



ΤΕΙ ΜΕΣΟΛΟΓΙΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ & ΑΛΙΕΥΤΙΚΗΣ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Βασικές αρχές και εναλλακτικές μέθοδοι καλλιέργειας ζωοπλακτονικών οργανισμών



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ:

Γκανάσος Παναγιώτης

Ζέρα Αρμάντ

ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ:

Δρ ΚΛΗΜΟΓΙΑΝΝΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2010

Αφιερώνεται στις οικογένειες μας

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Πρόλογος.....	4
---------------	---

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή.....	5
---------------	---

Κεφάλαιο 2

Εγχειρίδιο Παραγωγής και Χρήσης Ζωοπλαγκτονικών Οργανισμών στις Υδατοκαλλιέργειες.....	11
--	----

Τροχόζωα	13
• Εισαγωγή.....	13
• Μορφολογία.....	13
• Βιολογία και ιστορία ζωής.....	14
• Διαφορές στελεχών.....	16
• Γενικές συνθήκες καλλιέργειας.....	17
• Θρεπτική αξία των καλλιεργούμενων τροχοζώων.....	30
• Παραγωγή και χρήση των αυγών διάπαυσης.....	39
Artemia	43
• Εισαγωγή, βιολογία και οικολογία της <i>Artemia</i>	43
• Χρήση των κύστεων.....	70
• Χρήση των ναύπλιων και των μετά-ναύπλιων.....	88

Κεφάλαιο 3

Τεχνικές και Διαχειριστικές Ερευνητικές Εργασίες Καλλιέργειας Ζωοπλαγκτονικών Οργανισμών της Τελευταίας 20ετίας.....	111
--	-----

Τροχόζωα	
• Αυτόματος Έλεγχος της Αύξησης και της Πυκνότητας των Καλλιιεργειών Τροχοζώων.....	113
• Αυτόματη Μέτρηση της Πυκνότητων του Τροχοζώου <i>Brachionus plicatilis</i> σε Πρώτο-ταϊζόμενες Δεξαμενές.....	129
• Ένα Καινοτόμο Σύστημα Καλλιέργειας για την Παραγωγή Εξαιρετικά Υψηλής Πυκνότητας Τροχοζώων, <i>Brachionus rotundiformis</i> - μια Προκαταρκτική Αναφορά.....	139
• Η Χρήση του Οζοντος σε ένα Σύστημα Επανακυκλοφορίας Υψηλής Πυκνότητας Τροχοζώων.....	147
• Υψηλής Πυκνότητας Παραγωγή του Τροχοζώου <i>Brachionus plicatilis</i> σε ένα Σύστημα Επανακυκλοφορίας: Μελέτη της Ποιότητας του Νερού, Ζωοτεχνικές και Θρεπτικές Πτυχές.....	161
• Βελτίωση Οικοσυστήματος Καλλιέργειας Τροχοζώων για την Προαγωγή Ανακύκλωσης του Θαλάσσιου Μικροφύκου, <i>Nannochloropsis sp.</i>	175
• Ένα Εντατικό Σύστημα Χημειοστατικής Καλλιέργειας για την Παραγωγή Τροχοζώων στις Υδατοκαλλιέργειες.....	185
Artemia	
• Εντατική Μαζική Παραγωγή <i>Artemia</i> σε ένα Σύστημα Επανακυκλοφορίας.....	195
• Εντατικό Σύστημα Εκτροφής Νυμφών Ψαριών για την Έρευνα Συστήματος Εκκόλαψης και Εμπλουτισμού <i>Artemia</i>	205
• Βίο-ενθυλάκωση στην <i>Artemia</i> : Επιδράσεις της Συγκέντρωσης Μορίων κατά τη Διαδικασία Εμπλουτισμού.....	215
• Ένα Σύστημα Αερισμού Λίκνων για την Εκκόλαψη της <i>Artemia</i>	225
• Ελεγχόμενη Παραγωγή Βιομάζας <i>Artemia</i> Χρησιμοποιώντας μια Αδρανή Εμπορική Τροφή, Συγκρινόμενη με τα Μικροφύκη <i>Chaetoceros</i>	231
• Μία Απλή Τεχνική Καλλιέργειας Μέσω Ημι-ροής για την Ελεγχόμενη Υπέρ-εντατική Παραγωγή Νεαρών και Ενήλικων <i>Artemia</i>	241

Περίληψη / Abstract.....	251
--------------------------	-----

Βιβλιογραφία.....	253
-------------------	-----

Η παρούσα διπλωματική εργασία μας ανατέθηκε στο προηγούμενο ακαδημαϊκό έτος (2008-2009) από την καθηγήτριά μας Δρ Κλημογιάννη Αικατερίνη. Λόγω της υπέρμετρης αφοσίωσης και του έντονου ενδιαφέροντος της καθηγήτριάς μας για τη σχολή αυτή αλλά και για την εργασία της στο αντικείμενο αυτό, καθώς και τον δικό μας υπέρτατο ζήλο αλλά και τις υψηλές προσδοκίες που έχουμε θέσει σαν στόχο στο μέλλον, αποφασίσαμε και προσπαθήσαμε να βρούμε ένα θέμα πρωτότυπο και ιδιαίτερης σημασίας πάνω στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών.

Έτσι, καταλήξαμε από κοινού στο παραπάνω θέμα, δηλαδή σε έναν οδηγό παραγωγής και χρήσης της ζωντανής τροφής στις υδατοκαλλιέργειες. Τη ληφθείσα απόφαση μας την στηρίξαμε στο γεγονός ότι τα προαναφερθέντα αποτελούν το πιο σημαντικό κεφάλαιο διατροφής και θρέψης των οργανισμών στο σύγχρονο χώρο των υδατοκαλλιεργειών. Προσπαθήσαμε λοιπόν να καταγράψουμε και να αναλύσουμε όσο το δυνατόν πιο κατανοητά και περιεκτικά δεδομένα και στοιχεία που συλλέξαμε και θα θέλαμε να πιστεύουμε ότι καταφέραμε να κατασκευάσουμε έναν εύχρηστο και λειτουργικό οδηγό σε ότι αφορά τον τομέα της ζωντανής τροφής πάνω στις υδατοκαλλιέργειες.

Θέλοντας να ξεφύγουμε λίγο από το θέμα και εκμεταλλευόμενοι το κομμάτι αυτό της διπλωματικής εργασίας που ονομάζεται πρόλογος, θα θέλαμε να εκφράσουμε τις θερμότερες ευχαριστίες μας, καθώς και την ευγνωμοσύνη μας στα άτομα εκείνα που με την πολύτιμη βοήθεια αλλά και στήριξη τους μας ώθησαν στην επίτευξη και ολοκλήρωση της παρούσης διπλωματικής εργασίας. Πρώτα από όλα θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά την καθηγήτριά μας κα. Κλημογιάννη Α. για τη διάχυτη εμπιστοσύνη, τη συνεχή ενθάρρυνση και την τεραστία υπομονή που μας έδειξε στο χρονικό διάστημα της συνεργασίας μας. Ακόμη, τους γονείς μας και τα αδέρφια μας για την πολύ σημαντική υποστήριξη και αγάπη που μας δείξαν στην όλη πορεία υλοποίησης της εργασίας μας. Επίσης, τους φίλους και τις φίλες μας που με τις χρήσιμες συμβουλές τους πάνω σε θέματα που αφορούσαν την εργασία μας, μας βοήθησαν σημαντικά ως προς την αποτελεσματικότερη και γρηγορότερη συγγραφή της παρούσης διπλωματικής εργασίας. Τέλος, χωρίς να θέλουμε να ξεχάσουμε κάποιον ή κάποια, θα θέλαμε να πούμε ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους καθηγητές μας για τις χρήσιμες γνώσεις και συμβουλές που μας μετάδωσαν όπως και τους συμφοιτητές μας στη σχολή.

Να έχετε μια ευχάριστη ανάγνωση!

Η υδατοκαλλιέργεια σήμερα είναι αρκετά διαδεδομένη σε ολόκληρη την Ευρώπη, παράγοντας τόσο ψάρια όσο και ασπόνδυλα (ICAP, 1999). Στην Ελλάδα, η ραγδαία αύξηση της παραγωγής, η θεαματική διεύρυνση στις διεθνείς αγορές, η παραγωγή και η εξαγωγή τεχνολογίας, οι πρωτοπόρες αντιλήψεις οργάνωσης των μονάδων καθώς και η υποδειγματική αξιοποίηση των τοπικών συγκριτικών πλεονεκτημάτων, συντέλεσαν στην καθιέρωση του κλάδου ως μια παραγωγική δραστηριότητα με μεγάλη σημασία για την εθνική οικονομία. Όσον αφορά την πορεία του κλάδου της εκτροφής των ψαριών, προηγήθηκε μια περίοδος έρευνας και τεχνικών εφαρμογών από τις αρχές κιόλας του 20^{ου} αιώνα για να καταλήξει σε ραγδαία ανάπτυξη τις δύο τελευταίες κυρίως δεκαετίες (ΠΑΣΕΓΕΣ, 2010).

Μέσα όμως από την πορεία αυτή ανέρχεται στην επιφάνεια και το θέμα της ζωντανής τροφής των νυμφών, που καθιστούν τον οποιοδήποτε Ι/Σ ευάλωτο μιας και εξαρτάται σημαντικά και κατά κύριο λόγο από το βαθμό επιτυχίας παραγωγής της ζωντανής τροφής (Levels *et al.*, 1995). Σε καθολική πλειοψηφία, τα εκκολαπτήρια συνειδητοποιούν πλέον τα οφέλη της βελτίωσης της θρεπτικής αξίας της ζωντανής τροφής μέσω της διαδικασίας του εμπλουτισμού (Dhert *et al.*, 1990; Kyungmin *et al.*, 2000). Η υποδομή που απαιτείται για να επιτευχθεί αυτό είναι η ελάχιστη (Bengtson *et al.*, 1991) και από την άλλη τα έτοιμα εμπλουτιστικά σκευάσματα κυκλοφορούν ευρέως στο εμπόριο καθώς και η κατάλληλη τεχνολογία.

Από την άλλη, η χρήση τεχνητών τροφών κερδίζει βαθμιαία και σταδιακά την αποδοχή του κλάδου. Βέβαια, οι περισσότερες τεχνικές τροφές παραμένουν σε επίπεδο έρευνας και ελάχιστες εφαρμόζονται σε εμπορικό επίπεδο (Koven *et al.*, 2001). Εκτιμάται ευρέως ότι, η χρήση της πλέον οικονομικής ξηρής διαίτας (αυτής που περιέχει τις υψηλότερες συγκεντρώσεις DHA-EPA) σε συνδυασμό με τη μειωμένη χρήση *Artemia* οδηγούν σε ένα αποτέλεσμα καλύτερης στρατηγικής διαχείρισης (Blair *et al.*, 2003).

Οι πρόοδοι στη βιολογία και την τεχνολογία έχουν καταφέρει να ελαχιστοποιήσουν τα τελευταία εμπόδια των υδατοκαλλιεργειών όσο αφορά το θέμα της παραγωγής του ζωοπλαγκτού (Léger *et al.*, 1986; Fukusho, 1989). Οι ευρωπαϊκές τεχνικές υδατοκαλλιέργειας για τα εμπορικά εκτρεφόμενα είδη θαλάσσιων ιχθύων επανεξετάζονται σε σχέση με τις πρόσφατες εξελίξεις στους τομείς της διαχείρισης της υγείας, της διατροφής των νυμφών και τη λειτουργία του συστήματος (Dhert *et al.*, 2001). Η ευρωπαϊκή ιχθυοκαλλιέργεια κυριαρχείται από την ραγδαία αύξηση της παραγωγής κυρίως των ιχθυδίων τσιπούρας και λαυρακιού. Τα είδη αυτά είναι εντατικής εκτροφής με την τεχνική των ψευδό-πράσινων νερών, χρησιμοποιώντας *Brachionus plicatilis* και *Artemia* ως θηράματα που με τη σειρά τους παράγονται με εντατικό μαζικό τρόπο, αν και υπέρ-εντατικά και αυτόματα συστήματα έχουν εφαρμοστεί σε ολόκληρο τον κόσμο (Dehasque *et al.*, 1995; Suantika *et al.*, 2000; Zmora and Shpigel, 2006) καθώς και εκτατικά (Basil *et al.*, 1995; Zmora *et al.*, 2002). Η μελλοντική ανάπτυξη των ευρωπαϊκών εκκολαπτηρίων των ψαριών έχει βασιστεί στην αύξηση των επιπέδων παραγωγής και της αποδοτικότητας της παραγωγής για τα υπάρχοντα εκτρεφόμενα είδη, καθώς και στη βελτίωση των εγκαταστάσεων και των τεχνικών για να καταστεί δυνατή η διαφοροποίηση των ειδών. Το ζωοπλαγκτόν κατέχει θέση-κλειδί στο τροφικό πλέγμα των ιχθυοκαλλιεργειών. Η διαθεσιμότητα του ζωοπλαγκτού στο σωστό μέγεθος και στο σωστό τόπο και χρόνο κατά τη διάρκεια της διατροφικής περιόδου των νυμφών αποτελεί ότι καλύτερο για τη σωστότερη και αποτελεσματικότερη λήψη των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων (Cushing, 1990).

Στη φύση, όπως και στις ιχθυοκαλλιέργειες, το ζωοπλαγκτόν είναι μια από τις πρωταρχικές τροφές των νυμφών των ψαριών. Δύο από τις δεσπόζουσες ομάδες

ζωοπλαγκτού είναι τα Rotifers (τροχόζωα) και η *Artemia*. Αυτές οι δύο ομάδες είναι η λεία που προτιμάται για γαρίδες και ψάρια και αποτελούν τη ζωντανή τροφή που χρησιμοποιείται πιο συχνά από τους καλλιεργητές. Η εντατική καλλιέργεια των νυμφών των θαλάσσιων ψαριών εξαρτάται από τη μεγάλη και σπουδαία προσφορά του ζωοπλαγκτού.

Πληροφοριακά, το *Brachionus plicatilis* είναι ένα μικρό τροχόζωο που αναπτύχθηκε για πρώτη φορά ως τροφή για τις νύμφες των ψαριών στην Ιαπωνία τη δεκαετία του 1950 (Hagiwara *et al.*, 1995; Dhert *et al.*, 1995). Από τότε, πολλές μέθοδοι καλλιέργειας έχουν αναπτυχθεί. Παρά το γεγονός ότι το *Brachionus plicatilis* εντοπίστηκε για πρώτη φορά ως παράσιτο σε λίμνη καλλιέργειας χελιών τη δεκαετία του πενήντα και του εξήντα, οι Ιάπωνες ερευνητές σύντομα συνειδητοποίησαν ότι αυτό το τροχόζωο θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως κατάλληλος ζωντανός οργανισμός διατροφής των πρώτων σταδίων των νυμφών των θαλάσσιων ψαριών (Fukusho and Iwamoto, 1981). Η επιτυχής χρήση των τροχοζώων στα εμπορικά εκκολαπτήρια ενθάρρυνε τις έρευνες για την ανάπτυξη των τεχνικών μαζικής καλλιέργειάς τους. Τριάντα πέντε χρόνια μετά την πρώτη χρήση των τροχοζώων σε καλλιέργειες ψαριών, η χρήση με διάφορες τεχνικές καλλιέργειας για την εντατική παραγωγή τροχοζώων ήδη εφαρμόζονται σε όλο τον κόσμο. Η διαθεσιμότητα μεγάλων ποσοτήτων αυτής της ζωντανής πηγής τροφής συνέβαλε στην επιτυχή παραγωγή εκκολαπτηρίων σε πάνω από 60 θαλάσσια είδη ιχθύων και 18 είδη καρκινοειδών.

Προς γνώση μας, οι άγριοι πληθυσμοί των τροχοζώων έχουν παραχθεί μόνο σε μία περιοχή της Α.Δ. Κίνας, και συγκεκριμένα το Bohai που είναι στις αλυκές του ομώνυμου Κόλπου, όπου το *Brachionus plicatilis* χρησιμοποιείται ως τροφή σε τοπικά εκκολαπτήρια γαρίδων και καβουριών. Η επιτυχία των τροχοζώων ως οργανισμός καλλιέργειας είναι πολλαπλή, όπως π.χ. η πλαγκτονική του φύση, η ανεκτικότητα σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών καθώς και το υψηλό ποσοστό αναπαραγωγής (0,7 - 1,4 απόγονοι ανά θηλυκό ανά ημέρα), (Fukusho, 1989). Το μικρό τους μέγεθος και η αργή ταχύτητα που κολυμπούν τα καθιστά κατάλληλη λεία για τις νύμφες των ψαριών που μόλις έχουν απορροφήσει το λεκιθικό σάκο τους και που δεν μπορούν να καταπιούν τους μεγαλύτερους ναύπλιους *Artemia* ακόμα. Η καλλιέργεια των τροχοζώων έχει αποφέρει μεγάλα νούμερα παραγωγής, ωστόσο, η δυνατότητα εκτροφής των ζώων αυτών έχει πραγματοποιηθεί και σε πολύ υψηλότερες πυκνότητες (Suantika *et al.*, 2000; Alver *et al.*, 2010). Ακόμη και σε υψηλές πυκνότητες, τα ζώα αυτά αναπαράγονται γρήγορα και μπορεί έτσι να συμβάλλουν στη δημιουργία μεγάλων ποσοτήτων ζωντανής τροφής σε σύντομο χρονικό διάστημα. Από την άλλη, η φύση του τρόπου σίτισης των τροχοζώων (ηθμοφαγία) επιτρέπει την ενσωμάτωση στους ιστούς του σώματός του με τα ειδικά θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για τις νύμφες – θηρευτές αλλά και άλλων συστατικών (Chair *et al.*, 1995; Aragão *et al.*, 2004).

Το γένος της *Artemia* είναι ένα σύνολο από όμοια είδη, που το γεγονός αυτό οδηγεί και ορίζει το κριτήριο της αναπαραγωγικής απομόνωσής της. Μια πρόωρη ταξινομική προσπάθεια χρησιμοποίησε πληθυσμούς με διαφορετικές μορφολογίες που συγκεντρώνονται σε διάφορες θερμοκρασίες και αλατότητες. Αργότερα, η αφθονία των ονομάτων διακόπηκε και όλες οι γαρίδες άλμης αναφέρονταν ως *Artemia salina* (Linnaeus 1758). Σε γενικές γραμμές, τα είδη με τα διαφορετικά ονόματα αποδίδονται σε αναπαραγωγικά απομονωμένους πληθυσμούς ή ομάδες του πληθυσμού (Fukusho and Iwamoto, 1981). Επειδή διαρκώς νέοι πληθυσμοί συνεχώς χαρακτηρίζονται, οι επιστήμονες καλούνται να χρησιμοποιήσουν την ονομασία *Artemia sp.*, εάν δεν έχουν επαρκή βιοχημικά, κυτταρογενετικά ή μορφολογικά στοιχεία για να προσδιορίσουν το όνομα του είδους. Παρά το γεγονός ότι μέχρι

πρόσφατα πάνω από το 90% όλων των κύστεων στην αγορά προέρχονταν από την λίμνη Great Salt Lake, κύστεις *Artemia* είναι εμπορικά διαθέσιμες από διάφορες πηγές παραγωγής στην Αμερική, την Ασία, την Αυστραλία και την Ευρώπη. Η γνώση των χαρακτηριστικών (τόσο σε γονοτυπικό όσο και φαινοτυπικό επίπεδο) μιας συγκεκριμένης παρτίδας κύστεων μπορεί να αυξήσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα της χρήσης της σε ψάρια ή σε εκκολαπτήρια γαρίδας.

Η διατροφική αποτελεσματικότητα ενός οργανισμού – θήραμα καθορίζεται κυρίως από το βαθμό πρόσληψής του και κατά συνέπεια, από το μέγεθος και τη μορφή του. Τυποποιημένες δοκιμές καλλιέργειας με γαρίδες άλμης από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές προέλευσης εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στο ρυθμό ανάπτυξης, ακόμη και μέσα σε όμοια είδη, αλλά όχι μεταξύ των παρτίδων από το ίδιο στέλεχος (Clegg and Conte, 1980). Αν και στο χώρο, η αύξηση του πληθυσμού της *Artemia* (π.χ. μετά από εμβολιασμό) καθορίζεται από πολλούς παράγοντες, η επιλογή ενός στελέχους με υψηλό δυνητικό ρυθμό ανάπτυξης θα έχει θετικό αντίκτυπο στη μέγιστη απόδοση της παραγωγής. Τόσο η θερμοκρασία όσο και η αλατότητα επηρεάζουν σημαντικά την επιβίωση και την ανάπτυξη, με την επίδραση της θερμοκρασίας να είναι πιο έντονη. Ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών και αλατότητας πληρεί τις απαιτήσεις για >90% επιβίωση (Léger *et. al.*, 1986).

Στα τέλη της δεκαετίας του '70, όταν πολλά από τα εκκολαπτήρια ψαριών και γαρίδων άρχισαν να λειτουργούν, η μετάβαση από μια πηγή *Artemia* σε άλλη προκάλεσε απρόσμενα προβλήματα. Πολύ σημαντικές διαφορές στην απόδοση της παραγωγής είχαν ακόμη ληφθεί με διαφορετικές παρτίδες *Artemia* της ίδιας γεωγραφικής προέλευσης. Ειδικά η σύσταση των ολικών λιπιδίων και λιπαρών οξέων στην *Artemia* φαίνεται να διαφέρουν σημαντικά από στέλεχος σε στέλεχος, ακόμη και από παρτίδα σε παρτίδα, ως συνέπεια των διακυμάνσεων της βιοχημικής σύνθεσης των θηραμάτων (κυρίως μονοκύτταρα φύκη) του πληθυσμού των ενηλίκων *Artemia* (Leger *et. al.*, 1986).

Έχει αποδειχθεί ότι, οι κύστεις που συλλέγονται από εσωτερικούς πόρους διαθέτουν πιο σταθερή σύνθεση. Αυτές οι κύστεις είναι διαθέσιμες όλο το χρόνο σε μεγάλες ποσότητες κατά μήκος των ακτών υπεράλμυρων λιμνών διάσπαρτων στις πέντε ηπείρους. Μετά τη συγκομιδή και την επεξεργασία, οι κύστεις είναι διαθέσιμες σε εμπορευματοκιβώτια. Με 24-48 ώρες επώασης σε γλυκό νερό, από τις κύστεις ελευθερώνονται οι ναύπλιοι που μπορούν άμεσα να χορηγηθούν ως ζωντανή πηγή τροφής για τις νύμφες ψαριών και ασπόνδυλων, γεγονός που τις καθιστά τον πιο βολικό τύπο χορηγούμενης ζωντανής τροφής που διατίθενται στις υδατοκαλλιέργειες (Clegg and Conte, 1980).

Παρά το γεγονός ότι η *Artemia* έχει γίνει γνωστή για τον άνθρωπο εδώ και αιώνες, η χρήση της ως τροφή για την εκτροφή των νυμφών καλλιεργούμενων οργανισμών προφανώς άρχισε μόλις το 1930, όταν αρκετοί ερευνητές βρήκαν ότι αποτελεί μια αξιόπιστη τροφή για τις νύμφες των ψαριών. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1940, οι περισσότερες εμπορικά διαθέσιμες κύστεις γαρίδων άλμης προέρχονταν από συλλογές φυσικών λιμνών άλμης και από παράκτιες εγκαταστάσεις επεξεργασίας άλατος. Με αυξανόμενο το ενδιαφέρον για τα τροπικά ψάρια ως χόμπι στα τέλη της δεκαετίας του 1940, η εμπορική αξία των γαρίδων άλμης αυξήθηκε, και καθιερώθηκε έτσι μια νέα βιομηχανία (Lavens and Sorgeloos, 2000). Κατά τα επόμενα χρόνια, πολλές ερευνητικές προσπάθειες πραγματοποιήθηκαν για να αποδειχθεί η δυνατότητα της τοπικής παραγωγής *Artemia* σε χώρες ολόκληρου του κόσμου. Μέχρι σήμερα, η *Artemia* παράγεται και εκμεταλλεύεται και στις πέντε ηπείρους. Παρ' όλα αυτά, σήμερα ένα μεγάλο μέρος της αγοράς εξακολουθεί να παρέχεται από συγκομιδές από μία μόνο θέση, που είναι η λίμνη Great Salt Lake στη Γιούτα των Η.Π.Α.. Η

κατάσταση αυτή καθιστά την αγορά εξαιρετικά ευάλωτη στις κλιματολογικές ή και οικολογικές αλλαγές σε αυτήν την λίμνη.

Τέλος, η καλύτερη γνώση της βιολογίας της *Artemia* αποτέλεσε την αφετηρία για την ανάπτυξη καλύτερων διαχειριστικών εφαρμογών της, π.χ. απολύμανση και αποκελυφοποίηση κύστεων, με άμεση επίπτωση στην ποιότητα του παραγόμενου γόνου (Hanaee *et. al.*, 2005; Monroig *et. al.*, 2006).

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η συλλογή και καταγραφή πληροφοριών σχετικά με τη μορφολογία, τη βιολογία, την οικολογία, τη θρεπτική αξία, τη χρήση και τις σημαντικότερες τεχνικές παραγωγής και διαχείρισης ζωοπλαγκτονικών οργανισμών (τροχόζωα και *Artemia*) που έχουν υιοθετηθεί τα τελευταία χρόνια από την πλειοψηφία των εκκολαπτηρίων ψαριών και ασπόνδυλων. Επίσης, περιγράφηκαν αντιπροσωπευτικές ερευνητικές εργασίες που πραγματοποιήθηκαν σε ολόκληρο τον κόσμο πάνω στην εξέλιξη, σε τεχνικό και διαχειριστικό επίπεδο, της καλλιέργειας ζωοπλαγκτονικών οργανισμών της τελευταίας 20ετίας.

Σκοπός της αποτέλεσε, η συλλογή του υλικού αυτού να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί για την καλύτερη κατανόηση και χρονική παρακολούθηση της εξέλιξης της καλλιέργειας ζωοπλαγκτονικών οργανισμών, ενώ ταυτόχρονα, να αποτυπωθούν τα κενά και οι ανάγκες βελτίωσης της καλλιέργειας αυτής για μελλοντικές ερευνητικές προσπάθειες.

**Εγχειρίδιο Παραγωγής και Χρήσης Ζωοπλαγκτονικών Οργανισμών
στις
Υδατοκαλλιέργειες**

(Levens and Sorgeloos, 1996)

Philippe Dhert

Laboratory of Aquaculture & Artemia Reference Center

University of Gent, Βέλγιο

1.1. Εισαγωγή

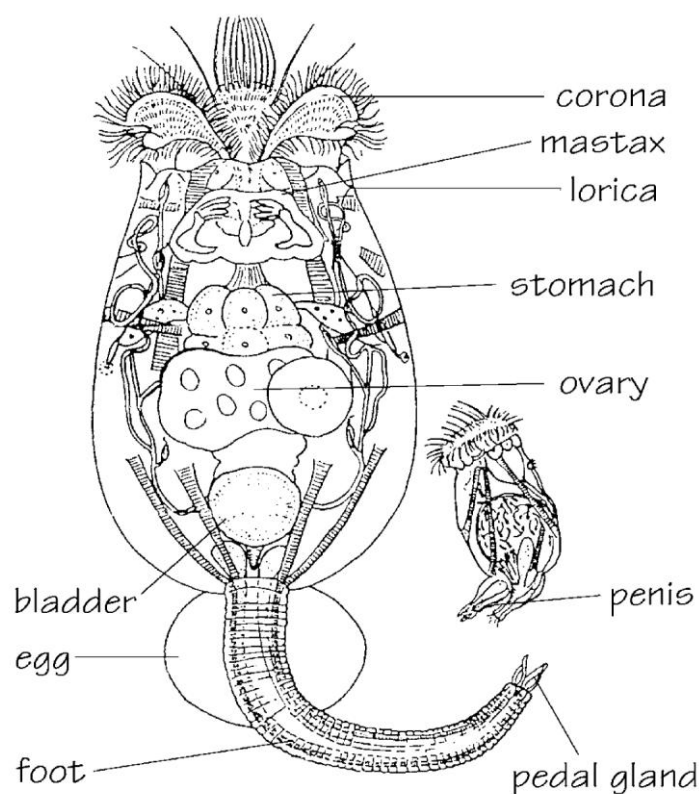
Αν και το *Brachionus plicatilis* προσδιορίστηκε αρχικά ως παράσιτο στην καλλιέργεια χελιών των λιμνών στη δεκαετία του '50 και τη δεκαετία του '60, οι Ιάπωνες ερευνητές σύντομα συνειδητοποίησαν ότι αυτό το τροχόζωο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως οργανισμός κατάλληλος ζωντανής τροφής για τα αρχικά νυμφικά στάδια των θαλασσίων ψαριών. Η επιτυχής χρήση των τροχόζωων στα εμπορικά εκκολαπτήρια της κόκκινης τσιπούρας (*Pagrus major*) ενθάρρυναν έρευνες στην ανάπτυξη τεχνικών μαζικής καλλιέργειας τροχόζωων. Είκοσι πέντε έτη μετά από την πρώτη χρήση των τροχόζωων στη σίτιση νυμφών ψαριών καλλιέργειας, διάφορες τεχνικές καλλιέργειας για την εντατική παραγωγή τους εφαρμόζονται παγκοσμίως. Η διαθεσιμότητα μεγάλων ποσοτήτων αυτής της πηγής ζωντανής τροφής έχει συμβάλει στην επιτυχή παραγωγή εκκολαπτηρίων περισσότερων από 60 θαλασσίων ειδών ψαριών και 18 ειδών καρκινοειδών. Από ότι ξέρουμε, άγριοι πληθυσμοί τροχόζωων συλλέγονται μόνο σε μια περιοχή στη Λαϊκή Δημοκρατία της Κίνας, (δηλ. στις αλυκές του κόλπου Bohai) όπου τα *Brachionus plicatilis* χρησιμοποιούνται ως τροφή στα τοπικά εκκολαπτήρια γαριδών και καβουριών. Η επιτυχία των τροχόζωων ως καλλιεργήσιμος οργανισμός είναι πολλαπλή, συμπεριλαμβανομένου της πλαγκτονικής φύσης τους, της ανοχής σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών και του υψηλού ποσοστού αναπαραγωγής (0.7-1.4 απόγονοι ανά θηλυκό ανά ημέρα). Επιπλέον, το μικρό μέγεθος και η αργή ταχύτητα κολύμβησής τους, το καθιστούν ως το κατάλληλο θήραμα για τις νύμφες των ψαριών που έχουν μόλις απορροφήσει τα λεκιθικά τους αποθέματα αλλά δεν μπορούν να καταπιούν ακόμα το μεγαλύτερο ναύπλιο *Artemia*. Εντούτοις, η μέγιστη δυνατότητα για καλλιέργεια των τροχόζωων έγκειται στη δυνατότητα αυτών των ζώων να ανατρέφονται σε πολύ υψηλές πυκνότητες (δηλ. πυκνότητες 2000 ζώα ml⁻¹ έχουν αναφερθεί από Hirata, 1979). Ακόμη και σε υψηλές πυκνότητες, τα ζώα αναπαράγονται ραγδαία και μπορεί έτσι να συμβάλλουν στη συγκέντρωση των μεγάλων ποσοτήτων των ζωντανών τροφών σε ένα πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Τελευταίο αλλά όχι ασήμαντο, η φύση της ηθμοφαγίας του τροχόζωου διευκολύνει τη συσσώρευση στους ιστούς του σώματός τους συγκεκριμένων θρεπτικών ουσιών για τους νυμφικούς θηρευτές (δηλ. μέσω του βίο-εγκλεισμού, βλ. παρακάτω).

1.2. Μορφολογία

Τα τροχόζωα (rotatoria ή rotifera) ανήκουν στα μικρότερα μετάζωα τα οποία είναι πάνω από 1000 είδη που έχουν περιγραφεί, το 90% των οποίων κατοικούν σε βιότοπους του γλυκού νερού. Φθάνουν, σπάνια, μέχρι τα 2 mm μήκος σώματος. Τα αρσενικά παρουσιάζουν μειωμένα μεγέθη και είναι λιγότερο ανεπτυγμένα από τα θηλυκά, που κάποια έχουν μετρηθεί μόνο 60 μm. Το σώμα όλων των ειδών αποτελείται από έναν σταθερό αριθμό κυττάρων και τα διάφορα είδη *Brachionus*

περιέχουν περίπου 1000 κύτταρα που δεν πρέπει να θεωρηθούν ως μονές ταυτότητες αλλά ως μέρος πλάσματος. Η ανάπτυξη του ζώου βεβαιώνεται από την αύξηση του πλάσματος και όχι από την κυτταροδιαίρεση.

Η επιδερμίδα αποτελείται από ένα πυκνά δομημένο στρώμα πρωτεϊνών κερατίνης και καλείται lorica. Η μορφή της lorica και η κατανομή των ακανθών και ιδιαίτερων χαρακτηριστικών επιτρέπουν τον προσδιορισμό των διαφορετικών ειδών και στελεχών (βλ. 1.4.). Το σώμα των τροχοζώων είναι διαφοροποιημένο σε τρία ξεχωριστά μέρη αποτελούμενο από την κεφαλή, τον κορμό και τον πόδα (Εικ. 1.1.). Η κεφαλή φέρει το όργανο περιστροφής ή την κορώνα-στεφάνη που αναγνωρίζεται εύκολα από το δακτυλιοειδές βλεφαριδωτό σχηματισμό, και στον οποίο οφείλεται η προέλευση του ονόματος Rotatoria (φέρον τροχός). Η ανασυρόμενη κορώνα προκαλεί μετατόπιση και μια στροβιλιζόμενη μετακίνηση νερού διευκολύνει την πρόσληψη μικρών τεμαχίων τροφής (κυρίως φυκών και τριμμάτων). Ο κορμός περικλείει τον πεπτικό αγωγό, το απεκκριτικό σύστημα και τα γεννητικά όργανα. Ένα χαρακτηριστικό όργανο για τα τροχοζώα είναι το mastax ή φαρυγγικό όργανο (δηλ. μια ασβεστοποιημένη συσκευή στη στοματική περιοχή), το οποίο είναι πολύ αποτελεσματικό στη λείανση των μορίων που έχουν καταπωθεί. Ο πόδας είναι μια ανασυρόμενη δομή τύπου δακτυλιδίου χωρίς τμηματοποίηση που καταλήγει σε ένα ή τέσσερα δάκτυλα.



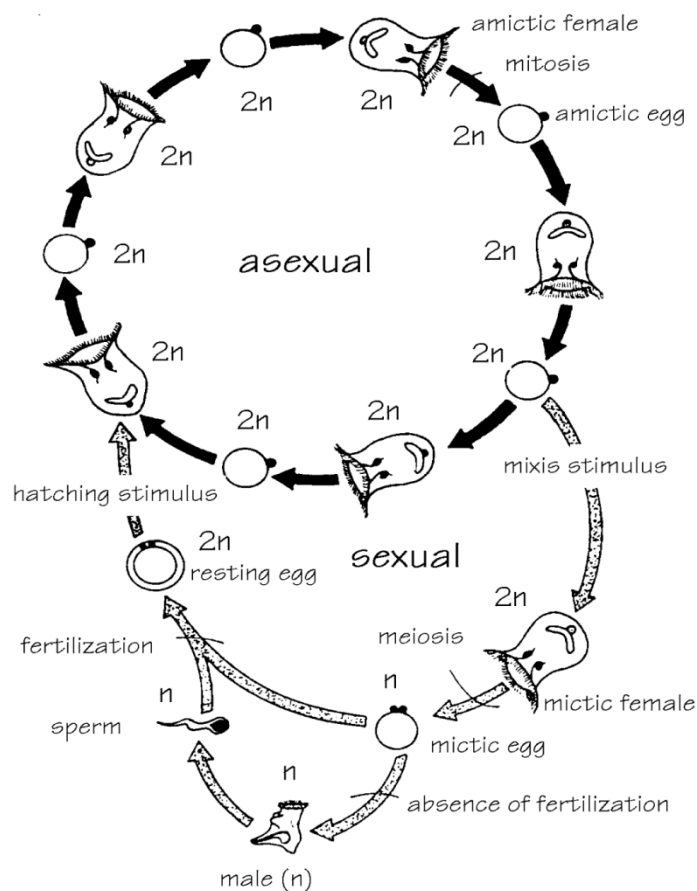
Εικ. 1.1. *Brachionus plicatilis*, θηλυκό και αρσενικό (σχεδιασμένο από Koste, 1980).
Fig. 1.1. *Brachionus plicatilis*, female and male (modified from Koste, 1980).

1.3. Βιολογία και ιστορία ζωής

Ο κύκλος ζωής των τροχοζώων έχει υπολογιστεί ότι κυμαίνεται μεταξύ 3.4 και 4.4 ημέρες στους 25°C. Γενικά, οι νύμφες γίνονται ενήλικες μετά από 0.5 έως 1.5 ημέρες

και τα θηλυκά έκτοτε αρχίζουν να γεννούν αυγά περίπου κάθε τέσσερις ώρες. Πιστεύεται ότι τα θηλυκά μπορούν να παράγουν δέκα γενιές απογόνων μέχρι το θάνατό τους. Η δραστηριότητα αναπαραγωγής των *Brachionus* εξαρτάται από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος όπως καταδεικνύεται στον Πίνακα 1.1.

Ο κύκλος ζωής του *Brachionus plicatilis* μπορεί να ολοκληρωθεί με δύο αναπαραγωγικούς τρόπους (Εικ. 1.2.). Κατά τη διάρκεια της θηλυκής παρθενογένεσης τα αμικτικά θηλυκά (amictic females) παράγουν αμικτικά (διπλοειδή, $2n$ χρωμοσώματα) αυγά που αναπτύσσονται και εκκολάπτονται σε αμικτικά θηλυκά. Κάτω από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες τα θηλυκά υπόκεινται αλλαγής σε μια πιο περίπλοκη σεξουαλική αναπαραγωγή σχηματίζοντας μικτικά (mictic) και αμικτικά θηλυκά. Αν και τα δύο δεν είναι διακριτά μορφολογικά, τα μικτικά θηλυκά παράγουν απλοειδή (n χρωμοσώματα) αυγά. Η εκκόλαση των νυμφών από αυτά τα αγονιμοποίητα μικτικά αυγά θα αναπτύξει απλοειδή αρσενικά.



Εικ. 1.2. Παρθενογενετική και φυλετική αναπαραγωγή του *Brachionus plicatilis* (σχεδιασμένο από τους Hoff and Snell, 1987).

Fig. 1.2. Parthenogenetical and sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (modified from Hoff and Snell, 1987).

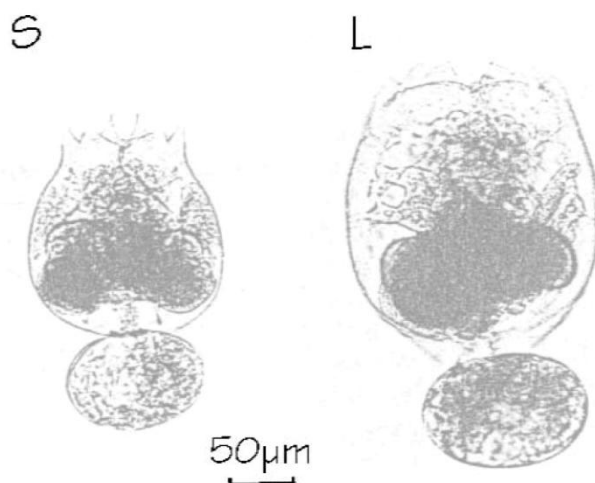
Αυτά τα αρσενικά είναι περίπου το ένα τέταρτο του μεγέθους του θηλυκού, δεν διαθέτουν πεπτική αγωγή και ουροδόχο κύστη αλλά έχουν έναν υπερμεγέθη μονό όρχι ο οποίος είναι γεμάτος σπέρμα. Τα μικτικά αυγά που θα εκκολαφθούν σε αρσενικά είναι σημαντικά μικρότερα στο μέγεθος, ενώ τα μικτικά γονιμοποιημένα αυγά είναι μεγαλύτερα και έχουν ένα παχύ, ελαφρώς κρυσταλλικό εξωτερικό στρώμα.

Αυτά είναι τα αυγά διάπαυσης (resting eggs) που θα αναπτυχθούν και θα εκκολαφθούν σε αμικτικά θηλυκά μόνο μετά από την έκθεσή τους σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Το γεγονός αυτό μπορεί να είναι το αποτέλεσμα αλλαγών στις περιβαλλοντικές συνθήκες που τελικά δημιουργείται από μεγάλες παραλλαγές στη θερμοκρασία ή την αλατότητα ή στις συνθήκες σίτισης. Πρέπει να υπογραμμιστεί ότι, η πυκνότητα του πληθυσμού των τροχοζώων διαδραματίζει επίσης έναν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό του τρόπου αναπαραγωγής. Αν και ο μηχανισμός δεν γίνεται κατανοητός σε όλη του τη διάσταση, γενικά θεωρείται ότι η παραγωγή των αυγών διάπαυσης είναι μια στρατηγική επιβίωσης του πληθυσμού λόγω δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών όπως η ξηρασία ή το κρύο.

1.4. Διαφορές στελεχών

Μόνο μερικά είδη τροχοζώων που ανήκουν στο γένος *Brachionus* χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες. Το ευρέως χρησιμοποιούμενο είδος είναι το *Brachionus plicatilis*, ένας κοσμοπολίτικος κάτοικος των εσωτερικών αλατούχων και παράκτιων υφάλμυρων νερών. Διαθέτει μήκος lorica που κυμαίνεται από 100 έως 340 μm, με τη lorica να καταλήγει σε 6 ινιακές άκανθες (Fukusho, 1989).

Εντούτοις, στις υδατοκαλλιέργειες, μια απλή ταξινόμηση χρησιμοποιείται η οποία βασίζεται σε δύο διαφορετικούς τύπους μορφών, τον τύπο *Brachionus rotundiformis* ή μικρά τροχόζωα (small ή S-τύπος) και *Brachionus plicatilis* ή μεγάλα τροχόζωα (large ή L-τύπος). Οι διαφορές μεταξύ των δύο τύπων μπορούν να διακριθούν σαφώς από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους: το μήκος της lorica του L-τύπου κυμαίνεται από 130 έως 340 μm (με μέσο όρο τα 239 μm), και του S-τύπου κυμαίνεται από 100 έως 210 μm (με μέσο όρο τα 160 μm). Επιπλέον, η lorica του S-τύπου παρουσιάζει οξείς άκανθες, ενώ του L-τύπου διαθέτει γωνιακές άκανθες (Εικ. 1.3.).



Εικ. 1.3. *Brachionus rotundiformis* (S-τύπος) and *Brachionus plicatilis* (L-τύπος) (σχεδιασμένο από τους Fu *et al.*, 1991).

Fig. 1.3. *Brachionus rotundiformis* (S-type) and *Brachionus plicatilis* (L-type) (modified from Fu *et al.*, 1991).

Στις υδατοκαλλιέργειες τροπικών ειδών, τροχόζωα SS-τύπου ή super small (πολύ μικρά τροχόζωα) προτιμώνται για την πρώτη σίτιση των νυμφών ψαριών που διαθέτουν μικρά στοματικά ανοίγματα (λαγόψαρα, ροφοί, και άλλα ψάρια με στοματικά ανοίγματα στην έναρξη σίτισης μικρότερα από 100 μm). Αυτά τα

τροχόζωα, εντούτοις, είναι γενετικά μη απομονωμένα από τα S-τύπου τροχόζωα, αλλά είναι μικρότερα από αυτά.

Ο S- και L-τύπος επίσης διαφέρουν στη βέλτιστη θερμοκρασία αύξησής τους. Ο S-τύπος έχει μια βέλτιστη αύξηση στους 28-35°C, ενώ ο L-τύπος φθάνει στη βέλτιστη αύξησή του στους 18-25°C. Μιας και η μόλυνση εμφανίζεται συχνά και στους δύο τύπους των τροχοζώων, χειρισμοί πτώσεις ή αύξησης τις θερμοκρασίες καλλιέργειας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επίτευξη καθαρών καλλιεργειών. Τα τροχόζωα στο ανώτερο ή κατώτερο όριο ανοχής τους δεν πολλαπλασιάζονται τόσο γρήγορα και μπορούν κατά αυτόν τον τρόπο να ανταγωνιστούν υπέρ του επικρατέστερου τύπου μορφής.

Πρέπει να υπογραμμιστεί ότι, εκτός από την ειδοειδική παραλλαγή μεγεθών, σημαντική εξωειδική παραλλαγή στο μέγεθος μπορεί να εμφανιστεί ως αποτέλεσμα του επιπέδου αλατότητας ή του σχήματος σίτισης. Αυτός ο πολυμορφισμός μπορεί να οδηγήσει σε μια διαφοροποίηση μεγαλύτερη του 15% (Fukusho and Iwamoto, 1981). Τα τροχόζωα που ταΐζονται με μαγιά αρτοποιίας είναι συνήθως μεγαλύτερα από εκείνα που ταΐζονται με ζωντανά φύκη.

1.5. Γενικές συνθήκες καλλιέργειας

1.5.1. Θαλάσσια Τροχόζωα

1.5.1.1. Αλατότητα

Αν και το *Brachionus plicatilis* αντέχει σε ένα μεγάλο εύρος αλατότητας που κυμαίνεται από 1 έως 97 ppt, η βέλτιστη αναπαραγωγή μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο σε αλατότητες κάτω από 35 ppt (Lubzens, 1987). Εντούτοις, εάν τα τροχόζωα πρέπει να ταϊστούν σε θηρευτές που εκτρέφονται σε μια διαφορετική αλατότητα (± 5 ppt), είναι ασφαλές να εγκλιματιστούν, δεδομένου ότι οι απότομες αλλαγές αλατότητας δύναται να εμποδίσουν το κολύμπι των τροχοζώων ή και ακόμα να προκαλέσουν το θάνατό τους.

1.5.1.2. Θερμοκρασία

Η επιλογή της βέλτιστης θερμοκρασίας καλλιέργειας για την εκτροφή των τροχοζώων εξαρτάται από τον τύπο του τροχοζώου. Τροχόζωα L-τύπου εκτρέφονται στις χαμηλότερες θερμοκρασίες από αυτά του S-τύπου. Γενικά, αυξάνοντας τη θερμοκρασία μέσα στο βέλτιστο εύρος, οδηγεί συνήθως σε μια αυξανόμενη αναπαραγωγική δραστηριότητα. Εντούτοις, εκτρέφοντας τροχόζωα σε υψηλή θερμοκρασία αυξάνει το κόστος παραγωγής της τροφής. Εκτός από το αυξανόμενο κόστος τροφής, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί επίσης στις συχνότερες και μικρότερες διανομές σίτισης. Αυτό είναι ουσιαστικό για τη συντήρηση υψηλής ποιότητας νερού και για την αποφυγή περιόδων υπερσίτισης ή τροφικής πείνας, τα οποία δεν είναι ανεκτά σε επίπεδα θερμοκρασίας κάτω των βέλτιστων. Για παράδειγμα, στις υψηλές θερμοκρασίες τα ζώα που έχουν υποστεί τροφική πείνα καταναλώνουν τα αποθέματα των λιπιδίων και υδατανθράκων τους πολύ γρήγορα. Εκτρέφοντας τροχόζωα κάτω από τη βέλτιστη θερμοκρασία τους επιβραδύνεται σημαντικά η πληθυσμιακή τους αύξηση. Ο Πίνακας 1.1 παρουσιάζει την επίδραση της θερμοκρασίας στην πληθυσμιακή δυναμική των τροχοζώων.

Πίνακας 1.3. Επίδραση της θερμοκρασίας στην αναπαραγωγική διαδικασία *Brachionus plicatilis*. (Κατά Ruttner-Kolisko, 1972).

Table. 1.3. Effect of temperature on the reproduction activity of *Brachionus plicatilis*. (After Ruttner-Kolisko, 1972).

Temperature (°C).	15 °C	20 °C	25 °C
Time for embryonic development (days).	1.3	1.0	0.6
Time for young female to spawn for the first time (days).	3.0	1.9	1.3
Interval between two spawnings (hours).	7.0	5.3	4.0
Length of life (days).	15	10	7
Number of eggs spawned by a female during her life.	23	23	20

1.5.1.3. Διαλυμένο οξυγόνο

Τα τροχόζωα μπορούν να επιζήσουν σε νερό με περιεκτικότητα διαλυμένου οξυγόνου κάτω από 2 mg I⁻¹. Το επίπεδο διαλυμένου οξυγόνου στο νερό καλλιέργειας εξαρτάται από τη θερμοκρασία, την αλατότητα, την πυκνότητα των τροχοζώων, και τον τύπο των τροφών. Ο αερισμός δεν πρέπει να είναι πάρα πολύ ισχυρός ώστε να αποφευχθεί η φυσική ζημία στον πληθυσμό.

1.5.1.4. pH

Τα τροχόζωα ζουν σε επίπεδα pH πάνω από 6.6, αν και στο φυσικό περιβάλλον τους κάτω από συνθήκες καλλιέργειας τα καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται σε ένα pH πάνω από 7.5.

1.5.1.5. Αμμωνία (NH₃)

Ο λόγος NH₃/NH₄⁺ επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και το pH του νερού. Τα υψηλά επίπεδα της μη-ιονισμένης αμμωνίας είναι τοξικά για τα τροχόζωα αλλά οι συνθήκες εκτροφής με συγκεντρώσεις NH₃ κάτω από 1 mg I⁻¹ εμφανίζονται να είναι ασφαλείς.

1.5.1.6. Βακτήρια

Τα *Pseudomonas* και τα *Acinetobacter* είναι κοινά βακτήρια που μπορούν να αποτελέσουν σημαντική συμπληρωματική πηγή σίτισης για τα τροχόζωα. Μερικά είδη *Pseudomonas*, για παράδειγμα, συνθέτουν τη βιταμίνη B₁₂ που μπορεί να είναι ένας περιοριστικός παράγοντας κάτω από συνθήκες καλλιέργειας (Yu *et al.*, 1988).

Αν και τα περισσότερα βακτήρια δεν είναι παθογόνα για τα τροχόζωα, ο πολλαπλασιασμός τους πρέπει να αποφευχθεί δεδομένου ότι ο πραγματικός κίνδυνος της συσσώρευσης και μεταφοράς μέσω της τροφικής αλυσίδας μπορεί να προκαλέσει καταστρεπτικά αποτελέσματα στο θηρευτή.

Μια μαζική δειγματοληψία που εκτελέστηκε σε διάφορα εκκολαπτήρια έδειξε ότι η κυρίαρχη βακτηριακή πανίδα στην καλλιέργεια των τροχοζώων ήταν το *Vibrio* (Verdonck *et al.*, 1994). Η ίδια μελέτη έδειξε ότι, η μικροχλωρίδα των ζωντανών

τροφών ήταν αρκετά διαφορετική μεταξύ των εκκολαπτηρίων ειδικά μετά από τον εμπλουτισμό, βρέθηκαν μεγάλοι αριθμοί των σχετικών βακτηρίων. Ο εμπλουτισμός των καλλιέργειών προκαλεί γενικά μια μετατόπιση στη βακτηριακή σύνθεση από την κυριαρχία των *Cytophaga / Flavobacterium*, προς την κυριαρχία των *Pseudomonas / Alcaligenes*. Αυτή η αλλαγή οφείλεται εν μέρει σε μια άνθιση των ταχέως αναπτυσσόμενων βακτηρίων, που ευνοείται από τα υψηλά επίπεδα υποστρωμάτων (Skjermo and Vadstein, 1993). Οι βακτηριακοί αριθμοί μετά από τον εμπλουτισμό μπορούν να μειωθούν στα αρχικά επίπεδά τους από την κατάλληλη αποθήκευση (6°C) και τη ρύθμιση της πυκνότητας των τροχοζώων (Skjermo and Vadstein, 1993). Ένας περισσότερο αποτελεσματικός τρόπος να μειωθούν οι πληθυσμοί βακτηρίων, ειδικά οι αριθμοί του κυρίαρχου *Vibrionaceae* στα τροχόζωα, είναι η σίτιση των τροχοζώων με το *Lactobacillus plantarum* (Gatesoupe, 1991). Η προσθήκη αυτών των προβιοτικών βακτηρίων όχι μόνο έχει μια ρυθμιστική επίδραση στη μικροχλωρίδα αλλά και αυξάνει το ποσοστό παραγωγής των τροχοζώων. Για τις σταθερές καλλιέργειες τροχοζώων, η μικροχλωρίδα καθώς επίσης και η φυσιολογική κατάσταση των τροχοζώων, πρέπει να εξετάζονται. Για παράδειγμα, έχει καταδειχθεί ότι, η διαιτητική κατάσταση του τροχοζώου *Brachionus plicatilis* μπορεί να μετρηθεί από τη φυσιολογική απόδοση και αντίδραση σε επιλεγμένο παθογόνο βακτηριακό στέλεχος (*Vibrio anguillarum* TR27). Ανάλογα αποτελέσματα αναφέρθηκαν επίσης από τους Yu *et al.*, (1990) για το στέλεχος *Vibrio alginolyticus* Y5 σε συγκέντρωση $2.5 \cdot 10^4$ CFU ml⁻¹.

1.5.1.7. Βλεφαριδωτά (Ciliates)

Τα Halotricha και Hypotricha βλεφαριδωτά, όπως *Uronema sp.* και *Euplotes sp.*, δεν επιδιώκονται στις εντατικές καλλιέργειες δεδομένου ότι ανταγωνίζονται για την τροφή με τα τροχόζωα. Η εμφάνιση αυτών των βλεφαριδωτών οφείλεται γενικά στις υπό-βέλτιστες συνθήκες εκτροφής, που οδηγούν σε λιγότερο αποδοτικά τροχόζωα και αυξάνουν τις πιθανότητες για τον ανταγωνισμό. Τα βλεφαριδωτά παράγουν μεταβολικά απόβλητα που αυξάνουν τα επίπεδα NO₂-N στο νερό και προκαλούν μια μείωση στο pH. Εντούτοις, έχουν μια θετική επίδραση στον καθαρισμό της δεξαμενής καλλιέργειας από τα βακτήρια και τα κατάλοιπα. Η προσθήκη μιας χαμηλής συγκέντρωσης φορμόλης 20 mg l⁻¹ στη δεξαμενή καλλιέργειας φυτοπλαγκτού, 24 ώρες πριν από τον εμβολιασμό των τροχοζώων μπορεί να μειώσει σημαντικά τη μόλυνση αυτή. Η φίλτραση και ο καθαρισμός των τροχοζώων μέσω της χρήσης πλαγκτονικών φίλτρων (<50 μm) ώστε να μειωθεί ο αριθμός των βλεφαριδωτών ή άλλων μικρών μολυσματικών παραγόντων είναι μια εύκολη προφύλαξη που μπορεί να ληφθεί όταν δημιουργούνται οι αρχικές καλλιέργειες.

1.5.2. Τροχόζωα του γλυκού νερού

Τα *Brachionus calyciflorus* και *Brachionus rubens* είναι τα πιο συνηθισμένα καλλιεργήσιμα τροχόζωα στις μαζικές καλλιέργειες του γλυκού νερού. Ανέχονται θερμοκρασιακές συνθήκες μεταξύ 15 και 31°C. Στο φυσικό περιβάλλον τους αναπτύσσονται σε νερά διάφορης ιοντικής σύνθεσης. Το *Brachionus calyciflorus* μπορεί να καλλιεργηθεί σε συνθετικό μέσο αποτελούμενο από 96 mg NaHCO₃, 60 mg CaSO₄ 2H₂O, 60 mg MgSO₄ και 4 mg KCl σε 1 l διπλά ιοντισμένου νερού. Το βέλτιστο pH είναι 6-8 στους 25°C με κατώτερα επίπεδα οξυγόνου τα 1.2 mg l⁻¹. Επίπεδα ελεύθερης αμμωνίας από 3 έως 5 mg l⁻¹ εμποδίζουν την αναπαραγωγή.

Τα *Brachionus calyciflorus* και *Brachionus rubens* έχουν εκτραφεί επιτυχώς σε

μικροφύκη *Scenedesmus costato-granulatus*, *Kirchneriella contorta*, *Phacus pyrum*, *Ankistrodesmus convoluius* και *Chlorella*, καθώς επίσης και σε μαγιά και συνθετικά γαλακτώματα Selco (Inve Aquaculture, Βέλγιο) και Roti-Rich (Florida Aqua Farms Inc., USA). Το σχήμα σίτισης του *Brachionus rubens* πρέπει να ρυθμιστεί δεδομένου ότι το ποσοστό σίτισής του είναι κάπως υψηλότερο από αυτό του *B. plicatilis*.

1.5.3. Διαδικασίες καλλιέργειας

Η εντατική εκτροφή τροχοζώων εκτελείται συνήθως με ομαδική παραγωγική καλλιέργεια σε εσωτερικές εγκαταστάσεις. Τα τελευταία είναι πιο αξιόπιστα από την υπαίθρια εντατική παραγωγή στις χώρες, όπου οι κλιματολογικοί περιορισμοί δεν επιτρέπουν την υπαίθρια παραγωγή μικροφυκών. Βασικά, η στρατηγική παραγωγής είναι η ίδια για τις εσωτερικές ή υπαίθριες εγκαταστάσεις, αλλά οι υψηλότερες πυκνότητες έναρξης και συγκομιδής επιτρέπουν τη χρήση των μικρότερων δεξαμενών παραγωγής (γενικά από 1 έως 2 m³) μέσα στις εντατικές εσωτερικές εγκαταστάσεις. Σε μερικές περιπτώσεις, η σίτιση με φύκη μπορεί να αντικατασταθεί από διαιτητικές φόρμουλες (βλ. 1.5.3.6.).

1.5.3.1. Αποθεματικές καλλιέργειες των τροχοζώων

Καλλιεργώντας μεγάλους όγκους των τροχοζώων στα φύκια, τη μαγιά αρτοποιίας ή σε τεχνητές τροφές συνεπάγονται μερικοί κίνδυνοι ξαφνικής θνησιμότητας του πληθυσμού. Οι τεχνικές ή ανθρώπινες αποτυχίες αλλά και η μόλυνση με παθογόνους ή ανταγωνιστικούς ηθμοφάγους οργανισμούς είναι οι κύριες αιτίες για τη χαμηλότερη αναπαραγωγή που μπορεί τελικά να οδηγήσει σε μια πλήρη κατάρρευση του πληθυσμού. Η στήριξη μόνο στις μαζικές καλλιέργειες των τροχοζώων για τον επανεμβολιασμό των νέων δεξαμενών είναι μια πάρα πολύ επικίνδυνη προσέγγιση. Προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί αυτός ο κίνδυνος, μικρές καλλιέργειες αποθεμάτων (stock cultures) κρατιούνται γενικά σε κλειστά φιαλίδια σε ένα απομονωμένο δωμάτιο για αποτροπή μόλυνσης με βακτήρια και βλεφαριδωτά.

Αυτές οι καλλιέργειες αποθεμάτων, που πρέπει να παράγουν τους μεγάλους πληθυσμούς των τροχοζώων όσο το δυνατό γρηγορότερα, γενικά διατηρούνται σε φύκη.

Τα τροχοζώα για τις αποθεματικές καλλιέργειες μπορούν να ληφθούν από τη φύση ή από ερευνητικά κέντρα ή από εμπορικά εκκολαπτήρια. Εντούτοις, πριν χρησιμοποιηθούν στον κύκλο παραγωγής πρέπει πρώτα να απολυμανθούν. Η πιο δραστική απολύμανση συνίσταται στην εξολόθρευση των ελεύθερων κολυμβητικών τροχοζώων αλλά όχι και των αυγών τους με ένα μίγμα αντιβιοτικών (π.χ. ερυθρομυκίνη 10 mg l⁻¹, γλωραμφενικόλη 10 mg l⁻¹, οξαλικό νάτριο 10 mg l⁻¹, πενικιλίνη 100 mg l⁻¹, στρεπτομυκίνη 20 mg l⁻¹) ή με ένα απολυμαντικό. Τα αυγά κατόπιν διαχωρίζονται από τα νεκρά σώματα σε ένα κόσκινο 50 μm και επωάζονται για εκκόλαψη, με τους απογόνους τους να χρησιμοποιούνται για την έναρξη των αποθεματικών καλλιεργειών. Εντούτοις, εάν τα τροχοζώα δεν φέρουν πολλά αυγά (όπως μπορεί να συμβεί μετά από μια μακριά αποστολή) ο κίνδυνος να χαθεί το πλήρες αρχικό απόθεμα είναι πάρα πολύ μεγάλο και σε αυτές τις περιπτώσεις ο πληθυσμός θα πρέπει να απολυμαίνεται σε υπό-θανατηφόρες δόσεις, όπου το νερό τους ανανεώνεται πλήρως και η μεταχείριση των τροχοζώων γίνεται είτε με αντιβιοτικά είτε με απολυμαντικά. Η επεξεργασία επαναλαμβάνεται μετά από 24 ώρες για μεγαλύτερη σιγουριά ότι οποιαδήποτε παθογόνα, που έχουν επιζήσει λόγω μετάβασής τους στον πεπτικό τμήμα των τροχοζώων, σκοτώνονται επίσης. Η

συγκέντρωση των προϊόντων απολύμανσης διαφέρει στην τοξικότητά τους και την αρχική κατάσταση των τροχοζώων.

Στο εργαστήριο Laboratory of Aquaculture & Artemia Reference Center, Βέλγιο οι αποθεματικές καλλιέργειες των τροχοζώων φυλάσσονται σε ένα θερμοκλιματιζόμενο δωμάτιο ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Τα φιαλίδια (50 ml κωνικοί φυγοκεντρικοί σωλήνες) έχουν προηγουμένως αποστειρωθεί και διατηρούνται σε περιστρεφόμενους δρομείς (4 rpm ή περιστροφές / λεπτό). Σε κάθε περιστροφή το νερό αναμιγνύεται με τον εσωκλειόμενο αέρα (± 8 ml), παρέχοντας αρκετό οξυγόνο για τα τροχοζώα (Εικ. 1.4.). Τα φιαλίδια είναι εκτεθειμένα στο φως δύο σωλήνων ελαφριού φθορισμού σε απόσταση 20 cm (ένταση φωτός 3000 lux στους σωλήνες).



Εικ. 1.4. Αποθεματικές καλλιέργειες σε 50 ml φυγοκεντρικούς σωλήνες. Οι σωλήνες είναι προσαρμοσμένοι σε ένα περιστρεφόμενο δρομέα. Σε κάθε ένα το μέσο ανακατεύεται με τον περιεχόμενο αέρα.

Fig. 1.4. Stock cultures of rotifers kept in 50 ml centrifuge tubes. The tubes are fixed on a rotor. At each rotation the medium is mixed with the enclosed air.

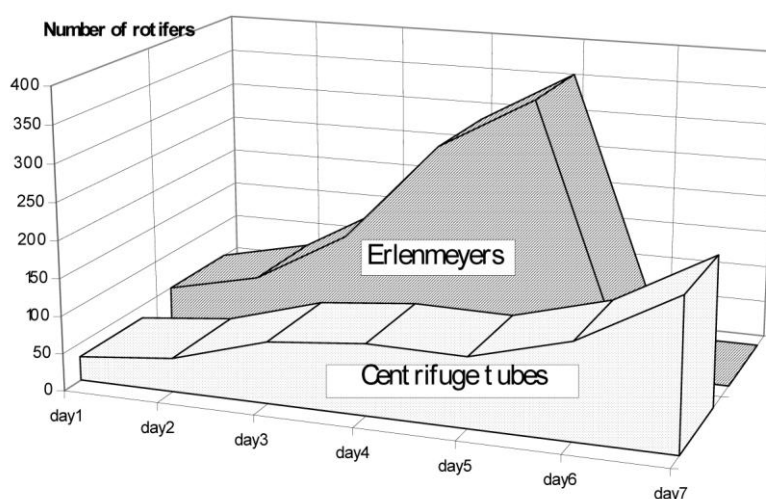
Το νερό καλλιέργειας (νερό της θάλασσας που αραιώνεται με το νερό βρύσης σε μια αλατότητα 25 ppt) αερίζεται, προ-φιλτράρεται από σακούλα φίλτρου $1 \mu\text{m}$ και απολυμαίνεται κατά τη διάρκεια της νύχτας με $5 \text{ mg l}^{-1} \text{ NaOCl}$. Την επόμενη ημέρα το NaOCl εξουδετερώνεται με $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ και το νερό φιλτράρεται με ένα φίλτρο $0.45 \mu\text{m}$.

Ο εμβολιασμός των σωλήνων πραγματοποιείται με μια αρχική πυκνότητα 2 άτομα ml^{-1} . Οι τροφές αποτελούνται από θαλάσσια *Chlorella*. Τα φύκη υποβάλλονται σε φυγοκέντρωση και συγκεντρώνονται σε 1 έως $2 \cdot 10^8$ κύτταρα ml^{-1} . Αυτή η φυκώδης συμπύκνωση αποθηκεύεται στους 4°C σε ένα ψυγείο για μια μέγιστη περίοδο 7 ημερών, που συμπίπτουν με έναν κύκλο εκτροφής τροχοζώων. Κάθε ημέρα η συμπύκνωση αυτή ομογενοποιείται με μια ανακίνηση και 200 μl δίνονται σε κάθε ένα από τους σωλήνες τροχοζώων. Εάν δίνονται φρέσκα φύκη αντί της φυκώδους συμπύκνωσης, 4 ml καλής καλλιέργειας φυκών προστίθενται καθημερινά.

Μετά από μια εβδομάδα η πυκνότητα των τροχοζώων πρέπει να έχει αυξηθεί από τα 2 στα $200 \text{ άτομα ml}^{-1}$ (Εικ. 1.5.). Τα τροχοζώα ξεπλένονται, ένα μικρό μέρος χρησιμοποιείται για τη συντήρηση του αποθέματος και τα απομείναντα άτομα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μεγαλύτερους όγκους. Επιπλέον, μετά από μερικούς μήνες της κανονικής καλλιέργειας οι αποθεματικές καλλιέργειες θα απολυμανθούν όπως περιγράφηκε νωρίτερα προκειμένου να κρατηθεί το υγιές και

καθαρό υλικό αποθεμάτων. Εντούτοις, η συνεχής συντήρηση των ζωντανών αποθεμάτων καλλιέργειας *Brachionus* δεν αποβάλλει τον κίνδυνο βακτηριακής μόλυνσης.

Η επεξεργασία με τα αντιβιοτικά μπορεί να χαμηλώσει το βακτηριακό φορτίο, αλλά και υπονομεύει τον κίνδυνο για την επιλογή των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων. Εντούτοις, η εμπορική διαθεσιμότητα των αυγών διάπαυσης θα μπορούσε να είναι μια εναλλακτική λύση στη διατήρηση των αποθεμάτων καλλιέργειας και τη μείωση των πιθανοτήτων για μόλυνση με τα βλεφαριδωτά ή τα παθογενετικά βακτήρια (Εικ. 1.7.).



Εικ. 1.5. Ρυθμός αύξησης του πληθυσμού των τροχοζώων στις αποθεματικές καλλιέργειες (φυγοκεντρικοί σωλήνες) και κατά τη διάρκεια των ενδιάμεσων στα erlenmeyers.

Fig. 1.5. Growth rate of the rotifer population in the stock cultures (centrifuge tubes) and during the Upscaling in erlenmeyers.

1.5.3.2. Κλιμάκωση των αποθεματικών καλλιεργειών για ξεκίνημα καλλιεργειών

Η κλιμάκωση (upscaling ή ενδιάμεσο στάδιο καλλιέργειας μεταξύ αποθεμάτων και μαζικών ποσοτήτων) των τροχοζώων πραγματοποιείται στα στατικά συστήματα που αποτελούνται από τα κωνικές φιάλες erlenmeyers 500 ml που τοποθετούνται 2 cm από τους λαμπτήρες φθορισμού (5000 lux). Η θερμοκρασία στα erlenmeyers δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 30°C. Τα τροχόζωα αποθηκεύονται σε μια πυκνότητα 50 ατόμων ml⁻¹ και ταΐζονται με 400 ml φρέσκα φύκη (*Chlorella* 1.6 10⁶ κύτταρα ml⁻¹). Περίπου 50 ml των φυκών προστίθενται κάθε ημέρα για παροχή αρκετής τροφής. Μέσα σε 3 ημέρες η συγκέντρωση των τροχοζώων μπορεί να αυξηθεί σε 200 άτομα ml⁻¹ (Εικ. 1.5.). Κατά τη διάρκεια αυτής της μικρής χρονικής περιόδου εκτροφής κανένας αερισμός δεν εφαρμόζεται.

Μόλις τα τροχόζωα φθάσουν σε μια πυκνότητα 200-300 άτομα ml⁻¹ ξεπλένονται σε ένα καταδύόμενο φίλτρο που αποτελείται από 2 επιφάνειες φίλτρων. Το ανώτερο μέγεθος πλέγματος (200 μm) συγκρατεί τα μεγάλα μόρια αποβλήτων, ενώ το χαμηλότερο φίλτρο (50 μm) συλλέγει τα τροχόζωα. Μόνο εάν ατομικοί διηθητήρες είναι διαθέσιμοι αυτός ο χειρισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο χωριστά φίλτρα.

Επιπλέον, εάν το ξέπλυμα εκτελείται κάτω από το νερό τα τροχοζώα δεν θα φράξουν και οι απώλειες θα περιοριστούν σε λιγότερο από 1%.

Τα συγκεντρωμένα τροχοζώα διανέμονται έπειτα σε αρκετές φιάλες των 15 l, όπου γεμίζουν νερό σε μια πυκνότητα 50 ατόμων ml^{-1} και παρέχεται ένας ήπιος αερισμός μέσω σωλήνων. Προκειμένου να αποφευχθεί η μόλυνση με τα βλεφαριδωτά ο αέρας πρέπει να φιλτραρισθεί από ένα ατομικό φίλτρο ασφαλείας ή ενεργά φίλτρα άνθρακα. Τα φρέσκα φύκη (*Chlorella* $1.6 \cdot 10^6$ κύτταρα ml^{-1}) παρέχονται καθημερινά. Κάθε άλλη ημέρα οι καλλιέργειες καθαρίζονται (φιλτράρισμα διπλής-οθόνης) και ξανά-εφοδιάζονται στις πυκνότητες των 200 rotifers ml^{-1} . Μετά από πρόσθεση φυκών για περίπου μια εβδομάδα οι φιάλες των 15 l είναι απολύτως πλήρεις και οι καλλιέργειες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εμβολιασμό των μαζικών καλλιεργειών.

1.5.3.3. Μαζική παραγωγή φυκών

Αναμφισβήτητα, τα θαλάσσια μικροφύκη είναι η καλύτερη διατροφή για τα τροχοζώα και πολύ υψηλές παραγωγές τροχοζώων μπορούν να ληφθούν εάν ικανοποιητικές ποσότητες φυκών είναι διαθέσιμες και ακολουθείται κατάλληλη διαχείριση. Δυστυχώς, στα περισσότερα μέρη δεν είναι δυνατό να αντιμετωπιστεί ο μεγάλος ρυθμός ηθμοφαγίας των τροχοζώων που απαιτούν συνεχείς ανθίσεις φυκών. Εάν οι υποδομές και η εργασία δεν αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες, μια διαδικασία συνεχούς (καθημερινής) συγκομιδής και μεταφοράς στις δεξαμενές μικροφυκών μπορεί να εφαρμοστεί. Στα περισσότερα μέρη, εντούτοις, τα καθαρά φύκη δίνονται μόνο για το ξεκίνημα των καλλιεργειών των τροχοζώων ή τον εμπλουτισμό των τροχοζώων (βλ. 1.5.3.1. και 1.6.1.1.).

Η καλλιέργεια παρτίδων (batch cultivation) είναι πιθανώς η πιο κοινή μέθοδος παραγωγής τροχοζώων στα εκκολαπτήρια θαλασσιών ψαριών. Η στρατηγική καλλιέργειας συνιστάται είτε από τη συντήρηση ενός σταθερού όγκου καλλιέργειας με μια αυξανόμενη πυκνότητα πληθυσμού είτε από τη συντήρηση μιας σταθερής πυκνότητας τροχοζώων με την αύξηση του όγκου καλλιέργειας (βλ. 1.5.3.4.). Εφαρμόζονται εκτενείς τεχνικές καλλιέργειας (χρησιμοποιώντας μεγαλύτερες δεξαμενές από 50 m^3) καθώς επίσης και οι εντατικές μέθοδοι (που χρησιμοποιούν δεξαμενές όγκου 200-2000 l). Και στις δύο περιπτώσεις μεγάλες ποσότητες καλλιεργημένων μικρό-φυκών, συνήθως τα θαλάσσια φύκια *Nannochloropsis*, συνήθως εμβολιάζονται στις δεξαμενές μαζί με έναν αρχικό πληθυσμό εκκίνησης των 50 έως 150 άτομα ml^{-1} .

1.5.3.4. Μαζική παραγωγή με τη χρήση φυκών και μαγιάς

Ανάλογα με τη στρατηγική και την ποιότητα των ανθίσεων των φυκών, η μαγιά αρτοποιίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα. Η ποσότητα της μαγιάς που ταΐζεται σε καθημερινή βάση είναι περίπου 1 g million^{-1} των τροχοζώων, αν και αυτός ο αριθμός ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο (S, L) των τροχοζώων και τις συνθήκες καλλιέργειας. Δεδομένου ότι τα φύκη έχουν μια υψηλή θρεπτική αξία, άριστη πλευστότητα και δεν μολύνουν το νερό, χρησιμοποιούνται όσο το δυνατόν περισσότερο, όχι μόνο ως τροφή των τροχοζώων, αλλά και ως βελτιωτικό νερού και βακτηριοστατικός παράγοντας.

Σε αντίθεση με τα περισσότερα ευρωπαϊκά συστήματα εκτροφής, οι Ιάπωνες ανέπτυξαν μεγάλα συστήματα καλλιέργειας των 10 έως 200 μετρικούς τόνους. Η αρχική πυκνότητα αποθεματοποίησης είναι σχετικά υψηλή (80-200 άτομα ml^{-1}) και μεγάλες ποσότητες τροχοζώων ($2-6 \cdot 10^9$) παράγονται καθημερινά με προσθήκη φυκών

(4-40 m³) και μαγιάς (1-6 Kg).

Η μαζική παραγωγή με φύκη και μαγιά εφαρμόζεται σε μια παρτίδα ή ένα ημισυνεχές σύστημα καλλιέργειας. Διάφορες αλλαγές και στα δύο συστήματα έχουν αναπτυχθεί, και ένα παράδειγμα του πρότυπου εκτροφής που χρησιμοποιούνται στο Oceanic Institute στη Χαβάη περιγράφονται:

- Σύστημα καλλιέργειας παρτίδων

Οι δεξαμενές (200 l χωρητικότητας) γεμίζουν κατά το ήμισυ με τα φύκη σε μια πυκνότητα 13-14 10⁶ κύτταρα ml⁻¹ και εμβολιάζονται με τροχόζωα σε μια πυκνότητα 100 άτομα ml⁻¹. Η αλατότητα του νερού είναι 23 ppt και η θερμοκρασία διατηρείται στους 30°C. Την πρώτη ημέρα μαγιά προστίθεται δύο φορές ημερησίως σε μια ποσότητα 0.25 g/10⁻⁶ τροχόζωα. Την επόμενη ημέρα οι δεξαμενές γεμίζουν εντελώς με τα φύκη στην ίδια πυκνότητα και 0.375 g μαγιάς ανά εκατομμύριο τροχοζώων προστίθεται δύο φορές την ημέρα. Την επόμενη ημέρα τα τροχόζωα συλλέγονται και νέες δεξαμενές εμβολιάζονται (δηλ. σύστημα καλλιέργειας παρτίδων δυο ημερών).

- Ημισυνεχής καλλιέργεια

Σε αυτήν την τεχνική καλλιέργειας τα τροχόζωα φυλάσσονται στην ίδια δεξαμενή για πέντε ημέρες. Κατά τη διάρκεια των πρώτων δύο ημερών ο όγκος καλλιέργειας διπλασιάζεται κάθε ημέρα για να αραιώσει η πυκνότητα των τροχοζώων στο μισό. Κατά τη διάρκεια των επόμενων ημερών, ο μισός όγκος δεξαμενών συλλέγεται και ξαναγεμίζει πάλι για να μειώσει την πυκνότητα στο μισό. Την πέμπτη ημέρα η δεξαμενή συλλέγεται και η διαδικασία αρχίζει ξανά (δηλ. πέντε ημερών ημισυνεχές σύστημα καλλιέργειας).

Η θρεπτική σύσταση των τροχοζώων που τρέφονται με φύκη δεν συναντά αυτόματα τις απαιτήσεις πολλών θηρευτών ψαριών και απαιτείται μερικές φορές ένα πρόσθετο βήμα εμπλουτισμού για τον εμπλουτισμό των τροχοζώων με τα πρόσθετα θρεπτικά συστατικά όπως λιπαρά οξέα, βιταμίνες ή πρωτεΐνες (βλ. 1.6.). Επίσης, η προσθήκη των βιταμινών και συγκεκριμένα η βιταμίνη B₁₂, έχουν αναφερθεί ως ουσιαστικές για την καλλιέργεια των τροχοζώων (Yu *et al.*, 1989).

1.5.3.5. Μαζική καλλιέργεια με μαγιά

Η μαγιά αρτοποιίας αποτελείται από σωματίδια μικρού μεγέθους (5-7 μm) και μια υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και είναι μια αποδεκτή διατροφή για τα *Brachionus*. Οι πρώτες δοκιμές για την αντικατάσταση της φυσικής τροφής των τροχοζώων από τη μαγιά αρτοποιίας χαρακτηρίστηκαν από ποικιλία επιτυχιών και περιστατικά ξαφνικών καταρρεύσεων καλλιεργειών (Hirayama, 1987). Πιθανότατα ο λόγος για αυτές τις καταρρεύσεις να ήταν η φτωχή πεπτικότητα της μαγιάς, η οποία απαιτεί την παρουσία βακτηρίων για την πέψη. Επιπλέον, η μαγιά πρέπει συνήθως να συμπληρωθεί με τα ουσιαστικά λιπαρά οξέα και τις βιταμίνες για να ικανοποιήσει τις νυμφικές απαιτήσεις των θηρευτών. Τα εμπορικά ενισχυτικά, αλλά και τα σπιτικά γαλακτώματα (γαλακτώματα ιχθυελαίων με εμπορικούς γαλακτωματοποιητές ή με εμβρυακή λεκιθίνη), μπορούν να προστεθούν στη μαγιά ή άμεσα στη δεξαμενή τροχοζώων (βλ. 1.6.1.3.). Η μεγαλύτερη επιτυχία λήφθηκε με τα αποκαλούμενα ω-μαγιά-ταϊσμένα τροχόζωα (τροχόζωα που ταΐζονται με μαγιά που ενισχύεται με την

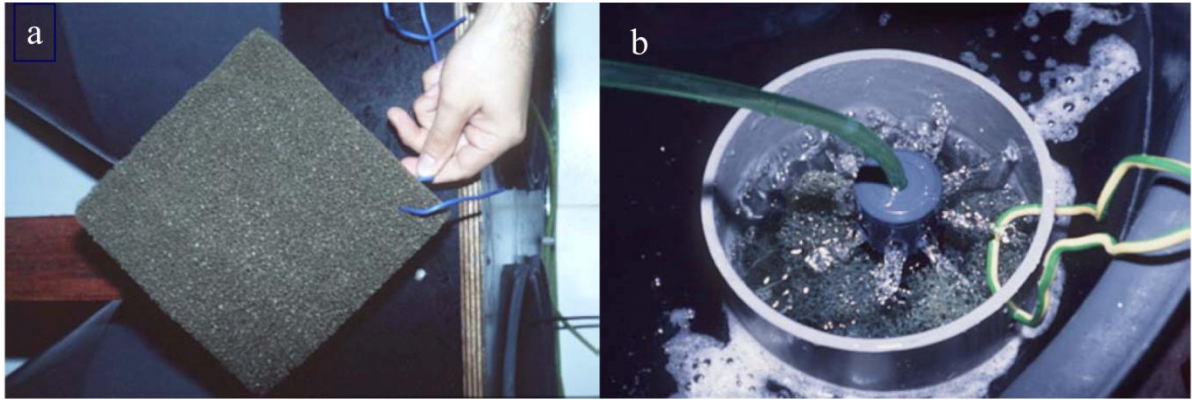
προσθήκη λαδιού συκωτιού σουπιάς σε ποσοστό 15% του μέσου καλλιέργειας της μαγιάς) που εξασφάλισαν ένα υψηλό επίπεδο (n-3) βασικών λιπαρών οξέων στα τροχόζωα (Watanabe *et al.*, 1983). Η ανάγκη θρεπτικής ενίσχυσης της σύστασης των τροφών των τροχοζώων ή του μέσου καλλιέργειας των τροχοζώων επιβεβαιώθηκε αργότερα με τη χρήση μικρό-σωματιδίων (microparticulate) και γαλακτωματοποιημένων μορφών (Watanabe *et al.*, 1983; Léger *et al.*, 1989). Εκτός από τη φρέσκια μαγιά αρτοποιίας η στιγμιαία μαγιά αρτοποιίας, η θαλάσσια μαγιά (*Candida*) ή η μαγιά ζαχαροπλαστικής (*Rhodotorula*) μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν.

1.5.3.6. Μαζική καλλιέργεια σε προκατασκευασμένες τροφές

Η πολύ συχνά χρησιμοποιημένη προκατασκευασμένη τροφή τροχοζώων στην καλλιέργεια τους στην Ευρώπη είναι το Culture Selco (CS) διαθέσιμο σε ξηρή μορφή. Έχει εφαρμοστεί ως πλήρες υποκατάστατο για ζωντανά μικροφύκη και εγγύεται συγχρόνως την ενσωμάτωση υψηλών επιπέδων EFA και βιταμινών στα τροχόζωα. Η βιοχημική σύνθεση της τεχνητής τροφής Culture Selco αποτελείται από 45% πρωτεΐνες, 30% υδατάνθρακες, 15% λιπίδια (33% των οποίων είναι (n-3) HUFA), και 7% τέφρα. Τα φυσικά χαρακτηριστικά του είναι βέλτιστα για τη λήψη από τα τροχόζωα: διαθέτει μόρια μεγέθους 7 μm , έχει ισχυρή ιδιότητα αιώρησης στην υδάτινη στήλη σε σχετικά ισχυρό αερισμό και δεν διαλύεται. Εντούτοις, το Culture Selco πρέπει να διαλυθεί στο νερό πριν από τη σίτιση, που διευκολύνει από τη μια πλευρά τις δυνατότητες για την αυτόματη σίτιση αλλά αφ' ετέρου απαιτεί τη χρήση αερισμού και κρύας αποθήκευσης. Η ακόλουθη τυποποιημένη διαδικασία καλλιέργειας έχει αναπτυχθεί και έχει δοκιμαστεί σε διάφορα στελέχη τροχοζώων σε δεξαμενές των 100 l.

Κύλινδρο-κωνικές δεξαμενές των 100 l με σκοτεινά λεία τοιχώματα (πολυαιθυλένιο) στήνονται σε σκιασμένες συνθήκες. Το μέσο καλλιέργειας αποτελείται από το αραιωμένο θαλασσινό νερό 25 ppt που φυλάσσεται στους 25°C. Καμία ανανέωση νερού δεν πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια των τεσσάρων ημερών καλλιεργητικής περιόδου. Οι πέτρες αέρα εγκαθίστανται μερικά cm επάνω από το κατώτατο σημείο του κώνου των δεξαμενών για να επιτρέψουν την ιζηματοποίηση και τη δυνατότητα απομάκρυνσης των αποβλήτων με "flushing". Τα ελαφρά υπολείμματα των τροφών παγιδεύονται σε κομμάτια υφάσματος που κρεμιούνται στην υδάτινη στήλη (Εικ. 1.6a.), ή σε μια παγίδα αέρα-νερού που φιλτράρει με σφουγγάρια (Εικ. 1.6b.).

Επιπλέον, καταβάλλονται προσπάθειες για τη διατήρηση μιας υψηλής ποιότητας νερού με ελάχιστες συσσωρεύσεις υπολειμμάτων τροφής διασφαλίζοντας σύντομους χρόνους κατακράτησης μορίων τροφής. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση υψηλών αρχικών πυκνοτήτων 200 τροχόζωα ml^{-1} και τη διανομή μικρών ποσοτήτων τροφής σε ωριαία διαστήματα, όπου τα τελευταία μπορούν εύκολα να αυτοματοποιηθούν με την άντληση του διαλύματος τροφής σε ένα ήπια αερισμένο απόθεμα που φυλάσσεται σε ένα ψυγείο στους 4°C μέχρι και για 30 ώρες (Εικ. 1.7.). Εφαρμόζοντας αυτήν την στρατηγική σίτισης, ένα βελτιστοποιημένο καθεστώς σίτισης αναπτύσσεται σύμφωνα με την πυκνότητα των τροχοζώων και την απόδοση της καλλιέργειας (Πίνακας 1.2.). Πρέπει να αναφερθεί ότι αυτό το πρωτόκολλο αναπτύσσεται σε τροχόζωα L-τύπου και πρέπει να προσαρμοστεί ελαφρώς (λιγότερο τάισμα) όταν χρησιμοποιούνται S-τύπου τροχόζωα.



Εικ. 1.6. Κομμάτι από ύφασμα (a) αέρα-νερό γεμάτα με σπόγγους (b) για τον εγκλωβισμό ακαθαρσιών στη δεξαμενή τροχοζώων.

Fig. 1.6. Piece of cloth (a) and air-water-lift filled with sponges (b) to trap the floccules in the rotifer tank.

Πίνακας 1.2. Σχήμα τσίματος για βέλτιστη καλλιέργεια τροχοζώων σε σχέση με την πυκνότητα των τροχοζώων χρησιμοποιώντας προκατασκευασμένη τροφή Culture Selco.

Table 1.2. Feeding regime for optimal rotifer culture in function of the rotifer density using the formulated diet Culture Selco.

Rotifer density.ml ⁻¹ (L-strain)	Culture Selco® per 10 ⁶ rotifers.day ⁻¹ (in g)	Culture Selco® per m ³ .day ⁻¹ (in g)
100 - 150	0.53	53 - 80
150 - 200	0.47	70 - 93
200 - 250	0.40	80 - 100
250 - 300	0.37	92 - 110
300 - 350	0.33	100 - 117
350 - 400	0.30	105 - 120
400 - 450	0.27	107 - 120
450 - 500	0.23	105 - 117
> 500	0.25	125
> 1200	0.20	240

Εφαρμόζοντας αυτήν την τυποποιημένη στρατηγική καλλιέργειας ένας διπλασιασμός του πληθυσμού επιτυγχάνεται κάθε δύο ημέρες, που φθάνουν σε μια πυκνότητα 600 τροχόζωα ml^{-1} μετά από τέσσερις ημέρες μόνο (Πίνακας 1.3.), η οποία είναι καλύτερη απ' ό τι η παραδοσιακή τεχνική που χρησιμοποιεί ζωντανά φύκη (και τη μαγιά αρτοποιίας). Δεν υπάρχει καμία υψηλή διακύμανση στα χαρακτηριστικά παραγωγής μεταξύ των διάφορων δοκιμών καλλιέργειας και πληθυσμιακές καταρρεύσεις παρατηρούνται σπάνια λόγω πιθανότατα της μη-εισαγωγής των μικροβιακών μολυσματικών παραγόντων και της γενικά υψηλής ποιότητας του νερού κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Από αυτή την άποψη, πρέπει να υπογραμμιστεί ότι, υγιεινές προφυλάξεις πρέπει να ληφθούν για να αποφύγουμε τις επαφές μεταξύ των διαφορετικών μονάδων εκτροφής. Όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της παραγωγής (όπως γυάλινα είδη) μπορούν να απολυμανθούν με λουτρά νερού με NaOCl , HCL ή άλλα απολυμαντικά. Μετά από κάθε κύκλο παραγωγής (4 ημέρες) οι δεξαμενές, οι πέτρες αέρος και οι σωλήνες πρέπει να απολυμανθούν λεπτομερώς. Προκειμένου να αποφευχθούν οι πληθυσμιακές κατακρημνίσεις συστήνεται μετά από περίπου έναν μήνα καλλιέργειας το πλήρες σύστημα να απολυμαίνεται και οι καλλιέργειες να ξανά-ξεκινήσουν χρησιμοποιώντας τροχόζωα από τις αρχικές καλλιέργειες.



Εικ. 1.7. Ψύκτης αναστολής διανομής τροφής στις ατομικές δεξαμενές τροχόζωων με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας.

Fig. 1.7. Refrigerated feed suspension distributed to the individual rotifer tanks by means of a peristaltic pump.

Πίν. 1.3. Χαρακτηριστικά αύξησης και αναπαραγωγής των τροχόζωων καλλιεργημένα σε CS κάτω

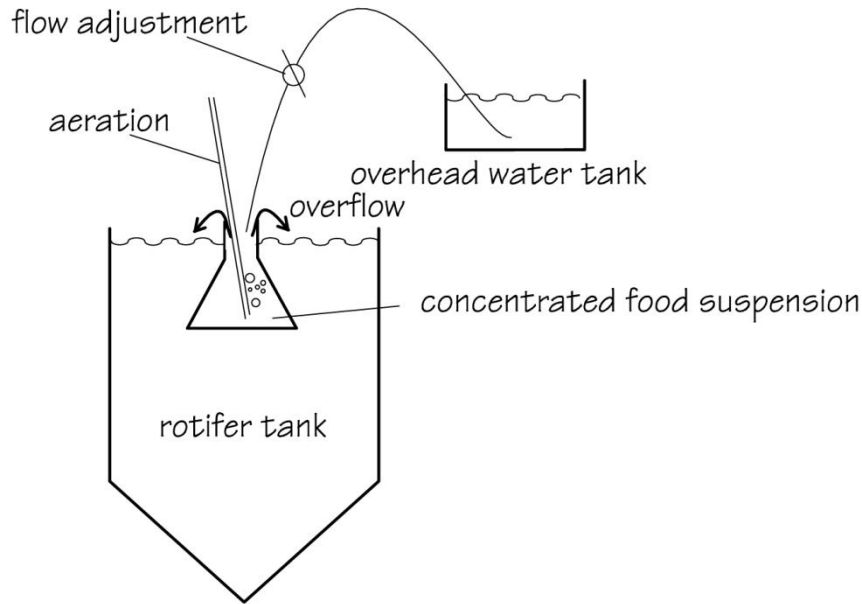
από πειραματικές αναβαθμισμένες συνθήκες.

Table 1.3. Growth and reproduction characteristics of the rotifers reared on CS under experimental and upscaled conditions.

Experimental	Batch 1	Batch 2	Batch 3
Age of the population	Number of rotifers per ml		
Day 1	200	200	200
Day 2	261 ± 13	327 ± 17	280 ± 12
Day 3	444 ± 65	473 ± 42	497 ± 25
Day 4	581 ± 59	687 ± 44	681 ± 37
Growth rate.day ⁻¹	0.267	0.308	0.306
Doubling time	2.60	2.25	2.27
Commercial	Batch 1		
Age of the population	Number of rotifers per ml		
Day 1	200		
Day 2	285		
Day 3	505		
Day 4	571		
Day 5	620		

Στα εμπορικά εκκολαπτήρια, οι περισταλτικές αντλίες δεν είναι πάντα διαθέσιμες. Σε αυτήν την περίπτωση η τεχνητή διατροφή μπορεί να ταϊστεί σε καθημερινή βάση με μια συγκέντρωση 400-600 mg/10⁻⁶ τροχόζωα, και να κατανεμηθεί σε 4 έως 6 δόσεις με μια ελάχιστη ποσότητα 50 - 100 mg l⁻¹ μέσου καλλιέργειας. Ανάλογα αποτελέσματα παραγωγής επιτυγχάνονται στις ενδιάμεσες συνθήκες καλλιέργειας σε εμπορικά εκκολαπτήρια (Πίνακας 1.3.).

Προκειμένου να αποφευχθούν χειρωνακτικά ταΐσματα ανά ημέρα, μια απλή τεχνική στάλαξης-σίτισης μπορεί να χρησιμοποιηθεί όπως διευκρινίζεται στην Εικ 1.8. Ένα συγκεντρωμένο διάλυμα τροφών τοποθετείται στη δεξαμενή και νερό στάζει στο παραπάνω διάλυμα που βαθμιαία αραιώνεται και επιτρέπει την υπερχειλίση των τροχοζώων στη δεξαμενή των θηρευτών. Δεδομένου ότι η υπερυψωμένη δεξαμενή περιέχει μόνο νερό, το ποσοστό ροής μπορεί να ρυθμιστεί χωρίς κίνδυνο φραξίματος. Οι διαστάσεις της δεξαμενής πρέπει να ρυθμιστούν έτσι ώστε το πλήρες περιεχόμενο της δεξαμενής τροφών να αραιώνεται σε 24 ώρες.



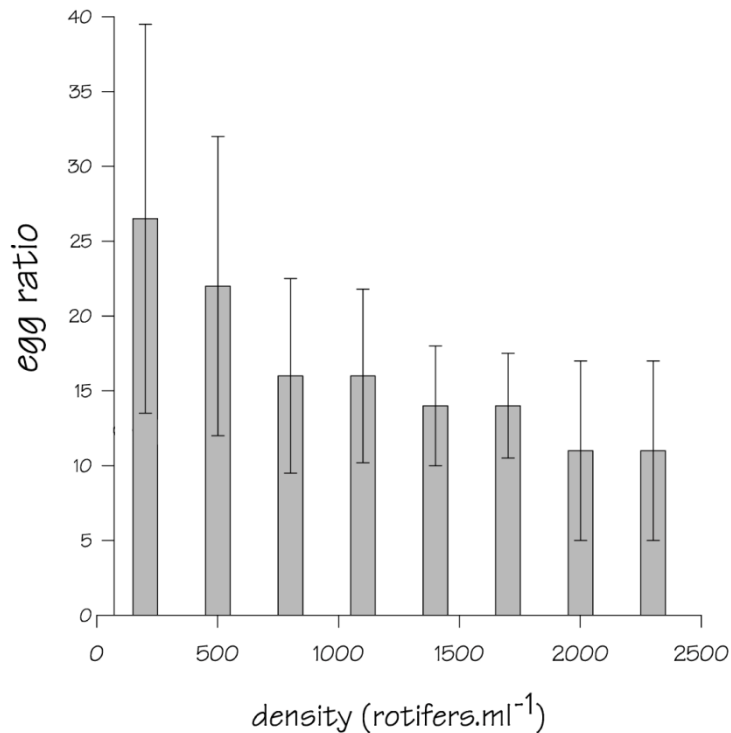
Εικ. 1.8. Σχέδιο της τεχνικής ταΐσματος με σταγόνες η οποία μπορεί να εφαρμοστεί όταν δεν διατίθεται υποστήριξη με άντληση.

Fig. 1.8. Illustration of the drip-feeding technique which can be applied when no sophisticated pumping devices are available.

1.5.3.7. Εκτροφή υψηλής πυκνότητας

Αν και η εκτροφή υψηλής πυκνότητας τροχοζώων αυξάνει τον κίνδυνο για περισσότερες αγχωτικές συνθήκες εκτροφής και έναν αυξανόμενο κίνδυνο μειωμένων ποσοστών αύξησης λόγω της έναρξης της σεξουαλικής αναπαραγωγής, ελπιδοφόρα αποτελέσματα έχουν επιτευχθεί στις ελεγχόμενες καλλιέργειες. Η τεχνική είναι η ίδια με αυτήν που χρησιμοποιείται για τη μαζική εκτροφή με Culture Selco αλλά μετά από κάθε κύκλο 4 ημερών η πυκνότητα των τροχοζώων δεν ξανάπροσαρμόζεται. Το σχήμα σίτισης προσαρμόζεται σε 0.25-0.3 g/10⁶ τροχόζωα για πυκνότητες μεταξύ 500 και 1500 τροχόζωα ml⁻¹ και σε 0.2 g για πυκνότητες άνω των 1500 τροχοζώων ml⁻¹. Η εκτροφή τροχοζώων σε υψηλές πυκνότητες έχει έναν άμεσο αντίκτυπο στην αναλογία των αυγών (Εικ. 1.9.). Αυτό το τελευταίο μειώνεται κατά μέσο όρο 30% σε μια πυκνότητα 150 τροχόζωα ml⁻¹ σε 10% σε μια πυκνότητα 2000 τροχόζωα ml⁻¹ και λιγότερο από 5% σε πυκνότητες των 5000 τροχόζωα ml⁻¹. Η διατήρηση των καλλιεργειών με αυτήν την χαμηλή αναλογία αυγών είναι πιο επικίνδυνη και έτσι το σύστημα πρέπει μόνο να χρησιμοποιηθεί υπό καλά ελεγχόμενες συνθήκες.

Η καλλιέργεια υψηλής πυκνότητας των *Brachionus* έχει επίσης εκτελεστεί στην Ιαπωνία. Σε αυτήν την τεχνική το *Nannochloropsis* έχει συμπληρωθεί με πάστα *Chlorella* γλυκού νερού, μαγιά αρτοποιίας και μαγιά που περιέχει ιχθυέλαιο. Η *Chlorella* του γλυκού νερού χρησιμοποιείται για τη συμπλήρωση βιταμινών B₁₂ (± 12 mg l⁻¹ σε μια συγκέντρωση κυττάρων της τάξης των 1.5 10¹⁰ κύτταρα ml⁻¹). Στις συνεχείς καλλιέργειες ο πληθυσμός των τροχοζώων διπλασιάζεται κάθε ημέρα. Η μισή καλλιέργεια αφαιρείται καθημερινά και αντικαθίσταται από νερό. Χρησιμοποιώντας μέσες πυκνότητες 1000 τροχόζωα ml⁻¹ το σύστημα παράγει περισσότερο από 3000 τροχόζωα ml⁻¹.



Εικ. 1.9. Επίδραση της καλλιέργειας υψηλής πυκνότητας τροχοζώων στο ποσοστό αυγών.
Fig. 1.9 Effect of high density rotifer culture on egg ratio.

1.5.4. Συγκομιδή/συγκέντρωση των τροχοζώων

Η μικρής κλίμακας συγκομιδή των τροχοζώων εκτελείται συνήθως με αναρρόφηση του περιεχομένου της δεξαμενής καλλιέργειας σε καλάθια φίλτρων με ένα μέγεθος πλέγματος 50-70 μm . Εάν αυτό δεν εκτελείται με τα καταδύόμενα φίλτρα τα τροχοζώα μπορεί να καταστραφούν με αποτέλεσμα την εμφάνιση θνησιμότητας. Επομένως, συστήνεται η συγκομιδή των τροχοζώων κάτω από το νερό (Εικ. 1.10.). Ο αερισμός κατά τη διάρκεια της συγκέντρωσης των τροχοζώων δεν θα βλάψει τα ζώα, αλλά δεν πρέπει να είναι πάρα πολύ ισχυρός ώστε να αποφευχθεί η απόφραξη του φίλτρου από τα τροχοζώα, διότι αυτό μπορεί να είναι πολύ κρίσιμο, ειδικά μετά τον εμπλουτισμό (βλ. 1.6.4.).

1.6. Θρεπτική αξία των καλλιεργούμενων τροχοζώων

1.6.1. Τεχνικές για εμπλουτισμό (n-3) HUFA

1.6.1.1. Φύκη

Το υψηλό περιεχόμενο του βασικού εικοσαπεντανοϊκού λιπαρού οξέος (eicosapentaenoic) (EPA 20:5n-3) και του δεκοσαεξαενοϊκού οξέος (docosahexaenoic) (DHA 22:6n-3) σε μερικά μικροφύκη (π.χ. 20:5n-3 στο *Nannochloropsis oculata* και 22:6n-3 στο *Isochrysis galbana*) τα έχει καταστήσει άριστες ζωντανές διατροφές για την άνοδο της περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέα στα τροχοζώα. Τα τροχοζώα που καταδύονται σε αυτά τα φύκη (περίπου $5 \cdot 10^6$ φύκη ml^{-1})

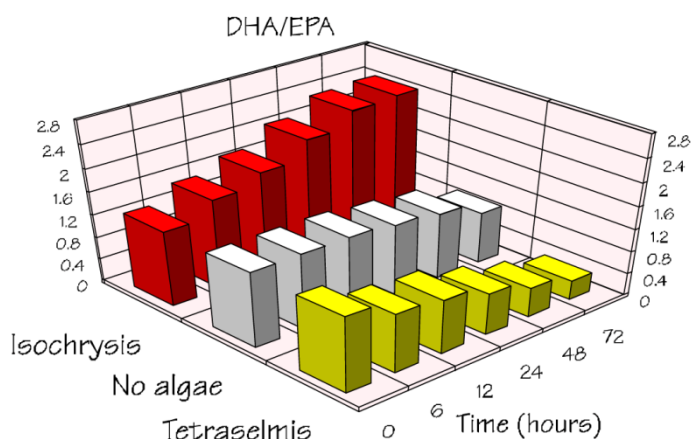
ενσωματώνουν τα βασικά λιπαρά οξέα σε μερικές ώρες και έρχονται σε μια ισορροπία με ένα επίπεδο DHA/EPA πάνω από 2 για τροχόζωα καταδεδυμένα σε *Isochrysis* και κάτω από 0.5 για *Tetraselmis* (Εικ. 1.11.).



Εικ. 1.10. Πλάγια και κάθετη όψη συλλέκτη αποτελούμενο από φίλτρο με δίχτυ μεγέθους πόρων 50 μm εφοδιασμένου με κολάρο αερισμού στον πυθμένα του.

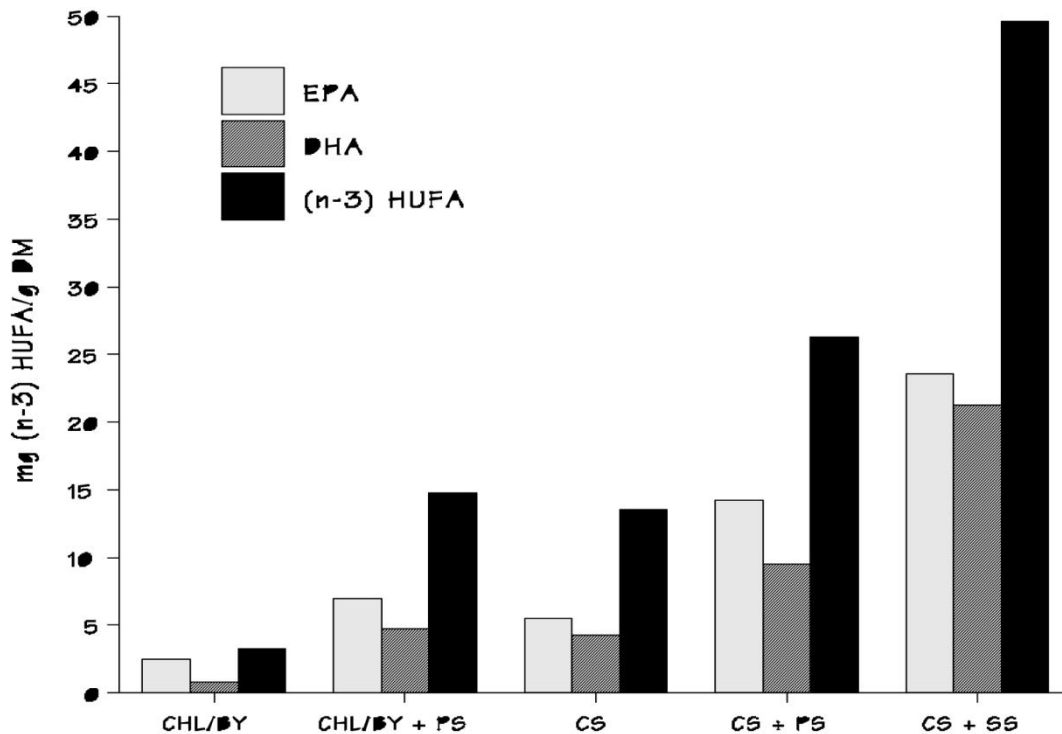
Fig. 1.10. Side and upper view of a concentrator rinser containing a filter with a mesh size of 50 μm and equipped with an aeration collar at the bottom.

Εντούτοις, η καλλιέργεια μικροφυκών ως μόνη διατροφή για τη σίτιση των τροχόζωων είναι δαπανηρή λόγω της εργασίας εντατικού χαρακτήρα της παραγωγής των μικροφυκών. Τις περισσότερες φορές τα τροχόζωα ωθούνται στα γαλακτώματα ελαίου (βλ. 1.6.1.3.) και δίνονται ως τροφή στους θηρευτές που καλλιεργούνται σε "πράσινα νερά". Αυτό τα "πράσινα νερά" που αποτελούνται από $\pm 0.2 \cdot 10^6$ κύτταρα φυκών ml^{-1} (*Tetraselmis*, *Nannochloropsis*, ή *Isochrysis*) εφαρμόζονται για να διατηρήσει ένα κατάλληλο HUFA (αλλά και άλλα συστατικά) περιεχόμενο στο ζωντανό θήραμα προτού να ληφθούν τελικά από το θηρευτή (βλ. 1.5.3.)



Εικ. 1.11. Αλλαγές του λόγου DHA/EPA των τροχόζωων με διάφορα φυκών μέσα.

Fig. 1.11. Changes in DHA/EPA ratio of rotifers in different algal media.



Εικ. 1.12. Επίπεδα των HUFA για διάφορες παραγωγές τροχοζώων. (CHL: *Chlorella sp.*; BY: Μαγιά αρτοποιίας; PS: Protein Selco; CS: Culture Selco; SS: Super Selco).

Fig. 1.12. HUFA levels for various rotifer productions (CHL: *Chlorella sp.*; BY: Baker's yeast; PS: Protein Selco; CS: Culture Selco; SS: Super Selco).

1.6.1.2. Προκατασκευασμένες ή φορμαρισμένες τροφές

Τα τροχοζώα που καλλιεργούνται με CS έχουν ήδη μια άριστη σύνθεση HUFA: 5.4, 4.4 και 15.6 mg g⁻¹ ξερής ουσίας EPA, DHA και (n-3) HUFA αντίστοιχα (Εικ. 1.12.), που είναι σημαντικά υψηλότερη από τις καλλιέργειες που αναπτύσσονται στα φύκη/μαγιά αρτοποιίας αλλά συγκρίσιμα με την περίπτωση οι τελευταίες καλλιέργειες υποβάλλονται σε μια πρόσθετη επεξεργασία εμπλουτισμού (Léger *et al.*, 1989). Το επίπεδο των συνολικών λιπιδίων είναι περίπου 18%. Δεδομένου ότι η χρήση CS επιτρέπει τον άμεσο εμπλουτισμό τροχοζώων χωρίς την ανάγκη για επεξεργασία βίο-εγκλεισμού και συμπληρωματικές διατροφές όπως Protein Selco (PS) και DHA Culture Selco (DHA-CS) έχει αναπτυχθεί προκειμένου να ενσωματωθούν πιο υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης και DHA (Πίνακας 1.4.). Τα πλεονεκτήματα του άμεσου (ή μακροπρόθεσμου) εμπλουτισμού είναι πολλαπλά. Αυτό το προφίλ λιπαρού οξέος που αποκτήθηκε είναι σταθερό και αναπαραγωγικό. Η περιεκτικότητα σε λιπίδια είναι συγκρίσιμη με αυτήν που λαμβάνεται στο άγριο ζωοπλαγκτόν και οι απώλειες των τροχοζώων είναι χαμηλότερες με τις δαπάνες εργασίας να μπορούν να μειωθούν.

Εντούτοις, για μερικές νέμφες θαλάσσιων ψαριών που απαιτούν ακόμα πιο υψηλά (n-3) επίπεδα HUFA ένας πρόσθετος εμπλουτισμός με τους ενισχυτές μπορεί να είναι απαραίτητος (Πίνακας 1.4.).

Πίνακας 1.4. Χαρακτηριστικά μερικών τροφών και γαλακτωμάτων που περιέχουν υψηλά επίπεδα DHA (σε mg g⁻¹ DW).

Table 1.4. Characteristics of some diets and emulsions containing high DHA levels (in mg g⁻¹ DW).

Diets	EPA	DHA	DHA/EPA	Σ(n-3)HUFA > 20:3n-3
CS	18.9	15.3	0.8	36.4
DHA-CS	16.9	26.7	1.6	45.4
DHA-PS	24.4	70.6	2.9	99.3
Emulsions				
DHA7	67.2	452.3	6.7	550.6
DHA20	0.8	15.6	19.5	16.4

1.6.1.3. Γαλακτώματα ελαίου

Ένας από τους φτηνότερους τρόπους να εμπλουτιστούν τα τροχόζωα είναι με τη χρησιμοποίηση των γαλακτωμάτων ελαίου. Αν και τα σπιτικά γαλακτώματα μπορούν να προετοιμαστούν με λεκιθίνη αυγών και ιχθυέλαια (Watanabe *et al.*, 1982) τα εμπορικά γαλακτώματα είναι γενικά σταθερότερα και έχουν μια προεπιλεγμένη σύνθεση HUFA.

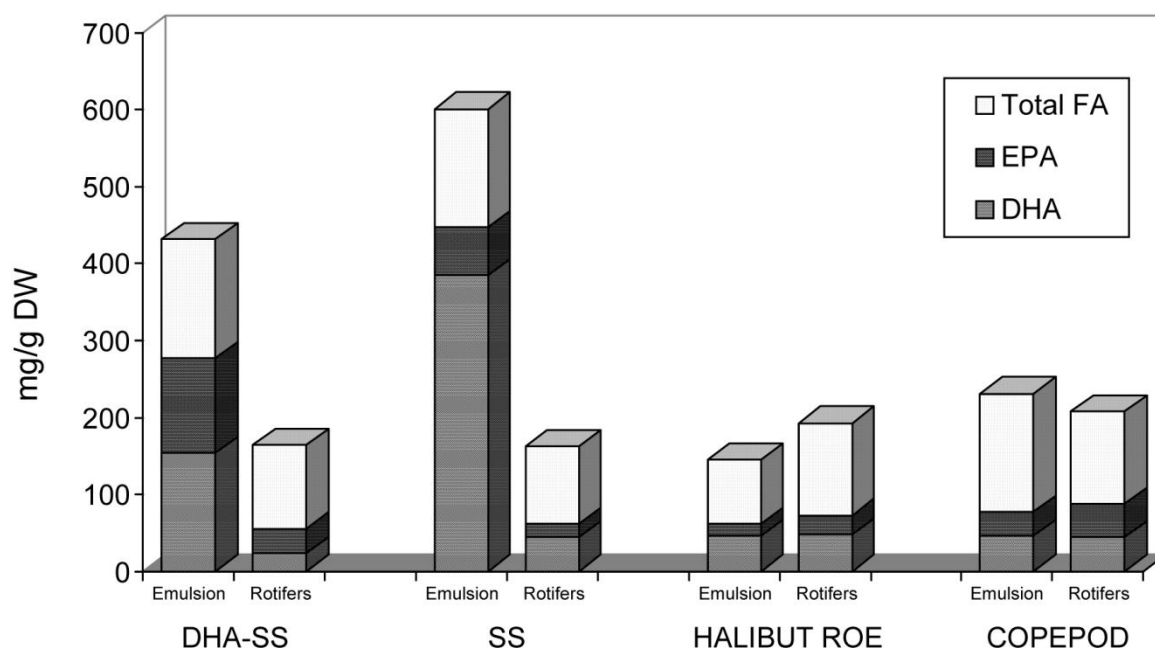
• Σπιτικά γαλακτώματα

Τα πρώτα γαλακτώματα έγιναν από (n-3) ενισχυμένα ιχθυέλαια HUFA (δηλ. από έλαιο σουπιών, έλαιο συκατιού μπακαλιάρου, κ.α.) γαλακτωματοποιημένων με λέκιθο αυγών και θαλασσινό νερό (Watanabe *et al.*, 1982, 1983). Πρόσφατα, περισσότερο ενισχυμένα έλαια που περιέχουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα βασικών λιπαρών οξέων 20:5n-3 και 22:6n-3 έχουν χρησιμοποιηθεί. Δεδομένου ότι η σταθερότητα και η δυνατότητα αποθήκευσης αυτών των προϊόντων είναι σχετικά χαμηλές γίνονται συνήθως επί τόπου και χρησιμοποιούνται αμέσως.

Για πολύ συγκεκριμένες εφαρμογές, ή όταν οι απαιτήσεις των ψαριών δεν καλύπτονται με τα εμπορικά γαλακτώματα, αυτή η τεχνική μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να ενσωματώσει τα εκχυλίσματα των λιπιδίων από το ζωοπλαγκτόν, τα ψάρια, τα αυγοτάραχα ψαριών, ή άλλες πηγές. Μια σύγκριση δύο εμπορικών προκατασκευασμένων (Super Selco και DHA-Super Selco) και δύο σπιτικών γαλακτωματοποιημένων εμπλουτιστικών δίνονται στις Εικόνες 1.13. και 1.14.

• Εμπορικά γαλακτώματα

Διάφορες γαλακτωματοποιημένες διατροφές είναι διαθέσιμες στο εμπόριο και βασισμένες στις καθορισμένες με σαφήνεια διατυπώσεις. Πολύ δημοφιλείς είναι οι αυτό-γαλακτωποιημένες συμπυκνώσεις (Selco, Inve Aquaculture NV, Βέλγιο) που μπορούν να ενισχύσουν τη συγκέντρωση HUFA των τροχόζωων σε μερικές ώρες. Σε αυτήν την τεχνική ένα διάλυμα τροχόζωων που περιέχει 200-300 άτομα ml⁻¹ βυθίζεται σε ένα αραιωμένο γαλάκτωμα λαδιού για 6 ώρες, συλλέγεται, ξεπλένεται και συγκεντρώνεται πριν ταϊστεί στους θηρευτές.



Εικ. 1.13. EPA, DHA και ολικά λιπαρά οξέα που περιέχονται σε δυο εμπορικά γαλακτώματα (DHA Super Selco, DHA-SS and Super Selco, SS) και σε εμπλουτισμένα τροχόζωα; Γαλάκτωμα φτιαγμένο με αυγοτάραχο από halibut και εκχύλισμα κωπηλόδων (από τους Reitan et al., 1994).

Fig. 1.13. EPA, DHA and total fatty acid content in two commercial emulsions (DHA Super Selco, DHA-SS and Super Selco, SS) and in the enriched rotifers; emulsion made up with halibut roe and copepod extracts, and in the enriched rotifers (modified from Reitan et al., 1994).

Πίνακας 1.5. Συγκέντρωση λιπαρών οξέων στα εμπλουτισμένα τροχόζωα (σε mg g⁻¹ DW).

Table 1.5. Fatty acid concentration in enriched rotifers (in mg g⁻¹ DW).

Type of enrichment	EPA	DHA	DHA/EPA	(n-3) HUFA
CS	5.4	4.4	0.8	15.6
<i>Nannochloropsis</i> sp.	7.3	2.2	0.3	11.4
DHA-Super Selco	41.4	68.0	1.6	116.8
	40.6*	73.0*	1.8*	123.1*
	43.1**	46.0**	1.1**	95.0**

* Concentration after 7 h storage at 20°C

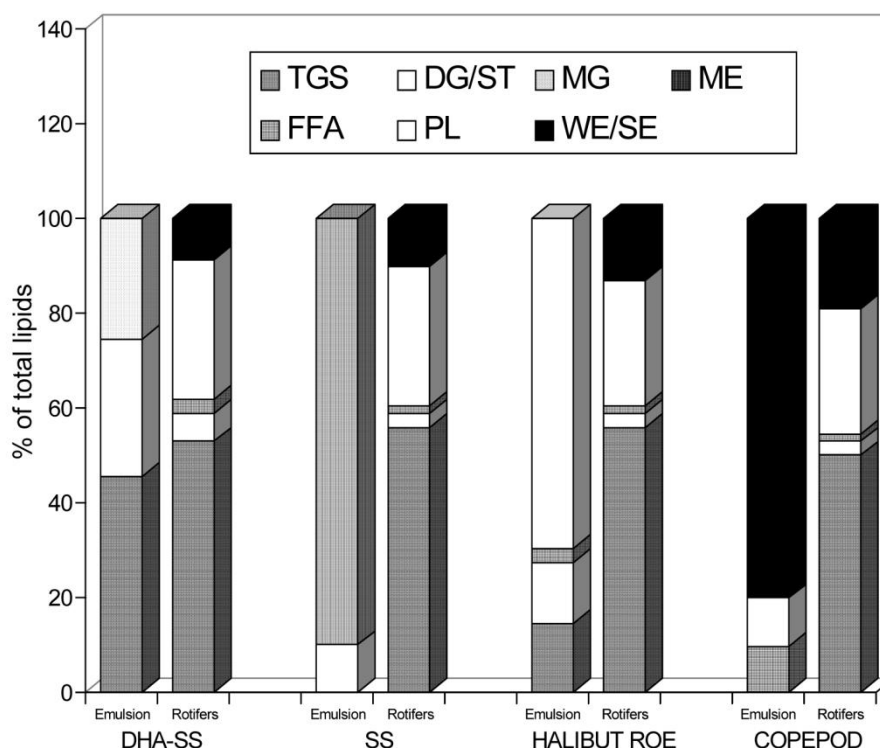
** Concentration after 12 h storage at 20°C

Λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία του DHA στη θαλάσσια καλλιέργεια νυμφών, ιδιαίτερες προσπάθειες έχουν καταβληθεί πρόσφατα να ενσωματώσουν τα υψηλά επίπεδα DHA ή και τις υψηλές αναλογίες DHA/EPA στα τροχόζωα. Μέχρι σήμερα τα καλύτερα αποτελέσματα έχουν επιτευχθεί χρησιμοποιώντας το DHA-Super Selco. Έναντι των αποτελεσμάτων που επιτυγχάνονται με το Super Selco, η ώθηση των CS-τροχοζώων με αυτό το προϊόν κάτω από τις τυποποιημένες πρακτικές εμπλουτισμού οδηγεί σε μια τριπλάσια αύξηση DHA και των βασικών (n-3) HUFA.

Επιπλέον, η εξέλιξη των συγκεντρώσεων του EFA μέσα στα εμπλουτισμένα τροχόζωα έχει ερευνηθεί μετά από τη χορήγηση στις δεξαμενές θηρευτών. Τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι τα επίπεδα EFA παραμένουν σταθερά για

τουλάχιστον 7 ώρες κάτω από καθαρό νερό στις συνθήκες καλλιέργειας στους 20°C με μόνο μια πτώση 30% σε DHA που σημειώνεται μετά από 12 ώρες (Πίνακας 1.5.). Τα περισσότερα εμπορικά γαλακτώματα είναι πλούσια σε τριακυλ-γλυκερόλες (triacylglycerols) ή και μεθυλικούς (methyl) εστέρες και κανένα γαλακτώμα δεν έχει παρασκευαστεί με φωσφολιπίδια ή και εστέρες. Στην Εικ. 1.13. τα συνηθέστερα χρησιμοποιημένα εμπορικά γαλακτώματα συγκρίνονται με τα σπιτικά γαλακτώματα αποκτηθέντα από αυγοτάραχο πλατύψαρου halibut και τα εκχυλίσματα κωπήποδων. Αν και το περιεχόμενο DHA και EPA είναι πολύ χαμηλότερο στα τελευταία γαλακτώματα, η σχετική συγκέντρωσή τους για να συμπληρώσει τα ολικά FA είναι πολύ υψηλότερη.

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι, μετά από τον εμπλουτισμό η σύνθεση των τροχοζών δεν διέφερε περισσότερο από κλάσμα των 30 ως 45% (n-3) σε HUFA (Εικ. 1.13). Επιπλέον, η σύνθεση λιπιδίων των τροχοζών επίσης επηρεάστηκε ελάχιστα από τη σύνθεση της διατροφής. Εντούτοις, όταν αναλύεται η αποδοτικότητα της ενσωμάτωσης των DHA και (n-3) HUFA στα τροχόζωα είναι προφανές ότι τα καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται με τα προϊόντα εκχύλισης. Δεδομένου ότι, όλες οι τροφές καταναλώνονται με περίπου όμοια αποδοτικότητα αυτό σημαίνει ότι τα φωσφολιπίδια (παρόντα στα προϊόντα εκχύλισης) ευκολότερα αφομοιώνονται και μεταβολίζονται από τα τροχόζωα.



