



Katholieke
Universiteit
Leuven

FACULTEIT WETENSCHAPPEN
Laboratorium voor Ecologie
en Aquacultuur



**INVLOED VAN $\omega 3$ POLY-ONVERZADIGDE VETZUREN EN
VERLICHTINGSSTERKTE OP DE OVERLEVING, GROEI EN
MORFOLOGISCHE ONTWIKKELING VAN DE LARVEN VAN
DE ZEEBAARS, *DICENTRARCHUS LABRAX* (LINNAEUS,
1758)**

Promotor: Prof. Dr. F. Ollevier

Proefschrift voorgedragen tot het
behalen van de graad van
Doctor in de Wetenschappen
door Serge CORNEILLIE



Katholieke
Universiteit
Leuven

FACULTEIT WETENSCHAPPEN
Laboratorium voor Ecologie
en Aquacultuur

**INVLOED VAN $\omega 3$ POLY-ONVERZADIGDE VETZUREN EN
VERLICHTINGSSTERKTE OP DE OVERLEVING, GROEI EN
MORFOLOGISCHE ONTWIKKELING VAN DE LARVEN VAN
DE ZEEBAARS, *DICENTRARCHUS LABRAX* (LINNAEUS,
1758)**

Promotor: Prof. Dr. F. Ollevier

Proefschrift voorgedragen tot het
behalen van de graad van
Doctor in de Wetenschappen
door Serge CORNEILLIE

1989

Dankwoord

Het verschijnen van deze doctoraatsthesis betekent voor mij een afscheid van mijn studiejaren. Deze jaren betekenden voor mij vele vreugdevolle momenten maar ook moeizaam en onverdroten werken aan een vooropgesteld doel. Nu ik dit doel ontwaar aan de horizon, wens ik alle mensen te danken die hun steentje tot dit werk bijgedragen hebben.

Op de allereerste plaats ben ik dank verschuldigd aan mijn promotor Prof. Dr. F. Ollevier. Deze dank is op zijn minst dubbel. Enerzijds voor de steun die zo noodzakelijk was om mijn doctoraalbeurs te behalen en anderzijds voor de begeleiding van dit werk op zijn laboratorium.

Prof. Dr. C. Agius, alsook zijn assistent Kevin, ben ik ontzettend dankbaar voor de geschonken gastvrijheid in zijn laboratorium te Londen. Dit verblijf betekende de start van ons vetzuuronderzoek.

Prof. Dr. P. Sorgeloos en zijn medewerkers wil ik speciaal danken voor de vruchtbare samenwerking die onontbeerlijk bleek voor het welslagen van deze onderneming

Dr. R. Ceusters verdient alle lof voor zijn deskundige hulp tijdens de statistische verwerking en interpretatie van de gegevens, en een "vriendelijke dank" voor zijn morele steun doorheen die jaren.

De Heren JM. Ricard en Denis Coves en Juffrouw Béatrice Chatain van het biologisch station "DEVA-SUD" te Palavas-les-Flots en de Heer Jean Robin en Juffrouw Nicole Devauchelle van het C.O.B. te Brest ben ik dankbaarheid verschuldigd voor het jarenlang gratis verstrekken van zeebaarseieren, en voor de vele informatie die ze mij gaven tijdens de stages die ik liep in hun onderzoekscentra.

Prof. Dr. A. De Loof krijgt mijn sympathie voor zijn continue interesse en de waardevolle gegeven tips.

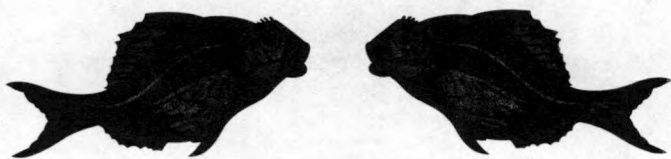
Ook Roos Peeters kan niet onvermeld blijven, voor haar steun tijdens bijzonder moeilijke momenten.

Mijn collega's van het labo ben ik dankbaar voor de samenwerking en de prettige werksfeer die ze creëerden, in het bijzonder Willy Verdonck en Claude Belpaire. Verder een woord van dank aan alle medewerkers van het Zoölogisch Instituut waarop ik me steeds kon beroepen voor om het even welke hulp. Daarbij denk ik speciaal aan Hendrik Van den bergh, Willy Van Ham, Francine Voets, Rik Reyniers, Johny Gijbels. Zeer bijzonder dank ik Kristel Op 't Roodt, Els Fias en Paul Van Damme voor het grondig nalezen van dit werk.

Het I.W.O.N.L. en het N.F.W.O. ben ik erkentelijk voor de financiële steun van dit onderzoek.

Tenslotte zal ik steeds goede herinneringen behouden aan een heleboel kameraden die maakten dat LEUVEN voor mij LEVEN betekende.

"The extremely delicate nature
of the young fry cannot be
overemphasized" (Siddal, 1979)



INHOUDSTAFEL

Voorwoord	1
DEEL I: LITERATUURSTUDIE	3
Hoofdstuk 1: KWEEK VAN ZOOPLANKTON	3
Inleiding	3
<u>I.1.1. Kweek van de rotifeer (<i>Brachionus plicatilis</i>)</u>	8
I.1.1.1. Inleiding	8
I.1.1.2. Karakterisatie van het raderdiertje (<i>Brachionus plicatilis</i>)	8
I.1.1.2.1. Systematiek	8
I.1.1.2.2. Afmetingen	9
I.1.1.2.3. Invloed van de temperatuur en de saliniteit op de vermenigvuldiging van <i>Brachionus plicatilis</i>	11
I.1.1.2.3.1. Temperatuursinvloed	11
I.1.1.2.3.2. Saliniteitsinvloed	11
I.1.1.2.4. Invloed van de waterkwaliteit op de vermenigvuldiging van de raderdiertjes	12
I.1.1.3. Voedingsbiologie	12
<u>I.1.2. Produktie van nauplii en metanauplii van <i>Artemia</i></u>	13
I.1.2.1. Inleiding	13
I.1.2.2. Systematiek	14
I.1.2.3. Produktie van de nauplii van <i>Artemia</i>	15
I.1.2.3.1. Verschillen tussen de populaties van verschillende geografische oorsprong	15
I.1.2.3.2. Ontluiking van de nauplii	17
I.1.2.3.3. Koude bewaring van de nauplii	17
I.1.2.3.4. Decapsulatie van de <i>Artemia</i> -cysten	18
I.1.2.4. Produktie van <i>Artemia</i> -metanauplii en aanrijking of bio-incapsulatie	19
Hoofdstuk 2: KWEEK VAN DE LARVALE STADIA VAN DE ZEEBAARS	21
I.2.1. Inleiding	21
<u>I.2.2. Ecologische aspecten van de zeebaars</u>	23
I.2.2.1. Systematiek van de zeebaars	23
I.2.2.2. Verspreiding van de zeebaars	23
I.2.2.3. Abiotische factoren die het voorkomen van de zeebaars bepalen	23

<u>I.2.3. Overzicht van de kweekomstandigheden bij de produktie van zeebaarslarven</u>	24
I.2.3.1. Incubatie van de eieren	24
I.2.3.2. Kweek van de larvale stadia	24
I.2.3.2.1. Kweeksystemen	24
I.2.3.2.2. Fysische en chemische variabelen	26
I.2.3.2.2.1. Temperatuur	26
I.2.3.2.2.2. Saliniteit	26
I.2.3.2.2.3. Zuurstof	30
I.2.3.2.2.4. Lichtregime en intensiteit	30
I.2.3.2.2.5. Tankvorm en kleur	30
I.2.3.2.2.6. Beluchting	33
I.2.3.2.2.7. pH en stikstofverbindingen	34
I.2.3.2.2.8. Debiet en larvendensiteit	34
I.2.3.3. Voedselregime	37
I.2.3.3.1. Startmoment van voederen	37
I.2.3.3.2. Prooidensiteit en consumptie	37
I.2.3.3.3. Overgang levend voedsel-inert voedsel	38

Hoofdstuk 3. MORFOLOGISCHE ONTWIKKELING EN PATHOLOGIE VAN DE ZEEBAARSLARVEN

40

<u>I.3.1. Morfologische ontwikkeling van de zeebaarslarven</u>	40
I.3.1.1. Algemene ontwikkeling	40
I.3.1.2. Ontwikkeling van de zwemblaas	40
<u>I.3.2. Pathologie van de larven van de zeebaars</u>	44
I.3.2.1. Zwemblaasafwijkingen	44
I.3.2.2. Skeletmisvormingen	46
I.3.2.3. Urinaire calculosis	47

Hoofdstuk 4. INVLOED VAN POLY-ONVERZADIGDE VETZUREN OP DE OVERLEVING, GROEI EN MORFOLOGISCHE ONTWIKKELING VAN DE ZEEBAARSLARVEN

49

I.4.1. Fysiologische betekenis van vetzuren	49
I.4.2. Synthese van vetzuren	50
I.4.3. Nutritionele waarde van <i>Brachionus plicatilis</i> en <i>Artemia</i> voor mariene vislarven	52
I.4.4. Essentiële vetzuren bij vissen	55
I.4.5. EFA-deficiëntie bij mariene vislarven	59

Hoofdstuk 5. INVLOED VAN DE LICHTINTENSITEIT OP DE OVERLEVING, GROEI EN DE MORFOLOGISCHE ONTWIKKELING VAN DE ZEEBAARSLARVEN 61

I.5.1 Zonneradiatie buiten de atmosfeer	61
I.5.2. Metingen binnen beperkt golflengtegebied	61
I.5.3. Lichtgrootheden	61
I.5.4. Lichtinval op het water	62

DEEL II: EIGEN ONDERZOEK 64

Hoofdstuk 1 KWEEK VAN ZOO- EN FYTOPLANKTON 64

II.1.1. Kweek van de rotifeer (*Brachionus plicatilis*) 64

I.1.2.1. Kweekmethode	64
I.1.2.2. Invloed van verschillende voedsels op de reproductiesnelheid	64
I.1.2.2.1. Gisten (bakkers- en biergist)	64
I.1.2.2.2. Wieren (gedroogd en levend)	66
I.1.2.2.4. Algemene bespreking	67

II.1.2. Kweek van groenwieren (*Tetraselmis suecica*) 69

II.1.2.1. Algemene beschouwingen	69
II.1.2.2. Kweek van <i>Tetraselmis suecica</i> op laboratoriumschaal	70
I.3.2.1. Kweekomstandigheden	70
I.3.2.2. Kweekmethode	72

Hoofdstuk 2: KWEEK VAN DE LARVALE STADIA VAN DE ZEEBAARS <i>(Dicentrarchus labrax).</i>	74
<u>II.2.1. Kweek van zeebaarslarven in volledig gesloten systemen met artificieel zeewater</u>	74
II.2.1.1. Algemeen	74
II.2.1.2. Opstellingen	74
II.2.1.3. Fysische en chemische variabelen	78
II.2.1.4. Bacterieel onderzoek	83
II.2.1.4.1. Materiaal en methoden	83
II.2.1.4.2. Resultaten	84
II.2.1.4.3. Bespreking	84
<u>II.2.2. Optimalisatie van het voedselschema</u>	87
II.2.2.1. Invloed van de kleur van de rotiferen op de opname door zeebaarslarven	87
II.2.2.1.1. Materiaal en methoden	88
II.2.2.1.2. Resultaten	88
II.2.2.1.3. Discussie	89
II.2.2.2. Geoptimaliseerd voedselschema	90
<u>II.2.3. Overleving</u>	90
 Hoofdstuk 3. MORFOLOGISCHE ONTWIKKELING EN PATHOLOGIE VAN DE ZEEBAARSLARVEN	 94
<u>II.3.1. Ontwikkeling van de zwemblaas en invloed van deze zwemblaasontwikkeling op de groei van de larven</u>	94
II.3.1.1. Inleiding	94
II.3.1.2. Materiaal en methoden	94
II.3.1.3. Resultaten en bespreking	94
<u>II.3.2. Ziektebeelden</u>	104
II.3.2.1. Introductie	104
II.3.2.2. Materiaal en methoden	105
II.3.2.3. Resultaten	105
II.3.2.4. Bespreking	105

Hoofdstuk 4. INVLOED VAN POLY-ONVERZADIGDE VETZUREN OP DE OVERLEVING, GROEI EN MORFOLOGISCHE ONTWIKKELING VAN DE ZEEBAARSLARVEN 111

<u>II.4.1. Analyse van vetzuurmethylesters</u>	111
II.4.1.1. Extractie van vetzuren	111
II.4.1.1.1. De gemodificeerde methode van Bligh en Dyer (1959)	111
II.4.1.1.2. De methode van Folch (1957)	112
II.4.1.2. Gaschromatografische bepaling van vetzuren	113
II.4.1.2.1. Analysetoestellen	113
II.4.1.2.2. Standaarden	114
<u>II.4.2. Natuurlijke vetzuurpatronen in zeebaarslarven</u>	119
II.4.2.1. Doelstellingen	119
II.4.2.2. Materiaal	119
II.4.2.3. Resultaten	120
II.4.2.3. Discussie	120
<u>II.4.3. Invloed van HUFA's op de overleving, groei en morfologische ontwikkeling van de zeebaarslarven</u>	122
II.4.3.1. Doelstellingen	122
II.4.3.2. Materiaal en methoden	123
II.4.3.3. Resultaten	124
II.4.3.4. Bespreking	125
<u>II.4.4. Rondtollende larven</u>	134
II.4.4.1. Introductie	134
II.4.4.2. Materiaal en methoden	135
II.4.4.3. Resultaten	136
II.4.4.4. Bespreking	139

Hoofdstuk V. INVLOED VAN DE LICHTINTENSITEIT OP DE OVERLEVING, GROEI EN DE MORFOLOGISCHE ONTWIKKELING VAN DE ZEEBAARSLARVEN 141

II.5.1. Inleiding	141
II.5.2. Materiaal en methoden	141
II.5.3. Resultaten	142
II.5.4. Algemene bespreking	146

SAMENVATTING	147
--------------	-----

SUMMARY	149
LIJST TABELLEN	151
LIJST FIGUREN	154
REFERENTIES	156

LIJST VAN AFKORTINGEN

ATP	: Adenosine TriFosfaat
C16:0	: Palmitinezuur
C16:1n7	: Palmitoleïnezuur
C18:0	: Stearinezuur
C18:2n6	: Linolzuur
C18:3n3	: Linoleenzuur
C.F.U.	: Colony Forming Units
F.A.B.P.	: Fatty Acids Binding Proteins
F.A.M.E.	: Fatty Acids Methyl Esters
FtdIns	: Fosfatidylinositol
G.S.L.	: Great Salt Lake
H.U.F.A.	: Highly Unsaturated Fatty Acids
K.T.A.	: Kligler Iron Agar
RTG-2	: Rainbow Trout Gonad Type 2
S.F.B.	: San Francisco Bay
T.S.B.	: Tryptic Soy Broth
V.L.D.L.	: Very Low Density Lipoproteins

VOORWOORD

De term "aquacultuur" omvat de kweek van alle in het water levende organismen. Dit behelst zowel de kweek van vissen als van schelpdieren, schaaldieren en fyto- en zoöplanktonorganismen. De teelt van vissen in vijvers vindt zijn oorsprong in China en dateert van ca 2000 voor Christus. In het Britse wetenschappelijke museum te Londen bevindt zich een handleiding voor het kweken van karpers, reeds geschreven in 475 voor Christus. De Romeinen bezaten eveneens vijvers, hoewel dit eerder een decoratief doel had. In de middeleeuwen trof men bij vele kloosters visvijvers aan (vnl. voor karperkweek), die duidelijk een stuk voedselvoorziening tot functie hadden. Dit wordt beschouwd als het begin van de ontwikkeling van de vijvercultuur in Europa (Huet, 1979; Person-le Ruyet en Bediér, 1984).

De totale wereld aquacultuurproductie in 1985 bedroeg 10,56 miljoen ton, waarvan de hoofdbrok (8,9 miljoen ton) geproduceerd werd in Azië. Europa nam "slechts" 0,85 miljoen ton voor zijn rekening. Vierenveertig procent van de totale wereld aquacultuurproductie bestaat uit viskweek, terwijl het procentueel aandeel van de schelpdier- en wierkweek elk 26 % bedraagt. De kweek van schaaldieren is eerder gering (2,5%) maar kent de laatste jaren een explosieve groei.

In Europa is de viskweek sterk geconcentreerd op de teelt van karper- en zalmachtigen, in 1985 elk ca 100.000 ton. De productie van zeebaars (*Dicentrarchus labrax*) en goudbrasem (*Sparus aurata*) in Europa is momenteel nog gering, 6000 ton in 1985. Niettemin verwacht men in 1992 een productie van 27000 ton en nog eens 20000 ton harders (*Mugil cephalus*) (New et al., 1987). De productie van zeebaars, goudbrasem en harder berustte in Zuid-Europa tot dan toe, en gedeeltelijk nog steeds, op de wildvang van pootvissen, die uitgezet worden in ondergestroomde kustgebieden (Italië: "Vallicultuur"). De grote en nog steeds exponentieel stijgende interesse voor maricultuur in de landen van de Middellandse Zee heeft als gevolg dat de vraag naar de betrokken pootvissen niet kan voldaan worden. Volgens een recente FAO-studie (New et al., 1987) zou er in 1992 een behoefte zijn aan 100 miljoen pootvissen. Niettegenstaande er vele larveproductiecentra in aanbouw zijn (bv. Griekenland ca 20, Mace, 1988) verwacht men voor 1992 slechts een productie van 27 miljoen stuks. De vrees bestaat dat de prijzen voor pootvissen binnen enkele jaren uit de pan zullen swingen. Momenteel bedraagt de aankoop prijs van één zeebaars en goudbrasem (ca 2 g) respectievelijk 29 en 37 Bfr. Voor één tarbotpootvisje dient men zelfs 100 Bfr neer te tellen (Huse, pers. mededeling, 1988).

De eerste pogingen om mariene vislarven te kweken, dateren van het eind van de negentiende eeuw. De soorten waar het meest onderzoek rond verricht werd, waren haring (*Clupea harengus*) en pladijs (*Pleuronectes platessa*). In 1878 poogde Meyer reeds haringlarven te kweken waarbij natuurlijke zoöplanktonorganismen als voedsel toegediend werden. Vanaf 1969 werden in Europa de eerste pogingen gestart, om vertrekkende van het bevruchte eistadium, de larven van de zeebaars en goudbrasem op te kweken. Het fundamenteel probleem bij de kweek van mariene

vislarven is de zeer kleine afmetingen van de eieren (tabel 1). De kleine larven ontluiken reeds na enkele dagen en beschikken slechts over geringe dooierreserves. De zeer fragiele larven van de zeebaars starten reeds vijf tot zes dagen na de ontluiking met de voedselopname. De larven nemen echter tijdens de eerste levensstadia uitsluitend bewegende voedseldeeltjes op, waardoor het noodzakelijk is levende zoöplanktonorganismen aan te bieden. De algemeen toegepaste zoöplanktonorganismen vertonen echter deficiënties in poly-onverzadigde vetzuren met nadelige gevolgen voor de larvale ontwikkeling. Het doel van deze studie was de invloed na te gaan van enkele belangrijke factoren zoals de hogere poly-onverzadigde vetzuren en de verlichtingssterkte op de overleving, groei en morfologische ontwikkeling van de zeebaarslarven.

Allereerst werd de kweek van de verschillende zoöplanktonorganismen (*Rotatoria*, *Brachionus plicatilis*; nauplii en metanauplii van *Artemia*) gerealiseerd (deel II.1). Voor de succesvolle kweek van *Rotatoria* was het noodzakelijk ook groenwieren (*Tetraselmis suecica*) te kweken als voedsel voor deze laatste.

Het tweede part (deel II.2) omvat enerzijds de beschrijving van de kweek- en filterinstallaties voor de zeebaarslarven en anderzijds een beschrijving van de fysische en chemische variabelen van het kweekwater toegepast tijdens onze experimenten. Een intrinsieke moeilijkheid tijdens deze experimenten was het gebruik van artificieel zeewater waardoor het noodzakelijk was, uit economische overwegingen, om volledig gesloten recirculatiesystemen te gebruiken. Daar de kleine larven zeer gevoelig zijn voor een verslechtering van de waterkwaliteit, was het noodzakelijk een uitgebreide filterinstallatie uit te bouwen om een optimale waterkwaliteit te handhaven. De bacteriële ontwikkeling werd dan ook kwalitatief en kwantitatief gevolgd.

Het eigenlijk corpus van dit werk start in deel II.3. In dit deel wordt de ontwikkeling van de zwemblaas en de invloed van een niet-geïnflateerde zwemblaas op de groei en overleving van de zeebaarslarven beschreven. Daarnaast wordt aandacht geschonken aan het voorkomen van pathologische afwijkingen.

In deel II.4 wordt de invloed van poly-onverzadigde vetzuren op de overleving, groei en morfologische ontwikkeling van de zeebaarslarven bestudeerd. Tevens wordt het verband nagegaan tussen de aanwezigheid van poly-onverzadigde vetzuren in het dieet en het voorkomen van rondtollend zwemgedrag met de dood als gevolg. Op basis van vetzuurpatronen van wildgevangen zeebaarslarven en dooierzaklarven wordt het belang van deze hogere vetzuren extra onderstreept.

In een laatste stuk (deel II.5) wordt de invloed nagegaan van de verlichtingssterkte op de overleving, groei en de morfologische ontwikkeling van de zeebaarslarven.

DEEL I: LITERATUURSTUDIE

Hoofdstuk 1: KWEEK VAN ZOOPLANKTON

Inleiding

Bij de kweek van de larven van mariene vissen (zeebaars, *Dicentrarchus labrax*; goudbrasem, *Sparus aurata*; tarbot, *Scophthalmus maximus*; tong, *Solea solea*; mahi-mahi, *Coryphaena hippurus*, enz.) start men bij de voeding van de jonge larven met "duur" levend zoöplankton. Pogingen om direct te starten met inert voedsel falen tot op heden (Barnabé, 1984). De larven van de rode zeebrasem (*Chrysophrys major*) en de ayu-vis (*Plecoglossus altivelis*) namen tijdens verschillende experimenten wel voedselkorrels op, doch zonder in staat te zijn deze te verteren vóór de elfde dag na hun ontluiking (Kanazawa *et al.*, 1982). Deze mislukkingen om mariene vislarven vanaf de eerste voedselopname direct te voeden met inert voedsel worden enerzijds toegeschreven aan het feit dat dit voedsel bewegingsloos is, terwijl algemeen aangenomen wordt dat de vislarven aangetrokken worden door de beweging van het zoöplankton (Ponticelli, 1987). Anderzijds zouden de zeer jonge larven niet over de nodige enzymen beschikken in het darmkanaal. De vertering van de levende voedsels zou dan ook eerder te wijten zijn aan specifieke enzymen in de levende prooiën zelf (autolytische proteolyse) (Dabrowski, 1979). Vu (1983) toonde aan dat de enzymeactiviteit in de darmtractus van de zeebaarslarven tijdens de eerste tien levensdagen minimaal is. Dit werd eveneens geconstateerd bij de larven van *Coregonus sp.* (Lauff en Hofer, 1984). Een bijkomend nadeel bij het toedienen van voedselkorrels als eerste voeder is de snelle bezinking, waarbij het op de bodem liggende voedsel ontbindt en leidt tot een daling van de waterkwaliteit. Dit proces wordt extra versterkt doordat de larven in het begin weinig of niets opnemen. Deze vervuiling is katastrofaal in combinatie met de zeer lage waterverversing (5 % van het tankvolume/h) tijdens de eerste twee levensweken van de larven. Daardoor zijn alle larvekweekcentra nog steeds verplicht levend zoöplankton te gebruiken. Dit verplicht gebruik van levend zoöplankton wordt omschreven als één van de hoofdobstakels voor de rentabiliteit van de kweek van mariene vissoorten (Ponticelli, 1987). Deze planktonkweek is bijzonder duur (9% van de totale kosten) vooral omdat men verschillende zoöplanktonorganismen moet kweken waarvan de kweekprocessen stuk voor stuk arbeidsintensief zijn (tabel 2) (Girin, 1979; Brunel, 1987). Bovendien heeft men in vergelijking met inert voedsel hoge investeringskosten, nood aan grote ruimtes en gespecialiseerde mensen voor de afzonderlijke kweken. Een bijkomend probleem is het kweken van levende wieren als voedsel voor de zoöplanktonorganismen, deze wierkweek is delicaat en bijzonder

arbeidsintensief. De productieprijs voor één kg wieren (drooggewicht) wordt dan ook geschat op 200 US \$ (De Pauw et al., 1984).

Mogelijke hulpmethodes zijn het gebruik van buitenvijvers en/of het collecteren van natuurlijk plankton. Het gebruik van externe vijvers voor de kweek van rotiferen wordt in Italië toegepast. Deze vijvers, die normaal voor de kweek van paling en zeebaars gebruikt worden, zijn dikwijls leeg tijdens de wintermaanden (verkoopsperiode van deze vissen). Door het achtereenvolgens enten van deze vijvers met wieren en met rotiferen kan men rotiferenconcentraties verkrijgen tot 80/ml (Ponticelli, 1987). Een andere hulpmethode bestaat erin natuurlijk zoöplankton te collecteren in lagunes via een pomp aangesloten op een planktonnet (Barnabé, 1984; Fanciulli, 1987). Beide systemen hebben echter het nadeel van een niet voorspelbare opbrengst, en bovendien bestaat het gevaar om ectoparasieten en ongewenste bacteriën in de gesloten recirculatiesystemen van de larvekweekcentra binnen te brengen (Flüchter, 1980).

Een efficiëntere en recent ontwikkelde methode om de hoge kosten te drukken, bestaat erin de periode waarin men levend voedsel toedient tot een absoluut minimum te beperken. In Frankrijk is men erin geslaagd om bij zeebaarslarven direkt te starten met *Artemia* nauplii. Daartoe worden de zeebaarslarven de eerste tien dagen in volstrekte duisternis gehouden (Chatain, pers. mededeling, 1988). Toch is men genoodzaakt een rotiferenkweek te onderhouden voor de nog kleinere goudbrasemlarven (tabel 2). Aan de andere kant stellen we vast dat de overgang naar korrelvoedsel steeds meer en meer vervroegd wordt. Traditioneel schakelde men bij zeebaarslarven over naar korrelvoedsel vanaf de vijfenveertigste dag. Recent heeft men in Frankrijk de techniek ontwikkeld om reeds na één maand over te stappen naar korrelvoedsel (Robin, pers. mededeling, 1988). Daarenboven onderzoekt men in Frankrijk de mogelijkheid om "slechts 18 dagen oude" zeebaarslarven over te schakelen op mikrokorrels (150 tot 250 μm), dit met reeds beperkt succes (Person-le Ruyet en Guillaume, 1988).

