

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Laboratoř intenzivní akvakultury

Masová produkce vířníků (*Brachiounus plicatilis*) a jejich
využití k odchovu larev candáta obecného (*Sander lucioperca* L.):
praktický průvodce

C. Yanes-Roca, V. Profant, T. Polícar

No:

Vodňany

2020

Vydání a tisk publikace byly uskutečněny v rámci Operačního programu Rybářství 2014–2020 a následujících projektů:

NAZV projekt QK1820354 Technická a technologická inovace intenzivních chovů ryb založená na nových znalostech – 70 %

NAZV projekt QK1810296 Využití alternativních komponent a inovativních postupů ve výživě ryb – 30%

OBSAH

1. ÚVOD	3
2. CÍL TECHNOLOGIE	10
3. MÍSTO OVĚŘOVÁNÍ TECHNOLOGIE	10
4. POPIS TECHNOLOGIE	10
4.1 Vytvoření vlastní zásobní kultury	11
4.2 Počáteční odchov vířníků	12
4.3 Produkce vířníku ve statickém (dávkovém) systému	13
4.4 Produkce vířníků ve vysokokapacitním systému	15
4.5 Odběr vířníků z vysokokapacitního systému	17
4.6 Obohacování vířníků za účelem zvýšení nutričních hodnot	18
4.7 Odkrm larev candáta obecného pomocí vířníku a výhody této metody	21
5. EKONOMICKÉ PŘÍNOSY TÉTO TECHNOLOGIE	22
6. VYUŽITÍ TÉTO TECHNOLOGIE K PRODUKCI RYB V ČESKÉ REPUBLICE.....	22
7. SEZNAM LITERATURY	23

1. Úvod

Vířníci jsou běžně nabízeni larvám ryb v průběhu prvních 7-30 dní exogenní výživy. Předkládaná hustota vířníků ovlivňuje množství a frekvenci krmení, potravní chování a následně rychlost a efektivitu růstu u larev. Druh vířníka *Brachionus plicatilis* může být využíván v potřebných koncentracích, které jsou důležité pro splnění metabolických požadavků larev, což vede k jejich vysokému přežití při odchovu (Fukusho, 1989). Živé potravní organismy mohou také obohatit a zlepšit trávicí procesy u larev dravých druhů ryb. Na začátku exogenní výživy larev jsou používány malé druhy vířníků a s následným růstem larev se pomalu přechází na větší druhy. Vířníci jsou zároveň považováni za jakési živé potravinové kapsle pro přenos živin do larev ryb (Léger a kol., 1989). Tyto živiny zahrnují především vysoce nenasycené mastné kyseliny (hlavně 20: 5n-3 a 22: 6 n-3), které jsou nezbytné pro přežití larev u mořských druhů ryb (Lubzens a kol., 1989) a larev candáta obecného (*Sander lucioperca*; Yanes-Roca a kol., 2018).

Vířníci jsou jako potravní organismy v akvakultuře úspěšně využíváni po několik desetiletí. Z tohoto důvodu je dnes známo několik kultivačních technik pro intenzivní produkci vířníků. Tyto techniky jsou využívány po celém světě (Hirata, 1979). Dostupnost velkého množství těchto živých potravních organismů přispěla k úspěšné produkci larev více než 60 druhů mořských ryb a 18 druhů korýšů (Lubzens a kol., 1989). Klíčem k úspěšné kultivaci vířníků je jejich vysoká adaptabilita a efektivita chovu. Dále je úspěšná kultivace potravních organismů závislá i na dalších faktorech, jako je jejich planktonní chování, tolerance k široké škále podmínek prostředí (teplota, pH, salinita, amoniak atd.) a vysoká plodnost a rychlá reprodukce (Hoff a Snell, 1987).

Hlavními výhodami je jejich malá velikost a pomalý pohyb při plavání. Tyto vlastnosti z nich činí vhodnou a snadno získatelnou kořist potažmo potravu pro primitivně vyvinuté larvy ryb, u kterých na začátku exogenní výživy neustále dochází k absorpci žloutkového vaku. Vířníci se využívají u malých a primitivně vyvinutých larev, jelikož tyto larvy na začátku exogenní výživy nedokážou ulovit větší naupliová stadia zábronožky *Artemia* sp, která se při akvakulturním odchovu větších a vyvinutějších larev ryb běžně využívají. Největším potenciálem masové a řízené kultivace vířníků je však možnost odchovávat tyto organismy ve velmi vysokých hustotách s relativně nízkými výrobními náklady (Lubzens a kol., 1989).

1.1 Morfologie

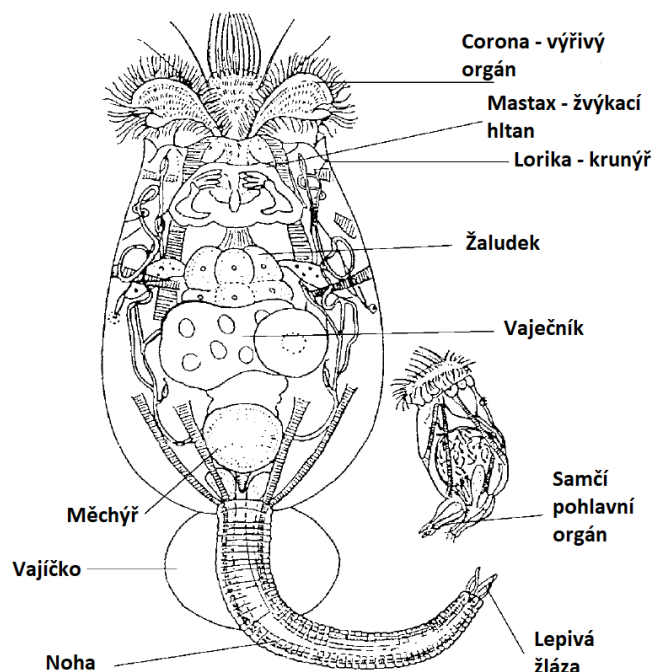
Vířníci (*Rotifera*) patří mezi nejmenším mnohobuněčné organismy, z nichž více jak 1000 druhů bylo vědecky popsáno a zhruba 90 % z nich obývá sladkovodní prostředí.

1.1.1 Velikost

Samci jsou méně vyvinutí a menší než samice. U některých druhů velikost samců dosahuje pouze 60 μm . Tělo vířníků je složeno z konstantního počtu buněk, což je typické pro všechny druhy. Některé druhy *Brachionus* obsahují přibližně 1000 buněk, které nejsou od sebe zřetelně ohraničeny a separovány, ale jsou součástí plazmy v těle vířníků. Samci nemají trávicí trakt ani plynový měchýř, ale mají jedno proporcionální varle, která je naplněna spermiemi.

1.1.2 Struktura těla

Tělo vířníků se skládá ze tří částí: z hlavy, trupu a nohy (Obr. 1).



Obr. 1: Vířník (*Brachionus plicatilis*) anatomie (upraveno dle Fukusho, 1989).

Hlava: nese rotující orgán nebo coronu, která je snadno rozpoznatelná pomocí věnců brv, ze kterých vychází původní název vířníků (kolová ložiska). Zatahovací corona zajišťuje pohyb a víření vody, což usnadňuje vířníkům přijímat drobnou potravu (hlavně řasy a detrit).

Trup: obsahuje trávicí trakt, vylučovací systém a pohlavní orgány. Charakteristickým orgánem pro vířníky je mastax – svalnatý hltan, který drtí přijatou potravu, s chitinózními výstupky.

Noha: se zatahovací strukturou prstencového typu, bez segmentace, s jedním nebo čtyřmi prstovými výběžky na konci.

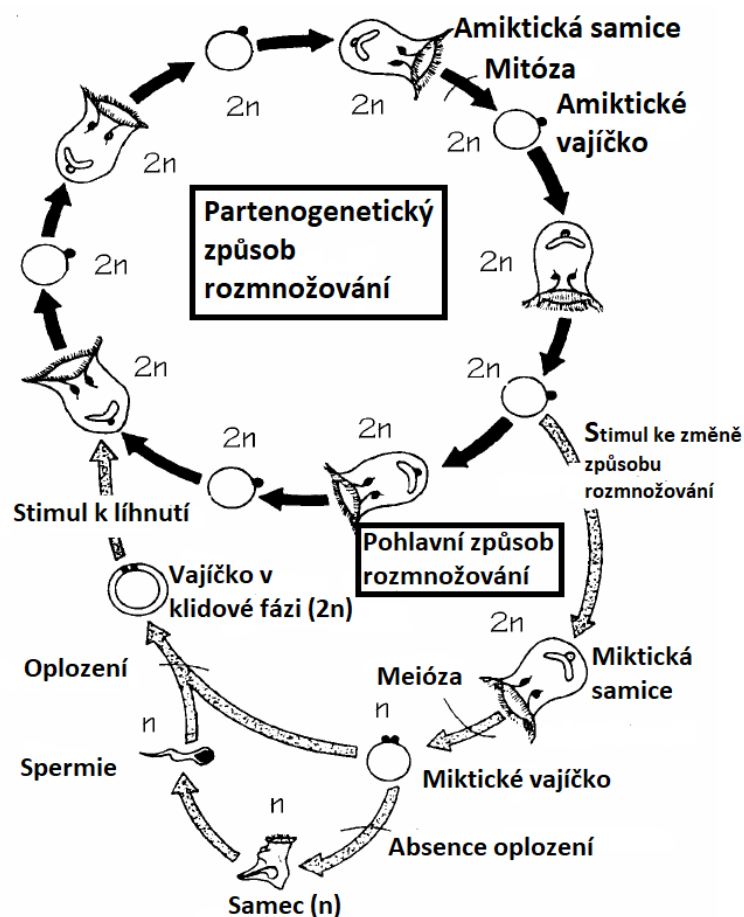
1.2. Reprodukce

Životní cyklus vířníka *Brachionus plicatilis* může být charakterizován dvěma různými cykly reprodukce, kdy prvním z nich je pohlavní způsob rozmnožování a druhým je partenogenetický způsob rozmnožování (Obr. 2.). V průběhu partenogeneze, amiktické samice produkují amiktická vajíčka (diploidní s $2n$ chromozomy), které se poté líhnou a vyvíjejí opět jako amiktické samice. Za specifických (především neoptimálních) podmínek prostředí, samice přecházejí na složitější způsob reprodukce, což vede ke vzniku populace miktických a amiktických samic. Ačkoli nejsou tyto samice rozlišitelné morfologicky, miktické samice produkují haploidní vajíčka ($1n$ chromozomy). Larvy, které se vylíhnou z těchto neoplozených miktických vajíček, se vyvíjejí v haploidní samce (Fukusho a Iwamoto, 1981).

