



KIANNE SILVA MONTEIRO

**EFFECTS OF OZONE ON ZEBRAFISH (*Danio rerio*)
MAINTAINED IN RECIRCULATION WATER SYSTEM**

**LAVRAS – MG
2022**

KIANNE SILVA MONTEIRO

**EFFECTS OF OZONE ON ZEBRAFISH (*Danio rerio*) MAINTAINED IN
RECIRCULATION WATER SYSTEM**

Tese de doutorado apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

**LAVRAS – MG
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Monteiro, Kianne Silva.

Effects of ozone on zebrafish (*Danio rerio*) maintained in
recirculation water system / Kianne Silva Monteiro. - 2022.

55 p.

Orientador(a): Luis David Solis Murgas.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. ozonioterapia. 2. qualidade da água. 3. modelo animal. I.
Murgas, Luis David Solis. II. Título.

KIANNE SILVA MONTEIRO

**EFFECTS OF OZONE ON ZEBRAFISH (*Danio rerio*) MAINTAINED IN
RECIRCULATION WATER SYSTEM**

Tese de doutorado apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 17 de novembro de 2022.

Dr. Juliana Tensol Pinto – DMV/UFLA

Dra. Gilmara Junqueira Machado – Centerfish

Dra. Stefânia Priscilla de Souza – DZO/UFLA

Dra. Zullyt Bárbara Zamora Rodríguez – Centro Nacional de Investigaciones Científicas de La Habana, Cuba.

Dr. André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna – UFPR (suplente)

Dr. Marcos Ferrante – DMV/UFLA (suplente)

Prof. Luis David Solis Murgas
Orientador

**LAVRAS – MG
2022**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus que me guiou em cada passo e me fortaleceu a cada momento. Aos meus pais e ao meu irmão por sempre acreditarem em mim, e por nunca medirem esforços para me ver vencer! Ao meu marido pela calma, pelo amor e por ser meu porto seguro. Obrigada por me sustentar todas as vezes que eu precisei! Aos meus sogros, familiares e amigos pelo carinho, incentivo e pela grande torcida!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradeço à CAPES pelo apoio, que tornou esse trabalho possível. À UFLA, ao DMV e ao PPGCV/UFLA pela estrutura de excelência que sempre me acolheu. Ao corpo docente por compartilhar tanta experiência e conhecimento.

À banca de avaliação por despender do seu tempo para apreciar nosso trabalho e por todas as considerações que serão de grande importância para a finalização desse projeto. Agradeço ao Prof. Dr. Luis Murgas por ter sido muito mais que um orientador ao longo de todos esses anos. Obrigada pela amizade, pela compreensão, por sempre confiar em mim e por me proporcionar diversas oportunidades que só me fizeram crescer! O senhor teve um papel fundamental na minha trajetória, e eu sempre serei grata por tudo!

Aos meus amigos do NEPAD, pois sem vocês nada disso seria possível! Agradeço por toda ajuda, parceria e troca de experiências. Sabemos que sozinhos não conseguimos ir muito longe, e com a ajuda de toda a equipe eu pude finalizar essa etapa! Agradeço também a todos os meus amigos da UFLA e do PPGCV por sempre estarem presentes na minha vida e pelo apoio de sempre.

Agradeço ao apoio do Laboratório de Análise de Água (LAADAM, DAM/UFLA), Laboratório de Fisiologia e Farmacologia (DMV/UFLA), Laboratório de Microbiologia (DMV/UFLA), Laboratório de Patologia Veterinária (DMV/UFLA) e Laboratório de Enzimologia (DZO/UFLA) pelo apoio e auxílio na condução das análises.

Hoje encerro essa grandiosa etapa e tenho uma gratidão enorme por cada momento que eu vivi até chegar aqui! “E pela lei natural dos encontros, eu deixo e recebo um tanto!”

RESUMO

A ozonioterapia é uma técnica importante utilizada na medicina humana e veterinária, aquicultura e indústria, devido a diversos fatores incluindo atividade antimicrobiana e antiinflamatória. Zebrafish (*Danio rerio*) é um modelo animal consolidado, amplamente cultivado e muito relevante em ensaios toxicológicos e farmacológicos. Contudo, o uso de ozônio em sistema de recirculação de água para zebrafish (*Danio rerio*) ainda não foi totalmente elucidada, e os seus efeitos na saúde dos animais e na qualidade da água ainda não foram descritos. O objetivo desse trabalho é avaliar o uso de ozônio em sistema de recirculação de água para zebrafish (*Danio rerio*) e os efeitos na saúde dos animais e nos parâmetros limnológicos. Foram usados 120 animais adultos de zebrafish (*Danio rerio*), com idade entre 8-10 meses, e a água de cada aquário foi ozonizada durante 10 minutos, de acordo com o protocolo: Grupo 1: água ozonizada (52 µg/ml) uma vez ao dia; Grupo 2: água ozonizada (52 µg/ml) duas vezes ao dia; Grupo 3: água ozonizada (72 µg/ml) uma vez ao dia; Grupo 4: água ozonizada (72 µg/ml) duas vezes ao dia; Grupo Controle: água sem ozonização. Após 10 dias de tratamento, os animais foram eutanaziados com tricafina (250 mg/mL) para análises futuras e amostras de água foram coletadas para avaliação de parâmetros limnológicos. O uso de ozônio diminuiu significativamente ($p < 0.05$) o crescimento de bactérias coliformes e aumentou ($p < 0.05$) a concentração de oxigênio em todos os grupos tratados, comparando com grupo controle. Além disso, o ozônio diminuiu ($p < 0.05$) os níveis de nitrato e foi observado um aumento significativo ($p < 0.05$) no número de trombócitos. Alterações histológicas nas brânquias foram observadas nos grupos tratados, como fusão de lamelas, aumento de secreção de muco, proliferação de eritrócitos, curvatura e vacúolos. Ozônio não aumentou ($p > 0.05$) os níveis de espécies reativas de oxigênio ou de enzimas antioxidantes, reforçando que o ozônio não causou um quadro de estresse oxidativo nos animais. Portanto, com esse estudo podemos perceber que o uso do ozônio em sistema de recirculação de água para zebrafish (*Danio rerio*) pode ser considerado para estimular a proliferação de células sanguíneas e de defesa e melhorar a qualidade da água, permitindo assim alguns avanços na criação de zebrafish.

Palavras-chave: ozonioterapia, estresse oxidativo, aquicultura, qualidade da água, modelo animal.

ABSTRACT

Ozone therapy is an important technique used in human and veterinary medicine, aquaculture and industry, due to many factors including antimicrobial and anti-inflammatory properties. Zebrafish (*Danio rerio*) is a consolidated organism model, largely cultivated and most important to toxicological and pharmacological assays. However, ozone therapy in water recirculation system to zebrafish (*Danio rerio*) was not evaluated actually, and were not described the effects in the animal health or water quality. Therefore, the aim of this study is to evaluate the use of ozone in zebrafish (*Danio rerio*) water recirculation system and the effects in the animal health and limnological parameters. 120 adults of zebrafish (*Danio rerio*) were used, eight to ten months old, and the water of each aquarium was ozonated during 10 minutes, according to protocols: Group 1: ozonated water (52 µg/ml) once a day; Group 2: ozonated water (52 µg/ml) twice a day; Group 3: ozonated water (72 µg/ml) once a day; Group 4: ozonated water (72 µg/ml) twice a day; Control group: water without ozone. 10 days after the treatment, animals were euthanized with tricaine (250 mg/mL) for further analysis and water sample was collected to limnological parameters evaluation. Based on the results, the use of ozone decreases significantly ($p < 0.05$) the growth of coliform bacteria and increase ($p < 0.05$) the concentration of oxygen in all of treated groups, comparing with the control group. Moreover, ozone decreases ($p < 0.05$) the levels of nitrate and an increase ($p < 0.05$) in the number of the thrombocytes was observed. Gill histological alterations were observed in treated groups, such as fusion of lamellas, increase of mucous secretion, proliferation of erythrocytes, curvature and vacuoles. Ozone did not increase ($p > 0.05$) reactive oxygen species or antioxidant enzymes, reinforcing that ozone did not cause a significant status of oxidative stress in the animals. Therefore, with this study, we realized that the ozone in water recirculation system to zebrafish (*Danio rerio*) can be considered to stimulate blood and defense cells proliferation and to improve the water quality, enabling improvements in the zebrafish culture.

Keywords: ozone therapy, oxidative stress, aquaculture, water quality, model animal.

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| | CAPÍTULO I | 08 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 08 |
| 1.1 | Características e produção de ozônio | 08 |
| 1.2 | Ozonioterapia | 10 |
| 1.3 | Ações biológicas do ozônio | 11 |
| 1.3.1 | Estresse oxidativo | 11 |
| 1.3.2 | Atividade antimicrobiana | 13 |
| 1.3.3 | Atividade antiinflamatória, imunomoduladora e de proliferação celular | 14 |
| 1.3.4 | Uso de ozônio na aquicultura | 15 |
| 2 | Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) como um modelo animal de pesquisa | 17 |
| 2.1 | A espécie zebrafish (<i>Danio rerio</i>) | 17 |
| 2.2 | Sistema de recirculação de água no cultivo de peixes | 19 |
| 2.3 | Ozônio e o modelo zebrafish (<i>Danio rerio</i>) | 23 |
| 3 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 24 |
| | REFERÊNCIAS..... | 25 |
| | CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO | 29 |

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O uso do ozônio (O_3) vem se destacando nos últimos tempos devido as diversas aplicações do uso desse gás, relacionado principalmente com uso terapêutico, tratamento de água e efluentes, desinfecção de recipientes e tratamento de produtos e alimentos. A ozonioterapia consiste na utilização do gás ozônio com grande versatilidade, considerada uma técnica importante na medicina humana e veterinária, devido suas propriedades antifúngicas, antimicrobianas, antiinflamatórias, relacionado também à cicatrização, regeneração tecidual e modulação da resposta imune.

Durante muito tempo o uso do ozônio foi pouco explorado, sobretudo devido a falta de informação sobre a aplicabilidade do uso do gás, toxicidade, real risco ocupacional e efeitos colaterais indesejados. Atualmente, diversas pesquisas já foram realizadas, comprovando-se a segurança no manuseio e a eficiência do ozônio em diversos casos. Entretanto, ainda há muito o que se explorar sobre o uso de ozônio, e os estudos devem continuar para que cada vez mais seu uso seja esclarecido e seus efeitos benéficos possam ser relatados.

1.1. Características e produção de ozônio

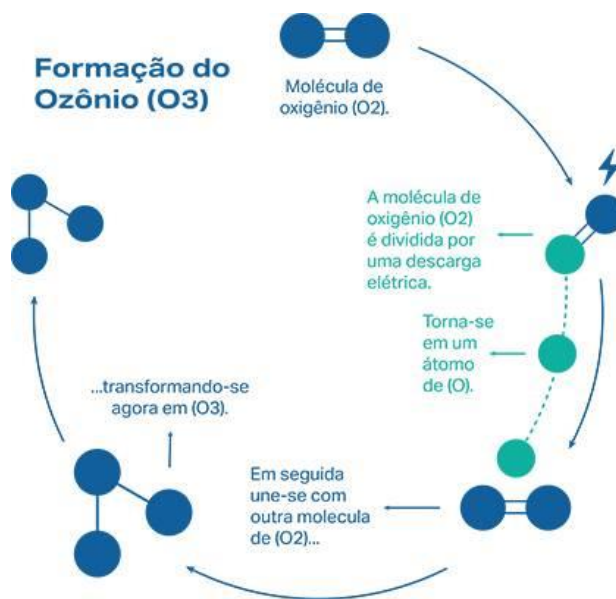
O O_3 é um gás instável, incolor, de odor característico e atividade oxidante, constituído por três átomos de oxigênio, descoberto pela primeira vez por Christian Friedrich, no ano de 1984. Quando presente em altas concentrações, o O_3 pode sair da condição incolor e apresentar uma cor azulada. Esse gás tem ponto de fusão $-192^\circ C$ e ponto de ebulição $-112^\circ C$. Sua formação se dá basicamente por descarga elétrica (Figura 1), raios UV e plasma frio (JANI et al., 2012; LIMA; FELIX; CARDOSO, 2021). Seu tempo de meia-vida é de cerca de 40 minutos a $20^\circ C$ e de aproximadamente 140 minutos a $0^\circ C$ (JANI et al., 2012).

O O_3 é capaz de realizar diversas reações químicas com compostos orgânicos e inorgânicos, porém sua reatividade pode depender de alguns fatores como temperatura e pressão

atmosférica. Possui atividade oxidante, principalmente nas interações com compostos insaturados (RODRÍGUEZ et al., 2017). Na água, o O_3 apresenta solubilidade com baixa estabilidade quando dissolvido. Após a aplicação na água, as perdas de O_3 podem ocorrer por evaporação e por características do meio, como temperatura, consumo por microrganismos e interação com outras moléculas do meio (LIMA; FELIX; CARDOSO, 2021).

