



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

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

# Odlepkování jiker jeseterů pomocí chlornanu sodného

Martin Pšenička, Marek Rodina, Zuzana  
Linhartová, Eva Prášková, Olena Shaliutina







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

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

# **Odlepkování jiker jeseterů pomocí chlornanu sodného**

---

Martin Pšenička, Marek Rodina, Zuzana Linhartová,  
Eva Prášková, Olena Shaliutina

**Vodňany**

**Publikace byla vytištěna prostřednictvím EU projektu TRAF00N „Traditional Food Network to Improve the Transfer of Knowledge for Innovation“, který je financován Evropskou komisí v rámci FP 7 2007–2013 pod projektovým číslem 613912.**



**Obsahová část publikace byla zpracována za finanční podpory následujících projektů:**

MŠMT projektu CENAKVA (CZ.1.05/2.1.00/01.0024) – 33%  
a projektu CENAKVA II (LO1205 v rámci programu NPU I) – 34%

Nové metody a biotechnologické přístupy v genetice a reprodukci ryb  
(GAJU 114/2013/Z) – 33%



č. 164

ISBN 978-80-7514-043-2

## **OBSAH**

<b>1. ÚVOD DO PROBLÉMU</b>	<b>6</b>
1.1. Lepivost jiker	6
1.2. Metody odlepkování	8
<b>2. CÍL</b>	<b>9</b>
<b>3. MÍSTO, KDE SE TECHNOLOGIE OVĚŘOVALA</b>	<b>9</b>
<b>4. POPIS TECHNOLOGIE A VÝSLEDKY</b>	<b>10</b>
4.1. Příprava generačních ryb	10
4.2. Testování v laboratorních podmínkách	10
4.3. Testování v praktických podmínkách	14
4.4. Předpokládaný mechanismus působení chlornanu sodného na obal jikry	15
<b>5. EKONOMICKÝ PŘÍNOS TECHNOLOGIE</b>	<b>18</b>
<b>6. UPLATNĚNÍ TECHNOLOGIE VE VÝROBĚ</b>	<b>18</b>
<b>7. SEZNAM LITERATURY</b>	<b>19</b>

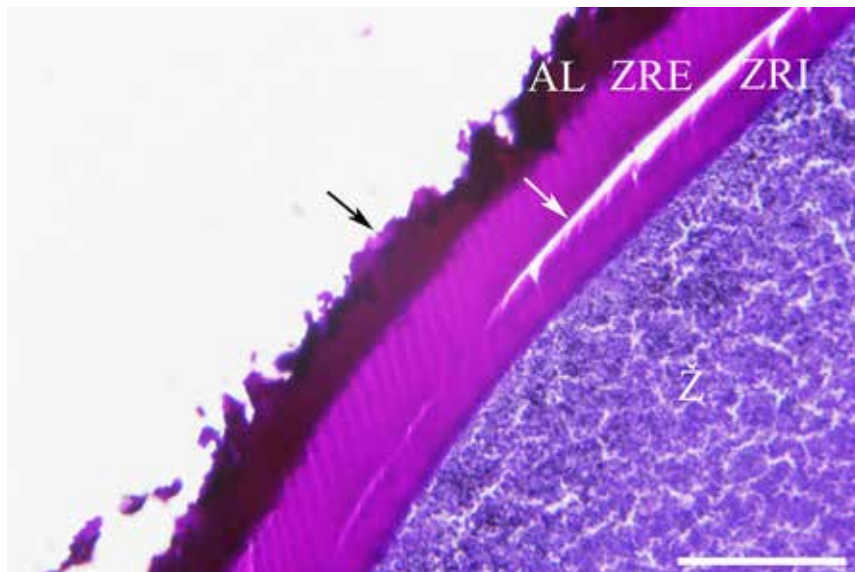
## 1. ÚVOD DO PROBLÉMU

V současné době jsou jikry jeseterovitých ryb odlepkovány relativně zdlouhavými a složitými postupy, které na specializovaných líhních komplikují práci. Tato technologie popisuje velice jednoduchý a rychlý postup odlepkování jiker jeseterů pomocí chlornanu sodného obsaženého v běžných dezinfekčních prostředcích. Postup odlepkování trvá jen několik desítek sekund, povrch jiker je dezinfikován, a navíc se takto ošetřená embrya líhnou snadněji a rychleji.

### 1.1. Lepivost jiker

Rybí vajíčka (jikry) jsou obalena relativně silným obalem (chorionem), který je přizpůsoben přirozeným výtěrovým podmínkám daného druhu (Rizzo a kol., 2002). Obaly jiker jeseterů se liší od jiker většiny ryb svojí strukturou a robustností. Většina jiker má obal složený z 3 hlavních vrstev a jedné lepivé. Obal ovulovaných jiker je silný okolo 6  $\mu\text{m}$  (např. kapr obecný *Cyprinus carpio*; Shabanipour a Hossayni, 2010). Na druhou stranu obaly jiker jeseterů (např. jeseter sibiřský *Acipenser baeri*) mají 4 hlavní vrstvy plus vrstvu lepivou a jejich celková šířka je okolo 50  $\mu\text{m}$ . Navíc se *zona radiata externa* a *interna* po aktivaci vodou oddělují a vytváří další meziprostor široký až 30  $\mu\text{m}$  (obr. 1; Pšenička a kol., 2010).

Obaly jiker mají především ochrannou funkci. Chrání vyvíjející se embryo před mechanickými a chemickými vlivy, bakteriálními nebo houbovými nemocemi a predátory (Riehl a Patzner, 1998; Esmaili a Johal, 2005; Rizzo a kol., 2002; Paxton a Willoughby, 2000; Mansour a kol., 2009a,b; Zelazowska, 2010). U některých ryb (např. z čeledí Cichlidae, Siluridae, Cyprinidae a Percidae) se vyvinula lepivost jiker. Ta slouží během přirozeného výtěru k uchycení jiker (embryí) k podkladu. Podle preference výtěrového substrátu se pak ryby rozdělují na litofilní (upřednostňují čistý kamenitý substrát a hrubý štěrk), fyto-litofilní (neuplatňují žádné specifické nároky na substrát), fytofilní (používají ke svému výtěru vodní a zaplavenou vegetaci), lito-pelagofilní (kladou jikry na kameny, avšak larvální stadia se vznášejí v proudících úsecích), pelagofilní (nechávají své jikry volně se vznášet ve vodním sloupci), psamofilní (používají ke tření čisté písčité dno), ostrakofilní (ukládají své jikry do žabrové dutiny mlžů), ariadnofilní (vytváří si hnízda ze zbytků rostlin) a speleofilní (schovávají své jikry v přírodních otvorech a dutinách nebo ve speciálně vytvořených doupatech). Jeseteři pak spadají do kategorie lito-pelagofilní (Balon, 1975). Jejich jikry ulpívají na oblázcích, štěrku a písku, aby byly ochráněny před negativními vlivy prostředí. Po vykulení jsou pak larvy unášeny proudem (Billard a Lecointre, 2001; Froese a Pauly, 2013).



