stav, zefektivnit a zvýšit produkci tržních ryb pstruha duhového. V této části projektu byla produkce tržních ryb pozitivně podpořena zvýšenou kvalitou vody v produkčních



systémech, vylepšenou výživou ryb z hlediska použitých krmiv s vyšším obsahem vitamínů C, A a E a pravidelnou kontrolou zdravotního stavu odchovávaných ryb, popřípadě využitím dlouhodobé koupele ve formaldehydu při výskytu patogenních ektoparazitů a krátkodobé koupele v přípravku Chloramin T při výskytu bakteriální infekce. Produkce ryb a její hlavní ukazatelé byly po zmíněné technologicko-chovatelské inovaci v roce 2019 porovnány s produkčními ukazateli z roku 2017 a 2018. Tato aktivita č. 1 byla řešená od 1.5.2019 do 31.1.2020).

V další fázi projektu byl navržen nový uzavřený RAS pro budoucí odchov juvenilních ryb pstruha duhového v podniku BioFish s.r.o. s cílem eliminovat mortalitu odchovávaných juvenilních ryb v místním chovu a zajistit kvalitní a stabilní roční produkci ryb o objemu 90 000 – 150 000 ks a kusové hmotnosti 5–10 gramů. Tato aktivita č. 2 byla realizována od 1.6.2019 do 31.1. 2020.

V intenzivním chovu pstruha duhového využívající uzavřený vnitřní RAS technologii dále došlo k aplikaci komerčně vyráběného peletového krmiva obohaceného o přídavek vitamínů C, A a E s cílem podpořit dobrý fyziologický a kondiční stav, posílit imunitní systém, zvýšit růst, přežití a konverzi přijímaných živin u odchovávaných ryb pstruha duhového. Tato aktivita č. 3, byla řešena od 1.12. 2019 do 30.4.2020.

Dále v rámci intenzivního chovu pstruha duhového byl realizován poloprovozní experiment využívajícího ozonizaci vody a krmivo obohacené o přídavek vitamínů C, A a E s cílem eliminovat výskyt onemocnění PKD, ektoparazitů a současně zlepšit kondiční stav chovaných ryb a produkční ukazatele chovu (SGR, FCR a přežití ryb). Tato aktivita č. 4 byla řešena od 1.5.2020 do 30.10.2020.

V období od 2.11.2020 do 31.1.2021 došlo k sumarizaci, matematicko-statistickému zpracování všech získaných výsledků a k přípravě této technické zprávy.

4 Optimalizace denního provozu produkčního systému RAS 1 a porovnání míry přežití a produkce ryb v průběhu tří let (2017–2019)

4.1 Materiál a metodika

V průběhu této aktivity č. 1 došlo od 1.5.2019 do 31.1.2020 k detailní analýze všech chovatelských úkonů, které se realizovaly v průběhu tří let (od 1.1.2017 do 31.12.2019) v rámci celého RAS 1 produkčního podniku BioFish s.r.o. o celkovém objemu vody 1050 m³ (Obr. 1). Tento produkční systém je tvořený 12 odchovnými nádržemi (o jednotném objemu 34 m³, rozměrech 11 x 2 metrů, s průměrnou hloubkou vody 1,55 m, vybavené dílčím airliftem, dvojicí sedimentačních kuželů, přítokovým a odtokovým oknem a mříží), jednokomorovým plovoucím a osmikomorovým ponořeným biofiltrem o celkovém objemu vody 550 m³, hlubokým airliftem (Obr. 2) a přítokovým a odtokovým kanálem o celkovém objemu vody 92 m³. Celkový objem vody v systému, který je určený pro chov ryb, je 408 m³.



Obr. 1. Venkovní recirkulační akvakulturní systém (RAS) dánského typu (A) produkčního podniku BioFish s.r.o. s detailním pohledem na odchovnou nádrž (B).



Obr. 2. Jednokomorový plovoucí (A), osmikomorový ponořený biofiltr (B) o celkovém objemu vody 550 m³ a hluboký airlift (C) recirkulačního akvakulturního systému produkčního podniku BioFish s.r.o.

Hlavní pozornost byla věnována analýze denního měření, úpravy a udržování kvality vody v daném systému v letech 2017 a 2018 s vytvořenou novou strategií měření, úpravy a udržování kvality vody v systému pro rok 2019 a následně pro rok 2020. Sledování kvality vody v RAS 1 v roce 2020 již nebylo součástí této aktivity, jelikož v tomto systému probíhala realizace jiných aktivit. Dalším cílem této aktivity bylo od začátku roku 2019 (kdy byla navázána úzká spolupráce pracovníků FROV JU s podnikem BioFish) udržovat dobrou a stabilní kvalitu vody u nejdůležitějších parametrů na optimálních hodnotách uvedených v závorce, jako byly:



koncentrace rozpuštěného kyslíku (95-105 %), pH (6,8-7,2), koncentrace celkového amoniaku ($\text{NH}_4^+ \leq 0,4$) a dusitanů ($\text{NO}_2^- \leq 0,3$). Dále byla zvolena nová strategie pravidelně udržovat salinitu vody v systému na úrovni 2-4 ppt (g.l^{-1}) a teplotu vody pod 18 °C v letním období. Teplota vody a obsah rozpuštěného kyslíku ve vodě byly měřeny dvakrát denně (ráno cca v 7:00 a odpoledne cca v 15:00) pomocí oxymetru Pro ODO od firmy YSI z USA, který byl nakoupen od firmy Aquamonitoring s.r.o. Brno. Hodnota pH vody byla měřena jednou denně cca v 7:00 pomocí kapesního pH-metru 3310 od firmy WTW s.r.o. Koncentrace celkového amoniaku a dusitanů byla měřena jedenkrát denně (většinou 3 hodiny po raním nakrmení cca v 10:00 – 11:00) podle Policara a kol. (2018a). Ke stanovení zmíněných parametrů kvality vody byly použity kolorimetrické sady využívající Seignetovu sůl a Nesslerovo činidlo v případě stanovení amoniaku a kyseliny sulfanilové ($\text{H}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$) a roztoku NED (N-1-Naftyl Etylendiamin Dihydrochlorid) v případě stanovení dusitanů.

Další inovací byla realizace pravidelné kontroly zdravotního stavu chovaných ryb: každodenně obsluhujícím personálem a místním veterinárním lékařem v intervalu jedenkrát týdně nebo dle aktuální potřeby. V případě, že byla u vyšetřovaných ryb zjištěna suspektně středně silná bakteriální infekce žaber byla podle Policara a kol. (2018b) aplikována krátkodobá protibakteriální koupel ryb v přípravku Chloramin T v koncentraci 20 mg na 1 litr se sníženým průtokem vody v dané nádrži po dobu 20 minut. V případě, že došlo při parazitologickém vyšetření ryb k identifikaci střední infekce ryb kožovcem rybím či čepelenkou rybí bylo pod dozorem veterinárního lékaře přistoupeno k dlouhodobé koupeli ryb ve formaldehydu (36-38 % od firmy Kulich, Česká republika) v dávce 0,15 ml na 1000 litrů vody. Koupel formaldehydu se aplikovala do celého objemu vody daného RAS včetně biologických filtrů a přítokového a odtokového kanálu. Přípravek formaldehyd se nechal v systému dlouhodobě působit bez jakékoliv speciální výměny vody.

Další technologicko-chovatelskou inovací chovu pstruhů duhových v daném systému bylo využití směsi komerčně vyráběných krmiv od firmy Skretting T-1P Optiline HT RC a T2P Optiline HE RC SF a od firmy Biomar Inicio Plus, Effico A 785 Boost a Effico Enviro 920 Advance, která se využívala většinou v poměru 50 % krmiva od firmy Skretting a 50 % od firmy Biomar pro krmení různých velikostních kategorií ryb s velikostí pelet od 1,5 – 6 mm. Předkládaná krmiva byla navíc obohacena o vitamíny C, A a E. Pro obohacování předkládaného krmiva vitamíny bylo využito multivitaminového přípravku Kombisol Multi sol. (Pharmagal, s.r.o., Slovensko) v dávce 20 ml.kg^{-1} a přípravku Vitamín C PG 100 % plv. (Trouw Nutrition Biofaktory s.r.o.) v dávce 20 g.kg^{-1} . Multivitaminový přípravek Kombisol Multi v podobě olejové suspenze byl na krmivo rovnoměrně aplikován jemným sprejováním. Tímto postupem bylo krmivo zvlhčeno a následně byla provedena aplikace vitamínu C v podobě prášku, který se na zvlhčené pelety nalepil. Takto obohacené krmivo se nechalo 1-2 dny zaschnout a následně se aplikovalo rybám. Takto se najednou připravilo maximální množství krmiva, které bylo možné kompletně zkonsumovat za dobu 10-14 dní. Obohacené krmivo podle našich zkušeností založených na analýzách od firmy Ekocentrum Ovalab, s.r.o. Ostrava průměrně obsahovalo 14,76 g.kg^{-1} vitamínu C, 23 mg.kg^{-1} vitamínu A a 481,2 mg.kg^{-1} vitamínu E. Toto obohacené krmivo bylo aplikováno běžným způsobem v denních krmných dávkách doporučených příslušnými výrobci (Skretting a Biomar) podle velikosti krmených ryb a aktuální teploty vody po dobu 5 dní. Následovalo 7denní období, kdy byly ryby krmeny stejným krmivem, ale bez obohacení o vitamíny. Po těchto 7 dnech bylo zase po dobu 5 dní krmeno krmivo obohacené o vitamíny.

Vedle zmíněných technologicko-chovatelských inovací byla v daném chovném systému analyzována, kalkulována, vyhodnocena a porovnána míra kumulativního a absolutního přežití



odchovávaných ryb v celém systému vždy v době ke konci předem stanovených klíčových období odchovu, které byly určeny stejně v jednotlivých sledovaných letech (2017, 2018 a 2019). Jednotlivá klíčová období odchovu v daných letech, která jsou uvedena níže, byla určena a zvolena z důvodu specifické doby působení různých negativních vlivů na odchovávané ryby v daném systému (jako např.: typický sezónní výskyt bakteriálního, ektoparazitárního (kožovec, čepelenka a další) a endoparazitárního (PKD) onemocnění či období rychle se zvyšující teploty vody po zimě či výskyt extrémně vysokých teplot vody v letních měsících):

Leden-duben: období spojené s nízkou teplotou vody a častým výskytem flavobakteriálních infekcí (způsobené bakterií *Flavobacterium psychrophilum*) a období se stoupající teplotou vody po zimním období, kdy stoupá potravní aktivita chovaných ryb při nedostatečně naběhnutých biologických filtrech a častým problémem, který je spojený s vysokými koncentracemi celkového amoniaku a dusitanů ve vodě, jelikož dostatečně nepracují biologické filtry;

Květen-červen: častý výskyt furunkulózy (způsobené bakterií *Aeromonas salmonicida*), počáteční období nástupu proliferativního onemocnění ledvin (PKD), intenzivní krmení a růst ryb, intenzivní produkce amoniaku a dusitanů a jejich uvolňování do vodního prostředí včetně jejich intenzivního odbourávání pomocí biologických filtrů, optimální podmínky pro ektoparazitární infekce v podobě kožovce rybího, čepelenky rybí a dalších parazitů;

Červenec-srpen: hlavní infekční období PKD, intenzivní krmení a růst ryb, intenzivní produkce amoniaku a dusitanů a jejich uvolnění do vodního prostředí včetně jejich intenzivního odbourávání pomocí biologických filtrů, optimální podmínky pro ektoparazitární infekce v podobě kožovce rybího a čepelenky rybí a dalších parazitů;

Září-říjen: odeznívání PKD, ojedinělý výskyt ektoparazitů, intenzivní krmení a růst ryb, se stabilní produkcí amoniaku a dusitanů do vodního prostředí včetně jejich intenzivního odbourávání pomocí biologických filtrů;

Listopad: pokles teploty vody, pokles potravního chování ryb, snížený růst ryb a produkce amoniaku – tzv. přechod na klidové období chovu, zvýšený výskyt flavobakteriálních infekcí;

Prosinec: pokles teploty vody, pokles potravního chování ryb, nízký růst ryb a produkce amoniaku, chov probíhá v klidovém období chovu bez dostatečné funkce biologických filtrů.

Použitý způsob vyhodnocení míry přežití odchovávaných ryb vzhledem k vybraným specifickým obdobím byl podložený zkušenostmi obsluhy z předchozích let, popřípadě ze zkušeností spojených s provozem jiných venkovních dánských RAS.

Absolutní a kumulativní míra přežití odchovávaných ryb byla kalkulována podle následujících vzorců:

Absolutní míra přežití ryb AP (v %) = $(PPR / PNR) \times 100$ - kde PPR je počet přeživších ryb (ks) a PNR je počet nasazených ryb (ks).

Kumulativní míra přežití ryb KP (v %) = $(AP_1 / 100) * (AP_2 / 100) * (AP_3 / 100) * \dots * (AP_x / 100)$ – kde AP_1 až x je absolutní míra přežití ryb po 1. až x-tém období chovu.

Vedle míry přežití byla v daném systému sledována také **celková roční produkce (přírůstek)** chovaných ryb pstruha duhového všech velikostních kategorií v jednotlivých letech (2017, 2018 a 2019). Tento ukazatel je však z 85 až 90 % tvořen roční produkcí tržních kategorií ryb o kusové hmotnosti 200 - 500 g. Tyto informace o celkové produkci pstruha duhového v období 2017-2019 byly také doplněny o informaci o celkové produkci ze stejného systému v rámci posledního roku řešení tohoto pilotního projektu (2020).



4.2 Výsledky

4.2.1 Vliv nového managementu chovu na míru kumulativního a absolutního přežití ryb

Detailní průběh kvality vody v RAS 1 v průběhu roku za období 2017-2019 je patrný z Grafů 1-5. Současně Tab. 1 sumarizuje průměrné hodnoty jednotlivých parametrů vody v daném období včetně směrodatných odchylek a minimálních a maximálních hodnot.

Z Grafu 1 a Tab. 1 je patrné, že průběh teploty vody v daném systému za sledované období 2017-2019 byl víceméně v rámci jednotlivých let podobný s průměrnou teplotou vody $10,4-10,6 \pm 5,4-6,0$ °C s minimální hodnotou $0,3-1,8$ °C v průběhu ledna či února a maximální hodnotou $19,4-21,7$ °C v průběhu června až srpna. Současně je nutné konstatovat, že oba druhy extrémních hodnot teploty vody přinášejí místnímu chovu pstruha duhového technologické a chovatelské problémy (nízká teplota vody způsobuje nízký příjem krmiva a růst ryb, případně zdravotní problémy způsobené flavobakteriálními infekcemi, a naopak vysoká teplota vody způsobuje vyšší nároky na kyslík, snížený příjem krmiva, degradaci růstu, vyšší organické zatížení vody a výskyt bakteriálních, ekto- a endoparazitárních infekcí). Kapacita a potenciál chovu v takovýchto teplotních podmínkách nejsou plně využity, jelikož ryby nejsou v optimálních teplotních podmínkách prostředí, kterou je teplota vody $12-18$ °C. Optimální teplotní podmínky v tomto chovu se vyskytují jen v období od začátku/poloviny dubna do začátku června (cca 45-60 dní) a od konce srpna do konce října (cca 60 dní). Tzn. pouze 120 dní v roce (32,9 % z celého roku) jsou pstruzi duhový v tomto systému chovu chováni v optimálních teplotních podmínkách. Obecně je tato skutečnost v ČR u venkovních RAS dánského systému známa a jako vylepšením tohoto stavu se využívá zastřešení tohoto způsobu chovu nebo postavení haly nad daným systémem (např. Pstruhařství Mlýny u Žáru). Ovšem tato investiční akce je velmi nákladná a mnohdy z důvodu nedostatku financí či budoucí nízké rentabilitě i velmi obtížně realizovatelná. Je jasné, že z důvodu poměrně dlouhého období chovu pstruha duhového v neoptimálních teplotních podmínkách daného chovu musí být ostatní parametry kvality vody (obsah rozpuštěného kyslíku, pH vody a obsah produktů dusíkatého metabolismu) co nejvíce optimalizovány, s cílem rybám nabídnout dobré životní podmínky pro vysokou míru růstu a přežití včetně dobré konverze živiny (viz další části této aktivity).

Z Tab. 1 a Grafu 2 je patrné, že v roce 2019 došlo k trvalému zvýšení koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě na úroveň $100,5 \pm 3,2$ % s minimální (92,6 %) a maximální (112,2 %) hodnotou oproti roku 2017 ($84,3 \pm 6,9$ % s minimem 67,2 % a maximem 96,0 %) a roku 2018 ($92,7 \pm 4,7$ % s minimem 76,3 % a maximem 102,4 %). Toto zvýšení koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě v roce 2019 oproti dvěma předcházejícím rokům bezesporu zvýšilo kvalitu prostředí pro chov pstruha duhového a přispělo k vytvoření vhodnějších podmínek pro zvýšenou produkci, lepší konverzi živin a sníženou mortalitu odchovávaných ryb. Ve snížené mortalitě odchovávaných ryb se tyto zlepšené podmínky prostředí především projeví v období od konce června do konce roku. V tomto období roku kumulativně v roce 2019 uhynulo jen 14 % chovaných ryb oproti roku 2017 a 2018. V průběhu roku 2017 a 2018 v rámci daného období uhynulo 30,0 % respektive 23,7 % odchovávaných ryb (Graf 6). V roce 2019 za období odchovu v červenec-srpen, září-říjen, listopad a prosinec odchovávané ryby dosáhly absolutního přežití na úrovni 85,8 %; 97,5 %; 91,6 % a 96,9 % oproti roku 2017 (62,2 %; 72,3 %; 99,1 %; 98,6 %) a roku 2018 (80,4 %; 95,4 %; 100 % a 97,3 %). Míra absolutního a kumulativního přežití odchovávaných ryb byla v roce 2019 významně vyšší v období červenec-srpen a září-říjen oproti roku 2017 a 2018, kdy toto období nejvyššího růstu a produkce ryb je jedno nejdůležitější v průběhu roku v rámci daného systému.



Tab. 1. Průměrné hodnoty parametrů kvality vody v RAS 1 v průběhu let 2017-2019.

	2017	2018	2019
Teplota vody (°C)			
Průměr ± SD	10,6 ± 5,42	10,4 ± 6,05	10,6 ± 6,07
Minimum	1,8	0,3	0,5
Maximum	19,4	20,2	21,7
O₂ (%)			
Průměr ± SD	84,3 ± 6,94	92,7 ± 4,73	100,5 ± 3,21
Minimum	67,2	76,3	92,6
Maximum	96,0	102,4	112,2
pH			
Průměr ± SD	měřeno sporadicky	6,6 ± 0,81	6,7 ± 0,31
Minimum	měřeno sporadicky	4,3	6,0
Maximum	měřeno sporadicky	7,7	7,6
Amoniak (mg.l⁻¹)			
Průměr ± SD	neměřeno	0,4 ± 0,20	0,04 ± 0,08
Minimum	neměřeno	0	0
Maximum	neměřeno	0,5	0,5
Dusitany (mg.l⁻¹)			
Průměr ± SD	0,3 ± 0,31	0,8 ± 0,21	0,05 ± 0,03
Minimum	0	0	0
Maximum	0,5	2,0	0,5

Z Grafu 3 je patrné, že pH bylo v roce 2017 v rámci RAS 1 měřeno jen sporadicky. Hodnoty pH významným způsobem ovlivňují činnost nitrifikačních bakterií, kdy jejich činnost se zpomaluje u pH pod 6,5 a optimálně probíhá při pH na úrovni 7,8–8,2. Obecně při průběhu nitrifikace dochází k neustálému snižování pH, jelikož se uvolňují H⁺ ionty narušující uhličitánovou rovnováhu vodního prostředí. Z tohoto důvodu musí být v rámci RAS hodnota pH alespoň jednou denně kontrolována a pravidelně uměle upravována do optimálních hodnot podle potřeby, tzn. zvyšována pomocí aplikace dolomitského vápence, vápence hořečnatého nebo jedné sody nebo snižována pomocí aplikace jedlého (potravinářského) octa. V RAS se většinou udržuje pH na optimální úrovni 6,8–7,2, což je hodnota, která vyhovuje jak chovaným rybám, tak i nitrifikačním bakteriím v biofiltrech. Tato kompromisní optimální hodnota pH nevyžaduje vysoké nároky na spotřebu alkalických činidel a současně není příčinou výrazného zvyšování toxicity volného amoniaku pro odchovávané ryby, která občas při neodborném provozu RAS hrozí. Jak je zřejmé z Tab. 1 a Grafu 3 v roce 2019 bylo udržováno nepatrně a významně vyrovnanější vyšší pH s průměrnou hodnotou 6,7 ± 0,3 s minimální (6,0) a maximální hodnotou (7,6) oproti více rozkolísanému pH v roce 2018 (s průměrem 6,6 ± 0,8 s minimem 4,3 a maximem 7,7). Dobře, pravidelně upravované a udržované pH v průběhu



roku 2019 v RAS 1 bezesporu pozitivně ovlivnilo činnost nitrifikačních bakterií v biologických filtrech a tím i koncentraci celkového amoniaku a dusitanů ve vodním prostředí.

Jak je zřejmé z Grafu 4 a 5 koncentrace celkového amoniaku a dusitanů nebyly v RAS 1 v roce 2017 vůbec měřeny. V roce 2018 tyto parametry kvality vody již měřeny byly a průměrná koncentrace celkového amoniaku dosahovala hodnoty $0,4 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ a koncentrace dusitanů $0,8 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ (Tab. 1). V některých obdobích (konec května, začátek a konec června a konec srpna) dosahovaly koncentrace dusitanů vyšších hodnot $1-2 \text{ mg.l}^{-1}$ (Graf 4 a 5). Tyto vyšší koncentrace dusitanů byly pravděpodobně způsobeny zhoršenou činností biofiltrů (viz vysvětlení v části týkající se pH) a mohly negativně ovlivňovat příjem krmiva, růst a fyziologický stav chovaných ryb. Zvýšená koncentrace dusitanů ve vodě v kombinaci s ektoparazitární infekcí (kožovec či čepelenka rybí) v období květen-červen 2018 a v kombinaci s infekcí PKD v období červenec-srpen 2018 mohly být hlavní příčinou snížené míry absolutního přežití ryb (89,1 a 80,4 %, které byly fakticky nejnižší mírou přežití ryb v daném roce; Graf 7). Koncentrace celkového amoniaku a dusitanů v roce 2019 byly vyrovnané a držely se na nižších hodnotách. V žádném období nedošlo k jejich zvýšení na hodnotu, která by mohly být nebezpečná pro zdravotní kondici a přežití odchovávaných ryb. I tato zjištění potvrzují, že RAS 1 byl v průběhu roku 2019 velmi dobře obsluhován a udržován.

Udržování vhodných parametrů kvality vody ve vodním prostředí v RAS 1 v roce 2019 bezesporu pozitivně ovlivnilo relativně dobré finální kumulativní přežití chovaných ryb na konci tohoto roku (54,0 %). Toto přežití ryb bylo podobné jako finální kumulativní přežití odchovávaných ryb v roce 2018 (58,8 %), avšak o 16,1 % vyšší, než bylo finální kumulativní přežití ryb v roce 2017 (Graf 6). Při tomto srovnání byl průběh odchovu pstruha duhového v roce 2018 v RAS 1 nejméně problémový. V tomto roce při odchovu pstruha duhového došlo k relativně nízkým absolutním úhynům chovaných ryb v kritických obdobích květen-červen (10,9 % při přežití 89,1 %) a červenec-srpen (19,6 % při přežití 80,4 %) zatížených každoročně infekcí bakterií (furunkulóza), ektoparazitů (kožovec či čepelenka) a PKD. Obě tato období v roce 2019 vykazovala vyšší mortalitu (31 % a 14,2 %) a nižší absolutní přežití odchovávaných ryb (69 % a 85,8 %). Hlavním důvodem těchto výsledků byla skutečnost, že až 45 % celé obsádky ryb v RAS 1 byla v roce 2019 tvořena malou velikostní kategorií ryb o kusové hmotnosti 8-10 gramů oproti oběma porovnávaným rokům 2017 a 2018, při kterých malé ryby tvořily jen 15% obsádky. V roce 2019 došlo k vyšším úhynům malých ryb v porovnání s rokem 2017 a 2018, které právě v průběhu května a června vedly k absolutnímu přežití jen na úrovni 69 %. V tomto období byly pstruzi duhová nízké váhové kategorie zasaženy silnou infekcí furunkulózy. Oproti výše zmíněným obdobím v roce 2019 vykazovala ostatní období poměrně vysokou míru absolutního přežití odchovávaných ryb na úrovni 91,6-100 % v porovnání s přežitím ryb v daných obdobích v roce 2017 (72,3-100 %) a v roce 2018 (97,5-100 %; Graf 7). Tato skutečnost v roce 2019 byla pravděpodobně dosažena kombinací dobré kvality vody, použitého krmiva s vyšším obsahem vitamínů a také díky pravidelné kontrole zdravotního stavu ryb a pravidelnou aplikací preventivní protibakteriální koupeli v Chrolaminu T (v roce 2019 aplikována celkem 18krát) a aktuální včasné aplikaci antiparazitární koupele ve formaldehydu, která byla v roce 2019 aplikována celkem 4 krát v průběhu roku. Tento názor je podpořen také skutečností, že v roce 2020 při podobném managementu chovu pstruha duhového v RAS 1 bylo dosaženo stejných a srovnatelných výsledků, které dosáhly dokonce o 11 % vyššího finálního kumulativního přežití odchovávaných ryb s absolutním přežitím v jednotlivých obdobích od 78 % do 100 % přežití ryb.