Atualmente, o O_3 é comumente produzido por máquinas elétricas de fácil aquisição, acopladas em cilindros de oxigênio, que convertem oxigênio em O_3 através de descarga elétrica (Figura 1). O uso de máquinas comerciais conversoras de O_3 já é bastante disseminado entre os profissionais que dominam essa técnica. Esses equipamentos contêm um destruidor de ozônio acoplado que degrada o ozônio residual que não foi utilizado, visto que este não pode ser devolvido para a atmosfera (JANI et al., 2012).

Figura 1. Formação do gás ozônio (O_3) por descarga elétrica



Fonte: Philozon Brasil

A concentração de ozônio liberado pela máquina elétrica conversora de O_3 é calculada com base na tabela de concentração de acordo com fluxo de oxigênio e a voltagem (Tabela 1). Dessa forma, é possível definir qual será a concentração de ozônio ($\mu\text{g/mL}$) liberada, respeitando o protocolo terapêutico estabelecido. Seu uso pode ser adaptado de acordo com o protocolo e o tipo de administração, sendo possível a coleta com retirada direta com seringa estéril e inserção da saída de O_3 da máquina na água, *bag* ou outro foco de tratamento.

Tabela 1. Concentração de ozônio ($\mu\text{g/mL}$) após conversão por máquina comercial

| Vazão de O_2 | DOSADOR | | | | | | | | | | |
|-----------------------|---------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 1,0 L/min | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 15 | 17 |
| 0,75 = 3/4 L/min | 0 | 1.5 | 3 | 4 | 5 | 8 | 10 | 13 | 16 | 19 | 21 |
| 0,5 = 1/2 L/min | 0 | 2 | 5 | 6 | 8 | 12 | 15 | 19 | 22 | 27 | 29 |
| 0,25 = 1/4 L/min | 0 | 4 | 10 | 13 | 16 | 22 | 28 | 34 | 40 | 47 | 51 |
| 0,125 = 1/8 L/min | 0 | 9 | 20 | 26 | 32 | 43 | 52 | 61 | 65 | 69 | 72 |

Legenda: A concentração de ozônio é dada pela relação entre a vazão de oxigênio (O_2) (L/min) e a regulagem do dosador da máquina comercial. Exemplo: para se obter 21 $\mu\text{g/mL}$ de ozônio, é necessário ter uma vazão de $\frac{3}{4}$ L/min de O_2 e uma regulagem do dosador da máquina em 10.

Fonte: Ozone & Life, modelo 1.5 RM.

1.2. Ozonioterapia

Na segunda guerra mundial a ozonioterapia já era usada por Albert Wolff para tratamento de feridas e fístulas e, posteriormente, foi inserido em protocolos de desinfecção durante exame de pacientes com câncer retal e ginecológico (RODRÍGUEZ et al., 2017). O uso do ozônio já foi relatado para diferentes finalidades, como por exemplo na indústria alimentícia, tratamento de água e efluentes e combate a micotoxinas no armazenamento de grãos (LIMA; FELIX; CARDOSO, 2021).

Seu uso em protocolos terapêuticos também já foi relatado em doenças vasculares periféricas, aterosclerose, infecções virais, fúngicas e bacterianas, doenças oculares degenerativas, reumatismo, câncer, AIDS, dentre outros (DI PAOLO; BOCCI; GAGGIOTTI, 2004; JANI et al., 2012). Nos tratamentos dermatológicos, ainda vem sendo usado na recuperação de úlceras e tratamento de alergias, cicatrização e desinfecção de feridas de pele (CHO et al., 2021). Na medicina veterinária, seu uso foi deliberado pela Resolução CFMV nº 1364, de 22 de outubro de 2020 (CFMV, 2020).

Existem relatos na literatura sobre os efeitos benéficos em diversos casos onde o ozônio foi incorporado ao protocolo terapêutico, como no tratamento de feridas em paciente diabético (MARCHESINI; RIBEIRO, 2020), tratamento dermatológico em cão com dermatite bacteriana (BORGES et al., 2019) e uso de ozônio via intra-articular para proliferação óssea e recuperação

de fratura traumática em filhote de cão (MORAES et al., 2022). No trato reprodutivo, o ozônio também é considerado como importante técnica para tratamento de afecções como melhorias nas taxas reprodutivas com uso de ozônio intrauterino, tratamento de metrites, endometrites, retenção de placenta e mastite bovina (RODRÍGUEZ et al., 2017).

Há alguns anos atrás, o uso do ozônio apresentava uma difícil aplicabilidade, pois era visto com potencial toxicológico e seu efeito residual não era muito esclarecido. Atualmente, sabe-se que, quando administrado em doses terapêuticas corretas, o ozônio não apresenta toxicidade. Porém, pode ser ineficiente se utilizado em doses muito baixas (DI PAOLO; BOCCI; GAGGIOTTI, 2004). Atualmente, sua segurança já foi esclarecida inclusive para o seu manuseio pelos aplicadores, respeitando sua dose para uso terapêutico que pode chegar até 100 g/L (HÉRNANDEZ; GONZALES, 2001).

Na ozonioterapia, a aplicação do gás pode ser realizada por diversas vias de administração: óleo ozonizado, auto-hemoterapia maior e menor, água ozonizada, aplicação intra-articular, tratamentos odontológicos, solução salina, conduto auditivo, vias urogenitais, insuflação retal, aplicação em sítios paravertebrais, injeção intramuscular (JANI et al., 2012; SMITH, 2017). A escolha da via de administração e do protocolo terapêutico deve ser avaliada de forma individual para cada caso, considerando-se a idade e comorbidades pré-existentes como pacientes asmáticos, cardíacos, geriátricos, entre outros (LIMA; FELIX; CARDOSO, 2021).

1.3. Ações biológicas do ozônio

1.3.1. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e a atividade de defesa antioxidante, gerando assim um acúmulo de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). Os radicais livres podem agir doando ou ganhando elétrons na busca por estabilidade, o que altera a estrutura celular e, além disso, essas reações dão origem a mais radicais livres, elevando ainda mais o seu acúmulo diante de um estresse oxidativo. As causas de estresse oxidativo geralmente são diversas, podendo ocorrer por fatores endógenos (alteração da função mitocondrial e dos peroxissomos, lipoxigenase, NADPH-oxidase), alteração

da atividade antioxidante (baixa atividade das enzimas antioxidantes, deficiência de agentes antioxidantes não enzimáticos como vitamina A, C e E, glutathione, dentre outros) e exógenos (exposição a agentes oxidantes como toxinas, bactérias, quimioterapias, radiação) (ILIE; MARGINA, 2012).

Atualmente, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com base nos efeitos do estresse oxidativo no organismo, pois se trata de um assunto complexo e de grande importância, relacionado com envelhecimento e desenvolvimento de diversas doenças como câncer, diabetes, asma, dentre outras (TSIKAS, 2017). As ROS estão relacionadas também com algumas doenças como aterosclerose, doenças neurodegenerativas, diabetes, artrite reumatóide, dentre outras (ZOROV; JUHASZOVA; SOLLITT, 2014). As ROS são altamente reativas, podendo reagir com estruturas próximas como proteínas, DNA e lipídeos (TSIKAS, 2017). Geralmente são geradas por ação do oxigênio em nutrientes ou componentes fisiológicos do organismo (ILIE; MARGINA, 2012).

O ozônio tem uma alta atividade oxidante, reagindo com compostos orgânicos e podendo clivar ligações duplas de carbono, essa oxidação pode ser potencializada na presença de raios UV, íons metálicos e pH alcalino (LIMA; FELIX; CARDOSO, 2021). Além disso, devido a oxidação do meio, estimula a ação de enzimas antioxidantes, permitindo que haja um maior efeito antioxidante no organismo, neutralizando ocorrências de estresse oxidativo e nitrosativo (DI PAOLO; BOCCI; GAGGIOTTI, 2004; SMITH, 2017). Pode, ainda, inibir a formação de ROS, evitando a formação de cascatas de inflamação (Figura 3) (MANOTO; MAEPA; MOTAUNG, 2018).

Em um estudo conduzido por CHO et al. (2021), o óleo de girassol ozonizado foi utilizado em embriões de zebrafish (*Danio rerio*). O estudo demonstrou uma importante atividade antioxidante do óleo ozonizado, favorecendo o crescimento celular devido a inibição de ROS e protegendo os embriões de zebrafish (*Danio rerio*) da mortalidade causada por agentes oxidantes exógenos (H_2O_2).

1.3.2. Atividade antimicrobiana

Em 1872, Benjamin Collins Brodie começou a investigar sobre as atividades antimicrobianas do ozônio e sua ação no controle e eliminação de microrganismos (RODRÍGUEZ et al., 2017). A atividade antimicrobiana do O₃ é um fator de destaque para o uso do gás em diversos casos, como tratamento de efluentes, obtenção de água potável, desinfecção de feridas de pele, profilaxia dentária, controle de micotoxinas, produção de alimentos como lácteos, frutas e frutos do mar. Na água, o O₃ é capaz de reagir com OH⁻ formando HO₂ e O₂, levando a oxidação da matéria orgânica na água ozonizada (LIMA; FELIX; CARDOSO, 2021).

A atividade antimicrobiana do ozônio se dá devido a oxidação de membrana celular e de componentes celulares, com oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos, levando a morte de agentes patogênicos (GURLEY, 1985; TUNCER, 2013). Nos fungos, inibe o crescimento celular, e nos vírus altera os sítios de modulação da replicação e a estrutura dos capsídeos, deixando-os susceptíveis à oxidação (ELVIS; EKTA, 2011). Além disso, o aumento do oxigênio oriundo do ozônio pode ser deletério para microrganismos patogênicos anaeróbicos (TUNCER, 2013).

Em um estudo conduzido por Tuncer et al. (2013), a contagem *in vitro* de unidades formadoras de colônia (UFC) de *S. mutans* diminuiu consideravelmente nos grupos ozonizados, sendo que no grupo controle foram observadas 1110 UFC e apenas 580 UFC no grupo tratado. Para as bactérias *S. salivarius*, *A. viscosus*, *L. casei* e *L. acidophilus*, os autores observaram um decréscimo de 1250 para 790 UFC, 1380 para 980 UFC, 1400 para 1049 UFC e 860 para 290 UFC, respectivamente.

A atividade antimicrobiana do ozônio também foi relatada em feridas cutâneas em paciente diabético. Os autores utilizaram *bag* de ozônio por 10 minutos no membro afetado e, após 15 sessões, tiveram uma diminuição de 100.000 UFC para menos de 350 UFC (MARCHESINI; RIBEIRO, 2020). Cho et al. (2021) relataram a inibição do crescimento de *E. coli* e *C. albicans* com o uso de óleo de girassol ozonizado, elucidando assim sua ação fungicida e bactericida.

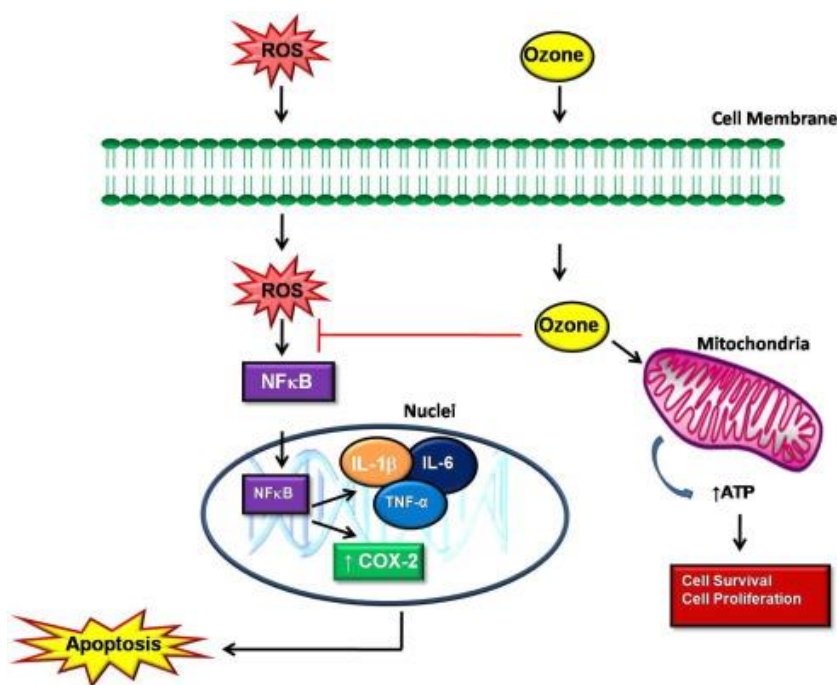
A inibição do crescimento de microrganismos pode ser avaliada de diversas formas após o uso de ozônio, dentre elas isolamento em meios de cultura, reação em cadeia de polimerase (PCR), ensaios imunoenzimáticos, entre outros. Um exemplo é o método de Número Mais

Provável (NMP), segundo protocolo de Hunt e Rice (2005). Nessa técnica, é utilizado o caldo lauril sulfato triptose para determinar a presença de bactérias coliformes (VIROTE et al., 2022).