Tabel 1: Eïdiameter, larvale lengte en gewicht bij de ontluijing van een aantal vissoorten

Soort	Eïdiameter (mm)	Lengte larven (mm)	Natgewicht larven (mg)	Referenties
<i>Salmo salar</i> (Europese zalm)	6	/	200-300	Metailler en Alliot, 1978
<i>Clarias gariepinus</i> (Afrikaanse katvis)	1,2	3,0-4,0	2,3±0,3	Roelants, 1985
<i>Solea solea</i> (tong)	1,4	3,0-3,5 3,3-4,0	0,65	Menu, 1987; Person-le Ruyet en Bedier, 1984
<i>Dicentrarchus labrax</i> (zeebaars)	1,1-1,2	3,4-3,5 3,5	0,1-0,3 0,4	Barnabé en René, 1972 Ronzand, 1972
<i>Sparus aurata</i> (goudbrasem)	0,94±0,05	2,8-3,1 2,5	0,13 0,3	Person-le Ruyet, 1987 Barnabé en René, 1973
<i>Scophthalmus maximus</i> (tarbot)	1,0-1,1 0,9-1,2	2,7-3,0 2,8-3,4	0,15 0,2	Menu, 1987 Person-le Ruyet en Bedier, 1984
<i>Scophthalmus rhombus</i> (griet)	1,2-1,5	3,8	/	Jones, 1972
<i>Pagrus major</i> (Japanse zeebrasem)		2,3		Kitajima, 1987
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> (heilbot)	3,08±0,03	6,4	0,08 (drooggew.)	Blaxter <u>et al.</u> , 1983
<i>Pleuronectes platessa</i> (pladijs)		6,5		Jones, 1972
<i>Engraulis mordax</i> (ansjovis)		3,5-4,3 (bij voedselopname)		Lasker <u>et al.</u> , 1970

Tabel 2: Opeenvolgende voedsels toegediend aan verscheidene gekweekte mariene vislarven (A. zeebaars, *Dicentrarchus labrax*; B. goudbrasem, *Sparus aurata*; C. tarbot, *Scophthalmus maximus*; D. heilbot, *Hippoglossus hippoglossus*; E. tong, *Solea solea*)

A. Voedselketen zeebaars
(Barnabé, 1986)

Dag 0- 5: dooierzakresorptie
Dag 6-12: *Brachionus plicatilis*
Dag 10-20: nauplii *Artemia*
Dag 20-45: metanauplii *Artemia*
Dag 40-50: vervroren *Artemia*,
vervroren visschilfers,
krill, inert voedsel

B. Voedselketen goudbrasem
(Bedier *et al.*, 1984)

Dag 0- 4: dooierzakresorptie
Dag 5-35: *Brachionus plicatilis*
en gistcellen
Dag 15-50: nauplii *Artemia*
Dag 30-55: metanauplii *Artemia*
Dag 35-55: vervroren copepoda
Dag 55-70: vervroren adulte
Artemia en inert
voedsel

C. Voedselketen tarbot
(Menu, 1987)

Dag 0- 3: dooierzakresorptie
Dag 3-11: *Brachionus plicatilis*
Dag 8-20: nauplii *Artemia*
Dag 18-30: metanauplii *Artemia*
Dag 30-50: inert voedsel

D. Voedselketen heilbot
(Mangor-Jensen, 1988)

Dag 0-50: dooierzakresorptie
Dag 51-80: *Brachionus plicatilis*,
Isochrysis galbana,
en nauplii *Artemia*

E. Voedselketen tong
(Person-le Ruyet en Bedier, 1984)

Dag 0- 2: dooierzakresorptie
Dag 2-22: nauplii *Artemia*
Dag 18-32: metanauplii van *Artemia*
Dag 32-40: inert voedsel

Tabel 3: Overzicht van enkele vissoorten waarbij rotiferen toegediend worden als eerste voedsel tijdens de kweek van de larven.

Zeebaars	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Barnabé, 1986
Zeebaars (Azië)	<i>Lates calcarifer</i>	Bagarinao en Kungvankij, 1986
Goudbrasem	<i>Sparus aurata</i>	Tandler en Helps, 1985
Tarbot	<i>Scophthalmus maximus</i>	Alderson en Bromley, 1973
Zwarte tarbot	<i>Scophthalmus maeoticus</i> <i>maeoticus</i>	Spectorova en Doroshev, 1976
Heilbot	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Blaxter <u>et al.</u> , 1983
Griet	<i>Scophthalmus rhombus</i>	Jones, 1972
Pladijs	<i>Pleuronectes platessa</i>	Howell, 1973
Tongschar	<i>Microstomus kitt</i>	Howell, 1973
Japanse zeebrasem	<i>Pagrus major</i>	Fujita, 1979
N.-Am. ansjovis	<i>Engraulis mordax</i>	Theilacker en Master, 1971.
Jap. schijnbot	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Harada, 1970 fide Buyl, 1983
"Milkfish"	<i>Chanos chanos</i>	Segner <u>et al.</u> , 1984
Witte zeebrasem	<i>Mylio berda</i>	Mok, 1985
Harder	<i>Mugil cephalus</i>	Nash <u>et al.</u> , 1977
Haring	<i>Clupea harengus</i>	Droop, 1975 fide Buyl, 1983
Tonijn	<i>Thunnus albacares</i>	Pozuelo, 1975
"Ayu-vis"	<i>Plecoglossus altivelis</i>	Kitajima <u>et al.</u> , 1980
Koi-karper	<i>Cyprinus carpio</i>	Lubzens <u>et al.</u> , 1987

I.1.1. Kweek van de rotifeer (*Brachionus plicatilis*)

I.1.1.1. Inleiding

Een dertigtal jaren geleden werden rotiferen (foto 1) beschouwd als een pest in palingvijvers in Japan, omwille van het feit dat ze grote hoeveelheden fytoplankton consumeerden die nodig waren voor het in stand houden van een homeostatisch ecosysteem (Hirata, 1980). Pas in 1963 stelde Dr. Takashi Ito de geschiktheid van rotiferen vast als voedsel voor de larven van de ayu-vis (*Plecoglossus altivelis*) (Ito, 1963 fide Hirata, 1980). Van dan af werden rotiferen bruikbaar bevonden als eerste voedsel voor een hele reeks vis- en schaaldierlarven (tabel 3). Deze vondst betekende een doorbraak voor de kweek van mariene vislarven. Voor mariene vislarven bleek de euryhalie *Brachionus plicatilis* zeer geschikt, terwijl voor zoetwatervislarven *Brachionus calyciflorus* en *Brachionus rubens* gebruikt worden (Lubzens, 1985).

Aanvankelijk werden de rotiferen geïncubeerd in de natuur. Daar er voor de productie van één vislarve 40 tot 100.000 rotiferen nodig zijn, rekening houdend met de mortaliteiten en verliezen van zowel de rotiferen als de vislarven, diende men zeer snel over te stappen naar massakweek van de raderdieren (Okauchi *et al.*, 1980; Lubzens *et al.*, 1987). De kleine afmetingen en de relatief gemakkelijke kweekbaarheid van *Brachionus plicatilis* hebben geleid tot zijn algemene toepassing. De huidige trend in het onderzoek rond *Brachionus* spitst zich toe op het verkrijgen van duurzame (commercialisatie) en op de cryopreservatie van de rotiferen. Beiden zouden toelaten de rotiferenkweek te elimineren in periodes van non-activiteit in de larvekweekcentra (Lubzens, 1985).

I.1.1.2. Karakterisatie van het raderdier (*Brachionus plicatilis*)

I.1.1.2.1. Systematiek

Volgens Buchsbaum (1969) behoren de raderdieren tot een afzonderlijk phylum. Volgens anderen (Barnes, 1982) worden de rotatoria tot het phylum van de Aschelminthes gerekend. Voor de klassificatie werd de systematische indeling van Sharma (1979) gevolgd.

Phylum	: Aschelminthes
Subphylum	: Trochelminthes
Klasse	: Rotatoria of Rotifera
Subklasse	: Eurotatoria (Bartos, 1959)
Superorde	: Monogononta (Wesenberg - Lund, 1889)

Orde	: Ploimida (Delage, 1897)
Familie	: Brachionidae (Hudson en Gosse, 1888)
Genus	: <i>Brachionus</i>
Species	: <i>Brachionus plicatilis</i> Müller, 1786

I.1.1.2.2. Afmetingen

Brachionus vermenigvuldigt zich onder ideale omstandigheden parthenogenetisch door het afzetten van één tot twee grote eieren (80 tot 100 μm diameter) die direkt ontluiken en amiktische wijfjes voortbrengen. Sexuele vermenigvuldiging komt slechts voor bij niet-ideale omstandigheden, en in die situatie vinden we de kleine (100 tot 200 μm) mannelijke rotiferen. De in het vervolg vermelde afmetingen van rotiferen hebben steeds betrekking op de amiktische wijfjes en de afmetingen verwijzen altijd naar de lengte van de lorica of het pantser (een verdikte chitineuze cuticula) (Buyl, 1983).

De loricalengte van de meeste rassen van *Brachionus plicatilis* varieert tussen 130 tot 320 μm , afhankelijk van het ras (Lubzens, 1985). De grootste specimens ooit gevonden waren afkomstig van het Colongulac-meer in Australië (440 μm). Hino en Hirano (1984a) vermelden het voorkomen van twee variëteiten van *Brachionus plicatilis*, namelijk var. *spatiosus* Rousselet (lange type) en var. *rotundiformis* Tschugunov (brede type). De lorica-lengte van variëteit *spatiosus* is 1,5 tot 2 maal groter dan die van *rotundiformis*. In de piscicultuur wordt meestal het lange type gebruikt. Voor de kweek van de zeer kleine larven van zeebrasem tracht men ofwel kleine rassen te selecteren ofwel de grootte van een bepaald ras te beïnvloeden door het wijzigen van de kweekomstandigheden. De laatste methode zou slechts in beperkte mate de lengte beïnvloeden. Hogere kweektemperaturen resulteren in kleinere raderdiertjes (King en Miracle, 1980). De invloed van het voedselregime is beperkt. Men vond in verschillende studies slechts 4,5 % verschil in loricalengte tussen rotiferen gevoed met bakkersgist en omega-gist (Fukusho en Iwamoto, 1981), maximum 13 % bij voeding met verschillende wiersoorten (Yufera, 1982) en maximum 15 % bij voeding met gisten of wieren (Snell en Carrillo, 1984). Hogere saliniteiten zouden algemeen leiden tot kleinere rotiferen, hoewel het effect ook hier maximaal 11 % bedroeg bij verhoging van de saliniteit van 10 naar 30 pro mille bij 23 °C (Snell en Carrillo, 1984). De lengte van rotiferen is dan ook hoofdzakelijk genetisch bepaald, en slechts in beperkte mate beïnvloedbaar door de kweekomstandigheden.

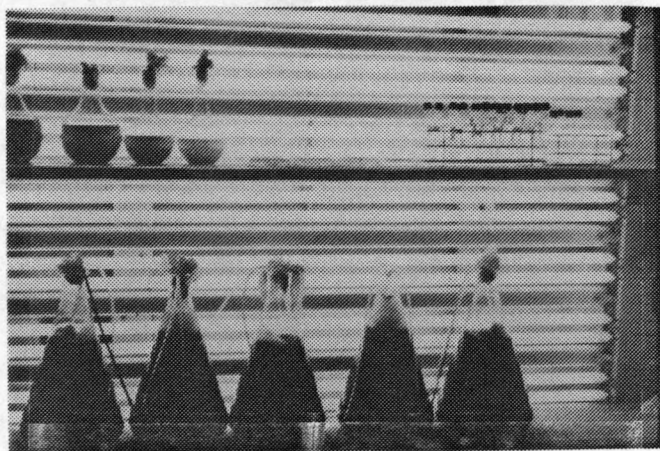
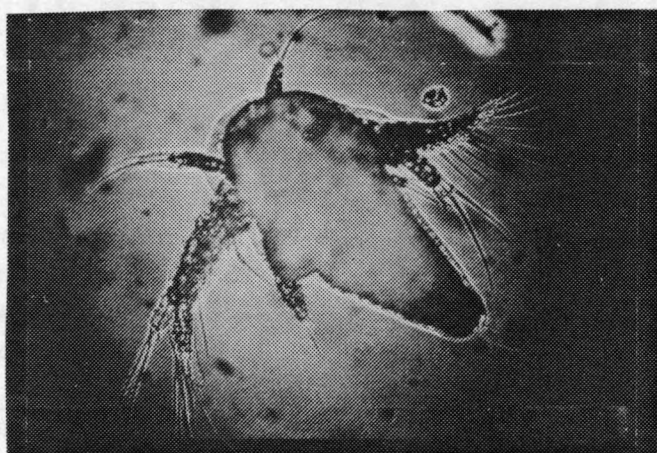
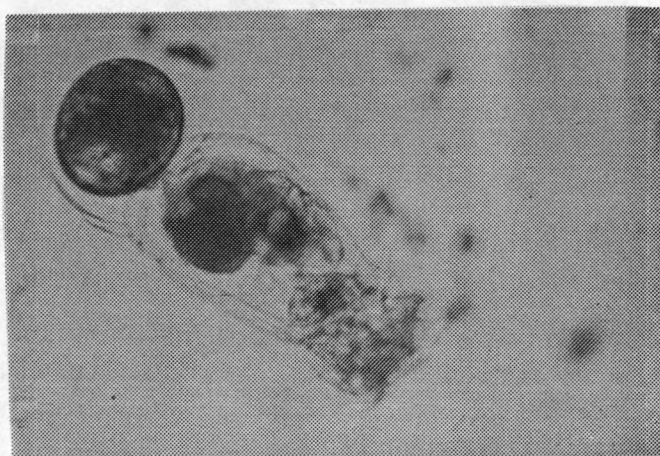


Foto 1: Amiktisch wijfje van Brachionus plicatilis
met zomerei

Foto 2: Nauplii van Artemia

Foto 3: Opstelling wierkweek

I.1.1.2.3. Invloed van de temperatuur en de saliniteit op de vermenigvuldiging van *Brachionus plicatilis*

I.1.1.2.3.1. Temperatuursinvloed

De cosmopolitische verspreiding van *Brachionus plicatilis* wijst reeds op een vermoedelijk ruime temperatuurstolerantie. *Brachionus* is een eurytherme rotifeer met een tolerantiegebied tussen 5 en 35 °C (Buyle, 1983). De optimale temperatuur bedraagt 20 tot 30 °C, variërend volgens het ras (Snell en Carrillo, 1984). Hirayama en Kusano (1972) adviseren 25 °C voor een optimale reproductie. Bij deze hoge temperatuur verkort de duur van de verschillende ontwikkelingsstadia, zoals o.a. de ei-ontwikkelingstijd, de tijd tussen twee eiafzettingen. Bij temperaturen lager dan 25 °C noteerden Hino en Hirano (1984b) een toenemende seksuele reproductiewijze t.o.v. de amiktische voortplanting.

De temperatuur beïnvloedt heel sterk de biochemische compositie van de rotiferen (Scott en Baynes, 1978). Bij 18 °C verteren de *Brachionus* hun voedsel langzaam en behouden op die manier over een langere tijd hun vet- en koolhydratenspiegels. Bij 28 °C wordt het voedsel snel verteerd en de verhoogde vet- en koolhydratenspiegels dalen eveneens zeer snel. Recent bestudeerden Olsen *et al.* (1987) de kinetika van de verandering van de vetzuurconcentraties in rotiferen bij dieetveranderingen en hongerperiodes bij verschillende temperaturen. Na een korte aanrijksperiode van 4 uur met poly-onverzadigde vetzuren werden de rotiferen gestockeerd bij 7 °C. De onderzoekers constateerden dat tijdens de volgende drie dagen de vetzuurconcentratie toenam en daarna twee dagen constant bleef. Bij stockage op 16 °C na een aanrijksperiode daalde de concentratie aan poly-onverzadigde vetzuren slechts 20 % over 2 dagen. De kennis van de invloed van de temperatuur op de biochemische samenstelling van de rotiferen zal vermoedelijk een zeer handig instrument worden voor een meer economische toepassing van de rotiferen in de larvekweekcentra. Een interessante toepassing voor de larvekweekcentra is de mogelijkheid om rotiferen te stockeren bij lage temperaturen (4 °C) voor een periode tot 22 dagen bij densiteiten van 2000 per ml, zonder noemenswaardige afsterving van de cultuur (Lubzens, 1985). Deze stockkulturen kunnen achter de hand gehouden worden voor eventuele noodgevallen, zoals bij plotse instortingen van de rotiferenkulturen.

I.1.1.2.3.2. Saliniteitsinvloed

Brachionus plicatilis wordt aangetroffen in waters met een uiteenlopend zoutgehalte. *Brachionus* is euryhalien en verdraagt saliniteiten van 1 tot 97 g/l (Ito, 1960). Verschillende studies toonden aan dat lagere zoutgehaltes geprefereerd worden; men vindt namelijk de snelste reproductie tussen 6,3 en 20 pro mille (Ito, 1960) en volgens Ruttner-Kolisko (1972) bij 17 pro mille. De saliniteit zou

bovendien in hoge mate de wijze van reproductie beïnvloeden. In een studie van Lubzens *et al.* (1985) werd aangetoond dat bij lage saliniteit (4 tot 20 pro mille) er veelvuldig mixis optrad (tot 80 %), terwijl deze mixis niet voorkwam bij saliniteiten hoger dan 35 pro mille. Bij de kweek van rotiferen bij een saliniteit van 20 pro mille kunnen ze zowel voor zoetwater als voor mariene vislarven aangewend worden, op voorwaarde dat men ze één dag voor het toedienen aan de vislarven in respektievelijk 10 en 30 pro mille brengt.

I.1.1.2.4. Invloed van de waterkwaliteit op de vermenigvuldiging van *Brachionus plicatilis*

Zeer weinig onderzoek is op dit moment verricht over de invloed van de concentratie aan stikstofhoudende verbindingen (ammoniak, nitriet, nitraat) op de reproductie van *Brachionus plicatilis*. Nochtans is het bekend dat rotiferen meer dan 10 maal per dag hun lichaamsgewicht aan faeces uitscheiden, wat aanleiding geeft tot hoge concentraties stikstofhoudende verbindingen in het kweekwater (Hirata, 1974). Volgens Lincoln *et al.* (1983) zou de reproductie van *Brachionus rubens* sterk dalen vanaf 17 mg/l totale ammoniak (NH_4^+ -N). Ook andere onderzoekers stelden tijdens de kweek van *Brachionus* bij hoge concentraties aan totale ammoniak (40-50 ppm) dalingen van de reproductie vast (Furukawa en Hidaka, 1973 fide Lubzens, 1985; Hirata *et al.*, 1983). Schluter en Groeneweg (1985) toonden aan dat *Brachionus rubens* binnen de twee dagen afstierf indien de totale ammoniakconcentratie boven 5 mg/l steeg.

Over de invloed van nitriet zijn er nog minder gegevens voorhanden. Schluter en Groeneweg (1981) vonden geen reproductiedalingen van *Brachionus rubens* bij nitrietwaarden variërend tussen 10 en 20 ppm. In onze rotifeerkulturen op het laboratorium werden nitrietwaarden genoteerd van 15 tot 20 ppm zonder ineenstorting van onze rotiferenkweek, zelfs niet over meerdere weken. Volgens Lubzens (1985) zou deze hoge tolerantie te wijten zijn aan adaptatie.

I.1.1.3. Voedingsbiologie

Naast het feit dat *Brachionus plicatilis* euryhalien en eurytherm is, is vooral de niet-selektieve voedselopname een interessante eigenschap voor de massakweek. De voedingswijze is obligaat fagotroof, m.a.w. particulier gesuspendeerd organisch materiaal wordt opgenomen en extracellulair verteerd (Buyl, 1983). De raderdierjes filteren het water d.m.v. een raderorgaan. Alhoewel het voedselregime sterk uiteenlopend kan zijn (polyfage filtreerder), heeft de aard en de grootte van het voedsel toch een duidelijke invloed op de opname. Hino en Hirano (1984a) toonden een positieve relatie aan tussen de maximum afmetingen van de opgenomen voedselpartikels en de loricalengte, en een lage korrelatie tussen de minimum afmetingen van de opgenomen voedselpartikels en de loricalengte. Hirayama *et al.* (1979) vonden dat de opnamesnelheid voor bepaalde wieren groter was dan voor andere. Niettegenstaande deze

verschillende opnamesnelheden, toonden andere onderzoekers aan dat *Brachionus plicatilis* niet in staat is één bepaald wier te selecteren uit een mengsel van verschillende wiersoorten (Chotyaputta en Hirayama, 1978).

Aanvankelijk werden rotiferen uitsluitend gekweekt op basis van verschillende levende of gedroogde wieren, alhoewel de produktie van deze wieren duur en arbeidsintensief is. De vinding van Hirata en Mori (1967, fide Buyl 1983) om rotiferen te kweken op basis van gisten betekende een belangrijke stap voorwaarts in het gebruik van *Brachionus plicatilis* als eerste voedsel voor vis- en schaaldierlarven. Het gebruik van gist als voedsel laat toe om de raderdiertjes op een veel goedkopere basis te kweken. Gisten zijn namelijk goedkoop, gemakkelijk verkrijgbaar en laten toe om de wierkweek sterk te reduceren (Requera *et al.*, 1982). Het gebruik van gisten voor de kweek van *Brachionus* heeft twee nadelen. Ten eerste zijn gisten deficiënt voor vitamine B₁₂ en cysteïne, die beide essentieel zijn voor de rotiferenreproductie, wat vermoedelijk de reproductiedaling van de rotiferen gevoed met gisten verklaart (Hirayama en Yu, 1985; Lubzens, 1985). Ten tweede zijn de rotiferen, gevoed met gisten, deficiënt voor poly-onverzadigde vetzuren (HUFA's, Highly Unsaturated Fatty Acids), wat belangrijke consequenties heeft voor hun voedselwaarde voor mariene vislarven (zie hoofdstuk IV).

I.1.2 Produktie van nauplii en metanauplii van *Artemia*.

I.1.2.1. Inleiding.

Naarmate de larven van vissen groeien, is het aan te bevelen grotere prooidieren toe te dienen. Op die manier hoeven de larven minder prooidieren te vangen en op te nemen om te voldoen aan hun energiebehoefte, wat aldus energie bespaart (Sorgeloos en Persoone, 1975). In 1971 maakte May een lijst van een vijftigtal verschillende voedselorganismen (veligerlarven van Gastropoda, trochophoor larven van Bivalvia, larven van Echinoidea, Crustacea, Nematoda...) die allen uitgetest waren als voedsel voor zoet- en zoutwatervislarven. Daaruit trad *Artemia* (het pekelkreeftje) naar voor als een hoogwaardig voedsel voor een groot aantal vissoorten. Kinne (1977) stelde dat meer dan 85 % van de mariene dieren gekweekt worden op basis van *Artemia*, uitsluitend of te samen met andere prooidieren. Reeds in 1933 beschreef Seale *Artemia* als een uitstekend voedsel. De wereldwijde toepassing van *Artemia* is te verklaren door de combinatie van een groot aantal interessante kenmerken die dikwijls bij andere voedselorganismen ontbreken. De nauplii van *Artemia* (foto 2) hebben een grootte van 428 tot 517 μm afhankelijk van het ras (Vanhaeke en Sorgeloos, 1980) waardoor ze voor de meeste gekweekte vis- en Decapoda- soorten rechtstreeks opneembaar zijn. Voor vele mariene vislarven zijn deze nauplii te groot als eerste

voedsel en start men met rotiferen. Na enkele dagen kan men dan overschakelen naar nauplii van *Artemia*. Daar de lengte van de kleinste *Artemia*-rassen (SFB) relatief weinig verschilt van de lengte van de grotere *Brachionus*-rassen ($\pm 100 \mu\text{m}$), stelt de geleidelijke overgang naar nauplii van *Artemia* weinig problemen. De nauplii van *Artemia* worden gemakkelijk opgenomen en verteerd door de vislarven, en hebben een hoge nutritionele waarde voor de meeste vissoorten. De levende nauplii van *Artemia* kunnen bovendien gemakkelijk bij hoge densiteiten en bij lage temperaturen (4°C) gestockeerd worden (Léger *et al.*, 1986). Alhoewel deze aspecten bijzonder interessant zijn, is de wereldwijde en algemene toepassing van *Artemia* vooral te verklaren door zijn beschikbaarheid in de vorm van cysten of duureieren (Léger *et al.*, 1986). Deze cysten hebben het voordeel gemakkelijk stockeerbaar te zijn, en zijn gemakkelijk "om te toveren" in levende nauplii (Sorgeloos *et al.*, 1987). De wereldvraag naar cysten bedroeg in 1985 80 tot 95 ton (aan ± 50 U.S. dollar per kg) en wordt geschat op 150 tot 170 ton in 1990 (Lai en Lavens, 1985 fide Léger *et al.*, 1986). Door de cosmopolitische verspreiding van *Artemia* (meer dan 100 geografische populaties over 5 continenten) beschikken vele landen over eigen voorraden *Artemia*.

Naast de nauplii bieden ook de oudere stadia en de adulte *Artemia* interessante perspectieven. Oudere stadia van *Artemia* worden toegediend aan grotere vislarven ter vergemakkelijking van de overgang levend voedsel-inert voedsel, "weaning", en aan adulte garnalen ter verhoging van de maturatie (Sorgeloos, 1978; Lavens *et al.*, 1985).

Nadelen van het gebruik van *Artemia* zijn de hoge kostprijs, en de vele verschillende geografische populaties elk met hun eigen specifieke nutritionele samenstelling. Zoals vroeger gesteld, probeert men het gebruik van de dure *Artemia* sterk te beperken.

I.1.2.2. Systematiek

Voor de systematiek werd de indeling van Barnes (1982) gevolgd.

Phylum	: Arthropoda
Subphylum	: Crustacea
Klasse	: Branchiopoda
Orde	: Anostraca
Genus	: <i>Artemia</i>

Tot op het einde der 19de eeuw werden aan de *Artemia*-populaties van diverse geografische oorsprong verschillende speciesnamen gegeven. Vanaf 1941 werden echter alle beschreven soorten gehergroepeerd onder *Artemia salina* Linnaeus, 1758. Uit verder onderzoek bleek dat verscheidene populaties reproductief geïsoleerd zijn, waaruit gekonkludeerd werd dat het genus *Artemia* bestaat uit een aantal "sibling species" (morfologisch zeer gelijkende of identische

populaties waartussen een reproductieve barrière bestaat) (Sorgeloos, 1979). Wegens deze complexiteit werd overeengekomen - tot nadere opheldering - alleen de genusnaam te gebruiken in geval het correcte sibilingspecies niet bekend is (Persoone et al., 1980).

I.1.2.3. Produktie van de nauplii van *Artemia*.

I.1.2.3.1. Verschillen tussen de populaties van verschillende geografische oorsprong.

Voor de viskweker is de keuze van een *Artemia*-ras (geschikte nutritionele samenstelling) niet alleen bijzonder moeilijk maar ook zeer belangrijk. Verschillende studies (Sorgeloos, 1979; Vanhaecke en Sorgeloos, 1980; Vanhaecke en Sorgeloos, 1983) hebben grote verschillen aangetoond tussen de populaties van verschillende geografische rassen wat betreft de afmetingen van de cysten en de nauplii van *Artemia*, de nutritionele samenstelling, het ontluikingsrendement, de energie-inhoud en het drooggewicht (tabel 4). De nutritionele samenstelling zou zelfs verschillen tussen de oogsten van éénzelfde geografische populatie.