Εικ. 1.14. Σύσταση λιπιδικής κλάσης στα γαλακτώματα (DHA Super Selco, Super Selco, αυγοτάραχο halibut and κωπήποδα) σε εμπλουτισμένα τροχόζωα.

Fig. 1.14. Lipid class composition in the emulsions (DHA Super Selco, Super Selco, halibut roe and copepods) and in the enriched rotifers. TGS: triglycerides, DG: diacylglycerides, ST: sterols, MG: monoacylglycerides, ME: methyl esters, FFA: free fatty acids, PL: phospholipids, WE: wax esters, SE: sterol esters.

1.6.2. Τεχνικές εμπλουτισμού βιταμίνης C

Η περιεκτικότητα σε βιταμίνη C των τροχοζών απεικονίζει τα διαιτητικά επίπεδα

ασκορβικού (AA) οξέος μετά από την καλλιέργεια και τον εμπλουτισμό (Πίνακας 1.6.). Για παράδειγμα, τα τροχόζωα που καλλιεργούνται στη στιγμιαία μαγιά αρτοποιίας περιέχουν 150 mg βιταμίνης C/g⁻¹ DW, ενώ τα ταϊσμένα τροχόζωα με *Chlorella* περιέχουν 2300 mg βιταμίνη C/g⁻¹ DW. Μέσα στα εμπορικά εκκολαπτήρια θαλασσιών ψαριών ένα ευρύ φάσμα προϊόντων χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια και τον εμπλουτισμό των τροχόζωων (Πίνακας 1.6.). Γενικά, ο εμπλουτισμός εμπορικού επιπέδου σημειώνει χαμηλότερα επίπεδα από τον εργαστηριακό εμπλουτισμό. Προβλήματα των παραμορφώσεων του βραγχιακού επικαλύμματος που εμφανίζονται αυτή την περίοδο στα μεσογειακά εκκολαπτήρια τσιπούρας μπορεί να οφείλονται στις αλλαγές στη διαχείριση κατά την παραγωγή ζωντανής τροφής και τα μειωμένα επίπεδα βιταμίνης C.

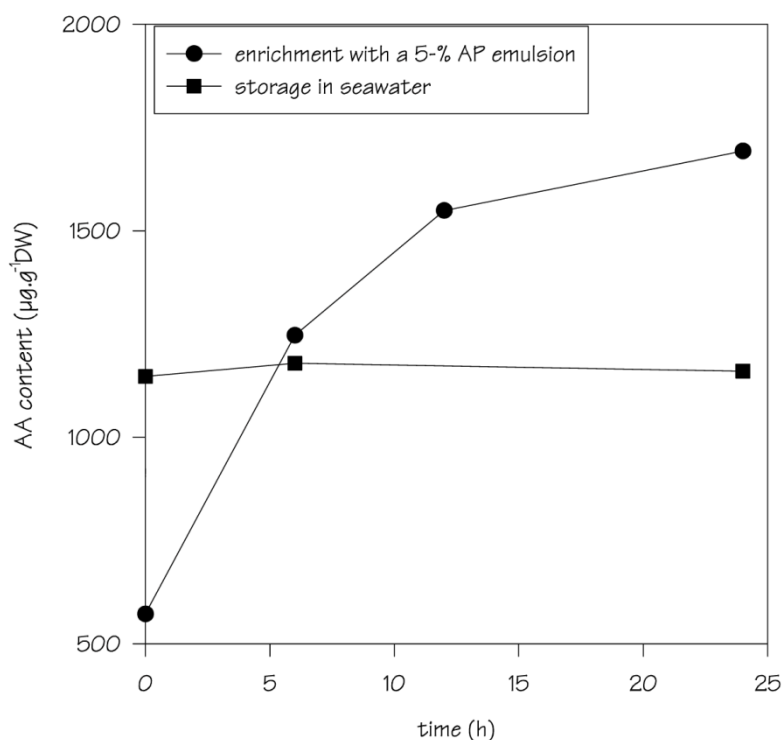
Πίνακας 1.6. Συγκέντρωση ασκορβικού οξέως (mg g⁻¹ DW) σε καλλιεργούμενα τροχόζωα σε εργαστηριακή και εκκολαπτηρίου κλίμακα (από τους Merchie *et al.*, 1995).
Table 1.6. Ascorbic acid content (mg g⁻¹ DW) of rotifers cultured on a laboratory and hatchery scale (modified from Merchie *et al.*, 1995).

culture / enrichment diet		
lab scale	culture (3 d)	enrichment (6 h)
<i>Chlorella</i> / <i>Isochrysis</i>	2289	2155
baker's yeast / <i>Isochrysis</i>	148	1599
Culture Selco ^{®1} / Protein Selco ^{®1}	322	1247
commercial scale	culture (5-7 d)	enrichment (6-24 h)
baker's yeast + <i>Chlorella</i> / <i>Chlorella</i>	928	1255
baker's yeast + <i>Nannochloris</i> / <i>Nannochloris</i>	220	410
Culture Selco [®] / Protein Selco ^{®1}	136	941
Culture Selco ^{®1} / <i>Isochrysis</i>	327	1559

¹vit C -boosted, Inve Aquaculture N.V.

Ο εμπλουτισμός των τροχόζωων με AA πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας το παλμικό ασκορβικό (ascorbyl palmitate) (AP) ως πηγή βιταμίνης C για συμπλήρωση των ενισχυτών. Το AP μετατρέπεται από τα τροχόζωα στο ενεργό AA μέχρι 1700 mg g⁻¹ DW μετά από 24ωρο εμπλουτισμό χρησιμοποιώντας ένα γαλάκτωμα AP 5% (w/w) (Εικ. 1.15.). Η αποθήκευση των τροχόζωων στο θαλασσινό νερό μετά από την καλλιέργεια ή τον εμπλουτισμό δεν έχει καμία επίδραση στο περιεχόμενο AA κατά τη διάρκεια των πρώτων 24 ωρών (Εικ. 1.15.), δείχνοντας ότι τα τροχόζωα διατηρούν τη θρεπτική αξία τους όταν δίνονται ως τροφή στις νύμφες ψαριών κατά τη διάρκεια

της καλλιέργειας.



Εικ. 1.15. Επίπεδα ασκορβικού οξέως στα τροχόζωα μετά από εμπλουτισμό (•) και μεταγενέστερη αποθήκευση σε θαλασσινό νερό.

Fig. 1.15. Ascorbic acid levels in rotifers after enrichment (•) and subsequent storage in seawater.

1.6.3. Τεχνικές εμπλουτισμού πρωτεϊνών

Από τις γνώσεις μας, το Protein Selco είναι η μόνη διατροφή εμπλουτισμού που σχεδιάζεται ειδικά για τον πρωτεϊνικό εμπλουτισμό στα τροχόζωα. Τα υψηλά επίπεδα των πρωτεϊνών επιτρέπουν στις καλλιέργειες να συνεχίσουν να αυξάνονται και να αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της περιόδου εμπλουτισμού. Κανονικά χρησιμοποιείται με τον ίδιο τρόπο όπως ένα γαλάκτωμα ελαίου (που αναδεύεται σε ένα μπλέντερ) και διανέμεται στη δεξαμενή σε μια συγκέντρωση 125 mg l⁻¹ θαλασσινού νερού σε δύο χρονικά διαστήματα 3 έως 4 ωρών.

Ο Πίνακας 1.7. δίνει μια σύγκριση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη των τροχοζώων που εμπλουτίζονται με τρεις διαφορετικές στρατηγικές εμπλουτισμού (A: μακροπρόθεσμος εμπλουτισμός κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας με μαγιά αρτοποιίας + 10% Super Selco; B: βραχυπρόθεσμος εμπλουτισμός με DHA-Selco; Γ: βραχυπρόθεσμος εμπλουτισμός με Protein Selco). Το ξηρό βάρος είναι σημαντικά μεγαλύτερο στα τροχόζωα που εμπλουτίζονται με Protein Selco και παρόμοια για το A και το B. Το πρωτεϊνικό επίπεδο είναι σημαντικά πιο υψηλό για το Γ από ότι για το B, αλλά καμία σημαντική διαφορά δεν μπορεί να παρατηρηθεί μεταξύ του πρωτεϊνικού επιπέδου των τροχοζώων A και Γ. Τα επίπεδα λιπιδίων είναι σημαντικά πιο υψηλά για το Γ από ότι για τα A τροχόζωα, αλλά καμία διαφορά δεν μπορεί να βρεθεί μεταξύ των τροχοζώων Γ και B. Τα A τροχόζωα έχουν την υψηλότερη αναλογία πρωτεϊνικών/λιπιδίων και το B τη χαμηλότερη αναλογία (Øie *et al.*, 1996).

Πίνακας 1.7. Ξηρό βάρος (DW), επίπεδα πρωτεϊνών και λιπιδίων σε εμπλουτισμένα τροχόζωα με διάφορες δίαιτες (από Øie *et al.*, 1996).

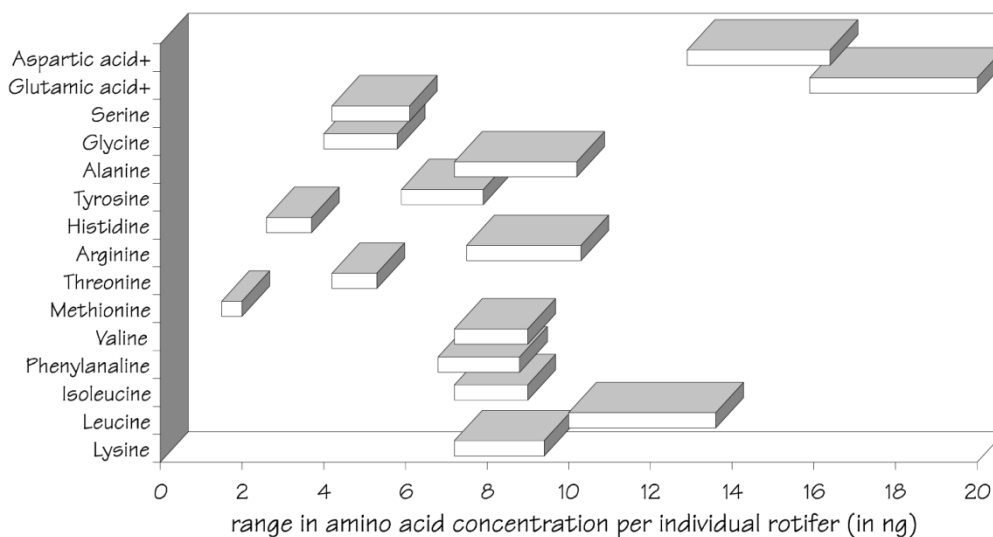
Table 1.7. Dry weight (DW), protein and lipid levels of rotifers enriched with different diets (modified from Øie *et al.*, 1996).

	Long term Selco® enrichment	Short term DHA-Selco® enrichment	Short term Protein Selco® enrichment
ng protein.ind ^{-1*}	200 ± 31	163 ± 13	238 ± 44
ng protein.ind ^{-1**}	117	100	165
protein /lipid [*]	3.7	2.3	2.6
protein/lipid ^{**}	2.2	1.4	1.8
ng DW.ind ⁻¹	376 ± 20	331 ± 13	502 ± 33

*protein expressed as N x 6.25

** protein expressed as sum amino acids

Η Εικ. 1.16 δείχνει τη διακύμανση της συγκέντρωσης των αμινοξέων στα τροχόζωα. Είναι φανερό ότι, για τα περισσότερα αμινοξέα τα τροχόζωα είναι πολύ συντηρητικά ακόμη και όταν εκτίθενται σε συνθήκες τροφικής πείνας.



Εικ. 1.16. Διακύμανση της συγκέντρωσης των αμινοξέων των τροχόζωα υπό τροφική πείνα (χαμηλότερες τιμές) και καλά ταϊσμένα (υψηλότερες τιμές) (Makridis and Olsen, προσ. επικοινων.).

Fig. 1.16. Ranges in amino acid concentration for starved (lower value) and well-fed (higher value) rotifers (Makridis and Olsen, pers. comm.).

1.6.4. Συγκομιδή/συγκέντρωση και κρύα αποθήκευση των τροχόζωων

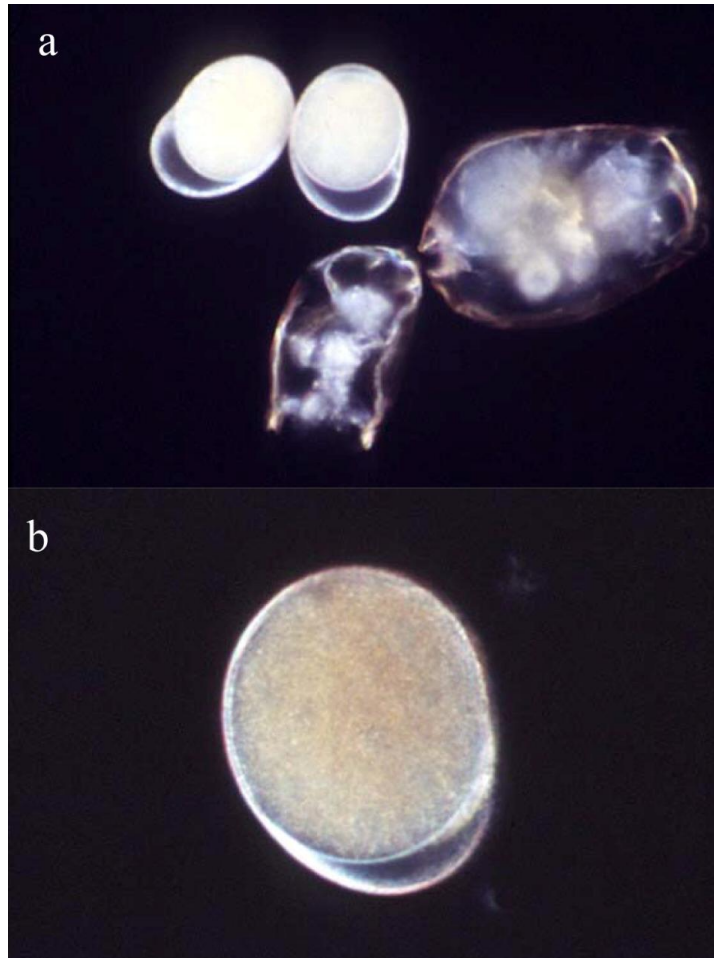
Όπως εξηγήθηκε νωρίτερα, η συγκομιδή και η συγκέντρωση μη εμπλουτισμένων τροχόζωων πρέπει να πραγματοποιηθεί με καταδύμενα φίλτρα (βλ. 1.5.4.). Η

συγκομιδή των εμπλουτισμένων τροχοζώων πρέπει να πραγματοποιηθεί με τεράστια προσοχή προκειμένου την αποτροπή της συγκόλλησης μεταξύ τους σε συσσωμάτωμα. Ειδικά όταν τα εμπλουτισμένα άτομα συγκεντρώνονται πριν από την πλύση, ο αερισμός μπορεί εύκολα να οδηγήσει στη συσσωμάτωση. Αντί της συλλογής εμπλουτισμένων τροχοζώων σε έναν κάδο συστήνεται η αναρρόφηση αυτών έτσι ώστε να αποφευχθεί η παρέμβαση των αεροφυσαλίδων.

Τροχόζωα που δεν μπορούν να ταϊστούν αμέσως πρέπει να αποθηκευτούν σε μια χαμηλή θερμοκρασία (4°C) προκειμένου να αποτραπεί η μείωση της θρεπτικής αξίας τους. Κατά τη διάρκεια μιας περιόδου τροφικής πείνας (starvation) μιας ημέρας στους 25°C, τα τροχόζωα μπορούν να χάσουν μέχρι το 26% του βάρους του σώματός τους ως αποτέλεσμα της μεταβολικής δραστηριότητας. Οι διαφορετικές διαδικασίες καλλιέργειας και εμπλουτισμού επηρεάζουν επίσης την επίδραση της τροφικής πείνας. Για παράδειγμα, η τροφική πείνα των εμπλουτισμένων τροχοζώων (δηλ., τροχόζωα που ενισχύθηκαν με γαλακτώματα ελαίου, μικρό-ειδικές διατροφές ή μικροφύκη) αμέσως πριν δοθούν ως τροφή στους θηρευτές (έμμεση διαδικασία εμπλουτισμού, βραχυπρόθεσμος εμπλουτισμός), συντελεί σε μια πολύ γρήγορη απώλεια περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέα, καθώς τα τροχόζωα αρχίζουν να αδειάζουν τον πεπτικό τους αγωγό μετά από 20 έως 30 min! Μετά από περίπου 6 ώρες στις δεξαμενές νυμφικών καλλιιεργειών, η περιεκτικότητα HUFA των τροχοζώων μπορεί να έχει μειωθεί στο 1/3 του αρχικού επιπέδου τους. Εμπλουτισμός των ιστών (άμεση διαδικασία εμπλουτισμού, μακροπρόθεσμος εμπλουτισμός), πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας των τροχοζώων και επιτρέπει μια αργή αλλά σταθερή αύξηση στην περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα των τροχοζώων. Αυτό το απόθεμα σε λιπαρά οξέα είναι έτσι σταθερότερο και λιγότερο εκτεθειμένο στη γρήγορη μείωση κατά την τροφική πείνα.

1.7. Παραγωγή και χρήση των αυγών διάπαυσης

Για τη μαζική εκτροφή των τροχοζώων ως νυμφική τροφή, ο αμικτικός τρόπος αναπαραγωγής (βλ. 1.3.) πρέπει να επιδιώκεται. Εντούτοις, όταν το ενδιαφέρον είναι στην παραγωγή των αυγών διάπαυσης για αποθηκευτική χρήση ανάμιξη πρέπει να εισαχθεί. Αυτά τα αυγά διάπαυσης, αποκαλούμενα επίσης κύστεις, είναι σχετικά μεγάλα (ο όγκος τους είναι σχεδόν 60% ενός κανονικού ενήλικου θηλυκού) (Εικ. 1.17.), είναι ιδανικά για αποθήκευση και μεταφορά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως "εμβόλια" για μαζικές καλλιέργειες. Η μαζική παραγωγή των τροχοζώων για την παραγωγή κύστεων εκτελείται σε δεξαμενές σκυροδέματος (Hagiwara *et al.*, 1995; Dhert *et al.*, 1995). Τα αυγά διάπαυσης συλλέγονται και από τα ίζηματα σε χωμάτινες λίμνες. Η παραγωγή αυγών διάπαυσης μπορεί να προκληθεί με τον περιορισμό της προσφοράς τροφών ή την αλλαγή της θερμοκρασίας ή και της αλατότητας. Τα αυγά διάπαυσης θα βυθιστούν και θα πρέπει να συγκομιστούν από το κατώτατο σημείο. Σε περίπτωση που πολλά απόβλητα είναι παγιδευμένα στο κατώτατο σημείο πρέπει να αντικατασταθεί το νερό έτσι ώστε τα αυγά διάπαυσης θα επιπλεύσουν και μπορούν να συλλεχθούν από την επιφάνεια του νερού. Εάν το ίζημα στο κατώτατο σημείο έχει μεγάλη συγκέντρωση, για να συλλεχθούν τα αυγά διάπαυσης το νερό πρέπει να αντικατασταθεί. Τα ξηρά αυγά διάπαυσης μπορούν να αποθηκευτούν για περισσότερα από ένα έτη. Όταν τοποθετηθούν σε θαλασσινό νερό, οι κύστεις των τροχοζώων εκκολάπτονται σε περίπου 24 ώρες στους 25°C κάτω από φωτεινές συνθήκες. Τα νέο-εκκολαπτόμενα τροχόζωα θα υποβληθούν σε παρθενογένεση.



Εικ. 1.17. Μικροσκοπική παρατήρηση αυγών διάπαυσης (μήκος 100-170 μm ; a. στην ίδια μεγέθυνση με δυο αμικτικά θηλυκά; b. σε μεγάλη μεγέθυνση.
Fig. 1.17. Microscopic view of resting eggs (length 100-170 μm ; a. at same magnification as two amictic females; b. at high magnification.

Εντοπίζονται διάφορα πλεονεκτήματα στη χρήση των κύστεων των τροχοζώων για την έναρξη μαζικών καλλιεργειών. Η χρήση αποθεματικών καλλιεργειών δεν απαιτείται, η οποία μειώνει αρκετά το κόστος εργασίας και τις δαπάνες από την παραγωγή φυκών. Επιπλέον, οι κλιμακωτές ή ενδιάμεσες καλλιέργειες μεταξύ των αποθεμάτων και των μαζικών παραγωγών μπορεί να μειωθούν αρκετά με τη χρήση μεγαλύτερου αριθμού κύστεων. Η χρήση των κύστεων συστήνεται επίσης ιδιαίτερα για την αποφυγή μολύνσεων. Οι κύστεις μπορούν εύκολα να επεξεργαστούν πριν εκκολαφθούν προκειμένου να εξασφαλιστούν αρχικές καλλιέργειες απαλλαγμένες από βακτήρια και βλεφαριδιωτά. Τα αυγά διάπαυσης μπορούν να απολυμανθούν με σύντομη έκθεση σε αντιβιοτικό, έτσι ώστε τα τροχοζώα να απαλλαγούν από τα βακτήρια. Τα αυγά διάπαυσης μπορούν επίσης να υποστούν σύντομη έκθεση σε απολυμαντικά όπως NaOCl ή γλουταρ-αλδεΐδη (glutaraldehyde).

1.8. Παραπομπές

- Dhert, Ph., Schoeters, K., Vermeulen, P., Sun, J., Gao, S., Shang, Z. and Sorgeloos, P. 1995. Production and evaluation of resting eggs of *Brachionus plicatilis* originating from the P.R. of China. In: Lavens, P.; E. Jaspers and I. Roelants (Eds.), Larvi'95 Fish and Shellfish Larviculture Symposium. European Aquaculture Society, Special Publication, Gent, Belgium, 24:315-319.
- Fu, Y, Hirayama, K. and Natsukari, Y. 1991. Morphological differences between two types of the rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Müller. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 151:29-41.
- Fukusho, K. 1989. Biology and mass production of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. Int. J. Aq. Fish. Technol., 1:232-240.
- Fukusho, K. and Iwamoto, H. 1981. Polymorphosis in size of rotifer, *Brachionus plicatilis*, cultured with various feeds. Bull. Nat. Res. Inst. Aquaculture, 2:1-10.
- Gatesoupe, F.J. 1991. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. Aquaculture, 96:335-342.
- Hagiwara, A., Balompapueng, M.D. and Hirayama, K. 1995. Mass production and preservation of marine rotifer resting eggs. Page 314. In: Lavens, P.; E. Jaspers and I. Roelants (Eds.), Larvi'95 Fish and Shellfish Larviculture Symposium. European Aquaculture Society, Special Publication, Gent, Belgium, 24:314.
- Hirata, H. 1979. Rotifer culture in Japan. In: Styczynska-Jurewicz, E.; T. Backiel; E. Jaspers and G. Persoone (Eds), Cultivation of fish fry and its live food. European Mariculture Society, Special Publication, 4:361-375.
- Hirayama, K. 1987. A consideration of why mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* with baker's yeast is unstable. Hydrobiologia, 147:269-270.
- Hoff, F.H. and Snell, T.W. 1987. Plankton culture manual, First edition, Florida Aqua Farms, Inc., Florida, USA 126 pp.
- Koste, W. 1980. Das rädertier-porträt. *Brachionus plicatilis*, ein salzwasserrädertier. Mikrokosmos, 5:148-155.
- Léger, P., Grymonpre, D., Van Ballaer, E. and Sorgeloos, P. 1989. Advances in the enrichment of rotifers and *Artemia* as food sources in marine larviculture. In: Aquaculture Europe'89, Short Communications and Abstracts, Special Publication, 10:141-142.
- Lubzens, E. 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. Hydrobiologia, 147:245-255.
- Merchie, G., Lavens, P., Dhert, Ph., Deshasque, M., Nelis, H., De-Leenheer, A. and Sorgeloos, P. 1995. Variation of ascorbic acid content in different live food organisms. Aquaculture, 134(3-4):325-337.
- Oie, G., Makridis, P., Reitan, K.I. and Olsen, Y. 1996. Survival and utilization of carbon and protein in turbot larvae fed rotifers with different protein, lipid and protein/lipid ratio. Aquaculture (in press).
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R. and Olsen, Y. 1994. Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. Aquaculture International, 2:33-48.
- Skjermo, J. and Vadstein, O., 1993. Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*. Hydrobiologia, Vol. 255/256:185-191.
- Verdonck, L., Swings, J., Kesters, K., Dehasque, M., Sorgeloos, P. and Léger, P. 1994. Variability of the microbial environment of rotifer *Brachionus plicatilis* and *Artemia* production systems. Journal of the World Aquaculture Society, 25(1):55-59.
- Watanabe, T., Kitajima, C. and Fujita, S. 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. Aquaculture, 34:115-143.
- Watanabe, T., Ohta, M., Kitajima, C. and Fujita, S. 1982. Improvement of dietary value of brine shrimp *Artemia salina* for fish larvae by feeding them w3 highly unsaturated fatty acids. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. Nippon Suisan/Gakkaishi, Vol. 48(12):1775-1782.
- Yu, J.P., Hino, A., Hirano, R. and Hirayama, K. 1988. Vitamin B12-producing bacteria as a nutritive complement for a culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi, 54(11):1873-1880.
- Yu, J.P., Hino, A., Ushiro, M. and Maeda, M. 1989. Function of bacteria as vitamin B12 producers during mass culture of the rotifer *B. plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi, 55(10):1799-1806.
- Yu, J.P., Hino, A., Noguchi and Wakabayashi, H. 1990. Toxicity of *Vibrio alginolyticus* on the survival of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi 56(9):1455-1460.

2. ARTEMIA

Gilbert Van Stappen
Greet Merchie

Laboratory of Aquaculture & Artemia Reference Center
University of Gent, Βέλγιο

2.1. Εισαγωγή, βιολογία και οικολογία της *Artemia*

2.1.1. Εισαγωγή

Μεταξύ των ζωντανών τροφών που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια νυμφών των ψαριών και των οστρακόδερμων, οι ναύπλιοι της *Artemia* αποτελούν το πιο ευρύτατα χρησιμοποιημένο προϊόν. Ετησίως, πάνω από 2000 μετρικοί τόνοι ξηρών κύστεων *Artemia* πωλούνται παγκοσμίως για την εκκόλαψη των 400 mm ναυπλίων. Πράγματι, η μοναδική ικανότητα ενός μικρού βραγχιόποδου καρκινοειδούς (branchiopod crustacean) *Artemia* στην παραγωγή ανεσταλμένων εμβρύων, αποκαλούμενες "κύστεις", το καθιστά κατάλληλο στη χρήση του ως άριστη πηγή τροφής για τις νύμφες. Αυτές οι κύστεις είναι διαθέσιμες καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου σε μεγάλες ποσότητες κατά μήκος των ακτών των λιμνών με αυξημένη αλατότητα, των παράκτιων λιμνοθαλασσών και αλυκών που διασκορπίζονται στις πέντε ηπείρους. Μετά από τη συγκομιδή και την επεξεργασία, οι κύστεις συσκευάζονται σε δοχεία και διανέμονται όπως είναι αποθηκευμένα κατόπιν παραγγελίας ως ζωντανή τροφή. Με επώαση 24 ωρών σε θαλασσινό νερό, οι κύστεις αυτές απελευθερώνουν τον ναύπλιο ως ελεύθερο κολυμβητή που μπορεί άμεσα να ταϊστεί ως θρεπτική ζωντανή πηγή τροφής στις νύμφες ποικίλων θαλασσιών οργανισμών καθώς επίσης και εσωτερικών υδάτων, η οποία τον καθιστά ως τον καταλληλότερο οργανισμό ζωντανής τροφής διαθέσιμο για τις υδατοκαλλιέργειες. Αν και η *Artemia* ήταν γνωστή στον άνθρωπο για αιώνες, η χρήση της ως τροφή για την καλλιέργεια νυμφικών οργανισμών άρχισε μόλις στη δεκαετία του '30, όταν διαπίστωσαν διάφοροι ερευνητές ότι ήταν μια άριστη τροφή για τις νέο-εκκολαπτόμενες νύμφες ψαριών. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του '40, οι εμπορικότερες διαθέσιμες κύστεις της αλμυρογαρίδας αντιπροσώπευσαν τις συλλογές από τις φυσικές αλατούχες λίμνες και τις παράκτιες αλυκές. Με το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα τροπικά ψάρια ως χόμπι προς το τέλος της δεκαετίας του '40, η εμπορική αξία συνδέθηκε με τις αλμυρογαρίδες, καθιερώνοντας μια νέα βιομηχανία. Οι πρώτοι που εκμεταλλεύτηκαν το 1951 την παραγωγή κύστεων *Artemia* ήταν στη λίμνη Great Salt Lake στη Utah των ΗΠΑ. Οι πρώτες συγκομιδές της λίμνης παρήγαγαν 16 τόνους ολοκληρωμένου προϊόντος. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του '50, η εμπορική προσοχή για τις αλμυρογαρίδες στράφηκε στις ελεγχόμενες πηγές παραγωγής στην περιοχή του κόλπου του San Francisco. Εδώ διαπιστώθηκε ότι οι αλμυρογαρίδες και οι κύστεις θα μπορούσαν να παραχθούν ως υποπροϊόν των αλυκών. Δεδομένου ότι, η παραγωγή αλατιού συμβαδίζει με τη διαχείριση της διαδικασίας εξάτμισης, η ετήσια παραγωγή κύστεων και βιομάζας θα μπορούσαν να προβλεφθούν κατά προσέγγιση. Στη δεκαετία του '60, οι εμπορικές απαιτήσεις προήλθαν από αυτές τις λίγες πηγές στη Βόρεια Αμερική που φάνηκε να είναι απεριόριστες. Εντούτοις, με την επέκταση της παραγωγής των υδατοκαλλιεργειών στη δεκαετία του '70, οι απαιτήσεις για κύστεις *Artemia* υπερέβησαν σύντομα την προσφορά και οι τιμές αυξήθηκαν εκθετικά, μετατρέποντας την *Artemia* σε ανασταλτικό παράγοντα για την επέκταση

των εκκολαπτηρίων υδατοκαλλιέργειών των θαλασσιών ψαριών και των καρκινοειδών. Συγκεκριμένα, πολλές αναπτυσσόμενες χώρες μετά βίας μπορούσαν να αντέξουν οικονομικά την εισαγωγή των πολύ ακριβών κύστεων.

Στη Τεχνική Διάσκεψη του FAO στο Κιότο σχετικά με τις υδατοκαλλιέργειες το 1976, αποδείχθηκε ότι η διαθεσιμότητα των κύστεων ήταν ελλιπής και αυτό αποτέλεσε ένα τεχνητό και προσωρινό πρόβλημα. Κατά τη διάρκεια των ακόλουθων ερευνητικών προσπαθειών που έγιναν φάνηκε η δυνατότητα της τοπικής παραγωγής της *Artemia* στις αναπτυσσόμενες χώρες.

Αυτή τη στιγμή, *Artemia* παράγεται και χρησιμοποιείται στις πέντε ηπείρους. Παρόλα αυτά, μεγάλο μέρος της αγοράς των κύστεων στηρίζεται και εφοδιάζεται ακόμα από τις συγκομιδές της Salt Lake. Αυτή η κατάσταση καθιστά την αγορά εξαιρετικά τρωτή από κλιματολογική άποψη και από τις οικολογικές αλλαγές σε αυτήν την λίμνη, ενώ έχουν εμφανιστεί χαμηλές παραγωγές κύστεων στις περιόδους 1993-1994 και κυρίως 1994-1995.

Ήδη προς το τέλος της δεκαετίας του '70 φάνηκε ότι η θρεπτική αξία της *Artemia*, ειδικά για τους θαλάσσιους οργανισμούς, δεν ήταν σταθερή αλλά ποικίλει μεταξύ των στελεχών και μέσα στις παρτίδες, προκαλώντας αναξιόπιστα αποτελέσματα στη θαλάσσια καλλιέργεια νυμφών. Μέσω των επιστημονικών μελετών στα μέσα της δεκαετίας του '80 προσδιορίστηκαν οι αιτίες για τη θρεπτική μεταβλητότητα της *Artemia* και οι μέθοδοι βελτίωσης της χαμηλής ποιότητάς της. Παραλλαγές στο γονότυπο και το φαινότυπο (δηλ. μέγεθος κύστης, χαρακτηριστικά εκκόλαψης κύστεων, θερμιδικό περιεχόμενο και σύνθεση λιπαρών οξέων των ναυπλίων) καθορίζουν εάν ένα ιδιαίτερο προϊόν σαν τις κύστεις είναι κατάλληλο για χρήση στα εκκολαπτήρια συγκεκριμένων ψαριών ή γαριδών.

Με τον βίο-εγκλεισμό (bio-encapsulating) συγκεκριμένων ποσοτήτων ναυπλίων ή γαλακτωματοποιημένων προϊόντων πλούσιων σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στο μεταναύπλιο της αλμυρογαρίδας, η θρεπτική ποιότητα της *Artemia* μπόρεσε να προσαρμοστεί περαιτέρω για να ταιριάζει στις απαιτήσεις των θηρευτών. Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου βίο-εγκλεισμού, ονομαζόμενη και ως εμπλουτισμός (enrichment) ή τόνωση (boosting), επέφερε σημαντικά αποτελέσματα στη βελτίωση των νυμφικών καλλιέργειών, όχι μόνο από την άποψη της επιβίωσης, της αύξησης και της επιτυχίας, αλλά και της μεταμόρφωσης πολλών ειδών ψαριών και καρκινοειδών όσον αφορά την ποιότητά τους, π.χ. μειωμένη εμφάνιση δυσμορφιών, βελτιωμένος χρωματισμός και αντίσταση στο στρες. Η ίδια μέθοδος αναπτύσσεται τώρα για την πεπτική εισαγωγή των βιταμινών, τις χημειοθεραπείες και τους εμβολιασμούς.

Επιπλέον, μια καλύτερη γνώση της βιολογίας της *Artemia* μπορεί να προσφέρει στο σχεδιασμό και άλλων προϊόντων *Artemia*, όπως απολυμασμένες και αποκελυφοποιημένες κύστεις με διάφορες βιομάζες, έχουν προς το παρόν εφαρμογή στα εκκολαπτήρια. Όλες αυτές οι εξελίξεις οδήγησαν στις βελτιστοποιημένες και οικονομικώς αποδοτικότερες εφαρμογές αυτού του τύπου ζωντανής τροφής των εκκολαπτηρίων.

2.1.2. Βιολογία και οικολογία της *Artemia*

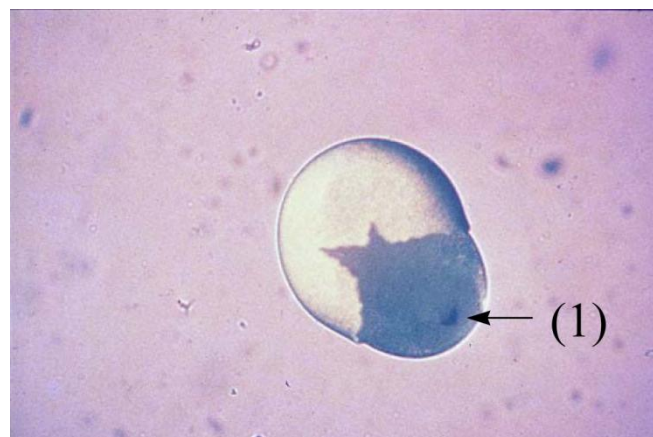
2.1.2.1. Μορφολογία και κύκλος ζωής

Στο φυσικό περιβάλλον της και σε συγκεκριμένες περιόδους του έτους η *Artemia* παράγει κύστεις που επιπλέουν στην επιφάνεια του νερού (Εικ. 2.1.1.) και διασκορπίζονται στη ξηρά από τον αέρα και τα κύματα. Αυτές οι κύστεις είναι

μεταβολικά ανενεργές και δεν αναπτύσσονται περαιτέρω εφ' όσον κρατιούνται ξηρές. Μετά από εμβάπτιση σε θαλασσινό νερό, οι αμφίκουλου σχήματος κύστες ενυδατώνονται, γίνεται σφαιρικές και το έμβρυο ενεργοποιεί τον ανεσταλμένο μεταβολισμό του. Μετά από περίπου 20 ώρες, η εξωτερική μεμβράνη των κύστεων (κέλυφος) διαρρηγνύεται και εμφανίζεται το έμβρυο που περικλείεται από τη μεμβράνη εκκόλαψης (Εικ. 2.1.2.). Καθώς το έμβρυο κρέμεται κάτω από το άδειο κέλυφος (= στάδιο "ομπρέλας" ή "umbrella" stage), η ανάπτυξη του ναύπλιου ολοκληρώνεται και μέσα σε λίγο χρονικό διάστημα η μεμβράνη εκκόλαψης σπάει (= "εκκόλαψη") και ένας ελεύθερος κολυμβητής ναύπλιος γεννιέται (Εικ. 2.1.3.).



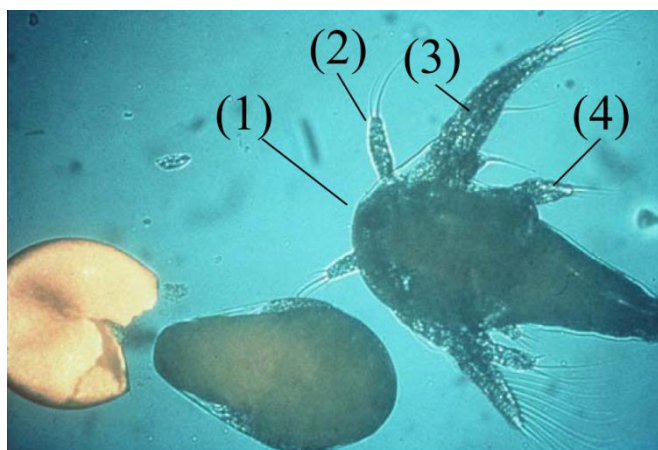
Εικ. 2.1.1. Συγκομιδή κύστεων αλμυρογαρίδας από αλμυρή λίμνη.
Fig. 2.1.1. Harvesting of brine shrimp cysts from a salt pond.



Εικ. 2.1.2. Κύστη στο στάδιο διάρρηξης. (1) οφθαλμός ναύπλιου.
Fig. 2.1.2. Cyst in breaking stage. (1) nauplius eye.

Το πρώτο νυμφικό στάδιο (instar I 400 έως 500 μm μήκους) διαθέτει ένα πορτοκαλί

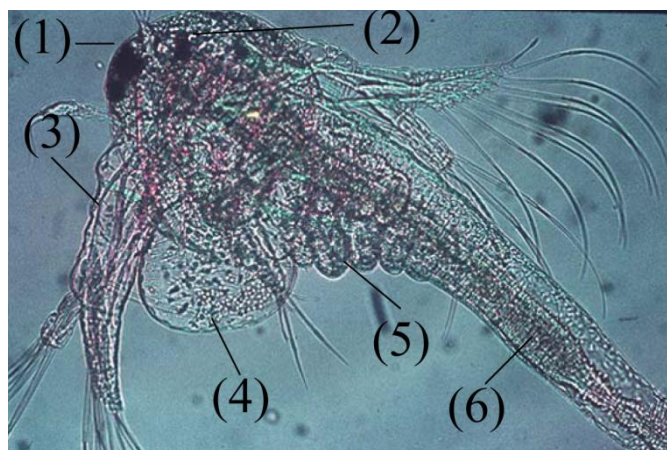
με τάση προς το καφέ χρώμα, ένα κόκκινο μάτι ναύπλιου στην περιοχή της κεφαλής και τρία ζευγάρια εξαρτημάτων: το πρώτο κεραίες (αισθητηριακή λειτουργία), το δεύτερο κεραίες (κινητική + ηθμοφαγική λειτουργία) και το τρίτο κάτω γνάθοι (λειτουργία λήψης τροφών). Η κοιλιακή πλευρά καλύπτεται από ένα μεγάλο σχηματισμό καλούμενο labrum (λήψης τροφών: μεταφοράς μορίων από τις ακίδες φίλτραρίσματος στο στόμα). Η προνύμφη instar I δεν λαμβάνει τροφές δεδομένου ότι το πεπτικό του σύστημα δεν είναι λειτουργικό ακόμα και οι διαιτητικές του απαιτήσεις καλύπτονται από τα λεκιθικά τους αποθέματα.



Εικ. 2.1.3. Έμβryo στο στάδιο "ομπρέλα" (αριστερά) και ναύπλιος instar I (δεξιά). (1) οφθαλμός ναύπλιου, (2) μικρή κεραία, (3) κεραία, (4) κάτω γνάθος.

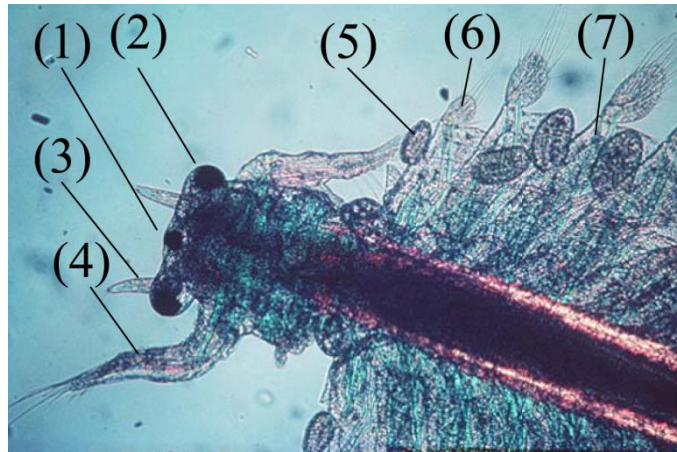
Fig. 2.1.3. Embryo in "umbrella" stage (left) and instar I nauplius (right). (1) nauplius eye, (2) antennula, (3) antenna, (4) mandible.

Μετά από περίπου 8 ώρες πραγματοποιείται δεύτερη έκδυση και σχηματίζεται το δεύτερο νυμφικό στάδιο (instar II). Τα μικρά μόρια τροφών (π.χ. κύτταρα φυκών, βακτηρίδια, συντρίμμια) που κυμαίνονται στο μέγεθος από 1 έως το 50 μm φιλτράρονται έξω από τις δεύτερες κεραίες και διοχετεύονται στην πεπτική οδό.

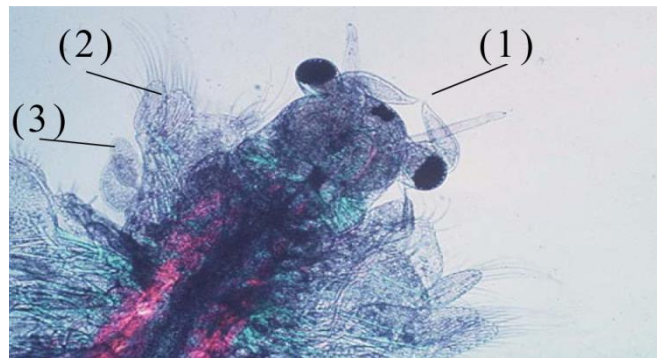


Εικ. 2.1.4. Instar V νύμφη. (1) οφθαλμός ναύπλιου, (2) πλευρικό σύμπλεγμα οφθαλμού, (4) σχηματισμός labrum, (5) προπλάσματα θωρακοποδίων, (6) πεπτικός αγωγός.

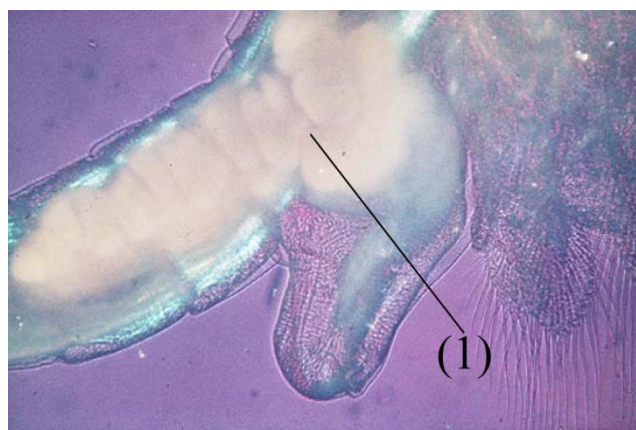
Fig. 2.1.4. Instar V larvae. (1) nauplius eye, (2) lateral complex eye, (3) antenna, (4) labrum, (5) budding of thoracopods, (6) digestive tract.



Εικ. 2.1.5. Κεφαλική και πρόσθια θωρακική περιοχή instar XII. (1) οφθαλμός, (2) πλευρικό σύμπλ. οφθαλμού, (3) μικρή κεραία, (4) κεραία, (5) εξωποδίτες, (6) τελοποδίτες, (7) ενδοποδίτες.
 Fig. 2.1.5. Head and anterior thoracic region of instar XII. (1) nauplius eye, (2) lateral complex eye, (3) antennula, (4) antenna, (5) exopodite, (6) telopodite, (7) endopodite.



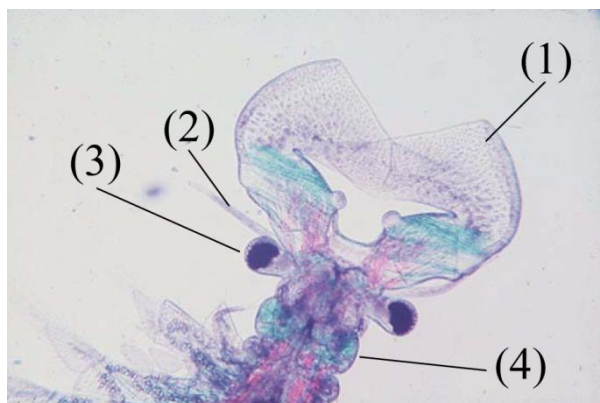
Εικ. 2.1.6. Κεφαλή και θωρακική περιοχή νεαρού αρσενικού. (1) κεραία, (2) τελοποδίτες, (3) ενδοποδίτες.
 Fig. 2.1.6. Head and thoracic region of young male. (1) antenna, (2) telopodite, (3) exopodite.



Εικ. 2.1.7. Οπίσθια θωρακική περιοχή, κοιλιά και μήτρα γόνιμου θηλυκού. (1) ώριμα αυγά στην ωοθήκη και τον ωαγωγό.
 Fig. 2.1.7. Posterior thoracic region, abdomen and uterus of fertile female. (1) ripe eggs in ovary and oviduct.

Η νύμφη αυξάνεται και διαφοροποιείται μέσω περίπου 15 εκδύσεων. Ταξινομημένα κατά ζευγάρια εξαρτημάτων εμφανίζονται στην κοιλιακή περιοχή του κορμού και

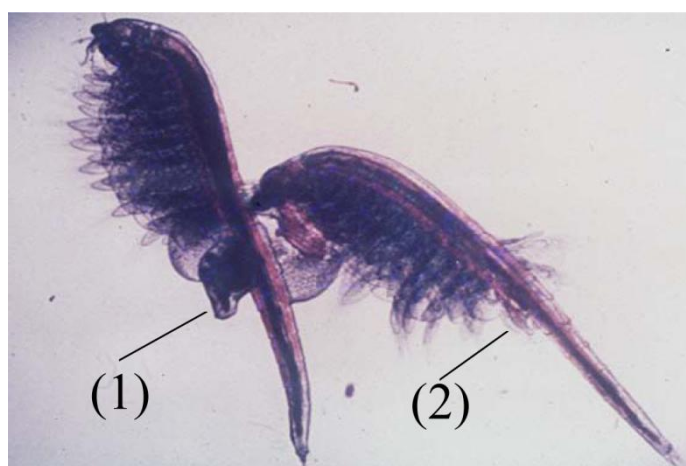
διαφοροποιούνται στα θωρακοπόδια (Εικ. 2.1.4.). Και στις δύο πλευρές του ναύπλιου αναπτύσσονται τα πλευρικά σύνθετα μάτια (Εικ. 2.1.5. και 2.1.6.).



Εικ. 2.1.8. Κεφαλή ενήλικου αρσενικού. (1) κεραία, (2) μικρή κεραία, (3) πλευρικό σύμπλεγμα οφθαλμού, (4) κάτω γνάθος.

Fig. 2.1.8. Head of an adult male. (1) antenna, (2) antennula, (3) lateral complex eye, (4) mandible.

Από το 10^ο instar στάδιο και επάνω, σημαντικές μορφολογικές καθώς επίσης και λειτουργικές αλλαγές πραγματοποιούνται: δηλ. οι κεραίες έχουν χάσει την κινητική λειτουργία τους και υποβάλλονται σε αναπαραγωγική διαφοροποίηση. Στα αρσενικά (Εικ. 2.1.6 και 2.1.8.) αναπτύσσονται αγκιστροειδείς άρπαγες (hooked graspers), ενώ οι θηλυκές κεραίες εκφυλίζονται σε αισθητήρια εξαρτήματα (Εικ. 2.1.11.). Τα θωρακοπόδια διαφοροποιούνται τώρα σε τρία λειτουργικά μέρη (Εικ. 2.1.13.), τους τελοποδίτες (telopodites), τους ενδοποδίτες (endopodites) (κίνηση και ηθμοφαγία), και τους μεμβρανώδεις εξωποδίτες (exopodites) (βράγχια).

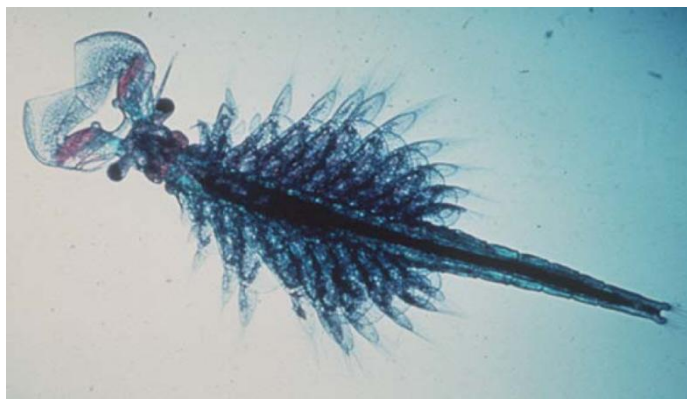


Εικ. 2.1.9. Ζευγάρι *Artemia* σε έφιππη θέση. (1) μήτρα, (2) όρχις.

Fig. 2.1.9. *Artemia* couple in riding position. (1) uterus, (2) penis.

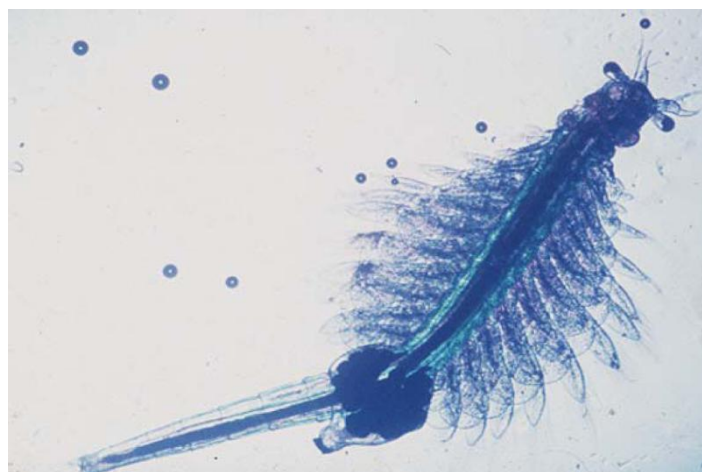
Η ενήλικη *Artemia* (± 1 cm μήκους) διαθέτει επίμηκες σώμα με δύο μισχωτούς σύνθετους οφθαλμούς, μια γραμμική πεπτική οδό, αισθητήριες κεραίες και 11 ζευγάρια λειτουργικών θωρακοποδίων (Εικ. 2.1.10 και 2.1.11.). Το αρσενικό (Εικ. 2.1.10.) φέρει ζεύγος συζευκτικών εξαρτημάτων (πέος) στην οπίσθια περιοχή του κορμού (Εικ. 2.1.9.). Το θηλυκό άτομο *Artemia* μπορεί εύκολα να αναγνωριστεί από τον ώσσοακο που τοποθετείται ακριβώς πίσω από το 11^ο ζευγάρι θωρακοποδίων (Εικ. 2.1.9 και 2.1.11.). Τα αυγά αναπτύσσονται σε δύο σωληνοειδείς ωοθήκες στην

κοιλιακή περιοχή (Εικ. 2.1.7.). Μόλις ωριμάσουν γίνονται σφαιρικά και μεταναστεύουν μέσω δύο ωαγωγών στην μονόκερη μήτρα.



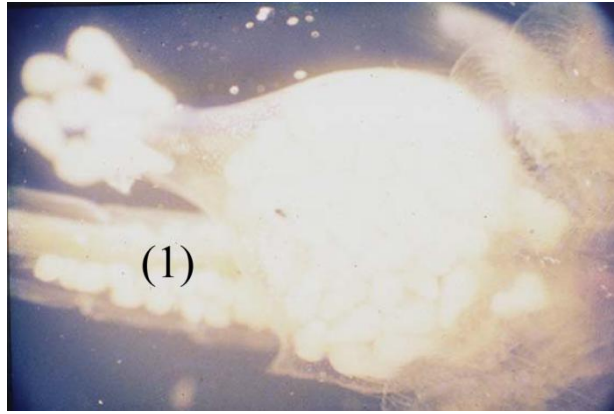
Εικ. 2.1.10. Ενήλικο αρσενικό.
Fig. 2.1.10. Adult male.

Τα γονιμοποιημένα αυγά φυσιολογικά αναπτύσσονται στον ναύπλιο ελεύθερο κολυμβητή (= ωοζωτόκα αναπαραγωγή) (Εικ. 2.1.12.) που απελευθερώνονται από το θηλυκό. Σε ακραίες συνθήκες (π.χ. υψηλή αλατότητα, χαμηλά επίπεδα οξυγόνου) τα έμβρυα αναπτύσσονται μόνο μέχρι το στάδιο του γαστριδίου. Δημιουργείται έτσι ένα παχύ κέλυφος (που εκκρίνεται από καφετί αδένες που βρίσκονται στη μήτρα), εισάγοντας το έμβρυο σε κατάσταση μεταβολικής στάσης ή λήθαργου (διάπαυσης) και απελευθερώνονται στη συνέχεια από το θηλυκό (= ωοτόκος αναπαραγωγή) (Εικ. 2.1.14.).

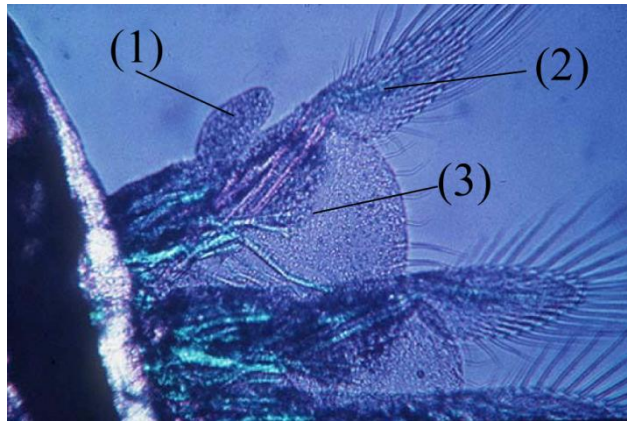


Εικ. 2.1.11. Ενήλικο θηλυκό.
Fig. 2.1.11. Adult female.

Σε γενικές γραμμές, και τα ζωοτόκα και τα ωοζωτόκα βρίσκονται σε όλους τους τύπους *Artemia*, και τα θηλυκά μπορούν να μεταπηδήσουν -μεταξύ των δύο κύκλων αναπαραγωγής- από έναν τρόπο αναπαραγωγής σε άλλον. Οι κύστεις επιπλέουν συνήθως



Εικ. 2.1.12. Μήτρα της ωοζωοτόκου *Artemia* γεμάτη με ναύπλιους. (1) ωοθήκη με αυγά.
 Fig. 2.1.12. Uterus of ovoviviparous *Artemia* filled with nauplii (first larvae are being released). (1) ovary with eggs.



Εικ. 2.1.13. Λεπτομέρεια πρόσθιων θωρακοποδίων σε ενήλικη *Artemia*. (1) εξωποδίτες, (2) τελοποδίτες, (3) ενδοποδίτες.
 Fig. 2.1.13. Detail of anterior thoracopods in adult *Artemia*. (1) exopodite, (2) telopodite, (3) andropodite.



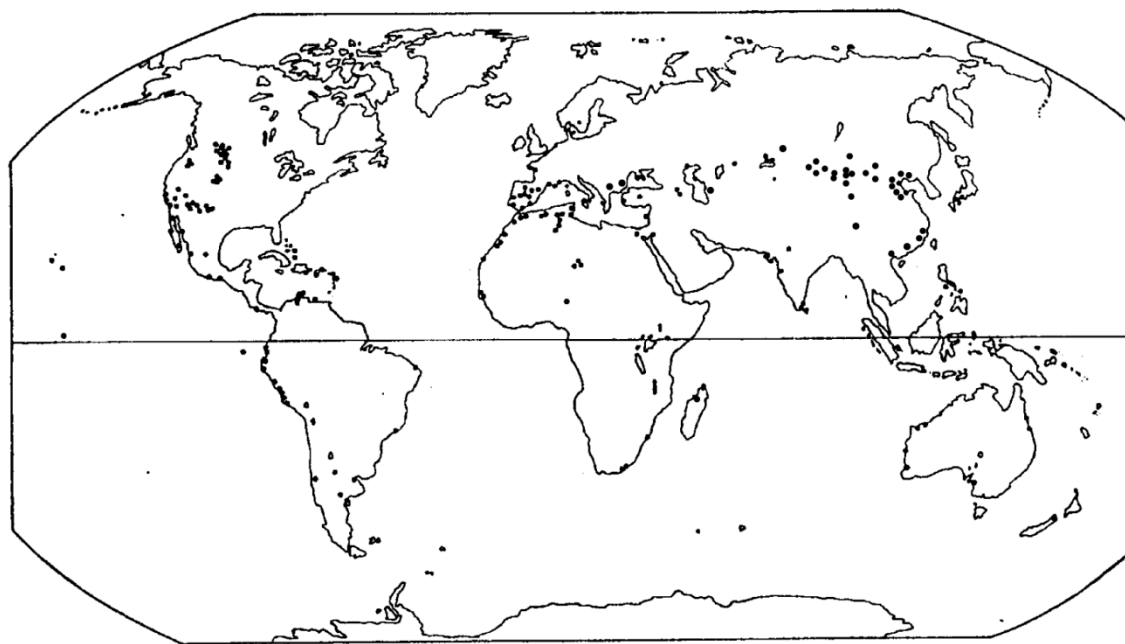
Εικ. 2.1.14. Μήτρα ζωοτόκου *Artemia* γεμάτη με κύστες. (1) κακέ αδένες κελύφους (σκοτεινότερο χρώμα).
 Fig. 2.1.14. Uterus of oviparous *Artemia* filled with cysts. (1) brown shell glands (darker color).

σε νερά υψηλής αλατότητας και μετακινούνται στη ξηρά όπου συσσωρεύονται και ξεραίνονται. Ως αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας αφυδάτωσης ο μηχανισμός διάπαυσης αδρανοποιείται γενικά και οι κύστεις είναι τώρα σε μια κατάσταση ηρεμίας και μπορούν να επαναλάβουν την περαιτέρω εμβρυική ανάπτυξή τους όταν ενυδατώνονται σε βέλτιστες συνθήκες εκκόλαψης.

Υπό τις βέλτιστες συνθήκες οι αλμυρογαρίδες μπορούν να ζήσουν για αρκετούς μήνες, να αναπτυχθούν από τον ναύπλιο στο ενήλικο στάδιο μόνο μέσα σε 8 ημέρες, και να αναπαράγονται σε ένα ποσοστό μέχρι τους 300 ναύπλιους ή κύστεις ανά 4 ημέρες.

2.1.2.2. Οικολογία και φυσική κατανομή

Οι πληθυσμοί της *Artemia* βρίσκονται σε περίπου 500 φυσικές αλατούχες λίμνες και τεχνητές από τον άνθρωπο αλυκές διεσπαρμένες στην τροπική, υποτροπική κλιματολογική ζώνη, κατά μήκος των ακτών καθώς επίσης και στα ηπειρωτικά (Εικ. 2.1.15.). Αυτός ο κατάλογος παραμένει ακόμα υπό διαμόρφωση δεδομένου ότι πιο εκτενής εργασία ερευνών πρέπει να οδηγήσει στην ανακάλυψη πολύ περισσότερων βιότοπων *Artemia* σε διαφορετικά μέρη του κόσμου (Πίνακας 2.1.1.).



Εικ. 2.1.15. Παγκόσμια κατανομή *Artemia*.
Fig. 2.1.15. The world distribution of *Artemia*.

Η κατανομή της *Artemia* είναι ασυνεχής και όχι όλοι οι ιδιαίτερα αλατούχοι βιότοποι είναι εποικημένοι με *Artemia*. Αν και οι αλμυρογαρίδες αναπτύσσονται πολύ καλά σε φυσικό νερό της θάλασσας, δεν μπορούν να μεταναστεύσουν από έναν αλατούχο βιότοπο σε άλλο μέσω των θαλασσών, δεδομένου ότι αυτές εξαρτώνται από τις φυσιολογικές προσαρμογές τους στην υψηλή αλατότητα για να αποφύγουν τους θηρευτές και τον ανταγωνισμό με άλλους ηθμοφάγους οργανισμούς. Οι φυσιολογικές προσαρμογές στην υψηλή αλατότητα παρέχουν μια πολύ αποδοτική οικολογική υπεράσπιση ενάντια στους θηρευτές, καθώς οι αλμυρογαρίδες διαθέτουν:

- ένα πολύ αποδοτικό ωσμωρυθμιστικό σύστημα

- την ικανότητα να συνθέτουν πολύ αποδοτικές αναπνευστικές χρωστικές ουσίες για να ανταπεξέλθουν στα χαμηλά επίπεδα O₂ στις υψηλές αλατότητες
- την ικανότητα παραγωγής αδρανών κύστεων όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες θέτουν σε κίνδυνο την επιβίωση του είδους

Η *Artemia* επομένως, βρίσκεται μόνο στις αλατότητες όπου οι θηρευτές της δεν μπορούν να επιζήσουν (>70 g l⁻¹). Ως αποτέλεσμα ακραίου φυσιολογικού στρες και τοξικότητας του νερού η *Artemia* πεθαίνει σε αλατότητες κοντά στον κορεσμό του NaCl, 250 g l⁻¹ και υψηλότερα.

Τα διαφορετικά γεωγραφικά στελέχη έχουν προσαρμοστεί σε ευρέως κυμαινόμενες συνθήκες όσον αφορά τη θερμοκρασία (6-35°C), την αλατότητα και την ιοντική σύνθεση του βιότοπου. Τα νερά που εντοπίζονται άτομα *Artemia* περιέχουν NaCl ως βασικό άλας. Αποτελούν τα περισσότερα, εάν όχι όλα, παράκτιους βιότοπους της *Artemia* όπου οι πυθμένες σχηματίζονται από εξάτμιση του θαλασσινού νερού σε αλυκές. Άλλοι βιότοποι *Artemia* είναι τοποθετημένοι εσωτερικά, όπως η Great Salt Lake στη Utah των ΗΠΑ. Οι βιότοποι *Artemia* που βρίσκονται ηπειρωτικά έχουν μια ιοντική σύνθεση που διαφέρει πολύ από αυτή του φυσικού νερού της θάλασσας: υπάρχουν νερά θεικού άλατος (π.χ. οι λίμνες Chaplin Lake, και Saskatchewan του Καναδά), νερά ανθρακικού άλατος (π.χ. η λίμνη Mono Lake, California των ΗΠΑ), και νερά πλούσια σε κάλιο (π.χ. διάφορες λίμνες στη Nebraska των ΗΠΑ).

Η *Artemia* είναι ένας μη εκλεκτικός ηθμοφάγος οργανισμός οργανικών ουσιών, μικροσκοπικών φυκών καθώς επίσης και βακτηριδίων. Οι βιότοποι της *Artemia* παρουσιάζουν χαρακτηριστικά πολύ απλής τροφικής δομής και χαμηλή ποικιλομορφία ειδών, όπου η απουσία θηρευτών και ανταγωνιστών τροφής επιτρέπει στις αλμυρογαρίδες να αναπτυχθούν σε μονοκαλλιέργειες. Δεδομένου ότι η υψηλή αλατότητα είναι το κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα που καθορίζει την παρουσία της *Artemia*, ο αντίκτυπος άλλων παραμέτρων (θερμοκρασία, αρχική παραγωγή τροφής, κ.λπ.) μπορεί να ασκήσει αρνητική επιρροή στην αφθονία του πληθυσμού και να προκαλέσει τελικά μια προσωρινή απουσία του είδους.

Δεδομένου ότι η *Artemia* είναι ανίκανη ενεργητικής διασποράς, ο αέρας και τα υδρόβια πουλιά (ειδικά φλαμίνγκο) είναι οι σημαντικότεροι φυσικοί υπαίτιοι της διασποράς τους, όπου οι επιπλέουσες κύστεις εμμένουν στα πόδια και τα φτερά των πουλιών, και όταν λαμβάνονται παραμένουν άθικτες για τουλάχιστον μερικές ημέρες στην πεπτική οδό των πουλιών. Συνεπώς, η απουσία αποδημητικών πουλιών είναι πιθανώς ο λόγος για τον οποίο ορισμένες περιοχές που είναι κατάλληλες για *Artemia* (π.χ. αλυκές κατά μήκος της βορειοανατολικής ακτής της Βραζιλίας) δεν κατοικούνται φυσικά από τις αλμυρογαρίδες.

Μετά τη φυσική διασπορά των κύστεων, προμελετημένοι εμβολιασμοί *Artemia* σε αλμυρές λίμνες επεξεργασμένες από τον άνθρωπο είχαν καταστεί κοινή πρακτική στο παρελθόν. Από τη δεκαετία του '70 ο άνθρωπος ήταν υπεύθυνος για διάφορες εισαγωγές *Artemia* στη Νότια Αμερική και την Αυστραλία, είτε για τη βελτίωση της παραγωγής αλατιού, είτε για χρήση της στις υδατοκαλλιέργειες. Επιπλέον, οι πληθυσμοί της κοσμοπολίτικης *Artemia* εντοπίζονται σε τροπικές περιοχές με μια απόσταση από την υγρή και ξηρή περίοδο (κλίμα μουσώνων) (π.χ. Κεντρική Αμερική, Νοτιοανατολική Ασία).

Πίνακας 2.1.1. Παγκόσμια κατανομή *Artemia*.
Table. 2.1.1. The world distribution of *Artemia*.

Country	Locality	Sex	Species
<i>Artemia</i> sites in Africa			
Algeria	Chegga Oase	---	---
	Chott Djeloud	---	---
	Chott Ouargla	---	---
	Dayet Morselli	---	---
	Gharabas Lake	---	---
	Sebket Djendli	---	---
	Sebket Ez Zemouk	---	---
	Sebket Oran	---	---
	Tougourt	---	---
Egypt	Port Fouad	B	A. sal
	Wadi Natron	B	A. sal
	Qarun Lake	P	A. par
	Elmenteita	---	---
Kenya			
Libya	Mandara	B	A. sp
	Ramba-Az-Zallaf (Fezzan)	---	---
	Quem el Ma	---	---
	Trouna	---	---
	Gabr Acun (Fezzan)	---	---
Madagascar	Salins de Diego Suarez	---	---
	Ankiembe saltworks	P(3n)	A. par
	Ifaty saltworks	B	A. fra
Morocco	Larache	P	A. par
	Moulaya estuary	---	---
	Qued Ammafatma	---	---
	Qued Chebeica	---	---
	Sebket Bon Areg	---	---
	Sebket Zima	---	---
Mozambique	Lagua Quissico	P	A. par
Namibia	Vineta Swakopmund	P(2n,4n)	A. par
Niger	Teguidda In Tessoun	---	---
Senegal	Dakar	---	---
	Lake Kayar	---	---
	Lake Retba	---	---
	Couga Salt Flats	---	---
South Africa	Swartkops	---	---
Tunisia	Bekalta	B	A. sal
	Chott Ariana	B	A. sal
	Chott El Djerid	---	---
	Megrine	B	A. sal
	Sebket Kowezia	---	---
	Sebket mta Moknine	B	A. sal
	Sebket Sidi el Hani	---	---
	Sfax	B	A. sal
<i>Artemia</i> sites in Australia and New Zealand			
New Zealand	Lake Grassmere	B	A. fra
Queensland	Bowen	---	---
	Port Alma	B	A. fra
	Rockhampton	B	A. fra

Πίνακας 2.1.1. (Συνέχ.) Παγκόσμια κατανομή *Artemia*.
Table. 2.1.1. (Contd.) The world distribution of *Artemia*.

Country	Locality	Sex	Species
South Australia	Dry Creek, Adelaide	P	A. par
West Australia	Dampier	---	---
	Lake Mc Leod	---	---
	Port Hedland	P	A. par
	Rottneest Island	P	A. par
	Shark Bay	P,B	A.par,A.fra
<i>Artemia</i> sites in North America			
Canada	Akerlund Lake	B	A. sp
	Alsask Lake	B	A. sp
	Aroma Lake	B	A. sp
	Berry Lake	B	A. sp
	Boat Lake	B	A. sp
	Burn Lake	B	A. sp
	Ceylon Lake	B	A. sp
	Chain Lake	B	A. sp
	Chaplin Lake	B	A. fra
	Churchill	B	A. sp
	Coral Lake	B	A. sp
	Drybore Lake	B	A. sp
	Enis Lake	B	A. sp
	Frederick Lake	B	A. sp
	Fusilier Lake	B	A. sp
	Grandora Lake	B	A. sp
	Gull Lake	B	A. sp
	Hatton Lake	B	A. sp
	Horizon Lake	B	A. sp
	Ingerbright Nath	B	A. sp
	Landis Lake	B	A. sp
	La Perouse	B	A. sp
	Little Manitou Lake	B	A. fra
	Lydden Lake	B	A. sp
	Mawer Lake	B	A. sp
	Meacham Lake	B	A. sp
	Muskiki Lake	B	A. sp
	Neola Lake	B	A. sp
	Oban Lake	B	A. sp
	Richmond Lake	B	A. sp
	Shoe Lake	B	A. sp
	Snakehole Lake	B	A. sp
	Sybouts Lake-East	B	A. sp
	Sybouts Lake-West	B	A. sp
	Verlo West	B	A. sp
	Vincent Lake	B	A. sp
	Wheatstone Lake	B	A. sp
	Whiteshore Lake	B	A. sp
USA Arizona	Kiatuthlana Red Pond	B	A. fra
	Kiatuthlana Green Pond	B	A. fra

Πίνακας 2.1.1. (Συνέχ.) Παγκόσμια κατανομή *Artemia*.
Table. 2.1.1. (Contd.) The world distribution of *Artemia*.

Country	Locality	Sex	Species	
USA California	Carpinteria Slough	B	A. sp	
	Chula Vista	B	A. sp	
	Mono Lake	B	A.f.mon	
	Moss Landing, Monterey Bay	B	A. fra	
	Owens Lake	B	A. sp	
	San Diego	B	A. sp	
	San Francisco Bay	B	A. fra	
	San Pablo Bay	B	A. fra	
	Vallejo West Pond	B	A. sp	
	USA Hawaii	Christmas Islands	B	A. sp
Hanapepe		B	A. sp	
Laysan Atoll		B	A. fra	
USA Nebraska	Alkali Lake	B	A. sp	
	Ashenburger Lake	B	A. sp	
	Antioch (Potash)Lake	B	A. fra	
	Cook Lake	B	A. sp	
	East Valley Lake	B	A. sp	
	Grubny Lake	B	A. sp	
	Homestead Lake	B	A. sp	
	Jesse Lake	B	A.fra	
	Johnson Lake	B	A. sp	
	Lilly Lake	B	A. sp	
	Reno Lake	B	A. sp	
	Richardson Lake	B	A. fra	
	Ryan Lake	B	A. sp	
	Sheridan County Lake	B	A. sp	
	Sturgeon Lake	B	A. fra	
	USA Nevada	Fallon Pond	B	A. fra
	USA North Dakota	Miller Lake	B	A. sp
Stink (Williams) Lake		B	A. sp	
USA New Mexico	Laguna del Perro	B	A. sp	
	Loving Salt Lake	B	A. sp	
	Quemado	B	A. fra	
USA Oregon	Zuni Salt Lake	B	A. fra	
	Lake Abert	B	A. sp	
USA Texas	Cedar Lake	B	A. fra	
	McKenzies Playa	B	A. sp	
	Mound Playa	B	A. sp	
	Playa Thahoka	B	A. sp	
	Raymondville	B	A. sp	
	Rich Playa	B	A. sp	
	Snow drop Playa	B	A. sp	
	USA Utah	Great Salt Lake	B	A. fra
	USA Washington	Cameron Lake	B	A. fra
		Deposit Thirteen	B	A. fra
Penley Lake		B	A. fra	
Hot (Bitter) Lake		B	A. fra	

Πίνακας 2.1.1. (Συνέχ.) Παγκόσμια κατανομή *Artemia*.
Table. 2.1.1. (Contd.) The world distribution of *Artemia*.

Country	Locality	Sex	Species
	Omak Plateau	B	A. sp
	Soap Lake	B	A. sp
<i>Artemia</i> sites in Central America			
Bahamas	Great Inagua	B	A. sp
	Long Island	B	A. sp
	San Salvador	B	A. sp
Brit. Virgin Islands	Anegada	B	A. sp
Carribbean Islands	Antigua	B	A. sp
	St. Kitts	B	A. sp
	St. Martin	B	A. sp
	South Caicos	B	A. sp
Costa Rica	Gulfo Nicova	B	A. sp
	Bahia salinas, Guanacaste	B	A. fra
Dominican Republic	Isla Cabra	B	A. sp
	Las Calderas	B	A. sp
	Monte Cristi	B	A. sp
	Puerto Alejandro	B	A. sp
	Punta Salinas	B	A. sp
Haiti	Grandes salines	B	A. fra
Mexico Baja Calif. Norte	San Quintin	B	A. fra
Mexico Baja Calif. Sur	Pichilingue, La Paz	B	A. fra
	Guerrero Negro	B	A. fra
	Isla del Carmen	B	A. fra
Mexico Sonora	Laguna de Yavaros	B	A. fra
Mexico Coahuila	Salinas 5 km SE Cuatrociénegas	B	A. sp
Mexico Chiapas	Laguna del Mar Muerto	B	A. sp
	La Joya	B	A. sp
	Buenavista	B	A. sp
	Los Palos	B	A. sp
	Solo Dios	B	A. sp
	Carretas	B	A. sp
	Pereyra	B	A. sp
	Chanchuto	B	A. sp
	Panzacola	B	A. sp
Mexico Estado de Mexico	Brine El Caracol, Sosa Texcoco	B	A. sp
Mexico Oaxaca	Ponds W. Salina Cruz	B	A. sp
Mexico San Luis Potosi	Las Salinas	B	A. sp
Mexico Sinaloa	Bahia de Ceuta	B	A. sp
Mexico Yucatan	San Crisanto	B	A. sp
	Celestun	B	A. sp
	Chuburna	B	A. sp
	Xtampu	B	A. sp
	Las Coloradas	B	A. sp
Netherlands Antilles	Aruba	B	A. sp
	Bonaire Duinmeer	B	A. fra
	Gotomeer	B	A. sp

Πίνακας 2.1.1. (Συνέχ.) Παγκόσμια κατανομή *Artemia*.
Table. 2.1.1. (Contd.) The world distribution of *Artemia*.

Country	Locality	Sex	Species
	Pekelmeer	B	A. sp
	Martinus	B	A. sp
	Slagbaai	B	A. sp
	Curaçao Fuik	B	A. sp
	Rifwater	B	A. sp
Nicaragua	Salinas Grandes, Leon	B	A. fra
Puerto Rico	Bahia Salinas	B	A. fra
	Bogueron	B	A. sp
	Cabo Rojo	B	A. sp
	La Parguera	B	A. sp
	Ponce	B	A. sp
	Tallaboa salterns	B	A. fr
<i>Artemia</i> sites in South America			
Argentina	Bahia Blanca	B	A. sp
	Buenos Aires	B	A. per
	Hidalgo	B	A. per
	Mar Chiquita	B	A. sp
Bolivia	Lake Canapa	B	A. sp
	Lake Chulluncani	B	A. sp
	Lake Hedonia	B	A. sp
	Lake Poopo	B	A. sp
Brazil	Aracati	B	A. sp
	Cabo Frio	B	A. fra
	Fortaleza	B	A. sp
	Icapui	B	A. sp
	Macau	B	A. fra
	Mundau	B	A. sp
Chile	Salar de Surire	B	A. sp
	Playa Yape (Iquique)	B	A. sp
	Salar de Pintados (I Region)	B	A. sp
	Salar de Llamara (II Region)	B	A. sp
		B	A. fra
	Puerto Viejo (Copiapo)	B	A. sp
	La Pampilla (Coquimbo)	B	A. sp
	Palo Colorado (Los Vilos)	B	A. sp
	Salinas de Cahuil (Pichilemu)	B	A. sp
	Salinas de Constitución (VIIB Región)	B	A. sp
Colombia	Galerazamba	B	A. sp
	Manaure	B	A. sp
Ecuador	Galapagos (S.Salvador)	B	A. fra
	Pacoa	B	A. sp
	Salinas	B	A. sp
Peru	Caucato	B	A. sp
	Chicama	B	A. sp
	Chilca	B	A. sp
	Estuario de Virrila	B	A. sp

Πίνακας 2.1.1. (Συνέχ.) Παγκόσμια κατανομή *Artemia*.
Table. 2.1.1. (Contd.) The world distribution of *Artemia*.

Country	Locality	Sex	Species
Venezuela	Guadalupe	B	A. sp
	Pampa de Salinas	B	A. sp
	Pampa Playa Chica	B	A. sp
	Puerto Huarmey	B	A. sp
	Tumbes	B	A. sp
	Boca Chica	B	A. sp
	Coya Sal	B	A. sp
	Coche	B	A. sp
	Coro Coastline	B	A. sp
	La Orchila	B	A. sp
	Las Aves	B	A. sp
	Los Roques	B	A. sp
	Port Araya	B	A. sp
Tucacas	B	A. sp	
<i>Artemia</i> sites in Asia			
P.R. China Liaoning	Jinzhou	P	A. par
	Yingkou	P(2,4,5n)	A. par
	Dongjiagou	P(2n)	A. par
	Pulandian	P(2n)	A. par
	Lushun	P(2,4,5n)	A. par
	Fuzhouwan	P	A. par
P.R. China Hebei	Nanpu	P(2n)	A. par
	Luannan	P	A. par
	Daqinghe	P	A. par
	Huanghua	P(2n)	A. par
	Shangyi	B	A. sin
	Zhangbei	B	A. sin
P.R. China Tianjin	Kangbao	B	A. sin
	Hangu	P(2n)	A. par
	Tanggu	P(2,4,5n)	A. par
P.R. China Shandong	Chengkou	P(2n)	A. par
	Yangkou	P(2n)	A. par
	Dongfeng	P(2,5n)	A. par
	Gaodao	P	A. par
	Xiaotan	P	A. par
P.R. China Jiangsu	Nanwan	P	A. par
	Jimo	P	A. par
	Xuyu	P	A. par
P.R. China Zhejiang	Lianyungang	P	A. par
	Zhanmao	P	A. par
	Shunmu	P	A. par
P.R. China Fujian	Zhujiajian	P	A. par
	Shanyao	P	A. par
	Xigang	P	A. par
P.R. China Guangdong	Huian	P	A. par
		P	A. par
P.R. China Hainan	Dongfang	P	A. par
	Yinggehai	P(2,4,5n)	A. par

Πίνακας 2.1.1. (Συνέχ.) Παγκόσμια κατανομή *Artemia*.
Table. 2.1.1. (Contd.) The world distribution of *Artemia*.

Country	Locality	Sex	Species
P.R. China Xinjiang	Aibi	P(2,4n)	A. par
	Dabancheng	P(2,3,4,5n)	A. par
	Balikun	P(2,4n)	A. par
P.R. China Tibet	Aletai	B	A. sp
	Yanjing	B	A. sp
	Shenzha	B	A. sp
	Bange	---	---
	Gaize	---	---
	Geji	---	---
	Zhangchaka	---	---
	Wumacuo	---	---
	Jibuchaka	---	---
	Dongcuo	---	---
P.R. China Qinghai	Gahai	P(2n)	A. par
	Xiaocaidan	P	A. par
	Dacaidan	P	A. par
	Suban	P	A. par
	Keke	P(4n)	A. par
	Chaka	P	A. par
	Tuosu	P	A. par
P.R. China Gansu	Gaotai	B	A. sp
P.R. China Inner Mongolia (Y = Yimeng Area) (X = Ximeng Area)	Haolebaoji(Y)	B	A. sin
	Haotongyin(Y)	B	A. sin
	Taigemiao(Y)	B	A. sin
	Ejinor(X)	B	A. sin
	Beidachi(Y)	B	A. sin
	Jilantai	B	A. sin
	Wuqiangi	B	A. sin
	Shanggendalai(X)	B	A. sin
	Dagenor(X)	B	A. sin
	Bayannor(X)	B	A. sin
	Zhunsaihannor	B	A. sin
	Erendabusen	B	A. sin
	Chagannor(X)	B	A. sin
	Huhetaolergai(Y)	B	A. sin
	Hangjinqi	B	A. sin
P.R. China Ningxia		---	---
P.R. China Shaanxi	Dingbian	---	---
P.R. China Shanxi	Yuncheng	B	A. sin
India Rajasthan	Didwana	---	---
India Gujarat	Sambhar Lake	---	---
	Gulf of Kutch	P	A. par
	Balamba salterns	P	A. par
	Mithapur	P	A. par
India Bombay	Jamnagar	---	---
	Vadala	---	---

Πίνακας 2.1.1. (Συνέχ.) Παγκόσμια κατανομή *Artemia*.
Table. 2.1.1. (Contd.) The world distribution of *Artemia*.

Country	Locality	Sex	Species
	Bhayander	P	A. par
	Bahinder	---	---
India Madras	Kelambakkam	---	---
	Vedaranyam	---	---
India Tuticorin	Veppalodai	---	---
	Pattanamaruthur	---	---
	Spic Nagar	---	---
	Thirespuram	---	---
	Karsewar Island	---	---
	Saltwater springs	P	A. par
	Harbour	---	---
India Kanyakumari	Thamaraikulam	P	A. par
Iraq	Abu-Graib, Baghdad	P	A. par
	Basra	---	---
	Dayala	---	---
	Mahmoodia	---	---
Iran	Urmia Lake	B	A. urm
	Schor-Gol	---	---
	Shurabil	---	---
	Athlit	---	---
Israel	Eilat North	P	A. par
	Eilat South	---	---
Japan	Chang Dao	---	---
	Tamano	---	---
	Yamaguchi	P	A. par
Kuwait		---	---
Korea	Pusan	---	---
Pakistan	Karachi saltworks	P	A. par
Sri Lanka	Bundala	---	---
	Hambantota	---	---
	Palavi	---	---
	Putallam	P	A. par
Taiwan	Peinan Salina	---	---
	Beimen	B	A. sp
Turkey	Balikesir, Aivalik	---	---
	Camalti, Izmir	P	A. par
	Tuz Golii	---	---
	Ankara Salt Lake	---	---
	Konya Karapinar-Meke Salt Lake	---	---
	Imbros	---	---
<i>Artemia</i> sites in Europe			
Bulgaria	Burgas	P	A. par
	Pomorye	---	---
Croatia	Secovlje, Portoroz	P(4n)	A. par
	Strunjan	P	A. par
	Ulcinj	P	A. par
Cyprus	Akrotiri Lake	---	---

Πίνακας 2.1.1. (Συνέχ.) Παγκόσμια κατανομή *Artemia*.
Table. 2.1.1. (Contd.) The world distribution of *Artemia*.

Country	Locality	Sex	Species
	Larnaca Lake	B	A. sal
France	Aigues Mortes	P	---
	Carnac-Trinité sur Mer	---	---
	Guérande-le Croisic	P	A. par
	La Palme	---	---
	Lavalduc	P	A. par
	Mesquer-Assérac	---	---
	Porte La Nouvelle	---	---
	Salin de Berre	P	A. par
	Salin de Fos	---	---
	Salin de Giraud	P	A. par
	Salins d'Hyères	---	---
	Salin des Pesquiers	---	---
	Sète	P	A. par
Greece	Citros, Pieria	P(4n)	A. par
	Megalon Embolon, Thessaloniki	P(4n)	A. par
	Kalloni, Lesbos	P(4n)	A. par
	Polychnitos, Lesbos	P(4n)	A. par
	Mesolongi	P	A. par
	Milos Island	P	A. par
Italy	Quartu or salina di Poetto, Cagliari	B	A. sal
	Carloforte, Sardinia	B	A. sal
	Cervia, Ravenna	P(4n)	A. par
	Commachio, Ferrara	P(4n)	A. par
	Margherita di Savoia, Foggia	P(2,4n)	A. par
	Sant' Antioco, Sardinia	B	A. sal
	Santa Gilla, Sardinia	P(2n)	A. par
	Siracuse, Sicily		
	Tarquini, Viterbo	B	A. sal
	Trapani, Sicily	B	A. sal
Portugal	Alcochete	P	A. par
	Tejo estuary	---	---
	Sado estuary	---	---
	Ria de Aveiro	---	---
	Ria de Farc	---	---
Romania	Lake Techirghiol	P	A. par
	Lacul Sârat Brâila	P	A. par
	Movila Miresii	---	---
Romania Slâric Prahova	Baia Baciului	P	A. par
Romania Slâric Prahova	Baia Neagrâ, SP	P	A. par
	Baia Verde I, SP	P	A. par
	Baia Verde II, SP	P	A. par
	Baia Verde III, SP	P	A. par
	Baia Rosie, SP	P	A. par
Romania Telega	Telega Bâi	P	A. par
	Telega II	P	A. par

Πίνακας 2.1.1. (Συνέχ.) Παγκόσμια κατανομή *Artemia*.
Table. 2.1.1. (Contd.) The world distribution of *Artemia*.

Country	Locality	Sex	Species
	Telega III	P	A. par
	Ocra Sibiului	P?	
	Sovata	P?	
Spain Alava	Añana	P(4n)	A. par
Spain Albacete	Petrola	P(4n)	A. par
	Pinilla	P(4n)	A. par
Spain Alicante	Bonmati, S.Pola	B,P(2,4n)	mixed
	Bras de Port, S.Pola	B	m
	Calpe	P(2n)	A. par
	La Mata	P(2n)	A. par
	Molina del Segura	B	
	Salinera Espanola, S. Pola	B	
	Villena	B	
Spain Burgos	Poza de la Sal	B	A. sp
Spain Cadiz	Sanlucar de Barrameda	P	A. par
	Dos hermanos	B, P(2n)	mixed
	San Eugenio	B, P(2n)	mixed
	San Felix	B	A. sal
	San Fernando	B	A. sal
	San Juan	B, P	mixed
	San Pablo	B, P	mixed
	Santa Leocadia	B, P	mixed
	Barbanera	B	A. sal
Spain Canary islands	Janubio, Lanzarote	P(2n)	A. par
Spain Cordoba	Encarnacion	P(4n)	A. par
	Puente Montilla	P(4n)	A. par
Spain Formentera	Salinera Espanola,	B	A. sal
Spain Guadalajara	Armalla	P(4n)	A. par
	Imon	P(4n)	A. par
	Olmeda	P(4n)	A. par
	Rienda	P(4n)	A. par
Spain Huelva	Ayamonte	P(2n)	A. par
	Lepe	P(2n)	A. par
	Isla Cristina	P(2n)	A. par
	San Juan del Puerto	B	A. sal
Spain Huesca	Rolda	P	A. par
	Peralta de la Sal	P	A. par
Spain Ibiza island	Salinera Espanola		
Spain Jaen	San Carlos		
	Don Benito		
Spain Malaga	Fuente de Piedra		
Spain Mallorca	Campos del Puerto	B	A. sal
Spain Murcia	San Pedro del Pinatar	B	A. sal
	Jumilla	B	A. sal
	sal. Punta Galera	B	A. sal
	sal. Catalana	B	A. sal
Spain Soria	Medinaceli	P(4n)	A. par
Spain Tarragona	Delta del Ebro	P(4n)	A. par

Πίνακας 2.1.1. (Συνέχ.) Παγκόσμια κατανομή *Artemia*.
Table. 2.1.1. (Contd.) The world distribution of *Artemia*.

Country	Locality	Sex	Species
Spain Teruel	Arcos de las Salinas	P(4n)	A. par
Spain Zaragoza	Chiprana	P(4n)	A. par
	Bujaralo	P(4n)	A.par
<i>Artemia</i> sites in former USSR			
Russia	Bolshoe Otar Mojnakhsho		
	Bolshoe Yarovoe	P	
	Maloe		
	Yarovoe/Mojnakshoe/Dscharylgach		
	Ghenicheskoe		
	Karachi Lake		
	Kujalnic liman	P	A.par
	Mangyshlak peninsula		
	Schekulduk	P	
	Tanatar	B	A. par
	Kulundinskoe	P	
	Soljonoe	P	
	Mirabilit	P	
	Bolshoe Shklo	P	A. par
	Kurichye	P	
	Buazonsor	P	
	Mormishanskoe A	P	
	Mormishanskoe B	P	
	Kutchukskoe	P	
		P	
Kazakhstan	Maraldi	P	
	Sejten	P	
Turkmenistan		P	
Ukraina	Popovskoe (=Ojburgskoe)	P	
	Tchokraskoe	B	
	Tobetchikskoe	P	
	Shtormovoe	B	
	Sakskoe		
	Sasyk		

P = parthenogenetic strain

B = bisexual strain

A. par = *Artemia parthenogenetica*

A. sal = *Artemia salina* (= *A. tunisiana*)

A. fr = *Artemia franciscana*

A. fr. mon = *Artemia franciscana monica*

A. per = *Artemia persimilis*

A. urm = *Artemia urmiana*

A. sin = *Artemia sinica*

A. sp = *Artemia* species (unknown)

2.1.2.3. Ταξινόμηση

Το γένος *Artemia* είναι μια πολύπλοκη ομάδα ειδών και υπέρ-ειδών, που καθορίζεται από το κριτήριο της αναπαραγωγικής απομόνωσης. Οι πρώτοι ταξινομητές όρισαν τα ονόματα των ειδών στους πληθυσμούς από τις διαφορετικές μορφολογίες, που συλλέχθηκαν στις διαφορετικές θερμοκρασίες και αλατότητες. Αργότερα, η αφθονία των ονομάτων εγκαταλείφθηκε και όλη η ομάδα της αλμυρογαρίδας αναφέρθηκε ως *Artemia salina* (Linnaeus 1758). Μερικοί ερευνητές συνεχίζουν αυτήν την πρακτική ως σήμερα. Γενικά, υπάρχουν διαφορετικά ονόματα για τους αναπαραγωγικά απομονωμένους πληθυσμούς ή το άθροισμα των πληθυσμών:

- *A. salina* (Linnaeus 1758): Lymington, Αγγλία (τόρα εκλείπει), Μεσογειακή περιοχή
- *A. tunisiana* (Bowen and Sterling 1978) συνώνυμο της *A. salina*)
- *A. parthenogenetica* (Barigozzi, 1974), (Bowen and Sterling 1978): Ευρώπη, Αφρική, Ασία, Αυστραλία
- *A. urmiana* (Gunther 1990): Ιράν
- *A. sinica* (Yaneng 1989): Κεντρική και Ανατολική Ασία
- *A. persimilis* (Piccinelli and Prosdocimi 1968): Αργεντινή
- *A. Franciscana* υπερείδος: Αμερική, Καραϊβική Ειρηνικός Ωκεανός
- *Artemia sp.* (Pilla and Beardmore 1994): Καζακστάν

Η συνύπαρξη δύο ειδών στον ίδιο αλατούχο βιότοπο είναι δυνατή: τα μίγματα παρθενογενετικών και φυλετικών πληθυσμών έχουν αναφερθεί στις μεσογειακές αλυκές. Επιπλέον, οι εμπορικές επιχειρήσεις υδατοκαλλιέργειών έχουν σπείρει τις αλυκές με τις εισαγόμενες κύστες σε πολλές περιπτώσεις. Η *A. franciscana* που εισάγεται από την Ασία, την Αυστραλία, και τη Νότια Αμερική, κατά τη διάρκεια των τελευταίων 20 ετών. Επειδή οι νέοι πληθυσμοί είναι συνεχώς σταθερά χαρακτηρισμένοι, οι επιστήμονες ωθούνται για να χρησιμοποιήσουν την ονομασία *Artemia sp.*, εκτός αν έχουν ικανοποιητικά βιοχημικά, κυτταρογενετικά ή μορφολογικά στοιχεία για τον προσδιορισμό του ονόματος του είδους.

Η παγκόσμια κατανομή της αλμυρογαρίδας σε ποικίλους απομονωμένους βιότοπους, χαρακτηρίζεται από τους οικολογικούς όρους της και επιπλέον έχει οδηγήσει στο διαχωρισμό πολυάριθμων γεωγραφικών στελεχών ή γενετικά στους διαφορετικούς πληθυσμούς μέσα στα ίδια είδη, ιδίως στην παρθενογενετική *Artemia* με τους 2-, 3-, 4- και 5-απλοειδείς πληθυσμούς, επιδεικνύοντας μια ευρεία παραλλαγή γενότυπου. Μεταξύ αυτών των τύπων ένας υψηλός βαθμός γενετικής ποικιλίας καθώς επίσης και μια μοναδική ποικιλομορφία στα διάφορα ποσοτικά χαρακτηριστικά έχουν παρατηρηθεί. Μερικά από αυτά τα χαρακτηριστικά (π.χ. η θρεπτική αξία του νέο-εκκολαπτόμενου ναύπλιου) είναι φαινοτυπικά όπως και υπόκεινται αλλαγής από χρόνο σε χρόνο ή από εποχή σε εποχή. Άλλα, εντούτοις (π.χ. διάμετρος κύστεων, ποσοστό αύξησης, αντίσταση σε υψηλές θερμοκρασίες) είναι ειδο-ειδικά και παραμένουν σχετικά σταθερά, (δηλ. έχουν γίνει γενοτυπικά ως αποτέλεσμα των μακροπρόθεσμων προσαρμογών των στελεχών στις τοπικές συνθήκες) (βλ. 2.1.2.4.).

2.1.2.4. Ειδο-ειδικά χαρακτηριστικά

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ενώ η θρεπτική αξία μπορεί να διευθετηθεί, άλλες ποιοτικές ιδιότητες για χρήση στις υδατοκαλλιέργειες μπορούν να ληφθούν από την επιλογή του στελέχους ή και της διασταύρωσης φυλών. Αν και μέχρι σήμερα πάνω από το 90% όλων των πωληθέντων κύστεων έχουν προέλθει από την λίμνη Great Salt Lake, οι κύστες *Artemia* είναι διαθέσιμες στο εμπόριο από διάφορες πηγές παραγωγής στην Αμερική, την Ασία, την Αυστραλία και την Ευρώπη. Μια γνώση των χαρακτηριστικών (γενοτυπικών και φαινοτυπικών) μιας ιδιαίτερης παρτίδας κύστεων μπορεί πολύ να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της χρήσης της σε ένα εκκολαπτήριο ψαριών ή γαριδών.

ΜΕΓΕΘΟΣ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ

Η θρεπτική αποτελεσματικότητα ενός οργανισμού που χρησιμοποιείται ως τροφή καθορίζεται πρώτιστα από την ικανότητά του να λαμβάνει τροφή και κατά συνέπεια, από το μέγεθος και τη μορφή της (βλ. 2.3.3.). Τα στοιχεία όσο αφορά τη βιομετρία του ναύπλιου διαφόρων στελεχών *Artemia* δίνονται στον Πίνακα 2.1.2.

Πίνακας 2.1.2. Μέγεθος, ατομικό ξηρό βάρος και ενεργειακό περιεχόμενο ναύπλιου *Artemia* instar I από διάφορες πηγές κύστεων που εκκολάφθηκαν σε σταθερές συνθήκες (35 g l⁻¹, 25°C).
Table 2.1.2. Size, individual dry weight and energy content of *Artemia* instar I nauplii from different cyst sources hatched in standard conditions (35 g l⁻¹, 25°C).

cyst source	length (mm)	dry weight (μg)	energy content (10 ⁻³ Joule)
San Francisco Bay, CA-USA	428	1.63	366
Macau, Brazil	447	1.74	392
Great Salt Lake, UT-USA	486	2.42	541
Shark Bay, Australia	458	2.47	576
Chaplin Lake, Canada	475	2.04	448
Tanggu, Bohai Bay, PR China	515	3.09	681
Aibi Lake, PR China	515	4.55	-
Yuncheng, PR China	460	2.03	-
Lake Urmiah, Iran	497	-	-

Πολλά στελέχη μπορούν να διαφοροποιηθούν βάσει των βιομετρικών χαρακτηριστικών τους. Παρά τις μικρές παραλλαγές μεταξύ των παρτίδων ίδιου στελέχους, που προκαλούνται ενδεχομένως από περιβαλλοντικούς ή και παράγοντες επεξεργασίας γενικά η διάμετρος των κύστεων διαφορετικών παρτίδων παραγωγής του ίδιου στελέχους παραμένει μάλλον σταθερή. Άλλα βιομετρικά χαρακτηριστικά όπως ο όγκος των κύστεων, το ξηρό βάρος των κύστεων, το μήκος του ναύπλιου instar I, το ατομικό βάρος του ναύπλιου και ο όγκος του ναύπλιου, το ενεργειακό περιεχόμενο κ.α., παρουσιάζουν υψηλό συσχετισμό με τη διάμετρο των κύστεων. Κατά συνέπεια, οι βιομετρικές παράμετροι και ιδιαίτερα η διάμετρος των κύστεων, είναι καλά εργαλεία για να χαρακτηρίσουν τα στελέχη *Artemia* και για να βοηθήσουν να καθορίσουν της προέλευσης των άγνωστων ή ακόμα και μικτών δειγμάτων κύστεων.

ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΕΚΚΟΛΑΨΗΣ

Οι συγκριτικές μελέτες της συμπεριφοράς εκκόλαψης των κύστεων διαφορετικής προέλευσης παρουσιάζουν μια ιδιαίτερη παραλλαγή στο ποσοστό εκκόλαψης, το ρυθμό και της αποδοτικότητας. Εντούτοις, καμία από αυτές τις παραμέτρους δεν είναι ειδο-ειδική καθώς επηρεάζονται από μια ποικιλία παραγόντων όπως τις τεχνικές συγκομιδής, επεξεργασίας, αποθήκευσης και εκκόλαψης, καθώς επίσης και τις συνθήκες παραγωγής που έχουν επιπτώσεις στην παραγωγή κύστεων. Για βέλτιστη χρήση της *Artemia* στις υδατοκαλλιέργειες τα χαρακτηριστικά εκκόλαψης οποιασδήποτε παρτίδας κύστεων που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι γνωστά. Περισσότερες πληροφορίες δίνονται στην ενότητα 2.2.5.2.

ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΟΥ ΝΑΥΠΛΙΟΥ II

Οι τυποποιημένες δοκιμές καλλιέργειας με τις αλμυρογαρίδες από διαφορετική γεωγραφική προέλευση παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στο ποσοστό αύξησης ακόμη και μέσα στα ίδια στελέχη, αλλά όχι μεταξύ των παρτίδων των στελεχών (Πίνακας 2.1.3.). Παρότι, και στο πεδίο η πληθυσμιακή αύξηση της *Artemia* (δηλ. μετά από τον εμβολιασμό) καθορίζεται από πολλούς παράγοντες, η επιλογή του στελέχους με υψηλό ρυθμό αύξησης θα έχει έναν θετικό αντίκτυπο στη μέγιστη παραγωγή.

Πίνακας 2.1.3. Αύξηση ναυπλίων *Artemia* από διάφορες πηγές κύστεων κάτω από σταθερές συνθήκες καλλιέργειας (7 ημέρες, 10 instar I/25 ml, 35 g l⁻¹, 25°C, ταϊσμένων με *Dunaliella viridis*).
Table 2.1.3. Growth of *Artemia* nauplii from different cyst sources under standard culture conditions (7 days, darkness, 10 instar I nauplii/25 ml, 35 g l⁻¹, 25°C, fed with *Dunaliella viridis*).

cyst source	growth expressed as % recorded for reference strain (SFB, batch 1)
San Francisco Bay, CA-USA, batch 1	96
San Francisco Bay, CA-USA, batch 2	96
Macau, Brazil, batch 1	98
Macau, Brazil, batch 2	103
Great Salt Lake, UT-USA, batch 1	125
Great Salt Lake, UT-USA, batch 2	127
Shark Bay, Australia	95
Chaplin Lake, Canada	130
Tanggu, Bohai Bay, PR China	110
Aibi Lake, PR China	105
Yuncheng, PR China	109

ΑΝΤΟΧΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ

Και η θερμοκρασία και η αλατότητα έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην επιβίωση και την αύξηση, όπου η επίδραση της θερμοκρασίας είναι εντονότερη. Ένα μεγάλο εύρος των θερμοκρασιών και των αλατότητας καλύπτει τις απαιτήσεις του είδους για

επιβίωση >90%. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της θερμοκρασίας και της αλατότητας είναι περιορισμένη και ουσιαστικές διαφορές στην αντοχή έχουν καταγραφεί στις χαμηλές αλατότητες (περίπου 5 g l⁻¹) και τις υψηλές θερμοκρασίες (30-34°C). Στις μεγάλες θερμοκρασίες η επιβίωση του GSL στελέχους είναι σημαντικά υψηλότερη απ' ό τι των άλλων στελεχών.

ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ ΙΣΤΟΡΙΑΣ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ

Η ιστορία ζωής και τα αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά των στελεχών της *Artemia* είναι σημαντικοί παράγοντες όταν εξετάζεται η εισαγωγή της αλμυρογαρίδας σε ένα νέο βιότοπο, ειδικά όταν ο ανταγωνισμός με ένα τοπικό στέλεχος είναι αναμενόμενος. Αυτές οι ανταγωνιστικές ιδιότητες συσχετίζονται με παράγοντες όπως το μήκος της αναπαραγωγικής, προ και μετά-αναπαραγωγικής περιόδου, τη συνολική διάρκεια ζωής, τον αριθμό απογόνων ανά γέννα, των γεννήσεων ανά θηλυκό, του χρόνου μεταξύ των γεννήσεων κ.α. Γενικά, οι νέοι παγκόσμιοι (αμφίφυλοι) πληθυσμοί έχουν έναν πολύ μεγάλο αριθμό απογόνων ανά γέννηση, ένα μεγάλο αριθμό απογόνων ανά ημέρα ανά θηλυκό και ένα γρήγορο χρόνο ανάπτυξης στη σεξουαλική ωριμότητα, η οποία ευνοεί αυτήν την ομάδα.

Η ηλικία της πρώτης αναπαραγωγής είναι ένας σημαντικός παράγοντας που καθορίζει το ποσοστό πληθυσμιακής αύξησης και το ποσοστό αποίκισης των νέων περιβαλλόντων με περιορισμένους θρεπτικούς πόρους. Συνεπώς, εάν οι περιβαλλοντικές προτιμήσεις και οι θρεπτικοί παράγοντες δεν παρεμβαίνουν, τα νέα παγκόσμια αμφίφυλα στελέχη γενικά ανταγωνίζονται με παρθενογενετικά στέλεχη. Τα πειράματα εμβολιασμού στους φυσικούς βιότοπους επομένως απαιτούν διαλογή των υποψήφιων στελεχών και των ενδεχόμενων τοπικών πληθυσμών, καθώς επίσης και τη μελέτη των επικρατουσών περιβαλλοντικών συνθηκών. Η ανεξέλεγκτη εισαγωγή *Artemia* μπορεί έτσι να οδηγήσει σε μια μείωση της φυσικής ποικιλομορφίας. Επομένως, προτού να πραγματοποιηθεί ο εμβολιασμός τοπικών στελεχών *Artemia* σε έναν βιότοπο, ικανοποιητικό υλικό κύστεων του τοπικού πληθυσμού πρέπει να συλλεχθεί και να αποθηκευτεί προκειμένου να προστατευθεί ο γονιδιακός του πλούτος.

ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ

Προς το τέλος της δεκαετίας του '70, όταν άρχισαν να πηγαίνουν καλά πολλά εμπορικά εκκολαπτήρια ψαριών και γαρίδων, η μεταπήδηση από μια πηγή *Artemia* σε άλλη προκάλεσε απροσδόκητα προβλήματα (Πίνακας 2.1.4.). Οι πολύ σημαντικές διαφορές στα εδάφη παραγωγής επηρέασαν ακόμη και τις ευδιάκριτες παρτίδες *Artemia* ίδιας γεωγραφικής προέλευσης. Ειδικά, το σχήμα των ολικών λιπιδίων και η σύνθεση λιπαρών οξέων, καθώς επίσης και ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων στην *Artemia*, φάνηκαν να διαφέρουν σημαντικά από στέλεχος σε στέλεχος και ακόμη από παρτίδα σε παρτίδα, με συνέπεια τις συνεχείς διακυμάνσεις στη βιοχημική σύνθεση των αρχικών παραγωγών (κυρίως μονοκύτταρων φυκών) διαθέσιμων στον ενήλικο πληθυσμό. Οι κύστες από ηπειρωτικές περιοχές είναι πιο σταθερές στη σύστασή τους, που όμως βρίσκεται σε χαμηλά υπό-βέλτιστα επίπεδα. Κατάλληλες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί έτσι για να βελτιώσουν το λιπιδικό προφίλ των στελεχών *Artemia*, εκμεταλλευόμενες στην ιδιότητα της για ηθμοφαγία.

Εφαρμόζοντας μεθόδους συμπλήρωσης απλών λιπόφιλων ενώσεων μπορούν να ενσωματωθούν εύκολα στην *Artemia* πριν προσφερθεί ως θήραμα (βλ. 2.4.).

Διάφορες άλλες ενώσεις εμφανίζονται επίσης να διαφέρουν από στέλεχος σε

στέλεχος: θρεπτικά συστατικά όπως το συνολικό ποσό των ελεύθερων αμινοξέων, χρωστικές (κανθαξανθίνη ή canthaxanthin), βιταμίνη C, μέταλλα και ιχνοστοιχεία, καθώς επίσης συγκεντρώσεις χημικών όπως φυτοφάρμακα και βαρέα μέταλλα. Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτές οι παραλλαγές δεν είναι χαρακτηριστικά των στελεχών, αλλά ακριβώς αντιστοιχούν στις διαφορετικές συνθήκες παραγωγής. Παρόλα αυτά, η επίδρασή τους στην επιτυχία της καλλιέργειας των νυμφών είναι συνήθως λιγότερο σημαντικά.

Πίνακας 2.1.4. Αύξηση και επιβίωση των ψαριών και οστρακόδερμων που ταϊστήκαν με ναύπλιους *Artemia* από διαφορετικές πηγές κύστεων.

Table 2.1.4. Growth and survival of fish and crustacean larvae fed with *Artemia* nauplii from different cyst sources.

cyst source	species tested	survival	growth
San Francisco Bay, CA-USA, various batches	<i>Mysidopsis bahia</i>	+	+
	<i>Palaemon serratus</i>	+	+
	<i>Cyprinus carpio</i>	+	+
	<i>Solea solea</i>	+	+
	<i>Scophthalmus maximus</i>	+/-	+/-
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	+	+
Macau, Brazil, various batches	<i>Mysidopsis bahia</i>	+	+
	<i>Cancer irroratus</i>	+	+
	<i>Menidia menidia</i>	+	±
	<i>Cyprinus carpio</i>	+	±
	<i>Scophthalmus maximus</i>	+	+
	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	+	±
Great Salt Lake, UT-USA, various batches	<i>Mysidopsis bahia</i>	+/-	+/-
	<i>Cancer irroratus</i>	-	-
	<i>Palaemon serratus</i>	-	-
	<i>Penaeus vannamei</i>	-	-
	<i>Menidia menidia</i>	+	+
	<i>Cyprinus carpio</i>	+	+
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	-	-
Shark Bay, Australia	<i>Mysidopsis bahia</i>	+	+
	<i>Cancer irroratus</i>	+	+
	<i>Menidia menidia</i>	+	+
	<i>Cyprinus carpio</i>	+	+
	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	+	+
Chaplin Lake, Canada	<i>Mysidopsis bahia</i>	±	±
	<i>Menidia menidia</i>	±	-
	<i>Cyprinus carpio</i>	+	-
	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	+	±
Tianjin, Bohai Bay, PR China	<i>Pagrus major</i>	+	±
	<i>Mysidopsis bahia</i>	+	+
	<i>Menidia menidia</i>	+	+
	<i>Cyprinus carpio</i>	+	+
Tianjin, Bohai Bay, PR China	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	+	+
	<i>Mysidopsis bahia</i>	+	+
	<i>Menidia menidia</i>	+	+
	<i>Cyprinus carpio</i>	+	+

2.1.3. Παραπομπές

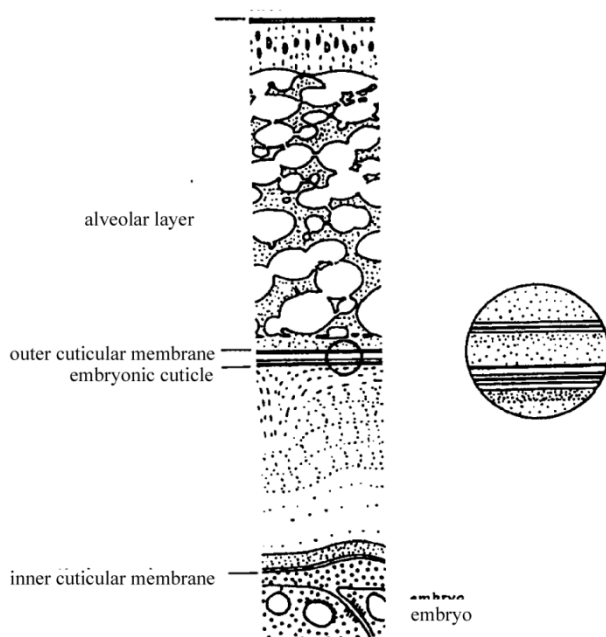
- Beardmore, J.A., Pilla, E.J., and Thomas, K.M. 1994. Genetic variation in *Artemia*: speciation, reproductive mode and potential for exploitation. In: Book of abstracts of contributions presented at the International Conference "Improvement of the commercial production of marine aquaculture species". G. Gajardo and P. Coutteau (Eds), Puerto Montt, Chile, 5-9, December 1994.
- Browne, R.A. and Bowen, S.T. 1991. Taxonomy and population genetics of *Artemia*. In: *Artemia* Biology. Browne, R.A., P. Sorgeloos and C.N.A. Trotman (Eds), CRC Press, Boca Raton Ann Arbor Boston, USA, pp 221 -235.
- Browne, R.A. and Halanych, K.M. 1989. Competition between sexual and parthenogenetic *Artemia*: are-evaluation (Branchiopoda, Anostraca). *Crustaceana*, 57 (1) :57-71.
- Browne, R.A., Li, M., Wanigasekera, G., Simonek, S., Brownlee, D., Eiband, G. and Cowan, J. 1993. Ecological, physiological and genetic divergence of sexual and asexual (diploid and polyploid) brine shrimp (*Artemia*). *Trends in Ecology*: 1-114.
- Browne, R.A., Sallee, S.E., Grosch, D.S., Segreti, W.O. and Purser, S.M. 1984. Partitioning genetic and environmental components of reproduction and lifespan in *Artemia*. *Ecology*, 65 (3): 949-960.
- Lavens, P. and Sorgeloos, P. 1987. The cryptobiotic state of *Artemia* cysts, its diapause deactivation and hatching, a review. In: *Artemia* Research and its Applications, Vol. 3. Sorgeloos, P., D.A. Bengtson, W. Decler and E. Jaspers (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp 27 -63.
- Léger, Ph., Bengtson, D.A., Sorgeloos, P., Simpson, K.L. and Beck, A.D. 1987 . The nutritional value of *Artemia*, a review. In: *Artemia* Research and its Applications, Vol. 3. Sorgeloos, P., D.A. Bengtson, W. Decler and E. Jaspers (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp 357 -372.
- Persoone, G. and Sorgeloos, P. 1980. . General aspects of the ecology and biogeography of *Artemia*. In: *The brine shrimp Artemia*. Vol. 3. Ecology, culturing, use in aquaculture. Persoone, G., P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp 3-24.
- Pilla, E.J.S and Beardmore, J.A. 1994. Genetic and morphometric differentiation in Old World bisexual species of the brine shrimp (*Artemia*). *Heredity*, 7 2: 47 -56.
- Tackaert, W. and Sorgeloos, P. 1991. Semi-intensive culturing in fertilized ponds. In: *Artemia* Biology. Browne, R.A, P. Sorgeloos and C.N.A. Trotman (Eds), CRC Press, Boca Raton Ann Arbor Boston, USA, pp 287-315.
- Triantaphyllidis, G.V., Zhang, B., Zhu, L. and Sorgeloos, P. 1994. International Study on *Artemia*. L. Review of the literature on *Artemia* from salt lakes in the People's Republic of China. *International Journal of Salt Lake Research*, 3:1-12.
- Vanhaecke, P., Tackaert, W. and Sorgeloos, P. 1987 . The biogeography of *Artemia*: an updated review. In: *Artemia* research and its applications. Vol. 1. Morphology, genetics, strain characterisation, toxicology. Sorgeloos, P., D.A. Bengtson, W. Decler and E. Jaspers (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp 129-155.

2.2. Χρήση των κύστεων

2.2.1. Βιολογία κύστεων

2.2.1.1. Μορφολογία κύστεων

Ένα σχηματικό διάγραμμα της δομής μιας κύστης *Artemia* δίνεται στην Εικ. 2.2.1.

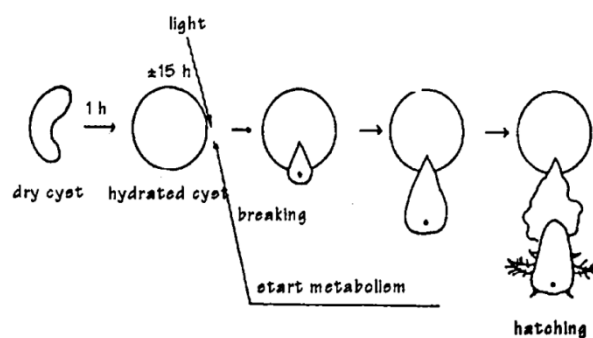


Εικ. 2.2.1. Σχηματικό διάγραμμα της υπερ-δομής κύστης *Artemia*. (Morris and Afzelius, 1967).
Fig. 2.2.1. Schematic diagram of the ultrastructure of an *Artemia* cyst. (Morris and Afzelius, 1967).

Το κέλυφος της κύστης αποτελείται από τρία στρώματα:

- φατνιακό (alveolar) στρώμα: ένα σκληρό στρώμα που αποτελείται από λιποπρωτεΐνες (lipoproteins) εμποτισμένες με χιτίνη (chitin) και αιματίνη (haematin), όπου η συγκέντρωση αιματίνης καθορίζει το χρώμα του κελύφους, δηλ. από ανοιχτό σε σκοτεινό καφέ χρώμα. Η κύρια λειτουργία της είναι να προσφέρει προστασία για το έμβryo ενάντια στη μηχανική διάλυση και τη UV ακτινοβολία. Αυτό το στρώμα μπορεί να αφαιρεθεί εντελώς (διάλυση) με επεξεργασία οξείδωσης με υποχλωριώδες (= αποκελυφοποίηση κύστεων, βλ. 2.2.3.).
- εξωτερική δευτερογενής (cuticular) μεμβράνη: προστατεύει το έμβryo από τη διείσδυση μορίων μεγαλύτερων από το μόριο του CO₂ (= πολύ-στρωματική μεμβράνη με την πολύ ειδική λειτουργία φιλτραρίσματος να λειτουργεί ως εμπόδιο διαπερατότητας).
- εμβρυική επιδερμίδα (cuticle): ένα διαφανές και ιδιαίτερα ελαστικό στρώμα χωριστό από το έμβryo εσωτερικά της δευτερογενούς μεμβράνης (μετασχηματίζεται σε μεμβράνη εκκόλαψης κατά τη διάρκεια της επώασης).

Το έμβryo εμφανίζεται με ανεσταλμένο το μεταβολισμό του στο στάδιο του γαστριδίου με περιεκτικότητα σε νερό κάτω από 10% και που μπορεί να αποθηκευτεί για μεγάλες περιόδους χωρίς απώλεια της βιωσιμότητάς του. Η βιωσιμότητα επηρεάζεται όταν αποθηκεύονται οι κύστες σε ποσοστό νερού μεγαλύτερο από 10% (έναρξη της μεταβολικής δραστηριότητας) και όταν εκτίθενται οι κύστες στο οξυγόνο δηλ. παρουσία του οξυγόνου η κοσμική ακτινοβολία οδηγεί σε σχηματισμό ελεύθερων ριζών που καταστρέφουν συγκεκριμένες ενζυμικές λειτουργίες στις μη μεταβολικές κύστες *Artemia*.



Εικ. 2.2.2. Ανάπτυξη κύστης *Artemia* από την επώαση σε θαλασσινό νερό μέχρι την απελευθέρωση του ναύπλιου.

Fig. 2.2.2. Development of an *Artemia* cyst from incubation in seawater until nauplius release.

2.2.1.2. Φυσιολογία της διαδικασίας εκκόλαψης

Η ανάπτυξη μιας κύστης *Artemia* από την επώαση στο εκκολαπτόμενο μέσο μέχρι την απελευθέρωση του ναύπλιου παρουσιάζεται στην Εικ. 2.2.2.

Όταν επωάζεται στο θαλασσινό νερό η αμφίκοιλη κύστη διογκώνεται και γίνεται σφαιρική μέσα σε 1 έως 2 ώρες. Μετά από 12 έως 20 ώρες ενυδάτωσης, οι μεμβράνες του κελύφους των κύστεων σπάζουν (συμπεριλαμβανομένης της εξωτερικής μεμβράνης) (= στάδιο διάρρηξης) και το έμβryo που περιβάλλεται από τη μεμβράνη εκκόλαψης γίνεται ορατό. Το έμβryo εγκαταλείπει έπειτα το κέλυφος εντελώς και κρέμεται κάτω από το κενό κέλυφος (αφού η μεμβράνη εκκόλαψης μπορεί ακόμα να συνδέεται με το κέλυφος). Μέσω της διαφανούς μεμβράνης εκκόλαψης μπορεί κάποιος να παρακολουθήσει τη διαφοροποίηση του προ-ναύπλιου στο instar I ναύπλιο που αρχίζει να κινεί τα εξαρτήματά του. Σύντομα η μεμβράνη εκκόλαψης σπάζει και η ελεύθερη κολυμβητική νύμφη (κεφαλή πρώτα) εκκολάπτεται.