1.3.3. Atividade antinflamatória, imunomoduladora e de proliferação celular

O ozônio desloca a curva de dissociação da hemoglobina, facilitando a liberação do oxigênio e nas plaquetas favorecendo a liberação de fatores de crescimento (DI PAOLO; BOCCI; GAGGIOTTI, 2004). Em doenças inflamatórias degenerativas, a formação de ROS ativa o fator nuclear kapa (NFκB) pelo aumento de translocação do ácido nucléico, levando a ativação de um estado inflamatório pela ação de citocinas inflamatórias como TNF-α, IL-6, IL-1β e COX-2, agentes importantes na cascata de processo inflamatório, levando a apoptose celular. O uso de ozônio neutraliza a ação de ROS, inibindo a ativação de NFκB (Figura 3), resultando em uma maior sobrevivência celular e reduzindo os danos teciduais em doenças degenerativas (MANOTO; MAEPA; MOTAUNG, 2018).

Figura 3. Mecanismo de ação do ozônio em doença inflamatória degenerativa



Fonte: Adaptado de Manoto, Maepa & Motaung (2018)

Em um estudo com pacientes com psoríase tratados com autohemoterapia ozonizada (ozônio a 20 µg/mL), foi observado um aumento nos níveis de PPAR- γ , um importante regulador de lipídeos no sangue e modulador de resposta inflamatória. Além disso, foi observado um aumento dos níveis de HDL e uma diminuição do colesterol total, LDL e triglicerídeos, além de apresentarem uma supressão de marcadores inflamatórios como TNF- α e interleucinas. Os autores afirmam que a autohemoterapia ozonizada é uma excelente alternativa para imunomodulação no tratamento da psoríase (ZHEN et al., 2021).

Quando aplicado no organismo, o ozônio consegue penetrar pelos tecidos, o que aumenta a oxigenação, reduz agregação plaquetária, age na modulação da algésia e na ativação do sistema reticuloendotelial (HERNÁNDEZ; GONZÁLEZ, 2001). Além disso, o ozônio é capaz de modificar a estrutura e o número de eritrócitos circulantes, o que também corrobora com um aumento da oxigenação, principalmente em casos onde há isquemia tecidual (BOCCI, 1992; LEITE, 1999). Quando a oxigenação tecidual é aumentada, algumas alterações fisiológicas podem ser desencadeadas, como um maior estímulo a mecanismos de resposta imunológica relacionados com o aumento da produção de imunoglobulinas e aumento da atividade fagocitária (BOCCI, 1992).

O ozônio aumenta os níveis de TGF- β , um importante remodelador tecidual, induz o aumento da produção de ATP mitocondrial, pela via enzimática da glicólise e aumenta a oxigenação tecidual, levando assim a um aumento da proliferação celular e reduzindo a apoptose celular (Figura 3) (MANOTO; MAEPA; MOTAUNG, 2018). A regeneração tecidual já foi relatada por Marchesini & Ribeiro (2020), onde os autores observaram uma diminuição de ferida cutânea após uso de ozônio através de análise métrica (cm) da área da ferida em membro posterior. Os autores relataram uma diminuição de 3.5 cm no diâmetro da ferida e de 3 cm na altura após o uso de *bag* de ozônio por 15 seções.

1.3.4. Uso de ozônio na aquicultura

Nos sistemas de recirculação, o ozônio já vem sendo apontado como agente de desinfecção, mantendo a qualidade da água no sistema (HAMMER, 2020; VIROTE et al., 2022).

O ozônio é rapidamente absorvido pela água, destruindo microrganismos como bactérias, vírus e protozoários, sendo necessário que seu efeito residual seja mantido por alguns segundos (MALONE, 2013). Além disso, rapidamente é convertido em oxigênio, levando a uma importante atividade oxidante. Diante de todas essas características, seu interesse comercial para uso na aquicultura tem crescido nos últimos anos, sendo aplicado tanto no tratamento de efluentes quanto nos sistemas de recirculação de água (POWELL; SCOLDING, 2018).

Na água, a ação do ozônio pode ser mensurada pelo potencial de oxidação-redução (ORP, do inglês oxygen reduction potential). Pode ser mensurado com eletrodos que captam a oxidação (anodo) e redução (catodo), e com isso determinar o poder de ação do ozônio, já que agentes oxidantes solúveis conseguem aumentar a diferença de potencial entre anodos e catodos e, com isso, determina-se o ORP na água, mensurado em mV (STILLER et al., 2020; POWELL; SCOLDING, 2018).

Existem poucos relatos na literatura relacionados à ação do ozônio em peixes, destacando-se alguns trabalhos avaliando o uso de ozônio no cultivo de salmão atlântico (*Salmo salar*) (STILLER et al., 2020) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (GESTO; GERGERSEN; PEDERSEN, 2022) e em meio de crescimento de embriões de zebrafish (*Danio rerio*) (HAO et al., 2015; ROTHE et al., 2021; VIROTE et al., 2022). Entretanto, não existem relatos sobre o uso de ozônio em sistema de recirculação de água para o cultivo de animais adultos de zebrafish (*Danio rerio*).

Um trabalho avaliou o uso de ozônio no cultivo de salmão atlântico (*Salmo salar*) em cinco milivoltagem diferentes (250 mV – controle; 280 mV – baixo; 350 mV – médio; 425 mV alto; 500 mV – super alto). Após a exposição do salmão ao ORP (mv) causado pelo ozônio na água, os animais expostos a mais de 425 mV apresentaram aumento da mortalidade e alterações das brânquias, dentre elas fusão lamelar e hipertrofia. Além disso, os níveis mais elevados de ORP aumentaram também o estresse oxidativo e a produção de resposta inflamatória nas brânquias, avaliados por expressão gênica. Os autores afirmam que a exposição ao ORP não deve ultrapassar de 350 mV no cultivo de salmão atlântico (STILLER et al., 2020).

Diversos benefícios do uso do ozônio na aquicultura podem ser explorados, principalmente quando se trata de melhorias na qualidade da água e controle de microrganismos patogênicos. Entretanto, os efeitos do ozônio na saúde dos peixes deve ser considerado e potenciais

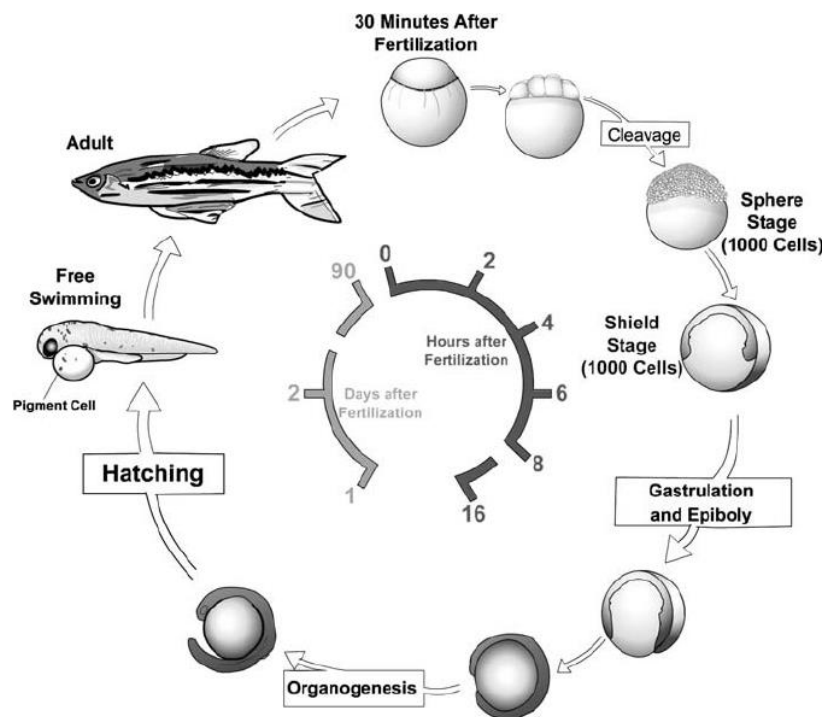
efeitos toxicológicos devem ser descartados, para que seu uso seja implementado com segurança e de forma viável e produtiva. Deve-se ainda buscar esclarecer as concentrações adequadas e os limites máximos para o uso do ozônio em sistema de criação de peixes.

2. Zebrafish (*Danio rerio*) como um modelo animal de pesquisa

2.1. A espécie zebrafish (*Danio rerio*)

O zebrafish (*Danio rerio*) é um modelo animal amplamente utilizado em estudos biológicos e toxicológicos (CASTRO et al., 2022). Essa espécie tornou-se um modelo experimental utilizado em diversas áreas de pesquisa, ressaltando-se ensaios embriotxicológicos, farmacológicos, comportamentais e nutricionais. Seu uso como modelo animal de estudo foi consolidado devido a sua similaridade genética e fisiológica com outras espécies animais e humanos, além de possuir um genoma completamente sequenciado.

O uso do zebrafish (*Danio rerio*) para fins experimentais apresenta algumas particularidades que deixam o modelo muito interessante: seus ovos são numerosos, transparentes e obtidos de maneira controlável e seus embriões se desenvolvem rapidamente e são fáceis de se avaliar (D’COSTA; SHEPERD, 2009). Como o desenvolvimento embrionário ocorre no meio externo, sua visualização e análise é fácil e viável, ao contrário de outros modelos animais de estudo como roedores, onde o desenvolvimento embrionário é intra-uterino e a avaliação dos embriões é inacessível. Portanto, devido a todas essas características, o zebrafish (*Danio rerio*) se destaca nos ensaios embriotxicológicos em diversos países. O zebrafish (*Danio rerio*) inicia seu desenvolvimento a partir de um zigoto unicelular, em uma célula vitelínica. A gastrulação se inicia cerca de 6 hpf e a eclosão em aproximadamente 72 hpf, resultando no nado livre das larvas (Figura 4).

Figura 4. Ciclo de vida do zebrafish (*Danio rerio*)

Fonte: D'Costa & Shepherd (2009)

A maturidade sexual ocorre com cerca de três meses de vida e os animais, geralmente, vivem até aproximadamente cinco anos. Seu dimorfismo sexual favorece mais o sexo feminino, e os animais machos e fêmeas podem ser diferenciados devido características específicas para o sexo, sendo mais facilmente observadas quando os animais já atingiram a idade adulta. Geralmente, os machos são menores, mais alongados e com listas douradas, enquanto as fêmeas têm o corpo maior e mais arredondado, de colocação mais esbranquiçada (RIBAS; PIFERRER, 2014).

Para cada fase de vida do zebrafish (*Danio rerio*) há uma exigência nutricional diferente. Para as larvas, o ideal é uma dieta baseada em zooplânctons e materiais orgânicos, e nessa fase a alimentação deve ser fornecida de forma constante e o mais próximo possível do que é preconizado, principalmente entre 6-15 dias pós fertilização, onde as larvas se encontram em fase crítica de sobrevivência. Para os adultos, pode-se introduzir na alimentação zooplânctons, phytoplanktons, filamentos de algas. Além disso, indica-se também o uso de ciliados, *Artemia nauplii* e rotíferos. No cultivo de zebrafish (*Danio rerio*), o uso de alimentos secos formulados para a espécie é utilizado em larga escala (RIBAS; PIFERRER, 2014).

A espécie possui tipos sanguíneos semelhantes quando comparados com mamíferos, e essa homologia também é vista na estrutura, localização e funcionalidade das células sanguíneas. A hematopoiese no zebrafish (*Danio rerio*) ocorre de forma primitiva logo nas primeiras horas pós-fertilização (hpf), para acompanhar o desenvolvimento acelerado dos embriões. Posteriormente, aproximadamente a partir de 26 hpf, a hematopoiese já se inicia de forma definitiva para manter todo o ciclo de produção, manutenção e renovação das células hematopoiéticas durante a vida do animal (GORE et al., 2018).

2.2.Sistema de recirculação de água no cultivo de peixes

Na aquicultura, e não diferentemente na criação de zebrafish (*Danio rerio*), a água deve estar limpa e devidamente oxigenada, com adequado controle de resíduos sólidos e compostos nitrogenados sabidamente tóxicos para os peixes. Deve-se atentar, ainda, para o suporte de oxigênio, essencial para a sobrevivência dos animais e para a ação de bactérias aeróbicas nitrificantes presentes nos filtros biológicos, necessárias para a qualidade da água no sistema (HAMMER, 2020).

A recirculação da água no cultivo de peixes é essencial para a manutenção de diversas condições vitais para os animais, dentre as mais variadas espécies. Atualmente, existem sistemas automatizados de recirculação de água para zebrafish (*Danio rerio*) com controle de parâmetros limnológicos, abastecimento individual de água nos aquários, calhas para coleta da água em recirculação, reservatório de água, filtros e bombas de água (Figura 5).