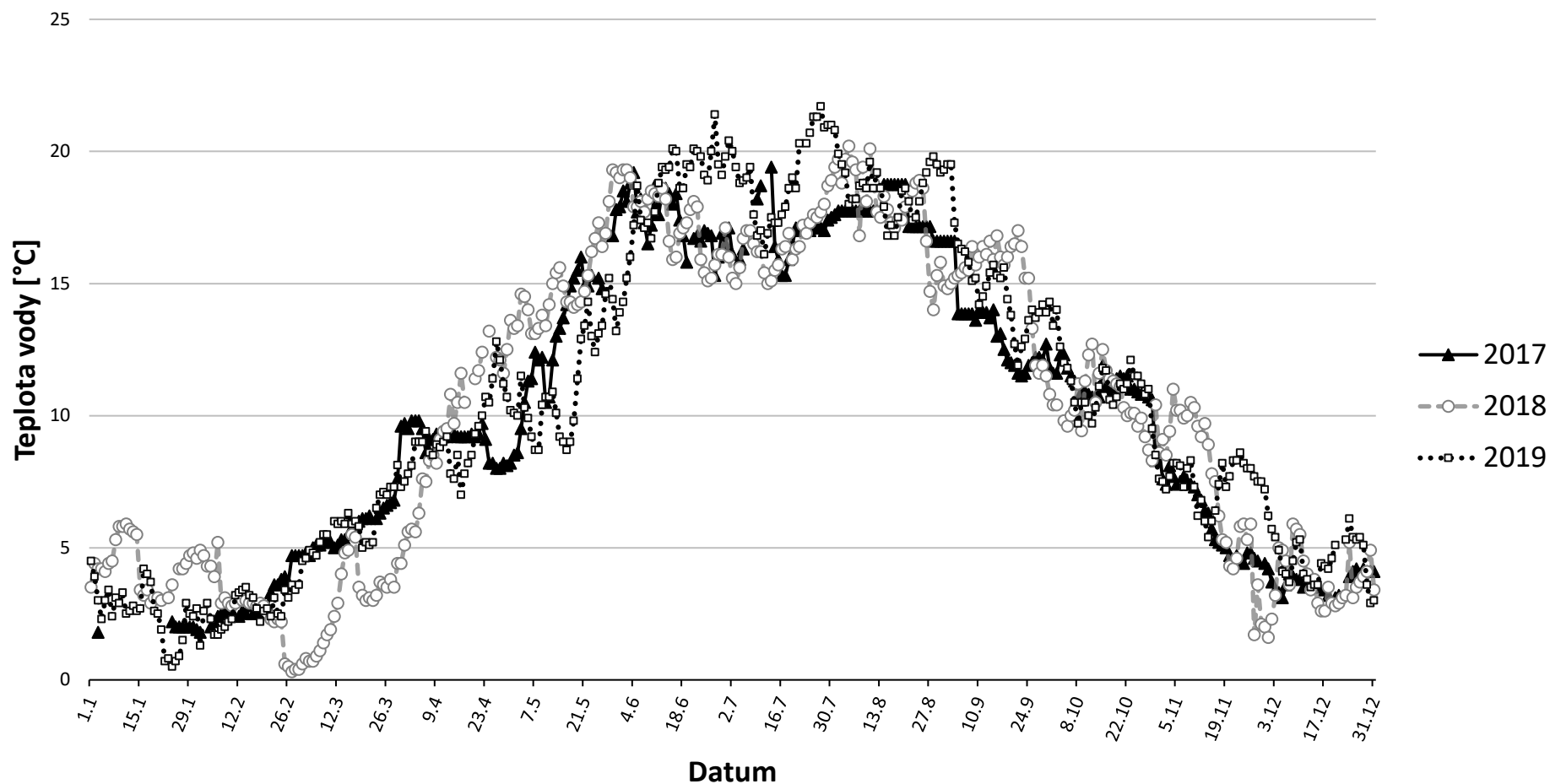
EVROPSKÁ UNIE
Evropský námořní a rybářský fond
Operační program Rybářství



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

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

Průběh teploty vody v průběhu roku



Graf 1. Průběh a porovnání teploty vody v RAS 1 v rámci podniku BioFish s.r.o. v průběhu let 2017-2019.



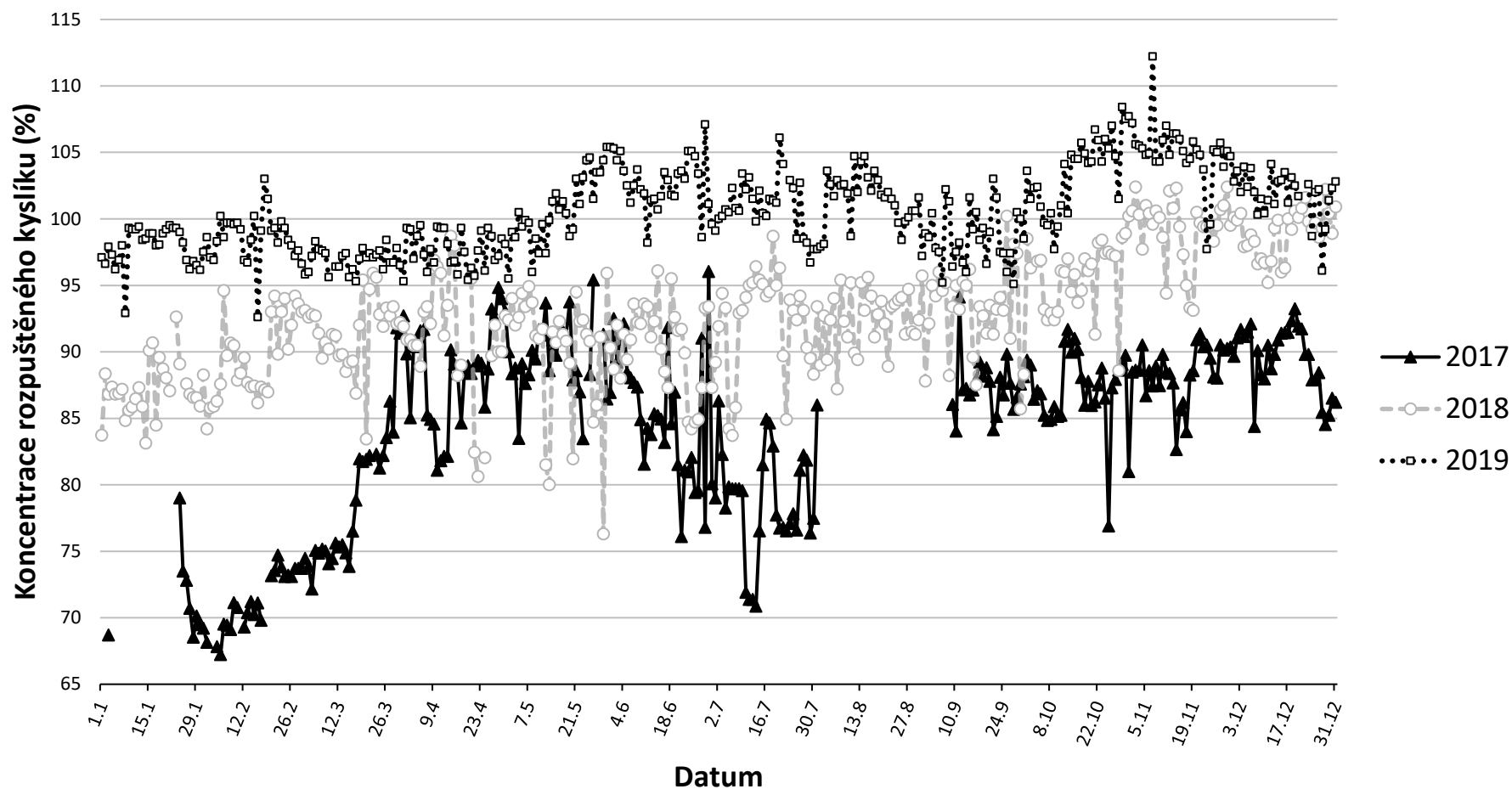
EVROPSKÁ UNIE
Evropský námořní a rybářský fond
Operační program Rybářství



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

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

Průběh koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě v průběhu roku



Graf 2. Průběh a porovnání koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě v RAS 1 v rámci podniku BioFish s.r.o. v průběhu let 2017-2019.



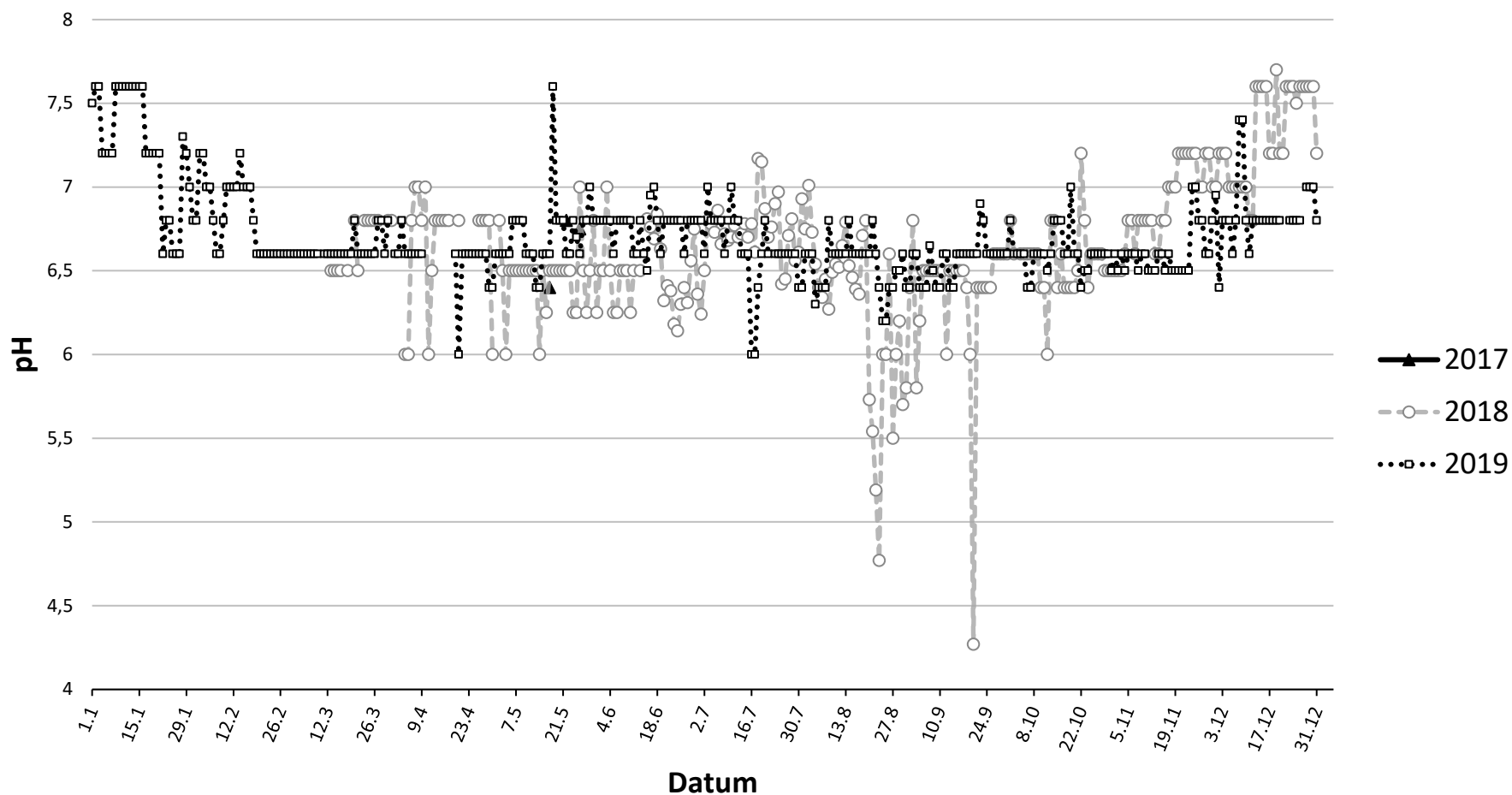
EVROPSKÁ UNIE
Evropský námořní a rybářský fond
Operační program Rybářství



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

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

Průběh pH vody v průběhu roku



Graf 3. Průběh a porovnání pH vody v RAS 1 podniku v rámci BioFish s.r.o. v průběhu let 2017-2019.



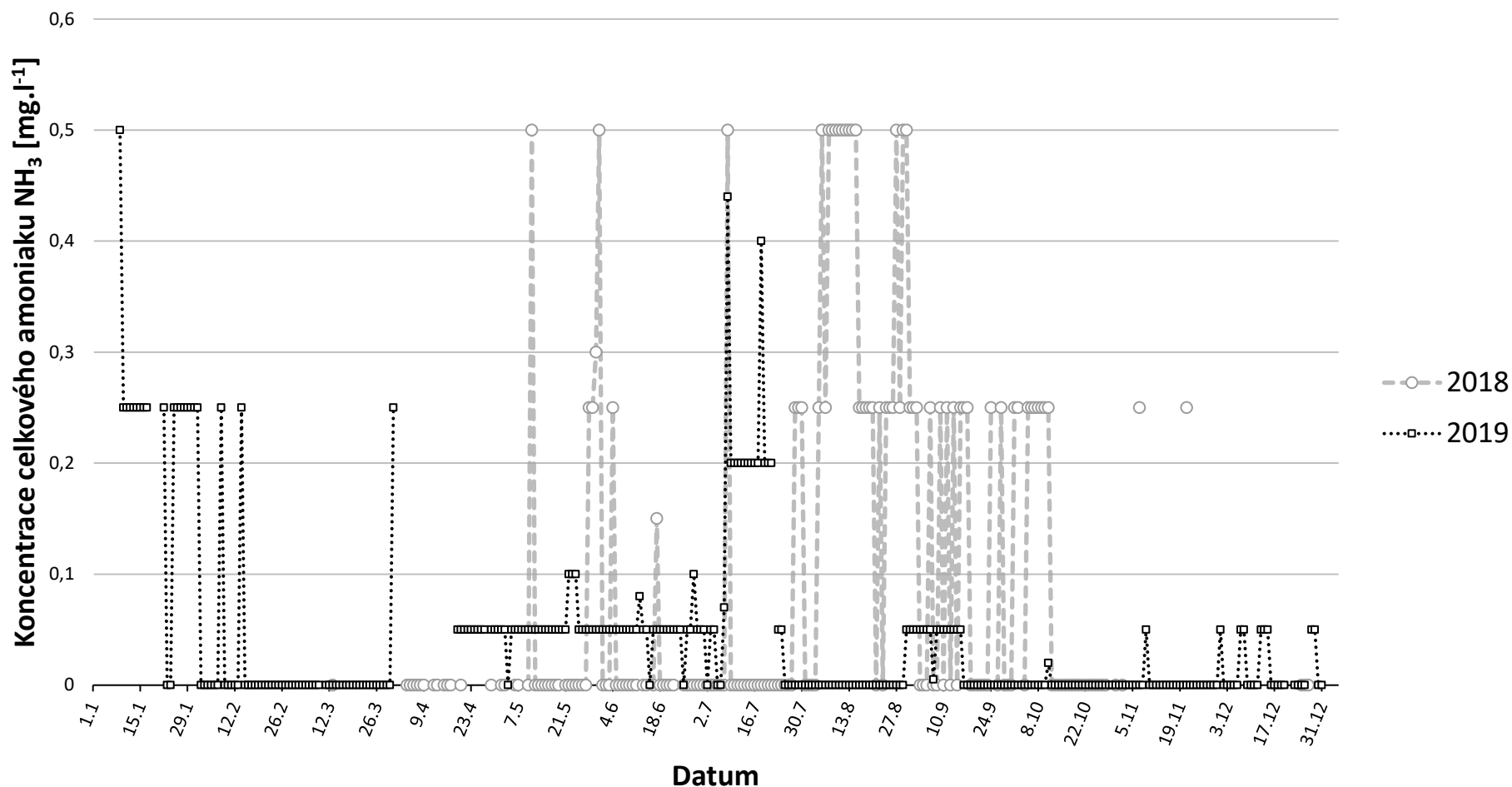
EVROPSKÁ UNIE
Evropský námořní a rybářský fond
Operační program Rybářství



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

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

Průběh hodnot koncentrace celkového amoniaku ve vodě v průběhu roku



Graf 4. Průběh a porovnání koncentrace celkového amoniaku ve vodě v RAS 1 v rámci podniku BioFish s.r.o. v průběhu let 2018 a 2019.



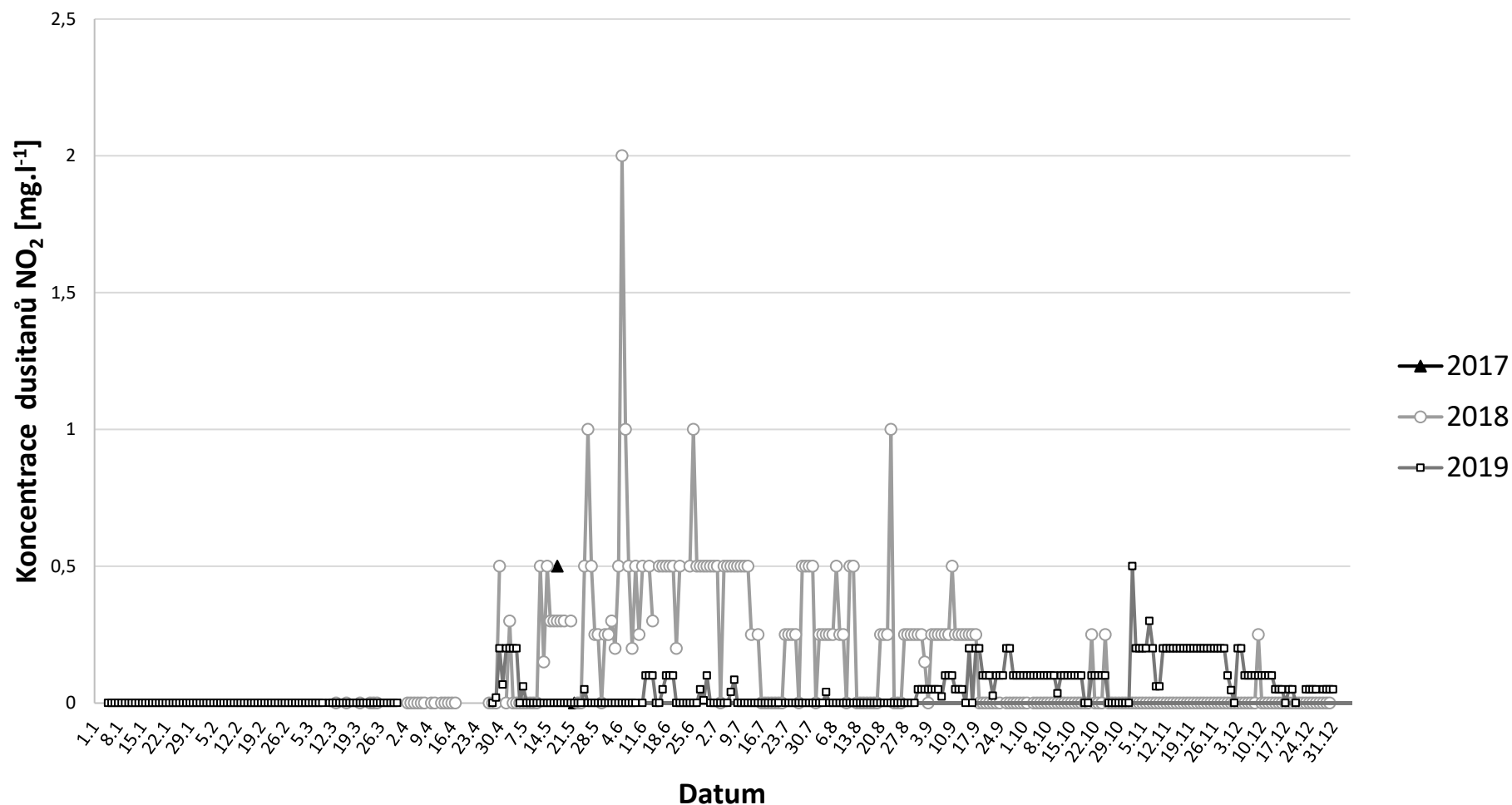
EVROPSKÁ UNIE
Evropský námořní a rybářský fond
Operační program Rybářství



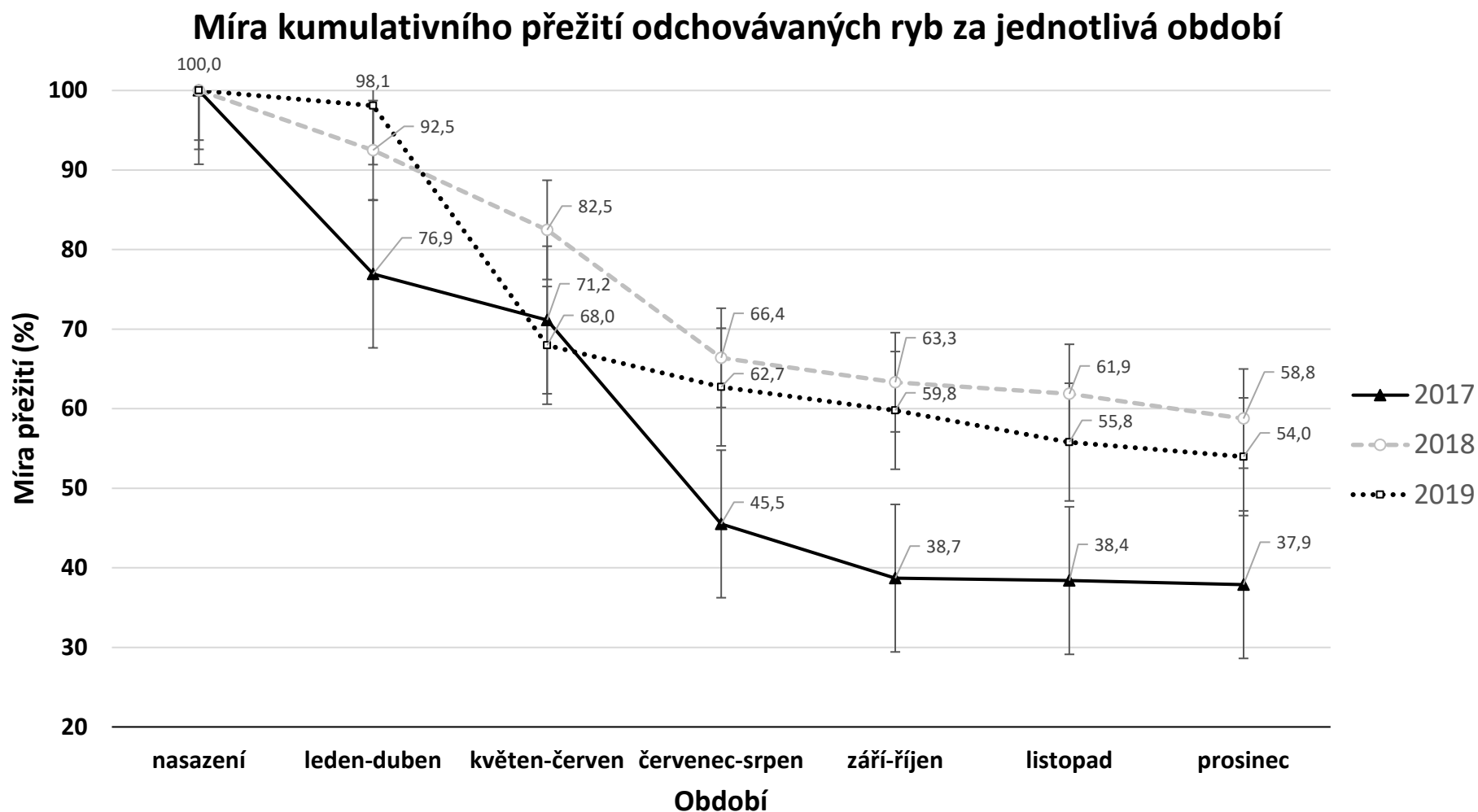
Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

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

Průběh koncentrace dusitanů (NO_2) ve vodě v průběhu roku



Graf 5. Průběh a porovnání koncentrace dusitanů v RAS 1 v rámci podniku BioFish s.r.o. v průběhu let 2017-2019.



Graf 6. Míra kumulativního přežití odchovávaných ryb pstruha duhového na konci jednotlivých období v RAS 1 v rámci podniku BioFish s.r.o. v průběhu let 2017-2019.