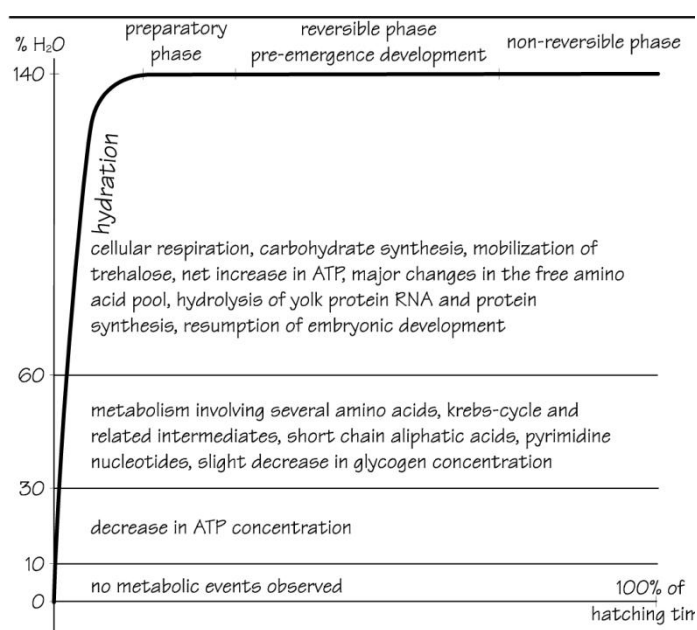
Οι ξηρές κύστες είναι πολύ υγροσκοπικές και λαμβάνουν νερό με γρήγορο ρυθμό (δηλ. μέσα στις πρώτες ώρες, όπου ο όγκος του ενυδατωμένου εμβρύου αυξάνεται σε ένα μέγιστο 40% της περιεκτικότητας σε νερό Εικ. 2.2.3.) Εντούτοις, η ενεργοποίηση του μεταβολισμού αρχίζει από μια περιεκτικότητα σε νερό 60% και μετά, υπό τον όρο ότι οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι ευνοϊκές (βλ. παρακάτω).

Ο αερόβιος μεταβολισμός στο έμβryo των κύστεων βεβαιώνει τη μετατροπή των υδατανθράκων και των αποθεμάτων της τρεχαλόζης (trehalose) στο γλυκογόνο (ως πηγή ενέργειας) και της γλυκερίνης.

Τα αυξανόμενα επίπεδα της τελευταίας υγροσκοπικής ένωσης οδηγούν στην περαιτέρω λήψη νερού από το έμβryo. Συνεπώς, η ωσμωτική πίεση μέσα στη δευτερογενή μεμβράνη ενισχύεται συνεχώς, έως ότου επιτυγχάνεται ένα κρίσιμο επίπεδο, το οποίο οδηγεί στο σπάσιμο των μεμβρανών των κύστεων, όπου σε κάποια

στιγμή όλη η παραχθείσα γλυκερίνη απελευθερώνεται στο μέσο εκκόλαψης. Με άλλα λόγια, ο μεταβολισμός της *Artemia* στις κύστες πριν από το σπάσιμο είναι ένα υπέρ-ωσμωτικό ρυθμιστικό σύστημα τρεχαλόζης-γλυκερίνης. Αυτό σημαίνει ότι τα επίπεδα αλατότητας στη μέση αύξηση της επώασης και οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της γλυκερίνης πρέπει να ενισχυθούν προκειμένου να επιτευχθεί η κρίσιμη διαφορά στην ωσμωτική πίεση που θα οδηγήσει στην έκρηξη του κελύφους και λιγότερα ενεργειακά αποθέματα θα αφεθούν έτσι στον ναύπλιο.

Μετά από τη διάρρηξη το έμβρυο είναι σε απευθείας επαφή με το εξωτερικό μέσο δια μέσου της εκκολαπτόμενης μεμβράνης. Ένα αποδοτικό ιοντικό ωσμωρυθμιστικό σύστημα είναι τώρα αποτελεσματικό, το οποίο μπορεί να αντιμετωπίσει ένα μεγάλο εύρος αλατότητας και το έμβρυο διαφοροποιείται σε μια κινούμενη προνύμφη ναύπλιου. Ένα εκκολαπτόμενο ένζυμο, που εκκρίνεται στην πρόσθια κεφαλική περιοχή του ναύπλιου, αποδυναμώνει την εκκολαπτόμενη μεμβράνη και επιτρέπει στον ναύπλιο να ελευθερωθεί στο εκκολαπτόμενο μέσο.



Εικ. 2.2.3. Κυτταρικός μεταβολισμός κύστης *Artemia* σε λειτουργικό υδάτινο επίπεδο.
Fig. 2.2.3. Cellular metabolism in *Artemia* cysts in function of hydration level.

2.2.1.3. Επίδραση των περιβαλλοντικών συνθηκών στο μεταβολισμό των κύστεων.

Οι ξηρές κύστες (Πίνακας 2.2.6) είναι πολύ ανθεκτικές στις ακραίες θερμοκρασίες με βιωσιμότητα εκκόλαψης που δεν επηρεάζεται από σειρά θερμοκρασίας -273°C και ανώτερη θερμοκρασία 60°C και επάνω, καθώς και στις σύντομες εκθέσεις στους 90°C .

Οι ενυδατωμένες κύστες έχουν πολύ πιο συγκεκριμένες ανοχές, με θνησιμότητες που εμφανίζονται κάτω από -18°C και επάνω από $+40^{\circ}\text{C}$ με μια ανατρέψιμη διακοπή του μεταβολισμού (= η βιωσιμότητα δεν επηρεάζεται) που εμφανίζεται μεταξύ -18°C και $+4^{\circ}\text{C}$ και μεταξύ $\pm 33^{\circ}\text{C}$ και $\pm 40^{\circ}\text{C}$, με ανώτερα και χαμηλότερα όρια θερμοκρασίας που ποικίλλουν ελαφρώς από είδος σε είδος. Ο ενεργός μεταβολισμός των κύστεων είναι τοποθετημένος μεταξύ $+ 4^{\circ}\text{C}$ και $\pm 33^{\circ}\text{C}$, όπου το ποσοστό εκκόλαψης παραμένει σταθερό.

Όσο αφορά τις υπόλοιπες περιβαλλοντικές συνθήκες, τα βέλτιστα εκκολαπτόμενα αποτελέσματα επιτυγχάνονται σε pH 8-8.5. Κατά συνέπεια, η προσθήκη NaHCO_3 πάνω από 2 g l^{-1} , σε τεχνητό ή αραιωμένο θαλασσινό νερό βοηθάει στη βελτίωση της εκκόλαψης. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με τη βέλτιστη δραστηριότητας του pH για τα ένζυμα εκκόλαψης.

Μια αυξανόμενη εκκόλαψη έχει αναφερθεί με το αυξανόμενο επίπεδο οξυγόνου από 0.6 και 2 ppm και τη μέγιστη εκκόλαψη που λαμβάνεται επάνω από αυτήν την συγκέντρωση. Για αποφυγή των κλίσεων οξυγόνου κατά τη διάρκεια της εκκόλαψης είναι προφανές ότι μια καλή ομοιογενής μίξη των κύστεων στο μέσο επώασης απαιτείται.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η εκκόλαψη σε ένα υψηλότερο μέσο αλατότητας θα απαιτήσει μεγαλύτερα ποσοστά ενέργειας από το έμβρυο. Επάνω από μια αλατότητα κατώτατων ορίων (που ποικίλλει από στέλεχος σε στέλεχος, $\pm 90 \text{ g l}^{-1}$ για τα περισσότερα στελέχη) οι ανεπαρκείς ποσότητες νερού μπορούν να ληφθούν για να υποστηρίξουν το μεταβολισμό του εμβρύου. Η βέλτιστη αλατότητα για την εκκόλαψη είναι εξίσου συγκεκριμένη, αλλά γενικά στα 15-70 g l^{-1} .

Αν και ο φυσιολογικός ρόλος του φωτός κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκκόλαψης είναι ανεπαρκώς κατανοητός, οι κύστες αλμυρογαρίδας, όταν ενυδατώνονται σε αερόβιους όρους, χρειάζονται ένα ελάχιστο φως για την αρχή της διαδικασίας εκκόλαψης, εξαρτώμενη με την ένταση φωτός και ή και το χρόνο έκθεσης.

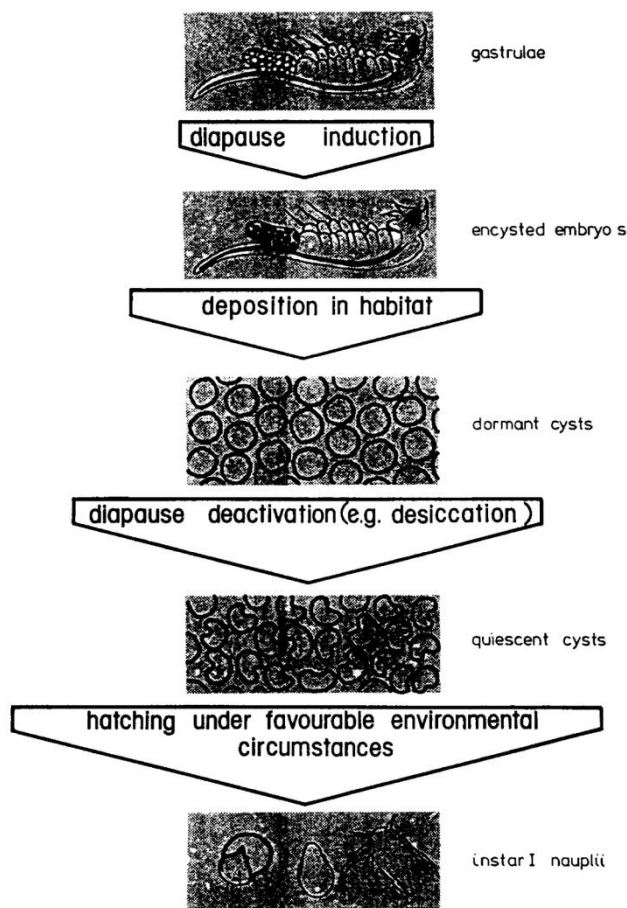
Ως αποτέλεσμα των μεταβολικών χαρακτηριστικών των ενυδατωμένων κύστεων, διάφορες συστάσεις μπορούν να διατυπωθούν όσο αφορά τη χρήση τους. Όταν οι κύστες αποθηκεύονται για πολύ, μερικές προφυλάξεις πρέπει να ληφθούν προκειμένου να διατηρηθούν τα μέγιστα ενεργειακά περιεχόμενα και η εκκολαψιμότητα. Η εκκόλαψη των κύστεων καθορίζεται κατά ένα μεγάλο μέρος από τους όρους και τις τεχνικές που εφαρμόζονται για τη συγκομιδή, τον καθαρισμό, την ξήρανση και την αποθήκευση του υλικού κύστεων. Ο αντίκτυπος στις περισσότερες από αυτές τις διαδικασίες μπορεί να αφορά τα αποτελέσματα της αφυδάτωσης ή της συνδυασμένης αφυδάτωσης ή ενυδάτωσης. Για τις κύστες και τους παράγοντες που μπορούν επίσης να παρεμποδίσουν τη διαδικασία της διάπαυσης-λήξης, αλλά και για τις ήρεμες κύστες, η ανεξέλεγκτη αφυδάτωση ή η ενυδάτωση οδηγούν σε μια σημαντική πτώση της βιωσιμότητας των εμβρύων.

Η ποιότητα εκκόλαψης στις αποθηκευμένες κύστες μειώνεται αργά όταν οι κύστες περιέχουν ποσοστά νερού από 10 σε 35%. Αυτή η διαδικασία μπορεί εντούτοις να καθυστερηθεί όταν αποθηκεύονται οι κύστες στις υπερβολικά χαμηλές θερμοκρασίες. Η ακριβής βέλτιστη ποσότητα νερού μέσα στην κύστη (περίπου 5%) δεν είναι γνωστή, αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι μια πάρα πολύ αυστηρή αφυδάτωση (κάτω από 12%) οδηγεί σε μια πτώση της βιωσιμότητας.

Τα επίπεδα νερού 30-65% ενεργοποιούν τις μεταβολικές δραστηριότητες, μειώνοντας τελικά το ενεργειακό περιεχόμενο σε ανεπαρκή επίπεδα, ώστε να φθάσουν στην κατάσταση κατεπειγόντως υπό τους βέλτιστους όρους εκκόλαψης. Μια μείωση των ενεργειακών αποθεμάτων επιπλέον επιτυγχάνεται όταν υποβάλλονται οι κύστες στους επόμενους κύκλους αφυδάτωσης ή ενυδάτωσης. Η μακροπρόθεσμη αποθήκευση τέτοιου υλικού μπορεί να οδηγήσει σε μια ουσιαστική μείωση της έκβασης της εκκόλαψης. Οι κύστες που εκτίθενται για υπερβολικά μακρά περίοδο σε υγρασία που υπερβαίνει το 65% θα έχουν ολοκληρώσει την προ-εμφάνισή τους στην εμβρυική ανάπτυξη και η επόμενη αφυδάτωση αυτών των κύστεων θα οδηγήσει στη χειρότερη περίπτωση στη δολοφονία των διαφοροποιημένων εμβρύων.

Οι αρκετά αφυδατωμένες κύστες κρατούν μόνο τη βιωσιμότητά τους όταν

αποθηκεύεται υπό κενό ή στο άζωτο, αφού η παρουσία οξυγόνου οδηγεί σε μια ουσιαστική μείωση της εκκολαπτόμενης παραγωγής μέσω του σχηματισμού των ιδιαίτερα καταστρεπτικών ελεύθερων ριζοσπαστών. Ακόμη και οι κατάλληλα συσκευασμένες κύστει πρέπει να κρατηθούν κατά προτίμηση στις χαμηλές θερμοκρασίες. Εντούτοις, όταν παγώνουν, οι κύστει πρέπει να είναι για μια εβδομάδα στη θερμοκρασία δωματίου πριν εκκολαφτούν.



Εικ. 2.2.4. Σχηματικό διάγραμμα που επεξηγεί την ειδική ορολογία που χρησιμοποιείται σε σχέση με τα αδρανή έμβρυα *Artemia*.

Fig. 2.2.4. Schematic diagram explaining the specific terminology used in relation with dormancy of *Artemia* embryos.

2.2.1.4. Διάπαυση (*diapauses*)

Δεδομένου ότι η *Artemia* είναι κάτοικος των βιότοπων που χαρακτηρίζονται από τις ασταθείς περιβαλλοντικές συνθήκες, η επιβίωσή της κατά τη διάρκεια των περιόδων ακραίων συνθηκών (δηλ. ξήρανση, ακραίες θερμοκρασίες, υψηλές αλατότητες) εξασφαλίζεται από την παραγωγή των αδρανοποιημένων εμβρύων. Τα θηλυκά μπορούν εύκολα να διακόψουν την παραγωγή ζωντανών ναυπλίων (ωζωτοκά) και να ακολουθήσουν το σχηματισμό κύστεων (ωοτόκα) ως γρήγορη απάντηση στις ακραίες περιστάσεις. Αν και οι βασικοί μηχανισμοί που περιλαμβάνονται σε αυτό και τη διακοπή ακόμα δεν είναι πλήρως κατανοητοί, αφού οι ξαφνικές διακυμάνσεις φαίνονται να προκαλούν την ωοτοκία (πίεση οξυγόνου, αλλαγές αλατότητας...). Ο

προκαλούμενος μηχανισμός για την επαγωγή της κατάστασης της διάπαυσης δεν είναι εντούτοις ακόμα γνωστός. Σε γενικές γραμμές, τα έμβρυα που απελευθερώνονται ως κύστεις στο μέσο είναι σε κατάσταση διάπαυσης και δεν θα επαναλάβουν την ανάπτυξή τους, ακόμη και κάτω από ευνοϊκές συνθήκες, έως ότου υποβληθούν σε κάποια διάπαυση που απενεργοποιεί την περιβαλλοντική διαδικασία σε αυτή τη φάση, όπου η μεταβολική διακοπή ρυθμίζεται από τους εσωτερικούς μηχανισμούς και δεν μπορεί να διακριθεί από ένα έμβρυο μη ενεργό. Επάνω στη διακοπή της διάπαυσης, οι κύστεις εισάγουν το στάδιο ηρεμίας, που σημαίνει ότι η μεταβολική δραστηριότητα μπορεί να επαναληφθεί προς το παρόν, αφού παρουσιάζεται στις ευνοϊκές συνθήκες εκκόλαψης, τελικά με συνέπεια την εκκόλαψη: σε αυτήν τη φάση η μεταβολική αναστολή είναι μεμονωμένα εξαρτώμενη των εξωτερικών παραγόντων (Εικ. 2.2.4.). Κατά συνέπεια, η σύγχρονη εκκόλαψη εμφανίζεται, με συνέπεια μια γρήγορη έναρξη και μια επακόλουθη ανάπτυξη του πληθυσμού αμέσως μετά από την αποκατάσταση των ευνοϊκών περιβαλλοντικών συνθηκών. Αυτό επιτρέπει την αποτελεσματική αποίκιση στους φυσικούς βιότοπους. Για το χρήστη των κύστεων *Artemia* διάφορες τεχνικές έχουν αποδειχθεί επιτυχείς στη διακοπή της διάπαυσης. Είναι σημαντικό να σημειωθεί εδώ ότι, η ευαισθησία των κύστεων *Artemia* σε αυτές τις τεχνικές παρουσιάζει στελεχιακή ή ακόμη και ιδιαιτερότητα παρτίδας και ως εκ τούτου είναι δύσκολη η ακριβής πρόβλεψη της έκβασης της εκκόλαψης. Κατά το χειρισμό νέων ή άγνωστων στελεχών, η σχετική επιτυχία ή η αποτυχία ορισμένων μεθόδων πρέπει να ανακαλυφθεί κατόπιν εμπειρίας. Σε πολλές περιπτώσεις η μετακίνηση του νερού των κύστεων είναι ένας ικανός τρόπος να ολοκληρωθεί η διαδικασία της διάπαυσης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την ξήρανση των κύστεων σε θερμοκρασίες που δεν υπερβαίνουν τους 35°C ή με την αναστολή των κύστεων σε ένα διάλυμα NaCl (300 g l⁻¹). Δεδομένου ότι κάποια μορφή αφυδάτωσης είναι μέρος των περισσότερων διαδικασιών επεξεργασίας ή και αποθήκευσης, ο τερματισμός της διάπαυσης δεν απαιτεί ιδιαίτερο πρόσθετο χειρισμό. Εντούτοις, σε μερικά στελέχη *Artemia* οι συνηθισμένες τεχνικές επεξεργασίας κύστεων δεν παράγουν μια αρκετά υψηλή ποιότητα εκκόλαψης, δείχνοντας ότι μια πιο ιδιαίτερη μέθοδος απενεργοποίησής της διάπαυσης είναι απαραίτητη.

Πίνακας 2.2.1. Επίδραση της κρύας αποθήκευσης σε διάφορες θερμοκρασίες στην εκκολαψιμότητα ξηρών κύστεων *Artemia* από το Καζακστάν
Table 2.2.1. Effect of cold storage at different temperatures on the hatchability of shelf dried *Artemia* cysts from Kazakhstan

storage time	storage temperature		
	+4°C	-25°C	-80°C
0 days	7	7	7
2 weeks	-	-	4
1 month	7	16	12
2 months	27	44	50

Hatchability is expressed as hatching percentage

Οι ακόλουθες διαδικασίες έχουν αποδειχθεί επιτυχείς όταν εφαρμόζονται σε συγκεκριμένες πηγές κύστεων *Artemia*:

- πάγωμα: "μιμείται" τη φυσική περίοδο διαχείμασης των κύστεων που προέρχονται από ηπειρωτικούς βιότοπους με τις πολύ χαμηλές χειμερινές θερμοκρασίες (Great

Salt Lake, Utah των ΗΠΑ ηπειρωτική Ασία, Πίνακας 2.2.1.)

- επώαση σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ευαισθησία του στελέχους (ή της παρτίδας) σε αυτό το μέσο είναι δύσκολο να προβλεφθεί και προκαταρκτικά τεστ απαιτούνται για να παρέχουν τις πληροφορίες για τις βέλτιστες δόσεις την περίοδο που εφαρμόζεται και για τη μέγιστη επίδραση που μπορεί να ληφθεί (Πίνακας 2.2.2.). Υπερβολική δόση οδηγεί σε αποτελέσματα μειωμένης εκκόλαψης ή ακόμη και πλήρης θνησιμότητα ως απόρροια της τοξικότητας της χημικής ουσίας. Εντούτοις, σε μερικές περιπτώσεις δεν παρατηρείται καθόλου καμία επίδραση.

Γενικά, άλλες τεχνικές λήξης της διάπαυσης (κυκλική αφυδάτωση/ενυδάτωση, αποκελυφοποίηση, άλλες χημικές ουσίες...) δίνουν αμφίβολα αποτελέσματα και δεν είναι φιλικά προς τον χρήστη. Πρέπει, εντούτοις, να ληφθεί υπόψη ότι, η αύξηση των ποσοστών εκκόλαψης μετά από οποιαδήποτε διαδικασία (ακόμα και μερικώς) πρέπει να είναι το αποτέλεσμα μιας αλλαγής στο ρυθμό εκκόλαψης (προηγούμενη εκκόλαψη).

Πίνακας 2.2.2. Επίδραση δόσης-χρόνου της προ-επώασης επεξεργασίας με H₂O₂ στην εκκολλαπιμότητα κύστεων *Artemia* από το Vung Tau (Βιετνάμ).

Table 2.2.2. Dose-time effect of H₂O₂ pre-incubation treatment on the hatchability of *Artemia* cysts from Vung Tau (Vietnam)

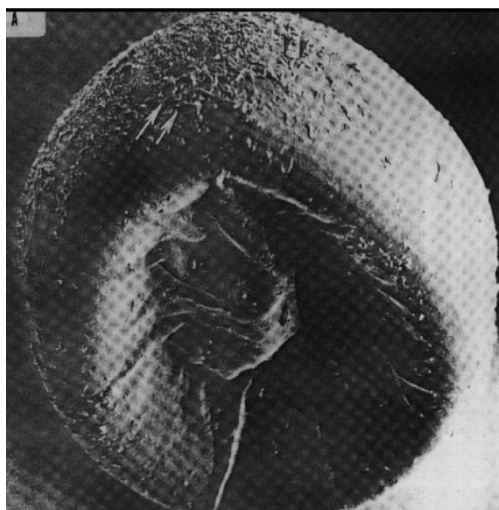
Time (min.)	Doses(%)					
	0.5	1	2	3	5	10
1					46	10
2					94	5
5			54	69	102	
10	47		90	81	88	32
15		46	100	76		
20			91	94	52	
30		91	95			
60	56	85		6	1	
120		15				
180	47					

Data are expressed as percentage of hatching results obtained at 2%/15 min. treatment (74% hatch)

2.2.2. Διαδικασίες απολύμανσης

Ένα σοβαρό πρόβλημα στην εκτροφή των πρώιμων σταδίων των θαλάσσιων ψαριών και γαριδών είναι η ευαισθησία των νυμφών στις μικροβιακές μολύνσεις. Θεωρείται ότι τα ζωντανά τρόφιμα μπορούν ενδεχομένως να είναι μια σημαντική πηγή παθογόνων βακτηριδίων, τα οποία μεταφέρονται εύκολα μέσω της τροφικής αλυσίδας στους θηρευτές τους (νύμφες). Το *Vibrio sp.* αποτέλεσε την κύρια βακτηριακή πανίδα της *Artemia* στην εκκόλαψη των κύστεων. Τα περισσότερα στελέχη *Vibrio* είναι καιροσκοπικά (opportunistic) βακτηρίδια που μπορούν να προκαλέσουν εκδηλώσεις ασθενειών και θνησιμότητας στη νυμφική εκτροφή, ειδικά όταν τα ψάρια δεν εκτρέφονται υπό τις βέλτιστες συνθήκες. Όπως παρουσιάζεται στην Εικ. 2.2.5., τα κελύφη των κύστεων *Artemia* μπορούν να γεμίσουν με βακτήρια, μύκητες και να μολυνθούν ακόμη και με τις οργανικές ακαθαρσίες. Η βακτηριακή μόλυνση στο μέσο εκκόλαψης μπορεί να φθάσει σε αριθμούς περισσότερο από 10⁷ CFU ml⁻¹ (=μονάδες που σχηματίζουν αποικία). Στις υψηλές πυκνότητες κύστεων και

τις υψηλές θερμοκρασίες επώασης κατά τη διάρκεια της εκκόλαψης, η βακτηριακή ανάπτυξη (π.χ. στην απελευθερωμένη γλυκερίνη) μπορεί να είναι ιδιαίτερη και τα διαλύματα εκκόλαψης μπορεί να γίνουν θολά, γεγονός το οποίο μπορεί επίσης να οδηγήσει στις μειωμένες παραγωγές εκκόλαψης. Επομένως, εάν χρησιμοποιούνται εμπορικές μη απολυμασμένες κύστες, συστήνεται να ισχύσει συνήθως μια διαδικασία απολύμανσης με τη χρησιμοποίηση υποχλωρίτη. Αυτή η επεξεργασία, εντούτοις, μπορεί να μην σκοτώσει όλα τα μικρόβια του κελύφους. Η πλήρης αποστείρωση μπορεί να επιτευχθεί μέσω της διαδικασίας αποκελυφοποίησης των κύστεων, που περιγράφεται στην ακόλουθη ενότητα.



Εικ. 2.2.5. Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αφυδατωμένης κύστης *Artemia*.
Fig. 2.2.5. Scanning electron microphotograph of dehydrated *Artemia* cyst.

2.2.3. Αποκελυφοποίηση (*decapsulation*)

Το σκληρό κέλυφος που κρατάει το έμβρυο *Artemia* "κοιμισμένο" μπορεί να απομακρυνθεί με βραχυπρόθεσμη έκθεση σε διάλυμα υποχλωρίτη. Αυτή η διαδικασία καλείται αποκελυφοποίηση. Οι αποκελυφοποιημένες κύστες προσφέρουν διάφορα πλεονεκτήματα έναντι των μη αποκελυφοποιημένων:

- Τα κελύφη των κύστεων δεν εισάγονται στις δεξαμενές καλλιέργειας. Κατά την εκκόλαψη ομαλών κύστεων, πλήρης χωρισμός του ναύπλιου *Artemia* από το κέλυφός τους δεν είναι πάντα εφικτός. Οι μη-εκκολαπτόμενες κύστες και τα άδεια κελύφη μπορούν να προκαλέσουν επιβλαβή αποτελέσματα στις νυμφικές δεξαμενές όταν λαμβάνονται από το ψάρι θηρευτή, όπου τα μη αφομοιωμένα κελύφη μπορεί να φράξουν το έντερο.
- Ο ναύπλιος που εκκολάπτεται από τις κύστες διαθέτει μεγαλύτερο ενεργειακό απόθεμα και ατομικό βάρος (κατά 30-55% ανάλογα με το στέλεχος) από τον κανονικό ναύπλιο instar I, επειδή δεν ξοδεύει επιπλέον ενέργεια για να σπάσει το κέλυφος (Εικ. 2.3.4.). Σε μερικές περιπτώσεις όπου οι κύστες διαθέτουν σχετικά χαμηλότερο ενεργειακό απόθεμα, η εκκολαψιμότητα μπορεί να βελτιωθεί με την αποκελυφοποίηση, εξαιτίας των χαμηλότερων ενεργειακών απαιτήσεων για τη διάρρηξη των αποκελυφοποιημένων κύστεων (Πίνακας 2.2.3.).
- Η αποκελυφοποίηση οδηγεί σε απολύμανση του υλικού των κύστεων (βλ. 2.2.2.).

- Οι αποκελυφοποιημένες κύστεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως άμεση ενεργειακά πλούσια πηγή τροφής για τα ψάρια και τις γαρίδες (βλ. 2.2.4.).
- Για τις αποκελυφοποιημένες κύστεις, οι απαιτήσεις φωτισμού για την εκκόλαψη είναι μικρότερες.

Πίνακας 2.2.3. Βελτιωμένα χαρακτηριστικά εκκόλαψης (σε ποσοστό αλλαγών των κύστεων *Artemia* σαν αποτέλεσμα της αποκελυφοποίησης)

Table 2.2.3. Improved hatching characteristics (in percent change of *Artemia* cysts as a result of decapsulation)

cyst source	hatchability	naupliar dry weight	hatching output
San Francisco Bay, CA-USA	+ 15	+ 7	+ 23
Macau, Brazil	+ 12	+ 2	+ 14
Great Salt Lake, UT-USA	+ 24	- 2	+ 21
Shark Bay, Australia	+ 4	+ 6	+ 10
Chaplin Lake, Canada	+ 132	+ 5	+ 144
Bohai Bay, PR China	+ 4	+ 6	+ 10

Η διαδικασία αποκελυφοποίησης περιλαμβάνει την ενυδάτωση των κύστεων (μιας και η πλήρης αφαίρεση του κελύφους μπορεί μόνο να εκτελεσθεί όταν οι κύστεις είναι σφαιρικές), αφαίρεση του καφέ κελύφους με έκθεση σε διάλυμα υποχλωρίτη. Αυτές οι κύστεις μπορούν να εκκολαφθούν άμεσα στον ναύπλιο ή να αφυδατωθούν σε κορεσμένη άλμη και να αποθηκευτούν για αργότερα που θα εκκολαφθούν ή για την άμεση σίτιση. Μπορούν να αποθηκευτούν για μερικές ημέρες στο ψυγείο σε 0-4°C χωρίς καμία μείωση των ποσοστών εκκόλαψης. Εάν απαιτείται αποθήκευση για παρατεταμένη περίοδο (εβδομάδες ή λίγους μήνες), οι κύστεις μπορούν να μεταφερθούν σε διάλυμα κορεσμένης άλμης. Κατά τη διάρκεια ολονύκτιας αφυδάτωσης (παρουσία αερισμού για να διατηρήσει μια ομοιογενή κατανομή) οι κύστεις απελευθερώνουν συνήθως πάνω από 80% του εσωτερικού κυτταρικού νερού τους και με διακοπή του αερισμού, οι νέες αποκελυφοποιημένες κύστεις σχήματος καφέ-φασόλι ακινητοποιούνται. Επιπλέον, δεδομένου ότι χάνουν την ικανότητα εκκόλαψής τους όταν εκτίθενται σε UV φως, ενδείκνυται η αποθήκευσή τους μακριά από το ηλιακό φως.

2.2.4. Η άμεση χρήση των αποκελυφοποιημένων κύστεων.

Η άμεση χρήση των κύστεων *Artemia* είναι περιορισμένη στις συνήθεις καλλιέργειες των ψαριών και των γαρίδων, έναντι της χρήσης του ναύπλιου *Artemia*. Εντούτοις, οι ξηρές κύστεις *Artemia* έχει αποδειχθεί μια κατάλληλη τροφή για τη νυμφική εκτροφή των διάφορων ειδών όπως το γατόψαρο του γλυκού νερού (*Clarias gariepinus*) και τον κυπρίνο (*Cyprinus carpio*), τις θαλάσσιες γαρίδες και τις προνύμφες του milkfish. Αυτή την περίοδο, οι εμπορικά παραγόμενες κύστεις χρησιμοποιούνται συχνά στα εκκολαπτήρια γαρίδων της Ταϊλάνδης από το PL4 στάδιο και μετά. Η χρήση των κύστεων στη νυμφική εκτροφή παρουσιάζει μερικά ευδιάκριτα πλεονεκτήματα, και από πρακτική και θρεπτική άποψη.

Η καθημερινή παραγωγή του ναύπλιου είναι εντατική εργασία και απαιτεί πρόσθετες εγκαταστάσεις. Επιπλέον, οι κύστες *Artemia* μιας υψηλής ποιότητας εκκόλαψης είναι συχνά ακριβές και η αποκελυφοποίηση των μη-εκκολαπτόμενων κύστεων σημαίνει την αξιοποίηση ενός ειδιάλλως κατώτερου προϊόντος. Οι κύστες έχουν την εμφάνιση και τα πρακτικά πλεονεκτήματα μιας ξηράς τροφής και σε αντίθεση με το ναύπλιο *Artemia* (470-550 μm), το μικρότερο μέγεθος των μορίων τους (200-250μm) είναι καταλληλότερο για τα μικρά στάδια των θηρευτών. Εάν είναι ξηροί πριν από την εφαρμογή τους, έχουν μια υψηλή ικανότητα να επιπλεύσουν και βυθίζονται μόνο αργά στο κατώτατο σημείο της δεξαμενής καλλιέργειας. Η έκπλυση των θρεπτικών συστατικών (για παράδειγμα, με τις τεχνητές διατροφές) δεν εμφανίζεται, δεδομένου ότι η δευτερογενή μεμβράνη ενεργεί ως εμπόδιο για τα μεγαλύτερα μόρια.

Από την άλλη πλευρά, ένα πιθανό σημαντικό μειονέκτημα είναι η ακινησία των κύστεων και έτσι υπάρχει χαμηλή οπτική δραστηριότητα για το ζώο θηρευτή. Επιπλέον, οι κύστες που αφυδατώθηκαν γρήγορα στο κατώτατο σημείο της δεξαμενής άλμης, αυτές μειώνουν τη διαθεσιμότητα τους στις νύμφες ψαριών που ταΐζονται στην υδάτινη στήλη. Επομένως, ο πρόσθετος αερισμός ή η ξήρανση απαιτείται για να κρατήσει αυτά τα μόρια καλύτερα μέσα σε αναστολή. Εντούτοις, αντίθετα, οι μεγαλύτερες νύμφες της γαρίδας penaeid είναι κυρίως θηρευτές που τρέφονται από στον πυθμένα και έτσι δεν αντιμετωπίζουν αυτό το πρόβλημα.

Πίνακας 2.2.4. Οι άμεσες συγκεντρώσεις (σε % ξηρό βάρος) αποκελυφοποιημένων κύστεων *Artemia* και ναύπλιοι instar I

Table 2.2.4. The proximate composition (in % of dry matter) of decapsulated *Artemia* cysts and instar I nauplii

	GSL		SFB	
	cysts	nauplii	cysts	nauplii
protein	± 50	41-47	± 57	47-59
lipid	± 14	21-23	± 13	16-27
carbohydrate	-	11	-	11
ash	± 9	10	± 5	6-14

Από θρεπτικής άποψης, η μικτή χημική σύσταση των αποκελυφοποιημένων κύστεων είναι συγκρίσιμη με αυτή του νέο-εκκολαπτόμενου ναύπλιου (Πίνακας 2.2.4.). Επιπλέον, το ατομικό ξηρό βάρος και το ενεργειακό περιεχόμενό τους είναι υψηλότερο κατά μέσο όρο 30 με 40% από αυτά του instar I ναύπλιου (βλ. 2.2.3. και Εικ. 2.3.4.). Για παράδειγμα, για την καλλιέργεια των νυμφών κυπρίνου κατά τη διάρκεια των πρώτων δύο εβδομάδων, η χρήση των αποκελυφοποιημένων κύστεων αποτελεί μια αποταμίευση κατά το ένα τρίτο στο ποσό των χρησιμοποιημένων κύστεων *Artemia*, έναντι της χρήσης του ζωντανού ναύπλιου.

Επιπλέον, μερικές διαφορές βρίσκονται σε συγκεκριμένα θρεπτικά συστατικά που μπορούν να επιφέρουν επίδραση στη θρεπτική ποιότητά τους.

- **Λιπαρά οξέα:** το φάσμα των λιπαρών οξέων των κύστεων και του ναύπλιου είναι σχεδόν ίδιο, αν και διαφορές μπορούν να βρεθούν στα επίπεδα λιπιδίων, τα επίπεδα FAME, τη σύνθεση των λιπαρών οξέων και το ενεργειακό περιεχόμενο των διαφορετικών στελεχών.

- Ελεύθερα αμινοξέα: η αναλογία των ελεύθερων αμινοξέων (FAA) στην περιεκτικότητα των πρωτεϊνών είναι γενικά υψηλότερη για το ναύπλιο instar I, έναντι των κύστεων, αν και μεγάλες παραλλαγές μπορούν να υπάρξουν από στέλεχος σε στέλεχος. Αυτό μπορεί να έχει διαιτητικές συνέπειες όταν οι κύστες χρησιμοποιούνται, δεδομένου ότι οι νύμφες θαλάσσιων ψαριών χρησιμοποιούν τη μεγάλη ομάδα ελεύθερων αμινοξέων τους ως ενεργειακό απόθεμα κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών μετά από την εκκόλαψη.
- Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) εξετάζεται ως ουσιαστική θρεπτική ουσία κατά τη διάρκεια της νυμφικής εκτροφής. Βρίσκεται ως ασκορβικό οξύ 2-θεικό άλας (AAS) στις κύστες της αλμυρογαρίδας, μια πολύ σταθερή μορφή αλλά με χαμηλή βιολογική διαθεσιμότητα. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκκόλαψης το AAS υδρολύεται στο ελεύθερο ασκορβικό οξύ, μια ασταθέστερη μορφή, αλλά άμεσα διαθέσιμη στο ναύπλιο για το ψάρι θηρευτή. Η απορρόφηση και η βιολογική δραστηριότητα του AAS στον ιστό του ψαριού είναι ακόμη κάτω από έρευνα και παρότι πολλά ψάρια του γλυκού νερού αναπτύσσονται επιτυχώς με αποκελυφοποιημένες κύστες στο νυμφικό στάδιο (βλ. ανωτέρω), μπορεί να θεωρηθεί ότι η σίτιση των αποκελυφοποιημένων κύστεων στις νύμφες των ψαριών για έναν παρατεταμένο χρόνο θα οδηγήσει σε ανεπάρκεια βιταμίνης C στην περίπτωση που στο θηρευτή λείπει το θειικό ένζυμο sulfatase που απαιτείται για το σπάσιμο του AAS.
- Καροτενοειδή: το πρότυπο των καροτενοειδών και ιδιαίτερα το περιεχόμενο κανθαξανθινών, παρουσιάζουν ποιοτικές διαφορές μεταξύ των κύστεων και του ναύπλιου.

2.2.5. Εκκόλαψη

2.2.5.1. Συνθήκες και εξοπλισμός εκκόλαψης

Αν και η εκκόλαψη μικρών ποσοτήτων κύστεων *Artemia* είναι βασικά πολύ απλή, διάφορες παράμετροι πρέπει να ληφθούν υπόψη για την επιτυχή εκκόλαψη των μεγάλων (δηλ. χιλιόγραμμα) ποσοτήτων κύστεων, η οποία είναι μια κοινή καθημερινή πρακτική μέσα στα μεγάλα εκκολαπτήρια:

- αερισμός
- θερμοκρασία
- αλατότητα
- pH
- πυκνότητα κύστεων
- φωτισμός

Για καθημερινή λειτουργία, είναι αποδοτικότερη η εργασία σε τυποποιημένες συνθήκες (π.χ. καυστήρες με θερμοστάτες ή κλιματιζόμενο δωμάτιο για την εξασφάλιση σταθερής θερμοκρασίας, σταθερή πυκνότητα κύστεων) για να επιτρέψει

τη μέγιστη παραγωγή ενός ομοιογενούς πληθυσμού instar I μετά από έναν σταθερό χρόνο επώασης.

Τα καλύτερα αποτελέσματα εκκόλαψης επιτυγχάνονται σε δεξαμενές με ένα κωνικό κατώτατο σημείο, που αερίζεται από το κατώτατο σημείο με γραμμή αέρα (Εικ. 2.3.1.). Οι κυλινδρικές ή τετραγωνικές δεξαμενές έχουν νεκρά σημεία στα οποία οι κύστες *Artemia* και οι ναύπλιοι συσσωρεύονται και πάσχουν από τα μειωμένα επίπεδα του οξυγόνου. Οι διαφανείς ή ημιδιαφανείς δεξαμενές διευκολύνουν την επιθεώρηση της αναστολή της εκκόλαψης, ειδικά κατά τη συγκομιδή.

Ως αποτέλεσμα των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών, η αλληλεπίδραση των παραμέτρων εκκόλαψης είναι ελαφρώς διαφορετική από στέλεχος σε στέλεχος, με συνέπεια τα μεταβλητά αποτελέσματα εκκόλαψης. Η ένταση αερισμού πρέπει να είναι επαρκής για να διατηρήσει τα επίπεδα οξυγόνου επάνω από 2 mg l^{-1} , κατά προτίμηση 5 mg l^{-1} . Το βέλτιστο ποσοστό αερισμού εξαρτάται από το μέγεθος των δεξαμενών και την πυκνότητα των κύστεων που επωάζονται. Το υπερβολικό άφρισμα μπορεί να μειωθεί από την απολύμανση των κύστεων πριν από την επώαση και ή με την προσθήκη μερικών αντί-αφρωδών μέσων (π.χ. αντί-αφρώδης σιλικόνη).

Η θερμοκρασία του θαλασσινού νερού κρατιέται κατά προτίμηση στους $25\text{-}28^\circ\text{C}$. Κάτω από 25°C οι κύστες εκκολάπτονται πιο αργά και επάνω από 33°C σταματά αμετάκλητα ο μεταβολισμός των κύστεων. Εντούτοις, η επίδραση περισσότερων ακραίων θερμοκρασιών στην παραγωγή της εκκόλαψης είναι κατά ένα μεγάλο μέρος συγκεκριμένη.

Τα ποσοτικά αποτελέσματα της αλατότητας στην επώαση και εκκόλαψη των κύστεων συσχετίζονται κατά πρώτο λόγο με το επίπεδο ενυδάτωσης που μπορεί να επιτευχθεί στις κύστες. Επάνω από μια αλατότητα κατώτατων ορίων, οι ανεπαρκείς ποσότητες νερού μπορούν να ληφθούν από τις κύστες και αυτή η τιμή κατώτατων ορίων ποικίλλει από στέλεχος σε στέλεχος, αλλά είναι περίπου $85\text{-}90 \text{ g l}^{-1}$ για τα περισσότερα στελέχη *Artemia*. Η αλατότητα επώασης επηρεάζει το ποσό γλυκερίνης που πρέπει να συσσωρευτεί για να φθάσει στην κρίσιμη ωσμωτική πίεση μέσα από τη δευτερογενή μεμβράνη των κύστεων. Τα γρηγορότερα ποσοστά εκκόλαψης θα σημειωθούν έτσι στα χαμηλότερα επίπεδα αλατότητας δεδομένου ότι θα πάρει το λιγότερο χρόνο να επιτευχθεί το σημείο διάρρηξης. Η βέλτιστη εκκόλαψη μπορεί να ληφθεί μεταξύ 5 και 35 g l^{-1} . Για πρακτικούς λόγους το φυσικό θαλασσινό νερό χρησιμοποιείται συνήθως για να εκκολαφθούν οι κύστες. Εντούτοις, σε αλατότητα 5 g l^{-1} υπάρχει λιγότερη γλυκερίνη που πρέπει να συσσωρευτεί. Για μερικές πηγές κύστεων που εκκολάπτονται στα χαμηλά επίπεδα αλατότητας δημιουργούνται υψηλότερες αποδόσεις εκκόλαψης και ο ναύπλιος έχει ένα υψηλότερο ενεργειακό περιεχόμενο (Πίνακας 2.2.5). Η αλατότητα μπορεί εύκολα να μετρηθεί με τη βοήθεια ενός διαθλασίμετρου ή ενός πυκνόμετρου.

Το pH πρέπει να παραμείνει επάνω από 8 κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκκόλαψης ώστε να εξασφαλιστεί η βέλτιστη λειτουργία των ενζύμων εκκόλαψης. Εάν είναι απαραίτητο, (δηλ. όταν χρησιμοποιείται νερό χαμηλής αλατότητας), η ρυθμιστική ικανότητα του νερού μπορεί να αυξηθεί με την προσθήκη πάνω από $1 \text{ gr NaHCO}_3 \text{ l}^{-1}$. Οι αυξανόμενες ρυθμιστικές απαιτήσεις μπορούν επίσης να γίνουν ουσιαστικές όταν είναι υψηλές οι πυκνότητες των κύστεων που εκκολάπτονται (= υψηλή παραγωγή CO_2).

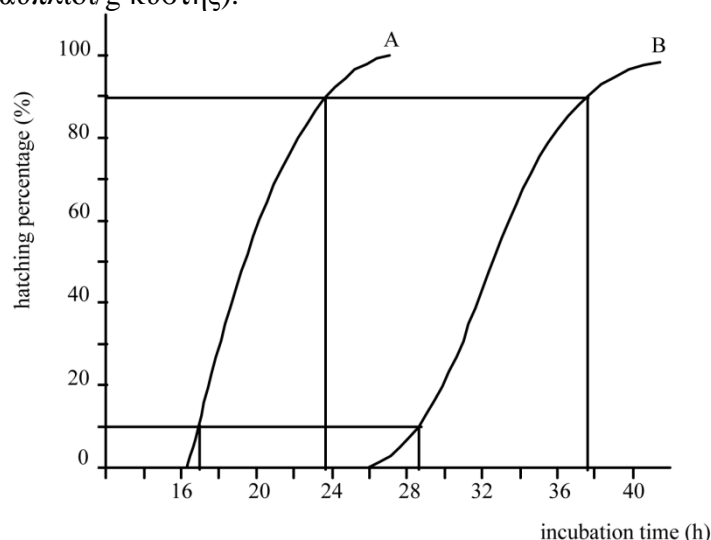
Η πυκνότητα κύστεων μπορεί επίσης να αλληλεπιδράσει με τους άλλους αβιοτικούς παράγοντες που είναι ουσιαστικοί για την εκκόλαψη, όπως το pH, το οξυγόνο και τον φωτισμό. Η πυκνότητα μπορεί να είναι τόσο υψηλή όπως 5 g l^{-1} για μικρούς όγκους (<20 l) αλλά πρέπει να μειωθεί σε 2 g l^{-1} για μεγαλύτερους όγκους, ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο μηχανικός τραυματισμός των ναυπλίων και για να αποφευχθούν οι

υπό-βέλτιστες συνθήκες του νερού.

Ο ισχυρός φωτισμός (περίπου 2000 lux στην επιφάνεια νερού) είναι ουσιαστικός, τουλάχιστον κατά τη διάρκεια των πρώτων ωρών μετά από την πλήρη ενυδάτωση, προκειμένου να προκαλέσει και να αρχίσει η εμβρυακή ανάπτυξη. Αν και αυτό το επίπεδο φωτισμού επιτυγχάνεται συνήθως κατά τη διάρκεια της ημέρας στις διαφανείς δεξαμενές, είναι προτιμότερο να διατηρούνται οι δεξαμενές εκκόλαψης σε εσωτερικούς χώρους και να παρέχεται τεχνητός φωτισμός.

2.2.5.2. Ποιότητα και αξιολόγηση εκκόλαψης

Μια αποδεκτή παραγωγή κύστεων πρέπει να περιέχει τις ελάχιστες ποσότητες ακαθαρσιών, όπως άμμος, ραγισμένα κελύφη, φτερά, κ.α. Η συγχρονισμένη εκκόλαψη πρέπει να είναι υψηλή, όταν επώαζεται σε 33 g l^{-1} θαλασσινό νερό στους 25°C , όπου ο πρώτος ναύπλιος πρέπει να εμφανιστεί μετά από επώαση 12 έως 16 ώρες (T_0 , βλ. περαιτέρω) και έκτοτε ο τελευταίος ναύπλιος πρέπει να έχει εκκολαφθεί μέσα σε 8 ώρες (T_{100}). Όταν η συγχρονισμένη εκκόλαψη είναι χαμηλή ($T_{100}-T_0 > 10$ ώρες), ο πρώτος-εκκολαπτόμενος ναύπλιος θα έχει καταναλώσει ένα μεγάλο μέρος των ενεργειακών αποθεμάτων του, ώσπου να εκκολαφθεί και ο τελευταίος ναύπλιος και έτσι η συγκομιδή ολοκληρώνεται. Επιπλέον, η συνολική περίοδος επώασης υπερβαίνει τις 24 ώρες και δεν θα είναι σε θέση να πραγματοποιηθεί ξανά ο κύκλος παραγωγής στον ίδιο χρόνο, απαιτώντας έτσι υψηλότερο κόστος εγκαταστάσεων (περισσότερες δεξαμενές). Η αποδοτικότητα της εκκόλαψης (ο αριθμός ναυπλίων που εκκολάπτονται ανά γραμμάριο κύστεων) και το ποσοστό εκκόλαψης (το συνολικό ποσοστό των κύστεων που πραγματικά υπάρχουν) συχνά ποικίλλουν αρκετά μεταξύ των διαφορετικών εμπορικών παρτίδων και αποτελούν προφανώς την μεγάλη αιτία των διαφορών τιμών. Από αυτή την άποψη, η αποδοτικότητα της εκκόλαψης μπορεί να είναι ένα καλύτερο κριτήριο από το ποσοστό εκκόλαψης δεδομένου ότι λαμβάνει υπόψη επίσης το περιεχόμενο των ακαθαρσιών (δηλ. κενά κελύφη κύστεων). Οι τιμές εκκόλαψης μπορούν να είναι τόσο χαμηλές όπως 100.000 ναύπλιοι g^{-1} του εμπορικού προϊόντος κύστεων, ενώ οι κύστεις εξαιρετικής ποιότητας από την λίμνη Great Salt Lake παράγουν ναύπλιους έως 270.000 ανά γραμμάριο κύστεων (με ένα ισοδύναμο ποσοστό εκκόλαψης $> 90\%$), και οι παρτίδες των μικρών (=φωτεινότερων) κύστεων (π.χ. τύπος SFB) μπορούν να παραγάγουν ακόμα υψηλότερους αριθμούς ναυπλίων, (δηλ. 320.000 ναύπλιοι/g κύστης).



Εικ. 2.2.6. Καμπύλες ρυθμού εκκόλαψης από διαφορετικές παρτίδες κύστεων. Καμπύλη A: $T_{10}=17\text{h}$,

$T_{90}=23.5h$, $T_s=6.5h$; Καμπύλη Β: $T_{10}=28.5h$, $T_{90}=37.5h$, $T_s=9h$

Fig. 2.2.6. Hatching rate curves from different cyst batches. Curve A: $T_{10}=17h$, $T_{90}=23.5h$, $T_s=6.5h$;
Curve B: $T_{10}=28.5h$, $T_{90}=37.5h$, $T_s=9h$

Για να αξιολογηθεί η ποιότητα της εκκόλαψης μιας παραγωγής κύστεων, τα ακόλουθα κριτήρια χρησιμοποιούνται (Πίνακας 2.2.7 και 2.2.8):

- ποσοστό εκκόλαψης:

= ο αριθμός των ναυπλίων που μπορεί να παραχθεί υπό σταθερές συνθήκες εκκόλαψης από 100 πλήρεις κύστες. Αυτό το κριτήριο δεν λαμβάνει υπόψη τις ακαθαρσίες των κύστεων, (δηλ. ραγισμένα κελύφη, άμμος, άλας, κ.α.), και αναφέρεται μόνο στην ικανότητα εκκόλαψης των πλήρων κύστεων, η οποία εξαρτάται στη συνέχεια από:

α) τον βαθμό της λήξης της διάπαυσης: οι κύστες που είναι ακόμα στη διάπαυση δεν εκκολάπτονται, ακόμη και υπό ευνοϊκούς όρους εκκόλαψης.

β) το ενεργειακό περιεχόμενο των κύστεων: μπορεί να είναι πάρα πολύ χαμηλό για να ενισχύσει τα ικανοποιητικά επίπεδα γλυκερίνης, για να επιτρέψει τη διάρρηξη και την εκκόλαψη. Για παράδειγμα, η μη κατάλληλη αποθήκευση (βλ. 2.2.1.3.), οι περιβαλλοντικές ή γενοτυπικές συνθήκες έχουν επιπτώσεις στην παραγωγή...

γ) το ποσό των νεκρών και μη βιώσιμων εμβρύων, λόγω της μη κατάλληλης επεξεργασίας και αποθήκευσης.

- αποδοτικότητα εκκόλαψης:

= ο αριθμός των ναυπλίων που μπορεί να παραχθεί από το ξηρό προϊόν κύστεων 1 gr κάτω από σταθερές συνθήκες εκκόλαψης. Αυτό το κριτήριο αντικατοπτρίζει:

α) το ποσοστό εκκόλαψης (βλ. ανωτέρω)

β) την παρουσία άλλων συστατικών εκτός από τις πλήρεις κύστες στο προϊόν κύστεων (δηλ. κενά κελύφη, άλας, άμμος, περιεκτικότητα σε νερό των κύστεων) και

γ) το ατομικό βάρος των κύστεων (δηλ. περισσότερες κύστες/g για τα μικρότερα στελέχη).

Δεδομένου ότι αυτό το κριτήριο μπορεί να αναφέρεται στο έτοιμο προς χρήση εμπορικό προϊόν, έχει και πολύ πρακτικές επιπτώσεις, δεδομένου ότι η τιμή του προϊόντος μπορεί να αφορά άμεσα τον δείκτη αυτό.

- ρυθμό εκκόλαψης:

αυτό το κριτήριο αναφέρεται στο χρονικό διάστημα για την πλήρη εκκόλαψη από την αρχή της επώασης (= ενυδάτωση των κύστεων) μέχρι την απελευθέρωση των ναυπλίων (εκκόλαψη) και λαμβάνει υπόψη διάφορα χρονικά διαστήματα, συμπεριλαμβανομένων:

T_0 = χρόνος επώασης μέχρι την εμφάνιση του πρώτου ελεύθερου κολυμβητή ναύπλιου

T_{10} = χρόνος επώασης μέχρι την εμφάνιση 10% του συνολικού των εκκολαπτόμενων ναυπλίων (Εικ. 2.2.6.).

Τα στοιχεία που αφορούν το ποσοστό εκκόλαψης επιτρέπουν στον υπολογισμό της βέλτιστης περιόδου επώασης ώστε να συγκομιστεί ο ναύπλιος περιέχοντας το υψηλότερο ενεργειακό περιεχόμενο (Εικ. 2.3.4.). Είναι σημαντικό ότι ο T_{90} επιτυγχάνεται μέσα σε 24 ώρες, εάν όχι, περισσότερες δεξαμενές εκκόλαψης θα απαιτηθούν ώστε να εξασφαλιστεί ένας καθημερινός ανεφοδιασμός ενός μέγιστου αριθμού instar I ναυπλίων.

- συγχρονικότητα εκκόλαψης:

= το χρονικό σφάλμα κατά τη διάρκεια του οποίου η μεγαλύτερη ποσότητα ναυπλίων εκκολάπτεται, $T_S = T_{90} - T_{10}$.

Μια υψηλή συγχρονικότητα εκκόλαψης εξασφαλίζει έναν μέγιστο αριθμό instar I ναυπλίων διαθέσιμων μέσα σε μια έκταση μικρού χρόνου, και σε περίπτωση φτωχών σύγχρονων εκκολάψεων η ίδια εκκολαπτόμενη δεξαμενή πρέπει να έχει συγκομιστεί αρκετές φορές προκειμένου να αποφευχθεί ένας μικτός instar I-II-III πληθυσμός κατά τη συγκομιδή T_{90} .

- προϊόν εκκόλαψης:

= η βιομάζα ξηρού βάρους των ναυπλίων που μπορεί να παραχθεί από το ξηρό προϊόν κύστεων 1 gr, επωασμένου υπό σταθερές συνθήκες εκκόλαψης. Για την καλύτερη παραγωγή του προϊόντος περίπου 600 mg ναύπλιοι g^{-1} κύστεις. Ο υπολογισμός γίνεται ως εξής:

= αποδοτικότητα εκκόλαψης x ατομικό ξηρό βάρος του instar I ναύπλιου.

Η αποδοτικότητα της εκκόλαψης αναφέρεται μόνο στον αριθμό των ναυπλίων που παράγονται, και όχι στο μέγεθος αυτών (εξαρτώμενη από το στέλεχος), σε αντίθεση με το κριτήριο του προϊόντος εκκόλαψης και συσχετίζεται με το συνολικό ποσό των τροφών που είναι διαθέσιμο για τον θηρευτή ανά γραμμάριο προϊόντος κύστεων.

Πίνακας 2.2.5. Επίδρασης της επώασης σε χαμηλή αλατότητα στο ποσοστό εκκόλαψης, το ατομικό βάρος του ναύπλιου, και το προϊόν εκκόλαψης κύστεων *Artemia* από διαφορετικές γεωγραφικές πηγές
Table 2.2.5. Effect of incubation at low salinity on hatching percentage, individual nauplius weight, and hatching output for *Artemia* cyst sources from different geographical origin

cyst source	hatching percentage (%)		
	35 g.l ⁻¹	5 g.l ⁻¹	% diff.
San Francisco Bay, CA-USA	71.4	68.0	-4.8
Macau, Brazil	82.0	86.4	+5.3
Great Salt Lake, UT-USA	43.9	45.3	+3.1
Shark Bay, Australia	87.5	85.8	-1.9
Chaplin Lake, Canada	19.5	52.2	+167.6
Bohai Bay, PR China	73.5	75.0	+2.0
	naupliar dry weight (µg)		
San Francisco Bay, CA-USA	1.63	1.73	+6.1
Macau, Brazil	1.74	1.76	+1.1
Great Salt Lake, UT-USA	2.42	2.35	-2.5
Shark Bay, Australia	2.47	2.64	+6.9
Chaplin Lake, Canada	2.04	2.28	+11.8
Bohai Bay, PR China	3.09	3.07	-0.6
	hatching output (mg nauplii.g ⁻¹ cysts)		
San Francisco Bay, CA-USA	435.5	440.2	+1.1
Macau, Brazil	529.0	563.7	+6.6
Great Salt Lake, UT-USA	256.5	257.0	+0.2
Shark Bay, Australia	537.5	563.3	+4.8
Chaplin Lake, Canada	133.8	400.4	+199.3
Bohai Bay, PR China	400.5	406.0	+1.4

Πίνακας 2.2.6. Πρακτικό παράδειγμα υπολογισμού του περιεχόμενου νερού των κύστεων *Artemia*.
Table 2.2.6. Practical example of the procedure for estimating the water content of *Artemia* cysts.

Sample	Weight of cup (in g) (=T _i)	Weight of cup + cyst sample (in g) (=G _i)	Weight of cup + dried cysts (in g) (=G _i ')	% water content (=W _i)
1	0.2158	0.7158	0.6688	9.4
2	0.2434	0.7434	0.6969	9.3
3	0.2827	0.7827	0.7365	9.2
mean water content				9.3

Πίνακας 2.2.7. Πρακτικό παράδειγμα ποσοστού εκκόλαψης (H%) και αποδοτικότητας εκκόλ. (HE).
Table 2.2.7. Practical example hatching percentage (H%) and hatching efficiency (HE).

nauplii (n)	umbrellas (u)	embryos (e)	$H\% = \frac{n \cdot (n+u+e)}{1 \cdot 100}$
replicate 1			
110	3	17	84.62
129	4	14	87.76
122	3	13	88.41
108	2	15	86.40
117	2	16	86.67
101	3	10	88.60
average nauplii = 115		average H% = 87.08	
replicate 2			
124	1	14	89.21
122	1	21	84.72
138	0	18	88.46
103	3	7	91.45
142	0	12	92.21
130	4	13	88.44
average nauplii = 127		average H% = 89.03	
replicate 3			
127	3	14	88.19
107	4	10	88.43
133	2	18	86.93
135	5	13	88.24
125	1	15	88.65
128	1	15	88.89
average nauplii = 126		average H% = 88.23	
average H% = $(87.08+89.03+88.23) \cdot 3^{-1} \times 100 = 88.11$ (st. dev. = 0.98)			
average HE = $(115+127+126) \cdot 3^{-1} \times 2000 = 245\,300$ (st. dev. = 13\,000)			

Πίνακας 2.2.8. Πρακτικό παράδειγμα του ρυθμού εκκόλαψης (HR)
Table 2.2.8. Practical example of hatching rate (HR)

incubation time (in h)	HE (N.g ⁻¹)	% of maximal HE
12	0	0
13	800	0.4
14	9 000	5
15	29 400	15
16	79 800	42
17	144 400	76
18	158 200	83
19	184 600	97
20	185 000	97
21	191 000	100
Characteristic time-intervals		$T_{10} = 14.5$ h $T_{50} = 16.2$ h $T_{90} = 18.5$ h $T_s = T_{90} - T_{10} = 4.0$ h

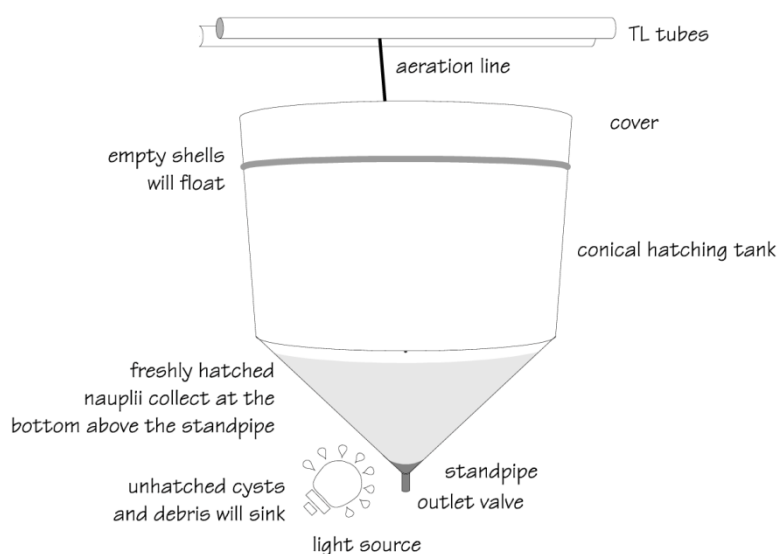
2.2.6. Παραπομπές

- Browne, R.A., Sorgeloos, P. and Trotman, C.N.A. (Eds). 1991. *Artemia* Biology. Boston, USA, CRC Press, 374 pp.
- Bruggeman, E., Sorgeloos, P. and Vanhaecke, P. 1980. Improvements in the decapsulation technique of *Artemia* cysts. In: The brine shrimp *Artemia*. Vol. 3. Ecology, culturing and use in aquaculture. Persoone, G., P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp 261-269.
- Clegg, J.S. and Conte, F.P. 1980. A review of the cellular and developmental biology of *Artemia*. In: The brine shrimp *Artemia*. Vol. 2. Physiology, biochemistry, molecular biology. Persoone, G., P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp 11-54.
- Lavens, P. and Sorgeloos, P. 1987. The cryptobiotic state of *Artemia* cysts, its diapause deactivation and hatching, a review. In: *Artemia* Research and its Applications, Vol. 3. Sorgeloos, P., D.A. Bengtson, W. Declair and E. Jaspers (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp 27-63.
- MacRae, T.H., Bagshaw, J.C. and Warner, A.H. (Eds). 1989. Biochemistry and cell biology of *Artemia*. Boca Raton, Florida, USA, CRC press, 264 pp.
- Morris, J.C. and Afzelius, B.A. 1967. The structure of the shell and outer membranes in encysted *Artemia salina* embryos during cryptobiosis and development. *Journal of Ultrastructure Research* 20: 244-259.
- Verreth, J., Storch, V. and Segner, H. 1987. A comparative study on the nutritional quality of decapsulated *Artemia* cysts, micro-encapsulated egg diets and enriched dry feeds for *Clarias gariepinus* (Burchell) larvae. *Aquaculture*, 63: 269-282.
- Warner, A.H., MacRae, T.H. and Bagshaw J.C. (Eds). 1989. Cell and molecular biology of *Artemia* development. New York, USA, Plenum Press, 453 pp.

2.3. Χρήση των ναύπλιων και των μετά-ναύπλιων

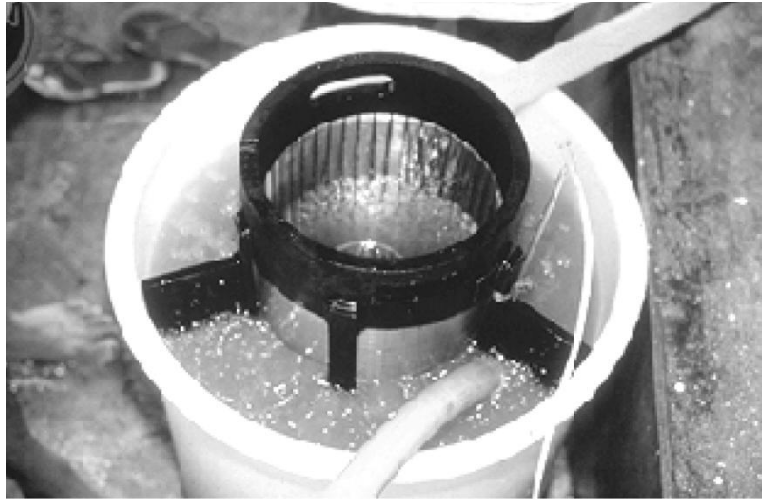
2.3.1. Συγκομιδή και διανομή

Μετά την εκκόλαψη και πριν από τη σίτιση των ναύπλιων στις νύμφες των ψαριών και των καρκινειδών, πρέπει να χωριστούν από τα εκκολλαπτόμενα απόβλητα (κενά κελύφη κύστεων, μη-εκκολλαπτόμενες κύστεις, συντρίμμια, μικροοργανισμοί και μεταβολίτες εκκόλαψης). Πέντε έως δέκα λεπτά μετά από το κλείσιμο του αερισμού, τα κελύφη των κύστεων επιπλέουν και μπορούν να αφαιρεθούν από την επιφάνεια, ενώ ναύπλιοι και μη εκκολλαπτόμενες κύστεις θα συγκεντρωθούν στο κατώτατο σημείο (Εικ. 2.3.1.).



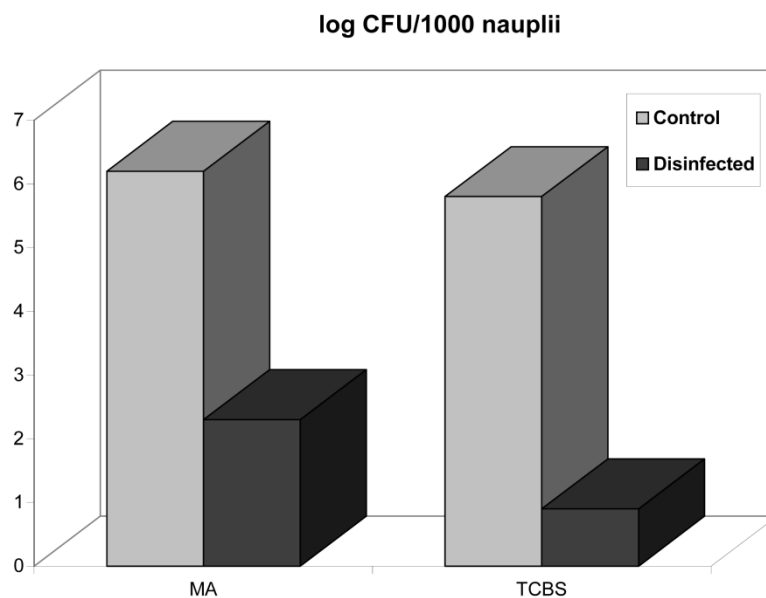
Εικ. 2.3.1. Δοχείο εκκόλαψης στη συγκομιδή.
Fig. 2.3.1. Hatching container at harvest.

Δεδομένου ότι οι ναύπλιοι παρουσιάζουν θετικό φωτοτακτισμό, η συγκέντρωσή τους μπορεί να βελτιωθεί, με σκίαση του ανώτερου μέρους της δεξαμενής εκκόλαψης (με τη χρήση καλύμματος) και την τοποθέτηση μιας πηγής φωτός στο διαφανές κωνικό μέρος του κατώτατου σημείου της δεξαμενής. Οι ναύπλιοι δεν πρέπει να εγκατασταθούν για υπερβολικά μεγάλο χρονικό διάστημα (μέγιστο 5 έως 10 λεπτά) στον κώνο της δεξαμενής, για να αποτραπεί η θνησιμότητα λόγω της μείωσης οξυγόνου. Αρχικά, μη-εκκολλαπτόμενες κύστεις και άλλα συντρίμμια που έχουν συσσωρευτεί κάτω από τους ναύπλιους αναρροφούνται ή αποχετεύονται όταν χρειάζεται (κατά τη χρησιμοποίηση των κύστεων μιας χαμηλότερης ποιότητας εκκόλαψης). Κατόπιν οι ναύπλιοι συλλέγονται σε ένα φίλτρο πλέγματος (<math>< \mu\text{m} 150</math>), το οποίο πρέπει να καταδυθεί σε νερό όλη την ώρα, ώστε να αποτραπεί η φυσική καταστροφή των ναυπλίων. Κατόπιν αυτά ξεπλένονται λεπτομερώς με το νερό προκειμένου να αφαιρεθούν οι πιθανοί μολυσματικοί παράγοντες και οι μεταβολίτες εκκόλαψης, όπως η γλυκερίνη. Η εγκατάσταση των αυτοματοποιημένων συστημάτων απλοποιεί τις τεχνικές παραγωγής σε εμπορικές διαδικασίες, (δηλ. με την χρήση ενός συμπυκνωτή Εικ. 2.3.2.) επιτρέποντας την ταχύτερη συγκομιδή μεγάλων όγκων ναυπλίων *Artemia* και την πλήρη αφαίρεση των συντριμμίων από το εκκολλαπτόμενο μέσο. Αυτή η τεχνική οδηγεί σε μια σημαντική μείωση της εργασίας και του κόστους παραγωγής.



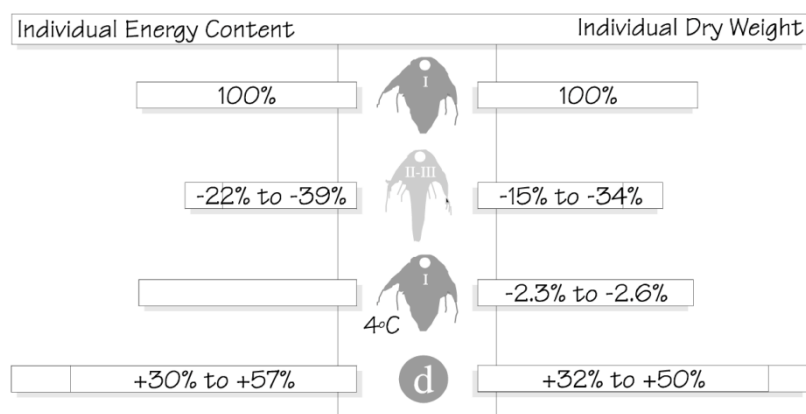
Εικ. 2.3.2. Συλλέκτης/καθαριστής σε χρήση (Φωτο Sorgeloos and Leger, 1992).
 Fig. 2.3.2. Concentrator/rinser in use (Photo from Sorgeloos and Leger, 1992).

Καθώς οι ζωντανές τροφές αποτελούν πηγή βακτηριακών μολύνσεων προκαλώντας τελικά τα προβλήματα ασθενειών στη νυμφική εκτροφή, η μικροβιακή μόλυνση πρέπει να περιοριστεί στο ελάχιστο. Κατά τη διάρκεια της εκκόλαψης των κύστεων *Artemia*, οι βακτηριακοί αριθμοί αυξάνονται από 10^3 έως 10^5 έναντι του αρχικού πληθυσμού πριν από τη διάρρηξη των κύστεων. Αυτός ο βακτηριακός πληθυσμός παραμένει και δεν μπορεί να αφαιρεθεί από τους ναύπλιους με το ξέπλυμα με το νερό της θάλασσας ή του γλυκού νερού και έχει μόνο μια επίδραση αραιώσης στο νερό που περιβάλλει του ναύπλιους.



Εικ. 2.3.3. Βακτηριακές μετρήσεις (σε θαλασσινό άγαρ MA και TCBS από εκκολαπτόμενη *Artemia* χρησιμοποιώντας κύστες σαν μάρτυρα).
 Fig. 2.3.3. Bacterial counts (on marine agar MA and TCBS for hatched *Artemia* using disinfected cysts vs. control).

Εντούτοις, εκκολάπτοντας τους ναύπλιους από τις κύστες που έχουν υποβληθεί σε μια διαδικασία απολύμανσης μειώνονται επιτυχώς οι βακτηριακοί αριθμοί μετά από τη συγκομιδή έναντι των τυποποιημένων τεχνικών εκκόλαψης που χρησιμοποιούν μη απολυμασμένες κύστες (Εικ. 2.3.3.) και συγκεκριμένα τα επίπεδα *Vibrio* μειώνονται κάτω από 10^3 CFU g⁻¹. Τη στιγμή αυτή ένα νέο προϊόν απολύμανσης κύστεων είναι διαθέσιμο στο εμπόριο (ονομάζεται DC-cysts, INVE Aquaculture NV, Βέλγιο) και έχει οδηγήσει σε χαμηλούς βακτηριακούς αριθμούς μετά από την εκκόλαψη.



Εικ. 2.3.4. Αλλαγή στην ενέργεια και το νωπό βάρος διαφορετικών *Artemia* (νέο-εκκολαπτόμενος ναύπλιος instar I θεωρούνται ότι έχουν 100% τιμές από αυτές τις ποικιλίες). Το % ποσοστό ή η μείωση για τους instar I, instar II-III μετά-ναύπλιους, instar I ναύπλιοι αποθηκευμένοι στους 4°C για 24h, και αποκελυφοποιημένοι (from Leger et al., 1987a).

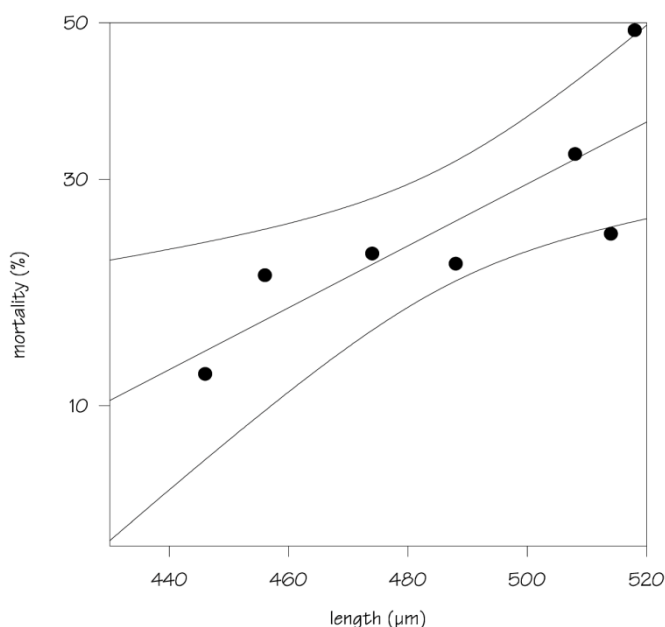
Fig. 2.3.4. Change in energy and dry weight of different of *Artemia* (newly hatched instar I nauplii are considered to have 100% values for those variables). The % decrease or increase is shown for instar I, instar II-III meta-nauplii, instar I nauplii stored at 4°C for 24h, and decapsulated (from Leger et al., 1987a).

Δεδομένου ότι ο ναύπλιος instar I στηρίζεται εντελώς στα ενεργειακά του αποθέματα, πρέπει να συγκομιστεί και να ταϊστεί στις νύμφες των ψαριών ή των καρκινοειδών με την πιο ενεργητική του μορφή, (δηλ. το συντομότερο δυνατόν μετά από την εκκόλαψη). Για πολύ καιρό οι καλλιεργητές αγνοούν το γεγονός ότι ένας ναύπλιος *Artemia* στη πρώτη φάση ανάπτυξης του δεν μπορεί να λάβει τροφή και έτσι καταναλώνει τα ενεργειακά του αποθέματα. Στις υψηλές θερμοκρασίες που υποβάλλονται για την επώαση κύστεων, ο νέο-εκκολαπτόμενος ναύπλιος *Artemia* περνά στο δεύτερο νυμφικό στάδιο μέσα σε λίγες ώρες. Είναι προτιμότερο να ταϊστεί ο πρώτος instar I ναύπλιος στα θηράματα παρά ο πεινασμένος δεύτερος instar II μετά-ναύπλιος, που θα έχει καταναλώσει ήδη το 25-30% των ενεργειακών αποθεμάτων του μέσα σε 24 ώρες μετά την εκκόλαψη (Εικ. 2.3.4.). Επιπλέον, ο ναύπλιος instar II *Artemia* είναι ορατός δεδομένου ότι είναι διαφανής, μεγαλύτερος και κολυμπά γρηγορότερα από τις προνύμφες του πρώτου instar και κατά συνέπεια είναι προσιτός ως θήραμα. Παρόλα αυτά, περιέχει χαμηλότερα ποσά ελεύθερων αμινοξέων, χαμηλότερο ατομικό οργανικό ξηρό βάρος και το ενεργειακό περιεχόμενό του θα μειώσει την ενεργειακή λήψη από τα αρπακτικά ψάρια ανά προσπάθεια κυνηγιού. Όλο αυτό έχει αντίκτυπο σε μια μειωμένη αύξηση των νυμφών και μια αυξανόμενο ποσότητα κύστεων *Artemia* περίπου κατά 20-30% θα απαιτηθούν για να εκκολαφθούν για να ταΐσουν το ίδιο βάρος του πεινασμένου μετά-ναύπλιου στα θηράματά τους (Léger et al., 1986). Αφ' ετέρου, το instar II στάδιο μπορεί να είναι πιο ευαίσθητο σε λύση των πεπτικών ενζύμων στο έντερο του θηρευτή μιας και αυτά

τα ένζυμα μπορούν επίσης να διαπεράσουν την πεπτική οδό της *Artemia* μέσω του ανοιγμένου στόματος ή της έδρας.

2.3.2. Κρύα αποθήκευση

Η έκδυση του ναύπλιου *Artemia* στο δεύτερο instar στάδιο μπορεί να αποφευχθεί και η μεταβολική ενέργεια είναι πολύ μειωμένη (Εικ. 2.3.4.) με την αποθήκευση του νέο-εκκολαπτόμενου ναύπλιου σε μια θερμοκρασία κάτω από 10 °C σε πυκνότητες μέχρι 8 εκατομμύρια ανά λίτρο. Μόνο ένας μικρός αερισμός απαιτείται προκειμένου να αποτραπεί η συσσώρευση των ναύπλιων στο κατώτατο σημείο της δεξαμενής. Κατά αυτόν τον τρόπο ο ναύπλιος μπορεί να αποθηκευτεί για περιόδους μέχρι και περισσότερο από 24 ώρες χωρίς σημαντικές θνησιμότητες και με μια μείωση της ενέργειας λιγότερο από 5%. Εφαρμόζοντας την κρύα αποθήκευση των 24 ωρών που πραγματοποιείται σε μονωμένες με φολιζόλ δεξαμενές ή μπλε πακέτα πάγου ή σε πάγο σε κλειστές πλαστικές τσάντες ειδικές για ψύξη, τα εμπορικά εκκολαπτήρια είναι σε θέση για οικονομικότερη διαχείριση της εκκόλαψης των κύστεων *Artemia* (μείωση του αριθμού εκκόλαψης και συγκομιδών καθημερινά, λιγότερων δεξαμενών, μεγαλύτεροι όγκοι). Επιπλέον, η κρύα αποθήκευση επιτρέπει στον καλλιεργητή συχνότερη και πιο αυτοματοποιημένη διανομή βέλτιστης ζωντανής τροφής. Το γεγονός αυτό είναι ευεργετικό για τα ψάρια και τις νύμφες γαριδών, μιας και οι χρόνοι διατήρησης τροφών στις δεξαμενές των νυμφών μπορούν να μειωθούν και ως εκ τούτου η αύξηση της *Artemia* στη δεξαμενή καλλιέργειας μπορεί να ελαχιστοποιηθεί. Για παράδειγμα, εφαρμόζοντας μια ή το μέγιστο δύο τροφοδοτήσεις ανά ημέρα, οι καλλιεργητές γαριδών δοκίμασαν συχνά νέα *Artemia* στις δεξαμενές των νυμφών τους που ανταγωνίζονται με τις μετά-νύμφες γαριδών της αλμυρογαρίδας.

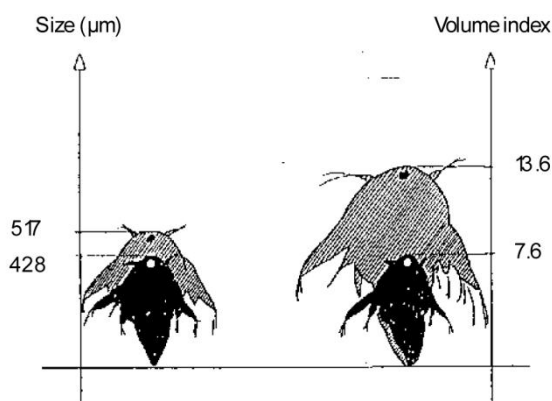


Εικ. 2.3.5. Σχέση μεταξύ ρυθμού θνησιμότητας νυμφών *Menidia menidia* και μήκους ναυπλίων *Artemia* από αρκετές γεωγραφικές πηγές που προσφέρονται σαν τροφή στις νύμφες ψαριών (Beck and Bengtson, 1982)..

Fig. 2.3.5. Correlation of mortality rate of *Menidia menidia* larvae and nauplii length of *Artemia* from seven geographical sources offered as food to fish larvae (Beck and Bengtson, 1982).

2.3.3. Θρεπτική ποιότητα

Η θρεπτική αποτελεσματικότητα ενός οργανισμού που προορίζεται για τροφή καθορίζεται κατά πρώτο λόγο από το δυνατότητα κατάποσή του και επομένως από το μέγεθος και τη μορφή του. Το μέγεθος του ναύπλιου *Artemia*, που ποικίλλει πολύ από τη μια γεωγραφική πηγή στην άλλη, δεν είναι συχνά κρίσιμο για τις καρκινοειδείς νύμφες, οι οποίες μπορούν να συλλάβουν και να συνθλίψουν τα μόρια των τροφών με τα εξαρτήματα σίτισής τους. Για τις νύμφες των θαλασσίων ψαριών που έχουν ένα πολύ μικρό στόμα και καταπίνουν το θήραμά τους σε ένα δάγκωμα, το μέγεθος του ναύπλιου είναι ιδιαίτερα κρίσιμο. Για παράδειγμα, οι νύμφες ψαριών που τους προσφέρονται μεγάλου μεγέθους ναύπλιοι *Artemia* μπορούν να υποπέσουν σε κατάσταση τροφικής πενίας επειδή δεν μπορούν να λάβουν το θήραμα. Για τουλάχιστον ένα είδος, το θαλάσσιο ασημί *Menidia menidia*, ένας υψηλός συσχετισμός υπάρχει μεταξύ του μήκους του ναύπλιου *Artemia* και της νυμφικής θνησιμότητας των ψαριών κατά τη διάρκεια πέντε ημερών μετά από την εκκόλαψη: με χρήση μεγαλύτερων στελεχών *Artemia* (μήκος ναύπλιου 520 μm), πάνω από το 50% των ψαριών δεν μπορεί να συλλάβει το θήραμά τους και πεθαίνει, ενώ ταΐζοντας τη μικρή *Artemia* (430 μm), οδηγείται στη θνησιμότητα μόνο το 10% (Εικ. 2.3.5.). Ψάρια που παράγουν μικρά αυγά, όπως η κοινή τσιπούρα, η γλώσσα και οι ροφοί, πρέπει να ταΐστούν αρχικά με τροχόζωα επειδή ο ναύπλιος από οποιαδήποτε στέλεχος *Artemia* είναι πάρα πολύ μεγάλος. Σε αυτές τις περιπτώσεις, το μέγεθος του ναύπλιου (επιλεγμένου στελέχους) θα καθορίσει τότε τα ψάρια μπορούν να αντικαταστήσουν τα τροχόζωα από *Artemia*. Όσο το μέγεθος του θηράματος δεν συγκρούεται με το μηχανισμό κατάποσης του θηρευτή, χρήση μεγαλύτερου ναύπλιου (με ένα υψηλότερο ατομικό ενεργειακό περιεχόμενο) είναι ευεργετική δεδομένου ότι, ο θηρευτής θα ξοδέψει λιγότερη ενέργεια μιας και θα χρειαστεί να λάβει έναν μικρότερο αριθμό μεγαλύτερων ναυπλίων για να ικανοποιήσει τις ενεργειακές απαιτήσεις του.



Εικ. 2.3.6. Σχηματικό διάγραμμα της βιομετρικής ποικιλίας σε νέο-εκκολαπτόμενους ναύπλιους instar I *Artemia* από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές (size=μήκος ναύπλιου, volume index= μέτρηση καλλιέργειας)

Fig. 2.3.6. Schematic diagram of the biometrical variation in freshly-hatched instar I *Artemia* nauplii from different geographical origin (size=nauplius length; volume index=culture counter)

Στοιχεία που αφορούν τη βιομετρία των ναυπλίων διαφόρων στελεχών *Artemia* παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1.2. και εύρη δίνονται στην Εικ. 2.3.6.

Ένα άλλο σημαντικό διατροφικό χαρακτηριστικό του ναύπλιου *Artemia* προσδιορίστηκε προς το τέλος της δεκαετίας του '70 και τις αρχές δεκαετίας του '80, όταν σε πολλά εκκολαπτήρια ψαριών και γαριδών εμφανίσθηκαν απροσδόκητα προβλήματα κατά την αλλαγή των πηγών *Artemia*. Ιάπωνες, Αμερικανικοί και

Ευρωπαίοι ερευνητές μελέτησαν αυτά τα προβλήματα και επιβεβαίωσαν σύντομα τις παραλλαγές στη θρεπτική αξία κατά τη χρησιμοποίηση των διαφορετικών γεωγραφικών πηγών της *Artemia* για τα ψάρια και τα είδη γαρίδων. Η κατάσταση έγινε κρισιμότερη όταν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ διαφορετικών παρτίδων ίδιας γεωγραφικής προέλευσης κύστεων *Artemia*.

Μελέτες στην Ιαπωνία και η διεπιστημονική διεθνής μελέτη International Study on *Artemia* αποκάλυψαν ότι η συγκέντρωση του βασικού λιπαρού οξέος (EFA) 20:5n-3 στις κύστες *Artemia* καθόριζε τη θρεπτική αξία των νυμφών διάφορων θαλασσιών ψαριών και καρκινοειδών (Léger *et al.*, 1986). Διάφορα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με τις διαφορετικές παρτίδες ίδιας γεωγραφικής πηγής *Artemia*, που περιέχουν διαφορετικά ποσά EPA και που παράγουν τα ανάλογα αποτελέσματα στην αύξηση και την επιβίωση των γαρίδων *Mysidopsis Bahía* που ταΐστηκαν με αυτές τις κύστες *Artemia*. Τα επίπεδα του EFA ποικίλλουν παρά πολύ από στέλεχος σε στέλεχος και ακόμη και από παρτίδα σε παρτίδα (Πίνακας 4.3.1.), όπου ο αιτιολογικός παράγοντας είναι οι διακυμάνσεις στη βιοχημική σύνθεση των αρχικών παραγωγών διαθέσιμων στον ενήλικο πληθυσμό. Μετά από αυτές τις παρατηρήσεις, κατάλληλες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για τη βελτίωση του λιπιδικού προφίλ στελεχών *Artemia* (βλ. περαιτέρω). Οι εμπορικές κύστες *Artemia* που περιέχουν υψηλά επίπεδα EPA είναι περιορισμένες και συνεπώς, αυτές οι κύστες είναι πολύ ακριβές. Επομένως, η χρήση των κύστεων με υψηλό EPA πρέπει να περιοριστεί στην περίοδο σίτισης που απαιτείται μικρού μεγέθους θηράματα (νέο-εκκολαπτόμενοι ναύπλιοι).

Σε αντίθεση με τα λιπαρά οξέα, η σύνθεση των αμινοξέων των ναύπλιων *Artemia* φαίνεται να είναι εντυπωσιακά παρόμοια μεταξύ των στελεχών, που προτείνει ότι δεν είναι περιβαλλοντικά εξαρτώμενα όπως είναι τα λιπαρά οξέα.

Πίνακας 2.3.1. Έσω-ειδική ποικιλία των 20:5n-3 (EPA) του περιεχόμενου *Artemia*. Οι τιμές παρουσιάζονται ως εύρη (%) και συμπληρώνονται με την τυπική απόκλιση (Léger *et al.*, 1986).
Table 2.3.1. Intra-strain variability of 20:5n-3 (EPA) content in *Artemia*. Values represent the range (area percent) and coefficient of variation of data as compiled by Léger *et al.* (1986).

Cyst source	20:5n-3 range (area %)	Coefficient of variation (%)
San Francisco Bay, CA-USA	0.3-13.3	78.6
Great Salt Lake (South arm), UT-USA	2.7-3.6	11.8
Great Salt Lake (North arm), UT-USA	0.3-0.4	21.2
Chaplin Lake, Canada	5.2-9.5	18.3
Macau, Brazil	3.5-10.6	43.2
Bohai Bay, PR China	1.3-15.4	50.5

Τα επίπεδα των βασικών αμινοξέων της *Artemia* δεν είναι γενικά ένα σοβαρό πρόβλημα λαμβάνοντας υπόψη τη θρεπτική αξία, αλλά τα αμινοξέα θείου, όπως η μεθειονίνη, είναι τα πρώτα περιοριστικά αμινοξέα (Πίνακας 2.3.2.).

Πίνακας 2.3.2. Σύνθεση αμινοξέων των ναυπλίων *Artemia* (mg g⁻¹ πρωτεΐνη) (Seidel *et al.*, 1980).
Table 2.3.2. Amino-acid composition of *Artemia* nauplii (mg g⁻¹ protein) (Seidel *et al.*, 1980).

	Macau, Brazil	Great Salt Lake, UT-USA	San Pablo Bay, CA-USA
aspartic acid	110	113	141
threonine	52	48	60
serine	45	54	77
glutamic acid	131	135	102
proline	57	59	49
glycine	60	60	74
alanine	46	49	42
valine	53	52	55
methionine	22	37	26
isoleucine	56	68	54
leucine	89	100	84
tyrosine	105	66	77
phenylalanine	51	85	104
histidine	49	27	35
lysine	117	93	87
arginine	115	97	98

Η παρουσία διάφορων πρωτεολυτικών ενζύμων στο αναπτυσσόμενο έμβryo της *Artemia* στο ναύπλιο της *Artemia* έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι αυτά τα εξωγενή ένζυμα διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στη λύση του ναύπλιου *Artemia* στην πεπτική οδό των νυμφών των θηρευτών.

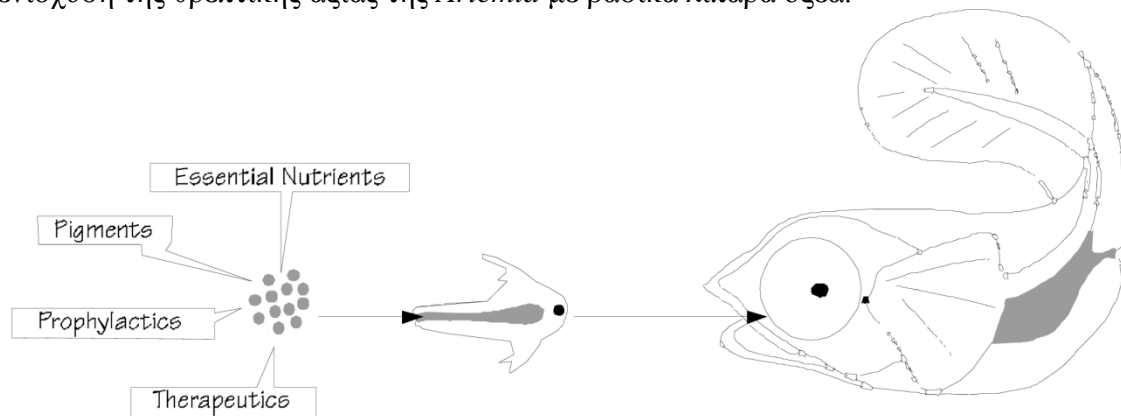
Τα επίπεδα ορισμένων μετάλλων στην *Artemia*, έχουν συνοψιστεί από τους Léger *et al.*, (1986). Εντούτοις, αν και οι απαιτήσεις σε μέταλλα των θαλασσιών οργανισμών είναι ανεπαρκώς κατανοητές και μπορούν να ικανοποιηθούν μέσω της κατανάλωσης νερού της θάλασσας, η βασική ανησυχία σχετικά με τη μεταλλική σύνθεση της *Artemia* είναι εάν καλύπτουν τις απαιτήσεις των νυμφών των ψαριών ή των καρκινοειδών που εκτρέφονται σε γλυκά νερά. Για παράδειγμα, μια πρόσφατη μελέτη της μεταβλητότητας 18 μετάλλων και ιχνοστοιχείων στις κύστες *Artemia* αποκάλυψε ότι τα επίπεδα σεληνίου μπορούν σε μερικές περιπτώσεις να μην είναι επαρκή.

Οι κύστες *Artemia* (κόλπος του Σαν Φρανσίσκο) αναλύθηκαν για το περιεχόμενο των διάφορων βιταμινών και βρέθηκαν να περιέχουν υψηλά επίπεδα θειαμίνης (7-13 $\mu\text{g g}^{-1}$), νιασίνης (68-108 $\mu\text{g g}^{-1}$), ριβοφλαβίνης (15-23 $\mu\text{g g}^{-1}$), παντοθενικού οξέος (56-72 $\mu\text{g g}^{-1}$) και της ρετινόλης (10-48 $\mu\text{g g}^{-1}$). Μια σταθερή μορφή βιταμίνης C (ασκορβικό οξύ 2-θειικό) είναι παρούσα στις κύστες *Artemia*. Αυτό το παράγωγο υδρολύεται στο ελεύθερο ασκορβικό οξύ κατά τη διάρκεια της εκκόλαψης, όπου τα επίπεδα ασκορβικού οξέος στον ναύπλιο *Artemia* ποικίλλουν από 300 έως 550 το $\mu\text{g g}^{-1}$ DW. Τα δημοσιευμένα στοιχεία εμφανίζουν να δείχνουν ότι, τα επίπεδα βιταμινών της *Artemia* είναι αρκετά να ικανοποιήσουν τις διατροφικές απαιτήσεις των αναπτυσσόμενων ψάρια. Εντούτοις, οι απαιτήσεις βιταμινών κατά τη διάρκεια των

νυμφικών καλλιεργείων, είναι ακόμα κατά ένα μεγάλο μέρος άγνωστες και ίσως να είναι υψηλότερες στις νύμφες ψαριών και καρκινοειδών υψηλής αύξησης και μεταβολικού ρυθμού.

2.3.4. Εμπλουτισμός με θρεπτικές ουσίες

Όπως αναφέρεται προηγουμένως, ένας σοβαρός παράγοντας που έχει επιπτώσεις στη θρεπτική αξία της *Artemia* ως πηγή τροφής για τους θαλάσσιους νυμφικούς οργανισμούς είναι το περιεχόμενο των βασικών λιπαρών οξέων, EPA: 20:5n-3 και ακόμη πιο σημαντικό το DHA: 22:6n-3. Σε αντίθεση με τα είδη του γλυκού νερού, οι περισσότεροι θαλάσσιοι οργανισμοί δεν έχουν την ικανότητα σύνθεσης αυτών από τα χαμηλότερα ακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το λινολεϊνικό οξύ (18: 3n-3). Λαμβάνοντας υπόψη την ανεπάρκεια των λιπαρών οξέων της *Artemia*, έρευνα έχει πραγματοποιηθεί για τη βελτιώσει της σύνθεσης των λιπιδίων με ενίσχυση πριν το τάϊσμα με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (HUFA) της σειράς n-3. Είναι χρήσιμο ότι η *Artemia*, λόγω των πρωτόγονων χαρακτηριστικών σίτισής της επιτρέπει έναν πολύ κατάλληλο τρόπο χειρισμού της σύνθεσης της. Παρότι, η *Artemia* στο δεύτερο νυμφικό στάδιο (περίπου επόμενη έκδυση 8 ωρών), είναι μη εκλεκτική στην επιλογή των θηραμάτων της, απλές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την ενσωμάτωση των προϊόντων λιπιδίων στον ναύπλιο *Artemia* πριν από την προσφορά του ως θήραμα στις νύμφες του θηρευτή. Αυτή η μέθοδος της βιοεγκλεισμού, που επίσης ονομάζεται εμπλουτισμός ή ενίσχυση της *Artemia* (Εικ. 2.3.7.), εφαρμόζεται ευρέως στα εκκολαπτήρια θαλάσσιων ψαριών και καρκινοειδών σε όλο τον κόσμο για την ενίσχυση της θρεπτικής αξίας της *Artemia* με βασικά λιπαρά οξέα.

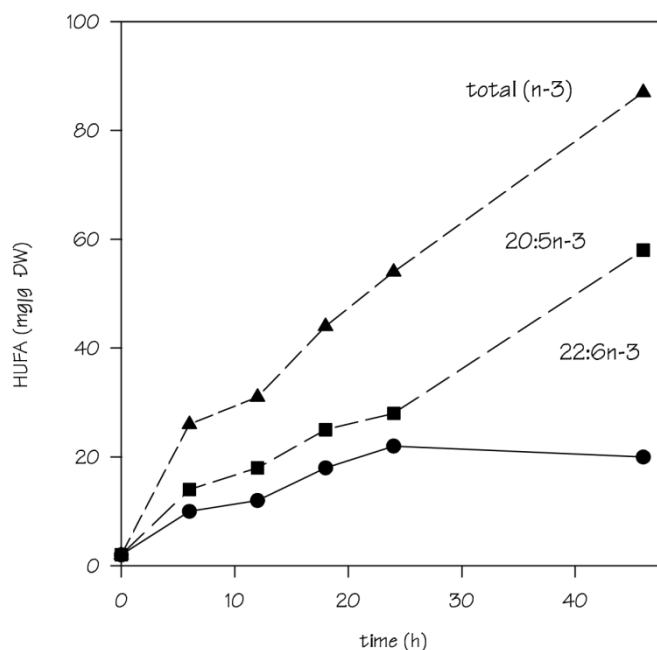


Εικ. 2.3.7. Σχηματικό διάγραμμα της χρήσης *Artemia* ως διαμεσολαβητή συγκεκριμένων συστατικών στις καλλιεργούμενες νύμφες.

Fig. 2.3.7. Schematic diagram of the use of *Artemia* as vector for transfer of specific components into cultured larvae.

Βρετανικοί, Ιάπωνες, Γάλλοι και Βέλγοι ερευνητές έχουν αναπτύξει επίσης άλλα προϊόντα εμπλουτισμού, συμπεριλαμβανομένων των μονοκύτταρων φυκών, της ωμαγιάς και ή των γαλακτωματοποιημένων σκευασμάτων, των σύνθετων διατροφών, των μικρό-μοριακών διατροφών ή των αυτό-γαλακτοποιημένων συμπυκνωμάτων. Εκτός από τη χρήση διατροφής εμπλουτισμού, οι διαφορετικές τεχνικές ποικίλλουν με σεβασμό στις συνθήκες εκκόλαψης, τον χρόνο πριν τον εμπλουτισμό (χρόνος μεταξύ της εκκόλαψης και της προσθήκης της διατροφής εμπλουτισμού), την περίοδο εμπλουτισμού και τη θερμοκρασία. Τα πιο υψηλά επίπεδα εμπλουτισμού

λαμβάνονται κατά τη χρησιμοποίηση των γαλακτωματοποιημένων συμπυκνώσεων (Εικ. 2.3.8., Πίνακας 2.3.3.).



Εικ. 2.3.8. HUFA-επίπεδα στη Great Salt Lake στους μετά-ναύπλιους *Artemia* που εμπλουτίστηκαν με Super Selco (INVE) (Dhont et al., 1993).

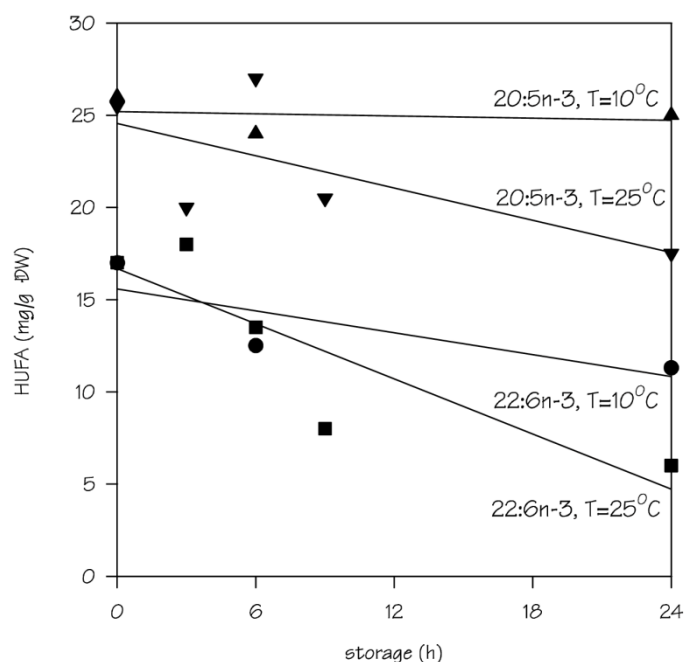
Fig. 2.3.8. HUFA-levels in Great Salt Lake *Artemia* meta-nauplii enriched with Super Selco (INVE) (Dhont et al., 1993).

Η διατροφή Selco είναι ένα αυτό-διασκορπιζόμενο σύμπλεγμα επιλεγμένων θαλασσίων πηγών ελαίου, βιταμινών και καροτενοειδών. Κατά τη διάλυσή του στο θαλασσίνο νερό, τα λεπτά μικρό-μόρια του διαμορφώνονται και λαμβάνονται εύκολα από την *Artemia* και προσφέρουν επίπεδα EFA εμπλουτισμού σε τιμές ανώτερες από αυτές που έχουν μέχρι τώρα αναφερθεί (Léger *et al.*, 1986). Για τον εμπλουτισμό, ο πρόσφατα εκκολαπτόμενος ναύπλιος μεταφέρεται σε μια δεξαμενή εμπλουτισμού και σε μια πυκνότητα από 100 (για περίοδο εμπλουτισμού 24 ώρες) έως 300 ναύπλιους ml^{-1} (μέγιστος εμπλουτισμός σε 24 ώρες ανά περίοδο).

Πίνακας 2.3.3. Επίπεδα εμπλουτισμού levels (mg g^{-1} DW) σε ναύπλιους *Artemia* ενισχυμένους με διάφορα προϊόντα

Table 2.3.3. Enrichment levels (mg g^{-1} DW) in *Artemia* nauplii boosted with various products

	DHA	EPA	(n-3) HUFA
Super Selco (INVE Aquaculture NV)	14.0	28.6	50.3
DHA Selco (INVE Aquaculture NV)	17.7	10.8	32.7
Superartemia (Catvis)	9.7	13.2	26.3
SuperHUFA (Salt Creek)	16.4	21.0	41.1

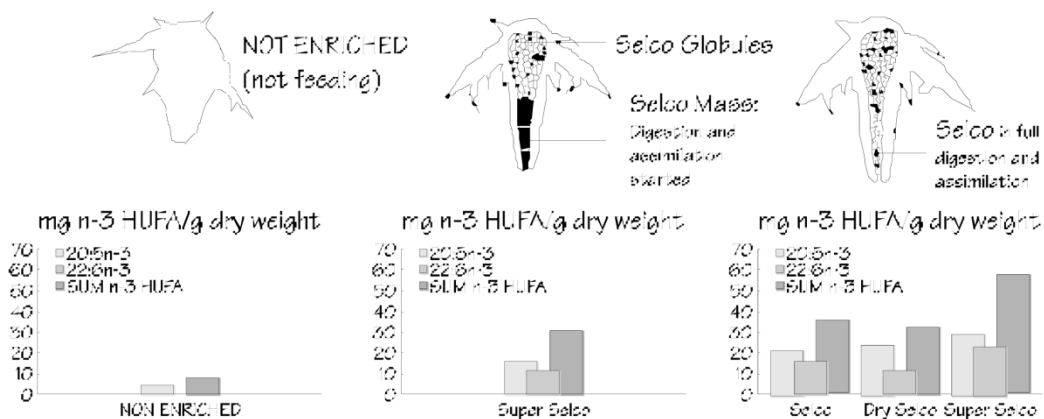


Εικ. 2.3.9. Επίπεδα HUFA σε 24-h εμπλουτισμένους με Super Selco μετά-ναύπλιους *Artemia* κατά την αποθήκευσή τους στους 10 και 25°C (Dhont *et al.*, 1993).

Fig. 2.3.9. HUFA levels in 24-h Super Selco enriched *Artemia* meta-nauplii during storage at 10 and 25°C (Dhont *et al.*, 1993).

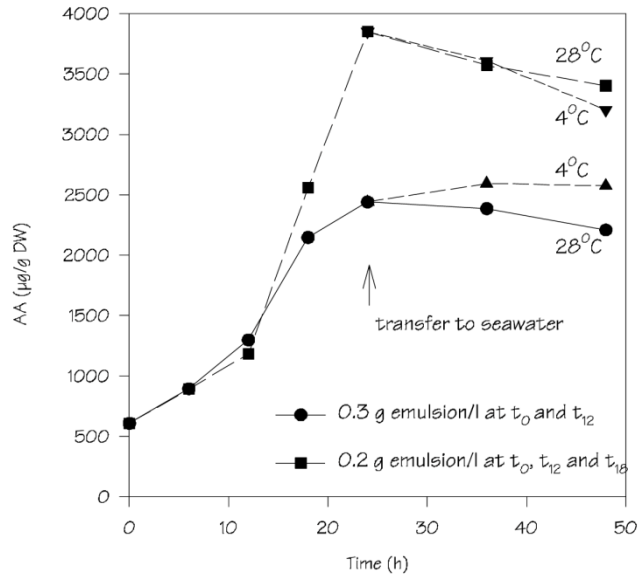
Το μέσο εμπλουτισμού διατηρείται σε απολυμασμένο θαλασσινό νερό στους 25°C. Το γαλάκτωμα εμπλουτισμού προστίθεται συνήθως σε διαδοχικές δόσεις των 300 mg l⁻¹ κάθε 12 ώρες με έναν ισχυρό αερισμό (που χρησιμοποιεί πέτρες αέρος) που απαιτείται, ώστε να διατηρηθούν τα διαλυμένα επίπεδα οξυγόνου επάνω από 4 mg l⁻¹ (τα τελευταία είναι απαραίτητα για να αποφύγει τις θνησιμότητες).

Non Enriched *Artemia* 12 h Enriched *Artemia* 24 h Enriched *Artemia*
 Instar I: 450 micrometer Instar II: 600 micrometer Instar III: 800 micrometer



Εικ. 2.3.10. HUFA-επίπεδα σε μετά-ναύπλιους *Artemia* εμπλουτισμένους για 24h χρησιμοποιώντας διαφορετικά αυτό-γαλακτοποιημένα σκευάσματα: Selco, Super Selco, high-DHA Super Selco (INCE).

Fig. 2.3.10. HUFA-levels in *Artemia* meta-nauplii enriched for 24h using different self-emulsifying concentrates: Selco, Super Selco, high-DHA Super Selco (INCE)



Εικ. 2.3.11. Εμπλουτισμός ασκορβικού οξέως σε ναύπλιους *Artemia*.

Fig. 2.3.11. Ascorbic acid enrichment in *Artemia nauplii*.

Οι εμπλουτισμένοι ναύπλιοι συλλέγονται μετά από 24 ώρες (μερικές φορές ακόμα και μετά από 48 ώρες), όπου ξεπλένονται λεπτομερώς και που ταΐζονται έπειτα άμεσα ή που αποθηκεύεται κάτω από τους 10°C, ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο μεταβολισμός των HUFA, (τα επίπεδα HUFA μειώνονται από 0 έως 30% μετά από 24 ώρες στους 10°C, Εικ.. 2.3.9.). Με τη χρησιμοποίηση αυτών στα επίπεδα ενσωμάτωσης τεχνικών εμπλουτισμού πολύ υψηλά ποσά των EFA μπορούν να επιτευχθούν αρκετά παραπάνω από τις μέγιστες συγκεντρώσεις που βρίσκονται φυσικά στα στελέχη. Αυτός ο πολύ υψηλός εμπλουτισμός στα επίπεδα αυτά είναι το αποτέλεσμα όχι μόνο μιας βέλτιστης σύνθεσης προϊόντων, αλλά και των κατάλληλων διαδικασιών εμπλουτισμού: δηλ. ο ναύπλιος που μεταφέρεται ή που εκτίθεται στο μέσο εμπλουτισμού αμέσως πριν ταΐστεί και ετοιμάζεται για το επόμενο διατροφικό στάδιο (instar II στάδιο).

Επιπλέον, η αύξηση μεγέθους κατά τη διάρκεια του εμπλουτισμού είναι ελάχιστη: η *Artemia* που εμπλουτίζεται σύμφωνα με άλλες διαδικασίες που φθάνουν τα > 900 µm, ενώ εδώ τα υψηλά επίπεδα εμπλουτισμού αποκτιούνται στον ναύπλιο μετρώντας τον στα 660 µm (μετά από τον εμπλουτισμό των 12 ωρών), στα 790 µm (μετά από τον εμπλουτισμό των 48 ωρών, Εικ. 2.3.10.). Διάφορα ευρωπαϊκά εκκολαπτήρια θαλασσιών ψαριών εφαρμόζουν, επομένως, το ακόλουθο καθεστώς σίτισης, μεταστρέφοντας από μια *Artemia* διατροφή στην επόμενη δεδομένου ότι οι νύμφες ψαριών είναι σε θέση να δεχτούν ένα μεγαλύτερο θήραμα: μόνο στην έναρξη της σίτισης με *Artemia* ένα συγκεκριμένο στέλεχος παράγει μικρούς ναύπλιους με ένα υψηλό περιεχόμενο EPA (10 mg g⁻¹ DW), που ακολουθείται από 12 ώρες και τελικά φτάνει τις 24 ώρες με (n-3) HUFA να εμπλουτισθούν οι μετά-ναύπλιοι *Artemia*. Η εργασία βρίσκεται ακόμα σε εξέλιξη για να τυποποιήσει περαιτέρω την τεχνική βιοεγκλεισμού (δηλ. χρησιμοποιώντας τις απολυμασμένες κύστες, που εφαρμόζουν τις τυποποιημένες μεθόδους αερισμού). Στην πραγματικότητα, τα αποτελέσματα της εργαστηριακής δοκιμής αποκαλύπτουν ακόμα μια υψηλή μεταβλητότητα στη σύνθεση βασικών λιπαρών οξέων του ναύπλιου *Artemia*, ακόμα κι αν εμπλουτίζονται από το ίδιο πρόσωπο ή από τα διάφορα πρόσωπα (Πίνακας 2.3.4.).

Πίνακας 2.3.4. Μεταβλητότητα στα επίπεδα DHA, EPA και ολικά (n-3) HUFA σε εμπλουτισμένους ναύπλιους *Artemia* από εργαστήριο (A) χρησιμοποιώντας καθορισμένη διαδικασία και σε τρία εκκολαπτήρια τσιπούρας (B) κατά την οικιακή μέθοδο (μέσοι όροι και τυπ.απ.) (Lavens *et al.*, 1995)
 Table. 2.3.4. Variability in DHA, EPA and total (n-3) HUFA levels in enriched *Artemia* nauplii sample in the laboratory (A) using a standard procedure and in three sea bream hatcheries (B) according to the in-house method (mean and sd) (Lavens *et al.*, 1995)

	DHA		EPA		(n-3) HUFA	
	area %	mg g ⁻¹	area %	mg g ⁻¹	area %	mg g ⁻¹
A :						
applied by the same person (n=10)						
	7.1 ± 2.5	12.5 ± 6.5	13.8 ± 2.2	24.2 ± 5.7	23.5 ± 4.5	41.9 ± 13.1
applied by different people over a 2-month period (n=5)						
	6.2 ± 0.9	11.3 ± 2.6	14.5 ± 4.1	27.0 ± 9.9	23.3 ± 5.1	43.0 ± 12.9
applied by different people over a 2-year period (n=13)						
	7.8 ± 2.2	17.0 ± 5.8	16.7 ± 2.3	35.7 ± 7.6	26.7 ± 4.8	57.4 ± 14.2
B :						
1 (n=2)	3.8 ± 2.5	8.1 ± 6.3	9.9 ± 4.0	20.3 ± 1.2	16.1 ± 7.1	33.2 ± 19.7
2 (n=3)	5.9 ± 2.4	8.1 ± 1.4	10.5 ± 1.1	15.9 ± 5.4	20.0 ± 5.8	28.5 ± 6.4
3 (n=3)	6.1 ± 0.6	12.6 ± 1.5	14.2 ± 0.8	29.1 ± 2.3	12.6 ± 1.5	46.6 ± 4.0

Λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία των DHA στα είδη θαλασσιών ψαριών πολλή προσπάθεια έχει καταβληθεί να ενσωματωθούν υψηλές αναλογίες DHA/EPA στα ζωντανά τρόφιμα. Μέχρι σήμερα, τα καλύτερα αποτελέσματα έχουν επιτευχθεί με τα γαλακτώματα εμπλουτισμού που ενισχύονται με DHA (που περιέχει μια αναλογία DHA/EPA μέχρι 7), παράγοντας μετά-ναύπλιους *Artemia* που περιέχουν 33 mg DHA g⁻¹ DW. Έναντι του εμπλουτισμού με τα παραδοσιακά προϊόντα, μια μέγιστη αναλογία DHA/EPA 2 αντί 0.75 μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας τις τυποποιημένες πρακτικές εμπλουτισμού.

Εκτός από το EFA, άλλες θρεπτικές ουσίες όπως βιταμίνες και χρωστικές ουσίες μπορούν να ενσωματωθούν μέσα στην *Artemia*. Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες (ειδικά βιταμίνη A και βιταμίνη E) έχουν αναφερθεί ότι συσσωρεύονται στην *Artemia* κατά τη διάρκεια μιας βραχυπρόθεσμης (9 ωρών) περιόδου εμπλουτισμού με τα επίπεδα της βιταμίνης A να είναι κάτω από 1 IU g⁻¹ (βάση WW) σε πάνω από 16 IU g⁻¹ και επίπεδα βιταμινών E που αυξάνονται από κάτω από 20 μg g⁻¹ σε περίπου 250 μg g⁻¹. Πρόσφατα εργασίες έχουν πραγματοποιηθεί επίσης για να ενσωματώσουν το ασκορβικό οξύ στις ζωντανές τροφές. Η χρησιμοποίηση της τυποποιημένης διαδικασίας εμπλουτισμού και οι πειραματικές αυτό-γαλακτοποιημένες

συμπυκνώσεις που περιέχουν 10, 20 και 30% (DW βάση) του παλμιτικού ασκορβικού (AP) σε σχέση με τα τρι-γλυκερίδια, υψηλά επίπεδα του ελεύθερου ασκορβικού οξέος (AA) μπορούν να ενσωματωθούν στον ναύπλιο αλμυρογαρίδας (Εικ. 2.3.11.). Για παράδειγμα, 10%-AP στο γαλάκτωμα ενισχύει τα επίπεδα AA στο νέο-εκκολαπτόμενο ναύπλιο κατά 50% από τα φυσικά επίπεδα (500 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW). Εντούτοις, η προσθήκη 20 ή 30% αυξάνει τα επίπεδα AA στην *Artemia* 3^{ου} σταδίου και 6^{ου} σταδίου αντίστοιχα μετά από εμπλουτισμό 24 ωρών στους 27°C. Επιπλέον, αυτές οι AA οι συγκεντρώσεις δεν μειώνονται όταν αποθηκεύεται ο εμπλουτισμένος ναύπλιος για 24 ώρες στο θαλασσίνο νερό (Εικ. 2.3.11.).

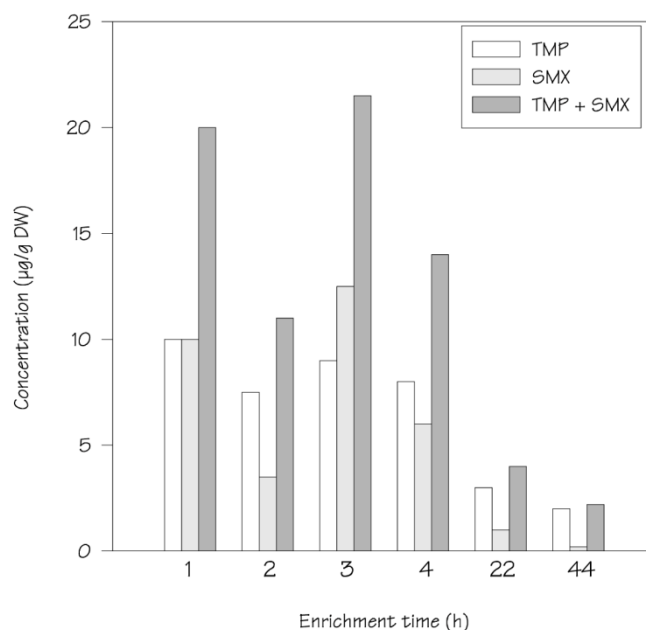
Πίνακας 2.3.5. Συσώρευση trimetoprim (TMP) και sulfamethoxazole (SMX) σε ναύπλιους *Artemia* μετά από 24h εμπλουτισμό χρησιμοποιώντας μίξη γαλακτώματος TMP:SMX (1:5)

Table 2.3.5. Accumulation of trimetoprim (TMP) and sulfamethoxazole (SMX) in *Artemia* nauplii after 24h enrichment using an enrichment emulsion containing TMP:SMX (1:5)

	ng.mg ⁻¹ protein	ng.mg ⁻¹ dry weight
TMP	212.1	77.8
SMX	579.3	212.4
TMP+SMX	791.4	291.1

2.3.5. Εμπλουτισμός για τον έλεγχο ασθενειών

Η επίπτωση των μικροβιακών ασθενειών έχει αυξηθεί εντυπωσιακά μαζί με το βαθμό ενδυνάμωσης στη νυμφική παραγωγή ειδών υδατοκαλλιέργειας. Η θεραπεία των μικροβιακών μολύνσεων στα ψάρια και τις νύμφες γαρίδων συχνότερα πραγματοποιείται με τη διάλυση των σχετικά υψηλών δόσεων των ευρέως παραγόμενων αντιβιοτικών στο νερό της καλλιέργειας. Ένα σημαντικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι μεγάλες ποσότητες φαρμάκων ελευθερώνονται στο περιβάλλον θέτοντας σε κίνδυνο ζώο και άνθρωπο. Εντούτοις, μια άμεση θεραπεία μέσω της τροφικής αλυσίδας που χρησιμοποιεί οι πολύ μικρότερες ποσότητες έχει αποδειχθεί αποτελεσματικότερη και ασφαλέστερη για το περιβάλλον. Από αυτή την άποψη, η δυνατότητα επεξεργασίας της *Artemia* με δόσεις μέχρι 300 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW του θεραπευτικού μίγματος Trimetoprim:Sulfamethoxazole (1:5), χρησιμοποιώντας τις αυτό-γαλακτωματοποιημένες τροφές 10%, έχει καταδειχθεί (Πίνακας 2.3.5.). Αυτή η τεχνική βιοεγκλεισμού τελικά απέδωσε με επίπεδα 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ αντιβιοτικού σε νύμφες λαβρακιού 3 ώρες μετά το τάισμα (Εικ. 2.3.12.). Στις προνύμφες καλκανιού ακόμα πιο υψηλά επίπεδα ιστού έχουν ληφθεί, με μέγιστη συγκέντρωση 90 μg αντιβιοτικού g^{-1} να εντοπίζεται 4 ώρες μετά από τη σίτιση. Η προφυλακτική και θεραπευτική αποδοτικότητα εξετάστηκε με την σίτιση εμπλουτισμένης *Artemia* αντίστοιχα πριν και μετά από εμβολιασμό με *Vibrio anguillarum*. Και στις δύο περιπτώσεις η θνησιμότητα μειώθηκε σημαντικά στο καλκάνι σε σχέση με το μη επεξεργασμένο πληθυσμό. Φυσικά, τα επίπεδα εμπλουτισμού καθώς επίσης και η θεραπευτική αποδοτικότητα θα εξαρτηθούν από τα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά. Στην πραγματικότητα, η ίδια διαδικασία εμπλουτισμού μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να ενσωματώσει και να μεταφέρει τα εμβόλια στις νύμφες ψαριών και έτσι να κάνει διευκολύνοντας τον εμβολιασμό από το στόμα.



Εικ. 2.3.12. Ενσωμάτωση και αποθήκευση trimetoprim (TMP) και sulfamethoxazole (SMX) στις νύμφες ευρωπαϊκού λαβρακιού που ταΐστηκαν με ναύπλιους *Artemia* με αντιβιοτικό.
Fig. 2.3.12. Incorporation and storage of trimetoprim (TMP) and sulfamethoxazole (SMX) in European sea bass larvae fed antibiotic-enriched *Artemia* nauplii.