Po oplození samice samčími spermiemi vznikají vajíčka - cysty v klidové fázi (vajíčko v průběhu této fáze, je odolné vůči nepříznivým podmínkám), ze kterých se po dosažení specifických vhodných podmínek prostředí líhnou a vyvíjí pouze v amiktické samice. Línutí amiktických samic

je výsledkem zlepšených podmínek prostředí, popřípadě vytvoření optimální podmínek prostředí jako je teplota vody, salinita vody nebo zvýšení potravní nabídky. Je důležité si také uvědomit, že sexuální a partenogenetický cyklus vířníků je také ovlivněn vlastní hustotou chovaných vířníků v dané populaci. Platí pravidlo, že hustota kolem 200 ks vířníků.ml⁻¹ je typická pro sexuální cyklus a 150 ks vířníků.ml⁻¹ pro asexuální (partenogenetický) cyklus (Dhert a kol., 1995).

Ačkoli mechanismus klidové fáze života vířníků není zcela objasněn, obecně se předpokládá, že produkce trvalých vajíček pro klidovou fázi je u vířníků strategií pro přežití populací v nepříznivých podmínkách prostředí, jako je sucho nebo zima (Hagiwara a kol., 1995).



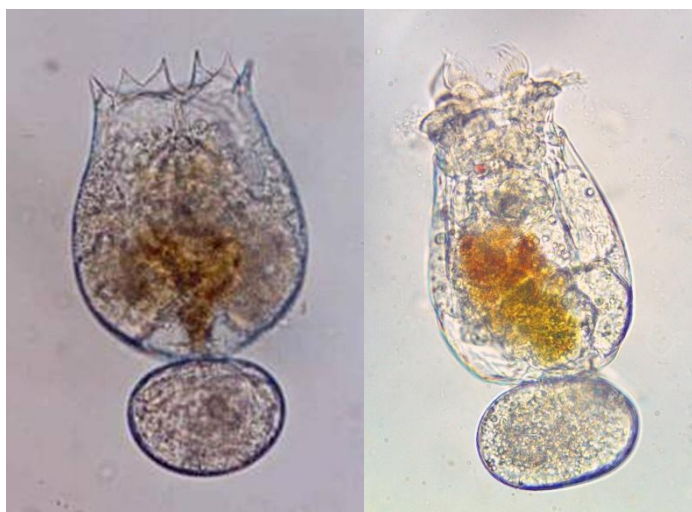
Obr. 2: Reprodukční cyklus vířníků (upraveno dle Fukusho, 1989).

1.3. Druhy vířníků

V akvakultuře se používá jednoduchá klasifikace vířníků, která je založena na dvou různých morfologických typech. Mezi malé druhy vířníků (S-typ) patří například *Brachionus rotundiformis* a naopak mezi velké druhy vířníků (L-typ) pak *Brachionus plicatilis* (Obr. 3; Fu a kol., 1991). Rozdíly mezi těmito dvěma typy lze odlišit podle jejich morfologických vlastností: délka krunýře je u typu

L v rozmezí od 130 do 340 μm (s průměrem 239 μm) u typu S pak v rozmezí od 100 do 210 μm (s průměr 160 μm ; Fukusho a Iwamoto, 1981).

Vedle typů S a L jsou tropické akvakultuře ještě upřednostňovány vírníci typu SS (super malé) jakožto první exogenní výživa pro larvy ryb, které mají velmi malý ústní otvor jako jsou králičkovcovití (*Siganus* sp.), kanicovití (*Epinephelus*, *Mycteroperca* sp.) a další druhy ryb. U těchto druhů dosahují larvy na počátku exogenní výživy velikosti těla menší než 1 mm. Vírníci typu SS však nejsou geneticky izolovány od typu S, ale jsou pouze menšími poddruhy než jsou běžné poddruhy vírníků typu S. S a L morfologické typy se také liší v optimální teplotě k růstu. Pro typ S je optimální teplota 28-35 °C, zatímco typ L vyžaduje pro optimální růst teplotu 18-25 °C. Vzhledem k tomu, že často dochází ke kontaminaci kultur jednotlivých morfologických typů vírníků, může být k získání čistých kultur použito snížení nebo zvýšení teploty vody v průběhu odchovu vírníků. Výsledkem potom je čistá populace vírníků, kteří mají toleranci k vyšší nebo k nižší teplotě vody (Fu a kol., 1991).



Obr. 3: *Brachionus rotundiformis* a *Brachionus plicatilis* (Hirata, 1979).

1.4 Optimální podmínky pro kultivaci *Brachionus plicatilis*

1.4.1. Salinita

I když vírníci *Brachionus plicatilis* snášejí široký rozsah salinity od 1 do 97 ppt (gram na litr). Optimální reprodukce probíhá pouze při salinitě pod 35 ppt (Lubzens a kol., 1989). Pokud jsou vírníci používány ke krmení larev ryb, které jsou chovány při jiné salinitě, která je rozdílná od jejich chovu o ± 5 ppt, je vhodné vírníky alespoň částečně aklimatizovat na tyto jiné podmínky. Rychlý a razantní šok způsobený rozdílnou salinitou vody může snižovat pohyb vírníků, nebo může vést až k jejich úhynu (Imantai a kol., 2019b).

1.4.2. Teplota vody

Jak již bylo uvedeno výše, volba optimální teploty vody pro kultivaci a odchov vírníků závisí na daném morfologickém typu daných vírníků. Vírníci typu L se chovají při nižších teplotách (v průměru 22 °C), naopak vírníci typu S při vyšších teplotách (v průměru 27 °C). Obecně platí, že s rostoucí optimální teplotou vody se zvyšuje reprodukční aktivita vírníků a zároveň se také zvyšují požadavky na nabídku krmení. Ovšem je nutné si uvědomit, že krmení vírníků je jeden z nejdůležitějších a nejvyšších produkčních nákladů spojených s odchovem a produkcí vírníků. Z hlediska rentability a efektivity chovu larev ryb je proto důležité zvolit optimální teplotu vody pro produkci vírníků, která bude podporovat rychlou a masovou produkci těchto potravních organismů s minimálními produkčními náklady. Vyšší teplota vody může totiž často vést k překrmování nebo k hladovění odchovávaných vírníků, což má přímý negativní vliv na produkci vírníků a kvalitu vody při jejich chovu. Naopak nižší teplota vody zpomaluje růst populace vírníků a snižuje celkovou jejich produkci (Fukusho, K, 1989; Tab. 1).

Tab. 1: Vliv teploty na embryonální vývoj a reprodukční aktivitu vírníků druhu *Brachionus plicatilis* (Ruttner-Kolisko, 1972).

Teplota vody (°C)	15 °C	20 °C	25 °C
Doba embryonálního vývoje (dny)	1,3	1,0	0,6
Doba první reprodukce u mladých samic (dny)	3,0	1,9	1,3
Interval mezi dvěma následujícími reprodukci (hodiny)	7,0	5,3	4,0
Délka života (dny)	15	10	7
Počet vajíček od jedné samice v průběhu životního cyklu	23	23	20

1.4.3 Rozpuštěný kyslík

Vírníci mají vysokou toleranci k nízkým koncentracím rozpuštěnému kyslíku (2 mg.l⁻¹), ale optimální koncentrace by se měla pohybovat na úrovni mezi 5 až 10 mg.l⁻¹. Provzdušňování by mělo být mírné a konstantní, aby se zabránilo mechanickému poškození vírníků a bylo však zároveň vytvořeno ideální nasycení vody rozpuštěným kyslíkem (Ruttner-Kolisko, 1972).

1.4.4. pH

Vírníky je optimální odchovávat při pH nad 6,6. Nejlepších výsledků je dosahováno při pH nad 7 (Bentley a kol., 2008; Epp a Winston, 1978; Hirata, 1979).