**Obr. 1.** Histologický parafinový řez jikrou jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) barvený hematoxylinem-eozinem. AL – alveolární vrstva, černá šipka – lepidivá vrstva, ZRI – zona radiata interna, ZRE – zona radiata externa, bílá šipka ukazuje vytvářející se meziprostor mezi ZRI a ZRE, Ž – žloutek. Měřítko 100  $\mu$ m. (foto M. Pšenička)

Po osemenění jiker spermii a aktivaci vodou probíhá oplození. V této době dochází k oddělování chorionu od plazmatické membrány, mezi nimiž vzniká tzv. periviteliní prostor zabírající průnik dalšími spermii a dochází k nástupu lepidivosti (Pšenička a kol., 2010). Lepivost je u většiny druhů ryb přisuzována glykoproteinům na povrchu *zóny radiaty* (Cherr a Clark, 1984; Chang a Huang, 2002; Mansour a kol., 2009a,b). Rizzo a kol. (2002), Patzner a Glechner (1996) a Riehl a Patzner (1998) navíc popisují různé druhově specifické struktury na povrchu lepidivých jiker a označují mukopolysacharidy jako významnou složku *zóny radiaty* u druhů ryb s lepidivými jikrami. Ovšem konkrétní uspokojivé důkazy o mechanismu lepidivosti jiker ryb obecně nebyly prozatím podány. Lepivost jiker byla potvrzena i u řady druhů jeseterů (Markov, 1975; Altuf'ev a kol., 1980; Cherr a Clark, 1984; Le Menn a Pelissero, 1991; Ginzburg, 1972; Dettlaff a kol., 1993, Vorobyeva a Markov, 1999; Debus a kol., 2002, 2008). Zřetelná lepidivá vrstva na povrchu jikry jeseterů obklopuje alveolární vrstvu. Hlavní složkou lepidivé vrstvy u jeseterů je glykoprotein o velikosti 110 kDa obsahující kyselinu sialovou (Cherr a Clark, 1984). Po kontaktu s vodou je tato lepidivá vrstva hydratována a způsobuje lepidivost jiker (Dettlaff a kol., 1993). Pšenička

a kol. (2010) popsali lepidlo vrstvu pomocí elektronového mikroskopu jako elektrolucentní jemně vločkovitý materiál. Tloušťka této vrstvy je jen od 0,3 do 0,9  $\mu\text{m}$  (Cherr a Clark, 1982; Le Menn a Pelissero, 1991).

---

## 1.2. Metody odlepkování

---

Odlepkování jiker je u většiny druhů ryb chovaných v akvakultuře jedním ze základních požadavků pro úspěšnou umělou reprodukci. V případě inkubace lepidlo vrstvy jiker v inkubační láhvi nebo jiném přístroji dochází během krátké doby k jejich slepení, vytvoření shluků, které brání dostatečné výměně plynů a dalších metabolitů mezi embryi a vodním prostředím, přičemž dochází k jejich úhynu. Na mrtvých jikrách se rozvíjejí plísňe, které dále infikují sousední slepené jikry. Volba a optimalizace metody odlepkování pak naprosto zásadně zvyšuje přežití embryí a líhivost (Linhart a kol., 2000; Gela a kol., 2003; Demska-Zakes a kol., 2005).

V dnešní době existuje celá řada metod odlepkování založených na různých principech. Podle působení můžeme rozdělit odlepkovací metody na mechanické s použitím suspenze nebo emulze např. jílů, mléka nebo talku; enzymatické při použití alkalázy, hyaluronidázy nebo trypsinu; chemické jako Woynarovichova metoda nebo pomocí kyseliny tříslové a jejich kombinace (Woynarovich a Woynarovich, 1980; Gela a kol., 2003; Linhart a kol., 2003, 2004; Carral a kol., 2006; Žarski a kol., 2015).

Jedna z nejčastěji používaných metod odlepkování byla vyvinuta Woynarovichem (1980) pro kapra obecného. Odlepkovací roztok obsahuje 0,3 % močoviny a 0,4 % NaCl, doba nutná k odlepkování je cca 40 min. Metoda byla často modifikována a použita na různé druhy ryb včetně jeseterů. Ovšem u žádných metod se nepodařilo zkrátit dobu nutnou k eliminaci lepidlo vrstvy bez negativního ovlivnění líhivosti. Kowtal a kol. (1986) zkombinovali Woynarovichovu metodu s krátkodobou inkubací v 0,1 % roztoku kyseliny tříslové, kde dosáhli 57,7% líhivosti. Řada studií později prokázala negativní vliv kyseliny tříslové na líhivost, neboť kyselina tříslová způsobuje inkrustaci jikerných obalů, a to především ve vodách s vyšším obsahem kovů (Takeda a kol., 2002; Chebanov a kol., 2004). Od odlepkování pomocí kyseliny tříslové se v současné době ustupuje právě kvůli komplikacím s líhnutím (kulením). Jikry ryb, které se vytírají v teplejším období, jako lín obecný (*Tinca tinca*), sumec velký (*Silurus glanis*) a kapr obecný, je možné odlepkovat pomocí enzymů, které jsou ve vyšších teplotách aktivnější (Linhart a kol., 2003). Například metoda odlepkování jiker lína obecného pomocí alkalázy trvá pouhé 2 minuty, je efektivní a navíc jikerné obaly částečně obnažené enzymem usnadňují kulení a zvyšují tím celkovou líhivost (Linhart a kol., 2000). Líhivost jiker odlepkovaných alkalázou byla 87,1%, oproti tomu kontrola odlepkovaná jílem



## ODLEPKOVÁNÍ JIKER JESETERŮ POMOCÍ CHLORNANU SODNÉHO

měla líhivost jen 74,1 %. Líhnutí plůdku z jiker ošetřených enzymem trvalo navíc o 13 % kratší dobu. Pokusy odlepkování jiker pomocí enzymů u jeseterů a dalších druhů ryb, které se vytírají v chladnějším období, ukazují, že teplota kolem 16 °C je nedostačující pro účinnou aktivitu enzymů.