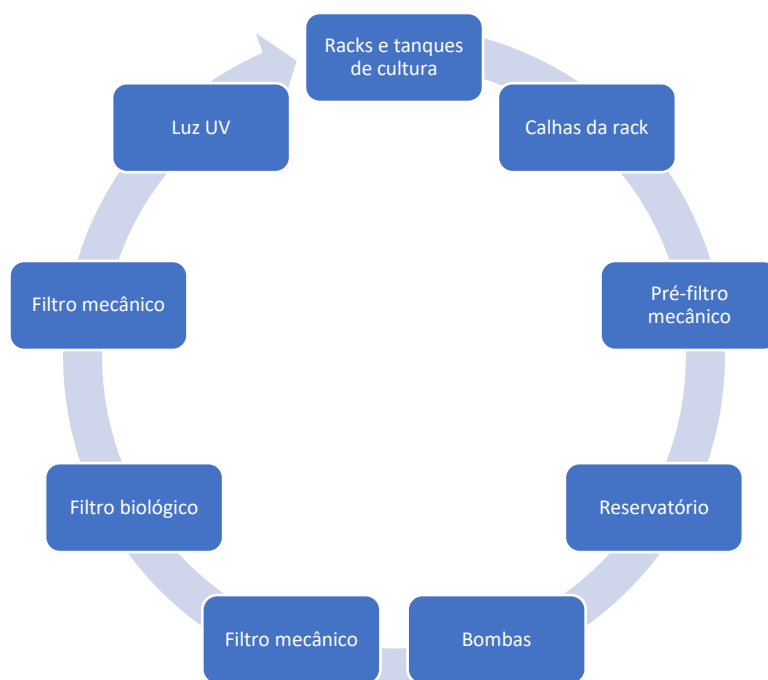
Figura 5. Rack comercial (Hydrus-Alesco) para cultivo de zebrafish (*Danio rerio*) em sistema automatizado de recirculação de água



Fonte: Autor (2022)

Parâmetros como pH, temperatura, níveis de oxigênio, amônia, nitrato e colonização bacteriana devem ser mantidos nos níveis ideais dentro do sistema, evitando assim que haja um desequilíbrio entre esses fatores. Portanto, necessita-se de um controle rotineiro da qualidade da água, garantido assim as condições ideais para o crescimento, desenvolvimento, manutenção, saúde e bem-estar dos animais (GESTO; GERGERSEN; PEDERSEN, 2022). O sistema de recirculação de água para zebrafish (*Danio rerio*) é constituído por várias etapas: tanques de cultura, calhas, filtros mecânicos, filtros biológicos, reservatório, bombas e luz UV (Figura 6).

Figura 6. Sistema de recirculação de água para cultura de zebrafish (*Danio rerio*)



Legenda: a água é recolhida do tanque para a rack, passando por um pré-filtro mecânico (filtro de poliéster, meia de filtro, tela de aço), chegando até o reservatório. As bombas de água movem a água do reservatório até o filtro mecânico, com remoção de partículas sólidas. A água segue para o filtro biológico onde ocorre oxidação bacteriana dos resíduos nitrogenados. A água sai do filtro biológico e é filtrada mecanicamente até que passa por desinfecção ultravioleta (UV), eliminando patógenos antes que retorne novamente ao tanque.

Fonte: Adaptado de Hammer (2020).

Os filtros biológicos são responsáveis pela manutenção do oxigênio disponível e pela remoção de resíduos nitrogenados de característica tóxica para os peixes, oriundos de restos alimentares, metabolismo de proteínas e resíduos fecais. Esse processo, chamado de nitrificação, permite a eliminação de amônia (NH_3), nitrito (NO_2) e nitrato (NO_3). Dois principais grupos de bactérias aeróbicas nitrificantes são responsáveis por esse processo: bactérias amônia-oxidantes, capazes de converter NH_3 em NO_2 e bactérias nitrito-oxidantes que convertem NO_2 em NO_3 (HAMMER, 2020).

A desinfecção utilizando lâmpada de luz ultravioleta (UV) é utilizada para eliminação de microrganismos patogênicos, penetrando no DNA, bloqueando sua replicação e impedindo a proliferação desses agentes (HAMMER, 2020). Contudo, a utilização do ozônio na água em sistema de recirculação retira a necessidade de se usar luz UV, pois o próprio ozônio tem

propriedades antifúngicas e antibacterianas, levando ao controle de patógenos no sistema (ELVIS; EKTA, 2011; MALONE, 2013). Além disso, devido a outros diversos efeitos do ozônio relacionado com qualidade da água e com a saúde dos animais, se torna uma opção de maior versatilidade e com uma melhor aplicabilidade no sistema de recirculação de água para cultivo de peixes.

O uso do ozônio em sistema de recirculação de água tem capacidade de melhorar a qualidade da água, reduzindo conteúdos orgânicos, deixando a água mais clara e melhorando a atividade de nitrificação no biofiltro (MALONE, 2013). Isso é possível devido suas propriedades viricida, fungicida e bactericida por oxidação de membrana celular e de componentes celulares levando a morte de agentes patogênicos. O aumento de oxigênio formado pela aplicação do ozônio é tóxico para microrganismos anaeróbicos, o que justifica o fato do ozônio conseguir matar fungos, vírus e bactérias anaeróbicas (TUNCER, 2013).

O nível de oxigênio na água é um fator crítico para a manutenção dos peixes e de bactérias aeróbicas que habitam o sistema de recirculação, principalmente na porção biológica dos filtros (TUNCER, 2013). A concentração de oxigênio dissolvido na água é variável e depende de diversos fatores, dentre eles salinidade, temperatura e altitude. Para o cultivo de zebrafish, a concentração de oxigênio deve estar próxima de 6-9 mg/L e o monitoramento deve ser realizado com frequência (MALONE, 2013; HAMMER, 2020).

No sistema de recirculação há saída de água por torneiras, causando uma agitação nos aquários individualmente, com certo borbulhamento de água. Esse efeito é chamado de “desgaseificação”, pois proporciona oxigenação com uma remoção concomitante de CO₂. Com isso, é possível manter um equilíbrio entre O₂ e CO₂, já que há uma tendência das bactérias do filtro consumirem muito O₂, diminuindo sua concentração e elevarem os níveis de CO₂, o que resultaria em uma baixa qualidade da água para os animais (HAMMER, 2020).

Entretanto, um desequilíbrio no sistema de recirculação pode afetar a saturação de O₂, seja por consumo excessivo de O₂ pelas bactérias ou por diminuição ou ausência de aeração na água. Por isso, com um maior aporte de oxigênio na água proveniente da ozonização, a manutenção dos níveis de O₂ tende a ser mais controlada e de fácil manutenção, o que seria um resultado positivo esperado pelo uso de ozônio na água em sistemas de recirculação para cultivo de peixes. Além disso, se a saturação de oxigênio é aumentada pelo uso de ozônio na água, isso seria um

fator benéfico para as bactérias aeróbicas do filtro biológico, favorecendo sua atividade nitrificante e melhorando então o controle dos níveis de NH_3 , NO_2 e NO_3 no sistema (MALONE, 2013).

2.3. Ozônio e o modelo zebrafish (*Danio rerio*)

O uso do ozônio em embriões de zebrafish (*Danio rerio*) vem sendo relatado em estudos recentes (HAO et al., 2015; CHO et al., 2021; ROTHE et al., 2021; VIROTE et al., 2022). Entretanto, não existem relatos sobre o uso de ozônio em sistema de recirculação de água para o cultivo de animais adultos de zebrafish (*Danio rerio*).

Um estudo conduzido por Hao et al. (2015) avaliou a regulação da resposta inflamatória em embriões de zebrafish (*Danio rerio*). Os autores concluíram que a concentração ótima de ozônio para os embriões foi de 0.1 mg/L. Segundo resultados do estudo, o ozônio promoveu um maior recrutamento de neutrófilos em ferida provocada na cauda, levando a uma maior regeneração tecidual quando comparado com o grupo controle, 24 e 72 hpf (HAO et al., 2015).

Os embriões de zebrafish (*Danio rerio*) foram usados também por Cho et al. (2021) para se avaliar os efeitos de óleo de girassol ozonizado. Ao expor os embriões ao peróxido de hidrogênio, o óleo ozonizado demonstrou um efeito protetor no grupo tratado, impedindo a mortalidade dos embriões, que no grupo controle foi relatada em 100% após exposição ao peróxido de hidrogênio.

Virote et al. (2022) avaliaram o uso de ozônio no meio de desenvolvimento embrionário de embriões de zebrafish (*Danio rerio*) e os autores não observaram alterações na sobrevivência ou taxa de eclosão das larvas, reforçando a ausência de efeitos deletérios aos embriões nas concentrações utilizadas (meio E₃ com 72 µg/mL de ozônio, acrescenta ao meio em diluições seriadas). Além disso, os autores relataram uma diminuição significativa no crescimento de fungos e de bactérias do gênero coliforme, confirmando o potencial antimicrobiano do ozônio.

No estudo de Rothe et al. (2021) a água residual e a água de rio foram ozonizadas e embriões de zebrafish (*Danio rerio*) foram cultivados como modelo para avaliações toxicológicas, comparando com um grupo controle cultivado em água sem ozônio. Os autores não encontraram efeitos toxicológicos do uso do ozônio, mas relataram uma diminuição no nado livre das larvas e

um aumento na frequência cardíaca e frequência respiratória. Para eles, essas alterações podem estar relacionadas com os compostos da água de rio e da água residual, e não necessariamente são atribuídas ao ozônio.

3. Considerações finais

O ozônio é um gás amplamente utilizado, com diversas finalidades e meios de ação. No zebrafish (*Danio rerio*) seu uso ainda pode ser mais explorado, principalmente porque vários estudos terapêuticos e toxicológicos podem ser conduzidos com esse modelo animal. Por isso, torna-se relevante e necessária a realização de estudos que busquem esclarecer os efeitos do uso do ozônio nessa espécie, principalmente para a saúde dos animais adultos e também na qualidade da água tratada com ozônio em sistema de recirculação para zebrafish (*Danio rerio*).

REFERÊNCIAS

BOCCI, V. Ozonization of blood for the therapy of viral diseases and immunodeficiencies. A hypothesis. **Medical hypotheses**, v. 39, 1992.

BORGES, T. L. Ozonioterapia no tratamento de cães com dermatite bacteriana: relato de dois casos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 32, 2019.

CASTRO, T. F. D. et al. The toxicological effects of *Eryngium foetidum* extracts on zebrafish embryos and larvae depend on the type of extract, dose, and exposure time. **Toxicology Research**, 2022.

CHO, K. H. et al. Ozonated Sunflower Oil Exerted Protective Effect for Embryo and Cell Survival via Potent Reduction Power and Antioxidant Activity in HDL with Strong Antimicrobial Activity. **Antioxidants**, v. 10, 2021.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (CFMV). Resolução nº 1364, de 22 de outubro de 2020. Define orientações para a ozonioterapia em animais. **Diário Oficial da União**, seção: 1, edição 204, p. 528, 23 outubro 2020.

D’COSTA, A. SHEPERD, I. Zebrafish Development and Genetics: Introducing Undergraduates to Developmental Biology and Genetics in a Large Introductory Laboratory Class. **Zebrafish**, v. 6, n. 2, 2009.

DI PAOLO, N.; BOCCI, V.; GAGGIOTTI, E. Ozone therapy. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 27, n. 3, 2004.

ELVIS, A. M.; EKTA, J. S. Ozone therapy: a clinical review. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, 2011.

GESTO, M.; GERGERSEN, K. J. J.; PEDERSEN, L. Effects of ozonation and foam fractionation on rainbow trout condition and physiology in a small-scale freshwater recirculation aquaculture system. **Aquaculture**, v. 557, 2022.

GORE, A. V.; PILLAY, L. M.; GALANTERNIK, M. V.; WEINSTEIN, B. M. The zebrafish: a fantastic model for hematopoietic development and disease. **Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.**, v. 7, n. 3, 2018.

GURLEY, B. Ozone: pharmaceutical sterilant of the future? **Journal of parenteral science and technology**, v. 39, 1985. p. 256-261.

HAMMER, H. S. Recirculation Aquaculture System (RAS) for zebrafish culture. **The Zebrafish in Biomedical Research**, cap. 30, 2020. p. 337-356.

HAO, K. et al. Ozone promotes regeneration by regulating the inflammatory response in zebrafish. **International Immunopharmacology**, v. 28, 2015.

HERNÁNDEZ O.; GONZÁLEZ, R. Ozonoterapia En Úlceras flebostáticasin: **Rev Cubana Cir**, v. 40, n. 2, 2001. p.123-129.

HUNT, H. E.; RICE, E. W. Microbiological Examinations. In: EATON, A. D. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21th ed. Washington, APHA, p. 9-1 – 9-169, 2005.

JANI, P. et al. Ozone therapy: the alternative medicine of future. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 2, n. 4, 2012.

ILIE, M.; MARGINA, D. Trends in the Evaluation of Lipid Peroxidation Processes. **InTech**, cap. 5, 2012.

LEITE, R. C.; **Ozonio**, 1. Ed.- Curitiba: Corpo Mente Publicações, 1999. 138 p.

LIMA, M. J. A; FELIX, E. P.; CARDOSO, A. A. Aplicações e implicações do ozônio na indústria, ambiente e saúde. **Química Nova**, v. 44, n. 9, 2021.

MALONE, R. Recirculation Aquaculture Tank Production Systems: a review of current design practice. **Southern Regional Aquaculture Center**, n. 453, 2013.