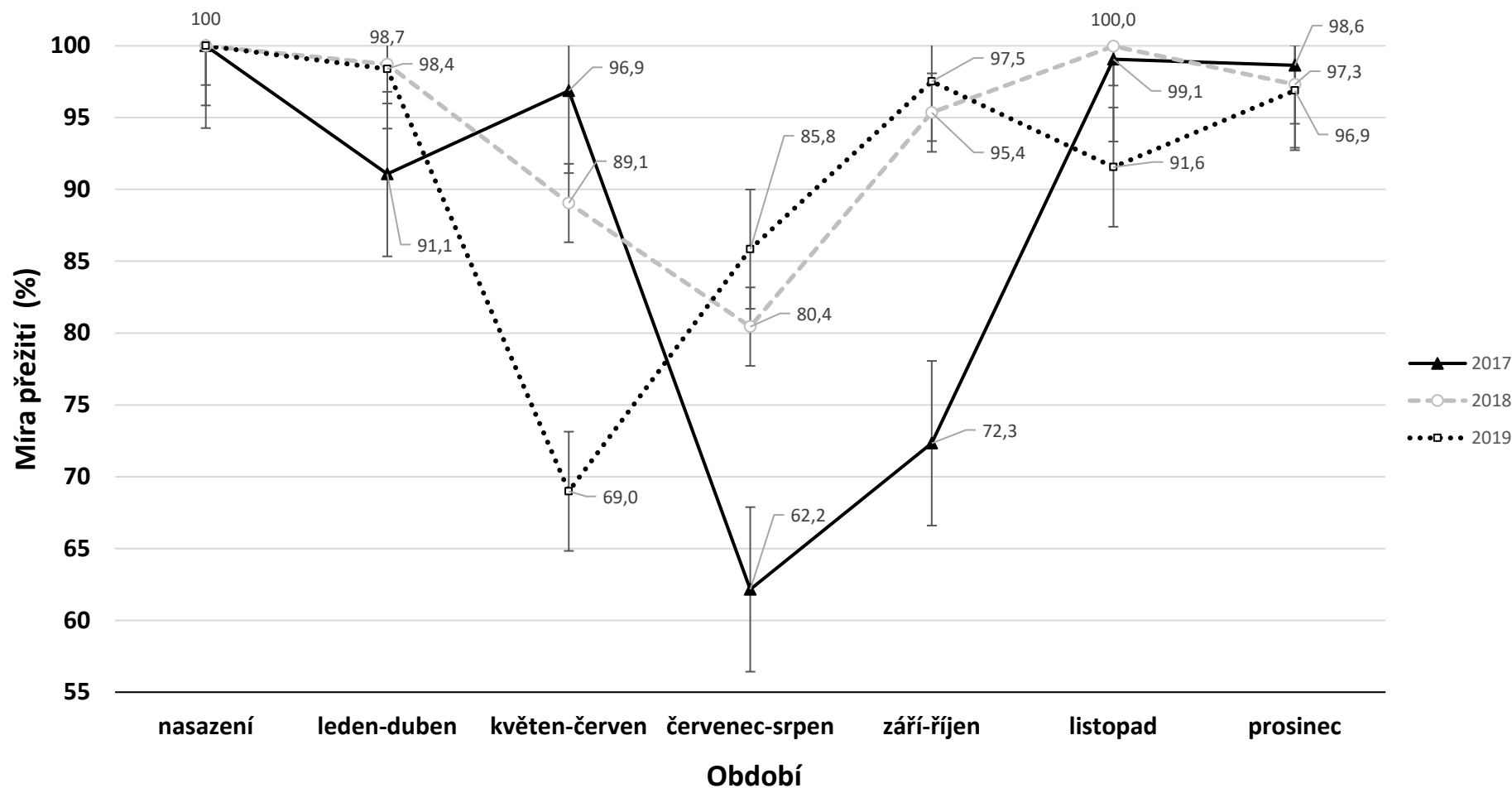
EVROPSKÁ UNIE
Evropský námořní a rybářský fond
Operační program Rybářství



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

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

Míra absolutního přežití odchovávaných ryb za jednotlivá období odchovu

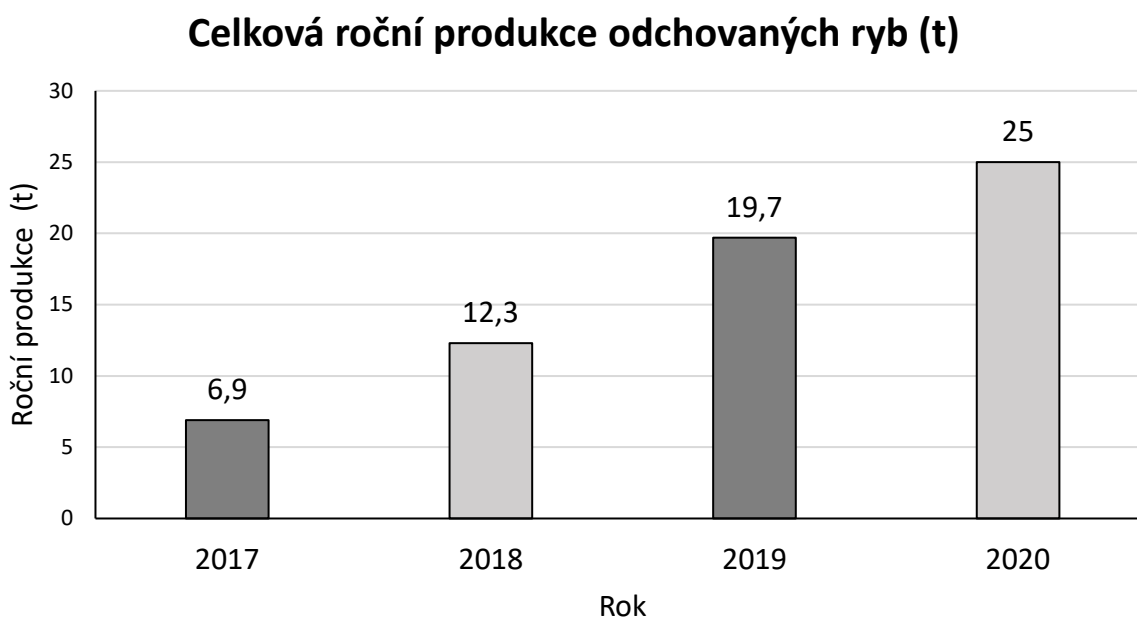


Graf 7. Míra absolutního přežití odchovávaných ryb pstruha duhového za jednotlivá období odchovu v RAS 1 v rámci podniku BioFish s.r.o. v průběhu let 2017-2019.



4.2.2 Vliv nového managementu chovu na absolutní roční produkci ryb

Z Grafu 8 je patrný stoupající trend dosažené celkové roční produkce odchovaných ryb pstruha duhového v RAS 1. Zvyšující se produkce ryb s vysokou pravděpodobností byla dosažena díky novému managementu chovu pstruha duhového, který byl založen na udržení optimální kvality vody ve vodním prostředí RAS, výživě ryb krmivy s vyšším obsahem vitamínu C, A a E, pravidelné kontroly a udržování dobrého zdravotního ryb. Celková roční produkce ryb v RAS 1 v roce 2019 dosáhla 19,7 tun a v roce 2020 až 25 tun, což je nárůst produkce ryb oproti roku 2018 o 1,6 krát a 2krát a oproti roku 2017 dokonce o 2,9krát a 3,6krát (Graf 8).



Graf 8. Trend celkové roční produkce chovaných ryb pstruha duhového v RAS 1 v průběhu období 2017-2020.

4.3 Závěr

Závěrem lze konstatovat, že dosažený stoupající trend celkové roční produkce ryb pstruha duhového v RAS 1 podniku BioFish, s.r.o. v letech 2017 až 2020 je výsledkem systematické práce rybářské obsluhy daného produkčního systému, která pečlivě od roku 2019 začala: 1) udržovat dobré a stabilní parametry kvality vody (především obsah rozpuštěného kyslíku, pH, koncentrace celkového amoniaku a dusitanů), 2) využívat management krmení ryb založený na zvýšeném obsahu vitamínů C, A a E v používaných krmivech a 3) pravidelně kontrolovat a udržovat dobrý zdravotní stav chovaných ryb včetně aplikace preventivních či léčebných zásahů proti bakteriální a parazitární infekci chovaných ryb.

Použitá literatura:

Polícar T., Kříšťan, J., Hampl, J., Blecha, M., Kolářová J., 2018a. Provozní manuál sloužící k efektivnímu provozu intenzivní akvakultury využívající RAS. Edice Metodik (Certifikovaná metodika), FROV JU Vodňany, 169: 54 s.



Policar, T., Kolařová, J., Křišťan, J., 2018b. Provozní ověření využití ozonu v intenzivním chovu ryb. Technická zpráva pilotního projektu č. CZ.10.2.101/2.1/0.0/15_001/0000044, FROV JU, 55 s.

5 Návrh nového uzavřeného RAS pro odchov juvenilních ryb do kusové hmotnosti 5–10 gramů

5.1 Materiál a metodika

Jak již bylo částečně zmíněno v předchozí aktivitě projektu, u chovu juvenilních ryb pstruha duhového do kusové hmotnosti 10 gramů, který probíhal v jarním a podzimním období roku 2018 a 2019 ve venkovních RAS, byl chov těchto ryb zatížen poměrně nízkým přežitím ryb kolem 35-45 %. Vysoká mortalita odchovávaných ryb byla způsobena především následkem perakutního, akutního a chronického průběhu bakteriálních infekcí: flavobakteriízy (*Flavobacterium psychrophilum*) v období s nízkou teplotou vody (5-10°C) a furunkulózy (*Aeromonas salmonicida*) v období s teplotou vody 15-17°C. Výskyt těchto bakterií souvisel především s rozkolísanou kvalitou vody v odchovných systémech z hlediska (pH 6,7 ± 0,8), organického zatížení (BSK₅ 8-16 mgO₂·l⁻¹) a použití neoptimálního zdroje přítokové vody do systému, kterou byla povrchová voda z místního rybníku či vodoteče. Furunkulóza u odchovávaných ryb probíhala za přítomnosti typického klinického obrazu a patologických změn (exoftalmus a hemoragie v kůži, především na bázích ploutví). Flavobakteriíza pstruha duhového označovaná jako BCWD (bacterial cold water disease) nebo také RTFS (rainbow trout fry syndrome) probíhala v chovu v podobě akutní i chronické formy. Byl zaznamenán výskyt typických kožních lézí a ztmavnutí těla ryb. Léčba bakterií již v klinickém stádiu byla komplikovaná, zvláště pro chov ryb v RAS, kde je problematická aplikace antibiotik, a tak výsledkem byla pravidelná vysoká mortalita ryb, která způsobovala nestabilní produkci juvenilních ryb pro další odchov a poměrně velké ekonomické ztráty.

Z těchto důvodů v roce 2019 došlo v rámci tohoto projektu k návrhu přesunout celý chov juvenilních ryb do uzavřeného recirkulačního akvakulturního systému, který byl postupně technicky a technologicky optimalizován a na závěr navržen jako podklad pro budoucí investiční projekt. Budova místní líhně (Obr. 3), která není v rámci podniku BioFish, s.r.o. v současné době dlouhodobě efektivně využívána, byla zvolena jako vhodné místo, kde bude navržený RAS pro odchov juvenilních ryb nainstalován při vlastní realizaci této investiční akce v příštích letech. Podle využitelného vnitřního půdorysu budovy byla potom navržena velikost a kapacita zmíněného RAS. Návrh byl následně zkompletován tím, že byly navrženy jednotlivé technologické komponenty navrženého RAS.



Obr. 3. Budova dlouhodobě neefektivně využívané líhně podniku BioFish s.r.o., do které bude v budoucnosti umístěn navržený vnitřní RAS pro odchov juvenilních ryb pstruha duhového.

5.2 Výsledky

5.2.1 Navržená technologie pro chov ryb

Nově navržený RAS pro odchov juvenilních ryb pstruha duhového je schematicky znázorněn na Obr. 4 a 5. Tento systém je navržen tak, aby vyplňoval a efektivně využíval vnitřní prostor tamní líhně o rozměrech 6,3 x 9,3 metrů, s výškou stropu 2,5 metrů.

Nově navržený RAS je koncipován a složen ze dvou na sobě nezávislých systémů z důvodu maximální eliminace provozních rizik zajišťující vyšší stabilitu tamní produkce juvenilních ryb. Každý navržený systém zahrnuje 4 malé nádrže (o průměru 1,4 m, s výškou 1,0 m a s užitným objemem 1400 litrů), 1 velkou nádrž (o průměru 2,3 m, s výškou 1,0 m a s užitným objemem 4000 litrů).

V každém systému je tedy kalkulováno s objemem vody 9600 litrů, které jsou určeny pro chov ryb. Z tohoto objemu pro chov ryb je 5 600 litrů určeno pro chov pstruhů o kusové hmotnosti 0,1-3 gramů (s celkovou kapacitou 25 000 – 30 000 ks) a 4000 litrů určených pro odchov pstruhů o kusové hmotnosti 3-10 gramů (s celkovou finální kapacitou 20 000 ks ryb o kusové hmotnosti 10 gramů, s finální hustotou 5000 ks.m⁻³ či 50 kg.m⁻³). Celková produkce líhně je kalkulována na dvojnásobnou produkci, jelikož jsou plánovány dva systémy. Jedná se tedy o finální kapacitu 40 000 ks juvenilních ryb pstruha duhového o kusové hmotnosti 10 gramů za období odchovu 3 měsíců. Předpokládá se, že v líhni každoročně budou realizovány až 3 odchovné turnusy, mezi kterými bude vždy jednoměsíční dezinfekční a karanténní období. V takovém to případě je kalkulováno s celkovou roční kapacitou 120 000 ks juvenilních ryb o kusové hmotnosti 10 gramů, která je v současné době požadovaná pro efektivní využití dvou běžících RAS v rámci podniku BioFish, s.r.o. Tento objem násadového materiálu potencionálně umožňuje dosáhnout roční produkce až 36-60 tun pstruha duhového o kusové velikosti 300-



500 gramů. To odpovídá finální hustotě 36-60 kg.m⁻³ v rámci stávající kapacity podniku BioFish, s.r.o., která v rámci obou systémů přibližně představuje 1000 m³ určených pro chov ryb.

Předpokládá se, že přežití ryb z kategorie rozkrmeného plůdku do kategorie hmotnosti 3 gramů bude na úrovni 70-80 % a přežití ryb z kategorie 3 gramů do 10 gramů bude na úrovni 90 %. Je tedy kalkulováno s finálním kumulativním přežitím ryb z váčkového plůdku do kategorie 10 gramů na úrovni 63-72 %. Tato kalkulace přináší potřebu třikrát ročně do líhne nasazovat cca 50 000 ks rozkrmeného plůdku pstruha duhového, popřípadě nasazovat do líhnoucích aparátů cca 60 000 ks jiker v očních bodech.

5.2.2 Navržená technologie pro filtraci vody a udržení parametrů její optimální kvality pro chov

Pro dosažení plánovaných chovatelských výsledků, je nutné navržený RAS vybavit veškerým nutným technickým vybavením. Toto vybavení následně umožní v systému udržovat stabilní parametry kvalitního vodního prostředí pro chov juvenilních ryb za předpokladu, že obsluha bude denně dodržovat veškeré potřebné technologicko-chovatelské úkony.

Pro efektivní a úspěšný odchov juvenilních ryb pstruha duhového byly definovány následující parametry vody, které by v navržených systémech měly být dlouhodobě udržovány:

Teplota vody	13-16 °C
Obsah rozpuštěného kyslíku	100 %
pH	6,8-7,2
Koncentrace celkového amoniaku maximálně	0,5-1 mg.l ⁻¹
Koncentrace dusitanů maximálně	0,3-0,5 mg.l ⁻¹
BSK5	1-5 mg.l ⁻¹ (Davidson a kol., 2014).

Pro dobré samočištění nádrží, kyslíkové poměry a dostatečné proudění vody v nádržích je kalkulováno, že u každé nádrže bude dlouhodobě nastaven průtok vody umožňující výměnu celého objemu vody v nádrži 2x za hodinu. V každém systému se předpokládá tedy s celkovým průtokem vody na úrovni 19-20 m³ vody za hodinu.

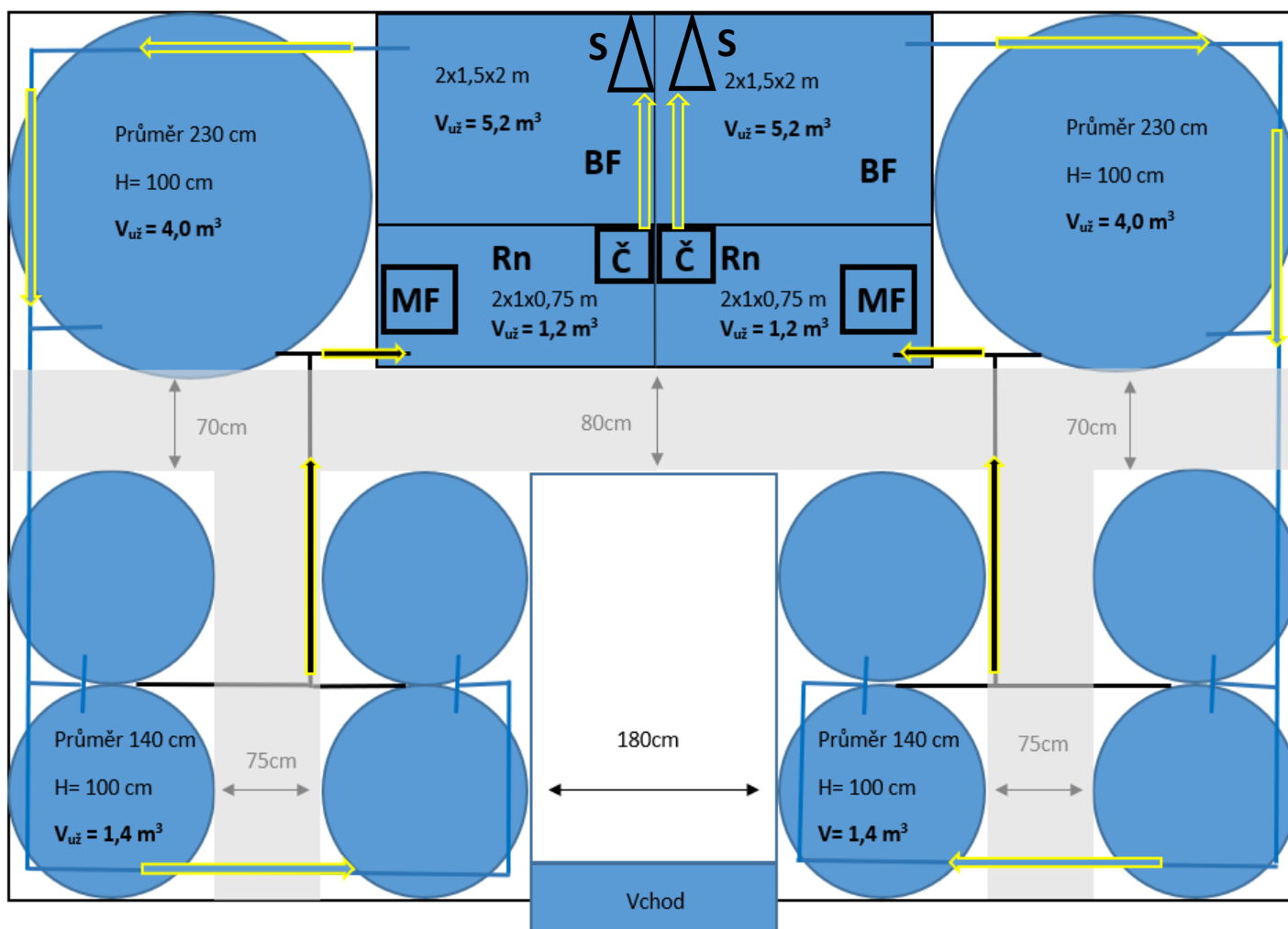
V každém systému je navrženo následující technologické vybavení:

- 1) Bubnový mechanický filtr (MF), který bude filtrovat vodu vytékající přímo z nádrží, kdy mechanické nečistoty nebudou nijak rozrušeny a rozmíchány. Tato skutečnost bude umožňovat docílit efektivní mechanické filtrace. Navrženými variantami mechanických filtrů jsou následující typy, které dosahují plánovaného celkového průtoku vody za hodinu: mechanický bubnový filtr BaseDrum 15/60 od německé firmy Ratz Ltd. nebo mechanický bubnový filtr TM2 od belgické firmy Trome nebo mechanický bubnový filtr AEM A-35 od českého dodavatele Star-fish jezírka s.r.o. nebo mechanický bubnový filtr 1FB od firmy IN-EKO TEAM s.r.o..
- 2) Voda z mechanického filtru bude gravitačně přepadávat do retenční nádrže (Rn) plastovým potrubím, do kterého bude vložena přenosná ponorná UV lampa (např. UV Technics AM 90W od firmy **Star-fish jezírka s.r.o.**).
- 3) Zmíněná retenční plastová nádrž (Rn) o rozměrech 2x1x0,75 m s užitným objemem 1,2 m³, s bezpečnostním přepadem přebytečné vody bude ještě vybavena provzdušňovacím roštem na odplynění přitékající vody z nádrží od ryb, při kterém



dojde k uvolnění části CO₂ z vodního prostředí. Jako zdroje vzduchu, který bude vháněn do zmíněného provzdušňovacího roštu, budou použity místní generátory vzduchu v současnosti používané v podniku BioFish, s.r.o. k pohonu airliftů v rámci RAS 1 a 2.

- 4) V retenční nádrži bude nainstalované ponorné kalové čerpadlo (Č) HCP AL-21N s maximálním průtokem 22,8 m³ · h⁻¹, příkonem 700 W od firmy Neptun, s. r.o., které bude pro jistotu v každém systému zdvojené pro případ náhlé poruchy jednoho čerpadla.
- 5) Zmíněné čerpadlo bude čerpat vodu z retenční jímky přes směšovač kyslíku (S; kónický směšovač C-1 od firmy Aquacultur Fischtechnik GmbH Nienburg, Německo) do biologického filtru. Do směšovače kyslíku bude používán čistý kyslík ze svazku tlakových bomb či výrobku kyslíku.
- 6) Biologický filtr (BF) v každém systému bude tvořen plastovou nádrží o rozměrech 2 m x 1,5 m a výškou 2 m o užitém objemu vody 5200 litrů. Plastová nádrž bude ještě vybavena děrovanou příčkou po celém bočním průřezu nádrže (cca 10–15 cm od stěny nádrže) tak, aby odtékající voda z biofiltru do odchovných nádrží neobsahovala žádné filtrační elementy. Na dně nádrže biologického filtru bude nainstalován provzdušňovací rošt. Do tohoto roštu bude periodicky vháněn vzduch (jednou za 2 hodiny po dobu 15 minut) z místních generátorů vzduchu, které jsou v podniku BioFish, s.r.o. v současnosti využívány k pohonu airliftů v rámci RAS 1 a 2. Zmíněné provzdušnění v rámci biologického filtru bude sloužit k rozpočívání vložených filtračních elementů RK BioElements Medium od firmy DANIA PLAST z Dánska. Celkem bude do jednoho biologického filtru vloženo 3500 litrů zmíněných filtračních elementů, což přibližně odpovídá plánované nejvyšší denní krmné dávce 10 kg krmiva, která bude využívána v jednom systému.
- 7) Následně voda z biologického filtru poteče samospádem do odchovných nádrží, které budou vybaveny regulačními ventily průtoku vody.
- 8) Každý systém bude mít možnost zvyšovat teplotu vody ohřevem pomocí elektrického kotle např. Protherm Ray 28 K od firmy Vaillant Group Czech s.r.o. a tepelného výměníku. S chlazením systémů se prozatím nepočítá.
- 9) Každý systém bude vybaven tlakovým ponorným čidlem, které bude umístěno v biologickém filtru. Toto čidlo bude kontrolovat dostatek vody v systému. Dále běžící čerpadlo bude kontrolováno čidlem elektrického napětí v čerpadle. Čidla budou napojena na současný alarmový systém podniku BioFish, s.r.o.



Obr. 4. Celkové schématické znázornění navrženého nového vnitřního RAS pro odchov juvenilních ryb pstruha duhového do kusové hmotnosti 10 gramů, který bude provozován v uzavřené líhni produkčního podniku BioFish, s.r.o. BF = biologický filtr; MF = mechanický filtr; Rn = retenční nádrž; Č = čerpadlo; S= směšovač vody s kyslíkem.