1.4.5. Kontaminace chované kultury vírníků

Bakterie

Většina bakterií není pro vírňíky patogenní. Avšak bakteriální kontaminaci a rozšíření bakterií v kultuře vírňíků je nutné se vyvarovat, jelikož bakterie v kultuře vírňíků způsobují skutečné riziko v kumulaci jejich biomasy a v postupné inhibici biologických a fyziologických procesů u vírňíků. Bakterie, které kontaminovaly vírňíky, mohou negativně působit i přes potravní řetězec na larvy odchovávaných ryb. Tyto negativní vlivy se u odchovávaných larev na začátku jejich exogenní výživy projevují sníženým růstem a přežití ryb způsobené poruchami trávení a vývojem trávicího traktu larev.

Naopak některé bakterie mohou být pro vírňíky dalším doplňkovým potravním zdrojem, jako jsou například bakterie rodu *Pseudomonas* nebo *Acinetobacter* (Skjermo a Vadstein, 1993). Dále bakterie rodu *Vibrio* (Verdonck a kol., 1994) jsou nejčastěji se vyskytující bakteriální flórou v kultuře vírňíků. Vírňíci často tyto bakterie využívají jako doplňkové potraviny. Avšak hustota těchto bakterií je mezi různými odchovnými systémy vírňíků v jednotlivých rybích líhních velmi rozdílná. Proto je výživa vírňíků především realizována díky předkládaným řasám (kapitola 1.6). Rychlé podpory kultivované populace vírňíků je možné dosáhnout, pokud se kultury vírňíků obohacují o bakteriální kultury rodů *Cytophaga/Flavobacterium*, nebo *Pseudomonas/Alcaligenes* (Skjermo a Vadstein, 1993).

Množství a hustota bakterií v kultuře vírňíků může být snadno kontrolována pomocí řízené (většinou snížené) teploty vody po obohacení kultury vírňíků zmíněnými bakteriemi nebo při uchovávání vírňíků před vlastním zkrmením larvám ryb, kdy vírňíci nejsou drženi v optimálních životních podmínkách. Bakteriální infekci vírňíků lze také eliminovat aplikací probiotických bakterií, které se aplikují přímo do produkované kultury vírňíků (Gatesoupe, 1999). V tomto případě jako probiotika označujeme živé mikrobiální doplňky krmiva, která příznivě ovlivňují hostitelský organismus (v našem případě vírňíky) tím, že zlepšují jejich střevní mikrobiální rovnováhu (Fuller, 1989). Jestliže se k výživě larev ryb využili vírňíci pozitivně ovlivnění živými probiotickými bakteriemi, tak bylo prokázáno, že tato výživa larev zlepšuje jejich zdravotní stav a zvyšuje jejich odolnost vůči patogenům a nemocem. Výživa larev ryb pomocí vírňíků, kteří jsou obohaceni o probiotické bakterie, pozitivně ovlivňuje gastrointestinální mikrobiotickou flóru a celkovou imunitu larev ryb (Gatesoupe, 1999). Probiotické bakterie skrze výživu vírňíky umožní odchovávaným larvám nastartovat obranné mechanismy imunitního systému, které brání množení patogenních bakterií v těle larev ryb (Vanbelle a kol., 1990).

Nálevníci

Nejčastěji se vyskytujícími nálevníky v produkované kultuře vírňíků jsou přítomny rody *Holotricha* a *Hypotricha* (např. *Uronema* sp. a *Euplotes* sp.). Přítomnost většiny nálevníků není v kultuře vírňíků žádoucí, jelikož nálevníci potravně konkurují kultivovaným vírňíků, což může způsobovat zvýšené produkční náklady. Výskyt nálevníků v kultuře vírňíků je obecně způsoben neoptimálními podmínkami prostředí v průběhu kultivace vírňíků. Vírňíci jsou při takovýchto podmínkách v horší kondici a mají sníženou obranyschopnost a konkurenceschopnost vůči výskytu konkurenčních organismů. Nálevníci také v kultuře vírňíků produkují metabolické odpady, které zvyšují koncentraci dusitanů ve vodě a způsobují snížení pH. Nicméně nálevníci mají pozitivní vliv na čištění kultur vírňíků od vyskytujících se bakterií a detritu. Přidáním nízké koncentrace formaldehydu o koncentraci 36 – 38% (0,02 ml.l⁻¹) do nádrže, kde probíhá kultivace řas (Fukusho, 1989), v době 24 hodin před aplikací řas (jako potraviny) do kultury vírňíků, lze významně snížit kontaminaci vírňíků prvoky. Při kontrole a čištění kultury vírňíků pomocí sterilních

a vydezinfikovaných fytoplanktonních sítěk (s oky menšími než 50 µm), lze také snížit koncentraci nálevníků nebo bakteriálních kontaminací u produkované populace vířníků. Zároveň tato technika může být použita jako preventivní opatření, které může být použito při založení nových startovacích kultur vířníků, kdy tyto kultury jsou velmi náchylné na jakékoliv kontaminace nálevníky či bakteriemi (Fukusho, 1989).

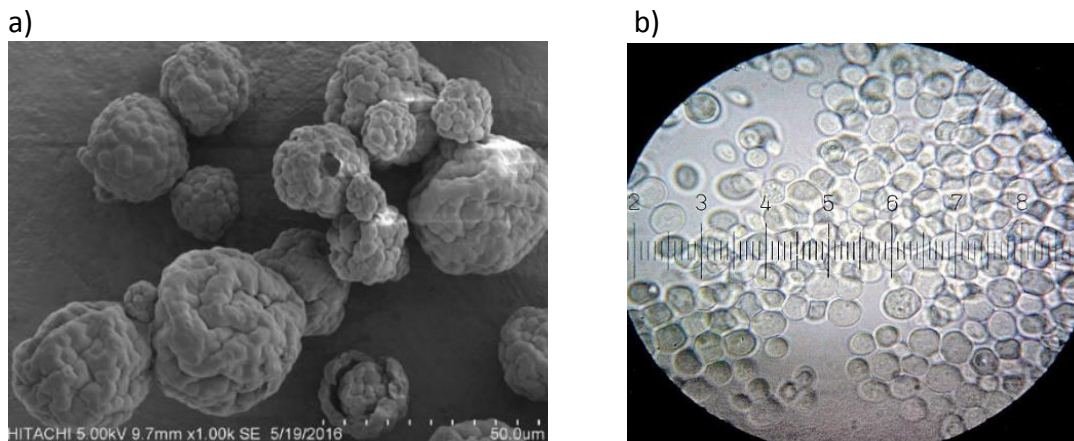
1.5 Ostatní druhy kultivovaných vířníků

Dalšími druhy vířníků, které jsou nejčastěji kultivováni a produkováni k výživě larev ryb v rámci sladkovodní akvakultury, jsou následující sladkovodní druhy: *Brachionus calyciflorus* a *Brachionus rubens*. Tyto druhy tolerují teplotu vody mezi 15 až 31 °C a jsou poměrně tolerantní ke zvýšené koncentraci iontů v odchovávané vodě. Toho se využívá při jejich kultivaci. Tito vířníci jsou produkováni ve vodě s vyšší salinitou nebo v uměle připravovaném médiu. Tato technika ochraňuje chov sladkovodních vířníků před bakteriální kontaminací či kontaminací nálevníky. Avšak koncentrace celkového amoniaku v rozmezí 3 až 5 mg.l⁻¹ inhibuje reprodukci a tím celý chov zmíněných sladkovodních vířníků.

Brachionus calyciflorus může být kultivován a produkován v uměle připraveném médiu o složení: 96 mg NaHCO₃, 60 mg CaSO₄.2H₂O, 60 mg MgSO₄ a 4 mg KCl v 1 l destilované vody s optimálním pH vody 6-8, teplotou vody 25 °C a minimální koncentrací kyslíku 1,2 mg.l⁻¹ (Hirata, 1979).

1.6. Krmení vířníků

Úspěšný odchov vířníků druhů *Brachionus plicatilis*, *Brachionus calyciflorus* a *Brachionus rubens* byl realizován díky výživě v podobě živých produkovaných kultur mikrořas druhu *Scenedesmus costato-granulatus*, *Kirchneriella contorta*, *Phacus pyrum*, *Ankistrodesmus convoluus*, *Nannochloropsis oculata* a *Chlorella* sp., stejně tak i kvasinek. Avšak kvasinky jsou méně vhodné z hlediska jejich nutriční hodnoty a nebezpečí kontaminace kultury vířníků bakteriemi či nálevníky. Kontinuální produkce živých kultur řas je poměrně časově, prostorově a technologicky náročná. Z tohoto důvodu se v produkci a kultivaci vířníků využívají komerčně využívaná krmiva (koncentrované emulze), které představují dlouhodobě uchované kultury mikrořas. Pro efektivní a úspěšnou kultivaci vířníků v kontrolovaných podmínkách lze například úspěšně využít umělá komerční krmiva od značek Culture Selco® (Inve Aquaculture, Belgie) nebo Roti-Rich (Florida Aqua Farms Inc., USA).