MANOTO, S. L.; MAEPA, M. J.; MOTAUNG, S. K. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis. **Saudi Journal of Biological Science**, v. 25, n. 2, 2018.

MARCHESINI, B. F.; RIBEIRO, S. B. Efeito da ozonioterapia na cicatrização de feridas. **Fisioterapia Brasil**, v. 21, n. 3, 2020.

MORAES, B. C. et al. O efeito da ozonioterapia no tratamento de fratura de fêmur em filhote canino: relato de caso. **Revista MV & Z**, v. 20, n. 1, 2022.

POWELL, A.; SCOLDING, J. W. S. Direct application of ozone in aquaculture systems. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, 2018.

RIBAS, L.; PIFERRER, F. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. **Reviews in Aquaculture**, v. 6, 2014.

RODRIGUÉZ, Z. B. Z. et al. **Ozonioterapia en Medicina Veterinaria**. 1 ed. La Habana: Multimedia, 2017.

ROTHER, L. E. et al. Effects of conventionally-treated and ozonated wastewater on mortality, physiology, body length, and behavior of embryonic and larval zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Pollution**, v. 286, 2021.

SMITH, N. L. et al. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. **Medical Gas Research**, v. 7, n. 3, 2017.

STILLER, K. T. et al. The effects of the ozone on Atlantic Salmon Post-Smolt in brackish water – establishing welfare indicators and thresholds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 51, 2020.

TAGHVAEI, M. M.; LAHIJI, H. S.; GOLFAZANI, M. M. Evaluation of expression changes, proteins interaction network, and microRNAs targeting catalase and superoxide dismutase genes under cold stress in rapeseed (*Brassica napus L.*). **Oilseeds and facts Crops and Lipids**, v. 29, n. 3, 2022.

TSIKAS, D. Assessment of Lipid Peroxidation by Measuring Malondialdehyde (MDA) and Relatives in Biological Samples : Analytical and Biological Challenges. **Analytical Biochemistry**, v. 524, p. 13–30, 2017.

TUNCER, D. et al. Antimicrobial effect of ozone on cariogenic microorganisms in vitro. **Ozone: Science & Engineering: The Journal of the International Ozone Association**, v. 35, 2013.

VIROTE, B. C. R. et al. Use of ozone in the culture medium of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 16, 2022.

ZHEN, J. et al. Ozonated autohemotherapy elevates PPAR- γ expression in CD4⁺ T cells and serum HDL-C levels, a potential immunomodulatory mechanism for treatment of psoriasis. **American Journal of Translational Research**, v. 13, n. 1, 2021.

ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLOTT, S. J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. **Physiol. Rev.**, p. 909-950, 2014.

**OZONE CAN IMPROVE THE WATER QUALITY IN A RECIRCULATION SYSTEM
TO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Kianne Silva Monteiro¹, Moisés Silvestre de Azevedo Martins¹, William Franco Carneiro¹, Kiara Cândido Duarte da Silva¹, Letícia Meireles Silva¹, Luis David Solis Murgas^{1,*}

¹Department of Veterinary Medicine, Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil.

*Corresponding author: lsmurgas@ufla.br (L. D. S. Murgas)

Abstract: Ozone therapy is an important technique used in human and veterinary medicine, aquaculture and industry due to many factors, including antimicrobial and anti-inflammatory properties. Zebrafish (*Danio rerio*) is a consolidated organism model that is largely cultivated and most important to toxicological and pharmacological assays. However, ozone therapy in a water recirculation system for zebrafish (*Danio rerio*) was not evaluated and did not describe the effects on animal health or water quality. Therefore, the aim of this study was to evaluate the use of ozone in a zebrafish (*Danio rerio*) water recirculation system and the effects on animal health and limnological parameters. A total of 120 adults of zebrafish (*Danio rerio*) were used, eight to ten months old, and the water of each aquarium was ozonated for 10 minutes, according to the following protocols: Group 1 (O52OD): ozonated water (52 µg/ml) once a day; Group 2 (O52TD): ozonated water (52 µg/ml) twice a day; Group 3 (O72OD): ozonated water (72 µg/ml) once a day; Group 4 (O72TD): ozonated water (72 µg/ml) twice a day; Control group (CG): water without ozone. Ten days after the treatment, animals were euthanized with tricaine (250 mg/mL) for further analysis, and water samples were collected for limnological parameter evaluation. Based on the results, the use of ozone significantly decreased ($p < 0.05$) the growth of coliform bacteria and increased ($p < 0.05$) the concentration of oxygen in all treated groups compared with the control

group. Additionally, ozone decreased ($p < 0.05$) the levels of nitrate, and an increase ($p < 0.05$) in the number of thrombocytes was observed. Gill histological alterations were observed in the treated groups, such as fusion of lamellas, increase in mucous secretion, proliferation of erythrocytes, curvature and vacuoles. Ozone did not increase ($p > 0.05$) reactive oxygen species or antioxidant enzymes, reinforcing that ozone did not cause a significant status of oxidative stress in the animals. Therefore, in this study, we realized that ozone in the water recirculation system of zebrafish (*Danio rerio*) can be considered to stimulate blood and defense cell proliferation and to improve water quality, enabling improvements in zebrafish culture.

Keywords: ozone therapy, aquaculture, model organism, dissolved oxygen concentration, water quality.

Introduction

Ozone therapy is an important technique that uses ozone for different actions due to antimicrobial and anti-inflammatory activities, which are also related to immunomodulation, healing of skin wounds and tissue regeneration (Jani et al., 2012). A few years ago, the use of ozone was not elucidated, and the gas was known to be toxic. Ozone handling is possible due to many studies, showing that the use of ozone does not cause occupational risk.

Ozone in water recirculation systems has the capacity to improve water quality, decrease organic compounds, make the water cleaner and increase nitrifying activity on biofilters by aerobic bacteria (Malone, 2013). This is possible due to its viricide, fungicide and bactericide actions, causing oxidation of membrane and cellular components and posteriorly the death of pathogens on water. In addition, an increase in the oxygen levels in ozonated water is deleterious to anaerobic pathogenic microorganisms, decreasing their survival (Tuncer, 2013). In aquaculture, few articles have been published about the use of ozone (Hao et al., 2015; Stiller et al., 2020; Rothe et al.,

2021; Gesto et al., 2022; Virote et al., 2022). However, the use of ozone in the zebrafish (*Danio rerio*) water recirculation system has not been elucidated or explored.

Zebrafish (*Danio rerio*) is an important animal model for toxicological assays (Castro et al., 2022) used for genomic resources, growth performance, larval development assays, nutrition, environmental and dietary toxicology, vaccine production and disease control in aquaculture (Ribas and Piferrer, 2013). This species has consolidated use as an animal model due to its physiological and genetic similarity with other species and humans. In addition, the genome of zebrafish is completely known, allowing its use in different assays. Due to their wide culture, the management of the zebrafish (*Danio rerio*) water recirculation system needs to be constantly improved, and new techniques need to be evaluated. Water to zebrafish (*Danio rerio*) requires high quality and the proper amount of oxygen, with the control of wastes and nitrogen compounds that are toxic to the animals (Hammer, 2020). Therefore, the aim of this study was to evaluate the use of ozone in a zebrafish (*Danio rerio*) water recirculation system and the effects on animal health and limnological parameters.

Materials and methods

Animal model

This study was conducted at Fish Section on the Animal Housing of Federal University of Lavras, Brazil, by protocols number 045/19 of Ethics Committee in the Use of Animals. A total of 120 adult zebrafish (*Danio rerio*) were used, eight to ten months old, maintained in aquariums with three liters of water (8 fish/aquarium). Animals were kept in a water recirculation system (Rack Hydrus-Alesco) and fed twice a day with commercial feed (Alcon Basic®, Alcon, Brazil). All the environmental conditions were constantly monitored to keep the animals in ideal conditions: temperature at 27 °C, photoperiod at 14 h light:10 h dark and pH at 7.0.

Water ozonation

The water of each aquarium was ozonated with an industrial machine to convert oxygen in ozone (Ozone & Life, 1.5 RM, Brazil) accoupled at the oxygen cylinder with controlled flow. Ozonation was accomplished for 10 minutes in a total of 10 days according to the following protocols: Group 1 (O52OD): ozonated water (52 µg/ml) once a day; Group 2 (O52TD): ozonated water (52 µg/ml) twice a day; Group 3 (O72OD): ozonated water (72 µg/ml) once a day; Group 4 (O72TD): ozonated water (72 µg/ml) twice a day; Control group (CG): water without ozone ($n = 24$ animals per group).

The ozone concentration was based on case reports about the clinical and experimental use of ozone (Di Paolo et al., 2004; Smith, 2017; Rothe, 2021). After 10 days of treatment, animals were euthanized with tricaine (250 mg/mL) for further analysis, and 20 mL of water was collected for limnological parameter evaluation.

Limnology

The dissolved oxygen concentration (mg/L) was obtained by a multiparameter meter (AKSO – AK88) using an oxygen meter function. The concentration of dissolved oxygen was evaluated on the last day of treatment at two different times, before and after water ozonation, to evaluate the variation between the initial (IO) and final (FO) oxygen concentrations. After that, a delta value (ΔO_2) was stipulated using the formula $\Delta O_2 = FO - IO$.

The oxygen reduction potential (ORP) was evaluated to measure the activity of ozone on the water (Stiller et al., 2020). ORP was obtained with an electrode in a pH meter (KASVI, Model K39-1014B) immediately after water ozonation, measuring the difference between the anode and cathode, and the results were obtained in mV (Powell and Scolding, 2018).

The more probable number (MPN) of coliform bacteria was determined by Hunt & Rice (2005) protocols. An aliquot of 10 mL of water was collected in a completely sterile way immediately after ozonation on the last day of treatment. Analysis was performed before to 2 hours of collection to guarantee a minor effect on the bacterial population in the samples.

An aliquot of 20 mL of water was collected on the last day of treatment for further analysis of nitrate (Yang et al., 1998 cited by Matos, 2012), nitrite (APHA, 1998 - Standard Methods 4500-NO₂⁻) and ammonia (Bordon et al., 2022) using a commercial colorimetric test kit (Alconpet, Brazil).

Hematology and histology

Blood from six fish/group ($n = 30$) was extracted by tail resection after euthanasia, prepared by blood smear slide and stained for hematological evaluation (Castro et al., 2018). Relative (%) and absolute (n) numbers of blood and defense cells were counted, such as thrombocytes, vacuolated monocytes, neutrophils, eosinophils and lymphocytes (Weir et al., 2015; Megarani et al., 2020).

Gills of six fish/group ($n = 30$) were collected and prepared according to protocols for histological analysis. Paraffin blocks containing gills were cut at 2 μm for histological evaluation under 10x and 40x optical microscopes (Olympus Corporation, model CX22LEDDRFS1, Tokyo, Japan). Metric analysis was performed using computer analysis (Motic Image Plus 3.0), and lamellar height (mm), interlamellar space (μm) and lamellar mass (μm) were determined (Rahmani et al., 2016).

Oxidative stress

Animal whole bodies ($n = 30$) were macerated using a tissue homogenizer (IKA® ULTRA-TURRAX® disperser tools, stainless steel, Model T25 Basic S1) in phosphate-buffered

saline (PBS) (1:5 m/v). Samples were centrifuged for 30 minutes at 4 °C at 5500 rpm (Thermo Fisher Scientific, Model D-37520, Germany), and the supernatant was kept at -80 °C for further analysis. An oxidative stress assay was performed to evaluate the levels of catalase (CAT) (Aebi, 1984), superoxide dismutase (SOD) (Dieterich et al., 2000), reactive oxygen species (ROS) (Driver et al., 2000) and malondialdehyde (MDA) (Buege and Aust, 1978). Levels of CAT, SOD, ROS and MDA were obtained based on total protein of the samples, determined by Bradford's protocol (Bradford, 1986).

Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). Data were tested for normal distribution by the Shapiro–Wilk test and variance homogeneity by the Levene test. Significant differences were determined by ANOVA, followed by the Tukey test, when applicable. Statistical analyses were conducted using Minitab software version 19, and the level of significance for all statistical tests was set to 5% ($p < 0.05$).