De verschillen in afmetingen van de nauplii (San Francisco Bay, 428 μm ; Margharita di Savoia, 517 μm) kunnen bepalend zijn voor het succes van de larvekweek, daar de predatoren soms grotere nauplii niet kunnen opnemen. Anderszijds hebben grotere nauplii een grotere individuele energie-inhoud (San Francisco Bay, 0,036 J, Margharita di Savoia, 0,0725 J) (Vanhaecke et al., 1983). Vanhaecke et al. (1983) concludeerden dan ook terecht dat wanneer de afmetingen en de nutritionele samenstelling aanvaardbaar zijn voor de predator, men best het *Artemia*-ras kiest met de hoogste energie-inhoud per larve. Dit resulteert in een betere groei van de predator. Nutritionele verschillen tussen de verschillende *Artemia*- populaties situëren zich op het vlak van de minerale samenstelling, de procentuele verdeling van proteïnen, lipiden en carbohydraten, het vetzuurpatroon en de aanwezigheid van zware metalen en pesticiden (Léger et al., 1986). De aminozuursamenstelling van *Artemia* afkomstig van verschillende geografische oorsprong is evenwel zeer gelijkend. Siedel et al. (1980) vonden weinig verschillen bij analyse van de aminozuursamenstelling van 5 rassen.

Vooral de verschillen in vetzuurpatronen zijn van wezenlijk belang voor de viskweker, daar de specifieke vetzuurbehoefte mede bepaald wordt door het feit of de predatoren voorkomen in zoet- of zoutwater. Grote verschillen werden aangetroffen tussen geografische populaties van *Artemia*, waarbij Watanabe et al. (1978) *Artemia* indeelden in een groep geschikt voor zoetwaterorganismen (hoge 18:3n3, lage 20:5n3) en een groep goed voor mariene organismen (lage 18:3n3,

Tabel 4: Ontluikingskarakteristieken van cysten en biometrische gegevens over nauplii van *Artemia* afkomstig van verschillende geografische plaatsen (naar: Vanhaecke, 1983).

Herkomst Cysten	Ontluikings- percentage (%)	Ontluikings- efficiëntie (nauplii/ g cysten)	Ontluikings- opbrengst (μ g biomassa/ g cysten)	Nauplius drooggew. (μ g)	Nauplius lengte (μ m)	Ontluikings- tijd (h)		
						T ₀	T ₉₀	T ₉₀ -T ₀
San Francisco Bay (2596, U.S.A)	71,4	267.200	435,5	1,63	428	15,0	20,5	5,5
San Francisco (2016, U.S.A.)	-	249.600	-	-	-	25,8	37,8	12,0
San Pablo Bay (1628, U.S.A.)	84,3	259.200	497,7	1,92	433	13,9	20,1	6,2
Great Salt Lake (U.S.A.)	43,9	106.000	256,5	2,42	486	14,1	21,7	7,6
Refence <i>Artemia</i> Cysts	45,7	211.000	375,6	1,78	448	18,0	32,2	14,2
Lavalduc (Frankrijk)	75,8	182.400	561,8	3,08	509	19,5	30,5	11,0
Tsientin (China)	73,5	129.600	400,5	3,09	515	16,0	27,2	11,2

(T₉₀: tijdstip waarop 90% van de nauplii ontloken zijn; T₀: tijdstip waarop de eerste nauplii ontluiken)

hoge 20:5n3) (zie verder). De viskweker dient aldus bij de selectie van een *Artemia* ras vooral volgende specificaties te bepalen: afmetingen van de nauplii, nutritionele waarde en de prijs.

I.1.2.3.2. Ontluiking van de nauplii.

Het wereldwijd gebruik van *Artemia* voor aquacultuur is deels te wijten aan het gemakkelijk produceren van de nauplii. Men hoeft inderdaad enkel een kleine hoeveelheid cysten in zout water te brengen en 18 tot 30 uur later ontluiken de Instar I larven of nauplii. Een maximaal ontluikingsvermogen (totale produktie biomassa nauplii uitgedrukt in mg per gram cysten) verkrijgt men slechts onder zeer specifieke omstandigheden die bovendien rasafhankelijk zijn. Aanvankelijk werd gebruik gemaakt van containers met een platte bodem, met als groot nadeel de zeer sterke beluchting noodzakelijk om de cysten in suspensie te houden (Sorgeloos *et al.*, 1975). Daarenboven gebeurde de incubatie dikwijls met weinig of geen belichting. Sorgeloos en Persoone (1975) toonden aan dat de ontluikingsefficiëntie (aantal nauplii per gram cysten) verhoogt met 30 tot 40 % indien de cysten kort na de hydratatie belicht werden. In verschillende studies werden de optimale condities vastgelegd voor een maximale ontluikingsefficiëntie (Sorgeloos *et al.*, 1975; Sorgeloos en Persoone, 1975; Sorgeloos, 1979; Sorgeloos *et al.*, 1982; Vanhaecke en Sorgeloos, 1983; Lavens *et al.*, 1986).

- Gebruik van konische recipiënten met aëratie vanuit de punt van de kone om alle cysten in suspensie te houden.
- Maximale cystendensiteit: 7 g/l.
- Lage saliniteit: 5 pro mille (deze saliniteit geeft betere ontluikingsrendementen en hogere energie-inhoud)
- pH hoger dan 8 (toevoegen van 1 g NaHCO_3 per liter incubatievolume).
- Temperatuur: 28 tot 30 °C.
- Zuurstof minimaal 2 mg/l (aëratiersterkte: 20 l/min voor een tank van 75 liter).
- Continue belichting van de cysten (2000 lux).
- Oogsten van de nauplii op het moment dat 90 % van de nauplii ontloken zijn.

I.1.2.3.3. Koude bewaring van nauplii

Eenmaal nauplii van *Artemia* ontloken zijn, verbruiken ze zeer snel hun dooierreserves, waardoor hun energie-inhoud snel daalt. Léger *et al.* (1983) toonden aan dat 90 % van de nauplii, met uitzondering van de rassen Chaplin Lake (Canada) en Buenos Aires (Argentinië), in leven bleven na 48 uur bewaring bij 4 °C en bij voldoende aëratie. Het terug overbrengen naar de kweektankcondities (25 °C) had geen mortaliteit tot gevolg. Maximale stockage- densiteiten zouden 15 miljoen nauplii per liter bedragen (Sorgeloos *et al.*, 1983). Tijdens de stockage op 4 °C

blijven de nauplii in het Instar I stadium en vertonen over die periode slechts minimale energie verliezen en een geringe lengte toename (slechts 5,4 % over 48 uur) (Léger et al., 1986). De koud gestockeerde nauplii zouden zich bovendien aanzienlijk trager voortbewegen bij het inbrengen in de predatortanks, wat een gemakkelijker captatie toelaat (Lavens et al., 1986). Deze koudestocking betekent een belangrijke arbeidsbesparing bij het veelvuldig voederen van de vislarven over één dag, daar men slechts éénmaal per dag nauplii moet oogsten.

I.1.2.3.4. Decapsulatie van *Artemia*-cysten

Na ontluking van de duureieren of cysten vinden we in het ontlukingsmedium enerzijds levende nauplii en anderszijds niet-ontloken cysten en schaalresten. Daar deze schaalresten en cysten, wanneer opgenomen, darmobstructies veroorzaken bij larven van mariene vissen, met de dood als gevolg, is het noodzakelijk om een 100 % scheiding te verkrijgen tussen de nauplii en het inert materiaal. Hoewel nauplii positief fototactisch zijn, is een scheiding op basis van het licht praktisch niet haalbaar omdat het een langdurig proces betreft en een onvoldoende scheiding oplevert. Een uitstekende methode is de decapsulatietechniek waarbij het chorion van de cysten volledig opgelost wordt in een hypochlorietoplossing. De embryos zijn na de decapsulatie slechts omgeven door een elastische embryonale kutikula, bestaande uit een interne kuticulair membraan en een fibrillaire laag, en een uitwendige kutikulaire membraan (Sorgeloos, 1979).

Deze methode werd aanvankelijk gebruikt voor het steriliseren van *Artemia* cysten ter voorkoming van bacteriële infecties (Nakanishi et al., 1962 fide Léger et al., 1986). Deze techniek werd later uitgebreid tot een volledige decapsulatie (Slobin en Moller, 1976). De routineprocedure voor toepassing in de aquakultuur werd evenwel uitgewerkt en beschreven door Sorgeloos et al. (1977) en verbeterd door Bruggeman et al. (1977).

De decapsulatietechniek van de cysten verloopt in een serie van opeenvolgende stappen (Sorgeloos et al., 1983).

Cyst-hydratatie. Voor de volledige verwijdering van het chorion is het nodig dat de cysten een sferische vorm hebben. Dit wordt verkregen door de cysten twee uren in zoetwater te brengen.

Decapsulatie. De eigenlijke decapsulatie gebeurt door de gehydrateerde cysten in een oplossing van NaOCl te brengen. Per gram cysten bestaat de oplossing uit:

- 0,5 g actief NaOCl,
- 14 ml totale oplossing (35 pro mille zoutwater),
- 0,33 ml NaOH (40 % oplossing).

Het decapsulatieproces duurt 5 tot 7 minuten, waarbij men de kleurverandering van bruin naar oranje neemt als eindpunt. Tijdens de decapsulatie mag de temperatuur de 40°C niet overschrijden.

Wassen en desactivatie. Onmiddellijk na het oplossen van het chorion worden de gedecapsuleerde cysten gespoeld met leidingwater en gedurende dertig seconden in een bad van 0,1 N HCl gebracht voor het volledig desactiveren van eventuele chloorresten en daarna verder gespoeld (10 min).

Bewaring. Na de decapsulatie worden de cysten ofwel direct gebruikt ofwel gedehydrateerd in verzadigde pekkel ter bewaring.

De toepassing van de decapsulatietechniek heeft als belangrijkste voordeel een perfecte scheiding van de nauplii van de cysten en lege schalen, dit in tegenstelling met de scheidingstechniek op basis van fototaxie. De extra tijd die men dient te spenderen aan het decapsuleren van de cysten, wordt ruim teruggewonnen door de tijdwinst bij de snelle en eenvoudige scheiding van de nauplii van het débris. Daarenboven geven gedecapsuleerde cysten van bepaalde geografische oorsprong (Buenos Aires, Argentinië, Galera-Zamba, Colombia) betere ontlukingsrendementen, wat mogelijk verklaard kan worden door het feit dat embryo's in gedecapsuleerde cysten minder energie moeten gebruiken om tot het "breaking-stadium" te komen in vergelijking met niet-behandelde cysten (Sorgeloos, 1979). Een ander belangrijk voorbeeld is de desinfectie van de cysten tijdens het decapsulatieproces. Cysten afkomstig van vreemde plaatsen bevatten dikwijls schadelijke bacteriën en eventuele andere contaminanten (wieren) die de gesloten recirculatiesystemen van de vislarven kunnen besmetten. Door de decapsulatie worden deze contaminanten gedood. Bij Decapoda kunnen gedecapsuleerde cysten rechtstreeks als voedsel gebruikt worden, terwijl dit bij vislarven sterk afhankelijk is van de soort. Zo groeien larven van "milkfish" (*Chanos chanos*) en karper (*Cyprinus carpio*) zeer goed uitsluitend op basis van gedecapsuleerde cysten, terwijl dit bij tonglarven minder goede resultaten oplevert (Sorgeloos, 1979; Lavens *et al.*, 1986).

I.1.2.4. Productie van *Artemia* metanauplii en aanrijking of bio-incapsulatie.

Tijdens het eerste larvale stadium (Instar I of nauplii) is het spijsverteringskanaal niet functioneel en de nauplii consumeren tijdens die periode hun dooiervoorraad. Achttien tot vierentwintig uur later, afhankelijk van de temperatuur, treedt een eerste vervelling op (Instar II of metanauplii) en start de voedselopname (Sorgeloos, 1979). In deze tijdspanne neemt de lengte toe tot 610 à 720 μm (Vanhaecke, 1983).

Deze grotere dooierloze metanauplii bieden de mogelijkheid tot aanrijking (bio-incapsulatie). Deze aanrijking is een effectief hulpmiddel in het verhogen van de nutritionele waarde van *Artemia* waarbij het de mogelijkheden biedt om selectief bepaalde nutriënten (poly-onverzadigde vetzuren, mineralen, vitaminen) en eventueel antibiotica aan de vislarven toe te dienen. Daarenboven verhoogt deze aanrijking de energieinhoud van de metanauplii, wat een compensatie inhoudt voor de afwezigheid van het dooiermateriaal. De hoofdreden voor de algemene toepassing van de aanrijking is vooral de verhoging van de C20:5n3 en C22:6n3 (poly-onverzadigde vetzuren, essentieel voor de meeste zeevissen, zie hoofdstuk 4). De aanrijkingsprocedure bestaat hierin dat

men 12 tot 24 uur voor het toedienen van de metanauplii aan de predatoren, de metanauplii in een milieu brengt met een hoge concentratie aan wieren, gisten, micro-geincapsuleerde diëten of emulsies. Tijdens het verblijf van de metanauplii in dit voedselrijk milieu, nemen ze de voedselpartikels op. Twaalf tot vierentwintig uur later heeft men dan metanauplii waarvan de volledige darmtractus volgestouwd is met deze voedseldeeltjes (bio-incapsulatie). Dit resulteert in een extra en meer geschikte voedselbron voor de predatoren.

De laatste decennia werden er verschillende aanrijkmethode ontwikkeld:

- de Britse techniek op basis van levende wieren,
- de Japanse techniek op basis van omega-gist of emulsies,
- de Franse techniek met samengestelde diëten, en
- de Belgische techniek met zelf-emulgerende concentraten (Léger *et al.*, 1986).

Hoofdstuk 2: KWEEK VAN DE LARVALE STADIA VAN DE ZEEBAARS (*DICENTRARCHUS LABRAX*)

I.2.1. Inleiding

De eerste pogingen om de larvale stadia van zeebaars (*Dicentrarchus labrax*) en goudbrasem (*Sparus aurata*) te kweken, vertrekkend van het bevruchte eistadium situeren zich rond 1969-1970. De maximale overlevingstijd voor zeebaarslarven bedroeg in 1969 slechts 17 dagen, en in 1971 zelfs maar 13 dagen (Barnabé en René, 1972; Barnabé, 1974). In 1971 slaagde men erin vertrekkende van 30.000 bevruchte eieren een 300-tal goudbrasemlarven op te kweken tot aan het metamorfosestadium (Barnabé en René, 1973). Een eerste doorbraak vond plaats in het biologisch station te Sète (Frankrijk) tijdens de winter 1971-1972, toen werden 12.000 zeebaarslarven opgekweekt tot een lengte van 5 cm (Barnabé, 1974). De kweekomstandigheden toegepast in deze experimenten (weergegeven in tabel 5) werden door de meeste onderzoeksgroepen met slechts beperkte wijzigingen overgenomen tot in 1982. In de periode 1972-1982 werden reeds enkele honderdduizenden zeebaarslarven geproduceerd voornamelijk in Frankrijk en Italië (Coves, 1985b). Niettemin was de productie onzeker en onregelmatig met overlevingscijfers variërend tussen 0 en 40 % op dag 50. De techniek werd toegepast in grote tanks waarbij zeer grote aantallen larven nodig waren om een zeker produktieniveau te halen. De startdensiteit van de larven was meestal laag (20 larven per liter). Tijdens de eerste twintig dagen van de larvekweek creëerde men een fytoplanktonbloom (de "Groenwater-techniek"), waarbij de tanks sterk en continu belicht werden (2000-5000 lux op het wateroppervlak). Vanaf de twintigste dag werd waterverversing toegepast.

Vanaf 1984 werd de nadruk gelegd op de verbetering van de waterkwaliteit. Daartoe werd het water in de larvetanks reeds vanaf de eerste dag ververst. In dit systeem werden geen wieren toegediend en de verlichtingsterkte werd verminderd (1000 tot 1500 lux). Bovendien werd ook een natuurlijke fotoperiode (9-12 L/ 15-12 D) toegepast. Op basis van deze principes werden de larven ofwel op een intensieve manier gekweekt (tanks van 2 m³ met hoge densiteit aan larven, 100 larven/liter) ofwel op een semi-intensieve manier (grote tanks 10 m³, met een lage larvedensiteit, 10-25 larven/liter). De toepassing van deze methode leidde tot sterk verhoogde overlevingscijfers (45-60% op dag 50). Bovendien stelde men vast dat bepaalde afwijkingen zoals rondtollen, lordosis, ontbreken van een functionele zwemblaas, operculumafwijkingen, in verminderde mate voorkwamen; toch wisselden de resultaten sterk van experiment tot experiment (Coves 1985a, b).

In wat volgt worden eerst enkele ecologische aspecten van de zeebaars belicht, waarna een gedetailleerd overzicht gegeven wordt van alle facetten die belangrijk zijn voor de overleving en een goede morfologische ontwikkeling van mariene vislarven, in het bijzonder van de zeebaars.

Tabel 5: Overzicht van de kweekomstandigheden toegepast bij de eerste succesvolle produktie van zeebaarslarven:

A. Ei-incubatie

B. Larvekweek (Barnabé, 1974)

A. Ei-incubatie:

- techniek: "groenwater"
- licht: continu
- aëratie: geen
- saliniteit: 35 pro mille
- temperatuur: 13-16°C
- zuurstof: 5-9 ppm
- pH: 7,5-8,5
- nitriet: < 1mg/l

B. Larvekweek:

- temperatuur: - dag 1-10: 14-16°C
 - dag 10-30: 16-18°C
 - dag 30-90: 17-20°C
- saliniteit: 25-38 pro mille
- pH: 7-8,5
- zuurstof: - dag 1-20: 5-8 ml/l
 - dag 20-90: 4-9 ml/l
- nitriet: <2 mg/l
- licht: continu
 - ± 250 lux
- verversing: - dag 1-30: 0% van het tankvolume/dag
 - dag 30-50: 30% van het tankvolume/dag
 - dag 50-90: 100% van het tankvolume/dag
- voedingsschema: - dag 2-15 : *Brachionus plicatilis*
 - dag 12-30 : nauplii *Artemia*
 - dag 15-30 : Copepoda
 - dag 30-50 : nauplii *Artemia*, Copepoda, gemalen vis en krabpasta

I.2.2. Ecologische aspecten van de zeebaars

I.2.2.1. Systematiek van de zeebaars (*Dicentrarchus labrax*)

De naamgeving en de systematiek van de zeebaars is lange tijd voorwerp van discussie geweest. Aanvankelijk werden zowel de genusnamen *Morone*, *Lupus* als *Labrax* gebruikt. Uiteindelijk koos men de geslachtsnaam *Dicentrarchus*. De Amerikaanse verwant wordt nog steeds aangeduid met de geslachtsnaam *Morone*. Voor de classificatie werd de indeling volgens Barnabé (1980) gevolgd:

Superklasse	: Pisces
Klasse	: Osteichthyes
Superorde	: Teleostei
Orde	: Percomorphi
Suborde	: Percoidea
Familie	: Serranidae
Genus	: <i>Dicentrarchus</i>
Species	: <i>Dicentrarchus labrax</i> (Linnaeus, 1758)

Het genus *Dicentrarchus* heeft als typische kenmerken een tweevoudige dorsale vin (D_1 IX; D_2 I, 13-14) en een anale vin met 3 stekels. Het genus *Dicentrarchus* bevat twee soorten:

- *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), en
- *Dicentrarchus punctatus* (Bloch, 1792).

Het zichtbare onderscheid tussen beide soorten is de aanwezigheid van donkere stippen op de flanken van *Dicentrarchus punctatus*. Morfologisch zijn beide soorten te onderscheiden o.a. op basis van de tanden op het vomer. *Dicentrarchus labrax* bezit alleen tanden op het voorste gedeelte van het vomer (in een V-vorm), terwijl *Dicentrarchus punctatus* tanden heeft op het gehele vomer (in een pijlvorm).

I.2.2.2. Verspreiding van de zeebaars

Het verspreidingsgebied van de zeebaars strekt zich uit over de volledige Middellandse Zee en de Zwarte Zee tot aan Ierland. Er werden zelfs enkele exemplaren gevangen aan de Zuid-oostkust van Noorwegen.

I.2.3. Overzicht van de kweekomstandigheden bij de produktie van zeebaarslarven

I.2.3.1. Incubatie van de eieren

Bij de incubatie van de eieren worden er algemeen 2 werkwijzen toegepast. De eieren worden ofwel rechtstreeks geïncubeerd in de larvetanks, bij een densiteit van ongeveer 160 eieren per liter, ofwel in afzonderlijke broedbakken waarbij de eidensiteit 10.000 eieren per liter bedraagt. Bij toepassing van de laatste methode werkt men meestal in doorstroomsystemen, wat toelaat gemakkelijker te werken met antibacteriële en antifungale middelen. De eerste methode wordt vooral toegepast bij bentische eieren. In deze methode worden de eieren geïncubeerd in konische tanks waarbij de beluchting zorgt voor het in suspensie houden van de eieren (Person-le Ruyet en Bedier, 1984). Bij de tweede methode gebruikt men afhankelijk van de vissoort ofwel konische of platte roterende incubators. De platte roterende incubators blijken zeer geschikt voor de eieren van tong en tarbot (Devauchelle *et al.*, 1986). Tijdens de incubatie van de eieren dient men zoveel mogelijk alle thermische en mechanische schokken te vermijden, de eieren zijn het meest gevoelig tijdens de eerste klievingen en juist voor de ontluiking (Devauchelle, 1987a). Devauchelle (1984) geeft als optimale condities voor de incubatie van de eieren van zeebaars en zeebrasem:

- saliniteit : 35 pro mille;
- temperatuur : 13-16 °C;
- zuurstof : $7 \pm 0,7$ mg/l;
- pH : 7,7-8;
- fotoperiode : 8-10L/16-14D;
- ammoniak : max. 0,008-0,02 ppm;
- nitriet : 0,002-0,003 ppm.

In het larvenkweekcentrum DEVA-SUD (Palavas-les-Flots, Frankrijk) worden de eieren volledig in het donker geïncubeerd.

I.2.3.2. Kweek van de larvale stadia

I.2.3.2.1. Kweeksystemen

De fragiele larven van mariene vissen zijn bijzonder gevoelig voor de waterkwaliteit. De larven nemen zuurstof uit het water op en produceren koolstofdioxide en ammoniak, zodat het noodzakelijk is de waterkwaliteit continu bij te sturen. De eenvoudigste methode om een goede waterkwaliteit te handhaven is het kweken van de vissen in een zogenaamd doorstroomstelsel, waarbij continu vers water aangevoerd wordt, terwijl het vervuilde water afgevoerd en niet opnieuw gebruikt wordt. Dit systeem vereist grote hoeveelheden water van goede kwaliteit. Indien men dit

water dient te behandelen (verwarmen, steriliseren), dan lopen de kosten te hoog op voor een rendabele bedrijfsvoering. Een andere en algemeen toegepaste methode in de larvekweekcentra is de zuivering van het water voor meervoudig gebruik. Theoretisch dient men geen vers water toe te voegen in dit systeem. Praktisch zal men toch dagelijks een hoeveelheid vers water (meestal 10% per dag) toevoegen om niet-afbreekbare, ongewenste stoffen (zoals nitraat) beneden een kritische concentratie te houden en tevens waterverliezen via o.a. verdamping te compenseren.

De voordelen van dit laatste systeem zijn velerlei:

- kostenbesparing op het vlak van de verwarming, sterilisatie en lozingen,
- gemakkelijker handhaving van constante en optimale condities,
- verkleind risico op ziekten.

De nadelen van dit systeem zijn de hogere investeringskosten voor de zuiveringsinstallatie en de relatieve onbekendheid van de processen die zich in een visteeltrecirculatiesysteem voordoen (Huisman, 1985).

Bij de zuivering van het gebruikte water onderscheidt men de mechanische filtratie, de biologische filtratie, de sterilisatie, de zuurstoftoediening en de verwarming. Belangrijk voor de in stand houding van een goede waterkwaliteit is het concentreren én snel verwijderen van de partikels (voedselresten, faeces) die voorkomen in het water door toepassing van een mechanisch filterproces. Dergelijke snelle verwijdering voorkomt de ontbinding van deze partikels waarbij schadelijke stikstofhoudende verbindingen en fenolen vrijkomen (Maurel, 1984). Bezinkbare organische stoffen kunnen het eenvoudigst (goedkoopst) verwijderd worden via bezinking. Voor industriële kwekerijen maakt men veelal gebruik van plaatbezinkers. Een ander systeem is het filterbed, waarbij het water over een reeks zeven stroomt waarvan de poriëngrootte mee met de waterstromingsrichting verkleint. Een recent ontwikkelde filter is de triangelfilter waarbij het water continu door een zeef stroomt die via controle door een elektronisch oog automatisch gereinigd wordt bij verstopping.

Door ontbinding van organische resten en via rechtstreekse uitscheiding door de vissen, komt er continu ammoniak vrij in het water. Hoge ammoniakconcentraties zijn zeer toxisch voor vissen (Hasan en Macintosh, 1986). Biologische filtratie betreft de aërobe omzetting van toxische componenten (ammoniak, nitriet) in weinig toxische componenten (nitraat) via micro-organismen. Deze omzetting van ammoniak in nitraat verloopt in twee stappen: eerst de omzetting van ammoniak in nitriet door de bacterie *Nitrosomonas europea* en vervolgens de oxidatie van nitriet tot nitraat door de bacterie *Nitrobacter winogradskyi*. Het is dus aangewezen een zo hoog mogelijke concentratie van de twee voormelde micro-organismen te ontwikkelen. In de biologische filters hechten de bacteriën zich vast op een drageroppervlak (biofilmsysteem) en het afvalwater stroomt langs dit oppervlak. Biologische filters bestaan onder verschillende vormen

(droog oxidatiebed of trickling filter; nat oxidatiebed of submerged filter: down-flow of up-flow; roterende schijven). Als dragermateriaal kunnen vele materialen dienst doen (keien, gepofte klei, plastieken strips, golfplaten, bio-disks). Belangrijk is dat een zo groot mogelijk oppervlak bekomen wordt per volume-eenheid, in welk opzicht de bio-disks zeer geschikt zijn ($220 \text{ m}^2/\text{m}^3$). Na de mechanische en biologische filtratie wordt het water extra belucht en gesteriliseerd (via UV of ozon) vooraleer het terug naar de vistanks stroomt.