Obr. 4: a) *Chlorella* sp. (Zakaria a kol., 2017); b) Kvasinky (FAO, 2016)

2. Cíl technologie

Cílem této ověřené technologie je popsat a úspěšně zrealizovat masovou kultivaci vířníků druhu *Brachionus plicatilis*, kteří se následně využijí k produkci larev candáta obecného v rámci intenzivního chovu využívající recirkulační akvakulturní systém (RAS). Larvy candáta obecného mají na začátku příjmu exogenního potravy velmi malý ústní otvor. Tento faktor je velice problematický s ohledem na následný odchov larev, jelikož larvy musí být krmeny velmi malými živými organismy, které mají optimální pohyb, hustotu a přijatelný obsah živin. Pouze tyto předpoklady mohou zvýšit přežití larev candáta obecného v kontrolovaných podmínkách a zajistit tak jeho rostoucí produkci v akvakultuře a zároveň zvýšit rentabilitu a konečný zisk farem zabývající se produkcí tržních či násadových candátů. Tato ověřená technologie může být také užitečná a využitelná pro rozvoj intenzivní akvakultury okrasných tropických druhů ryb či některých dalších nových druhů ryb, které se využívají ke zvýšené diverzifikaci vnitrozemské sladkovodní akvakultury v Evropě a mají stejné biologické nároky jako larvy candáta obecného (*Sander lucioperca*).

3. Místo ověřování technologie

Popsaný technologický proces v této publikaci byl ověřen ve spolupráci s výzkumnými pracovníky z Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (FROV JU) a chovateli ryb ze společnosti Tilapia s.r.o. v Táboře a Nuzbelích v roce 2019. Masová kultivace vířníků (*Brachionus plicatilis*) byla testována a optimalizována především ve výzkumném zařízení pro potravní organismy v rámci Laboratoře intenzivní akvakultury (FROV JU) (Obr. 5). Tento technologický proces byl aplikován a modifikován na základě několika dříve publikovaných metodik a vědeckých publikací o masové kultivaci vířníků. Konkrétně se jednalo o publikace následujících autorů: Fukuso (1989), Hoff a Snell (1987) a Hirata (1979).

4. Popis technologie

4.1 Vytvoření vlastní zásobní kultury

Populace vírníků *Brachionus plicatilis* pro vytvoření zásobní kultury pocházela od firmy Florida Aqua farms s.r.o., která působí v Ruskin na Floridě (USA). Po obdržení cyst a jejich vylíhnutí při optimálních podmínkách bylo inokulum vydezinfikováno antibiotiky (erythromycin 10 mg.l⁻¹ po dobu 15 min.). Dezinfekce populace vírníků spočívala v zabití volně plavajících jedinců, ale nedotkla se vajíček, které se v daném okamžiku vyskytovaly v populaci. Další alternativou dezinfekce bylo ošetření pomocí chloramfenikolu 10 mg.l⁻¹, kyseliny oxolinové 10 mg.l⁻¹, penicilinu 100 mg.l⁻¹, streptomycinu 20 mg.l⁻¹, furazolidonu 7,5 mg.l⁻¹, oxytetracyklinu 10 mg.l⁻¹, sarafloxacinu 30 mg.l⁻¹ nebo linco-spectinu 30 mg.l⁻¹ opět po dobu 15 min. Vajíčka byla poté před inkubací oddělena od mrtvých vírníků pomocí síta o velikosti ok 50 µm. Po následném vylíhnutí vírníků z vajíček byli tito vírníci použity pro založení vlastní zásobní kultury, která byla potencionálně prostá jakýchkoliv patogenů.

Tato kultura vírníků byla uchovávána v termo-aklimatizovaném boxu (možné bylo také použít místnost) se stabilní teplotou vzduch 28 °C ± 1 °C. Základní odchov probíhal v centrifugačních zkumavkách (50 ml), které byly nejdříve autoklavovány a poté umístěny do nízko rychlostní odstředivky (Sorvall ST8, Thermo Scientific) s rychlostí otáček 4 rpm. Odchov vírníků probíhal při rotaci, při které byla voda míchána se vzduchem (± 8 ml), což poskytovalo dostatečné nasycení rozpuštěného kyslíku ve vodě. Ve vzdálenosti 20 cm od rotujících zkumavek byl umístěn zdroj světla v podobě dvou zářivek s intenzitou světla 3000 luxů měřené v těsné blízkosti zářivky.

Voda určená ke kultivaci vírníků byla získána rozpuštěním mořské soli (Instant Ocean Sea Salt) v pitné vodě na finální salinitu 25 ppt (25 gramů na jeden litr vody). Připravená voda byla následně provzdušněna klasickým akvarijním vzduchováním, přefiltrována přes filtrační papír s jemností filtrace na úrovni 1 µm a přes noc byla ještě vydezinfikována chlornanem sodným (NaClO) o koncentraci 5 mg.l⁻¹. Druhý den byl nadbytek NaClO ve vodě neutralizován a voda byla filtrována přes ultra jemný filtr s jemností filtrace 0,45 µm.

Naočkování větších zkumavek o objemu 150 ml, které byly naplněny pouze 20 ml připravené kultivační vody, inokulem vírníků se provádělo s počáteční hustotou vírníků na úrovni 2 ks.ml⁻¹. Vírníci byly krmeny čerstvě nakultivovanou sladkovodní řasou *Chlorella* sp., která byla získána z vědeckého pracoviště Mikrobiálního ústavu AV ČR v.v.i., Centra Algotech, Laboratoře řasové biotechnologie v Třeboni. Získané řasy byly odstředěny a koncentrovány na hustotu 1-2.10⁸ buněk.ml⁻¹. Koncentrát řas byl uchováván pro postupné použití při teplotě 4 °C v chladničce po dobu 6 dní, což se shodovalo s jedním odchovným cyklem u vírníků. Každý den byl koncentrát řas homogenizován třepáním a do každé zkumavky k inokulu vírníků bylo přidáváno 200 µl roztoku řas. Po jednom týdnu se hustota vírníků zvýšila ze 2 na 200 ks.ml⁻¹. Malá část této kultury byla použita pro udržení zásobní kultury a zbývající část vírníků se využila pro následný masový odchov.

Zásobní kultura byla i nadále udržována jako zdroj nového inokula vírníků v případě kolapsu již odchovávané masové kultury. Po několika měsících odchovu zásobní kultury, byla tato kultura opět vydezinfikována stejným způsobem, jak již bylo popsáno dříve, s cílem udržet čistou a zdravotně nezávadnou zásobní kulturu vírníků pro případné nové založení masové produkce. Hlavním důvodem této praxe byla skutečnost, že i přesto že byla masová kultura vírníků *Brachionus plicatilis* odchovávaná v kontrolovaných podmínkách (detailní popis níže) a optimální stav kultury byl pravidelně udržován a kontrolován, nebylo možné vyloučit riziko nežádoucí

bakteriální či nálevníkové kontaminace, která by mohla potencionálně ohrozit celou produkci vířníků.

4.2 Počáteční odchov vířníků

Vířníci ze zásobní kultury byly přeneseni a umístěni do kádinky o objemu 150 ml, která byla na začátku kultivace naplněna 20 ml připravené kultivační vody o salinitě 25 ppt a teplotě 25 °C. Nasazení vířníci byli vystaveni kontinuálním světelným podmínkám po dobu 24 hodin denně při intenzitě světla 1000 luxů. Reprodukce nasazených vířníků začala probíhat po 24 hodinách od nasazení a v tento okamžik byla do kádinky přidána koncentrovaná a zakonzervovaná kultura řasy druhu *Nannochloropsis occulata* v podobě přípravku Nanno 3600 od firmy Reed Mariculture s.r.o., USA.



Obr. 5. Systémy pro odchov vířníků v Laboratoři intenzivní akvakultury, Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (foto Yanes-Roca).

Po dalších 24 hodinách bylo přidáno do kultivační kádinky větší množství řas v podobě přípravku Nanno 3600 (přibližně 1,5 násobné množství oproti počátečnímu dávkování řasy) a po 48 hodinách byla kultura vířníků rozdělena po 5 mililitrech do 4 zkumavek o jednotném objemu 20 ml. Následně bylo do každé ze zkumavek přidáno 15 ml nové kultivační vody, aby byly všechny zkumavky naplněny ze 100% (Obr. 6). Vířníci byli krmeni standardní dávkou 1 ml koncentrovaného přípravku Nanno 3600 na jeden litr kultury vířníků. To znamená, že do každé zkumavky s 20 ml bylo aplikováno 0,02 ml přípravku Nanno 3600. Po 5 dnech byli vířníci ze 4 zkumavek přesunuty do nové kádinky o objemu 250 ml, která byla doplněna kultivační vodou po

rysku 240 ml (2,4 násobný objemu oproti předcházejícímu objemu všech zkumavek). Pro kontrolu před nasazením vířníků do větší kádinky byly odebrány čtyři vzorky vířníků o objemu 1 ml z každé zkumavky a následně byla spočítána a zaznamenávána průměrná hustota vířníků pomocí laboratorního mikroskopu a počítací komůrky. Průměrná hustota vířníků ve zkumavkách byla $234 \pm 58 \text{ ks.ml}^{-1}$. Tzn. nasazovaná hustota vířníků v 240 ml vířníkové kultury byla $97,5 \text{ ks.ml}^{-1}$. O pět dní později byla hustota vířníků sledována a zaznamenána stejným způsobem ve 240 ml kultury vířníků a průměrná hustota byla 351 ks.ml^{-1} . V tomto období byla kultura přenesena do 2,5 litrové baňky o skutečném objemu 2 litry (Obr. 6).



Obr. 6. Rozšiřování chovaných kultur vířníků (foto Yanes-Roca).