Results

Survival

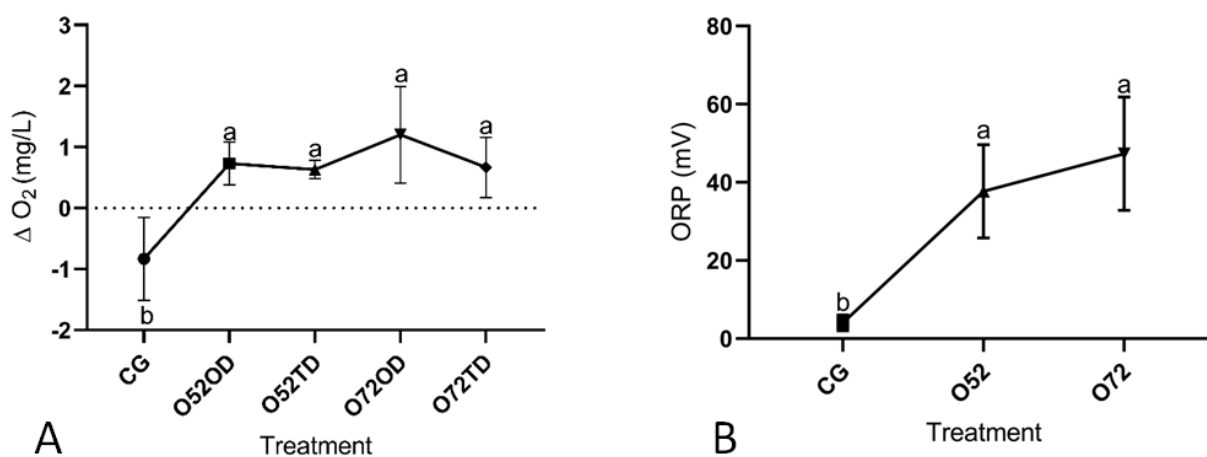
The average animal survival was 88% in all groups, and there was no significant difference between the control group and the treated groups. Survival was also observed in the group without ozonated water, with an average of 90% of survival.

Limnology

There was an increase in the final dissolved oxygen concentration after ozonation in all of the treated groups, with a significant difference ($p < 0.05$) between the ΔO_2 of the treated groups

and the control group (Figure 1). A decrease in the final dissolved oxygen concentration was observed in the control group, causing a negative value of ΔO_2 for this group. The ORP (mV) was significantly higher ($p < 0.05$) in the water with 52 $\mu\text{g/mL}$ and 72 $\mu\text{g/mL}$ ozone than in the control group (Figure 1).

Figure 1. Dissolved oxygen concentration (ΔO_2) and oxygen reduction potential (ORP) in an ozonated water recirculation system for zebrafish (*Danio rerio*)

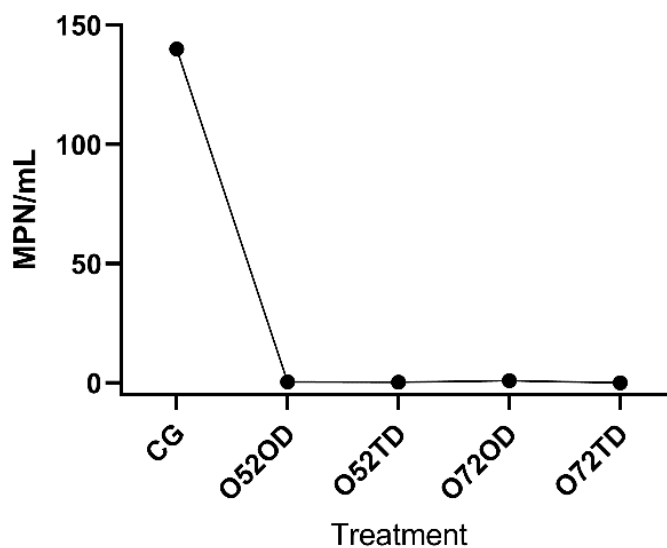


Note: A – Delta (ΔO_2) between the final and initial dissolved oxygen concentrations. CG – control group; O52OD – ozone at 52 $\mu\text{g/mL}$ once a day; O52TD – ozone at 52 $\mu\text{g/mL}$ twice a day; O72OD – ozone at 52 $\mu\text{g/mL}$ once a day; O72TD – ozone at 72 $\mu\text{g/mL}$ twice a day. B – Oxygen reduction potential (ORP) evaluated in the control group (CG) and treated groups: O52 (ozone at 52 $\mu\text{g/mL}$) and O72 (ozone at 72 $\mu\text{g/mL}$). Means followed by different superscripts differ ($p < 0.05$).

Coliform bacterial growth was inhibited with ozone in all of the treated groups. The MPN of coliform bacteria was higher in the control group, with more than 140×10^3 MPN/mL. Turbidity and gas production in the bacterial culture medium were observed, indicating coliform bacterial growth. Coliform bacterial growth in the treated groups was approximately 0.6 MPN/mL, and it

was observed as a clear culture medium without turbidity or gas production, indicating the absence of coliform bacterial growth (Figure 2).

Figure 2. More probable number (MPN) of coliform bacteria growth in ozonated water recirculation system for zebrafish (*Danio rerio*)



Note: CG – control group; O52OD – ozone at 52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ once a day; O52TD – ozone at 52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ twice a day; O72OD – ozone at 72 $\mu\text{g}/\text{mL}$ once a day; O72TD – ozone at 72 $\mu\text{g}/\text{mL}$ twice a day.

Levels of nitrite, nitrate and ammonia are described in Table 1. A decrease in nitrate levels was observed ($p < 0.05$) in the O52OD, O72OD and O72TD groups. There were no significant differences ($p > 0.05$) for nitrite and ammonia in the control group and treated groups.

Table 1. Nitrogen compounds of the ozonated water recirculation system for zebrafish (*Danio rerio*)

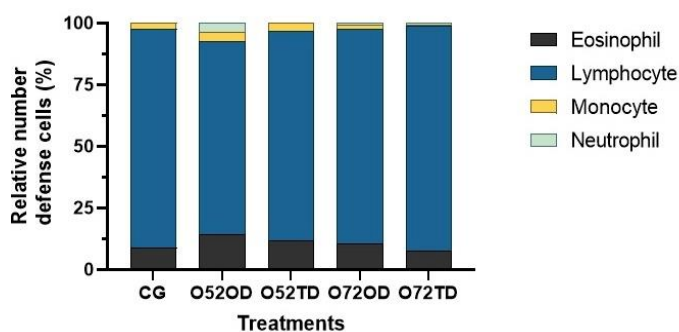
| Treatment | CG | O52OD | O52TD | O72OD | O72TD |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Nitrite (mg/L) | 0.02 ± 0.00 | 0.02 ± 0.00 | 0.02 ± 0.00 | 0.02 ± 0.00 | 0.01 ± 0.00 |
| Nitrate (mg/L) | 0.16 ± 0.00 ^a | 0.11 ± 0.02 ^b | 0.19 ± 0.02 ^a | 0.10 ± 0.01 ^b | 0.10 ± 0.00 ^b |
| Ammonia (mg/L) | 0.01 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.01 ± 0.00 | 0.01 ± 0.00 | 0.01 ± 0.00 |

Note: CG – control group; O52OD – ozone at 52 µg/mL once a day; O52TD – ozone at 52 µg/mL twice a day; O72OD – ozone at 72 µg/mL once a day; O72TD – ozone at 72 µg/mL twice a day. Means followed by different superscripts in the same row differ ($p < 0.05$).

Hematology

Blood and defense cells were observed in the control group and treated groups. The frequency (%) of each defense cell did not differ ($p > 0.05$) among the control group and treated groups (Figure 4).

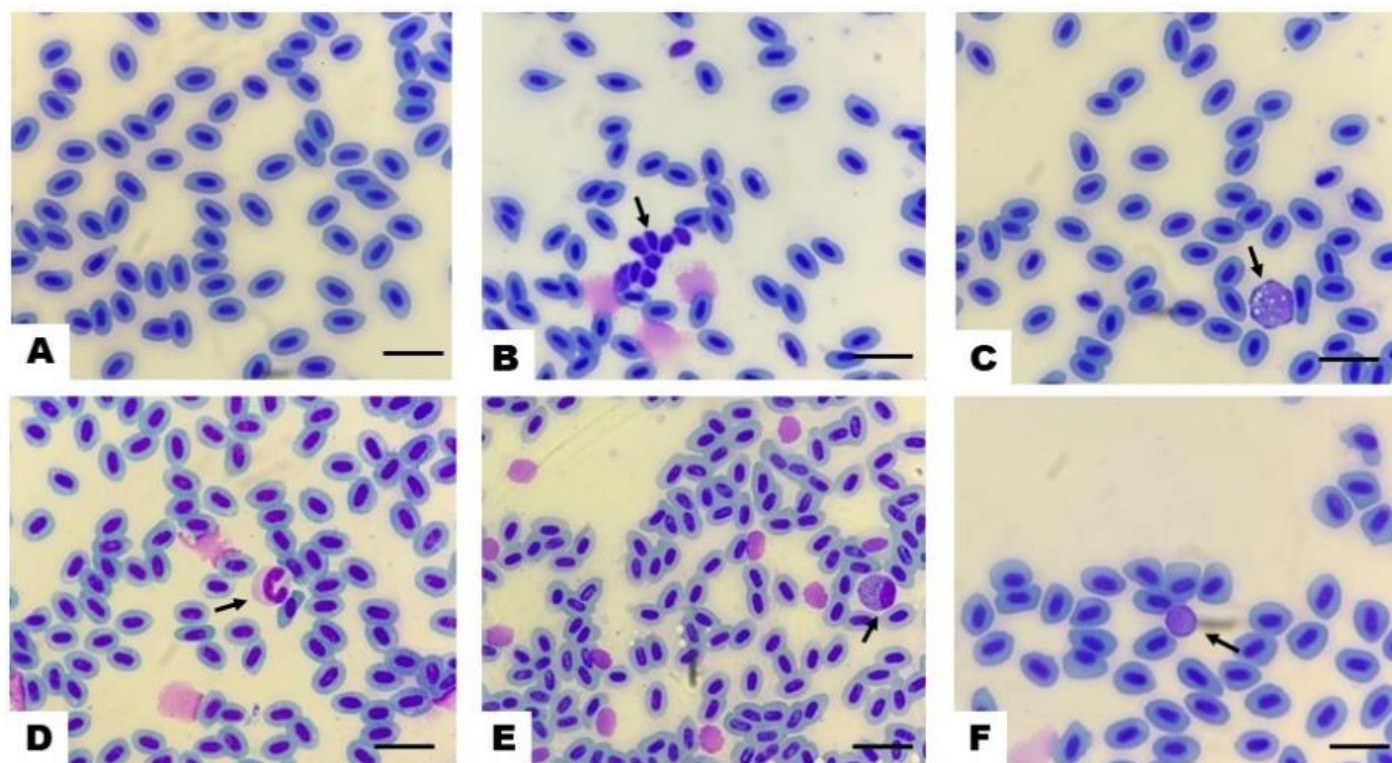
Figure 4. Frequency of defense cells in zebrafish (*Danio rerio*) in the ozonated water recirculation system



Note: CG – control group; O52OD – ozone at 52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ once a day; O52TD – ozone at 52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ twice a day; O72OD – ozone at 52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ once a day; O72TD – ozone at 72 $\mu\text{g}/\text{mL}$ twice a day.

Erythrocytes, thrombocytes, vacuolated monocytes, neutrophils, eosinophils and lymphocytes were identified (Figure 5). Hematology analysis is described in Table 2. A significant difference ($p < 0.05$) between the control group and treated groups was observed in the number of thrombocytes (n), with an increase in thrombocytes in all treated groups, and higher numbers were observed in the O52OD and O72OD groups. The total number of defense cells and the absolute number (n) of vacuolated monocytes, neutrophils, eosinophils and lymphocytes did not differ ($p > 0.05$) between the control groups and treated groups.

Figure 5. Micrograph of zebrafish (*Danio rerio*) blood and defense cells.



Note: A – erythrocytes; B – thrombocytes; C – vacuolated monocyte; D – neutrophil; E – eosinophil; F – lymphocyte. Optical microscope images (100x magnification). Bar = 1 cm.

Table 2. Blood and defense cell evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) in an ozonated water recirculation system

| Treatment | CG | O52OD | O52TD | O72OD | O72TD |
|--------------------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Thrombocyte (n) | 61.7 ± 23.9 ^a | 316 ± 151 ^b | 209 ± 69.8 ^{a,b} | 270.7 ± 25.7 ^b | 203.3 ± 22.4 ^{a,b} |
| Neutrophil (n) | 0 ± 0 | 4 ± 6.9 | 0 ± 0 | 0.7 ± 0.6 | 0.7 ± 1.2 |
| Lymphocyte (n) | 41.3 ± 7.6 | 70.3 ± 13.4 | 70 ± 19.1 | 83 ± 8.0 | 73.7 ± 34.6 |
| Monocyte (n) | 1 ± 1.7 | 4 ± 2.6 | 2.7 ± 1.5 | 1.3 ± 2.3 | 0.7 ± 1.2 |
| Eosinophil (n) | 4.3 ± 3.5 | 13 ± 3.5 | 9 ± 5.6 | 10.7 ± 8.5 | 7 ± 6.2 |
| Total of defense cells (n) | 46.7 ± 19.9 | 91.3 ± 32 | 81.7 ± 33.4 | 95.7 ± 39.8 | 82 ± 35.6 |
| Neutrophil (%) | 0 ± 0 | 3.5 ± 6.1 | 0 ± 0 | 0.7 ± 0.6 | 0.5 ± 0.9 |
| Lymphocyte (%) | 88.6 ± 8.0 | 78.2 ± 7.0 | 85.4 ± 6.4 | 87.3 ± 5.3 | 91.5 ± 5.0 |
| Monocyte (%) | 2.5 ± 4.3 | 4.0 ± 2.1 | 3.1 ± 1.3 | 1.6 ± 2.9 | 0.5 ± 0.9 |
| Eosinophil (%) | 8.9 ± 6.1 | 14.2 ± 1.2 | 11.5 ± 6.8 | 10.4 ± 7.4 | 7.4 ± 3.2 |

Note: CG – control group; O52OD – ozone at 52 µg/mL once a day; O52TD – ozone at 52 µg/mL twice a day; O72OD – ozone at 72 µg/mL once a day; O72TD – ozone at 72 µg/mL twice a day. Means followed by different superscripts in the same row differ ($p < 0.05$).