I.2.3.2.2. Fysische en chemische variabelen (tabel 6,7,8)

I.2.3.2.2.1. Temperatuur

De zeebaarslarven werden tijdens de periode 1969-1984 gekweekt bij temperaturen variërend tussen 14 en 18°C (Barnabé, 1974; Girin, 1975b; Villani, 1976; Gatesoupe en Luquet, 1981; Barahona-Fernandes, 1981; Katavic, 1986). Pas in 1984 werd echter het effect van de temperatuur op de groei en de overleving onderzocht (Johnson en Katavic, 1984). Deze onderzoeksgroep bestudeerde het effect van verschillende combinaties van temperatuur (15, 18 en 21°C) en saliniteit (25 en 36 pro mille) op de overleving en de groei van zeebaarslarven. Zij stelden een verminderde overleving vast bij hogere kweektemperaturen, met een afzwakking van dit effect bij verlaagde saliniteit. De groei daarentegen nam toe met verhoogde temperatuur en bij verlaagde saliniteit. Dezelfde auteurs (Johnson en Katavic, 1986) vonden in een tweede studie terug een verlaging van de overleving bij verhoogde temperaturen (na 19 dagen: 24,2% bij 15°C; 6,4% bij 18°C en 7,9% bij 21°C). Het gebruik van lage kweektemperaturen heeft echter als nadeel een langere ontwikkelingstijd van de larven zodat de overgang levend voedsel-korrelvoedsel slechts plaatsvindt na de vijftigste dag. Volgens Saroglia (1988, persoonlijke mededeling) is het percentage morfologische afwijkingen beduidend lager bij larven gekweekt bij lagere temperaturen (15°C). Niettegenstaande de lagere overleving en het verhoogd percentage afwijkingen start men in de Franse larvekweekcentra bij 14°C en verhoogt men progressief de temperatuur tot 20°C tussen dag 6 en 20, daarna wordt deze temperatuur behouden gedurende de volledige larvale cyclus (Coves, 1985a).

I.2.3.2.2.2. Saliniteit

Algemeen worden de zeebaarslarven gekweekt bij een saliniteit schommelend tussen 35 en 38 pro mille. Nochtans worden zeebaarslarven dikwijls aangetroffen in estuaria (Ferrari en Chieragato, 1981). Chervinski en Lahav (1979) stellen dat jonge zeebaarsen aangetrokken worden door brak water. Zeebaarspootvissen (1 tot 2 g) kunnen gedurende verschillende weken en zonder enig probleem in bijna zoet water verblijven (0,5 pro mille) (Denayer, pers. mededeling, 1988). In een

studie van Zanuy en Carrillo (1985) werden over een periode van 15 maanden groei, conversie-efficiëntie, voedselopname en hematocrietwaarde bestudeerd in twee groepen volwassen zeebaarzen gekweekt in zeewater (37,8 pro mille) en in brak water (3,5 pro mille). Verschillen tussen beide groepen waren eerder klein en meestal toe te schrijven aan de ontwikkeling van de gonaden van de zeebaarzen gekweekt in zeewater. De zeebaarzen gekweekt in brak water vertoonden een iets betere groei bij lagere temperaturen (19 versus 22 °C). Conte (1984) stelde bij oudere zeebaarzen, intensief gekweekt in nagenoeg zoetwater, een verhoging van de schimmelinfecties vast. Dit werd echter niet opgemerkt bij de zeebaarzen die extensief gekweekt werden in zoetwater. De enige afdoende behandeling tegen deze schimmels bestond erin de saliniteit te verhogen.

Gegevens over saliniteitstoleranties van de larven van mariene vissen zijn eerder zeldzaam. Johnson en Katavic (1984) onderzochten de relaties tussen het voorkomen van "swimbladder stress syndrome" (zwemblaas stress syndroom, SBSS, hoofdsymptomen: sterk opgezwollen zwemblaas; hypertrofie) en bepaalde fysische en chemische kweekvariabelen zoals temperatuur, saliniteit en lichtregime. Zij stelden vast dat SBSS veel minder voorkwam bij larven gekweekt bij lage temperaturen en saliniteit (25 pro mille). De verlaging van de saliniteit had eveneens een gunstig effect op de overleving (na één maand: 38 tot 58% bij 36 pro mille, en 50 tot 81% bij 25 pro mille). Bovendien is het mogelijk bij toepassing van een lage saliniteit (26 pro mille) en een lage temperatuur (15°C) de zeebaarslarven niet te voeden gedurende de eerste tien levensdagen zonder nadelig effect op de overleving (Johnson en Katavic, 1986). Alliot et al. (1983) vonden dat zeebaarslarven gekweekt bij hoge watertemperatuur (22°C) sneller groeiden bij hoge of lage saliniteit (37 en 6 pro mille), terwijl bij een lage temperatuur de groei het snelst was bij intermediaire saliniteit (11 en 24 pro mille). De larven van de zeebaars blijken reeds zeer vroeg in de ontwikkeling lage saliniteten te tolereren. Iizawa (1984) onderzocht het effect van de prooiconsentratie bij tien dagen oude larven in "slechts" tien pro mille zeewater. Ook Coves (1985a) stelt dat de saliniteit mag variëren tussen 25 en 38 pro mille zonder te grote risico's bij iets oudere larven, maar waarschuwt voor saliniteitsschommelingen tijdens vroege stadia. Cambré et al. (submitted 1988) slaagden erin prolactine (het hormoon dat mede verantwoordelijk geacht wordt voor o.a. de capaciteit om in hypotone milieus te verblijven) aan te tonen in de hypofyse van jonge zeebaarslarven vanaf dag 9. Een hogere saliniteit heeft volgens Coves (1985a) een gunstig effect op het drijfvermogen van de larven in het water, waardoor ze energie besparen en gemakkelijker op de bewegende prooi kunnen jagen. Zowel het larvekweekstation in DEVA-SUD (Palavas-les-Flots, Frankrijk) als in Ferme Marine de Douhet (Douhet, Frankrijk) verlagen de saliniteit tijdens de eerste week tot 25 à 27 pro mille (Chatain, 1987, pers. mededeling; White, 1988, pers. mededeling). Barnabé (1986) suggereert dat een verlaagde saliniteit de zwemblaasontwikkeling bevordert. Andere mariene vislarven, zoals goudbrasem (*Sparus aurata*), vertonen ook minder mortaliteit bij lage saliniteit (15-25 pro mille) (Freddi et al., 1981 fide Johnson en Katavic, 1984).

Tabel 6: Overzicht van enkele abiotische en biotische variabelen (temperatuur, saliniteit, zuurstof , pH en densiteit) toegepast bij de kweek van zeebaarslarven over de voorbije twintig jaar.

Referenties:	Temperatuur (°C)	Saliniteit (‰)	Zuurstof	pH	Densiteit (larven/liter)
Barnabé en René, 1972	± 15	31-34	/	/	/
Barnabé, 1974	dag 1-10: 14-16 dag 10-30: 16-18 dag 30-90: 17-20	25-38	dag 1-20: 7-11 mg/l dag 20-90: 6-13 mg/l	7,0-8,5	/
Girin, 1975	18±1	35	6,4-7,5 mg/l	8,1-8,5	50
Girin, 1976	17,5-20	/	/	/	28-154
Girin <u>et al.</u> , 1975	18±1	/	6,4 mg/l		
Allesio <u>et al.</u> , 1976	17-21	36-39	7,5-10,2 mg/l	7,	
Barnabé, 1976	14-16	36,3-37,4	6,7- 7,2 mg/l	7,5-7,9	/
Villani, 1976	17	36-37	8,3- 8,7 mg/l	8,2-8,5	/
Barahona-Fernandes en Girin, 1977	18-18,9	/	5,3- 7,4 mg/l	/	/
Barahona-Fernandes, 1978	19±1	/	4,6- 6,3 mg/l	/	60
Anonymus, 1978	18-20	> 30	6,4- 7,5 mg/l	7,8-8,3	15
Girin, 1979	±18	34,5-35,5	4,5 mg/l	/	10-15

Vervolg tabel 6:

Gatesoupe en Luquet, 1981	dag 1: 14 dag 13: 17±1	/	/	/	/
Barahona-Fernandes, 1982	18±1	/	> 6,4 mg/l	/	/
Gatesoupe en Robin, 1982	/	/	/	/	43-55
Johnson en Katavic, 1984	18	25-64	4,0- 5,9 mg/l	7,8-8,2	25
Iizawa, 1984	16-18	9,1-37,2	/	/	/
Coves, 1985a	14-20	25-38	5-8 mg/l	7,5-8,5	100
Coves, 1985b	14-22	/	/	/	100
Ré <u>et al.</u> , 1985	12-15	35-36	/		
Johnson en Katavic, 1986	15-21	10-38	7,4- 9,2 mg/l	7,8-8,2	28-33
Katavic, 1986	dag 0-20: 14-16 dag 20-60: 16-18	34-38,5	5,5- 7,9 mg/l	7,8-8,2	5-15
Barnabé, 1986	dag 0-10: 15-18 dag 10-60: 18-22	30-37	< verzaadiging	/	100
					30
Franicevic <u>et al.</u> , 1987	19-20	38	/		
Barnabé, 1987	dag 0-20: 13-20 dag 20-50: 16-24	35-39 5-40	4,7- 7,6 mg/l	7,7-8,4	100
Sweetman, 1988	16-20	/	/	/	40

Eschmeyer (1975) vond dat bij *Morone saxatilis*, een Amerikaanse verwant van de zeebaars, het voedsel twee tot vier maal sneller door de maag passeerde bij isoösmotische saliniteit dan in zoetwater. De langere retentietijd van het voedsel, gecombineerd met een verlaagde wateropname in de maag, verhoogt er potentieel de concentratie van de spijsverteringsenzymen, wat een verklaring kan bieden voor de snellere groei van de zeebaarslarven bij verlaagde saliniteit, bekomen in de experimenten van Johnson en Katavic (1984, 1986).

I.2.3.2.2.3. Zuurstof

Bij de kweek van zeebaarslarven werden hoge mortaliteiten vastgesteld bij daling van de zuurstof onder 50% van de verzadiging, waarbij de dode larven wijd openstaande opercula vertoonden (Girin, 1979). De optimale zuurstofconcentratie voor de jonge larven bedraagt 85 tot 100% verzadiging. In de intensieve systemen worden deze hoge concentraties bijna uitsluitend bekomen via het instromend zuurstofrijke water (Coves, 1985b). Bij de semi-intensieve productie wordt er een rechtstreekse beluchting toegepast.

I.2.3.2.2.4. Lichtregime en verlichtingssterkte

Zie hoofdstuk 5

I.2.3.2.2.5. Tankvorm en kleur

De larven van zeebaars en zeebrasem werden aanvankelijk op een semi-intensieve wijze gekweekt in grote tanks (5-20 m³) bij lage densiteiten (10-20 larven/liter). De eerste twintig dagen werd het water niet ververst, terwijl wieren toegevoegd werden om o.a. de waterkwaliteit op peil te houden (Coves, 1985a, b). De tanks hadden meestal een platte of ronde bodem. Pas in 1985 werden kleinere, cilinderkonische tanks toegepast, die een betere beheersing van de hygiëne toelaten. Een gelijkaardige vaststelling was reeds geobserveerd door Girin (1975b). Door onmiddellijk te starten met de verversing van het water (5% van het tankvolume/uur) was het bovendien mogelijk om met hogere larvedensiteiten te starten (100 larven/liter).

Het gebruik van tanks met zwarte wanden i.p.v. licht gekleurde wanden resulteerde in een betere overleving, snellere groei, beter gedrag en een efficiëntere prooicaptatie (Coves, 1985b). Nochtans waren Houde en Ramsay (1971) reeds veel vroeger tot dezelfde vaststelling gekomen. Deze auteurs stelden dat zowel witte als zwarte tanks redelijke resultaten gaven voor de kweek van mariene vislarven. Toch gaven ze de voorkeur aan tanks met zwarte wanden omdat de larven zich in deze tanks homogeen verspreidden en zich minder concentreerden tegen de tankwand. Bovendien treedt er minder vervuiling, "fouling", op door allerhande wieren en invertebraten.

Tabel 7: Overzicht van enkele abiotische en biotische variabelen toegepast bij de kweek van zeebaarslarven over de voorbije twintig jaar.

Referenties	Fotoperiode	Verlichtingssterkte (lux)	Beluchting (l/h.m ³)	Debiet (% tankV./tijd)	Overleving (%)
Barnabé , 1974	continu	250	/	dag 1-30: 0%/dag dag 30-50: 30%/dag dag 50-90: 100%/dag	/
Girin, 1975	continu of 14L/10D	500-2000	/	op dag 90: 25%/h	12
Girin, 1976	natuurlijk of artific. 14L/10D	/	/	10-20%/h	3-69(dag 30)
Girin <u>et al</u> , 1975	continu	2000	/	10%/h	
Villani, 1976	artific.	1800-3000	/	/	0.5-5(dag 60)
Allesio <u>et al.</u> , 1976	artific. 14-16L	1000-3000	/	d. 20:10-15	
Barnabé, 1976	natuurl. + artif. (nacht)	max. 10000 700-1100	30-47	op dag 50: 1-8%/h	0-4
Barahona-Fernandes en Girin, 1977	/	/	/	/	22-35(dag 30)
Anonymus, 1978	natuurl.	/	/	dag 50: 0-100%/dag	/
Barahona- Fernandes, 1978	/	/	5-32	/	2-56(dag 30)
Girin, 1979	/	200-600	5	dag 0- 4: 0 %/h dag 5-19: 4-8 %/h dag 20-40:10-25%/h dag >40: 100%/h	/

Vervolg tabel 7:

Gatesoupe en Luquet, 1981	/	/	/	/	11-27(dag 25)
Gatesoupe en Robin, 1982	/	/	/	/	21-87(dag 21)
Johnson en Katavic, 1984	natuurl. + artif. 14L	/	/	50%/h	38-81(dag 30)
Iizawa, 1984	artif.	/	300	/	/
Coves, 1985a	natuurl.	/	24-180	/	/
Coves, 1985b	9-12L/15-12D	1000-1500	24-180	5-50%/h	45(dag 50)
Ré <u>et al.</u> , 1985	natuurl. + artif. (dimlicht s'nachts)	/	/	/	
Johnson en Katavic, 1986	natuurl.	/	/	50%/h	6-47(dag 19)
Katavic, 1986	natuurl. + artif.	/	/	d. 0-15: 25%/dag d. 16-30: 50%/dag d. 30-60:100%/dag	40(dag 60)
Barnabé, 1986	/	/	/	/	/
Franicevic <u>et al.</u> , 1987	natuurl.	/	/	30%/h	
Barnabé, 1987	continu	500-1000	60	/	/
Sweetman, 1988	12L/12D	30-500	/	/	20(dag 60)

Zowel Blaxter (1962) als Shelbourne (1965, fide Houde en Ramsay, 1971) toonden aan dat larven van respectievelijk pladijs en haring hun prooien gemakkelijker kunnen onderscheiden in zwart gekleurde tanks. Studies uitgevoerd in het larvenkweek-centrum DEVA-SUD toonden een hogere overleving aan bij zeebaarslarven bij toepassing van zwarte tanks. Voor goudbrasem wordt het effect nog onderzocht (Chatain, 1987, pers. mededeling).

1.2.3.2.2.6. Beluchting

De beluchting in de tanks bij de kweek van zeebaars, en mariene vislarven in het algemeen, beoogt als voornaamste doelstelling een homogene verspreiding van de larven en de prooien (Houde en Ramsey, 1971). Lasker et al. (1970) vonden geen verschillen in overleving en groei bij ansjovislarven (*Engraulis mordax*) gekweekt in tanks met en zonder aëratie. Nochtans stelden Fabre-Domerque en Bietrix (1905, fide Lasker et al., 1970) dat de agitatie van het water een noodzakelijke voorwaarde is voor de succesvolle kweek van tonglarven. Girin (1975) pastte een lichte aëratie toe bij de kweek van zeebaarslarven om een regelmatige beweging van de watermassa te verkrijgen, aangezien bij het ontbreken hiervan de larven dichte scholen vormen aan het wateroppervlak en vele larven afsterven (Barnabé, 1974). De specifieke reden voor deze optredende mortaliteit bij aggregaatforming is onbekend, maar vast staat dat in deze omstandigheden de voedselcaptatie zeer laag is in vergelijking met een situatie waar de larven homogeen verspreid zijn. Bovendien zullen de larven bij het ontbreken van een voldoende aëratie zich hoofdzakelijk aan het oppervlak bevinden waarbij er heel snel hypertrofie van de zwemblaas optreedt, door de verhoogde opname van lucht aan het oppervlak (Nash et al., 1977). Barahona-Fernandes (1978) bestudeerde het effect van drie verschillende aëratiersterktes op de groei en de overleving van zeebaarslarven (laag: 0,5-12 ml/min.150l; medium: 40-44 ml/min.150l; en hoog: 67-85 ml/min.150l). De aëratie bestond uit een puntbeluchting vertrekkend uit het diepste punt van de cilinderkonische tanks, waarbij de gasbellen een diameter hadden van 5 tot 8 mm. Barahona-Fernandes stelde vast dat de larven in de tanks met een middelmatige en hoge beluchting een typisch rheotactisch gedrag vertoonden waarbij de larven homogeen in de tanks verspreid waren. In de conditie met de lage beluchting verbleven de larven dicht bij het oppervlak en hoofdzakelijk tegen de wanden, dicht opeengepakt. De overleving was het laagst in de conditie met de laagste aëratiersterkte, maar er werden geen groeiverschillen waargenomen tussen de drie condities. De hogere sterfte in de lage-beluchtingsconditie kon niet geassocieerd worden met een verschil in chemische compositie of zuurstofconcentratie in het water. Wel was de totale bacterieconcentratie tienmaal hoger in de tanks met lagere beluchting. Er waren echter geen directe bewijzen om deze hogere sterfte te associëren met de hogere concentratie aan bacteriën. De auteur besloot dan ook dat we de aëratie als een determinerende factor voor de overleving van de larven dienen te beschouwen en dat een aëratiersterkte ten bedrage van 40ml/min/150l de beste

overlevingsresultaten geeft. Uit tabel 7 blijkt dat weinig onderzoekers een waarde opgeven voor de aëratiersterkte in de tanks, wat vermoedelijk wijst op een miskenning van deze problematiek. Girin (1979) koos op basis van voorgaande proeven voor 5 l/h.m^3 als aëratiersterkte. Coves (1985a, b) geeft als beginnende waarde 24 l/min.m^3 , en naar het einde van de larvekweek 180 l/min.m^3 . De eerste waarde ligt dicht in de buurt van deze welke als optimale waarde gevonden werd door Barahona-Fernandes (1978). Bij de nog fragielere goudbrasemlarven is de beluchtingsterkte slechts $0,2\text{-}0,4 \text{ l/h.m}^3$ gedurende de eerste 15 dagen en men verhoogt deze tot maximaal 7 l/h.m^3 op dag 60-70 (Tandler en Helps, 1985).

Te hoge aëratiersterktes hebben eveneens een nadelig effect, daar de larven zich moeilijker kunnen stabiliseren in het water met als gevolg enerzijds een verhoogd energieverbruik en anderzijds een lager rendement bij de prooicapatie.

I.2.3.2.2.7. pH en stikstofhoudende verbindingen

Algemeen wordt gesteld dat de pH voor mariene vislarven mag variëren tussen 7,8 en 8,4, wat een weerspiegeling is van de pH van het natuurlijk zeewater, nl. 8,2. De toleranties van zeebaarslarven voor stikstofhoudende verbindingen verschillen volgens de auteur. Villani (1976) geeft als waarden 0,005-0,05 ppm voor totale ammoniak, 0,0001-0,05 ppm voor nitriet en 0,001-0,6 ppm voor nitraat. Barnabé (1986) toonde aan dat na 24 uur de CL_{50} waarde voor de jongste larvale stadia voor totale ammoniak 4 mg/l en voor nitriet 3 mg/l bedraagt. Tijdens de larvale kweek maten Johnson en Katavic (1986) voor ammoniak maximaal 0,05 ppm, voor nitriet 0,0001-0,001 ppm en voor nitraat 0,0003-0,003 ppm.

I.2.3.2.2.8. Debiet en larvedensiteit

Studies over het effect van de waterverversing op de groei en overleving van zeebaarslarven zijn zeer schaars. Zoals hoger reeds aangehaald, werkte men vroeger in grote tanks, waarbij er gedurende de eerste twintig dagen geen waterverversing toegepast werd (Coves, 1985b). Bij de huidige kweekmethodes werkt men bij hoge larvedensiteiten (100 larven/liter) waarbij het water reeds vanaf de eerste dag ververst wordt. De procedure die meestal gevolgd wordt, is een 5% verversing van het tankvolume/uur in de beginfase, waarna dit progressief verhoogd wordt tot 50% bij de overgang naar korrelvoedsel. Enkele studies uitgevoerd bij de kweek van larven van de goudbrasem toonden aan dat het ontbreken van de waterverversing (intensieve systemen, 70 larven/liter) gedurende de eerste twintig dagen een positief effect heeft op de overleving en de groei (Alessio, 1975; Tandler en Helps, 1985). Bij de kweek van de larven van de Japanse zeebrasem (*Pagrus major*) wordt het water gedurende de eerste tien dagen niet ververst, daarna bedraagt de verversing éénmaal het tankvolume per dag. De mortaliteit bedraagt tijdens de eerste

Tabel 8: Overzicht van enkele abiotische en biotische variabelen toegepast bij de kweek van zeebaarslarven over de voorbije twintig jaar.

Referenties	Tankvorm	Tankkleur	Tankinhoud (1)	N-verbindingen
Barnabé , 1974	/	/	/	nitriet <2ppm
Girin, 1975	/	/	60/450	/
Girin, 1976	cil.-konisch cilindrisch	grijs	60/150/480	/
Girin <u>et al.</u> , 1975	/	/	/	/
Villani, 1976	rond/vierkant	/	141	ammonium 0,05-0,09 ppm nitriet 0,002-0,003 ppm nitraat 0,017-0,06 ppm
Allesio <u>et al.</u> , 1976	hemisfeer	/	200/600	/
Barnabé, 1976	rond/bodem plat	/	6000	nitriet 0.08ppm
Barahona-Fernandes en Girin, 1977	/	/	/	/
Anonymus, 1978	rond	/	9000/12000	/
Barahona- Fernandes, 1978	cil.-konisch	/	150	ammoniak(-tot)0,003-0,004 ppm nitriet 0.02 ppm nitraat 1.3 ppm
Girin, 1979	/	/	/	/
Gatesoupe en Luquet, 1981	/	/	60	/

Vervolg tabel 8:

Gatesoupe en Robin, 1982	cil.-konisch		150	/	
	cil./bodemplat		250		
Johnson en Katavic, 1984	cil./bodem plat	zwart	1000	/	
Iizawa, 1984	cil.-konisch				
Coves, 1985a	cil.-konisch	zwarte wand witte bodem	2000	/	
Coves, 1985b	cil.-konisch	/	2000	/	
Ré <u>et al.</u> , 1985	cil.-konisch	/	175	/	
Johnson en Katavic, 1986	cil./bodem plat	zwart	2	/	
Katavic, 1986	cil./bodem plat	zwart	1200		ammoniak <0.5 ppb nitriet 0.0001-0,001 ppm nitraat 0.0003-0,003 ppm
Barnabé, 1986	rond	/	2000-20000		max. ammoniak 4ppm nitriet 3ppm
Franicevic <u>et al.</u> , 1987	cil.-konisch	zwart	2000	/	
Barnabé, 1987	/	/	1000	/	
Sweetman, 1988	rond	/	15000	/	

dagen praktisch 0%, pas na de tiende dag treedt er sterfte op (50-60%) (Kitajima, 1987). Bij de semi-intensieve kweek van zeebaars- en goudbrasemlarven varieert de densiteit tussen 15 en 25 larven/liter, terwijl in de intensieve methode gestart wordt met 100 larven/liter (Coves, 1985b).

I.2.4. Voedselregime

I.2.4.1. Startmoment van voederen

Tijdens de eerste dagen na de ontluijing pigmenteren de ogen en wordt de mond gevormd, de larven teren tijdens deze periode uitsluitend op hun dooiervoorraad. Vanaf de vierde of vijfde dag, afhankelijk van de temperatuur, opent de mond en kunnen de zeebaarslarven voedsel opnemen. Pas dan wordt levend zoöplankton toegediend (Barnabé, 1974; Girin, 1975a). Johnson en Katavic (1986) stellen dat tijdens die eerste dagen slechts een gedeelte van de larven voedsel opnemen waardoor er kans bestaat op overvoederen en vervuiling van de tanks. Daarom is het volgens hen interessant om enkele dagen later voedsel toe te dienen. Een probleem hierbij is dat voedseldeprivatie tijdens die kritieke fase kan leiden tot een irreversibele uithongering van de larven, "point of no return". Johnson en Katavic (1986) onderzochten in dit verband het effect van de saliniteit en de temperatuur op de verschuiving van dit kritiek punt, en vonden dat bij toepassing van een verlaagde saliniteit (13 en 26 pro mille) en verlaagde temperatuur (15°C) het mogelijk is de voeding van de larven uit te stellen tot de zesde dag na ontluijing, zonder een negatief effect op de overleving. Bij larven van de ansjovis treedt een irreversibele verhongering op indien de larven geen voedsel krijgen binnen anderhalve dag na de dooiërabsorptie (Lasker *et al.*, 1970). Voor tarbotlarven wordt de "point of no return" bereikt na 168 uur, de larven starten normaal met voedselopname 65 uur na de ontluijing (Jones, 1972). In de natuur ontwikkelen de zeebaarslarven zich bij 12-15°C, waardoor ze gedurende langere tijd kunnen overleven indien ze niet onmiddellijk voedsel vinden.

I.2.4.2. Prooidensiteit en consumptie

Verschillende onderzoekers stelden als norm voor de prooidensiteit in de larvetanks 5 rotiferen of nauplii van *Artemia*/ml; (Barnabé, 1974; Anonymus, 1978). Als criteria voor de toevoeging van nieuwe prooien neemt men ofwel het punt waar 90% van de prooien verorberd zijn ofwel het tijdstip waarop de prooidensiteit daalt onder 2/ml. Barahona-Fernandes en Girin (1977) bestudeerden het effect van verschillende prooiconcentraties (2 tot 26 prooien/ml) op de groei en de overleving van de zeebaarslarven. De auteurs leerden uit het onderzoek dat de overleving hoger was bij lage voederniveaus. De groei werd niet beïnvloed over een lange termijn, hoewel op dag 15 de larven in de hoogste voedselconditie de snelste groei vertoonden. Wel besloten ze dat

een hoge prooidensiteit gunstig is in het begin van de voedingsperiode maar in een later stadium eerder een negatief effect heeft. In een andere studie vond Iizawa (1984) dat bij een lage prooidensiteit het rendement van de prooicapstatie door de zeebaarslarven zeer laag was. Deze auteur stelde als optimale prooiconcentratie een waarde van 5/ml voorop. Johnson en Katavic (1986) daarentegen startten met 10 rotiferen/ml. Sweetman (1988) prefereert als rotifeerconcentratie 2 tot 3/ml, omwille van de nutritionele deficiënties die optreden wanneer de prooien te lang in de tanks verblijven. De cijfers omtrent de dagelijkse prooiconsumptie van zeebaarslarven verschillen eveneens sterk van onderzoeker tot onderzoeker. Barnabé (1974) stelt dat een tien dagen oude larve 200-500 rotiferen opneemt per dag, terwijl Iizawa (1984) een waarde van 98 rotiferen vond. Aangezien een tien dagen oude zeebaarslarve ongeveer 1 mg weegt en het natgewicht van een rotifeer op 0.003 mg geschat werd, betekent dit dus dat een larve 30 tot 150 % van zijn gewicht consumeert per dag (Barnabé, 1986) of volgens Jones en Houde (1986) zelfs 100 tot 400%. Voor de productie van een één maand oude larve zijn er volgens Barahona-Fernandes en Girin (1977) 2000 tot 4000 rotiferen, 7000 tot 13000 nauplii van *Artemia* en 400 tot 900 metanauplii van *Artemia* nodig. Vergelijkbare cijfers worden gegeven door Bedier (1981, fide Barnabé, 1986), 750 rotiferen, 7000 *Artemia* nauplii en 800 *Artemia* metanauplii. Het is mogelijk dat deze laatste het aantal rotiferen onderschat.