4.3 Produkce vířníku ve statickém (dávkovém) systému

Následně byl odchov vířníků realizován ve statickém systému, který byl na začátku tvořen zmíněnou 2,5 litrovou baňkou s využitým objemem vířníkové kultury o 2000ml, které byly lehce provzdušňovány. Za touto baňkou byla umístěna zářivka o intenzitě světla 5000 luxů (Obr. 6) ve vzdálenosti 20 cm. Teplota vody byla nastavena na 28°C a každý den byli vířníci krmeni řasou *Nannochloropsis acculata* ve formě přípravku Nanno 3600 v dávce 1 ml na litr kultury. Takto probíhalo krmení v denním intervalu ve stejném schématu po celou dobu této produkce vířníků. Další parametry vody byly udržovány na optimálních podmínkách prostředí: salinita vody 35 ppt, délka světelného dne 12 hodin, koncentrace rozpuštěného kyslíku $6,5 \text{ mg.l}^{-1}$ a pH 7,8. Po 3 dnech od začátku nasazení vířníků do tohoto odchovu, byla opět spočítána a zaznamenána hustota vířníků, která v tomto období dosáhla hodnoty 408 ks.ml^{-1} a následně byla kultura přenesena do 20 litrové bílé plastové nádoby, kam byl zaveden zdroj vzduchu v podobě vzduchování vody (Obr. 7). Počáteční hustota vířníků v této nádobě a 20 litrové kultuře byla na úrovni $40,8 \text{ ks.ml}^{-1}$. Jakmile

hustota vírníků dosáhla 200 ks.ml^{-1} (po 4 dnech odchovu) došlo k přesunu vírníků do větší 50 litrové bílé plastové nádoby se skutečným využitým objemem kultury vírníků na úrovni 50 litrů (Obr. 7). Po dalších 4 dnech byla hustota kultury vírníků na úrovni 287 ks.ml^{-1} . V této době byla kultura rozdělena do tří 50 litrových bílých plastových nádob, ve kterých byl prozatím udržován konstantní objem 30 litrů. Tato kultura začala na počáteční hustotě vírníků 159 ks.ml^{-1} . Jakmile hustota vírníků ve všech třech nádobách dosáhla úrovně 200 ks.ml^{-1} (po 5 dnech odchovu), byl objem kultury v těchto nádobách navýšen na 50 litrů. V tomto období bylo dosaženo finálního celkového objemu kultury o 150 litrech. Po další 5 dnech odchovu kultura vírníků dosáhla hustoty 472 ks.ml^{-1} . V tomto období bylo 100 litrů kultury vírníků použito k inokulaci systému, určeného k vysokokapacitnímu odchovu a 50 litrů kultury bylo dále použito v tomto statickém (dávkovém) odchovu vírníků tak, že kultura vírníků byla z jedné 50-ti litrové nádoby rozdělena do tří nádob o jednotném objemu 50-ti litrů. Začínalo se zase s počáteční hustotou vírníků na úrovni 157 ks.ml^{-1} s cílem dosáhnout za 5 dní finální hustoty kolem $400 - 500 \text{ ks.ml}^{-1}$.

V období, kdy bylo dosaženo finální hustoty vírníků 472 ks.ml^{-1} ve 150 litrech vírnikové kultury bylo celkem v tomto statickém (dávkovém) systému vyprodukováno přibližně 71 miliónů vírníků. Na tuto produkci vírníků byly zkalkulovány celkové produkční náklady na úrovni 1000 Kč. Toto množství vírníků stačilo na chov cca 75 – 100 tisíc larev candáta obecného, které se odchovávaly v kontrolovaných podmínkách RAS při hustotě 100 ks na liter při hustotě vírníků od 6 ks.ml^{-1} (v období od 5. dne do 9. dne po vylíhnutí larev) do 8 ks.ml^{-1} (v období od 10. do 17. dne po vylíhnutí larev), kdy je doporučováno vírníky v chovu larev tohoto druhu využívat. Díky výživě larev pomocí vírníků bylo dosahováno až 60 – 65% přežití u odchovávaných larev ve věku 17 dní po vylíhnutí oproti konvenčnímu odchovu larev při výživě pomocí naupliových stádií artémie, který běžně dosahuje přežití odchovávaných larev na úrovni 35%.

Obecně intenzivní statický (dávkový) odchov vírníků v rámci vnitřních prostor intenzivní akvakultury (Obr. 6) je možné s úspěchem doporučit k využívání při nižší potřebě produkovaných vírníků, kteří v tomto chovu dosahují konečných hustot kolem $350 - 500 \text{ ks.ml}^{-1}$. Tato metoda je spolehlivější než extenzivní produkce ve venkovních podmínkách, zejména v zemích, kde kvůli klimatickým podmínkám není možné vírníky ani mikrořasy produkovat extenzivním způsobem ve venkovních podmínkách. Technické a technologické nároky na tento způsob odchovu a produkce vírníků je relativně nízká, kdy se využívají jednotlivé odchovné nádrže o objemu několika desítek či stovek litrů až obvykle po objem 1 až 2 m^3 kultury vírníků (Lubzens a kol., 1989). Daleko složitější a komplexnější je masový velkokapacitní produkční systém využívající speciální RAS pro chov vírníků. Tento způsob chovu umožňuje kontinuálně produkovat obrovské množství vírníků. Avšak tato technologie je zatížena vyššími pořizovacími ale i provozními náklady. Z těchto důvodů si musí každý chovatel rozmyslet, jaký systém je pro jeho produkci vírníků a následně larev ryb provozně výhodnější.



7. Produkce vířníků v dávkovém systému v Laboratoři intenzivní akvakultury, Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (foto Yanes-Roca).

4.4 Produkce vířníků ve velkokapacitním systému

Jelikož odchov vířníků ve vysokých hustotách zhoršuje kvalitu vody (kultivačního média) dochází ve statických (dávkových) systémech a tím se zvyšuje riziko výskytu stresujících podmínek pro vlastní fyziologii, reprodukci a následný chov a produkci vířníků, začaly se v produkční akvakultuře rybích druhů, které mají na začátku exogenní výživy primitivně vyvinuté larvy, uplatňovat velkokapacitní RAS. Tyto systémy se využívají k masové produkci vířníků s cílem kontinuálně produkovat obrovské množství vířníků v řádech stovek miliónů až miliard jedinců. Snahou těchto systémů je eliminovat stresující podmínky pro chovu vířníků a současně eliminovat sníženou rychlosti růstu a reprodukce vířníků potažmo úplně zabránit zahájení sexuálního cyklu u vířníků, který vede k výskytu samců v populaci vířníků a následně produkci trvalých vajíček vířníků a zastavení jejich produkce.

V rámci chovu, reprodukce a vlastní produkce vířníků ve velkokapacitním systému využívající speciální RAS v kontrolovaných podmínkách prostředí bylo dosaženo velmi slibných produkčních výsledků. Technika kultivace vířníků ve vysokokapacitních systémech s trvale udržitelnou vysokou hustotou vířníků má stejné principy jako statická dávková produkce vířníků. Rozdíl mezi oběma systémy je ten, že zatímco v dávkovém systému se každý 4. den mění (snižuje) hustota chované kultury, tak ve vysokokapacitním systému nikoliv a hustota vířníků je víceméně stabilní bez jakéhokoliv negativního stresového vlivu na produkci či fyziologii chovaných vířníků (Hagiwara a kol., 1995).

Pro masovou produkci vířníků ve vysokých hustotách v rámci velkokapacitního systému byl použit nový, speciálně vyvinutý RAS, který je dodáván firmou PENTAIR z USA. Tento RAS se skládá z biofiltru (objem 50 - 70 litrů) vybaveného bioelementy a jeho funkčním a efektivním provzdušňováním, z odpěňovače volně rozpuštěných bílkovin ve vodě (tzv. protein skimmer), z přítokového a odtokového potrubí, z oběhového čerpadla, které zajišťuje koloběh vody systémem a z odchovné nádrže o objemu 150 litrů. Odchovná nádrž je vybavena v prostředku

nádrže plastovou perforovanou trubkou, která je pokryta jemným uhelonem o velikosti ok 50 μm zabraňující úniku vířníků z dané nádrže. Tato mřížka z uhelonu musí mít dostatečný povrch, aby nedocházelo k jejímu zanesení a přetečení vody z nádrže mimo daný odchovný systém. Tato mřížka musí být pravidelně (při zastavení průtoku vody systémem) vyměňována a čištěna s minimálně jednodenním intervalem. Výměna a čištění uhelonové mřížky je většinou spojené s odpouštěním vířníkové kultury z dané nádrže. Do odchovné nádrže pro vířníky se taky zavěšují 2-4 kusy bílých plastových pruhů jemné struktury od šířce 30 – 40 cm a délce 50 – 60 cm. Tyto pruhy v odchovné nádrži slouží jako mechanická filtrace, která filtruje a zachytává větší nerozpuštěné částice, jako je detrit, shluky bakterií a řas. Díky tomuto systému může být kultivační voda (médium) pro odchov vířníků využita opakovaně po dobu více jak 30-ti dní (optimálně 45 dní) jen s minimální denní výměnou na úrovni 3-10 %.

Celkový objem odchovávané kultury vířníků v odchovné nádrži v rámci zmíněného velkokapacitního systému pro produkci vířníků v Laboratoři intenzivní akvakultury FROV JU byl 150 litrů (Obr. 8). Jakmile byl systém nasazen 2 dávkami kultur vířníků z 50 litrových nádob (celkem bylo do 150 litrů připravené kultivační vody nasazeno 47,2 miliónů vířníků s počáteční hustotou 314 ks.ml⁻¹), tak se hustota vířníků začala zvyšovat během následujících 24 hodin. Po 7 dnech byla průměrná hustota vířníků na úrovni 700 ks.ml⁻¹. To znamená, že bylo tímto systémem v daný okamžik vyprodukováno 1,05 miliardy jedinců vířníka *Brachionus plicatilis*.