Gill histology

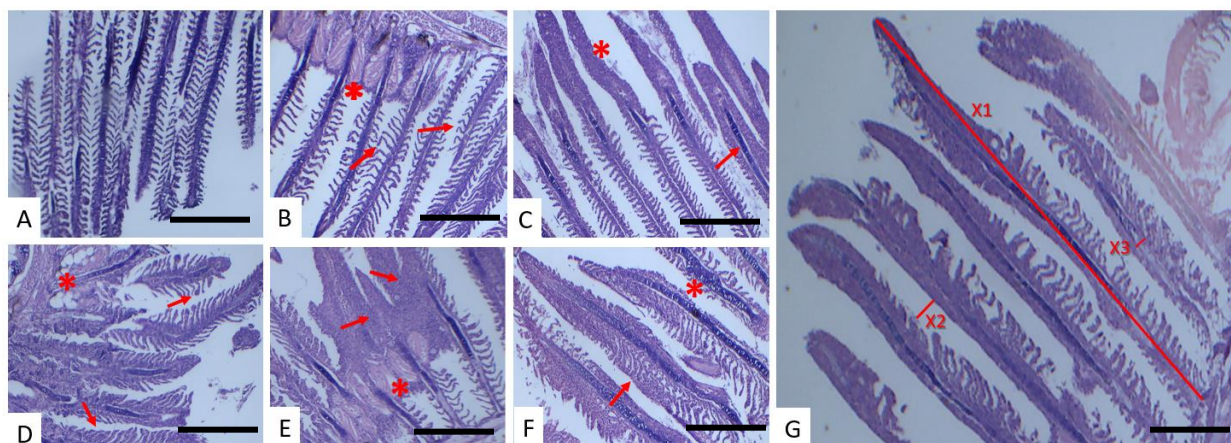
Metric analysis of gills, such as lamellar height, interlamellar space and lamellar mass, did not differ ($p > 0.05$) when comparing the control group and treated groups (Table 3). Gill histological alterations were observed in the treated groups, such as hypertrophy, fusion of gill lamellas, increase in mucous secretion, proliferation of erythrocytes on the cartilaginous core, lamellar synechia, proliferation of lamellar epithelium with dilated and curved tips, curvature and vacuoles (Figure 6). Histological alterations in the gills were observed more frequently in the groups treated with ozone. In the control group, alterations were observed but less frequently when compared with all the treated groups.

Table 3. Metric analysis in gill of zebrafish (*Danio rerio*) in ozonated water recirculation system

| Treatment | CG | O52OD | O52TD | O72OD | O72TD |
|---------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Lamellar height (mm) | 2.16 ± 0.18 | 2.09 ± 0.14 | 2.81 ± 0.55 | 2.30 ± 0.36 | 2.32 ± 0.48 |
| Interlamellar space (µm) | 89.75 ± 30.79 | 62.71 ± 8.99 | 92.56 ± 20.37 | 89.09 ± 18.49 | 82.82 ± 23.77 |
| Lamellar mass (µm) | 61.47 ± 7.74 | 70.80 ± 12.96 | 73.88 ± 21.83 | 94.33 ± 30.39 | 86.97 ± 19.41 |

Note: CG – control group; O52OD – ozone at 52 µg/mL once a day; O52TD – ozone at 52 µg/mL twice a day; O72OD – ozone at 72 µg/mL once a day; O72TD – ozone at 72 µg/mL twice a day.

Figure 6. Gill histology of zebrafish (*Danio rerio*) in an ozonated water recirculation system.

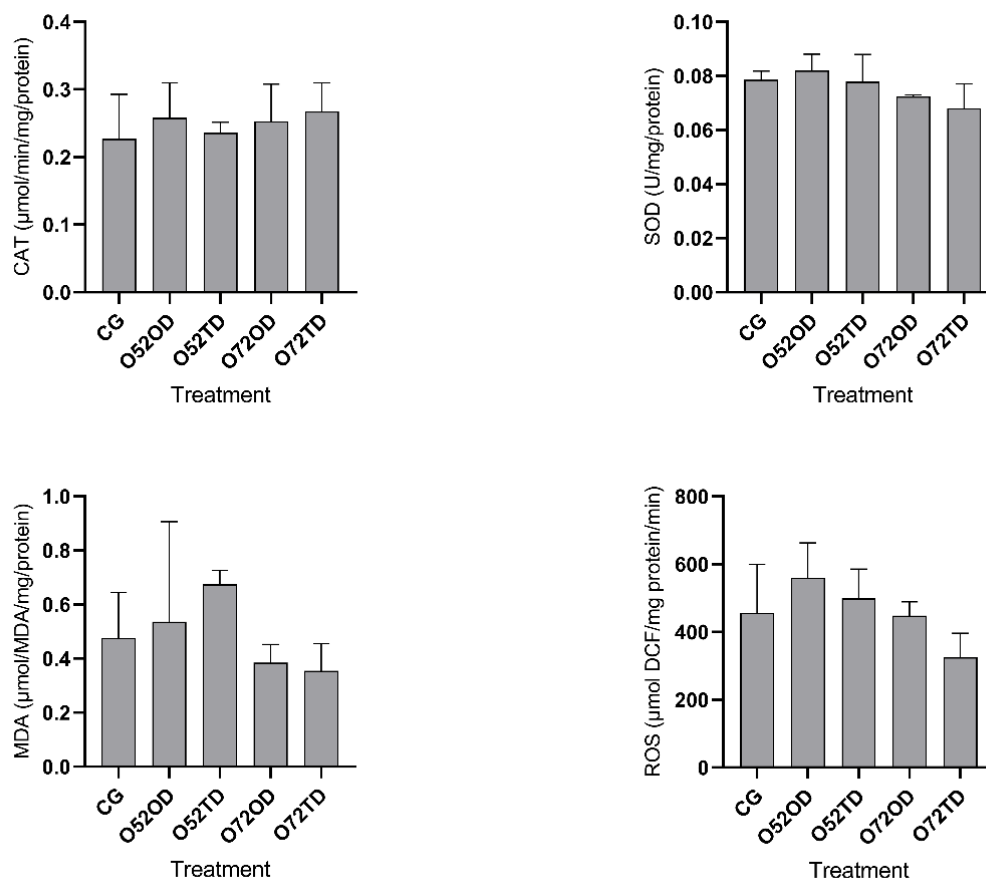


Note: A – normal lamellas; B: arrow (→) indicating curved tips; asterisk (*) indicating increase of mucous secretion; C: arrow (→) indicating proliferation of erythrocytes on cartilaginous core; asterisk (*) indicating hypertrophy and proliferation of lamellar epithelium; D: arrow (→) indicating dilated tips; asterisk (*) indicating vacuoles; E: arrow (→) indicating lamellar fusion; asterisk (*) indicating increase of mucous secretion; F: arrow (→) indicating lamellar synechiae; asterisk (*) indicating proliferation of erythrocytes on cartilaginous core; G: X1 – lamellar height; X2 – interlamellar space; X3 – lamellar mass. Optical microscope computer images (10x magnification). Bar = 1 cm.

Oxidative stress

The levels of SOD, CAT, MDA and ROS are described in Figure 7. There were no significant differences ($p > 0.05$) for the control group and treated groups at all evaluations.

Figure 7. Levels of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and oxygen reactive species (ROS) in the whole body of zebrafish (*Danio rerio*) in an ozonated water recirculation system



Note: CG – control group; O52OD – ozone at 52 µg/mL once a day; O52TD – ozone at 52 µg/mL twice a day; O72OD – ozone at 72 µg/mL once a day; O72TD – ozone at 72 µg/mL twice a day.

Discussion

A low mortality rate is usually observed in the fish culture, and in this study, it was not attributed to ozone because in the control group, this rate was also observed. Additionally, the

dosage of ozone used in this assay was according to the recommended therapeutic protocol (Hérmendez and Gonzales, 2001).

An increase in the levels of oxygen was observed in all the treated groups after ozonation, and an imbalance in oxygen can be adjusted if ozone is installed in the water recirculation system. When the water in the recirculation system shows a greater oxygen level, the control and maintenance of oxygen is easier, and it is another benefit of the use of ozone in the water recirculation system for zebrafish (*Danio rerio*). We know that oxygen is an important element for organisms and health, including cell activity and survival, benefiting energy production (Jani et al., 2012), and the increase in oxygen due to ozone therapy causes more efficient respiration in mitochondria (Smith, 2017). Additionally, oxygen has great importance in the nitrifying activity performed by aerobic bacteria, and it is vital to water quality in the recirculation system to zebrafish (*Danio rerio*) due to the control of NH_3 , NO_2 and NO_3 levels (Malone, 2013; Hammer, 2020).

The mV of the water increases as ORP has higher levels, affirming the ozone activity in the water. However, the ORP observed in this study is in accordance with recommendations for fish culture. Stiller et al. (2020) evaluated the ORP (mV) on ozonated water to Atlantic salmon (*Salmo salar*). The authors observed that the ORP could be present on ozonated water up to 350 mV and did not cause negative effects on animal health by survival quantification and tissue and gill analysis. However, differences in ORP (mV) can be observed according to water composition, time to ozone exposition, species of fish, time of evaluation and particularities in the water recirculation system. In water, dissolved ozone has a low stability, and its concentration can decrease due to temperature, microorganism consumption and interaction with other molecules (Lima et al., 2021).

The antimicrobial activity of ozone has been reported by many authors, and in this study, we also observed a decrease in the growth of coliform bacteria in all the treated groups compared with the control group. In aquaculture systems, ozone is mentioned as an important agent to remove pathogens (Powell and Scolding, 2018). The ozone in contact with bacteria causes an oxidation of phospholipase and lipoproteins present in the bacterial envelope, causing an elimination of the microorganism (Smith, 2017).

Marchesini & Ribeiro (2020) related a study about cutaneous wounds in a human due to diabetes mellitus. A significant difference was observed in colony-forming units (CFUs) using ozone bags for 10 minutes. The authors related 100,000 CFU on cutaneous wounds before treatment, and after 15 sessions, was observed a decrease in CFU, with no more than 350 CFU on skin. Virote et al. (2022) also observed a significant decrease in MPN of coliform bacteria in ozonated medium to zebrafish (*Danio rerio*) embryos, describing 2.5×10^4 MPN in treated groups compared to more than 140×10^4 in the control group. Cho et al. (2021) observed that ozonated sunflower oil inhibited the growth of *E. coli* and *C. albicans*, showing that it is a potent fungicidal and bactericidal agent.

High levels of nitrite cause great disorders to fish in water recirculation system, related to cardiovascular functions, decreased oxygen transport and other physiological functions (Kroupova et al., 2005). In addition, an increase in the levels of ammonia causes oxidative stress, immune alterations, tissue damage and stress (Carneiro et al., 2022). Therefore, the maintenance of the nitrogen compound levels at an ideal rate is very important to animal health. We observed a decrease in the levels of nitrate and a balance of the levels of nitrite and ammonia, which could be attributed to the influence of ozone on nitrifying activity by aerobic bacteria due to an increase in

dissolved oxygen concentration (Malone, 2013; Hammer, 2020). Therefore, we observed that ozone improves water quality due to nitrogen compound regulation.

The hematology evaluation showed a higher number of thrombocytes in fish maintained in ozonated water, as also observed by Stiller et al. (2020) in salmon (*Salmo salar*). In addition, we know that ozone has the capacity to simulate the immune system by inducing cytokine release (Manoto et al., 2018). It is a great piece of information about the use of ozone in fish culture because after that, we know how important ozone is to recruit defense cells, to induce blood cell proliferation and to increase immune activity in the animals. Therefore, ozone can be considered in cases of immunosuppression, ischemia or circulatory diseases.

Stiller et al. (2020) observed adverse effects on gill histology when animals were in ozone at 350 mV and higher. It was also related to a protective mechanism against the higher levels of ORP in ozonated water. In addition, a decrease in Cl^- and an increase in Mg^+ serum levels were observed by the authors, and this ion imbalance could be related to stress and alterations in fish respiration, resulting in gill alterations such as hypoxia, a decrease in growth rates and an ion imbalance in the organism (Stiller et al., 2020). The gills are an important organ in fish and are responsible for respiration and oxygen absorption, regulation of acids and bases and excretion of nitrogen compounds (Kroupova et al., 2005). Therefore, we infer that these alterations in the gills are associated with the first contact with ozone and dissolved oxygen concentration.