2.3.6. Εφαρμογές της *Artemia* για σίτιση διαφορετικών ειδών

2.3.6.1. Γαρίδες penaeid

Η *Artemia* χρησιμοποιείται γενικά για τη σίτιση των προχωρημένων νυμφικών και μετά-νυμφικών σταδίων των penaeids. Οι νέο-εκκολαπτόμενος ναύπλιος προσφέρονται συνήθως στην έναρξη του πρώτου σταδίου (μύσιδα) (mysis) και μερικές φορές ακόμα προηγουμένως στο ζωή-μύσιδα (zoea-mysis) με μερικούς ερευνητές να συστήνουν ακόμη και την εισαγωγή της *Artemia* κατά τη διάρκεια του δεύτερου σταδίου ζωής.

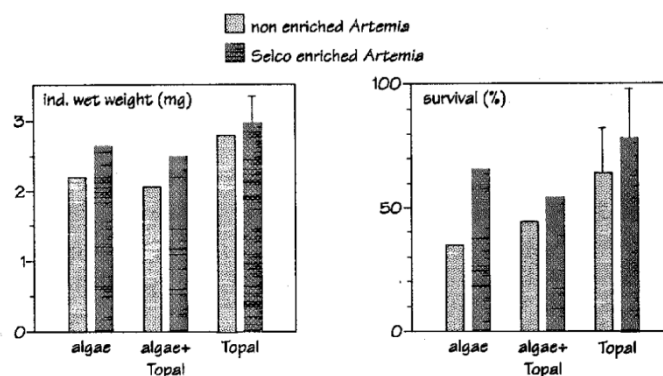
Πίνακας 2.3.6. Τυπικό σχήμα ταΐσματος των νυμφών *Penaeus* (*P. vannamei*)
Table 2.3.6. Typical feeding regime for *Penaeus* (*P. vannamei*) larvae.

Substage	<i>Chaetoceros neogracile</i> (cells.ml ⁻¹)	<i>Tetraselmis chuii</i> (cells.ml ⁻¹)	<i>Artemia</i> (nauplii.ml ⁻¹)
N ₅ or N ₆	60000	0-15000	0
P ₁	100000-120000	30000	0
P ₂	120000	35000	0
P ₃	120000	35000	0-0.5
M ₁	100000	30000	0.2-1.5
M ₂	75000	20000	1.5-5.0
M ₃	50000-75000	20000	3-8
PL ₁ to PL ₅	20000-75000	5000-20000	6-20

Εντούτοις, οι γαρίδες penaeids ταΐζονται συνήθως με φύκη πριν από την *Artemia* και υποβάλλονται σε μια περίοδο απογαλακτισμού όταν δίνονται και οι δύο τροφές. Κατά συνέπεια, η προσθήκη της *Artemia* πάρα πολύ νωρίς στον κύκλο ζωής μπορεί να οδηγήσει στον ανταγωνισμό για τα φύκη μεταξύ της ατάιστης *Artemia* και των

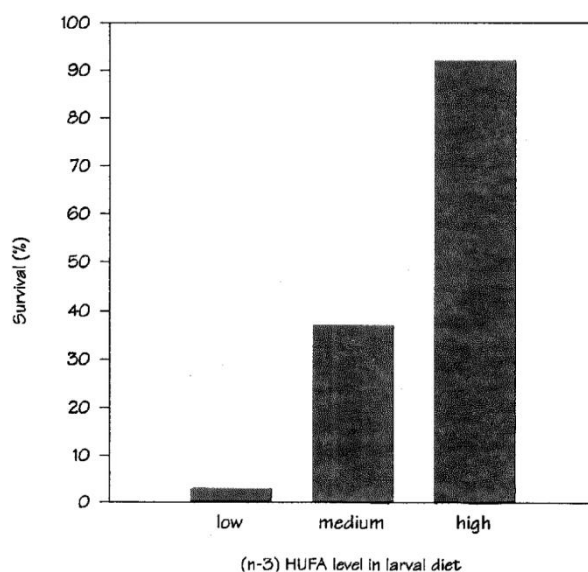
γαρίδων. Μια κατάλληλη λύση μπορεί να είναι η χρήση πρόσφατα σκοτωμένων ναυπλίων (σύντομη βύθιση σε ένα νερό - λουτρό 80°C ή παγωμένο λεπτό στρώμα στους -10°C) ή η χρήση κύστεων *Artemia*. Ο εμπλουτισμένος ναύπλιος *Artemia* μπορεί επίσης να χορηγηθεί από τα μετά-νυμφικά στάδια και μετά.

Υψηλή επιβίωση και αύξηση έχουν επιβεβαιωθεί για διάφορα είδη renaeid που ταΐστηκαν με (n-3) HUFA-εμπλουτισμένες διατροφές, αν και συχνά τα αποτελέσματα της σύνθεσης διατροφής γίνονται μόνο εμφανή στα προχωρημένα στάδια (Εικ. 2.3.13).



Εικ. 2.3.13. Νυμφικές καλλιέργειες *P. vannamei* αναπτυσσόμενων μέχρι το στάδιο PL 8 σε δεξαμενές 200 l με δίαιτες φυκών ή υποκατάστατο φυκών Topal (INVE).

Fig. 2.3.13. Larviculture outputs with *P. vannamei* reared up to PL 8 in 200 l tanks on diets consisting of only algae or algae substitute Topal (INVE).



Εικ. 2.3.14. Επιβίωση PL 10 *P. Monodon* καλλιεργημένων με συνδυασμούς νυμφικών διατροφών χαμηλών, μέσων και υψηλών επιπέδων (n-3) HUFA μετά από 60 min, μεταφερόμενων από 35 σε 7 g l⁻¹ θαλασσινό νερό(Sorgeloos and Leger, 1992).

Fig. 2.3.14. Survival of *P. Monodon* PL 10 culture on larval diet combinations containing low, medium and high levels of (n-3) HUFA after 60 min, transfer from 35 to 7 g l⁻¹ seawater (Sorgeloos and Leger, 1992).

Μια καλή απεικόνιση αυτού είναι η αντίσταση στην πίεση αλατότητας στο PL 10 στάδιο μιας παρτίδας νυμφών του *Penaeus monodon* που ταΐστηκαν με τρεις διαφορετικές τροφές με ποικίλα επίπεδα (n-3) HUFA. Αν και καμία σημαντική διαφορά στην επιβίωση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των επεξεργασιών πριν από το τεστ στρες, διακριτές διαφορές στην ποιότητα των PL (εκφρασμένη ως δυνατότητα τους να επιζήσουν στην πίεση της αλατότητας που εφαρμόζεται) παρατηρήθηκαν (Εικ. 2.3.14).

Αυτό το κριτήριο της αντίστασης στις αλλαγές αλατότητας που μπορούν εύκολα να εφαρμοστούν στα εκκολαπτήρια τώρα συνήθως χρησιμοποιείται ως ποιοτικό κριτήριο για τον καθορισμό του κατάλληλου χρόνου για τη μεταφορά των PL από το εκκολαπτήριο στη λίμνη. Οι πρόσφατες μελέτες που ερευνούν τις ποσοτικές διαιτητικές απαιτήσεις καθώς επίσης και την ανάλογη σημασία επιλεγμένου HUFA (δηλ. DHA) έδειξαν ότι ταΐζοντας *Artemia* που εμπλουτίστηκε στα μέσα επίπεδα 12.5 mg HUFA g⁻¹ DW (αναλογία DHA/EPA 0.4) ενίσχυσε αρκετά την επιβίωση του *Penaeus monodon* και την ωσμωτική αντίσταση των PL-10.

Πίνακας 2.3.7. Ποικιλία ποσοτήτων φαγητού ανά νύμφη ανά ημέρα εκτροφής (Aquacop, 1983)
Table 2.3.7. Variations of food amount per larvae per day during larval rearing (Aquacop, 1983)

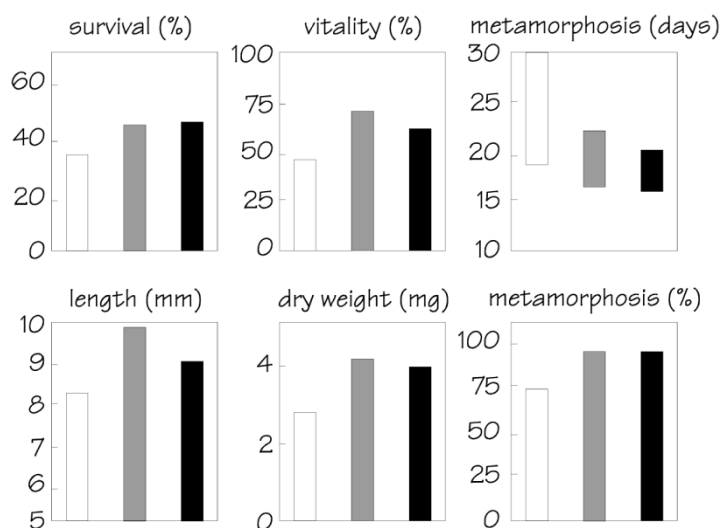
Day	<i>Artemia</i> nauplii	Pellets (μg DW)
3	5	0
4	10	0
5-6	15	0
7	20	0
8	25	0
9	30	0
10-11	35	0
12	40	70
13-14	45	80-90
15-24	50	100-180
25-30	45	200
30+	40	200

2.3.6.2. Γαρίδα του γλυκού νερού

Ο ναύπλιος *Artemia* είναι η επιτυχέστερη διατροφή που υιοθετείται για τη νυμφική εκτροφή των νυμφών γαρίδων του γλυκού νερού. Σε αντίθεση με τη γαρίδα *penaeid*, η *Macrobrachium* μπορεί αρχικά να ταϊστεί με ναύπλιο *Artemia*, σε πυκνότητες από 0.1 ναύπλιοι ml⁻¹ για να εξασφαλίσει κατάλληλη κατάποση (Πίνακας 2.3.7).

Η λήψη ενέργειας στη *M. rosenbergii* ήταν ανάλογη όχι μόνο προς τη συγκέντρωση της *Artemia* αλλά και προς το μέγεθος της *Artemia*. Οι (n-3) HUFA-απαιτήσεις της γαρίδας *Macrobrachium* αναμένονται να μην είναι πολύ κρίσιμες, λαμβάνοντας υπόψη ότι αυτά τα είδη περνούν το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους στο γλυκό νερό. Αυτές οι υποθέσεις, εντούτοις, αντικρούστηκαν κατά ένα μεγάλο μέρος από μια μελέτη χρησιμοποιώντας την *Artemia* που εμπλουτίστηκε με γαλακτώματα διαφορετικών επιπέδων (n-3) HUFA για την εκτροφή *Macrobrachium*. Εκτός από το βελτιωμένο ρυθμό αύξησής τους, μια διαφορά που έχει έναν σημαντικό αντίκτυπο για τον εμπορικό καλλιεργητή ήταν η πιο πρόωρη και συγχρονισμένη μεταμόρφωση καθώς επίσης και η υψηλότερη αντίσταση στο στρες στη μετά-νύμφη *Macrobrachium* που ταΐστηκε με (n-3) HUFA εμπλουτισμένη *Artemia* κατά τη διάρκεια του νυμφικού σταδίου (Εικ. 2.3.15.). Εντούτοις, πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι, αυτά τα αποτελέσματα οφείλονται στη διατροφή γεννητόρων, με τις προνύμφες που λήφθηκαν από τα ταϊσμένα θηλυκά με HUFA ενισχυμένη διατροφή αποδίδοντας

εξίσου καλά μη-εμπλουτισμένη ή εμπλουτισμένη *Artemia*. Ομοίως, αν και καμία ενισχυμένη παραγωγή στα εκκολαπτήρια δεν παρατηρήθηκε στις ταϊσμένες *Artemia* εμπλουτισμένες με βιταμίνη C, η βιταμίνη C είχε μια θετική επίδραση στο φυσιολογικό κατάσταση των μετά-νυμφών (Πίνακας 2.3.8.).



Εικ. 2.3.15. Αποτελέσματα 28-ημερών δοκιμής καλλιέργειας νυμφών *M. rosenbergii* ταϊσμένων με *Artemia* ναύπλιους εμπλουτισμένους με χαμηλά (αριστερά), μεσαία και υψηλά (δεξιά) (n-3) HYFA.
Fig. 2.3.15. Results of a 28-day culture test with *Macrobrachium rosenbergii* larvae fed *Artemia* nauplii enriched with low (left open bar), medium (central grey bar) and high (right) (n-3) HYFA.

Πίνακας 2.3.8. Επίδραση της βιταμίνης C εμπλουτισμού σε ναύπλιους *Artemia* σε νυμφο-καλλιέργεια της γαρίδας γλυκού νερού *M. rosenbergii* (28 ημερών) (Merchie *et al.*, 1995)
Table 2.3.8. Effect of vitamin C enrichment in *Artemia* nauplii on the larviculture success of the giant freshwater prawn *M. rosenbergii* (day 28) (Merchie *et al.*, 1995)

	experiment 1		experiment 2		
dietary ascorbic acid ($\mu\text{g g}^{-1}$)	529	2920	656	1305	2759
survival (%)	72.1	48.4	57.5	57.8	57.1
ind. length (mm)	9.31	9.34	9.67	9.73	9.58
ind. dry weight (μg)	831	888	1130	1200	1310
metamorphosis (%)	12.9	16.2	40.6	53.3	49.1
survival after osmotic stress (%)	8.7	32.7	40.0	62.0	74.0
ascorbic acid in larvae ($\mu\text{g.g}^{-1}$ DW)	365	552	352	448	507
ascorbic acid in PL ($\mu\text{g.g}^{-1}$ DW)	288	325	255	389	432

2.3.6.3. Θαλάσσια ψάρια

Στις νύμφες πολλών ειδών θαλασσίων ψαριών, όπως τσιπούρα, ροφός, και καλκάνι, μπορεί μόνο να προσφερθεί μια *Artemia* διατροφή μετά από μια αρχική περίοδο σε ένα μικρότερο θήραμα, όπως το τροχοζώο, *Brachionus plicatilis*. Εντούτοις, αντίθετα με τις καρκινοειδείς νύμφες, η καλλιέργεια νυμφών θαλασσίων ψαριών χρησιμοποιεί *Artemia* για μια πολύ μακρύτερη χρονική περίοδο, (δηλ. από 20 έως 40 ημέρες Πίνακας 2.3.9.). Συνεπώς, η κατανάλωση κύστεων *Artemia* είναι υψηλότερη στις νυμφικές καλλιέργειες θαλασσίων ψαριών, κυμαινόμενη από 200g έως 500g ανά 1000 παραχθέντα ψάρια. Γενικά, ο ναύπλιος instar I ταΐζεται για αρκετές ημέρες ως μετάβαση από τη διατροφή τροχοζώων στα μεγαλύτερα εμπλουτισμένα 24 ωρών θηράματα.

Πίνακας 2.3.9. τυπικό παράδειγμα του σχήματος ταΐσματος του λαβρακιού (*D. labrax*) εκτροφής από την εκκόλαψη στο ενήλικο στάδιο

Table 2.3.9. Typical example of feeding regime for seabass (*D. labrax*) reared from hatching to juveniles

Age (days)	Wet weight (gram)	<i>Artemia</i>		Lansy compound diets (INVE Aquaculture NV, Belgium)		
		small instar I SFB-type	Selco-enriched GSL-type	Lansy R1 80-200 μm	Lansy A2 150-300μm	Lansy W3 300-500μm
0-7						
8-11		1				
12		2.5				
13-16		2.7-3.0				
17-19		5.0-7.0		2-5		
20-23		3.0-4.3	3-11	5-7		
24-27		0	14-17	7-10		
28-29			17-20	10-15		
30-34			20	10-15	10-15	
35-37			20	0	20-30	
38-41	0.05		20		30-40	
Start of weaning						
			20-15		40-50	
	0.08		15-10		45-55	15-25
			10-0		45-55	45-55

Η μεταβλητότητα της θρεπτικής αξίας του ναύπλιου *Artemia* ως πηγή τροφής για τις νύμφες θαλασσίων ψαριών είναι καλά τεκμηριωμένη. Όπως αναφέρεται προηγουμένως, η εφαρμογή εμπλουτισμένης HUFA διατροφής *Artemia* έχει μια σημαντική επίδραση στη καλλιέργεια νυμφών των θαλασσίων ψαριών και έχει οδηγήσει γενικά στην αυξανόμενη επιβίωση και τη μειωμένη μεταβλητότητα στην παραγωγή εκκολαπτηρίων ψαριών. Το τελευταίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό δεδομένου ότι ήταν το ζητούμενο στην ανάπτυξη της εμπορικής παραγωγής. Επιπλέον, η ποιότητα από την άποψη της αντίστασης στο στρες, καλύτερης χρώσης, μειωμένες παραμορφώσεις, καλύτερη διόγκωση της νηκτικής κύστης και οι αυξημένες αντοχές, εμφανίζεται να συσχετίζονται άμεσα με την εμπλουτισμένη (n-3) HUFA νυμφική διατροφή.

Για παράδειγμα, η επιβίωση του Ευρωπαϊκού λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) εμφανίζεται έντονα συσχετισμένη με το περιεχόμενο σε 20:5n-3 των ναυπλίων *Artemia*, ενώ η αύξηση συσχετίζεται ιδιαίτερα με το περιεχόμενο σε 22:6n-3. Όλες τις νύμφες που ταΐστηκαν με μη-εμπλουτισμένη *Artemia* πέθαναν μέσα σε 35 ημέρες, ενώ το 25% εκείνων που ταΐζονταν με εμπλουτισμένη *Artemia* (n-3) HUFA GSL

επέζησαν για 42 ημέρες.

Ομοίως, για την καλή αύξηση και επιβίωση στις νύμφες τσιπούρας (*Sparus aurata*), τα θηράματα (τροχόζωα και ναύπλιοι *Artemia*) πρέπει να περιέχουν υψηλά επίπεδα 20:5n-3 και 22:6n-3 λιπαρά οξέα. Επιπλέον, η καλύτερη αντίσταση στους στρεσογόνους παράγοντες (δηλ., δοκιμή δραστηριότητας) παρατηρήθηκε στις προνύμφες που ταΐζονταν με 22:6n-3 εμπλουτισμένη ζωντανή τροφή. Πιο πρόσφατα, η καλύτερη αύξηση επιτεύχθηκε με μια διατροφή πλούσια σε (n-3) HUFA και υψηλής αναλογίας DHA/EPA 2 κατά τη διάρκεια των πρώτων δύο εβδομάδων μετά από την εκκόλαψη.

Επιπλέον, στο καλκάνι (*Scophthalmus maximus*) ο εμπλουτισμός (n-3) HUFA και η διατροφική αναλογία DHA/EPA μπορεί επίσης να αναμιγνύεται στη χρώση των νυμφών. Πρόσφατες έρευνες σε απομονωμένα κύτταρα καλκανιού έχουν καταδείξει ότι η μετατροπή από EPA σε DHA είναι πολύ αργή στο καλκάνι και ότι η άμεση συμπλήρωση με DHA είναι ευεργετική για τις νύμφες αυτού του είδους. Εντούτοις, η δόση και η ενίσχυση με DHA κατά τη διάρκεια των αρχικών νυμφικών σταδίων πρέπει να εξεταστούν με μεγάλη προσοχή δεδομένου ότι, οι απαιτήσεις των νυμφών μπορούν όχι μόνο να εξαρτηθούν από το οντογενετικό στάδιο τους αλλά και από τα αποθέματα λιπαρών οξέων στο λεκιθικό σάκο που μπορεί στη συνέχεια να ποικίλει με τη διατροφή των γεννητόρων.

Η ανάγκη σε DHA στη νυμφική διατροφή του Ιαπωνικού πλατύψαρου έχει αποδειχθεί επίσης (Πίνακας 2.3.10.): η χρήση DHA με συνέπεια ένα πολύ υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης και αύξησης απ' ότι στην επεξεργασία ελέγχου και επίσης η ενισχυμένη αντίσταση στους στρεσογόνους παράγοντες (ημέρα 50). Τα ίδια πειράματα έχουν πραγματοποιηθεί επίσης στην κόκκινη τσιπούρα και είναι πιο αποκλειστικά: η αύξηση των DHA ταϊσμένων νυμφών είναι κατά 50% μεγαλύτερη από την ομάδα ελέγχου μέχρι την ημέρα 38.

Πίνακας 2.3.10. Επιβίωση, αύξηση και αντίσταση στο στρες στο Ιαπωνικό πλατύψαρο *P. olivaceus* (50 ημερών) ταϊσμένων με τροχόζωα και *Artemia* (μάρτυρας) εμπλουτισμένων με high-DHA Super Selco (Devresse *et al.*, 1992).

Table 2.3.10. Survival, growth and stress resistance of Japanese flounder *P. olivaceus* (day 50) fed either unenriched rotifers and *Artemia* (control) or high-DHA Super Selco enriched live food (DHA) (Devresse *et al.*, 1992).

	control	DHA
survival (%)	1.8	21.5
length (mm)	19.1	28.7
stress resistance (% survival)	40.0	93.0

Για τα είδη του Ειρηνικού, παρόμοιες τάσεις με εκείνων των ευρωπαϊκών ειδών έχουν αναφερθεί. Για παράδειγμα, η επιβίωση στη μεταμόρφωση και η αντίσταση στο στρες (δηλ., σοκ αλατότητας) στο Ασιατικό λαβράκι (*Lates calcarifer*) έχουν συσχετιστεί έντονα με τα επίπεδα HUFA στην *Artemia*. Στην πραγματικότητα, μια υιοθετημένη στρατηγική σίτισης στην οποία τα HUFA εμπλουτισμένα ζωντανά θηράματα προσφέρονται κατά τη διάρκεια μιας σύντομης περιόδου (2-5 ημέρες) πριν από τη μεταμόρφωση εμφανίζεται να είναι επαρκής για να επιταχύνει το ποσοστό μεταμόρφωσης και για να αποτρέψει τις επόμενες θνησιμότητες στα άτομα *Lates*.

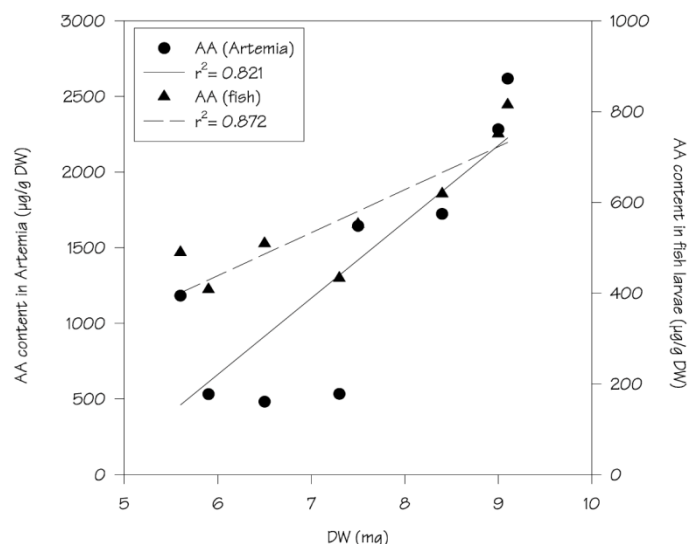
Ομοίως, το milkfish (*Chanos chanos*) παρουσίασε σημαντικές αλλαγές στην αύξηση (μήκος και ξηρό βάρος) ταϊσμένο με ενισχυμένη σε HUFA *Artemia* κατά τη διάρκεια μιας περιόδου τριών εβδομάδων. Επιπλέον, οι νύμφες του λαγόψαρου (*Siganus guttatus*) ταϊσμένες με *Artemia* εμπλουτισμένη με HUFA εμφάνισαν λιγότερη θνησιμότητα από αυτές που ταΐστηκαν με φτωχούς σε περιεχόμενο HUFA ναύπλιους *Artemia*.

Έως τις αρχές του 1988, οι δοκιμές καλλιέργειών με τις νύμφες mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) ήταν μόνο επιτυχείς όταν οι προνύμφες ταΐστηκαν με φυσικά κωπήποδα ή άλλο ζωοπλαγκτόν. Οι δοκιμές καλλιέργειών με νέο-εκκολαπτόμενη *Artemia* δεν ήταν επιτυχείς εκείνη τη στιγμή. Εντούτοις, το 1988 και το 1989, η σημαντική πρόοδος στην καλλιέργεια νυμφών αυτού του ταχέως αναπτυσσόμενου είδους υδατοκαλλιέργειας επιτεύχθηκε από τις διάφορες ερευνητικές ομάδες στις ΗΠΑ και την Αυστραλία. Συγκεκριμένα, νύμφες που ταΐζονταν με *Artemia* με τα υψηλά επίπεδα (n-3) HUFA και συγκεκριμένη DHA, οδήγησε στα συνεπέστερα αποτελέσματα καλλιέργειας νυμφών από την πλευρά της επιβίωσης, της νυμφικής αύξησης και της υγείας σε σύγκριση με τις νύμφες που καλλιεργήθηκαν με άλλον ζωοπλαγκτονικό οργανισμό ως τροφή.

2.3.6.4. Ψάρια του γλυκού νερού

Η καλλιέργεια ψαριών του γλυκού νερού πραγματοποιείται συχνά στις λίμνες με φυσικό ζωοπλαγκτόν ως νυμφική τροφή. Τα Σαλμονοειδή, ίσως η ομάδα που καλλιεργείται ευρύτερα σε πιο εντατική βάση, έχουν μια σχετικά καλά ανεπτυγμένη πεπτική οδό στην πρώτη διατροφή και ταΐζονται συνήθως με προκατασκευασμένες τροφές από την έναρξη σίτισης. Εντούτοις, πολλά είδη ψαριών του γλυκού νερού ταΐζονται με *Artemia*. Οι νύμφες των λευκόψαρων (οικογένεια Coregonidae) ταΐζονται συχνά με *Artemia* έως ότου μεταμορφωθούν και μπορέσουν να μεταπηδήσουν σε μια ξηρά τροφή. Οι νύμφες Walleye (*Stizostedion vitreum*) που ανατράφηκαν είτε με *Artemia*, είτε με φυσικό ζωοπλαγκτόν, είτε με νύμφες ψαριών, προτίμησαν την *Artemia* ως πρώτη τροφή. Συνεπώς, υπάρχει μια περίοδος σίτισης 15 ημερών με αλμυρογαρίδες στις νύμφες walleye πριν να ταϊστούν με τις παραδοσιακές τεχνητές τροφές. Ομοίως, οι ναύπλιοι *Artemia* χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στις ΗΠΑ ως πρώτη τροφή για τις νύμφες του ριγωτού λαβρακιού (*Morone saxatilis*). Κατά τρόπο ενδιαφέροντα, αν και αυτά τα ψάρια εκτρέφονται στο γλυκό νερό ή νερό πολύ χαμηλής-αλατότητας, πρόσφατα στοιχεία προτείνουν ότι μπορούν να έχουν τις απαιτήσεις σε λιπαρών οξέων ενός θαλάσσιου ψαριού (που γίνονται τελικά στην ενηλικίωση). Οι νύμφες ταΐζονται χαρακτηριστικά με *Artemia* από περίπου την 5^η ημέρα μετά την εκκόλαψη μέχρι περίπου την 20^η ημέρα και απογαλακτίζονται έπειτα με μια τεχνητή διατροφή μέχρι την 30^η ημέρα και μετά η σίτιση με *Artemia* διακόπτεται.

Επιπλέον, οι νύμφες του αφρικανικού γατόψαρου (*Clarias gariepinus*) έχει βρεθεί να αποδίδουν σημαντικά καλύτερα όταν ταΐζονται με μια διατροφή *Artemia* σε σύγκριση με την ομο-σίτιση με *Artemia* και μια ημι-πλούσια διατροφή (αναλογία 80:20). Η διαιτητική συμπλήρωση με ασκορβικό οξύ υπό μορφή βιταμίνης C εμπλουτισμένης στην *Artemia*, βρέθηκε επίσης να έχει μια σημαντικά θετική επίδραση στην αύξηση των νυμφών του γατόψαρου μια εβδομάδα μετά από το πρώτο ταΐσμα και η αξιολόγηση της φυσιολογικής κατάστασης των νυμφών παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερη αντίσταση στο στρες με την αυξανόμενη διαιτητική συγκέντρωση βιταμίνης C (Εικ. 2.3.16).



Εικ. 2.3.16. Γραμμική σχέση μεταξύ του ξηρού νυμφικού βάρους (mg) και του διατροφικού ασκορβικού οξέως (mg g^{-1} DW) ή του ενσωματωμένου AA στις νύμφες *C. gariepinus* (8 ημερών).
Figure 2.3.16. Linear relationship between the larval dry weight (mg) and either the dietary ascorbic acid (mg g^{-1} DW) or the ascorbic acid incorporated in the *Clarias gariepinus* larvae (day 8).

Ένα σημαντικό μειονέκτημα στη σίτιση οργανισμών του γλυκού νερού με *Artemia* είναι ότι, η *Artemia* πεθαίνει μετά από 30 έως 60 λεπτά στο γλυκό νερό. Κατά συνέπεια, δεν είναι συνεχώς διαθέσιμη στο θηρευτή δεδομένου, και πρέπει επομένως να ταΐζεται περιοδικά κάθε 2 έως 3 ώρες.

2.3.6.5. Ψάρια ενυδρείων

Και οι δύο, ζωντανή και κατεψυγμένη *Artemia*, χρησιμοποιούνται ως τροφές για τα είδη ψαριών ενυδρείων. Οι κύστες αγοράζονται επίσης από αυτούς τους χρήστες και εκκολάπτονται για τη σίτιση ως ναύπλιοι. Επιβίωση, αντοχές και χρώση έχουν αναφερθεί ότι βελτιώνονται σημαντικά σε διάφορα τροπικά είδη όταν αυξήθηκαν τα επίπεδα (n-3) HUFA μέσω του εμπλουτισμού.

2.3.7. Παραπομπές

- Aquacop, 1983. Intensive larval rearing of *Macrobrachium rosenbergii* in recirculating system. 1st International Biennial Conference on Warm Water Aquaculture - *Crustacea*, February 9-11, 1983. Brigham Young University, Hawaii, USA.
- Beck, A.D., Bengtson, D.A. 1992. Study on Artemia XXII. Nutrition in Aquatic toxicology - diet quality of geographical strains of *Artemia*, p.161-169. In: Aquatic toxicology and hazard assessment. 5th Conf., ASTM STP 766. Pearson, J.G., Foster, R.B., Bishop, W.E. (Eds). Amer.Soc.Testing and Materials, Philadelphia, USA, 400 p.
- Bengtson, D.A., Léger, P. and Sorgeloos, P. 1991. Use of *Artemia* as a food source for aquaculture. In: *Artemia Biology*. Browne, R.A., P. Sorgeloos and C.N.A. Trotman (Eds), CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA, pp 225-285.
- Chair, M., Dehasque, M., Sorgeloos, P., Nelis, H. and De Leenheer, A.P. 1995. Live food mediated drug delivery as a tool for disease treatment in larviculture: a case study with turbot *Scophthalmus maximus*. J. World Aquaculture Soc., 26(2):217-219.
- Chair, M., Romdhane, M., Dehasque, M., Leenheer, A.P. and Sorgeloos, P.-1991. Live food mediated drug delivery as a tool for disease treatment in larviculture. II. A case study with European

- seabass. In: Larvi'91. Fish & Crustacean Larviculture Symposium, Lavens, P., P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier (Eds), European Aquaculture Society, Special Publication N°15, Ghent, Belgium, 1991, pp 412-414.
- Dehasque, M., Ooghe, B., Wille, M., Candreva, Y. and Lavens, P. 1995. Automation of live food in industrial zootechnics and economics. In: Larvi'95. Lavens, P., E. Jaspers and I. Roelants (Eds), European Aquaculture Society, Spec. Publ. No 24, Gent, Belgium, pp 325-327.
- Devresse, B., Romdhane, M., Buzzi, M., Rasowo, J., Léger, Ph., Brown, J. and Sorgeloos, P. 1990. Improved larviculture outputs in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* fed a diet of *Artemia* nauplii enriched with n3-HUFA and phospholipids. *World Aquaculture*, 21(2):123-125.
- Devresse, B., Leger, B., Sorgeloos, P., Murata, O., Nasu, T., Ikeda, S., Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Kjorsvik, E. And Olsen, Y. 1992. Improvement of flat fish pigmentation through the use of DHA enriched rotifers and *Artemia*. Poster presentation at the 5th International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, 7-10 September 1992, Santiago, Chile.
- Dhert, Ph., Lavens, P., Duray, M. and Sorgeloos, P. 1990. Improved larval survival at metamorphosis of Asian seabass (*Lates calcarifer*) using ω 3- HUFA-enriched live food. *Aquaculture*, 90:63-74.
- Dhont, J., Lavens, P., and Sorgeloos, P. 1993. Preparation and use of *Artemia* as food for shrimp and prawn larvae. In: CRC Handbook in Mariculture, Vol. I. Crustacean Aquaculture (2nd edition). McVey, J. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp 61-93.
- Lavens, P., Coutteau, P. and Sorgeloos, P. 1995. Laboratory and field variation in HUFA enrichment of *Artemia* nauplii. In: Larvi'95. Lavens, P., E. Jaspers and I. Roelants (Eds), European Aquaculture Society, Spec. Publ. No 24, Gent, Belgium, pp 137-140.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., Dhert, Ph. and Devresse, B. 1995. Larval Foods. In: Broodstock Management and Egg and Larval Quality, Bromage, N.R. and R.J. Roberts (Eds), Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, pp 373-397.
- Léger, Ph., Vanhaecke, P. and Sorgeloos, P. 1983. International Study on *Artemia* XXIV. Cold storage of live *Artemia* nauplii from various geographical sources: Potentials and limits in aquaculture. *Aquacultural Eng.*, 2:69-78.
- Léger, Ph., Bengtson, D.A., Simpson, K.L. and Sorgeloos, P. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 24:521-623.
- Léger, Ph., Naessens-Foucquaert, E. and Sorgeloos, P. 1987a. International study on *Artemia*. XXXV. Techniques to manipulate the fatty acid profile in *Artemia* nauplii and the effect on its nutritional effectiveness for the marine crustacean *Mysidopsis bahia* (M.). In: *Artemia* research and its applications. Vol. 3. Ecology, culturing, use in aquaculture. Sorgeloos, P., D.A. Bengtson, W. Declair and E. Jaspers (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 411-424.
- Léger, Ph., Ferraz De Queiroz, J. and Sorgeloos, P. 1987. Improved hatchery production of postlarval *Penaeus vannamei* through application of innovative feeding strategies with an algal substitute and enriched *Artemia*. Paper presented at the 18th Ann. Meeting Guayaquil (Ecuador), January 18-23, 1987.
- Léger, Ph. and Sorgeloos, P. 1992. Optimized feeding regimes in shrimp hatcheries. In: Culture of Marine Shrimp: Principles and Practices. A.W. Fast, Lester, L.J. (Eds), Elsevier Science Publishers, New York, USA, pp 225-244.
- Merchie, G., Lavens, P., Dhert, Ph., Dehasque, M., Nelis, H., De Leenheer, A. and Sorgeloos, P. 1995. Variation of ascorbic acid content in different live food organisms. *Aquaculture*, 134: 325-337.
- Romdhane, M.S., Devresse, B., Léger, Ph. and Sorgeloos, P. 1995. Effects of feeding (n-3) HUFA-enriched *Artemia* during a progressively increasing period on the larviculture of freshwater prawns. *Aquaculture International*, 3:236-242.
- Seidel, C.R., Schaver, P.S., Katayama, T. And Simpson, K.L. 1980. Culture of Atlantic silversides fed on artificial diets and brine shrimp nauplii. *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.*, 46(2):237-245.
- Sorgeloos, P., Dehasque, M. Dhert, Ph. and Lavens, P. 1995. Review of some aspects of marine fish larviculture. *ICES mar. Sci. Symp.*, 201:138-142.
- Sorgeloos, P. and Léger, Ph. 1992. Improved larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn. *J. World Aquaculture Soc.*, 23(4):251-264.
- Verpraet, R., Chair, M., Léger, Ph., Nelis, J., Sorgeloos, P. and De Leenheer, A.P. 1992. Live food mediated drug delivery as a tool for disease treatment in larviculture. 1. The enrichments of therapeutics in rotifers and *Artemia* nauplii. *Aquacultural Engineering*, 11:133-139.

**Τεχνικές και Διαχειριστικές Ερευνητικές Εργασίες
Καλλιέργειας Ζωοπλακτονικών Οργανισμών
της Τελευταίας 20ετίας**

Αυτόματος Έλεγχος της Αύξησης και της Πυκνότητας των Καλλιέργειών Τροχοζώων

Automatic Control of Growth and Density in Rotifer Cultures

Morten Omholt Alvera^{a,*}, Jo Arve Alfredsen^a, Gunvor Øieb^b, Werner Storøy^b, Yngvar Olsenc^c

^a Department of Engineering Cybernetics, Norwegian University of Science and Technology, Odd Bragstads plass 2D, 7491 Trondheim, Norway

^b SINTEF Fisheries and Aquaculture AS, SINTEF Sealab, Brattørkaia 17B, 7010 Trondheim, Norway

^c Department of Biology, Norwegian University of Science and Technology, 7491 Trondheim, Norway

Aquacultural Engineering (2010), in press

Περίληψη

Ένα σύστημα για τον αυτόματο έλεγχο της αύξησης και την πυκνότητα των καλλιέργειών τροχοζώων παρουσιάζεται και εξετάζεται. Το σύστημα υπολογίζει τα ποσοστά σίτισης βασισμένα σε ένα σημείο ρύθμισης για την πυκνότητα των τροχοζώων και προβλέπει μια περίοδο γρήγορης αύξησης που ακολουθείται από τη γρήγορη σταθεροποίηση της πυκνότητας των τροχοζώων. Την ίδια στιγμή, αποτρέπεται το υπερ-τάϊσμα, και εκ τούτου το ρίσκο κατάρρευσης της καλλιέργειας. Ο ρυθμός σίτισης υπολογίζεται αυτόματα βάσει των μετρήσεων της πυκνότητας της καλλιέργειας και του ποσοστού αυγών και των εσωτερικών σημείων ρύθμισης για το ρυθμό αύξησης και των ποσοστών των αυγών. Ο ελεγκτής δοκιμάζεται και συντονίζεται κατά ένα μαθηματικό μοντέλο μιας καλλιέργειας τροχοζώων που έχει χρησιμοποιηθεί στις τέσσερις πειραματικές καλλιέργειες.

Τα πειραματικά αποτελέσματα παρουσίασαν πυκνότητες σε όλες τις δεξαμενές που αυξάνονται από 60 έως 90 ml⁻¹ στα σημεία ρύθμισης των 500 και 1000 ml⁻¹ σε 5-7 ημέρες, μετά από ασήμαντη αύξηση την πρώτη ημέρα. Τα ολικά ποσοστά αύξησης επιβράδυναν αρκετά προς το τέλος του πειράματος, μιας και ο ελεγκτής μείωσε τους ρυθμούς ταΐσματος προκειμένου να σταθεροποιηθούν οι πυκνότητες. Οι καλλιέργειες σταθεροποιούνταν στις υψηλότερες πυκνότητες έναντι των σημείων ρύθμισής τους, ενώ δεν υπήρξε καμία τέτοια κλίση στα παρατηρηθείσα ποσοστά αυγών. Αυτό δείχνει ότι ένα μέρος του ελέγχου του αλγορίθμου χρειάζεται περαιτέρω να συντονιστεί. Η προσέγγιση στις πυκνότητες των σημείων ρύθμισης ήταν γρήγορη και εντός της πειραματικής περιόδου δεν υπήρξε καμία ένδειξη των ταλαντώσεων πέρα από εκείνους που προκλήθηκαν από την καθημερινή διάλυση.

Σκοπός

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν ο σχεδιασμός και η ρύθμιση ενός αυτόματου συστήματος καταμέτρησης της πυκνότητας των τροχοζώων στις δεξαμενές καλλιέργειάς τους.

Υλικά και μέθοδοι

A. Γενική ιδέα

Όλα τα σύμβολα που εισάγονται παρακάτω παραθέτονται στον Πίνακα 1. Εμείς εξετάσαμε ένα σύστημα που αποτελείται από μια ημισυνεχής καλλιέργεια τροχοζώων μαζί με τα εισαγόμενα και τα εξαγόμενά του (Εικ. 1). Ο κύριος παράγοντας

εισαγωγής που έχει επιπτώσεις στη πληθυσμιακή αύξηση είναι το ποσοστό σίτισης. Η σίτιση αντιμετωπίζεται χρησιμοποιώντας μια μονάδα ελέγχου που χρησιμοποιεί τις μετρήσεις της καλλιέργειας των τροχοζώων και καθορίζει το απαραίτητο ποσοστό σίτισης. Φύκη υπό τη μορφή πάστας φυκών χρησιμοποιήθηκε ως τροφή, αν και το σύστημα μπορεί επίσης να εφαρμοστεί και σε άλλους τύπους τροφών. Σκοπός του ελεγκτή είναι να εξασφαλίσει μια γρήγορη αύξηση της πυκνότητας των τροχοζώων, R [ml^{-1}], μέχρι ένα επίπεδο ρύθμισης R_r , και να κρατήσει έκτοτε την πυκνότητα κοντά σε αυτό το επίπεδο. Αυτό πρέπει να επιτευχθεί ελαχιστοποιώντας το ποσό τροφής που χρησιμοποιείται και ελαχιστοποιώντας τον κίνδυνο κατάρρευσης της καλλιέργειας με συνεχόμενες προσαρμογές στην τρέχουσα πυκνότητα της καλλιέργειας, με τη βελτιστοποίηση των ρυθμών ταΐσματος για να αποφευχθεί το υπερ-τάισμα ή η αστία, και με την παρεμπόδιση της πυκνότητας πολύ επάνω από το επιθυμητό επίπεδο. Αυτές οι μετρήσεις μπορούν να αναμένονται για να μειώσουν τον κίνδυνο, αν και πληθυσμιακές καταρρέψεις μπορούν επίσης να οφείλονται και σε άλλες αιτίες (Dhert *et al.*, 2001 Papakostas *et al.*, 2006).

Πίνακας 1

Κατάσταση των συμβόλων που χρησιμοποιήθηκαν στις εξισώσεις του ελεγκτή.

Table 1

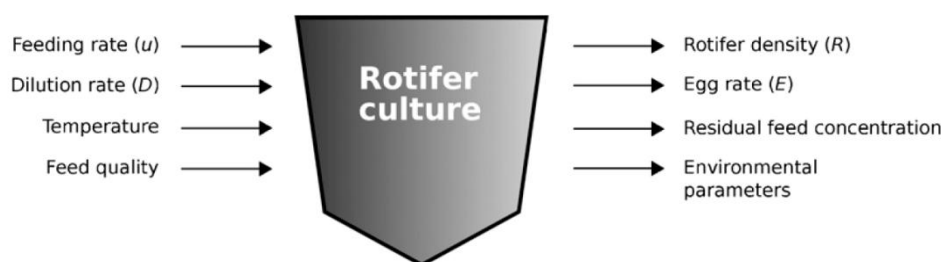
List of the symbols used in the controller equations.

Symbol	Unit	Description
D	day^{-1}	Dilution rate
E		Egg rate
\hat{E}		Measured egg rate
E_r		Reference egg rate
$g(u)$		Egg rate as function of growth rate
$g^{-1}(E)$	day^{-1}	Growth rate as function of egg rate
$h(E)$	$\mu\text{g day}^{-1}$	Individual feed ration as function of egg rate
κ_u		Correction factor to U_b
K_{I1}	day^{-1}	Integrator coefficient for growth rate
K_{I2}		Integrator coefficient for egg rate
K_{P1}	day^{-1}	Proportional coefficient for growth rate
K_{P2}		Proportional coefficient for egg rate
$\hat{\mu}$	day^{-1}	Estimated growth rate
μ_D	day^{-1}	Growth rate needed to compensate for dilution
μ_r	day^{-1}	Desired culture growth rate
q_u	ml min^{-1}	The pumping rate of feed
R	ml^{-1}	Rotifer density
\hat{R}	ml^{-1}	Estimated rotifer density
\hat{R}_p	ml^{-1}	Projected rotifer density
R_r	ml^{-1}	Reference density
ρ_{res}	g ml^{-1}	Feed density in reservoir
Δt_d	days	Dilution interval
u	$\text{g l}^{-1} \text{day}^{-1}$	Daily feed ration
U	s	The feed pumping time per cycle
U_b	$\mu\text{g day}^{-1}$	Estimated feed ration corresponding to E_r
u_{cycle}	g	The amount of feed to add per pumping cycle
U_u	$\mu\text{g day}^{-1}$	Individual feed ration
V_w	l	Tank volume

Ο ελεγκτής το επιτυγχάνει αυτό με τη στήριξη των μετρήσεων της κατάστασης της καλλιέργειας των τροχοζώων. Η σημαντικότερη μέτρηση είναι αυτή της πυκνότητας των τροχοζώων, που είναι η αρχική τιμή παραγωγής που επιθυμούμε να ελέγξουμε. Η πυκνότητα μπορεί να μετρηθεί με το χέρι με τον υπολογισμό των ατόμων στα συντηρημένα δείγματα χρησιμοποιώντας ένα στερεοσκοπικό μικροσκόπιο. Εντούτοις, ο χειρωνακτικός υπολογισμός είναι χρονοβόρος και τρωτός σε υποκειμενικότητα ανάλογα με το ποιος κάνει τον υπολογισμό. Για παράδειγμα, πηγές λάθους όπως η επιλογή της θέσης δειγματοληψίας, η ακρίβεια του όγκου που μετριέται από την πιπέτα και ο προσδιορισμός από ποια μόρια να μετρηθούν εξαρτώνται από το πρόσωπο που μετράει. Ένας αυτόματος μετρητής τροχοζώων έχει

αναπτυχθεί, ο οποίος επιτρέπει τις συχνές μετρήσεις, παρουσιάζει υψηλή ακρίβεια και επιλύει τα ζητήματα της υποκειμενικής και χειρωνακτικής εργασίας (Alver *et al.*, 2007).

Ο μέσος αριθμός αυγών που φέρει κάθε θηλυκό (το ποσοστό αυγών) είναι μια άλλη σημαντική μεταβλητή σε μια καλλιέργεια τροχοζώων (Olsen, 2004, σελ. 79). Το ποσοστό αυγών είναι ισχυρός προάγγελος του ποσοστού αύξησης της καλλιέργειας για 24 ώρες και για αυτόν τον λόγο μια μέτρηση του ποσοστού αυγών είναι πολύ σημαντικό στοιχείο κατά τον υπολογισμό της τροφής μιας καλλιέργειας. Μετρώντας με το χέρι την πυκνότητα τροχοζώων, τα αυγά που φέρονται από κάθε άτομο είναι ορατά και μπορούν να μετρηθούν προκειμένου να καθοριστεί το ποσοστό αυγών.



Εικ. 1. Επισκόπηση του συστήματος εισερχόμενων και εξερχόμενων.
Fig. 1. Overview of the system inputs and outputs.

B. Εκτίμηση της τροφής και του δυναμικού αύξησης

Πριν περιγράψουμε το σχεδιασμό ελεγκτών, χρησιμοποιούμε το μοντέλο Alver *et al.*, (2006) για τον υπολογισμό διάφορων βασικών λειτουργιών που καθορίζουν τη δυναμική των τροφών και της αύξησης μιας καλλιέργειας τροχοζώων. Η λειτουργία $h(E)$ πρέπει να δώσει το απαραίτητο ατομικό ρυθμό σίτισης ως λειτουργία του επιθυμητού ποσοστού αυγών, και το $g(\mu)$ το ποσοστό αυγών κατάστασης ως λειτουργία του ποσοστού αύξησης της καλλιέργειας $(\mu)_r$.

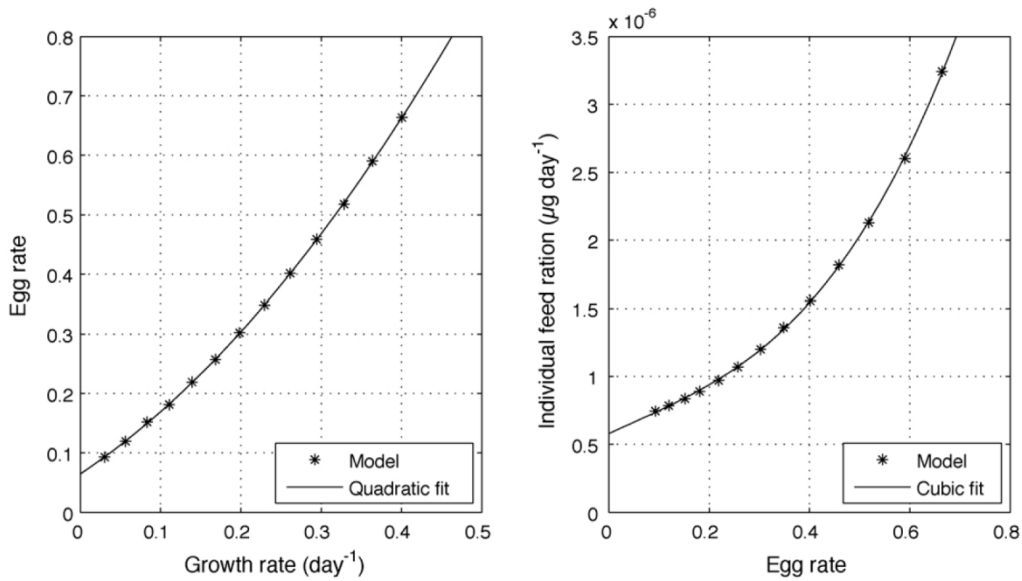
Οι λειτουργίες υπολογίζονται με το τρέξιμο του μοντέλου στην κατάσταση με τη σταθερή προσθήκη τροφών και μιας σειράς ποσοστών διαλύσεων. Σε σταθερή κατάσταση η πυκνότητα πληθυσμών είναι σταθερή και το ποσοστό αύξησης εξαρτάται από το ποσοστό διαλύσεων μόνο. Υπολογίσθηκε η αντιστοιχία για το συγκεκριμένο ρυθμό σίτισης [$\text{g υγρό βάρος άτομο}^{-1}$] με τη διαίρεση του ποσοστού προσθήκης τροφών με τον αριθμό ατόμων για κάθε ποσοστό διαλύσεων και η αναλογία των αυγών μπορεί να εξαχθεί άμεσα από το μοντέλο. Οι τιμές παρουσιάζονται στην Εικ. 2. Χρησιμοποιώντας MathWorks Matlab 7.2, οι πολυωνυμικές εξισώσεις $h(x)$ και $g(x)$ τοποθετήθηκαν στα στοιχεία με την εξίσωση των ελάχιστων τετραγώνων:

$$h(E) = 6.38 \times 10^{-6}E^3 - 7.72 \times 10^{-7}E_2 + 1.69 \times 10^{-6}E + 5.80 \times 10^{-7} \quad (1)$$

$$g(\mu) = 1.50\mu^2 + 0.89\mu + 0.065 \quad (2)$$

Χρειαζόμαστε επίσης μια εκτίμηση του ρυθμού αύξησης ως μια ενέργεια του ποσοστού αυγών. Αυτό είναι η αντίστροφη λειτουργία του $g(E)$, και μπορεί να προσεγγιστεί σαν

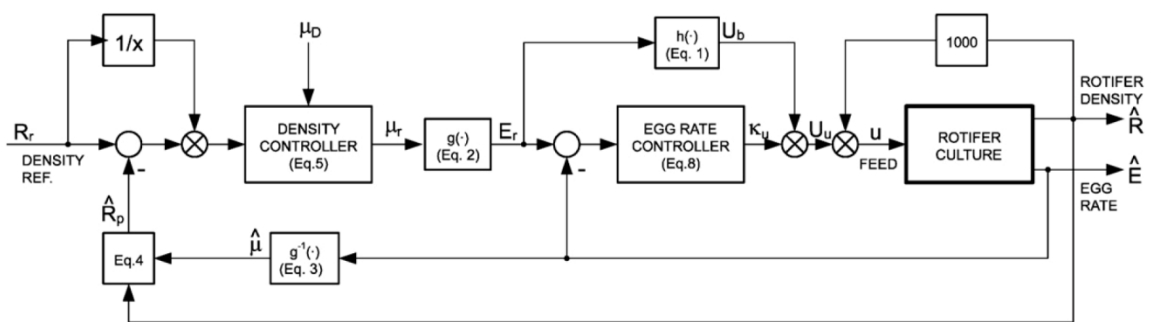
$$g^{-1}(E) = -0.32E^2 + 0.89E - 0.045 \quad (3)$$



Εικ. 2. Υπολογισμός του $h(E)$ και $g(\mu)$ από το μοντέλο διαδικασίας, όπου τρέχει σε σταθερή κατάσταση με σταθερή αραιώση. Το αριστερό πλαίσιο δείχνει το ποσοστό αυγών συναρτήσει του ρυθμού αύξησης. Το δεξιό πλαίσιο δείχνει τον ατομικό ρυθμό σίτισης σε μg υγρό βάρος ανά ημέρα.
 Fig. 3. Estimating $h(E)$ and $g(\mu)$ from the process model, running in steady-state with constant dilution. The left panel shows the egg rate as a function of growth rate. The right panel shows the individual feed ration in μg wet weight day^{-1} .

Γ. Σχέδιο ελεγκτή

Στόχος του ελεγκτή είναι να υπολογίζει το καθημερινό ρυθμό ταΐσματος (u) για τη δεξαμενή καλλιέργειας βασισμένη στην πυκνότητα τροχοζώων του σημείου ρύθμισης (R_r) και μια εκτίμηση της πυκνότητας τροχοζώων (R) και του ποσοστού αυγών (\hat{E}). Η καλλιέργεια υποβάλλεται σε καθημερινές διαλύσεις όπου ένα μέρος D του αποθέματος συγκομίζεται, αν και η διάλυση μπορεί να παραλειφθεί στην αρχική φάση προκειμένου να επιτευχθεί το σημείο ρύθμισης γρηγορότερα.



Εικ. 3. Διάγραμμα του μπλοκ συστήματος κλειστού-βρόχου, με παραπομπές σε σχετικούς αριθμούς στο κείμενο.

Fig. 3. Block diagram of the closed-loop system, with references to relevant equation numbers in the text.

Μια άμεση στρατηγική ελέγχου επιλέγεται, όπου ένας εσωτερικός βρόχος ελέγχου χρησιμοποιείται για να κρατήσει το ποσοστό αυγών της καλλιέργειας (E) στο επιθυμητό επίπεδο, χρησιμοποιώντας το ρυθμό σίτισης u [$\text{g l}^{-1} \text{day}^{-1}$] ως ελεγχόμενη

εισαγωγή. Το σημείο ρύθμισης για τον εσωτερικό βρόχο ελέγχου καθορίζεται από τον εξωτερικό ελεγκτή που χρησιμοποιεί το ποσοστό αυγών ως μεταβλητή εισαγωγής για να ελέγξει την πυκνότητα τροχοζώων (R). Ο ειδικός ρυθμός ταΐσματος μ υπολογίζεται σύμφωνα με τον ακόλουθο αλγόριθμο (που διευκρινίζεται στην Εικ. 3):

- (1) Υπολογίστε την προβλεπόμενη πυκνότητα τροχοζώων R_p που είναι, η τιμή του R που αναμένεται στο μισό χρόνο μεταξύ δυο διαλύσεων. Αυτό απαιτεί μια εκτίμηση του τρέχοντος ρυθμού αύξησης όπως και την πυκνότητα, και την προβλεπόμενη πυκνότητα που υπολογίζεται με την υποθετική εκθετική αύξηση:

$$\hat{R}_p = \hat{R}e^{\hat{\mu}(0.5 - \Delta t_d)} \quad (4)$$

όπου μ είναι ο κατ' εκτίμηση τρέχον ρυθμός αύξησης, και Δt_d είναι ο χρόνος από την τελευταία διάλυση. Μια κατά προσέγγιση εκτίμηση του ρυθμού αύξησης λαμβάνεται από την εξίσωση (3).

- (2) Υπολογίστε τον επιθυμητό ρυθμό αύξησης μ_r βασισμένο στο ρυθμό διαλύσεων D , την προβλεπόμενη πυκνότητα τροχοζώων R_p και την πυκνότητα αναφοράς R_r :

$$\mu_r = \mu_D + K_{p1} \frac{R_r - \hat{R}_p}{R_r} + K_{I1} \int_0^t \frac{R_r - \hat{R}_p}{R_r} dt \quad (5)$$

όπου, η απόκλιση $R_r - R_p$ διαιρείται με το R_r προκειμένου να ληφθεί η σχετική απόκλιση. Αυτό είναι απαραίτητο επειδή το ποσοστό αύξησης μ_r καθορίζεται σχετικά με την πυκνότητα πληθυσμών.

- (3) Εκτιμήστε ποιο ποσοστό αυγών στη σταθερή κατάσταση θα δώσει ένα ρυθμό αύξησης μ_r , χρησιμοποιώντας την εξίσωση (2). Καλέστε αυτό το ρυθμό E_r :

$$E_r = g(\mu_r) \quad (6)$$

- (4) Εκτιμήστε ποιος καθημερινός ρυθμός σίτισης στη σταθερό κατάσταση θα δώσει ένα ποσοστό αυγών E_r , χρησιμοποιώντας την εξίσωση (1). Καλέστε αυτό το ρυθμό U_b :

$$U_b = h(E_r) \quad (7)$$

- (5) Υπολογίστε μια ρύθμιση του U_b βασισμένη στην απόκλιση μεταξύ του E_r και του μετρημένου ποσοστού αυγών \hat{E} . Καλέστε το παράγοντα αυτό κ_u :

$$\kappa_u = 1 + K_{p2}(E_r - \hat{E}) + K_{I2} \int_0^t (E_r - \hat{E}) dt \quad (8)$$

Καλέστε τον προκύπτον ρυθμό σίτισης U_u :

$$U_u = U_b \kappa_u \quad (9)$$

(6) Υπολογίστε το ποσό τροφής ανά λίτρο ανά ημέρα, u , από το U_u από τον κατ' εκτίμηση αριθμό τροχοζώων ανά λίτρο ($1000 \times R$):

$$u = 1000 \times R \times U_u \quad (10)$$

Τα βήματα 2 και 5 είναι συνηθισμένοι νόμοι ελέγχου PI. Τα βήματα 3 και 4, αφ' ετέρου, εξαρτώνται από την εμπειρική γνώση για τη σίτιση και τη δυναμική αύξησης των τροχοζώων.

Δ. Μελέτες προσομοίωσης

Οι μελέτες προσομοίωσης διαμορφώνουν ένα σημαντικό μέρος της ανάπτυξης εφαρμογών και της άδειας της δοκιμής του σχεδίου ελεγκτών χωρίς την προσπάθεια της εκτέλεσης ενός πειράματος πραγματικού μεγέθους. Εάν ένα αρκετά ρεαλιστικό πρότυπο της διαδικασίας είναι διαθέσιμο, το σχέδιο ελεγκτών μπορεί εύλογα να εξεταστεί πριν εφαρμοστεί στην πραγματική διαδικασία. Ο ελεγκτής που παρουσιάστηκε σε αυτό το έγγραφο αναπτύχθηκε και συντονίστηκε αρχικά μέσω των προσομοιώσεων του προτύπου διαδικασίας κατά Alver *et al.*, (2006).

Ε. Πείραμα

Ο ελεγκτής εξετάστηκε σε ένα πείραμα με τέσσερις κυλινδροκωνικές δεξαμενές 250 l επονομαζόμενες ως A₁, A₂, B₁ και B₂. Οι δεξαμενές A οργανώθηκαν με πυκνότητα τροχοζώων του σημείου ρύθμισης 500 ml⁻¹ και οι δεξαμενές B με 1000 ml⁻¹. Οι υψηλότερες πυκνότητες χρησιμοποιούνται μερικές φορές στα εμπορικά εκκολαπτήρια, αλλά έχουμε επιλέξει αυτές τις τιμές προκειμένου να μειωθεί ο αντίκτυπος των πιθανών αρνητικών αποτελεσμάτων υψηλής πυκνότητας όπως η μείωση του οξυγόνου. Τα τροχόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα ήταν ένα στέλεχος από Cayman των *B. plicatilis* ειδών, μετά από την ταξινόμηση των Gómez *et al.*, (2002). Αυτή η καταγωγή χρησιμοποιείται συνήθως στα νορβηγικά εκκολαπτήρια βακαλάων (Baer *et al.*, 2008).

Αρχικά ένας πληθυσμός τροχοζώων διανεμήθηκε ομοιόμορφα μεταξύ των τεσσάρων δεξαμενών. Οι δεξαμενές εξοπλίστηκαν με τα φίλτρα για την εκροή του νερού, που επιτρέπει την ανταλλαγή νερού χωρίς απώλειες τροχοζώων. Μια ανανέωση νερού περίπου όγκου τριών δεξαμενών ανά ημέρα εφαρμόστηκε σε όλο το πείραμα. Τα φίλτρα εφοδιάστηκαν με αερισμό για να μειώσουν την απόφραξη και ξεπλένονταν μια φορά την ημέρα. Επιπλέον, κάθε δεξαμενή είχε τον αερισμό σε μια θέση κοντά στην κορυφή στο κωνικό τμήμα και στις δεξαμενές B παραχωρήθηκε πρόσθετο οξυγόνο από την 4^η ημέρα.

Σε αυτό το πείραμα, τα τροχόζωα αυξήθηκαν σε αλατότητα θαλασσινού νερού (32 ppt περίπου), θερμοκρασίες περίπου 23-24°C, χρησιμοποιώντας πάστα φυκών ως τροφή (Rotifer DietTM, Reed Mariculture). Η πάστα φυκών έχει 18% ξηρό βάρος έναντι του υγρού βάρους τους, σύμφωνα με τον παραγωγό.

Η θερμοκρασία και το οξυγόνο καταμετρούνταν μια φορά την ημέρα, με τη χρήση ενός φορητού αισθητήρα OxyGuard Handy Polaris (ακρίβεια ±0.2°C για τη θερμοκρασία ±1% για το οξυγόνο). Η αλατότητα μετρούταν μια φορά την ημέρα χρησιμοποιώντας ένα φορητό αλατόμετρο Atago S/Mill (ακρίβειας ±1 ppt). Η καλλιέργεια τροχοζώων διέθετε ποσοστό διαλύσεων 25%, αλλά η διάλυση δεν άρχισε μέχρι την 5^η ημέρα. Ο συνδυασμένος μετρητής ελεγκτής τροχοζώων ρυθμίστηκε με τους σωλήνες δειγματοληψία και σίτισης μέσα σε όλες τις δεξαμενές. Το ποσοστό

αυγών καταμετρούταν μια έως δύο φορές καθημερινά και οι τιμές εισάγονταν με το χέρι στον ελεγκτή. Η πυκνότητα των τροχοζώων μετρούταν με το χέρι μια έως δύο φορές καθημερινά και από τον αυτόματο μετρητή περίπου μια φορά ανά ώρα (αν και συχνότερα στην αρχική φάση του πειράματος). Για τη μείωση του αντίκτυπου των διακυμάνσεων μέτρησης, ο ελεγκτής κράτησε μια χαμηλή-περάσματος-φιλτραρισμένη εσωτερική εκτίμηση της πυκνότητας τροχοζώων, που υπολογίστηκε ως εξής:

$$\check{R}_t = 0.5R_t + 0.5R_{t-1} \quad (11)$$

όπου \check{R}_t είναι η εκτίμηση και R_t είναι η ακατέργαστη μετρημένη τιμή, στο χρόνο t . R_{t-1} είναι η προηγούμενη εκτίμηση.

Η πάστα φυκών αραιώθηκε με θαλάσσιο νερό προκειμένου να ελαχιστοποιήσει την απόφραξη των σωλήνων σίτισης, που κρατιόταν σε έναν καλάθι 10 l και αντλούνταν στις δεξαμενές από τον ρυθμιστή. Ο ρυθμιστής περνούσε όλες τις δεξαμενές σε χρόνο Δt_u . Ο χρόνος άντλησης ανά μονάδα χρόνου υπολογίστηκε από το u , που εκφράζεται ως g day^{-1} . Η ποσότητα σίτισης κάθε κύκλου είναι:

$$u_{\text{cycle}} = (4\Delta t_u / 86,400) V_w u \quad (12)$$

όπου, 86,400 είναι ο αριθμός των δευτερολέπτων την ημέρα. Για κάθε χρόνο, δίνεται μια περίοδος άντλησης U δευτερολέπτων:

$$U = u_{\text{cycle}} / q_u p_{\text{res}} \quad (13)$$

Ο ρυθμός άντλησης q_u μετρήθηκε και βρέθηκε να είναι 220 ml min^{-1} .

Πίνακας 2.

Τιμές των παραμέτρων του ρυθμιστή που χρησιμοποιήθηκαν στις εξισώσεις 5, 8 και 12.

Table 2.

Controller parameter values used in Eqs. 5, 8 and 12.

Parameter	Value
K_{I1}	0
K_{I2}	0.1
K_{P1}	0.2 day^{-1}
K_{P2}	0.4
Δt_u	480 s

Αποτελέσματα

A. Προσομοιώσεις

Οι τιμές των παραμέτρων του ελεγκτή επιλέχθηκαν βασισμένες στις μελέτες

προσομοίωση (Πίνακας 2). Διαπιστώθηκε ότι η ολοκληρωτική επίδραση και ο υπολογισμός του μ_r δεν βελτίωσε την απόδοση του ελεγκτή, έτσι το K_{II} ρυθμίστηκε στο 0.

Στην πρώτη προσομοίωση, ένα σημείο ρύθμισης για το E εφαρμόστηκε άμεσα χωρίς εξέταση της πυκνότητας τροχοζώων. Αυτό χρησιμεύει για την εξέταση των ποσοστών των αυγών. Το E_r αρχικά ρυθμίστηκε στο 0.3 και αυξήθηκε έπειτα σε 0.5 σε χρόνο $t = 10$ ημέρες. Οι βιολογικές παράμετροι του μοντέλου ήταν οι ίδιες με εκείνες που βρήκαν οι Alver *et al.*, (2006), και το σενάριο προσομοίωσης οργανώθηκε σύμφωνα με τις παραμέτρους που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

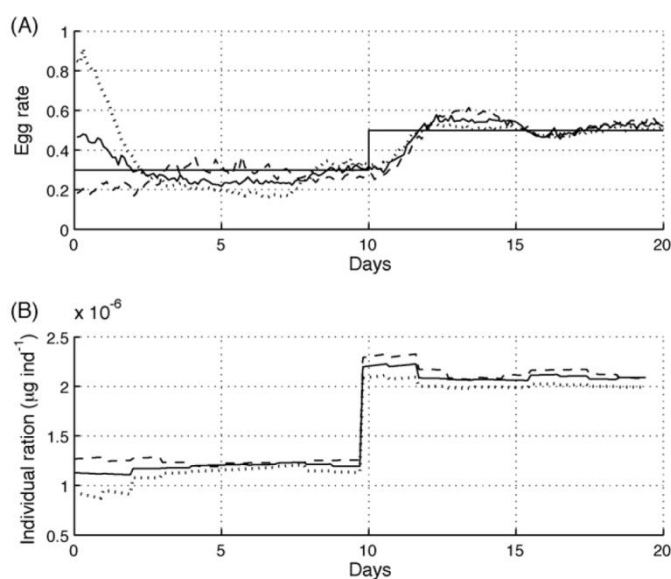
Πίνακας 3

Τιμές παραμέτρων που χρησιμοποιούνται στην προσομοίωση για να επιτευχθούν οι επιθυμητές καλλιεργητικές συνθήκες και η αρχική πυκνότητα.

Table 3

Parameter values used in the simulation to obtain the desired culture conditions and initial density.

Parameter	Description	Value
D	Dilution rate	0.25
R_0	Initial rotifer density	100 ml ⁻¹
T_w	Water temperature	24 °C
V_w	Tank volume	250 l



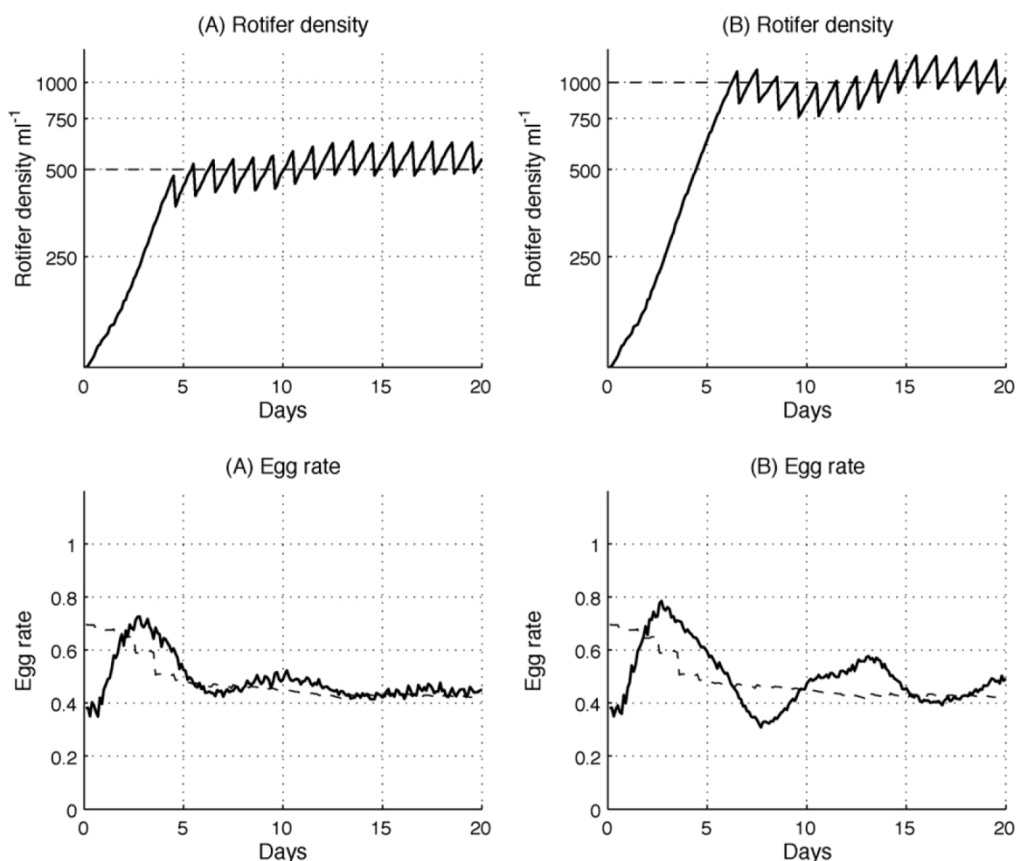
Εικ. 4. (Α) Ποσοστό αυγών του μοντέλου σε τρεις περιπτώσεις με διαφορετικές αρχικές τιμές. Η λεπτή συμπαγής γραμμή δείχνει το ποσοστό αυγών στο σημείο ρύθμισης. (Β) Ατομικός ρυθμός σίτισης που εφαρμόστηκε από τον ελεγκτή καθ' όλη την περίοδο και στις τρεις περιπτώσεις.

Fig. 4. (A) Modelled egg rate in three cases with different initial values. The thin, solid line shows the egg rate setpoint. (B) Individual feeding ration applied by the controller throughout the period in all three cases.

Η Εικ. 4 παρουσιάζει την απάντηση στο διαμορφωμένο ποσοστό αυγών. Και στα δυο, αρχικά και μετά την αλλαγή του σημείου ρύθμισης, το ποσοστό των αυγών χρειάστηκε περίπου 2 ημέρες για να αποκριθεί και να φθάσει στο σωστό επίπεδο και περισσότερο για να σταθεροποιηθεί στο σημείο ρύθμισης. Η εικόνα δείχνει πώς ο ατομικός ρυθμός καθορίστηκε από το ποσοστό των αυγών του σημείου ρύθμισης, με τις τροποποιήσεις που καθορίστηκαν από τις αποκλίσεις στο ποσοστό των αυγών.

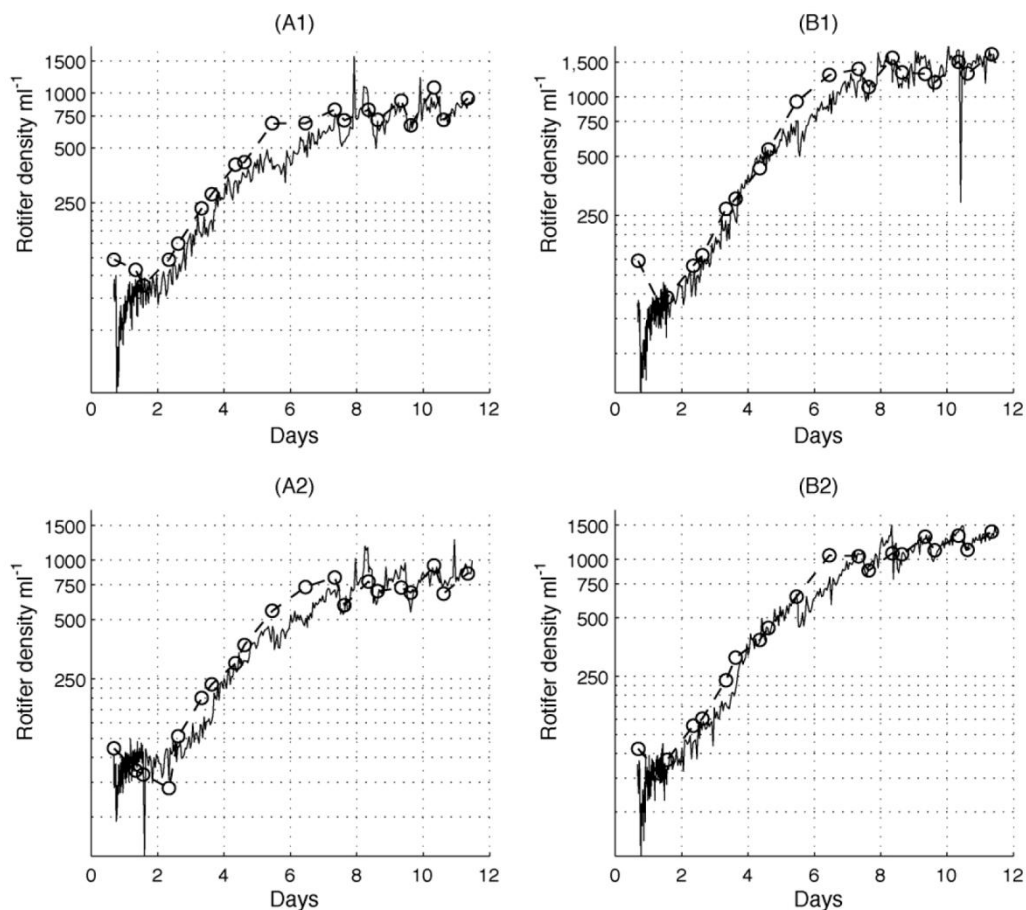
Στη δεύτερη προσομοίωση, δύο διαφορετικά σημεία ρύθμισης χρησιμοποιήθηκαν για

την πυκνότητα τροχοζώων (500 ml^{-1} στην καλλιέργεια των Α και 1000 ml^{-1} στην καλλιέργεια των Β) και ο ελεγκτής απευθύνθηκε σε έναν πληθυσμό τροχοζώων με μια αρχική πυκνότητα 100 ml^{-1} , όπου η διάλυση 25% αρχίζει την 4^η ημέρα στην καλλιέργεια Α και την 6^η ημέρα στην καλλιέργεια Β. Η Εικ. 5 παρουσιάζει την απάντηση στα διαμορφωμένα P και E , έναντι των σημείων ρύθμισης σε όλες τις προσομοιώσεις. Η καλλιέργεια Α διαρκεί 5 ημέρες για να φθάσει σε 500 ml^{-1} , ενώ η καλλιέργεια Β παίρνει 6 ημέρες για να φθάσει σε 1000 ml^{-1} . Και οι δύο καλλιέργειες παρουσιάζουν πυκνότητες κοντά στο σημείο ρύθμισης μετά από την κατάκτηση της σωστής πυκνότητας. Η καλλιέργεια Α "ισοπεδώνεται" ελαφρώς επάνω από 500 ml^{-1} , ενώ η καλλιέργεια Β παρουσιάζει μικρές ταλαντώσεις γύρω από τα 1000 ml^{-1} .



Εικ. 5. Προσομοιωμένες πυκνότητες και ποσοστά αυγών. Το (Α) πλαίσιο δείχνει την πυκνότητα τροχοζώων και το ποσοστό των αυγών στο μοντέλο, όπου η πυκνότητα του σημείου ρύθμισης είναι 500 ml^{-1} . Το ποσοστό αυγών συγκρίνεται στον ελεγκτή με το ατομικό ποσοστό των αυγών (διακεκομμένη γραμμή). Στο (Β) πλαίσιο φαίνεται το ίδιο όταν η πυκνότητα στη θέση ρύθμισης είναι 1000 ml^{-1} .

Fig. 5. Simulated densities and egg rates. The (A) panels show the modeled rotifer density and egg rate, respectively, when the density setpoint is 500 ml^{-1} . Egg rate is compared to the controller's internal egg rate setpoint (hatched line). The (B) panel shows the same when the density setpoint is 1000 ml^{-1} .



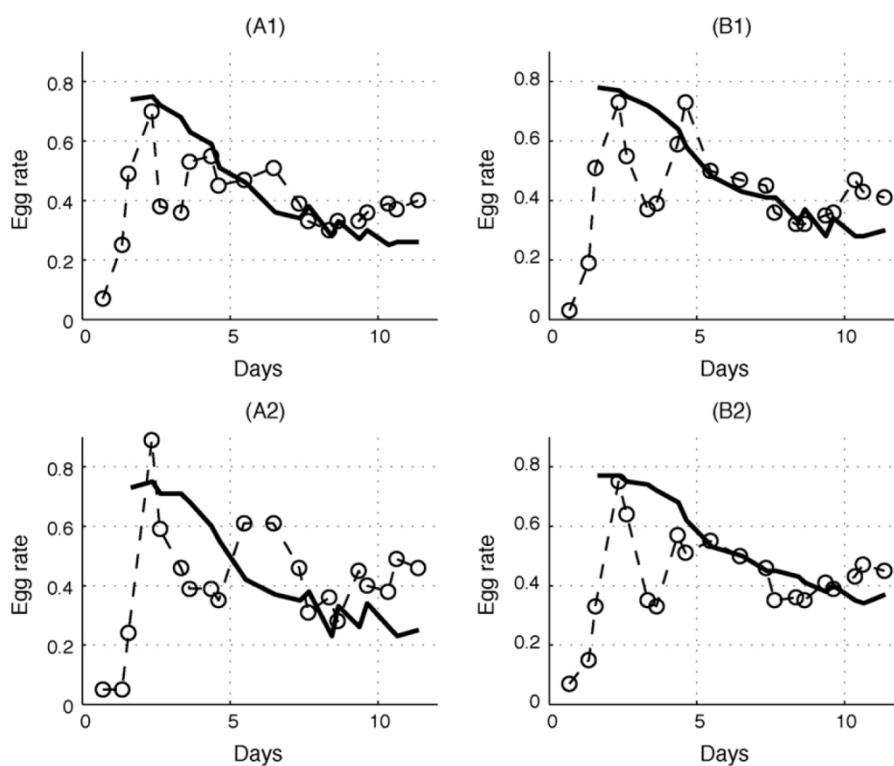
Εικ. 6. Πυκνότητα τροχοζώων που μετρήθηκε σε όλες τις πειραματικές δεξαμενές, χειρονακτικές (κύκλοι) και αυτόματες μετρήσεις (συμπαγής γραμμής).
 Fig. 6. Rotifer density measured in all experiment tanks, both manual (circles) and automatic measurements (solid lines).

B. Πείραμα

Η πυκνότητα και στις τέσσερις δεξαμενές αυξήθηκε γρήγορα μετά από μια αρχική περίοδο καθυστέρησης (Εικ. 6). Όλες οι δεξαμενές παρουσιάζουν μια πτώση στα μικτά ποσοστά αύξησης την 8^η ημέρα, που οδηγεί στις πυκνότητες που ισοπεδώνονται βαθμιαία μακριά από το τέλος του πειράματος. Η μακριά ισοπέδωση δεν συνέπεσε με την έναρξη της διάλυσης την 5^η ημέρα, δεδομένου ότι όλες οι δεξαμενές παρουσίασαν μια σημαντική αύξηση πυκνότητας τις ημέρες 5-8. Όλες οι δεξαμενές, εντούτοις, παρουσίασαν πυκνότητες σημαντικά υψηλότερες από τα σημεία ρύθμισή τους. Τα παραχωρηθέντα ποσοστά των αυγών (Εικ. 7), δεν παρουσίασαν καμία προφανή πρόβλεψη έναντι των σημείων ρύθμισης.

Οι ατομικοί ρυθμοί που εφαρμόζονται από τον ελεγκτή παρουσιάζονται στην Εικ. 8. Αρχικά, οι υψηλοί ρυθμοί χρησιμοποιούνται για να επιτύχουν ταχεία ανάπτυξη. Καθώς οι πυκνότητες πλησιάζουν τα επίπεδα αναφοράς τους, το ποσοστό αυγών των σημείων ρύθμισης και συνεπώς, οι ατομικοί ρυθμοί, μειώνονται βαθμιαία. Μπορεί να διαπιστωθεί ότι, οι διαφορές στους ατομικούς ρυθμούς μεταξύ των δεξαμενών Α και Β είναι αρκετά λεπτές, δεδομένου ότι ακριβώς μια δευτερεύουσα αύξηση στο συγκεκριμένο ποσοστό αύξησης συσσωρεύεται γρήγορα σε μια σημαντική αύξηση στην πυκνότητα των πληθυσμών. Η συμφωνία μεταξύ των αυτόματων και χειρονακτικών μετρήσεων από την πυκνότητα των τροχοζώων είναι πολύ καλή για το

μεγαλύτερο μέρος της περιόδου του πειράματος. Τις ημέρες 5-7 ο αυτόματος μετρητής παρουσίασε σημάδια της αρνητικής πρόβλεψης, στα αντικείμενα του γυαλιού όπου τα δείγματα φωτογραφίζονται (Alver *et al.*, 2007) και αντικαθίστανται την 7^η ημέρα. Λόγω της διαδικασίας παραγωγής το βάθος κάθε γυαλιού μπορεί να παρουσιάσει κάποια παραλλαγή, και αυτό αντιμετωπίστηκε με τη σύγκριση των μετρήσεων μετά από την αντικατάσταση με το εγχειρίδιο των αριθμήσεων και τη ρύθμιση της σταθεράς βαθμολόγησης όγκου του μετρητή αναλόγως. Ο Πίνακας 4 δίνει τη μέση και τη σταθερή απόκλιση των επιπέδων θερμοκρασίας, οξυγόνου και αλατότητας που μετρήθηκαν στις τέσσερις δεξαμενές καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου. Η θερμοκρασία μένει συνήθως σταθερή, εκτός από μια μικρή πτώση τη 10^η ημέρα που πρέπει να αποδοθεί στη θερμοκρασία του παρεχόμενου νερού. Τα επίπεδα οξυγόνου μειώνονται καθώς οι πυκνότητες των τροχοζώων αυξάνονται, αλλά λόγω της προσθήκης οξυγόνου στις δεξαμενές B₁ και B₂, οι συγκεντρώσεις κρατήθηκαν επάνω από 2.5mg l⁻¹. Η αλατότητα παρέμεινε σταθερή.



Εικ. 7. Ποσοστό αυγών μετρημένα χειρονακτικά σε όλες τις πειραματικές δεξαμενές (κύκλοι), συγκρινόμενα με τα εσωτερικά σημεία ρύθμισης του ελεγκτή (συμπαγής γραμμή).

Fig. 7. Egg rate manually measured in all experiment tanks (circles), compared to the controllers internal setpoints (solid lines).

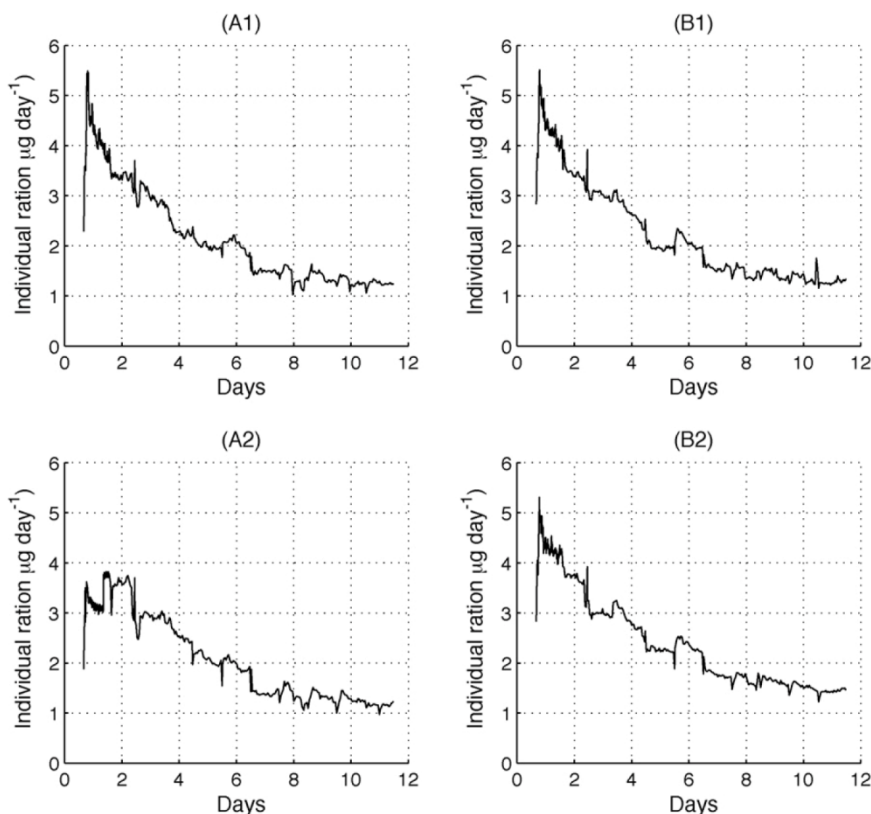
Συζήτηση

A. Απόδοση ελεγκτών και περιορισμοί

Ο ελεγκτής δούλεψε όπως θα έπρεπε, και έτσι οι τέσσερις πειραματικές δεξαμενές παρουσίασαν πυκνότητες που αυξάνονται γρήγορα πριν να ισοπεδώθουν μακριά χωρίς ταλάντωση. Κάποια ρύθμιση στον αλγόριθμο ελέγχου είναι απαραίτητη, ως προκύπτουσες πυκνότητες σε όλες τις καλλιέργειες, ενώ δεν υπήρξε καμία προφανής πρόληψη στα ποσοστά των αυγών έναντι του ποσοστού των αυγών στα σημεία

ρύθμισης. Αυτό δείχνει ότι η απόκλιση στις πυκνότητες των τροχοζώων προκαλείται πρώτιστα από τους πληθυσμούς που εκθέτουν το υψηλότερο ρυθμό αύξησης από το αναμενόμενο για ένα δεδομένο ποσοστό αυγών. Με άλλα λόγια, η πρόληψη μπορεί να αναμένεται για να είναι κατά ένα μεγάλο μέρος ένα αποτέλεσμα της ανακρίβειας στη λειτουργία $g(\mu_r)$ που υπολογίζεται στην Εικ. 2.

Οι λειτουργίες στην Εικ. 2 είναι εκτιμήσεις του μοντέλου της σίτισης των τροχοζώων και της δυναμική αύξησης, και προτείνουν τα λάθη του μοντέλου όσο και τις διαφορές των στελεχών. Το μοντέλο εξετάστηκε αρχικά ενάντια του "SINTEF" βιοτόπου του *B. plicatilis* παρά από το Cayman και οι διαφορές μεταξύ αυτών θα μπορούσαν να είναι η αιτία της ανακρίβειας των εκτιμήσεων του μοντέλου.



Εικ. 8. Ατομικοί ρυθμοί όπως εμφανίζονται από τον ελεγκτή από όλες τις δεξαμενές καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Fig. 8. Individual rations as applied by the controller for all four tanks throughout the experiment.

Εάν ο πληθυσμός παρουσιάζει αλλαγές στο ποσοστό αυγών σε πιο γρήγορο χρόνο από ότι μπορεί να ανιχνευτεί από τις καθημερινές μετρήσεις, η απόδοση του ελεγκτή μπορεί να βελτιωθεί με το σχεδιασμό συχνότερων μετρήσεων. Η εργασία είναι αυτήν την περίοδο υπό εξέλιξη στην προσαρμογή αυτόματου μετρητή τροχοζώων βασισμένο στις διαφορές των μορφών των μορίων. Εντούτοις, όσο αυτό δεν είναι διαθέσιμο, μπορεί να είναι μια καλή αρχή για την παράληψη της μέτρησης του ποσοστού των αυγών συνολικά, και αντ' αυτού υπολογίζεται το ποσοστό των αυγών από τον παρατηρημένο ρυθμό αύξησης χρησιμοποιώντας την εξίσωση (2). Αυτό έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην απόδοση του ρυθμιστή, αλλά το σύστημα είναι ακόμα πιθανό να δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Περαιτέρω πειραματική εργασία απαιτείται για το έλεγχο των παραπάνω.

Ο ελεγκτής χρησιμοποιεί το πρόγραμμα του συγκεκριμένου ρυθμού σίτισης για να καθορίσει τις τιμές εισαγωγής, αλλά όμως δεν λαμβάνει τη συγκέντρωση της τροφής

υπόψη. Εάν η συγκέντρωση των τροφών μειώνεται στις τιμές γύρω και κάτω από το μισό του κορεσμού (X_K στο μοντέλο, που υπολογίζεται σε $4.8 \times 10^{-3} \text{ g l}^{-1}$, Alver *et al.*, 2006), τα τροχόζωα δεν θα είναι σε θέση να ταΐσουν σε ποσοστά κοντά στο μέγιστό τους. Συνεπώς, περισσότερη τροφή θα χαθεί στην ανταλλαγή του νερού. Για την αντιστάθμιση αυτού, το *SFR* πρέπει να αυξηθεί. Τέτοια αντιστάθμιση δεν εφαρμόζεται αυτή την περίοδο, αλλά λογική λειτουργία του ελεγκτή είναι εφικτή σε πυκνότητες ανώτερες των 50 ml^{-1} .

Πίνακας 4

Σύνοψη των μετρήσεων της ποιότητας του νερού. Οι μέσες τιμές και η τυπική απόκλιση καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος παραθέτονται.

Table 4

Summary of the water quality measurements. Mean values with standard deviation throughout the experimental period are given.

Parameter	A1	A2	B1	B2
Temperature [$^{\circ}\text{C}$]	23.9 ± 1.0	23.1 ± 1.1	24.0 ± 1.1	23.6 ± 1.1
Oxygen [mg l^{-1}]	4.7 ± 1.2	5.2 ± 1.3	5.0 ± 1.2	4.6 ± 1.4
Salinity [ppm]	32.0 ± 1.2	32.8 ± 0.9	31.9 ± 1.0	32.3 ± 1.0

B. Πηγές λάθους

Όπως εκτίθεται λεπτομερώς από τους Alver *et al.*, (2007), ο αυτόματος μετρητής τροχόζωων μετρά την πυκνότητά τους με την ανάλυση των ψηφιακών εικόνων των δειγματοληψιών νερού που αντλούνται μέσω ενός γυάλινου αντικειμένου. Με την πάροδο του χρόνου, υπολείμματα από το νερό θα εισχωρήσουν βαθμιαία στην εσωτερική επιφάνεια του γυαλιού, αναγκάζοντας τη δημιουργία αντίθεσης. Η απώλεια αντίθεσης οδηγεί στις χαμηλότερες τιμές μέτρησης, καθώς ορισμένα άτομα γίνονται ανεπαρκώς διακριτά. Αυτή η επίδραση αντιμετωπίζεται με την αντικατάσταση του γυαλιού.

Ο υπολογισμός της προβαλλόμενης πυκνότητας Rp της εξίσωσης (4) εξαρτάται από την εκτίμηση του ρυθμού αύξησης της καλλιέργειας. Ο υπολογισμός του μ από την εξίσωση (3) μπορεί να οδηγήσει στο λάθος, δεδομένου ότι $g^{-1}(x)$ ισχύει μόνο στην παρούσα κατάσταση. Όταν το ποσοστό των αυγών είναι κυμαινόμενο, δεν μπορεί να αναμείνει αυτή την μέθοδο για να δώσει μια ακριβή εκτίμηση. Εντούτοις, ενώ το λάθος μπορεί να οδηγήσει στις καθημερινές ταλαντώσεις των ατομικών ρυθμών σίτισης, έχει μόνο μια δευτερεύουσα επίδραση στην καλλιέργεια μακροπρόθεσμα.

Ανακρίβειες μπορούν επίσης να αναμένονται στη διάλυση των τροφών παρά τον αερισμό, όπου η τροφή δεν μπορεί να διανεμηθεί τέλεια στη δεξαμενή αποθήκευσης, και η συγκέντρωση της πάστας μαγιάς μπορεί να παρεκκλίνει από την καθορισμένη συγκέντρωση. Η ακριβής δόση της τροφής μπορεί να επηρεαστεί από τα μήκη σωλήνων, τους σωλήνες που φράζουν και τις ανακρίβειες στους χρόνους έναρξης και στάσεων από την αντλία. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να επιφέρουν ελάχιστες επιδράσεις, γιατί το μήκος των σωλήνων ήταν μόνο 2-5 m και η απόφραξη δεν βρέθηκε να είναι σημαντική. Οι σωλήνες καθαρίζονταν αρκετές φορές κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Συμπέρασμα

Αυτή η εργασία έχει καταδείξει ένα σύστημα όπου καλλιέργειες τροχοζώων μπορούν να οργανωθούν αυτόματα από μια αφετηρία χαμηλής συγκέντρωσης και μέσω της φάσης αύξησης να φτάσουν στη φάση συγκομιδής. Όλες οι δόσεις σίτισης υπολογίζονται και μετριούνται έξω από τον ελεγκτή βασισμένες στις αυτόματες μετρήσεις πυκνότητας και τις χειρωνακτικές μετρήσεις ποσοστού των αυγών, όπου με αυτόν τον τρόπο δίνουν μια αποδοτική διαδικασία καλλιέργειας με μικρή χειρωνακτική εργασία. Ο ελεγκτής δεν προορίζεται να αποβάλει την απαίτηση για την ανθρώπινη συμμετοχή στην καλλιέργεια. Ακόμα και εάν η μέτρηση του ποσοστού των αυγών μπορεί να αυτοματοποιηθεί, ένας ανθρώπινος παρατηρητής θα είναι σε θέση να αξιολογήσει την ποιότητα καλλιέργειας με την εξέταση στην ταχύτητα κολύμβησης, ερευνώντας την ύπαρξη ξένων οργανισμών όπως βλεφαριδοφόρα ή ciliates, ή ακόμη και από την μυρουδιά της καλλιέργειας, και έτσι ελέγχεται η θέση της καλλιέργειας με τρόπο που ο αυτοματοποιημένος ελεγκτής δεν είναι ικανός να κάνει.

Ο παρόν ελεγκτής παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, πέρα από τα απλουστευμένα σχέδια σίτισης με το σταθερό πρόγραμμα σίτισης. Μα κυρίως, γιατί ο ελεγκτής είναι προσαρμοσμένος στην αύξηση και το ποσοστό των αυγών επιφέροντας χωρίς θυσίες σταθερότητα. Δεδομένου ότι το κόστος της τροφής είναι σημαντικό, ειδικά κατά τη σίτιση με φύκια, στον ελεγκτή παρέχεται επίσης ένα πραγματικό όφελος με τον περιορισμό της πυκνότητας καλλιέργειας στο απαραίτητο επίπεδο, όπου με αυτόν τον τρόπο περιορίστηκε η υπερπαραγωγή τροχοζώων. Ο ελεγκτής είναι εύχρηστος, δεδομένου ότι προσαρμόζει το ρυθμό σίτισης έτσι ώστε κανένας συντονισμός δεν απαιτείται για να αποτελέσει την αρχική πυκνότητα ή τις διαφορές στην πυκνότητα του σημείου ρύθμισης, το ποσοστό διαλύσεων ή τη θερμοκρασία. Με λίγα λόγια, ο ελεγκτής μπορεί να ανταποκριθεί στις περιπτώσεις όπου η αύξηση υπερβαίνει ή αποτυγχάνει να συναντηθεί με τις προσδοκίες.

Παραπομπές

- Alver, M.O., Alfredsen, J.A., Olsen, Y., 2006. An individual-based population model for rotifer (*Brachionus plicatilis*) cultures. *Hydrobiologia* 560, 93–108.
- Alver, M.O., Tennøy, T., Alfredsen, J.A., Ψie, G., 2007. Automatic measurement of rotifer *Brachionus plicatilis* densities in first feeding tanks. *Aquacultural Engineering* 36, 115–121.
- Alver, M.O., Tennøy, T., Alfredsen, J.A., Ψie, G., Olsen, Y., 2008. Automatic control of rotifer density in larval first feeding tanks. *Control Engineering Practice* 16, 347–355.
- Baer, A., Langdon, C., Mills, S., Schulz, C., Hamre, K., September, 2008. Particle size preference, gut feeling and evacuation rates of the rotifer *Brachionus* “Cayman” using polystyrene latex beads. *Aquaculture* 282, 75–82.
- Dhert, P., 1996. Rotifers. In: Lavens, P., Sorgeloos, P. (Eds.), *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*. FAO, Rome, pp. 49–78.
- Dhert, P., Rombaut, G., Suantika, G., Sorgeloos, P., 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture* 200, 129–146.
- Gmez, A., Serra, M., Carvalho, G.R., Lunt, D.H., 2002. Speciation in ancient cryptic species complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (rotifera). *Evolution* 56, 1431–1444.
- Haley, T.A., Mulvaney, S.J., April, 1995. Advanced process control techniques for the food industry. *Trends in Food Science & Technology* 6, 103–110.
- Jõms-Jounela, S.L., September, 2001. Current status and future trends in the automation of mineral and metal processing. *Control Engineering Practice* 9, 1021–1035.
- Kolkovski, S., Curnow, J., King, J., 2004. Intensive rearing system for fish larvae research. I. Marine fish larval rearing system. *Aquacultural Engineering* 31, 295–308.
- Korstad, J., Olsen, Y., Vadstein, O., 1989. Life history characteristics of *Brachionus plicatilis* (rotifera) fed different algae. *Hydrobiologia* 186–187, 43–50.
- McNair, J.N., Boraas, M.E., Seale, D.B., 1998. Size-structure dynamics of the rotifer chemostat: a

- simple physiologically structured model. *Hydrobiologia* 387–388, 469–476.
- Olsen, Y., 2004. Live food technology of cold-water marine fish larvae. In: *Culture of Cold-water Marine Fish*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 73–128.
- Papakostas, S., Dooms, S., Triantafyllidis, A., Deloof, D., Kappas, I., Dierckens, K., Wolf, T.D., Bossier, P., Vadstein, O., Kui, S., May, 2006. Evaluation of DNAMethodologies in identifying *Brachionus* species used in European hatcheries. *Aquaculture* 255, 557–564.
- Papandroulakis, N., Dimitris, P., Pascal, D., 2002. An automated feeding system for intensive hatcheries. *Aquacultural Engineering* 26, 13–26.

Αυτόματη Μέτρηση της Πυκνοτήτων του Τροχοζώου *Brachionus plicatilis* σε Πρωτο-ταιϊζόμενες Δεξαμενές

Automatic Measurement of Rotifer *Brachionus plicatilis* Densities in First Feeding Tanks

Morten Omholt Alver^{a,*}, Torodd Tennøy^c, Jo Arve Alfredsen^a, Gunvor Øie^b

^a Department of Engineering Cybernetics, Norwegian University of Science and Technology, Odd Bragstads plass 2D, 7491 Trondheim, Norway

^b SINTEF Fisheries and Aquaculture AS, SINTEF Sealab, Brattorkaia 17B, 7010 Trondheim, Norway

^c Thelma AS, Box 6170 Sluppen, 7435 Trondheim, Norway

Aquacultural Engineering 36 (2007) 115-121

Περίληψη

Τα τροχοζώα είναι μια σημαντική ζωντανή τροφή στην καλλιέργεια των θαλασσινών ψαριών, αλλά η διαδικασία μέτρησης της πυκνότητάς τους είναι χρονοβόρα. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα σε χαμηλές πυκνότητες, όπως εκείνες που εφαρμόζονται στις πρωτο-ταιϊζόμενες δεξαμενές. Μια συσκευή υπολογισμού για αυτόματη καταμέτρηση της πυκνότητας των τροχοζώων σχεδιάστηκε. Το όργανο αυτό λαμβάνει αυτόματα δείγματα, όπου σε συνδυασμό με ψηφιακή κάμερα και ανάλυση εικόνας προβαίνει σε καταμέτρηση της πυκνότητας των τροχοζώων. Λόγω του αυτόνομου χαρακτήρα του, το όργανο είναι κατάλληλο για χρήση ως συστατικό στοιχείο σε διαδικασία παρακολούθησης και ελέγχου.

Ο σχεδιασμός του μετρητή των τροχοζώων παρουσιάζεται εδώ, καθώς συμπληρώνονται και οι στατιστικές ιδιότητες των μετρήσεων. Η ακριβής επιτυχία στην πρακτική των μετρήσεων εξετάστηκε με μια σειρά από δοκιμαστικούς ελέγχους. Για την αξιολόγηση της ποιότητας των μετρήσεων σε μια πραγματική πρωτο-ταιϊζόμενη δεξαμενή με δείγματα που προέρχονται από ένα μόνο σημείο, ο μετρητής των τροχοζώων χρησιμοποιήθηκε σε μια δυναμική πειραματική μελέτη τροχοζώων σε μια δεξαμενή η οποία συνεχώς αραιωνόταν. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι, τα τροχοζώα είναι περίπου ομοιόμορφα κατανομημένα στη στήλη του νερού και ότι πρέπει κανείς να εξετάσει τα τροχοζώα που κατανέμονται κοντά στα τοιχώματα της δεξαμενής για να είναι σε θέση να προβλέψει τις πυκνότητες των τροχοζώων κάτω από αυτές τις συνθήκες. Το πείραμα προσφέρει ένα παράδειγμα μιας σημαντικά δυναμικής εργασίας που επικουρείται από έναν αυτόματο μετρητή τροχοζώων.

Σκοπός

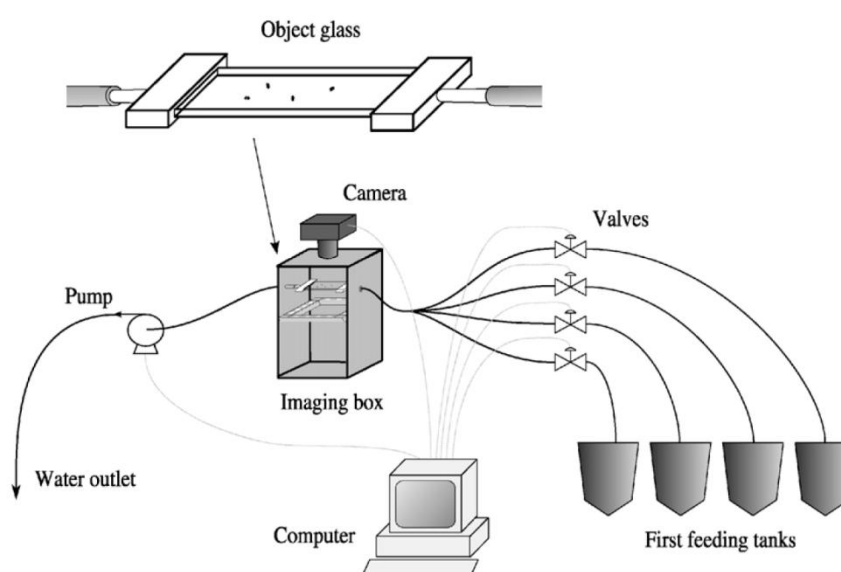
Ο σχεδιασμός ενός αυτόματου μετρητή τροχοζώων σε πρωτο-ταιϊζόμενες δεξαμενές, μιας και ο έλεγχος της πυκνότητας της ζωντανής τροφής σε αυτές αλλά και στα δοχεία παραγωγής της, είναι πολύ καθοριστικός παράγοντας της επιτυχίας της αύξησης και επιβίωσης των νυμφών των ψαριών.

Υλικά και μέθοδοι

A. Μετρητής τροχοζώων

Διαδικασία μέτρησης

Η Εικ. 1 παρουσιάζει μια επισκόπηση του μετρητή των τροχοζώων. Είναι εξοπλισμένος με τέσσερις σωλήνες για την απόσταση των δειγμάτων και χρησιμοποιεί βαλβίδες που ελέγχονται από τον υπολογιστή ώστε να ανοίγει ένας σωλήνας κάθε φορά. Κάθε σωλήνας είναι εξοπλισμένος με ένα φίλτρο 0.5 mm στην άκρη του ώστε να αποτρέπει την προσρόφηση των προνύμφες των ψαριών. Η αντλία τραβά νερό από τη δεξαμενή μέσα από γυάλινο αντικείμενο, όπου μια γνωστή ποσότητα όγκου V φωτογραφίζεται από μια ψηφιακή κάμερα (Sumix SMX-100, κάμερα CMOS USB2.0). Το γυάλινο αντικείμενο αποτελείται από δύο γυάλινες πλάκες που συνδέονται σε επαφή με ένα μεταλλικό διάστημα κατά μήκος των εξωτερικών άκρων του μήκους δίνοντας 2.9 mm απόσταση μεταξύ τους. Τα δυο τελικά κομμάτια είναι κατασκευασμένα από πλεξιγκλάς, και διαθέτει θηλές για την τοποθέτηση των σωλήνων.



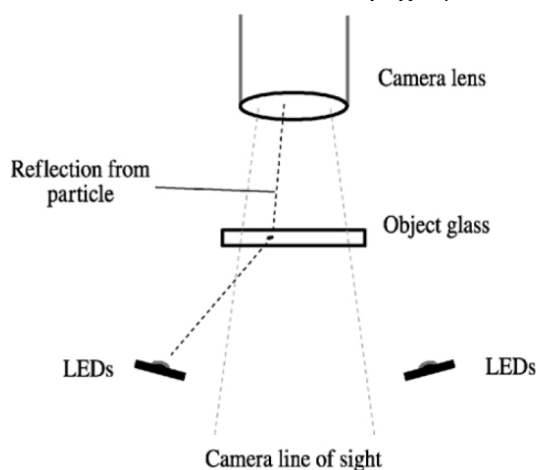
Εικ. 1. Επισκόπηση του μετρητή τροχοζώων.

Fig 1. Overview of the rotifer counter.

Φωτισμός παρέχεται από 16 διόδους εκπομπής φωτός (587 nm κίτρινο φως, συνολικά 750 mcd) τοποθετημένους σε τετράγωνο με τέσσερις διόδους κατά μήκος κάθε πλευράς. Η πλατεία κάτω από το γυάλινο αντικείμενο σε ένα επίπεδο παράλληλο προς τις γυάλινες πλάκες, αποστασιοποιήθηκε έτσι ώστε να κάνει τον κώνο ορατό από την κάμερα που πέφτει ανάμεσα στις λυχνίες LED (Εικ. 2). Αυτό το στήσιμο προσφέρει συνθήκες σκοτεινού πεδίου, όπου το φως αντανακλάται από τα σωματίδια του νερού, αναγκάζοντας τα τροχοζώα και άλλα σωματίδια να εμφανίζονται ως φωτεινά σημάδια σε σκοτεινό φόντο. Αυτός ο φωτισμός διαπιστώθηκε ότι προσφέρει εικόνες με καλύτερη αντίθεση από οποιοδήποτε φωτεινό πεδίο. Οι καλλιεργητές χρησιμοποιούν συχνά "πράσινα νερά" (*green water*) (Shields, 2001), αλλά η προσθήκη των μικροφυκών στην καλλιέργεια έχει αμελητέα αποτελέσματα στην αντίθεση στο φως που έχει χρησιμοποιηθεί.

Οι εικόνες αιχμαλωτίστηκαν στην γκριζα κλίμακα. Για να φιλτραριστούν τα τροχοζώα σε ακινησία ή άλλα σωματίδια, η προηγούμενη εικόνα αφαιρούταν από κάθε νέα εικόνα, μετακινώντας όλες τις φωτεινές περιοχές και σωματίδια που επίσης

παρουσιάζονται στην προηγούμενη εικόνα. Η εικόνα στη συνέχεια μειωνόταν σε δυαδική μορφή με την τοποθέτηση όλων των φωτεινών pixels, από ένα ορισμένο κεντρικό επίπεδο στο λευκό, και όλα τα κάτωθι pixels στο μαύρο. Κάθε σωματίδιο (συνεχόμενη λευκή περιοχή) στην εικόνα φιλτραριζόταν στη συνέχεια εκτός περιοχής του, επιμηκνόνταν και στρογγυλοποιούταν ως δείκτες που ήταν εντός των προκαθορισμένων διαστημάτων. Τα διαστήματα αυτά επιλέχθηκαν για να αντιπροσωπεύουν το μέγεθος και το σχήμα των κανονικών τροχόζωων (40 με 600 pixels για την περιοχή, 1.75 έως 6.50 για την επιμήκυνση και 1.0 έως 1.4 για τη στρογγυλοποίηση), και μπορούν σε ορισμένο βαθμό να διακρίνουν τα τροχόζωα από άλλα σωματίδια, όπως φυσαλίδες αέρα ή υπολείμματα από τις νύμφες των ψαριών. Η περιοχή των διαστημάτων είναι αρκετά μεγάλη, ώστε να λαμβάνονται υπόψη μεταβολές ως προς το μέγεθος μεταξύ τροχόζωων διαφορετικών ηλικιών και διατροφικών συνθηκών. Τα υπόλοιπα σωματίδια μετρήθηκαν και το αποτέλεσμα διαιρούταν με τον όγκο V για την επίτευξη μιας εκτίμησης της πυκνότητας των τροχόζωων. Κάθε τελειοποιημένη εικόνα επεξεργαζόταν με το πρόγραμμα National Instruments IMAQ το οποίο τρέχει με το LabView 7.0.



Εικ. 2. Σκοτεινού πεδίου φωτισμός. Οι φωτεινές πηγές είναι τοποθετημένες εκτός οπτικού πεδίου της κάμερας. Το μοναδικό φως που φτάνει στην κάμερα είναι αυτό που αντανακλάται από τα σωματίδια της γυάλινης πλάκας.

Fig. 2. Dark field lighting. The light sources are placed outside of the camera's line of sight. The only light reaching the camera is that reflected by particles in the object glass.

Ο καταμετρητής παίρνει εικόνες με ταχεία ακολουθία, ενεργοποιώντας την αντλία για περίπου 1s μεταξύ κάθε εικόνας για να αντικαταστήσει τον όγκο του δείγματος. Για να πάρετε μια σαφή εικόνα, ο μετρητής πρέπει να σταματήσει μετά τη διακοπή της αντλίας έως ότου ο όγκος του δείγματος σταματήσει να κινείται. Μετά από μια αλληλουχία

N εικόνων (που καθορίζεται από τον χειριστή), η αντλία ενεργοποιείται για μεγάλο χρονικό διάστημα για να ξεπλυθεί το σύνολο των σωλήνων. Η μέση πυκνότητα που βρέθηκε σε αυτές τις εικόνες N καταγράφεται ως ενιαίο σημείο δεδομένων. Ο ελάχιστος χρόνος μεταξύ των στοιχείων των σημείων εξαρτάται πρωτίστως από το χρόνο μεταφοράς για τα δείγματα του νερού και για τον αριθμό των εικόνων που χρησιμοποιούνται για κάθε μέτρηση. Με το τρέχων στήσιμο, το συνολικό ποσοστό των μετρήσεων είναι περίπου 15 σημεία δεδομένων ανά ώρα. Υψηλότερα ποσοστά μετρήσεων μπορεί να επιτευχθούν αντικαθιστώντας ένα τμήμα του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται.

Η αντιμετώπιση είναι εντελώς αυτόνομη, και καταγράφει κάθε σημείο δεδομένων για

μεταγενέστερη ανάκτηση, εκτός από την εμφάνιση των πιο πρόσφατων μετρήσεων σε μια οθόνη υπολογιστή.

Στατιστική μετρήσεων

Για να εκτιμηθεί η ακρίβεια των μετρήσεων, χρειαζόμαστε ένα στατιστικό μοντέλο για τη μέθοδο μετρήσεων. Αφού μετρήσουμε και αναλύσουμε μετά υποθέτουμε ότι τα τυχαία δείγματα που προέρχονται από τη δεξαμενή είναι αντιπροσωπευτικά και ότι ο μετρητής σωστά υπολογίζει τον αριθμό των τροχοζώων ανά εικόνα.

Κάθε εικόνα αναλύεται από τον μετρητή που περιέχει ένα μικρό δείγμα του νερού από τη δεξαμενή και κάθε τροχόζωο που βρίσκεται σε ένα τέτοιο δείγμα μπορεί να θεωρηθεί ένα γεγονός. Αυτά τα γεγονότα συμβαίνουν τυχαία, αλλά η συχνότητά τους είναι εξαρτώμενη από την πυκνότητα των τροχοζώων στο νερό. Έτσι, το ποσό των τροχοζώων που διαπιστώνονται σε κάθε εικόνα είναι το πρότυπο από την κατανομή Poisson $p(x; \lambda t)$ με x τον αριθμό των τροχοζώων, ο όγκος του νερού ανά εικόνα είναι ανάλογος με το χρονικό διάστημα t , καθώς και η πυκνότητα των τροχοζώων είναι ανάλογη με την συχνότητα λ . Η μέση τιμή και η διασπορά του Poisson $p(x; \lambda t)$ έχουν και οι δύο την τιμή λt (Walpole *et al.*, 1998, σελ. 137).

Χρησιμοποιώντας συναφείς μονάδες, η πυκνότητα των τροχοζώων p δίνεται ως τροχόζωα ανά ml, και ο όγκος ανά εικόνα είναι V (ml). Από την κατανομή Poisson, ο αριθμός ανά εικόνα, x , μπορεί να ποικίλει από τις μέσες τιμές και την ποικιλότητα του pV .

Είναι ξεκάθαρο ότι x/V είναι αμερόληπτα υπολογισμένο από το p με διακύμανση p/V . Παρόλα αυτά, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, κάθε δεδομένο σημείο προκύπτει ως αριθμητικός μέσος όρος της πυκνότητας των N εικόνων:

$$\hat{\rho} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{x_i}{V} \quad (1)$$

Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι, η υπάρχουσα διακύμανση των μετρήσεων δεν είναι σταθερή, αλλά ανάλογη με την πραγματική πυκνότητα των τροχοζώων. Επίσης, είναι αντιστρόφως ανάλογη με τον όγκο του δείγματος και τον αριθμό των εικόνων ανά μέτρηση, πράγμα που σημαίνει ότι αυτές οι μεταβλητές μπορεί να αυξηθούν για τη βελτίωση της ακρίβειας. Αυτοί είναι οι παράμετροι της τρέχουσας ρύθμισης:

$$V = 0.439 \text{ cm}^3 \quad (2)$$

$$N = 50 \quad (3)$$

$$\text{var}(p) = 0.0456p \quad (4)$$

Η σχετική τυπική απόκλιση μειώνεται με την αύξηση της πυκνότητας. Στον μετρητή τροχοζώων χρησιμοποιώντας μια σχέση υψηλής πυκνότητας, ένα χαμηλό N μπορεί να αυξήσει την ταχύτητα μετρήσεων.

B. Δοκιμή μετρήσεων

Μια σειρά από 16 δείγματα νερού με διαφορετικές πυκνότητες τροχοζώων στο διάστημα 0-13000 τροχόζωα ανά l ήταν προετοιμασμένα. Κάθε δείγμα μετρήθηκε

τέσσερις φορές, ενώ παράλληλα διατηρούνταν σε ένα δοχείο του 1 λίτρου, και αναμειγνύεται με μαγνητικό αναδευτήρα. Το νερό εξάγεται μέσω ενός σωλήνα που τοποθετείται με το άνοιγμα του κοντά στο κέντρο του όγκου του νερού. Για σύγκριση, όλα τα δείγματα μετρήθηκαν με το χέρι. Το εγχειρίδιο καταμέτρησης έγινε με εκχύλιση μέχρι 72 ml δείγματα, χρησιμοποιώντας πιπέτα των 5 ml, και για την σταθεροποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιώντας Lugol διάλυμα, βρέθηκε ο οπτικός προσδιορισμός του συνολικού αριθμού των τροχοζώων χρησιμοποιώντας ένα στερεοσκοπικό μικροσκόπιο.

Γ. Μακροπρόθεσμη δοκιμή

Ένα πείραμα πραγματοποιήθηκε, που διήρκεσε 48 ώρες, χρησιμοποιώντας τα τροχοζώα σε αντίθεση με τη διερεύνηση της δυναμικής πυκνότητας των τροχοζώων, σε περιβάλλον παρόμοιο με ένα σχήμα μικρής κλίμακας τάισματος για τις θαλάσσιες νύμφες των ψαριών.

Μια πειραματική δεξαμενή χρησιμοποιήθηκε, χωρητικότητας 163 l. Τα τοιχώματα της δεξαμενής ήταν μαύρα, και ο παρεχόμενος φωτισμός ήταν από μια 40 W λάμπα να κρέμεται 25 εκατοστά πάνω από την επιφάνεια. Η θερμοκρασία κρατήθηκε στους περίπου 10°C, και εφαρμόστηκε συνεχής ανανέωση του νερού. Η εκροή πέρασε μέσα από ένα διάτρητο σωλήνα που επισυνάπτεται στην βάση της δεξαμενής και φτάνοντας στην επιφάνεια. Η ανανέωση του νερού ως ποσοστό μετρίοταν τακτικά, και πραγματοποιήθηκε σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα σε όλο το πείραμα. Ο Πίνακας 1 δείχνει τους ρυθμούς ανανέωσης του νερού και τις ώρες προσαρμογής.

Ο μετρητής των τροχοζώων χρησιμοποίησε τέσσερις σωλήνες τοποθετημένους σε διαφορετικές τοποθεσίες στη δεξαμενή. Ο ένας ήταν τοποθετημένος περίπου 20 cm από την επιφάνεια και 20 cm από τα τοιχώματα της δεξαμενής. Οι υπόλοιποι τρεις βρίσκονταν επισυναπτόμενοι: στο πάνω μέρος, μέχρι τη μέση και στο κάτω μέρος.

Σε πέντε διαφορετικές χρονικές στιγμές, τρεις εκ των οποίων συμπίπτουν με τις προσαρμογές των ανανεώσεων του νερού, τα τροχοζώα προστέθηκαν στη δεξαμενή. Ο αριθμός των τροχοζώων που προστέθηκαν κάθε ώρα αναφέρονται στον Πίνακα 1. Τα τροχοζώα ήταν SINTEF στέλεχος του *Brachionus plicatilis*, και ήταν καλλιεργημένα με μαγιά και λάδι στους 22°C σε μια συνεχή καλλιέργεια περίπου των 400 τροχοζώα ανά ml. Τα τροχοζώα εγκλιματίστηκαν στη θερμοκρασία της πειραματικής δεξαμενής πριν την τοποθέτησή τους και ούτε φύκια ή άλλες τροφικές ουσίες δεν προστέθηκαν στη δεξαμενή δοκιμής.

Κατά τη διάρκεια της περιόδου δοκιμής, έγιναν συνολικά 695 μετρήσεις από τις τέσσερις θέσεις μέτρησης, με ρυθμό περίπου 15.3 μετρήσεις ανά ώρα.

Μαθηματικά μοντέλα

Ένα απλό μαθηματικό μοντέλο για την πυκνότητα των τροχοζώων χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των τιμών. Το μοντέλο περιγράφηκε από τους Alver *et al.*, 2005. Μιας και δεν εφαρμόστηκε τάισμα στα τροχοζώα, τα αυγά αγνοήθηκαν. Τα τροχοζώα είναι γνωστό ότι χρησιμοποιούν τον πόδα τους για προσκόλληση σε επιφάνειες.