V tomto okamžiku byl zahájen kontinuální odběr vířníku za účelem krmení larev candáta obecného. Denně bylo odebráno 15 l kultury o celkovém množství vířníků na úrovni 10,5 miliónu jedinců, které stačili na okamžitý odchov 175 – 200 tisíc larev candáta obecného. Odebraný objem kultury byl do systému okamžitě doplněn čistou kultivační vodou, která splňovala optimální jakostní parametry pro chov vířníků. Tento RAS byl schopen dodávat vířníky k odchovu larev candáta po dobu až 45 dnů. Jestliže si uvědomíme, že odchov larev candáta obecného v kontrolovaných podmínkách pomocí vířníků trvá přibližně 12 dní (od 5. do 17. dne po vylíhnutí larev), je možné konstatovat, že zmíněný systém a jeho produkce vířníků poskytla výživu celkem třem cyklům odchovu larev candáta s celkovým počtem odchovávaných larev na úrovni 525 – 600 tisíc larev zmíněného druhu s přežitím na úrovni až 65 %.



Obr. 8: RAS masové produkci vířníků (foto Yanes-Roca)

4.5 Odběr vířníků z velkokapacitního systému

Odběr vířníků a jejich následné využití v akvakultuře larev candáta obecného bylo prováděno skrze ventil, který se nacházel u dna odchovné nádrže s vířníkovou kulturou (Obr. 8). Vypouštěná kultura vířníků byla filtrována přes sítky z uhelonové tkaniny o velikosti ok 50-70 μm . Sítky byly při filtrování ponořené v kbelíku, aby nedocházelo k mechanickému poškození vířníků. Obecně je doporučováno odebírat a manipulovat s vířníky pouze ve vodě. Také provzdušňování vody v průběhu filtrace snižuje riziko jejich poškození. Zároveň by ale aerace vody neměla být příliš silná, aby se zabránilo uvíznutí vířníků v jemných uhelonových tkaninách. Mechanické poškození slovených vířníků je velmi kritické pro průběh a efektivitu obohacování vířníků (Fukusho, 1989) a další jejich využití v akvakultuře larev. Pro vysokou atraktivitu vířníků larvy potřebují, aby byli vířníci živí a normálně se pohybovali. Pohyb vířníků totiž stimuluje potravní apetit a příjem potravy larev a následně zlepšuje míru jejich růstu a přežití.

Vířníci byly odebíráni z RAS jednou denně. Obvykle se začínalo s odběrem mezi 7:00 - 8:00 hodinou ranní a odběr byl dokončen zhruba v 8:30. Samotný odběr trval asi 20 minut a vždy byl proveden podle následujících pravidel:

1. Celý odběr kultury vířníků tvořil 10 % celkového objemu kultury. Objem odebrané kultury byl kalkulován s ohledem na velikost populace z předchozích několika dní. Pokud byla velikost populace, nebo rychlost růstu menší, bylo odebráno menší množství kultury.
2. Před vlastním odběrem byli vířníci jemně rozmícháni v odchovné nádrži, aby byli v nádrži rovnoměrně rozmístěni a bylo možné odebrat reprezentativní množství vířníků v rámci odebíraného objemu kultury. Následně byli vířníci vypouštěni z nádrže přes zmíněný kohout a přefiltrováni přes sítka, které byly vyrobené z jemné uhelonové tkaniny o velikosti ok 50-75 μm . Jakmile byly vířníci koncentrováni v těchto sítkách, byly následně převedeny pomocí kultivační vody do připravených nádob.

3. Po odebrání vířníků byla voda v kultivačních nádržích nahrazena novou čistou kultivační vodou, aby se zde zachovaly ideální podmínky pro jejich růst. Koncentrace celkového amoniaku, dusitanů a dusičnanů byly vždy kontrolovány před a po výměně vody. Koncentrace celkového amoniaku a dusitanů byla udržována na úrovních 1 – 3 mg.l⁻¹ a dusičnanů kolem 100 – 150 mg.l⁻¹. Každý den bylo vyměněno cca 10 % celkového objemu nádrže s kulturou vířníků, v čemž je zahrnut především objem, který souvisel s odběr vířníků. Tato výměna vody se realizovala s cílem udržet vysokou kvalitu vody při odchovu a produkci vířníků.

4. Plastové filtrační pruhy, které byly zavěšovány v odchovné nádrži, byly vyjmuty a pečlivě vyčištěny po každém odběru vířníku z odchovné nádrže. Použité filtrační pruhy po vyjmutí byly opláchnuty proudem teplé pitné vody s cílem odstranit všechny přítomné nečistoty. Po opláchnutí byly tyto filtry vráceny zpět do nádrže. Středová uhelonoá mřížka, která zamezovala úniku vířníků z kultivační nádrže, byla pravidelně vyměňována a čištěna. Po důkladném jejím opláchnutí a následném vyschnutí po dobu 1 dne, bylo možné tuto mřížku v odchovné nádrži opětovně použít.

4.6 Obohacování vířníků za účelem zvýšení nutričních hodnot

Kultivovaní vířníci samy o sobě měli nižší nutriční hodnotu, než která je vyžadována odchovávanými larvami candáta obecného v kontrolovaných podmínkách RAS. Vzhledem k jejich příjmu potravy skrze filtraci vody, je možné jejich nutriční hodnoty lehce vylepšit, pomocí vhodné potravní nabídky, která se rozpustí do kultivační vody či média (Léger a kol., 1989). Tento proces byl v rámci této ověřené technologie prováděn za účelem obohacení nutričního složení odchovávaných vířníků.

Obohacení vířníků řasami

Vysoký obsah esenciálních mastných kyselin jako je kyselina eikosapentanová (EPA 20:5n-3) a dokosahexanová (DHA 22:6n-3) je obsažen v řase *Nannochloropsis occulata*. Proto je tato řasa považována za velmi vhodnou živou potravu vířníků, která zvyšuje obsah nenasycených mastných kyselin v odchovávaných kulturách vířníků. V případě, že se tato řasa běžně používá ke krmení vířníků, jako v našem případě v rámci této technologie, nemusí se produkovaná kultura vířníků touto řasovou opakovaně a speciálně ošetřovat s cílem obohacovat vířníky o zmíněné nenasycené mastné kyseliny. Avšak v případě, že se kultura vířníků krmí řasou *Chlorella* sp. či kvasinkami, je velmi vhodné odchovávanou kulturu vířníků obohacovat řasou *Nannochloropsis occulata* v podobě přípravku Nanno 3600 (Obr. 9) nebo jiných instantních preparátů obsahujících tento druh řasy. V tomto případě je vhodné postupovat následovně: odlovená kultura vířníků se z masového chovu nasadí do 10 litrového kbelíku se vzduchováním. Následně se do kultury vířníků naaplikuje emulze řasy *Nannochloropsis occulata* (Obr. 9) o přibližné koncentraci 5.10⁶ řas.ml⁻¹. Poté dochází k výživě vířníkové kultury touto řasou a k inkorporaci nenasycených mastných kyselin do těl vířníků po dobu 12 hodin. Cílem této techniky je obohatit vířníky o nenasycené mastné kyseliny s poměrem DHA/EPA vyšší než 2. Po již zmíněných 12 hodinách jsou vířníci připraveni ke krmení larev ryb.

Komerčně vyráběné přípravky

Vířníci byly také v rámci této ověřené technologie obohacování pomocí komerčních emulzí. Culture Spresso Selco (SS) (Obr. 9) je první vhodnou variantou. Je to uměle vyráběná emulze, která má již vynikající složení HUFA: 5,4; 4,4 a 15,6 mg.g⁻¹ sušiny EPA, DHA a HUFA (n-3) v tomto pořadí. Tento obsah je výrazně vyšší než u kultur vířníku, kteří jsou krmeni pouze řasou, ale obsah nenasycených mastných kyselin je srovnatelných v případě dalšího obohacení kultury, jak již bylo popsáno výše (Léger a kol., 1989). Úroveň celkových lipidů je přibližně 18 %. Další přípravky, jako jsou Protein Selco® (PS) a DHA Culture Selco® (DHA-CS), byly vyvinuty s cílem zakomponovat vyšší koncentrace bílkovin a DHA do těl produkovaných vířníků (Tab. 2), aby požadované nutriční hodnoty vyhovovaly širšímu spektru odchovávaných ryb (Léger a kol., 1989). Díky použití přípravku DHA-CS se nám podařilo získat stabilní a reprodukovatelný obsah lipidů a nenasycených mastných kyselin v těle vířníků, ve srovnání s volně žijícím zooplanktonem. Zároveň byly sníženy ztráty vířníků a také došlo ke snížení produkčních nákladů. Vířníci byli ponořeni do 10 litrů vody obsahující SS v dávce 230 g.m⁻³ při hustotě vířníků 1000 ks.ml⁻¹. V našem případě bylo použito 2,3 gramů SS na 10 litrů vody pro obohacení vířníků s nadějnými výsledky pro následný odchov larev. Díky obohacení vířníků pomocí DHA-CS se zvýšilo přežití larev candáta obecného v průběhu prvních 21 dnů o 10 % (na 75%) ve srovnání s larvami, které byli krmeni vířníky bez tohoto obohacení (Yanes-Roca a kol., 2020).