The metric parameters in the gills were not affected by the use of ozone. This shows that ozone does not cause alterations in the lamellar height, lamellar mass or interlamellar space. This is important because the interlamellar space and gill size are related to ideal gill activity, and the presence of alterations in this characteristic could cause negative effects on animal health. General effects due to gill alterations require an elucidation with further studies, considering the time, dose

and chronicity of the exposure, to prove that ozone will not cause deleterious effects on the gills of zebrafish or other diseases related to this alteration.

In this study, ozone did not increase reactive oxygen species and antioxidant enzymes, and we are reinforcing that ozone does not cause a significant status of oxidative stress in the animals or increase the levels of ROS in the zebrafish (*Danio rerio*) whole body. We know that high levels of ROS and oxidative stress can be deleterious for cells and tissues, increasing disease occurrence (Zorov et al., 2014). Therefore, we consider that it was important to prove that the use of ozone in adult zebrafish (*Danio rerio*) does not cause this negative effect on animal health.

Ozone showed relevant activities that we can consider in fish culture: in large or small fish cultures to maintain water quality; to ensure the levels of oxygen in the water for longer periods; to reduce the population of pathogens; and to prevent oxidative stress due to transport or installation changes. Considering our results in this study, ozone is a substantial factor in fish culture and can be used to achieve various goals and show great results.

Conclusion

In this study, we concluded that ozone in a water recirculation system for zebrafish (*Danio rerio*) is an important agent to improve water quality, increasing the dissolved oxygen concentration and decreasing the levels of nitrate and the growth of coliform bacteria. In addition, ozone increases the proliferation of blood and defense cells and is an important agent to improve animal health in ozonated culture medium.

Acknowledgments

This work was supported by the Coordination of Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) under Grant Number 88887.597128/2021-00 and the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) under Grant Number 308359/2019-4.

We thank the Water Analysis Laboratory (LAADAM, DAM/UFLA, Lavras, Brazil), Physiology and Pharmacology Laboratory (DMV/UFLA, Lavras, Brazil), Microbiology Laboratory (DMV/UFLA, Lavras, Brazil), Pathology Laboratory (DMV/UFLA, Lavras, Brazil) and Enzymology Laboratory (DZO/UFLA, Lavras, Brazil) for the support in the accomplished analysis.

Author Disclosure Statement

The authors declare that no conflict of interest can be construed as impairing the impartiality of the reported research.

References

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.

American Public Health Association (APHA). 1998. *Standard Methods for the Examination of water and wastewater*, 20 ed.

Bordon, I. C., Campos, B. G., Miyai, C. A., Silva, J. R. M. C., Cotrim, M. E. B., Favaro, D. I.

T., Abessa, D. M. S. 2022. Pb removal form water by three types of biofilters. *Journal of Trace Elements and Minerals*. <https://doi.org/10.1016/j.jtemin.2022.100027>

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- Buege, J. A., Aust, S. D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, 52, 302-10. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Carneiro, W. F., Castro, T. F. D., Reichel, T., Uzeda, P. L. C., Martínez-Palacios, C. A., Murgas, L. D. S. 2022. Diets containing *Arthrospira platensis* increase growth, modulate lipid metabolism, and reduce oxidative stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) exposed to ammonia. *Aquaculture*, 527. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737402>
- Castro, T. F. D., Souza, J. G. S., Carvalho, A. F. S., Assis, I. L., Palmieri, M. J., Vieira, L. F. A., Marcussi, S., Machado, M. R. F., Murgas, L. D. S. 2018. Anxiety-associated behavior and genotoxicity found in adult *Danio rerio* exposed to tebuconazole-based commercial product. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 62. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.06.011>
- Castro, T. F. D., Carneiro, W. F., Reichel, T., Fabem, S. L., Machado, M. R. F., Souza, K. K. C., Resende, L. V., Murgas, L. D. S. 2022. The toxicological effects of *Eryngium foetidum* extracts on zebrafish embryos and larvae depend on the type of extract, dose, and exposure time. *Toxicology Research*, 1-9. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfac067>
- Cho, K. H., Kang, D. J., Nam, H. S., Kim, J. H., Kim, S. Y., Lee, J. O., Kim, B. J., 2021. Ozonated Sunflower Oil Exerted Protective Effect for Embryo and Cell Survival via Potent Reduction Power and Antioxidant Activity in HDL with Strong Antimicrobial Activity. *Antioxidants*, 10. <https://doi.org/10.3390/antiox10111651>
- Dieterich, S., Bieligg, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., Prestle, J. 2000. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increase expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*, 101:1, 33-39. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.1.33>

- Di Paolo, N., Bocci, V., Gaggiotti, E. 2004. Ozone therapy. *The International Journal of Artificial Organs*, 27:3. <https://doi.org/10.1177/039139880402700303>
- Driver, A. S., Kodavanti, P. R. S., Mundy, W. R. 2000. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicology and Teratology*, 22. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(99\)00069-0](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(99)00069-0)
- Gesto, M., Gergersen, K. J. J., Pedersen, L. 2022. Effects of ozonation and foam fractionation on rainbow trout condition and physiology in a small-scale freshwater recirculation aquaculture system. *Aquaculture*, 557. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738312>
- Hammer, H. S. 2020. Recirculation Aquaculture System (RAS) for zebrafish culture. *The Zebrafish in Biomedical Research*, cap. 30, 337-356. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00030-0>
- Hao, K., Li, Y., Feng, J., Zhang, W., Zhang, Y., Ma, N., Zeng, Q., Pang, H., Wang, C., Xiao, L., He, X. 2015. Ozone promotes regeneration by regulating the inflammatory response in zebrafish. *International Immunopharmacology*, 28. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.05.026>Get rights and content
- Hernández, O. D., González, R. C. 2001. Ozonoterapia en úlceras flebostáticas. *Revista Cubana de Cirugía*, 40:2, 123-129.
- Hunt, H. E.; Rice, E. W. 2005. Microbiological Examinations. In: EATON, A. D. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21th ed. Washington, APHA, 9-1 – 9-169.

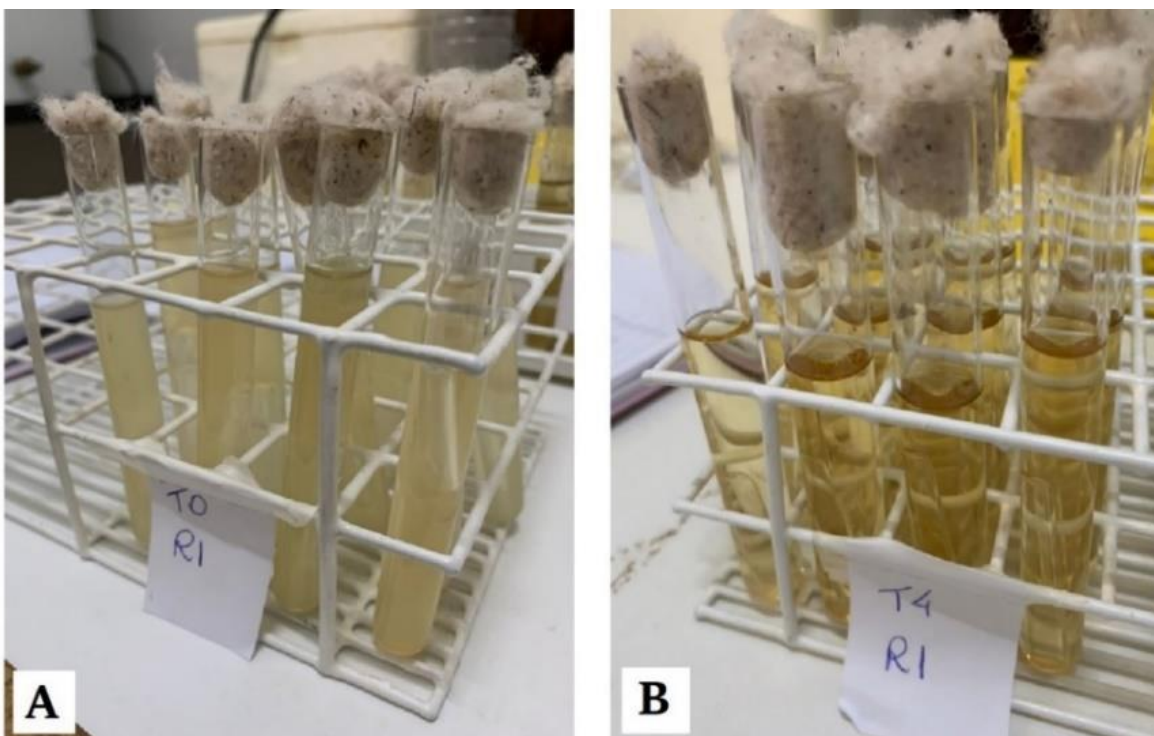
- Jani, P., Patel, G. Yadav, P., Sant, L., Jain, H. 2012. Ozone therapy: the alternative medicine of future. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 2:4, 196-203.
- Kroupova, H. C.; Machova, J.; Svobodova, Z. 2005. Nitrite influence on fish: a review. *Vet. Med. – Czech*, 50. <http://dx.doi.org/10.17221/5650-VETMED>
- Lima, M. J. A; Felix, E. P.; Cardoso, A. A. 2021. Aplicações e implicações do ozônio na indústria, ambiente e saúde. *Química Nova*, 44:9. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170759>
- Malone, R. 2013. Recirculation Aquaculture Tank Production Systems: a review of current design practice. *Southern Regional Aquaculture Center*, 453.
- Manoto, S. L.; Maepa, M. J.; Motaung, S. K. 2018. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis. *Saudi Journal of Biological Science*, 25:2. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.002>
- Marchesini, B. F.; Ribeiro, S. B. 2020. Efeito da ozonioterapia na cicatrização de feridas. *Fisioterapia Brasil*, 21:3. <http://dx.doi.org/10.33233/fb.v21i3.2931>
- Megarani, D. V., Hardian, A. B., Arifianto, D., Santosa, C. M., Salasia, S. I. O. 2020. Comparative morphology and morphometry of blood cells in Zebrafish (*Danio rerio*), Common Carp (*Cyprinus carpio carpio*), and Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 59:6. <http://dx.doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-20-000013>
- Powell, A.; Scolding, J. W. S. 2018. Direct application of ozone in aquaculture systems. *Reviews in Aquaculture*, 10. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12169>

- Rahmani, R. Mansouri, B., Azadi, N. A., Davari, B., Johari, S. A., Maleki, A., Pordel, M. A. 2016. Histopathological alterations in the gill of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to Cr and Ba doped TiO₂ nanoparticles. *AAAL Bioflux*, 9:4.
- Ribas, L.; Piferrer, F. 2014. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Reviews in Aquaculture*, 6. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12041>
- Rothe, L. E., Botha, T. L., Feld, C. K., Weyand, M., Zimmermann, S., Smit, N. J., Wepener, V., Sures, B. 2021. Effects of conventionally-treated and ozonated wastewater on mortality, physiology, body length, and behavior of embryonic and larval zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, 286. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117241>
- Smith, N. L., Wilson, A. L., Gandhi, J., Vatsia, S., Khan, S. A. 2017. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Medical Gas Research*, 7:3. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.215752>
- Stiller, K. T., Kolarevic, J., Lazado, C. C., Gerwins, J., Good, C., Summerfelt, S. T., Mota, V. C., Espmark, A.M. O. 2020. The effects of the ozone on Atlantic Salmon Post-Smolt in brackish water – establishing welfare indicators and thresholds. *International Journal of Molecular Sciences*, 51. <https://doi.org/10.3390/ijms21145109>
- Tuncer, D., Yazici, A. R., Ayturan, S., Ozgunaltay, G., Dayangac, B. 2013. Antimicrobial effect of ozone on cariogenic microorganisms in vitro. *Ozone: Science & Engineering: The Journal of the International Ozone Association*, 35. <http://dx.doi.org/10.1080/01919512.2013.796862>

- Virote, B. C. R., Martimiano, D. V., Fabem, S. L., Tanaka, M. S., Locha, L. A., Murgas, L. D. S. 2022. Use of ozone in the culture medium of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Acta Veterinaria Brasilica*, 16. <http://dx.doi.org/10.21708/avb.2022.16.3.10986>
- Weir, H., Chen, P. L., Deiss, T. C., Jacobs, N., Nabity, M. B., Young, M., Criscitiello, M. F. 2015. DNP-KLH yields changes in leukocyte populations and immunoglobulin isotype use with different immunization routes in zebrafish. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00606>
- Yang, J. E., Kim, J. J., Skogley, E. O., Schass, P. E. 1998. A simple spectrophotometric determination of nitrate in water, resin, and soil extracts. *Soil Science Society of America Journal*, 62, 108-115.
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., Sollott, S. J. 2014. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol. Rev.*, 909-950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>

Complementary content

Figure 1. More probable number (MPN/mL) of growth coliform bacteria in ozonated water on a recirculation system to zebrafish (*Danio rerio*)



Note: A – turbidity and gas production on culture medium, indicating coliform growth; B – clear culture medium, without turbidity or gas production, indicating absence of coliform growth.

Figure 2. Graphic summary of the use of ozone in the zebrafish (*Danio rerio*) water recirculation system