Πίνακας 1

Αριθμός τροχοζώων που προστέθηκαν στη δεξαμενή, και ρυθμός ανανέωσης του νερού (όγκος δεξαμενής ανά ημέρα)

Table 1

Number of rotifers added to the tank, and water exchange rate (tank volumes day⁻¹)

Time (h)	Rotifers (l^{-1})	Water exchange rate
0	3000	1.29
3.5	2500	1.29
15.5	2500	2.53
26	1500	3.53
40	4500	5.30

Το ολικό ποσό των τροχοζώων στη στήλη του νερού συμβολίζεται ως N_c , και ο αριθμός των συγκεντρώσεων στα τοιχώματα ως N_w . Με δεδομένο τον όγκο των δεξαμενών ως V_w (cm^3) και την συνολική επιφάνεια των τοιχωμάτων ως A_w (cm^2), μπορούμε να εκφράσουμε την καταμετρημένη πυκνότητα των τροχοζώων ως $\rho = N_c / V_w$ και την πυκνότητα στα τοιχώματα της δεξαμενής ως $\rho_w = N_w / A_w$.

Τα σύμβολα M_w (ανά ημέρα) και M_c (ανά ημέρα) αντιπροσωπεύουν το ρυθμό μετανάστευσης των τροχοζώων στα τοιχώματα και στη στήλη του νερού, αντίστοιχα. Η μετανάστευση στα τοιχώματα υπολογίζεται ως:

$$M_w = N_c k_1 (A_w / V_w) \quad (5)$$

όπου, k_1 (cm ανά ημέρα) είναι μια σταθερά. Ο M_c επιβάλλει χαλαρό ανώτερο όριο ρ_{cap} (ανά cm^2) στη συγκέντρωση στα τοιχώματα:

$$M_c = N_w k_2 (N_w / A_w \rho_{cap})^4 \quad (6)$$

όπου, k_2 (cm ανά ημέρα) είναι μια σταθερά.

Πρόσθεση στα τροχοζώα εμφανίζεται από την ελεγχόμενη μεταβλητή u , όπου έχει η μονάδα των τροχοζώων που προσθέτονται καθημερινά. Το τάϊσμα συχνά λαμβάνει τη μορφή στιγμιαίων προσθηκών σε διακριτές χρονικές στιγμές – π.χ. u_x τροχοζώα που προστέθηκαν τη στιγμή t_x . Ο σχετικός ρυθμός ανανέωσης του νερού σημειώνεται ως Q_w (ανά ημέρα).

Με όλα τα παραπάνω το μαθηματικό μοντέλο λαμβάνει την τελική μορφή:

$$N_c = u - M_w + M_c - Q_w N_c \quad (7)$$

$$N_w = M_w - M_c \quad (8)$$

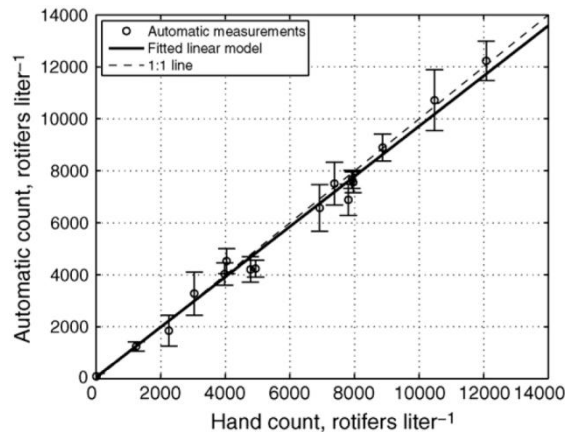
Αποτελέσματα και συζήτηση

Δοκιμή μετρήσεων

Η Εικ. 3 δείχνει την αυτόματη μέτρηση που χαράσσεται σε σχέση με τη χειρωνακτική μέτρηση, μαζί με ένα γραμμικό μοντέλο που υπολογίστηκε από ένα γραμμικό μοντέλο υπολογισμένο από το μέσο όρο, καθώς μια γραμμή δείχνει την ιδανική χαρακτηριστική μέτρηση. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, οι χειρωνακτικές μετρήσεις επίσης προτείνουν τα λάθη, τα πιθανά λάθη κατά τη μέτρηση ή τα λάθη κατά τη δειγματοληψία.

Θα θέλαμε έτσι να αξιολογηθεί η παρατηρούμενη διακύμανση σε σύγκριση με τους θεωρητικούς υπολογισμούς. Η πραγματική διακύμανση εξαρτάται από την πραγματική πυκνότητα των τροχοζώων και μπορεί, συνεπώς, να μην είναι γνωστή σε

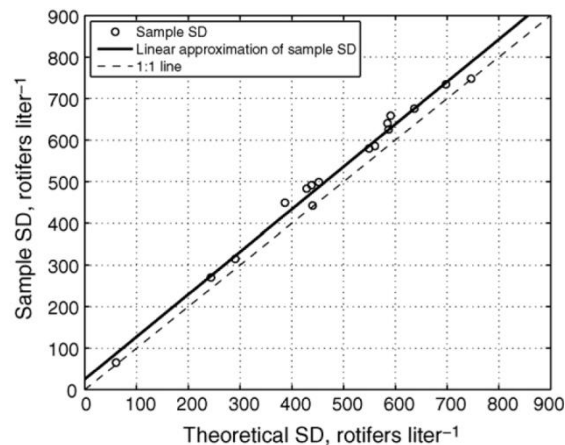
κανένα σημείο, αλλά για κάθε μέτρηση ρ , της αξίας, μια αμερόληπτη εκτίμηση της θεωρητικής



Εικ. 3. Αποτελέσματα από τη δοκιμή μέτρησης, με αυτόματες μετρήσεις με καταγεγραμμένες μπάρες σε σχέση με εγχειρίδιο μετρήσεων. Η γραμμή παλινδρόμησης είναι $y = 0.97x + 58$.

Fig. 3. Results from test counts, with automatic measurements with error bars plotted against manual measurements. The regression line is $y = 0.97x + 58$.

διακύμανσης της μέτρησης να είναι ρ / \sqrt{N} . Για κάθε σημείο μέτρησης έχουμε 4 δείγματα, το καθένα αποτελούμενο από 50 επιμέρους υποδείγματα. Η Εικ. 4 δείχνει τα δείγματα της τυπικής απόκλισης κάθε υποδείγματος από τα 200, διαιρούμενο με $\sqrt{50}$ ώστε να λογοδοτήσουν για τη συγκέντρωση των 50 επιμέρους δειγμάτων σε κάθε μέτρηση, συναρτήσει του θεωρητικού ελάχιστου της τυπικής απόκλισης που υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την εξίσωση (4).



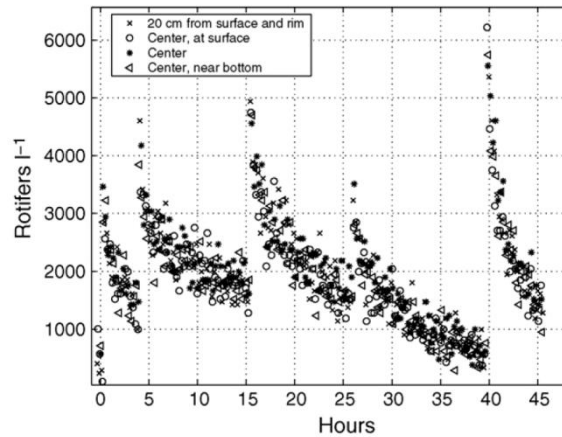
Εικ. 4. Συγκριτική παρουσίαση των δειγμάτων καταγεγραμμένων τυπικών αποκλίσεων και των θεωρικά υπολογισμένων από την εξ. (4). Η γραμμή παλινδρόμησης είναι $y = 1.02x + 25.0$ ($R^2 = 0.987$).

Fig. 4. Comparison of observed sample SD in automatic measurements with estimated theoretical SD computed from Eq. (4). The regression line is $y = 1.02x + 25.0$ ($R^2 = 0.987$).

Επίσης, εμφανίζεται ένα γραμμικό μοντέλο των παρατηρούμενων μέσω τετραγώνων των τυπικών αποκλίσεων, που υπολογίζονται από την εξίσωση $y = 1.02x + 25.0$ με καλή προσαρμογή ($R^2 = 0.987$).

Η παρατηρούμενη αύξηση του SD είναι περίπου με τον ίδιο ρυθμό όπως προβλέπεται

από την εξίσωση (4), αλλά υπάρχει μια μικρή θετική κλίση. Η κλίση δείχνει ότι ορισμένες διακύμανσης εισάγονται με τη δειγματοληψία και την επεξεργασία εικόνας, πέρα από το θεωρητικό ελάχιστο που δίνεται από το μέγεθος του δείγματος.



Εικ. 5. Ολοκληρωμένες σειρές μετρήσεων από το μακροπρόθεσμο πείραμα. Όλες οι μετρήσεις των τεσσάρων τοποθεσιών φαίνονται.

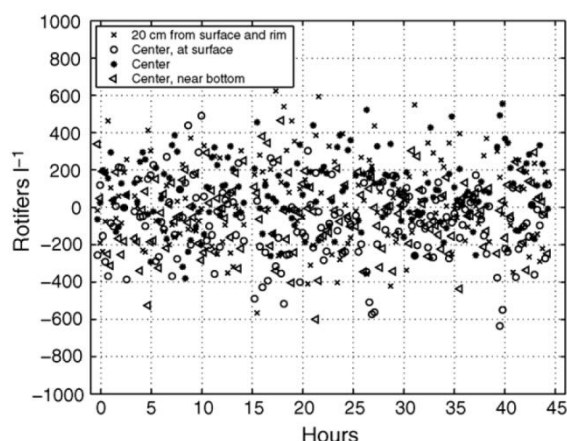
Fig. 5. Complete measurement series from long-term experiment. All four measurement locations are shown.

Δοκιμή μακροπρόθεσμη

Η Εικ. 5 δείχνει τη σειρά των μετρήσεων που γίνονται από τον αυτόματο μετρητή για τις τέσσερις θέσεις μέτρησης. Η Εικ. 6 δείχνει πώς κάθε μια από τις θέσεις μέτρησης αποκλίνει από τον μέσο όρο εις διπλούν. Οι μέσες τιμές που μετρώνται στα επιμέρους σημεία έδειξαν τις ακόλουθες αποκλίσεις από τη μέση για όλες τις θέσεις: +3.4% στα 20 cm από την επιφάνεια και το χείλος, 4.06% από το κέντρο κοντά στην επιφάνεια, 3.8% στο κέντρο της δεξαμενής και 2.7% στο κέντρο κοντά στον πάτο. Η ένδειξη αυτή, επομένως, φανέρωσε ότι η επιλογή της τοποθεσίας της μέτρησης δεν έχει μεγάλη επίδραση στις μετρήσεις. Τα τροχόζωα περίπου κατανέμονται ομοιόμορφα στη στήλη του νερού.

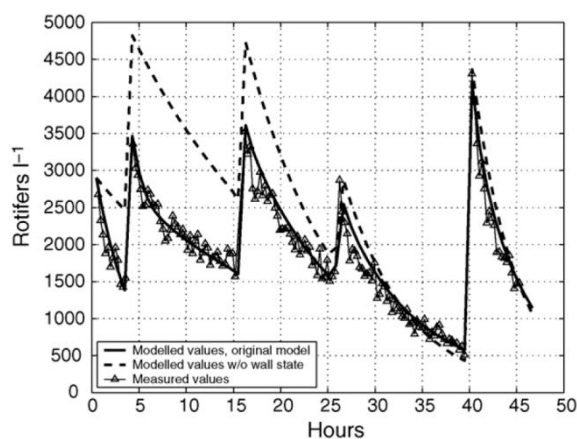
Το μαθηματικό μοντέλο με τις τρέχουσες παραμέτρους (συμπεριλαμβανομένων των τροχοζώων και της ανανέωσης του νερού), δίνεται με το πείραμα. Η παράμετρος $A_w = 1.7 \times 10^4$ (βασισμένη στη γεωμετρική εκτίμηση της περιοχής της δεξαμενής), $k_1 = 0.005$ και $k_2 = 1$. Σε όλα τα πειράματα με 10 l μονάδες, ένα μέγιστο ποσό των περίπου 14 τροχόζωα ανά cm βρέθηκαν σε επαφή με τα τοιχώματα (Olav Vadstein, προσωπική επικοινωνία), για αυτό επιλέχθηκε $\rho_{cap} = 14$. Με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της επαφής των τροχοζώων με τα τοιχώματα, το μοντέλο έτρεξε και σε άλλο χρόνο, ώστε διατυπώθηκε η εξίσωση:

$$M_c = M_w = 0 \quad N_w = 0$$



Εικ. 6. Αποκλίσεις σε κάθε περιοχή μέτρησης από τις μέσες τιμές των μετρήσεων.
 Fig. 6. Deviations at each measurement location from the mean measurements.

Έτσι και τα δύο τρέχοντα μοντέλα παρατίθενται μαζί με τις καταγεγραμμένες τιμές, μέσες τιμές στις τέσσερις θέσεις, στην Εικ. 7. Η διαφορά είναι προφανής, και το μοντέλο με την κατάσταση των τοιχωμάτων δείχνει μια πολύ καλύτερη και ταιριαστή με τη μετρούμενη τιμή από ότι το τροποποιημένο μοντέλο, ιδίως κατά το πρώτο μέρος της περιόδου. Αυτό δείχνει ότι, η κατάσταση των τοιχωμάτων στην πραγματικότητα περιγράφει μια σημαντική κυριότητα του μεντελικού συστήματος. Στις αρχικές ημέρες της εκκίνησης της σίτισης, αυτό σήμαινε ότι η πυκνότητα των τροχοζώων στη στήλη του νερού θα είναι χαμηλότερη από ότι αναμένεται από το ποσό των τροχοζώων που προστέθηκαν.



Εικ. 7. Μετρήσεις από το μακροχρόνιο πείραμα, μέσες τιμές από τις τέσσερις περιοχές, συγκρινόμενες με αυτές του μοντέλου προσομοίωσης με και χωρίς την κατάσταση των τοιχωμάτων.
 Fig. 7. Measurements from long-term experiment, averaged over the four measurement locations, compared to model simulation with and without the wall state.

Συμπεράσματα

Ο αυτόματος μετρητής των τροχοζώων που παρουσιάζεται στο παρόν έγγραφο παρέχει ένα μέσο για την παρακολούθηση της πυκνότητας των τροχοζώων με το ελάχιστο της χειρωνακτικής εργασίας. Δοκιμές δείχνουν ότι, η ακρίβεια των μετρήσεων της πυκνότητας είναι αρκετά κοντά στην στατιστική δυνατή ακρίβεια που καθορίζεται από το μέγεθος του δείγματος. Με την προσαρμογή του όγκου του

δείγματος και τον αριθμό των εικόνων ανά μέτρηση, η αντιμετώπιση μπορεί να ρυθμιστεί ώστε να επιτύχουμε την απαιτούμενη ακρίβεια του χρήστη.

Η μακροπρόθεσμη δοκιμή εφαρμόζει το σύστημα αυτό σε ένα ρεαλιστικό σκηνικό, και δίνει μια ένδειξη των ερευνητικών δυνατοτήτων που μπορεί να προσφέρει. Σε αυτό το μικρό πείραμα, αποδείχθηκε ότι οι χωρικές μεταβολές της πυκνότητας των τροχοζώων είναι μικρές, για δεξαμενές που χρησιμοποιούνταν σε ένα τυπικό σύστημα καλλιέργειας νυμφών κατά την αρχή του τείσματος τους. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας ένα απλό μαθηματικό μοντέλο, τα στοιχεία δείχνουν σαφώς της τάση των τροχοζώων για κατανομή στα τοιχώματα των δεξαμενών.

Παραπομπές

- Alver, M.O., Alfredsen, J.A., Øie, G., 2005. A system for model based biomass estimation of larvae in intensive cod larvicultures. *Aquacult. Int.* 13, 519–541.
- Hoehne-Reitan, K., Kjorsvik, E., Reitan, K.I., 2001. Bile salt-dependent lipase in larval turbot, as influenced by density and lipid content of fed prey. *J. Fish Biol.* 58, 746–754.
- le Ruyet, P., Alexandre, J.C., Thebaud, L., Mugnier, C., 1993. Marine fish larvae feeding: formulated diets or live prey. *J. World Aquacult. Soc.* 24, 211–224.
- Lubzens, E., Tandler, A., Minkoff, G., 1989. Rotifers as food in aquaculture. *Hydrobiologia* 186/187, 387–400.
- Puvanendran, V., Brown, J.A., 1999. Foraging, growth and survival of Atlantic cod larvae reared in different prey concentrations. *Aquaculture* 175, 77–92.
- Shields, R.J., 2001. Larviculture of marine finfish in Europe. *Aquaculture* 200, 55–88.
- Walpole, R.E., Myers, R.H., Myers, S.L., 1998. *Probability and Statistics for Engineers and Scientists*. Prentice Hall International.

Ένα Καινοτόμο Σύστημα Καλλιέργειας για την Παραγωγή Εξαιρετικά Υψηλής Πυκνότητας Τροχοζώων, *Brachionus rotundiformis* - μια Προκαταρκτική Αναφορά

A Novel Culture System for the Ultra-High-Density Production of the Rotifer, *Brachionus rotundiformis* – a Preliminary Report

Kenji Yoshimuraa^a, Kenji Tanakab^b, Takao Yoshimatsuc,^{c,*}

^a *Fukuoka Mariculture Corp., Fukuoka 811-3512, Japan*

^b *Department of Biological and Environmental Chemistry, Kyushu School of Engineering, Kinki University, Fukuoka 820-8555, Japan*

^c *Laboratory of Advanced Animal and Marine Bioresources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan*

Aquaculture 227 (2003) 165-172

Περίληψη

Ένα νέο σύστημα καλλιέργειας για τη συνεχή φίλτρανση του νερού καλλιέργειας αναπτύχθηκε για εξαιρετικά υψηλή πυκνότητα παραγωγής θαλάσσιων τροχοζώων. Αυτό το σύστημα καλλιέργειας εξαιρετικά υψηλής πυκνότητας είναι εξοπλισμένο με ένα σετ ατομικών διηθητικών μεμβρανών (μέγεθος πόρων: 0.4 μm) μέσα σε ένα δοχείο καλλιέργειας. Η απόδοση αυτού του συστήματος καλλιέργειας εξετάστηκε σιτίζοντας με πάστα *Chlorella* γλυκού νερού ως τροφή σε μια τεσσάρων ημερών καλλιεργητική παρτίδα.

Για την αποτροπή του στομώματος των επιφανειών των μεμβρανικών, η μονάδα διήθησης καθαριζόταν καθημερινά βυθίζοντάς την σε διάλυμα NaOCl. Η μονάδα φίλτρων μεμβρανών ήταν αποτελεσματική στην ανταλλαγή του νερού καλλιέργειας με υψηλά επίπεδα αμμωνίας με φρέσκο θαλασσινό νερό, ενώ τα κύτταρα των τροχοζώων και της *Chlorella* παρέμεναν στο καλλιεργητικό δοχείο. Χρησιμοποιώντας αυτή τη μονάδα διήθησης μεμβρανών με τον εφοδιασμό αερίου οξυγόνου, πυκνότητα τροχοζώων μεγαλύτερη των 1.6×10^5 άτομα ανά ml καταμετρήθηκε την 4^η ημέρα της καλλιέργειας. Η αφαίρεση της συσσωρευμένης αμμωνίας από το νερό καλλιέργειας επέτρεψε μια αύξηση της παραγωγικότητας των τροχοζώων.

Σκοπός

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η ανάπτυξη ενός νέου καλλιεργητικού συστήματος παραγωγής εξαιρετικά υψηλής πυκνότητας τροχοζώων.

Υλικά και μέθοδοι

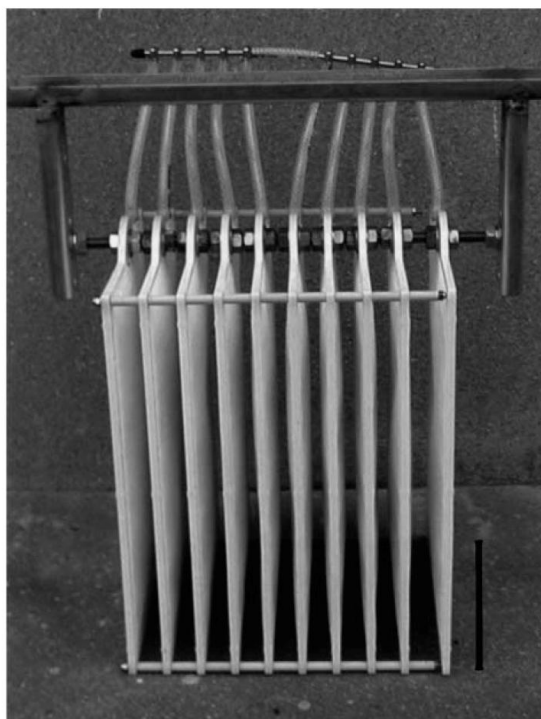
Μονάδα φίλτρων μεμβρανών

Ο σχεδιασμός της μονάδας διήθησης μεμβρανών που χρησιμοποιείται σε αυτό το πείραμα παρουσιάζεται στην Εικ. 1. Κάθε φύλλο φίλτρων μεμβρανών (χλωριωμένο φίλτρο πολυαιθυλενίου, τύπος H3-203, Kubota, Τόκιο, Ιαπωνία) είχε μέγεθος 315x225 mm, πάχος 6 mm, ξηρό βάρος 0.4 Kg, ωφέλιμη επιφάνεια φίλτρανσης 0.11 m², και μέσο μέγεθος πόρων, 0.4 μm. Η μονάδα φίλτρων μεμβρανών αποτελείται από 10 φύλλα φίλτρων μεμβρανών που πλαισιώνεται από ευθυτενείς ανοξείδωτους

σωλήνες. Κάθε επιμέρους σωλήνας στο ανώτερο μέρος των φύλλων των φίλτρων συνδέθηκε με μια μεταλλική διακλάδωση. Η σχισμή μεταξύ κάθε φύλλου φίλτρων μεμβρανών ήταν 20 mm. Σύμφωνα με τις προδιαγραφές των φύλλων των φίλτρων, μια ροή της τάξης των 120 ml min⁻¹ παρατηρήθηκε με καθαρό νερό κάτω από θερμοκρασία 20°C και πίεση 5 kPa.

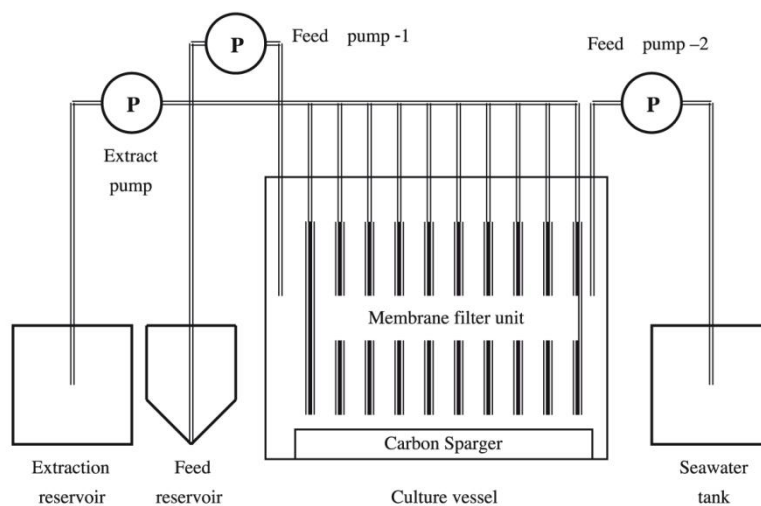
Σύστημα καλλιέργειας με τη μονάδα διήθησης

Το σύστημα καλλιέργειας με τη μονάδα διήθησης μεμβρανών (CMFU) παραθέεται σχηματικά στην Εικ. 2. Το δοχείο καλλιέργειας είχε μήκος 385 mm, πλάτος 285 mm και βάθος 500 mm. Ο όγκος του δοχείου καλλιέργειας, εκτός από το διάστημα της μονάδας διήθησης μεμβρανών, ήταν 40 l. Μια περισταλτική αντλία, στην οποία λαστιχένιοι σωλήνες από κάθε επιφάνεια φίλτρων μεμβρανών εισήχθησαν, χρησιμοποιήθηκε για να εξαγάγει το υπερκείμενο νερό του μέσου καλλιέργειας από το δοχείο. Αυτή η περισταλτική αντλία για την εξαγωγή, προσαρμόστηκε για να λειτουργήσει με αναρρόφηση της τάξης των 5-s με διακοπή 10-s. Άλλες περισταλτικές αντλίες προσαρμόστηκαν επίσης για το συνεχές τάισμα της πάστας *Chlorella* και για το θαλασσινό νερό. Το επίπεδο του μέσου καλλιέργειας στο δοχείο διατηρήθηκε σταθερό χρησιμοποιώντας τις αντλίες και έναν αισθητήρα του επιπέδου του νερού. Ένας διανομέας (Furuhashi, Νάγκουα, η Ιαπωνία) προσαρμόστηκε στο κατώτατο σημείο του δοχείου για να παρέχει το αέριο οξυγόνου στο νερό καλλιέργειας αποτελεσματικά και για να αποτρέψει το στόμωμα της μεμβράνης. Η επιφάνεια των φίλτρων μεμβρανών καθαριζόταν κάθε ημέρα με την καταβύθισή τους σε διάλυμα NaOCl (ενεργό CL₂, 1%) για 30 min με έντονο αερισμό για την αφαίρεση τα βουλωμένων μορίων.



Εικ. 1. Φωτογραφία της μονάδας διήθησης μεμβρανών. Η μπάρα στη φωτογραφία αντιστοιχεί σε 10 cm.

Fig. 1. Photograph of membrane filtration unit. A bar in the picture represents 10 cm.



Εικ. 2. Σχηματική απεικόνιση του συστήματος καλλιέργειας υψηλής πυκνότητας με τη χρήση μονάδας διήθησης μεμβρανών (CMFU) (βλ. Υλικά και μέθοδοι για τη λειτουργία του συστήματος).
 Fig. 2. Schematic diagram of the ultra-density culture system with membrane filtration unit (CMFU) (see Materials and methods for the operation of the system).

Παρτίδα καλλιέργειας με τη διήθηση

Το θαλάσσιο είδος τροχοζώων που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη ήταν το *Brachionus rotundiformis* (τροχοζώο S-τύπου, που καλλιεργείται στη Fukuoka Mariculture, Ιαπωνία, καλλιεργημένο με εμπορική *Chlorella* του γλυκού νερού) ενώ πάστα *Chlorella* του γλυκού νερού χρησιμοποιήθηκε ως τροφή (*C. regularis*, όγκου συσκευασίας: 600 ml ανά l, Yoshimura *et al.*, 1997). Οι δοκιμές καλλιέργειας παρτίδων, που χρησιμοποιούν CMFU με έναν εφοδιασμό αερίου οξυγόνου ή αερισμό πραγματοποιήθηκαν και μια δοκιμή παρτίδας χωρίς CMFU πραγματοποιήθηκε με παροχή οξυγόνου. Το φρέσκο θαλασσινό νερό (33-35 ppt) φιλτραρίστηκε με ένα αυτόματο φίλτρο σιφωνισμού (Shinko Pantec, Kobe, Ιαπωνία) πριν τη χρήση του. Η θερμοκρασία καλλιέργειας ελεγχόταν συνεχώς ώστε να είναι 32°C χρησιμοποιώντας ένα υδατόλουτρο. Ο ογκομετρικός ρυθμός του αερίου οξυγόνου ή ο αερισμός κυμάνθηκε από 0.075 έως 0.125 ννμ (όγκος αερισμού/όγκος νερού/min, Yoshimura *et al.*, 1996b). Το αέριο οξυγόνου διοχετευόταν με μια ηλεκτρική γεννήτρια οξυγόνου (Yanmar, Τόκιο, Ιαπωνία). Στις καλλιέργειες με την παροχή οξυγόνου, η αρχική πυκνότητα των τροχοζώων προσαρμόστηκε στα 20.000 άτομα ανά ml και το ποσό της πάστας *Chlorella* που ταιίστηκε στη δεξαμενή ήταν 4 l (560 g ξηρό βάρος) την 1^η ημέρα, 6 l την 2^η ημέρα και 8 l την 3^η ημέρα της καλλιέργειας. Στην καλλιέργεια με τον αερισμό, τα τροχοζώα που εμβολιάστηκαν ήταν 880 άτομα ανά ml και 0.4 l πάστας *Chlorella* ανά 10⁶ τροχοζώων ταιίζονταν καθημερινά.

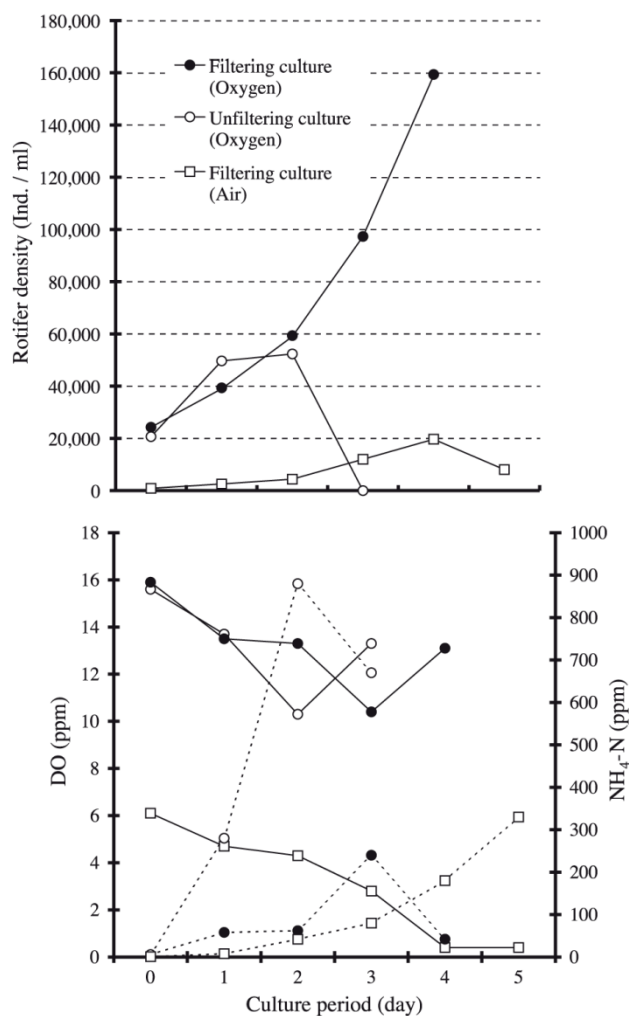
Αναλύσεις

Οι συγκεντρώσεις της ολικής αμμωνίας (NH₄⁺-N), των νιτρικών (NO₂⁻), των νιτρικών (NO₃⁻), των φωσφορικών (PO₄³⁺), και του διαλυμένου οξυγόνου (DO) ελέγχονταν καθημερινά. Το DO καταγραφόταν με ένα οξυγονόμετρο (YSI, Τόκιο, Ιαπωνία). Οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων παραμέτρων μετρήθηκαν με σπεκτροφωτόμετρο (HACH, κοβάλτιο, ΗΠΑ) μετά από φιλτράρισμα του νερού

καλλιέργειας με ειδικό φίλτρο (μέγεθος πόρων 0.2 μm).

Αποτελέσματα και συζήτηση

Οι καθημερινές αλλαγές στην πυκνότητα των τροχοζώων και στη συγκέντρωση του DO και της $\text{NH}_4^+\text{-N}$ παρουσιάζονται στην Εικ. 3. Στις καλλιέργειες με την παροχή οξυγόνου, η συγκέντρωση του DO ρυθμιζόταν πάντα σε 10 ppm καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειας.



Εικ. 3. Ημερήσιες αλλαγές των συγκεντρώσεων των τροχοζώων (άνωτερο γράφημα) και των περιβαλλοντικών παραμέτρων DO και αμμωνία (κάτωτερο γράφημα) σε διαφορετικές καλλιεργητικές συνθήκες. Σύμβολα των καλλιεργητικών συνθηκών: συμπαγής κύκλος, φιλτραρισμένη καλλιέργεια εφοδιασμένης με οξυγόνο; ανοιχτός κύκλος, καλλιέργεια παρτίδας εφοδιασμένης με οξυγόνο; ανοιχτό τετράγωνο, φιλτραρισμένη καλλιέργεια με αερισμό. Σύμβολα περιβαλλοντικών παραμέτρων: συμπαγής γραμμή, διαλυμένο οξυγόνο (DO); διακεκομμένη γραμμή, ολική αμμωνία ($\text{NH}_4^+\text{-N}$).

Fig. 3. Daily changes in rotifer densities (upper graph) and environmental parameters DO and ammonia (lower graph) at the different culture conditions. Symbols of the culture conditions; solid circle, filtration culture with oxygen supply; open circle, batch culture with oxygen supply; open square, filtration culture with aeration. Symbols of environmental parameters: solid line, dissolved oxygen (DO); dotted line, total ammonia ($\text{NH}_4^+\text{-N}$).

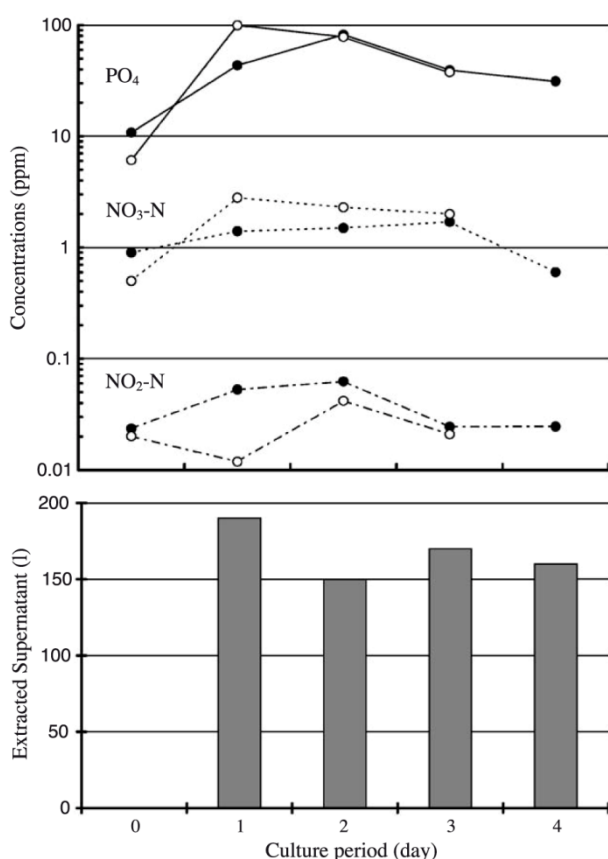
Στη καλλιέργεια χωρίς CMFU και με τη παροχή οξυγόνου, η πυκνότητα τροχοζώων αυξήθηκε στα 50.000 άτομα ανά ml την 3^η ημέρα, αλλά η πληθυσμιακή αύξηση έπαυσε τη 4^η ημέρα, λόγω της τοξικότητας της συσσωρευμένης αμμωνίας (880 ppm την 3^η ημέρα). Στη καλλιέργεια που χρησιμοποιεί CMFU με την παροχή οξυγόνου, η συγκέντρωση της $\text{NH}_4^+\text{-N}$ παρέμεινε κάτω από τα 240 ppm και μια λογαριθμική φάση συνεχής αύξησης παρατηρήθηκε μέχρι την 5^η ημέρα της καλλιέργειας. Η πυκνότητα των τροχοζώων έφθασε τελικά τα 159.000 άτομα ανά ml σε αυτή τη δοκιμή. Στη καλλιέργεια που χρησιμοποιεί CMFU με τον αερισμό, η συγκέντρωση της $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ήταν χαμηλότερη από 330 ppm και η λογαριθμική αύξηση συνεχίστηκε μέχρι την 5^η ημέρα της καλλιέργειας επίσης. Η πυκνότητα των τροχοζώων σε αυτή την καλλιέργεια έφθασε τα 22.000 άτομα ανά ml την 5^η ημέρα. Ωστόσο, η αύξηση των τροχοζώων σταμάτησε την 6^η ημέρα, λόγω της ανεπάρκειας του DO (0.4 ppm την 5^η ημέρα).

Είναι γνωστό ότι, η έλλειψη του οξυγόνου και η τοξικότητα της συσσωρευμένης αμμωνίας εμποδίζουν δραστικά την πληθυσμιακή αύξηση των τροχοζώων και αυτοί οι δύο ανασταλτικοί παράγοντες λειτουργούν πάντα ταυτόχρονα στις καλλιέργειες υψηλής πυκνότητας (Yoshimura *et al.*, 1994). Επομένως, ήταν δύσκολο να χωριστούν τα αποτελέσματα κάθε ανασταλτικού παράγοντα της αύξησης των τροχοζώων. Σε αυτή τη μελέτη, πετύχαμε τον έλεγχο των συγκεντρώσεων της $\text{NH}_4^+\text{-N}$ και επάρκεια του DO με τη χρήση CMFU. Μια ραγδαία αύξηση στη συγκέντρωση της $\text{NH}_4^+\text{-N}$ προκάλεσε προφανώς μια κατάρρευση της καλλιέργειας τροχοζώων όπως φαίνεται στην Εικ. 3. Αφ' ετέρου, στη καλλιέργεια που χρησιμοποιεί CMFU με τον αερισμό, αν και υπήρξε μια έλλειψη του οξυγόνου για μια σχετικά μεγάλη περίοδο στο δεύτερο μισό της καλλιέργειας, τα περισσότερα τροχοζώα φάνηκαν ακόμα υγιή κάτω από μικροσκοπική παρατήρηση. Όπως έχει αναφερθεί (Imada, 1983; Yamasaki *et al.*, το 1987), τα τροχοζώα ήταν πιο ανεκτικά στο στρες οξυγόνου απ' ό,τι στην υψηλή συσσώρευση της αμμωνίας.

Στη καλλιέργεια που χρησιμοποιεί CMFU με την παροχή οξυγόνου, η καθαρή παραγωγή τροχοζώων ήταν 5.39×10^9 άτομα και η παραγωγή τροχοζώων ανά λίτρο της καταναλωμένης πάστας *Chlorella* υπολογίστηκε για να είναι 3.0×10^8 άτομα ανά l. Η καθαρή παραγωγή και συγκομιδή τροχοζώων ανά μονάδα όγκου πάστας *Chlorella* στη καλλιέργεια χωρίς CMFU ήταν σχεδόν ίσες με εκείνες στη καλλιέργεια που χρησιμοποιεί CMFU μέχρι την 3^η ημέρα. Εντούτοις, η πυκνότητα τροχοζώων μειώνεται γρήγορα αφότου είχε φθάσει στη μέγιστη τιμή της την 4^η ημέρα. Στη καλλιέργεια με τον αερισμό, η καθαρή παραγωγή και συγκομιδή τροχοζώων μειώθηκαν επίσης αφότου η πυκνότητα των τροχοζώων έφθασε στην αιχμή της την 5^η ημέρα. Μόνο η καλλιέργεια που χρησιμοποιεί CMFU με το οξυγόνο επέτρεψε την υγιή συγκομιδή των τροχοζώων στη μέγιστη πυκνότητα με μια υψηλή αποδοτικότητα της χρησιμοποίησης τροφών, η οποία πρέπει να σημειωθεί ως σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης CMFU στη καλλιέργεια τροχοζώων εξαιρετικά υψηλής πυκνότητας.

Οι καθημερινές αλλαγές των συγκεντρώσεων των φωσφορικών, των νιτρωδών και των νιτρικών στις καλλιέργειες με την παροχή οξυγόνου παρουσιάζονται στην Εικ. 4 (άνωτη γραφική παράσταση). Η συγκέντρωση των φωσφορικών κυμάνθηκαν από 6.1-99.5 και 10.8-82.0 ppm στις καλλιέργειες με και χωρίς CMFU, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση των νιτρωδών κυμάνθηκαν μεταξύ 0.5-2.8 και 0.6-1.7 ppm (με και χωρίς CMFU, αντίστοιχα), και τα νιτρικά κυμαίνεται μεταξύ 0.024-0.053 και 0.012-0.042 ppm (ομοίως). Αν και η καλλιέργεια χωρίς CMFU κατάρρευσε την 3^η ημέρα, καμία μεγάλη διαφορά δεν παρατηρήθηκε μέχρι τότε στις συγκεντρώσεις των φωσφορικών, των νιτρωδών και των νιτρικών μεταξύ των καλλιεργειών με ή χωρίς

CMFU. Η ροή του υπερκείμενου νερού κυμάνθηκε από 1.36 έως 1.73 ml ανά ημέρα ανά cm μέσα στη καλλιέργεια που χρησιμοποιεί CMFU και το συνολικό ποσό το υπερκείμενου νερού κυμάνθηκε μεταξύ 150 και 190 l ανά ημέρα (375-475% του όγκου του δοχείου καλλιέργειας) όπως φαίνεται στην Εικ. 4 (χαμηλότερη γραφική παράσταση). Επομένως, το συνολικό ποσό των φωσφορικών, των νιτρικών και των νιτρικών που παράγονται στη καλλιέργεια που χρησιμοποιεί CMFU ήταν αρκετά μεγαλύτερο απ' ό,τι στη καλλιέργεια χωρίς CMFU. Τα φωσφορικά που συσσωρεύονται στο μέσο καλλιέργειας ίσως προερχόταν από την πάστα *Chlorella* και τα νιτρικά και νιτρικά ίσως να έχουν παραχθεί από τη νιτροποίηση της $\text{NH}_4^+\text{-N}$ από τα νιτροποιητικά βακτήρια στο θαλασσινό νερό. Για να μειωθούν οι συγκεντρώσεις αυτών των θρεπτικών ουσιών στο μέσο καλλιέργειας, είναι πολύ σημαντικό να ελεγχθεί η βακτηριακή άνθιση που θα προκαλέσει το ξεσπάσματα των ασθενειών των ψαριών (Usuki *et al.*, 1998). Σαν επόμενο βήμα, είναι απαραίτητο να μελετηθεί λεπτομερώς η επίδραση του φιλτραρίσματος του θαλασσινού νερού στη βακτηριακή σύνθεση και την αφθονία στο μέσο καλλιέργειας των τροχοζώων.



Εικ. 4. Ημερήσιες αλλαγές των περιβαλλοντικών παραμέτρων φωσφορικών, νιτρικών και νιτρικών (άνωτερο γράφημα) στις διαφορετικές καλλιεργητικές συνθήκες και αφαίρεσης των υπερκείμενων (κατώτερο γράφημα) σε φιλτραρισμένη καλλιέργεια εφοδιασμένης με οξυγόνο. Σύμβολα των καλλιεργητικών συνθηκών: συμπαγής γραμμή, φιλτραρισμένη καλλιέργεια εφοδιασμένης με οξυγόνο; ανοιχτός κύκλος, καλλιέργεια παρτίδας εφοδιασμένης με οξυγόνο.

Fig. 4. Daily changes in environmental parameter phosphate, nitrite and nitrate (upper graph) at the different culture conditions and amount of extracted supernatant (lower graph) in filtration culture with oxygen supply. Symbols of culture conditions: solid circle, filtration culture with oxygen supply; open circle, batch culture with oxygen supply.

Η αφαίρεση της αμμωνίας από το νερό καλλιέργειας με CMFU ήταν πολύ αποτελεσματική, ενισχύοντας την παραγωγή υγιών τροχοζώων, η οποία επιτεύχθηκε από τη συνεχή ανανέωση του υπερκείμενου νερού καλλιέργειας. Εντούτοις, είχαμε ακόμα μερικά προβλήματα που πρέπει να λυθούν προκειμένου να καθιερωθεί η καλλιέργεια εξαιρετικά υψηλής πυκνότητας χρησιμοποιώντας CMFU. Αυτή τη στιγμή, τα κύρια προβλήματα είναι το άφρισμα του θαλασσινού νερού της καλλιέργειας, η αύξηση στη θερμοκρασία καλλιέργειας, το στόμωμα του φίλτρου μεμβρανών και η αδυναμία των σωλήνων, των βαλβίδων και των αντλιών που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή του θαλασσινού νερού της καλλιέργειας και της σίτισης με *Chlorella*.

Παραπομπές

- Imada, M., 1983. Foods and environments on mass culture of rotifer. In: Japanese Fisheries Society (Ed.), The Rotifer *Brachionus plicatilis*—Biology and Mass Culture, Koseisha Kouseikaku, Tokyo, pp. 129–156. In Japanese.
- Kitajima, C., 1983. Actual examples of mass culture of rotifer. In: Japanese Fisheries Society (Ed.), The Rotifer *Brachionus plicatilis*—Biology and Mass Culture, Kouseisha Kouseikaku, Tokyo, pp. 102–128. In Japanese.
- Usuki, K., Yoshimura, K., Yoshimatsu, T., 1998. Changes in bacterial counts and its control in high density culture of rotifer, *Brachionus rotundiformis*. *Suisanzoshoku* 46, 193–201 (In Japanese with English summary).
- Yamasaki, S., Secor, D.H., Hirata, H., 1987. Population growth of two types of rotifer (L and S) *Brachionus plicatilis* at different dissolved oxygen levels. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53, 1303 (In Japanese with English summary).
- Yoshida, M., 1989. Classification and actual examples of mass culture of rotifer. In: Fukusho, K., Hirayama, K. (Eds.), Living Food Organism—*Brachionus plicatilis*, Kouseisha Kouseikaku, Tokyo, pp. 58–72. In Japanese.
- Yoshimura, K., 1995. Systematization of the high-density mass culture of marine rotifers. Doctoral Thesis, Kyushu University, Fukuoka. 118 pp. In Japanese with English summary.
- Yoshimura, K., Miyamoto, Y., Nakamura, T., 1992. High-density mass culture of the rotifer by feeding condensed *Chlorella*. *Saibaigiken* 21, 1–6 (In Japanese).
- Yoshimura, K., Kitajima, C., Miyamoto, Y., Kishimoto, G., 1994. Factors inhibiting growth of the rotifer *Brachionus plicatilis* in high-density cultivation by feeding condensed *Chlorella*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 60, 207–213 (In Japanese with English summary).
- Yoshimura, K., Iwata, T., Tanaka, K., Kitajima, C., Ishizaki, A., 1995. A high-density cultivation of rotifer in an acidified medium for reducing undissociated ammonia. *Nippon Suisan Gakkaishi* 61, 602–607 (In Japanese with English summary).
- Yoshimura, K., Hagiwara, A., Yoshimatsu, T., Kitajima, C., 1996a. Culture technology of marine rotifers and the implications for intensive culture of marine fish in Japan. *Mar. Freshw. Res.* 47, 217–222.
- Yoshimura, K., Ohmori, Y., Yoshimatsu, T., Tanaka, K., Ishizaki, A., 1996b. On the aeration method in high density culture of the rotifer *Brachionus rotundiformis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 62, 897–903 (In Japanese with English summary).
- Yoshimura, K., Usuki, K., Yoshimatsu, T., Tanaka, K., Ishizaki, A., 1997a. Quantitative determination and separation of wastes in high-density culture medium for marine rotifer. *Nippon Suisan Gakkaishi* 63, 912–919 (In Japanese with English summary).
- Yoshimura, K., Usuki, K., Yoshimatsu, T., Tanaka, K., Ishizaki, A., 1997b. Determination of marine rotifer biomass by centrifugation. *Suisanzoshoku* 45, 171–177 (In Japanese with English summary).
- Yoshimura, K., Usuki, K., Yoshimatsu, T., Hagiwara, A., 1997c. Effects of salinity on the packed volume of *Chlorella* and marine rotifer. *Suisanzoshoku* 45, 451–456 (In Japanese with English summary).
- Yoshimura, K., Usuki, K., Yoshimatsu, T., Tanaka, K., Ishizaki, A., Kamimura, H., 1998. Changes in the concentration of ammonia and particulate organic matter and rotifer biomass in high-density semi-continuous culture. *Suisanzoshoku* 46, 183–192 (In Japanese with English summary).

Η Χρήση του Όζοντος σε ένα Σύστημα Επανακυκλοφορίας Υψηλής Πυκνότητας Τροχοζώων

The Use of Ozone in a High Density Recirculation System for Rotifers

G. Suantika^{a,*}, P. Dhert^a, G. Rombaut^b, J. Vandenberghe^c, T. De Wolf^d, P. Sorgeloos^a

^a *Laboratory of Aquaculture and Artemia Reference Center, Ghent University, Rozier 44, B-9000 Ghent, Belgium*

^b *Laboratory of Microbial Ecology and Technology, Ghent University, Coupure L 653, B-9000 Ghent, Belgium*

^c *Laboratory for Microbiology, Ledeganckstraat 35, B-9000 Ghent, Belgium*

^d *INVE Technologies, NV, OeÛerstraat 7, B-9200 Baasrode, Belgium*

Aquaculture 201 (2001) 35-49

Περίληψη

Η χρήση του όζοντος στην επεξεργασία αποβλήτων ενός κλειστού συστήματος επανακυκλοφορίας για τροχοζώα οδήγησε σε μια σημαντική βελτίωση της παραγωγής των τροχοζώων και της ποιότητας του νερού. Έναντι μιας επεξεργασίας ελέγχου, η καλλιέργεια των τροχοζώων που εκτέθηκε στο όζον όχι μόνο υποστήριξε μια υψηλότερη παραγωγή βιομάζας τροχοζώων (16000 έναντι 8000 τροχοζώα ανά ml), αλλά επέτρεψε επίσης μια επέκταση της περιόδου καλλιέργειας για 4 ημέρες. Συγκριτικά με την επεξεργασία ελέγχου, τα επίπεδα αμμωνίου μειώθηκαν κατά 67%, τα επίπεδα νιτρικών κατά 85% και τα επίπεδα νιτρικών κατά 67%. Η υποστήριξη του όζοντος δεν είχε επιπτώσεις στο pH και τα διαλυμένα επίπεδα οξυγόνου. Εκτός από τη θετική επίδραση του όζοντος στη διαδικασία νιτροποίησης, μια καλύτερη αφαίρεση των αιωρούμενων στερεών παρατηρήθηκε. Αυτό οδήγησε σε μείωση της θολερότητας και μείωση του αριθμού των σωματιδίων στο νερό καλλιέργειας. Η χρήση του όζοντος μείωσε επίσης τον αριθμό βακτηριδίων στο νερό καλλιέργειας. Γενικά, μπορεί να υποστηριχθεί ότι η συμπλήρωση του όζοντος σε ένα κλειστό σύστημα επανακυκλοφορίας για τροχοζώα βελτιώνει αρκετά την ποιότητα του νερού, εξασφαλίζει σταθερές και πιο μεγάλες περιόδους καλλιέργειας τροχοζώων, ενώ ελέγχει και το βακτηριακό πολλαπλασιασμό.

Σκοπός

Στη μελέτη μας αξιολογήθηκε η χρήση του όζοντος ως απολυμαντικό σε ένα καλλιεργητικό σύστημα επανακυκλοφορίας τροχοζώων ως μέσο για τη βελτίωση της ποιότητας του νερού και αναστολέα πληθυσμιακών εκρήξεων των βακτηριδίων.

Υλικά και μέθοδοι

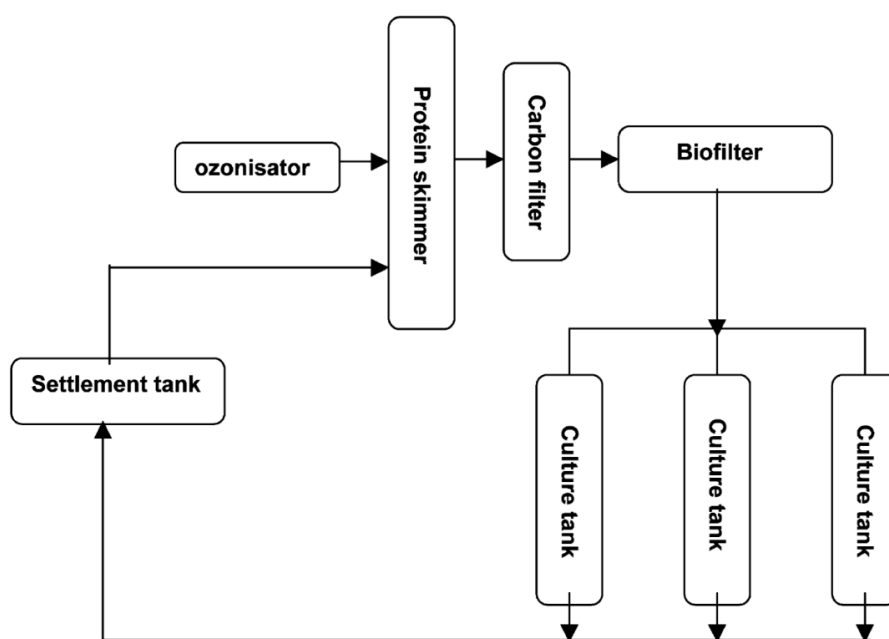
Στέλεχος τροχοζώων

Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν με το *B. plicatilis* (L-στέλεχος με μήκος κορμού $180 \pm 15 \mu\text{m}$). Πριν από την έναρξη του πειράματος, το στέλεχος αυτό διατηρήθηκε σε καλλιέργεια στο Εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών και Κέντρου Αναφοράς της *Artemia*, σύμφωνα με τη διαδικασία καλλιέργειας που περιγράφεται από τους Sorgeloos και Lavens (1996).

Πειραματικός σχεδιασμός

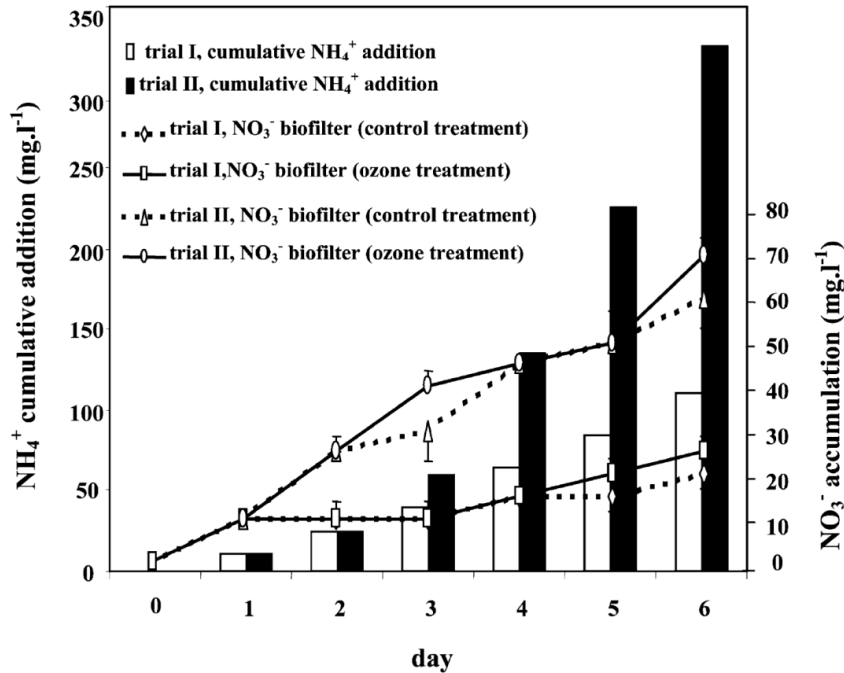
Τα τροχοζώα εμβολιάστηκαν σε μια πυκνότητα 500 άτομα ανά ml σε 100 l PVC κυλινδρικές δεξαμενές σε τρεις επαναλήψεις για κάθε επεξεργασία. Το καλλιεργούμενο νερό αποτελούνταν από αραιωμένο θαλασσινό νερό (25 ppt αλατότητας), όπου η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους $25\pm 1^\circ\text{C}$.

Το σύστημα εκτροφής των τροχοζώων συνδέθηκε με ένα κλειστό σύστημα επανακυκλοφορίας του νερού (Εικ. 1). Το νερό αποβλήτων της αποχέτευσης, καθαριζόταν από τα αιωρούμενα στερεά και τη διαλυτή πρωτεΐνη σε έναν πρωτεϊνικό εξαφριστή (protein skimmer) πριν οδηγηθεί σε βιολογικό φίλτρο. Μετά από τη βιολογική φίλτραση, το επεξεργασμένο νερό επανερχόταν στις δεξαμενές καλλιέργειας τροχοζώων με ένα ημερήσιο ρυθμό ανανέωσης του νερού κατά 500% (Suantika *et al.*, το 2000).



Εικ. 1. Σχηματική απεικόνιση του συστήματος επανακυκλοφορίας.
Fig. 1. Schematic overview of the recirculation system.

Το όζον (O_3) παραγόταν από δύο οζονιστές (Sander Ozoniser 100 και 200, Sander Aquarientechnik, Γερμανία) συνδεδεμένους στη σειρά με το πρωτεϊνικό skimmer. Τα πειράματα ελέγχου οργανώθηκαν χρησιμοποιώντας τον ίδιο εξοπλισμό εκτός από την έγχυση όζοντος στο πρωτεϊνικό skimmer. Τα βιοφίλτρα εμβολιάστηκαν με νιτροποιητικά βακτήρια (10^5 CFU ml^{-1} , ABIL Aqua, Aviceom, Βέλγιο) 6 ημέρες πριν από τον εμβολιασμό των τροχοζώων στις δεξαμενές καλλιέργειας. Κατά τη διάρκεια αυτών των 6 ημερών, η απόδοση του βιοφίλτρου ελεγχόταν με καθημερινές μετρήσεις αμμωνίου, νιτρικών και νιτρικών για να σιγουρευτεί ότι καμία διαφορά στη βιολογική δραστηριότητα δεν προκλήθηκε. Το δεύτερο πείραμα πραγματοποιήθηκε υπό τις ίδιες συνθήκες εκτός από την κατάσταση του βιοφίλτρου. Σε αυτό το πείραμα, 20 l (~30 Kg) CaCO_3 και 215 mg l^{-1} NH_4Cl προστέθηκαν στο βιοφίλτρο για τη βελτίωση της ρυθμιστικής ικανότητας του βιοφίλτρου (Εικ. 2).



Εικ. 2. Συνθήκες και επιδόσεις του βιοφίλτρου μετά από μονό εμβολιασμό (10^5 βακτήρια ml^{-1}) με νιτροποιητικά βακτήρια. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τα συσσωρευμένα επιπλέον NH_4^+ . Οι γραμμές αντιστοιχούν στο συσσωρευμένο NO_3^- .

Fig. 2. Conditioning and performance of the biofilter after a single inoculums (10^5 bacteria ml^{-1}) with nitrifying bacteria. Bars represent the cumulative NH_4^+ addition. Lines represent the NO_3^- accumulation.

Δειγματοληψία και μέτρηση

Τρία δείγματα των 500 μ ανά 1 λαμβάνονταν από τις καλλιέργειες τροχοζώων χρησιμοποιώντας μια αυτόματη μικροπιπέτα. Τα τροχοζώα σε κάθε δείγμα σκοτώνονταν με την προσθήκη τριών σταγόνων lugol και καταμετρούνταν. Κενοί και διαφανείς κορμοί που ανήκουν σε νεκρά τροχοζώα δεν συνυπολογίζονταν.

Τα αιωρούμενα οργανικά υλικά (π.χ., πλεονάζουσα τροφή κ.α.) από το νερό αποβλήτων της αποχέτευσης που παγιδεύονταν στον αφρό του πρωτεϊνικού skimmer απομακρύνονταν καθημερινά και υποβάλλονταν σε μικροσκοπική παρατήρηση. Τα μόρια οργανικών αποβλήτων μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα αιματοκυττόμετρο (Fulch-Rosenthal) κατά τη μέθοδο που περιγράφηκε από τους Sorgeloos και Lavens, 1996.

Διατροφή τροχοζώων

Η διατροφή τροχοζώων αποτελούταν από Culture Selco High, CSH (INVE, Βέλγιο), διαλυμένο σε 800 ml νερό και έντονα αναδευμένο με μπλέντερ. Το διάλυμα που περιείχε ακριβώς την καθημερινή αναλογία τροφής διατηρούταν σε δοχείο αποθήκευσης (4°C) για 24 ώρες. Στις κρύες δεξαμενές αποθήκευσης η τροφή χορηγούταν αυτόματα μια περισταλτική αντλία προς τις επιμέρους καλλιέργειες τροχοζώων ανά διάστημα 1 h (τάισμα 33 ml h^{-1} ή 800 ml διάλυμα ανά ημέρα). Τα τροχοζώα ταΐστηκαν σύμφωνα με το σταθερό σχήμα διατροφής (Suantika *et al.*, 2000):

$$CSH=0.035 D^{0.415} V,$$

όπου: CSH=το βάρος της πειραματικής τροφής (g), D=η πυκνότητα των τροχοζώων (άτομα ανά ml), V=ο όγκος του νερού καλλιέργειας.

Φυσικοχημικές παράμετροι

Το pH, NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , το ORP (μειωμένο δυναμικό οξυγόνου) και το διαλυμένο οξυγόνο (DO) του νερού υπολογίζονταν ως πρώτη καθημερινή δραστηριότητα κατά τη διάρκεια του πειράματος. Τα NH_4^+ , NO_2^- και NO_3^- υπολογίζονταν στο νερό καλλιέργειας των τροχοζώων που φιλτραριζόταν μέσω ενός φίλτρου-μμ. Οι συγκεντρώσεις των NH_4^+ , NO_2^- και NO_3^- προσδιορίζονταν χρησιμοποιώντας kit δοκιμών (Aquamerck, Γερμανία). Το ORP μετρήθηκε μετά από την εκροή του πρωτεϊνικού skimmer και πριν από το βιοφίλτρο καθώς επίσης και στη καλλιέργεια τροχοζώων με τη χρήση ενός μετρητή (Smarteste, Σιγκαπούρη). Το βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD) και το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD) μετρήθηκαν σε μια δεξαμενή καλλιέργειας τροχοζώων, στο πρωτεϊνικό skimmer, και μετά από το βιοφίλτρο την 5^η ημέρα της περιόδου καλλιέργειας με τη χρησιμοποίηση επεξεργασίας Winkler (BOD) και με μέθοδο τιτλοδότησης (COD). Η απορροφητικότητα μετρήθηκε με τη χρησιμοποίηση σπεκτοφωτόμετρου στο μήκος κύματος 600-nm.

Βακτηριακή δειγματοληψία

Δείγματα νερού (10 ml) λαμβάνονταν από την καλλιέργεια και το πρωτεϊνικό skimmer μετά από την 5^η ημέρα της καλλιέργειας των τροχοζώων. Για τις καλλιέργειες, διαδοχικές διαλύσεις προετοιμάζονταν σε αποστειρωμένο αλατούχο διάλυμα (1.5%) από τα ομογενοποιημένα δείγματα νερού. Τέσσερα διαλύματα των 100 μl τοποθετήθηκαν εις διπλούν σε θαλασσινό άγαρ MA (Difco, ΗΠΑ) και TCBS (Difco) επωασμένο στους 25°C. Οι πληθυσμοί βακτηρίων υπέστησαν επώαση για 24 και 48 ώρες.

Στατιστική ανάλυση

Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν σε τρεις επαναλήψεις και επαναλήφθηκαν τρεις φορές. Όλα τα στοιχεία επεξεργάστηκαν στατιστικά χρησιμοποιώντας ANOVA. Οι σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων ($P<0.05$) εξετάστηκαν με Duncan τεστ.

Αποτελέσματα

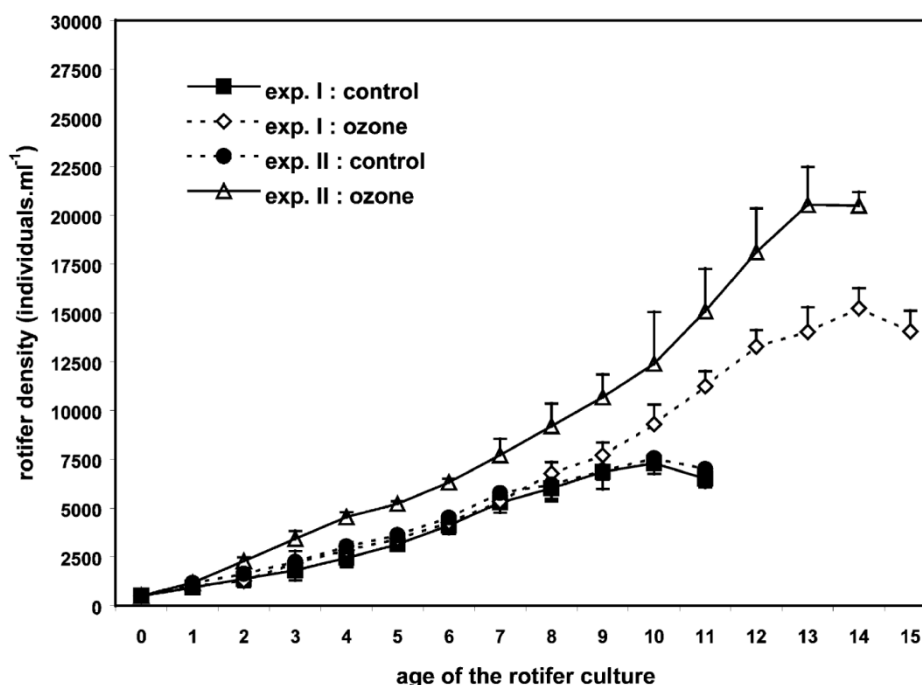
Βελτίωση του βιοφίλτρου

Η απόδοση του βιοφίλτρου κατά τη διάρκεια των έξι ημερών ρυθμιστικής περιόδου παρουσιάζεται στην Εικόνα 2. Κατά τον πρώτο κύκλο, το βιοφίλτρο ρυθμίστηκε με ημερήσια βαθμιαία αύξηση των NH_4^+ (110 mg ανά l για τη συνολική περίοδο των 6 ημερών). Καμία σημαντική διαφορά στη βιολογική δραστηριότητα δεν παρατηρήθηκε μεταξύ του βιοφίλτρου για την επεξεργασία του ελέγχου και αυτής για την επεξεργασία του όζοντος. Κατά τον δεύτερο κύκλο, η καθημερινή ποσότητα των NH_4^+ αυξήθηκε κατά τη διάρκεια της περιόδου των 6 ημερών (325 mg ανά l). Επίσης,

σε αυτό το δεύτερο κύκλο, η βιολογική δραστηριότητα του βιοφίλτρου για την επεξεργασία του ελέγχου και αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία του όζοντος δεν ήταν σημαντικά διαφορετική.

Αύξηση των τροχοζώων

Το μέσο ποσοστό αύξησης των πληθυσμών των τροχοζώων που εκτράφηκαν στο σύστημα επανακυκλοφορίας για την επεξεργασία του ελέγχου και την επεξεργασία με τη συμπλήρωση του όζοντος παρουσιάζεται στην Εικ. 3. Στους δυο κύκλους πειραμάτων, μια σημαντική αύξηση στην πυκνότητα των τροχοζώων ($P < 0.05$) παρατηρήθηκε όταν συμπληρώθηκε το όζον. Στην επεξεργασία ελέγχου, η καλλιέργεια κατέρρευσε την 11^η ημέρα περίπου, αφότου επιτεύχθηκε μια μέγιστη πυκνότητα τροχοζώων 7300 άτομα ανά ml. Η προσθήκη του όζοντος στο σύστημα επανακυκλοφορίας επέτρεψε μια επέκταση της περιόδου καλλιέργειας 4 ημερών. Στην επεξεργασία του όζοντος, μια μέγιστη πυκνότητα τροχοζώων της τάξης των 15000 άτομα ανά ml λήφθηκε την 14^η ημέρα. Καμία σημαντική διαφορά στην πυκνότητα των τροχοζώων δεν παρατηρήθηκε στο επαναλαμβανόμενο πείραμα της επεξεργασίας του ελέγχου. Για την επεξεργασία του όζοντος, εντούτοις, η μέση μέγιστη πυκνότητα των τροχοζώων ήταν σημαντικά διαφορετική (15200 άτομα ανά ml για τον πρώτο κύκλο και 20500 άτομα ανά ml για τον δεύτερο κύκλο (Πίνακας 1). Η υψηλότερη παραγωγή τροχοζώων παρατηρήθηκε στο επαναλαμβανόμενο πείραμα, όπου το βιοφίλτρο ήταν καλύτερα ρυθμισμένο με CaCO_3 και εφοδιασμένο με περισσότερα NH_4^+ .



Εικ. 3. Συγκέντρωση τροχοζώων στο σύστημα επανακυκλοφορίας στην επεξεργασία ελέγχου και όζοντος.

Fig. 3. Rotifer density obtained in the recirculation system in the control and ozone treatment.

Πίνακας 1

Μέσες τιμές και τυπική απόκλιση της πυκνότητας των τροχοζώων (άτομα ml⁻¹) που παρατηρήθηκαν στην επεξεργασία ελέγχου και όζοντος

Table 1

Mean values and S.D. of the rotifer density (individuals ml⁻¹) obtained in the control and ozone treatment

Day	Experiment I		Experiment II	
	Control	Ozone	Control	Ozone
0	500 ± 0 ^a	500 ± 0 ^a	500 ± 0 ^a	500 ± 0 ^a
1	933 ± 286 ^a	997 ± 210 ^a	1158 ± 138 ^a	1165 ± 114 ^a
2	1374 ± 436 ^a	1271 ± 213 ^a	1632 ± 97 ^{ab}	2279 ± 201 ^b
3	1808 ± 516 ^a	2177 ± 614 ^a	2238 ± 291 ^{ab}	3421 ± 401 ^b
4	2441 ± 459 ^a	2836 ± 427 ^a	3022 ± 368 ^a	4542 ± 257 ^b
5	3135 ± 253 ^a	3412 ± 165 ^a	3611 ± 508 ^a	5220 ± 134 ^b
6	4115 ± 138 ^a	4244 ± 145 ^a	4509 ± 831 ^a	6319 ± 187 ^b
7	5275 ± 338 ^a	5338 ± 409 ^a	5784 ± 1015 ^a	7713 ± 828 ^b
8	6017 ± 663 ^a	6771 ± 592 ^a	6212 ± 735 ^a	9197 ± 1164 ^b
9	6862 ± 887 ^a	7704 ± 654 ^{ab}	6911 ± 443 ^a	10681 ± 1166 ^b
10	7300 ± 544 ^a	9306 ± 989 ^b	7565 ± 371 ^a	12391 ± 2656 ^c
11		11 239 ± 777 ^a		15086 ± 2173 ^b
12		13 276 ± 850 ^a		18 119 ± 2246 ^b
13		14 028 ± 1261 ^a		20 544 ± 1937 ^b

Means within the same row and followed by the same letter are not significantly different ($P > 0.05$).

Φυσικο-χημικές παράμετροι

Οι φυσικο-χημικές παράμετροι δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των επαναλαμβανόμενων δοκιμών (εκτός από τα νιτρικά) και έχουν ομαδοποιηθεί ως μέσες τιμές στην Εικ. 4.

Στην αρχή της περιόδου καλλιέργειας, η επεξεργασία του όζοντος και ελέγχου είχε ένα επίπεδο pH 8.0. Από την 1^η ημέρα και μετά, το επίπεδο pH μειώθηκε αργά χωρίς οποιαδήποτε σημαντική διαφορά μεταξύ των επεξεργασιών των επαναλαμβανόμενων πειραμάτων (Εικ. 4A).

Το χαμηλότερο και σταθερότερο επίπεδο αμμωνίου παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειας στα συστήματα που εκτέθηκαν στο όζον στο οποίο τα επίπεδα NH₄⁺ κυμάνθηκε από 0.3 έως 0.6 mg ανά l (Εικ. 4B). Στο πείραμα ελέγχου, τα επίπεδα NH₄⁺ ήταν διπλάσια και τόσο υψηλά όσο και στην επεξεργασία όζοντος όπου κυμάνθηκαν από 0.7 έως 1.2 mg ανά l.

Χαμηλά επίπεδα NO₂⁻ λήφθηκαν στην αρχή της περιόδου καλλιέργειας, όπου και στις δύο επεξεργασίες από την ημέρα 0 στην ημέρα 4 το επίπεδο αυτό παρέμεινε σταθερό και χαμηλό (NO₂⁻ < 2.5 mg ανά l) στο σύστημα που εκτίθεται στο O₃ κατά τη διάρκεια της πλήρους περιόδου της καλλιέργειας. Από την άλλη, το επίπεδο αυτό αυξήθηκε δραστικά από την 5^η ημέρα και μετά για τον έλεγχο και την επεξεργασία. Τα χαμηλότερα επίπεδα NO₂⁻ λήφθηκαν κατά τη διάρκεια του επαναλαμβανόμενου πειράματος με την καλύτερη βελτίωση του βιοφίλτρου.

Χαμηλά επίπεδα NO₃⁻ παρατηρήθηκαν στην αρχή της περιόδου από την καλλιέργεια της ημέρας 0 στην 5^η ημέρα. Από την 6^η ημέρα και μετά, το επίπεδο αυτό αύξησε δραστικά στον έλεγχο και την επεξεργασία. Μία πιο αργή και σταθερή αύξηση μετρήθηκε στο σύστημα που εκτέθηκε στο όζον έναντι της επεξεργασίας ελέγχου

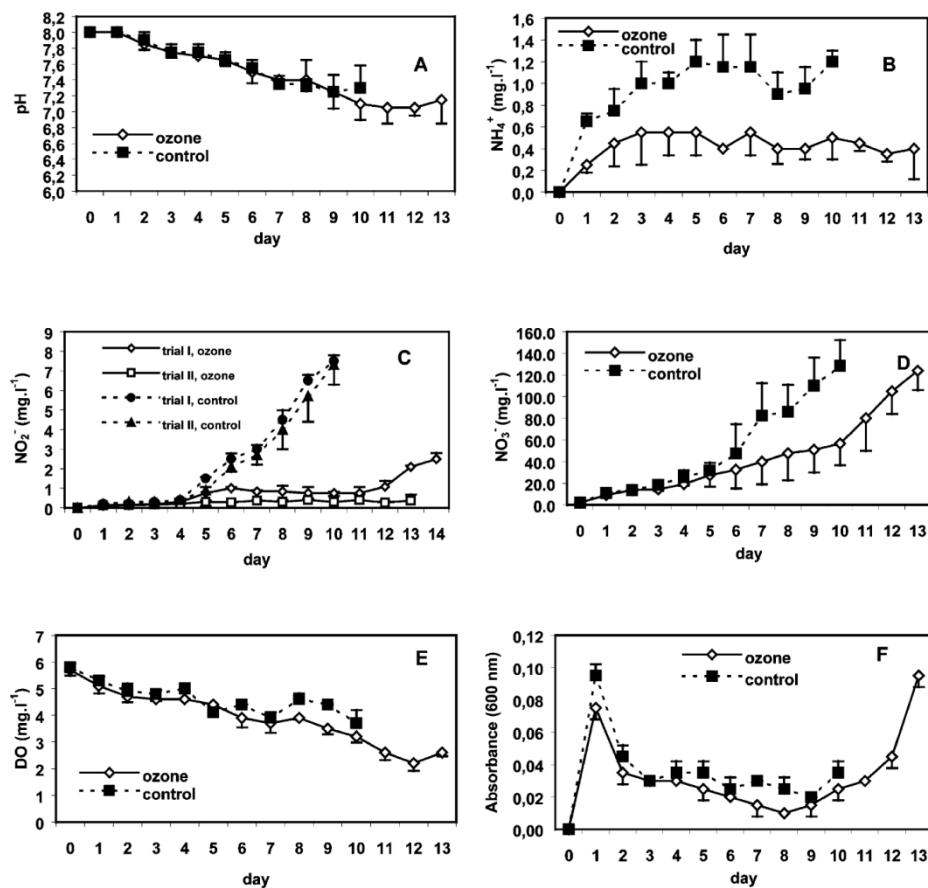
κατά τη διάρκεια των πρώτων 10 ημερών (Εικ. 4D).

Κατά τη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειας, το διαλυμένο οξυγόνο μειώθηκε ελαφρώς από 5.7 έως 2.6 mg ανά l μέσα σε 13 ημέρες και 5.8 έως 3.7 mg ανά l μέσα σε 10 ημέρες για το σύστημα που εκτίθεται στο όζον και χωρίς τη συμπλήρωση του όζοντος, αντίστοιχα (Εικ. 4E).

Ένας χαμηλότερος χρωματισμός και μια θολούρα νερού παρατηρήθηκαν στην επεξεργασία όζοντος και απεικονίζονται στους αριθμούς που λήφθηκαν από την ανάλυση των δειγματοληπιών νερού με το σπεκτοφωτόμετρο (Εικ. 4F).

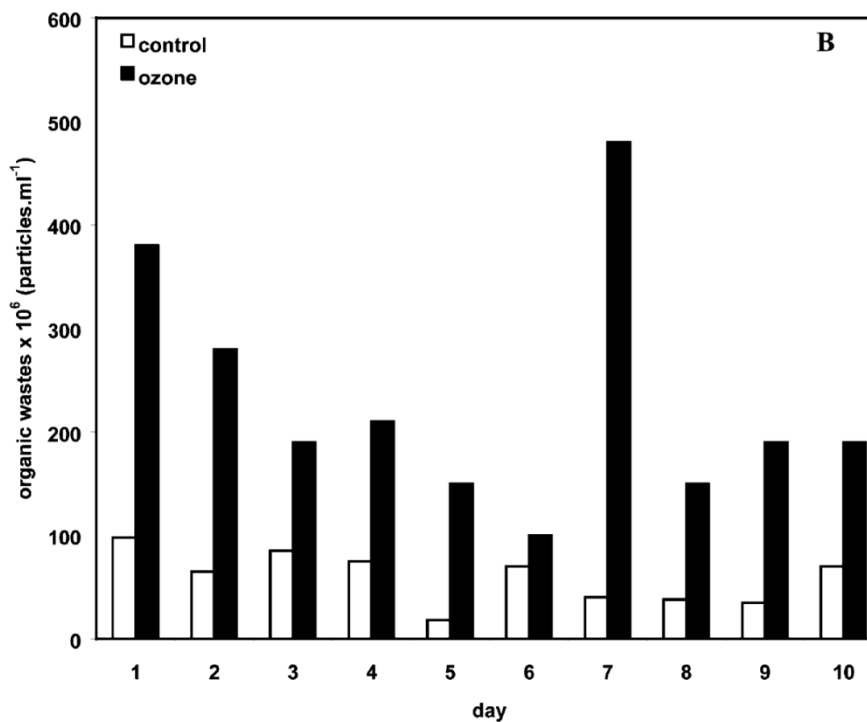
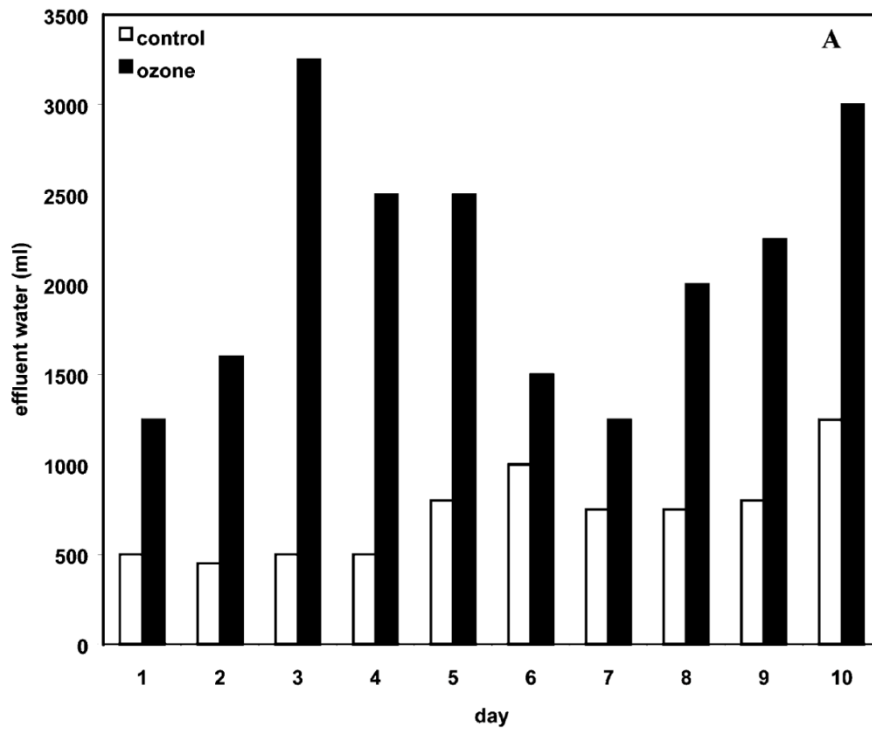
Στο σύστημα που εκτέθηκε στο όζον, το πρωτεϊνικό skimmer μείωσε το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο COD από 231 mg ανά l στο νερό καλλιέργειας σε 91 mg ανά l και μείωσε το βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνο BOD από 25 έως 6 mg ανά l. Στην επεξεργασία ελέγχου, το πρωτεϊνικό Skimmer μείωσε το COD από 216 mg ανά l στο νερό καλλιέργειας σε 136 mg ανά l και μείωσε το BOD από 15 έως 10 mg ανά l.

Στην επεξεργασία όζοντος, οι μετρήσεις ORP κυμάνθηκαν από 310 έως 360 mV στο πρωτεϊνικό skimmer και 165-225 mV στο νερό καλλιέργειας (Εικ. 5).



Εικ. 4. Φυσικοχημικές παράμετροι που μετρήθηκαν στο σύστημα επανακυκλοφορίας στην επεξεργασία ελέγχου και όζοντος. Τα δεδομένα που δεν φέρουν σημαντικές διαφορές στις δοκιμές I και II ομαδοποιήθηκαν και παρουσιάζονται ως μέσες τιμές.

Fig. 4. The physico-chemical parameters measured in the recirculation system in the control and ozone treatment. Data points those were not significantly different in trials I and II were grouped and represented as average value.



Εικ. 5. Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός της ικανότητας εξαφρισμού του πρωτεϊνικού εξαφριστή που εκτέθηκε στην επεξεργασία ελέγχου και όζοντος. (Α) Συλλεγμένα λύματα από τον πρωτεϊνικό εξαφριστή. (Β) Οργανικά μόρια από τα λύματα.

Fig. 5. Quantitative and qualitative evaluation of the skimming capacity of the protein skimmer exposed to a control and ozone treatment. (A) Effluent water collected from the protein skimmer. (B) Organic waste particles in the effluent water.

Η ικανότητα εξαφρισμού και η σύσταση των συλλεχθέντων αιωρούμενων στερεών από τον πρωτεϊνικό εξαφριστή (skimmer) στο σύστημα επανακυκλοφορίας για την επεξεργασία ελέγχου και την επεξεργασία με τη συμπλήρωση του όζοντος παρουσιάζονται στην Εικ. 5. Στην επεξεργασία ελέγχου, 730 ml ανά ημέρα κατά μέσο όρο συλλέγονταν από το πρωτεϊνικό skimmer. Τρεις φορές μεγαλύτερο ποσό νερού αποβλήτων της αποχέτευσης εισπράχθηκε από το πρωτεϊνικό skimmer όταν το όζον συμπληρώθηκε (Εικ. 5Α). Κατά τη διάρκεια των δέκα ημερών της περιόδου καλλιέργειας, καμία διαφορά στις απώλειες τροφών δεν παρατηρήθηκε μεταξύ του ελέγχου και επεξεργασίας του όζοντος (1.1×10^{11} και 3.2×10^{11} μόρια, αντίστοιχα). Τα συνολικά μόρια οργανικών αποβλήτων (4.1×10^{11} μόρια που συλλέχθηκαν από την επεξεργασία του ελέγχου και 5.7×10^{12} μόρια που συλλέχθηκαν από την επεξεργασία του όζοντος), εντούτοις, είχαν σημαντική διαφορά (Εικ. 5Β).

Μετρήσεις βακτηρίων

Οι πληθυσμοί βακτηρίων μετρήθηκαν 48 ώρες μετά από την επώαση στα τριβλία. Η χρήση του όζοντος στο σύστημα επανακυκλοφορίας μείωσε το ποσό βακτηριδίων στο νερό της καλλιέργειας (Πίνακα 2). Στον πρώτο κύκλο, το ποσό βακτηριδίων στο νερό καλλιέργειας για το σύστημα που εκτέθηκε στο όζον ήταν 2.7×10^4 και 10^3 CFU ανά ml στο θαλασσινό άγαρ και στο TCBS, αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί βακτηρίων που μετρήθηκαν στο πρωτεϊνικό skimmer μειώθηκαν σημαντικά λιγότερο από 30 CFU ανά ml στο θαλασσινό άγαρ και στο TCBS. Για την επεξεργασία ελέγχου, καμία μείωση στους πληθυσμούς βακτηρίων δεν παρατηρήθηκε. Το νερό καλλιέργειας περιείχε 9.0×10^4 και 1.8×10^3 CFU ανά ml στο θαλασσινό άγαρ και το TCBS, αντίστοιχα, και 10^5 και 5.4×10^2 CFU ανά ml στο πρωτεϊνικό skimmer.

Στον δεύτερο κύκλο, οι πληθυσμοί βακτηρίων στο θαλασσινό άγαρ μειώθηκαν από 2.7×10^7 έως 8.0×10^4 CFU ανά ml στο πρωτεϊνικό skimmer και από 2.0×10^4 έως 3.6×10^3 CFU ανά ml στο TCBS. Για την καλλιέργεια ελέγχου, το νερό περιείχε 3.0×10^7 και 1.7×10^5 CFU ανά ml στο θαλασσινό άγαρ και στο TCBS, αντίστοιχα, και 1.6×10^5 CFU ανά ml (θαλασσινό άγαρ) και 3.2×10^5 CFU ανά ml (TCBS) στο πρωτεϊνικό skimmer.

Πίνακας 2

Μετρήσεις βακτηρίων που παρατηρήθηκαν στο νερό καλλιέργειας και στον πρωτεϊνικό εξαφριστή στην επεξεργασία ελέγχου και όζοντος

Table 2

Bacterial counts obtain in the culture water and the protein skimmer for the control and ozone treatment

	Trial I		Trial II	
	Control	Ozone	Control	Ozone
<i>Marine agar</i>				
Culture	9.0×10^{4a}	2.7×10^{4b}	3.7×10^{7c}	2.7×10^{7c}
Protein skimmer	1.0×10^{5a}	$< 30^b$	1.6×10^{5c}	8.0×10^{4d}
<i>TCBS</i>				
Culture	1.8×10^{3a}	1.1×10^{3a}	1.7×10^{5b}	2.0×10^{4c}
Protein skimmer	5.4×10^{2a}	$< 30^b$	3.2×10^{5c}	3.6×10^{3d}

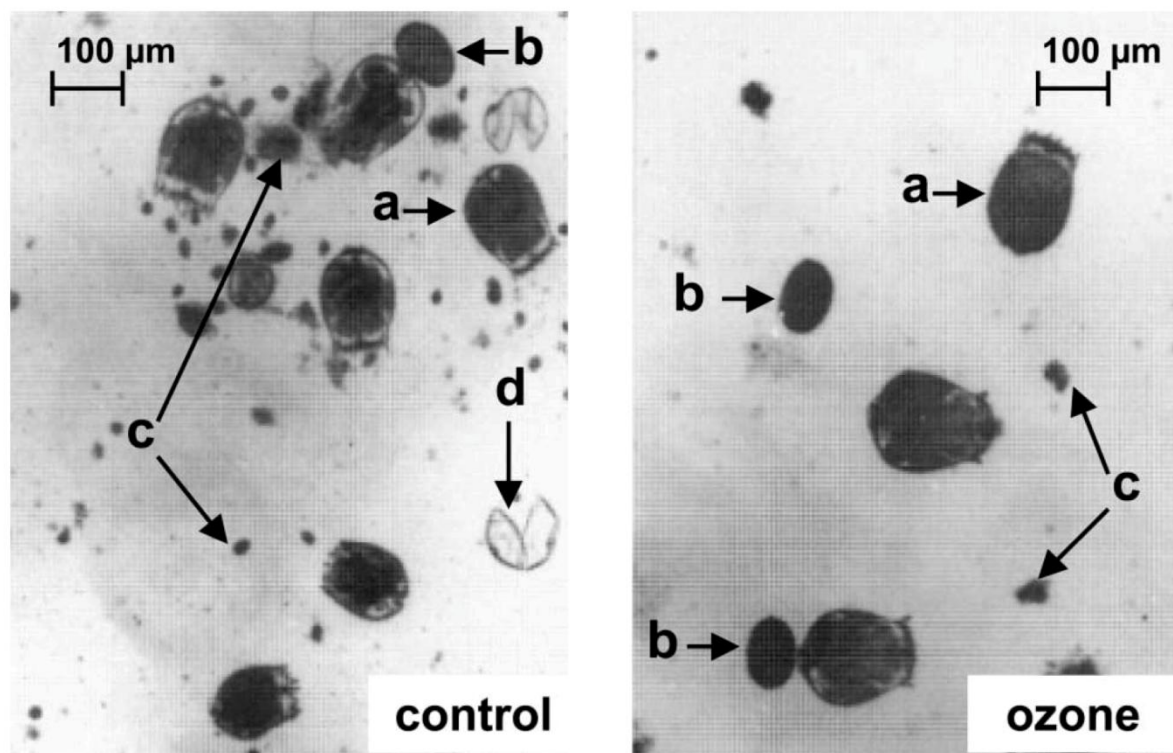
Means within the same row and followed by the same letter are not significantly different ($P > 0.05$).

Συζήτηση

Ιδιαίτερα σημαντικές διαφορές στην αύξηση των καλλιεργειών των τροχοζώων λήφθηκαν με την χρήση του όζοντος στο σύστημα επανακυκλοφορίας. Η εφαρμογή του όζοντος οδήγησε στις κατά 1.3 φορές πυκνότερες καλλιέργειες τροχοζώων σε μια περίοδο εκτροφής δέκα ημερών. Επέτρεψε επίσης μια επέκταση της περιόδου καλλιέργειας για 4 ημέρες με μέσο μόνιμο πληθυσμό της τάξης των 1.6 δισεκατομμύρια τροχόζωα ανά 100 l (δοκιμή ή κύκλος I). Περαιτέρω συντονισμός του συστήματος από την άποψη της βελτίωσης του βιοφίλτρου οδήγησε σε μια επιπλέον αύξηση της παραγωγής των τροχοζώων σχεδόν κατά 40% (δοκιμή II).

Η προσθήκη του όζοντος στο σύστημα επανακυκλοφορίας οδήγησε σε μια γενική βελτίωση στην ποιότητα του νερού μειώνοντας τα επίπεδα νιτρικών κατά 85% και τα επίπεδα νιτρικών κατά 67%. Η μείωση των νιτρικών στην καλλιέργεια που συμπληρώνεται με το όζον μπορεί να εξηγηθεί από τις οξειδωτικές ιδιότητες του όζοντος που οξειδώνει γρήγορα τα νιτρώδη σε νιτρικά (Rosenthal and Krüner, το 1985). Η προσθήκη του όζοντος στο σύστημα επανακυκλοφορίας μπορεί έτσι να χρησιμοποιηθεί από τη μια πλευρά για να προστατεύσει τα τροχόζωα από τη τοξική συσσώρευση των νιτρικών και αφ' ετέρου, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να μειώσει το μέγεθος του βιοφίλτρου. Ειδικά στο σύστημα επανακυκλοφορίας, όπου η μετατροπή των νιτρικών σε νιτρικά είναι ο περιοριστικός παράγοντας, το όζον μπορεί να εφαρμοστεί αποτελεσματικά. Αν και πολύ λίγες σημαντικές διαφορές λήφθηκαν στις φυσικοχημικές παραμέτρους, μεταξύ της πρώτης και δεύτερης δοκιμής καλλιέργειας, χαμηλότερες και ειδικά πιο σταθερότερες παράμετροι νερού βρίσκονται στην προέλευση της καλύτερης απόδοσης τροχοζώων που παρατηρήθηκε στο δεύτερο κύκλο (Εικ. 4). Είναι πολύ πιθανό ότι εκτός από τα νιτρώδη, η συσσώρευση άλλων παραμέτρων, που δεν είναι σημαντικά διαφορετικές από μόνες τους, μπορεί να συμβάλει σε μια υψηλότερη τοξικότητα όταν αθροίζονται όλοι οι παράγοντες μαζί. Είναι δύσκολο να υπολογιστεί η επίδραση των υψηλότερων συγκεντρώσεων των νιτρικών με τα άλλα συστατικά στο κύκλο ζωής των τροχοζώων, αλλά η επίδραση στο ρυθμό αναπαραγωγής και το σχηματισμό των αυγών παρατηρήθηκε ξεκάθαρα. Επίσης, πρέπει να παρατηρηθεί ότι η σύγκριση μεταξύ των επαναλαμβανόμενων πειραμάτων πρέπει να αναλυθεί με προσοχή δεδομένου ότι οι μικρές διαφορές στην ποιότητα των τροχοζώων που χρησιμοποιήθηκαν στον εμβολιασμό θα οδηγήσουν στις διαφορετικές παρατηρήσεις. Εφ' όσον η ποιότητα των τροχοζώων δεν μπορεί να μετρηθεί, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε ότι τα καλύτερα αποτελέσματα που επιτυγχάνονται στην επαναλαμβανόμενη δοκιμή οφείλονται σε μια καλύτερη αρχική ποιότητα τροχοζώων ή ακόμα και στις διαφορές στην αρχική βακτηριακή σύνθεση (Rombaut et al., 1999). Εκτός από τον οξειδωτικό ρόλο του όζοντος στη διαδικασία της νιτροποίησης, μια θετική επίδραση παρατηρήθηκε επίσης στην πήξη-κροκιδωση των κολλοειδών ουσιών (Farvardin and Collins, 1989). Αυτό οδηγεί σε ένα νερό αποβλήτων της αποχέτευσης με τα καλύτερα χαρακτηριστικά από την άποψη της ικανότητας του ξαφρίσματος. Στο πείραμά μας, αυτό μετρήθηκε ως μια μειωμένη θολούρα και μια μείωση του αριθμού μορίων στο νερό της καλλιέργειας (Εικ. 5 και 6). Τα αποτελέσματα του καλύτερου ξαφρίσματος και της οξείδωσης που λαμβάνονται στο σύστημα που συμπληρώνεται με το όζον μπορεί να διευκρινιστεί στην Εικ. 6. Το νερό στη δεξαμενή εκτροφής των τροχοζώων που εκτίθεται στην επεξεργασία όζοντος έχει τα λιγότερα αιωρούμενα και μόρια έναντι της επεξεργασίας ελέγχου. Αυτό εξηγείται από τις επαναλαμβανόμενες διελεύσεις των μορίων στο πρωτεϊνικό skimmer όπου οξειδώνονται μερικώς από τη μείωση του όζοντος. Μικρότερα και λιγότερα αιωρούμενα στο σύστημα εκτροφής όχι μόνο οδηγεί στις καλύτερες συνθήκες

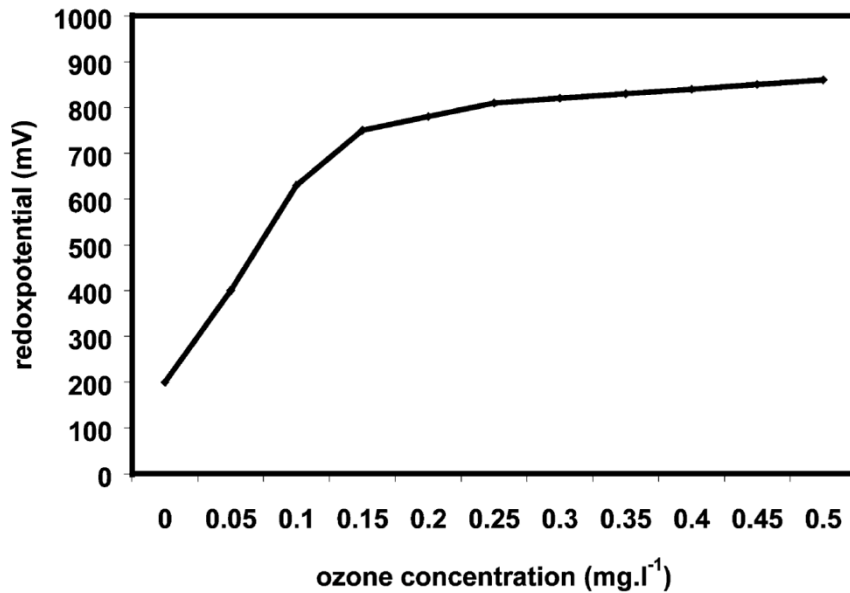
εκτροφής, αλλά μειώνει αρκετά τον κίνδυνο για την απόφραξη των φίλτρων στη δεξαμενή εκτροφής.



Εικ. 6. Νερό καλλιέργειας από υψηλής συγκέντρωσης καλλιέργεια τροχοζώων εκτεθειμένα στην επεξεργασία ελέγχου και όζοντος όπου περιλαμβάνουν τροχοζώα (a), αυγά τροχοζώων (b), υπολείμματα (c) και κενούς κορμούς (d).

Fig. 6. Culture water of the high density rotifer culture exposed to a control and ozone treatment containing rotifers (a), rotifer eggs (b), froccules/debris (c) and empty lorica (d).

Οι ιδιότητες απολύμανσης του όζοντος το κάνουν επίσης ιδανικό για τη μείωση των ετερότροφων βακτηριδίων στο πρωτεϊνικό skimmer. Σε αυτό το πείραμα, η προσθήκη του όζοντος μείωσε τους αριθμούς των βακτηριδίων σε $3 \log_{10}$ μονάδες. Μια μείωση του αριθμού των βακτηρίων μπορεί μόνο να έχει τα πλεονεκτήματα από την άποψη της υγιεινής ποιότητας των τροχοζώων, εντούτοις, προσοχή πρέπει επίσης να ληφθεί στις αλλαγές των βακτηριακών πληθυσμών που επιβάλλονται από την απολύμανση. Στο πείραμά μας, καμία σημαντική μείωση των βακτηριδίων δεν παρατηρήθηκε στο νερό καλλιέργειας, που μπορεί να εξηγηθεί από το χρόνο διατήρησης του νερού (± 5 ώρες) που είναι μακρύτερο από το χρόνο διπλασιασμού των βακτηριδίων. Εντούτοις, η συνεχής έκθεση του όζοντος θα μπορούσε να οδηγήσει το μικροβιακό πληθυσμό κατά τέτοιο τρόπο ώστε η αλλαγή στη μικροβιακή κοινότητα να είναι πολύ λιγότερο σημαντική απ' ό,τι στο σύστημα παρτίδας (Rombaut *et al.*, το 2000). Η περαιτέρω αύξηση της συμπλήρωσης του όζοντος μπορεί να εφαρμοστεί προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η μείωση των βακτηριδίων στις καλλιέργειες τροχοζώων εντούτοις, αυτή η πτυχή πρέπει να ληφθεί υπόψη στον καθορισμό μιας βέλτιστης δόσης OPD (pre-ozonation) στο σύστημα, χωρίς οποιαδήποτε καταστρεπτική επίδραση στην κοινότητα της μικροχλωρίδας του βιοφίλτρου.



Εικ. 7. Σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων redoxpotential και όζοντος (εγκεκριμένα από Sander Aquarientechnik).
 Fig. 7. Relation between redoxpotential and ozone concentration (adopted from Sander Aquarientechnik).

Η προσθήκη του όζοντος στο σύστημα επανακυκλοφορίας δεν είχε καμία επίδραση στο pH ή στη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου. Τα επίπεδα pH δεν έφθασαν ποτέ κάτω από το 7.0 κατά τη διάρκεια του πειράματος και στις δύο επεξεργασίες. Αυτό το σταθερό pH είναι πολύ σημαντικό, όχι μόνο για τα τροχόζωα αλλά και για τη βέλτιστη διαδικασία νιτροποίησης στο βιοφίλτρο.

Είναι εκπληκτικό ότι, αν και το O₃ έχει διάφορα πλεονεκτήματα, δεν χρησιμοποιείται ευρύτερα. Ένας από τους κύριους λόγους που το όζον δεν χρησιμοποιείται ευρέως στις υδατοκαλλιέργειες μπορεί να εξηγηθεί από την τοξικότητά του στους υδρόβιους οργανισμούς (Bullock *et al.*, 1997). Επιπλέον, η έλλειψη φτηνών και αξιόπιστων οργάνων και χημικών δοκιμών για την απευθείας ανίχνευση του όζοντος στο νερό εξηγεί πιθανώς την απροθυμία διάφορων καλλιεργητών να την εφαρμόσουν. Σήμερα, εντούτοις, η έμμεση μέτρηση του κατάλοιπου όζοντος με τη βοήθεια του μέσου όρου ORP είναι πολύ αξιόπιστη (Εικ 7). Με βάση αυτήν την τυποποιημένη καμπύλη, η συγκέντρωση του όζοντος που λήφθηκε στο πρωτεϊνικό skimmer και στην καλλιέργεια ήταν περίπου 0.05 και 0.02 mg ανά l. Αυτά τα επίπεδα είναι ασφαλή για χρήση στα ενυδρεία και μη τοξικά για τα τροχόζωα (Hemdal, 1992). Ένα ασφαλές ORP στο νερό καλλιέργειας, για το γλυκό νερό εμφανίζεται να είναι μεταξύ 300 και 350 mV (Bullock *et al.*, 1997). Εντούτοις, υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες για την ανοχή των τροχόζωων στο όζον και τα υπόλοιπα οξειδωτικά που συνδέονται με τη χρήση του όζοντος στο νερό της θάλασσας.

Συνοψίζοντας, είναι κατανοητό ότι η χρήση του O₃ σε ένα κλειστό σύστημα επανακυκλοφορίας καλλιέργειας τροχόζωων, βελτιώνει σημαντικά την ποιότητα του νερού, και προσφέρει σταθερότερη και μακρύτερη καλλιεργητική περίοδο. Από τη σκοπιά των μικροβίων, μείωση του αριθμού των βακτηριδίων παρατηρείται.

Παραπομπές

- Abu-Rezq, T., Al-Shimmari, J., Dias, P., 1997. Live food production using batch culture and chemostat system in Kuwait. *Hydrobiologia* 358, 173–178.
- Bullock, G.L., Summerfelt, S.T., Noble, A.C., Weber, A.L., Durant, M.D., Hankins, J.A., 1997. Ozonation of a recirculating rainbow trout culture system: I. Effects on bacterial gill disease and heterotrophic bacteria. *Aquaculture* 158, 43–55.
- Cryer, E., 1992. Recent application of ozone in freshwater fish hatchery systems. In: Blogoslawski, W.J. ŽEd., Proceeding of the 3rd International Symposium on the Use of Ozone in Aquatic Systems, Norwalk, CT. International Ozone Association, pp. 134–154.
- Davis, D.A., Arnold, C.A., 1997. Tolerance of the rotifer *Brachionus plicatilis* to ozone and total oxidative residuals. *Ozone: Sci. Eng.* 19, 457–469.
- Farvardin, M.R., Collins, A.G., 1989. Preozonation as an aid in the coagulation of humic substances—optimum preozonation dose. *Water. Res.* 23, 307–316.
- Fu, Y., Hada, H., Yamashita, T., Yoshida, Y., Hino, A., 1997. Development of continuous culture system for stable mass production of the marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia* 358, 145–151.
- Gatesoupe, F.J., 1989. Further advances in the nutritional and antibacterial treatments of rotifers as food for turbot larvae, *Scophthalmus maximus* L. In: De Pauw, N., Ackerfors, H., Wilkins, N. ŽEds., *Aquaculture — A Biotechnology in Progress*. Eu. Aqua. Soc. vol. 2, pp. 721–730.
- Hemdal, J.F., 1992. Reduction of ozone-oxidants in synthetic seawater by use of sodium thiosulfate. *Prog. Fish-Cult.* 54, 54–56.
- Munro, P.D., Birkbeck, T.H., Barbour, A., 1993. Influence of rate of bacterial colonization of the gut of turbot larvae on larval survival. In: Reinertsen, H., Dahle, L.A., Jorgensen, L., Tvinnereim, K. ŽEds., *Fish Farming Technology*. Balkema, Rotterdam, pp. 85–92.
- Munro, P.D., Barbour, A., Birkbeck, T.H., 1994. Comparison of the gut bacterial flora of starting feeding larval turbot reared under different conditions. *J. Food Prot.* 40, 288.
- Øie, G., Makridis, P., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1997. Protein and carbon utilization of rotifers Ž*Brachionus plicatilis*. in first feeding of turbot larvae Ž*Scophthalmus maximus* L... *Aquaculture* 153, 103–122.
- Owsley, D.E., 1991. Ozone for disinfecting hatchery rearing water. In: Colt, J., White, R.J. ŽEds., *Fisheries Bioengineering Symposium*. Americ. Fish. Soc, Bethesda, MD, pp. 417–420.
- Rombaut, G., Dhert, P., Vandenbergh, J., Verschuere, L., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 1999. Selection of bacteria enhancing the growth rate of axenically hatched rotifers Ž*Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 176, 195–207.
- Rombaut, G., Suantika, G., Boon, N., Maertens, S., Dhert, P., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Monitoring of the evolving diversity of the microbial community present in rotifer cultures. *Aquaculture*, submitted for publication.
- Rosenthal, H., Krüner, G., 1985. Treatment efficiency of an improved ozonation unit applied to fish culture situations. *Ozone: Sci. Eng.* 7, 179–190.
- Snell, T.W., Childress, M.J., Boyer, E.M., Hoff, F.H., 1987. Assessing the status of rotifer mass culture. *J. World Aquacult. Soc.* 18, 270–277.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. Fisheries Technical Paper, vol. 361, Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome, pp. 9–100.
- Suantika, G., Dhert, P., Nurhudah, M., Sorgeloos, P., 2000. High density production of the rotifer *Brachionus plicatilis* in a recirculation system: consideration of water quality, zootechnical and nutritional aspects. *Aquacult. Eng.* 21, 201–214.
- Summerfelt, S.T., Hankins, J.A., Weber, A.L., Durant, M.D., 1997. Ozonation of a recirculating rainbow trout culture system: II. Effects on microscreen filtration and water quality. *Aquaculture* 158, 57–67.
- Walz, N., Hintze, T., Rusche, R., 1997. Algae and rotifer turbidostat: studies on stability of live feed cultures. *Hydrobiologia* 358, 127–132.
- Yoshimura, K., Kitajima, C., Miyamoto, Y., Kishimoto, G., 1994. Factors inhibiting growth of the rotifer *Brachionus plicatilis* in high density cultivation by feeding condensed chlorella. *Nippon Suisan Gakkaishi* 60, 207–213.
- Yoshimura, K., Usuki, K., Yoshimatsu, T., Kitajima, C., Hagiwara, A., 1997. Recent development of a high density mass culture system for the rotifer *Brachionus rotundiformis* tshugunoff. *Hydrobiologia* 358, 139–144.

Υψηλής Πυκνότητας Παραγωγή του Τροχοζώου *Brachionus plicatilis* σε ένα Σύστημα Επανακυκλοφορίας: Μελέτη της Ποιότητας του Νερού, Ζωοτεχνικές και Θρεπτικές Πτυχές

High-density Production of the Rotifer *Brachionus plicatilis* in a Recirculation System: Consideration of Water Quality, Zootechnical and Nutritional Aspects

G. Suantika *, P. Dhert, M. Nurhudah, P. Sorgeloos
*Laboratory of Aquaculture and Artemia Reference Center, University of Ghent, Rozier 44,
B-9000 Ghent, Belgium*

Aquacultural Engineering 21 (2000) 201-214

Περίληψη

Τα τροχοζώα εκτράφηκαν με την τεχνητή διατροφή culture Selco στην παρτίδα και τις συνθήκες επανακυκλοφορίας σε διαφορετικές τιμές ανανεώσεων νερού. Οι διαφορετικές συνθήκες εκτροφής, επέφεραν σημαντικές αλλαγές στην ποιότητα των υδάτων, επηρεάζοντας την αύξηση των τροχοζώων και την κατανάλωση τροφής. Σε μια ημερήσια ανανέωση νερού κατά 100%, δεν σημειώθηκε καμία θετική επίδραση στην αύξηση των τροχοζώων σε σχέση με το σύστημα εκτροφής της παρτίδα, αλλά η περίοδος καλλιέργειας των τροχοζώων θα μπορούσε να παραταθεί κατά μια εβδομάδα. Με την αύξηση της ημερήσιας ανανέωσης του νερού από 100 σε 300% η μέγιστη συγκέντρωση των τροχοζώων θα μπορούσε να είναι σημαντικά ($P < 0.05$) μεγαλύτερη από 1800 έως 2500 άτομα ανά ml. Στο υψηλότερο ποσοστό επανακυκλοφορίας (ημερήσια ανανέωση του νερού 500%) η υψηλότερη παραγωγή τροχοζώων (2800 άτομα ανά ml σε 11 ημέρες) παρατηρήθηκε μετά την προσαρμογή στο σχήμα σίτισης. Αυτή η προσαρμογή ήταν αναγκαία για την αντιστάθμιση των απωλειών των τροφών στο σύστημα επανακυκλοφορία. Η χρήση ενός τροποποιημένου culture Selco (CSH) θα μπορούσε να βελτιώσει περαιτέρω την απόδοση των τροχοζώων. Χρησιμοποιώντας αυτήν την πειραματική δίαιτα, πυκνότητα 8000 ατόμων ανά ml θα μπορούσε να επιτευχθεί σε 8 ημέρες χωρίς έκπλυση και ανανέωση των αποθεμάτων κατά την περίοδο παραγωγής. Όταν οι πληθυσμοί τροχοζώων βρίσκονταν κάτω από τη μέγιστη πυκνότητά τους από την ημέρα της συγκομιδής η περίοδος της καλλιέργειας θα μπορούσε να επεκταθεί σε περισσότερο από ένα μήνα. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, οι καλλιέργειες δεν υπόκεινται σε τυχόν ανανεώσεις νερού ή εμπλουτισμό, εκτός από την ανανέωση του νερού για την αντικατάσταση του νερού από την καθημερινή συγκομιδή των τροχοζώων (20% του μόνιμου πληθυσμού). Σε γενικές γραμμές αποτελεί κοινή διαπίστωση ότι η χρήση ενός συστήματος επανακυκλοφορίας συντελεί στη μείωση της εργασίας και του κόστους συντήρησης με παράλληλη εξασφάλιση σταθερών φυσικοχημικών συνθηκών εκτροφής, συμβάλλοντας σε πιο αξιόπιστες και υγιείς καλλιέργειες τροχοζώων.

Σκοπός

Πρόκληση της παρούσας μελέτης αποτέλεσε ο σχεδιασμός μιας τεχνικής υψηλών συγκεντρώσεων τροχοζώων με τη χρήση μιας τεχνητής τροφής αντικαθιστώντας τα θαλάσσια φύκη. Για το σκοπό αυτό ένα κατάλληλο σύστημα επανακυκλοφορίας σχεδιάστηκε για τη διατήρηση βέλτιστης ποιότητας νερού κατά τη διάρκεια της

εκτροφής υποστηρίζοντας τη μείωση των χειρισμών και του στρες στον πληθυσμό των τροχοζώων.

Υλικά και μέθοδοι

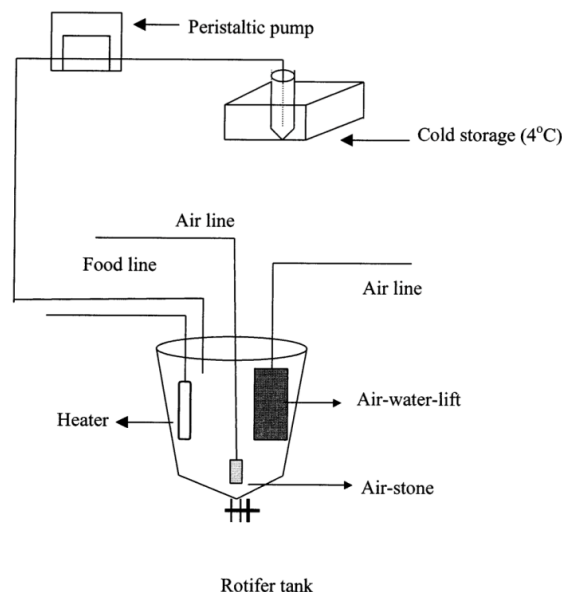
Στέλεχος τροχοζώων

Όλα τα πειράματα έγιναν με το *B. plicatilis* (L-στέλεχος με μήκος κορμού 180 ± 15 μm). Πριν από την έναρξη του πειράματος, το στέλεχος αυτό διατηρήθηκε σε καλλιέργεια για 6 μήνες στο Εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών και Κέντρου Αναφοράς της *Artemia*, σύμφωνα με τη διαδικασία καλλιέργειας που περιγράφεται από τους Sorgeloos και Lavens (1996).

Πειραματικός σχεδιασμός

Σε όλα τα πειράματα τα τροχοζώα εμβολιάστηκαν σε μια πυκνότητα 250 άτομα ανά ml σε 100 l κυλινδρο-κωνικές δεξαμενές σε τρεις επαναλήψεις για κάθε επεξεργασία. Το καλλιεργούμενο νερό αποτελούνταν από αραιωμένο θαλασσινό νερό (25 ppt αλατότητας), όπου η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Μια σχηματική περιγραφή του συστήματος καλλιέργειας της παρτίδας (batch) παρουσιάζεται στην Εικ. Το σύστημα καλλιέργειας της παρτίδας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται από τους Sorgeloos και Lavens (1996). Σε αυτό το σύστημα καλλιέργειας, τροχοζώα αποθεματοποιήθηκαν με αρχική συγκέντρωση 250 άτομα ανά ml και η συγκομιδή και επανα-αποθεματοποίηση προγραμματίστηκε κάθε 4 ημέρες.

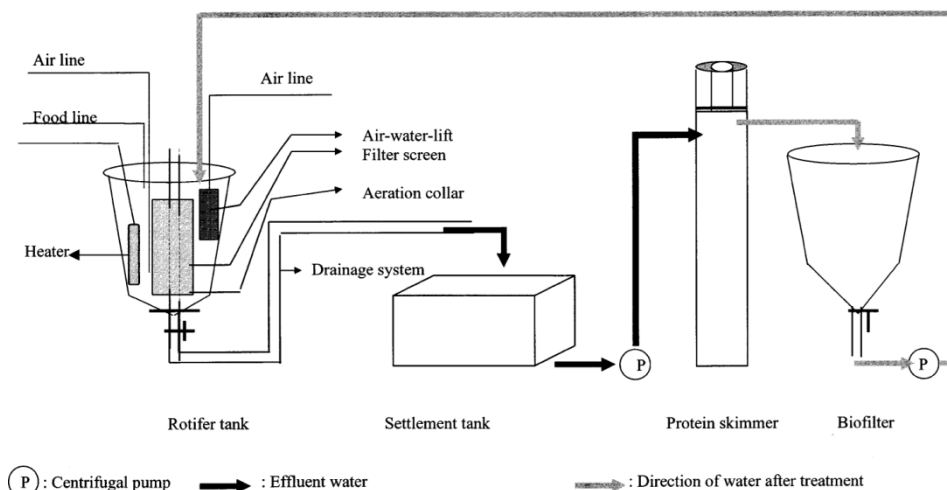


Εικ. 1. Σχηματική απεικόνιση του καλλιεργητικού συστήματος της παρτίδας.

Fig. 1. Schematic overview of the batch culture system.

Η Εικ. 2 προβαίνει σε μια σχηματική περιγραφή της καλλιέργειας του συστήματος επανακυκλοφορίας (RC) που χρησιμοποιήθηκε. Τα τροχοζώα διατηρήθηκαν σε πανομοιότυπες δεξαμενές εκτροφής όπως και για την καλλιέργεια της παρτίδας, αλλά οι δεξαμενές ήταν εξοπλισμένες με μια κεντρική νάιλον επιφάνεια με μέγεθος ματιού

33 μm . Οι αερόπετρες είχαν αντικατασταθεί από ένα δαχτυλίδι αερισμού το οποίο περιέκλειε την εξωτερική πλευρά στο κάτω μέρος του φίλτρου. Προκειμένου να εξασφαλιστεί ο συνεχής καθαρισμός των φίλτρων προσαρμόστηκε αερισμός $2.1 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$. Παρέχεται επίσης μια ομοιογενή ανάμειξη των τροχοζώων και των τροφών τους με αυτό τον αερισμό. Τα εκρέοντα απόβλητα του νερού και από τις τρεις επαναλήψεις της καλλιέργειας συλλέγονταν σε μια δεξαμενή καθίζησης 100 l πριν καταλήξουν για επεξεργασία σε πρωτεϊνικό εξαφριστή (protein skimmer). Αυτός είχε χωρητικότητα 55 l και μια μέγιστη ταχύτητα ροής του νερού 1200 l ανά h (DBPr. 35 25 861 AquarienTechnik Klaes, Γερμανία). Τα αιωρούμενα σωματίδια οργανικής ύλης (π.χ. επιπλέον τροφές, ciliates) από την απορροή του νερού παγιδεύονταν στο αφρό του skimmer πρωτεΐνης και απομακρύνονται καθημερινά. Μετά τον φυσικό διαχωρισμό στο skimmer πρωτεΐνης, τα λύματα του νερού καλλιέργειας υποβάλλονταν σε βιολογικό φιλτράρισμα σε ένα καταδύόμενο βιολογικό φίλτρο χωρητικότητας 90 l πληρωμένο με 60 l υπόστρωμα χαλικιού (μεγέθους 3-8 mm). Το βιολογικό φίλτρο εμβολιάστηκε με ένα εμπλουτισμένο μίγμα βακτηριδίων νιτροποίησης.



Εικ. 2. Σχηματική απεικόνιση του συστήματος επανακυκλοφορίας.
 Fig. 2. Schematic overview of the recirculation system.

Πίνακας 1

Σύσταση του μέσου νιτροποίησης που χρησιμοποιήθηκε στην καλλιέργεια των νιτροβακτηρίων

Table 1

Composition of the nitrification medium used for the culture of nitrifying bacteria

	(g l ⁻¹)
NH ₄ Cl	Variable (0.5–1.0 N–NH ₄ Cl)
CaCO ₃	0.4
KH ₂ PO ₄	0.16
Trace element solution	0.08
Synthetic seawater (instant ocean [®])	25

Κατά τη διάρκεια αρκετών μηνών, αυτά τα αυτότροφα βακτήρια καλλιεργούνταν σε ένα συνεχώς αερούμενο και pH ελεγχόμενο βιοαντιδραστήρα, και διατρέφονταν με ένα μέσο νιτροποίησης-διατροφής (Πίνακας 1). Μετά το βιολογικό φίλτρο, το επεξεργασμένο νερό επέστρεφε στις καλλιέργειες των τροχοζώων. Η επίδραση των διαφορετικών ρυθμών ανανέωσης νερού στην αύξηση του πληθυσμού των τροχοζώων ερευνήθηκε με την αύξηση της ανανέωσης του νερού στις δεξαμενές της καλλιέργειας ξεκινώντας από 100 (δηλαδή 100 l την ημέρα) στα 300 και 500%. Ο ρυθμός ροής για το βιολογικό φίλτρο επίσης εξαρτάται από το ποσοστό ανανέωσης του νερού στις καλλιέργειες που ήταν δύο φορές υψηλότερη από το ποσοστό της ανανέωσης του νερού στις δεξαμενές. Για τη βελτιστοποίηση του σχήματος διατροφής με τη χρήση culture Selco (CS), μια πειραματική CSH διατροφή εφαρμόστηκε στο σύστημα επανακυκλοφορίας, με ημερήσια ανανέωση νερού 500% και ξεκινώντας με 500 άτομα ανά ml. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν ή τριπλούν, ανάλογα με τη διαθεσιμότητα των δεξαμενών. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν μέχρι να σταματήσει η εκθετική αύξηση των τροχοζώων και το οποίο οφειλόταν στη μέγιστη μεταφερόμενη συγκέντρωση του συστήματος επανακυκλοφορίας.