Monaco a Doroshov (1983) označili kontrolu plísňových infekcí jako nejpodstatnější problém během inkubace jiker jeseterů při použití tradičních odlepkovacích metod pomocí jílu, mléka nebo talku. Bouchard a Aloisi (2002) dezinfikovali jikry koupelí v roztoku jódu o koncentraci 50 mg.l<sup>-1</sup> po dobu 30 minut ihned po odlepkování pomocí roztoku močoviny, NaCl a kyseliny tříslové podle Kowtala a kol. (1986) nebo jílu. Obě odlepkovací metody s použitím jódu byly úspěšné s líhivostí 84,2 % a 85,6 %, ovšem relativně zdlouhavé.

### 2. CÍL

Z výše uvedeného vyplývá, že je žádoucí vyvinout technologii odlepkování jiker jeseterů, která bude rychlá, efektivní a nebude mít negativní vliv na vývoj embryí a larev. Odlepkovací postup by neměl způsobovat inkrustaci jiker, která by snižovala líhivost. Obal jiker by měl být naopak v ideálním případě částečně obnažený nebo změkčený a odlepkovací postup by měl zahrnovat dezinfekci jiker.

### 3. MÍSTO, KDE SE TECHNOLOGIE OVĚŘOVALA

Vývoj, experimentální testování technologie a analýza vzorků probíhala v Laboratoři zárodečných buněk, Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického (VÚRH), Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (FROV JU). Ověřování výsledků v praxi, především na jikrách jesetera malého, probíhalo na rybí líhni v Mydlovarech pro firmu BaHa, s.r.o. Další ověření, především na jikrách jesetera sibiřského a ruského, probíhalo na rybí líhni Marjoss firmy Fischzucht Rhönforelle GmbH & Co. KG Rendelmühle, D – 36129 Gersfeld v Německu.

## 4. POPIS TECHNOLOGIE A VÝSLEDKY

### 4.1. Příprava generačních ryb

K vývoji technologie byly použity generační ryby jesetera malého (*Acipenser ruthenus*), jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*) a jesetera ruského (*Acipenser gueldenstaedti*). Ryby připravené k výtěru byly umístěny do bazénů s teplotou vody 14–15 °C. Samci byli stimulováni jednorázovou vnitrosvalovou injekcí suspenze sušené kapří hypofýzy ve fyziologickém roztoku v dávce 4 mg.kg<sup>-1</sup> živé hmotnosti ryby. Sperma bylo odebíráno 36 hodin po injkaci pomocí kanyly zavedené do chámovodu. Poté bylo až do dalšího použití uchováno na ledu v kontejnerech pro buněčné kultury o objemu 50 ml. Samice byly stimulovány vnitrosvalovou injekcí suspenze kapří hypofýzy ve dvou dávkách. První dávka 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> živé hmotnosti byla po 12 hodinách následována druhou ve výši 4,5 mg.kg<sup>-1</sup>. Ovulace jiker nastala přibližně po 42 hodinách od první dávky, kdy byly jikry uvolňovány po mírném zatlačení na dutinu břišní. Umělá reprodukce jeseterů je detailně popsána v metodice Gely a kol. (2008).

### 4.2. Testování v laboratorních podmínkách

#### 4.2.1. Odběr a oplození jiker

Byly použity gamety od 3 samců a 3 samic jesetera malého. Pohyblivost spermií byla kontrolována pomocí mikroskopu vybaveného zařízením ExposureScope® (Linhart a kol., 2011). Procento pohyblivých spermií nebylo u žádného použitého spermatu nižší než 80 %. Pro každý vzorek byl použit 1 gram jiker (cca 100ks) zvlášt od každé samice a stejná směs spermatu od všech tří samců. Jikry byly oplozovány 50 µl spermatu aktivovaného v 3 ml dechlorované (pomocí uhlíkového filtru) vody po dobu 2 minut na Petriho misce.

#### 4.2.2. Optimalizace procesu odlepkování

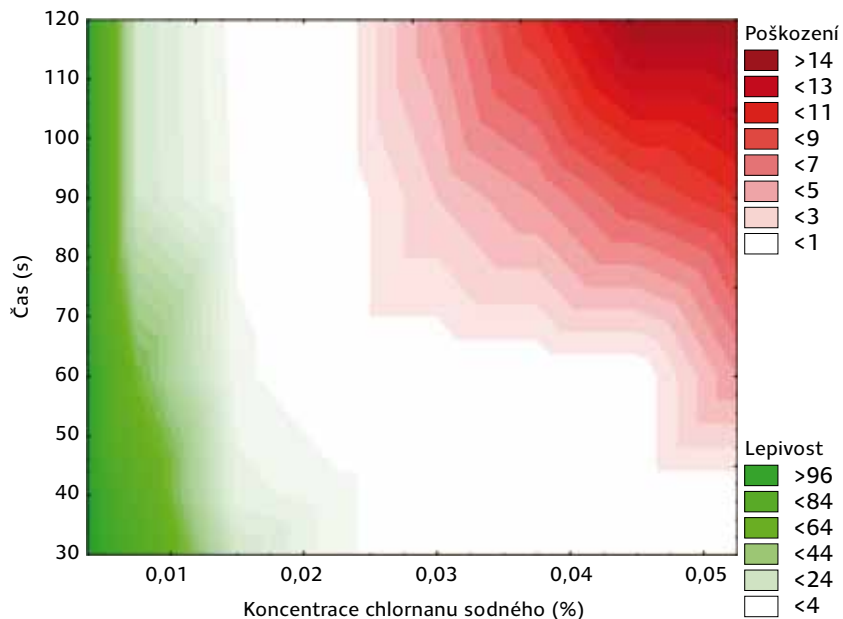
Oplozené jikry byly vystaveny působení chlornanu sodného (používaný pro úpravu pitné vody nebo jako bazénová chemie) o různé finální koncentraci (0,00375–0,0525 %) a různé době expozice (30–120 sekund). Působení chlornanu sodného bylo ukončeno přecezením jiker přes sítko a třikrát opakovaným promýváním vodou. Jikry byly poté umístěny na plastové Petriho misky. Lepivost a poškození jiker bylo hodnoceno 30 minut od oplození. Jako lepidly byly počítány jikry přilepené k povrchu Petriho misky nebo jikry slepené

## ODLEPKOVÁNÍ JIKER JESETERŮ POMOCÍ CHLORNANU SODNÉHO

k sobě. Jako poškozené byly počítány jikry s deformovaným chorionem, případně s vyhřezlou cytoplazmou vajíčka (obr. 2). Výsledky tohoto experimentu (obr. 3) naznačily, že použití chlornanu sodného o finální koncentraci 0,03 % po dobu 40 s by mohlo být funkčním a zároveň bezpečným způsobem pro odlepkování.