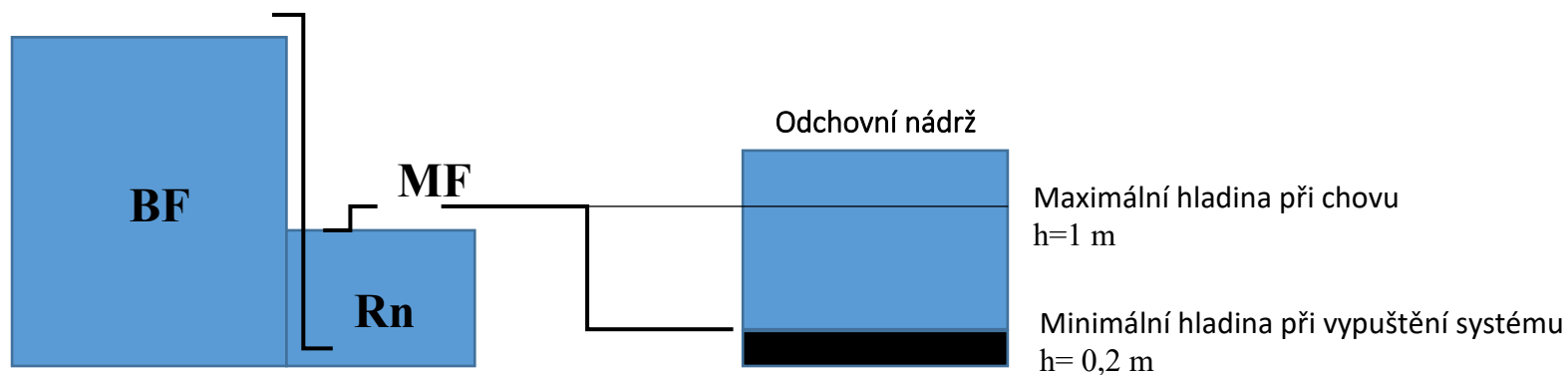


EVROPSKÁ UNIE
Evropský námořní a rybářský fond
Operační program Rybářství



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

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



Obr. 5. Schématické znázornění navrženého nového RAS z bočního pohledu. BF = biologický filtr; MF = mechanický filtr; Rn = retenční nádrž



5.3 Závěr

V průběhu řešení projektu došlo k zpracování návrhu uzavřeného RAS, který bude v krátké budoucnosti firmou BioFish, s.r.o. pořízen a instalován do tamní nevyužité budovy líhně. V současné době se připravený návrh RAS a celá investiční akce uplatňuje v rámci podané žádosti OP Rybářství v opatření 2.4. „Recirkulační zařízení a průtočné systémy s dočišťováním“. Cílem této činnosti je získat finanční podporu pro tuto investiční akci, která podniku BioFish, s.r.o. pomůže zefektivnit odchov juvenilních ryb pstruha duhového s přežitím 63-72 % z váčkového plůdku do kategorie juvenilních ryb o kusové hmotnosti 10 gramů. Tím dojde k navýšení přežití odchovávaných ryb až o 18–27 % a především dojde k zajištění plnohodnotné vlastní produkce násadových ryb pro následnou tržní produkci pstruha duhového v tohoto podniku. Tím se podnik stane nezávislým subjektem v chovu pstruha duhového na ostatních dodavatelích, což může podniku pomoci eliminovat přenos nebezpečných onemocnění ryb z jiných chovů, získávat kvalitní násadové ryby, dosahovat vyrovnané a vyšší produkce násadových a tržních ryb v čase a dosahovat vyšší rentability chovu.

Použitá literatura:

Davidson, J.W., Kenney, P.B., Manor, M., Good, C.M., Weber, G.M., Aussanasuwannakul, A., Turk, P.J., Welsh, C., Summerfelt, S.T., 2014. Growth performance, fillet quality, and reproductive maturity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured to 5 kilograms within freshwater recirculating systems. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 5: 238.

6 Optimalizace intenzivního chovu pstruha duhového při využití umělého krmiva s vyšším obsahem vitamínu C, A a E

Cílem této aktivity č. 3 bylo pomocí komerčně vyráběného krmiva obohaceného o vitamíny C, A a E podpořit dobrý fyziologický a kondiční stav, posílit imunitní systém, zvýšit růst, přežití a konverzi přijímaných živin u odchovávaných ryb v rámci intenzivního chovu pstruha duhového v uzavřeném vnitřním RAS. Snahou této aktivity bylo podpořit celou efektivitu a ekonomickou rentabilitu chovu pstruha duhového včetně welfare odchovávaných ryb.

6.1 Materiál a metodika

Realizace této aktivity probíhala od 1.12.2019 do 30.4.2020 jak v experimentálních rybochovných zařízeních FROV JU, tak i v poloprovozním chovu podniku BioFish, s.r.o. Zálohování experimentu na obou místech umožnilo eliminovat rizika spojená s intenzivním chovem pstruha duhového v RAS a dosáhnout slíbených a plánovaných výsledků.



6.1.1 Příprava odchovných systémů, experimentálních skupin a nasazení ryb pstruha duhového

K řešení této aktivity byly na každém místě realizace experimentu použity dva nezávislé RAS, které zahrnovaly 6 odchovných nádrží z polypropylenu o tvaru válce, s vnitřní užitnou výškou 0,62 m, průměrem 0,885 m a užitném objemu 380 litrů. Systém byl dále vybaven mechanickým bubnovým filtrem, biologickým filtrem, UV zářičem, Venturiho trubicí pro oxygenaci vody a řízeným ohřevem systému s termostatem a řízený světelným režimem s časovým spínačem. Detailní použité vybavení daných RAS je na příklad popsáno Policarem a kol. (2016a).

Experimentální ryby pstruha duhového pocházely ze dvou různých geografických linií (dánské: TL=148,9±15,6 mm, SL=132,5±14,6 mm a W=39,8±12,3 g a italské: TL=148,2±19,9 mm, SL=132,9±19,1 a W= 41,5±15,9 g), které byly nasazovány v podobných kusových velikostech, ve stejných počtech (55 ks na nádrž) a v celkové počáteční biomase (5,8-6,0 kg.m⁻³) do každé nádrže. Celkem bylo nasazeno 6 nádrží s dánskou linií a 6 nádrží s italskou linií pstruha, kdy vždy 3 nádrže u obou linií v rámci jednoho RAS byly krmeny komerčně vyráběným krmivem obohaceným přídavkem vitamínů C, A a E. Další 3 nádrže s oběma liniemi pstruha duhového v rámci druhého systému byly krmeny stejným komerčně vyráběným krmivem bez dalšího obohacení vitamíny. Při nasazení všech nádrží vznikly následující experimentální skupiny:

It+: pstruh duhový italská linie s přídavkem vitamínů

It-: pstruh duhový italská linie bez přídavku vitamínů

D+: pstruh duhový dánská linie s přídavkem vitamínů

D-: pstruh duhový dánská linie bez přídavku vitamínů.

Ve všech použitých systémech byla udržována podobně stabilní a dobrá kvalita vodního prostředí v průběhu celé aktivity zahrnující následující parametry: teplota vody 16,7±0,5 °C, koncentrace rozpuštěného kyslíku 103,2±10,5 %, obsah celkového amoniaku 0,54±0,3 mg.l⁻¹, obsah dusitanů 0,3±0,1 mg.l⁻¹, pH 6,9±0,3 a salinita vody 1-2 ppt s řízeným světelným režimem 12 hodin světla denně na úrovni 150 luxů dopadající na hladinu vody v časovém období od 6:30 do 18:30.

6.1.2 Management krmení a obohacení krmiv o vitamíny

Po nasazení ryb do nádrží byly ryby krmeny komerčně vyráběným plovoucím krmivem Europa 15 (obsah bílkovin 55 % a tuků 16 % o velikosti pelet 2 mm v denní krmné dávce 3 % z biomasy (na začátku experimentu) a 3 mm v denní krmné dávce 2 % z biomasy (od poloviny do konce experimentu) od firmy Skretting dodané firmou Trouw Nutrition Biofaktory s.r.o., Česká republika. Skupiny experimentálních ryb bez vitamínových přídavků byly krmeny tímto krmivem. Skupinám ryb s přídavkem vitamínů C, A a E bylo krmivo obohaceno podobným způsobem jako v kapitole 4.1 této zprávy, jen v jiném dávkování. Přípravek Vitamín C PG 100 % plv. byl aplikován v dávce 25 g.kg⁻¹ a Kombisol Multi sol. v dávce 25ml.kg⁻¹. Detailní obsah vitamínů v krmivu bez a s přídavkem vitamínových preparátů sumarizuje Tab. 2. Analýzy obsahu vitamínů v krmivech byly provedeny a dodány firmou Ekocentrum Ovalab, s.r.o. Ostrava. Ryby byly krmeny v pravidelných intervalech v průběhu celé světlé části dne od 7:00 do 18:00 hodin vždy 30 minut po začátku rozsvícení odchovny a 30 minut před zhasnutím odchovny. Veškeré předkládané krmivo rybám bylo navažováno a evidováno za účelem výpočtu krmného koeficientu (FCR = **Feed Conversion Ratio**, tzv. **koeficient konverze krmiva**), který byl vypočítán na každého období či konci celého experimentu podle vzorce:



Koeficient konverze krmiva (FCR v $g \cdot g^{-1}$) = $DKD / (KB - PB)$ - kde DKD je denní krmná dávka za celé období odchovu (g), tzn. celkové množství předloženého krmiva, KB je konečná celková biomasa ryb v nádrži (g) a PB je počáteční biomasa ryb v nádrži (g) (Stejskal a kol., 2009). Využitá hodnota DKD zahrnovala v rámci výpočtu FCR i množství předloženého krmiva, které nebylo rybami stoprocentně využito. V poloprovozních podmínkách nebylo možné zjistit a oddělit množství nevyužitého krmiva, a tak s ním bylo kalkulováno při stanovení **hodnoty FCR** .

Tab. 2. Obsah vitamínů C, A a E v použitém krmivu Europa 15 s a bez přídavku vitamínů.

Druh krmiva	Vitamín C ($g \cdot kg^{-1}$)	vitamín A ($mg \cdot kg^{-1}$)	vitamín E ($mg \cdot kg^{-1}$)
Europa 15 bez přídavku vitamínů	1,64±0,0	1,57±0,09	89,4±8,95
Europa 15 s přídavkem vitamínů	18,45±0,92	28,65±2,60	601,50±20,5
Násobek obsahu vitamínů u obohaceného krmiva oproti normálnímu	11,25	18,2	6,7

6.1.3 Průběh experimentu

Celá aktivita č. 3 probíhala od 1.12. 2019 do 30.4.2020, kdy od 1.12.2019 do 6.1.2020 byly připravovány jednotlivé odchovné systémy společně s napouštěním systémů a náběhu biologických filtrů. Od 6.1.2020 do 27.4.2020 probíhal vlastní experiment, který byl rozdělen na 4 dílčí období po 28 dnech s celkovou délkou odchovu 112 dní. Na konci každého období byly ryby v každé nádrži spočítány a zvážena biomasa obsádky pro aktualizaci výpočtu denních krmných dávek. Na závěr testu, během 3 odběrových dnů (27.4. - 30.4.2020) byly odebírány veškeré vzorky z experimentálních ryb. Následně byly analyzovány jednotlivé sledované parametry, kalkulovány produkční ukazatele experimentu. Poté byl celý systém vypuštěn, vydezinfikován a připraven k dalšímu experimentálnímu nebo poloprovoznímu použití.

6.1.4 Sledování míry růstu, kondice a přežití ryb

Pro stanovení **specifické rychlosti růstu (SGR)** odchovávaných ryb u každé nádrže bylo prováděno na začátku a na konci experimentu vážení a měření všech přeživších ryb. Při měření a vážení ryb bylo použito anestetikum hřebíčkový olej v dávce 0,33 ml na 10 litrů vody. Ke kontrolnímu měření celkové délky (TL) a délky těla (SL) ryb bylo použito klasického měřidla využívaného k biometrickému měření ryb. Obě zmíněné délky ryb byly měřeny s přesností na 1 mm. Ke kontrolnímu vážení hmotnosti (W) odchovávaných ryb bylo využito digitálních vah Mettler AE 200) od firmy Mettler Toledo s.r.o. (Česká republika) s přesností vážení na 0,01 g. **Specifická rychlost růstu** byla následně vypočtena podle vzorce: $SGR (\% \cdot d^{-1}) = \ln(W_k) - \ln(W_p) / t \cdot 100$; kde t je počet dní v odchovu, W_p je průměrná hmotnost nasazovaných ryb a W_k je konečná průměrná hmotnost odchovaných ryb na konci experimentu. Ze zjištěných dat týkající se TL a W byl také vypočítán **Fultonův koeficient** podle vzorce: $FK = (W / TL^3) \cdot 100$; kde W je kusová hmotnost v gramech a TL je celková délka těla odchovávaných ryb v centimetrech.

Na konci experimentu bylo po předchozí anestezii (hřebíčkový olej, viz výše) a při dodržení zásad welfare usmrceno 21 ks ryb z každé skupiny (celkem 84 ks ryb), u kterých po stanovení TL , SL a W byly vypreparovány a zváženy celkové vnitřnosti (VW), vybrané orgány (játra,



gonády, ledviny, slezina) a tuk z dutiny břišní s přesností na 0,0001g pomocí váhy KERN-ABT 220-SDM od firmy KERN & SOHN GmbH (Německo). Ze získaných dat byly po experimentu vypočítány následující **tělesné indexy** prezentující procentní podíly hmotnosti vnitřností, vybraných orgánů a tělního tuku k celkové hmotnosti odchovaných ryb podle uvedených vzorců publikovaných Policarem a kol. (2011; 2013):

VSI (%) = *Viscero Somatic Index* = procentní podíl vnitřností $(VW/W) \times 100$

HIS (%) = *Hepato Somatic Index* = hmotnostní podíl jater $= (W_{\text{jater}}/W) \times 100$

GSI (%) = *Gonado Somatic Index* = hmotnostní podíl gonád $= (W_{\text{gonád}}/W) \times 100$

KSI (%) = *Kidney Somatic Index* = hmotnostní podíl ledvin $= (W_{\text{ledvin}}/W) \times 100$

SSI (%) = *Spleen Somatic Index* = hmotnostní podíl sleziny $= (W_{\text{sleziny}}/W) \times 100$

FSI (%) = *Fat Somatic Index* = hmotnostní podíl tuku $= (W_{\text{tuku}}/W) \times 100$

Na konci odchovu podle uhynulých a přeživších ryb byla kalkulována **míra přežití ryb (P v %)** $= (PPR/PNR) \times 100$ - kde PPR je počet přeživších ryb (ks) a PNR je počet nasazených ryb (ks).

6.1.5 Průběžné monitorování zdravotního stavu ryb

Monitorování zdravotního stavu ryb bylo prováděno pravidelně během celého experimentu obsluhujícím personálem. V případě výskytu zdravotních potíží u odchovávaných ryb bylo provedeno vyšetření veterinárním lékařem. V takovém případě byly vyšetřované ryby usmrceny dle zásad welfare. Následné patologické a parazitologické vyšetření bylo provedeno makroskopicky a mikroskopicky. Makroskopicky byl hodnocen povrch těla, barva těla, integrita ploutví, oči, žábry a vnitřní orgány ryb se speciálním zaměřením na stav ledvin. V systému, odkud experimentální ryby pocházely, se totiž vyskytuje chronická a akutní forma proliferativního onemocnění ledvin (PKD). Dále byly mikroskopicky vyšetřeny stěry z jedné poloviny těla, ze 4 žaberních oblouků z jedné strany a také jakýkoli podezřelý nález na různých tkáních ryb.

6.1.6 Posouzení stavu poškození ploutví

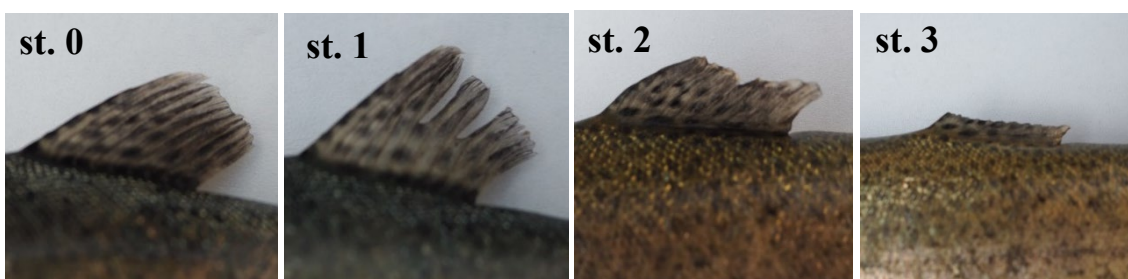
Na konci experimentu bylo u 15 ks ryb z každé sledované skupiny (celkem u 60 ks ryb) provedeno makroskopické hodnocení všech ploutví. Hodnocena byla pravá a levá prsní, pravá a levá břišní, hřbetní, tuková, řitní a ocasní ploutev. Stav u všech ploutví s výjimkou tukové ploutve byl hodnocen na základě hodnocení poškození ploutví u candáta obecného – *Sander lucioperca* podle Policara a kol. (2016b), které bylo přizpůsobeno na pstruha duhového (Obr.6): stupeň poškození: 0 = minimální poškození (<5%); 1 = nízká míra poškození (nad 5 do 30 %), 2 = střední míra poškození (nad 30 do 70 %); 3 = kompletní míra poškození (> 70%). Hodnocení stavu ploutví je subjektivní postup, a tak jej prováděla u všech ryb jen jedna osoba podobně jako u poškození ledvin. Následně byla v procentech stanovena frekvence výskytu každého stupně poškození ploutví a průměrný stupeň poškození u jednotlivých skupin.



Ocasní ploutev - 4 stupně



Řitní ploutev - 4 stupně



Hřbetní ploutev - 4 stupně



Prsní ploutev - 4 stupně



Břišní ploutev - 4 stupně



Tuková ploutev - 1 stupeň

Obr. 6. Hodnocení stupně poškození ploutví u odchovávaných ryb pstruha duhového.



6.1.7 Posouzení poškození ledvin

Z důvodu podezření, že experimentální ryby trpí chronickým onemocněním PKD, bylo na konci experimentu u 15 ks odchovaných ryb z každé sledované skupiny (celkem u 60 ks ryb) provedeno makroskopické hodnocení ledvin, při kterém byly ledviny hodnoceny orientačně podle stupně poškození, viz Obr. 7. Makroskopické hodnocení ledvin je subjektivní, a tak jej prováděla u všech ryb jen jedna osoba podobně jako u poškození ploutví. Stanoveno bylo procento výskytu každého stupně poškození ledvin (st. 0-4). V případě potřeby bylo pro výstižnější hodnocení použito upřesnění na 0,5 stupně. Dále byl od všech použitých ryb odebrán vzorek ledvin ihned po jejich usmrcení pro analýzu PCR za účelem stanovení diagnózy PKD (viz kapitola 6.1.8.)



st. 0



st. 1



st. 2



st. 3



st. 4

- st. 0: beze změn
- st. 1: tmavé zbarvení, mírné zvětšení
- st. 2: střední zvětšení
- st. 3: změna struktury
- st. 4: bochánkovité zduření



Obr. 7. Posuzování stupně poškození ledvin (stupeň 0-4) u odchovaných ryb pstruha duhového.

6.1.8 Diagnostika PKD (proliferativní onemocnění ledvin) pomocí real-time PCR

Z důvodu podezření, že experimentální ryby trpí chronickým onemocněním PKD, byl na konci experimentu u 6 ks odchovaných ryb z každé sledované skupiny (celkem 24 ryb) proveden odběr vzorků ledvin pro PCR diagnostiku onemocnění PKD. Tkáň byla odebrána ihned po usmrcení ryby a fixována v 90 % ethanolu. Detekce původce onemocnění PKD, *T. bryosalmonae*, pomocí real-time PCR byla prováděna následovně: DNA byla extrahována ze vzorků ledvin pomocí kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) postupem doporučeným výrobcem kitu. Detekce DNA původce onemocnění PKD, *T. bryosalmonae*, byla prováděna pomocí real-time PCR podle Fontes a kol. (2017). Primery byly navrženy tak, aby cílily na sekvenci genu kódujícího malou podjednotku rRNA (18S SSU rDNA) hledaného parazita. Sekvence primerů je uvedena ve Fontes a kol. (2017). Reakční směs o objemu 20 µl obsahovala 1 µl DNA, 1× Fast Start universal SYBR green master obsahující ROX (Sigma Aldrich), primery o finální koncentraci 1 µM a PCR vodu. Reakční proces se sestával ze dvou fází. V první fázi byla reakční směs zahřívána na 95 °C po dobu 10 minut, ve druhé fázi pak proběhlo 45 cyklů, kdy se střídalo 95 °C po dobu 15 s a 60 °C po dobu 60 s. Všechny vzorky byly analyzovány minimálně v duplikátu. V každém analyzovaném setu vzorků byla vždy zahrnuta pozitivní a negativní kontrola a dále reakční směs, kde byl vzorek DNA nahrazen stejným objemem vody. Vzorek byl považován za pozitivní v případě, že byla zaznamenána amplifikační křivka nebo negativní, pokud křivka zaznamenána nebyla.

6.1.9 Stanovení hematologického profilu nativní krve ryb

Na konci experimentu u 6 ks odchovaných ryb z každé sledované skupiny (celkem u 24 ks) byl proveden odběr krve za účelem hematologického vyšetření nativní krve a také pro získání krevní plazmy pro biochemické vyšetření (viz kapitola 6.1.10). Krev byla odebrána před usmrcením ryby z ocasních cév do heparinizovaného odběrového materiálu (pro stabilizaci 1 ml krve ryb bylo použito 0,01 ml přípravku Heparin Léčiva v injekčním roztoku 1x 10 ml od firmy Zentiva, a. s., Česká republika). Část krve byla vyšetřena hematologicky ihned po odběru. Při stanovení hematologického profilu krve bylo postupováno podle metodiky Svobodová a kol. (2012) a podle Piačková a kol. 2014 (pro leukogram). Z nativní krve byl proveden ihned po odběru nátěr pro následné stanovení **diferenciálního počtu bílých krvinek** (leukogramu = lymfocyt, monocyt, neutrofilní granulocyt - tyčka, neutrofilní granulocyt - segment), dále pak stanoven **celkový počet červených krvinek** (Er = erytrocyt nebo také **RBC** = Red Blood Cells) a **bílých krvinek** (**Leuco** = leucocytes). Současně byla z nativní krve stanovena **hematokritová hodnota** (**PCV**) a množství **hemoglobinu** (**Hb**). Ze získaných hodnot pak byly vypočteny parametry charakterizující erytrocyty (**střední objem erytrocytu** = **MCV**, **hemoglobin erytrocytu** = **MCH** a **střední barevná koncentrace erytrocytu** = **MCHC**).

6.1.10 Stanovení biochemického profilu krve ryb

Na konci experimentu u 6 ks odchovaných ryb z každé sledované skupiny (celkem u 24 ryb) byl proveden odběr krve (viz také kapitola 6.1.9) za účelem získání krevní plazmy pro biochemické vyšetření. Heparinizovaná krev byla odstředěna při 4000 otáčkách po dobu 10



min. Krevní plazma byla odsáta a uložena do teploty -80°C pro následné biochemické vyšetření.

Při stanovení biochemického profilu krve bylo postupováno podle metodiky Kolářová a Velíšek (2012). Měření biochemických parametrů bylo provedeno na biochemickém analyzátoru VETTEST 8008 s cílem stanovit parametry charakterizující případné poškození jater (TP - celkové bílkoviny, ALB - albumin, GLU - glukóza, TRIG - triglyceridy, ALPK - alkalická fosfatáza, ALT - alanin aminotransferáza, NH_3 - amoniak), poškození ledvin (TP - celkové bílkoviny, ALB - albumin, Ca - vápník, PHOS - fosfor) a pankreatu (AMYL-amyláza).

6.1.11 Stanovení biomarkerů oxidativního stresu

Na konci experimentu byl u 6 ks odchovaných ryb z každé sledované skupiny (celkem u 24 ryb) proveden odběr tkání jater, střeva, ledvin, žáber a tyto vzorky byly odděleně umístěny do sterilních zkumavek Eppendorf a uloženy při teplotě -80°C . Tyto tkáně byly následně použity pro analýzu antioxidantů jako je: superoxiddismutáza (SOD; EC 1.15.1.1), kataláza (CAT; EC 1.11.1.6), glutathion S-transferáza (GST; EC 2.5.1.18), redukovaný glutathion (GSH) a aktivita acetylcholinesterázy (AChE), peroxidace lipidů (LPO) a celková hladina bílkovin (TP= total protein).

Před zmíněnými analýzami zmrazené vzorky tkáně byly homogenizovány ve fosfátovém PBS pufru (0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,29 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,02 % KH_2PO_4 v deionizované vodě při pH 7,2). Množství tkáně navážené na objemový pufr = 1 ml pufru na 100 mg tkáně. Tkáně byly homogenizovány v kulovém homogenizátoru (TissueLyser II, QIAGEN®) a homogenizace přípravku musela být provedena vždy na ledu (přibližně 5 minut). Dále byly vzorky centrifugovány podle použité testovací metody:

- LPO, TP - bez centrifugace,
- CAT, SOD - centrifugace po dobu 30 minut při 30 000 otáčkách za minutu a při 4°C ,
- GST, GSH - centrifugace po dobu 15 minut při 10 000 otáčkách za minutu a při 4°C ,
- AChE - centrifugace po dobu 30 minut při 12 000 otáčkách za minutu a při 4°C .

Jednotlivé testy byly upraveny pro použití na mikrodestičkovém spektrofotometru Infinite M200 (TECAN Austria GmbH).

Aktivita SOD byla stanovena podle metody založené na inhibici redukce NBT (nitro tetrazoliová modř) a produkci superoxidů pomocí NADH a PMS (fenazin methosulfát) při nekyselém pH (Ewing a Janero, 1995). Pokles rychlosti tohoto produktu byl měřen spektrofotometricky při 560 nm. Specifická aktivita SOD byla vyjádřena jako nmolů NBT za minutu na mg proteinu.

Aktivita CAT byla stanovena podle metody založené na spektrofotometrickém měření rychlosti zmizení H_2O_2 (peroxid vodíku) katalázou (Aebi, 1984). Absorbance byla měřena při 240 nm a specifická aktivita CAT byla vyjádřena jako $\mu\text{moly H}_2\text{O}_2$ za minutu na mg proteinu.