Δεδομένου ότι τα συστήματα επανακυκλοφορίας είναι ιδιαίτερα κατάλληλα για μακροχρόνια εκτροφή ένα πείραμα διεξήχθη στα τροχόζωα που διατηρήθηκαν σε 3000 άτομα ανά ml με καθημερινή συγκομιδή. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε με επανακυκλοφορία σε ποσοστό 500% υπό ιδανικές συνθήκες σίτισης (βλ. παρακάτω).

Δειγματοληψία και μέτρηση

Η πυκνότητα των τροχοζώων μετριόταν καθημερινά, όταν οι δεξαμενές αποθήκευσης τροφών είχαν αδειάσει. Τρία δείγματα των 400 ml λαμβάνονταν από όλες τις δεξαμενές με την αυτόματη πιπέτα. Δύο σταγόνες Lugol προσθέτονταν στα δείγματα για να σκοτώσουν τα τροχόζωα πριν από τη μέτρηση. Κενοί και διαφανείς κορμοί που ανήκουν σε νεκρά τροχόζωα δεν συνυπολογίζονται. Ο ειδικός ρυθμός αύξησης (SGR) υπολογιζόταν με την εξής εξίσωση (1):

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / t \quad (1)$$

όπου: μ είναι ο ειδικός ρυθμός αύξησης, N_t είναι η πυκνότητα τροχοζώων μετά την περίοδο t καλλιέργειας (άτομα ανά ml), N_0 η αρχική πυκνότητα τροχοζώων (άτομα ανά ml), t είναι η περίοδος της καλλιέργειας (ημέρες).

Διατροφή τροχοζώων

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το culture Selco (CS). Αυτή η ξηρή τροφή διαλυόταν σε 800 ml νερό και αναδευόταν έντονα με μπλέντερ. Το διάλυμα που περιείχε ακριβώς την καθημερινή αναλογία τροφής διατηρούταν σε δοχείο

αποθήκευσης (4°C) για 24 ώρες. Στις κρύες δεξαμενές αποθήκευσης η τροφή χορηγούταν αυτόματα μια περισταλτική αντλία προς τις επιμέρους καλλιέργειες τροχοζώων. Το σταθερό σχήμα διατροφής προήλθε από τους Lavens *et. al.*, (1994), και μειώθηκε με την εξής εξίσωση (2):

$$CS = 0.0168 D^{0.415} V \quad (2)$$

όπου CS είναι το culture Selco (g), D η πυκνότητα τροχοζώων (άτομα ανά ml), V είναι ο όγκος του νερού (l).

Η σίτιση γινόταν κάθε μία ώρα με τη βοήθεια μιας περισταλτικής αντλίας. Ένα χρονόμετρο συνδέονταν με την περισταλτική αντλία ρυθμίζοντας τη διανομή τροφής με ρυθμό 33 ml h⁻¹ ή 800 ml ανά ημέρα.

Μια τροποποιημένη συνταγή CS (Πίνακας 2) με διαφορετική κατανομή συστατικών, υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, μεγαλύτερη σταθερότητα στο νερό και χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά επίσης δοκιμάστηκε στο σύστημα επανακυκλοφορίας. Σε ένα προκαταρκτικό πείραμα ένα δοκιμαστικό σχήμα σίτισης εφαρμόστηκε (τα αποτελέσματα δεν εμφανίζονται). Πράγματι, προέκυψε ότι λόγω των διαφορετικών χαρακτηριστικών της πειραματικής διατροφής CSH χρειάζεται το σύστημα σίτισης να τροποποιηθεί σύμφωνα με την εξίσωση (3):

$$CSH = 0.027 D^{0.415} V$$

όπου CSH είναι πειραματική τροφή CSH (g), D η πυκνότητα τροχοζώων (άτομα ανά ml), V είναι ο όγκος του νερού (l).

Η βελτιστοποίηση του σχήματος διατροφής και για τις δύο τροφές στην αυξημένη ανανέωση νερού (αυξημένες απώλειες τροφής στο σύστημα επανακυκλοφορίας) παρατηρήθηκε με τη διόρθωση των συντελεστών α και β των εξισώσεων (2) και (3).

Πίνακας 2

Βιοχημική σύσταση της τροφής culture Selco και της πειραματικής τροφής CSH

Table 2

Biochemical composition of the diet culture Selco and the experimental diet CSH

Composition	Diet	
	Culture Selco® (%)	CSH (%)
Moisture	Max 5	Max 5
Fat	Min 15	Min 9
Protein	Min 35	Min 40
Ash	Max 15	Max 10
Vitamin A	500 IU g ⁻¹	500 IU g ⁻¹
Vitamin D3	50 IU g ⁻¹	50 IU g ⁻¹
Vitamin E	3600 mg kg ⁻¹	3600 mg kg ⁻¹
Particles	1.8 × 10 ¹⁰ cells g ⁻¹	2.4 × 10 ¹⁰ cells g ⁻¹

^a Source, INVE, N.V., Belgium.

Φυσικοχημικές παράμετροι

Το pH, τα NH₄⁺, το διαλυμένο οξυγόνο και το ιξώδες του νερού υπολογίζονταν ως

πρώτη καθημερινή δραστηριότητα κατά τη διάρκεια του πειράματος. Τα NH_4^+ και οι μετρήσεις του ιξώδους πραγματοποιούνταν στο νερό καλλιέργειας της δεξαμενής τροχοζώων που φιλτραριζόταν μέσω ενός 30- μm φίλτρο. Η συγκέντρωση NH_4^+ προσδιοριζόταν χρησιμοποιώντας ένα kit δοκιμών (Aquamerck, Γερμανία). Το ιξώδες του νερού μετρήθηκε από το χρόνο ροής (t) 3 ml δείγματος νερού σε συγκεκριμένο (capilar) σωλήνα (Oswald Ιξωδόμετρο). Το ιξώδες (v) υπολογίστηκε από την ακόλουθη εξίσωση (4):

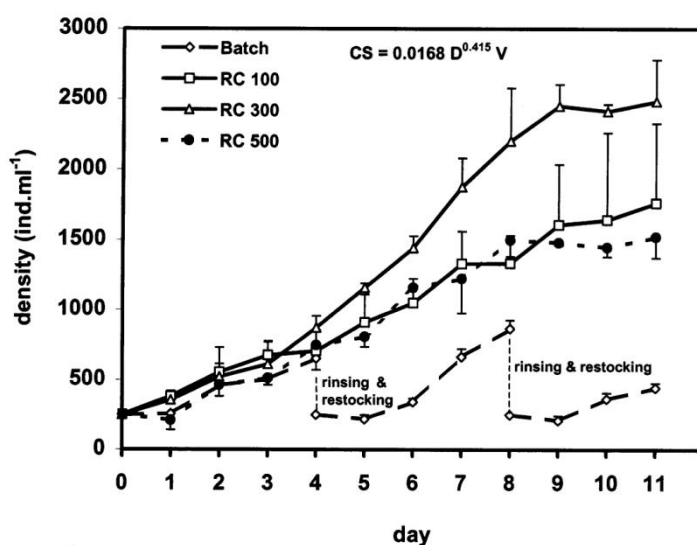
$$U = K (t - \theta) \quad (4)$$

όπου v είναι το ιξώδες, $K=0.01$, t είναι ο χρόνος ροής (s), $\theta=0.12/Kt$.

Το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD) μετρήθηκε στην δεξαμενή της καλλιέργειας των τροχοζώων, μετά το skimmer πρωτεϊνών και στο βιολογικό φίλτρο.

Στατιστική ανάλυση

Όλα τα στοιχεία ελέγχθηκαν για την ομοιογένεια και την κανονική κατανομή, προτού υποβληθούν σε ANOVA one way. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών ($P<0.05$) εξετάστηκαν με τεστ Duncan.



Εικ. 3. Η παρατηρούμενη συγκέντρωση των τροχοζώων στην παρτίδα και στο επανακυκλοφορούμενο σύστημα με το σταθερό σχήμα διατροφής: $\text{CSH} = 0.0168D^{0.415}V$

Fig. 3. Rotifer density obtained in the batch and recirculation system with a standard feeding scheme: $\text{CSH} = 0.0168D^{0.415}V$

Αποτελέσματα

Αυξητικές επιδόσεις των τροχοζώων

Η μέση αύξηση των πληθυσμών των τροχοζώων που εκτράφηκαν στην καλλιέργεια της παρτίδας και στο σύστημα επανακυκλοφορίας με τις διάφορες ανανεώσεις νερού [100% ανακύκλωση ανά ημέρα (RC 100), 300% ανακύκλωση ανά ημέρα (RC 300),

500% ανακύκλωση ανά ημέρα (RC 500)], παρουσιάζεται στην Εικ. 3. Στην καλλιέργεια της παρτίδας, το νερό είχε ανανεωθεί μία φορά κατά την αύξηση του πληθυσμού (δηλαδή μετά από 4 ημέρες καλλιέργειας). Μετά από αυτό, τα τροχοζώα ξεπλύθηκαν και επιστράφηκαν στο σύστημα σε νέο θαλασσινό νερό σε μια πυκνότητα 250 άτομα ανά ml. Στο σύστημα παρτίδας η μέγιστη πυκνότητα των τροχοζώων (860 άτομα ανά ml) επιτυγχανόταν στο τέλος κάθε περιόδου της καλλιέργειας των 4 ημερών.

Στο σύστημα επανακυκλοφορίας των καλλιεργειών η πυκνότητα των τροχοζώων ξεκινούσε από 250 άτομα ανά ml αλλά ούτε έκπλυση ή αντικατάσταση του νερού πραγματοποιήθηκε. Όταν η παραγωγή των τροχοζώων από τα δύο συστήματα συγκρίθηκε, έγινε σαφές ότι η παρτίδα του συστήματος της καλλιέργειας της παραγωγής είναι χαμηλότερη ιδιαίτερα κατά την πρώτη ημέρα μετά από κάθε εμπλουτισμό του αποθέματος. Για μια 11 ημερών καλλιεργητική περίοδο προέκυψε ότι η συνολική παραγωγή των τροχοζώων ήταν 1800 άτομα ανά ml (δηλαδή αθροίζονται σαν παραγωγή τριών παρτίδων: 0-4 ημερών, 4-8 ημερών, 8-11 ημερών). Στο σύστημα επανακυκλοφορίας του νερού με χαμηλό ρυθμό ανανέωσης του νερού (RC 100) η ίδια παραγωγή επιτεύχθηκε σε 11 ημέρες. Μια σημαντική αύξηση της πυκνότητας των τροχοζώων ($P < 0.05$) παρατηρήθηκε από την αύξηση του ημερήσιου ρυθμού ανανέωσης του νερού από 100 σε 300% με αποτέλεσμα την παραγωγή 2500 άτομα ανά ml στο τέλος των 11 ημερών καλλιέργειας. Ωστόσο, η αύξηση του ημερήσιου ρυθμού ανανέωσης του νερού στο σύστημα επανακυκλοφορίας κυμαινόταν από 300% (RC 300) έως 500% (RC 500) και δεν οδήγησε σε αύξηση του ειδικού ρυθμού αύξησης ή της πυκνότητας των τροχοζώων στο καθιερωμένο σχήμα σίτισης (Πίνακας 3).

Πίνακας 3

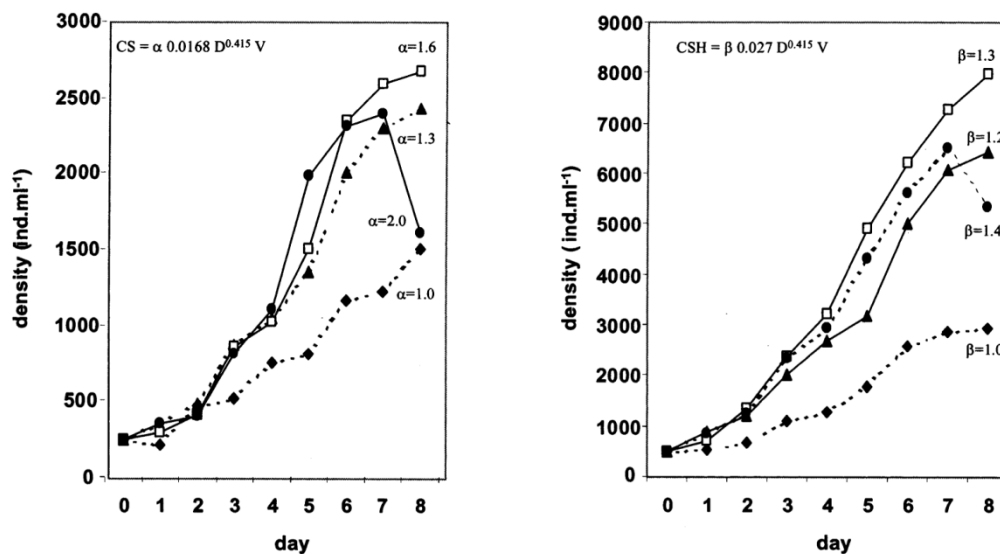
Μέσες τιμές και τυπική απόκλιση της πυκνότητας των τροχοζώων (άτομα ml⁻¹) που παρατηρήθηκαν στην παρτίδα και το σύστημα επανακυκλοφορίας με σταθερό σχήμα διατροφής, $CSH = 0.0168D^{0.415}V^a$

Table 3

Mean values and S.D. of the rotifer density (individuals ml⁻¹) obtained in a batch and a recirculation system with a standard feeding regime, $CSH = 0.0168D^{0.415}V^a$

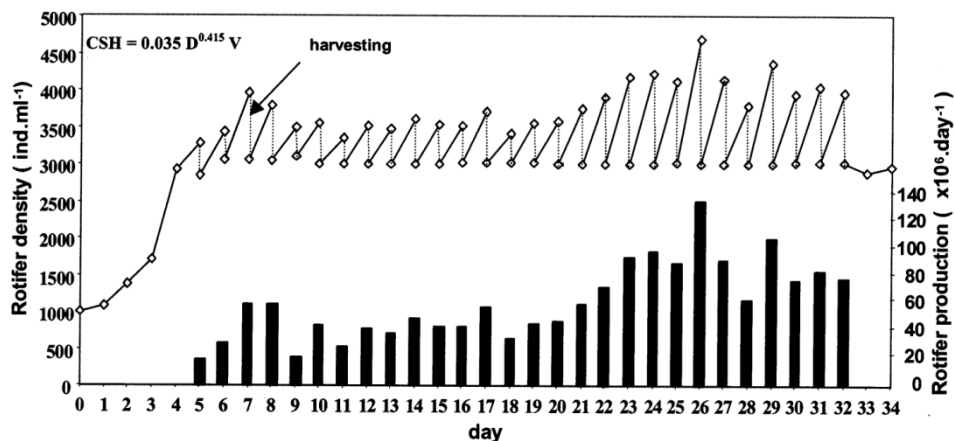
Day	Batch (specific growth rate)			Recirculation (Specific growth rate)		
	Day 0-4	Day 4-8	Day 8-11	RC 100%	RC 300%	RC 500%
0	250			250	250	250
1	256 ± 21 ^a (0.02)			384 ± 35 ^b (0.43)	357 ± 50 ^b (0.36)	210 ± 70 ^a (-0.17)
2	462 ± 42 ^a (0.31)			555 ± 175 ^a (0.40)	523 ± 92 ^a (0.37)	463 ± 81 ^a (0.31)
3	506 ± 34 ^a (0.24)			677 ± 99 ^a (0.33)	613 ± 157 ^a (0.30)	513 ± 50 ^a (0.24)
4	654 ± 45 ^a (0.24)	250		706 ± 149 ^a (0.26)	873 ± 83 ^a (0.31)	747 ± 176 ^a (0.27)
5		219 ± 30 (-0.13)		911 ± 200 ^a (0.26)	1160 ± 30 ^a (0.31)	807 ± 72 ^b (0.23)
6		342 ± 26 (0.16)		1051 ± 173 ^a (0.24)	1443 ± 83 ^b (0.29)	1160 ± 0 ^c (0.26)
7		666 ± 57 (0.33)		1332 ± 227 ^a (0.24)	1877 ± 203 ^b (0.29)	1223 ± 247 ^c (0.23)
8		867 ± 60 (0.31)	250	1335 ± 194 ^a (0.21)	2203 ± 376 ^b (0.27)	1497 ± 116 ^a (0.22)
9			210 ± 33 (-0.17)	1606 ± 429 ^a (0.21)	2450 ± 184 ^b (0.25)	1480 ± 20 ^a (0.20)
10			366 ± 43 (0.19)	1641 ± 619 ^a (0.19)	2413 ± 50 ^b (0.23)	1447 ± 67 ^a (0.18)
11			445 ± 33 (0.19)	1761 ± 566 ^a (0.18)	2483 ± 297 ^b (0.21)	1520 ± 147 ^a (0.16)

^a Means within the same row and followed by the same letter are not significantly different ($P > 0.05$).
() = Specific growth rate.



Εικ. 4. Παρατηρούμενη πυκνότητα τροχοζώων ταισμένων με CS και CSH με 500% ημερήσια ανανέωση νερού

Fig. 4. Rotifer density obtained at various feeding regimes with CS and CSH at 500% daily recirculation rate



Εικ. 5. Πυκνότητα τροχοζώων και παραγωγή τροχοζώων που παρατηρήθηκαν με καθημερινή συγκομιδή σε πυκνότητες τροχοζώων άνω των 3000 ατόμων ανά ml με ένα βέλτιστο σχήμα διατροφής: $CSH = 0.035D^{0.415}V$

Fig. 5. Rotifers density and rotifer production obtained by daily harvest at rotifer densities above 3000 individuals per ml with an optimized feeding scheme: $CSH = 0.035D^{0.415}V$

Δεδομένου ότι μια μείωση της παραγωγής των τροχοζώων εντοπίστηκε σε αυξημένα ποσοστά ροής υπό κανονικές συνθήκες σίτισης μια νέα σειρά πειραμάτων άρχισε με την οποία η επανακυκλοφορία διατηρήθηκε σε επίπεδο 500%, αλλά με τη διανομή των τροφών να αυξάνεται. Για αυτό, το πρότυπο διατροφής $CS=0.0168 D^{0.415}V$ τροποποιήθηκε στο $CS=α0.0168D^{0.415}V$ με $α=1, 1.3, 1.6$ και 2.0 . Αυξάνοντας την ημερήσια αναλογία των τροφών, με $α=1.6$ είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση του ρυθμού ανάπτυξης των τροχοζώων κατά 85% σε 8 ημερών καλλιεργητική προσπάθεια (Εικ. 4). Κατά τη διάρκεια αυτής της 8 ημερών καλλιεργητικής προσπάθειας ο SGR μετρήθηκε 0.30.

Ακολουθώντας την ίδια προσέγγιση για τον προσδιορισμό του βέλτιστου σιτηρεσίου για την πειραματική δίαιτα, το πρότυπο διατροφικού σχήματος $CSH=β0.027D^{0.415}V$ τροποποιήθηκε με $β=1.0, 1.2, 1.3$ και 1.4 . Με τη βελτιστοποίηση του διατροφικού καθεστώτος από $β=1.0$ έως $β=1.3$ μια 170% αύξηση στην πυκνότητα των τροχοζώων θα μπορούσε να επιτευχθεί στο σύστημα επανακυκλοφορίας (RC 500) (Εικ. 4). Με αυτό το σχήμα σίτισης πυκνότητα 8000 άτομα τροχοζώων ανά ml επετεύχθη μετά από 8 ημέρες (SGR=0.35).

Αυτό το σχήμα διατροφής ($CSH=0.035D^{0.415}V$) χρησιμοποιήθηκε σε μια συνεχή καλλιέργεια με την καθημερινή συγκομιδή των τροχοζώων. Η καλλιέργεια κρατήθηκε σε πυκνότητα των 3000 ατόμων ανά ml στο ρυθμό ανανέωσης 500%. Η καλλιέργεια θα μπορούσε να διατηρηθεί κατά τη διάρκεια 32 ημερών και παράχθηκαν 1.7×10^9 τροχοζώα (Εικ. 5). Η μέση ημερήσια συγκομιδή ήταν $60.5 \pm 28.5 \times 10^6$ τροχοζώα ή περίπου το 20% του μόνιμου πληθυσμού.

Φυσικοχημικές παράμετροι του νερού

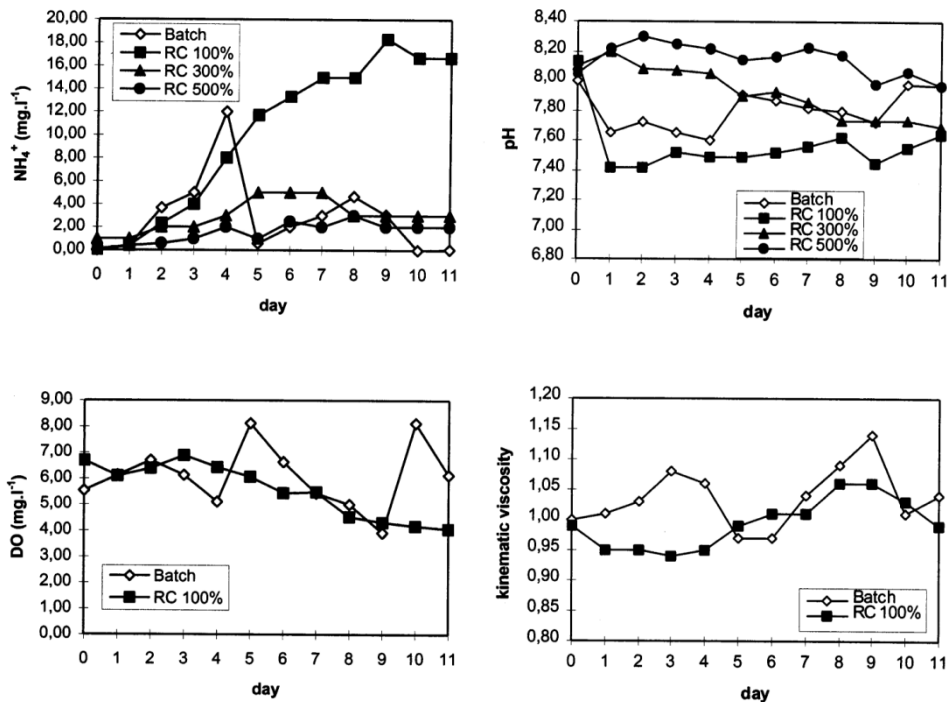
Χαμηλά επίπεδα αμμωνιακών (NH_4^+) παρατηρήθηκαν στην έναρξη της περιόδου καλλιέργειας και στα δύο συστήματα. Για την καλλιέργεια της παρτίδας, το επίπεδο NH_4^+ αυξήθηκε κατά τη διάρκεια των 4 ημερών περιόδου καλλιέργειας από 0 σε 12 mg ανά l και μειώθηκε μετά από ανανέωση και έκπλυση των τροχοζώων. Σε RC 100, το επίπεδο NH_4^+ αυξήθηκε σταδιακά κατά τη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειας. Χαμηλότερα επίπεδα NH_4^+ προκύπτουν από την αύξηση της καθημερινής ανανέωσης

του νερού σε ποσοστό 300 έως 500% στο σύστημα επανακυκλοφορίας. Αν και οι συγκεντρώσεις NH_4^+ αυξήθηκαν ελαφρά κατά τη λήξη της περιόδου της καλλιέργειας, αποδεκτά επίπεδα του 5.0 και των 2.0 mg ανά l παρατηρήθηκε σε RC 300 και RC 500, αντίστοιχα (Εικ. 6).

Από την Εικ. 6 προκύπτει ότι, κατά την έναρξη της περιόδου καλλιέργειας (ημέρα 0) όλων των συστημάτων της καλλιέργειας είχε ένα επίπεδο το pH της τάξης των 8.0. Από την 1η ημέρα και μετά, το RC 100 έδειξε χαμηλότερο pH σε σχέση με την καλλιέργεια της παρτίδας. Με την αύξηση του ημερήσιου ρυθμού ανανέωσης του νερού από 300 σε 500% ένα υψηλότερο pH θα μπορούσε να διατηρηθεί στο σύστημα επανακυκλοφορίας από την καλλιέργεια της παρτίδας. Επιπλέον, το pH είναι πιο σταθερό στο σύστημα επανακυκλοφορίας σε σχέση με την παρτίδα καλλιέργειας κατά τη διάρκεια της πλήρους περιόδου καλλιέργειας. Το επίπεδο του pH κυμάνθηκε από 7.6-8.0 (κατά τη διάρκεια 4 ημερών) για το σύστημα καλλιέργειας της παρτίδας και 7.7-8.1, 7.7-8.1 και 7.9-8.1 για RC 100, 300 και 500%, αντίστοιχα, καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας των 11 ημερών.

Επίσης, η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου και του ιξώδους της παρτίδας του συστήματος της καλλιέργειας εμφάνισαν υψηλότερες τιμές σε σχέση με το σύστημα επανακυκλοφορία. Το skimmer πρωτεΐνης μείωσε το COD από 444 mg ανά l στην καλλιέργεια σε 84 mg ανά l. Το βιολογικό φίλτρο μείωσε περαιτέρω το COD σε 2 mg ανά l.

Κατά τη διάρκεια της μακράς περιόδου (32 ημέρες) στη συνεχή καλλιέργεια των τροχοζώων, παρατηρήθηκε χαμηλή διακύμανση των φυσικοχημικών παραμέτρων. Το επίπεδο NH_4^+ κυμάνθηκε από 0.5 έως 3.0 mg ανά l. Το pH σταδιακά μειώθηκε κατά την περίοδο της καλλιέργειας από 7.7 στην αρχή της περιόδου της καλλιέργειας σε 7.0 κατά το τέλος της περιόδου της καλλιέργειας. Επίσης, το NO_3^- επίπεδο και το ιξώδες παρουσίασαν μικρές διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια της περιόδου της καλλιέργειας, όπου το NO_3^- επίπεδο αυξήθηκε σταδιακά, ως αποτέλεσμα της διαδικασίας της νιτροποίησης και το ιξώδες κυμάνθηκε από 1.02 σε 1.18.



Εικ. 6. Φυσικοχημικοί παράμετροι που μετρήθηκαν στην παρτίδα και στα διάφορα συστήματα επανακυκλοφορίας.

Fig. 6. The physico-chemical parameters measured in the batch and in the different recirculation systems.

Συζήτηση

Χρησιμοποιώντας την πυκνότητα ως παράμετρο για την αξιολόγηση των επιδόσεων των τροχοζώων σε μια παρτίδα και ένα σύστημα επανακυκλοφορίας θα μπορούσε να αποδειχθεί ότι οι πολύ σημαντικές διαφορές στην ανάπτυξη του πληθυσμού των τροχοζώων μπορούν να λαμβάνονται όταν το νερό ανανεώνεται με μεγάλους ρυθμούς.

Με αυξημένη ανανέωση νερού λοιπόν το σχήμα διατροφής απαιτείται να αποζημιωθεί για τις απώλειες των ζωοτροφών στο skimmer πρωτεΐνης. Η αύξηση του ποσοστού σίτισης για την αντιστάθμιση των απωλειών του συστήματος ανακύκλωσης και για την κάλυψη των βασικών αναγκών των πυκνότερων πληθυσμών των τροχοζώων οδήγησε σε βελτίωση της αύξησης του πληθυσμού. Ωστόσο, αυτή η αύξηση της κατανάλωσης τροφών ήταν περιθωριακή σε σχέση με την αυξημένη παραγωγή τροχοζώων. Η χρήση ενός συστήματος επανακυκλοφορίας ημερήσιου ρυθμού ανανέωσης νερού 300% αντί του 100% επέτρεψε την παραγωγή κατά 1,5 φορές πυκνότερης καλλιέργειας τροχοζώων. Αυξάνοντας τον ημερήσιο ρυθμό ανανέωσης νερού από 300 σε 500%, απαιτήθηκε μόνο μια προσαρμογή του σχήματος σίτισης με $\alpha=1.6$ και οδήγησε σε αύξηση 12% της παραγωγής των τροχοζώων. Υψηλότερες ανανεώσεις νερού μπορούν να δώσουν ακόμα καλύτερες επιδόσεις τροχοζώων, αλλά δεν μπορούν να ερευνηθούν λόγω της περιορισμένης διείσδυσης του νερού μέσα από την επιφάνεια του νάιλον φίλτρου 33 μm . Από την άποψη αυτή, είναι πολύ πιθανό ότι με τη χρήση τριτοβάθμιας επεξεργασίας συστημάτων φίλτρων θα επιτευχθούν παραγωγές τροχοζώων με υψηλότερες πυκνότητες.

Η εφαρμογή της πειραματικής τροφής (CSH) στο σύστημα επανακυκλοφορίας οδήγησε σε αύξηση 17% του ειδικού συντελεστή αύξησης σε σύγκριση με το CS, επιτρέποντας την παραγωγή μόνιμου πληθυσμού πυκνότητας 800 εκατομμυρίων τροχοζώων μετά από μόλις 8 ημέρες εμβολιασμού του συστήματος σε 100 l (Εικ. 4). Σε σύγκριση με το σύστημα της παρτίδας αυτή εμφάνισε 100% κέρδος στο χρόνο παραγωγής και μάλιστα σημαντική εξοικονόμηση σε εργατικό δυναμικό, δεδομένου ότι η επανακυκλοφορία αυτή δεν υπόκειται σε κανένα ενδιάμεσο ξέπλυμα ή τον καθαρισμό κατά την περίοδο παραγωγής. Αυτό μπορεί επίσης να έχει ενεργειακό πλεονεκτήματα μιας και λιγότερο νερό απαιτείται για ζέσταμα. Με βάση τα αποτελέσματα από τα πειράματα, θα μπορούσε να αποδειχθεί ότι για την παραγωγή ίδιας ποσότητας τροχοζώων (10^9) στην παρτίδα ή στο σύστημα επανακυκλοφορίας η χρήση της πιο αποδοτικής CSH τροφής οδήγησε σε 30% χαμηλότερη κατανάλωση τροφών (Πίνακας 4).

Πίνακας 4

Σύγκριση της κατανάλωσης τροφής και του μήκους της καλλιεργητικής περιόδου για διάφορα καλλιεργητικά συστήματα για παραγωγή 10^6 τροχοζώων σε 100 l

Table 4

Comparison in the food consumption and length of the culture period for different rotifer culture systems for the production of 10^6 rotifers in 100 l

	Culture system		
	Batch	RC 500%	RC 500%
Food	CS [®]	CS [®]	CSH
Food consumption (g)	1027	1046	763
Length of the culture period (days)	16 ^a	11 ^b	8 ^b

^a During the rearing period four restockings and rinsings need to be performed.

^b No restocking and rinsing.

Η βελτίωση της ποιότητας του νερού που έχει ληφθεί με το σύστημα επανακυκλοφορίας οδήγησε σε σταθερές συνθήκες εκτροφής. Οι παράμετροι ποιότητας του νερού είχαν άμεση σχέση με το ρυθμό ανανέωσης του νερού στις καλλιέργειες των τροχοζώων. Το σύστημα της καλλιέργειας παρτίδας έδειξε υψηλότερες συγκεντρώσεις αμμωνίου από τα συστήματα επανακυκλοφορίας. Οι συνθήκες αυτές μπορούν να αποδοθούν στην ικανότητα του ίδιου του συστήματος, το οποίο δεν είναι σε θέση να παρασύρει τη συσσωρευμένη, διαλυμένη και αιωρούμενη οργανική ύλη από το σύστημα (π.χ. περιττώματα τροχοζώων, πλεονάζουσα τροφή). Αυξάνοντας την ημερήσια αλλαγή νερού στο σύστημα επανακυκλοφορίας είχαμε πολύ καλύτερη και πιο σταθερή ποιότητα του νερού. Αυτό είναι αποτέλεσμα της καλύτερης απομάκρυνσης των σωματιδίων (περισσότερα περάσματα μέσα από το skimmer πρωτεΐνης) και την καλύτερη έκθεση στο βιολογικό φίλτρο. Από την άποψη αυτή το skimmer πρωτεΐνης ήταν το πιο αποτελεσματικό εργαλείο για την απομάκρυνση των οργανικών ενώσεων και ήταν υπεύθυνο για την πτώση του χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD) κατά 81,2%.

Τα συστήματα καλλιέργειας της παρτίδας των τροχοζώων συνήθως ξεπλένονταν και επανα-αποθεματοποιούνταν μετά από περίπου 4 ημέρες, όταν τα επίπεδα NH_4^+ έφταναν τα 10 mg ανά l και η αύξηση των τροχοζώων μειωνόταν. Από την τοξικότητα της μη-ιονισμένης αμμωνίας ($\text{NH}_3\text{-N}$) που παραγόταν από το αμμώνιο ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) συναρτήσει του pH (Losordo and Westers, 1994), είναι κοινή πρακτική η μείωση του pH σε υψηλές πυκνότητες των τροχοζώων (Yoshimura *et al.*, 1996). Στην παρτίδα της καλλιέργειας το 2.2% (0.28 mg ανά l) παρουσιάστηκε ως μη-ιονισμένη αμμωνία, στο τέλος του κάθε 4ήμερου κύκλου της καλλιέργειας. Στο σύστημα επανακυκλοφορίας (500%), η μη-ιονισμένη αμμωνία φτάνει μόνο 0.09 mg ανά l στο τέλος του κύκλου καλλιέργειας των τροχοζώων (δηλαδή μετά από 11 ημέρες). Είναι προφανές από τους αριθμούς αυτούς ότι αν και το σύστημα επανακυκλοφορίας λειτουργεί σε υψηλότερο pH από το σύστημα παρτίδας, η συγκέντρωση της μη-ιονισμένης αμμωνίας είναι χαμηλότερη σε κάθε στιγμή, ακόμη και χωρίς τη ρύθμιση του pH. Αν και δεν έχει αρνητική επίδραση στο pH έχει αναφερθεί σχετικά με την ανάπτυξη των τροχοζώων που μπορεί να είναι λογικό να διατηρηθεί υψηλότερα και καλύτερα στα ρυθμισμένα συστήματα εκτροφής γύρω από το κανονικό pH του θαλασσινού νερού. Ειδικά, όταν τα τροχοζώα είναι έτοιμα για σίτιση αυτό μπορεί να έχει πολλά πλεονεκτήματα. Η επακόλουθη έκπλυση πριν από τη διατροφή τους στους θηρευτές και τη βύθιση της νύμφης στη δεξαμενή μπορεί να συμβεί χωρίς σημαντικές αλλαγές για την ποιότητα των υδάτων που μπορούν να επωφεληθούν μόνο σε μια καλύτερη ποιότητα διατροφής των ιχθυονυμφών.

Αν και η υψηλή πυκνότητα των τροχοζώων μπορεί να είναι ελκυστική για τους καλλιεργητές, μπορεί όμως να είναι επικίνδυνη στο να διευθύνουν τις επιχειρήσεις

κοντά στη μέγιστη ικανότητά τους. Η συνεχής παραγωγή τροχοζώων σε χαμηλότερες πυκνότητες από την ημέρα της συγκομιδής προσφέρει καλύτερες προοπτικές δεδομένου ότι μπορεί να διατηρηθεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα εκτροφής. Δεδομένου ότι το σύστημα δεν είναι σε υπερφόρτωση υπόκειται στις διακυμάνσεις των φυσικοχημικών παραμέτρων. Αυτό αντανακλάται στην αξιόπιστη καθημερινή παραγωγή του, με το 20% της καλλιέργειας και των διαρκώς μεγάλων κύκλων παραγωγής.

Εν κατακλείδι, μπορούμε να πούμε ότι πολλά από τα μειονεκτήματα που είναι σύμφυτα με την παρτίδα του συστήματος της καλλιέργειας μπορεί να επιλυθούν με τη χρήση ενός συστήματος επανακυκλοφορίας. Η χρήση τέτοιων έχει αποδειχθεί χρήσιμη για τη μείωση του κόστους εργασίας, την κατανάλωση του νερού και με παράλληλη εξασφάλιση σταθερών φυσικοχημικών παραμέτρων. Αν και δεν μετρήθηκε ο βακτηριακός πληθυσμός στα πειράματά μας, δεν είναι απίθανο, πιο σταθερές συνθήκες καλλιέργειας να μπορούσαν να επιτευχθούν και να αποφεύγονταν επίσης η εμφάνιση των ανεξήγητων κατακρημνίσεων των πληθυσμών των τροχοζώων σε παρτίδες καλλιέργειας.

Παραπομπές

- Abu-Rezq, T., Al-Shimmari, J., Dias, P., 1997. Live food production using batch culture and chemostat system in Kuwait. *Hydrobiologia* 358, 173–178.
- Candrea, P., Dhert, P., Novelli, A., Brissi, D., 1996. Potential gains through alimention nutrition improvements in the hatchery. In: Chatain, B., Sargalia, M., Sweetman, J., Lavens, P. (Eds.), *Seabass and Seabream Culture: Problems and Prospects. An International Workshop, 16–18 October 1996, Verona, Italy, vol. 388. European Aquaculture Society*, pp. 148–159.
- Dehasque, M., Ooghe, B., Wille, M., Candrea, P., Cladas, P., Lavens, P., 1997. Automation of live food in industrial hatcheries: zootechnics and economics. *Aquacult. Int.* 5, 179–182.
- Fu, Y., Hada, H., Yamashita, T., Yoshida, Y., Hino, A., 1997. Development of continuous culture system for stable mass production of the marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia* 358, 145–151.
- Fukusho, K., 1983. Present status and problems in culture of rotifer *Brachionus plicatilis* for fry production of marine fishes in Japan. In: *Internacional de Acuicultura Symposium, September 1983, Coquimbo, Chile*, pp. 361–374.
- Fukusho, K., 1989. Biology and mass production of the rotifer, *Brachionus plicatilis* (1). *Int. J. Aquacult. Technol.* 1 (232–240), 68–76.
- Lavens, P., Dhert, P.h., Merchie, G., Stael, M., Sorgeloos, P., 1994. A standard procedure for the mass production on an artificial diet of rotifers with a high nutritional quality for marine fish larvae. In: Chou, L.M., Munro, A.D., Lam, T.J., Chen, T.W., Cheong, L.K.K., Ding, J.K., Hooi, K.K., Khoo, H.W., Phang, V.P.E., Shim, K.F., Tan, C.H. (Eds.), *The Third Asian Fisheries Forum, Manila, Philippines. Asian Fisheries Society*, pp. 745–748.
- Losordo, T.M., Westers, H., 1994. System carrying capacity and flow estimation. In: Timmons, M.B., Losordo, T.M. (Eds.), *Aquaculture Water Reuse Systems: Engineering Design and Management. Elsevier, Amsterdam*, pp. 8–60.
- Morizane, T., 1991. A review of automation and mechanization used in the production of rotifer in Japan. Rotifer and Microalgae culture systems. In: *Proceedings of US–Asia Workshop, Honolulu, HI. The Oceanic Institute*, pp. 79–88.
- 214 G. Suantika et al. : *Aquacultural Engineering* 21 (2000) 201–214.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., 1996. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. Fisheries Technical Paper, vol. 361. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp. 49–78.
- Sorgeloos, P., Sweetman, J., 1993. Aquaculture success story. *World Aquacult.* 24 (1), 4–14.
- Yoshimura, K., Hagiwara, A., Yoshimatsu, T., Kitajima, C., 1996. Culture technology of marine rotifers and the implication for intensive culture of marine fish in Japan. *Mar. Freshwater Res.* 47, 217–222.
- Yoshimura, K., Usuki, K., Yoshimatsu, T., Kitajima, C., Hagiwara, A., 1997. Recent development of a

high density mass culture system for the rotifer *Brachionus rotundiformis* tschugunoff.

Βελτίωση Οικοσυστήματος Καλλιέργειας Τροχοζώων για την Προαγωγή Ανακύκλωσης του Θαλάσσιου Μικροφύκου, *Nannochloropsis sp.*

Improvement of a Rotifer Ecosystem Culture to Promote Recycling Marine Microalga, *Nannochloropsis sp.*

Leila Chebila ^{a*}, Shigehisa Yamasaki^b

^aInstitute National des Sciences et Technologies de la Mer 28, rue 2 Mars 1934, 2025 Salamhho. Tunisia

^bFaculty of Fisheries, Kagoshima University. Kagoshima 890, Japan

Aquacultural Engineering 17 (1998) 1-10

Περίληψη

Ένα οικοσύστημα καλλιέργειας με μια σχέση καταναλωτή-παραγωγού βασιζόμενο στον κύκλο της ουσίας του φυσικού οικοσυστήματος κατασκευάστηκε με σκοπό να μελετήσει τη σκοπιμότητα της οικονομικής καλλιέργειας του θαλάσσιου μικροφύκου *Nannochloropsis sp.* στα λύματα των τροχοζώων. Για την προαγωγή της ανάπτυξης των φυκών, τα ακόλουθα σημεία ερευνήθηκαν για τον καθορισμό: (1) κατά πόσον τα μικρο-θρεπτικά συστατικά είναι απαραίτητα για την καλλιέργεια του *Nannochloropsis* που παράγονται από τα τροχοζώα, (2) τα ευνοϊκά και βέλτιστα εύρη των συγκεντρώσεων θρεπτικών ουσιών στο νερό της καλλιέργειας των τροχοζώων που εμπλέκονται στην βέλτιστη ανάπτυξη του *Nannochloropsis sp.* και (3) την καταλληλότητα ορισμένων οικονομικών οργανικών λιπασμάτων στα λύματα των τροχοζώων σε πρώιμα στάδια.

Σε πρώιμα λύματα τροχοζώων, η αύξηση του *Nannochloropsis* ήταν όμοια με αυτή του εμπλουτισμένου θαλασσινού νερού με τα θρεπτικά συστατικά του τυποποιημένου Θαλασσινού Εμπλουτισμένου Νερού Provasoli (ESP). Τα μικρο-θρεπτικά συστατικά θα μπορούσαν να ανακυκλώνονται ταχέως μέσω της διατροφής και της απέκκρισης των τροχοζώων. Χρησιμοποιώντας παλιά λύματα τροχοζώων, η μέγιστη κυτταρική πυκνότητα παρατηρήθηκε στα λύματα με άζωτο και φώσφορο σε συγκεντρώσεις των 364 και 179 $\mu\text{g at. l}^{-1}$, αντίστοιχα. Αυτή η αύξηση ήταν 23% υψηλότερη από εκείνη που παράχθηκε στο εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό ESP (μάρτυρας). Από την άλλη πλευρά, το οργανικό λίπασμα που χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το πείραμα (κοπριά πουλερικών και αποσυντιθέμενο κρέας καρχαρία) κρίθηκε κατάλληλο για την ενίσχυση της ανάπτυξης του *Nannochloropsis sp.* σε πρώιμο στάδια. Η χρήση της κοπριάς κοτόπουλου με μια πρόσθετη πηγή ανόργανου αζώτου στα λύματα τροχοζώων είχε ως αποτέλεσμα μια αύξηση 50% στην κυτταρική πυκνότητα του γένους *Nannochloropsis sp.* σε σύγκριση με αυτό που λαμβάνεται από τον μάρτυρα. Ωστόσο, η προσθήκη του αποσυντιθέμενου κρέατος καρχαρία στα λύματα τροχοζώων οδήγησε μόνο σε αύξηση 20%.

Σκοπός

Η παρούσα μελέτη σκοπό είχε:

(α) εάν τα απαραίτητα μικρο-θρεπτικά για την καλλιέργεια του *Nannochloropsis sp.* παράγονται από τα τροχοζώα στην καλλιέργεια του *Nannochloropsis* όταν εισάγονται στην καλλιέργεια φυκών.

(β) σε ποιο βαθμό είναι τα κυριότερα θρεπτικά, άζωτο και φώσφορος, εξαντλημένα

στο μέσο της καλλιέργειας φυκών κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης της καλλιέργειας του *Nannochloropsis sp.* και τον προσδιορισμό των ευνοϊκών και βέλτιστων εύρων αυτών των θρεπτικών συγκεντρώσεων στις παλιές καλλιέργειες τροχοζώων που εμπλέκονται στην αύξηση του *Nannochloropsis sp.*

(γ) η σκοπιμότητα της χρήσης οικονομικών οργανικών λιπασμάτων όπως κοπριά πουλερικών και αποσυντιθέμενο κρέας καρχαρία, στον εμπλουτισμό της αύξησης του *Nannochloropsis sp.* στα λύματα τροχοζώων σε πρώιμο στάδιο.

Υλικά και μέθοδοι

Η γενική πειραματική διαδικασία περιελάμβανε καλλιέργειες θαλάσσιων μικροφυκών *Nannochloropsis sp.* σε μια υπαίθρια δεξαμενή χωρητικότητας 30 l γεμάτη 15 l εμπλουτισμένου θαλασσινού νερού ESP θρεπτικών συστατικών (Provasoli, 1968). Η αλατότητα είχε προσαρμοστεί στο 20 ppt. Το μέσο αυτό φιλτραρίστηκε με διηθητικό χαρτί από ίνες γυαλιού.

Η καλλιέργεια είχε τη δυνατότητα να αναπτύσσεται σε πυκνότητα 40×10^6 κύτταρα ανά ml. Τότε, ένα δείγμα των 150 ml, χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό της ποιότητας των *Nannochloropsis sp.* στο νερό καλλιέργειας (Πείραμα 1). Στον υπόλοιπο όγκο, τα τροχοζώα ήταν εμβολιασμένα σε πυκνότητα 10 άτομα ανά ml. Όταν όλες οι τροφές είχαν καταναλωθεί, ένα δείγμα λήφθηκε από τη δεξαμενή της καλλιέργειας και χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό της ποιότητας των λυμάτων τροχοζώων (Πείραμα 2).

Στη συνέχεια, τα τροχοζώα καλλιεργούνταν συνεχώς για 35 ημέρες. Δείγματα πάρθηκαν κατά την 1η, 2η, 3η, και 4η εβδομάδα για τη μέτρηση της δυνατότητας ανάπτυξης του *Nannochloropsis sp.* (Πείραμα 3).

Εναλλακτικές προσπάθειες πραγματοποιήθηκαν για να τονώσουν την ανάπτυξη του *Nannochloropsis sp.* σε λύματα τροχοζώων σε πρώιμα στάδια, χρησιμοποιώντας οικονομικά προϊόντα αποβλήτων κοτόπουλων και αποσυντιθέμενου κρέατος καρχαρία ως λίπασμα (Πείραμα 4).

Όλα αυτά τα πειράματα της ικανότητα ανάπτυξης του φύκου, πραγματοποιήθηκαν σε 30 ml φιάλες με 25 ml του μέσου καλλιέργειας. Οι φιάλες ήταν τοποθετημένες σε ένα περιστροφικό αναδευτήρα 10 r.p.m. (Hirata and Kohirata, 1989) με κλίση 30° προς το φως. Η κυτταρική πυκνότητα της καλλιέργειας καθοριζόταν κάθε 3 ημέρες από την καταμέτρηση των κλασμάτων της καλλιέργειας με ένα αιμοκυττόμετρο.

Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 25°C , με ένταση φωτός $120 \mu\text{E}$ ανά m^2 ανά s, από λευκό φως λαμπτήρων φθορισμού (Toshiba FL 37W). Εφαρμόστηκε πρόγραμμα 13 : 11 h φως : σκοτάδι, έτσι ώστε να επιτευχθεί συγχρονισμός στις καλλιέργειες. Εμβολιασμός 1×10^6 λογαριθμικής φάσης κυττάρων ανά ml χρησιμοποιήθηκε ως αρχική πυκνότητα. Το στέλεχος *Nannochloropsis sp.* που χρησιμοποιήθηκε σε αυτά τα πειράματα ήταν απομονωμένο από τον κόλπο Yashima (Kagoshima, Ιαπωνία) και καλλιεργημένο συνεχώς σε 20 ppt. αλατότητας θαλασσινό νερό φιλτραρισμένου μέσω ενός γυάλινου φίλτρου ινών, αποστειρωμένο σε αυτόκαυστο στους 120°C για 20 λεπτά και εμπλουτισμένο με ESP θρεπτικά συστατικά.

Εντελώς τυχαία σχεδιασμένα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε τρεις επαναλήψεις ανά προσπάθεια. Οι διαφορές μεταξύ των προσπαθειών συγκρίθηκαν με τεστ πολλαπλών σειρών Duncan (Gomez and Gomez, 1984). Όλα τα πειράματα τερματίστηκαν μετά από 18 ημέρες καλλιέργειας.

Πείραμα 1

Ο στόχος του πρώτου πειράματος ήταν να προσδιοριστεί κατά πόσο τα μικρο-θρεπτικά συστατικά θα έλειπαν από το *Nannochloropsis sp.*, όταν η καλλιέργεια έφθασε στη στατική φάση. Κατά τη στατική φάση, τα κύτταρα του *Nannochloropsis sp.* που είχαν αφαιρεθεί με φυγοκέντριση από το μέσο καλλιέργειας συλλέχθηκαν. Οι συγκεντρώσεις ολικού αζώτου και ολικού φωσφόρου προσδιορίστηκαν (Strickland and Parsons, 1972; Parsons *et al.*, 1984) και η αρχική συγκέντρωση έγινε από την προσθήκη των αντίστοιχων ποσοτήτων. Οι πηγές αζώτου και φωσφόρου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν νιτρικό νάτριο και γλυκεροφωσφορικό νάτριο. Το μέσο καλλιέργειας δεν υποστηρίχθηκε από μείγμα μεταλλικών ιχνοστοιχείων (PII), του ESP μέσου. Το τροποποιημένο μέσο καλλιέργειας εφαρμόστηκε σε μια νέα καλλιέργεια *Nannochloropsis sp.*

Πείραμα 2

Το δεύτερο πείραμα προσδιόρισε αν τα λύματα τροχοζώων περιείχαν τα απαιτούμενα ποσά των μικρο-θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη του γένους *Nannochloropsis sp.* Τα τροχόζωα ήταν φιλτραρισμένα μέσω ενός φίλτρου από ίνες υάλου (0.45 μm μέγεθος πόρου) και χρησιμοποιήθηκαν ως μέσο καλλιέργειας για το *Nannochloropsis sp.* Δύο προσπάθειες προετοιμάστηκαν: η πρώτη ήταν απλά λύματα τροχοζώων και η δεύτερη λύματα τροχοζώων στο νερό των οποίων τα σύνολα αζώτου και ολικού φωσφόρου προσαρμόστηκαν με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στο εμπλουτισμένο μέσο θαλασσινού νερού ESP. Η καλλιέργεια μάρτυρας εμπλουτίστηκε με το μέσο θαλασσινού νερού ESP.

Πείραμα 3

Στο τρίτο πείραμα διερευνήθηκε το επιθυμητό και βέλτιστο εύρος των θρεπτικών συγκεντρώσεων των λυμάτων τροχοζώων που απαιτούνται για την βέλτιστη ανάπτυξη του *Nannochloropsis sp.* Τα τροχόζωα σε συνεχή καλλιέργεια τρέφονταν καθημερινά με διατηρημένα με απλή ψύξη συμπυκνωμένα *Nannochloropsis sp.* σε συγκέντρωση 1×10^5 κύτταρα ανά άτομο (Yamasaki *et al.*, 1989). Τα τροχόζωα συλλέχθηκαν με τη χρήση πλαγκτονικού διχτυού 50 μm άνοιγμα ματιού, όταν η πυκνότητα του πληθυσμού τους έφθασε πάνω από 100 άτομα ml. Τα λύματα που έμειναν μετά τη συγκομιδή των τροχοζώων επιστράφηκαν πίσω στη δεξαμενή της καλλιέργειας. Καλλιεργητικά ιζήματα, περιττώματα και πλεονάζον τροφές είχαν τη δυνατότητα να συσσωρεύονται καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας.

Το συνολικό διαλυμένο άζωτο και ο ολικός φωσφόρος προσδιορίζονταν εβδομαδιαία (Strick and Parsons, 1972; Parsons *et al.*, 1984). Εντούτοις, ο ανόργανος άνθρακας μετρήθηκε άμεσα με τη χρήση αναλυτή ολικών οργανικών (Shimadzu TOC-5000). Το pH μετριόταν καθημερινά χρησιμοποιώντας ένα φορητό ψηφιακό μετρητή pH (Yokogama pH- 81). Το πείραμα των φυκών της καλλιέργειας ξεκίνησε αμέσως μετά τη δειγματοληψία λυμάτων τροχοζώων την 1η, 2η, 3η, και 4η εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό. Η καλλιέργεια μάρτυρας ήταν φιλτραρισμένο και εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό.

Πείραμα 4

Το τελευταίο πείραμα που πραγματοποιήθηκε ήταν για τη δοκιμή της καταλληλότητας της κοπριάς πουλερικών που έχει υποστεί ζύμωση μαζί με κρέας καρχαρία ως εναλλακτική πηγή θρεπτικών στα λύματα των τροχοζώων. Η κοπριά

των κοτόπουλων είχε παρασκευαστεί με ανάμειξη ενός μέρους αποξηραμένης κοπριάς κοτόπουλων με τέσσερα μέρη συνθετικού θαλασσινού νερού 20 ppt. αλατότητας, βρασμένου για 2 ώρες φιλτραρισμένου, και αποστειρωμένου σε αυτόκαυστο στους 120°C για 20 λεπτά.

Κρέας καρχαρία σε αποσύνθεση παρασκευάστηκε με ανάμειξη ενός μέρους λεπτοκομμένης σάρκας με ένα μέρος νερού της βρύσης και αφήνοντάς το σε εξωτερικούς χώρους (22±6°C) για τη ζύμωση. Το κρέας του καρχαρία είχε υποστεί ζύμωση για 5 χρόνια πριν από αυτό το πείραμα. Το μίγμα αυτό φιλτραρίστηκε σε πλαγκτονικό δίκτυο (38-μm άνοιγμα ματιού), και αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 120°C για 20 λεπτά.

Η συγκέντρωση του ολικού διαλυμένου αζώτου και φωσφόρου στα δύο προηγούμενα αποστειρωμένα μέσα αναλύθηκαν (Strickland and Parsons, 1972; Parsons *et al.*, 1984). Το ολικό άζωτο και οι ολικές συγκεντρώσεις φωσφόρου στα λύματα των τροχοζώων είχαν προσαρμοστεί ώστε να ταιριάζουν με εκείνες του αρχικού εμπλουτισμένου μέσου του θαλασσινού νερού με την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας κοπριάς κοτόπουλου. Δεδομένου ότι η κοπριά κοτόπουλου ήταν ανεπαρκής σε άζωτο, ανόργανο άζωτο με τη μορφή νιτρικών προστέθηκε.

Κρέας καρχαρία σε αποσύνθεση προστέθηκε στην καλλιέργεια φυτοπλαγκτού τόση ώστε η συνολική συγκέντρωση του αζώτου να είναι παρόμοια με αυτή του εμπλουτισμένου θαλασσινού νερού. Μετά τον προσδιορισμό του ολικού αζώτου και του ολικού φωσφόρου, περίπου 2 ppt. κρέας καρχαρία σε αποσύνθεση, προστέθηκε στα λύματα των τροχοζώων. Η καλλιέργεια μάρτυρας ήταν φιλτραρισμένο και εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό.

Αποτελέσματα και συζήτηση

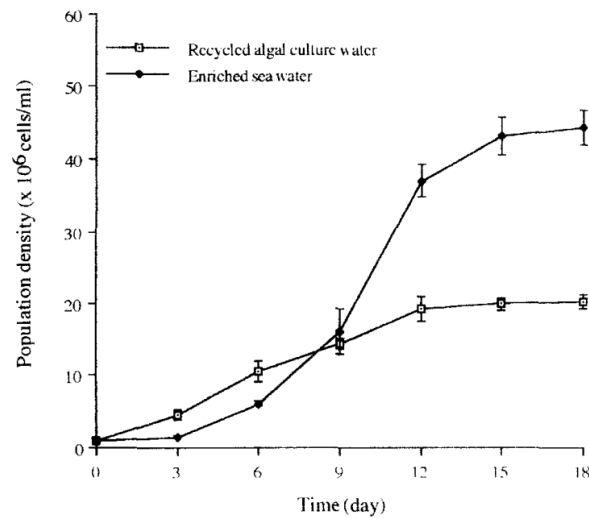
Στο πείραμα 1, η ανώτατη κυτταρική πυκνότητα που παρατηρήθηκε κατά τη στατική φάση στην ανακυκλωμένη καλλιέργεια *Nannochloropsis sp.* ήταν 19.9×10^6 κύτταρα ανά ml. Αυτή η αύξηση ήταν 46% μικρότερη σε σχέση με το εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό, η οποία έφτασε σε τελική βιομάζα κατά τη στατική φάση της τάξης των 43.2×10^6 κύτταρα ανά ml (Εικ. 1). Αυτή η διαφορά μπορεί να είναι λόγω της έλλειψης των ιχνοστοιχείων στο ανακυκλωμένο νερό καλλιέργειας του *Nannochloropsis sp.* Έχει αναφερθεί ότι η εξάντληση των ιχνοστοιχείων αναστέλλει την ανάπτυξη του φυτοπλαγκτού (Kerry *et al.*, 1988). Στην περίπτωση αυτή, τα φύκια απορρόφησαν σχεδόν το σύνολο των ιχνοστοιχείων στο νερό καλλιέργειας.

Στο Πείραμα 2, η αύξηση του *Nannochloropsis sp.* στα λύματα των τροχοζώων χωρίς κανέναν εμπλουτισμό ήταν πολύ κακή. Η πυκνότητα του πληθυσμού, κατ' ουσίας παρέμεινε όμοια με την αρχική πυκνότητα κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου. Τα φύκια έδειξαν καλύτερη αύξηση στα εμπλουτισμένα λύματα τροχοζώων (μέγιστη κυτταρική πυκνότητα: 64.5×10^6 κύτταρα ανά ml) σε σχέση με το εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό (μέγιστη κυτταρική πυκνότητα: 56.8×10^6 κύτταρα ανά ml) (Εικ. 2). Ωστόσο, με στατιστική ανάλυση δεν προέκυψε σημαντική διαφορά $P < 0.01$.

Από τα αποτελέσματα αυτά, μπορούμε να πούμε ότι το *Nannochloropsis sp.* μπορεί να αναπτυχθεί σε λύματα τροχοζώων εμπλουτισμένα με άζωτο και φώσφορο. Το τροχοζώο, *Brachionus plicatilis*, μπορεί να ανακυκλώνει άζωτο, φώσφορο (Nigata, 1989) και μερικά άλλα μικρο-θρεπτικά συστατικά απαραίτητων για την ανάπτυξη του *Nannochloropsis sp.*.

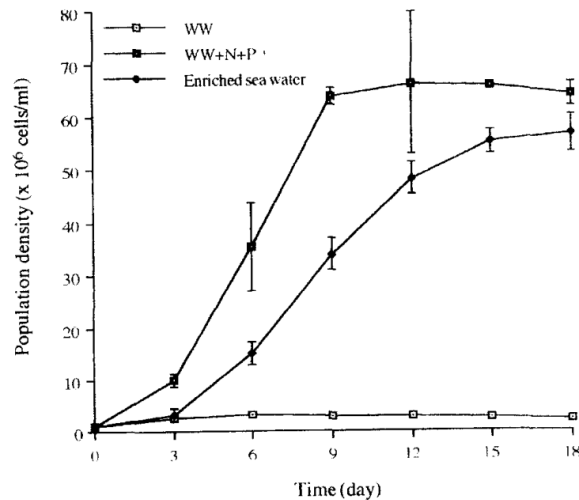
Στο πείραμα 3, οι ποιοτικοί παράμετροι του νερού των τροχοζώων, όπως το pH, δεν διαφέρουν σημαντικά καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας. Η μέση τιμή του pH

ήταν 7.42 ± 0.36 .



Εικ. 1. Αύξηση του *Nannochloropsis sp.* σε εμπλουτισμένο νερό καλλιέργεια ανακύκλωσης φυκών. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση.

Fig. 1. Growth of *Nannochloropsis sp.* in enriched water and in recycled algal culture. Error bars denote standard deviation.



Εικ. 2. Αύξηση του *Nannochloropsis sp.* σε λύματα τροχοζώων, εμπλουτισμένα λύματα τροχοζώων, και εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό: WW, λύματα τροχοζώων, WW+N+P, λύματα τροχοζώων όπου οι συγκεντρώσεις του αζώτου και φωσφόρου προσαρμόστηκαν ώστε να ταιριάζουν με αυτά των εμπλουτισμένων λυμάτων. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση.

Fig. 2. Growth of *Nannochloropsis sp.* in rotifer waste water, enriched rotifer waste water, and enriched sea water: WW, rotifer waste water; WW+N+P, rotifer waste water where nitrogen and phosphorus concentrations were adjusted to match those of enriched sea water. Error bars denote standard deviation.

Η μεταβολή της ολικής συγκέντρωσης του αζώτου έδειξε σταδιακή αύξηση κατά τις

πρώτες 3 εβδομάδες, αλλά ξαφνικά εμφανίσθηκε τάση για μια χαμηλότερη συγκέντρωση την τέταρτη εβδομάδα (Πίνακας 1). Η μείωση αυτή μπορεί να οφείλεται στη νιτρική αναπνοή ή απονιτροποίηση (Alexander, 1961). Υποτίθεται ότι σε περίπτωση απουσίας του μοριακού οξυγόνου, πολλοί μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιούν το νιτρικό ή άλλες οξειδωμένες μορφές του αζώτου αντί του οξυγόνου ως αποδέκτες ηλεκτρονίων στην αναπνοή. Οι αέριες μορφές του αζώτου απελευθερώνονται ως μεταβολίτες που χάθηκαν από το σύστημα (Boyd, 1990).

Πίνακας 1

Η συγκέντρωση του ολικού αζώτου (TN), του ολικού φωσφόρου (TP), και του ανόργανου άνθρακα (IC) στο νερό της καλλιέργειας τροχοζώων και η μέγιστη κυτταρική πυκνότητα του *Nannochloropsis sp.* σε διαφορετικές ηλικίες καλλιέργειας.

Table 1

The concentration of total nitrogen (TN), total phosphorus (TP), and inorganic carbon (IC) in rotifer culture water and the maximum cellular density reached by *Nannochloropsis sp.* at different culture ages.

Rotifer culture period	TN ($\mu\text{g at. l}^{-1} \pm \text{SD}$)	TP ($\mu\text{g at. l}^{-1} \pm \text{SD}$)	IC ($\text{mg l}^{-1} \pm \text{SD}$)	Maximum cellular density ($\times 10^6$ cells ml^{-1})
Day 0	168.5 \pm 23.8 a	3.1 \pm 0.3 a	21.2 \pm 1.2 b	3.3 \pm 0.5 a
1 week	277.6 \pm 15.4 b	25.3 \pm 0.4 b	18.7 \pm 0.6 b	21.5 \pm 5.1 b
2 weeks	369.6 \pm 20.8 c	49.2 \pm 5.7 d	17.0 \pm 0.1 b	31.4 \pm 2.6 c
3 weeks	527.4 \pm 3.1 d	146.8 \pm 10.1 e	21.6 \pm 6.9 b	45.2 \pm 4.3 d
4 weeks	363.7 \pm 5.9 e	179.4 \pm 6.5 f	19.7 \pm 2.5 b	69.9 \pm 1.1 f
Control	833.6 \pm 1.4 e	32.9 \pm 0.9 c	14.8 \pm 0.1 a	56.5 \pm 3.4 e

Groups of treatments with the same letter are not significantly different at $P < 0.05$.

Η ολική συγκέντρωση φωσφόρου παρουσίασε μια σταθερή αύξηση κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου. Οι τιμές κυμαίνονταν από $3.1 \pm 0.3 \mu\text{g at. l}^{-1}$ στην αρχή του πειράματος μέχρι $180 \pm 6.5 \mu\text{g at. l}^{-1}$ κατά την 4 εβδομάδα καλλιέργειας των λυμάτων τροχοζώων (Πίνακας 1). Η συγκέντρωση του ανόργανου άνθρακα δεν διαφέρει σημαντικά κατά τη διάρκεια του πειράματος. Η μέση τιμή της συγκέντρωσης του ανόργανου άνθρακα ήταν $20 \pm 2 \text{ mg ανά l}$.

Το τροχοζώο *Brachionus plicatilis* εμφάνισε μια περισσότερο ή λιγότερο σταθερή πυκνότητα πληθυσμού μέχρι το τέλος του πειράματος, με μέσο όρο τα 119 ± 15 άτομα ανά ml. Με αυτό το σύστημα της καλλιέργειας, οι συνθήκες αυτές διατηρήθηκαν επαρκείς για την ικανοποιητική αύξηση των τροχοζώων κατά την περίοδο της καλλιέργειας. Οι συγκεντρώσεις ολικού αζώτου, ολικού φωσφόρου, ανόργανου άνθρακα, και το pH κρατήθηκαν σε ανασταλτικές τιμές σε σχέση με εκείνες που καταγράφηκε από του Hirata *et. al.* (1983).

Η καλλιέργεια του *Nannochloropsis sp.* στα λύματα των τροχοζώων σε διαφορετικές ηλικιακά καλλιέργειες έδειξαν ανώτατο όριο κυτταρική πυκνότητα τα 69.8×10^6 κύτταρα ανά ml. Η τιμή αυτή λαμβανόταν στα 4 εβδομάδων λύματα τροχοζώων όπου το συνολικό άζωτο και ο ολικός φωσφόρος ήταν σε συγκεντρώσεις 364 και $178 \mu\text{g at. l}^{-1}$, αντίστοιχα. Η ανάπτυξη αυτή ήταν 23% υψηλότερη από εκείνη του μάρτυρα, η οποία οριστικοποιήθηκε ως βιομάζα στη στατική φάση στα 54×10^6 κυττάρων ανά ml (Πίνακας 1).

Συνήθως, στα ιαπωνικά ιχθυοτροφεία, το *Nannochloropsis sp.* χρησιμοποιείται όταν η πυκνότητα καλλιέργειας είναι περίπου 30×10^6 κύτταρα ανά ml (Iki and Suehara, 1989). Στη μελέτη αυτή, η πυκνότητα αυτή παρατηρήθηκε στα λύματα τροχοζών μόνο μετά από 2 εβδομάδες από την έναρξη, όπου το ολικό άζωτο και ο ολικός φωσφόρος είχαν φτάσει τα 370 και 49 $\mu\text{g at. l}^{-1}$, αντίστοιχα (Πίνακας 1). Στην πραγματικότητα, ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη της υψηλής πυκνότητας του πληθυσμού του *Nannochloropsis sp.* στα λύματα των τροχοζών εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ολικού αζώτου και φωσφόρου. Άζωτο και φώσφορος θεωρήθηκαν οι σημαντικές θρεπτικές ουσίες που απαιτούνται για τη φυσιολογική ανάπτυξη των φυκών (Sverdrup *et al.* 1942; Khul, 1962; Odum, 1971).

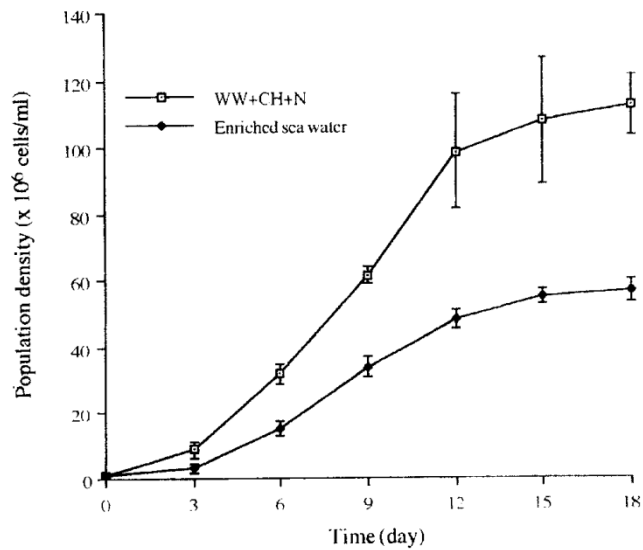
Στο πείραμα 4, η χημική ανάλυση και των δύο μέσων εμπλουτισμού, έδειξε έλλειψη αζώτου. Οι συγκεντρώσεις του ολικού αζώτου και φωσφόρου σε αποστειρωμένη κοπριά πουλερικών ήταν $61 \pm 14 \mu\text{g at. l}^{-1}$ και $1717 \pm 109 \mu\text{g at. l}^{-1}$, αντίστοιχα. Σε όμοιες συγκεντρώσεις ολικού αζώτου και φωσφόρου, το μέσο καλλιέργειας που υποστηρίχτηκε με κοπριά κοτόπουλου είχε ως αποτέλεσμα έκδηλες διαφορές σε ρυθμούς ανάπτυξης σε σύγκριση με το εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό. Η μέγιστη κυτταρική πυκνότητα του γένους *Nannochloropsis sp.* σε λύματα τροχοζών που ήταν εφοδιασμένο με κοπριά κοτόπουλου λήφθηκε κατά τη στατική φάση και ήταν 112×10^6 κύτταρα ανά ml. Αυτή η αύξηση ήταν σχεδόν διπλάσια εκείνης που παράγεται στην καλλιέργεια μάρτυρα, η οποία κατέληξε σε τελική βιομάζα στην στατική φάση της τάξης των 57×10 κύτταρα ανά ml (Εικ. 3).

Η διαφορά αυτή μπορεί πιθανότατα να οφείλεται σε κάποια συνθετικά πρόσθετα (μικρο-θρεπτικά και βιταμίνες) που ενσωματώνονται στις ζωοτροφές των κοτόπουλων. Αυτά μπορεί να έχουν βρει το δρόμο τους στην κοπριά και εμμέσως μέσα στο μέσο.

Η συγκέντρωση του ολικού αζώτου και ολικού φωσφόρου στο πρόσθετο αποσυντεθημένο κρέας του καρχαρία ήταν $284 \pm 12 \mu\text{g at. l}^{-1}$ και $2069 \pm 278 \mu\text{g at. l}^{-1}$, αντίστοιχα. Στο νωπό κρέας του καρχαρία, ο λόγος N:P υπολογίστηκε ως 45:1 (Kagawa, 1994). Στα παρόντα δεδομένα, η χαμηλή συγκέντρωση του αζώτου μπορεί να οφείλεται στην απώλεια του φυσικού αερίου αζώτου κατά τη διάρκεια της μακράς (5 έτη) διαδικασία της αποσύνθεσης. Ωστόσο, σε σχεδόν ίδια συγκέντρωση του αζώτου, στο εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό, αυξάνεται η ανάπτυξη του *Nannochloropsis sp.* στα εμπλουτισμένα λύματα των τροχοζών με το αποσυντιθέμενο κρέας του καρχαρία. Η μέγιστη κυτταρική πυκνότητα που λαμβάνεται κατά τη στατική φάση ήταν 69×10 κύτταρα ανά ml. Η τιμή αυτή είναι 22% υψηλότερη από αυτή που λαμβάνεται από το εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό (Εικ. 4).

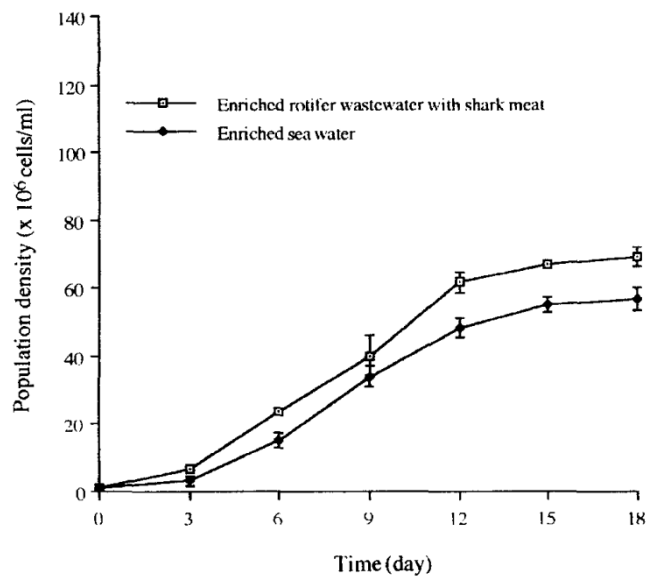
Συνήθως ο καρχαρίας θεωρείται ένα ψάρι του κλάδου της αλιείας που συλλέγεται με παραγάδι. Στην Ιαπωνική αλιεία αντιπροσωπεύει περίπου το 23% όλων των αλιευμένων ψαριών (Hirata *et al.*, 1980). Η κοπριά κοτόπουλου χρησιμοποιείται για τη λίπανση του εδάφους και αποτελεί δυνητική απειλή για το περιβάλλον.

Η πιθανότητα χρησιμοποίησης ενός μείγματος νέο-αποσυντεθημένου κρέατος καρχαρία ως πηγή αζώτου και κοπριά κοτόπουλου ως πηγή φωσφόρου για την ενίσχυση της ανάπτυξης του *Nannochloropsis sp.* σε λύματα τροχοζών θα μπορούσε να είναι μια καλή εναλλακτική λύση διάθεσης για τα απόβλητα αυτά. Ίσως αυτό το πείραμα μπορεί να αναπαραχθεί σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια και η αποτελεσματικότητά της μπορεί να ενισχυθεί σε μια περιοχή όπου το ηλιακό φως είναι διαθέσιμο. Συμπληρωματικές εργασίες σχεδιάζονται για την αξιολόγηση της χρήσης αυτών των διαδικασιών σε εμπορικής κλίμακας παραγωγή των εμπορεύσιμων τροχοζών και των θαλασσινών φυκών.



Εικ. 3. Αύξηση του *Nannochloropsis sp.* στα εμπλουτισμένα λύματα τροχοζώων με εκχύλισμα κοπριάς κοτόπουλων, πηγής ανόργανου αζώτου (WW+CH+N), και εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση.

Fig. 3. Growth of *Nannochloropsis sp.* in enriched rotifer waste water with chicken manure extract and an inorganic nitrogen source (WW+CH+N), and enriched sea water. Error bars denote standard deviation.



Εικ. 4. Αύξηση του *Nannochloropsis sp.* στα εμπλουτισμένα λύματα τροχοζώων με κρέας καρχαρία σε αποσύνθεση και εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση.

Fig. 4. Growth of *Nannochloropsis sp.* in rotifer waste water enriched with fermented shark meat and enriched sea water. Error bars denote standard deviation.

Παραπομπές

- Alexander, M., 1961. Introduction to Soil Microbiology. John Wiley and Sons, New York, 472 pp.
- Boney, A.D., 1965. A Biology of Marine Algae. Hutchinson Educational Ltd, London, 216 pp.
- Boyd, C.E., 1990. Water Quality in Ponds for Aquaculture. Birmingham Publishing Co., Birmingham, AL, 482 pp.
- Buggeln, R.C. 1974. Physiological investigations on *Alaria esculanta* (L.) Grev. (Laminariales). 1. Elongation of the blade. J. Phycol., 10, 228-283.
- De Pauw, N., De Leenheer, L., 1979. Mass culturing of marine and freshwater algae on aerated swine manure. In: Styczynska-Jurewicz, E., Backiel, T., Jaspers, E., Persoone, G. (Eds.), Cultivation of Fish Fry and its Live Food. Proc. Conf. Szymbark, 23-28 September 1977, Poland. European Mariculture Society. Spec. Publ. No. 4, pp. 441-473.
- Gomez, K.A., Gomez, A.A., 1984. Statistical Procedures for Agricultural Research. 2nd ed. John Wiley and Sons, New York, 680 pp.
- Hirata, H. 1974. An attempt to apply an experimental microcosm for the mass culture of marine rotifer-*Rachionus plicatilis*, O.F. Muller. Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ., 23. 16% 172
- Hirata, H. 1977. Zooplankton cultivation and prawn seed production in an artificial ecosystem. Helgoländer Meeresunters. 30, 230-242.
- Hirata, H. 1978a. Principle of feedback culture system and its developmental experiment. Yoshoku. 11, 34-37.
- Hirata, H. 1978b. Seed-production of prawn, *Penaeus japonicus*. with reference to application of activated sludge method. Food Ind. (Tokyo), 21, 10 20-34.
- Hirata, H. and Kohirata, E. 1989. Slant/rotary culture equipment using multiple hotplates. Samsanzoshokki. 325-326.
- Hirata, H. and Nagata, W. 1982. Excretion rates and excreted compounds of the rotifer *Rachionus plicatilis* O.F. Müller in culture. Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ., 11. 174-174
- Hirata, H., Yamasaki, S., 1980. Steady-state zooplankton community in a feedback culture system. 111 Giesy, J.P. (Ed.). Microcosms in Ecological Research. Symp. Ser 57. US Department of Energy, pp 402-415.
- Hirata, H., Makita, T., Ikeda, F., Higashikawa, S., Nishi, T., Arima, S., Masumitsu, S., and Iorluaki. 1980. Distribution ratio of useable trash caught by long-line fishing. Mem. Kagoshima Univ. Res. Center S. Pac. 1 (I).
- Hirata, H., Yamasaki, S., Kawaguchi, T. and Ogawa, M. 1983. Continuous culture (periphyton) of *Rachionus plicatilis* fed recycled algal diets. Hydrobiologia. 104. 71-75.
- Iki, H., Suehara, H., 1989. Production of *Nannochloropsis* sp. in large SILC tank. Activity Report 01 Hyogo Prefectural Fish Farming Center During 1988- 1989, pp. 17- 18 (in Japanese).
- Johannes, R.E. 1964. Phosphorus excretion and body size in marine animals: microzooplankton and nutrient regeneration. Science, 146, 923-924.
- Kagawa, A., 1994. Standard tables of food composition in Japan. Woman's (University of Nutrition). Tokyo, pp. 130.
- Kerry, A., Laudenbach, D.E. and Trick, C.G. 1988. Influence of iron limitation and nitrogen SOLI-CLO'n growth and siderophore production by cyanobacteria. J. Phycol., 24. 3 571-571
- Ketchum, B.H., 1969. Eutrophication of Estuaries. Eutrophication. Cause. (Consequence. Corrective, Nat. Acad. Sci., Publ. 1700. Washington, DC, pp. 197-209.
- Khul, A., 1962. Inorganic phosphorus uptake and metabolism. In: Ivin, A. (Ed.). Physiology and Biochemistry of Algae. Academic Press, New York, USA.
- Nigata, W.D., 1989. Nitrogen flow through a *Bruellionusichlorococcus* mass culture system. Hydrobiologia 186/187: 401-40X.
- Odum, E.P., 1971. Fundamentals of Ecology. Toppan Co. Ltd. Tokyo. Japan. 574 pp.
- Parsons, T.R., Maita, Y., Lalli, C.M., 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for Water Analysis. Pergamon Press. UK, 173 pp.
- Provasoli, L., 1968. Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: Watanabe, A., Hatlorr, A. (Eds.), Culture and Collection of Algae. Proc. US-Japan (Conference. September 1968. In Plant. Physiol, pp. 63-75.
- Ryther, J.H. and Dunstan, W.M. 1971. Nitrogen, phosphorus anti eutrophication in the (oceanic marine environment. Science, 171, 144- 152.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A Practical Handbook of Sea Water Analysis. The Journal of the Fisheries Research Board of Canada, No. 167. 2nd ed., Ottawa, Canada, 310 pp.
- Sverdrup, H.U., Johnson, M.W., Fleming, R.H., 1942. The Oceans. Their Physics. (Chemistry and General Biology. Prentice-Hall, New York. USA. 1087 pp.

- Yamasaki, S. and Hirata, H. 1988. Optimum food consumption rate of I-type rotifer *Hirataea plicatilis* in culture on the basis of the growth rate and water quality maintenance. *Suisanzoshoku*. 1.253-257.
- Yamasaki, S., Tanabe, K., Hirata, H., 1989. Efficiency of chilled and frozen *Nannochloris* sp. (Marine Chlorella) for culture of rotifer. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.*. Vol. 3X. I. 77-82.

Ένα Εντατικό Σύστημα Χημειοστατικής Καλλιέργειας για την Παραγωγή Τροχοζώων στις Υδατοκαλλιέργειες

An Intensive Chemostat Culture System for the Production of Rotifers for Aquaculture

CHARLES M. JAMES and T.S. ABU-REZEQ

Kuwait institute for Scientific Research, Mariculture and Fisheries Department,
P.O. Box 1638, 22017 Salmiya (Kuwait)

Aquaculture, 81 (1989) 291-301

Περίληψη

Ένα αυτοματοποιημένο σύστημα συνεχούς εντατικής καλλιέργειας, με βάση τις αρχές της χημειοστατικής, για να παραχθούν δύο στελέχη του τροχοζώου *Brachionus plicatilis* (L και S-τύπου) έχει ερευνηθεί. Χρησιμοποιώντας μια δεξαμενή από υαλοβάμβακα 1 m³ χωρητικότητας, κατέστη δυνατόν να επιτευχθεί μία μέση παραγωγή των 308.75 x 10⁶ άτομα ανά m³ ανά ημέρα τροχοζώα τύπου S και 186.71 x 10⁶ άτομα ανά m³ ανά ημέρα τροχοζώα τύπου L στο σύστημα της καλλιέργειας. Τα τροχοζώα είχαν τραφεί με απομονωμένα μικροφύκη *Nannochloropsis* στέλεχος MFD-2, το οποίο έχει παραχθεί χρησιμοποιώντας φύκη από χημειοστάτες. Μαγιά αρτοποιίας χρησιμοποιήθηκε ως διατροφικό συμπλήρωμα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η παραγωγικότητα των τροχοζώων στο σύστημα συνεχούς καλλιέργειας είναι σημαντικά υψηλότερη από ότι σε οποιοδήποτε από τα συμβατικά συστήματα που περιγράφονται μέχρι σήμερα για τους υδατοκαλλιεργητικούς σκοπούς. Επιπλέον, η σύσταση σε ω3-λιπαρά οξέα των τροχοζώων στο σύστημα καλλιέργειας δείχνει ότι τα τροχοζώα περιέχουν επαρκείς ποσότητες των απαραίτητων λιπαρών οξέων που απαιτούνται για τις θαλάσσια νύμφες των ψαριών και περαιτέρω θρεπτικός εμπλουτισμός δεν χρειάζεται.

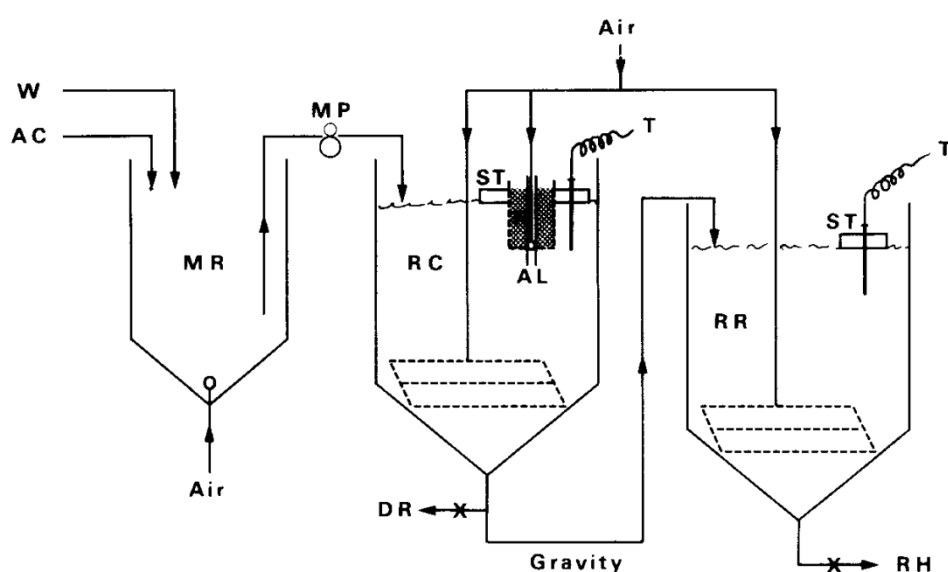
Σκοπός

Η παρούσα μελέτη σκοπό είχε την αξιολόγηση της παραγωγής και της σύστασης των λιπαρών οξέων δυο στελεχών τροχοζώων κάτω από συνεχές και αυτόματο σύστημα καλλιέργειας και υπό ελεγχόμενες καλλιεργητικές συνθήκες.

Υλικά και μέθοδοι

Οι έρευνες πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση τροχοζώων τύπου S *Brachionous plicatilis rotundiformis* (μέγεθος 95-160 μm) και τροχοζώων τύπου L *Brachionous plicatilis typicus* (μέγεθος 220-300 μm) σε δύο σταδίων εντατικής συνεχούς καλλιέργειας του συστήματος (Εικ. 1). Το στάδιο 1 συνεχούς καλλιέργειας φυκών αποτελείται από 200 l χωρητικότητας ημιδιαφανείς κάθετες σωλήνες (διαμέτρου 30 cm) κατασκευασμένες από μη διαβρωμένο υαλοβάμβακα ενισχυμένο με φύλλα πολυμερών (Solar Components Corporation, ΗΠΑ). Οι James *et al.* (1988) έχουν περιγράψει το στάδιο 1 φυκών σχεδιασμού χημειοστατικής καλλιέργειας και την παραγωγικότητα των φυκών υπό ελεγχόμενες συνθήκες καλλιέργειας. Το στάδιο 2 καλλιέργειας τροχοζώων αποτελείτο από μια 1 m³ χημειοστατική μονάδα εφοδιασμένης με αντιδραστήρα ανάμιξης 500 l χωρητικότητας. Το επιθυμητό επίπεδο

θηραμάτων των τροχοζώων ήταν συγχρονισμένο με μια αντλία από την ανάμιξη της χημειοστατικής καλλιέργειας των τροχοζώων με τον αντιδραστήρα ανάμιξης. Η έκπλυση ή αλλιώς τα παραγόμενα τροχοζώα από τη χημειοστατική καλλιέργεια των τροχοζώων συλλέγονταν με τη χρήση δεξαμενής συγκέντρωσης 1 m³ χωρητικότητας. Δύο τέτοιες μονάδες χρησιμοποιούνται για την εκτέλεση των πειραμάτων. Οι χημειοστάτες των τροχοζώων επίσης συνδέθηκαν με θερμοστάτες (1000 W) για τη σταθεροποίηση της θερμοκρασίας στους 25°C. Ένα δοχείο 20 l γεμάτο με πλαστικά δαχτυλίδια και στο οποίο προσαρμόστηκε υποδοχή αέρα (air lift), εγκαταστάθηκε σε κάθε μονάδα (Εικ. 1) με σκοπό την προσκόλληση βακτηριδίων και την παράγερση μεγάλων σωματιδίων (> 1 mm). Για κάθε σειρά πειραμάτων το σύστημα παραγωγής λειτουργούσε για 2 εβδομάδες.



Εικ. 1. Σχηματικό διάγραμμα του συνεχούς καλλιεργητικού συστήματος: W- είσοδος νερού 30%; AC- είσοδος από το στάδιο 1 φυκών χημειοστατικών; MR- αντιδραστήρας ανάμιξης; MP- αντλία βυθιζόμενου μετρητή; RC- χημειοστατική καλλιέργεια τροχοζώων; ST- επιπλέον φελιζόλ; T- ρυθμιστής θερμοκρασίας; AL- υποδοχή αέρα; DR- διαρροή εξόδου; RH- έξοδος για συλλογή τροχοζώων.

Fig. 1. Schematic diagram of the continuous rotifer culture system: W- 30% water inlet; AC- inlet from stage-1 algal chemostat; MR- mixing reactor; MP- piston metering pump; RC- rotifer chemostat; ST- Styrofoam float; T- temperature controller; AL- air lift; DR- drain-age outlet; RR- rotifer reservoir; RH- outlet for rotifer harvest.

Ένα τοπικό απομονωμένο στέλεχος φύκους *Nannochloropsis* MFD-2 που παράχθηκε κατά τη φάση 1 χημειοστατικής καλλιέργειας φυκών, χρησιμοποιήθηκε για να τροφοδοτήσει τα τροχοζώα σε συγκέντρωση 20×10^6 κύτταρα φυκών ανά ml. Για την απόκτηση αυτής της συγκέντρωσης των κυττάρων στο σύστημα καλλιέργειας, τα φύκη που παράχθηκαν στο στάδιο 1 (μέση κυτταρική συγκέντρωση 50×10^6 κύτταρα/ml) αναμείχθηκαν με αραιωμένο θαλασσινό νερού 30% αλατότητας στον αντιδραστήρα ανάμιξης πριν την άντληση στη χημειοστατική καλλιέργεια των τροχοζώων. Τα κύτταρα των φυκών μετρήθηκαν με αιμοκυτταρόμετρο. Η μαγιά χρησιμοποιήθηκε ως διατροφικό συμπλήρωμα κατά μέσο όρο περίπου από 0,3 έως 0,4 g ανά 10^6 τροχοζώων ανά ημέρα. Η καταμέτρηση του πληθυσμού των

τροχοζώων πραγματοποιήθηκε από πέντε δείγματα του 1 ml που συλλέγονταν τυχαία και σταθεροποιούνταν με μία σταγόνα διαλύματος lugols. Η δυναμική παραγωγή των τροχοζώων υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση που συζητήθηκε από τους James *et al.* (1986). Ο ρυθμός αραίωσης ήταν συγχρονισμένος με τον ρυθμό αύξησης του πληθυσμού, με τη χρήση αντλιών που συνδέονται με ένα χρονόμετρο. Η θερμοκρασία του νερού ήταν σταθερή στους 25°C και για τους δύο τύπους τροχοζώων. Ο ρυθμός αραίωσης είχε προσαρμοστεί ανάλογα με το ποσοστό αύξησης των τροχοζώων και κατά μέσο όρο ήταν 0,6 ανά ημέρα για τον S-τύπο και 0,5 ανά ημέρα για τον L-τύπο τροχοζώων. Κατ'αρχάς, αμικτικά τροχοζώα εγκλιματισμένα σε στέλεχος *Nannochloropsis* MFD-2 χρησιμοποιήθηκαν στον εμβολιασμό των καλλιέργειών με συγκέντρωση περίπου 50 τροχοζώα ανά ml. Οι καταμετρήσεις του πληθυσμού, το pH και το DO ελέγχονταν κάθε 24 ώρες. Το ξηρό βάρος των τροχοζώων υπολογίστηκε από ξηρά δείγματα πάγου και φούρνου και κατά μέσο όρο ήταν 0,22 μg ανά *B. plicatilis* S τύπου και 0,33 μg ανά *B. plicatilis* L τύπου. Η μετατρεψιμότητα της τροφής (food conversion rate) αντιστοιχίστηκε με το σύνολο της βιομάζας των τροφών που καταναλώνονταν ανά ημέρα, διαιρούμενο από τη βιομάζα (ίδιες μονάδες) των τροχοζώων που παράγονται ανά ημέρα. Η σύσταση των λιπαρών οξέων στα φύκη και τα τροχοζώα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τυπικές μεθόδους, όπως περιγράφονται από τους James *et al.* (1988). Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη μέθοδο ANOVA ($P < 0.05$).

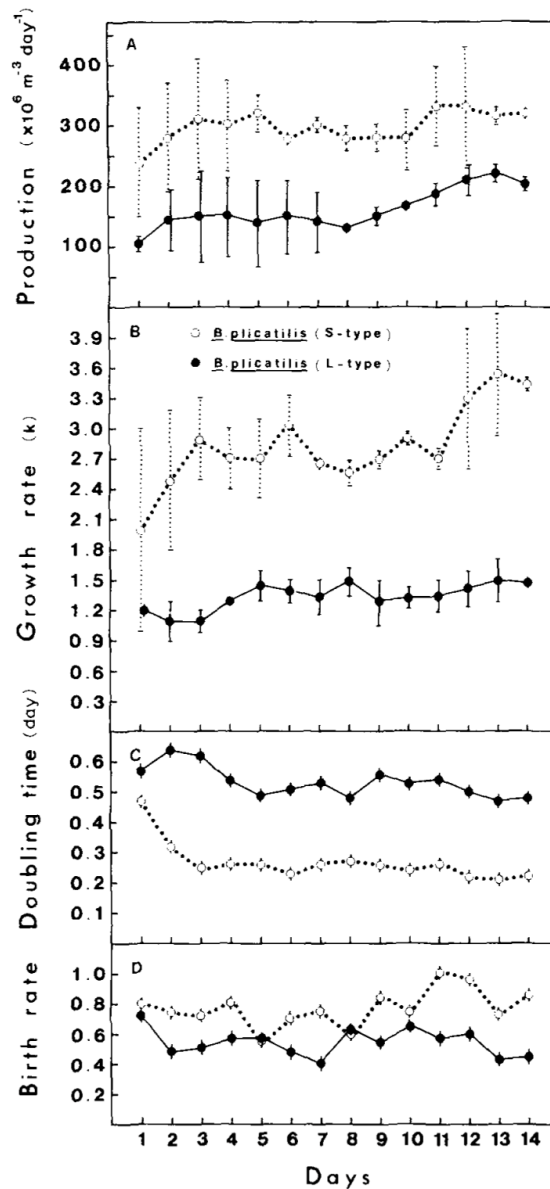
Αποτελέσματα

Δυναμική παραγωγής των τροχοζώων

Η Εικ. 2a δείχνει την παραγωγή των S και L-τύπου τροχοζώων στο χημειοστατικό σύστημα καλλιέργειας. Κατά την περίοδο της έρευνας, η παραγωγικότητα των S-τύπου τροχοζώων κυμάνθηκε μεταξύ των 148 και 427x10⁶ τροχοζώα ανά ml³ ανά ημέρα, με μέσο όρο τα 308.75±65.79x10⁶ τροχοζώα ανά ml³ ανά ημέρα, και η παραγωγικότητα των L-τύπου κυμάνθηκε μεταξύ των 63 και 238x10⁶ τροχοζώα ανά ml³ ανά ημέρα με μέσο όρο τα 186.71± 43.26x10⁶ τροχοζώα ανά ml³ ανά ημέρα. Η παραγωγή του S-τύπου τροχοζώων στο σύστημα της καλλιέργειας ήταν σημαντικά υψηλότερο ($P < 0.0001$) από εκείνη του L-τύπου τροχοζώων. Επιπλέον, το ξηρό βάρος του S-τύπου τροχοζώων παραγόμενης βιομάζας (Πίνακας 1) στο σύστημα της καλλιέργειας, ήταν επίσης σημαντικά μεγαλύτερο ($P < 0,01$) από ότι του L-τύπου. Η μετατρεψιμότητα της τροφής (Πίνακας 1) του S-τύπου ήταν σημαντικά χαμηλότερη ($P < 0.0001$) από εκείνο του L-τύπου τροχοζώων.

Ο ρυθμός ανάπτυξης (Εικ. 2b) του S-τύπου τροχοζώων κυμάνθηκε μεταξύ 0.99 και 4.25 ανά ημέρα, με μέσο όρο τα 2.99±0.54 ανά ημέρα, και του L-τύπου κυμάνθηκε μεταξύ 0.89 και 1.72 ανά ημέρα, με μέσο όρο τα 1.36±0.21 ανά ημέρα κατά τη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης. Η αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των S-τύπου τροχοζώων ήταν ιδιαίτερα σημαντική ($P < 0.0001$) σε σύγκριση με τον L-τύπου. Για τον S-τύπο ο χρόνος διπλασιασμού (Εικ. 2c) κυμάνθηκε μεταξύ 0.16 και 0.70 ανά ημέρα με μέσο όρο 0.27±0.13 ανά ημέρα, ο οποίος ήταν σημαντικά χαμηλότερος ($P < 0.0001$) από εκείνον του L-τύπου τροχοζώων που κυμάνθηκε μεταξύ 0.40 και 0.78 ανά ημέρα με μέσο όρο 0.53±0.09 ανά ημέρα στο σύστημα καλλιέργειας. Ο ρυθμός γεννήσεων (Εικ. 2d) του S-τύπου τροχοζώων κυμάνθηκε μεταξύ 0.42 και 1.09 με μέσο όρο 0.80±0.18 ανά ημέρα, η οποία ήταν επίσης σημαντικά υψηλότερος ($P < 0.0001$) από εκείνον του L-τύπου που κυμάνθηκε μεταξύ 0.30 και 0.84 ανά ημέρα με μέσο όρο 0.53±0.08 ανά ημέρα στο σύστημα της καλλιέργειας. Δεν υπήρξε

σημαντική διαφορά ($P>0.05$) στη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου που παρατηρήθηκε για τον S-τύπο (3.2-4.8 ppm) και L-τύπου (3.6-5.0 ppm) τροχοζώων στο σύστημα καλλιέργειας. Επίσης, δεν υπάρχει σημαντική διαφορά ($P> 0.05$) στο pH του νερού της καλλιέργειας που παρατηρήθηκε μεταξύ του S-τύπου (7.55-7.86) και L-τύπου (7.71- 7.98) τροχοζώων.



Εικ. 2. Δυναμικές παραγωγής του S (o) και L (•) τύπου τροχοζώων σε συνεχές καλλιεργητικό σύστημα. Η κάθετη μπάρα αντιπροσωπεύει το εύρος. Ανοιχτοί και κλειστοί κύκλοι αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές τη συγκεκριμένη ημέρα. (a) παραγωγικότητα, (b) ρυθμός ανάπτυξης, (c) χρόνος διπλασιασμού και (d) ρυθμός γεννήσεων του *Brachionus plicatilis* S και L-τύπου τροχοζώων στο καλλιεργητικό σύστημα.

Fig. 2. Production dynamics of S (o) and L (•) type rotifers in the continuous culture system. Vertical bar indicates the range. Open and closed circles indicate the mean values on that day. (a) Productivity, (b) growth rate, (c) doubling time and (d) birth rate of *Brachionus plicatilis* S and L-type rotifers in the culture system.

Παραγωγή βιομάζας τροχοζώων και μετατρεψιμότητα τροφής στο συνεχές καλλιεργητικό σύστημα

TABLE 1

Rotifer biomass production and food conversion ratio in the continuous culture system

Rotifer biomass production and food conversion ratio in the continuous culture system				
Rotifer type	Biomass (dry wt. g m ⁻³ day ⁻¹)		Food conversion ratio	
	Range ^a	Mean ± SD	Range ^a	Mean ± SD
<i>B. plicatilis</i> S-type	41.09-96.50	65.96 ± 15.15	3.07- 6.16	4.43 ± 1.02
<i>B. plicatilis</i> L-type	26.12-78.94	53.63 ± 17.64	5.08-13.92	7.92 ± 3.02

^an=28.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

Σύσταση λιπαρών οξέων (% έκταση) στο στέλεχος *Nannochloropsis* MFD-2 και στον S- και L- τύπο τροχοζώων του ταΐστηκαν με το στέλεχος *Nannochloropsis* MFD-2

TABLE 2

Fatty acid composition (area %) in *Nannochloropsis* strain MFD-2 and in the S- and L-type rotifers fed with *Nannochloropsis* strain MFD-2

Fatty acid composition (area %) in *Nannochloropsis* strain MFD-2 and in the S- and L-type rotifers fed with *Nannochloropsis* strain MFD-2

Fatty acid	<i>Nannochloropsis</i> strain MFD2		<i>B. plicatilis</i> S-type		<i>B. plicatilis</i> L-type	
	Range ^a	Mean ± SD	Range ^a	Mean ± SD	Range ^a	Mean ± SD
14:0	7.3- 7.7	7.5 ± 0.15	2.4- 2.8	2.58 ± 0.15	3.1- 3.6	3.20-0.24
14:1ω9	-	-	-	-	-	-
15:0	0.3- 0.5	0.38 ± 0.08	0.7- 0.9	0.78 ± 0.08	0.5- 0.7	0.55 ± 0.09
16:0	16.3-27.9	22.63 ± 4.54	13.9-17.5	15.63 ± 1.48	12.0-17.7	13.45 ± 2.45
16:1ω9	17.1-19.4	18.75 ± 0.96	14.5-15.3	14.90 ± 0.29	10.8-19.2	17.03 ± 3.59
17:0	0.0- 0.5	0.33 ± 0.19	0.5- 0.8	0.68 ± 0.13	0.3- 0.5	0.35 ± 0.09
18:0	b	-	b	-	4.6- 5.6	4.88 ± 0.42
18:1ω9	2.0- 3.9	3.00 ± 0.86	20.6-25.5	23.08 ± 2.19	8.9-15.9	14.13 ± 3.02
18:2ω6	2.3- 5.2	3.73 ± 1.08	2.3- 2.4	2.35 ± 0.05	4.5-11.4	6.25 ± 2.97
18:3ω6	-	-	-	-	0.0- 0.3	0.23 ± 0.13
18:3ω3	0.0- 0.6	0.33 ± 0.24	-	-	0.6- 2.6	1.10 ± 0.87
19:0	0.6- 1.1	0.90 ± 0.19	-	-	-	-
20:0	-	-	-	-	0.0- 0.5	0.38 ± 0.22
20:1ω9	-	-	1.5- 2.6	2.05 ± 0.55	1.2- 1.7	1.55 ± 0.21
20:2ω6	-	-	-	-	-	-
20:3ω3	4.0- 4.6	4.23 ± 0.23	5.0- 5.2	5.10 ± 0.07	4.2- 4.4	4.30 ± 0.07
20:4ω3	-	-	-	-	0.0- 0.3	0.23 ± 0.13
20:5ω3	27.8-37.8	31.18 ± 4.01	13.0-14.8	13.88 ± 0.79	14.8-20.1	18.68 ± 2.24
22:1ω5	-	-	0.5- 0.8	0.68 ± 0.13	0.4- 0.8	0.50 ± 0.17
22:3ω3	-	-	0.9- 1.4	1.13 ± 0.19	0.4- 0.9	0.53 ± 0.22
22:4ω3	-	-	-	-	-	-
22:5ω3	-	-	-	-	-	-
22:6ω3	-	-	8.0- 9.0	8.58 ± 0.38	3.4- 4.5	4.2 ± 0.46
24:0	-	-	0.0- 0.5	0.25 ± 0.12	-	-
24:1ω6	-	-	-	-	0.0- 0.3	0.23 ± 0.13
Σω3-HUFA	32.6-41.8	36.00 ± 3.72	27.5-29.8	28.68 ± 1.00	26.0-30.3	29.03 ± 1.75
Total lipid%	15.0-22.0	18.38 ± 2.77	21.7-25.8	23.90 ± 1.87	22.6-23.7	23.35 ± 0.45

^an=4.

^b18:0 and 18:1ω9 are together.

- = not detected.

Σύσταση των λιπαρών οξέων

Τη σύσταση των λιπαρών οξέων του στελέχους *Nannochloropsis* MFD-2, το οποίο χρησιμοποιείται για τη διατροφή των τροχοζώων, έδειξε ότι ανάμεσα στα ω3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (ω3-HUFA), το εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA 20:5ω3) είναι το κυρίαρχο οξύ που ακολουθείται από το 20:3ω3 (Πίνακας 2). Η μακρά αλυσίδα του δεκοσαεξαενοϊκού οξέος (22:6ω3) ήταν απών. Το λινολεϊνικό οξύ (18:3ω3) ήταν ελάχιστο

(<1%). Μεταξύ των λιπαρών οξέων του S και L-τύπου τροχοζώων, το EPA 20:5ω3 περιεχόμενο ήταν σημαντικά υψηλότερο ($P<0.05$) στον L-τύπο τροχοζώων (μέση τιμή $18.68\pm 2.24\%$) από του S-τύπου (μέσος όρος $13.88\pm 0.79\%$). Ωστόσο, η μακρά αλυσίδα του δεκοσαεξαενοϊκού οξέως (22:6ω3) ήταν σημαντικά υψηλότερη ($P<0.0001$) στον S-τύπο τροχοζώων (μέση τιμή $8.58\pm 0.38\%$) σε σχέση με τον L-τύπο (μέση τιμή $4.2\pm 0.46\%$). Το λινολεϊνικό οξύ (18:3ω3) απουσίαζε στον S-τύπου τροχοζώων και εμφανιζόταν ως κατά μέσο όρο $1.10\pm 0.87\%$ στον L-τύπο τροχοζώων. Δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές ($P>0.05$) στο συνολικό περιεχόμενο των ω3-HUFA που παρατηρήθηκε στον S-τύπο (μέση τιμή $28.68\pm 1.00\%$) και στον L-τύπο (μέση τιμή $29.03\pm 1.75\%$), τροχοζώων.

Συζήτηση

Παραγωγή τροχοζώων

Η παραγωγικότητα του S-τύπου (μέση τιμή 308×10^6 τροχοζώων ανά m^3 ανά ημέρα) και L-τύπου (μέση τιμή 186×10^6 τροχοζώων ανά m^3 ανά ημέρα), που επιτεύχθη στο συνεχές σύστημα καλλιέργειας ήταν πολύ υψηλότερη από ό, τι σε οποιαδήποτε συμβατική παραγωγή τροχοζώων που έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα για υδατοκαλλιεργητικούς σκοπούς (James *et al.*, 1987; Lubzens, 1987). Μολονότι είναι γενικά γνωστό (Lubzens, 1987) ότι στα συμβατικά συστήματα παραγωγής τροχοζώων χαμηλές αποδόσεις είναι ως επί το πλείστον συνδεδεμένες με μεγάλες δεξαμενές των 10-20 m^3 , η υψηλότερη παραγωγικότητα τροχοζώων επιτεύχθηκε στα μικρής κλίμακας πειράματα με τη χρήση δοχείων καλλιέργειας μέχρι 60 l που ήταν μόνο 122 τροχοζώων ανά ml ανά ημέρα (Gatesoupe και Luquet, 1981) και η οποία είναι μικρότερη από την παραγωγικότητα τροχοζώων που επιτεύχθηκε κατά τη διάρκεια αυτής της έρευνας σε 1 m^3 χωρητικότητα δεξαμενών. Ο Boraas (1983) υπό πειραματικές συνθήκες καλλιέργειας το *B. calyciflorus* σε ένα σύστημα χημειοστατικής δύο σταδίων πέτυχε την ξηρά βιομάζα της τάξης του 0.0202 g ανά l ανά ημέρα σε ποσοστό αραίωσης 0.83 ανά ημέρα και 0.0252 g ανά l ανά ημέρα σε ποσοστό αραίωσης 1.08 ανά ημέρα. Κατά τη διάρκεια της παρούσας έρευνας, χρησιμοποιώντας ρυθμό αραίωσης 0.6 ανά ημέρα, ήταν δυνατόν να ληφθεί ξηρή βιομάζα έως και 0.0965 g ανά l ανά ημέρα με μέση τιμή τα 0.0659 g ανά l ανά ημέρα για τον S-τύπου τροχοζώων και 0.0789 g ανά l ανά ημέρα, με μέσο όρο τα 0.0536 g ανά l ανά ημέρα (αραίωση 0.5 ανά ημέρα) για τον L-τύπο τροχοζώων που παρουσίαζαν την υψηλότερη παραγωγικότητα σε αυτό το σύστημα της καλλιέργειας σε σύγκριση με προηγούμενες παρατηρήσεις. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας ένα πίσω-τροφοδοσίας (feed-back) πειραματικό σύστημα καλλιέργειας ο Hirata (1979) πέτυχε μια παραγωγή τροχοζώων άνω των 161×10^6 ανά m^3 ανά ημέρα. Οι Groenweg και Schlüter (1981) είχαν πετύχει μέχρι 125×10^6 τροχοζώων ανά m^3 ανά ημέρα σε ένα ημι-συνεχές

σύστημα καλλιέργειας σε πειραματικές συνθήκες. Η παραγωγικότητα των τροχοζώων που επιτευχθεί στην έρευνά μας ήταν σημαντικά υψηλότερη από εκείνη των ανωτέρω παρατηρήσεων και στο πλαίσιο της μεγάλης κλίμακας των ημισυνεχών συστημάτων παραγωγής που αναφέρθηκαν προηγουμένως (Ortega *et al.*, 1983 James *et al.*, 1987) για τους υδατοκαλλιεργητικούς σκοπούς.

Η υψηλή παραγωγικότητα του S-τύπου τροχοζώων σε σύγκριση με το τροχόζωο L-τύπου που παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια αυτής της έρευνας είναι, σύμφωνα με την παρατήρηση των Yufera *et al.* (1983) και των James και Abu-Rezeq (1989) αυτά που έχουν λάβει την υψηλότερη απόδοση του μικρού μεγέθους τροχοζώων (στέλεχος-Bs), σε σύγκριση με του μεγάλου μεγέθους τροχοζώων (στέλεχος-S1) υπό το ίδιο καθεστώς τροφών στις καλλιέργειές τους. Κατά τη διάρκεια της έρευνάς μας, η μετατρεψιμότητα τροφής του S-τύπου τροχοζώων ήταν επίσης σημαντικά μεγαλύτερη ($P < 0.0001$) από εκείνη του L-τύπου. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι, η κατανάλωση τροφών και η χρησιμοποίησή τους εξαρτάται από το στέλεχος των τροχοζώων που χρησιμοποιούνται σε ένα σύστημα (Yufera and Pascuala, 1984). Επιπλέον, αυτό μπορεί επίσης να οφείλεται στο μικρότερο χρονικό διάστημα της ανάπτυξη των αυγών του S-τύπου τροχοζώων από ό,τι σε άλλα στελέχη, όπως έχουν παρατηρήσει οι Yufera και Pascuala (1984). Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας έδειξαν ότι η παραγωγικότητα των τροχοζώων κάτω από εντατικές συνθήκες καλλιέργειας εξαρτάται από το στέλεχος των τροχοζώων που χρησιμοποιούνται στο σύστημα καλλιέργειας.

Ο μέσος ρυθμός αύξησης του πληθυσμού και της απόδοση που παρατηρήθηκε στη συνεχή καλλιέργεια του συστήματος για τον S και τον L-τύπο τροχοζώων είναι σημαντικά υψηλότερος από αυτόν των Yufera *et al.* (1983) ο οποίος συγκέντρωσε ποσοστό αύξησης από 0.29 έως 0.65 ανά ημέρα για το στέλεχος Bs (μικρά τροχοζώα) και 0,29 έως 0,66 ημέρα για το στέλεχος Bs (μικρά τροχοζώα). Επιπλέον, ο ρυθμός ανάπτυξης των τροχοζώων που επιτεύχθηκε σε αυτό το σύστημα συνεχούς καλλιέργειας ήταν σημαντικά υψηλότερος από εκείνον των Pascuala και Yufera (1983), Yufera Pascuala (1984), Boraas και Bennet (1988) και James και Abu-Rezeq (1989) που λαμβάνονται για τα διάφορα στελέχη του τροχοζώου υπό πειραματικές συνθήκες. Ενώ με τη χρήση των φυκών για τάισμα (*Nannochloris oculata* και *N. maculata*) υπό εργαστηριακές συνθήκες καλλιέργειας οι Yufera *et al.* (1983) παρατήρησαν μέση παραγωγή των 105 τροχοζώων ανά ml ανά ημέρα για το στέλεχος Bs (μικρά τροχοζώα) και 42 τροχοζώα ανά ml ανά ημέρα για το στέλεχος S-1 (μεγάλα τροχοζώα), ενώ ήταν σημαντικά χαμηλότερη από την απόδοση που παρατηρήθηκε στο σύστημα συνεχούς καλλιέργειάς μας.

Σύσταση λιπαρών οξέων

Τα αποτελέσματα σχετικά με τη σύνθεση των λιπαρών οξέων των τροχοζώων δείχνουν ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά ($P > 0.05$) στη συνολική σύσταση σε $\omega 3$ -HUFA που παρατηρήθηκαν μεταξύ των S και L-τύπου τροχοζώων, η οποία είναι σύμφωνη με τις παρατηρήσεις των James και Abu-Rezeq (1989). Η σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) στη συγκέντρωση των EPA 20:5 $\omega 3$ και της μακράς αλυσίδας 22:6 $\omega 3$ που παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της παρούσας έρευνας μεταξύ των δύο τύπων τροχοζώων ίσως να είναι στελεχο- εξαρτώμενη μιας και το ίδιο σχήμα ταΐσματος χρησιμοποιήθηκε και στους δυο τύπους τροχοζώων. Τα $\omega 3$ -HUFA στα τροχοζώα, είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και την επιβίωση των θαλάσσιων προνυμφών των ψαριών (James *et al.*, 1983b Watanabe *et al.*, 1983) και δείχνουν ότι οι επαρκείς ποσότητες αυτών των απαραίτητων λιπαρών οξέων (EFA), είναι

παρούσες και στα δύο στελέχη. Στο εντατικό σύστημα των τροχοζώων που παράγονται στο σύστημα καλλιέργειάς μας, χρησιμοποιώντας το στέλεχος *Nannochloropsis* MFD-2. Η παρουσία μεγάλων ποσοτήτων EPA 22:6ω3 και στα δύο στελέχη του τροχοζώου και της απουσίας του στο στέλεχος *Nannochloropsis* MFD-2 δείχνουν ότι τα τροχοζώα θα μπορούσαν να βιοσυνθέσουν τη μακρά αλυσίδα EPA 22: 6ω3, ενώ η τροφή περιέχει EPA 20: 5ω3, η οποία είναι υποχρεωτική για την ανάπτυξη και την επιβίωση των θαλάσσιων προνυμφών των ψαριών (Scott and Middleton, 1979 Watanabe *et al.*, 1983). Επιπλέον, έχει φανεί ότι η σύνθεση των λιπιδίων στα τροχοζώα εξαρτάται από την ποιότητα των φυκών που χρησιμοποιούνται στο σύστημα καλλιέργειας (James and Abu-Rezeq, 1988). Συγκέντρωση του 12% των EPA 20:5ω3 των τροχοζώων χρησιμοποιείται συνήθως για τη διατροφή των θαλάσσιων προνυμφών των ψαριών (Watanabe *et al.*, 1983). Κατά τη διάρκεια της παρούσας έρευνας, η μέση συγκέντρωση 13.88% των EPA 20:5ω3 του S-τύπου και η μέση συγκέντρωση 18,68% των EPA 20:5ω3 ανήκε στον L-τύπο τροχοζώων, ενώ τράφηκαν με στέλεχος *Nannochloropsis* MFD-2. Επιπλέον, οι υψηλές συγκεντρώσεις των EPA 22:6ω3 που παρατηρήθηκαν σε αυτά τα τροχοζώα φανερώνει ότι υπάρχουν επαρκείς ποσότητες ω3-HUFA στα τροχοζώα για τη διατροφή των θαλάσσιων προνυμφών των ψαριών και περαιτέρω εμπλουτισμός για την ενίσχυση της διατροφικής ποιότητας των τροχοζώων που γενικά εφαρμόζεται στους θαλάσσιους ιχθυογεννητικούς σταθμούς (James *et al.*, 1983 Watanabe *et al.*, 1983), δεν απαιτείται.

Συμπέρασμα

Αυτή η έρευνα δείχνει ότι σημαντικά υψηλότερη παραγωγή τροχοζώων επιτεύχθηκε στο χημειοστατικό σύστημα καλλιέργειας από ό, τι στις συμβατικές και τις ημισυνεχείς μεθόδους καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται για υδατοκαλλιεργητικούς σκοπούς. Επιπλέον, το σύστημα αυτό του 1 m³ χωρητικότητας υψηλής παραγωγικότητας τροχοζώων θα μπορούσε να προσαρμοστεί ως κατάλληλη μονάδα για την παραγωγή μεγάλης κλίμακας τροχοζώων στις υδατοκαλλιέργειες. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας δείχνουν ότι η παραγωγικότητα των τροχοζώων υπό μαζικές συνθήκες καλλιέργειας εξαρτάται από το στέλεχος του τροχοζώου που χρησιμοποιείται στο σύστημα καλλιέργειας. Οι μελέτες δείχνουν επίσης ότι τα τροχοζώα που παράγονται χρησιμοποιώντας φύκη στέλεχος *Nannochloropsis* MFD-2 περιέχουν επαρκείς ποσότητες λιπαρών οξέων που απαιτούνται για τη σίτιση των θαλάσσιων νυμφών των ψαριών και κατά συνέπεια δεν απαιτούν επιπλέον θρεπτικό εμπλουτισμό των τροχοζώων, ο οποίος θα μπορούσε να μειώσει τη διάρκεια χρησιμοποίησης του εργατικού δυναμικού, σε ένα εκκολαπτήριο θαλασσίων ψαριών.

Παραπομπές

- Boraas, M.E., 1980. A chemostat system for the study of rotifer-algal-nitrate interactions. In: W.C. Kerfoot (Editor), *Evolution and Ecology of Zooplankton Communities*. University Press of New England, Hanover, NH, pp. 173-182.
- Boraas, M.E., 1983. Population dynamics of food limited rotifers in two-stage chemostat culture. *Limnol. Oceanogr.*, 28: 546-564.
- Boraas, M.E. and Bennet, W.N., 1988. Steady state rotifer growth in a two-stage, computer-controlled turbidostat. *J. Plankton Res.*, 10: 1023-1038.
- Droop, M.R., 1970. In: R.J. Conover (Editor), *Cultivation of plankton populations*. Helgol. Wiss. Meeresunters., 21: 401-444.
- Droop, M.R., 1975. The chemostat in mariculture. A. Persoone and E. Jaspers (Editors), *Proc. 10th Eur. Symp. Mar. Biol.* Belgium University Press, Ostend, pp. 71-93.

- Droop, M.R. and Scott, J.M., 1978. Steady-state energetics of a planktonic herbivore. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 58: 749-772.
- Droop, M.R. and Scott, J.M., 1982. A steady state approach to some microplankton problems. *Ann. Inst. Oceanogr.*, 58: 47-54.
- Gatesoupe, F.J. and Luquet, P., 1981. Practical diet for mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*: application to larval rearing of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 22: 149-163.
- Gatesoupe, F.J. and Robin, J., 1981. Commercial single cell proteins either as sole food source or in formulated diets for intensive and continuous production of rotifers (*Brachionusplicatilis*). *Aquaculture*, 25: 1-15.
- Groeneweg, J. and Schluter, M., 1981. Mass production of freshwater rotifers on liquid wastes. II. Mass production of *Brachionus rubens* Ehrenberg, 1938, in the effluent of high-rate algal ponds used for the treatment of piggery waste. *Aquaculture*, 25: 25-33.
- Hiram, H., 1979. Rotifer culture in Japan. *Spec. Publ. Eur. Maricult. Soc.*, 4: 361-388.
- Hirayama, K. and Funamoto, H., 1983. Supplementary effect of several nutrients on nutritive deficiency of bakers' yeast for population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Bull. Jpn. Sot. Sci. Fish.*, 49: 505-510.
- James, C.M. and Abu-Rezeq, T., 1988. Effect of different cell densities of *Chlorella capsdata* and a marine *Chlorella* sp. for feeding the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 69: 43-56.
- James, C.M. and Abu-Rezeq, T., 1989. Production and nutritional quality of two small-sized strains of the rotifer *Brachionusplicatilis*. *J. World Aquacult. Soc.*, 20: 136-142.
- James, C.M., Bou-Abbas, M., Al-Khars, A.M., Al-Hinty, S. and Salman, A.E., 1983a. Production of the rotifer *Brachionusplicatilis* for aquaculture in Kuwait. *Hydrobiologia*, 104: 77-84.
- James, C.M., Al-Khars, A.M., Abbas, M.B. and Al-Ameeri, A.A., 1983b. Nutritional studies on rotifers and *Artemia* for feeding fish larvae. *KISR Annu. Res. Rep.*, ISSN 0250-4065, pp. 61-63.
- James, C.M., Abu-Rezeq, T., Dias, P.A. and Salman, A.E., 1986. Production dynamics and nutritional quality of the rotifer *Brachionus plicatilis* under different feed regimes. *Kuwait Inst. Sci. Res.*, Kuwait. Technical Report KISR 2183, pp. 1-30.
- James, C.M., Dias, P. and Salman, A.E., 1987. The use of marine yeast (*Candida* sp.) and bakers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in combination with *Chlorella* sp. for mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 147: 263-268.
- James, C.M., Al-Khars, A.M. and Chorbani, P., 1988. pH dependent growth of *Chlorella* in a continuous culture system. *J. World Aquacult. Soc.*, 19: 27-35.
- Lubzens, E., 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia*, 147: 245-255.
- Ortega, A., Santaella, E., Garcia, A., Olmedo, M. and Peleteiro, J.B., 1983. Cultivo de dorada Sparus aurata L. en el centro costero del mar Menor durante la temporada 1978-1979. *Inf. Tee. Inst. Espan. Oceanogr.* 5: 1-29.
- Pascuala, E. and Yufera, M., 1983. Crecimiento en cultivo de una cepa de *Brachionusplicatilis* O.F. Muller en funcion de la temperatura y la salinidad. *Invest. Pesq.*, 47: 151-159.
- Rothhaupt, K.O., 1985. A model approach to the population dynamics of the rotifer *Brachionus rubens* in two-stage chemostat culture. *Oecologia*, 65: 252-259.
- Scott, J.M., 1977. Rotifer reproduction under controlled experimental conditions. *Arch. Hydrobiol. Beih.*, 8: 169-171.
- Scott, J.M., 1980. Effect of growth rate of the food alga on the growth/ingestion efficiency of a marine herbivore. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 60: 681-702.
- Scott, A.P. and Middleton, C., 1979. Unicellular algae as food for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae - the importance of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 18: 227-240.
- Taub, F.B., 1980. Use of continuous culture technique to control nutritional quality. In: G. Shelef and C.J. Soeder (Editors), *Algae Biomass*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 708-721.
- Trotta, P., 1980. A simple and inexpensive system for continuous monoxenic culture of *Brachionus plicatilis* Muller as a basis for mass production. In: G. Shelef and C.J. Soeder (Editors), *Algae Biomass*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 307-313.
- Walz, N., 1983. Continuous culture of the pelagic rotifers *Ikatda cochlearis* and *Brachionus angularis*. *Archiv. Hydrobiol.*, 98: 70-92.
- Watanabe, T., Kitajima, C. and Fujita, S., 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish. A review. *Aquaculture*, 34: 115-143.
- Yufera, M. and Pascuala, E., 1984. Influencia de la dieta sobre la puesta del rotifero *Brachionus plicatilis* en cultivo. *Invest. Pesq.*, 48: 549-556.
- Yufera, M., Lubian, L.M. and Pascuala, E., 1983. Efecto de cuatro algas marinas sobre el crecimiento

poblacional de dos cepas de *Brachionusplicatilis* (Rotifera: Brachionidae) en cultivo. Invest. Pesq., 47: 325-337.