**Obr. 2.** Ukázka jiker jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) s deformovaným chorionem vlivem působení příliš vysoké koncentrace chloridu sodného. Šipka ukazuje na počínající výhřez cytoplazmy vajíčka. Měřítko 2 mm. (foto M. Pšenička)

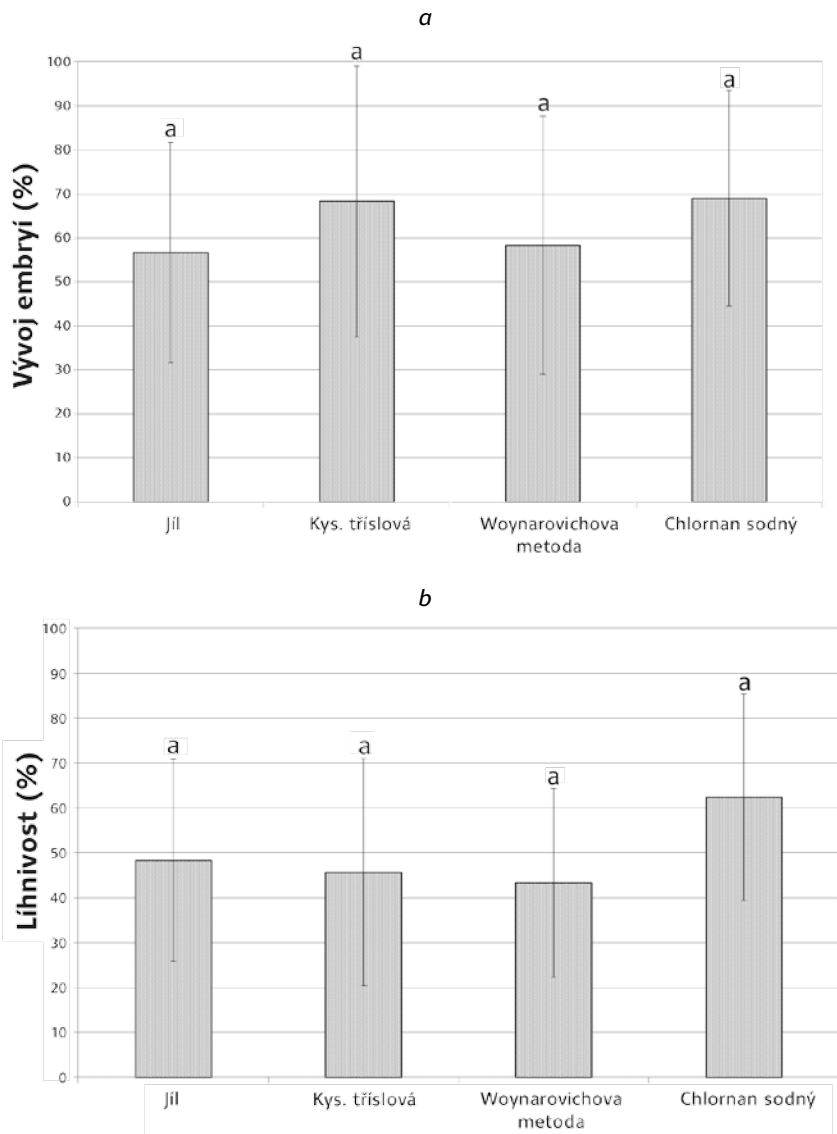


**Obr. 3.** Graf znázorňující snižující se lepivost a zvyšující se poškození jiker (v %) jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) při zvyšující se koncentraci chlornanu sodného a době působení.

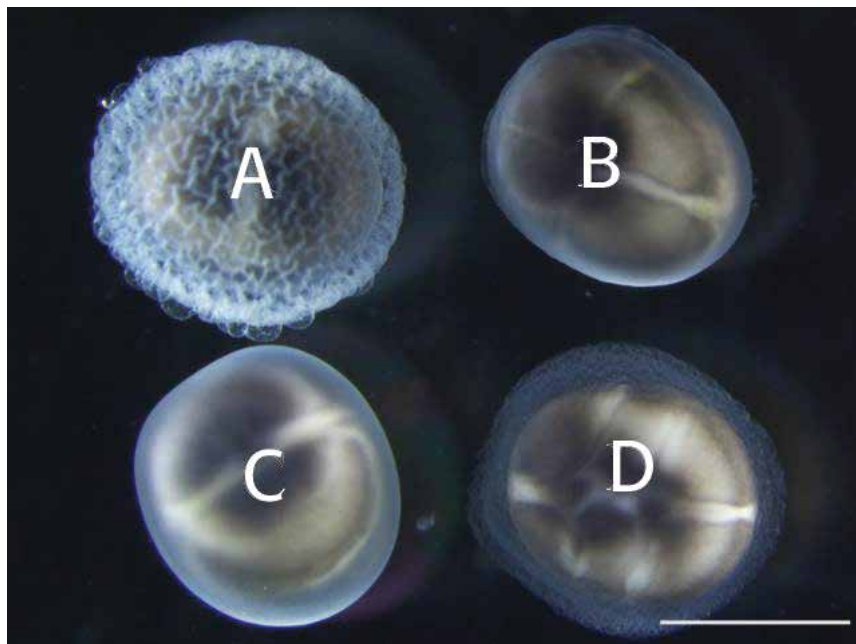
#### 4.2.3. Porovnání různých metod odlepkování

V dalším experimentu byly oplozené jikry odlepkovány čtyřmi různými postupy: 1) suspenzí jílu po dobu 45 minut; 2) třikrát opakovanou expozicí 0,4% roztoku kyseliny tříslové po dobu 30, 20 a 10 sekund s následným promýváním vodou po každé expozici; 3) Woynarovichovou modifikovanou metodou podle Kowtala a kol., 1986; viz úvod; 4) 0,03% roztokem chlornanu sodného po dobu 40 sekund. Jikry ošetřené těmito metodami byly umístěny do inkubátoru na Petriho miskách při teplotě 15 °C. Vývoj embryí byl hodnocen ve stadiu 2 až 8 buněk, tj. po 3 až 5 hodinách od oplození a po vylíhnutí. Při experimentu nebyla po žádném ošetření pozorována lepivost jiker. Výsledky neprokázaly žádné statisticky významné ( $p \leq 0,05$ ) rozdíly ve vývoji embryí (obr. 4). Jikry se lišily svojí bobtnavostí vzhledem k inkrustaci jejich povrchu při použití roztoku kyseliny tříslové (obr. 5).