I.2.4.3. Overgang levend voedsel-inert voedsel

Een delikate fase bij de kweek van mariene vislarven is de uiteindelijke overschakeling van levend naar korrelvoedsel. Het korrelvoedsel is t.o.v. het levend voedsel inert, heeft een andere biochemische samenstelling en heeft een totaal verschillende smaak en geur. Klassiek past men bij de overgang naar korrelvoedsel een aanpassingsperiode of "weaning" toe waar men eerst vervroren zoöplankton toedient (vervroren copepoden of vervroren *Artemia*) waarna men langzaam overschakelt naar 100% korrelvoedsel. De larven nemen echter zeer moeilijk dit korrelvoedsel aan en men stelt in deze periode dan ook zeer hoge mortaliteiten vast van 76 tot 96%, afhankelijk van de grootte van de larven waarmee men start (Corrao, 1984). Barahona-Fernandes (1982) toonde aan dat er geen invloed is van de fotoperiode (14L of 24L) en de larvedensiteit (variërend tussen 2 en 8/ml) op de overleving (mortaliteit 20 tot 50%). In dezelfde studie stelde Barahona-Fernandes ook vast dat het minimale gewicht voor de overgang naar korrelvoedsel 15 mg bedraagt. De samenstelling van het korrelvoedsel blijkt de belangrijkste factor te zijn voor de al of niet opname. Bepaalde attractantia (poeder van *Artemia*, krill of mosselen) hadden geen of een negatieve invloed op de overleving. Bij de "weaning" (overgangsproces) van vijftiendertig dagen oude tonglarven daarentegen verhoogde de overleving van 38% naar 78% door toevoeging van betaine, iosine, en glycine (Métailler *et al.*, 1983). Volgens

mededeling) bedraagt de overleving bij de kweek van zeebaarslarven 50 tot 60% op dag 40, terwijl nog eens de helft sterft bij de overgang naar korrelvoedsel.

Hoofdstuk 3: MORFOLOGISCHE ONTWIKKELING EN PATHOLOGIE VAN DE ZEEBAARSLARVEN

I.3.1. Morfologische ontwikkeling van de zeebaarslarven

I.3.1.1. Algemene ontwikkeling

De wijfjes van de zeebaars zetten per kg lichaamsgewicht 300.000 eieren af, waarna de bevruchting in het water onmiddellijk volgt (Devauchelle, 1987). De levensvatbare eieren zijn doorschijnend en drijven bij een saliniteit hoger dan 35 pro mille. Barnabé (1986) onderscheidt tijdens de larvale ontwikkeling een prelarvaal stadium (periode voor de opname van voedsel) en een larvale fase (tot aan de vorming van de schubben, totale metamorfose). Voor de details m.b.t. de eiontwikkeling verwijzen we naar Barnabé (1976).

Op het moment van de ontluijing zijn de vitale organen reeds aanwezig. Naar de ontluijing toe vertoont het hart reeds regelmatige kloppingen. De larve bevrijdt zich uit het ei via afscheiding van enzymen die het chorion oplossen. De nieuw geboren larven zijn doorzichtig en hebben een opvallend grote ovale dooierzak, met een oliedruppel gelokaliseerd in het posterieur gedeelte (foto 4). De doorsnede van de oliedruppel is zowat een derde van de lengte van de dooierzak. Gele en zwarte melanoforen zijn op dit moment reeds diffuus verspreid over het gehele lichaam. Het voorste deel van de darm en de vinnen zijn reeds ontwikkeld. Tijdens de vijf volgende dagen (bij 15°C) ontwikkelt de volledige en aanvankelijk rechte darmtractus, pigmenteren de ogen en wordt de mond gevormd (foto 5). Bij het uitkomen van de larve uit het ei zijn er reeds enkele levercellen aanwezig. Vanaf de derde dag differentiëren deze cellen zich, waarbij er tevens een open verbinding met de darm ontstaat. De pancreas vertoont een analoog ontwikkelingspatroon, en rond de zevende dag versmelten de uitgangen van de pancreas en de lever met elkaar. Bij de eerste voedselopname, dag 6, zijn de pectorale vinnen ondertussen gevormd en vertoont de larve georiënteerde bewegingen (Barnabé, 1976). Rond de elfde dag zijn de vitellinereserves praktisch volledig geresorbeerd en is alleen de oliedruppel nog waarneembaar. Het volledig darmstelsel ontwikkelt zich, en de larve produceert eigen spijsverteringsenzymen. De volledige metamorfose vindt plaats na een drietal maanden met de vorming van de schubben.

I.3.1.2. Ontwikkeling van de zwemblaas

De zwemblaas speelt bij vissen een belangrijke rol, op de eerste plaats als hydrostatisch orgaan. Daarnaast heeft de zwemblaas ook verscheidene functies zoals bij het gehoor, bij de geluidsproductie, de ademhaling (longvissen), en als drukreceptor (Kolb, 1984). Tijdens de laatste

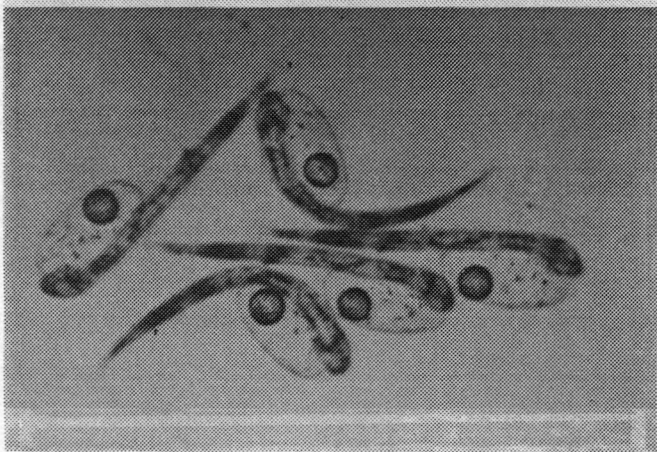
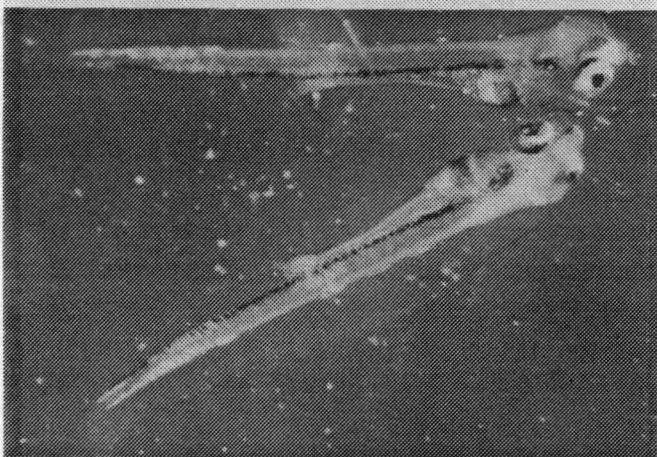
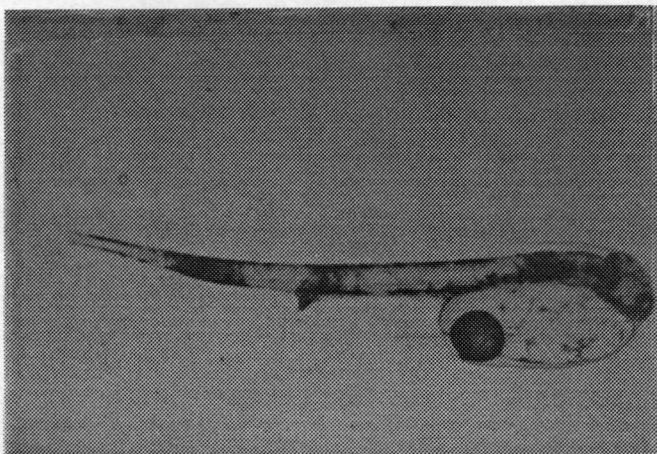


Foto 4: Pas ontloken zeebaarslarve

Foto 5: Vijf dagen oude zeebaarslarven

Foto 6: Pas ontloken zeebaarslarven

(gezonde en larven met totale kromming)

decennia werd de morfologie en de fysiologie van de zwemblaas uitvoerig bestudeerd, hoofdzakelijk bij volwassen vissen (Steen, 1970; Kolb, 1984). Daarentegen bezit men slechts weinig gegevens over de post-embryonale ontwikkeling van de zwemblaas. Nochtans is een correcte ontwikkeling van de zwemblaas van belang voor een goede groei en morfologische ontwikkeling van de vissen (Kolb, 1984). De niet-ontwikkeling van een functionele zwemblaas is nog steeds één van de hoofdstruikelblokken voor de commerciële productie van zeebaars- en goudbrasemlarven in vele larvekeekcentra (Mace, 1988). De zwemblaas ontstaat bij de beenvissen als een dorsale uitstulping van de wand van de slokdarm. Deze uitstulping blijft ofwel permanent (physostomen) ofwel tijdelijk (physoclisten) in verbinding met de slokdarm via de ductus pneumaticus. Kort na de vorming van de embryonale zwemblaas treedt er differentiatie op in de cellagen. In de tunica interna kan dan een vasculaire en een musculaire laag onderscheiden worden. De tunica externa is een bindweefsellaag gevormd door somatische mesenchymcellen (Steen, 1970). Bij de physoclisten degenereert de ductus pneumaticus met als gevolg een gesloten zwemblaas. Waarschijnlijk is deze ductus pneumaticus nodig voor de initiële vulling van de zwemblaas. Deze initiële vulling komt bij bepaalde vissoorten tot stand door de opname van atmosferische lucht. Jonge stekelbaarzen die verhinderd werden om de wateroppervlakte te bereiken bleken niet in staat te zijn hun zwemblaas te vullen.

Bij de larven van de zeebaars kan men reeds 3 tot 4 dagen na de ontluiding de primordiale zwemblaas waarnemen als een klein blaasje tussen de wervelkolom en de spijsverteringsbuis, gemaskeerd door chromatoforen (Chatain, 1986; Corneille en Ollevier, 1988). De ontwikkeling verloopt in twee stappen, namelijk de primaire inflatie en de secundaire expansie. De eerste fase start op het moment dat de larven 7 dagen oud zijn (minimum lengte 5,5 mm) en wordt gekenmerkt door het verschijnen van een luchtbel in de zwemblaas (foto 7). Volgens Chatain (1986) is de primaire inflatie niet meer mogelijk vanaf het moment dat de larven een lengte van 6,5 mm bereiken. Dit gaat samen met het tijdstip van de volledige resorptie van de dooiermassa. Men onderscheidt op het einde van deze fase twee afwijkende vormen: larven waarvan de zwemblaas niet geïnflateerd is en larven met een zwemblaas in een intermediaire toestand.

De tweede fase, de secundaire expansie, karakteriseert zich door het verschijnen van een tweede, kleinere luchtbel in de zwemblaas die fusioneert met de eerste grotere (foto 8). Vanaf dit stadium verlengt de zwemblaas tot een lengte bereikt wordt van 20 tot 30% van de totale lengte van de larven (foto 9). Het mechanisme verantwoordelijk voor de primaire inflatie is bij de zeebaarslarven nog steeds controversieel. Deze inflatie kan ofwel tot stand komen via het luchthappen aan de oppervlakte zoals bij de stekelbaars, ofwel door de interne secretie van gassen via de bloedbanen. Bij de larven van de Japanse zeebrasem verhoogt het volume van de zwemblaas bij de overgang van licht naar donker en vice versa. Bij het bedekken van het wateroppervlak met paraffine treden er geen wijzigingen op in dit natuurlijk circadiaan ritme van volumetoe- en afname. Daaruit werd afgeleid dat de volumeveranderingen te wijten zijn aan

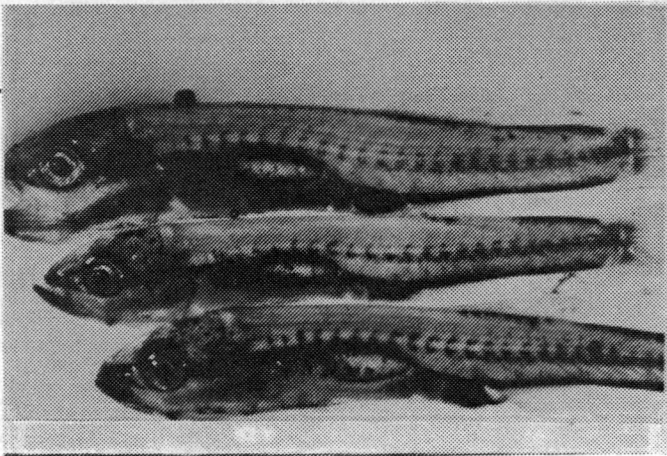
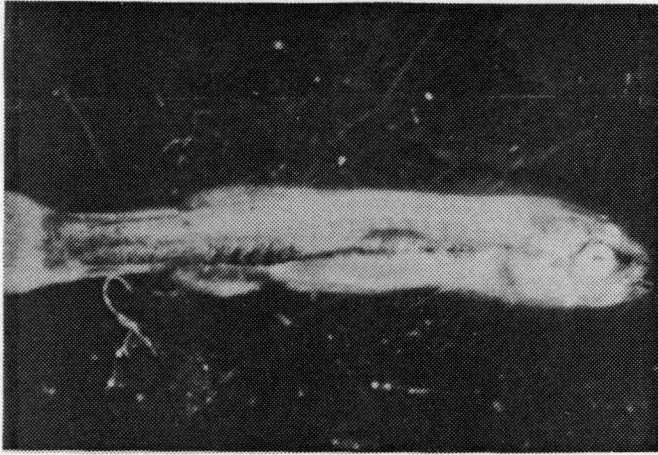
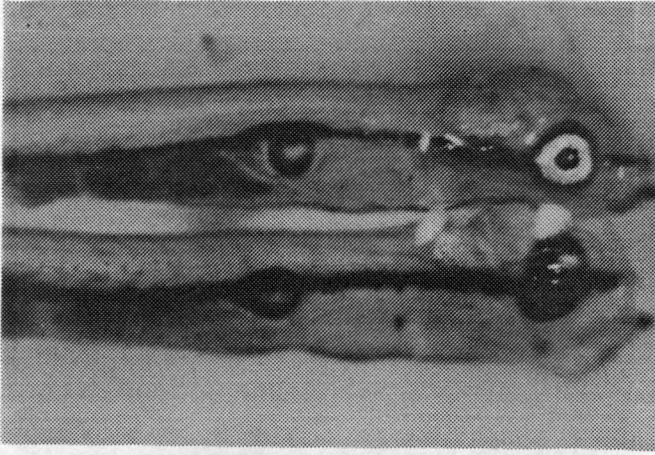


Foto 7: Zeebaarslarven (8 dagen oud) met geïnflateerde zwemblaas

Foto 8: Zeebaarslarve (13 dagen oud) met dubbele gasbel in de zwemblaas

Foto 9: Zeebaarslarven (40 dagen oud) met correct gevormde zwemblaas

interne gasuitwisselingsmechanismen (Kitajima et al., 1985; Kitajima, 1987). Bij de ansjovis (*Engraulis mordax*) werden gelijkaardige volumeveranderingen vastgesteld. De vulling van de zwemblaas tijdens de nacht zou leiden tot energiebesparing, daar de larven zich dan niet voeden en op die manier rustig blijven zweven tijdens de donkere periode. Uit aanvullende experimenten bleek dat bij deze soort de vulling van de zwemblaas tot stand komt via het happen van lucht aan de oppervlakte (Hunter en Sanchez, 1976). De Amerikaanse verwant van de zeebaars (*Morone saxatilis*) zou eveneens lucht happen aan het wateroppervlak voor de primaire inflatie, en bij verschillende aëratiersterktes was het percentage larven met een correcte inflatie hoger in de tanks met een sterke aëratie (Doroshev en Cornacchia, 1979). *Tilapia mossambica* beschikt niet over een ductus pneumaticus en de primaire inflatie is dan ook niet te wijten aan het opnemen van atmosferische lucht. Veeleer zou deze inflatie teweeggebracht worden door transport van gassen via de bloedcirculatie (Doroshev en Cornacchia, 1979).

I.3.2. Pathologie van de larven van de zeebaars

I.3.2.1. Zwemblaasafwijkingen

Bij de kweek van de larven van de zeebaars en de goudbrasem is het voorkomen van larven met een niet-functionele zwemblaas één van de meest aangetroffen afwijkingen en zowat de hoofdstruikelblok voor de commerciële productie. Tot voor enkele jaren hadden in vele larvekweekcentra- en ook nog vandaag in sommige centra- tot 90% van de larven een niet ontwikkelde zwemblaas, meestal gekoppeld aan een verwrongen wervelkolom (lordosis) (Olesen, 1986; Mace, 1988). Weppe en Bonami (1983) vermelden zelfs dat 97% van de larven deze afwijking vertoonden. Dit ziektebeeld veroorzaakt een hoge cumulatieve sterfte tijdens de eerste twee kweekjaren. Larven zonder zwemblaas zwemmen continu om hun dieptepositie te handhaven in de waterkolom, verbruiken daarbij zeer veel energie en groeien zeer traag. Uitgeput zinken deze vissen regelmatig op de bodem, waarbij eventueel een verhoging van de bacteriële infecties optreedt. De meeste onder hen sterven dan ook tijdens de eerste winterperiode. Volgens dezelfde auteurs treedt deze afwijking reeds op tussen dag 5 en 8 na ontluijing, waarbij de zwemblaas verandert in een tumorachtige massa. Tien tot vijftien dagen later treedt vascularisatie op in deze celmassa.

De exacte oorzaak voor het niet inflateren van de zwemblaas tussen dag 6 en 10 is nog steeds een punt van intensief onderzoek. Volgens Barnabé (1987) is het noodzakelijk de verlichtingssterkte te beperken tot maximum 500 lux (optimum 50-300 lux), omdat een hoge verlichtingssterkte de zwemblaasvorming belet. Een hoge verlichtingssterkte zou immers de larven afschrikken waarbij ze niet naar het oppervlak durven komen om lucht te happen voor de zwemblaasvorming. Coves (1985b) stelt echter dat er geen enkel verband kon aangetoond worden tussen de

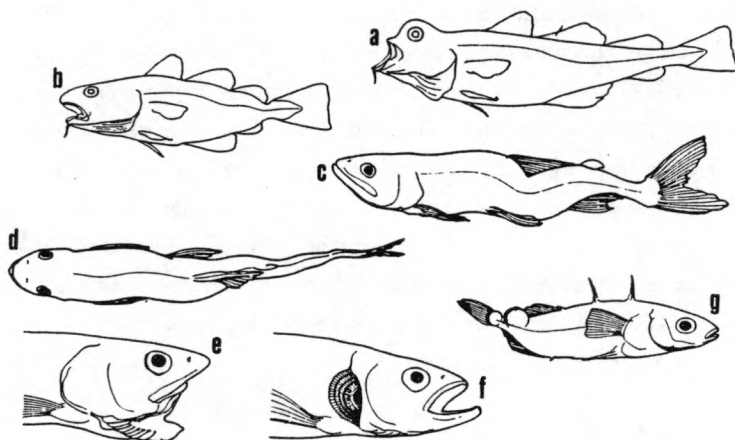
verlichtingssterkte en de zwemblaasinflatie. Volgens Kitajima (1987) zou een lage concentratie aan HUFA's en een te hoge aëratie eveneens bijdragen tot het niet ontwikkelen van de zwemblaas. Larven gevoed met een dieet arm aan HUFA's bezitten onvoldoende energie om naar het oppervlak te komen voor de vulling van de zwemblaas. Sterke aëratie bemoeilijkt extra dit proces. Dit laatste punt wordt ook bijgetreden door Foscarini (1988). Volgens deze onderzoeker mag de luchtdoorborreling in de tanks met larven van de Japanse zeebrasem (*Pagrus major*) maximaal 0,2-0,6 l/min per zuurstofsteen bedragen (8 zuurstofstenen per tank van 86 m³). Een hogere beluchting hindert de Japanse zeebrasem om lucht op te nemen aan het wateroppervlak. Recent stelde Mace (1988) dat het probleem van de niet-functionele zwemblaas ook in verband dient gebracht te worden met tankhygiëne. Het verwijderen van de oppervlaktefilm op het water zou een positief effect hebben op de zwemblaasinflatie. In Japan stelde men vast dat bij de voeding van de zeebrasemlarven met vervroren *Brachionus*, er een olielaag op het wateroppervlak dreef. Deze olielaag was afkomstig van niet geconsumeerde rotiferen die snel ontbinden. Deze olielaag zou het luchthappen bemoeilijken en de primaire inflatie van de zwemblaas hinderen. Om dit te voorkomen start men pas na twee weken met vervroren rotiferen en bovendien brengt men een drijvende geperforeerde PVC-ring aan op het wateroppervlak. Deze PVC-ring wordt aangewend om de olielaag naar de uitlaat toe te blazen (Foscarini, 1988).

Een andere vorm van zwemblaasafwijking is de hyperextensie van de zwemblaas. Bij het optreden van dit fenomeen zwelt de blaas zeer sterk op en drijven de larven op hun zij op het wateroppervlak. Dit verschijnsel werd bij zeebaars voor het eerst beschreven door Bonami et al. (1984). Deze onderzoekers bemerkten reeds rond de vijftiende dag een sterk opgezwollen abdomen bij de larven, veroorzaakt door het abnormaal vergroten van de zwemblaas. Het volume van de zwemblaas bereikt in deze gevallen 3 tot 4 maal het volume van de lever. Door deze uitzetting worden de hepatocyten platgedrukt en treedt er necrose op. Een gelijkaardig ziektebeeld was beschreven bij *Mugil cephalus*. Twaalf dagen oude larven stierven massaal (>75%) aan buitensporige zwemblaasvergroting. Nash et al. (1977) veronderstelden dat de larven teveel lucht opnamen bij het voeden aan het oppervlak. Verhoging van de aëratie, waarbij de larven minder aan het oppervlak konden verblijven, bracht een zeer sterke vermindering mee van dit probleem. Volgens Giavenni (1986) wordt deze opzwellings veroorzaakt door stressverschijnselen. Deze stress leidt tot acidosis van het bloed, waarbij er een dalende affiniteit tussen de zuurstof en het bloed ontstaat. Daardoor kan de zuurstof opgestapeld in de zwemblaas niet afgevoerd worden via de bloedcapillairen in de zwemblaaswand. Bij de Europese zeebaars (*Dicentrarchus labrax*) en de Aziatische zeebaars (*Lates calcarifer*) werden gelijkaardige verschijnselen waargenomen (Corrao, 1984; Bagarino en Kungvankij, 1986). Johnson en Katavic (1984) beschrijven deze symptomen als "swimbladder stress syndrome" (SBSS) en benadrukken dat het opzwellen van de zwemblaas niets te maken heeft met "gas bubble disease". SBSS bij zeebaars is niet geassocieerd met supersaturatie van het water. SBSS zou veroorzaakt worden door stress

inducerende factoren zoals plotse veranderingen van de verlichtingssterkte en saliniteit, transport van de larven en hantering. Voedingsdeficiënties zoals lage concentraties aan vitamine C en vitamine B6 zouden eveneens een rol kunnen spelen. Bij de Aziatische zeebaars traden deze verschijnselen op na het transporteren van 14 dagen oude larven naar een andere tank. Reeds na enkele uren werden drijvende larven bemerkt aan het oppervlak van de tank. De volgende dag dreven 80 tot 90% van de larven op hun zij op het wateroppervlak, niet in staat te zwemmen, met snelle uithongering en sterfte als gevolg (Bagarino en Kungvankij, 1986).

I.3.2.2. Skeletmisvormingen

Misvormingen van het skelet zijn bekend bij een aantal vissoorten. De meest voorkomende skeletafwijkingen zijn vervormingen van de wervelkolom, afwijkingen van de kaakbeenderen en van de opercula (figuur 1) (Möller en Anders, 1986). Bij de larven van de zeebaars en van de Europese en Japanse zeebrasem is de vervorming van de wervelkolom één van de meest voorkomende afwijkingen (Fujita, 1977; Olesen, 1986; Mace, 1988). Men onderscheidt lordosis (dorsoventrale vervorming van de wervelkolom), scoliosis (laterale deformatie) en spondilosis (degeneratie van de tussenschijven, gedrongen wervelkolom) (Francescon *et al.*, 1988). Fujita (1977) vermeldt dat 5 tot 50% van de geproduceerde larven van de Japanse zeebrasem (*Pagrus*



Figuur 1: Enkele typische skeletafwijkingen bij vissen: A. Bultvorming, B. Verkorting van de wervelkolom, C. Lordosis, D. Scoliosis, E. Onderkaakvervorming, F. Verkorting van het operculum G. Pseudodeformatie van de wervelkolom door een spieraafwijking te wijten aan parasieten

major) een vervorming van de wervelkolom vertonen. Deze vervorming is volgens verschillende onderzoekers sterk gecorreleerd met de afwezigheid van een functionele zwemblaas (Weppe en Bonami, 1983; Coves, 1985b; Kitajima, 1987). Kitajima *et al.* (1981) toonden aan dat lordosis optreedt rond de veertigste dag en dat meer dan 90% van de vissen zonder functionele zwemblaas eveneens een vervormde wervelkolom bezit. Deze lordosis zou ontstaan doordat de larven zonder zwemblaas zinken bij stilstand in het water en dus continu terug omhoog moeten zwemmen. Dezelfde fenomenen werden vastgesteld bij de zwarte zeebrasem (*Acanthopagrus schlegelii*), de Japanse zeebaars (*Lateo labrax japonicus*) en de zilverzeebrasem (*Sparus sabra*) (Kitajima, 1987). Verschillende onderzoekers vermelden het voorkomen van operculaverkortingen, dit zowel bij zeebaars als bij zeebrasem (Villani, 1976; Allesio *et al.*, 1976; Coves, 1985b). In deze gevallen bedekken de opercula niet volledig de kieuwen. Wellicht omdat deze afwijking geen directe aanleiding geeft tot mortaliteit, beperken de meesten zich uitsluitend tot de vermelding van het voorkomen van deze afwijking. Allesio *et al.* (1976) veronderstelden dat deze afwijking veroorzaakt wordt door het gebruik van antibiotica.