Εντατική Μαζική Παραγωγή *Artemia* σε ένα Σύστημα Επανακυκλοφορίας

Intensive Mass Production of *Artemia* in a Recirculated System

Odi Zmora^{*}, Muki Shpigel
National Center for Mariculture (NCM), Israel Oceanographic and Limnological Research Ltd., P.O.
Box 1212, Eilat 88112, Israel

Aquaculture, 255 (2006) 488-494

Περίληψη

Ένα υπαίθριο κλειστό σύστημα για την εντατική παραγωγή βιομάζας *Artemia* αξιολογήθηκε. Το σύστημα ενσωματώνει τη χρήση φθηνών αγρο-τεχνικών προϊόντων και φωτοσύνθεσης για να δημιουργήσει μια βελτιωμένη διατροφή για την καλλιέργεια ενήλικης *Artemia*. Η διατροφή στις αρχικές ημέρες της καλλιέργειας αποτελείται από μικροφύκη, που ακολουθούνται από ένα μίγμα ζύμης και πρωτεΐνης σόγιας. Κανένα στερεό ή νερό δεν απαλλάσσεται από το σύστημα κατά τη διάρκεια ολόκληρου του κύκλου παραγωγής. Τα προϊόντα αποβλήτων ανακυκλώνονται από τα βακτηρίδια, τα μικροφύκη και τα πρωτόζωα, τα οποία τα ίδια λαμβάνονται στη συνέχεια από την *Artemia* σε ένα συνεχή κύκλο. Η τελική παραγωγή ενήλικων *Artemia* μετά από 17 έως 20 ημέρες υπολογίστηκε κατά μέσο όρο $40.28 \pm 4.84 \text{ kg m}^{-3}$ (νωπό βάρος) σε 600 l και 31 kg m^{-3} σε 3000 l δεξαμενές. Η μέγιστη παραγωγή ήταν μέχρι 47.5 kg m^{-3} . Ο συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής (FCR) κυμάνθηκε μεταξύ 0.17 και 0.25. Τα ποσοστά επιβίωσης από την ημερομηνία εμβολιασμού υπολογίστηκαν κατά μέσο όρο στα $23.3 \pm 9.24\%$. Συστήματα αυτού του τύπου μπορούν παραγωγικά να καλύπτουν τα εκκολαπτήρια των πτερυγιόψαρων, των γαρίδων και των καβουριών με μεγάλες ποσότητες ζωντανής *Artemia*.

Σκοπός

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η δοκιμή μιας καινοτόμου εφαρμογής για τη μαζική παραγωγή *Artemia* με ένα σύστημα μηδενικής ανταλλαγής νερού.

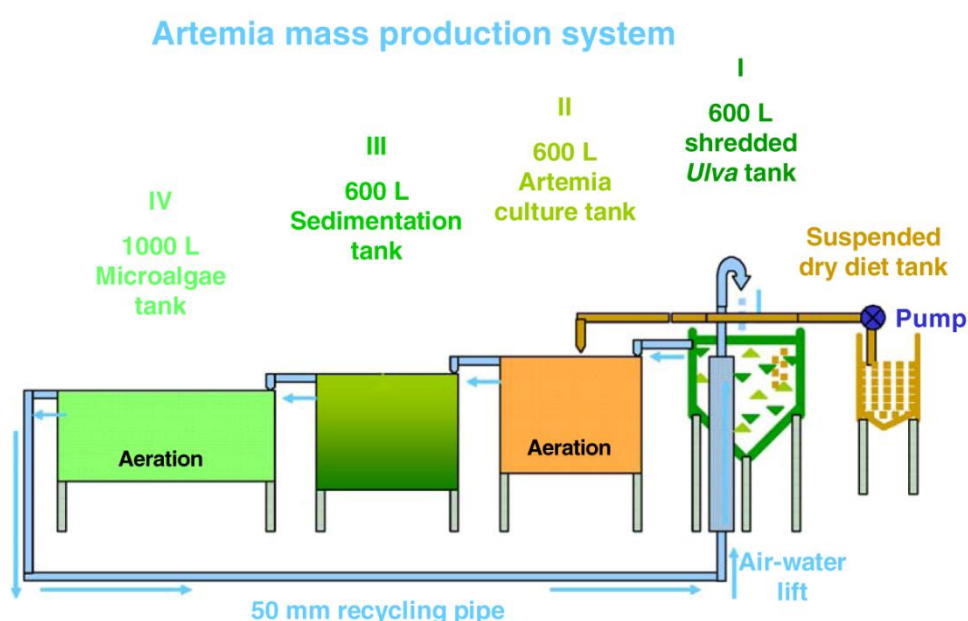
Υλικά και μέθοδοι

Οι δοκιμές παραγωγής πραγματοποιήθηκαν στο National Center for Mariculture (NCM), στην πόλη Eilat, Ισραήλ ($29^{\circ}30' \text{ N}$, 35°E). Τέσσερις ίδιες πειραματικές μονάδες παραγωγής και μια πειραματική μονάδα χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα.

Σχέδιο πειραματικής μονάδας

Κάθε πειραματική μονάδα αποτελούταν από τέσσερις δεξαμενές με συνολικό όγκο 2800 l, που κατανεμήθηκαν σε μια σειρά. Οι δεξαμενές τοποθετήθηκαν ως ένα σύστημα καταρρακτών στο οποίο το νερό έρεε με τη βαρύτητα από τη μια στην άλλη (Εικ. 1). Τα εκρέοντα νερά της αποχέτευσης της τέταρτης δεξαμενής επιστρέφονταν στην πρώτη δεξαμενή μέσω ενός σωλήνα πολυαιθυλενίου 50 mm Ø χρησιμοποιώντας έναν ανυψωτή αέρα-νερού, χωρίς το νερό να αποφορτίζεται από το σύστημα. Η πρώτη δεξαμενή ήταν μια κυλινδροκωνική δεξαμενή 600 l; η έξοδος υπερχειλίσεως της καλύφθηκε με φίλτρο πλέγματος 150 μm για μια περιοχή επιφάνειας 8000 cm^2 ;

ισχυρός αερισμός από το κατώτατο σημείο της δεξαμενής ανάδευε το νερό. Δύο kg (0.4 kg ξηρού βάρους) φρέσκων τεμαχισμένων μικροφυκών *Ulva lactuca* εισάγονταν σε αυτή την δεξαμενή την πρώτη ημέρα κάθε κύκλου καλλιέργειας. Η δεύτερη δεξαμενή ήταν μια τετραγωνική δεξαμενή με επίπεδο πυθμένα 600 l (100×100×60 cm) που εφοδιάστηκε με 10 ναύπλιους ml⁻¹ *Artemia franciscana* (τύπος της Great Salt Lake). Στη δεξαμενή εφαρμόστηκε ισχυρός αερισμός μέσω διαχυντών από το κατώτατο σημείο της, και η έξοδος της καλύφθηκε με ένα φίλτρο πλέγματος. Το πλέγμα των φίλτρων άλλαζε (150, 250, 350, 420, 500, 600 ή 710 μm) καθώς η *Artemia* μεγάλωσε (Lavens *et al.*, 1980). Η τρίτη δεξαμενή ήταν ίδια με το δεύτερο στο μέγεθος και τη μορφή αλλά κανένα φίλτρο δεν προστάτευσε την έξοδό της, και χρησιμοποιήθηκε ως δεξαμενή ιζηματοποίησης. Η τέταρτη δεξαμενή ήταν 2.8 m², τύπου D-raceway 1000 l (100×300 cm) με ένα 200 cm μήκους κεντρικό χώρισμα. Αυτή η δεξαμενή, που διέθετε διακοπτόμενο αερισμό, χρησιμοποιήθηκε για την καθίζηση και τη διάδοση των φυκών.



Εικ. 1. Σχηματική παράσταση συστήματος μαζικής παραγωγής *Artemia*.
Fig. 1. Schematic plan of *Artemia* mass production system.

Οι δεξαμενές γέμισαν με πρόσφατα αντλημένο θαλάσσιο νερό (40 ppt, από τον κόλπος του Eilat, Ερυθρά Θάλασσα) και εμπλουτίστηκαν με θρεπτικές ουσίες NH₄⁺ (0.5 mM l⁻¹), PO₄⁻³ (0.14 mM l⁻¹), Fe⁺³ (24 mM l⁻¹) και Si₂O₃⁻ (0.56 mM l⁻¹). Οι δεξαμενές εμβολιάστηκαν με 10 l πυκνών εργαστηριακών καλλιεργειών (~400-600 mg DW l⁻¹) με κάθε ένα από τα ακόλουθα είδη φυκών: *Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis tetraethele* και *Navicula cf lenzi*. Σε μια προκαταρκτική μελέτη, αυτά τα είδη βρέθηκαν να υποστηρίζουν μια γρήγορη αύξηση της *Artemia* κάτω από συνθήκες πειραματικής επιτόπιας έρευνας που διευθύνουμε. Στην αρχή, ο αερισμός και η αερογέφυρα ανάγκασαν το νερό να κυκλοφορήσει μέσω όλων των δεξαμενών σε ένα ποσοστό 600 l h⁻¹. Μετά από 3 ημέρες, η πυκνότητα των φυκών ήταν περίπου 20 cm στο δίσκο Secchi, και μια ταινία του *N. cf lenzi* κάλυψε τους τοίχους και τα κατώτατα σημεία των δεξαμενών. Σε αυτό το σημείο, ο αερισμός στις δεξαμενές III και IV κλείστηκε, οι ναύπλιοι αποθεματοποιήθηκαν στη δεξαμενή II, και η ροή του νερού μειώθηκε σε 300 l h⁻¹.

Μια κυλινδρο-κωνική δεξαμενή 120 l χρησιμοποιήθηκε ως εφεδρική σίτισης. Σε αυτή μια ειδική ξηρά διατροφή που αναπτύσσεται σε NCM από φθηνά συστατικά (πρωτεΐνη σόγιας και ζύμη) διαλύθηκε σε νερό βρύσης. Κάθε πρωί, μετά από το δείγμα και τον υπολογισμό της βιομάζας *Artemia* στη δεξαμενή καλλιέργειας, ένα δελτίο διατροφής προετοιμάστηκε περιέχοντας 10% (DW) της κατ' εκτίμηση βιομάζας *Artemia* (WW). Δεδομένου ότι η *Artemia* αυξήθηκε, ο ρυθμός της ξηρής τροφής αυξήθηκε αναλογικά και δεν ξεπέρασε ποτέ τα 1660 g m⁻³ στις δεξαμενές πειραματικής καλλιέργειας.

Μια δοσομετρική αντλία ρυθμίστηκε για τη συνεχή παράδοση της τροφής στη δεξαμενή καλλιέργειας (II) μέσω 4×6 mm σωλήνα πολυαιθυλενίου ενυδρείων (Εικ. 1).

Εκτός από τις πρώτες δύο πειραματικές δοκιμές (Πίνακας 1, A και B), όταν παρήγαμε τη ζύμη από την πρώτη ημέρα της καλλιέργειας, το μίγμα ξηρής τροφής παραδόθηκε μόνο την ημέρα 3 ή 4, όταν είχε καταναλωθεί συνολικά ο πλαγκτονικός φυκώδης πληθυσμός από τα αυξανόμενα πρώτα στάδια της *Artemia*.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Μέσος όρος αβιοτικών παραμέτρων στη δεξαμενή καλλιέργειας (A, B – εξωτερικές συνθήκες; C, D, E, F – στο θερμοκήπιο; σε όλες τις επεξεργασίες προστέθηκαν 2 kg νωπού βάρους ή 0.4 kg DW *Ulva lactuca* στην αρχή του κύκλου)

TABLE 1

Average abiotic parameters in the culture tank (A, B – outdoor conditions; C, D, E, F – under greenhouse; to all the treatments we added 2 kg wet weight or 0.4 kg DW *Ulva lactuca* at the start of the cycle)

Parameter	A September	B September	C November	D December	E December	F January	Average S.D.
Temperature (°C)	08:00		24.46±2.25	22.54±3.36	24.77±1.64	23.57±3.18	23.82±0.87
	14:00		25.71±1.79	24.95±2.40	26.61±1.16	24.69±2.20	25.49±0.74
Oxygen (mg/l)	08:00		5.38±0.51	6.33±0.86	5.89±0.67	6.10±0.77	5.93±0.35
	14:00		5.05±0.37	6.16±0.61	5.66±0.54	5.91±0.67	5.70±0.41
pH	08:00		7.09±0.02	7.10±0.02	7.06±0.02	7.07±0.02	7.08±0.02
	14:00		8.11±0.03	8.12±0.03	8.04±0.02	8.12±0.01	8.10±0.03
Final yield (kg/m ³)	47.50	46.50	38.00	36.59	34.85	38.23	40.28±4.89
Dry food (g)	9.10	9.10	5.88	6.48	6.93	6.76	7.38±1.26
FCR (with <i>Ulva</i>)	0.20	0.20	0.17	0.19	0.21	0.19	0.19±0.12
Survival (%)			22.98	33.88	15.50	26.12	24.62±6.59
Final <i>Artemia</i> density (no./ml)			5.4	4.3	2.0	3.6	3.83±1.23

Μια φορά την ημέρα τα τοιχώματα και οι πυθμένες των δεξαμενών καθίζησης (δεξαμενή III) βουρτσίζονταν για την αναστολή εγκαθίδρυσης ιζήματος και συνημμένων φυκών, και ο αερισμός ανοιγόταν για 4 h για να κρατήσει τα μικροφύκη σε αιώρηση, επιτρέποντάς τους κατά συνέπεια να ρέουν στις επόμενες δεξαμενές και να αποτρέψουν την ιζηματοποίηση με την ανάπτυξη των αναερόβιων συνθηκών.

Κατά το καλοκαίρι, η απώλεια νερού λόγω της εξάτμισης (που ήταν μέχρι 3 cm day⁻¹; 350 cm ετησίως; Zmora *et al.*, 2002) αντισταθμίστηκε με την προσθήκη φρέσκου νερού βρύσης (εκτός από το νερό στην τροφή). Καθόλου νερό δεν διέφυγε κατά τη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειας. Από το Μάιο μέχρι τον Οκτώβριο, οι μονάδες παραγωγής ήταν υπαίθριες, εκτεθειμένες σε άμεση ηλιακή ακτινοβολία. Σε αυτήν την περίοδο, η θερμοκρασία του νερού έφθασε μέχρι 32°C αργά το απόγευμα. Κατά τη διάρκεια του υπολοίπου έτους η περιοχή εργασίας καλύφθηκε με ένα κάλυμμα πολυαιθυλενίου τύπου θερμοκηπίου και θερμοαντές κράτησαν τη θερμοκρασία του νερού στους 25.5±2.5°C.

Το πιλοτικό σύστημα παραγωγής

Το πιλοτικό σύστημα παραγωγής ήταν μεγαλύτερο από το πειραματικό σύστημα και βασισμένο στα αποτελέσματά του. Η πρώτη δεξαμενή ήταν όγκου 2000 l, η δεύτερη 3000 l και σχήματος U, και η τρίτη ήταν μια δεξαμενή σχήματος U όγκου 5000 l. Η λογική για τη χρησιμοποίηση μόνο τριών δεξαμενών, αντί τεσσάρων όπως στο πειραματικό σύστημα, βασίστηκε στο συμπέρασμά μας ότι η τρίτη δεξαμενή μπορεί να χρησιμεύσει ως μονάδα ιζηματοποίησης και καλλιέργειας φυκών συγχρόνως. Ο συνολικός όγκος για αυτήν την μονάδα παραγωγής ήταν 10000 l. Η δεξαμενή σίτισης ήταν μια δεξαμενή 400 l στην οποία ένα καθημερινό ξηρό δελτίο τροφής διαλυόταν, εφαρμόζοντας τις ίδιες μεθόδους που περιγράφηκαν για το πειραματικό σύστημα. Η ροή του νερού μέσα σε αυτή τη μονάδα ήταν 1500 l h^{-1} στις αρχικές ημέρες μετά την αποθεματοποίηση των ναυπλίων *Artemia* και αυξήθηκε βαθμιαία μέχρι 5000 l h^{-1} κατά τη διάρκεια των πέντε τελικών ημερών του κύκλου καλλιέργειας.

Πειραματικές διαδικασίες

Οκτώ δοκιμές πραγματοποιήθηκαν ανάμεσα στο Σεπτέμβριο του 2002 και τον Ιανουάριο του 2003: έξι δοκιμές στις πειραματικές μονάδες παραγωγής και δύο στην πιλοτική μονάδα.

Στις πειραματικές μονάδες, δύο δοκιμές (A και B) το Σεπτέμβριο του 2002 πραγματοποιήθηκαν υπαίθρια και τέσσερις δοκιμές ανάμεσα στο Νοέμβριο του 2002 και τον Ιανουάριο του 2003 μεταφέρθηκαν έξω στα θερμοκήπια.

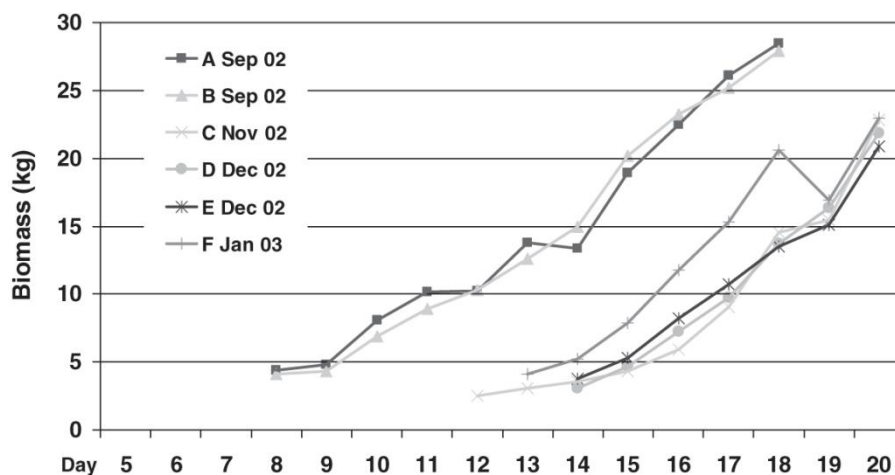
Στις πιλοτικές μονάδες παραγωγής, οι δοκιμές έγιναν υπαίθρια κατά τη διάρκεια Σεπτεμβρίου και Οκτωβρίου του 2002. Οι πειραματικοί κύκλοι ολοκληρώθηκαν όταν το 25% των ζώων (που υποτίθεται ότι ήταν 50% των θηλυκών) ανέπτυξαν ανιχνεύσιμες ωοθήκες και έφτασαν ένα μέγεθος περίπου 10 mm. Τα επίπεδα θερμοκρασίας, οξυγόνου και pH ελέγχονταν δύο φορές καθημερινά στις 08:00 και τις 14:00. Αμμωνία και επίπεδο ολικού διαλυμένου αζώτου (TDN) μετρήθηκαν στο τέλος κάθε πειράματος χρησιμοποιώντας τον Technikon Autoanalyzer II, μετά από τη περιγραμμένη μέθοδο των Krom *et al.*, (1985).

Τρία δείγματα (250 ml το κάθε ένα) λαμβάνονταν καθημερινά ώστε να υπολογιστεί το ποσοστό επιβίωσης των *Artemia*. Ένα δείγμα 1 l λαμβανόταν καθημερινά για τον υπολογισμό της βιομάζας. Το δείγμα περνούσε μέσω ενός κόσκινου και το επιπλέον νερό αφαιρέθηκε με χαρτί. Αυτό μας επέτρεψε να αξιολογήσουμε περίπου τη συνολική βιομάζα της *Artemia* και να υπολογίσουμε τα δελτία τροφών για τις επόμενες 24 h. Εκτός από την ξηρή τροφή, 10 kg (2 kg ξηρού βάρους) φρεσκοτεμαχισμένης *U. lactuca* τοποθετήθηκε στην πρώτη δεξαμενή στην έναρξη κάθε κύκλου.

Στο τέλος του πειράματος, η συνολική βιομάζα στη δεξαμενή καλλιέργειας *Artemia* ζυγίστηκε. Ένα προκαταρκτικό πείραμα είχε δείξει ότι το δείγμα 1 l ήταν αντιπροσωπευτικό της δεξαμενής καλλιέργειας, και οι τιμές που λήφθηκαν την τελευταία ημέρα της καλλιέργειας συμβαδίζουν με την προβαλλόμενη παραγωγή. Ο συντελεστής FCR υπολογίστηκε ως:

Συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής (FCR) =
συνολική προσλαμβανόμενη τροφή (g ξηρής τροφής) / συνολικό κέρδος βάρους (g βάρους)

Το υγρό βάρος του *Ulva* υπολογίστηκε ως ξηρό βάρος (20%) της συνολικής προσλαμβανόμενης τροφής.



Εικ. 2. Συσσώρευση βιομάζας σε έξι δεξαμενές 600-l, σε έξι αντίγραφα στη μονάδα πειραματισμού (τα δυο πειράματα του Σεπτεμβρίου 2002 πραγματοποιήθηκαν σε εξωτερικές συνθήκες και τα υπόλοιπα τέσσερα αντίγραφα σε θερμοκήπια).

Fig. 2. Biomass accumulation in six 600-l tanks, in six replicates in the experimental unit (the two September 2002 experiments were done in outdoor conditions and the other four replicates in greenhouses).

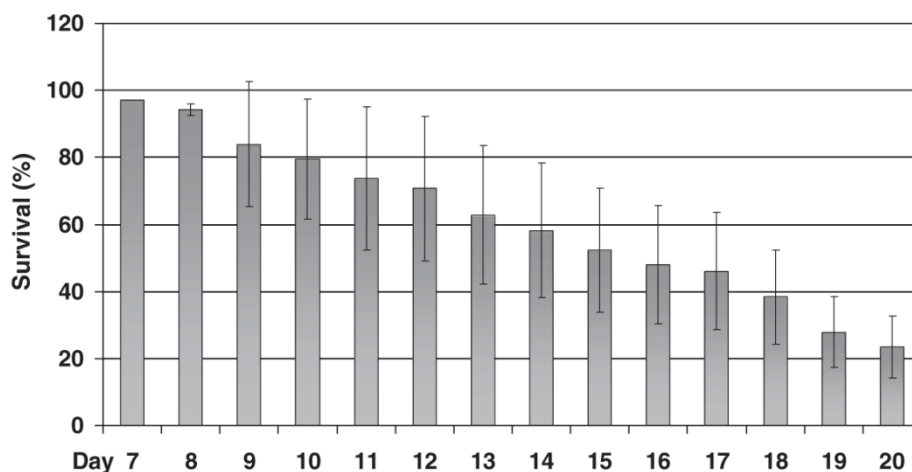
Αποτελέσματα

Πειραματικές μονάδες παραγωγής

Η θερμοκρασία νερού στις δεξαμενές καλλιέργειας *Artemia* κρατήθηκε σταθερή κατά τη διάρκεια του χειμώνα, που υπολογίζεται κατά μέσο όρο σε $23.80 \pm 0.9^\circ\text{C}$ στις 08:00 και $25.50 \pm 0.75^\circ\text{C}$ στις 14:00. Τα επίπεδα οξυγόνου διατηρήθηκαν μέσω του αερισμού στο $90 \pm 0.7\%$ του κορεσμού καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας. Τα επίπεδα pH υπολογίστηκαν κατά μέσο όρο 7.08 ± 0.02 στις 08:00 και 8.1 ± 0.03 στις 14:00 (Πίνακας 1). Αμμωνία συσσωρεύτηκε κατά τη διάρκεια της παραγωγής και υπολογίστηκε κατά μέσο όρο σε $4.67 \pm 2.1 \text{ mM l}^{-1}$ μετά από 20 ημέρες. Η μέγιστη συγκέντρωση που μετρήθηκε ήταν 6.8 mM l^{-1} (ως ολικό διαλυμένο άζωτο - TDN) στις τελευταίες ημέρες της καλλιέργειας.

Ξεκινώντας ως ναύπλιος, η *Artemia* αυξήθηκε ως την ωριμότητα μέσα σε 19-20 ημέρες (Εικ. 2). Η τελική βιομάζα που υπολογίζεται κατά μέσο όρο ήταν $40.28 \pm 4.89 \text{ kg m}^{-3}$ στη δεξαμενή καλλιέργειας (Πίνακας 1). Η καλλιέργεια από τις δοκιμές του Σεπτεμβρίου του 2002 αυξήθηκε γρηγορότερα και έφθασε στην ωριμότητα μετά από μόνο 17 ημέρες, και η τελική παραγωγή της ήταν μεγαλύτερη (47 kg m^{-3}). Η μέση τιμή του FCR ήταν 0.19 ± 0.012 (Πίνακας 1). Η επιβίωση μειώθηκε βαθμιαία σε όλες τις δοκιμές και υπολογίστηκε κατά μέσο όρο στα $24.62 \pm 6.59\%$ (Πίνακας 1, Εικ. 3). Οι τελικοί αριθμοί *Artemia* κυμάνθηκαν κατά μέσο όρο στα 3.83 ± 1.23 άτομα ml^{-1} , τα μισά από τα οποία ήταν σεξουαλικά ώριμα ενήλικα ($\sim 10 \text{ mm}$ μήκους).

Πέντε έως έξι ημέρες αφότου εμβολιάστηκε το σύστημα με μικροφύκη (από 3 ημέρες πριν την αποθεματοποίηση των ναυπλίων σε 2-3 ημέρες μετά την αποθεματοποίηση) τα πλαγκτονικά μικροφύκη άνθισαν και έφθασαν σε μια πυκνότητα περίπου 20 cm του δίσκου Secchi. Συγχρόνως, μια καφέ ταινία του βενθικού διατόμου *N. cf lenzi* κάλυψε τα τοιχώματα και τους πυθμένες των δεξαμενών (Εικ. 4A).



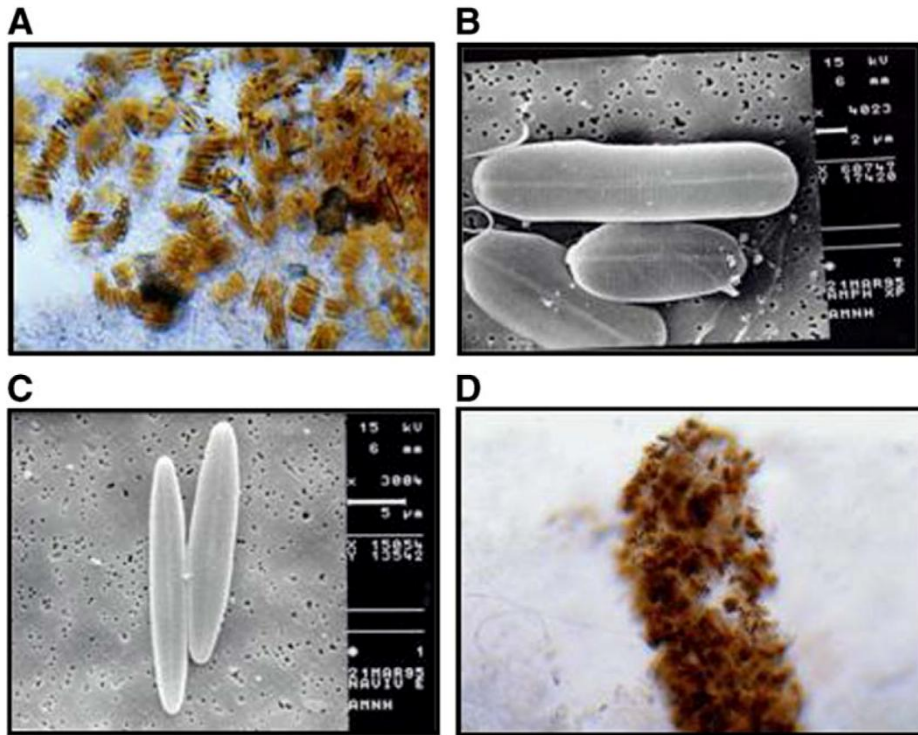
Εικ. 3. Ποσοστό επιβίωσης (% ± S.D.) της *Artemia* κατά τη διάρκεια 20 ημερών της παραγωγής (N=6).
 Fig. 3. Survival rate (% ± S.D.) of *Artemia* during 20 days of production (N=6).

Όταν οι ναύπλιοι έγιναν αποδοτικότεροι ως προς την ηθμοφαγία, οι πληθυσμοί των πλαγκτονικών μικροφυκών μειώθηκαν και τα βενθικά διάτομα (*N. cf lenzi*) καθιερώθηκαν σημαντικά στα τοιχώματα και στους πυθμένες των δεξαμενών. Οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις αποκάλυψαν ότι κύτταρα διατόμων χρησιμοποίησαν τεμαχισμένο *Ulva* ως υπόστρωμα; κάλυψαν πολυάριθμα μικρά κομμάτια και πολλαπλασιάστηκαν γρήγορα (Εικ. 4B και Γ); ενώ μερικά *Ulva* συνέχισαν τον πολλαπλασιασμό τους και άλλα αποσυντέθηκαν. Κύτταρα διατόμων μεταφέρθηκαν σε σημαντικούς αριθμούς στις δεξαμενές καλλιέργειας *Artemia*, που εγκαταστάθηκαν και ευημέρησαν στα οργανικά ιζήματα, τα οποία αποτελούνταν από εξωσκελετούς *Artemia* και περιττώματα σε διαφορετικά στάδια της αποσύνθεσης, των αφάγων τροφών, των βακτηριδίων, κ.α. (Εικ. 4D).

Όταν ο αερισμός κλείστηκε, τα βενθικά διάτομα ήταν ανενόχλητα και ανανέωσαν τη βιομάζα τους. Αυτό το φαινόμενο επαναλαμβανόταν καθημερινά. Στις δεξαμενές καθίζησης και τις δεξαμενές με *Ulva* εμφανίστηκε το βλεφαριδωτό *Euplotes vannus* σε σχετικά πυκνούς (πάνω από 1000 άτομα ml⁻¹) πληθυσμούς. Εκτός από τα πολύ αρχικά στάδια, η *Artemia* προφανώς ταΐστηκε με αυτό το πρωτόζωο, επειδή, αν και παρατηρήθηκαν να ρέουν στη δεξαμενή καλλιέργειας *Artemia*, ουσιαστικά κανένα βλεφαριδωτό δεν παρατηρήθηκε στην ίδια τη δεξαμενή. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώθηκε σε ένα πείραμα εργαστηριακής κλίμακας μελετώντας την ικανότητα της *Artemia* που ταΐζεται και αυξάνεται με το *E.vannus* και υποστηρίχθηκε από τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται).

Πιλοτική μονάδα παραγωγής

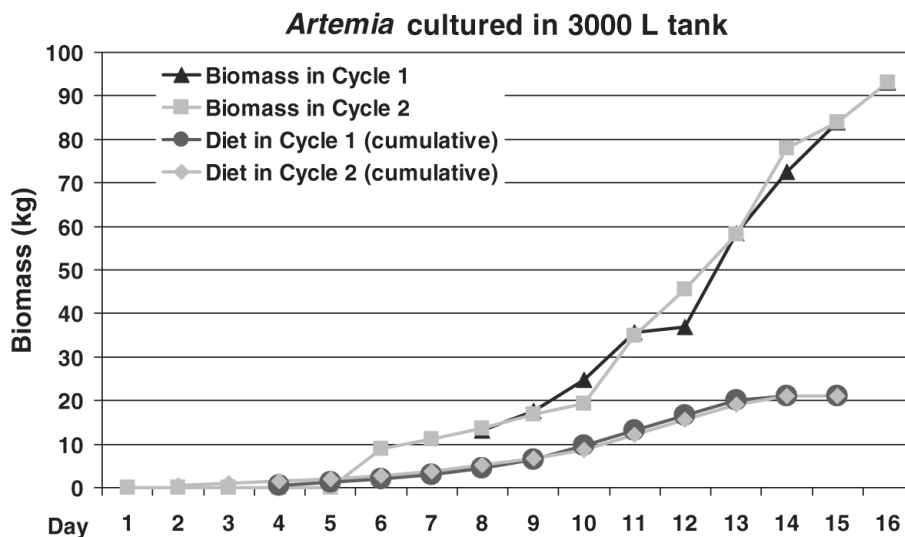
Η κατανομή των αβιοτικών παραμέτρων καθώς επίσης και των μικροφυκών και των βλεφαριδωτών ήταν παρόμοιες με εκείνες που καταγράφηκαν στις πειραματικές μονάδες. Η θερμοκρασία που μετρήθηκε σε αυτό το σύστημα κυμάνθηκε μεταξύ 24°C το πρωί και 30°C προς το τέλος του απογεύματος. Μετά από 16 ημέρες καλλιέργειας, η συνολική παραγωγή στις δύο δοκιμές που επιτεύχθηκαν ήταν 93 kg, και η συσσωρευμένη διατροφή ήταν 21 kg, εκτός των 2 kg DW του *U. lactuca* (Εικ. 5). Ο μέσος όρος παραγωγής *Artemia* στο πιλοτικό σύστημα ήταν 31 kg WW m⁻³. Δεδομένου ότι χρησιμοποιήσαμε 21 kg ξηρής



Εικ. 4. Διάτομα που βρέθηκαν στον πυθμένα των δεξαμενών της *Artemia* (A), *Navicula lenzi* (B), και *Navicula salinicola* (C), των *U. lactuca*, *N. lenzi* στα περιττώματα *Artemia* (D) (EM photos were made by Proff. J.J. Lee CUNY).

Fig. 4. Diatoms found in the bottom of *Artemia* tanks (A), *Navicula lenzi* (B), and *Navicula salinicola* (C), on thallae of *U. lactuca*, *N. lenzi* on *Artemia* feces (D) (EM photos were made by Proff. J.J. Lee CUNY).

τροφής, το FCR ήταν 0.23 για τη ξηρή τροφή εκτός του *U. Lactuca*, και 0.25 συμπεριλαμβανομένου του *U. Lactuca*.



Εικ. 5. Βιομάζα και συσσώρευση τροφής σε δυο αντίγραφα 3000-l δεξαμενών σε πιλοτική μονάδα (τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε εσωτερικές συνθήκες).

Fig. 5. Biomass and feed accumulation of two replicates in 3000-l tank in the pilot unit (the experiments were done in outdoor conditions).

Συζήτηση

Το πολλαπλών βημάτων, εντατικό κλειστό σύστημα που περιγράφεται μέσα σε αυτή τη μελέτη ενσωματώνει διάφορες οικολογικές παραμέτρους για να δημιουργήσει τις καλύτερες συνθήκες για την παραγωγή *Artemia*, εκμεταλλευόμενο τα φθηνά αγροτεχνητά προϊόντα και τη φωτοσύνθεση. Οι διαφορετικές δεξαμενές στο σύστημα, κάθε μια με το στόχο της, διευκολύνουν τον έλεγχο της γενικής παραγωγής. Η πρώτη δεξαμενή, που περιέχει το τεμαχισμένο φύκος *Ulva*, ενέργησε ως έμμεση πηγή τροφής για την *Artemia*. Τα διαλυμένα μόρια συντριμμίων και η αποσύνθεση του *Ulva* παρείχαν ένα καλό υπόστρωμα για τα βενθικά κύτταρα διατόμων, τα αερόβια βακτηρίδια και τα βλεφαριδωτά. Το φίλτρο των 150 μm στην εκροή διατήρησε τα μεγάλα μόρια, εξασφαλίζοντας ότι θα συνέχιζαν να παρέχουν το υπόστρωμα και τις θρεπτικές ουσίες από την αποσύνθεση στη δεξαμενή.

Η δεξαμενή καλλιέργειας της *Artemia* (II) κράτησε την ανάπτυξη των ζώων σε ένα ευνοϊκό περιβάλλον που παρείχε μια σταθερή ροή τροφών, διατήρησε ένα υψηλό επίπεδο DO, και επέτρεψε στα διαλυμένα (CO₂, αμμωνία) ή ανασταλμένα (περιττωματικοί σβόλοι, εξωσκελετοί) προϊόντα αποβλήτων να κατευθυνθούν προς χρήση στη δεξαμενή καθίζησης.

Τα στερεά που απορρίφθηκαν από τη δεξαμενή καλλιέργειας κατακρημνίστηκαν στον πυθμένα της πρώτης δεξαμενής ιζηματοποίησης (III). Εκεί, το ίζημα υποβλήθηκε σε αποσύνθεση από τα βακτηρίδια και καταναλώθηκαν από τα βλεφαριδωτά. Τα βενθικά διάτομα μπορεί να έλαβαν τις θρεπτικές ουσίες που παράχθηκαν ή που απελευθερώθηκαν εκεί, και κινήθηκαν εμπρός προς την επόμενη δεξαμενή ιζημάτων ενώ υπήρχε ανάδευση.

Η δεξαμενή IV ήταν μια πηγή διατόμων. Έλαβε μια υψηλή συγκέντρωση των διαλυμένων θρεπτικών ουσιών και μικροφυκών (αποσυνδεδεμένα διάτομα), και επειδή εκτέθηκε στην άμεση ηλιακή ακτινοβολία κατά τη διάρκεια της ημέρας, τα διάτομα πολλαπλασιάστηκαν στο κατώτατο σημείο, τους τοίχους και το κεντρικό χώρισμά του. Διάτομα τα οποία είχαν αποσυνδεθεί φυσικά ή ενώ η δεξαμενή ήταν επεξεργασμένη και σε ανάδευση, μετακινήθηκαν προς τη δεξαμενή I για να ενισχύσουν την πυκνότητα φυκών (των ίδιων ειδών) εκεί. Στην πιλοτική μονάδα, τα καθήκοντα των δεξαμενών III και IV ολοκληρώθηκαν με μια ενιαία μακριά δεξαμενή και τα περισσότερα από τα στερεά μόρια βυθίστηκαν στο κατώτατο σημείο του πρώτου μισού αυτής της δεξαμενής. Για την απλοποίηση των μεθόδων καλλιέργειας και τη μείωση των δαπανών, οι σχετικά μακριές δεξαμενές μπορούν να εφαρμοστούν σε μελλοντικά συστήματα παραγωγής, όπως καταδεικνύεται στο πιλοτικό σύστημα.

Η κύρια διαφορά μεταξύ του συστήματος που περιγράφεται σε αυτή τη μελέτη και των άλλων συστημάτων παραγωγής είναι η προσέγγιση στα απόβλητα προϊόντα. Το σύστημά μας δεν απαλλάσσει κανένα απόβλητο προϊόν κατά τη διάρκεια ολόκληρου του κύκλου παραγωγής, καθώς άλλα εντατικά συστήματα εφαρμόζουν διάφορες μεθόδους απομάκρυνσης των προϊόντων στερεών αποβλήτων (περιττωματικοί σβόλοι, κ.α.). Η επιβίωση της *Artemia* στο σύστημά μας υπολογίστηκε κατά μέσο όρο 50% και 24% μετά από 14 και 20 ημέρες αντίστοιχα, και ήταν παρόμοια με τη θνησιμότητα σε άλλα περιγραφέντα συστήματα μέσω ροής (Dhert *et al.*, 1992).

Το σχετικά υψηλό pH κατά τη διάρκεια της ημέρας και το τεράστιο κέρδος στη βιομάζα, που συνδέεται με εξαιρετικά - χαμηλό FCR, δείχνει υψηλή φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Η μικτή διατροφή διατόμων, βλεφαριδωτών, ζύμης, και πρωτεΐνης σόγιας συμβάλλουν σε μια πολύ υψηλότερη παραγωγή της βιομάζας *Artemia* από οποιοδήποτε άλλο σύστημα καλλιέργειας που έχει περιγραφεί μέχρι τώρα (15 και 25/kg/m³ για συστήματα μέσω ροής, Tobias *et al.*, 1979; Dobbelier *et al.*, 1980;

Dhont and Lavens, 1996; Dhont and Van Stappen, 2003). Επιπλέον, ο πληθυσμός βακτηριδίων που αναπτύχθηκε στις δεξαμενές μπορεί να είναι μια επιπρόσθετη θρεπτική πηγή για την *Artemia* (Gorospe and Nakamura, 1996; Milligan *et al.*, 1980). Το σύστημα που περιγράφηκε στην πιλοτική μελέτη εξετάστηκε με μια μεγάλη δεξαμενή σχεδόν σε βιομηχανική κλίμακα και η παραγωγή του παρέμεινε σχετικά υψηλή έναντι άλλων ερευνημένων συστημάτων. Επιπλέον, το FCR του συστήματός μας ήταν εξαιρετικά - χαμηλό (0.225), θεωρώντας ότι ένα FCR 3-7 στις διαφορετικές θερμοκρασίες στα εκτατικά συστήματα (Vanhaecke and Sorgeloos, 1989), και 1 για την αδρανή τροφή, θεωρούνται ως κανονικές τιμές (Dhont and Lavens, 1996; Sorgeloos, *προσ. επικοινων.*). Αυτό το γεγονός θα μπορούσε να συμβάλλει κατά πολύ στην αποτελεσματική μείωση των δαπανών του προϊόντος σε οποιαδήποτε δεδομένη κλίμακα παραγωγής.

Η υψηλή συγκέντρωση της αμμωνίας στις τελευταίες ημέρες του κύκλου καλλιέργειας δεν φάνηκε να έχει επιπτώσεις στην επιβίωση ή την αύξηση της *Artemia*, δεδομένου ότι η βιομάζα της αυξήθηκε εντυπωσιακά κατά τη διάρκεια αυτών των ημερών. Αυτά τα αποτελέσματα είχαν παρουσιαστεί και από τους Dhont και Van Stappen (2003). Κατά συνέπεια, μηδενικές αλλαγές των μέσων καλλιέργειας θα μπορούσαν να διατηρηθούν και καμία προσπάθεια δεν έγινε για να μειωθεί η τιμή του pH.

Οι φυσικές αναλογίες μεταξύ των διαφορετικών δεξαμενών του συστήματος παραγωγής μπορούν να βελτιωθούν προς την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των δαπανών. Αυτό το σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη μελέτη και την επίδειξη της ανακύκλωσης της οργανικής ουσίας και της ενέργειας που ρέει σε αρκετά τροφικά επίπεδα.

Παραπομπές

- Brisset, P.J., Versichele, D., Bossuyt, E., De Ruyck, L., Sorgeloos, P., 1982. High density flow-through culturing of brine shrimp *A. franciscana* *Artemia* on inert feeds—preliminary results with a modified culture system. *Aquac. Eng.* 1, 115–119.
- Dhert, P., Bombeo, R.B., Lavense, P., Sorgeloos, P., 1992. A simple semi-flow through culture technique for the controlled superintensive production of *Artemia* juveniles and adults. *Aquac. Eng.* 11, 107–119.
- Dhont, J., Lavens, P., 1996. Tank production and use of ongrown *Artemia*. In: Lavens, P., Sorgeloos, P. (Eds.), *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper, vol. 361, pp. 164–194.
- Dhont, J., Van Stappen, G., 2003. Biology, tank production and nutritional value of *A. franciscana* *Artemia*. In: Stottrup, J.G., McEvoy, L.A. (Eds.), *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Blackwell Science, pp. 65–121.
- Dobbelier, J., Adam, N., Bossuyt, E., Bruggeman, E., Sorgeloos, P., 1980. New aspects of the use of inert diets for high density culturing of brine shrimp. In: Persoon, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Japers, E. (Eds.), *The Brine Shrimp A. franciscana Artemia*. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture, vol. 3. Univesa Press, Wettere, Belgium, pp. 165–174.
- Gorospe, J., Nakamura, K., 1996. Associated bacterial microflora in *Artemia*-rice bran culture. *Bamidgeh* 48 (2), 99–107.
- Krom, M.D., Grayer, S., Davidson, A., 1985. An automated method of ammonia determination for use in mariculture. *Aquaculture* 44, 159–177.
- Lavens, P., De Meulemeester, A., Sorgeloos, P., 1980. Evaluation of mono- and mixed diets as food for intensive *Artemia* culture. In: Sorgeloos, P., Bengston, D.A., Declair, W., Japers, E. (Eds.), *Artemia Research and Its Application*. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture, vol. 3. Univesa Press, Wettere, Belgium.
- Leger, P., Bengtson, D.A., Simpson, K.L., Sorgeloos, P., 1986. The use and nutritional value of *A. franciscana* *Artemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 24, 521–623.
- Milligan, D.J., Quick, J.A., Hill, S.E., Morris, J.A., Hover, R.J., 1980. Sequential use of bacteria, algae and brine shrimp to treat industrial wastewater at pilot plan scale. In: Persoon, G., Sorgeloos, P.,

- Roels, O., Japers, E. (Eds.), The Brine Shrimp, *franciscana Artemia*. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture, vol. 3. Univesa Press, Wettere, Belgium, pp. 193–206.
- Tobias, W.J., Sorgeloos, P., Bossuyt, E., Roels, O.A., 1979. The technical feasibility of mass-culturing *A. franciscana Artemia salina* in the St. Croix ‘artificial upwelling’ mariculture system. Proc. World Maric. Soc. 10, 203–214.
- Tobias, W.J., Sorgeloos, P., Roels, O.A., Sharfstein, B.A., 1980. International study on *A. franciscana* XIII. A comparison of production data of 17 geographical strains of *A. franciscana Artemia* in the St. Croix artificial upwelling-mariculture system. In: Persoon, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Japers, E. (Eds.), The Brine Shrimp, *franciscana Artemia*. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture, vol. 3. Univesa Press, Wettere, Belgium, pp. 383–392.
- Vanhaecke, P., Sorgeloos, P., 1989. International study on *Artemia*. XLVIII. The effect of temperature on cyst hatching, larval survival and biomass production for different geographical strains of brine shrimp *Artemia*. Ann. Soc. R. Zool. Belg. 119, 7–23.
- Zmora, O., Avital, E., Gordin, H., 2002. Results of an attempt for mass production of *Artemia* in extensive ponds. Aquaculture 213, 395–400.
- Zmora, O., Findiesen, A., Frenkel, V., Stubblefield, J., Zohar, Y., 2005. Large scale juvenile production of the blue crab *Callinectes sapidus*. Aquaculture 244, 129–139.

Εντατικό Σύστημα Εκτροφής Νυμφών Ψαριών για την Έρευνα Συστήματος Εκκόλαψης και Εμπλουτισμού *Artemia*

Intensive Rearing System for Fish Larvae Research *Artemia* Hatching and Enriching System

Sagiv Kolkovski*, John Curnow, Justin King
Research Division, Department of Fisheries, Western Australia,
P.O. Box 20, North Beach, WA 6920, Australia

Aquacultural Engineering 31 (2004) 309-317

Περίληψη

Η ζωντανή τροφή όπως η *Artemia* θεωρείται πως είναι βασικό μέρος οποιουδήποτε εκκολαπτηρίου θαλάσσιων πτερυγιόψαρων. Τυποποιημένοι μέθοδοι αναπτύχθηκαν για την εκκόλαψη και την ενίσχυση της θρεπτικής αξίας του ναυπλίου της *Artemia* με τη χρησιμοποίηση διαφορετικών προϊόντων εμπλουτισμού. Αν και υπάρχουν ποικίλα διαθέσιμα εμπορικά προϊόντα στην αγορά, απαιτείται ακόμα περαιτέρω έρευνα πάνω σε πιο συγκεκριμένους εμπλουτισμούς για την επίλυση των συγκεκριμένων θρεπτικών ανεπαρκειών στις νύμφες των ψαριών. Ένα απλό, συμπαγές και αξιόπιστο πειραματικό σύστημα αναπτύχθηκε για αυτά τα θρεπτικά πειράματα. Το σύστημα δομήθηκε ως ένα συμπαγές, όλα σε-ένα, σύστημα με οκτώ κωνικές δεξαμενές 50 l νερού. Το σύστημα μειώνει την παραλλαγή μεταξύ των αντιγραφών (δεξαμενών), αλλιώς ως αποτέλεσμα των μεμονωμένων θερμοκρασιακών σωματιδίων και του αερισμού. Μειώνει το εργατικό δυναμικό και το χρόνο που απαιτείται για τη συγκομιδή και την επαναλειτουργία του συστήματος σε καθημερινή βάση από τη δυνατότητα να συγκομιστούν, να πλυθούν και να ξαναγεμιστούν όλες οι δεξαμενές συγχρόνως με τον ίδιο όγκο του νερού. Το σύστημα έχει χρησιμοποιηθεί για ποικίλα πειράματα, συγκρίνοντας εμπορικούς και πειραματικούς εμπλουτισμούς, βακτηριακό έλεγχο και για την αξιολόγηση των διαφορετικών διαδικασιών της *Artemia*.

Σκοπός

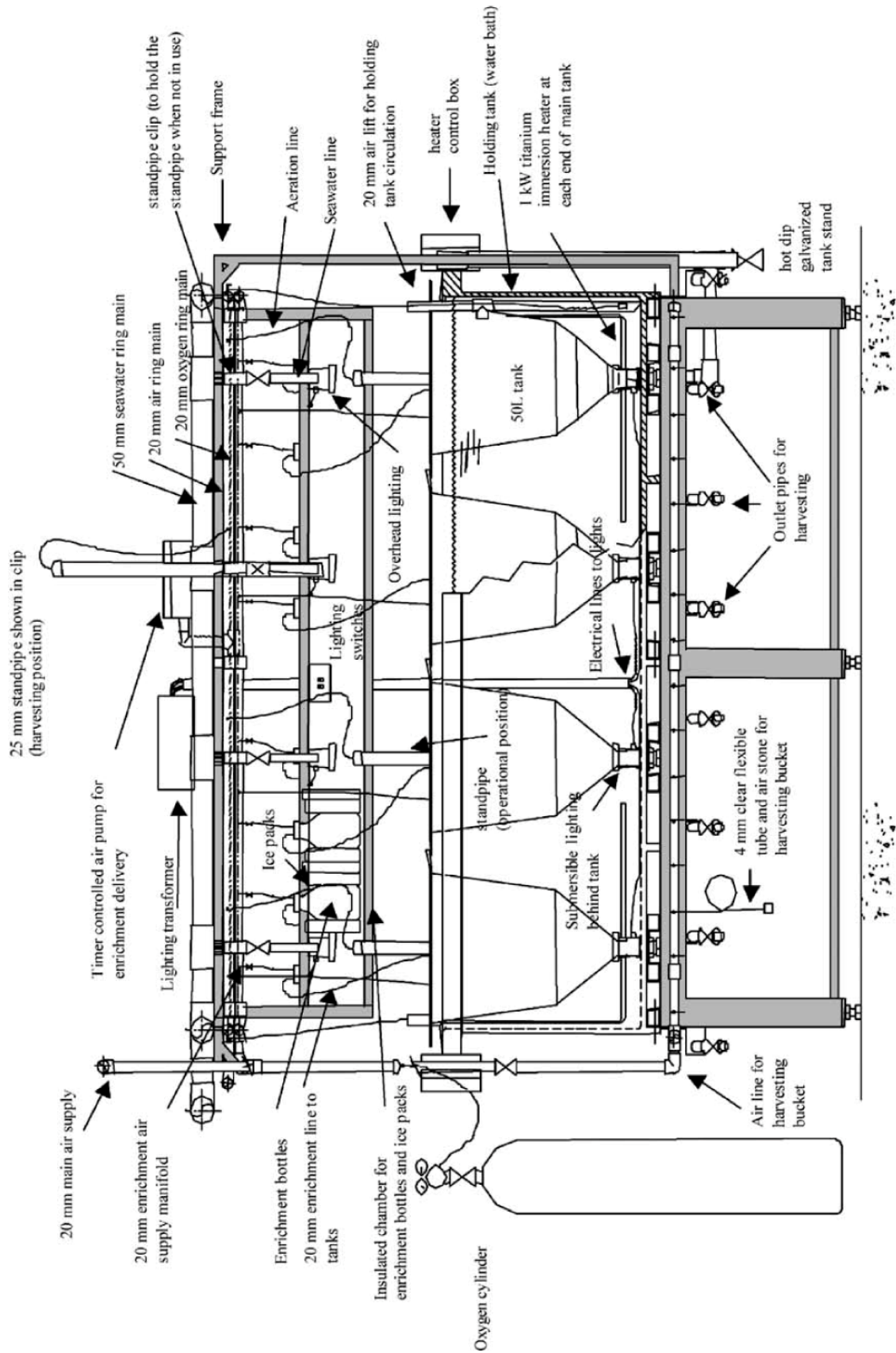
Πειραματικό σύστημα παραγωγής ζωντανής τροφής σχεδιάστηκε και αναπτύχθηκε για τον έλεγχο διαφορετικών δεδομένων της διαχείρισης της *Artemia* και περαιτέρω μεταφοράς των αποτελεσμάτων σε βιομηχανικό επίπεδο.

Περιγραφή συστήματος

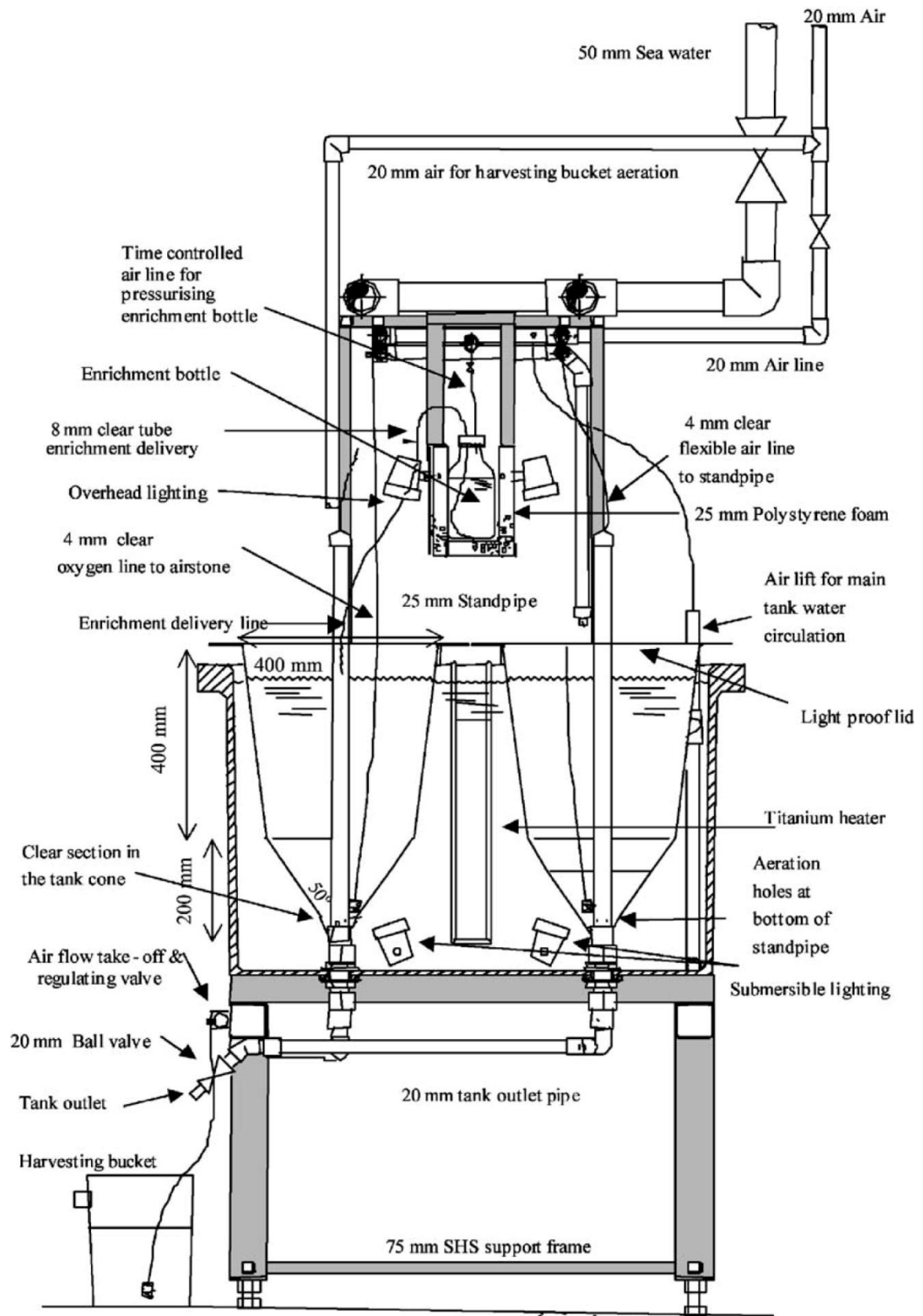
Το συμπαγές σύστημα σχεδιάστηκε για να επανεντοπιστεί ως ενιαία μονάδα. Ενσωματώνει 8 × 50 l μαύρες κωνικές πλαστικές με ίνες ενισχυμένες (FRP) δεξαμενές σε μια μαύρη υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου δεξαμενή (HDPE) ορθογώνιας εκμετάλλευσης (Εικ. 1).

Η κορυφή του κώνου του πυθμένα κάθε δεξαμενής είναι διαφανής για να επιτρέψει στο φως να περάσει μέσω των τοιχωμάτων των δεξαμενών. Μια σπειροειδής έξοδος σε κάθε δεξαμενή (PVC Ø 3/4" BSPT σπειροειδής συνδετήρας, ενσωματωμένος στην FRP) συνδέθηκε με μια γωνία PVC μέσω των τοιχωμάτων της δεξαμενής με μια βαλβίδα σύνδεσης (Εικ. 2). Ο σωλήνας PVC συνδέει κατόπιν τη γωνία με μια

εξωτερική σφαιρική βαλβίδα. Και οι οκτώ



Εικ. 1. Σύστημα εμπλουτισμού *Artemia*, πρόσθια όψη.
 Fig. 1. *Artemia* enrichment system, front elevation.



Εικ. 2. Σύστημα εμπλουτισμού *Artemia* και δοχείο συγκομιδής, πλάγια όψη.
Fig. 2. *Artemia* enrichment system and harvesting bucket, side elevation.

σφαιρικές βαλβίδες που συνδέονται με τις δεξαμενές είναι τοποθετημένες στην πρόσθια πλευρά της δεξαμενής εκμετάλλευσης. Αυτή η ρύθμιση βαλβίδων επιτρέπει τη (χειρωνακτική) συγκομιδή και των οκτώ δεξαμενών ταυτόχρονα, επιτρέποντας στον τεχνικό επιτήρηση ολόκληρης της διαδικασίας.

Το σύστημα εισαγωγής νερού αποτελείται από υπο-πολλαπλά δαχτυλίδια εφοδιασμένα με 2" (50 mm) PVC σφαιρική βαλβίδα που συνδέεται με την παροχή νερού του εκκολαπτηρίου (35 ppt για το θαλασσινό νερό). Οι μεμονωμένες σφαιρικές βαλβίδες 3/4" παρέχουν νερό σε κάθε δεξαμενή από μια υπερυψωμένη θέση. Όλες οι μεμονωμένες βαλβίδες παρέχουν το ίδιο συγχρονισμένο ποσοστό ροής που εξασφαλίζει έναν ίσο όγκο και ένα ρεύμα του νερού όταν η κύρια βαλβίδα είναι πλήρως ανοικτή. Αυτό εξασφαλίζει ότι μετά από την συγκομιδή, η *Artemia* πλένεται με τον ίδιο όγκο νερού σε όλες τις δεξαμενές και για την ίδια χρονική περίοδο. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό κατά τη χρησιμοποίηση του συστήματος για τις βακτηριακές μελέτες κατά την παραλλαγή στον όγκο του νερού, τη ροή και το χρονικό διάστημα που θα προκαλέσει την παραλλαγή στα επίπεδα βακτηριδίων.

Σύστημα αερισμού

Για την απόκτηση ενός βέλτιστου επιπέδου ενσωμάτωσης κατά τον εμπλουτισμό στην *Artemia*, τα επίπεδα οξυγόνου δεν πρέπει να μειωθούν κάτω από 4 ppm (Lavens and Sorgeloos, 1996). Λόγω της φύσης τους, τα περισσότερα εμπορικά προϊόντα εμπλουτισμού, δηλ. γαλάκτωμα ελαίου, σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία που συστήνεται για τον εμπλουτισμό (26-28°C) και τις υψηλές πυκνότητες *Artemia* που συστήνονται, η δυνατότητα του νερού να διατηρηθεί σε ικανοποιητικά επίπεδα οξυγόνου μετά την πρόσθεση του εμπλουτιστικού είναι περιορισμένη, με συνέπεια τις υπο-βέλτιστες συνθήκες. Διαφορετικά συστήματα αερισμού έχουν αναπτυχθεί σε βάθος χρόνου (Babu *et al.*, 2001; Lavens and Sorgeloos, 1996; Sorgeloos *et al.*, 1986), εντούτοις, το τρέχον σύστημα περιλαμβάνει διπλά συστήματα αερισμού, ένα παρεχόμενου αέρα και το άλλο παρεχόμενου οξυγόνου (Εικ. 1 και 2).

Ο αέρας παρέχεται μέσω ενός PVC σωλήνα που συνδέεται μέσω δαχτυλιδιών με την κύρια παροχή αέρα εκκολαπτηρίου (από μια κεντρική αντλία αέρα). Μια βελόνα από ορείχαλκο και βαλβίδα παρέχει τον αέρα σε κάθε δεξαμενή. Ένας εύκαμπτος αεραγωγός 4 mm χρησιμοποιείται για να συνδέσει τη βαλβίδα με ένα κολλημένο τελικό καπάκι σε έναν κατακόρυφο υδροσωλήνα PVC. Εξασφαλίζοντας ότι η βαλβίδα εξόδου δεξαμενών είναι κλειστή, ο αέρας δημιουργεί φυσαλίδες μέσω έξι τρυπών 1 mm στο κατώτατο σημείο του κατακόρυφου υδροσωλήνα. Αυτό δημιουργεί μεγάλες φυσαλίδες που αερίζουν δυνατά και κυκλοφορούν τα μέσα εκκόλαψης ή εμπλουτισμού, εξασφαλίζοντας τη μετακίνηση των κύστεων και των *Artemia* στη δεξαμενή χωρίς οποιαδήποτε "νεκρά σημεία" στη βάση του κώνου, όπου οι κύστες μπορούν να συλλεχθούν και να παραμείνουν μη-εκκολάψιμες. Ο κατακόρυφος υδροσωλήνας επομένως λειτουργεί ως τυπικός κατακόρυφος υδροσωλήνας, αποτρέποντας την καταβύθιση των κύστεων στο σωλήνα εξόδου, και επίσης ως ένας ανεμιστήρας.

Το δεύτερο σύστημα αερισμού είναι βασισμένο στη παροχή οξυγόνου που χρησιμοποιεί έναν συμπιεσμένο κύλινδρο οξυγόνου. Η ίδια βασική δομή δαχτυλιδιών όπως στο σύστημα αερισμού χρησιμοποιείται, με έναν εύκαμπτο σωλήνα που συνδέεται με έναν μετρητή ροής (μανόμετρο) στη φιάλη οξυγόνου, ο οποίος ελέγχει

τον εφοδιασμό του οξυγόνου. Το οξυγόνο δημιουργεί φυσαλίδες στο νερό μέσω των λεπτών πορωδών διαχυτών (ή διασκορπιστές), οι οποίοι ελαχιστοποιούν το μέγεθος φυσαλίδων και μεγιστοποιούν την περιοχή επιφάνειας φυσαλίδων για την ανταλλαγή αερίου. Ο συνδυασμός αέρα και οξυγόνου επιτρέπει τη διατήρηση του κορεσμού οξυγόνου στα 80-100% στο σύστημα, όπου ένα σχετικά χαμηλό ποσό του οξυγόνου τελικά χρησιμοποιείται ($1-3 \text{ l min}^{-1}$ για ολόκληρο το σύστημα) για μια μέγιστη πυκνότητα της *Artemia* (GSL τύπος INVE, 1×10^6 ναύπλιοι l^{-1}).

Σύστημα θέρμανσης

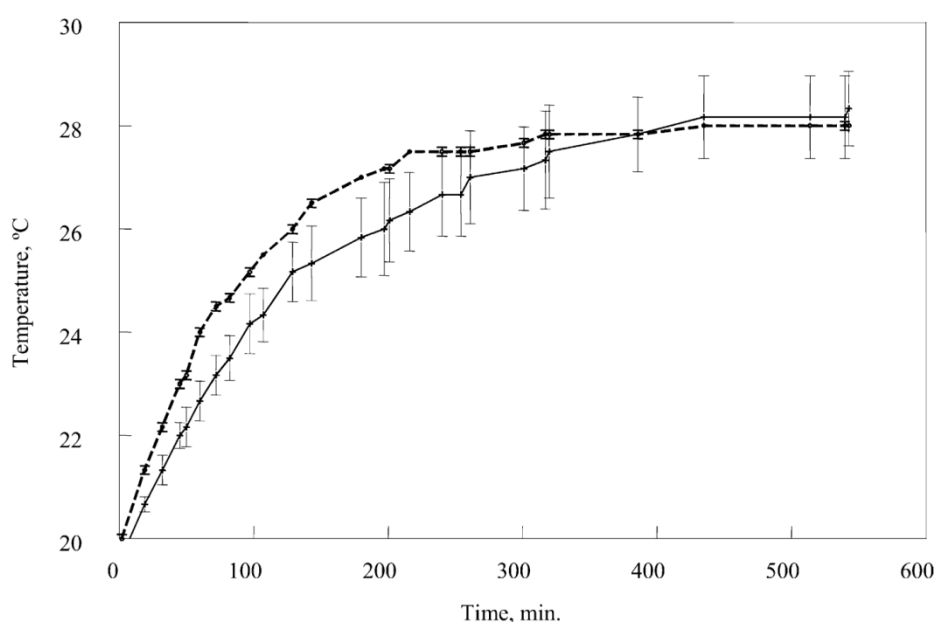
Η βέλτιστη θερμοκρασία για τυπική εκκόλαψη και εμπλουτισμό της *Artemia* είναι $26-28^\circ\text{C}$ (Lavens and Sorgeloos, 1996), αν και υπάρχουν τύποι *Artemia* με διαφορετικές βέλτιστες θερμοκρασίες (Vanhaecke *et al.*, 1984). Για αυτό, καταδύομενοι θερμαντές χρησιμοποιούνται χαρακτηριστικά σε άλλα συστήματα *Artemia*. Αυτοί αποτελούνται από γυαλί (θερμαντές ενυδρείων, 150-300 W) για μικρές δεξαμενές και από τιτάνιο ή ανοξείδωτο ατσάλι για τις μεγαλύτερες δεξαμενές. Οι ατομικοί υποβρύχιοι θερμαντές μέσα σε μια δεξαμενή παρουσιάζουν διάφορα προβλήματα:

1. παραλλαγή μεταξύ των θερμοκρασιών των δεξαμενών λόγω των ασυμβίβαστων μεμονωμένων θερμαντών,
2. κίνδυνος ηλεκτροπληξίας εάν δεν συνδέεται κατάλληλα ή δεν απομονώνεται,
3. ο κίνδυνος πυρκαγιάς όταν δεν έχει έναν αυτόματο on/off διακόπτη και αυτό αφήνεται επάνω κατά τη διάρκεια της συγκομιδής, και
4. θραύσεις όταν οι θερμαντές γυαλιού χρησιμοποιούνται

Για να αποφύγουν αυτά τα προβλήματα, οι μεμονωμένες δεξαμενές τοποθετήθηκαν σε μια υψηλή πυκνότητα 1000 l δεξαμενή εκμετάλλευσης πολυαιθυλενίου (HDPE) που κρατιέται συνεχώς πλήρης με γλυκό νερό. Οι δύο θερμάστρες τιτανίου 1-KW καταδύονται, μια σε κάθε τέλος της δεξαμενής που διατηρεί μια σταθερή θερμοκρασία $28 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Δύο αερογέφυρες εξασφαλίζουν ακόμη και κυκλοφορία νερού γύρω από τη δεξαμενή. Δεδομένου ότι οι θερμαντές καταδύονται συνεχώς στο νερό δεν υπάρχει καμία ανάγκη να απομακρυνθούν μακριά κατά τη συγκομιδή, η οποία ελαχιστοποιεί το ανθρώπινο λάθος (Εικ. 1). Λόγω της μεγάλης θερμικής μάζας του νερού - λουτρό, η ταχύτητα με την οποία οι νέες δεξαμενές του νερού μπορούν να παρουσιαστούν μέχρι την απαραίτητη θερμοκρασία εκκόλαψης επιταχύνεται. Αυτό επιτρέπει τη μεγαλύτερη αποδοτικότητα κατά τη διαχείριση των επεξεργασιών σε καθημερινή βάση.

Προκειμένου να καταδειχθεί το πλεονέκτημα του ελέγχου θερμοκρασίας και η χαμηλή παραλλαγή μεταξύ των δεξαμενών που το σύστημα έχει πέρα από τις αυτόνομες δεξαμενές, μια σύγκριση μεταξύ έξι δεξαμενών (50 l) του συστήματος και έξι ίδιων αυτόνομων δεξαμενών πραγματοποιήθηκε. Οι δεξαμενές γέμισαν με θαλασσινό κρύο νερό (20°C) και αφήθηκαν για να θερμανθούν ολονυκτίς στο σύστημα και να μείνουν μόνο με τους θερμαντές ενυδρείων (300 W) ρυθμισμένους στους 28°C . Σε μία προσπάθεια μίμησης του τυπικού πρωτόκολλου συγκομιδής, το επόμενο πρωί, οι δεξαμενές εκκενώθηκαν και γέμισαν πάλι με θαλασσινό κρύο νερό. Οι καταγραφείς θερμοκρασίας (eTemperature, OnSolution, Αυστραλία) τοποθετήθηκαν σε κάθε μια από τις δεξαμενές. Ο χρόνος που λήφθηκε για το σύστημα και τις αυτόνομες δεξαμενές για να φθάσουν σε μια καθορισμένη θερμοκρασία καταγράφηκε, καθώς επίσης και η παραλλαγή θερμοκρασίας μεταξύ

των δεξαμεμών (Εικ. 3). Σε μια περιβαλλοντική θερμοκρασία αέρα $20\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, το σύστημα των δεξαμεμών έφθασε σε μια θερμοκρασία 27.5°C μετά από 216 min, ενώ οι αυτόνομες δεξαμεμές έφθασαν στην ίδια θερμοκρασία μετά από 320 min. Σαφώς, όσο χαμηλότερη η θερμοκρασία αέρα είναι, τόσο περισσότερη ώρα θα πάρει στις αυτόνομες δεξαμεμές να φθάσουν στην επιθυμητή θερμοκρασία. Εντούτοις, ο χρόνος που απαιτείται για να φθάσει σε μια καθορισμένη θερμοκρασία το σύστημα δεξαμεμών επηρεάζεται λιγότερο από την περιβαλλοντική θερμοκρασία του αέρα. Μειώνοντας την παραλλαγή της θερμοκρασίας μεταξύ των δεξαμεμών μειώνεται επίσης και η παραλλαγή οξυγόνου λόγω της σχέσης μεταξύ της θερμοκρασίας και του κορεσμού οξυγόνου στο νερό. Για παράδειγμα, η διαλυμένη συγκέντρωση οξυγόνου στο αλατισμένο νερό 30‰ στους 27°C είναι 6.72 και 6.61 mg/l στους 28°C (Creswell, 1993). Αν και όχι μεγάλη διαφορά θα συνέβαλλε στην παραλλαγή των αποτελεσμάτων κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων.



Εικ. 3. Σύγκριση θερμοκρασίας μεταξύ συστήματος δεξαμεμών (χρησιμοποιώντας 2 x 1 kW θερμαντών από τιτάνιο στην κύρια δεξαμενή) και αυτόδύναμες δεξαμεμές (χρησιμοποιώντας ατομικούς γυάλινους θερμαντές ενυδρείου 300 W). Τα δεδομένα αντικατοπτρίζουν μέσους όρους και τυπικές αποκλίσεις μεταξύ έξι αντίγραφων δεξαμεμών στο σύστημα και στο αυτόδύναμο.

Fig. 3. Temperature comparison between tanks system (using 2 x 1 kW titanium heaters in the main tank) and standalone tanks (using individual aquarium glass heaters 300W). Data reflect average and standard errors between six replicated tanks in the system or standalone.

Διανομή εμπλουτιστικού

Σύμφωνα με τις περισσότερες από τις οδηγίες του κατασκευαστή, οι εμπορικοί εμπλουτισμοί *Artemia* δίνονται σε δύο ίσες μερίδες (12 και 6 h πριν από τη συγκομιδή). Αυτό εξασφαλίζει ότι ο εμπλουτισμός που κερδίζεται από την *Artemia* είναι φρέσκος και τηρεί τα διαλυμένα επίπεδα οξυγόνου σε ένα μέγιστο. Ο πρώτος μισός τοποθετείται συνήθως άμεσα στη δεξαμενή. Ένας αυτόματος μηχανισμός διανομής εξασφαλίζει την παράδοση της δεύτερης μερίδας του εμπλουτισμού σε κάθε δεξαμενή *Artemia* κατά τη διάρκεια της νύχτας.

Το σύστημα διανομής αποτελείται από δοχεία γυαλιού 1 l που περιέχουν το εμπλουτιστικό, από ένα χρονικά ελεγχόμενο σύστημα αέρας-αντλιών και ένα μονωμένο εμπορευματοκιβώτιο. Οι φιάλες που περιέχουν τους εμπλουτισμούς τοποθετούνται στο μονωμένο εμπορευματοκιβώτιο μεταξύ κομματιών πάγου (σημαντικών το καλοκαίρι όταν μπορεί να υπερβεί η θερμοκρασία αέρα τους 40°C), το οποίο κρατά τους εμπλουτισμούς σε ψύξη μέχρι να αυτο-διανεμηθούν. Κάθε καπάκι φιάλης έχει δύο εύκαμπτα σωληνάκια που περνούν μέσω αυτού, ένα συνδεδεμένο με το χρονικά-ελεγχόμενο σύστημα αέρα και το άλλο ως γραμμή παράδοσης από το κατώτατο σημείο της φιάλης μέσω του καπακιού στις ατομικές δεξαμενές *Artemia*. Στον καθορισμένο χρόνο η αεραντλία ξεκινάει από το χρονόμετρο, που ωθεί τον αέρα στη φιάλη, αναγκάζοντας τον εμπλουτισμό να περάσει το δεύτερο σωλήνα και το σιφώνιο στη δεξαμενή. Αυτό το απλό και οικονομικώς αποδοτικό σύστημα επιτρέπει τη διανομή οκτώ χωριστών εμπλουτισμών στις μεμονωμένες δεξαμενές. Δεδομένου ότι οι μηχανικές αντλίες ή οι ακριβές περισταλτικές αντλίες δεν χρησιμοποιούνται πια, δεν υπάρχει κανένα όριο στον αριθμό εμπλουτισμών και των χρησιμοποιούμενων δεξαμενών (Εικ. 1 και 2).

Συγκομιδή

Ο Merchie (1996) περιέγραψε μια απλή μέθοδο, που χρησιμοποιήθηκε ευρέως, για τη συγκομιδή νεο-εκκολαφθέντων ναυπλίων χρησιμοποιώντας μια πηγή φωτός. Στο τρέχον σύστημα, δύο πηγές φωτός εγκαθίστανται: μια πάνω από κάθε δεξαμενή και άλλη μια που καταδύεται στο νερό - λουτρό κοντά στον κατώτατο κώνο κάθε δεξαμενής. Κάθε σετ φώτων μπορεί να ανοιχτεί/κλειστεί ξεχωριστά. Η διαδικασία συγκομιδής αρχίζει με την αφαίρεση των γραμμών αερισμού (οξυγόνου και αέρα) και το άνοιγμα των ανώτερων φώτων. Οι ναύπλιοι κατόπιν προσελκύονται στην επιφάνεια, η οποία επιτρέπει το χωρισμό μη-εκκολαπτόντων κύστεων και συντριμμιών που βυθίζονται στο κατώτατο σημείο και απομακρύνονται μέσω της βαλβίδας εξόδου. Η δεξαμενή ανακατεύεται ξανά και οξυγονώνεται με την επανατοποθέτηση του αερισμού στη δεξαμενή για μερικά δευτερόλεπτα και έπειτα την αφαίρεση του. Οι ναύπλιοι συγκεντρώνονται έπειτα γύρω από το καθαρό κωνικό πυθμένα με την αλλαγή της πηγής φωτός που φωτίζει κάτω από τις δεξαμενές και την κάλυψη της κορυφής της δεξαμενής με ένα ελαφρύ καπάκι. Τα κενά κελύφη των κύστεων μπορούν έπειτα να συλλεχθούν από την επιφάνεια. Εναλλακτικά, τα τελευταία λίτρα που περιέχουν τα επιπλέοντα κελύφη μπορούν να απορριφθούν.

Μετά το χωρισμό των μη-εκκολαπτόντων κύστεων και κελυφών οι ναύπλιοι που έχουν νεο-εκκολαφθεί συλλέγονται σε κάδους συγκομιδής 15 l με εσωτερικά φίλτρα (Sorgeloos and Léger, 1992). Το εσωτερικό φίλτρο (125 μm) αποτρέπει τις απώλειες ναυπλίων κατά τη διάρκεια του σταδίου πλύσης. Η υπερχειλίση λόγω της στόμωσης του φίλτρου αποτρέπεται από μια "κουρτίνα" αέρα κατά μήκος του πλέγματος φίλτρου. Μετά από τη συγκέντρωση των ναυπλίων, η κύρια βαλβίδα νερού ανοίγεται και οι ναύπλιοι πλένονται. Δεδομένου ότι όλες τις μεμονωμένες βαλβίδες (σε κάθε δεξαμενή) τίθενται ως στόχος να έχουν το ίδιο ποσοστό ροής, όλες οι οκτώ δεξαμενές μπορούν να συγκομιστούν και να πλυθούν συγχρόνως με την ίδια ποσότητα και τη ροή του νερού, μειώνοντας αποτελεσματικά την παραλλαγή ανταλλαγής νερού μεταξύ των δεξαμενών (Εικ. 2).

Μετά τη συγκομιδή των δεξαμενών καλλιέργειας και οι εσωτερικοί κατακόρυφοι υδροσωλήνες πλένονται λεπτομερώς, απολυμαίνονται με οξαλικό οξύ και έπειτα ξεπλένονται πάλι με το νερό της θάλασσας. Αυτή η διαδικασία είναι παρόμοια με οποιαδήποτε δεξαμενή, εντούτοις, αυτό έχει το πλεονέκτημα της απομάκρυνσης του

οξέως από όλες τις δεξαμενές που μειώνουν συγχρόνως επομένως τις απαιτήσεις εργασίας. Οι δεξαμενές είναι έπειτα έτοιμες για το ξαναγέμισμα με το νερό για το στάδιο εμπλουτισμού. Στην περίπτωση που μόνο μερικές από τις δεξαμενές χρησιμοποιήθηκαν για εκκόλαψη, οι ναύπλιοι μπορεί να τοποθετηθούν μέσα στις άλλες μετά από το ξέπλυμα. Το σύστημα επιτρέπει την εκκόλαψη και τα στάδια εμπλουτισμού που τρέχουν δίπλα-δίπλα όταν αρκετές δεξαμενές είναι διαθέσιμες.

Η ίδια μέθοδος συγκομιδής πραγματοποιείται με την εμπλουτισμένη *Artemia*. Ενώ δεν υπάρχει καμία ανάγκη να χρησιμοποιηθεί ο φωτισμός δεδομένου ότι τα κελύφη έχουν αφαιρεθεί ήδη, είναι ακόμα απαραίτητο να πλυθεί η εμπλουτισμένη *Artemia*, που βοηθά να στη μείωση των βακτηριακών επιπέδων που εισάγονται στις δεξαμενές καλλιέργειας προνυμφών ψαριών (Dehasque *et al.*, 1993; Verdonck *et al.*, 1994). Η διαδικασία πλύσης γίνεται στους κάδους συγκομιδής χρησιμοποιώντας την παροχή νερού μέσω κάθε δεξαμενής.

Πλεονεκτήματα του συστήματος

Το σύστημα *Artemia* είναι συμπαγές και απλό στη λειτουργία του. Το σύστημα ελαχιστοποιεί την παραλλαγή στις περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, αερισμός, φως) και στους χειρισμούς (ροή του νερού κατά τη διάρκεια του ξεπλύματος) μεταξύ των δεξαμενών.

Το σχέδιο συστημάτων προωθεί την ασφάλεια των χειριστών όταν συγκρίνεται με οποιαδήποτε αυτόνομη δεξαμενή με ένα μεμονωμένο (συνήθως γυαλί) θερμοαντή εξαιτίας του γεγονότος ότι δεν υπάρχει καμία ανάγκη να ανάψει και να κλείσει οποιαδήποτε θερμοαντή και να αφαιρεθούν από τη δεξαμενή (κανένας κίνδυνος θραύσης).

Τα συστατικά όπως ο αυτόματος-δότης εμπλουτισμού παρουσιάζουν βιώσιμη και (πολύ) φτηνή εναλλακτική λύση συγκριτικά με των περισταλτικών ή μηχανικών αντλιών που χρησιμοποιούνται συνήθως για την παράδοση των εμπλουτισμών.

Το σχέδιο συστημάτων μειώνει το χρόνο και την προσπάθεια που περιλαμβάνονται συνήθως με διαδικασίες εκκόλαψη και εμπλουτισμού της *Artemia*. Παράγοντες όπως η ταυτόχρονη συγκομιδή και η αξιοπιστία των κάδων συγκομιδής (αποτρέπουν την υπερχειλίση) επιτρέπουν την ευελιξία των χειριστών και την ελευθερία να ολοκληρωθούν άλλα καθήκοντα κατά τη διάρκεια της συγκομιδής και του ξεπλύματος των ναυπλίων. Αυτό μπορεί να είναι πολύ χρήσιμο για τους σπουδαστές ή τους ερευνητές που τρέχουν τα πειράματά τους με την ελάχιστη βοήθεια.

Το σύστημα είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για οποιοδήποτε ερευνητικό κέντρο που συμμετέχει στη διατροφή προνυμφών. Αν και μικρό, το σύστημα μπορεί να αναπαραχθεί ή οι αρχές μπορούν να εφαρμοστούν σε δεξαμενές μεγαλύτερου όγκου.

Παραπομπές

- Babu, M.M., Marian, P.M., Kitto, M.R., 2001. A cradle aeration system for hatching *Artemia*. *Aquacult. Eng.* 24, 85–89.
- Creswell, R.L., 1993. *Aquaculture Desk Reference*. Van Nostrand Reinhold Publishing, 205 pp.
- Dehasque, M., Devresse, B., Sorgeloos, P., 1993. Effective suppression of bacteria bloom during hatching and enrichment of *Artemia* and its applicability in fish/shrimp hatcheries. In: *World Aquaculture'93 Proceedings. Book of Abstracts*. European Aquaculture Society, Special Publication No. 22, Ostend.
- Kolkovski, S., Dabrowski, K., 1999. Diets for Fish Larvae – Present State of Art. *World Aquaculture'99 Proceedings*, Sydney, Australia, 406 pp.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*, 295 pp.

- Merchie, G., 1996. Use of nauplii and meta-nauplii. In: Lavens, P., Sorgeloos, P. (Eds.), Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp. 137–161.
- Sorgeloos, P., Dhert, P., Candreva, P., 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200, 147–159.
- Sorgeloos, P., Léger, P., 1992. Improved larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn. *J. World Aquacult. Soc.* 201, 251–264.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Leger, P., Tackaert, W., Versichele, D., 1986. Manual for the Culture and Use of Brine Shrimp *Artemia* in Aquaculture. Artemia Reference Centre, Ghent, Belgium.
- Vanhaecke, P., Sorgeloos, P., 1983. International study on *Artemia*. XIX. Hatchery data for ten commercial sources of brine shrimp cysts and re-evaluation of the “hatchery efficiency” concept. *Aquaculture* 30, 43–52.
- Vanhaecke, P., Siddall, S.E., Sorgeloos, P., 1984. International study on *Artemia*. XXXII. Combined effects of temperature and salinity on survival of *Artemia* of various geographical origin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 80, 259–275.
- Vanhaecke, P., Sorgeloos, P., 1989. International study on *Artemia*. XVIII. The hatching rate of *Artemia* cysts – a comparative study. *Aquacult. Eng.* 1, 263–273.
- Verdonck, L., Swings, J., Kersters, K., Dehasque, M., Sorgeloos, P., Leger, P., 1994. Variability of the microbial environment of Rotifer *Brachionus plicatilis* and *Artemia* production systems. *J. World Aquacult. Soc.* 25 (1), 55–59.

Βιο-ενθυλάκωση στην *Artemia*: Επιδράσεις της Συγκέντρωσης Μορίων κατά τη Διαδικασία Εμπλουτισμού

Bioencapsulation in *Artemia*: Influences of the Particle Concentration in the Enrichment Process

Rolando Gelabert F.*

Facultad de Química, Universidad Autónoma del Carmen, Ave. 56 No. 4 e/31 y Ave. Concordia, Col. Aviación, C.P. 24180, Ciudad del Carmen, Campeche, Mexico

Aquaculture 216 (2003) 143-153

Περίληψη

Οι διαθέσιμες πληροφορίες για τη βιο-ενθυλάκωση της *Artemia* δείχνουν ότι δεν υπάρχει συμφωνία σχετικά με τις συγκεντρώσεις τροφής για την εκπλήρωση αυτού του στόχου. Σε αυτή τη μελέτη, πειράματα με 15 διαφορετικές συγκεντρώσεις των 5 µm διαμέτρου μορίων γαλακτώματος έγιναν. Η συμπεριφορά των διαφορετικών κατηγοριών μεγέθους των ζώων που αναλύθηκαν παρουσιάζονται με τα αποτελέσματα δηλώνοντας ότι, η συμπεριφορά σίτισής τους είναι εξαρτώμενη του μεγέθους. Μια αύξηση στο ποσοστό των πλήρων πεπτικών αγωγών των ατόμων παρατηρείται όταν η συγκέντρωση των μορίων στο μέσο αυξάνεται. Συγκεντρώσεις υψηλότερες από 12500 μόρια/ml επιτρέπουν την πλήρωση του πεπτικού αγωγού στα άτομα μέχρι του μεγέθους 3.2 mm σε 1 h επεξεργασίας. Οι συγκεντρώσεις 200000 και 400000 μόρια/ml επιτρέπουν την καθολική πλήρωση του πεπτικού αγωγού των ατόμων μέχρι 5.6 mm σε 1 h. Για άτομα μεγαλύτερα από 5.6 mm, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μορίων είναι εκείνες που επιτρέπουν την πλήρωση του πεπτικού αγωγού αποτελεσματικότερα.

Σκοπός

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν ο προσδιορισμός των απαραίτητων συγκεντρώσεων των μορίων που προτιμούν κατά τη διαδικασία της ηθμοφαγίας τα διαφορετικά μεγέθη *Artemia*.

Υλικά και μέθοδοι

Για να καθιερωθούν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις τροφών για την βιο-ενθυλάκωση, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές εμπλουτισμού *Artemia* με μόρια γαλακτωμάτων διαμέτρου 5 µm. Το χρησιμοποιημένο εύρος των οργανισμών ήταν μεταξύ 0.8 και 8 mm μήκους. Ομαδοποιήθηκαν σε τρεις κατηγορίες μεγέθους (0.8-3.2, 3.21-5.6, και 5.61-8.0 mm). Όλα τα άτομα προήλθαν από ένα σύστημα παραγωγής βιομάζας όπου το θαλάσσιο μικροφύκος *Tetraselmis tetrahele* χρησιμοποιήθηκε ως τροφή.

Περίπου 50 άτομα τέθηκαν σε φιάλες 250 ml για 60 min. Σε αυτές τις φιάλες, 15 συγκεντρώσεις των μορίων γαλακτώματος (400000, 200000, 100000, 50000, 25000, 12500, 6250, 3125, 1562, 781, 390.6, 195.3, 97.5, 48.8 και 24.4 μόρια/ml) εφαρμόστηκαν. Οι φιάλες έλαβαν συνεχή αερισμό (5 l αέρα ανά l νερού ανά min) για να κρατήσουν τα κατάλληλα επίπεδα οξυγόνου και για να διατηρήσουν τα μόρια σε αιώρηση.

Μετά από 1 h, τα άτομα σκοτώθηκαν με Lugol, παρατηρήθηκαν και μετρήθηκαν

κάτω από ένα στερεοσκοπικό μικροσκόπιο με μια οφθαλμική μικρο-κλίμακα. Οι εγκάρσιες τομές εκτελέστηκαν αργότερα για την παρατήρηση της μετατόπισης των μορίων στον πεπτικό αγωγό, που επιτρέπει σε μας να καθιερώσουμε το ποσοστό του πεπτικού συστήματος που γεμίζει. Οι τομές έγιναν στην κεφαλή, στο πέμπτο θωρακικό τμήμα, και στο πέμπτο κοιλιακό τμήμα. Θεωρώντας ότι, ο πεπτικός αγωγός γεμίζει σταδιακά ξεκινώντας στην κεφαλική περιοχή και τελειώνοντας στο μακρινό τέλος της κοιλιακής περιοχής, άτομα με την κεφαλική περιοχή του αγωγού απολύτως πλήρους θεωρήθηκε ότι έχουν 33% πληρότητα αγωγού. Τα άτομα με πεπτικό αγωγό γεμάτο μέχρι το πέμπτο θωρακικό τμήμα θεωρήθηκε ότι έχουν 66% πληρότητα αγωγού και άτομα με το σύνολο του αγωγού μέχρι το πέμπτο κοιλιακό τμήμα πλήρες θεωρήθηκε ότι διαθέτουν πληρότητα 100%.

Τα αποτελέσματα ομαδοποιήθηκαν σε 15 εικόνες που λαμβάνουν υπόψη το ποσοστό των ατόμων και τη συμπεριφορά πληρότητας του πεπτικού αγωγού από κάθε μεγάλη κατηγορία με όλες τις συγκεντρώσεις των μορίων δοκιμασμένες.

Προκειμένου να ομαδοποιηθούν τα αποτελέσματα, ένας λογαριθμικός μετασχηματισμός των στοιχείων συγκέντρωσης με μόνο το ποσοστό *Artemia* με πληρότητα αγωγού περιελήφθη στη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης.

Αποτελέσματα και συζήτηση

Ο αριθμός ατόμων (n) που χαρακτηρίστηκε σε κάθε μια κατηγορία μελετημένου μεγέθους για κάθε συγκέντρωση των μορίων, παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

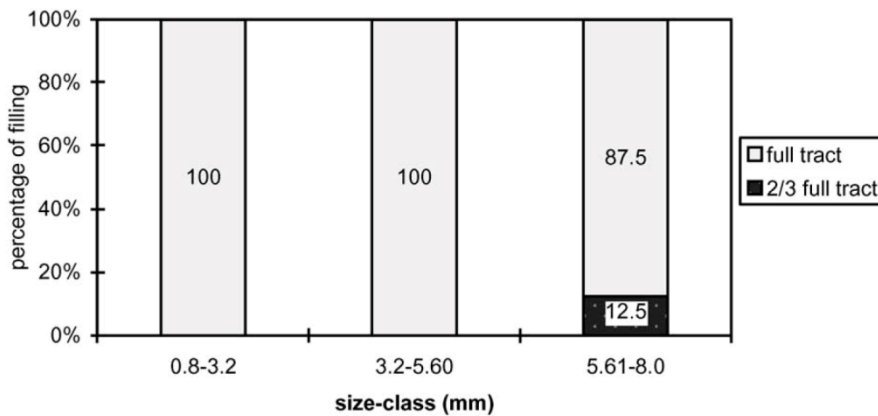
Αριθμός ατομικών μελετών για κάθε κλάση μεγέθους και κάθε συγκέντρωση σωματιδίων

TABLE 1

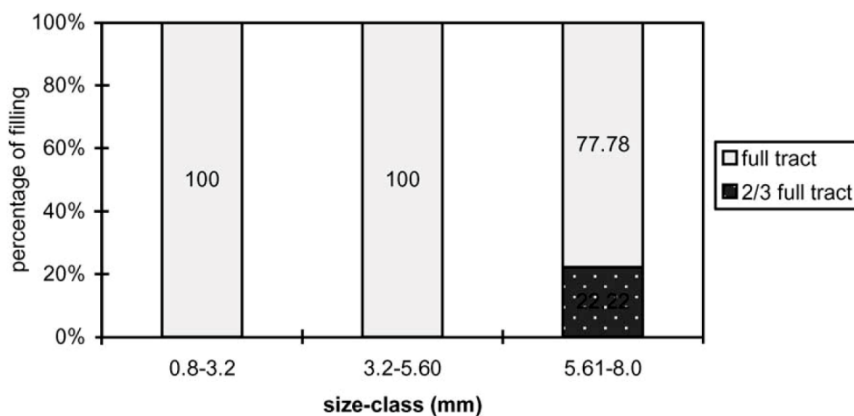
Number of individuals (n) studied for each size class and each particle concentration

Concentration (particles/ml)	Size (0.8–3.2) n	Size (3.21–5.6) n	Size (5.61–8.0) n	Total (n)
400 000	12	10	8	30
200 000	11	11	9	31
100 000	8	12	10	30
50 000	10	8	12	30
25 000	10	13	7	30
12 500	12	12	7	31
6 250	7	13	10	30
3 125	6	16	8	30
1 562	9	16	5	30
781	14	9	7	30
390.6	10	10	10	30
195.3	11	13	6	30
97.5	7	13	10	30
48.8	13	9	8	30
24.4	11	13	7	31

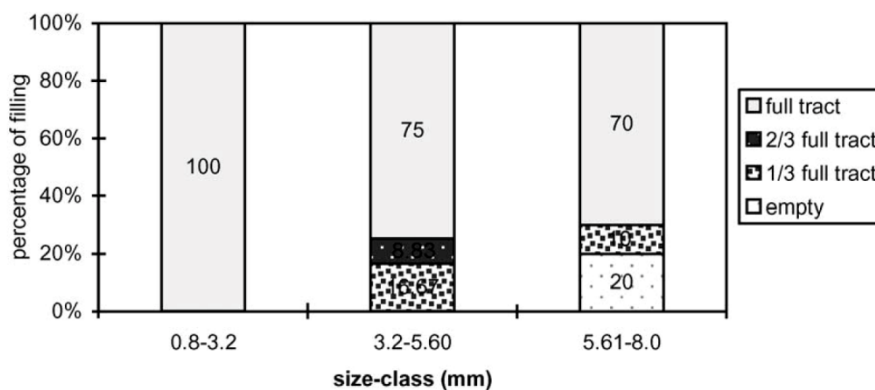
Οι Εικ. 1-15 παρουσιάζουν τη συμπεριφορά του πεπτικού αγωγού για τα άτομα των διαφορετικών κατηγοριών μεγέθους μετά από 1 h επεξεργασίας με κάθε μια από τη δοκιμασμένη συγκέντρωση μορίων.



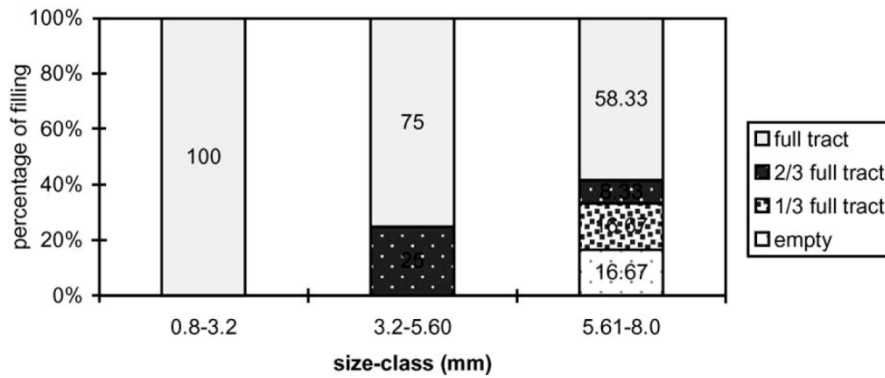
Εικ. 1. Συμπεριφορά πληρότητας του πεπτικού αγωγού με συγκέντρωση 400000 σωματίδια/ml.
 Fig. 1. Behavior of the digestive track filling with the concentration of 400000 particles/ml.



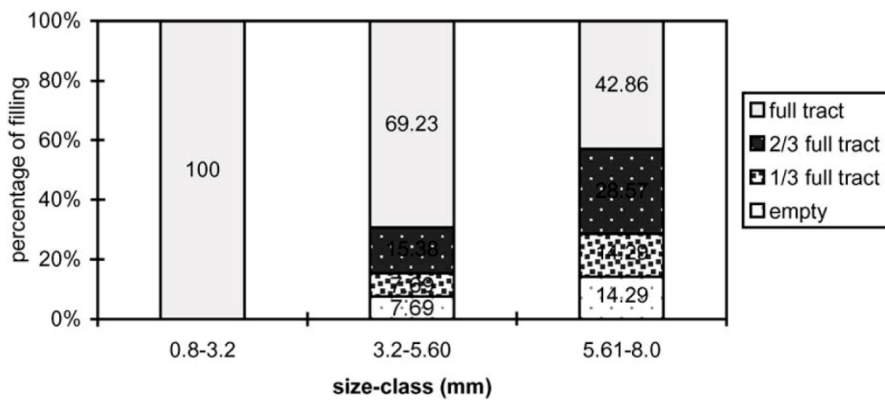
Εικ. 2. Συμπεριφορά πληρότητας του πεπτικού αγωγού με συγκέντρωση 200000 σωματίδια/ml.
 Fig. 2. Behavior of the digestive track filling with the concentration of 200000 particles/ml.



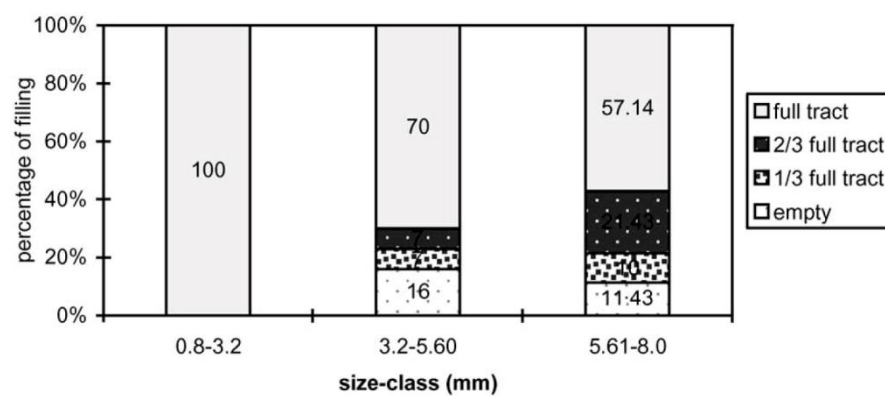
Εικ. 3. Συμπεριφορά πληρότητας του πεπτικού αγωγού με συγκέντρωση 100000 σωματίδια/ml.
 Fig. 3. Behavior of the digestive track filling with the concentration of 100000 particles/ml.



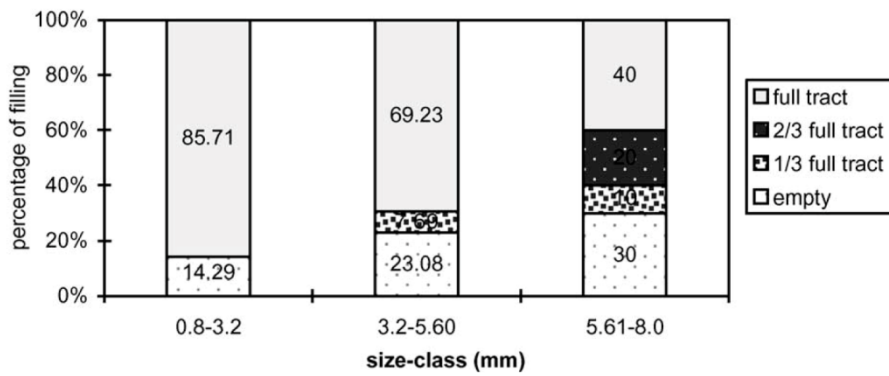
Εικ. 4. Συμπεριφορά πληρότητας του πεπτικού αγωγού με συγκέντρωση 50000 σωματίδια/ml.
 Fig. 4. Behavior of the digestive track filling with the concentration of 50000 particles/ml.



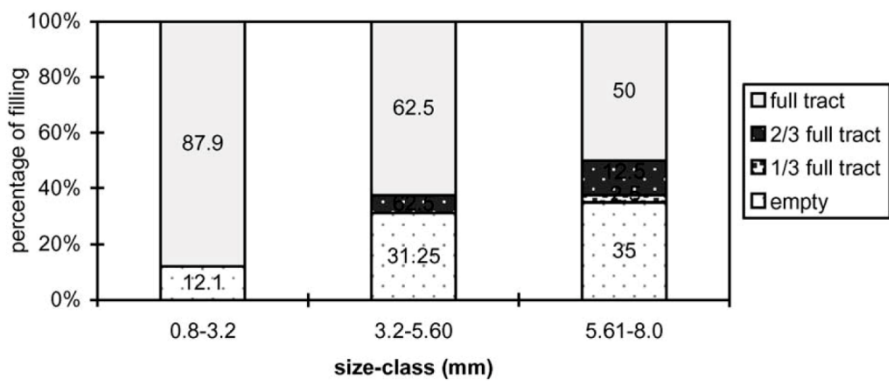
Εικ. 5. Συμπεριφορά πληρότητας του πεπτικού αγωγού με συγκέντρωση 25000 σωματίδια/ml.
 Fig. 5. Behavior of the digestive track filling with the concentration of 25000 particles/ml.



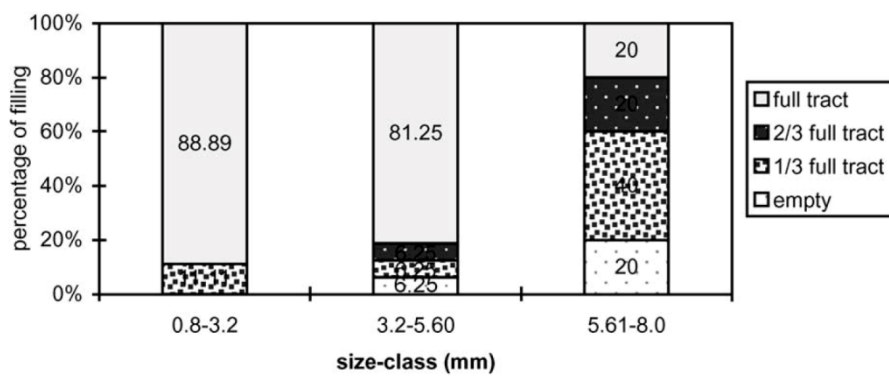
Εικ. 6. Συμπεριφορά πληρότητας του πεπτικού αγωγού με συγκέντρωση 12500 σωματίδια/ml.
 Fig. 6. Behavior of the digestive track filling with the concentration of 12500 particles/ml.



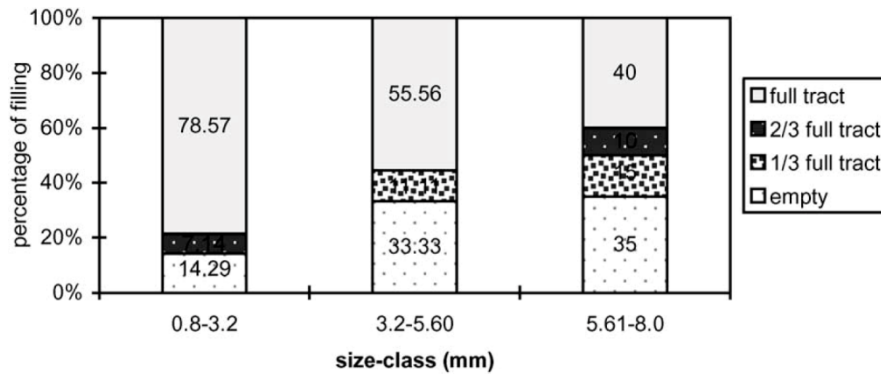
Εικ. 7. Συμπεριφορά πληρότητας του πεπτικού αγωγού με συγκέντρωση 6250 σωματίδια/ml.
 Fig. 7. Behavior of the digestive track filling with the concentration of 6250 particles/ml.



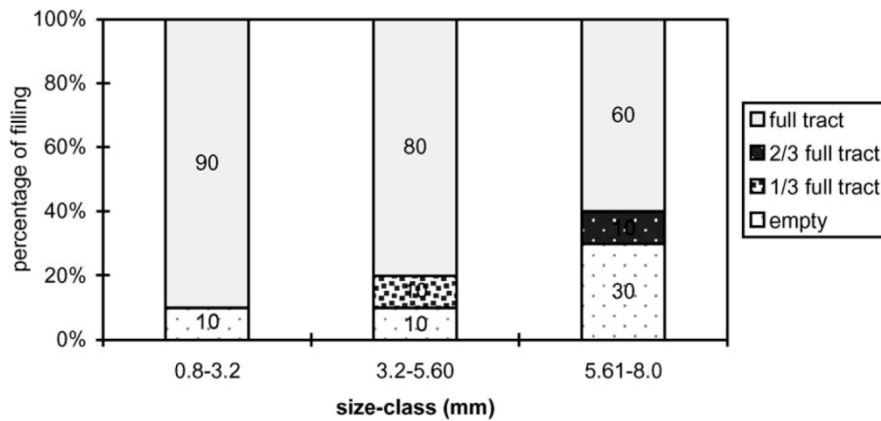
Εικ. 8. Συμπεριφορά πληρότητας του πεπτικού με συγκέντρωση 3125 σωματίδια/ml.
 Fig. 8. Behavior of the digestive track filling with the concentration of 3125 particles/ml.



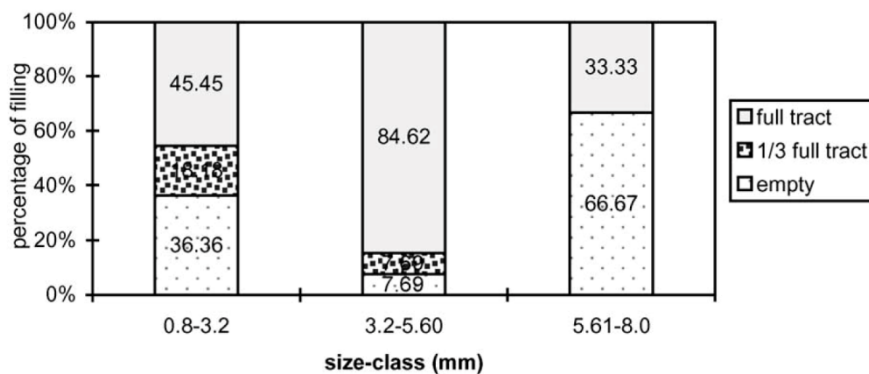
Εικ. 9. Συμπεριφορά πληρότητας του πεπτικού αγωγού με συγκέντρωση 1562 σωματίδια/ml.
 Fig. 9. Behavior of the digestive track filling with the concentration of 1562 particles/ml.



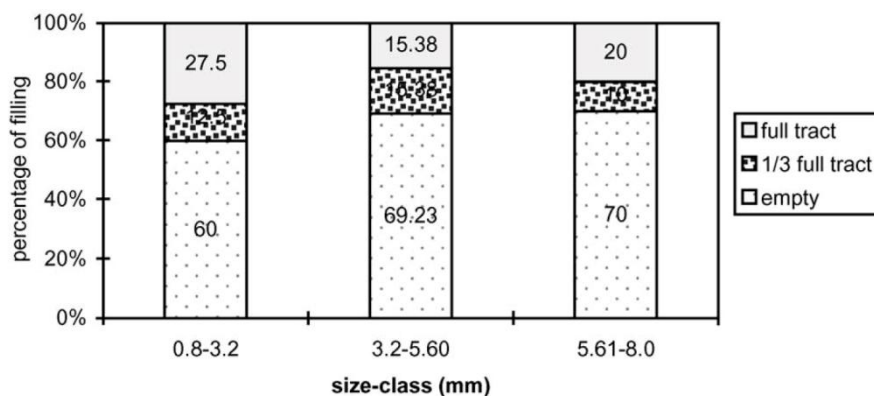
Εικ. 10. Συμπεριφορά πληρότητας του πεπτικού αγωγού με συγκέντρωση 781 σωματίδια/ml.
 Fig. 10. Behavior of the digestive track filling with the concentration of 781 particles/ml.



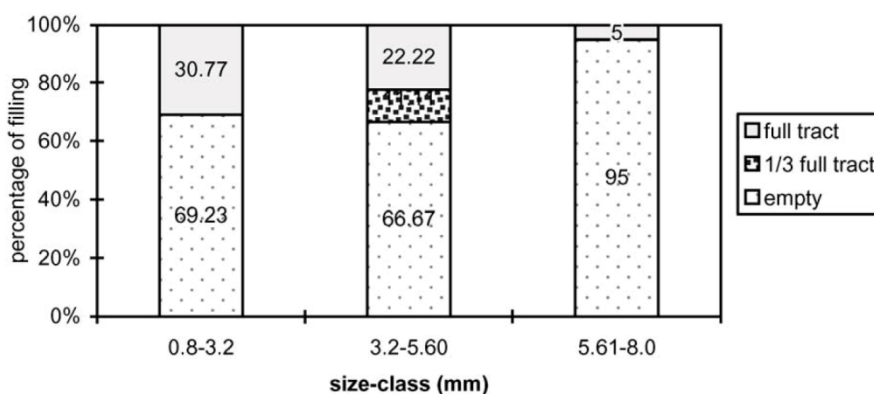
Εικ. 11. Συμπεριφορά πληρότητας του πεπτικού αγωγού με συγκέντρωση 390.6 σωματίδια/ml.
 Fig. 11. Behavior of the digestive track filling with the concentration of 390.6 particles/ml.



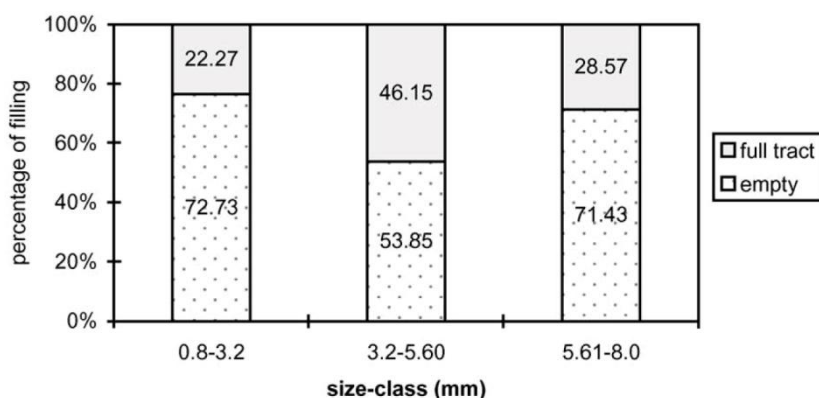
Εικ. 12. Συμπεριφορά πληρότητας του πεπτικού αγωγού με συγκέντρωση 195.3 σωματίδια/ml.
 Fig. 12. Behavior of the digestive track filling with the concentration of 195.3 particles/ml.



Εικ. 13. Συμπεριφορά πληρότητας του πεπτικού αγωγού με συγκέντρωση 97.56 σωματίδια/ml.
 Fig. 13. Behavior of the digestive track filling with the concentration of 97.56 particles/ml.



Εικ. 14. Συμπεριφορά πληρότητας του πεπτικού αγωγού με συγκέντρωση 48.8 σωματίδια/ml.
 Fig. 14. Behavior of the digestive track filling with the concentration of 48.8 particles/ml.



Εικ. 15. Συμπεριφορά πληρότητας του πεπτικού αγωγού με συγκέντρωση 24.4 σωματίδια/ml.
 Fig. 15. Behavior of the digestive track filling with the concentration of 24.4 particles/ml.

Τα άτομα του μικρότερου μεγέθους (0.8-3.2 mm) παρουσιάζουν υψηλές αποδοτικότητες διήθησης παρά το χαμηλότερο βαθμό ανάπτυξης στο σύστημα φιλτραρίσματος των αρχικών σταδίων *Artemia*. Σε αντίθεση με τα μεγαλύτερα

μεγέθη, αυτοί οι μικροί οργανισμοί παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά πληρότητας των πεπτικών αγωγών, στην ίδια ποσότητα του χρόνου και τη χρησιμοποίηση της ίδιας συγκέντρωσης μορίων. Αυτή η συμπεριφορά φαίνεται να συνδέεται με τις μορφολογικές δομές και τις στρατηγικές φιλτραρίσματος στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των ναυπλίων *Artemia* (Cohen, G. προσ. επικοινων.). Η εντονότερη μεταβολική δραστηριότητα των μικρών ατόμων (Wilson, 1989) θα μπορούσε να ευνοήσει αυτή τη συμπεριφορά.

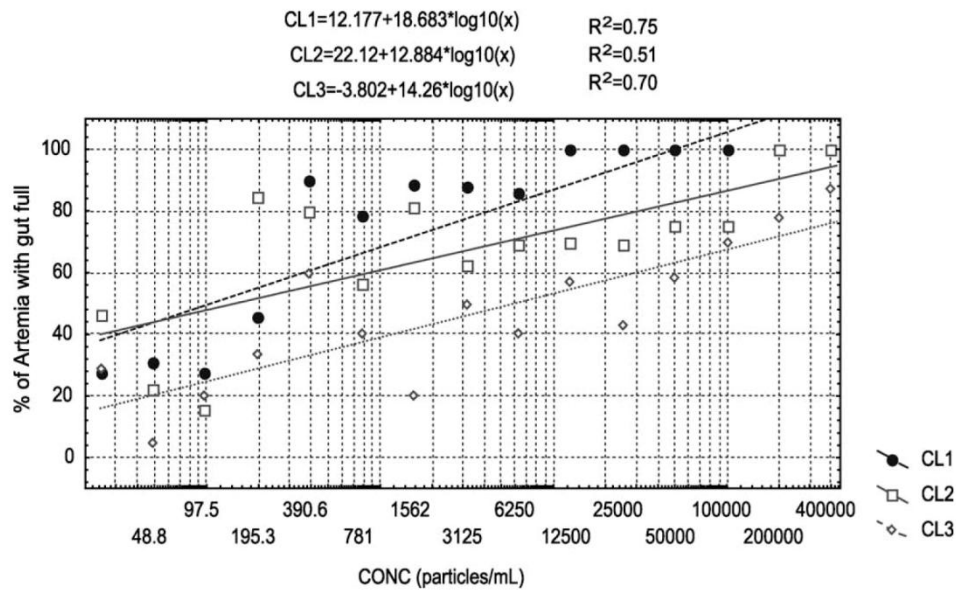
Εάν η βιο-ενθυλάκωση της *Artemia* θεωρείται ως απλή πλήρωση του πεπτικού αγωγού με μικρή βιολογική μεταβολή του προϊόντος εμπλουτισμού στο πεπτικό σύστημα (Tocher *et al.*, το 1997), είναι δυνατό να προκύψει ότι, για τα μικρά άτομα (0.8-3.2 mm), οι συγκεντρώσεις κάτω από 781 μόρια/ml είναι πάρα πολύ χαμηλές για την αποδοτική βιο-ενθυλάκωση επειδή μέρος του πεπτικού αγωγού του πληθυσμού είναι κενό. Σε αντίθεση, συγκεντρώσεις υψηλότερες από 12500 μόρια/ml επέτρεψαν την πλήρωση του πεπτικού αγωγού κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Η παρατηρηθείσα τάση στην πλήρωση του πεπτικού αγωγού στα άτομα με τα μεγέθη μεταξύ 3.21 και 5.6 mm παρουσιάζει επίσης μια διαφορετική συμπεριφορά. Όταν οι συγκεντρώσεις μορίων στο μέσο μειώνονται, το ποσοστό της πλήρωσης του πεπτικού αγωγού των ζώων μειώνεται επίσης και τα ανεπαρκώς γεμισμένα επίπεδα στο πεπτικό σύστημα εμφανίζονται. Το αντίθετο παρατηρείται με τις συγκεντρώσεις 200000 και 400000 μορίων/ml, που καθιστούν αυτές τις συγκεντρώσεις κατάλληλες για τα άτομα με μεγέθη μεταξύ 3.21 και 5.6 mm μετά από 1 h επεξεργασίας με 5 μm μόρια γαλακτώματος.

Για τα μεγαλύτερα ζώα (5.6-8.0 mm), τα αποτελέσματα δείχνουν ότι, οι υψηλότερες δοκιμασμένες συγκεντρώσεις μορίων (200000 και 400000 μορίων/ml) είναι οι πιο κατάλληλες για βιο-ενθυλάκωση, επειδή επιτρέπουν τα υψηλότερα ποσοστά της πλήρωσης του πεπτικού συστήματος. Κατόπιν 1 h επεξεργασίας, μεταξύ 77% και 87% των επιλεγμένων ζώων είχαν την πεπτική οδό τους απολύτως πλήρη με τα μόρια γαλακτώματος. Εάν αντί της χρησιμοποίησης μορίων 5 μm, είχαν χρησιμοποιηθεί μεγέθη μορίων μεταξύ 6.8 και 27.5 μm, η συγκέντρωση των μορίων που υιοθετείται μπορεί να είχε μειωθεί περαιτέρω. Αυτές οι διαστάσεις μορίων είναι εκείνες που η *Artemia* λαμβάνει ευκολότερα (Gelabert, 2001) και ένας μικρότερος αριθμός τους θα επέτρεπε το ίδιο γεμισμένο επίπεδο του πεπτικού συστήματος.

Οι τάσεις της γραμμής παλινδρόμησης στην Εικ. 16 δείχνουν ότι, για όλα τα μεγέθη, όταν τα μόρια συγκέντρωσης στο μέσο αυξάνονται, υπάρχει μια αύξηση του ποσοστού των ζώων με πλήρες το πεπτικό τους σύστημα. Η *F-τιμή* και η προκύπτουσα *P-τιμή* που χρησιμοποιούνται γενικά στο *F-test* της σχέσης μεταξύ της εξαρτώμενης μεταβλητής και του συνόλου των ανεξάρτητων μεταβλητών για όλες τις γραμμές παλινδρομήσεις είναι σημαντικές ($P < 0.05$). Εάν η βιο-ενθυλάκωση ορίζεται ως μια απλή διαδικασία πλήρωσης του πεπτικού αγωγού των οργανισμών χωρίς την ενσωμάτωση στους ιστούς, κάποιος μπορεί να συμπεράνει ότι, οι υψηλές συγκεντρώσεις των τροφών δεν ευνοούν απαραίτητως τον εμπλουτισμό σε άτομα μικρού μεγέθους.