9. *Nannochloropsis occulata* od společnosti Reed Mariculture s.r.o. a Culture Spresso Selco od společnosti Selco s.r.o. (foto Yanes-Roca)

Tab. 2: Charakteristiky některých přípravků a emulzí obsahující vysoké hladiny DHA (v mg.g⁻¹ sušiny) (Léger a kol., 1989).

Obohacení	EPA	DHA	DHA/EPA	S(n-3) HUFA > 20:3n-3
Název obchodního přípravku				

Spresso Selco (SS)	18,9	15,3	0,8	36,6
DHA Cultura Selco DHA-CS	16,9	26,7	1,6	45,4
Protein Selco DHA-PS	24,4	70,6	2,9	99,3
Emulze				
Selco DHA7	67,2	452,3	6,7	550,6
Selco DHA20	0,8	15,6	19,5	16,4

Obohacení o vitamín C

Obecně platí, že při využití komerčně vyráběných přípravků je obohacení o vitamin C nižší, než je tomu při použití přirozené potravy. Obsah vitaminu C (kyseliny askorbové AA) v kultuře vířníků vzhledem k použití konkrétního přípravků a následného obohacení je vidět v tabulce č. 3. Například pekařské kvasnice obsahují 150 mg vitaminu C v 1 gramu sušiny, zatímco řasa *Chlorella* obsahuje 2300 mg vitaminu C v 1 gramu sušiny. Na líhních pro mořské druhy ryb, jsou vířníci obohacováni širokou škálou přípravků (Tab. 3). Problémy s deformitami se v současné době vyskytují u několika druhů ryb chovaných v akvakultuře, jako jsou: okoun říční (*Perca fluviatilis*) (Kestemont a Henrotte 2015; Policar a kol., 2019), mořčák evropský (*Dicentrarchus labrax*) (Teroval a kol., 1998) a pražma zlatá (*Sparus aurata*) (Ortuño a kol., 1999) atd., což může souviset se změnami v produkci potravních organismů a snížená koncentrace vitaminu C v umělých startérech a krmivech (Merchie a kol., 1995). Aby se zabránilo možným problémům s deformitami u odkrmovaných larev candáta, tak byli vířníci obohacováni kyselinou askorbovou (AA). Obohacování bylo provedeno a ověřeno v našem vysokokapacitním systému, skrze přidávání askorbylu palmitátu (AP) jakožto zdroje vitaminu C do používaných přípravků a emulzí. AP je poté vířníky převeden na aktivní AA až do koncentrace 1700 mg.g⁻¹ v sušině. Tato koncentrace byla stanovena po 24 h od obohacení pomocí 5% AP (w.w⁻¹) emulze. Vířníci obohacení o AA byly uchovávány ve slané vodě a po 12 hodinách byly připravené ke krmení. Po celou dobu odchovu larev měli vířníci stabilní nutriční hodnoty.

Tab. 3: Obsah kyseliny askorbové (mg.g⁻¹sušiny) u vířníků krmených laboratorními/komerčními přípravky s následným obohacením kultury (upraveno dle Merchie a kol., 1995).

Laboratorní přípravy	Odchov / obohacení	
	Odchov (3 dny)	Obohacení (6 hodin)
<i>Chlorella/Isochrysis</i>	2289	2155
pekařské kvasnice/ <i>Isochrysis</i>	148	1599
Culture Selco ^{®1} /Protein Selco ^{®1}	322	1247

Komerční přípravky	Odchov (5-7 dní)	Obohacení (6-24h)
Pekařské kvasnice + <i>Chlorella/Chlorella</i>	928	1255
Pekařské kvasnice + <i>Nannochloris/Nannochloris</i>	220	410
Culture Selco®/Protein Selco® ¹	136	941
Culture Selco® ¹ / <i>Isochrysis</i>	327	1559

¹obohacený o vitamin C, Inve Aquaculture N.V.

4.7 Odkrm larev candáta obecného pomocí vířníku a výhody této metody

Vířníci byli přidáváni do odchovných nádrží s larvami candáta obecného s cílem nabídnout larvám vhodnou živou potravu s optimálními hodnotami HUFA na začátku exogenní výživy. Současně s vířníky byla přidávána do nádrže i řasa *Nannochloropsis* (tzv. metoda „zelené vody“) o koncentraci $2 \cdot 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$, což poskytovalo další přidanou hodnotu odchovu v podobě vyššího zakalení vody a kontinuální výživy využitých vířníků (Watanabe, 1982). Výhodou těchto krmných technik je poskytnutí optimální první exogenní výživy pro larvy candáta, s výrazně vyšší mírou přežití a růstu, současně s přijatelnými výrobními náklady (Yanes-Roca a kol., 2018). Obecná pravidla týkající se využití vířníků pro odchov larev candáta jsou shrnuty níže, dle zveřejněných zkušeností v publikacích od Imentai a kol., 2019a, 2019b; Yanes-Roca a kol., 2018.

1. Třicet až šedesát minut před krmením larev candáta pomocí vířníků *Brachionus plicatilis* je nutné vířníky odebrat z odchovných nádob či nádrží, kde probíhá masová kultivace vířníků. Produkovaná kultura vířníků musí být rovnoměrně rozmíchaná, aby došlo k odběru reprezentativního množství odchovávaných vířníků z nádoby/ nádrže. Následně jsou vířníci krátkodobě uchovávaní v platových nádobách až do vlastního okamžiku krmení larvám. Kultivační voda či médium v odchovných nádobách či nádržích je zpětně doplněna na požadovaný finální objem. Následně dojde ke kontrole aktuální hustoty vířníků v odchovných prostorech a odebraném objemu daného vzorku určeného ke zkrmení larvám. Tímto způsobem má chovatel přehled o skutečném zkrmovaném množství vířníků larvám.

2. Celkový odebraný objem z kultury vířníků byl rovnoměrně rozdělen do tří kbelíků, kdy každý kbelík byl určen pro jedno krmení jedné nádrže s larvami candáta obecného. Před vlastním krmením došlo k rovnoměrnému rozptýlení krátkodobě uchovávaných vířníků pomocí pomalého míchání kbelíkem. Následně byli vířníci aplikováni do odchovné nádrže s larvami candáta obecného.

3. Krmení probíhalo třikrát denně (9:00, 13:00 a 16:00). Larvy candáta byly krmeny hustotou vířníků 6-8 ks. ml^{-1} . Tato hustota byla udržována přibližně po dobu 12 dní v odchovných nádržích při zvýšené salinitě vody (2 - 4 ppt). Vyšší salinita vody pomohla zvýšit pohyblivost a přežití přidávaných vířníků ke kultuře larev candátů. Díky těmto podmínkám byli vířníci atraktivnější pro

larvy candáta, a jejich využití bylo mnohem efektivnější v podobě vyššího růstu a přežití candátích larev (Imentai a kol., 2019a, b; Yanes-Roca a kol., 2018).

4. Už hustota vírníků 6 ks.ml⁻¹ je považován za optimální pro růst larev candáta od 4. do 9. dne po vylíhnutí. Vyšší hustota vírníků (8 ks.ml⁻¹) nebo později v kombinaci naupliovými stádii *Artemia* sp. je doporučována od 10. do 17. dne po vylíhnutí s následným před úplným přechodem na umělá peletovaná krmiva ve věku 19. - 22. den po vylíhnutí larev (Policar a kol., 2019).

5. Ze získaných zkušeností spojených s aplikací vírníků při výživě larev candáta obecného v rámci intenzivní akvakultury využívající RAS vyplývá naše doporučení zastavovat průtok vody skrze odchovnou nádrž v období 1 - 2 hodiny po aplikaci vírníků do nádrže. Hlavním důvodem zastaveného průtoku vody v nádrži je eliminace splachu vírníků z odchovné nádrže do mechanického či biologického filtru daného systému, což způsobuje ztrátu na vírnicích a navyšuje nároky na produkci a dávkování vírníků do chovu larev candáta obecného. Takovéto plýtvání potom zvyšuje produkční náklady na odchov larev candáta, což je nežádoucí. Jedn hodinová až dvouhodinová absence průtoku vody odchovnou nádrží nezpůsobuje žádné problémy v rámci intenzivního chovu larev candáta obecného. Po 2 hodinách od nakrmení larev je možné opět obnovit průtok vody v nádrži na požadovanou úroveň (Yanes-Roca a kol., 2018).

6. Aplikace vírníků *Brachionus plicatilis* během odchovu larev candáta v optimálních podmínkách prostředí od 5. do 17. dne od vylíhnutí, může výrazným způsobem zvýšit míru přežití larev až na 85 - 87 % ve věku larev 21 dní po vylíhnutí (průměrná kusová hmotnost 0,2 - 0,3 g). Zvyšuje se tak efektivita chovu, jelikož konvenční odchovy larev dosahují pouze 35% přežití larev 21. den po vylíhnutí a současně i kvalita odchovávaných larev, které jsou bez výskytu morfologických deformit s dobře naplněným plynovým měchýřem. Tento způsob odchovu larev tedy produkčním podnikům zabývající se intenzivním chovem candáta obecného poskytují zvýšenou rentabilitu a celkový zisk z intenzivní akvakultury u tohoto vysoce cenného druhu ryby v Evropě.