Een derde skeletmisvorming betreft de vervorming van de kaakbeenderen. Bij de verkorting van de bovenkaakbeenderen (maxillare) spreekt men van "bullhead-type". Bij de onderkaak (mandibulare) stelt men zowel abnormale verkorting als verlenging vast (Möller en Anders, 1986). Verschillende oorzaken voor deze skeletmisvormingen zijn reeds aangetoond. Deze kunnen veroorzaakt worden door nutritionele deficiënties zoals het ontbreken van tryptofaan, magnesium, fosfor en vitamine C (Tacon, 1986). Veelal zijn parasieten of bacteriën verantwoordelijk voor deze afwijkingen zoals *Myxosoma cerebralis* bij salmoniden, en streptococcon bij de gekweekte "Yellowtail" in Japan (Paperna, 1978). Ook de aanwezigheid van toxische stoffen zoals PCB's, lood, cadmium of zelfs geoxideerde visolieën kunnen deze afwijkingen veroorzaken (Kinne, 1984; Tacon, 1986). Dikwijls treden deze afwijkingen zeer vroeg op in de larvale ontwikkeling en zijn dan te wijten aan niet optimale incubatie-omstandigheden van zowel de eieren als de larven (temperatuurschokken, saliniteiten en temperaturen die buiten de tolerantielimieten van de larven vallen) (Möller en Anders, 1986).

I.3.2.3. Urinaire calculosis

Vanaf de tweede dag na ontluiking kan men kristallijne structuren aantreffen die de volledige urineblaas opvullen. Analyse van deze kristallen toonde aan dat ze fosfor en calcium en in mindere mate magnesium, chloor en natrium bevatten (Giavenni, 1986). Literatuurgegevens over het voorkomen van urinaire calculosis zijn zeldzaam. Zoals bij hyperinflatie van de zwemblaas zou stress eveneens de oorzaak zijn bij het voorkomen van urinaire calculosis. Bij goudbrasemlarven

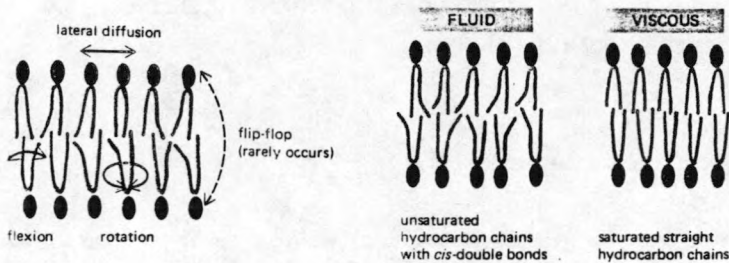
stelde Giavenni (1986) een hoge correlatie vast tussen urinaire calculosis en een lege darminhoud, 55,8% van de larven zonder voedsel in de darm vertoonden deze afwijking tegenover slechts 7,7% van de larven die wel voedsel in de darm hadden. Bij zeebaarslarven vond men geen verschillen tussen beide groepen (37,8 en 33,6%). Urinaire calculosis zou bij zeebaarslarven geen invloed hebben op de groei en de overleving (Giavenni, 1986). Volgens Chatain (1987, persoonlijke mededeling) zou urinaire calculosis wel mortaliteit veroorzaken bij zowel zeebaars als zeebrasem. Zowat één derde van de jonge larven lijden aan deze afwijking en dit cijfer komt overeen met de sterfte tijdens de eerste tien levensdagen van de larven. Johnson en Katavic (1984) stellen dat urinaire calculosis veroorzaakt wordt door hoge concentraties aan vrije koolstofdioxide en vrije ionen gekoppeld aan de lage urineproductie van de larven.

Hoofdstuk 4: INVLOED VAN POLY-ONVERZADIGDE VETZUREN OP DE OVERLEVING, GROEI EN MORFOLOGISCHE ONTWIKKELING VAN DE ZEEBAARSLARVEN

I.4.1. Fysiologische betekenis van vetzuren

Vetzuren hebben een grote fysiologische betekenis. Enerzijds zijn ze belangrijk als energie-stockage molekulen en anderzijds zijn het belangrijke componenten van biologische membranen (fosfo- en glycolipiden). De vetzuren worden opgeslagen in de vorm van triglyceriden in de vetcellen. Bij de oxydatie van 1 g vetzuren komt 37500 J (9 kcal) vrij, t.o.v. slechts 16700 J (4 kcal) voor proteïnen en koolhydraten. Daarenboven zijn triglyceriden zeer apolair waardoor ze opgeslagen worden in een praktisch watervrije vorm. Proteïnen en koolhydraten zijn veel meer polair en binden dan ook veel meer water. De triglyceriden opgeslagen in de vetcellen worden onder hormonale controle omgezet in vrije vetzuren door het lipase-enzyme. De vrije vetzuren komen in de bloedbaan terecht waar ze binden aan het serumalbumine, en in deze vorm worden ze via het bloed vervoerd naar de weefsels. In de cellen van de energie-behoefte weefsels worden de vrije vetzuren eerst geactiveerd in het cytoplasma waarna ze in de mitochondria volledig geoxydeerd worden. Oxydatie van bijvoorbeeld één molecule palmitaat levert 129 ATP's op (Johnson en Davenport, 1971; Lehninger, 1979; Stryer, 1981).

Alle biologische membranen, zowel de plasmamembranen als de interne membranen in de eukaryote cellen, zijn samengesteld uit een dubbele laag lipiden met daarin een aantal proteïnen. Deze membranen zijn dynamische, vloeibare structuren en fungeren als hoog selectieve filters die ionenverdelingen in stand houden en de uitwisseling van o.a. nutriënten en afvalprodukten toelaten. Binnenin de dubbele lipidenlaag vertonen de afzonderlijke lipiden drie soorten bewegingen: flip-flop (migratie van de ene laag naar de andere), laterale diffusie (verwisseling van plaats met de geburen), en rotatie om de eigen lengte-as (fig. 2). Deze bewegingen dragen bij tot de vloeibaarheid van de membranen. In de celmembraan bevinden zich hoofdzakelijk 3 types lipiden: fosfo- en glycolipiden evenals cholesterol. Vooral cholesterol en de fosfolipiden spelen een grote rol in de vloeibaarheid van de membranen. Het stollingspunt van de celmembraan wordt bepaald door de types vetzuren ingebouwd in de fosfolipiden en door de hoeveelheid cholesterol aanwezig in de membraan. Het stollingspunt ligt des te lager naarmate de vetzuurketens korter zijn en meer dubbele verbindingen vertonen (fig. 3).



Figuur 2: Verschillende bewegingen van de fosfolipiden in de celmembraan

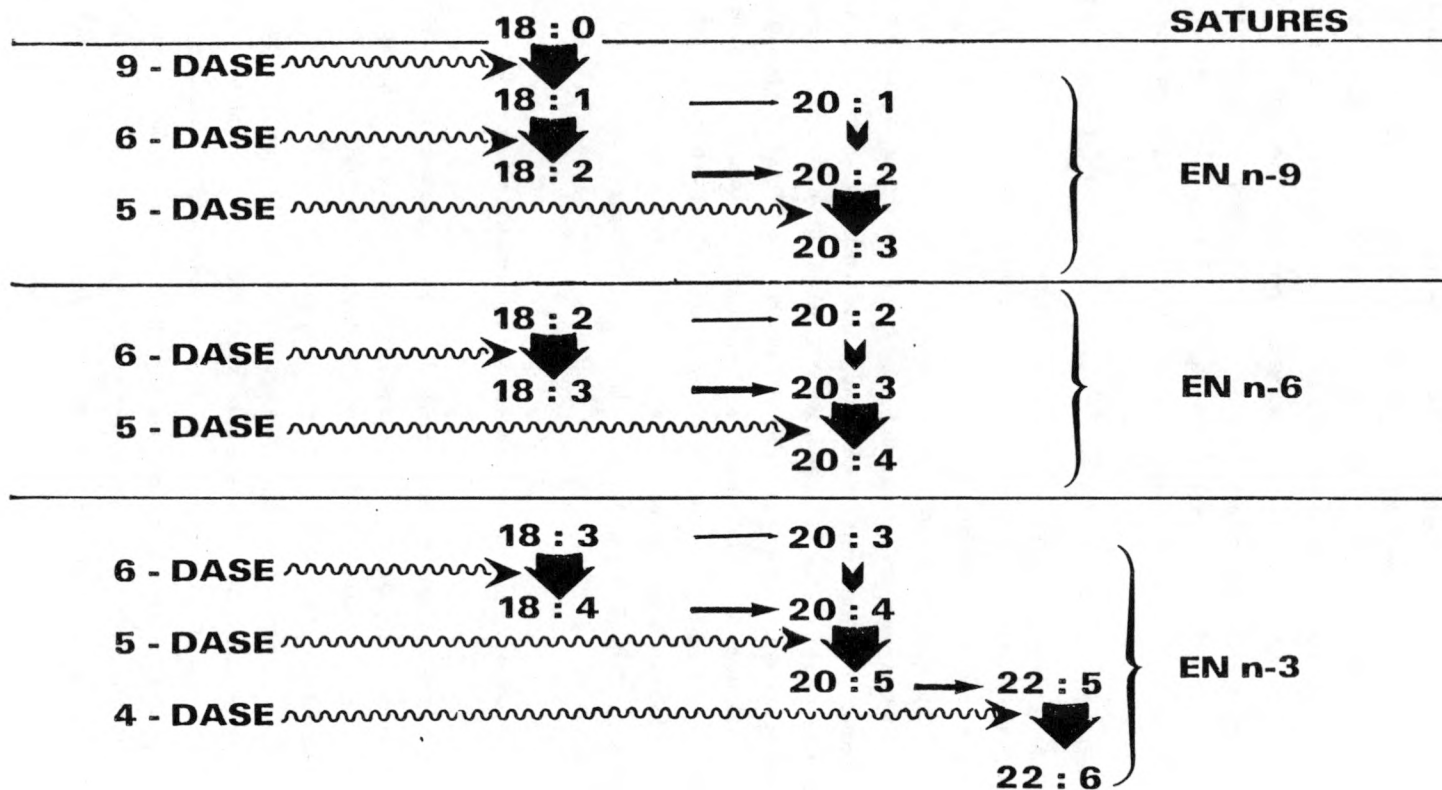
Figuur 3: Dubbele bindingen in de vetzuurketens verhogen de vloeibaarheid van de celmembraan door het samenvlakken van de ketens te bemoeilijken

Kortere ketens hebben minder de neiging om te interageren, en dubbele bindingen veroorzaken kinken in de ketens zodat ze moeilijker kunnen versmelten. Cholesterol plaatst zich tussen de fosfolipiden in en belet eveneens dat de koolstofketens te samen komen en kristalliseren (Ansell *et al.*, 1973; Stryer, 1981). Naast de reeds vermelde hoofdfuncties fungeren lipiden ook als carriers van vetoplosbare vitaminen zoals vitamine A, D, K (Watanabe, 1982). Recent (Henderson *et al.*, 1985) werd vastgesteld dat het vetzuur C20:5n3* maar vooral C20:4n6 belangrijk zijn als precursoren van prostaglandines. Bij zoogdieren blijkt het linolzuur belangrijk te zijn in verband met de zout- en waterbalans. Mariene vissen pompen voortdurend via de kieuwen NaCl naar buiten. De fosfolipiden van deze epithelia bevatten hoge hoeveelheden fosfatidylinositol (ftdIns) die rijk zijn aan C20:4n6. Deze ftdIns zijn een bekende bron van C20:4n6 voor de biosynthese van prostaglandines. De prostaglandines spelen een regulerende rol bij de zoutuitscheiding van de kieuwen (Henderson *et al.*, 1985).

I.4.2. Synthese van vetzuren

Aan de behoefte aan hogere vetzuren wordt bij vissen en andere vertebraten voldaan via opname van exogene vetzuren en via de endogene vetzuursynthese. Bij de opname van vetten aanwezig in het voedsel worden de vetten eerst gehydrolyseerd in de maag. Vervolgens wordt er in de darm door de pancreas lipase afgescheiden die de vetzuren afsplitst voornamelijk in de positie 1 en 3,

* (In de formule $C_x \cdot Y^n Z$ stelt x het aantal koolstof atomen voor, y het aantal dubbele bindingen, en geeft z de plaats aan van de eerste dubbele binding vertrekkende van het methyleinde van de koolstofketen; n vervangt de griekse letter omega).



Figuur 4 : Verlenging en desaturatie van de vetzuurketens startend vanaf de respektievelijke C18-precursoren

waarbij glycerol en vetzuren gevormd worden. De vetzuren zullen naargelang hun ketenlengte en verzadigingsgraad meer of minder gemakkelijk geabsorbeerd worden door de epitheelcellen van de dunne darm. De vetzuren worden gebonden aan vetzuurbindende proteïnen (FABP, Fatty Acids Binding Proteins), en in de vorm van chylomicronen en VLDL (Very Low Density Lipoproteins) via de bloedbaan getransporteerd naar de lever of vetweefsels voor verdere synthese. Van de lever worden ze naar de vetcellen vervoerd, terug geassembleerd tot triglyceriden en opgeslagen. Onder hormonale controle worden de vetzuren terug vrijgemaakt en vervoerd naar de targetcellen om in de energiebehoefte te voorzien. De vetzuren kunnen ook direct vervoerd worden naar de energiebehoefte cellen zonder voorafgaande opslag in de vetcellen.

De bio-synthese van vetzuren vindt plaats in zowat alle organen van de vertebraten, maar vooral in de lever en in het vetweefsel. In deze de novo-synthese, die plaatsgrijpt in het cytosol, wordt palmitaat opgebouwd vertrekkende van acetyl-Coenzyme A. De verdere verlenging en desaturatie van palmitaat verloopt via twee verschillende enzymsystemen, het eerste in de mitochondriën, het tweede in het endoplasmatisch reticulum. Als basis voor de verdere opbouw van de verschillende vetzuren dienen 4 precursoren, namelijk: palmitine-, olie-, linol- en linoleenzuur. De laatste twee precursoren kunnen echter niet gesynthetiseerd worden door vertebraten en moeten dan ook opgenomen worden via het voedsel (essentiële vetzuren) (Lehninger, 1979). Deze twee essentiële vetzuren worden dan verder verlengd en gedesatureerd tot C20:5n3 en C22:6n3, twee belangrijke vetzuren voor o.a. vissen (fig. 4). In tegenstelling tot zoetwatervissen beschikken vele mariene vissoorten niet of slechts in beperkte mate over de enzymsystemen om vertrekkende van linolzuur en linoleenzuur hogere poly-onverzadigde vetzuren op te bouwen (Cowey *et al.*, 1976; Watanabe, 1982; Léger *et al.*, 1986). Deze HUFA's dienen dan ook noodzakelijk aanwezig te zijn in het opgenomen voedsel.

I.4.3. Nutritionele waarde van *Brachionus plicatilis* en *Artemia* voor mariene vislarven

Het voeden van mariene vislarven met hun natuurlijk dieet wordt meestal aanzien als een ideale situatie. Om redenen van praktische aard (zie hoger) wordt in de aquacultuur geopteerd voor *Brachionus plicatilis* en *Artemia* als voedsel voor zowel zoetwater- als mariene vislarven. Bij het voeden van larven van de Japanse zeebrasem (*Pagrus major*) met rotiferen, gekweekt op basis van bakkersgist, stelde men dikwijls plotse hoge sterftes vast bij de vislarven. Deze sterftes werden niet vastgesteld indien de rotiferen gekweekt waren op basis van mariene *Chlorella minutissima* of kort voor het toedienen aan de vislarven aangerijkt werden met deze wiersoort (Kitajima *et al.*, 1979; Watanabe *et al.*, 1979). Watanabe *et al.* (1983) onderzochten dan ook de verschillen in mineralen, aminozuren en vetzuursamenstelling tussen rotiferen en *Artemia* gevoed met gist of *Chlorella*. Uit deze studie bleek dat de mineralen- en aminozuursamenstelling weinig verschilden tussen de

rotiferen gevoed met de verschillende voedsels. Wat de vetzuren betrof, vond men dat in mariene *Chlorella* en in rotiferen gevoed met deze wiersoort het essentiële vetzuur C20:5n3 in een veel hogere mate aanwezig was dan in bakkersgist en in rotiferen gevoed met bakkersgist (tabel 9). Uit de analyse van verschillende *Artemia*-rassen, concludeerden dezelfde auteurs dat zowat alle *Artemia*-rassen geschikt zijn voor zoetwatervislarven maar dat alleen de *Artemia*-rassen hoog in C20:5n3 bruikbaar zijn als voedsel voor mariene vislarven. In dezelfde studie werden eveneens nauplii van copepoden en rotiferen, aangerijkt met n-gist (een gist waarvan de voedingsbodem aangerijkt is met kabeljauwlevertraanolie), geanalyseerd. De resultaten toonden aan dat in deze prooidieren C20:5n3 en C22:6n3 in hoge mate aanwezig waren. Het belang van het essentiële vetzuur C22:6n3 werd op dat ogenblik nog niet ten volle beseft. Men vond immers goede resultaten indien men de larven van de "yellowtail" (*Seriola quinqueradiata*) voedde met rotiferen aangerijkt met *Chlorella*. In deze aangerijkte prooien was het gehalte aan 20:5n3 hoog, terwijl men slechts sporen van C22:6n3 aantrof.

In een andere studie (Schauer et al., 1980) vond men eveneens een duidelijk verband tussen het vetzuurpatroon en de overleving. De *Artemia*-rassen met de laagste spiegel aan C20:5n3 (San Pablo Bay) resulteerden in de laagste overleving bij de mariene vislarven. Het ras met de tweede laagste concentratie aan dit vetzuur (GSL) gaf eveneens een lage overleving. De overleving van de zoetwaterlarven werd echter niet beïnvloed door de vetzuurpatronen van de verschillende *Artemia*-rassen.

Bij de kweek van *Pagrus major* werden de beste resultaten behaald indien de aangerijkte *Artemia* naast C20:5n3 ook C22:6n3 bevatten (Léger et al., 1986). De betere resultaten die bekomen worden indien men *Pagrus major* voedt met *Acartia clausii* (Copepoda) i.p.v. met mariene *Artemia* zijn vermoedelijk ook te wijten aan de aanwezigheid van C22:6n3. Aanrijking van *Artemia* met *Isochrysis galbana* (rijk aan HUFA's) leidt eveneens tot betere resultaten bij de kweek van mariene vislarven. In verschillende studies werden betere resultaten vermeld bij de kweek van mariene vislarven indien men naast nauplii van *Artemia* eveneens nauplii van copepoden toevoegt (Watanabe et al., 1978; Barnabé, 1986; Kuhlman et al., 1981; Jones en Houde, 1987). Léger et al. (1986) stellen dan ook terecht dat omwille van de zeer lage concentraties aan C22:6n3 in *Artemia* nauplii het steeds nodig is om deze aan te rijken met oliën rijk aan HUFA. Een alternatieve methode bestaat erin de gisten die men aanwendt als voedsel voor *Brachionus plicatilis*, te kweken op een voedingsbodem waaraan men kabeljauwlevertraanolie toevoegt (indirekte methode). De hogere poly-onverzadigde vetzuren worden in de gisten ingebouwd en op hun beurt door de rotiferen (met uitzondering van C22:6n3) opgenomen (Dendrinis en Thorpe, 1987). Een tegenwoordig fel bestudeerde methode bestaat erin *Brachionus* en *Artemia* aan te rijken met microcapsules (Walford en Lam, 1987). Acht uur na aanrijking van de rotiferen met deze microgeïncapsuleerde diëten vond men een verviervoudiging van het percentage HUFA's (17,1 %). In tegenstelling met de experimenten van Dendrinis en Thorpe (1987) werd er ook een sterke stijging

Tabel 9: Vetzuurpatronen (in oppervlakte-procent) van
bakkersgist en verschillende prooidieren al of
niet aangerijkt met verschillende substanties
Bron: (1) Watanabe et al., 1983;
(2) Dendrinos en Thorpe, 1987

	Bakkers- gist (2)	<i>Brachionus plicatilis</i>				<i>Acartia clausii</i> (1)
		b.gist (1)	b.gist (2)	Chlorella (1)	ω -gist (1)	
14:0	0,3	/	3,3	/	/	12,1
16:0	8,3	6,1	20,3	14,4	10,0	18,3
16:1n7	38,2	27,2	30,8	20,4	10,0	10,7
18:0	4,1	3,8	1,6	2,2	2,0	5,0
18:1n9	43,9	26,8	13,1	10,1	22,0	5,4
18:2n6	2,8	8,9	0,7	4,7	2,0	1,1
18:3n3	0,5	0,6	3,1	0,1	0,7	1,0
18:4						
20:0	/	/	0,4	/	/	/
20:1	0,2	3,6	/	1,7	8,0	2,3
20:3n3						
20:4n6	/	2,0	1,1	4,1	3,0	1,0
20:4n3	/	0,4	/	0,2	/	0,4
20:5n3	/	1,9	tr	27,7	9,0	16,6
22:1	/	0,9	tr	1,8	/	/
22:5n3	/	0,3	tr	3,0	2,0	0,8
22:6n3	/	0,5	2,2	tr	7,0	12,3
HUFA:	0	3,1	3,3	30,9	21,0	30,1

(b.gist: bakkersgist, *Saccharomyces cerevisiae*)

van C22:6n3 waargenomen (van 0,3 naar 5,9 %). Vergelijkbare resultaten werden gevonden voor *Artemia*, alhoewel de stijging van de totale HUFA's niet zo opvallend was als in de rotiferen, wel is er een sterke stijging van C22:6n3 (0,1 naar 3,6 %).

I.4.4. Essentiële vetzuren bij vissen

De vetzuurbehoeften bij vissen verschillen van soort tot soort, weliswaar zijn er parallellen te vinden tussen vissen die voorkomen in eenzelfde milieu (koud, warm, zoet, zout). Vooral bij de salmoniden werd de behoefte aan EFA (essentiële vetzuren, "essential fatty acids") uitgebreid onderzocht, en werd vooral de noodzaak aan n3-vetzuren van de linoleenfamilie vastgesteld (C18:3n3) (Castledine en Buckley, 1982). Castell *et al.* (1972) stelden vast dat de behoefte aan C18:3n3 1% van het dieet bedraagt bij regenboogforellen. Bij deze concentratie vindt men maximale groei en voedselconversie. Uit latere studies bleek echter dat het percentage C18:3n3 20% van de totale vetten in het dieet dient te bedragen voor een normale groei (Watanabe, 1982). Warmwatervissen zoals de Amerikaanse katvis (*Ictalurus punctatus*) en de karper (*Cyprinus carpio*) hebben naast linoleenzuur ook behoefte aan linolzuur (C18:2n6). De beste resultaten werden verkregen met een dieet waarin linol- en linoleenzuur elk 1% bedroegen. De oosterse paling (*Anguilla japonica*) vertoont dezelfde EFA-behoefte, maar in een lagere mate namelijk elk 0,5% van het dieet. Niettegenstaande linolzuur en linoleenzuur beschouwd worden als essentiële vetzuren bij deze zoetwatervissen, blijkt toch dat deze vetzuren in feite startvetzuren zijn in de opbouw van C22:6n3. Forellen gevoed met een dieet waarin de essentiële vetzuren ontbreken, vertonen zwakke groei, lage voedselconversies, hoge mortaliteiten, bleke lever, verhoogde hepatosomatische index, opzwellen van de mitochondriën en shocksyndroom. Toediening van linolzuur herstelt in zekere mate de groei. Toevoeging van linoleenzuur doet echter alle ziektesymptomen verdwijnen (Castledine en Buckley, 1982). Uit verschillende waarnemingen blijkt dat linoleenzuur zeer snel omgezet wordt in C22:6n3. Aangezien C22:6n3 het eindproduct is van de verlenging en desaturatie van linoleenzuur en aangezien C22:6n3, wanneer het toegevoegd wordt aan het dieet in staat is de symptomen van essentiële vetzuurontbering op te heffen, stellen Léger en Fremont (1981) dan ook dat C22:6n3 als het werkelijk essentieel vetzuur moet beschouwd worden. Rechtstreekse toediening van C22:6n3 gaf gelijkwaardige resultaten qua groei van forellen als aanrijking met linoleenzuur (Takuchi en Watanabe, 1976). Reeds in 1972 was men op de hoogte van het feit dat mariene platvissen (pladijs en tarbot) over slechts beperkte mogelijkheden beschikten voor de elongatie en desaturatie van linolzuur en linoleenzuur. Jonge tarbotten en regenboogforellen werden radio-actief gemerkte vetzuren toegediend. Na 6 dagen werd nagegaan waar de radio-actief gemerkte vetzuurketens zich bevonden. Uit de resultaten kwam naar voor dat tarbot slechts in zeer beperkte mate deze C18-vetzuren konden verlengen (3 tot 15%). Bij regenboogforellen werd 70% van de radio-activiteit teruggevonden onder de vorm

van C22:6n3 (Owen et al., 1975). Toevoeging van linolzuur verdubbelt de groei van tarbot in vergelijking met een dieet deficiënt in hogere vetzuren, terwijl de groei met een factor 3 tot 7 verhoogt bij aanrijking van het dieet met respectievelijk linoleenzuur en kabeljauwleverolie (Cowey et al., 1976). Kanazawa et al. (1979) gingen eveneens na bij 6 verschillende soorten in welke mate ze linoleenzuur konden ombouwen tot hogere poly-onverzadigde vetzuren. Na 24 uur stelden zij vast dat bij forel 100% omgebouwd was, bij ayu-vis (*Plecoglossus altivelus*) 36%, bij japanese paling 20%, bij japanese goudbrasem 15% en bij een sebastussoort (*Sebasticus marmoratus*) slechts 7%. Haring zou geen enkele mogelijkheid hebben tot verlenging (Léger en Fremont, 1981). Deze mogelijkheid tot verlenging zou waarschijnlijk aanvankelijk aanwezig geweest zijn bij mariene vissen. Daar echter het marien zoöplankton hoge hoeveelheden poly-onverzadigde vetzuren bevat, zou deze verlenging niet meer nodig geweest zijn en verloren gegaan zijn (Watanabe, 1982). De rode zeebrasem (*Chrysophrys major*), de zwarte zeebrasem (*Mylio macrocephalus*) en de "yellow tail" (*Seriola quinqueradiata*) hebben weinig behoefte aan linoleenzuur. De "yellow tail" en de rode zeebrasem vertonen een betere groei, een betere voedselconversie en een hoger hematocriet- en hemoglobinegehalte wanneer het dieet kabeljauwleverolie bevat in plaats van een graanolie. Toevoeging van 3% linoleenzuur aan het dieet van "yellow tail" resulteert in een vette lever, dit in tegenstelling met forellen waar dit verschijnsel zich voordoet bij afwezigheid van dit zuur (Watanabe, 1982). Hoe dan ook blijkt duidelijk dat de hogere poly-onverzadigde vetzuren (C20:5n3 en C22:6n3) beschouwd moeten worden als de essentiële vetzuren voor mariene vissen. Daar ze zelf deze hogere vetzuren niet kunnen opbouwen, is het noodzakelijk ze extra toe te dienen via het voedsel. Het belang van deze hogere vetzuren blijkt ook uit de vetzuuranalyse van wilde gevangen mariene vissen. Culkin en Morris (1970) analyseerden 8 verschillende niet-commerciële vissoorten uit de oostelijke zone van de Noord-Atlantische Oceaan en stelden vast dat bij 7 van de 8 soorten C22:6n3 in hoge mate aanwezig was (8 tot 20% van de totale vetzuren). C20:5n3 was in veel mindere mate vertegenwoordigd (2,5 tot 5,5%, tabel 11). In de Baltische haring (*Clupea harengus*) varieerde de hoeveelheid C22:6n3 tussen 8,6 en 21%, afhankelijk van de periode van vangst. Opvallend was de zeer hoge aanwezigheid van C20:5n3 (7 tot 19%) (Linko et al., 1985). Deze veranderingen in vetzuursamenstelling zijn te wijten aan seizoensveranderingen in zoöplanktonorganismen (Kaitaranta et al., 1986). De dooier van haring en tong bevat eveneens een hoge hoeveelheid aan C22:6n3 en in mindere mate C20:5n3 (Tocher et al., 1985; Dendrinos en Thorpe, 1987). Deze gegevens bevestigen nogmaals het belang van HUFA's voor mariene vissen en voor vissen in het algemeen.