Aktivita GST (glutathion S-transferázy) byla měřena spektrofotometricky s použitím 50 mM CDNB (1-chlor-2,4-dinitrobenzenu) jako substrátu a 10 mM GSH v PBS (pH 7,2) (Habig a kol., 1974). Absorbance byla měřena při 340 nm. Specifická aktivita GST byla vyjádřena jako nmol formovaného produktu za minutu na miligramový protein.

Koncentrace GSH byla stanovena podle metody za použití DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny) jako substrátu (Ellmann, 1959). DTNB interaguje s -SH skupinami GSH ve vzorcích bez bílkovin a tvoří měřitelný červeně zbarvený komplex. Absorbance konjugátu GSH-DTNB byla měřena při 420/680 nm a koncentrace (nmol GSH / mg proteinu) byly vypočteny podle standardní kalibrace.



Hladina LPO byla stanovena metodou TBA (kyselina thiobarbiturová) (Uchiama a Mihara, 1978). TBA je schopen reagovat s produkty peroxidace lipidů a generovat spektrofotometricky měřené barevné **TBARS** (reaktivní látky s kyselinou thiobarbiturovou). Absorbance TBARS byla měřena při 550 nm a koncentrace (nmol TBARS / mg proteinu) byly vypočteny podle standardní kalibrace generované pomocí MDA (malondialdehyd).

Aktivita AChE žáber a střevních tkání byla měřena při 405 nm absorbance podle metody Ellman a kol. (1961). Výsledky byly vyjádřeny jako nmol / min / mg proteinu.

Hladiny proteinu TP byly stanoveny při 562 nm za použití bovinního sérového albuminu (BSA) jako standardu podle metody Bradford (1976).

6.1.12 Stanovení obsahu vitamínů ve vybraných tkáních ryb a použitých krmivech

Pro **stanovení obsahu vitamínu C, A a E ve vybraných tkáních** byly odebrány z každé testované skupiny 2 směsné vzorky tkání (játra, ledviny, sval), 1 směsný vzorek sleziny ze 6 ryb. Vzorky tkání byly uchovány při teplotě -20 °C. Pro chemické analýzy byly odebrány také vzorky komerčně vyráběného krmiva Europa 15 o velikosti 2 a 3 mm a stejného krmiva obohaceného navíc o vitamíny C, A a E o velikosti 2 a 3 mm. Tyto vzorky krmiv byly odebrány v průběhu experimentu a uskladněny při teplotě -20°C. Stanovení vitamínů v krmivech složilo především pro detailní metodický popis managementu krmení odchovávaných experimentálních ryb (viz kapitola 6.1.2 a Tab. 2). Stanovení obsahu vitamínů v tkáních ryb a v krmivu bylo provedeno již zmíněnou laboratoří EKOCENTRUM OVALAB, s.r.o., Ostrava, analytickou metodou HPLC/FLD (vitamin E a A) a HPLC/UV-VIS (vitamin C).

6.1.13 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení

Všecké výsledky týkající se všech produkčních ukazatelů, kondičního a fyziologického stavu odchovaných ryb, stupně poškození ploutví a ledvin, hematologických, biochemických parametrů, úrovně oxidativního stresu a v chemických analýz vitamínů ve vybraných tkáních ryb jsou prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka u všech testovaných skupin ryb. Některé výsledky byly také zpracovány a vyhodnoceny bez ohledu na linie pstruha duhového, italskou či dánskou (Pd + jsou sloučené výsledky ryb linie dánské a italské, které byly krmeny krmivem obohaceným o vitamíny; Pd- jsou sloučené výsledky ryb linie dánské a italské, které byly krmeny krmivem bez přídavku vitamínů). Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno v programu Statistika pomocí t-testu. Všechny testy byly hodnoceny na hladině významnosti $p < 0,05$.

6.2 Výsledky

6.2.1 Dosažená rychlost růstu a přežití odchovaných ryb včetně konverze živin

Sumarizace produkčních parametrů, týkající se růstu a přežití odchovaných ryb na konci odchovu ze všech testovaných skupin a jejich konverze živin je uvedena v Tab. 3. V této tabulce jsou také uvedeny dané parametry pro obě linie pstruha duhového dohromady, krmené krmivem s a bez přídavku vitamínu. Tyto skupiny jsou statisticky hodnoceny pouze mezi sebou, vyznačeno šedě. U všech parametrů (SGR, přežití a FCR) byly zjištěny podobné hodnoty ve všech testovaných a porovnávaných skupinách. Z těchto výsledků je parné, že výživa odchovávaných pstruhů duhových s a bez přídavku vitamínů neměla vliv na jejich růst, přežití a konverzi předkládaných živin.



Tab. 3.: Sumarizace produkčních parametrů týkající se růstu a přežití odchovaných ryb dánské (D) a italské (It) linie a obou linií dohromady (Pd) pstruha duhového krmených krmivem s přídatkem (+) a bez přídatku (-) vitamínů C, A a E.

Skupina/ Produkční ukazatel	It+	It-	D+	D-	Pd+	Pd-
TL - počáteční (mm)	148± 19,9 ^a	148± 19,9 ^a	148,9± 15,6 ^a	148,9± 15,6 ^a	1,4± 0,14 ^a	1,4± 0,11 ^a
TL - konečná (mm)	245,4± 22,4 ^a	247,9± 22,7 ^a	244,5± 24,5 ^a	239,3± 24,0 ^a	245,1± 23,0 ^a	242,5± 23,5 ^a
W - počáteční (g)	41,5± 15,9 ^a	41,5± 15,9 ^a	39,8± 12,3 ^a	39,8± 12,3 ^a	40,7± 14,4 ^a	40,7± 14,4 ^a
W - konečná (g)	195,2± 44,5 ^a	215,5± 59,9 ^a	197,5± 48,4 ^a	199,7± 60,1 ^a	197,6± 52,3 ^a	208,9± 65,4 ^a
SGR (%.d ⁻¹)	1,41± 0,2 ^a	1,51± 0,16 ^a	1,41± 0,13 ^a	1,48± 0,18 ^a	1,4± 0,18 ^a	1,5± 0,27 ^a
Přežití (%)	92,1± 2,1 ^a	95,2± 1,43 ^a	92,1± 1,8 ^a	88,5± 1,9 ^a	92,1± 2,0 ^a	91,9± 3,5 ^a
FCR (kg.kg ⁻¹)	0,93± 0,06 ^a	0,74± 0,15 ^a	0,94± 0,11 ^a	0,81± 0,21 ^a	0,9± 0,09 ^a	0,8± 0,06 ^a

6.2.2 Vyhodnocení kondičních parametrů a tělesných indexů odchovaných ryb

Výsledky týkající se Fultonova koeficientu a jednotlivých tělesných indexů, které vyjadřují procentuální podíl vybraných orgánů či tkání a současně charakterizují výživovou a fyziologickou kondici odchovaných ryb na konci odchovu, jsou uvedeny v Tab. 4 a Grafu 9. Pstruzi italské (It), dánské (D) i obou linií dohromady (Pd), kterým byla předkládána krmná dávka bez dotace vitamínů (It-, D- a Pd-) měli statisticky významně vyšší HSI charakterizující větší játra v těle odchovaných ryb. Současně ryby ze skupiny italské linie (It-) a skupiny ryb obou linií dohromady (Pd-), které byly krmeny bez dotace vitamínů, dosáhly statisticky vyšší SSI prezentující větší podíl sleziny k celkovému tělu odchovaných ryb. Ryby s většími játry a slezinami pravděpodobně pocházely nějakým zánětlivým obdobím, které mohlo souviset s intenzivnějším onemocněním z hlediska PKD. Skupina ryb dánské linie (D-) a obou linií dohromady (Pd+) odchovaných bez přídatku vitamínů vykázaly vyšší FSI charakterizující vyšší podíl tělního tuku, což může charakterizovat abnormální průběh metabolismu lipidů v těle těchto ryb.

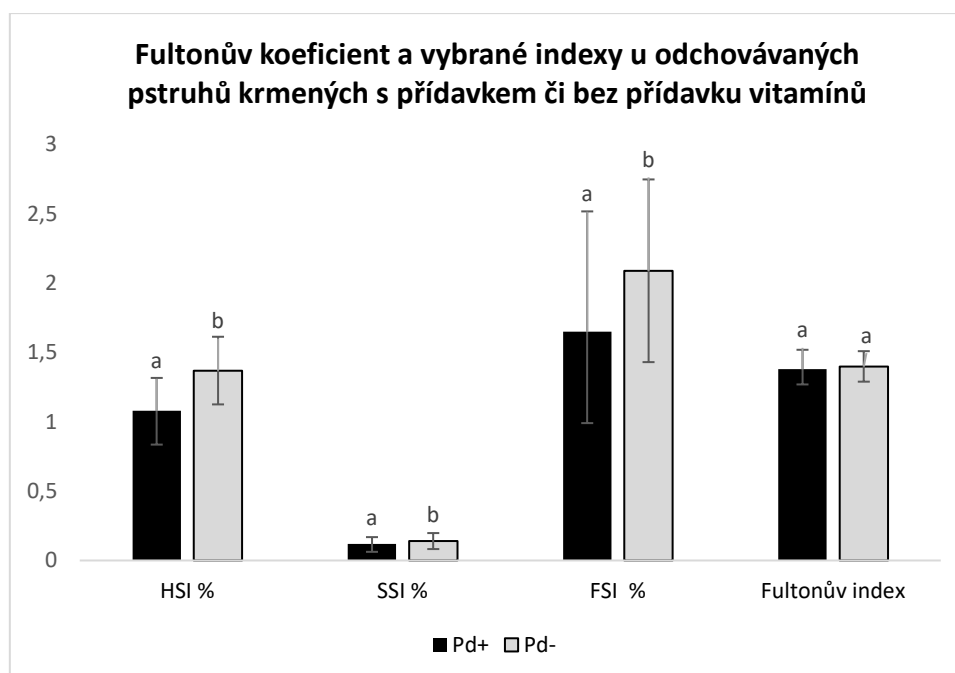
Tab. 4. Fultonův koeficient a tělesné indexy charakterizující výživovou a zdravotní kondici odchovaných ryb dánské a italské pstruha duhového a obou linií dohromady u skupin krmených krmivem s přídatkem a bez přídatku vitamínů C, A a E.

Skupina/ Tělesný index	It+	It-	D+	D-	Pd+	Pd-
FK	1,41± 0,2 ^a	1,36± 0,1 ^a	1,36± 1,15 ^a	1,44± 0,14 ^a	1,38± 0,14 ^a	1,40± 0,11 ^a
VSI (%)	11,88± 0,61 ^a	13,23± 1,81 ^b	14,15± 9,09 ^b	12,76± 2,15 ^{a,b}	13,02± 6,55 ^a	13,00± 1,97 ^a
HSI (%)	1,04±	1,42±	1,12±	1,31	1,08±	1,37±



	0,27 ^a	0,24^b	0,20 ^a	±0,24^b	0,24 ^a	0,24^b
GSI (%)	0,11± 0,07 ^a	0,53± 0,32 ^a	0,10± 0,04 ^a	0,11± 0,06 ^a	0,11± 0,06 ^a	0,32± 0,29 ^a
KSI (%)	0,87± 0,22 ^a	0,92± 0,31 ^a	0,86± 0,20 ^a	0,87± 0,22 ^a	0,86± 0,21 ^a	0,90± 0,27 ^a
SSI (%)	0,13± 0,05 ^a	0,17± 0,06^b	0,10± 0,43 ^a	0,11± 0,04 ^a	0,12± 0,05 ^a	0,14± 0,06^b
FSI (%)	1,35± 0,53 ^a	1,91± 0,95 ^a	1,94± 0,65 ^a	2,27± 0,76^b	1,65± 0,87 ^a	2,09± 0,66^b

Vysvětlivky: Kurzívou a tučně jsou zvýrazněné zajímavé statistické rozdíly mezi experimentálními skupinami odchovaných ryb, které jsou komentované v textu zprávy.



Graf 9. Fultonův koeficient a vybrané tělesné indexy charakterizující výživovou a zdravotní kondici u odchovaných ryb obou linií pstruha duhového dohromady (italské a dánské, Pd) krmených krmivem s přídatkem (Pd+) a bez přídatku (Pd-) vitamínů C, A a E.

Ze zmíněných výsledků vyplývá, že obohacení krmné dávky o vitamíny C, A a E snížilo hmotnostní podíl jater, sleziny a tuku v těle odchovaných ryb, což může souviset s lepší a vyrovnanější zdravotní kondicí odchovaných ryb bez výrazných patologických změn u zmíněných tkání.

6.2.3 Průběžné sledování zdravotního stavu ryb

Během experimentu bylo provedeno vyšetření veterinárním lékařem ve dvou případech: **13.2.2020** byla diagnostikována u všech testovaných skupin ryb infekce kožovcem rybím na žábřích ve slabé intenzitě. U všech testovaných skupin ryb byla aplikována dlouhodobá léčebná koupel ve formaldehydu v koncentraci 0,0015 ml.m⁻³. Po 1,5měsíčním odchovu v rámci tohoto experimentu byly také zaznamenány patologické změny na ledvinách (1.-4.



stupeň poškození (Obr. 7) charakterizující chronické onemocnění ryb PKD. Tento nález byl ponechán bez léčebného zásahu, neboť léčba PKD není známá.

2.3.2020 bylo provedeno vyšetření, ve kterém nebyla diagnostikována žádná infekce. Nalezeny byly opakovaně patologické změny na ledvinách (2. stupeň poškození dle Goulida, 2011) potvrzující ustupující onemocnění PKD.

Další kontroly zdravotního stavu nebyly prováděny, jelikož odchovávané ryby se vyskytovaly ve velmi dobré zdravotní kondici.

Závěrem lze konstatovat, že odchovávané ryby všech skupin dosahovaly dlouhodobě velmi dobrého zdravotního stavu, který nijak negativně neovlivnil produkční parametry dosažené v tomto experimentu.

6.2.4 Posouzení stavu a poškození ploutví

Sumarizované výsledky dokumentující frekvenci a průměrný stupeň poškození ploutví u všech testovaných skupin ryb jsou uvedeny v Grafu 10 a 11.

Obě **prsí ploutve** vykazovaly větší poškození u obou skupin ryb italské linie (It+ a It-). Byl u nich zaznamenán statisticky významně vyšší stupeň poškození (průměr: It+ levá prsní 1,6; It+ pravá prsní 1,5; It- levá prsní 1,8, It- pravá prsní 1,7) tak i větší procento frekvence výskytu poškození (It+ levá prsní poškozená u 60% ryb, It+ pravá prsní u 73%; It- levá prsní u 73%, It- pravá prsní u 73%) v porovnání s oběma dánskými liniemi (D+ a D-). Při porovnání obou skupin dánské linie mezi sebou se projevil pozitivní vliv přídavku vitamínů. U ryb této linie s přídavkem vitamínů (D+) byl zaznamenán nižší stupeň poškození pravé prsní (0,20) a levé prsní ploutve (0,06) a nižší frekvence výskytu poškození u pravé prsní (7 %) a levé prsní ploutve (14 %) v porovnání se skupinou bez přídavku vitamínů (D-).

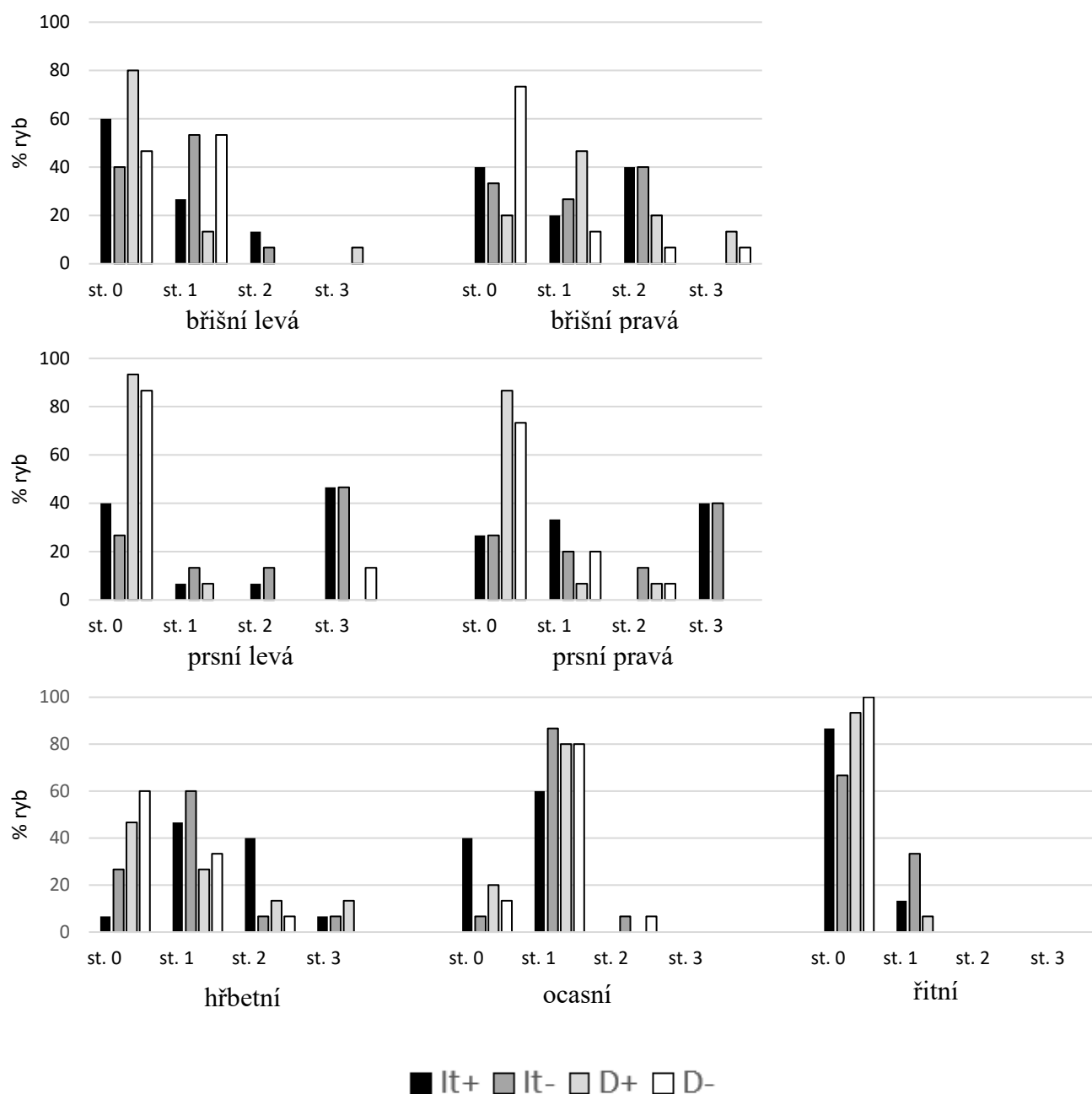
Při porovnání poškození **břišních ploutví** byl zaznamenán vyšší stupeň poškození i vyšší frekvence výskytu poškození u pravé břišní ploutve, a to u všech skupin ryb, kromě skupiny dánské linie bez přídavku vitamínů (D-), kde byl stupeň poškození pravé i levé břišní ploutve téměř stejný. U směsné skupin ryb s přídavkem vitamínů (It+ a D+) byla levá břišní ploutev nepoškozená u 60 % (It+) a u 80 % (D+) na rozdíl od skupin ryb bez přídavku vitamínů, kde tato ploutev byla nepoškozená jen u 40 % (It-) a u 46 % (D-). Toto však neplatilo u pravé břišní ploutve. Sledování intenzity poškození levé břišní ploutve nepřineslo statisticky významné rozdíly mezi skupinami. Pouze při srovnání stupně poškození pravé břišní ploutve byly statisticky významně menší poškození u ryb z dánské linie bez přídavku vitamínů (D-) při porovnání se skupinou stejné linie s přídavkem vitamínů (D+).

Hřbetní ploutev byla více poškozená u skupin ryb s přídavkem vitamínů (It+ a D+) v porovnání s rybami bez přídavku vitamínů (It- a D-) a to pokud jde o frekvenci výskytu i stupeň poškození.

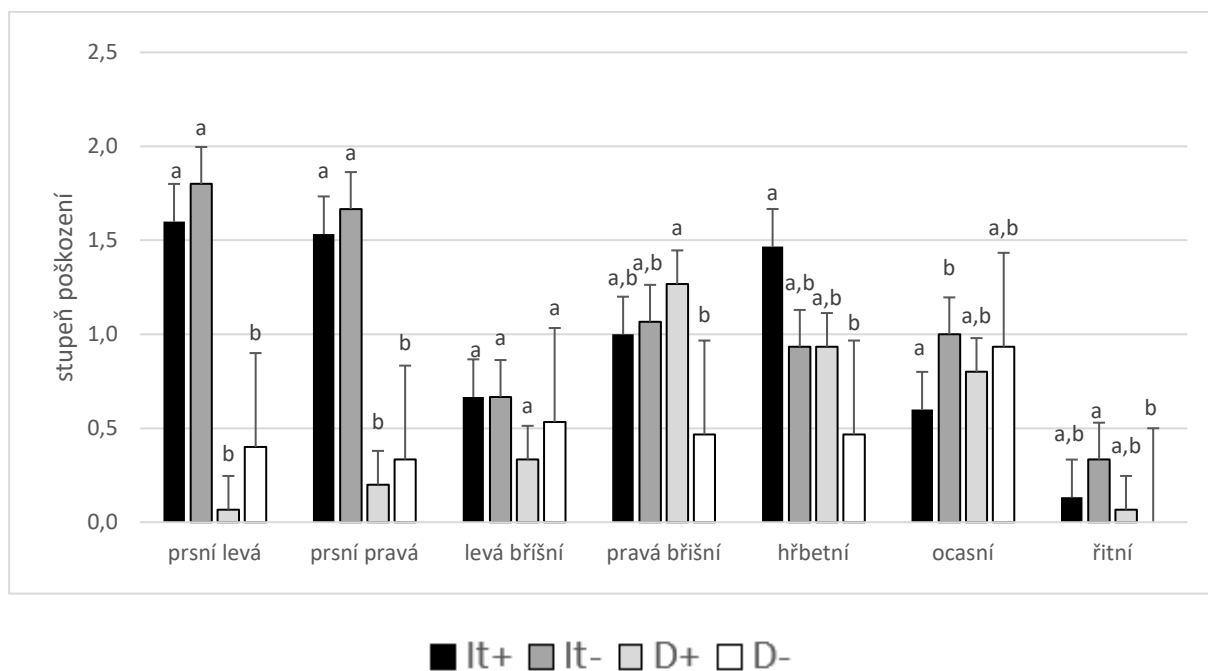
Poškození **ocasní ploutve** dosahovalo nejvýše stupně 1, ale u většiny sledovaných ryb všech skupin (u 60-86,6 % ryb). Frekvence výskytu poškození ocasní ploutve byla nižší u skupiny pstruhů italské linie s přídavkem vitamínů (It+) v porovnání se všemi ostatními skupinami. Také průměrný stupeň poškození ocasní ploutve u této skupiny ryb byl nižší než u ostatních skupin, ale pouze v porovnání se skupinou It- (italská linie bez přídavku vitamínů) byl statisticky významný.

U žádné z vyšetřovaných ryb nebylo zaznamenáno poškození **tukové ploutve**, proto není v Grafu 10 a 11 uváděna.

Z uvedených výsledků vyplývá, že obohacení krmné dávky o vitamíny C, A a E se příznivě projeví na nižším poškození obou prsních ploutví, levé břišní a ocasní ploutve.



Graf 10. Frekvence výskytu poškození ploutví u odchovaných ryb dánské a italské linie pstruha duhového krmených krmivem s přidavkem a bez přidavku vitamínů C, A a E. Stupeň poškození: 0 = minimální (< 5%); 1 = malý (5 - 30%), 2 = průměrný (30 - 70%); 3 = kompletní (> 70%).



Graf 11. Průměrný stupeň poškození ploutví u odchovaných ryb dánské a italské linie pstruha duhového krměných krmivem s přídavkem a bez přídavku vitamínů C, A a E. Stupeň poškození: 0 = minimální (< 5%); 1 = malý (5 - 30%), 2 = průměrný (30 - 70%); 3 = kompletní (> 70%).

6.2.5 Vyhodnocení stavu a poškození ledvin a diagnostiky PKD prostřednictvím real-time PCR

Výsledky z vyšetření ledvin, které posuzovalo patologické změny a stupeň poškození ledvin u odchovaných ryb všech testovaných skupin s přídavkem či bez přídavku vitamínů v krmné dávce, jsou sumarizovány v Tab. 5.

Výsledky potvrdily přítomnost infekce *T. bryosalmonae* u ryb ve všech experimentálních skupinách, a to v nízké intenzitě, která nezapříčinila v průběhu experimentu žádné klinické akutní příznaky u ryb ani významné patologické změny ledvin. Na základě PCR diagnostiky lze konstatovat, že dánská linie vykazovala nižší % podílu pozitivních ryb než linie italská. Podle průměrného stupně poškození, popřípadě podle procentuálního zastoupení stupňů s vyšším poškozením ledvin je možné konstatovat, že nejméně patologicky postižené ledviny měla italská linie bez přídavku vitamínů a dánská linie s přídavkem vitamínů v krmné dávce. Naopak nejvíce poškozené ledviny měla italská linie s krmnou dávkou obohacenou o vitamíny.