# ODLEPKOVÁNÍ JIKER JESETERŮ POMOCÍ CHLORNANU SODNÉHO



**Obr. 4.** Procento vyvíjejících se embryí (a) a procenta vykulených embryí (b) jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) při použití různých metod odlepkování. Data znázorňují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku ( $n = 3$ ). Identická písmena vyjadřují nenalezení statisticky signifikantního ( $p < 0,05$ ) rozdílu mezi skupinami.



**Obr. 5.** Jikry jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) ošetřené různými metodami odlepkování: A) suspenze jílů, B) roztok kyseliny trichlorové, C) Woynarovichova modifikovaná metoda a D) chlornan sodný. Měřítka 2 mm. (foto M. Pšenička)

#### 4.2.4. Testování technologie s vyloučením interakcí

Pro zjištění bezpečnosti použití postupu byl proveden experiment ve standardizovaných podmínkách. Jikry tří samic jesetera malého byly oplozeny a odlepkovány postupem uvedeným výše ve dvojím opakování, přičemž místo dechlorované vody z řádu byl použit uměle připravený 2mM roztok NaCl v destilované vodě pro aktivaci, odlepkování i inkubaci. Jako kontrola byly použity stejně oplozené jikry bez odlepkování, kdy byly jikry po oplození nalepeny na dno Petriho misky. Jikry ošetřené 0,03% chlornanem sodným po dobu 40 s byly účinně odlepkovány, a navíc výsledky ukázaly, že líhivost u jiker odlepkovaných a neodlepkovaných byla porovnatelná ( $71,0 \pm 22,9$  a  $70,7 \pm 15,8$  %).

Aktivita chlornanu sodného je obecně závislá na pH media, ve kterém je rozpuštěn. V dalším experimentu byly jikry oplozeny, odlepkovány i inkubovány ve stejném uměle připraveném roztoku s různým pH upraveným pomocí HCl a NaOH (6,6; 7,6 a 8,4). Výsledky prokázaly, že jikry byly odlepkovány ve všech

## ODLEPKOVÁNÍ JIKER JESETERŮ POMOCÍ CHLORNANU SODNÉHO

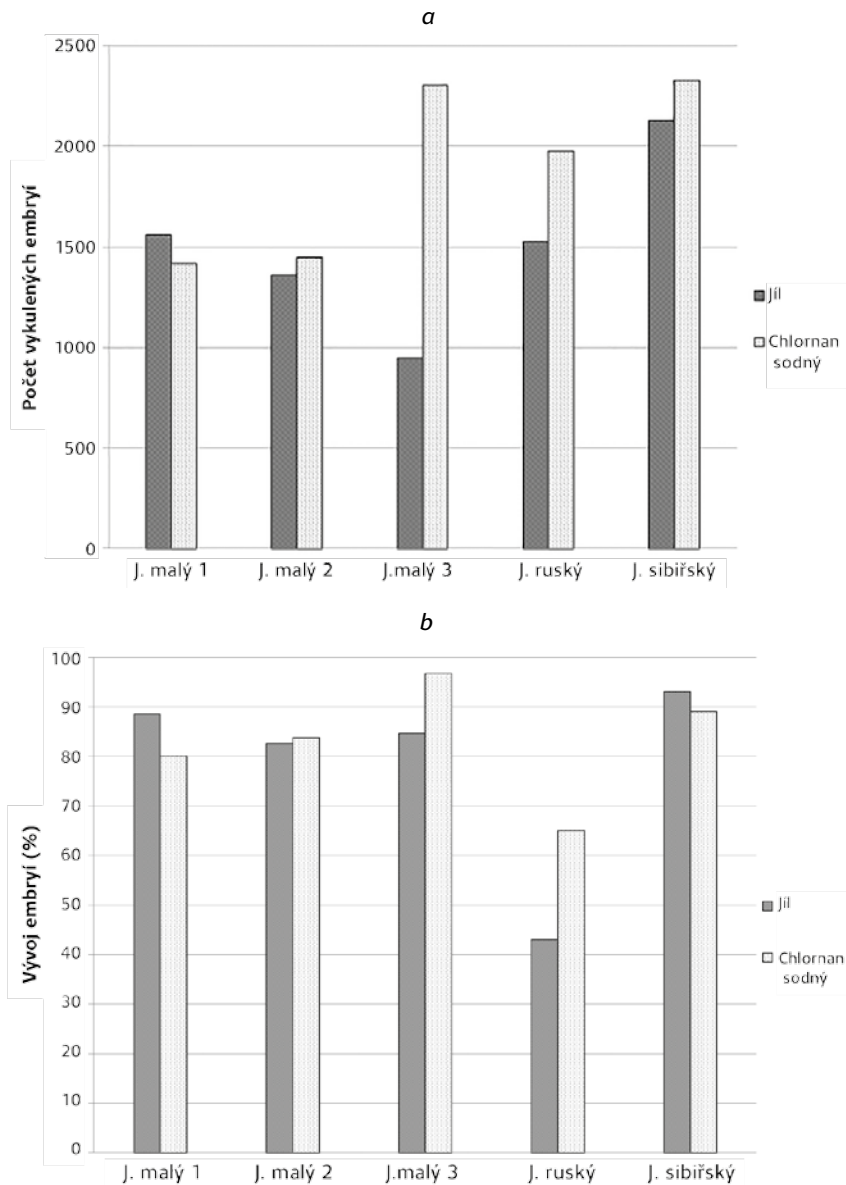
třech roztocích a ani líhnivost se statisticky nelišila ( $65,0 \pm 9,1$ ;  $73,3 \pm 6,7$  a  $52,2 \pm 11,1$  %). Tento pokus neprokázal žádný nebo minimální vliv pH na vývoj jiker při použití chlornanu sodného k odlepkování.