Tabel 10: Vetzuurpatronen van pas ontloken nauplii van *Artemia* afkomstig van verschillende geografische oorsprong (uitgedrukt in oppervlakte procent van het elutiepatroon)
(Bronnen: (1) Schauer et al., 1980; (2) Dendrinis en Thorpe, 1987)

F.A.M.E	Australië (1)	Brazilië (1)	SFB 313 (1)	SFB 321 (1)	SFB (2)	SP 1628 (1)	Italië (1)	Utah (1)
14:0	1,34	1,57	0,99	1,57	1,3	0,43	1,53	0,93
14:1	2,23	0,81	1,27	0,74		2,26	3,30	1,45
15:0	0,34	0,67	0,16	0,58		0,25	0,11	0,11
15:1	0,15	0,24	0,20	0,13		0,46	0,54	0,37
16:0	13,45	15,42	10,33	12,13	12,6	7,79	15,23	11,78
16:1	9,97	10,79	13,27	19,52	3,9	5,24	10,38	5,64
16:2n7						1,51	2,94	
16:3n4	3,87	3,88	2,09	2,32		2,44	3,28	2,90
18:0	3,07	2,79	6,83	2,90	4,2	3,08	3,17	4,07
18:1n9	28,23	35,86	26,97	31,20	26,9	29,15	29,05	28,58
18:2n6	5,78	9,59	9,35	3,69	6,3	4,60	6,79	4,60
18:3n3	14,77	4,87	17,33	5,16	28,6	33,59	6,35	31,46
18:4n3	4,37	0,96	3,26	1,28		4,88	1,01	3,10
20:1n9	0,37	0,52	0,41	0,35	0,4	0,35	0,42	0,37
20:2n6	0,12	0,06	0,06			0,24	0,20	0,09
20:3n6	0,79	2,76	1,01	2,23	0,4	0,05	1,47	0,48
20:3n3			1,48	2,69	0,5	1,48		
20:5n3	10,50	8,98	4,06	12,44	2,2	1,68	13,63	3,55
22:6n3	0,26	0,06						

(Australië: Shark Bay; Brazilië: Macau; U.S.A.: San Francisco Bay, SF 313 - 321 - San Pablo Bay, SP 2628; Italië: Margherita di Savoia; USA: Utah - Great Salt Lake)

Tabel 11: Vetzuurpatronen (opervlakteprocent) van acht mariene niet-commerciële vissoorten uit de oostelijke zone van de N-Atl. Oceaan, alsook van haring en tong (dooier). (bron; 1-8: Culkin en Morris, 1970; 9: Linko et al., 1985; 10: Dendr Thorpe, 1987; 11: Tocher et al., 1985)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
12:0	tr	0,2	0,6	0,3	2,6	0,6	0,3	0,1	0,1	/	/
14:0	6,3	6,1	4,1	7,8	4,7	3,9	3,0	9,2	3,5	2,8	1,8
16:0	26,3	23,0	26,1	22,6	23,4	24,8	28,7	19,9	20,8	19,9	27,6
16:1	10,5	13,3	6,5	9,8	9,6	13,9	5,5	10,9	6,8	8,7	3,4
18:0	5,9	4,8	4,6	6,7	5,3	4,5	5,0	5,4	2,8	2,9	2,7
18:1	26,4	18,1	22,0	16,9	18,4	26,8	20,9	12,2	16,0	16,8	10,6
18:2n6	0,6	0,9	0,6	2,2	2,3	0,5	0,4	2,2	2,7	1,7	0,5
18:3n3	tr	/	/	tr	1,0	tr	tr	0,3	3,1	0,9	0,3
20:0	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0,1	/
20:1	3,5	4,5	0,7	3,7	2,7	1,1	0,7	3,4	0,1	1,2	0,5
20:3	tr	/	/	tr	tr	/	/	/	0,1	1,9	/
20:4	0,8	3,2	2,5	1,9	2,6	1,8	2,2	1,2	2,0	0,1	1,0
20:5n3	1,0	2,5	4,8	4,8	5,1	2,8	5,5	5,6	12,2	4,6	13,7
22:4n3	1,6	2,3	/	/	/	0,7	tr	0,5	/	/	/
22:5n3	0,7	0,5	1,1	1,1	2,0	0,4	1,8	2,1	0,8	/	1,0
22:6n3	2,2	8,1	17,3	11,5	10,6	10,4	19,8	14,8	21,1	21,6	31,4

(1: *Diaphus taaningi*; 2: *Diaphus dumerili*, borstelmondvissen; 3: *Lampanyctus alatus*, lantaarnvissen; 4: *Hygophum macrochir*; 5: *Ceratoscopelus townsendi*; 6: *Idiacanthus fasciola*, diepzeedraakvis; 7: *Gonostoma elongatum*, borstelmondvissen; 8: *Macrorhamphosus scolopax*, snipvis; 9: *Clupea harengus*, haring; 10: *Solea solea* (dooier, tong); 11: *Clupea harengus* (dooier))

I.4.5. EFA-deficiëntie bij mariene vislarven

De invloed van HUFA's werd de laatste jaren uitvoerig beschreven bij zowat alle gekweekte mariene vissoorten (zeebaars: Gatesoupe en Luquet, 1981; Robin *et al.*, 1981; Katavic, 1986; Van Ballaer *et al.*, 1985; Franicevic *et al.*, 1987; zeebrasem: Lisac *et al.*, 1987; pladijs: Owen *et al.*, 1972; tarbot: Cowey *et al.*, 1976; Witt *et al.*, 1984; Bell *et al.*, 1985; Japanse zeebrasem: Kitajima, 1979; Kitajima *et al.*, 1979; Fujita, 1979; Watanabe *et al.*, 1979).

Van Ballaer *et al.* (1985) vonden sterke verschillen in overleving van zeebaarslarven bij toediening van verschillende *Artemia*-rassen. Rassen met een hogere HUFA-inhoud (7 tot 11%) leidden tot significant hogere overleving, hoewel geen significante verschillen in groei opgemerkt werden. Een gelijkaardige studie werd uitgevoerd door Franicevic *et al.* (1987). In de condities waar de zeebaarslarven gevoed werden met *Artemia*-nauplii aangerijkt met SELCO (een olie rijk aan polyonverzadigde vetzuren, Artemia Systems N.V., Gent) vonden deze onderzoekers een snellere groei en een betere overleving na 42 dagen. Uit analyses van de verschillende *Artemia*-rassen bleek dat de groeiverschillen eerder te verklaren zijn door verschillen in C22:6n3-concentraties dan aan verschillen in C20:5n3-concentraties. De overleving werd echter wel beïnvloed door de concentratie aan C20:5n3: de overleving nam toe met stijgende concentratie aan C20:5n3. Katavic (1986) stelde vast dat de sterfte bij zeebaarslarven zeer hoog is indien ze eenzijdig gevoed worden met *Artemia*-nauplii en dat deze sterfte veel lager is indien de zeebaarslarven naast *Artemia* ook copepoden toegediend krijgen. Deze resultaten zijn vermoedelijk te verklaren door het feit dat deze copepoden-nauplii, meestal rijk aan HUFA, essentiële vetzuurdeficiënties van *Artemia* compenseren. M.a.w. deze extra copepoden fungeren als een zekere aanrijking. Vandaar dat deze extra aanrijking in verschillende larvekweekcentra toegepast wordt (Barnabé, 1984). Witt *et al.* (1984) vergeleken de groei, de overleving en de vetzuurpatronen van tarbotlarven, gevoed enerzijds met rotiferen en *Artemia* en anderzijds met verschillende copepoden. Op dag 21 was de groei in groep 2 significant hoger dan in groep 1 ($14,8 \pm 1,2$ mm versus $11,1 \pm 1,6$ mm). De overleving vertoonde een gelijkaardig resultaat (42% versus 8% tussen dag 12 en 33). Bij analyse van de vetzuurpatronen van de tarbotlarven in de 2 groepen werden grote verschillen gevonden in HUFA-concentraties. In een andere studie werden 3 groepen jonge tarbot gevoed met een dieet verschillend in vetzuursamenstelling (dieet 1 : 10% visolie; dieet 2 : 10% palmitinezuur; dieet 3 : 8,7% palmitinezuur en 1,3% HUFA). Enkel de vissen gevoed met dieet 1 vertoonden een significante groei over 15 weken. In de andere 2 condities werden er hoge mortaliteiten aangetroffen. Vissen gevoed met een HUFA-deficiënt dieet vertoonden sterke degeneratieverschijnselen van de kieuwen : verdwijning van de chloridecellen, accumulatie van cellulair materiaal in de interlamellaire ruimtes, afbraak van het epithelium van de primaire en secundaire filamenten. Daar de chloridecellen een normale levensduur van 6 dagen vertonen, zou de degeneratie van de kieuwepithelia een gevoelige indicator zijn voor EFA-deficiënties (Bell *et al.*,

1985). Ter compensatie van de lage concentratie aan vetzuren in de rotiferen en in de verschillende geografische rassen van *Artemia* rijkt men deze prooidieren aan met specifieke groenwieren (*Isochrysis galbana*) of met visoliën, beide rijk aan n3-HUFA's (Watanabe, 1982). Recent is er in het kader van het I.C.E.S.-programma (International Conseil for the Exploration of the Seas) (Vigo, Spanje, 1988) een onderzoeksprogramma gestart waarbij voor zowat alle gekweekte mariene vissoorten onderzocht wordt welke de invloed is van HUFA's op groei, overleving en morfologische ontwikkeling van de larven.

Hoofdstuk 5: INVLOED VAN DE VERLICHTINGSSTERKTE OP DE OVERLEVING, GROEI EN MORFOLOGISCHE ONTWIKKELING VAN DE ZEEBAARSLARVEN

I.5.1. Zonneradiatie buiten de atmosfeer

De elektromagnetische radiatie van de zon beslaat een breed veld van golflengtes, van radiogolven over het zichtbaar spectrum tot X- en Y-golven. Negennegentig procent van de energie situeert zich in het gebied 0,2 tot 4 μm . De radiatie buiten dit beperkt gebied heeft weinig belang voor het aardoppervlak. Daar de aarde een elliptische baan rond de zon beschrijft, varieert de zonneradiatie over het ganse jaar met $\pm 3,3\%$. De gemiddelde zonneradiatie over het ganse jaar wordt de zonneconstante genoemd en bedraagt 139 m W cm^{-2} of $1,99 \text{ cal cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ (langley/min). Bij de passage door de atmosfeer verliest een parallelle monochromatische radiatiestraal energie, enerzijds door absorptie door atmosferische gassen en door partikels (waterdruppels bvb.), en anderzijds door verspreiding (Rayleigh verspreiding). Bij heldere hemel wordt ongeveer 61 % van de radiatie uiteindelijk geabsorbeerd door het aardoppervlak, terwijl dit bij bewolkt weer slechts 28 % is (Blackwell, 1966; Collingbourne, 1966).

I.5.2. Metingen binnen beperkt golflengtegebied

Bij metingen van de zonneradiatie op het aardoppervlak is een instrument gevoelig in het 0,3-3 μm voldoende. Het daglicht wordt gedefinieerd als de zonneradiatie dat in staat is het menselijk oog te stimuleren. Dit is binnen het 0,4 tot 0,7 μm gebied met een piekgevoeligheid bij 0,55 μm (Collingbourne, 1966). Wel afgelijnde groepen binnen enkele vertebratenklassen (zoals vissen, vogels en mammalia) zijn in staat tot kleurwaarnemingen. Bij mammalia hebben alleen de primaten deze eigenschap (Odum, 1971).

I.5.3. Lichtgrootheden

Bij de studie van het licht wordt er onderscheid gemaakt tussen lichtstroom, lichtsterkte, luminantie en verlichtingssterkte.

Het licht zelf wordt gedefinieerd als dit deel van het spectrum waarvoor het menselijk oog gevoelig is (400 tot 750 nm).

De lichtstroom is de hoeveelheid licht die per tijdseenheid wordt uitgezonden of opgevangen. De eenheid van lichtstroom is de lumen.

De lichtsterkte is de lichtstroom die in een bepaalde richting per eenheid van ruimtehoek wordt uitgezonden. De eenheid is de candela (vastgesteld in 1937 door het "Bureau International des

Poids et des Mesures"). De lichtsterkte van een integrale straler met een oppervlak van 1 cm^2 (zwart lichaam) bij de temperatuur gelijk aan het stolpunt van platina bedraagt 60 candela (cd). De lichtsterkte is in het algemeen afhankelijk van de richting. Daar de gehele ruimte 12,56 steradiaal telt, is de gemiddelde sferische lichtsterkte van de lichtbron met een lichtstroom van 1000 lumen ca. 80 candela. Zo is de lichtsterkte van een 100 Watt gloeilamp in alle richtingen ca. 100 cd.

De luminantie of de objectieve helderheid gemeten in een punt van een vlak in een bepaalde richting, is het quotient van de lichtsterkte van een oppervlakte-element in de beschouwde richting en het schijnbare oppervlak. Dit laatste is de projectie van het oppervlakte-element op een vlak loodrecht op de beschouwde richting (waarnemingsrichting). De eenheid van luminantie is de cd/m^2 . De luminantie van de zon is ca. 15.000.000 cd/m^2 .

De verlichtingssterkte is de hoeveelheid licht per oppervlakte-eenheid die in een punt op een vlak (werkvlak) valt. De eenheid is lux (latijn = licht). Een oppervlak heeft een verlichtingssterkte van 1 lux als er per m^2 een lichtstroom van 1 lumen op valt. Bij een verlichtingssterkte van 1 lux is het juist mogelijk de ons omgevende voorwerpen te onderscheiden. Dertig tot vijftig lux volstaan om te werken. Vijfhonderd lux volstaat om te lezen. Bij een zonnige dag is de verlichtingssterkte ongeveer 100.000 lux. Bij de kweek van ééncellige wieren wordt normaal 3000 tot 7000 lux als verlichtingssterkte gebruikt (Wiggers, 1971; Voss, 1980).

I.5.4. Lichtinval op het water

Op de grens lucht-water wordt een deel van het licht gereflecteerd. Naarmate de invalshoek groter is, wordt een groter percentage teruggekaatst (figuur 5 a, b). Voor een bepaalde golflengte is:

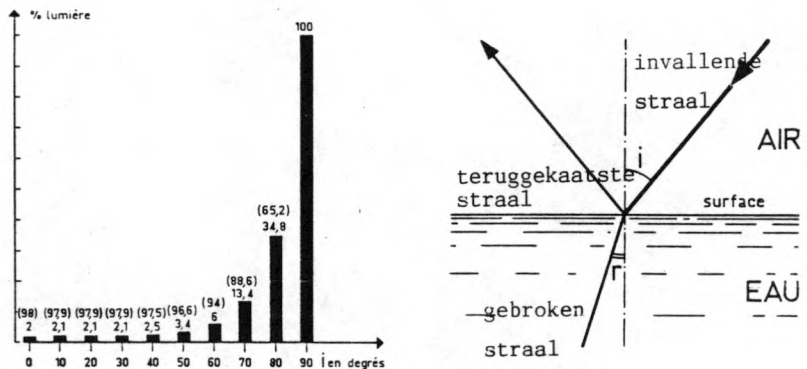
$$\sin r = \frac{\sin i}{n}$$

i = invalshoek

r = reflectiehoek

n = refractie-index

De refractie-index is een variabele afhankelijk van de golflengte van het invallend licht, van de temperatuur en de saliniteit van het water.



Figuur 5 A: Procentuele terugkaatsing van het invallend licht in functie van de invalshoek (i) (tussen haakjes: % gebroken licht, andere cijfers: teruggekaatst licht)

Figuur 5 B: Breking van het licht op het wateroppervlak (I: invallende lichtstraal, R: teruggekaatste lichtstraal, G: gebroken lichtstraal)

De voortplantingssnelheid van het licht vermindert in het water tot zowat 225.000 km/s met als gevolg een verandering van de golflengte, wat vertaald wordt in een kleurverandering.

De lichtstroom daalt met toenemende diepte wat uitgedrukt wordt door volgende vergelijking (wet van Lambert-Beer):

$$F = F_0 e^{-kx}$$

F_0 = lichtstroom aan het oppervlak

x = afgelegde weg

k = milieuvariabele (afhankelijk van de golflengte)

Infrarood golven worden bij het binnentreden in het water onmiddellijk geabsorbeerd. De rode stralen verminderen met 95 % over een diepte van 5 m. De overige kleuren verdwijnen achtereenvolgens in functie van de dalende lengte van de golven. Blauw vermindert met slechts 50 % over een diepte van 30 m. Vandaar de blauwgroene kleur van de zeeën.

DEEL II: EIGEN ONDERZOEK

Hoofdstuk 1: KWEEK VAN ZOO- EN FYTOPLANKTON

II.1. Kweek van de rotifeer (*Brachionus plicatilis*)

II.1.1. Kweekmethode

Daar de kweek van *Brachionus plicatilis* uitsluitend op basis van verse wieren bijzonder duur is, werd nagegaan of het mogelijk is deze rotiferen te kweken op basis van andere goedkopere voedsels. Uit verschillende Japanse studies kwamen gisten naar voor als een mogelijk alternatief, alleen of in combinatie met verse wieren (Hirata en Mori, 1967 fide Buyl, 1983; Kitajima, 1987). Bij het uittesten van verschillende voedsels voor *Brachionus plicatilis* werd zoveel mogelijk gewerkt bij kweekomstandigheden die volgens de literatuurgegevens voor deze rotiferen optimaal zijn:

- temperatuur : 26 ± 1 °C,
- saliniteit : 18 ± 2 pro mille,
- pH : $8,0 \pm 0,2$,
- fotoperiode : continu,
- verlichtingssterkte : 1000 tot 1300 lux.

De proeven werden vooral uitgevoerd in omgekeerd opgestelde flessen van één of anderhalve liter inhoud met puntbeluchting. Er werd meestal gestart met een volume van 500 ml en een densiteit van 50 rotiferen per ml of m.a.w. met een begin aantal van 25000 rotiferen. Soms werd de reproductie van de rotiferen gevolgd in grotere volumes (aquaria van 20 tot 40 liter). Elke dag werd via volumeaanpassingen de densiteit herleid tot 50 rotiferen/ml. Voor de kweek van de rotatoria werkten we steeds met artificieel zeewater (HW, Wiegandt, Krefeld, W-Duitsland). Voor een uniforme weergave van de resultaten werd voor elke proef de beginsituatie herkend voor 100 rotiferen.

II.1.1.2. Invloed van verschillende voedsels op de reproductiesnelheid van *Brachionus plicatilis*

II.1.1.2.1. Gisten (bakkers- en biergist)

In een eerste fase werd *Brachionus* gekweekt op basis van "verse" bakkersgist (*Saccharomyces cerevisiae*). Per dag werd er 1 g gist/ 10^6 rotiferen toegediend over drie voedingsbeurten (9, 13 en 18 uur). Naast gewone "verse" bakkersgist werd ook biergist (*Saccharomyces uvarum*) getest. Biergist werd ons ter beschikking gesteld door de N.V. Stella Artois te Leuven, ofwel als pure

kultuur (propagatiegist) ofwel als reeds gebruikt produkt na het biergistingsproces. Uit tellingen met de Bürkerkamer bleek dat de propagatiegist een tweemaal hogere concentratie aan gistcellen bevatte dan de reeds gebruikte gist ($5,6 \cdot 10^9$ t.o.v. $2,7 \cdot 10^9$ cellen/g). Dit was te wijten aan een hoger vochtgehalte in de biergist en aan de aanwezigheid van graanpellets in de niet-pure kultuur. De dagelijks toegediende hoeveelheid biergist bedroeg 2,5 g/ miljoen rotiferen voor de zuivere kultuur en 5 g/ miljoen rotiferen voor de reeds gebruikte gist, dit eveneens verspreid over drie voedingstijdstippen.

Resultaten en bespreking

Figuur 6 geeft de toename van het aantal *Brachionus* weer, bij voeding met bier- en bakkersgist, in de verschillende proeven uitgevoerd tussen november 84 en maart 85.

Wat bakkersgist betreft, vonden we grote verschillen in reproductiesnelheid over de verschillende experimenten. Soms stelden we een bevredigende toename van de raderdieren vast, met als beste resultaat een stijging van het aantal *Brachionus* van 100 naar 3562 over 16 dagen. Meestal was de reproductiesnelheid veel trager (van 100 naar 423 over 12 dagen), gevolgd door een snelle ineenstorting van de kultuur. Later bleek de versheid van de gebruikte gist, waarover we slechts weinig controle hadden, een bepalende factor te zijn voor de al of niet bruikbaarheid van de gist. Volgens Takakuwe en Watanabe (1980) degraderen de fosfolipiden in de celmembraan tijdens de bewaring van gist. Daarenboven zijn de gistcellen niet in staat onverzadigde vetzuren te synthetiseren in anaërobe omstandigheden (Henry, 1982). Naast een degradatie van de fosfolipiden dalen de reserves aan koolhydraten, ter voldoening van de energiebehoefte van de levende gistcellen (Edelman *et al.*, 1980).

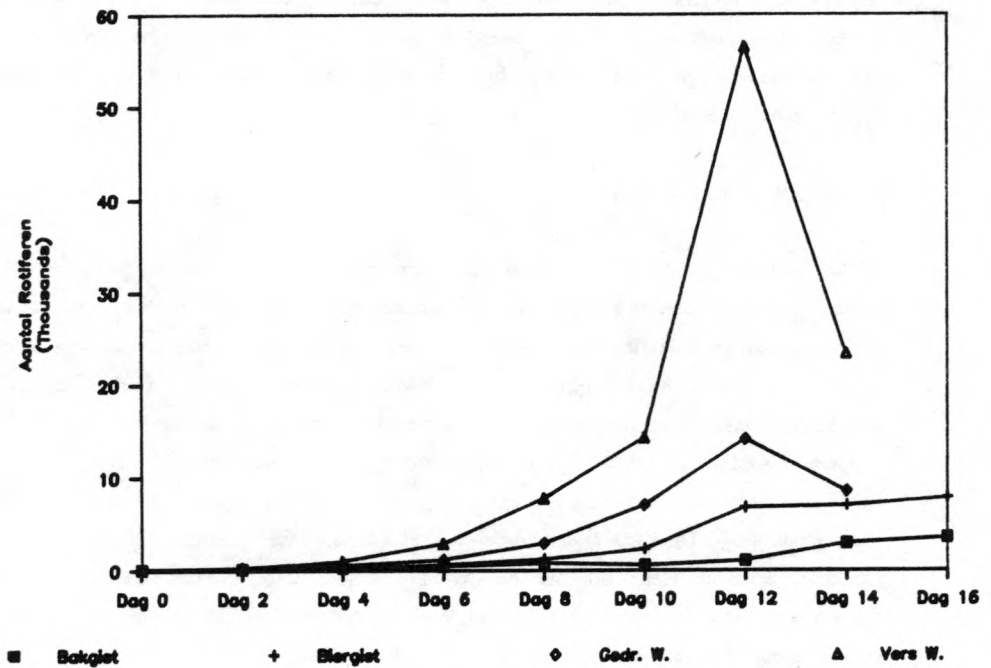
Bij de kweek van *Brachionus* op basis van een pure kultuur biergist vonden we, in vergelijking met bakkersgist, een tweemaal snellere toename (van 100 naar 7840 over 16 dagen). Bij het aanwenden van de reeds gebruikte biergist was de reproductie van de rotiferen zeer traag (van 100 naar 749 over 12 dagen) en telkenmale stierf de kultuur af binnen de twee tot drie weken. Reeds veelvuldig gebruikte biergist heeft een verminderde gistingsactiviteit. Bij de veroudering zouden er volgens Verachtert (pers. mededeling, 1988) wijzigingen in de celmembraan optreden en een daling van de poly-onverzadigde vetzuren. Alhoewel we met biergist een snellere reproductie verkrijgen dan met bakkersgist, is biergist toch minder geschikt als praktisch voedselregime voor de rotiferen. Bij het gebruik van zowel verse als reeds gebruikte biergist bemerkten we steeds een zeer sterke ciliatenontwikkeling. Dit maakte het noodzakelijk om zowat om de week het water volledig te verversen, wat duur en arbeidsintensief is. Bij het gebruik van bakkersgist daarentegen, was de ciliatenontwikkeling zeer laag zodat het slechts om de maand noodzakelijk was de kultuur te verversen.

II.1.1.2.2. Wieren (gedroogde en verse wieren)

De wisselende resultaten met gisten noodzaakten ons om groenwieren toe te dienen, ofwel commercieel gedroogde wieren (Mikrozell, Hobby, Dohse, Duitsland) ofwel levende, verse wieren (*Tetraselmis suecica*). De gedroogde wieren werden dagelijks toegediend a rato van $0,5 \text{ g}/10^6$ rotiferen. Bij de experimenten met verse wieren startten we met $4 \cdot 10^6$ wiercellen per ml cultuurmedium.

Resultaten en bespreking

Bij het gebruik van Mikrozell hadden we aanvankelijk zeer goede resultaten (toename van de



Figuur 6: Toename van het aantal rotiferen per ml (*Brachionus plicatilis*) bekomen in verschillende kweekexperimenten bij toediening van verschillende voedsels (bakkersgist, biergist, gedroogde wieren, verse wieren)

rotiferen van 100 naar 14167 over 12 dagen). Vanaf januari 1986 stelden we een veel tragere reproductie vast (van 100 naar 520 over 14 dagen) bij toepassing van dit gedroogd wierpreparaat

onder identieke omstandigheden als in de voorgaande proeven. Deze grote verschillen waren vermoedelijk te wijten aan de samenstelling van de gedroogde wierpreparaten die waarschijnlijk varieerden van lot tot lot. Bepaalde loten bevatten vermoedelijk wieren die zeer geschikt zijn voor raderdieren en andere niet.