V rámci této části projektu není možné jednoznačně potvrdit pozitivní vliv přídavku vitamínů v krmivu odchovávaných ryb pstruha duhového na potlačení výskytu PKD. Avšak byla potvrzena nižší vnímavost dánských linií k tomuto onemocnění oproti italské. Výsledky dále ukazují na skutečnost, že ryby byly chované v dobrých a optimálních podmínkách prostředí pro pstruha duhového, co se týče kvality vody případně výživy. V průběhu experimentu nedošlo k žádnému projevu akutního propuknutí a manifestaci klinických příznaků PKD. Výsledky současně potvrzují skutečnost, že všechny experimentální ryby se s onemocněním PKD setkaly již před experimentem.



Tab. 5. Stupeň poškození ledvin a jeho procentuální zastoupení včetně podílu postižených ryb PKD podle PCR analýzy u odchovaných ryb dánské a italské linie a u ryb obou linií pstruha duhového souhrnně krměných krmivem s přídavkem a bez přídavku vitamínů C, A a E.

Skupiny ryb	% podíl ryb postižených PKD podle PCR	Stupeň poškození ledvin	% zastoupení jednotlivých stupňů poškození ledvin					
			st. 0	st. 0,5	st. 1	st. 2	st. 3	st. 4
It+	50	$0,6 \pm 0,42^b$	28,6	33,3	38,1	0	0	0
It-	50	$0,1 \pm 0,18^a$	76,2	19,0	4,8	0	0	0
D+	33,33	$0,1 \pm 0,28^a$	85,7	14,3	0	0	0	0
D-	33,33	$0,3 \pm 0,41^a$	57,1	19,1	23,8	0	0	0
Pd+	41,65	$0,3 \pm 0,41^a$	57,1	23,8	19,1	0	0	0
Pd-	41,65	$0,21 \pm 0,35^a$	69	19,1	11,9	0	0	0

Vysvětlivky: Kurzívou a tučně jsou zvýrazněné zajímavé statistické rozdíly mezi experimentálními skupinami odchovaných ryb, které jsou komentované v textu zprávy.

6.2.6 Posouzení hematologických parametrů nativní krve

Výsledky hematologického vyšetření u odchovaných ryb všech testovaných skupin s přídavkem či bez přídavku vitamínů v krmné dávce jsou uvedeny v Tab. 6. Hodnoty bílého a červeného krevního obrazu nepřesáhly u žádné skupiny odchovaných ryb fyziologické meze. U dánských linií bez ohledu na přídavek vitamínů v krmné dávce byla zjištěna vyšší koncentrace hemoglobinu. Naopak nejnižší koncentrace hemoglobinu byla zjištěna u italské linie s přídavkem vitamínů v krmné dávce. U italské a směsné linie pstruhů s přídavkem vitamínů v krmné dávce byly zjištěny nižší hodnoty celkového počtu erytrocytů (RBC). U zmíněných linií byly zjištěny vyšší hodnoty MCV a MCH, jelikož se z RBC hodnoty vypočítávají. U italské linie bez přídavku vitamínů v krmné dávce a u obou skupin dánské linie byl statisticky zjištěn vyšší počet neutrofilních granulocytů s tyčkovitým jádrem (tyček). U dánské populace s přídavkem vitamínů v krmné dávce byl ještě zjištěn vyšší počet neutrofilních granulocytů se segmenty.

Pstruzi italské linie s přídavkem vitamínů vykazovali nižší celkový počet erytrocytů (RBC) jednak vůči fyziologické hodnotě a také vůči ostatním skupinám ryb. S touto skutečností souvisely i odlišné základní hodnoty erytrocytu MCV a MCH, které se vypočítávají za využití RBC. Erytrocytopenie (snížený počet erytrocytů) může signalizovat anémii nebo urémii. U stejné skupiny ryb byl zaznamenán také nižší obsah hemoglobinu (Hb) vůči ostatním skupinám ryb, což přímo souvisí s erytrocytopenií. Počet erytrocytů a obsah hemoglobinu přímo souvisí s přenosem krevních plynů v organismu. U stejné skupiny ryb (It+) byl zaznamenán v rámci počtu leukocytů nižší počet neutrofilních granulocytů s tyčkovitým jádrem v porovnání s ostatními skupinami ryb. Primární funkcí neutrofilních granulocytů je fagocytóza uplatněná v



procesech nespecifické imunity, kdy tyto buňky mohou vycestovat z krevního řečiště do tkání, kde probíhá zánětlivý proces. Proto lze usuzovat, že u této skupiny ryb probíhal nějaký chronický zánětlivý proces, pravděpodobně v ledvinách v souvislosti s výskytem onemocnění PKD.

Tab. 6. Hematologické parametry krve u odchovaných ryb dánské, italské a směsné linie pstruha duhového krmných krmivem s přídavkem a bez přídavku vitamínů C, A a E.

Skupiny ryb Hematologický parametr	It+	It-	D+	D-	Pd+	Pd-
Hb (g.l⁻¹) <i>hemoglobin</i>	68,3± 7,78^a	74,5± 9,02 ^{a,b}	82,8± 9,53^b	78,0± 9,38^{a,b}	75,5± 11,41 ^a	76,3± 10,27 ^a
PCV (l.l⁻¹) <i>hematocrit</i>	0,4± 0,03 ^a	0,4± 0,04 ^a	0,4± 0,04 ^a	0,4± 0,04 ^a	0,4± 0,04 ^a	0,4± 0,04 ^a
RBC (T.l⁻¹) <i>celkový počet erytrocytů</i>	1,0± 0,09^a	1,3± 0,16 ^b	1,2± 0,07 ^{a,b}	1,2± 0,14 ^{a,b}	1,1± 0,19^a	1,2± 0,18 ^{a,b}
MCV (fl) <i>střední objem erytrocytu</i>	447,4± 97,94^b	299,3± 32,79 ^a	355,1± 27,65 ^{a,b}	318,4± 223,95 ^a	388,5± 96,71^b	308,8± 30,03 ^a
MCH (pg) <i>hemoglobin erytrocytu</i>	80,9± 15,0^b	59,3± 8,16 ^a	70,9± 5,21^b	67,3± 6,38 ^{a,b}	73,9± 15,61^b	63,3± 8,15 ^a
MCHC (l.l⁻¹) <i>střední barevná koncentrace erytrocytu</i>	0,2± 0,01 ^a	0,2± 0,01 ^a	0,2± 0,02 ^a	0,2± 0,02 ^a	0,2± 0,02 ^a	0,2± 0,02 ^a
WBC (G.l⁻¹) <i>celkový počet bílých krvinek</i>	13,1± 2,62 ^a	17,3± 9,82 ^a	12,1± 2,84 ^a	13,4± 8,67 ^a	12,6± 3,01 ^a	15,4± 10,16 ^a
lymfocyt %	94,8± 3,62 ^a	95,4± 2,78 ^a	92,5± 5,54 ^a	95,1± 3,12 ^a	93,6± 4,61 ^a	95,3± 2,82 ^a
monocyt %	3,3± 2,66 ^a	2,8± 1,54 ^a	3,8± 3,53 ^a	2,3± 1,44 ^a	3,6± 2,99 ^a	2,5± 1,45 ^a
n. g. tyčka % <i>neutrofilní granulocyt</i>	0,5± 0,45 ^a	0,9± 0,74^{a,b}	1,4± 0,86^b	1,3± 1,40^{a,b}	1,0± 0,81 ^a	1,1± 1,09 ^a
n. g. segment % <i>neutrofilní granulocyt</i>	1,4± 1,53 ^a	0,8± 0,98 ^a	2,3± 1,92^b	1,3± 1,03 ^a	1,1± 1,71 ^a	1,1± 0,10 ^a

Vysvětlivky: Kurzívou a tučně jsou zvýrazněné zajímavé statistické rozdíly mezi experimentálními skupinami odchovaných ryb, které jsou komentované v textu zprávy.

6.2.7 Posouzení biochemických parametrů v krevní plazmě

Sumarizované výsledky týkající se biochemických parametrů krve odchovaných ryb všech testovaných skupin s přídavkem či bez přídavku vitamínů v krmné dávce jsou uvedeny v Tab. 7. U většiny parametrů biochemického profilu krve vyšetřovaných ryb pstruha duhového nebyly překročeny běžně publikované fyziologické meze. Pouze u jaterních enzymů ALPK a amylázy byly hodnoty u všech testovaných skupin ryb nepatrně vyšší. To signalizuje na poruchy činnosti jater a pankreatu. Tento stav pravděpodobně souvisí s vyskytující se chronickou formou PKD u všech skupin experimentálních ryb.

Jednoznačně vyšší hodnoty byly zaznamenány u glukózy a triglyceridů v krvi u všech skupin pstruhů bez přídavku vitamínů v krmné dávce (It-, D- a Pd-). Zvýšená koncentrace glukózy v



krvi daných skupin odchovaných pstruhů signalizuje probíhající stress. Zvýšený obsah triglyceridů u daných skupin ryb vypovídá o abnormálním metabolismu lipidů. Tyto zmíněné biologické parametry krve úzce souvisí s výsledky, které byly stanoveny v rámci sledování indikátorů oxidativního stresu (TBARS), a které také potvrzují poruchu metabolismu lipidů (viz kap. 6.2.8).

Závěrem lze konstatovat, že všechny testované skupiny ryb na konci odchovu vykazovaly u biochemického profilu krve vyšší koncentrace enzymů ALP a amylázy, které naznačily poruchy jater a pankreatu pravděpodobně související s chronickým průběhem PKD. U skupin bez přídavku vitamínů do krmné dávky byly zjištěny vyšší koncentrace glukózy a triglyceridů, které odhalily probíhající stres a abnormální metabolismus lipidů u daných skupin ryb.

Tab. 7. Vybrané biochemické parametry v krevní plazmě odchovaných ryb dánské, italské a smíšené linie pstruha duhového krmených krmivem s přídavkem a bez přídavku vitamínů C, A a E.

Skupiny ryb Biochemický parametr	It+	It-	D+	D-	Pd+	Pd-
TP (g.l⁻¹) <i>celková bílkovina</i>	57,2± 27,00 ^a	50,75± 2,83 ^a	48,5± 3,90 ^a	53,3± 2,80 ^a	53,3± 21,3 ^a	51,9± 3,579 ^a
GLOB (g.l⁻¹) <i>globuliny</i>	41,2± 24,77 ^a	34,0± 1,71 ^a	32,8± 2,28 ^a	35,7± 1,58 ^a	37,4± 18,88 ^a	34,7± 1,98 ^a
ALB (g.l⁻¹) <i>albumin</i>	15,8± 4,33 ^a	16,8± 0,83 ^a	16,3± 2,30 ^a	17,7± 0,69 ^a	16,0± 4,21 ^a	17,1± 1,22 ^a
GLU (mmol.l⁻¹) <i>glukóza</i>	3,20± 2,37 ^a	6,1± 0,98^b	3,9± 0,21 ^a	6,1± 0,39^b	3,5± 1,79 ^a	6,1± 0,92^b
TRIG (g.l⁻¹) <i>triglyceridy</i>	2,0± 1,06 ^a	2,7± 0,26^b	1,8± 0,39 ^a	2,7± 0,22^b	1,9± 0,98 ^a	2,7± 0,45^b
ALT (μkat.l⁻¹) <i>alanin aminotransferáza</i>	0,17± 0,01 ^a	0,2± 0 ^a	0,2± 0,05 ^a	0,2± 0,02 ^a	0,4± 0,38 ^a	0,2± 0,05 ^a
ALPK (μkat.l⁻¹) <i>alkalická fosfatáza</i>	4,53± 1,04^a	3,1± 1,12^a	2,3± 0,52^a	3,2± 0,06^a	3,1± 1,76^a	3,2± 0,80^a
AMYL (μkat.l⁻¹) <i>amyláza</i>	13,60± 1,81^a	16,1± 2,722^a	22,7± 4,33^b	21,4± 1,51^b	17,7± 5,80^a	18,4± 3,78^a
Ca (mmol.l⁻¹) <i>vápník</i>	3,14± 0,08 ^a	3,2± 0,10 ^a	3,0± 0,19 ^a	3,2± 0,14 ^a	3,1± 0,18 ^a	3,2± 0,15 ^a
PHOS (mmol.l⁻¹) <i>fosfor</i>	5,05± 0,06 ^b	4,5± 0,47 ^b	5,1± 0,26 ^b	3,6± 0,13^a	5,1± 0,28 ^b	4,1± 0,61^a
NH3 (μmol.l⁻¹) <i>amoniak</i>	859,2± 40,39 ^a	852,0± 117,53 ^a	950,0± 0 ^a	922,3± 42,26 ^a	899,6± 150,58 ^a	882,1± 99,43 ^a

Vysvětlivky: Kurzívou a tučně jsou zvýrazněné zajímavé statistické rozdíly mezi experimentálními skupinami odchovaných ryb, které jsou komentované v textu zprávy.



6.2.8 Posouzení úrovně oxidativního stresu

Souhrnné výsledky týkající se úrovně oxidativního stresu, vyjádřené přítomností antioxidantních enzymů, odchovaných ryb všech testovaných skupin s přidavkem či bez přidavku vitamínů v krmné dávce jsou uvedeny v Tab. 8.

Hodnocení úrovně oxidativního stresu na základě hladiny defenzivních enzymů, tzv. zhasinacích enzymů (SOD, CAT, GST, GSH, AChE, TBARS) záleží na typu prováděného testu. Pokud by se jednalo o toxikologickou studii je zvýšení uvedených enzymů ve srovnání s kontrolní skupinou hodnoceno jako vyšší oxidativní stres, a tedy větší zátěž/poškození organismu. Pokud je však vyhodnocován test sledující efekt krmiva s dotací vitamínů, které mají vylepšit výživovou a zdravotní kondici ryb, lze vyšší hladinu stejných defenzivních enzymů hodnotit jako lepší připravenost organismu na zátěž v podobě, např. oxidativního stresu.

V hodnoceném experimentu bylo využíváno krmivo s přidavkem vitamínů C, A a E, které patří mezi významné defenzivní látky, tedy látky pomáhající organismu lépe zvládnout zátěž typu oxidativního stresu. Z toho důvodu hodnotíme nižší hodnoty některých defenzivních enzymů (SOD střeva, CAT střeva a žábry, GST ledviny a žábry) u skupiny ryb bez dotace vitamínů v krmné dávce (Pd-) jako horší připravenost organismu k případnému oxidativnímu stresu.

Jiným způsobem jsme přistoupili k vyhodnocení výsledků v případě stanovení TBARS (látek reaktivních s kyselinou thiobarbiturovou). Zvýšené hodnoty TBARS ukazují na porušení lipidového metabolismu s možnou následnou ceroidní degenerací jater. Tento stav nastává právě při hypovitaminóze vitamínu C, A a E. V našem experimentu byly statisticky významně vyšší hodnoty TBARS v játrech, střevu a žábrech u skupin ryb bez přidavku vitamínů v krmné dávce (It-, D- i Pd-). S tím koresponduje zvýšený obsah triglyceridů (viz kap. 6.2.7) u stejných skupin ryb. To znamená, že ryby s dotací vitamínů v krmné dávce byly lépe připraveny zvládnout poruchy lipidového metabolismu, např. jako důsledek oxidativního stresu. Tato skutečnost dokladuje významnou prospěšnost dotace vitamínů v krmné dávce odchovávaných pstruhů (Tab. 8).

Obohacení krmné dávky o vitamíny má pozitivní vliv na vyšší připravenost ryb odolávat případnému oxidativnímu stresu a porušení lipidového metabolismu, který může vést až k ceroidní degradaci jater.

Tab. 8. Vybrané biomarkery oxidativního stresu v játrech, střevu, ledvinách a žábách u odchovaných ryb dánské, italské a směsné linie pstruha duhového krmených krmivem s přidavkem a bez přidavku vitamínů C, A a E.



Skupiny ryb Oxidativní stres	Tkáň	It+	It-	D+	D-	Pd+	Pd-
SOD superoxid dismutáza nmol NBT/min/mg protein	játra	0,44± 0,078 ^a	0,47± 0,076 ^a	0,47± 0,077 ^a	0,50± 0,071 ^a	0,46± 0,076 ^a	0,48± 0,072 ^a
	střevo	0,66± 0,13 ^b	0,53± 0,080 ^{a,b}	0,41± 0,104 ^a	0,43± 0,081 ^a	0,54± 0,174^{a,b}	0,48± 0,092^a
	ledviny	0,57± 0,130 ^a	0,62± 0,069 ^a	0,56± 0,065 ^a	0,53± 0,203 ^a	0,56± 0,098 ^a	0,58± 0,153 ^a
	žábry	0,23± 0,055 ^a	0,25± 0,063 ^{a,b}	0,32± 0,065 ^b	0,32± 0,045 ^b	0,28± 0,074 ^{a,b}	0,28± 0,066 ^{a,b}
CAT antioxidant kataláza μmol H ₂ O ₂ /min/mg protein	játra	1,63± 0,150 ^a	2,07± 0,085 ^b	2,08± 0,304 ^b	2,00± 0,130 ^b	1,86± 0,327 ^a	2,04± 0,110 ^b
	střevo	0,55± 0,158 ^a	0,51± 0,179 ^a	0,57± 0,277 ^a	0,87± 0,300 ^b	1,1± 0,592^b	0,69± 0,304^a
	ledviny	0,47± 0,134 ^a	0,44± 0,192 ^a	0,55± 0,141 ^a	0,49± 0,251 ^a	0,51± 0,140 ^a	0,47± 0,214 ^a
	žábry	0,25± 0,060 ^a	0,34± 0,222 ^b	0,31± 0,033 ^b	0,13± 0,029 ^a	0,28± 0,057^b	0,23± 0,185^a
GST glutathion-S- transferáza nmol/min/mg protein	játra	7,71± 0,610 ^b	7,22± 1,429 ^b	6,03± 0,518 ^a	6,25± 1,319 ^a	6,87± 1,033 ^a	6,74± 1,406 ^a
	střevo	0,73± 0,304 ^a	0,74± 0,361 ^a	0,76± 0,179 ^a	0,82± 0,330 ^a	0,74± 0,238 ^a	0,78± 0,332 ^a
	ledviny	3,69± 1,918 ^b	3,84± 1,789 ^b	3,67± 0,570^b	2,35± 0,718^a	3,68± 1,349 ^a	3,09± 1,514 ^a
	žábry	3,01± 0,601 ^b	3,50± 0,955 ^b	2,51± 0,465 ^a	2,03± 0,390 ^a	4,63± 1,956^b	2,77± 1,039^a
GSH redukováný glutathione nmol GSH/mg protein	játra	38,04± 2,571 ^a	41,64± 4,859 ^b	37,58± 3,447 ^a	43,44± 6,844 ^b	37,81± 2,910^a	42,54± 5,736^b
	střevo	30,12± 5,511 ^a	33,85± 6,581 ^a	30,36± 14,886 ^a	35,92± 12,116 ^a	30,24± 10,702 ^a	34,89± 9,358 ^a
	ledviny	28,35± 4,551 ^a	28,81± 3,433 ^a	34,35± 8,433 ^a	27,50± 7,024 ^a	31,35± 7,179 ^a	28,16± 5,315 ^a
	žábry	9,74± 2,405 ^a	11,34± 1,735 ^{a,b}	14,30± 1,577 ^b	12,54± 1,583 ^{a,b}	12,02± 3,073 ^a	11,94± 1,702 ^a
AChE acetylcholinesterase activity nmol/min/mg protein	střevo	3,95± 0,723 ^a	4,07± 0,904 ^a	3,35± 0,684 ^a	3,02± 0,819 ^a	3,65± 0,739 ^a	3,55± 0,990 ^a
	žábry	1,39± 0,545 ^a	1,01± 0,316 ^a	1,31± 0,217 ^a	1,04± 0,471 ^a	1,35± 0,398 ^a	1,02± 0,383 ^a
TBARS látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou nmol TBARS/mg protein	játra	0,43± 0,023 ^a	0,46± 0,024 ^{a,b}	0,44± 0,017 ^{a,b}	0,48± 0,040 ^b	0,44± 0,020^a	0,47± 0,034^b
	střevo	0,42± 0,073 ^a	0,42± 0,048 ^a	0,52± 0,062 ^b	0,60± 0,076 ^b	0,47± 0,083^a	0,51± 0,114^b
	ledviny	0,35± 0,032 ^a	0,36± 0,033 ^a	0,37± 0,024 ^a	0,37± 0,040 ^a	0,36± 0,031 ^a	0,37± 0,035 ^a
	žábry	0,37± 0,029 ^b	0,40± 0,045 ^b	0,33± 0,026 ^a	0,39± 0,067 ^b	0,35± 0,035^a	0,40± 0,054^b

Vysvětlivky: Kurzívou a tučně jsou zvýrazněné zajímavé statistické rozdíly mezi experimentálními skupinami odchovaných ryb, které jsou komentované v textu zprávy.



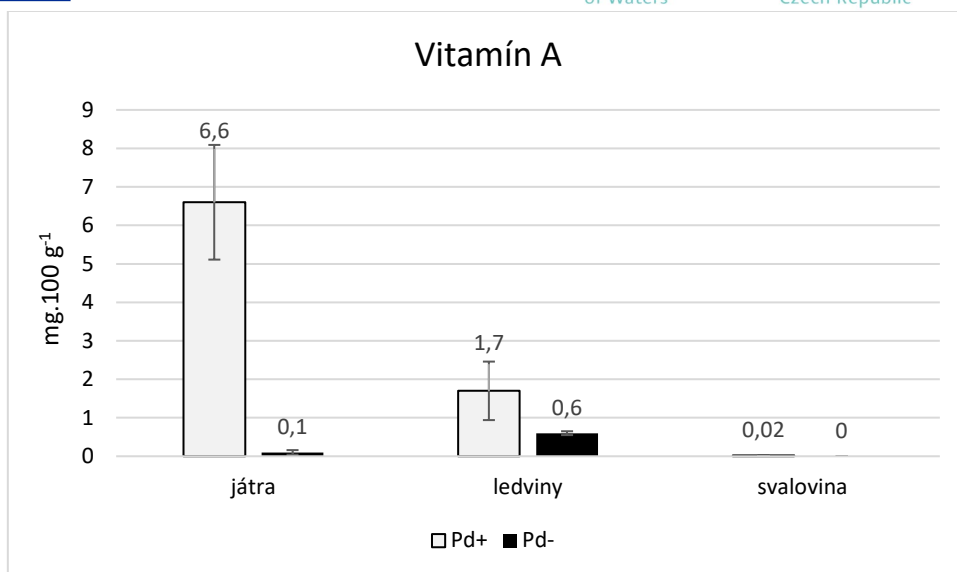
6.2.9 Stanovení obsahu vitamínů A, C a E v tkáních ryb

Výsledky o obsahu a detekovaných koncentracích vitamínů C, A a E ve směsných vzorcích tkání (játra, ledviny, svalovina) testovaných jednotlivých skupin odchovaných ryb pstruha duhového krmeného s přídavkem či bez přídavku vitamínů (C, A a E) jsou prezentovány v Tab. 9 a v Grafech 12 - 14. Ze zmíněné tabulky vyplývá, že všechny skupiny ryb, které byly krmeny obohaceným krmivem o vitamíny, vykazovaly několikanásobně vyšší koncentraci vitamínů ve všech sledovaných tkání než ryby kontrolních skupin (krmených krmivem bez přídavku vitamínů). U všech vitamínů bylo zjištěno, že jejich nejvyšších koncentrace se nacházejí v játrech, následně v ledvinách a nejméně vitamínů bylo zjištěno ve svalovině. Nejvíce kumulovaným vitamínem je vitamín E, následně C a A v játrech. V ledvinách a svalu se vitamín E a C ukládá v podobných koncentracích. Několikanásobně méně se ukládá vitamín A.

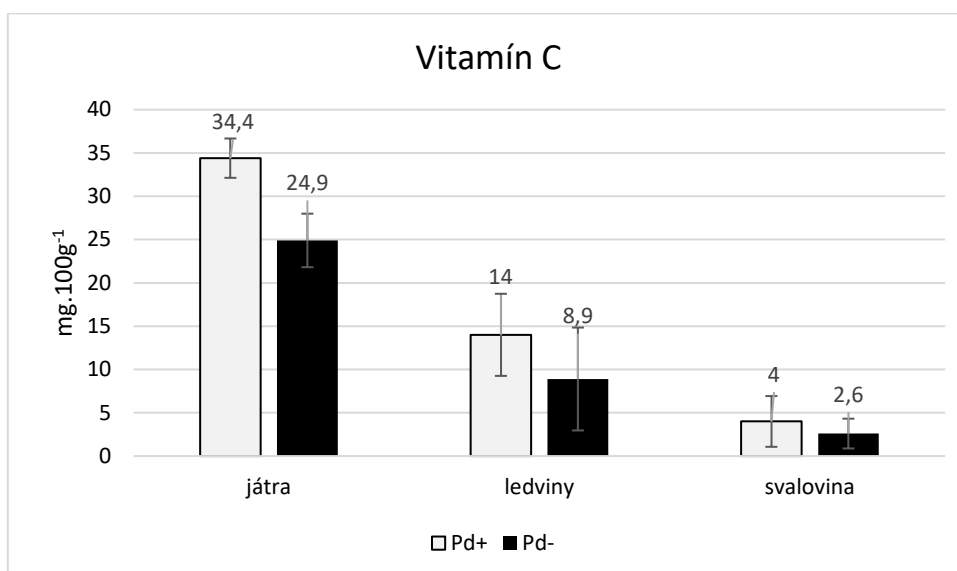
Závěrem, lze konstatovat, že u všech odchovaných ryb pstruha duhového, které byly po dobu experimentu v průběhu 112 dní v kmeny krmivem s vyšším obsahem vitamínu C, A a E byly zjištěny několikanásobně vyšší koncentrace těchto vitamínů v játrech, ledvinách a svalu oproti rybám, které krmivem s přídavkem vitamínů krmeny nebyly.