---

### 4.3. Testování v praktických podmínkách

---

Testování bylo prováděno na jikrách 3 samic jesetera malého, jedné samice jesetera sibiřského a jesetera ruského. Od každé samice bylo oploženo 50 g jiker 0,5 ml spermatu. Toto sperma bylo smícháno od tří samců stejného druhu s pohyblivostí spermií nad 80 %, aktivováno bylo v 75 ml vody. Po dvou minutách byly jikry přecezeny přes sítku a umístěny do misky. Na oplozené jikry bylo aplikováno 100 ml roztoku vody z líhně (říční zdroj) s 0,03 % chlornanu sodného. Jikry byly v roztoku míchány po dobu 40 sekund. Poté byly opět přecezeny přes sítku a 3x propláchnuty ve 100 ml vody. V kontrolní skupině bylo užito stejné množství jiker, byl aplikován totožný postup oplodnění. Jikry byly odlepkovány pomocí suspenze jílu po dobu 45 minut. Odlepkované jikry byly nasazeny k inkubaci do Kannengieterovy láhve o objemu 1 l při průměrné teplotě 17 °C. Vývoj jiker byl hodnocen ve stadiu 2–8 buněk (obr. 6a) a při líhnutí (obr. 6b). Pomocí tohoto experimentu jsme získali statisticky neprůkazně lepší výsledky při použití chlornanu sodného. Jikry odlepkované jílem se začaly kulit po 5 dnech. Z 50 g jiker odlepkovaných pomocí suspenze jílu se průměrně vykulilo 1 503 larev. Na druhou stranu jikry ošetřené chlornanem sodným se začaly kulit již 4. den a průměrně se z těchto jiker vykulilo 1 892 larev. Obě skupiny larev byly dále rozkrmeny a odchovány bez významných úhynů či pozorovaných malformací.

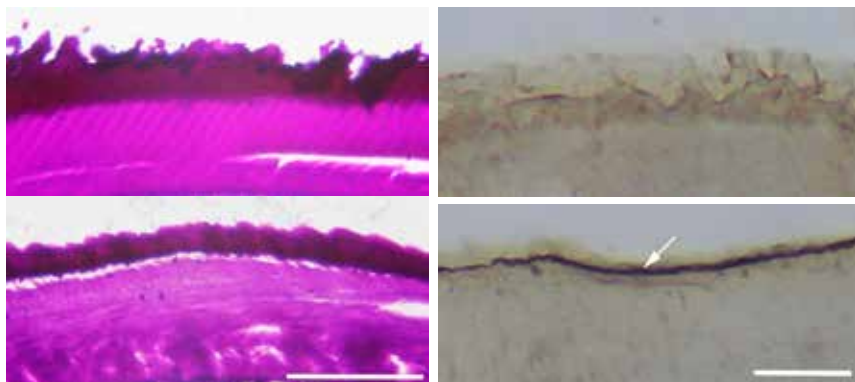


**Obr. 6.** Graf porovnává vývoj jiker jeseterů v procentech (a) a počet vykulených larev z 50 g jiker (b) po odlepkování jílem a chlornanem sodným.



## 4.4. Předpokládaný mechanismus působení chlornanu sodného na obal jikry

Chlornan sodný je silné oxidační činidlo, které působí na povrch jikry a její lepivé vrstvy. Jak bylo popsáno v úvodu, lepivá vrstva jiker jeseterů je složena z glykoproteinů obsahující kyselinu sialovou. Tyto látky vlivem působení chlornanu sodného oxidují a přitom se štěpí na jednodušší cukry a karbonyly. Takto porušená molekula glykoproteinu zjevně ztrácí lepivé vlastnosti. Zoxidovaný povrch jikry je patrný i na struktuře histologických parafinových řezů jiker barvených hematoxylinem-eozinem (obr. 7). Pomocí imunoznačení (Cosmo Bio Co., LTD., Product No. SML-R01K04-EX) se podařilo prokázat přítomnost karbonylové skupiny vznikající oxidací proteinů pouze na povrchu jiker (do 2  $\mu\text{m}$ ). Žádná další známka karbonylu nebyla pozorována v dalších vnitřních vrstvách obalu ani cytoplazmy vajíčka.



**Obr. 7 a 8.** Povrch jikry jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) bez odlepkování (nahore) a po odlepkování chlornanem sodným (dole). Obr. 7 (nalevo, měřítko 100  $\mu\text{m}$ ) barveno hematoxylinem-eozinem a obr. 8 (napravo, měřítko 20  $\mu\text{m}$ ) značení karbonylu vznikajícího po oxidaci proteinu (šipka). (foto M. Pšenička)

## 5. EKONOMICKÝ PŘÍNOS TECHNOLOGIE

Přínosem této technologie je především nemalá časová úspora, která se pak odráží do efektivity reprodukce ryb a ekonomiky provozu. Časová úspora je dána jako čas potřebný na klasický odlepkovací postup minus čas potřebný pro odlepkovací postup pomocí chlornanu sodného. Klasický a nejčastěji používaný postup odlepkování pomocí jílu zabere celkem s promýváním nejméně 60 minut, kdežto odlepkovací postup pomocí chlornanu sodného trvá i s promýváním maximálně 2 minuty, z čehož vyplývá reálná úspora 58 min na jikry jedné samice. S touto technologií dokáže celý pracovní postup oplození, odlepkování a nasazení jiker k inkubaci obsloužit jeden zaškolený pracovník.

Navíc předpokládáme, že při použití chlornanu sodného lze zvýšit konečnou líhivost, vlivem částečného obnažení jikerných obalů. Statisticky signifikantní rozdíly v líhivosti se nám sice nepodařilo prokázat pravděpodobně kvůli nedostatečnému počtu opakování, ovšem v dalších dílčích experimentech, neuvedených do statistik v této práci, jsme zaznamenali výrazně lepší výsledky při použití chlornanu sodného, především pak na jikrách horší kvality (jikry přezrálé nebo získané při druhém „dotírání“ samic), na kterých se technologie v počátcích zkoušela v provozu.

## 6. UPLATNĚNÍ TECHNOLOGIE

Uživatel technologie, rybářství BaHa, s.r.o., bude popsanou technologií používat k odlepkování jiker při produkčních výtěrech jeseterů, přičemž předpokládáme časovou, pracovní, a tedy i finanční úsporu. Pracovní postup od oplození přes odlepkování a nasazení jiker k inkubaci bude prováděn jediným pracovníkem. Tato technologie má velký potenciál a doporučujeme její zavedení i na dalších rybářstvích.