5. Ekonomické přínosy této technologie

Zavedením vysoce kvalitních živých potravních organismů, jako jsou právě vírníci, z hlediska jejich nutričního obsahu, přijatelné velikosti, hustoty a pohybu je klíčovým technologickým pokrokem pro optimalizaci přežití, rychlosti růstu a kvalitní produkci larev candáta obecného bez výskytu morfologických deformací během larválního odchovu. Tímto může být produkce (přežití) velmi kvalitních larev candáta o průměrné hmotnosti 1 gramu zvýšena až na úroveň 30 - 40 % ve srovnání s konvenční kulturou s průměrnou mírou přežití larev o hmotnosti 1 gramu mezi 10 - 20 %. Tato technologie může až zdvojnásobit přežití a objem produkce juvenilních candátů. Zároveň tento technologický proces může výrazně až o 30 - 50 % snížit výrobní náklady na výrobu 1 gramových ryb a obecně zvýšit celkovou rentabilitu intenzivního odchovu candáta obecného pomocí technologie RAS.

6. Využití této technologie k produkci ryb v České republice

Kultivace vírníků je rozšířena po celém světě, a především se využívá k produkci larev mořských druhů ryb déle než 100 let. Tyto kultivační techniky prozatím nebyly využívány v České republice zejména díky filozofii produkčních rybářských podniků produkovat tržní ryby především

pomocí tradiční rybniční akvakultury. Vzhledem k nutnosti diverzifikovat chované tržní druhy ryb v České republice, potažmo v celé Evropě, jsou stále hledány nové potencionální druhy ryb pro rozvoj intenzivní akvakultury využívající RAS technologii. Proto se kultivace a využití vířníků může stát klíčovým technologickým pokrokem při vývoji odchovných protokolů pro nové potencionální druhy, jako je candát obecný, mník jednovousý (*Lota lota*) nebo lín obecný (*Tinca tinca*) a také okrasné druhy, jako jsou: neonka obecná (*Paracheirodon innesi*), neonka červená (*Paracheirodon axelrodi*), nebo tetrovité či labyrintní druhy ryb. Tyto druhy ryb jsou již v současnosti v České republice hojně produkovány s poměrně dobrou realizací na evropském trhu. Proto je velmi výhodné zmíněnou technologii u českých chovatelů daných druhů ryb neustále podporovat, rozvíjet a optimalizovat s cílem dosahovat potencionálně jejich vyšší efektivity, rentability a konkurenceschopnosti. Tento technologický postup budou v České republice využívat především progresivní chovatelé ryb, kteří již nějakým způsobem produkují či zkoušejí produkovat zmíněné vysoce cenné druhy ryb v intenzivním akvakultuře pomocí technologie RAS.

7. Seznam literatury

- Bentley, C.D., Carroll, P.M., Watanabe, W.O., Riedel, A.M., 2008. Intensive Rotifer Production in a Pilot-scale Continuous Culture Recirculating System Using Nonviable Microalgae and an Ammonia Neutralizer. J. World Aquac. Soc. 39, 625–635. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00201.x>
- Dhert, P., Schoeters, K., VERMEULEN, P., SUN, J., GAO, S., SHANG, Z., Sorgeloos, P., 1995. Production and evaluation of resting eggs of *Brachionus plicatilis* originating from the PR of China: 315-319. Larvi 95 521.
- Epp, R.W., Winston, P.W., 1978. The effects of salinity and pH on the activity and oxygen consumption of *Brachionus plicatilis* (rotatoria). Comp. Biochem. Physiol. – Part A Physiol. 59, 9–12. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(78\)90297-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(78)90297-9)
- FAO, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture; Contribution to Food Security and Nutrition for all. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma: 200.
- Fu, Y., Hirayama, K., Natsukari, Y., 1991. Morphological differences between two types of the rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Müller. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 151, 29–41. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(91\)90013-M](https://doi.org/10.1016/0022-0981(91)90013-M)
- Fukusho, K., Iwamoto, H., 1981. Polymorphosis in size of rotifer, *Brachionus plicatilis*, cultured with various feeds. Bull. Natl. Res. Inst. Aquac. 2, 1–10.
- Fukusho, K., 1989. Biology and mass production of the rotifer, *Brachionus plicatilis* (1). Int J Aqu Fish Technol 1, 232–240.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66, 365–78.
- Gatesoupe, F., 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180, 147–165. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00187-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00187-8)
- Hagiwara, A., Balompapueng, M.D. and Hirayama, K., 1995. Mass production and preservation of marine rotifer resting eggs, in: Lavens, P. E.J. and I.R. (Ed.), Larvi'95 Fish and Shellfish Larviculture Symposium. European Aquaculture Society, Gent, p. 314.
- Hirata, H., 1979. Rotifer culture in Japan, in: Styczynska-Jurewicz, E. T.B.E.J. and G.P. (Ed.),

- Cultivation of Fish Fry and Its Live Food. European Mariculture Society, pp. 361–375.
- Hoff, F.H. and Snell, T., 1987. Plankton culture manual, first. Ed. Florida Aqua Farms, Inc, Florida.
- Imentai, A., Yanes-Roca, C., Malinovskyi, O., Policar, T., 2019a. Effect of *Brachionus plicatilis* density on pikeperch (*Sander lucioperca* L.) larva performance at first feeding. J. Appl. Ichthyol. <https://doi.org/10.1111/jai.13963>
- Imentai, A., Yanes-Roca, C., Steinbach, C., Policar, T., 2019b. Optimized application of rotifers *Brachionus plicatilis* for rearing pikeperch *Sander lucioperca* L. larvae. Aquac. Int. 27, 1137–1149. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00420-3>
- Kestemont, P., Henrotte, E., 2015. Nutritional Requirements and Feeding of Broodstock and Early Life Stages of Eurasian Perch and Pikeperch, in: Biology and Culture of Percid Fishes. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 539–564. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7227-3_20
- Léger, P., Grymonpre, D., Van Ballaer, E. and Sorgeloos, P., 1989. Advances in the enrichment of rotifers and *Artemia* as food sources in marine larviculture, in: Aquaculture Europe'89. Pp. 10.141-142.
- Lubzens, E., Tandler, A., Minkoff, G., 1989. Rotifers as food in aquaculture. Hydrobiologia. <https://doi.org/10.1007/BF00048937>
- Merchie, G., Lavens, P., Dhert, Ph., Deshasque, M., Nelis, H., De-Leenheer, A. and Sorgeloos, P., 1995. Variation of ascorbic acid content in different live food organisms. Aquac. ELSEVIER Aquac. 134, 325–337.
- Ortuño, J., Esteban, M.A., Meseguer, J., 1999. Effect of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish Shellfish Immunol. 9, 429–443. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0201>
- Policar, T., Schaefer, F.J., Panana, E., Meyer, S., Teerlinck, S., Toner, D., Żarski, D., 2019. Recent progress in European percid fish culture production technology—tackling bottlenecks. Aquac. Int. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00433-y>
- Ruttner-Kolisko, A., 1972. The influence of the temperature and salinity of the medium on the metabolic and reproductive intensity of *Brachionus plicatilis* (Rotatoria). Ger. Zool. Ges.
- Skjermo, J., Vadstein, O., 1993. Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*. Hydrobiologia 255–256, 185–191. <https://doi.org/10.1007/BF00025838>
- Terova, G., Saroglia, M., Papp, Z.G., Cecchini, S., 1998. Ascorbate dynamics in embryos and larvae of sea bass and sea bream, originating from broodstocks fed supplements of ascorbic acid. Aquac. Int. 6, 357–367. <https://doi.org/10.1023/A:1009237022692>
- Vanbelle, M., Teller, E., Focant, M., 1990. Probiotics in animal nutrition: a review. Arch. Tierernahr. <https://doi.org/10.108yanes/17450399009428406>
- Verdonck, L., Swings, J., Kersters, K., Dehasque, M., Sorgeloos, P., Leger, P., 1994. Variability of the Microbial Environment of Rotifer *Brachionus plicatilis* and *Artemia* Production Systems. J. World Aquac. Soc. 25, 55–59. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1994.tb00804.x>
- Watanabe, T., 1982. Lipid nutrition in fish. Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem. 73, 3–15. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90196-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90196-1)
- Yanes-Roca, C., Mráz, J., Born-Torrijos, A., Holzer, A.S., Imentai, A., Policar, T., 2018. Introduction of rotifers (*Brachionus plicatilis*) during pikeperch first feeding. Aquaculture 497, 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.004>
- Yanes-Roca, C., Holzer, A., Mráz, J., Veselý, L., Malinovskyi, O., Policar, T., 2020. Improvements on live feed enrichment for pikeperch (*Sander lucioperca*) larval culture. Animals, 10, 401.

Zakaria, S. M., Kamal, S. M. M., Harun, M. R., Omar, R., & Sijam, S. I., 2017. Subcritical water technology for extraction of phenolic compounds from *Chlorella* sp. Microalgae and assessment on its antioxidant activity. *Molecules*, 22(7), 1105.

Odborný externí oponent

RNDr. Irena Šetlíková, Ph.D.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Studentská 13

370 05 České Budějovice

Odborný interní oponent

????????????????????

Ověřování a uplatnění technologie 2020

Tilapia s.r.o. Tržní 274/2, 390 01 Tábor

Adresa autorů

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany, Česká republika, www.frov.jcu.cz