Tab. 9. Obsah vitamínu C, A a E ve tkáních odchovaných ryb dánské, italské a směsné linie pstruha duhového krmených krmivem s přídavkem a bez přídavku vitamínů C, A a E.

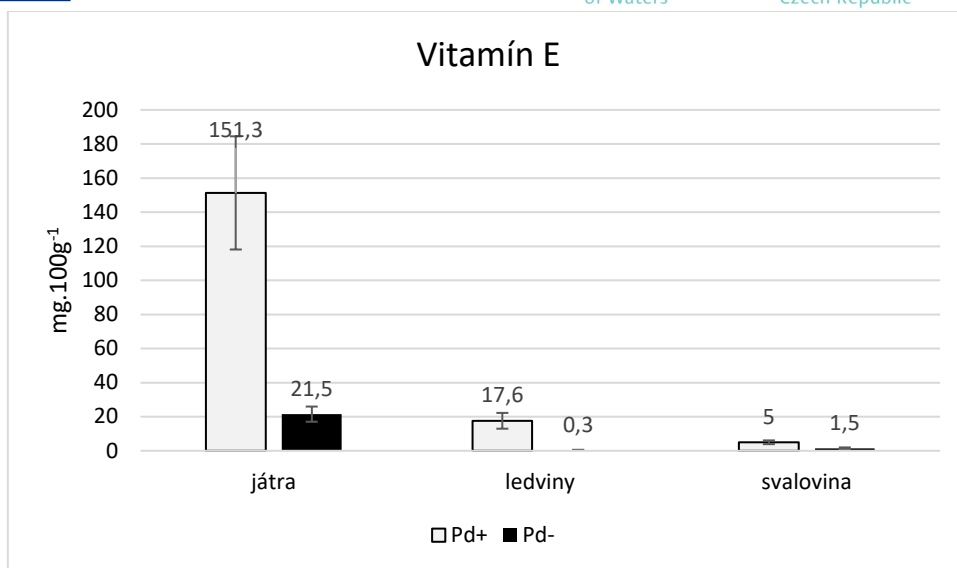
Tkáň	Experimentální skupiny	Vitamín C (mg.100g ⁻¹)	Vitamín A (mg.100g ⁻¹)	Vitamín E (mg.100g ⁻¹)
játra	It+	35,7±2,83	5,8±1,86	70±0
	It-	26,6±2,90	0,1±0,02	18,8±4,53
	D+	29,3±0,64	5,7±0,87	156,0± 41,01
	D-	23,3±3,11	0,2±0	24,2±3,11
	Pd+	34,4±2,27	6,6±1,49	151,3±33,20
	Pd-	24,9±3,09	0,1±0,06	21,5±4,45
ledviny	It+	14,6±7,36	2,1±0,97	14,6±0,85
	It-	12,0±0,42	0,6±0,06	0,8±0
	D+	13,0±3,39	1,6±0,47	14,3±5,37
	D-	5,8±8,20	0,6±0,05	0,1±0,09
	Pd+	14,0±4,74	1,7±0,76	17,6±4,63
	Pd-	8,9±5,94	0,6±0,05	0,3±0,41
sval	It+	4,9±4,547	0,02±0,001	5,6±1,17
	It-	2,8±2,67	0	1,2±0,62
	D+	4,2±1,41	0,02±0,001	4,5±0,83
	D-	2,4±1,27	0	1,8±0,05
	Pd+	4,0±2,93	0,02±0,001	5,0±1,1
	Pd-	2,6±1,72	0	1,5±0,48



Graf 12. Obsah vitamínu A ve tkáních odchovaných ryb pstruha duhového krmných krmivem s přídatkem a bez přídatku vitamínů.



Graf 13. Obsah vitamínu C ve tkáních odchovaných ryb pstruha duhového krmných krmivem s přídatkem a bez přídatku vitamínů.



Graf 14. Obsah vitamínu E ve tkáních odchovaných ryb pstruha duhového krmných krmivem s přidavkem a bez přidavku vitamínů.

6.3 Závěr

Na závěr této aktivity je možné konstatovat, že aplikace krmiva s vyšším obsahem vitamínu C, A a E při odchovu pstruha duhového v intenzivním chovu v RAS:

- neměla vliv na růst a přežití odchovávaných ryb a konverzi předkládaných živin,
- způsobila nižší hmotnostní podíl jater, sleziny a tuku v těle odchovávaných ryb, což může souviset s lepší a vyrovnanější fyziologickou kondicí odchovávaných ryb bez výrazných patologických změn u zmíněných tkání,
- neměla významný vliv na zdravotního stav odchovávaných ryb,
- zajistila nižší výskyt poškození obou prsních ploutví, levé břišní a ocasní ploutve,
- neměla jednoznačně pozitivní vliv na potlačení výskytu PKD,
- neměla jednoznačný vliv na hematologické ukazatele krve odchovávaných ryb,
- zajistila nižší koncentrace glukózy a triglyceridů v krvi odchovávaných ryb prezentující nižší úroveň stresu a normální průběh metabolismu lipidů v jejich těle,
- měla pozitivní vliv na vyšší připravenost ryb odolávat případnému oxidativnímu stresu a porušení lipidového metabolismu, který může vést až k ceroidní degradaci jater.
- zajistila několikanásobně vyšší obsah a koncentraci vitamínů C, A a E v játrech, ledvinách a svalovině odchovávaných ryb.

Použitá literatura:

- Aebi, H., 1984. Catalase Invitro. Methods Enzymol. 105, 121–126.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88–95.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue Sulfhydryl Groups. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70–77.
- Ewing, J.F., Janero, D.R., 1995. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. Anal. Biochem. 232, 243–248.



- Fontes I., Hartikainen H., Holland J. W., Secombes C. J., Okamura B., 2017. *Tetracapsuloides bryosalmonae* abundance in river water. *Diseases of Aquatic Organisms* 124(2): 145-157.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases – First enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Kolářová, J., Velíšek, J., 2012. Stanovení a vyhodnocení biochemického profilu krve ryb. Edice Metodik, VÚRH FROV JU Vodňany, č.135, 54s.
- Piačková, V., Palíková, M., Zusková, E., Flajšhans, M., 2014. Stanovení diferenciálního počtu leukocytů u ryb. Edice Metodik VÚRH FROV Vodňany, č.160, 65 s.
- Policar, T., Podhorec, P., Stejskal, V., Kozák, P., Švinger, V., Alavi, S.M.H., 2011. Growth and survival rates, puberty and fecundity in captive common barbel (*Barbus barbus* L.) under controlled conditions. *Czech Journal of Animal Science* 56, 433–442.
- Policar, T., Stejskal, V., Křišťan, J., Bossuyt, J., Bláha, M., 2013. The effect of fish size and density on the weaning success in pond-cultured pikeperch (*Sander lucioperca* (L.)). *Aquaculture International* 21: (4), 869–882.
- Policar, T., Blecha, M., Křišťan, J., 2016a. Hromadný poloumělý výtěr candáta obecného (*Sander lucioperca* L.) s použitím recirkulačního akvakulturního systému (RAS). Edice Metodik (Poloprovoz), FROV JU Vodňany, 163: 32 s.
- Policar, T., Blecha, M., Křišťan, J., Mráz, J., Velíšek, J., Stará, A., Stejskal, V., Malinovskyi, O., Svačina, P., Samarin, A. M., 2016b. Comparison of production efficiency and quality of differently cultured pikeperch (*Sander lucioperca* L.) juveniles as a valuable product for on-growing culture. *Aquacult. Int.*, 24: 1607–1626
- Stejskal, V., Kouril, J., Policar, T., Hamackova, J., Musil, J., 2009. The growth pattern of all-female perch (*Perca fluviatilis* L.) juveniles – is monosex perch stock beneficial? *Journal of Applied Ichthyology* 25: 432-437.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Modrá, H., 2012. Metody hematologického vyšetřování ryb. Edice Metodik VÚRH FROV JU Vodňany, č. 122, 38 s.
- Uchiama, M., Mihara, M., 1978. Determination of malondialdehyd precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* 86, 271–278.

7 Vliv pravidelné ozonizace vody a využití krmiva s vyšším obsahem vitamínu C, A a E za účelem eliminace výskytu onemocnění PKD a ektoparazitárních infekcí, a vylepšení produkčních ukazatelů intenzivního chovu pstruha duhového ve venkovním RAS dánského typu

V rámci řešení pilotního projektu byl dále v rámci intenzivního chovu pstruha duhového realizován poloprovozní experiment využívající ozonizaci vody a krmivo s vyšším obsahem vitamínu C, A a E s cílem eliminovat výskyt onemocnění PKD, infekce ektoparazitů, podpořit zdravotní a kondiční stav odchovávaných ryb a celkově vylepšit produkční ukazatele chovu (SGR, FCR) a přežití ryb. Tato aktivita č. byla v rámci projektu řešena od 1.5.2020 do 30.10.2020.



7.1 Materiál a metodika

Realizace této aktivity č. 4 probíhala od 1.5. 2020 do 30.10.2020 v poloprovozním chovu podniku BioFish, s.r.o. nedaleko Pravíkova díky ucelené metodice, pravidelnému kontrolování a údržbě chovu ze strany pracovníků FROV JU, kteří současně spolupracovali na přípravě chovatelského zařízení, na nasazení ryb do experimentu a na ukončení experimentu.

7.1.1 Příprava odchovných systémů, experimentálních skupin a nasazení ryb pstruha duhového

K řešení této aktivity byly využity dva recirkulační akvakulturní systémy dánského typu podniku BioFish, s.r.o, kdy jeden z nich je popsán v aktivitě č. 1 této zprávy (kapitola 4). Druhý systém je podobné konstrukce, avšak je tvořený pouze 10 odchovnými nádržemi o jednotném objemu 34 m^3 a podobným zařízením na filtraci vody jako první systém. Ovšem tento druhý systém je ještě vybavený kontinuální sterilizací vody pomocí ozonizace (dávka až $20 \text{ g O}_3 \cdot \text{h}^{-1}$). V rámci každého systému bylo nasazeno 6 odchovných nádrží, kdy tři nádrže byly využity na odchov pstruhů, krmených krmivem obohaceným o vitamíny C, A a E, jak je to popsáno v kapitole 4 této zprávy. Další tři nádrže byly využity pro chov pstruhů krmených krmivem bez obohacení o vitamíny C, A a E. K tomuto experimentu byli použiti pstruzi duhové irské geografické linie s počáteční $TL = 131 \pm 21,2 \text{ mm}$, $SL = 114 \pm 18,6 \text{ mm}$ a $W = 27,0 \pm 8,9 \text{ g}$ v počáteční biomase $1,7 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ a počáteční počtu ryb 2150 kusů na nádrž ($63,24 \text{ ks} \cdot \text{m}^{-3}$). Celkem vznikly následující experimentální skupiny:

V+Oz+: pstruh duhový krmený krmivem obohaceným o vitamíny C, A a E, který byl chovaný ve vodním prostředí s ozonizací vody,

V+Oz-: pstruh duhový krmený krmivem obohaceným o vitamíny C, A a E, který byl chovaný ve vodním prostředí bez ozonizace vody,

V-Oz+: pstruh duhový krmený krmivem bez obohacení o vitamíny, který byl chovaný ve vodním prostředí s ozonizací vody,

V-Oz-: pstruh duhový krmený krmivem bez obohacení o vitamíny, který byl chovaný ve vodním prostředí bez ozonizace vody,

Ve všech použitých systémech byla udržována podobná stabilní a dobrá kvalita vodního prostředí v průběhu celé aktivity zahrnující následující parametry: teplota vody $14,9 \pm 2,23 \text{ }^\circ\text{C}$, koncentrace rozpuštěného kyslíku $104,1 \pm 2,92 \text{ %}$, obsah celkového amoniaku $0,1 \pm 0,01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, obsah dusitanů $0,2 \pm 0,01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, pH $7,05 \pm 0,38$ a salinita vody 2-4 ppt s přirozeným světelným režimem.

7.1.2 Management krmení a obohacení krmiv o vitamíny

Po nasazení ryb do nádrží byly ryby krmeny směsí potápivých krmiv: T-1P Optiline HT RC a T2P Optiline HE RC SF od firmy Skretting a Inicio Plus od firmy Biomar o velikosti pelet 2 mm v denní krmné dávce 3 % z biomasy (na začátku do poloviny experimentu) a 3 mm v denní krmné dávce 2 % z biomasy (od poloviny do konce experimentu). Skupiny experimentálních ryb bez vitamínových přísad byly krmeny klasickými komerčně vyráběnými krmivy, které jsou uvedeny výše. U tohoto krmiva byl průměrný obsah vitamínů následující: vitamín C: $0,8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, vitamín A: $1,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a vitamín E: $75,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. U skupin ryb s přísadkou vitamínů C, A a E došlo k obohacení stejného komerčně vyráběného krmiva podobným způsobem jako je to uvedené v kapitole 4 této zprávy. Průměrný obsah vitamínů v tomto obohaceném krmivu byl:



14,76 g.kg⁻¹ vitamínu C, 23 mg. kg⁻¹ vitamínu A a 481,2 mg. kg⁻¹ vitamínu E. Ryby v průběhu tohoto experimentu byly krmeny denně v pravidelných intervalech 4 - 6krát během 24 hodin. Veškeré předkládané krmivo bylo rybám navažováno a evidováno za účelem výpočtu krmného koeficientu **FCR (Feed Conversion Ratio, tzv. koeficient konverze krmiva)**, který byl vypočítán po ukončení experimentu podle vzorce uvedeného v kapitole 4 této zprávy.

7.1.3 Průběh experimentu

Celá aktivita probíhala od 1.5.2020 do 30.10.2020., kdy od 1.5.2020 do 15.5.2020 byly připravovány jednotlivé odchovné systémy a nádrže na vysazení experimentálních skupin ryb. Na konci každého období (celkem 7 dílčích období) bylo provedeno u jednotlivých nádrží převážení biomasy celé obsádky ryb pro aktualizaci výpočtu denních krmných dávek. Současně byly stanoveny biometrické ukazatele a orientačně zkontrolován zdravotní stav 50 ks reprezentativních ryb z každé nádrže. Na závěr experimentu byl kromě biometrických stanovení proveden odběr vzorků tkání pro podrobná sledování. Analyzovány byly parametry zdravotní kondice odchovaných ryb a kalkulovány produkční ukazatelé experimentu. Použité nádrže byly na konci experimentu vydezinfikovány, vyčištěny a připraveny na další použití v rámci komerčního chovu podniku BioFish, s.r.o.

7.1.4 Sledování míry růstu, kondice a přežití ryb

Stejným způsobem jako v aktivitě č. 3 tohoto projektu (kapitola 6 této zprávy) byly stanoveny a spočítány následující parametry růstu, kondice a přežití odchovaných ryb na konci experimentu:

- **Celková délka (TL mm), délka těla (SL mm) a hmotnost (W g),**
- **Specifická rychlost růstu SGR (%.d⁻¹),**
- **Fultonův koeficient,**
- **Tělesné indexy: VSI (%), HIS (%), GSI (%), KSI (%), SSI (%), FSI (%),**
- **Míra přežití ryb (%).**

7.1.5 Průběžné monitorování zdravotního stavu ryb

Monitorování zdravotního stavu ryb bylo prováděno pravidelně během celého experimentu obsluhujícím personálem, místním veterinárním lékařem v Pravíkově, pracovníky FROV JU a podniku BioFish při kontrolním přelovení, a současně v případě výskytu zdravotních problémů i veterinárním lékařem FROV JU po transportu ryb do Vodňan. Deatálně vyšetřované ryby byly usmrceny dle zásad welfare. Následné patologické a parazitologické vyšetření bylo provedeno makroskopicky a mikroskopicky. Makroskopicky byl hodnocen povrch těla, barva těla, integrita ploutví, oči, žábry a vnitřní orgány ryb se speciálním zaměřením na stav ledvin. V systému, kde probíhal experiment, se každoročně vyskytuje chronická a akutní forma proliferativního onemocnění ledvin (PKD). Dále byly mikroskopicky vyšetřeny stěry z jedné poloviny těla, ze 4 žaberních oblouků z jedné strany a také jakýkoli podezřelý nález na různých tkáních ryb.

7.1.6 Posouzení stavu poškození ploutví

V průběhu experimentu od 4.8. do 7.8.2020 a na konci experimentu bylo vždy u 6 ks ryb z každé sledované skupiny (celkem u 24 ks ryb) provedeno makroskopické hodnocení všech ploutví stejným způsobem jako u aktivity č. 3 tohoto projektu (kap. 6.1.6). Výsledkem této



činnosti byla identifikace stupně poškození ploutví (Obr. 6.) a kalkulace výskytu průměrného stupně poškození ploutví a procentuální frekvence výskytu každého stupně u jednotlivých testovaných skupin.

7.1.7 Posouzení poškození ledvin

Z důvodu výskytu onemocnění PKD v odchovných systémech, kde probíhal tento experiment, bylo v průběhu experimentu (4.8. 2020) u 6 ks odchovaných ryb z každé sledované skupiny (celkem u 24 ks ryb) provedeno makroskopické hodnocení ledvin podle aktivity č. 3 tohoto projektu (viz kap. 6.1.7 a Obr. 7). Stanoveno bylo procento výskytu každého stupně poškození ledvin (stupeň 0-4) u jednotlivých skupin a pořízena byla fotodokumentace ledvin pro pozdější detailní zpracování výsledků. Dále od vyšetřovaných ryb byl odebrán vzorek ledvin ihned po usmrcení ryby pro analýzu PCR za účelem stanovení diagnózy PKD (viz kapitola 7.1.8 a 7.1.9).

7.1.8 Diagnostika PKD pomocí real-time PCR

V průběhu experimentu (4.8.2020) byl u 6 odchovaných ryb z každé sledované skupiny (celkem u 24 ks ryb) proveden odběr vzorků ledvin pro PCR diagnostiku PKD. Tkáň byla odebrána ihned po usmrcení ryby a fixována v 90 % ethanolu. Detekce původce onemocnění PKD (*T. bryosalmonae*) pomocí real-time PCR byla prováděna stejným způsobem jako je uvedeno v aktivitě č. 3 tohoto projektu (kapitola 6.1.8 této zprávy).

7.1.9 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení

Veškeré výsledky týkající se všech produkčních ukazatelů, kondičního a zdravotního stavu odchovaných ryb, stupně poškození ploutví a ledvin jsou prezentovány jako průměr $\pm$ směrodatná odchylka u všech testovaných skupin ryb. Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno v programu Statistika pomocí t-testu. Všechny testy byly hodnoceny na hladině významnosti $p < 0,05$.

7.2 Výsledky

7.2.1 Dosažená rychlost růstu a přežití odchovaných ryb včetně konverze živin

Sumarizace produkčních parametrů, týkající se růstu a přežití odchovaných ryb na konci odchovu ze všech testovaných skupin a jejich konverze živin je uvedena v Tab. 10. Z uvedených dat vyplývá, že skupiny chované v RAS s ozonizací vody dosahovaly vyššího růstu a lepší konverze živin oproti skupinám odchovaných v systému bez ozonizace vody bez ohledu na přidavek vitamínů C, A a E v krmivu. U všech testovaných skupin bylo dosaženo stejné míry přežití odchovaných ryb na konci odchovu.

Závěrem lze konstatovat, že ozonizace vody v RAS pozitivně ovlivnila produkční parametry týkající se růstu odchovávaných ryb a jejich konverze živin bez ohledu na obohacení použitých krmiv o vitamíny C, A a E.

Tab. 10. Sumarizace produkčních parametrů týkající se růstu a přežití odchovaných ryb pstruha duhového krměných krmivem s přídavkem a bez přídavku vitamínů C, A a E při ozonizaci či bez ozonizace vody včetně konverze živin.

Skupina/	V+Oz+	V+Oz-	V-Oz+	V-Oz-
----------	-------	-------	-------	-------



Produkční ukazatel				
TL - počáteční (mm)	131,3± 21,2 ^a	131,3± 21,2 ^a	131,3± 21,2 ^a	131,3± 21,2 ^a
TL - konečná (mm)	255,4± 22,6^b	222,0± 21,9 ^a	248,5± 23,1^b	210,7± 18,6 ^a
W - počáteční (g)	27,0± 8,9 ^a	27,0± 8,9 ^a	27,0± 8,9 ^a	27,0± 8,9 ^a
W - konečná (g)	248,2± 41,8^b	135,5± 38,9 ^a	242,5± 45,3^b	120,2± 30,2 ^a
SGR (%·d ⁻¹)	1,30± 0,3^b	0,82± 0,08 ^a	1,12± 0,11^b	0,76± 0,05 ^a
Přežití (%)	88,0± 4,0 ^a	88,2± 4,0 ^a	88,8± 3,6 ^a	86,3± 2,0 ^a
FCR (kg·kg ⁻¹)	0,78± 0,07^a	1,16± 0,17 ^b	0,85± 0,10^a	1,28± 0,23 ^b

7.2.2 Vyhodnocení kondičních parametrů a tělesných indexů odchovaných ryb

Výsledky týkající se Fultonova koeficientu a jednotlivých tělesných indexů, které vyjadřují procentuální podíl vybraných orgánů či tkání a současně charakterizují výživovou a fyziologickou kondici odchovaných ryb na konci odchovu, jsou uvedeny v Tab. 11. Z této tabulky je zřejmé, že pstruzi odchovaní v systému, kde byla využita sterilizace vody díky ozonizaci, dosáhli vyšších hodnot FK. To znamená, že tyto ryby dosahovaly vyššího a lepšího kondičního stavu než ryby chované bez ozonizace vody bez ohledu na obohacení krmiva o vitamíny. Skupiny ryb, které byly chovány v systému bez ozonizace vody dosáhly vyšších indexů HSI a KSI, které prezentují vyšší procentuální podíl jater a ledvin k celkovému tělu odchovaných ryb. Tato skutečnost může souviset s průběhem různých zánětlivých procesů u takto chovaných ryb oproti rybám chovaných v systému s ozonizací vody bez ohledu na využití krmivo s či bez přídavku vitamínů. Na druhé straně u ryb, které byly odchovávané v systému s ozonizací vody dosahovaly vyššího indexu FSI, který charakterizuje ryby s větším ukládáním tělního tuku v těle ryb. Tato skutečnost pravděpodobně souvisela s intenzivně probíhajícím metabolismem, příjmem krmiva a ukládání tuku v těle ryb.

Tab. 11. Fultonův koeficient a tělesné indexy charakterizující výživovou a fyziologickou kondici odchovaných ryb pstruha duhového krmených krmivem s přídavkem a bez přídavku vitamínů C, A a E a chovaných při ozonizaci či bez ozonizace vody.

Skupina/ Tělesný index	V+Oz+	V+Oz-	V-Oz+	V-Oz-
------------------------------	-------	-------	-------	-------



FK	1,9± 0,11^b	1,6± 0,15 ^a	1,8± 0,22^b	1,5± 0,12 ^a
VSI (%)	23,3± 6,36 ^a	19,4± 3,22 ^a	19,3± 4,83 ^a	17,7± 1,09 ^a
HSI (%)	0,9± 0,12 ^a	1,4 ±0,39^b	1,0± 0,18 ^a	1,1± 0,20^{a,b}
GSI (%)	0,1± 0,07 ^a	0,1± 0,04 ^a	0,1± 0,06 ^a	0,2± 0,31 ^a
KSI (%)	0,1± 0,03 ^a	0,2± 0,04^b	0,1± 0,05 ^a	0,2± 0,09^b
SSI (%)	0,9± 0,30 ^a	1,0± 0,19 ^a	1,0± 0,22 ^a	1,0± 0,12 ^a
FSI (%)	2,0± 1,14^b	1,6± 0,41 ^a	2,2± 0,51^b	1,6± 0,38 ^a

Vysvětlivky: Kurzívou a tučně jsou zvýrazněné zajímavé statistické rozdíly mezi experimentálními skupinami odchovaných ryb, které jsou komentované v textu zprávy.

Závěrem lze konstatovat, že odchovávané ryby pstruha duhového v podmínkách chovu s ozonizací vody dosáhly vyššího kondičního stavu. U těchto ryb se také vyskytovaly menší játra a ledviny. Všechny tyto skutečnosti naznačují pozitivní vliv ozonizace vody na kondiční a fyziologický stav odchovaných ryb.