Postup odlepkování byl dále zkoušen na jikrách štiky obecné (*Esox lucius*) a kapra obecného. V případě jiker štiky bylo dosaženo stejných (pozitivních) výsledků jako v případě jiker jeseterů při použití stejné koncentrace a doby expozice chlornanu sodného. U jiker kapra obecného se nepodařilo najít vhodnou koncentraci a dobu expozice, která by spolehlivě jikry odlepkovala a zároveň je nepoškodila. To je zřejmě dáno tím, že obaly jiker kapra obecného jsou slabší než obaly jiker jeseterů či štiky. Využití u dalších druhů ryb nebylo prozatím testováno. Vzhledem k relativně malému „bezpečnému“ rozsahu koncentrace doporučujeme při zavádění technologie otestovat nově pořízený chlornan sodný na menším množství jiker, a to sledováním nástupu jejich lepivosti a vývoje embryí alespoň do stadia očních bodů.

## ODLEPKOVÁNÍ JIKER JESETERŮ POMOCÍ CHLORNANU SODNÉHO

Tento postup byl již nyní testován v praktických podmínkách 3 rybích líhní, kde používají k oplození, odlepkování a inkubaci jiker různé zdroje vody (pitná dechlorovaná, rybniční a potoční). Různý zdroj vody neměl negativní vliv na vývoj embryí a larev jesetera.

*Doporučený postup odlepkování je následující:*

Po odebrání spermatu a jiker jeseterů jsou spermie aktivovány vodou a ihned smíchány s jikrami v poměru 1 kg jiker : 1,5 l vody : 7 ml směsi spermatu (počítáno pro spermie s pohyblivostí nad 80 %). Jikry jsou společně se spermii míchány po dobu 2–3 minut (v případě rychlejšího nástupu lepivosti je doba kratší). Poté jsou jikry slity přes sítku a umístěny do misky, kam je přidán roztok 0,03 % chlornanu sodného o minimálním objemu 1,5 násobku objemu jiker. V roztoku jsou jikry míchány po dobu 40 sekund. Takto odlepkované jikry jsou opět slity přes sítku, minimálně třikrát promyty vodou a nasazeny k inkubaci.

Poznámka: doporučená finální koncentrace roztoku je 0,03 %. Při použití komerčně dostupného 15% chlornanu sodného určeného k úpravě pitné vody nebo vody v plaveckých bazénech (např. PWS chlornan sodný, Techneco Praha, spol. s r.o.) je odlepkovací roztok připraven ředěním 2 ml přípravku v 1 l vody. K odlepkování je možné použít i jiný prostředek obsahující chlornan sodný jako např. SAVO original (Unilever ČR, spol. s r.o., Praha). Vždy je ovšem nutné finální koncentraci chlornanu sodného přepočítat tak, aby se pohybovala okolo 0,03 %.

### 7. SEZNAM LITERATURY

- Altuf'yev, Y.V., Vlasenko, A.D., Polenov, A.L., Sheveleva, N.N., 1980. Analysis of the state of the neurohypophysis and gonads of the common sturgeon *Acipenser gueldenstaedti*, and the Beluga, *Huso huso*, below the dam of the Volgograd hydroelectric power station and in the "Mashkina Kosa" overwintering depression. *Journal of Ichthyology* 20: 95–103.
- Balon, E., 1975. Reproductive guilds of fishes: A proposal and definition. *Journal of the Fisheries Research Board* 32: 821–864.
- Billard, R., Lecointre, G., 2001. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10: 355–392.
- Bouchard III, H.J., Aloisi, D.B., 2002. Investigations in concurrent disinfection and de-adhesion of lake sturgeon eggs. *North American Journal of Aquaculture* 64: 212–216.

- Carral, J.M., Celada, J.D., Sáez-Royuela, M., Rodríguez, R., Aguilera, A., Melendre, P., 2006. Effects of four egg desticking procedures on hatching rate and further survival and growth of larvae in the tench (*Tinca tinca* L.). *Aquaculture Research* 37: 632–636.
- Chang, Y.S., Huang, F.L., 2002. Fibroin-like substance is a major component of the outer layer of fertilization envelope via which carp egg adheres to the substratum. *Molecular Reproduction and Development* 62: 397–406.
- Chebanov, M.S., Galich, E.V., Chmyr, Yu.N., 2004. Sturgeon breeding and rearing handbook. Moscow, Russia, 136 pp.
- Cherr, G.N., Clark, W.H., 1982. Fine structure of the envelope and micropyles in the eggs of the white sturgeon *Acipenser transmontanus* Richardson. *Development, Growth and Differentiation* 24: 341–352.
- Cherr, G.N., Clark, W.H., 1984. Jelly release in the eggs of the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: an enzymatically mediated event. *Journal of Experimental Zoology* 230: 145–149.
- Debus, L., Winkler, M., Billard, R., 2002. Structure of micropyle surface on oocytes and caviar grains in sturgeons. *International Review of Hydrobiology* 87: 585–603.
- Debus, L., Winkler, M., Billard, R., 2008. Ultrastructure of the oocyte envelopes of some Eurasian acipenserids. *Journal of Applied Ichthyology* 24: 57–64.
- Demska-Zakęś, K., Zakęś, Z., Roszuk, J., 2005. The use of tannic acid to remove adhesiveness from pikeperch, *Sander lucioperca*, eggs. *Aquaculture Research* 36: 1458–1464.
- Dettlaff, T.A., Ginsburg, A.S., Schmalhausen, O.I., 1993. Sturgeon fishes developmental biology and aquaculture. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New-York, 300 pp.
- Esmaili, H.R., Johal, M.S., 2005. Ultrastructural features of the egg envelope of silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* (Osteichthyes, Cyprinidae). *Environmental Biology of Fishes* 72: 373–377.
- Froese, R., Pauly, D. (Eds), 2013. FishBase. World Wide Web electronic publication. <<http://www.fishbase.org>>. Navštíveno 20. října 2013.
- Gela, D., Linhart, O., Flajšhans, M., Rodina, M., 2003. Egg incubation time and hatching success in tench *Tinca tinca* (L.) related to the procedure of egg stickiness elimination. *Journal of Applied Ichthyology* 19: 132–133.
- Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Řízená reprodukce jeseterů (*Acipenser*). Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany, č. 78, 24 s.
- Ginzburg, A.S., 1972. Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. In: Dettlaff, T.A. (Ed.), Jerusalem: Israel Program for Scientific Translations, Springfield, USA, 366 pp.