Από τα παρατηρηθέντα αποτελέσματα, είναι δυνατό να δηλωθεί ότι η βιο-ενθυλάκωση πρέπει να πραγματοποιηθεί λαμβάνοντας υπόψη το μέγεθος των οργανισμών και των συγκεντρώσεων μορίων που επιτρέπουν ένα κατάλληλο επίπεδο κορεσμού του πεπτικού συστήματος, χωρίς ένα πλεόνασμα των τροφών που θα μπορούσε τελικά να λειτουργήσει ενάντια στην ποιότητα του μέσου.



Εικ. 16. Επίδραση των συγκεντρώσεων τροφής στην πλήρωση του πεπτικού αγωγού των δοκιμαζόμενων ζώων.

Fig. 16. Effect of food concentrations in the digestive tract filling of animals tested.

Επειδή η βιο-ενθυλάκωση χρειάζεται ένα προϊόν που να κρατά τη φυσική ακεραιότητά του κατά την τοποθέτηση στο νερό, υπονοώντας την έννοια της φυσικής ακεραιότητας ως θρεπτική αξία, και ορισμένα σχετικά χαρακτηριστικά, κάποιος μπορεί να πει ότι η συγκέντρωση αυτού του προϊόντος πρέπει να καθιερωθεί ως κύτταρα ανά μονάδα όγκου, μικροκύτταρα ανά μονάδα όγκου, ή μόρια ανά μονάδα όγκου. Μεταξύ των μονάδων όγκου, τα ml είναι εκείνα που υιοθετούνται περισσότερο. Για μικροφύκη και ζύμες αρτοποιίας, η πρώτη μονάδα μπορεί να είναι η πύο κατάλληλη, για τα γαλακτώματα, μικροκύτταρα ή σταγονίδια του γαλακτώματος ανά ml πρέπει να χρησιμοποιούνται, για μερικούς τύπους μικρο-μορίων ή μικρο-ενθυλακίων τεχνητών τροφών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα μόρια/ml.

Για τις βιταμίνες και τις ορμόνες, ή άλλα διαλυτά προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν για να προκαλέσουν την τροποποίηση της θρεπτικής αξίας του οργανισμού, οι χρησιμοποιούμενες μονάδες θα μπορούσαν να είναι μερικές από εκείνες που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Αυτά τα προϊόντα χρησιμοποιούνται γενικά συμπεριλαμβανομένων των ελαίων, μέσα σε μικρο-κάψουλες, ή ως εσωτερική φάση στα λιποσώματα.

Η έκφραση της συγκέντρωσης στις μονάδες όπως παρουσιάζονται εδώ θα διευκόλυνε τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφορετικών συντακτών και θα επέτρεπε έναν καλύτερο έλεγχο της διαδικασίας εμπλουτισμού.

Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τους όρους που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα, είναι δυνατό να διεξαχθούν τα εξής συμπεράσματα:

Απαιτείται η γνώση του μεγέθους των ατόμων για την ολοκλήρωση της βιο-ενθυλάκωσης.

Τα ζώα με το μικρότερο μέγεθος φιλτράρουν αποτελεσματικότερα επειδή το πεπτικό τους σύστημα γεμίζει με μια συγκέντρωση μικρότερων μορίων στο μέσο.

Η συγκέντρωση των μορίων στο μέσο παρουσιάζει αξιοπρόσεχτη επιρροή στη διαδικασία πληρότητας των πεπτικών αγωγών για τα δοκιμασμένα άτομα. Το ποσοστό πληρότητας του πεπτικού συστήματος αυξάνεται με την άνοδο της συγκέντρωσης των μορίων στο μέσο. Συγκεντρώσεις μέχρι 12500 μόρια/ml επιτρέπουν την πλήρωση του πεπτικού αγωγού στα άτομα μεταξύ 0.8 και 3.2 mm μήκους σε 1 h επεξεργασίας.

Οι συγκεντρώσεις 200000 και 400000 μόρια/ml εξασφαλίζουν το μέγιστο ποσοστό πληρότητας του πεπτικού αγωγού στα άτομα από 3.21 έως 5.6 mm μήκους σε 1 h επεξεργασία.

Για τα ζώα μεγαλύτερα των 5.6 mm μήκους, οι συγκεντρώσεις 200000 και 400000 μορίων/ml επιτρέπουν την πλήρωση του πεπτικού αγωγού με τον πιο ικανό τρόπο.

Παραπομπές

- Bhat, B.V., 1992. Potentials and prospects for an *Artemia* aquabusiness in India. *Seafood Export J.* 24, 27–31.
- Coutteau, P., Sorgeloos, P., 1997. Manipulation of dietary lipids, fatty acids and vitamins in zooplankton cultures. *Freshw. Biol.* 38, 501–512.
- Dhont, J., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1991. Development of a lipid-enrichment technique for *Artemia* juveniles produced in an intensive system for use in marine larviculture. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. (Eds.), *Larvi '91*, pp. 51–55.
- Gelabert, R., 2001. *Artemia* bioencapsulation: I. Effect of particle sizes on the filtering behavior of *Artemia franciscana*. *J. Crustac. Biol.* 21, 435–442.
- Gomez-Gil, B., Cabanillas-Ramos, J., Paez-Brambila, S., Roque, A., 2001. Standardization of the bioencapsulation of enrofloxacin and oxytetracycline in *Artemia franciscana* Kellogg, 1906. *Z. Aquacult.* 196, 1–12.
- Han, K., Geurden, Sorgeloos, P., 2000. Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of n y 3 highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture* 183, 335–347.
- Hayashi, M., Toda, K., Yoneji, T., Sato, O., Kitaoka, S., 1993. Dietary value of rotifers and *Artemia* enriched with *Euglena gracilis* for red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi (Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.)* 59, 1051–1058.
- Hontoria, F., Crowe, J.H., Crowe, L.M., Amat, F., 1993. Bioencapsulation of liposomes in *Artemia* nauplii. Potential use as delivery system in larviculture. *Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura*, Cervino, A, pp. 497–502.
- Leger, P., Bengtson, D.A., Simpson, K.L., Sorgeloos, P., 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol.* 24, 521–623.
- McEvoy, L.A., Navarro, J.C., Bell, J.G., Sargent, J.R., 1995. Autoxidation of oil emulsions during the *Artemia* enrichment process. *Aquaculture* 134, 1–2.
- McEvoy, L.A., Navarro, J.C., Hontoria, F., Amat, F., Sargent, J.R., 1996. Two novel *Artemia* enrichment diets containing polar lipid. *Aquaculture* 144, 339–352.
- Olsen, A.I., Jensen, A., Evjemo, J.O., Olsen, Y., 1997. Effect of algal addition on stability of fatty acids in enriched *Artemia franciscana*. *Hydrobiologia* 358, 205–210.
- Ozkizilcik, S., Chu, F.-L.E., 1994. Evaluation of omega-3 fatty acid enrichment of *Artemia* nauplii as food for striped bass *Morone saxatilis* Walbaum larvae. *J. World Aquac. Soc.* 25, 147–154.
- Tocher, D.R., Mourente, G., Sargent, J.R., 1997. The use of silages prepared from fish neural tissues as enrichers for rotifers (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* in the nutrition of larval marine fish. *Aquaculture* 148, 2–3.
- Tonheim, S.K., Koven, W., Rønnestad, I., 2000. Enrichment of *Artemia* with free methionine. *Aquaculture* 190, 223–235.
- Watanabe, T., Oowa, F., Kitajima, C., Fujita, S., 1978. Nutritional quality of brine shrimp, *Artemia salina*, as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 44, 1115–1121.
- Wilson, J.A., 1989. Cap. 14. Nutricio'n y temperatura corporal. In: Limusa, E. (Ed.), *Fundamentos de Fisiología Animal*. Macmillan, México, DF, p. 984.

Ένα Σύστημα Αερισμού Λίκνων για την Εκκόλαψη της *Artemia*

A Cradle Aeration System for Hatching *Artemia*

M. Michael Babu ^{a,b,*}, M. Peter Marian ^{a,b}, M.R. Kitto ^c

^a Institute for Artemia Research and Training, Manonmanium Sundaranar University, Rajakkamangalam-629502, Tamil Nadu, India.

^b Institute for Coastal Area Studies, Manonmanium Sundaranar University, Scott Christian College Campus, Nagercoil-629003, Tamil Nadu, India

^c Department of Botany and Research Centre, Scott Christian College Campus, Nagercoil-629003, Tamil Nadu, India

Aquacultural Engineering 24 (2001) 85-89

Περίληψη

Η απόδοση εκκόλαψης τριών τύπων συστημάτων αερισμού συγκρίθηκε. Για εμπορικές εφαρμογές, το σύστημα αερισμού λίκνων ήταν ανώτερο από το απλό σύστημα πετρών αέρα (90.7 εναντίον 96.5% εκκολασιμότητα). Η χρήση αυτού του συστήματος οδήγησε σε οριακή Instar 1 παραγωγή, χαμηλότερη E-1-σύλληψη, υψηλή δραστηριότητα νερού στην ενυδάτωση κύστεων, ελάχιστο τραυματισμό ναυπλίων, και ευκολία στη συγκομιδή.

Σκοπός

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η ανάπτυξη συστημάτων εκκόλαψης *Artemia*, με έμφαση στο δίκτυο αερισμού, για εφαρμογή τους σε εκκολαπτήρια γαρίδων.

Υλικά και μέθοδοι

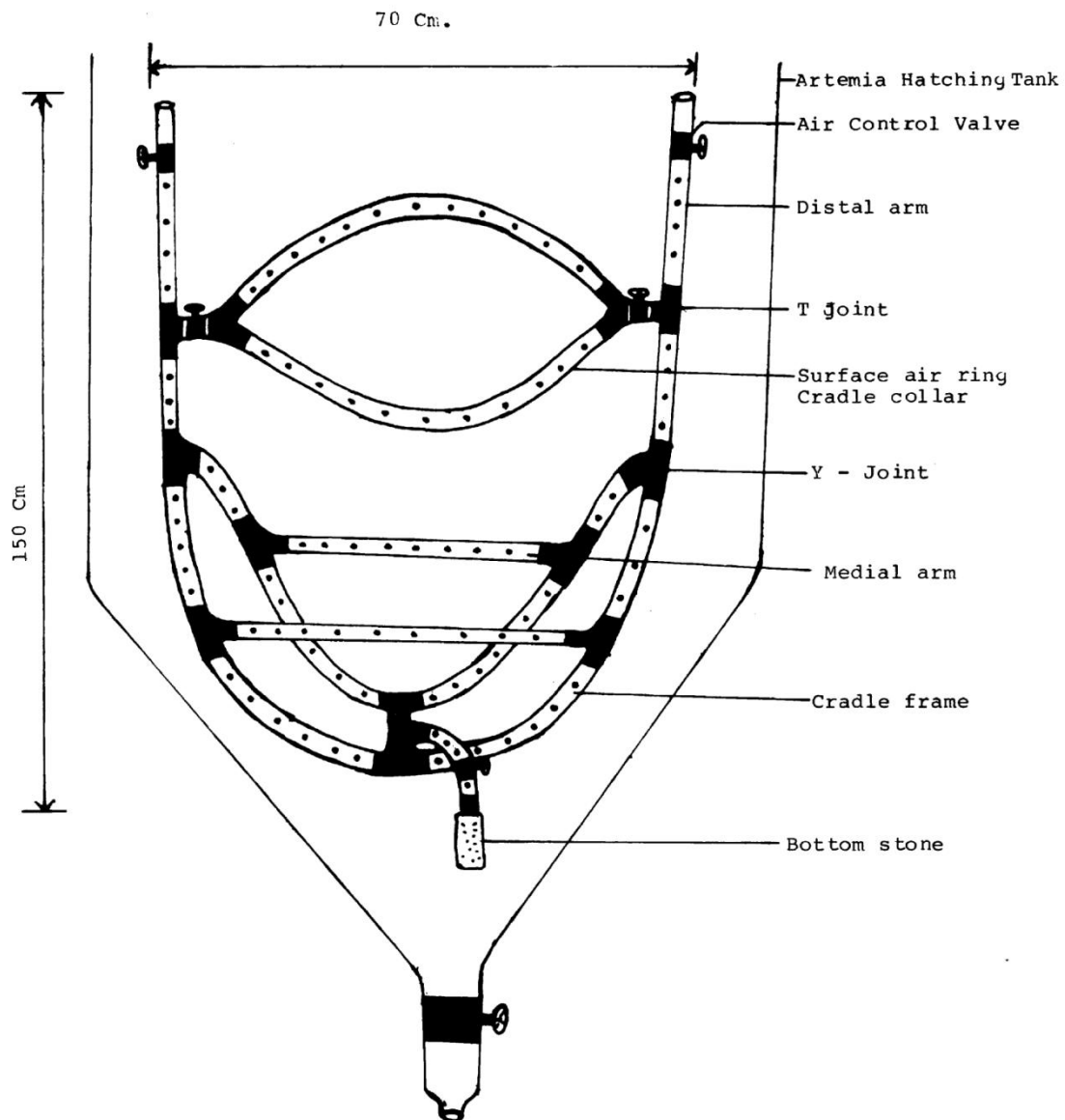
Ο αερισμός λίκνων (cradle) αποτελείται από πλαστικούς σωλήνες 0.6 mm που αρθρώνονται ο ένας στον άλλο για να διαμορφώσουν ένα πλαίσιο λίκνων (Εικ. 1) χρησιμοποιώντας Υ και Τ διαμορφωμένους συνδετήρες (αντάπτορες). Η εναέρια γραμμή σωλήνων αερισμού οδηγεί σε δύο άνω βραχίονες (με χωριστές βαλβίδες ελέγχου) που συνδέονται με ένα επιφανειακό δαχτυλίδι αέρα. Ο ακραίος βραχίονας επίσης επεκτείνεται και προς τα κάτω ως περιλαίμιο αναστολής για να συγκρατεί τα τμήματα των λίκνων.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε μαύρη, ενισχυμένη με πλαστικές ίνες, κυλινδρική δεξαμενή (FRP), χωρητικότητας 500 l. Η εξωτερική επιφάνεια του πυθμένα της δεξαμενής διέθετε ρυθμιστική βαλβίδα τύπου θυρών, η οποία διευκολύνει την εκλεκτική συγκομιδή των ναυπλίων *Artemia*. Η φωτεινή διαφανής περιοχή που βρίσκεται κοντά στην κατώτατη έξοδο βοηθά στη συμπεριφορά των ναυπλίων *Artemia* ως προς τη φωτοτακτική έλξη.

Φιλτραρισμένο θαλάσσιο νερό (35 ppt) χρησιμοποιήθηκε για την εκκόλαψη. Η θερμοκρασία δωματίου είχε έναν μέσο όρο 30°C με εύρος μεταξύ 32-28°C. Η μέση τιμή της θερμοκρασία του μέσου εκκόλαψης ήταν 30°C. Η δεξαμενή εκκόλαψης φωτίστηκε με λάμπες φθορισμού με ένταση στην επιφάνεια νερού περί τα 1950-2050 lux.

Η απολύμανση της κύστης πραγματοποιήθηκε με τη βύθισή τους για 30 min σε 150 ppm υγρής χλωρίνης (NaOCl) και έπειτα πλύθηκαν λεπτομερώς χρησιμοποιώντας το

φιλτραρισμένο θαλάσσιο νερό έως ότου δεν είχαν οι κύστεις καμία μυρωδιά χλωρίου. Οι απολυμασμένες κύστεις (1.68 g/l) αφήθηκαν στη δεξαμενή εκκόλαψης και αερίστηκαν από τον αερισμό τύπων λίκνων. Η ενυδάτωση μετρήθηκε με τη διάδοση 1 g ενυδατωμένης κύστης σε χαρτί με στίγματα για 10 λεπτά. Μετά από όλη την εξάτμιση του εξωτερικού νερού που βρέθηκε στην ενυδατωμένη κύστη από το έγγραφο, οι κύστεις ζυγίστηκαν. Το αυξανόμενο βάρος (g) αντιπροσωπεύεται ως δραστηριότητα ενυδάτωσης του νερού. Η παρατήρηση E-1, E-2, ελεύθερων ναυπλίων και E-1 σύλληψη παρατηρήθηκαν με φωτεινό μικροσκόπιο. Η πρώτη συγκομιδή έγινε 16 h μετά από την επώαση. Η πρώτη συγκομιδή περιέλαβε τρεις υπο-συγκομιδές που έγιναν μέσα σε διαστήματα 5 min. Το επίπεδο αερισμού μειώθηκε στο 50% του αρχικού ποσοστού μετά από 12 h επώασης. Η δεύτερη συγκομιδή και η τελική συγκομιδή έγιναν 24 h μετά από την επώαση. Νερό πιτσίλιζε κάθε 3 h τις δευτερεύων εμφανισμένες κύστεις στην κορυφή. Ο ρυθμός αερισμού ήταν 15-20 l ανά λεπτό. Ο ρυθμός αερισμού του συστήματος καθορίστηκε με τη μέθοδο των Sorgeloos *et al.*, (1986).



Εικ. 1. Σχηματική παράσταση του συστήματος αερισμού τύπου λίκνων.
Fig. 1. Structural view of the cradle aeration system.

Οι γραμμές αέρα τρυπήθηκαν με 500 μm δίδυμες τρύπες στην κεντρική περιοχή ανά 2cm και 180° μεταξύ τους. Οι ναύπλιοι που συλλέγονταν στραγγίζονταν έξω χρησιμοποιώντας ένα πλέγμα 215 μm και τοποθετούνταν σε κυλινδρική δεξαμενή αποθήκευσης ναυπλίων FRP (250 l χωρητικότητας) με βαθμονόμηση για τον όγκο νερού. Το ξέπλυμα εκτελέστηκε χρησιμοποιώντας νάιλον φίλτρο, για την αφαίρεση των διαλυμένων μικρομορίων κατά την εκκόλαψη.

Ο υπολογισμός έγινε με δείγματα 10 φορές, ενός l διαλύματος αποθηκευμένων ναυπλίων και κάθε φορά αραιώνοντάς το 10 φορές (με την προσθήκη 9 l θαλάσσιου νερού) και επιλέγοντας 10 φορές περίπου 25 ml, και μετρώντας τα με την τοποθέτηση σε ένα δισκίο petri ζωντανά και μετά από αφαίρεση των πιθανών νεκρών ναυπλίων. Οι μετρημένοι ναύπλιοι από το δείγμα των 25 ml λαμβάνεται ως X, η μέση ύπαρξη X. Η τιμή του X είναι πολλαπλάσια του 40 και η αξία προϊόντων πολλαπλάσια του 250, για να βρεθεί ο συνολικός αριθμός των εκκολαπτόμενων ζωντανών ναυπλίων *Artemia* από τη δεξαμενή εκκόλαψης.

Το απλό σύστημα πέτρας-αέρος αποτελείται από δύο συστατικά. Ένα είναι ο σωλήνας αέρος και το άλλο είναι η πέτρα αέρος. Σε αυτό το σύστημα, οι σωλήνες αέρος συνδέθηκαν με τον κεντρικό σωλήνα παροχής αέρα χρησιμοποιώντας τη βαλβίδα ρυθμιστών, η οποία βοηθά να ρυθμίσει την παροχή αέρα στα συστήματα εκκόλαψης. Η πέτρα αέρος κρεμάστηκε 2 cm πάνω από την κατώτατη επιφάνεια της δεξαμενής εκκόλαψης. Το ποσοστό ροής αέρα μειώθηκε μετά από την επιβεβαίωση της πλήρους εκκόλαψης. Ο κώνος Imhoff, το δεύτερο σύστημα που συγκρίθηκε αποτελούσαν από γυαλί ή διαφανές πλαστικό σε διαφορετικές χωρητικότητες αποτελούμενο από έναν αεροσωλήνα στο κέντρο του κώνου που βοηθά τον καλό αερισμό και τη γρήγορη ενυδάτωση των κύστεων.

Αποτελέσματα και συζήτηση

Η επιρροή ενός αερισμού τύπου λίκνων βοήθησε την ομοιογενή διάλυση δίνοντας υψηλότερο ποσοστό εκκόλαψης, και η μέγιστη παραγωγή ναυπλίων στην πρώτη συγκομιδή παρουσιάζει κρίσιμες παραλλαγές στις παρόμοιες παραμέτρους με το σύστημα απλής πέτρας αέρα. Η ποσοστιαία αύξηση στην εκκόλαψη με το σύστημα αερισμού λίκνων ήταν 4.2%. Η ποσοστιαία αύξηση σε instar I παραγωγή κατά τη διάρκεια της πρώτης συγκομιδής ήταν 16.3% με τον αερισμό λίκνων και είναι ο υψηλότερος καταγραμμένος παράγοντας συγκρίνοντας όλες τις άλλες παραμέτρους εκκόλαψης. Ο αερισμός λίκνων προκαλεί αποτελεσματικά τις κύστες στο E-1 στάδιο (στάδιο ομπρελών) μέσα σε 9 h της επώασης. Σε 11 h μετά από την επώαση, το 58% των συνολικών κύστεων έφθασε το E-1 στάδιο στο σύστημα λίκνων αερισμού έναντι στο 45% E-1 στο σύστημα πέτρα αέρος. Τα αποτελέσματα του κώνου εκκόλαψης Imhoff ήταν πολύ καλύτερα από τον αερισμό εκκόλαψης λίκνων. Τα στοιχεία εκκόλαψης Imhoff έδειξαν 91.1% συνολικής εκκόλαψης και 73.2% instar I συγκομιδή. Η δραστηριότητα ενυδάτωσης νερού (g/g κύστες w/w) των κύστεων ήταν 1.39, 1.45 και 1.51 με απλή πέτρα αέρος, αερισμό λίκνων και συστήματα κώνου Imhoff, αντίστοιχα. Το ποσοστό E-1 σύλληψης ήταν 3% στο σύστημα πέτρα αέρος, 0.5% στο σύστημα αερισμού λίκνων και 0.2% στο σύστημα κώνων Imhoff. Όλα τα ανωτέρω αποτελέσματα έχουν δοθεί στον Πίνακα 1.

Τα πλεονεκτήματα του παρόντος συστήματος οφείλονται στην υιοθέτηση των ακόλουθων λειτουργιών. Τα αυγά οφείλουν να είναι βασικά σε κίνηση (Terramoto

and Kinoshita, 1961). Η επιφάνεια του σωλήνα απελευθερώνει αέρα για τη θερμορύθμιση του συστήματος εκκόλαψης χωρίς μια μεταβλητή κλίση θερμοκρασίας. Ο χωρισμός του μοριακού αέρα σε μικρές φυσαλίδες μειώνει τη μερική πίεση του οξυγόνου ανά περιοχή μονάδων και αυξάνει

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Επίδοση εκκόλαψης των κύστεων *Artemia* σε διαφορετικά συστήματα εκκόλαψης

TABLE 1

Hatching performance of *Artemia* cysts in different hatching systems

Hatching system performance values	Dropline aeration (Single air stone) 500 l	Cradle aeration 500 l	Imhoff cone (Single air stone) 1 l
Number of nauplii harvested in first harvest/g cyst (16 h after incubation)	114 612	143 532	166 713
Number of nauplii harvested in second harvest	101 638	83218	61037
Hatching percentage	86.5	90.7	91.1
Time taken for attaining E-1 stage (hours)	11.0–12.0	9.0	8.5
% E-1 occurrence (after 11 h)	45%	58%	69%
E-2 stage appearance (hours after incubation)	12.0	10.0	9.7
Free nauplii appearance (hours after incubation)	13.0–14.0	12.0	11.5
% E-1 arrest (24 h after incubation)	3%	0.5%	0.2%
Water hydration activity a_w (g/g cysts) w/w 1 h after hydration	1.39	1.45	1.51

το χρόνος διατήρησης στο μέσο. Ο δυνατός αερισμός στη στήλη εκκόλαψης βεβαιώνει τη διανομή του οξυγόνου σε κάθε κυβική μονάδα ολόκληρης της καλλιέργειας. Η πέτρα αέρος του πυθμένα βοηθά κατά τη διάρκεια του χρόνου συγκομιδής στην αποφυγή συσσώρευσης των ναυπλίων εξασφαλίζοντας μια ελάχιστη κυκλοφορία αέρα για τους ναύπλιους των κατώτατων στρωμάτων. Αντίθετα, από τη διάσπαση του συγκεντρωμένου αέρα από μια πηγή σε μια πέτρα ή έναν διασκορπιστή αέρα, η ενότητα αερισμού λίκνων έχει τρεις λειτουργίες. Κατ' αρχάς, ωθώντας με δύναμη από την εκροή κατώτατου αέρα στην τακτοποίηση της βαρύτητας των κύστεων. Δεύτερον, απελευθερώνοντας δύναμη από τον αέρα του πυθμένα από το κάθισμα λίκνων, την αναστολή λίκνων και τα ενδιάμεσα άκρα στις ανασταλμένες κύστες. Επωθητική δύναμη βύθισης στις επιπλέουσες κύστες. Πριν από τη συγκομιδή των ναυπλίων, η διακοπή του αερισμού με τις βάνες επιφάνειας βοηθά τα αρχικά σπασμένο κελύφη των κύστεων σε άνωση.

Οι Lavens και Sorgeloos (1987), δηλώνουν ότι, το επαρκές μοριακό οξυγόνο με τις ικανοποιητικές μερικές πιέσεις είναι μια ουσιαστική απαίτηση για την αεροβική επαναδραστηριοποίηση της μεταβολικής διαδικασίας και ανάδυσης των προναυπλίων από τις κύστες. Εντούτοις, η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει ότι για την αποφυγή των κλίσεων οξυγόνου κατά τη διάρκεια της εκκόλαψης είναι προφανές ότι

μια καλή ομοιογενής μίξη των κύστεων στο μέσο επώασης απαιτείται. Όπως έχει επισημανθεί από τους συντάκτες στην παρούσα μελέτη, ο βίαιος αέρας με έντονη ανάδευση μπορεί να έχει μια επιβλαβή επίδραση στους ναύπλιους *Artemia* (Greve, 1968).

Παραπομπές

- Greve, W., 1968. The 'Plankton Kriesel' a new device for culturing zooplankton. *Mar. Biol.* 1, 201–203.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., 1987. The cryptobiotic state of *Artemia* cysts, its diapause deactivation and hatching: a review. In: Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Decleir, W., Jaspers, E. (Eds.), *Artemia Research and Its Applications — Ecology, Culturing Use in Aquaculture*, vol. 3. Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 556.
- Prescott, S.R., 1980. Economics of *Artemia* nauplii use in aquaculture. *Proc. World Maricult. Soc.* 11, 175–180.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Leger, P., Tackaert, W., Versichele, D., 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. *Artemia Reference Centre*, Ghent, Belgium, pp. 69–74.
- Terramoto, K., Kinoshita, S., 1961. Some information on the culture of *Artemia*. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 27, 801–804.

Ελεγχόμενη Παραγωγή Βιομάζας *Artemia* Χρησιμοποιώντας μια Αδρανή Εμπορική Τροφή, Συγκρινόμενη με τα Μικροφύκη *Chaetoceros*

Controlled Production of *Artemia* Biomass Using an Inert Commercial Diet, Compared with the Microalgae *Chaetoceros*

Ludwig C.A. Naegel *
Instituto Politécnico Nacional,
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (IPN:CICIMAR) Apdo. Postal 592 La Paz,
Baja California Sur, Mexico

Aquacultural Engineering 21 (1999) 49-59

Περίληψη

Κατά τη διάρκεια εργαστηριακών πειραμάτων, *Artemia* ταΐστηκε 14 ημέρες από το ναύπλιο στο ενήλικο στάδιο με μια εμπορικά διαθέσιμη, εμπλουτισμένη και μη-εμπλουτισμένη, αδρανή, ξηρή παιδική τροφή ("Nestum"). Η αύξηση, η επιβίωση και η περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά της *Artemia* καθορίστηκαν και συγκρίθηκαν με *Artemia* που ταΐστηκαν με μονοκύτταρα μικροφύκη *Chaetoceros sp.* Η ανάπτυξη της *Artemia* με Nestum οδήγησε σε ένα υψηλό ποσοστό επιβίωσης (Nestum 72%; Nestum εμπλουτισμένο 79%) και μια αύξηση μετά από 11 ημέρες 4.93 mm με Nestum και 5.02 mm με εμπλουτισμένο Nestum, που ήταν παρόμοια με *Artemia* που εκτρεφόταν με *Chaetoceros*. Η περιεκτικότητα σε λιπίδια της *Artemia* που εκτράφηκε σε Nestum ήταν σημαντικά υψηλότερη και η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη χαμηλότερη από την *Artemia* που εκτράφηκε με *Chaetoceros*. Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και τέφρας ήταν παρόμοια. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι *Artemia* εκτροφής με Nestum είναι μια βιώσιμη και οικονομική εναλλακτική λύση στην επίπονη παραγωγή των μονοκύτταρων φυκών.

Σκοπός

Στη μελέτη αυτή, ένα ξηρό, εύκολο στην πέψη, πλήρους θρεπτικότητας και εμπορικά διαθέσιμο προϊόν δοκιμάστηκε ως προς τη χρήση του σαν τροφή για την παραγωγή βιομάζας *Artemia*. Η επίδραση αυτού στην αύξηση και την επιβίωση της *Artemia* εκτρεφόμενης κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες προσδιορίστηκε και συγκρίθηκε με *Artemia* εκτρεφόμενη με *Chaetoceros*.

Υλικά και μέθοδοι

Οι κύστες της *Artemia franciscana* (κόλπου Σαν Φρανσίσκο) αποκελυφοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τυποποιημένες τεχνικές (Sorgeloos *et al.*, 1977) και επώαστηκαν υπό τις βέλτιστες συνθήκες εκκόλαψης (Sorgeloos *et al.*, 1986). Οι ναύπλιοι (τελική πυκνότητα αποθεματοποίησης, περίπου 2 οργανισμοί/ml) μεταφέρθηκαν σε οκτώ γυάλινα δοχεία (συνολικού όγκου περίπου 18 l), με απομονωμένο πυθμένα, κάθε ένα περιέχει 10 l αερισμένου θαλασσινού νερού (αλατότητας: 33.5 g/l). Το νερό ανανεωνόταν καθημερινά και η θερμοκρασία ύδατος κρατήθηκε σταθερή στους 25±0.2°C με ηλεκτρονικά ελεγχόμενους θερμοαστές. Οι καλλιέργειες εκτέθηκαν σε συνεχή φωτισμό και αερισμό.

Για την τυποποίηση της πειραματικής μεθοδολογίας και την εξέταση των συνθηκών

καλλιέργειας, προκαταρκτικές δοκιμές έγιναν με μικροφύκη *Chaetoceros sp.* ως τροφή για *Artemia*. Αυτό το είδος *Chaetoceros* (CH-X-1) ήταν απομονωμένο τοπικά και είναι τώρα διαθέσιμο από τις συλλογές φυκών CICESE, Ensenada, Baja Καλιφόρνιας, Μεξικό (Trujillo Valle, 1993). Ο αριθμός των κυττάρων ανά ζώο που απαιτήθηκε καθημερινά καθορίστηκε από την οπτική παρατήρηση διαφάνειας.

Για τα πειράματα με τις παιδικές τροφές σε σκόνη, 100 g Nestum (Nestle S.A, Vevey, Ελβετία) διαλυόταν σε 1 l νερού και ομογενοποιούνταν για 30 λεπτά με ένα μπλέντερ σε υψηλή ταχύτητα. Για την λήψη εμπλουτισμένου εναιωρήματος Nestum, 10% έλαιο σκουμπριών με 1% πολυσορβικό ως γαλακτωματοποιητής, 0.5% χοληστερόλη και 2.5% φωσφολιπίδια προστίθενται πριν αναμειχθούν. Το ομογενοποιημένο εναιώρημα στραγγιζόταν με δίχτυ 60 μm. Η τελική συγκέντρωση του Nestum ποίκιλε από 75-100 mg/ml, ανάλογα με την αποδοτικότητα κατά τη διάρκεια του στραγγίσματος.

Για κάθε προετοιμασία Nestum, το ακριβές βάρος του εναιωρήματος καθοριζόταν σταθμικά μετά από τη ξήρανση ενός δείγματος για 12 h σε 60°C.

Το πειραματικό σχέδιο για τις δύο επεξεργασίες - με Nestum και με εμπλουτισμένο Nestum - τυχαιοποιήθηκε εντελώς με τέσσερις αντιγραφές για κάθε μια.

Ο Πίνακας 1 παρουσιάζει τη θρεπτική σύνθεση του Nestum, και την περιεκτικότητα σε λιπαρά του εμπλουτισμένου Nestum.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Σύνθεση του Nestum σε ποσοστό ξηρού βάρους (σύμφωνα με τον κατασκευαστή, περιεκτικότητα λιπαρών στο εμπλουτισμένο Nestum)

TABLE 1

Composition of Nestum in percent dry weight (according to the manufacturer; fat content in enriched Nestum: this study)

Proteins	10.8	Minerals	3.4
Carbohydrate	75.4	Vitamin A (IU)	730
Fat	5.5	Vitamin D (IU)	260
Fat (enriched Nestum)	13.91		
Fiber	4.9	Energy (kcal/100 g)	394

Η παραπλήσια σύνθεση της *Artemia* είχε ως εξής: (α) Υγρό βάρος, συγκομισμένη *Artemia* πλύθηκε προσεκτικά με νερό και στη συνέχεια με το μυρμηκικό άλας αμμωνίου 3% για να αποβάλει τα τελευταία ίχνη χλωριούχου νατρίου. Τα ζώα ζυγίστηκαν μετά από το στράγγιγμα. (β) Ξηρό και αποτεφρωμένο βάρος, τα δείγματα ξηράθηκαν στο σταθερό βάρος σε έναν φούρνο μεταφοράς στους 60°C και αποτεφρώθηκαν στους 470°C σε ένα κλίβανο για 12 h. (γ) Πρωτεΐνη, τα λιπίδια, και η περιεκτικότητα σε τέφρα καθορίστηκαν σύμφωνα με τις μεθόδους που συστήθηκαν από τον A.O.A.C. (1984). (δ) Υδατάνθρακες, το περιεχόμενο των υδατανθράκων υπολογίστηκαν από τη διαφορά από 100 του συνολικού ποσού των συγκεντρώσεων πρωτεΐνης και λιπιδίων.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, η επιβίωση και το ατομικό μήκος των οργανισμών καταγραφόταν με υπο-δειγματοληψία. Ο αριθμός ζώων στην καλλιέργεια καθορίστηκε από μια προηγούμενος τυποποιημένη μέθοδο (Naegel and Mendez Gomez-Humaran, 1998). Το μέσο μήκος 20-50 ζώων που αδρανοποιήθηκαν με Lugol καθορίστηκε από την κορυφή της κεφαλής έως τη βάση της ουράς με τη χρησιμοποίηση ενός στερεοσκοπικού μικροσκοπίου (Zeiss Jena, Technival 2).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

Πρόγραμμα ταΐσματος για *Artemia* καλλιεργημένη με *Chaetoceros sp.*

Table 2

Feeding schedule for *Artemia* cultured with *Chaetoceros sp.*

Day	<i>Chaetoceros sp.</i> Ration (10^6 cells animal ⁻¹ day ⁻¹)
1	0.15
2	0.55
3	0.7
4	1.0
5	1.5
6	2.0
7	3.0
8	3.5
9	3.6
10–14	3.6
Total	34×10^6 cells animal ⁻¹ 14 days ⁻¹

Οι γαρίδες άλμης συγκομίστηκαν αφού έφθασαν στην ωριμότητα (ζεύγη ζευγαρώματος), πλύθηκαν λεπτομερώς με το αποσταγμένο νερό, κρύωσαν και πάγωσαν, για την επόμενη ανάλυση της πρωτεΐνης, των λιπιδίων, και της τέφρας.

Μετά από το τεστ κανονικότητας (Kolmogorov-Smirnov), τα στοιχεία αναλύθηκαν για να καθορίσουν τις διαφορές στις επεξεργασίες με ANOVA με ένα όριο απόρριψης ή αποδοχής $\alpha = 0.05$ (Statistica v.5, StatSoft Inc.).

Αποτελέσματα

Ο Πίνακας 2 παρουσιάζει το καθεστώς σίτισης με *Chaetoceros sp.* που εγγυάται γρήγορη αύξηση και υψηλά ποσοστά επιβίωσης της *Artemia*. Μετά από μόνο 11 ημέρες σίτισης της *Artemia* με *Chaetoceros sp.*, οι γαρίδες άλμης έφθασαν στην ωριμότητα και ζεύγη ζευγαρώματος παρατηρήθηκαν. Η επιβίωση μετά από 11 ημέρες καλλιέργειας ήταν πάνω από 80% και τα ενήλικα είχαν ένα μέσο μήκος 4.64 ± 0.70 mm ($n=121$) (Juarez Carrillo, 1995). Πρωτεΐνη (56.45% ξερή ουσία ± 0.21 $n=3$), λίπος (2.95% ξερή ουσία ± 1.8 $n=2$) και τέφρα (10.38% ξερή ουσία ± 2.73 $n=3$). Σε μόνο 9 ημέρες, η *Artemia* αυξήθηκε σχεδόν δέκα φορές στο μήκος. Ο Πίνακας 3 παρουσιάζει μέσο μέγεθος σε 3, 6, και 11 ημέρες *Artemia* που ταΐζόταν με *Chaetoceros sp.*

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

Μέσος όρος μεγέθους (mm, \pm τυπική απόκλιση, και αριθμός δειγμάτων) για *Artemia* ταϊσμένη με *Chaetoceros sp.* (Juarez Carrillo, 1995)

Table 3

Average size (mm, \pm standard deviation, and number of samples) of *Artemia* fed with *Chaetoceros sp.* (Juarez Carrillo, 1995)

Day	Length (mm)
3	0.476 ± 0.020 ($n = 30$)
6	1.970 ± 0.244 ($n = 122$)
11	4.641 ± 0.706 ($n = 121$)

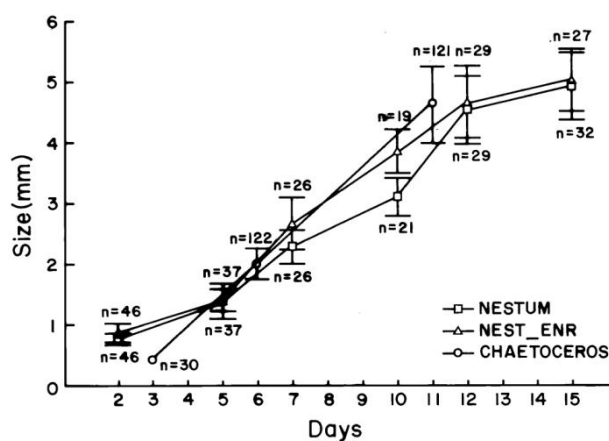
ΠΙΝΑΚΑΣ 4

Πρόγραμμα ταΐσματος για *Artemia* καλλιεργημένη με εμπλουτισμένο και μη εμπλουτισμένο Nestum

Table 4
Feeding schedule for *Artemia* cultured with enriched and non-enriched Nestum

Day	Nestum (mg per 1000 animals day ⁻¹)
1	50
2	50
3	60
4	60
5	80
6	100
7	150
8	175
9	200
10	220
11	275
12	350
13	450
14	450
Total	2670 mg 10 ⁻³ animals 14 days ⁻¹

Στα πειράματα με την αδρανή εμπορική τροφή, η *Artemia* ταΐστηκε καθημερινά μέχρι την ωριμότητα με ένα προηγουμένως καθορισμένο ποσό Nestum. Το ποσό που απαιτείται καθημερινά καθορίστηκε, όπως με *Chaetoceros*, από τις οπτικές παρατηρήσεις διαφάνειας. Οι ναύπλιοι *Artemia* ξεκίνησαν να λαμβάνουν τη τροφή μόνο μετά από την πρώτη έκδυση (Benijts *et al.*, 1976). Για αυτό το λόγο, κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών της καλλιέργειας μόνο μια τροφή μικρής ποσότητας απαιτείται. Όταν οι προνύμφες έχουν εκδύσει στο 2^ο και 3^ο νυμφικό στάδιο, ταΐζονται ενεργά. Μετά από την 4^η ημέρα της καλλιέργειας, τα ζώα αναπτύσσουν θωρακοπόδια και αυξάνουν την ικανότητα φιλτραρίσμάτος τους και ένα αυξανόμενο ποσό τροφής απαιτείται. Το καθεστώς σίτισης στον Πίνακα 4 υφίσταται καλή αύξηση και υψηλά ποσοστά επιβίωσης.



Εικ. 1. Μέσος όρος μεγέθους (μm, ± τυπική απόκλιση, και αριθμός δειγμάτων) για *Artemia* ταϊσμένη με Nestum, εμπλουτισμένο Nestum, και με *Chaetoceros*.

Fig. 1. Average size (μm, standard deviation, and number of animals measured) of *Artemia* fed with Nestum, enriched Nestum, and with *Chaetoceros*.

Η αύξηση μεγέθους των γαρίδων άλμης ταϊσμένων με Nestum και εμπλουτισμένο Nestum ακολούθησε το ίδιο μοντέλο αύξησης, και στο ενήλικο στάδιο καμία σημαντική διαφορά μεγέθους δεν θα μπορούσε να καθοριστεί (Εικ. 1). Στο τέλος του πειράματος, τα ζώα ταΐστηκαν με Nestum και εμπλουτισμένο Nestum που μετρήθηκε 4.93 mm (±0.55 n=32) και 5.02 mm (±0.51 n=27). Αυτό το μέγεθος είναι πολύ

παρόμοιο ($4.64 \text{ mm} \pm 0.706$ $n=121$) στην *Artemia* εκτρεφόμενη με *Chaetoceros sp.* Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν θα μπορούσε να καταγραφεί μεταξύ του ποσοστού επιβίωσης της *Artemia* που ταΐστηκε 11 ημέρες με Nestum (72%) και εμπλουτισμένο Nestum (79%) (Πίνακας 5). Η πυκνότητα αποθεματοποίησης στο τέλος του πειράματος σίτισης με Nestum ήταν 1870 ± 372 ($n=30$) ζώα/l, με εμπλουτισμένο Nestum 1938 ± 393 ($n=20$) ζώα/l. Η πυκνότητα αποθεματοποίησης μεταξύ των δύο διαχειρίσεων δεν ήταν σημαντικά διαφορετική. Το ποσοστό επιβίωσης για *Artemia* που εκτράφηκε για 11 ημέρες σε *Chaetoceros* ήταν $73.5\% \pm 3.4$ ($n=70$) (Juarez Carrillo, 1995).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5

Σύγκριση του ποσοστού επιβίωσης (σε %) μεταξύ *Artemia* ταϊσμένη με Nestum και με εμπλουτισμένο Nestum (μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση και καταγεγραμμένα υποδείγματα), και σε σχέση με *Chaetoceros*

Table 5

Comparison of the survival rate (in %) between *Artemia* fed with Nestum and with enriched Nestum (means \pm standard deviation and subsamples counted), and compared with *Chaetoceros*

Days of culture	Survival Rate (%)		
	Nestum	Enriched Nestum	Chaetoceros
4	100 ± 17 $n = 40$	100 ± 18 $n = 40$	
6	90 ± 15 $n = 30$	95 ± 19 $n = 40$	
11	72 ± 15 $n = 30$	79 ± 15 $n = 20$	73 ± 3 ($n = 70$)

Στον Πίνακα 6 τα θρεπτικά στοιχεία της *Artemia* που εκτράφηκε με Nestum και εμπλουτισμένο Nestum παρουσιάζονται, και συγκρίνονται με *Artemia* που αυξάνεται με *Chaetoceros*.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6

Προσεγγιστική ανάλυση (% ξηρό υλικό), νωπό και ξηρό βάρος (mg) ενήλικης *Artemia* ταϊσμένη με Nestum, εμπλουτισμένο Nestum, και με *Chaetoceros*

Table 6

Proximate analysis (% dry matter), wet and dry weight (mg) of adult *Artemia* fed with Nestum, enriched Nestum, and with *Chaetoceros*

	Nestum	Nestum enriched	Chaetoceros
Protein	42.87 ± 0.16 ($n = 3$)	41.16 ± 0.28 ($n = 3$)	56.45 ± 0.21 ($n = 3$)
Lipid	16.45 ± 1.39 ($n = 2$)	20.33 ± 4.50 ($n = 2$)	2.95 ± 1.8 ($n = 2$)
Carbohydrate	31.08	30.09	31.22
Ash	9.60 ± 0.05 ($n = 3$)	8.42 ± 0.05 ($n = 3$)	10.38 ± 2.73 ($n = 3$)
Wet weight	1.63 ± 0.46 ($n = 4$)	2.57 ± 0.28 ($n = 5$)	
Dry weight	0.19 ± 0.08 ($n = 8$)	0.37 ± 0.04 ($n = 5$)	

Η σύγκριση της συνολικής περιεκτικότητας σε λίπος μεταξύ *Artemia* ταϊσμένης με Nestum και εμπλουτισμένο Nestum παρουσιάζει σαφώς ότι τα λιπίδια ενσωματώθηκαν από το εμπλουτισμένο υλικό. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και τέφρας και στις δύο διαχειρίσεις είναι παρόμοια. Εντούτοις, η διαφορά μεταξύ του υγρού και ξηρού βάρους είναι αξιοπρόσεκτη, αν και τα ζώα ήταν παρόμοιου μεγέθους.

Συζήτηση

Το Nestum διατυπώνεται ως μια πρώτη τροφή για τους ανθρώπους. Οι απαιτήσεις τους σε τροφές είναι βεβαίως διαφορετικές από της *Artemia* και άλλους θαλάσσιους οργανισμούς, αλλά προφανώς αυτές οι πλήρεις παιδικές τροφές μπορούν να στηρίζουν την αύξηση της *Artemia*, και θα μπορούσαν να είναι κατάλληλο υποκατάστατο για μικροφύκη ως τροφή για *Artemia*.

Για κάθε μέγεθος μικροφύκους ή αδρανούς τροφής, ένα συγκεκριμένο καθεστώς σίτισης για *Artemia* πρέπει να αναπτυχθεί για να εξασφαλίσει επαρκή επίπεδα τροφών. Το καθεστώς σίτισης αναπτύχθηκε σε αυτήν τη μελέτη για *Chaetoceros sp.* και η αδρανής τροφή Nestum οδήγησε στη γρήγορη αύξηση και τα υψηλά ποσοστά επιβίωσης. Ο Mason (1963) καθόρισε την απαίτηση αύξησης της *Artemia* στα διάφορα καθεστάτα σίτισης με το είδος *Dunaliella tertiolecta*. Αυτός κατέδειξε ότι το ποσό τροφής διαθέσιμο ανά ζώο είναι η σημαντικότερη μεταβλητή που έχει επιπτώσεις στην αύξηση της *Artemia*. Στα πειράματά μου, το καθεστώς σίτισης που χρησιμοποιεί Nestum έδωσε τα παρόμοια αποτελέσματα στην αύξηση, το ποσοστό επιβίωσης, και την παραγωγή βιομάζας με εκείνα της χρησιμοποίησης *Chaetoceros*. Εντούτοις, ο χρόνος που απαιτήθηκε για τον καθημερινό καθαρισμό των συστημάτων καλλιέργειας από την μη καταναλωμένη τροφή ήταν σημαντικά υψηλότερος με Nestum απ' ό τι με μικροφύκη.

Το ποσοστό επιβίωσης μετά από 11 ημέρες της καλλιέργειας που λήφθηκε σε αυτήν την μελέτη (με Nestum 72%, με εμπλουτισμένο Nestum 79%) ήταν χαμηλότερο από τα στοιχεία που αναφέρθηκαν από τους Vanhaecke και Sorgeloos (1989). Έλαβαν ένα ποσοστό επιβίωσης 94% για *Artemia* από τον κόλπο του SAN Francisco εκτρεφόμενα για 9 ημέρες σε 25°C χρησιμοποιώντας ως τροφή το *Dunaliella tertiolecta*. Για το ποσοστό επιβίωσης της *Artemia* που τάιστηκε για 11 ημέρες με εμπλουτισμένο και μη-εμπλουτισμένο Nestum, καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν θα μπορούσε να καθοριστεί.

Το ξηρό βάρος της *Artemia* που αυξήθηκε με εμπλουτισμένο Nestum ήταν σχεδόν δύο φορές υψηλότερος (0.37 mg) από το βάρος των *Artemia* που αυξάνονται με καθαρό Nestum (0.19 mg). Το υγρό βάρος των *Artemia* ακολούθησε την ίδια τάση; ήταν υψηλότερο στα ζώα που αυξήθηκαν με εμπλουτισμένο Nestum (2.57 mg) από εκείνων που εκτρέφονταν με καθαρό Nestum (1.63 mg), αν και το μήκος των ζώων μετά από μια περίοδο εκτροφής 15 ημερών ήταν στατιστικά μη διαφορετικό (4.93 mm και 5.02 mm). Το μέγεθος των ζώων που αυξάνονταν με *Chaetoceros* ήταν παρόμοιο (4.64 mm \pm 0.51 n=27) (Juarez Carrillo, 1995). Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη των *Artemia* που εκτράφηκαν με *Chaetoceros* ήταν σημαντικά υψηλότερη (56.45%) από εκείνων που αυξήθηκαν με Nestum (42.87 και 41.16% σε εμπλουτισμένο Nestum). Οι Castro Barrera *et al.*, (1994) καθόρισαν την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη της *Artemia* από το Σαν Φρανσίσκο (53.25%), και στην *Artemia* από τη λίμνη Texcoco (Μεξικό) (58.4%) και την αύξηση σε φρέσκα *Spirulina*. Το περιεχόμενο πρωτεΐνης ενός παρόμοιου εύρους (52.9-74.04% ξηρό βάρος) καθορίστηκε μέσα στην ενήλικη *Artemia* που συλλέχτηκε από τους φυσικούς βιότοπους στην Ισπανία (Gonzalbo and Amat, 1988), και στην *Artemia* από την Greet Salt Lake (Γιούτα) που τρεφόταν για 5 ημέρες με *Dunaliella* (58.39%) (Gonzalbo *et al.*, 1987). Η περιεκτικότητα σε λιπίδια των *Artemia* που αυξάνονται και με τις δύο τροφές Nestum (με Nestum: 16.45%, Nestum εμπλουτισμένο: 20.33%) ήταν σημαντικά υψηλότερη από εκείνες που αυξήθηκαν σε *Chaetoceros sp.* (2.95%). Οι Gonzalbo και Amat (1988) καθόρισαν, στους διάφορους πληθυσμούς *Artemia sp.*, ποσοστά λιπιδίων μεταξύ 4.90 και 16.33%. Οι Castro Barrera *et al.*, (1994) πέτυχαν στην *Artemia* από τη λίμνη Texcoco, και από το Σαν Φρανσίσκο, περιεχόμενο

λιπιδίων ασβεστίου μόνο 7.29 και 3.37%. Η περιεκτικότητα σε τέφρα των *Artemia* που βρίσκονται σε αυτήν την μελέτη είναι παρόμοια με την περιεκτικότητα σε τέφρα των *Artemia* που περιγράφεται από τους Castro Barrera *et al.*, (1994).

Οι βιοχημικές διαφορές μέσα στα ίδια είδη προκαλούνται κυρίως από την ποσότητα και την ποιότητα των τροφών που είναι διαθέσιμα (Gonzalbo *et al.*, 1987). Επιπλέον, στην εκτροφή ενήλικων *Artemia* κάποιο μπορεί να αναμείνει τις διαφορές στη θρεπτική αξία που μπορεί να είναι μια συνέπεια της αναπαραγωγικής φάσης. Τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες απαιτούνται για τη σεξουαλική ανάπτυξη. Αυτό το φορτίο δεν απαιτείται στα ζώα όχι ακόμα έτοιμα για τη γαμετογένεση.

Για την παραγωγή της βιομάζας *Artemia*, είναι ενδιαφέρον να καθοριστεί ο ρυθμός κατανάλωσης τροφής (FCR). Ο ρυθμός αυτός που καθορίζεται σε αυτήν τη μελέτη στις 14.05:1 (στη βάση ξηρού βάρους) για Nestum και 7.2:1 για εμπλουτισμένο Nestum είναι πολύ υψηλότερη από τα προηγούμενα στοιχεία που αναφέρονται από τους Vanhaecke και Sorgeloos (1989) χρησιμοποιώντας το *Dunaliella tertiolecta* ως τροφή για 9 ημέρες. Έλαβαν FCR μεταξύ 2.4:1 και το 5.82:1 για τα διαφορετικά γεωγραφικά είδη *Artemia* που εκτρέφονταν στις θερμοκρασίες μεταξύ 20 και 32.5°C. Στο τέλος των πειραμάτων μου, 1900 ζώα σε 10 min θα μπορούσαν να παραχθούν. Έλαβαν, κατά τη διάρκεια του πειράματος, 5073 mg της τροφής. Αυτό οδηγεί σε FCR 1.64:1 (ή υπολογισμένο στη βάση ξηρού βάρους: 14.05:1) για τα Nestum-ταϊσμένα ζώα και μόνο στις 1.17:1 (υπολογισμένο στη βάση ξηρού βάρους: 7.2:1) για τα ζώα που ταΐζονται με εμπλουτισμένο Nestum.

Για την εκτροφή 1000 *Artemia* για 14 ημέρες με *Chaetoceros*, 34×10^9 κύτταρα απαιτήθηκαν. Το κόστος για αυτόν τον αριθμό μικροφυκών (με μορφή παγωμένης πάστας) είναι για 1.5 \$ US. Για τον ίδιο αριθμό ζώων και του ίδιου χρόνου εκτροφής, 2.67 g Nestum απαιτήθηκαν με συνέπεια ένα κόστος σίτισης 0.8 \$ US. Εκτρέφοντας *Artemia* με Nestum ως τροφή είναι όχι μόνο ευκολότερο από την επίμοχθη παραγωγή των μονοκύτταρων φυκών, αλλά και σημαντικά φτηνότερη.

Η χρήση των αδρανών, ξηρών εμπορικών παιδικών τροφών Nestum μπορεί να συστηθεί για την παραγωγή βιομάζας *Artemia* υπό τις ελεγχόμενες συνθήκες ως σχετικά φτηνή εναλλακτική λύση της ακριβής και κοπιαστικής εργασίας παραγωγής μικροφυκών. Επιπλέον, μέσω της ανάπτυξης των φτηνών τεχνικών εμπλουτισμού, είναι τώρα δυνατό να προσφέρει για υδρο-καλλιεργητικούς σκοπούς εμπλουτισμένης βιομάζας *Artemia* με μια υψηλή θρεπτική αξία και με ένα επαρκές σχεδιάγραμμα λιπαρού οξέος ως τροφή για τους υδρόβιους οργανισμούς (Le'ger *et al.*, 1987). Η ζήτηση για την εμπλουτισμένη βιομάζα *Artemia* με μια σταθερή και υψηλή θρεπτική αξία, χωρίς παθογόνα, και παραχθείς υπό τις ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες για να προκαλέσει την ωθητική ωρίμανση των γαρίδων αυξάνεται σημαντικά, και όλο και περισσότερο θα αντικαταστήσει το ακριβό πολύχαιτο (*Nereis diversicolor*, *Americanuphis reesei*) και το κόκκινο σκουλήκι (*Glycera spp.*) στα εκκολαπτήρια γαρίδων, τουλάχιστον εν μέρει. Εντούτοις, περισσότερη έρευνα απαιτείται για να προσδιοριστούν ενδεχομένως τα ενεργά συστατικά και οι βέλτιστες δόσεις τους που θα μπορούσαν να περιληφθούν στην αδρανή τροφή για να αξιολογήσουν τη θρεπτική αξία εμπλουτισμένων εναντίον μη-εμπλουτισμένων βιομαζών *Artemia*.

Παραπομπές

- A.O.A.C. (Association of Analytical Chemists, Washington), 1984. Official Methods of Analysis, 14th ed. Arlington, VA, 1141 pp.
- Benijts, F., Vanvoorden, E., Sorgeloos, P., 1976. Changes in the biochemical composition of the early larval stages of the brine shrimp, *Artemia salina* L. In: Persoone, G., Jaspers, E. (Eds.), Proc.

- 10th. European Symposium on Marine Biology. Research in Mariculture at Laboratorys and Pilot Scale, vol. 1. Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 1–9.
- Carlberg, J.M., Van Olst, J.C., 1976. Brine Shrimp (*Artemia salina*) Consumption by the Larval Stages of the American Lobster (*Homarus americanus*) in Relation to Food Density and Water Temperature. Proc. 7th. Annual Meeting World Mariculture Society, pp. 379–389.
- Castro Barrera, T., de Lara Andrade, R., Castro Mejia, J., 1994. El crustáceo *Artemia franciscana* alimentado con *Spirulina* spp. fresca, como dieta de especies acuáticas comerciales. Hidrobiológica 4 (1–2), 15–20.
- Claus, C., Benijts, F., Vandeputte, G., 1979. The biochemical composition of the larvae of two strains of *Artemia salina* (L.) reared on two different algal foods. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 36, 171–183.
- Coutteau, P., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1990. Baker's yeast as a potential substitute for live algae in aquaculture diets: *Artemia* as a case study. J. World Aquacult. Soc. 21 (1), 1–9.
- Coutteau, P., Brendonck, L., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1992. The use of manipulated baker's yeast as an algal substitute for the laboratory culture of Anostraca. Hydrobiologia 234, 25–32.
- Dhert, P., Bombeo, R.B., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1992. A simple semi flow-through culture technique for the controlled super-intensive production of *Artemia* juveniles and adults. Aquacult. Eng. 11, 107–119.
- Dhert, Ph., Bombeo, R.B., Sorgeloos, P., 1993. The use of ongrown *Artemia* in nursery culturing of the tiger shrimp. Aquacult. Int. 1, 170–177.
- Dobbeleir, J., Adam, N., Bossuyt, E., Bruggeman, E., Sorgeloos, P., 1979. New aspects of the use of inert diets for high density culturing of brine shrimp. In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), The Brine Shrimp *Artemia*. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture, vol. 3. Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 165–174.
- Gonzalbo, A., Amat, F., Hontoria, F., Navarro, J.C., Varo, I., 1987. Composición bioquímica de *Artemia* alimentada con diferentes dietas. Cuadernos Marisqueros Publ. Tec. 12, 583–590.
- Gonzalbo, A., Amat, F., 1988. Composición bioquímica de biomásas silvestres de *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca). Inv. Pesq. 52 (3), 375–385.
- Intriago, P., Jones, D.A., 1993. Bacteria as food for *Artemia*. Aquaculture 113, 115–127.
- Juarez Carrillo, E. 1995. Evaluación nutricional de *Artemia franciscana*, Kellogg, 1906, (Crustacea: Branchiopoda) alimentada con *Chaetoceros* sp. enriquecido con fosfolípidos en emulsión. M. en C. Thesis Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada, B.C. México, 85 pp.
- Le'ger, P., Naessens-Foucquaert, E., Sorgeloos, P., 1987. International Study on *Artemia*. XXXV. Techniques to manipulate the fatty acid profile in *Artemia* nauplii, and the effect on its nutritional effectiveness for the marine crustacean *Mysidopsis bahia* (M.). In: Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Decler, W., Jaspers, E. (Eds.), *Artemia* Research and its Applications. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture, vol. 3. Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 411–424.
- Mason, D.T., 1963. The growth response of *Artemia salina* (L.) to various feeding regimes. Crustaceana 5, 138–150.
- Naegel, L.C.A., Mendez Gomez-Humaran, I., 1998. Effect of sample volume and population density on precision of larval population estimates. Aquacult. Eng. 17, 11–19.
- Naessens, E., Lavens, P., Gomez, L., Browdy, C.L., McGovern-Hopkins, K., Spencer, A.W., Kawahigashi, D., Sorgeloos, P., 1997. Maturation performance of *Penaeus gannamei* co-fed *Artemia* biomass preparations. Aquaculture 155, 87–101.
- Person Le Ruyet, J., 1976. Elevage larvaire d'*Artemia salina* (Branchiopode) sur nourriture inerte: *Spirulina maxima* (Cyanophyceae). Aquaculture 8, 157–167.
- Sorgeloos, P., 1974. The influence of algal food preparations on the nutritional efficiency for *Artemia salina* L. larvae. Thalassia Yugoslavica 10 (1:2), 313–320.
- Sorgeloos, P., Bossuyt, E., Lavina, E., Baeza-Mesa, M., Persoone, G., 1977. Decapsulation of *Artemia* cysts: A simple technique for the improvement of use of brine shrimp in aquaculture. Aquaculture 12, 311–315.
- Sorgeloos, P., Baeza-Mesa, M., Bossuyt, E., Bruggeman, E., Dobbeleir, J., Versichele, D., et al., 1980. Culture of *Artemia* on rice bran: the conversion of a waste-product into highly nutritive animal protein. Aquaculture 21, 393–396.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Le'ger, P., Tackaert, W., Versichele, D., 1986. Manual for the Culture and Use of Brine Shrimp *Artemia* in Aquaculture. State University of Ghent, Belgium, 319 pp.
- Sylvester, J., Sato, V.T., Garvey, J., Kawahigashi, D., Smith, C.B., 1998. Impact of a bloodworm substitute on maturation, spawning and nauplius production of *Penaeus gannamei*. In: World Aquaculture Society Book of Abstracts, Aquaculture '98, 15–19 February, Las

- Vegas, USA, p. 528.
- Trujillo Valle, M.L., 1993. La Colección de Microalgas del CICESE. Informe Técnico. Comunicaciones Académicas, Serie de Acuicultura. CICESE CIACT9301, Ensenada, Mexico, 103 pp.
- Vanhaecke, P., Sorgeloos, P., 1989. International study on *Artemia*. XLVII. The effect of temperature on cyst hatching, larval survival and biomass production for different geographical strains of brine shrimp *Artemia* spp. *Annls. Soc. R. Zool. Belg.* 118 (1), 7–23.
- Wickins, J.F., 1972. The food value of brine shrimp, *Artemia salina* L., to larvae of the prawn, *Palaemon serratus* Pennant. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 10, 151–170.
- Wouters, R., Gomez, L., Lavens, P., Calderon, J., 1998. The Role of *Artemia* Biomass and its Enrichment on *P. 6annamei* Broodstock. In: World Aquaculture Society Book of Abstracts, Aquaculture '98 15–19 February, Las Vegas, USA, p 588.
- Yashiro, R., 1987. The effect of *Artemia* fed with different diets on the growth and survival of *Penaeus monodon* Fabricius postlarvae. In: Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Declair, W., Jaspers, E. (Eds.), *Artemia* Research and its Applications. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture, vol. 3. Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 449–457.

Μία Απλή Τεχνική Καλλιέργειας Μέσω Ημι-ροής για την Ελεγχόμενη Υπερ-εντατική Παραγωγή Νεαρών και Ενήλικων *Artemia*

A Simple Semi-Through Culture Technique for the Controlled Super-Intensive Production of *Artemia* Juveniles and Adults

P. Dhert, ^{a,b} R. B. Bombeo, ^a P. Lavens, ^b & P. Sorgeloos ^b

^aSoutheast Asian Fisheries Development Center, Aquaculture Department, PO Box 256, 5000 Iloilo City, Philippines

^bLaboratory of Aquaculture & Artemia Reference Center, State University of Ghent, Rozier 44, B-9000 Ghent, Belgium

Aquacultural Engineering 11 (1992) 107-119

Περίληψη

Μία απλή μέσω ημι-ροής μονάδα καλλιέργειας της *Artemia* περιγράφεται για την πιθανή ολοκλήρωση στα εκκολαπτήρια θαλασσίων ψαριών και οστρακόδερμων ως πηγή μιας φτηνής διατροφής των πρώιμων σταδίων. Το σύστημα δεν απαιτεί τη χρήση αντλιών σίτισης και χρειάζεται ελάχιστη προσοχή. Η προετοιμασία και η προσθήκη τροφών στη δεξαμενή σίτισης μειώνεται σε έναν ή δύο χειρισμούς ανά ημέρα κατά τη διάρκεια των μετα-ναυπλιακών σταδίων (ημέρα 1-3) και των νεαρών σταδίων (ημέρα 4-14), αντίστοιχα.

Οι παραγωγές βιομάζας είναι ανώτερες από εκείνες που αναφέρονται για τα στάσιμα συστήματα καλλιέργειας και είναι συγκρίσιμες με εκείνες που καταδεικνύονται σε μονάδες καλλιέργειας μέσω ροής. Αυτή η απλή τεχνική εκτροφής προσφέρει τη δυνατότητα παραγωγής πληθυσμών αλμυρογαρίδων με ένα ομοιόμορφο μέγεθος. Επιπλέον, από τη διαφοροποίηση του καθεστώτος σίτισης σχετικά με την πυκνότητα *Artemia* στην έναρξη της καλλιέργειας, τα συγκεκριμένα μεγέθη θηραμάτων *Artemia* που αντιστοιχούν στις καθημερινές φυσικές απαιτήσεις στα εκκολαπτήρια γαρίδων και ψαριών μπορούν να ληφθούν.

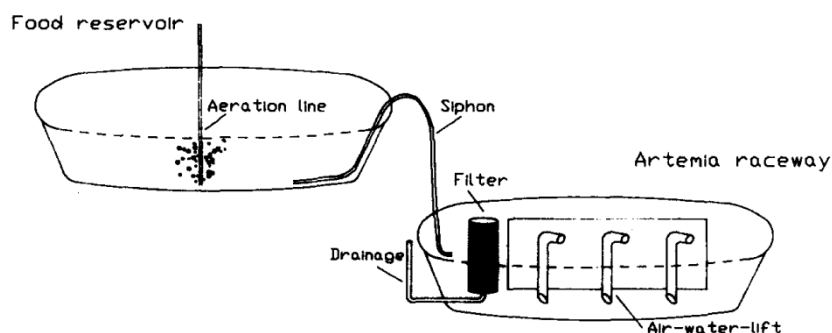
Σκοπός

Η παρούσα μελέτη σκοπό είχε την εφαρμογή ενός συστήματος καλλιέργειας θηραμάτων *Artemia* με τη χρήση τεχνικής που βασίζεται στην ημι ροή, με σκοπό τη χρήση της σε εντατικά εκκολαπτήρια παραγωγής ασπόνδυλων και ψαριών.

Υλικά και μέθοδοι

Το πιλοτικό σύστημα αποτελείται από έξι δεξαμενές τύπου raceways σχήματος οβάλ (Bossuyt & Sorgeloos, 1980) 1000 l περιεχομένου και έξι εφεδρικές δεξαμενές ίδιας χωρητικότητας που τοποθετούνται επάνω από κάθε raceway (Εικ. 1). Οι τελευταίες δεξαμενές κρατούν το θαλασσινό νερό και τις τροφές, και χρειάζεται να ξαναγεμίζουν με το χέρι μία φορά ή δύο φορές την ημέρα. Ένα σιφόνι με επιλεγμένη διάμετρο στραγγίζει με τη βαρύτητα την εφεδρική δεξαμενή στη δεξαμενή καλλιέργειας *Artemia*. Τα απόβλητα καλλιέργειας αποτελούμενα από περιττωματικά δισκία, τα απόβλητα τροφών και απορριμμένα εξω-σκελετικά στοιχεία στραγγίζονται μέσω του κυλινδρικού συστήματος φίλτρου που διατηρεί την *Artemia* στη δεξαμενή καλλιέργειας (Lavens *et al.*, 1985). Αυτό το φίλτρο αποτελείται από ένα κύλινδρο

στενά-σφηνών επιφάνειας φτιαγμένο από ανοξείδωτο, που τοποθετείται κάθετα στο raceway στο αντίθετο άκρο από την είσοδο νερού. Τα φίλτρα καθαρίζονται καθημερινά και ανταλλάσσονται με άλλα, μεγαλύτερων διαστάσεων οπών, όταν οι αλμυρογαρίδες γίνονται μεγαλύτερες. Ένα σύνολο φίλτρων που καλύπτουν τη συνολική περίοδο καλλιέργειας μέχρι την ενηλικίωση αποτελείται από πέντε διαφορετικές μονάδες με τις διαστάσεις των οπών που κυμαίνονται από 150 ως 400 μm.



Εικ. 1. Παράσταση του καλλιεργητικού συστήματος μέσω ημι-ροής για *Artemia*.
Fig. 1. View of the semi flow-through culture system for *Artemia*.

Οι τροφές αποτελούνται από αιωρούμενα πίτουρα ρυζιού που προετοιμάζονται με μίξη για 5 min ενός όγκου μη-μικροποιημένου πίτουρου ρυζιού και τέσσερις όγκους θαλασσινού νερού. Αυτό το διάλυμα φιλτράρεται στη συνέχεια μέσω 60 μm πλαγκτονικού διχτυού προκειμένου να ληφθούν μόνο τα μεγέθη μορίων κατάλληλα για γαρίδες άλμης (Dobbelaire *et al.*, 1980; Lavens & Sorgeloos, 1991). Χρησιμοποιώντας αυτή τη μεθοδολογία, η συγκέντρωση του αιωρούμενου πίτουρου ρυζιού ποικίλλει από 20 έως 30 g/l, ανάλογα με την ποιότητα του πίτουρου ρυζιού και την αποδοτικότητα κατά τη διάρκεια της συμπίεσης. Η ακριβής τιμή μπορεί να καθοριστεί με την αφαίρεση από το βάρος μιας ογκομετρικής φιάλης που γεμίζει με πρόσφατα προετοιμασμένη τροφή και το βάρος της ίδιας φιάλης όταν γεμίζει με το θαλασσινό νερό μόνο. Αυτό το εναιώρημα τροφών είναι περαιτέρω αραιωμένο στην απαραίτητη συγκέντρωση μέσα στην εφεδρική δεξαμενή και κρατείται σε αιώρηση με τη βοήθεια ισχυρού αερισμού μέσω σωλήνων αέρα. Η διανομή τροφής εξαρτάται από τις απαιτήσεις των ζώων και είναι βασικά ελεγχόμενη από τις μετρήσεις διαφάνειας στο σύστημα raceway (Bossuyt & Sorgeloos, 1980).

Κάθε δεξαμενή raceway εμβολιάστηκε με ναύπλιους instar-I *Artemia* προέλευσης της λίμνης Great Salt Lake (GSL) που εκκολάπτεται μετά από τις διαδικασίες που περιγράφονται από τους Sorgeloos *et al.*, (1983). Οι πυκνότητες έναρξης των διαφορετικών πειραμάτων είναι 2000, 5000 ή 8000 ζώα ανά λίτρο, ανάλογα με τα πειράματα. Η θερμοκρασία νερού στις δεξαμενές δεν ελέγχεται και ακολουθεί την περιβαλλοντική θερμοκρασία του εκκολαπτηρίου. Οι μέγιστες ημερήσιες θερμοκρασίες των 30°C καταγράφηκαν μετά από το χρόνο μεσημεριού, ενώ η ελάχιστη νυκτερινή θερμοκρασία ήταν 25°C. Τα πειράματα πραγματοποιούνται μόνο κατά τη διάρκεια της περιόδου ανομβρίας όταν ταλαντεύεται η αλατότητα του νερού της θάλασσας μεταξύ 30 και 32 ppt. Οι επεξεργασίες εκτελούνται σε έξι αντίγραφα και επαναλαμβάνονται στο χρόνο. Το ατομικό μήκος και τα ποσοστά επιβίωσης καταγράφονται καθημερινά με την υπο-δειγματοληψία των δεξαμενών καλλιέργειας. Τρία δείγματα των 60 ml λαμβάνονται και σταθεροποιούνται με διάλυμα lugol. Μετά από τη μέτρηση του αριθμού των *Artemia*, το μέσο μήκος 30 ζώων μετρήθηκε από

την κορυφή της κεφαλής έως τη βάση της ουράς χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο που εξοπλίζεται με ένα καθρέφτη. Προκειμένου να απαλειφτούν τα ανώμαλα στοιχεία των αποτελεσμάτων της μέτρησης πυκνότητας (επιβίωση), τα στοιχεία εκτίθενται στη μέθοδο ανάλυσης μέσω ορών. Οι παραγωγές βιομάζας υπολογίζονται από την υγρή ανάλυση βάρους των γαρίδων άλμης μετά από τη συγκομιδή και τη συμπίεση της *Artemia* σε ένα καθαρό πλέγμα.

Αποτελέσματα και συζήτηση

Τυποποίηση του συστήματος καλλιέργειας μέσω ημι-ροής

Η αποτελεσματικότητα της τεχνικής σίτισης μέσω ημι-ροής αρχικά δοκιμάστηκε χρησιμοποιώντας εφεδρική δεξαμενή νερού/τροφής 300 λίτρων μόνο, τα οποία έπρεπε να ξαναγεμιστούν κάθε 4 ώρες. Κατά αυτόν τον τρόπο, οι συγκεντρώσεις τροφής θα μπορούσαν να είναι ρυθμισμένες συχνά προκειμένου να διατηρηθούν τα βέλτιστα επίπεδα διαφάνειας στο raceway σύστημα (Πίνακας 1). Από τη στιγμή που οι ναύπλιοι της *Artemia* αρχίζουν να λαμβάνουν τροφή μόνο μετά από την πρώτη έκδυση, είναι αρχικά τοποθετημένοι σε ένα στάσιμο μέσο νερού που περιέχει πίτουρο ρυζιού (διαφάνεια 15 cm). Από την επόμενη ημέρα και μετά, όταν όλες οι νύμφες έχουν μεταβεί στο δεύτερο και τρίτο νυμφικό στάδιο και ταΐζονταν ενεργά, εφαρμόστηκαν συνθήκες μέσω ροή με τη βοήθεια ενός μικρού σιφωνίου (εσωτερική διάμετρος 4 mm: ποσοστό ροής 30-50 l/h) προκειμένου να διατηρηθούν τα επίπεδα διαφάνειας στα 15-20 cm. Σε αυτό το νυμφικό στάδιο μια εφεδρεία τροφών 300 λίτρων ήταν επαρκής για να αντισταθμίσουν τη λήψη τροφών από τους ναύπλιους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Συνθήκες ταΐσματος και αύξησης της *Artemia* κατά τη διάρκεια προκαταρκτικής δοκιμής σε (αρχική συγκέντρωση: 2000 *Artemia*/l)

TABLE 1

Feeding conditions and growth of *Artemia* during the preliminary run in a semi flow-through culture system (start density: 2000 *Artemia*/l)

Day of culture	Culture medium transparency (cm)	Number of refillings of the 300-litre food reservoir	Daily food supply (g)	Average food concentration per filling (g/litre)	Animal length (mm)
0	15	0	14		0.57 ± 0.09
1	15-20	1	35	0.12	1.02 ± 0.09
2	15-20	2	87	0.15	1.54 ± 0.12
3	15-20	2	89	0.15	1.88 ± 0.10
4	20-25	4	182	0.15	2.73 ± 0.27
5	20-25	4	140	0.12	3.96 ± 0.60
6	20-25	4	140	0.12	4.35 ± 0.43
7	> 30	4	177	0.15	5.39 ± 0.25
8	> 30	4	140	0.12	5.80 ± 0.46

Μετά από την τρίτη ημέρα της καλλιέργειας τα ζώα ανέπτυξαν τα θωρακοπόδια, αυξάνοντας τελικά την ικανότητα φιλτραρίσμάτος τους. Κατά συνέπεια η διαφάνεια νερού στο μέσο καλλιέργειας αυξήθηκε σε 20-25 cm., και διατηρήθηκε αυξάνοντας τα ποσοστά ροής που απαιτήθηκαν για τα συχνά ξαναγεμίματα της δεξαμενής τροφών. Αν και ο όγκος του συγκεντρωμένου πίτουρου ρυζιού που προστέθηκε στις δεξαμενές σίτισης αυξανόταν καθημερινά, μια σταθερότητα στην καθημερινή μέση συγκέντρωση τροφών παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της πλήρους περιόδου καλλιέργειας. Ο αριθμός ξαναγεμισμάτων ήταν χαμηλός πριν από την εμφάνιση των

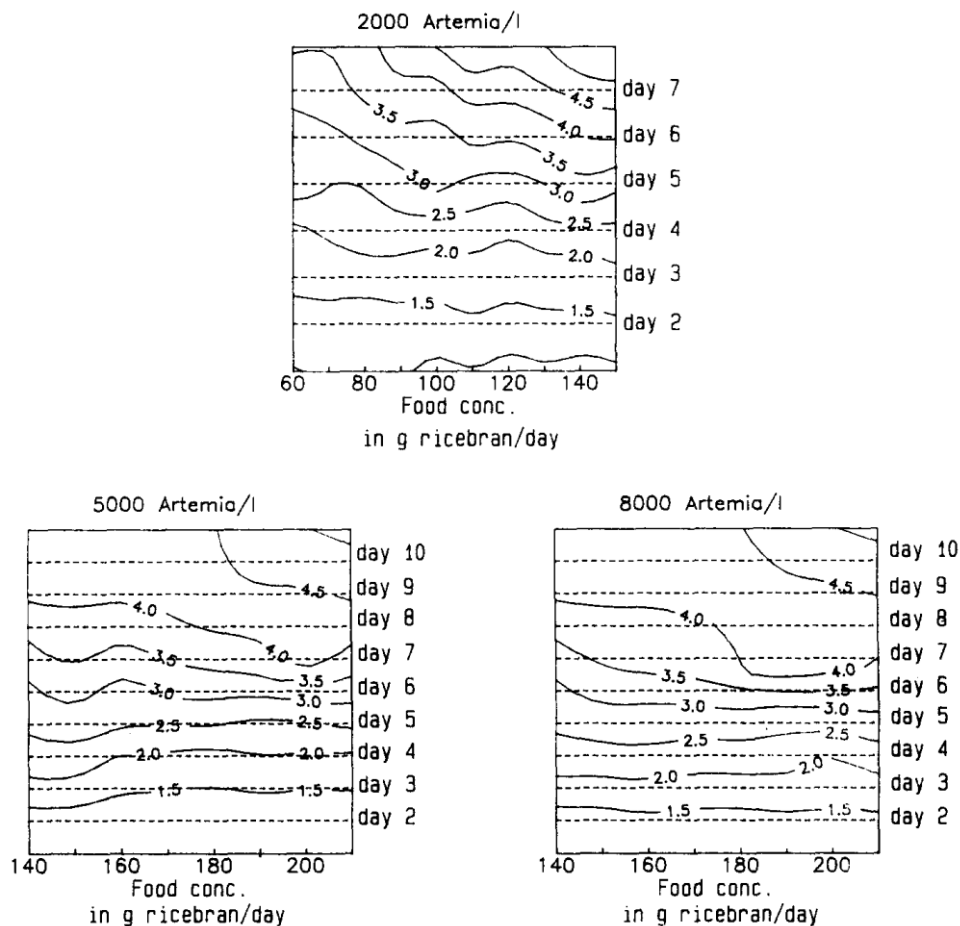
θωρακοποδίων, αλλά διπλασιάστηκε και παρέμεινε σταθερός μετά από τη μεταμόρφωση των νυμφών. Αυτό μπορεί να προτείνει την πιθανότητα εκτροφής ναυπλίων στις προ-ενήλικες γαρίδες άλμης, χρησιμοποιώντας μόνο ένα σταθερό καθημερινό ποσό τροφών που θα διανεμόταν στο ένα τάισμα πριν από την εμφάνιση των θωρακοποδίων και που θα μπορούσε να διαιρεθεί σε δύο τροφοδοτήσεις σε ένα διπλό ποσό νερού μετά από το σχηματισμό των θωρακοποδίων.

Δεδομένου ότι τα αποτελέσματα του πρώτου πειράματος έδειξαν ότι μια μέση συγκέντρωση τροφών 0.14 g/l θα μπορούσε να υποστηρίξει την καλλιέργεια, το μέγεθος της δεξαμενής τροφών αναρριχήθηκε μέχρι τα 1000 λίτρα, και 140 g της συγκέντρωσης διαλύματος πίτουρου ρυζιού προστίθενται καθημερινά. Ο μεγαλύτερος όγκος της δεξαμενής τροφών πρόσφερε το πλεονέκτημα του ξαναγεμίματος των δεξαμενών μια φορά κάθε 24 h. Ξεκινώντας την 4^η ημέρα ο ανεφοδιασμός πίτουρου ρυζιού στη δεξαμενή τροφών μειώθηκε κατά 50% (70 g) και το σιφώνιο αντικαταστάθηκε από έναν σωλήνα με μεγαλύτερη διάμετρο (εσωτερική διάμετρος 8 mm, ποσοστό ροής στην αρχική πλήρη ικανότητα νερού 150 l/h). Το αυξανόμενο ποσοστό ροής μείωσε το χρόνο λειτουργίας του σιφονίου σε περίπου 12 h. Συνεπώς, από εκείνη την ημέρα ένα δεύτερο ξαναγέμισμα της δεξαμενής τροφών απαιτήθηκε, αν και η καθημερινή προσφορά τροφών των 140 g παρέμεινε σταθερή. Η αυξανόμενη ανταλλαγή νερού επιπλέον εξασφάλισε μια βέλτιστη ποιότητα νερού. Λόγω της συνεχούς προσφοράς τροφών όλα τα ζώα εκτέθηκαν στους ίδιους όρους σίτισης, οι οποίοι οδήγησαν σε μια ομοιογενή αύξηση του πληθυσμού. Το γραμμικό μοντέλο αύξησης της *Artemia* ($r > 0,99$), συνδυαζόμενο με την υψηλή αξιοπιστία της παραγωγής των ποσών γαρίδων άλμης, άνοιξε τη δυνατότητα διαχείρισης των συνθηκών καλλιέργειας (διαθεσιμότητα τροφής, νυμφική πυκνότητα) κατά τέτοιο τρόπο ώστε τα καθορισμένα με σαφήνεια μεγέθη θηραμάτων *Artemia* να μπορούν να ληφθούν μετά από συγκεκριμένες χρονικούς περιόδους.

Παράμετροι που επηρεάζουν την αύξηση και την επιβίωση

Σε ένα δεύτερο σύνολο πειραμάτων, η επίδραση της αυξανόμενης/μειωμένης συγκέντρωσης πίτουρου αναλύθηκαν περαιτέρω για τρεις πυκνότητες *Artemia* (2000, 5000 και 8000 ζώα/l, αντίστοιχα) (Εικ. 2). Είναι σαφές ότι, ζώα του ίδιου μήκους μπορούν να παραχθούν από διάφορους συνδυασμούς συγκεντρώσεων τροφών και νυμφικών πυκνοτήτων, εντούτοις, στις υψηλές ζωικές πυκνότητες απαιτούνται πιο μεγάλοι περίοδοι εκτροφής για να φθάσουν στο ίδιο μήκος. Επιπλέον, η επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης τροφών στην αρχή της περιόδου εκτροφής δεν οδηγεί σε μια άμεση αύξηση ανάπτυξης των μεμονωμένων νυμφών. Αυτό προκύπτει πιθανώς από τη χαμηλή αποδοτικότητα ηθμοφαγίας από τις νύμφες (ναύπλιοι) σ' αυτό το στάδιο της ανάπτυξης. Είναι μόνο στο σχηματισμό των θωρακοποδίων (\pm ημέρα 4) που αποδοτικότερη λήψη τροφών καταχωρείται και ότι η λήψη των υψηλότερων συγκεντρώσεων πίτουρου ρυζιού φέρνει σε μια σημαντικά καλύτερη αύξηση των γαρίδων άλμης (καμπύλες αυξανόμενης αρνητικής κλίσης).

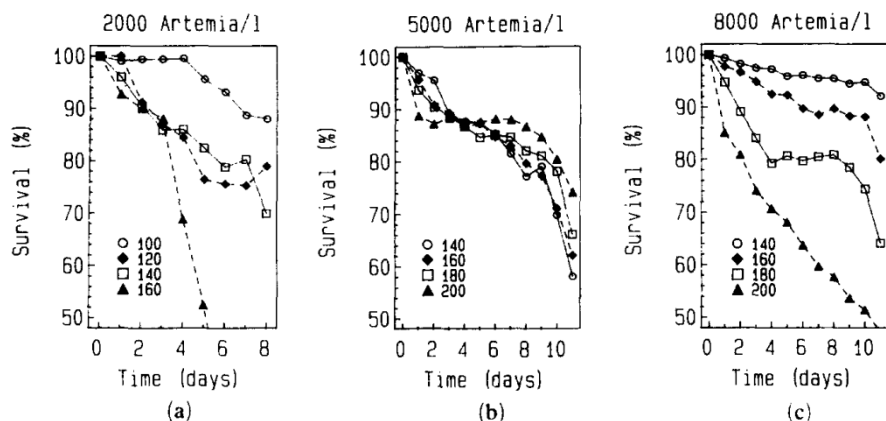
Η μέγιστη παραγωγή βιομαζών λήφθηκε στο νερό της χαμηλής διαφάνειας, αλλά τα τελευταία επηρέασαν αρνητικά την επιβίωση των ζώων (Εικ. 3α). Από αυτή την άποψη παρατηρήθηκε ότι, για μια χαμηλή νυμφική πυκνότητα (2000 ζώα ανά λίτρο) και οι συγκεντρώσεις τροφών που υπερβαίνουν τα 140 g/m³, η θνησιμότητα ήταν προκαλούμενη από την υπερσίτιση των ζώων.



Εικ. 2. Αύξηση της *Artemia* αναπτυσσόμενης σε διάφορες συγκεντρώσεις τροφής και αρχικές πυκνότητες αποθεματοποίησης των 2000, 5000 και 8000 ζώα/l (οι καμπύλες συνδέουν τα σημεία των δεδομένων παρόμοιων μηκών).

Fig. 2. Growth of *Artemia* reared at different food concentrations and initial stocking densities of 2000, 5000 and 8000 animals/l (curves connect data points of identical length).

Η αύξηση μεγέθους των γαρίδων άλμης ακολούθησε ένα γραμμικό σχέδιο αύξησης το οποίο παρατηρήθηκε σε όλους τους συνδυασμούς νυμφικής συγκέντρωσης πυκνότητας και τροφών. Αυτή η συνέπεια στην αύξηση της *Artemia* επέτρεψε έναν χαρακτηρισμό αύξησης μέσω ενός συνόλου γραμμικών εξισώσεων (Πίνακας 2). Αυξανόμενες συγκεντρώσεις τροφών οδήγησαν σε μια αναλογικά μεγαλύτερη αύξηση μεγέθους των ζώων που εκτράφηκαν στη χαμηλή πυκνότητα. Επιπλέον, όλα τα ζώα ήταν ομοιόμορφα στο μέγεθος (σταθερή απόκλιση λιγότερο από 15% του μέσου μήκους των ζώων στη δεξαμενή εκτροφής), ανεξάρτητα από την πυκνότητα στην οποία αναπτύχθηκαν. Η επιβίωση βρέθηκε να εξαρτάται από τον αρχικό δείκτη πυκνότητας των ζώων (Εικ. 3). Στη χαμηλή νυμφική πυκνότητα, η επιβίωση επηρεάστηκε από την αυξανόμενη συγκέντρωση τροφών, τελικά με συνέπεια την υψηλή θνησιμότητα λόγω της υπερσίτησης. Στις νυμφικές συγκεντρώσεις 5000 ζώων ανά λίτρο παρατηρήθηκαν χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης στις αυξανόμενες συγκεντρώσεις τροφών μόνο μέχρι την ημέρα 4; στο δεύτερο μέρος της περιόδου καλλιέργειας αυτές οι συνθήκες καλλιέργειας αποδείχθηκαν ακόμη και καλύτερα. Τέλος, οι πολύ πυκνοί πληθυσμοί της *Artemia* επηρεάστηκαν από την αυξανόμενη θνησιμότητα όταν αυξήθηκαν οι συγκεντρώσεις τροφών πάνω από 140 g/m³.



Εικ. 3. Επιβίωση *Artemia* αναπτυσσόμενης σε διάφορες συγκεντρώσεις τροφής (g νιφάδων ρυζιού/ημέρα) και αρχικές πυκνότητες αποθεματοποίησης των 2000, 5000 και 8000 ζώα/l.
 Fig. 3. Survival of *Artemia* reared at different food concentrations (g rice bran/day) and initial stocking densities of 2000, 5000 and 8000 animals/l.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

Εξισώσεις και συντελεστές συσχέτισης (r) που παρατηρούνται στη γραμμική παλινδρόμηση του μήκους (y) σε σχέση με την ηλικία (x) της *Artemia* που ταΐστηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις νιφάδων ρυζιού και αναπτυσσόμενης κάτω από τρεις διαφορετικές πυκνότητες αποθεματοποίησης

TABLE 2
 Equations and correlation coefficients (r) obtained by linear regression of the length (y) versus age (x) of *Artemia* fed on different rice bran concentration and reared under three different stocking densities

Rice bran conc. (g/m ³)	Artemia stocking density (n/litre)		
	2000	5000	8000
60	$y=0.382x+0.51$ $r=0.99$		
100	$y=0.518x+0.209$ $r=0.99$		
110	$y=0.578x+0.19$ $r=0.99$		
120	$y=0.587x-0.081$ $r=0.98$		$y=0.266x+0.617$ $r=0.98$
130	$y=0.604x+0.058$ $r=0.98$		$y=0.314x+0.553$ $r=0.98$
140	$y=0.702x-0.201$ $r=0.97$	$y=0.352x+0.779$ $r=0.98$	$y=0.291x+0.528$ $r=0.97$
150	$y=0.707x-0.177$ $r=0.95$	$y=0.370x+0.819$ $r=0.98$	$y=0.322x+0.547$ $r=0.97$
160		$y=0.338x+0.931$ $r=0.98$	$y=0.332x+0.451$ $r=0.99$
170		$y=0.376x+0.791$ $r=0.98$	$y=0.323x+0.513$ $r=1.00$
180		$y=0.388x+0.786$ $r=0.97$	$y=0.321x+0.549$ $r=0.99$
190		$y=0.409x+0.749$ $r=0.95$	$y=0.345x+0.534$ $r=0.99$
200		$y=0.426x+0.669$ $r=0.95$	$y=0.326x+0.635$ $r=0.99$
210		$y=0.432x+0.658$ $r=0.98$	$y=0.399x+0.541$ $r=0.99$

Η επίδραση της συγκέντρωσης τροφών και της πυκνότητας έναρξης ερευνήθηκε στην παραγωγή βιομάζας της νεανικής *Artemia* 5 mm. Η υψηλότερη παραγωγή βιομάζας λήφθηκε από την προσθήκη 140 g υφάδων ρυζιού/m³ στο σύστημα χαμηλής πυκνότητας, ενώ 180 g/m³ πρόσφεραν τα καλύτερα αποτελέσματα σε πυκνότερα εποικημένα raceways (Πίνακας 3).

ΠΙΚΑΝΑΣ 3

Παραγωγή της βιομάζας *Artemia* (σε kg υγρού βάρους) σε σχέση με τη συγκέντρωση τροφής και την πυκνότητα των ζώων

TABLE 3

Artemia biomass production (in kg wet weight) in function of the food concentration and animal density

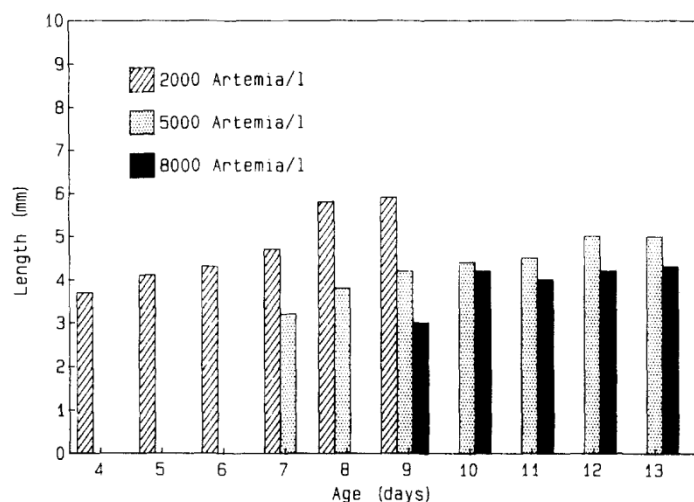
Rice bran concentration (g/m ³)	Artemia density (animals/litre)		
	2000	5000	8000
100	2.3	n.m.	n.m.
120	2.4	3.7	4.9
140	3.5	4.3	5.8
160	+	4.1	7.0
180	+	5.2	7.7
200	+	5.1	7.3
220	+	+	+

n.m.: Not measured.

+ : Collapse of the culture.

Αυτό το βέλτιστο καθεστώς σίτισης διατηρήθηκε στα ακόλουθα πειράματα, όπου ο κατάλληλος χρόνος συγκομιδής για τη μέγιστη βιομάζα παραγωγής καθορίστηκε. Για αυτόν το λόγο αντιγραφές των ίδιων καλλιεργειών (ίδια νυμφική πυκνότητα) συγκομίστηκαν τις διαδοχικές ημέρες και συγκρίθηκαν για την παραγωγή τους. Η Εικ. 4 αντιπροσωπεύει το μέσο μήκος του ατόμου γαρίδας άλμης και το βάρος της αντίστοιχης βιομάζας αποκτηθείσας κατά τη διάρκεια αυτών των επακόλουθων συγκομιδών. Ο βέλτιστος χρόνος συγκομιδής ήταν προσδιορισμένος ως η στιγμή όταν ήταν ακριβώς η τελευταία πρόσθετη εισαγωγή των τροφών αντισταθμισμένη από την πρόσθετη παραγωγή στη βιομάζα, τότε είναι που η γραμμή κατανάλωσης τροφών (διακεκομμένες γραμμές στην Εικ. 4b) είναι εφαπτομένη στη γραμμή παραγωγής βιομάζας.

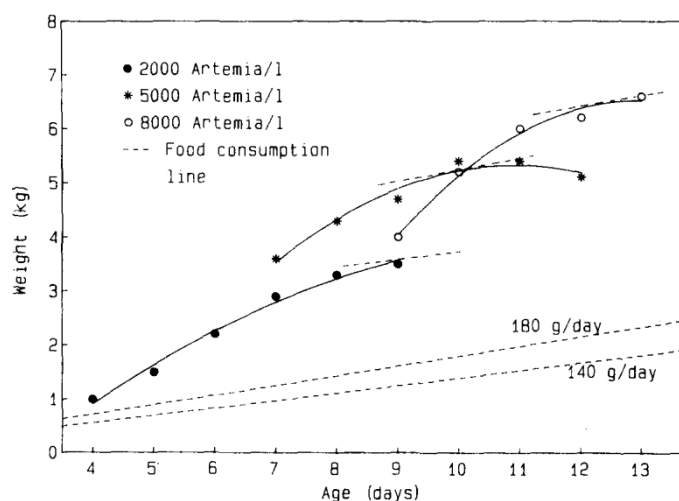
Η γραμμή παραγωγής βιομάζας σε κάθε ένα εκ των τριών διαφορετικών συστημάτων καλλιέργειας οριοθετεί σαφώς τα όρια όπου η μέγιστη συγκομιδή μπορεί να είναι αναμενόμενη, δηλ. (αντίστοιχα ημέρα 9, 10 και 12 για τις πυκνότητες των 2000, 5000 και 8000 ζώα ανά λίτρο) (Εικ. 4b). Στις μικρές χρονικές περιόδους εκτροφής μόνο οι υψηλές παραγωγές μπορούν να επιτευχθούν με τα συστήματα χαμηλής πυκνότητας. Μετά από 1 εβδομάδα, αντίστοιχα 10 ημέρες της καλλιέργειας, των συστημάτων με τους αρχικούς δείκτες πυκνότητας 5000 ή 8000 ναύπλιοι ανά λίτρο γίνονται παραγωγικότερες. Η απόλυτη υψηλότερη παραγωγικότητα του πυκνού συστήματος πρέπει, εντούτοις, να παρεμβληθεί σε ένα βέλτιστο οικονομικό κέρδος δεδομένου ότι η εισαγωγή ως κατανάλωση κύστεων και το μήκος της περιόδου εκτροφής μπορούν να έχουν τους σημαντικούς οικονομικούς περιορισμούς. Όταν αυτές οι δύο σημαντικές παράμετροι κόστους αποβάλλονται με την έκφραση της παραγωγής (συγκομιδής) ανά μονάδα εισαγωγής, το σύστημα χαμηλής πυκνότητας αποδεικνύεται πιο κερδοφόρο (Πίνακας 4).



Εικ. 4α. Μέσος όρος του μήκους της *Artemia* σε σχέση με την ηλικία και τη νυμφική πυκνότητα του πληθυσμού.

Fig. 4a. Average length of *Artemia* in function of the age and larval density of the population.

Συμπερασματικά, η χρήση του αναπτυγμένου συστήματος μέσω ημι-ροής μπορεί να συστήνεται για την καλλιέργεια υψηλής πυκνότητας της *Artemia* ως φτηνή εναλλακτική λύση για τα περιπλοκότερα υπερ-εντατικά συστήματα. Πράγματι, οι δαπάνες επένδυσης είναι χαμηλές έναντι των παραδοσιακών συστημάτων (Bossuyt & Sorgeloos, 1980; Brisset *et al.*, 1982 Lavens *et al.*, 1985). Έχει υψηλή αξιοπιστία στην παραγωγή των συνεπών ποσών βιομάζας και, επιπλέον παρέχει το πλεονέκτημα της νεανικής ή προ-ενήλικης *Artemia* ενός καλά καθορισμένου μεγέθους θηραμάτων. Η διάρκεια της περιόδου εκτροφής για τη λήψη του επιθυμητού θηράματος *Artemia* μπορεί να υπολογιστεί με τη βοήθεια των εξισώσεων αντιστοιχίας στις συνθήκες καλλιέργειας.



Εικ. 4β. Παραγωγή της βιομάζας *Artemia* σε σχέση με την ηλικία και τη νυμφική πυκνότητα του πληθυσμού.

Fig. 4b. *Artemia* biomass production in function of the age and larval density of the population.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4

Ικανότητα του καλλιεργητικού μέσω ημι-ροής συστήματος που χρησιμοποιήθηκε σε τρεις αρχικές πυκνότητες αποθεματοποίησης *Artemia*.

TABLE 4

Rentability of the semi flow-through culture system used at three different initial *Artemia* stocking densities

	<i>Stocking density (animals/litre)</i>		
	<i>2000</i>	<i>5000</i>	<i>8000</i>
Yield (kg)	3.3	5.4	6.2
Duration of production cycle (days)	9	10	12
Cyst consumption (g)	10	25	40
Rentability (biomass prod./day per g)	37	20	12

Τελικά, η επιλογή της πυκνότητας του raceway μπορεί να επιλεχτεί σύμφωνα με τον τελικό σκοπό της παραχθείσας βιομάζας. Οι καλλιεργητές γαρίδων, για παράδειγμα, προτιμούν να ταΐσουν με το μικρό θήραμα το οποίο μπορεί εύκολα να πιαστεί από το αρπακτικό ζώο και με αποτέλεσμα τα λιγότερα συντρίμια όταν συλλαμβάνεται από το αρπακτικό ζώο. Οι καλλιεργητές ψαριών, αφ' ετέρου, προτιμούν να προσφέρουν τα μεγέθη θηραμάτων που είναι μόνο ελαφρώς μικρότερα από το στοματικό μέγεθος των ψαριών, προκειμένου να επιτευχθεί μια καλύτερη ενεργειακή ισορροπία στη λήψη και την αφομοίωση τροφών.

Μια λύση στο πρώτο πρόβλημα μπορεί να δοθεί από την *Artemia* εκτροφής σε υψηλές πυκνότητες (8000 ανά λίτρο) και μέτρια προσφορά τροφών, μάλλον τα μικρά ζώα θα είναι άριστες τροφές που μπορούν να ταΐσουν στις γαρίδες για τις διαδοχικές ημέρες. Η πτώση στην πυκνότητα με επαναλαμβανόμενο δείγμα έχει επιπτώσεις βεβαίως στην αύξηση των γαρίδων άλμης αλλά μπορεί να είναι διορθωμένη με το χαμηλό των επιπέδων σίτισης. Στη δεύτερη εφαρμογή, χαμηλοί αρχικοί δείκτες πυκνότητας (5000 ανά λίτρο) που συνδυάζονται με τη μέγιστη προσφορά τροφών θα παραγάγουν την ταχέως αναπτυσσόμενη *Artemia* που θα καλύψει τις απαιτήσεις των αυξανόμενων ψαριών. Προκειμένου να ληφθεί ένα θήραμα που έχει τα καλύτερα χαρακτηριστικά μεγέθους για να ταΐσουν τα ψάρια, μια κατάλληλη επιλογή των παραμέτρων καλλιέργειας (πυκνότητα θηραμάτων και συγκέντρωση τροφών) πρέπει να πραγματοποιηθεί για να εξασφαλισθεί βέλτιστη αύξηση του ζώου. Σε περίπτωση αργής ανάπτυξης του θηράματος, μερική απομάκρυνση του πληθυσμού *Artemia* μπορεί να γίνει προκειμένου να ωφεληθεί από την αύξηση ανάπτυξης που προκαλείται από την απότομη μείωση στην πυκνότητα θηραμάτων. Σε όλες τις άλλες καταστάσεις όπου απαιτείται ενήλικη *Artemia*, ο παραγωγός πρέπει να καθοδηγηθεί από την υψηλότερη απόδοση εισοδήματος ενός συστήματος χαμηλής πυκνότητας (2000 ανά λίτρο).

Παραπομπές

- Bossuyt, E. & Sorgeloos, P. (1980). Technological aspects of the batch culturing of *Artemia* in high densities. In *The Brine Shrimp Artemia*, Vol. 3, ed. G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels & E. Jaspers. Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 133-52.
- Bossuyt, E. & Sorgeloos, E (1981). Batch production of adult *Artemia* in 2 m 3 and 5 m 3 air-water-lift operated raceways. In *Book of Abstracts. World Conference on Aquaculture*, 21-25 September, 1981, Venice, Italy.
- Brisset, E J., Versichele, D., Bossuyt, E., De Ruyck, L. & Sorgeloos, E (1982). High density flow-through culturing of brine shrimp *Artemia* on inert feeds - preliminary results with a modified

- culture system. *Aquaculture Eng.*, 1, 115-19.
- Dobbeleir, J., Adam, N., Bossuyt, E., Bruggeman, E. & Sorgeloos, P. (1980). New aspects of the use of inert diets for high density culturing of brine shrimp. In *The Brine Shrimp Artemia*, Vol. 3, ed. G. Persoone, E. Sorgeloos, O. Roels & E. Jaspers, Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 165-74.
- Lavens, E & Sorgeloos, E (1991). Production of *Anemia* in culture tanks. In *Artemia Biology*, ed. R. A. Browne, E. Sorgeloos & C. N. A. Trotman. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Lavens, E, Baert, P., De Meulemeester, A., Van BaUaer, E. & Sorgeloos, E (1985). New developments in the high density flow-through culturing of brine shrimp *Artemia*. *Journal of World Mariculture Society*, 16, 498-508.
- Leger, E, Bengston, D. A., Simpson, K. L. & Sorgeloos, E (1986). The use and nutritional value of *Anemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 24, 521-623.
- Sorgeloos, E, Bossuyt, E., Lavens, E, L6ger, E, Vanhaecke, P. & Versichele, D. (1983). The use of brine shrimp *Anemia* in crustacean hatcheries and nurseries. In McVey, J. E (Ed.), *CRC Handbook of Mariculture*, Vol. I. *Crustacean Aquaculture*, ed. J. E McVey. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 71-96.
- Sorgeloos, E, L6ger, E, Lavens, E & Tackaert, W. (1987). Increased yields of marine fish and shrimp production through apphcation of innovative techniques with *Artemia*. *Aquaculture et Developpement, Cahiers Ethologie Appliquee*, 7, 43-50.
- Tobias, W. J., Sorgeloos, E, Bossuyt, E. & Roels, O. A. (1979). The technical feasibility of mass-culturing *Artemia salina* in the St. Croix 'artificial upwelling' mariculture system. *Proc. WorldMaricult. Soc.*, 10, 203-14.
- Tobias, W. J., Sorgeloos, E, Roels, O. A. & Sharfstein, B. A. (1980). International study on *Anemia*^o XIII. A comparison of production data of 17 geographical strains of *Artemia* in the St. Croix artificial upwelling-mariculture system. In *The Brine Shrimp Artemia*, Vol. 3, ed. G. Persoone, E. Sorgeloos, O. Roels & E. Jaspers. Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 383-92

Εκεί που στη δεκαετία του '70 η παραγωγή εκτρεφόμενων θαλασσιών οστεϊχθών και γαρίδων στηρίχθηκε σχεδόν αποκλειστικά στη σύλληψη άγριων ιχθυδίων, από τότε η ελεγχόμενη παραγωγή των νυμφών από γεννήτορες σε αιχμαλωσία, ή με άλλα λόγια η παραγωγή ιχθυδίων σε εκκολαπτήρια, πλέον έχει γίνει τώρα μια στερεότυπη διαδικασία για τους περισσότερους καλλιεργούμενους ιχθύες και οστρακόδερμα, με παραγωγή δισεκατομμυρίων νυμφών, ιχθύων και οστρακόδερμων (δίθυρων μαλακίων, γαρίδων της οικογένειας των penaeidae, σαλμονοειδών, Ευρωπαϊκού λαυρακιού, τσιπούρας κ.α.) μέσα σε εκκολαπτήρια σε όλο τον κόσμο. Η καλλιέργεια των νυμφών πραγματοποιείται γενικά κάτω από τις ελεγχόμενες συνθήκες των εκκολαπτηρίων και συνήθως απαιτεί συγκεκριμένες τεχνικές καλλιέργειας. Το μικρό μέγεθος των νυμφών (δηλ. μικρό στοματικό μέγεθος), η ημιτελής ανάπτυξη των αισθητήριων οργάνων (δηλ. τα μάτια, οι χημειούποδοχείς) και το πεπτικό τους σύστημα, είναι περιοριστικοί παράγοντες στην επιλογή και χρήση κατάλληλης τροφής κατά τη διάρκεια της έναρξης ή της πρώτης περιόδου σίτισης.

Η επιλογή μιας κατάλληλης και θρεπτικής τροφής πρέπει να βασιστεί σε διάφορα κριτήρια. Από την πρακτική πλευρά του καλλιεργητή, μια καλή τροφή πρέπει να είναι άμεσα διαθέσιμη, οικονομικώς αποδοτική, απλή καθώς επίσης και πολύπλευρη στην εφαρμογή. Η συνεχής διαθεσιμότητα επαρκών ποσοτήτων ζωντανών οργανισμών, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν ζωντανή τροφή, είναι ύψιστης σημασίας στη συνεχή παραγωγή των εκκολαπτηρίων. Σήμερα, τρεις ομάδες ζωντανών τροφών χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανικής κλίμακας καλλιέργειας νυμφών ιχθύων και οστρακόδερμων: α. διάφορα είδη μικροφυκών από 2 έως 20 μm για δίθυρα, γαρίδες, τροχόζωα, ιχθύες, β. από 50 έως 200 μm τροχόζωο *Brachionus plicatilis* για καρκινοειδή, θαλάσσιους ιχθύες και γ. οι από 400 έως 800 μm μετα-ναύπλιοι του είδους *Artemia spp.* για καρκινοειδή, ιχθύες.

Η επιτυχία των τροχοζώων ως καλλιεργήσιμος οργανισμός είναι πολλαπλή, συμπεριλαμβανομένου της πλαγκτονικής φύσης τους, της ανοχής σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών, του μικρού μεγέθους, της αργής ταχύτητας κολύμβησής τους, του υψηλού ποσοστού αναπαραγωγής, της δυνατότητα αυτών των ζώων να ανατρέφονται σε πολύ υψηλές πυκνότητες και της φύσης της ηθμοφαγίας που διευκολύνει τη συσσώρευση στους ιστούς του σώματός τους συγκεκριμένων θρεπτικών ουσιών για τους νυμφικούς θηρευτές. Παρόμοια πλεονεκτήματα παρουσιάζει και η χρήση των μετα-ναύπλιων του είδους *Artemia spp.* όπου με τη διαδικασία του βιο-εγκλεισμού η θρεπτική ποιότητα της μπόρεσε να προσαρμοστεί περαιτέρω για να ταιριάζει στις απαιτήσεις των θηρευτών.

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η συλλογή και καταγραφή πληροφοριών σχετικά με τη μορφολογία, τη βιολογία, την οικολογία, τη θρεπτική αξία, τη χρήση και τις σημαντικότερες τεχνικές παραγωγής και διαχείρισης ζωοπλαγκτονικών οργανισμών (τροχόζωα και *Artemia*) που έχουν υιοθετηθεί τα τελευταία χρόνια από την πλειοψηφία των εκκολαπτηρίων ψαριών και ασπόνδυλων. Επίσης, περιγράφηκαν αντιπροσωπευτικές ερευνητικές εργασίες που πραγματοποιήθηκαν σε ολόκληρο τον κόσμο πάνω στην εξέλιξη, σε τεχνικό και διαχειριστικό επίπεδο, της καλλιέργειας ζωοπλαγκτονικών οργανισμών της τελευταίας 20ετίας.

Σκοπός της αποτέλεσε, η συλλογή του υλικού αυτού να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί για την καλύτερη κατανόηση και χρονική παρακολούθηση της εξέλιξης της καλλιέργειας ζωοπλαγκτονικών οργανισμών, ενώ ταυτόχρονα, να αποτυπωθούν τα

κενά και οι ανάγκες βελτίωσης της καλλιέργειας αυτής για μελλοντικές ερευνητικές προσπάθειες.

Whereas in the 1970s the production of farmed marine finfish and shrimp relied almost exclusively on the capture of wild fry, since then the controlled production of larvae from captive broodstock, or in other words the hatchery production of fry, has now become a routine operation for most cultivated fish and shellfish species, billions of fish and shellfish larvae (i.e. bivalve mollusks, penaeid shrimp, salmonids, European seabass, Gilthead seabream etc.) currently being produced within hatcheries all over the world. The cultivation of larvae is generally carried out under controlled hatchery conditions and usually requires specific culture techniques. The small size of larvae (ie. small mouth size), the uncompleted development of their perception organs (ie. eyes, chemoreceptors) and digestive system, are limiting factors in proper feed selection and use during the early first-feeding or start-feeding period.

The selection of a suitable and nutritious diet should be based on a number of criteria. From the practical viewpoint of the culturist, a good diet should be readily available, cost-effective, simple as well as versatile in application. The consistent availability of sufficient quantities of food organisms is of the utmost importance in continuous hatchery production. Today, three groups of live diets are widely applied in industrial larviculture of fish and shellfish: a. different species of 2 to 20 μm microalgae for bivalves, shrimp, rotifers, fish; b. the 50 to 200 μm rotifers *Brachionus plicatilis* for crustaceans, marine fish and c. the 400 to 800 μm brine shrimp *Artemia spp. meta-nauplii* for crustaceans, fish.

The success of rotifers as culture organism is manifold, including their planktonic nature, tolerance to a wide range of environmental conditions, their small size, slow swimming velocity, high reproduction rate, the possibility of rearing these animals at very high densities and the filter-feeding nature facilitates the inclusion into their body tissues of specific nutrients essential for the larval predators. Similar advantages showed the use of brine shrimp *Artemia spp. meta-nauplii*, while with the procedure of bio-encapsulation the nutritional quality of this can be further tailored to suit the predators' requirements.

Object of the present study was the collection and record of information about the morphology, biology, ecology, nutrition value, the use and the important production techniques and manipulation zooplankton organisms (rotifers and *Artemia*), whose had adopted the last years from the majority of fish and invertebrates hatcheries. Also, described representative research made around the world on the development, in technical and management level, of zooplankton culture the last 20 years.

The aim of this study was, the collection of these information to be useful for further understudying and time monitoring the evolution of zooplankton culture, while in the same time, be reflected in the gaps and needs improvement of this culture for futures research efforts.

- Alver, M. O., Alfredsen, J. A., Øie, G., Storøy, W., Olsen Y., 2010. Automatic control of growth and density in rotifer cultures. *Aquacultural Engineering*, In Press, (Available online 1 March 2010).
- Alver, M. O., Tennøy, T., Alfredsen, J. A., Øie, G., 2007. Automatic measurement of rotifer *Brachionus plicatilis* densities in first feeding tanks. *Aquacultural Engineering*, 36, 115-121.
- Aragão, C., Conceição, L. E. C., Dinis, M. T., Fyhn H.J., 2004. Amino acid pools of rotifers and *Artemia* under different conditions: nutritional implications for fish larvae. *Aquaculture*, 234, 429-445.
- Babu, M. M., Marian, M. P., Kitto, M. R., 2001. A cradle aeration system for hatching *Artemia*. *Aquacultural Engineering*, 24, 85-89.
- Basil, J. A., Nair, V. K. S., Thatheyus A. J., 1995. Laboratory studies on the culture of the brine shrimp *Artemia* using organic wastes. *Bioresource Technology*, 51, 265-267.
- Bengtson, D.A., Léger, P. and Sorgeloos, P. 1991. Use of *Artemia* as a food source for aquaculture. In: *Artemia* Biology. Browne, R.A., P. Sorgeloos and C.N.A. Trotman (Eds), CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA, pp 225-285.
- Blair, T., Castell, J., Neil, S., D'Abramo, L., Cahu, C., Harmon P., Ogunmoye K., 2003. Evaluation of microdiets versus live feeds on growth, survival and fatty acid composition of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Aquaculture*, 225, 451-461.
- Chair, M., Dehasque, M., Sorgeloos, P., Nelis, H., De Leenheer, A.P., 1995. Live food mediated drug delivery as a tool for disease treatment in larviculture: a case study with turbot *Scophthalmus maximus*. *J. World Aquaculture Soc.*, 26, 217-219.
- Chebil, L., Yamasaki S., 1998. Improvement of a rotifer ecosystem culture to promote recycling marine microalga, *nannochloropsis sp.* *Aquacultural Engineering*, 17, 1-10.
- Clegg, J.S., Conte, F.P., 1980. A review of the cellular and developmental biology of *Artemia*. In: *The brine shrimp Artemia*. Vol. 2. Physiology, biochemistry, molecular biology. Persoone, G., P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp 11-54.
- Cushing, D.H., 1990. Plankton Production and Year-class Strength in Fish Populations: an Update of the Match/Mismatch Hypothesis. *Advances in Marine Biology*, 26, 249-293.

- Dehasque, M., Ooghe, B., Wille, M., Candreva, Y. and Lavens, P. 1995. Automation of live food in industrial zootechnics and economics. In: Larvi'95. Lavens, P., E. Jaspers and I. Roelants (Eds), European Aquaculture Society, Spec. Publ. No 24, Gent, Belgium, pp 325-327.
- Dhert, P., Bombeo, R. B., Lavens, P., Sorgeloos P., 1992. A simple semi flow-through culture technique for the controlled super-intensive production of *Artemia* juveniles and adults. *Aquacultural Engineering*, 11, 107-119.
- Dhert, P., Rombaut, G., Suantika, G., Sorgeloos, P., 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*, 200, 129-146.
- Dhert, P., Schoeters, K., Vermeulen, P., Sun, J., Gao, S., Shang, Z., Sorgeloos, P., 1995. Production and evaluation of resting eggs of *Brachionus plicatilis* originating from the P.R. of China. In: Lavens, P.; E. Jaspers and I. Roelants (Eds.), Larvi'95 Fish and Shellfish Larviculture Symposium. European Aquaculture Society, Special Publication, Gent, Belgium, Vol. 24, pp 315-319.
- Dhert, P., Lavens, P., Duray, M., Sorgeloos, P., 1990. Improved larval survival at metamorphosis of Asian seabass (*Lates calcarifer*) using 3-HUFA-enriched live food. *Aquaculture*, 90, 63-74.
- Fukusho, K., 1989. Biology and mass production of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Int. J. Aq. Fish. Technol.*, 1, 232-240.
- Fukusho, K., Iwamoto, H., 1981. Polymorphosis in size of rotifer, *Brachionus plicatilis*, cultured with various feeds. *Bull. Nat. Res. Inst. Aquaculture*, 2, 1-10.
- Gelabert, R. F., 2003. Bioencapsulation in *Artemia*: II. Influences of the particle concentration in the enrichment process. *Aquaculture*, 216, 143-153.
- Hagiwara, A., Balompapueng, M.D., Hirayama, K., 1995. Mass production and preservation of marine rotifer resting eggs. Page 314. In: Lavens, P.; E. Jaspers and I. Roelants (Eds.), Larvi'95 Fish and Shellfish Larviculture Symposium. European Aquaculture Society, Special Publication, Gent, Belgium, Vol. 24, pp 314.
- Hanaee, J., Agh, N., Hanaee, M., Delazar A., Sarker, S.D., 2005. Studies on the enrichment of *Artemia urmiana* cysts for improving fish food value. *Animal Feed Science and Technology*, 120, 107-112.
- ICAP, 1999. Θαλάσσιες Υδατοκαλλιέργειες, Κλαδική Μελέτη. Σελ. 1-4
- James, C.M., Abu-Rezeq, T.S., 1989. An intensive chemostat culture system for the production of rotifers for aquaculture. *Aquaculture*, 81, 291-301.
- Kolkovski, S., Curnow J., King J., 2004. Intensive rearing system for fish larvae research II: *Artemia* hatching and enriching system. *Aquacultural Engineering*, 31, 309-317.
- Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, E., Gamsiz K., Tandler, A., 2001. Advances in the

- development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture*, 194, 107-121.
- Kyungmin H., Geurden I., Sorgeloos, P., 2000. Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of *n*-3 highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 183, 335-347.
- Lavens, P., Sorgeloos P., 2000. The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture*, 181, 397-403.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. Rotifers, *Artemia*. In: Manual on the production and use of live food for aquaculture, Lavens, P., Sorgeloos, P., (eds). FAO Fisheries Technical Paper. No 361, Rome, pp. 49-161.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., Dhert, P., Devresse, B., 1995. Larval Foods. In: Broodstock Management and Egg and Larval Quality, Bromage, N.R. and R.J. Roberts (Eds), Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, pp 373-397.
- Léger, P., Bengtson, D.A., Simpson, K.L., Sorgeloos, P., 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 24, 521-623.
- Monroig, Ó., Navarro, J. C., Amat, F., González, P., Bermejo, A., Hontoria, F., 2006. Enrichment of *Artemia* nauplii in essential fatty acids with different types of liposomes and their use in the rearing of Gilthead Sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 251, 491-508.
- Naegel, L.C.A., 1999. Controlled production of *Artemia* biomass using an inert commercial diet, compared with the microalgae *Chaetoceros*. *Aquaculture Engineering*, 21, 49-59.
- Ono, F., Minami, K., Saigusa, M., Matsushima, Y., Mori, Y., Takarabe, K., Saini, N.L., Yamashita, M., 2010. Life of *Artemia* under very high pressure. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, In Press (Available online 12 March 2010)
- Suantika, G., Dhert, P., Nurhudah, M., Sorgeloos, P., 2000. High-density production of the rotifer *Brachionus plicatilis* in a recirculation system: consideration of water quality, zootechnical and nutritional aspects. *Aquacultural Engineering*, 21, 201-213.
- Suantika, G., Dhert, P., Rombaut, G., Vandenberghe, J., De Wolf, T., Sorgel, P., 2001. The use of ozone in a high density recirculation system for rotifers. *Aquaculture*, 201, 35-49.
- Yoshimura, K., Tanaka K., Yoshimatsu, T., 2003. A novel culture system for the ultra-high-density production of the rotifers, *Brachionus rotundiformis* – a preliminary report. *Aquaculture*, 227, 165-172.
- Zmora, O., Avital, E., Gordin H., 2002. Results of an attempt for mass production of *Artemia* in extensive ponds. *Aquaculture*, 213, 395-400.

Zmora, O., Shpigel, M., 2006. Intensive mass production of *Artemia* in a recirculated system. *Aquaculture*, 255, 488-494.

ΠΑΣΕΓΕΣ, 2010. ΙΟΒΕ: Ιδιαίτερα θετικές οι προοπτικές για το κλάδο των ιχθυοκαλλιέργειών. <http://stock.ana-mpa.gr/articleview1.php?id=5863>.