7.2.3 Průběžné sledování zdravotního stavu ryb

Během experimentu byly veterinárním lékařem zjištěny následující skutečnosti:

1) Na konci května (28.5.2020) byla diagnostikována u všech testovaných skupin ryb infekce kožovcem rybím na kůži a žábách ve středně silné a silné intenzitě. Proti této infekci byla použita dlouhodobá koupel ve formaldehydu v celém objemu obou odchovných systémů, jak je to popsáno v aktivitě č. 1 a 3 tohoto projektu (kapitola 4 a 6 této zprávy). Dále byly zaznamenány také patologické změny na ledvinách a infiltrace žaber původcem PKD. Tento nález byl ponechán bez léčebného zásahu, neboť léčba PKD není známá.

2) Na konci července (20.7.2020) u všech vyšetřovaných ryb (8 ks) experimentálních skupin bylo patrné tmavé zbarvení těla a poškozené žábry (slepené žaberní lístky, nekrotická ložiska). U 37,5 % ryb byl zaznamenán exoftalmus. U všech ryb byly přítomny patologické změny na ledvinách (3.-4. stupeň poškození), což potvrdzovalo průběh PKD. Ovšem mortalita ryb v experimentu byla jen minimální připomínající normální stav.

3) Na začátku srpna (4.8.2020) u všech vyšetřovaných ryb bylo zaznamenáno tmavé zbarvení těla, na žábrech byla zaznamenána infiltrace, hemoragie a bakteriální infekce. Tyto příznaky nasvědčovaly na průběh PKD v chovu ryb. Pouze u jedné skupiny ryb byla zjištěna infekce kožovcem rybím na žábách v ojedinělé intenzitě. Tento stav ryb byl ponechán bez jakéhokoliv veterinárního a léčebného zásahu.

Ve všech skupinách ryb se v průběhu chovu vyskytovaly infekce ryb kožovcem rybím a PKD. Výživa ryb krmivy obohacenými o vitamíny C, E a A a ani ozonizace vody odchovného systému nedokázaly úplně zmíněné infekce potlačit, ale dokázaly zlehčit jejich průběh a zajistit vysoké přežívání odchovávaných ryb.

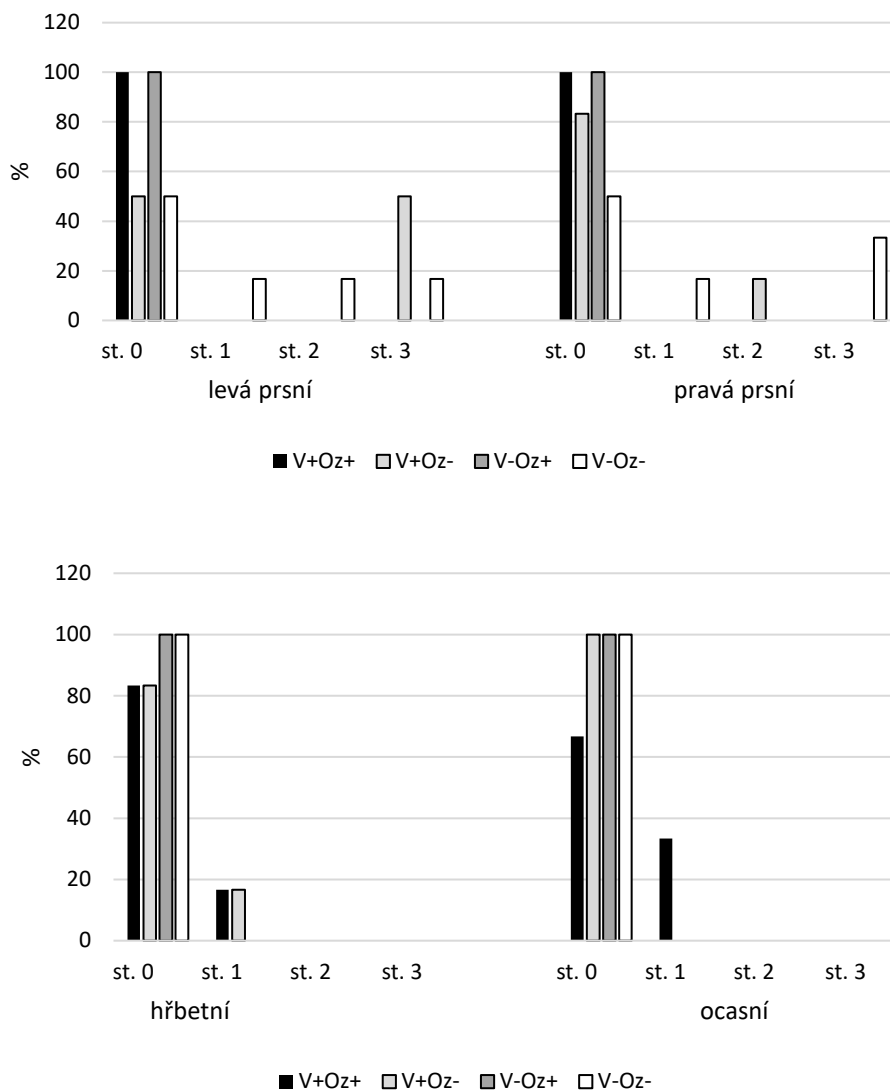


7.2.4 Posouzení stavu a poškození ploutví

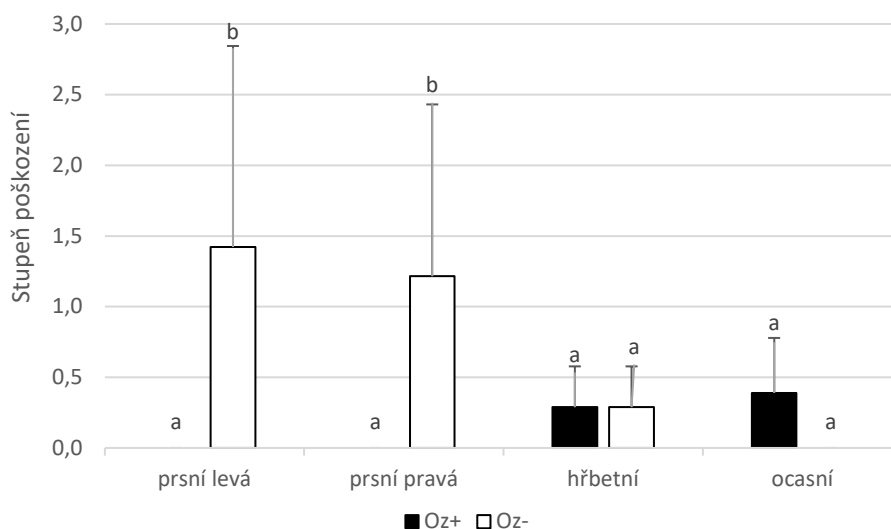
Výsledky sledování poškození ploutví v průběhu experimentu (ze dne 4.8.2020) jsou uvedeny v Grafu 15 a 16. Bylo zjištěno, že obě břišní ploutve nebyly poškozeny u žádné vyšetřované ryby, stejně jako ploutev tuková a řitní, proto nejsou v těchto grafech uvedeny. Naopak nejvíce poškozeny byly ploutve prsní, které u skupin ryb chovaných bez ozonizace vody dosahovaly statisticky průkazně nejvyššího stupně poškození (Graf 16). Příznivý vliv přídavku vitamínů na poškození ploutví nebyl potvrzen, proto je v Grafu 16 uveden jen vliv ozonizace vody na poškození ploutví.

V Grafu 17 a 18 jsou uvedeny výsledky sledování poškození ploutví na konci testu (ze dne 9.9.2020). Na rozdíl od sledování v průběhu testu, bylo na konci testu zaznamenáno poškození všech ploutví. Ve shodě s odběrem v průběhu testu se projevil příznivý vliv ozonizace vody na snížený výskyt poškozených ploutví a průměrný stupeň poškození ploutví. Pouze u ocasní a řitní ploutve byly u skupin ryb s ozonizací poškozeny více než ryby bez ozonizace (Graf 18).

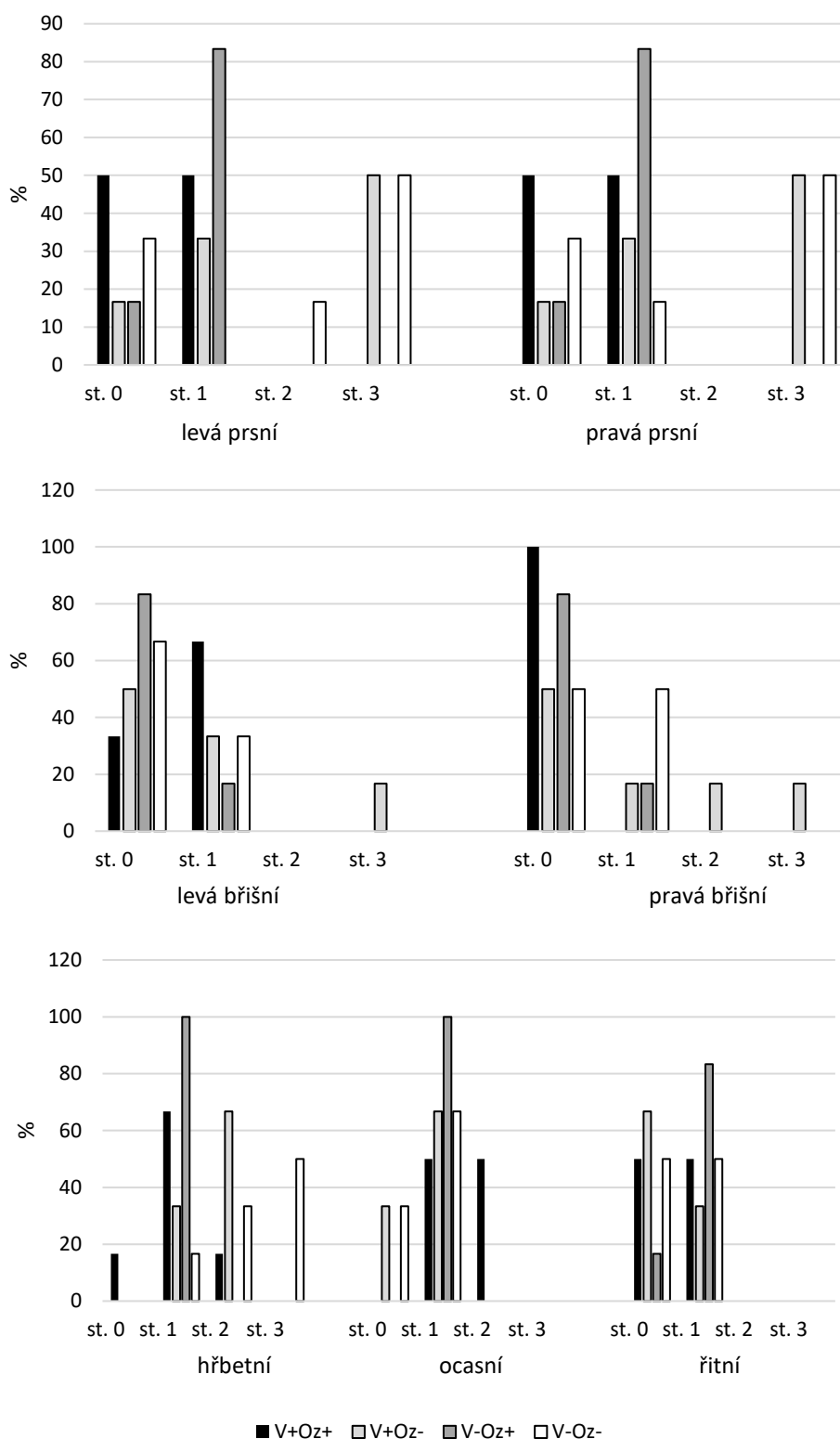
Výsledky sledování v průběhu i na konci testu potvrzují, že ozonizace vody chovného prostředí má prokazatelný pozitivní vliv na eliminaci poškození především prsních ploutví odchovávaných pstruhů duhových v intenzivním chovu.



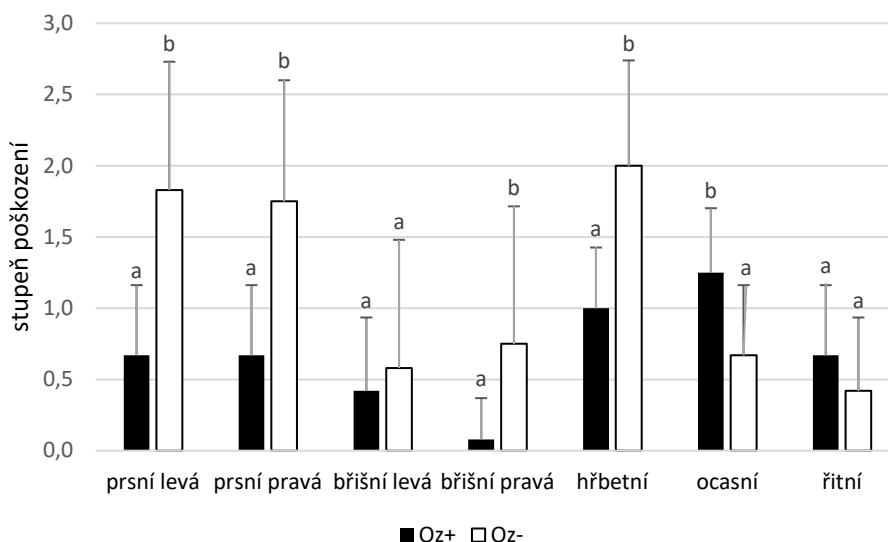
Graf 15. Frekvence výskytu poškození ploutví u odchovaných ryb pstruha duhového krměných krmivem s přídavkem a bez přídavku vitamínů C, A a E a chovaných při ozonizaci či bez ozonizace vody při vyšetření 4.8.2020. Stupeň poškození: 0 = minimální (<5%); 1 = malý (5 - 30%), 2 = průměrný (30 - 70%); 3 = kompletní (> 70%).



Graf 16. Průměrný stupeň poškození ploutví u odchovaných ryb pstruha duhového chovaných při ozonizaci či bez ozonizace vody při vyšetření 4.8.2020. Stupeň poškození: 0 = minimální (<5%); 1 = malý (5 - 30%), 2 = průměrný (30 - 70%); 3 = kompletní (> 70%).



Graf 17. Frekvence výskytu poškození ploutví u odchovaných ryb pstruha duhového krmných krmivem s přídavkem a bez přídavku vitamínů C, A a E a chovaných při ozonizaci či bez ozonizace vody při vyšetření 9.9.2020. Stupeň poškození: 0 = minimální (<5%); 1 = malý (5 - 30%), 2 = průměrný (30 - 70%); 3 = kompletní (> 70%).



Graf 18. Průměrný stupeň poškození ploutví u odchovaných ryb pstruha duhového chovaných při ozonizaci či bez ozonizace vody při vyšetření 9.9.2020. Stupeň poškození: 0 = minimální (<5%); 1 = malý (5 - 30%), 2 = průměrný (30 - 70%); 3 = kompletní (> 70%).

7.2.5 Vyhodnocení stavu a poškození ledvin

Ve sledovaném chovu pstruhů duhových se pravidelně každoročně vyskytuje proliferativní onemocnění ledvin (PKD). Proto bylo v průběhu experimentu (4.8.2020) sledující vliv přidavku vitamínů v krmné dávce a ozonizace vody na chov daných ryb provedeno také vyšetření ledvin se zaměřením na patologické změny typické pro toto onemocnění, které se nejvíce manifestují právě v tomto ročním období. Kromě makroskopického hodnocení klinických příznaků a patologických změn bylo provedeno také sledování zaměřené na průkaz přítomnosti DNA původce onemocnění *T. bryosalmonae* v ledvinách pomocí real-time PCR. Výsledky tohoto sledování jsou uvedeny v Tab. 12.

Poškození ledvin bylo u skupin ryb, kde byla použita ozonizace vody při odběru nižší. Toto je dokladováno diagnostikou PKD pomocí PCR, kdy % pozitivních ryb bylo vždy nižší u skupin ryb, kde byla použita ozonizace vody (Tab. 12). Tomu odpovídá také hmotnostní podíl ledvin (KSI, Tab. 11), který byl u těchto skupin ryb statisticky významně nižší, což koresponduje s jedním z typických příznaků onemocnění PKD (zvětšení ledvin u nemocných ryb). Při porovnání stupně poškození ledvin byl zjištěn statisticky vyšší stupeň jen u skupiny ryb s dotací vitamínů v krmné dávce a bez ozonizace vody (V+Oz-). Jinak ostatní skupiny měly relativně nízké poškození ledvin. To zase napovídá spíše pozitivnímu vlivu ozonizace na stav ledvin (Tab. 12). Závěrem je možné konstatovat, že při porovnání výsledků frekvence výskytu původce onemocnění (% podíl PKD pozitivních ryb dle výsledků PCR) a stupně poškození ledvin u skupin ryb s ozonizací (Oz+) a bez ozonizace vody (Oz-) byly výsledky příznivější u skupin ryb s ozonizací vody (Oz+), avšak bez statistické významnosti (Tab. 12).



Tab. 12. Poškození ledvin a diagnostika PKD u pstruhů duhových během (4.8.2020) dlouhodobého testování přídatku vitamínů v krmné dávce a ozonizace vody.

Skupiny ryb	% podíl ryb postižených PKD podle PCR	Stupeň poškození ledvin	% zastoupení jednotlivých stupňů poškození ledvin						
			st. 0	st. 0,5	st. 1	st. 1,5	st. 2	st. 3	st. 4
V+Oz+	16,67	0,25± 0,418 ^a	66,67	16,67	16,67	0	0	0	0
V+Oz-	33,33	0,83± 0,258 ^b	0	33,33	66,67	0	0	0	0
V-Oz+	0	0,33± 0,408 ^a	50	33,33	16,67	0	0	0	0
V-Oz-	33,33	0,25± 0,418 ^a	66,67	16,67	16,67	0	0	0	0
Oz+	8,33	0,29± 0,396 ^a	58,33	25	16,67	0	0	0	0
Oz-	33,32	0,54± 0,450 ^a	33,33	25	41,67	0	0	0	0
V+	24,99	0,54± 0,450 ^a	33,33	25	41,67	0	0	0	0
V-	16,66	0,29± 0,396 ^a	58,33	25	16,67	0	0	0	0

Vysvětlivky: Kurzívou a tučně jsou zvýrazněné zajímavé statistické rozdíly mezi experimentálními skupinami odchovaných ryb, které jsou komentované v textu zprávy.

7.3 Závěry

Na závěr této aktivity je možné konstatovat, že ošetření vodního prostředí chovného systému pomocí ozonizací vody při odchovu pstruha duhového v intenzivním chovu bez ohledu na obohacení použitých krmiv o vitamíny C, A a E:

- pozitivně ovlivnila produkční parametry týkající se růstu odchovávaných ryb a jejich konverze živin,
- podpořila lepší kondiční a zdravotní stav odchovaných ryb, nález menších jater a ledvin je také interpretován pozitivně,
- běžné ektoparazitární infekce odchovávaných ryb nedokáže zcela potlačit, ale dokáže zlehčit jejich průběh a zajistit vysoké přežívání odchovávaných ryb,
- má pozitivní vliv na snížení poškození ploutví odchovávaných ryb, především nejvíce postižených prsních ploutví,
- pozitivně ovlivnila frekvenci a stupeň poškození ledvin odchovávaných ryb v rámci každoročně opakovaně probíhající infekce PKD (Proliferativní onemocnění ledvin způsobené původcem *T. bryosalmonae*) v chovu.

Díky těmto závěrům se zdá být více účinnější ozonizace vody než obohacování krmiva o vitamíny C, A a E jako použitá profilerační a podpůrná metoda v intenzivním chovu pstruha duhového využívajícího dánský RAS, kde se vyskytují časté problémy s onemocněním PKD.



8 Závěr realizovaného projektu

Zrealizovaný inovační projekt CZ.10.2.101/2.1/0.0/18_013/0000773 „Optimalizace provozu RAS dánského typu zajišťující zvýšenou a kvalitní produkci lososovitých ryb“ ověřil možnosti další technologicko-chovatelské inovace intenzivního chovu pstruha duhového ve venkovních a vnitřních RAS s cílem optimalizovat podmínky chovu a zlepšovat zdravotní kondici chovaných ryb s cílem zvýšit efektivitu, stabilitu a kvalitu produkce těchto ryb, která podpoří budoucí rentabilitu podniků zabývajících se intenzivním chovem ryb. Z výsledků daného projektu je patrné že:

A) Optimalizace denního provozu produkčního systému RAS 1 podniku BioFish, s.r.o., díky výživě ryb krmivy se zvýšeným obsahem vitamínů C, A a E a pravidelnou kontrolou zdravotního stavu ryb došlo k:

- 1) stabilnímu udržování dobrých a stabilních parametrů kvality vody (především obsahu rozpuštěného kyslíku, pH, koncentrace celkového amoniaku a dusitanů) v odchovném systému,
- 2) sníženým úhynům ryb v kritických obdobích,
- 3) vyšší ochraně chovaných ryb před bakteriálními a parazitárními infekcemi
- 4) postupně stoupající celoroční produkci ryb pstruha duhového se zvýšenou rentabilitou chovu.

B) Návrhem nového vnitřního RAS s moderními prvky je možné v budoucnosti zefektivnit odchov juvenilních ryb pstruha duhového s předpokládaným přežitím 63-72 % z váčkového plůdku do kategorie juvenilních ryb o kusové hmotnosti 10 gramů. Tím dojde k navýšení přežití odchovávaných ryb až o 18 – 27 % a především dojde k zajištění plnohodnotné vlastní produkce násady pstruha duhového pro tržní produkci podniku BioFish, s.r.o. Tím se podnik stane nezávislým subjektem v chovu pstruha duhového na ostatních dodavatelích, což může podniku pomoci eliminovat přenos nebezpečných onemocnění ryb z jiných chovů, získávat kvalitní násadové ryby, dosahovat vyrovnané a vyšší produkce násadových a tržních ryb v čase a dosahovat vyšší rentability chovu.

C) Aplikace a využití krmiva s vyšším obsahem vitamínu C, A a E při odchovu pstruha duhového v intenzivním chovu využívající vnitřní uzavřený RAS:

- neměla vliv na růst a přežití odchovávaných ryb a konverzi předkládaných živin,
- způsobila nižší hmotnostní podíl jater, sleziny a tuku v těle odchovaných ryb, což může souviset s lepší a vyrovnanější zdravotní kondicí odchovaných ryb bez výrazných patologických změn u zmíněných tkání,
- neměla vliv na zdravotní stav odchovávaných ryb,
- měla příznivý vliv na nižší poškození prsních ploutví, levé břišní a ocasní ploutve,
- neměla jednoznačný pozitivní vliv na úplné potlačení výskytu PKD,
- neměla jednoznačný vliv na hematologické ukazatele krve odchovávaných ryb,
- pozitivně snížila koncentraci glukózy a triglyceridů v krvi odchovávaných ryb čímž snižuje jejich stres a podporuje normální průběh metabolismu lipidů v jejich těle,
- měla pozitivní vliv na vyšší připravenost ryb odolávat případnému oxidativnímu stresu a porušení lipidového metabolismu, který může vést až k ceroidní degradaci jater.
- způsobila několikanásobně vyšší obsah a koncentraci vitamínů C, A a E v játrech, ledvinách a svalu odchovaných ryb.



EVROPSKÁ UNIE
Evropský námořní a rybářský fond
Operační program Rybářství



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

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

D) Využitím ozonizace vody jako způsobu sterilizace vodního prostředí RAS je možné bez ohledu na obohacení použitých krmiv o vitamíny C, A a E při odchovu pstruha duhového v intenzivním chovu:

- pozitivně ovlivnit produkční parametry týkající se růstu odchovávaných ryb a jejich konverze živin,
- podpořit výživovou a zdravotní kondici odchovaných ryb,
- omezit výskyt parazitárních infekcí, zajistit jejich lehčí průběh a přinést tak vysoké přežívání odchovávaných ryb,
- snížit výskyt poškození ploutví odchovávaných ryb, především prsních ploutví,
- snížit frekvenci a stupeň poškození ledvin odchovávaných ryb v rámci každoročně opakovaně probíhající infekce PKD (Proliferativní onemocnění ledvin, způsobené původcem *T. bryosalmonae*).



EVROPSKÁ UNIE
Evropský námořní a rybářský fond
Operační program Rybářství



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

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

9 Seznam další doprovodná fotodokumentace



Obr. 1. Odlov ryb pro stanovení biometrických ukazatelů a kontrolu zdravotní kondice pstruhů duhových v produkčním podniku BioFish s.r.o. nedaleko Pravíkova.



Obr. 2. Manipulace se pstruhy duhovými v rámci stanovení biometrických ukazatelů a kontroly zdravotní kondice pstruhů duhových v produkčním podniku BioFish s.r.o. nedaleko Pravíkova.



Obr. 3. Stanovení biometrických ukazatelů u odchovávaných pstruhů duhových v produkčním podniku BioFish s.r.o. nedaleko Pravíkova.



Obr. 4. Příprava na odběr vzorků tkání pstruhů duhových v experimentálním rybochovném zařízení FROV JU ve Vodňanech.



Obr. 5. Odběr krve u pstruha duhového v průběhu realizace projektu.



Obr. 6. Odběr vzorků tkání pstruhů duhových v experimentálním rybochovném zařízení FROV JU ve Vodňanech.



EVROPSKÁ UNIE
Evropský námořní a rybářský fond
Operační program Rybářství



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

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



Obr. 7. Zpracování nativní krve u pstruha duhového v průběhu realizace projektu.