## ODLEPKOVÁNÍ JIKER JESETERŮ POMOCÍ CHLORNANU SODNÉHO

- Kowtal, G.V., Clark, W.H., Cherr, G.N., 1986. Elimination of adhesiveness in eggs from the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: Chemical treatment of fertilized eggs. *Aquaculture* 55: 139–143.
- Le Menn, F., Pelissero, C., 1991. Histological and ultrastructural studies of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii*. In: *Acipenser*. Williot, P. (Ed.). CEMAGREF Publ., Springer Netherlands, pp. 113–127.
- Linhart, O., Gela, D., Flajšhans, M., Duda, P., Rodina M., Novak, V., 2000. Alcalase enzyme treatment for elimination of egg stickiness in tench, *Tinca tinca* L. *Aquaculture* 191: 303–308.
- Linhart, O., Rodina, M., Gela, D., Flajšhans M., Kocour M., 2003. Enzyme treatment for elimination of egg stickiness in tench (*Tinca tinca* L.), European catfish (*Silurus glanis* L.) and common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 28: 507–508.
- Linhart, O., Gela, D., Rodina, M., Kocour, M., 2004. Optimization of artificial propagation in European catfish, *Silurus glanis* L. *Aquaculture* 235: 619–632.
- Linhart, O., Rodina M., Sladký, L., 2011. Zařízení pro synchronizaci světelných záblesků vydávaných světelným zdrojem se signálem vidokamery pro sledování a záznam obrazu mikroskopu. Užiténý vzor č. 23086. Úřad průmyslového vlastnictví, Praha, ČR.
- Mansour, N., Lahnsteiner, F., Patzner, R.A., 2009a. Ovarian fluid plays an essential role in attachment of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* eggs. *Theriogenology* 71: 586–593.
- Mansour, N., Lahnsteiner, F., Patzner, R.A., 2009b. Physiological and biochemical investigations on egg stickiness in common carp. *Animal Reproduction Science* 114: 256–268.
- Markov, K.P., 1975. Izuchenie mikrostruktury obolochki yaits russkovo osetra *Acipenser gueldenstaedti* Brandt s pomoshchyu elektronnoy skaniruyushchevo mikroskopa. *Voprosy Ikhtologii* 15: 822–832.
- Monaco, G., Doroshov, S.I., 1983. Mechanical de-adhesion and incubation of white sturgeon eggs (*Acipenser transmontanus* Richardson) in jar incubators. *Aquaculture* 35: 117–123.
- Patzner, R.A., Glechner, R., 1996. Attaching structures in eggs of native fishes. *Limnologica* 26: 179–182.
- Paxton, C.G.M., Willoughby, L.G., 2000. Resistance of perch eggs to attack by aquatic fungi. *Journal of Fish Biology* 57: 562–570.
- Pšenička, M., Rodina, M., Linhart, O., 2010. Ultrastructural study on the fertilisation process in sturgeon (*Acipenser*), function of acrosome and prevention of polyspermy. *Animal Reproduction Science* 117: 147–154.

- Riehl, R., Patzner, R.A., 1998. The modes of egg attachment in teleost fishes. *Italian Journal of Zoology* 65: 415–420.
- Rizzo, E., Sato, Y., Barreto, B.P., Godinho, H.P., 2002. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology* 61: 615–632.
- Shabanipour, N., Hossayni, S.N., 2010. Histological and ultrastructural study of *zona radiata* in oocyte of common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus 1758). *Micron* 41: 877–881.
- Takeda, N., Kusuda, S., Teranishi, T., Imada, K., 2002. Effect of iron concentrations on hatching rates of adhesive-eliminated Osmerid fish (*Sprinchnus lanceolatus*) eggs from the surface. *Scientific Reports of the Hokkaido Fish Hatchery* 56: 107–113.
- Vorobyeva, E.I., Markov, K.P., 1999. Specific ultra-structural features of eggs of Acipenseridae in relation to reproductive biology and phylogeny. *Journal of Ichthyology* 39: 157–169.
- Woynarovich, E., Woynarovich, A., 1980. Modified technology for elimination of stickiness of common carp *Cyprinus carpio* eggs. *Aquaculture Hungarica* 2: 19–21.
- Žarski, D., Krejszef, S., Kucharczyk, D., Palińska-Žarska, K., Targońska, K., Kupren, K., Fontaine, P., Kestemont, P., 2015. The application of tannic acid to the elimination of egg stickiness at varied moments of the egg swelling process in pikeperch, *Sander lucioperca* (L.). *Aquaculture Research* 46: 324–334.
- Zelazowska, M., 2010. Formation and structure of egg envelopes in Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii* (Acipenseriformes: Acipenseridae). *Journal of Fish Biology* 76: 694–706.

Celý postup byl dne 13. 10. 2015 přihlášen jako patent pod označením „Způsob eliminace lepivosti jiker ryb“ u Úřadu průmyslového vlastnictví pod č. 2015-730.

Bližší informace týkající se této problematiky byly dále publikovány v publikaci: Pšenička, M., 2016. A novel method for rapid elimination of sturgeon egg stickiness using sodium hypochlorite. *Aquaculture* 453: 73–76.

**Odborný externí oponent**

prof. Dr. Ing. Jan Mareš  
Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta,  
Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství  
Zemědělská 1, 613 00 Brno, [www.is.mendelu.cz](http://www.is.mendelu.cz)

**Odborný interní oponent**

prof. Ing. Martin Flajšhans, Dr. rer. agr.  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod,  
Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Výzkumný ústav  
rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, [www.frov.jcu.cz](http://www.frov.jcu.cz)

**Ověření a uplatnění technologie v roce 2015**

BaHa s.r.o. Rybí líheň Mydlovary  
Osíková 1589/15, 370 08 České Budějovice

**Adresa autorského kolektivu**

Ing. Martin Pšenička, Ph.D., Ing. Marek Rodina, Ph.D., Mgr. Eva Prášková, Ph.D.,  
M.Sc. Olena Shaliutina  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod,  
Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Výzkumný ústav  
rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, [www.frov.jcu.cz](http://www.frov.jcu.cz)

**Mgr. Zuzana Linhartová, Ph.D.**

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod,  
Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Ústav  
akvakultury a ochrany vod, Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice,  
[www.frov.jcu.cz](http://www.frov.jcu.cz)

V edici Metodik (Technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých  
Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, [www.frov.jcu.cz](http://www.frov.jcu.cz), odborný  
editor: Ing. Antonín Kouba, Ph.D.; redakce: Zuzana Dvořáková, náklad: 350 ks,  
1. vydání, technologie byla ověřena a uplatněna v roce 2015, vytištěna 2016,  
Grafický design a technická realizace: Jesenické nakladatelství Jena Šumperk.



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

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



ISBN 978-80-7514-043-2