De toename van *Brachionus plicatilis* gevoed met levende groenwercellen (*Tetraselmis suecica*) is zeer hoog (van 100 naar 73.200 over 10 dagen), waaruit de bijzondere geschiktheid van *Tetraselmis suecica* blijkt. Die geschiktheid kan ook afgeleid worden uit het aantal amiktische wijfjes die eieren dragen en uit het aantal eieren dat elk wijfje draagt. Vijftig procent van de *Brachionus* gevoed met gedroogde wieren droegen één ei. Drie dagen na het starten met levende wieren vonden we na controle 18 wijfjes zonder eieren, 13 wijfjes met één ei, 6 wijfjes met drie eieren en één wijfje met 4 eieren of m.a.w. 38 wijfjes droegen tesamen 35 eieren. Volgens Requera et al. (1982) dragen amiktische wijfjes gevoed met gisten maximaal één ei, zelden twee. Rotiferen gevoed met levende wieren dragen meerdere eieren, waarbij 4, 5 of zelfs 7 eieren geen zeldzaamheid zijn. Ook uit dit criterium blijkt de geschiktheid van *Tetraselmis suecica* als voedsel voor *Brachionus plicatilis*.

I.1.2.2.4. Algemene bespreking

Bij de kweek van de niet-selektieve filtreerder *Brachionus plicatilis* werden door vele onderzoeksgroepen een hele reeks voedsels uitgetest (groenwieren, blauwwieren, bruin- en roodwieren, gisten, bacteriën) (Buyl, 1983). Vergelijking van verschillende studies waarin het effect van deze voedsels op de reproductie van *Brachionus* nagegaan werd, is moeilijk omdat de verschillende onderzoeksgroepen werken met verschillende rotifeerrassen, bij verschillende temperaturen en saliniteiten (Snell et al., 1983). Niettegenstaande deze verschillen is het duidelijk dat levende wieren een snellere reproductie van de *Brachionus* teweeg brengen dan verse gisten (Snell et al., 1984). De oorzaken voor deze verschillen in reproductiesnelheid zijn, bij ons weten, nog niet onderzocht. Het is aldus niet geweten of de verschillen in reproductiesnelheid te wijten zijn aan een verschil in verteerbaarheid of aan de nutritionele samenstelling (vetzuren, aminozuren, koolhydraten) of andere onbekende factoren. Scott en Baynes (1978) vonden relatief weinig verschillen in de biochemische samenstelling van rotiferen (lipiden-, proteïnen-, koolhydraatgehalte) gevoed met verschillende wiersoorten (*Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Phaeodactylum tricornutum* en *Pavlova lutheri*). Parsons et al. (1961) vonden eveneens weinig verschillen in de biochemische samenstelling (% vet, % koolhydraten, % proteïnen) van elf wiersoorten. Dit sluit echter niet uit dat verschillen in vetzuur- en aminozuursamenstellingen van de wieren, wel een verklaring kunnen bieden voor de verschillen in reproductie van de rotiferen. Zo is het welbekend dat *Isochrysis galbana* een veel hogere hoeveelheid HUFA's bevatten dan andere veel toegepaste wiersoorten (Boussiba et al., 1988). Van de meest gebruikte gistsoorten, en

wiersoorten is de biochemische samenstelling welbekend, maar welke factor verantwoordelijk is voor de verschillen in reproductie van de rotiferen is niet geweten. De meeste studies evalueren de geschiktheid van een bepaald voedsel louter op de reproductiesnelheid. Zo vond Trotta (1983) een rotiferenvermenigvuldiging van 100 naar 4280 over zeven dagen bij het gebruik van *Tetraselmis suecica*. In onze experimenten vonden we als beste resultaat een stijging van de rotiferen van 100 naar 16500 over 6 dagen. Trotta (1983) werkte evenwel met een saliniteit van 36 pro mille terwijl wij werkten bij de optimale saliniteit voor *Brachionus plicatilis* (18 pro mille). Algemeen wordt *Chlorella* sp. beschouwd als het beste levende wier voor *Brachionus plicatilis* (Hirayama *et al.*, 1979), waarbij de coëfficiënt voor natuurlijke aangroei of de relatieve reproductiesnelheid (r) gelijk is aan 0,97 per dag.

$$r = \frac{\log_e N_t - \log_e N_0}{t}$$

N_0 = aantal amiktische wijfjes op dag 0

N_t = aantal wijfjes na x dagen

t = x dagen

Bij een combinatie van *Chlorella* met het blauwwier *Schizothrix* bekwamen Snell *et al.* (1983) een r -waarde gelijk aan 1,09, wat overeenkomt met een 1,3 maal snellere reproductie dan bij *Chlorella* of *Schizothrix* alleen. Droog *Chlorella*-poeder gaf een reproductie van 13 *Brachionus*/ml tot 434/ml over 16 dagen ($r = 0,22$; Hirayama en Nakamura, 1976), terwijl in onze experimenten met gedroogde wieren eenzelfde stijging werd waargenomen over tien dagen ($r = 0,35$).

Een belangrijke factor bij deze voedingsproeven is de concentratie van het voedsel in het kweekmedium. *Brachionus* gevoed met *Chlorella saccharophila* vertoont de beste conversiefactor bij één miljoen cellen per ml. Voor een maximale populatiegroei is evenwel een minimum van $3 \cdot 10^6$ cellen/ml vereist (Yamasaki *et al.*, 1984). Rotiferen gekweekt op basis van *Chlorella stigmatophora* vertonen een maximale reproductiesnelheid bij een wierconcentratie van 2 tot 8 miljoen cellen per ml (Lubzens, 1981). Hoewel deze concentraties afhankelijk zijn van de densiteit van de rotiferen en de saliniteit, berekende Hirata (1980) dat het benodigde wiertvolume voor de kweek van rotiferen 5 tot 10 maal het totale rotifeerkweekvolume bedraagt. Dit is niet alleen economisch onhaalbaar maar bovendien is de rotifeerkweek volledig afhankelijk van een andere zeer delicate levende kweek wat een zeer kritische situatie is voor de larvekweekcentra (Lubzens, 1985).

Hirata en Mori (1967 fide Buyl, 1983) testten 3 verschillende diëten, namelijk 100 % *Chlorella*, 100 % bakkersgist, en 50 % *Chlorella* en 50 % bakkersgist; waarbij ze geen verschil in reproductie vonden tussen 100 % *Chlorella* en het gemengde dieet. De rotiferen in de conditie met uitsluitend bakkersgist vertoonden tijdens de eerste week een gelijkmatige reproductie maar stierven tijdens

de tweede week praktisch volledig af. Ook Kitajima (1987) stelt dat toevoeging van *Chlorella* noodzakelijk is voor de rotiferenopkweek. De zwakkere resultaten op uitsluitend bakkersgist is volgens Al-Khars *et al.* (1980) te wijten aan het afsterven van de gistcellen tijdens de bewaringstijd met als gevolg een daling van de nutritionele waarde, en aan osmotische degeneratieverschijnselen die optreden wanneer de verse gistcellen in een marien of brakwatermilieu gebracht worden. Beide processen geven aanleiding tot ongewenste bacteriënfloora's (Al-Khars *et al.*, 1980). In Japan werd dan ook zeer snel overgestapt naar mariene gisten (*Saccharomyces marinus*) die het voordeel bieden iso-osmotisch te reageren, zodat men ze zelfs kan laten voortplanten in zeewater (Buyl, 1983). In verschillende studies (Hirayama en Watanabe, 1973; Hirata, 1974; James *et al.*, 1983) bleek bovendien dat de nutritionele waarde van mariene gisten hoger is dan bakkersgist, wat zich uitte in een snellere reproductie van de rotiferen.

Uit de voedselproeven door onszelf verricht kwam geen enkel ideaal voedsel naar voor voor de kweek van *Brachionus plicatilis* (goedkoop, weinig vervuילend, grote voedingswaarde die tot uiting komt in de snelle reproductie van de rotiferen). Vandaar dat ook wij opteerden voor een gemengd voedingsschema waarbij de rotiferen dagelijks gevoed werden met "verse" bakkersgist en waarbij we twee maal per week supplementair verse groenwieren (*Tetraselmis suecica*) toedienden. Over een periode van één maand dienden we aan onze rotiferenkweek (een totaal volume van 200 liter) 784 g bakkersgist toe en 63 liter wieren met een gemiddelde celconcentratie van $3 \cdot 10^6$ cellen/ml. Dit voedselschema liet ons toe op een relatief goedkope wijze een semicontinue massakweek van rotiferen over vier jaren (1984-1988) in stand te houden. Tijdens de zomer werd een stockcultuur behouden (40 liter) die hoofdzakelijk gevoed werd met levende wieren, terwijl tijdens de actieve larvekweekperiode (oktober-mei) de kweek uitgebreid werd tot 250 liter met een densiteit van 200 tot 300 rotiferen per ml.

II.1.2. Kweek van groenwieren (*Tetraselmis suecica*)

II.1.2.1. Algemene beschouwingen

Bij de kweek van larven van mariene vissen is het noodzakelijk levende wieren te kweken als aanvullend voedsel voor de massakweek van rotiferen. Het gebruik van wieren in de aquakultuur is wijd verbreid. De Pauw (1981) stelt dat meer dan 40 wiersoorten gebruikt worden voor dit doeleinde. In Japan wordt er jaarlijks 400.000 ton algen gekweekt, hoofdzakelijk macroalgen, vooral voor rechtstreekse menselijke consumptie maar ook microalgen als voedsel voor schaaldieren en vislarven (Robin, 1984). In de aquakultuur worden wieren gebruikt als rechtstreeks voedsel voor larven van garnalen, tweekleppigen, kreeften, en mariene weekdieren, of onrechtstreeks (via zoöplanktonorganismen) voor de larven van vissen (De Pauw en Pruder, 1987).

Bij de selectie van een geschikt wier dient men rekening te houden met de afmetingen van de ééncellige wieren, de verteerbaarheid van de celwand, de eventuele toxiciteit van de wieren en de biochemische samenstelling (De Pauw *et al.*, 1984). Juario en Storch (1984) toonden aan dat *Tetraselmis* en *Isochrysis galbana* rechtstreeks bruikbaar zijn als voedsel voor "milkfish", terwijl *Chlorella* niet rechtstreeks bruikbaar is omwille van zijn harde celwand. Verder speelt vooral de moeilijkheidsgraad van het kweekproces een doorslaggevende rol in de selectie van een geschikt wier.

Hoewel we continu konden beschikken over enten van *Dunaliella tertiolecta* werd toch geopteerd voor *Tetraselmis suecica* omwille van de hogere vetzuurconcentraties en de lagere moeilijkheidsgraad voor het opkweken. De lagere concentratie aan poly-onverzadigde vetzuren in *Dunaliella* gaf o.a. aanleiding tot lage kweekresultaten bij *Crassostrea gigas* (Langdon en Waldock, 1981). Verschillende onderzoekers beschreven *Tetraselmis suecica* als een geschikte wiersoort voor larven van Bivalvia (Walne, 1970; Mollo en Tudesq, 1984) en voor rotiferen (Person-le Ruyet, 1976). *Tetraselmis* is gemakkelijk opneembaar door de rotiferen (celdiameter 7-10 μm) en is zoals vele mariene microalgen sterk euryhalien (Mollo en Tudesq, 1984). De snelste vermenigvuldiging wordt verkregen bij een saliniteit van 25 tot 35 pro mille (Fabregas *et al.*, 1984). Andere wiersoorten zoals *Chlorella* sp. geven een nog betere reproductie van *Brachionus* en worden in het verre Oosten veelvuldig gebruikt voor de kweek van de rotiferen (Hirayama en Watanabe, 1973; Hirata, 1974; Hirata, 1980; Trotta, 1980; James *et al.*, 1983), maar waren tot voor enkele jaren moeilijk te verkrijgen in Europa.

Voor de kweek van *Tetraselmis suecica* volgden we zoveel mogelijk de methode beschreven door Mollo en Tudesq (1984).

II.1.2.2. Kweek van *Tetraselmis suecica* op laboratoriumschaal

II.1.2.2.1. Kweekomstandigheden.

Bij de kweek van wieren zijn volgende essentiële zaken vereist voor een snelle vermenigvuldiging: water, nutriënten, licht en CO_2 .

Water. Bij de kweek van zoutwaterwieren wordt ofwel natuurlijk ofwel artificieel zeewater gebruikt. Bij het gebruik van natuurlijk zeewater is het noodzakelijk om het water te steriliseren om contaminaties met andere organismen te vermijden. In het C.O.B. te Brest wordt het zeewater geautoclaveerd (Anonymus, 1978a). In ons geval werd geopteerd voor artificieel zeewater. Na het oplossen van de zouten wordt het water 24 uren sterk belucht en nadien over nominale kaarsfilters (0,2 μm ; weerhouden 90 % van de partikels groter dan 0,2 μm) gefilterd. In een latere fase werd het water alleen gefilterd over een wollen filterzak (5 μm).

Tabel 12: Samenstelling van het medium van Provasoli (naar Mollo en Tudesq, 1984)

Totaal volume: 1 liter (gedestilleerd water)

NaNO ₃	:	3500	mg
Na-glycerofosfaat	:	500	mg
Vitamine B ₁₂	:	0,1	mg
Thiamine	:	5	mg
Biotine	:	0,05	mg
Tris-buffer	:	5000	mg
Metaal-mix (A)	:	250	ml
Fe-oplossing (B)	:	25	ml

(A) Metaal-mix: totaal volume 1 liter (gedestilleerd water)

H ₃ BO ₃	:	1140	mg
Fe Cl ₃ 6H ₂ O	:	49	mg
Mn SO ₄ 4H ₂ O	:	164	mg
Zn SO ₄ 7H ₂ O	:	22	mg
Co SO ₄ 7H ₂ O	:	4,8	mg
Na-EDTA	:	1000	mg

(B) Fe-oplossing: totaal volume 500 ml (gedest. water)

Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) 6H ₂ O:	351	mg
Na ₂ -EDTA :	330	mg

De oplossingen samenvoegen en op pH 7,8 brengen

Tabel 13: Samenstelling van het medium van Walne (naar Mollo en Tudesq, 1984)

Totale oplossing: 1 liter (gedestilleerd water)

Fe SO ₄ 7H ₂ O	:	278	mg
Na H ₂ PO ₄ 2H ₂ O	:	4000	mg
Na NO ₃	:	30000	mg

Nutriënten. Voor de kweek van wieren werden een hele reeks nutritionele media ontwikkeld (medium van Walne, van Provasoli, van Conway; Mollo en Tudesq, 1984). Voor de kweek van *Tetraselmis suecica* op ons laboratorium werd aan elke liter wiermedium 10 ml medium van Provasoli en 5 ml medium van Walne toegevoegd (tabel 12 en 13).

Licht. Als lichtbron werden een reeks horizontaal en verticaal geplaatste buislampen gebruikt (type Sylvania, 40 Watt). De wierkulturen werden continu belicht, de verlichtingssterkte bedroeg 3000 tot 4000 lux ter hoogte van de wand van de recipiënt.

Beluchting en CO₂. Bij de niet-steriele opkweek van de wieren worden de recipiënten (erlenmeyers van 5l of plastic zakken van 30 liter) sterk belucht (22 liter/uur/5l erlenmeyer) om de wiercellen continu in suspensie te houden. De lucht wordt aangerijkt met 1 tot 3 % CO₂ (waarbij dalingen van de pH onder de waarde 7 als limiet genomen worden) teneinde het fotosyntheseproces te bevorderen, zoals aangetoond voor *Tetraselmis suecica* (Fabregas *et al.*, 1984).

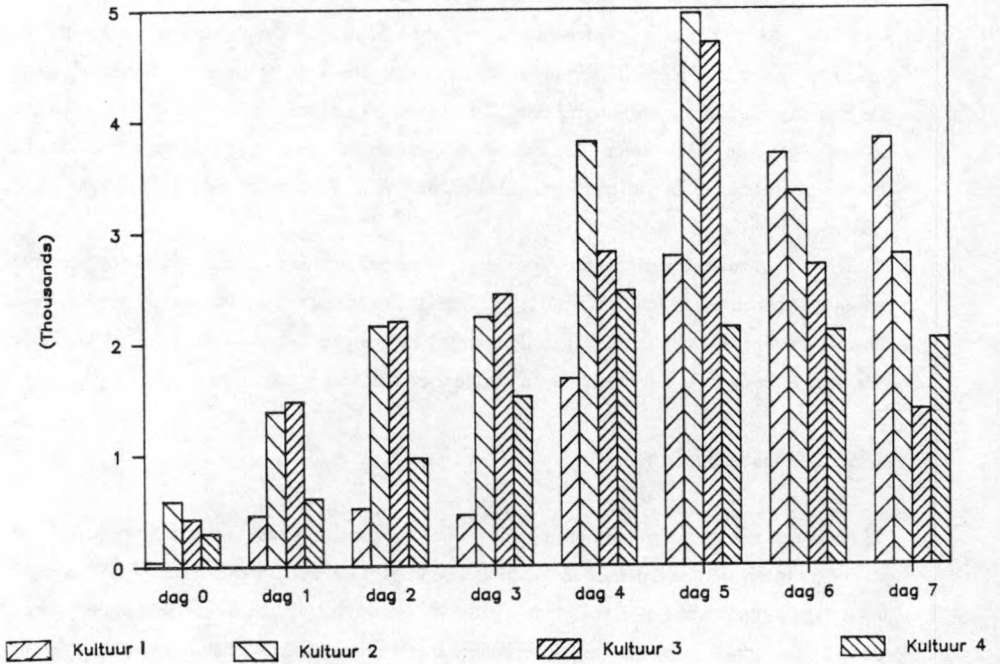
Fysische en chemische variabelen. Voor deze variabelen werden de waarden uit de literatuur gevolgd (Anonymus, 1978; Fabregas *et al.*, 1984). De temperatuur was steeds gelijk aan de omgevingstemperatuur ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) en de saliniteit bedroeg 28 ± 2 pro mille. De pH werd sterk beïnvloed door de CO₂-doorborreling en daalde over één week van 8,2 naar 7.

II.1.2.2.2. Kweekmethode

Bij de kweek van wieren werden er enerzijds kleine volumes gekweekt in steriele omstandigheden en anderzijds grotere volumes in niet-steriele kondities (foto 3). De kleine steriele kulturen zijn noodzakelijk om continu over een mono-kultuur te beschikken, die steeds kan aangewend worden als ent voor nieuwe opkweken. Bij deze steriele kweek is het noodzakelijk om zowel het zeewater als de nutriëntenoplossing te steriliseren. Op ons laboratorium werd gestart met een ent (2 x 1 ml) *Tetraselmis suecica* verkregen van het centrum DEVA-SUD te Palavas-les-Flots (Frankrijk). Deze ent werd overgebracht in een erlenmeyer (250 ml) waaraan 100 ml gesteriliseerd zeewater en respectievelijk 1 ml en 0,5 ml medium van Provasoli en Walne toegevoegd werden. Telkenmale één week later werd het volume verhoogd tot 200 ml, 500 ml en 1000 ml, waarbij 10 ml medium van Provasoli en 5 ml medium van Walne per liter wierkweek werden toegevoegd. Deze opkweek gebeurde in erlenmeyers (afgesloten met glaswol en aluminiumfolie) zonder beluchting, waarbij de erlenmeyers driemaal per dag geschud werden voor het terug in suspensie brengen van de wiercellen.

Wanneer de wierpopulatie een densiteit bereikte van 2.10^6 cellen/ml, werd een ent afgenomen terwijl de rest verdeeld werd over 2 flessen van 5 liter. In deze niet-steriele grotere volumes werden de wierkulturen continu doorborreld met lucht extra aangerijkt met CO₂. Eénmaal de kleur van de wieroplossingen donkergroen, werden ze geoogst en als voedsel gebruikt voor de

rotiferen. Figuur 7 geeft de toename weer van vier wierpopulaties. Daaruit blijkt dat 5 tot 6 dagen na het opstarten van de niet-steriele kulturen en afhankelijk van de begindensiteit, een maximale densiteit bereikt kan worden van bijna $5 \cdot 10^6$ cellen per ml. Het is belangrijk om de wieren op dit moment te oogsten, daar wieren toxisch worden in de plateau-faze (De Pauw *et al.*, 1984).



Figuur 7: Toename van de celconcentratie (miljoen cellen per ml) van het groenwier *Tetraselmis suecica* over zeven dagen in vier verschillende culturen (erlenmeyers, 5 l)

Hoofdstuk 2: KWEEK VAN DE LARVALE STADIA VAN DE ZEEBAARS (*DICENTRARCHUS LABRAX*)

II.2.1. Kweek van zeebaarslarven in volledig gesloten systemen met artificieel zeewater

II.2.1.1. Algemeen

In de meeste kwekerijen maakt men, omwille van de hoge verwarmingskosten, gebruik van een recirculatiesysteem voor de kweek van zeebaarslarven. Niettemin wordt elke dag 10% van het totale volume ververscht (Anonymus, 1978; Coves, 1985a, b; Barnabé, 1986). Daar er op het laboratorium voor Ecologie en Systematiek der Dieren geen natuurlijk zeewater voorhanden was, was het noodzakelijk om gebruik te maken van artificieel zeewater. De vraag stelde zich dan ook of kwalitatieve verschillen tussen artificieel en natuurlijk zeewater een ongunstig effect zou hebben op de overleving van de fragiele zeebaarslarven. Deze vraag is door ons niet rechtstreeks onderzocht, maar de overlevingscijfers en de groei bekomen met artificieel zeewater waren "minstens" vergelijkbaar met de centra die gebruik maakten van natuurlijk zeewater. Omwille van de hoge kosten van dit artificieel zeezout was het noodzakelijk een installatie te ontwerpen met een zeer intensieve filtratie (mechanisch en biologisch) van het gebruikte water. M.a.w. waar andere centra gebruik maakten van een 90% recirculatiesysteem, was de recirculatie in ons systeem praktisch 100% (verliezen door verdamping en spuien werd evenwel aangevuld; 0,4%/dag).

In wat volgt geven we :

- een beschrijving van de opstelling;
- de toegepaste fysische en chemische waarden tijdens onze experimenten;
- de kwalitatieve en kwantitatieve studie van de bacteriën in de recirculatiesystemen;
- een methode voor de optimalisatie van het voedingsschema.

II.2.1.2. Opstelling

Tijdens dit onderzoek werden verschillende tanks uitgetest voor de kweek van zeebaarslarven:

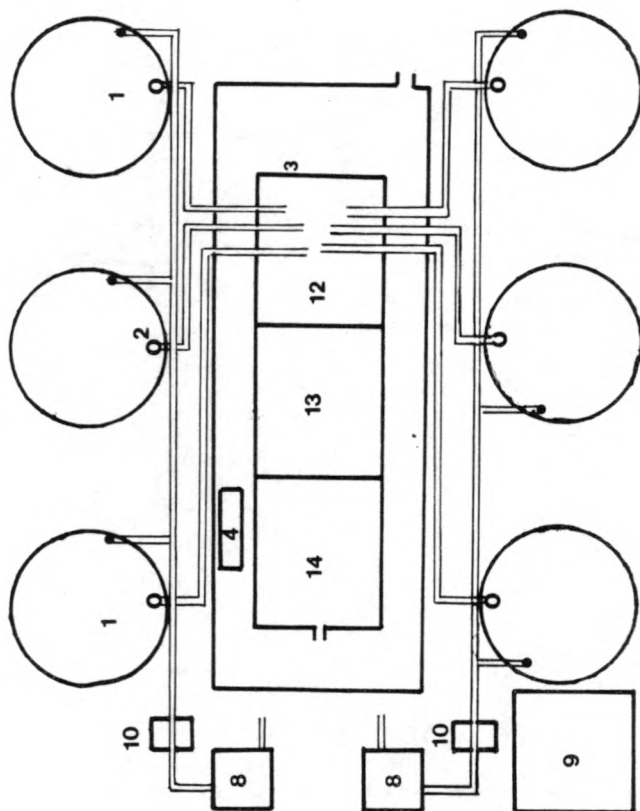
- rechthoekige aquaria (opstelling a);
- cilindrische tanks met platte zeebodem (opstelling b); en
- cilinderkonusche polyester tanks (opstelling c).

Opstelling a bestond uit twee reeksen van negen rechthoekige aquaria elk met een inhoud van 10 liter. Elke reeks aquaria was aangesloten op een U.V.-filter, een afkoelingssysteem, een mechanische- en een biologische filter. De bio-filter bestond uit twee honderdlitervaten gevuld met bio-disks als dragermateriaal (nat oxydatiebed). De tweede opstelling (b) bestond uit twee

dubbele boven elkaar geplaatste aquaria, elk met een inhoud van 250 liter. In de twee bovenste aquaria werden ronde kooien geplaatst voor de larven, de bodem bestond uit 50 μm gaas. De twee onderste aquaria dienden terug als filterinstallatie, waarbij poly-ethyleenlinten gebruikt werden als dragermateriaal. De derde opstelling (c) omvatte twee afzonderlijke cilinderkonische tanks met 80 liter inhoud. Deze tanks waren verbonden met een gelijkaardige filterinstallatie als in opstelling a. Uit de verschillende proeven bleek dat alleen de cilinderkonische tanks geschikt waren voor de kweek van zeebaarslarven. De tanks met een platte bodem (zowel opstelling a als b) waren uit praktisch oogpunt gezien niet bruikbaar omwille van het tijdrovend dagelijks afhevelen van de dode larven en voedselresten op de bodem. Dit leidt bovendien tot een dagelijkse verstoring van de larven eventueel gepaard gaande met negatieve stressinvloeden zoals ook vermeld door Johnson en Katavic (1984). Het niet verwijderen van het dood materiaal leidt tot schimmelvorming en bacteriegroei. De overleving was dan ook zeer laag (0-1,6% op dag 45) terwijl in de konische tanks een hogere overleving bereikt werd (8,3% op dag 45). Op basis van deze bevindingen werd besloten uitsluitend cilinderkonische tanks te gebruiken. Er werden twee nieuwe opstellingen gebouwd. De eerste opstelling bestond uit 6 cilinderkonische tanks van 80 liter gebouwd rond een centrale filterinstallatie (figuur 8), terwijl een tweede gelijkaardige opstelling bestond uit 8 cilinderkonische tanks van 30 liter, eveneens met een centrale filterinstallatie. Het water wordt opgepompt uit de onderste filterbak, waarbij het onderweg gesteriliseerd wordt via U.V.-lampen, en in de larvetanks verdeeld. Het water in de larvetanks stroomt vervolgens naar de mechanische filtertank, die bestaat uit opeenvolgende compartimenten gevuld met glaswol en actieve kool. In deze tank bevindt zich bovendien een ozonfilter (50mg O_3/min) verbonden met een afschuimer ter verwijdering van organische afbraakprodukten (o.a. fenolen). Vervolgens vloeit het water af naar de onderste filtertank waar het water eerst via een wollen filterzak (5 μm) extra gefilterd wordt en daarna biologisch gezuiverd. Als biologische filter werd het "nat oxydatiebed systeem" toegepast, met als dragermateriaal bio-disks. In een nat oxydatiebed is het filtermateriaal continu ondergedompeld, waarbij het noodzakelijk is de filter sterk te beluchten. Na dit laatste zuiveringsproces wordt het water gekoeld en terug naar de tanks gestuurd via luchtgekoelde pompen (EHEIM, Deizisau, W.-Duitsland).

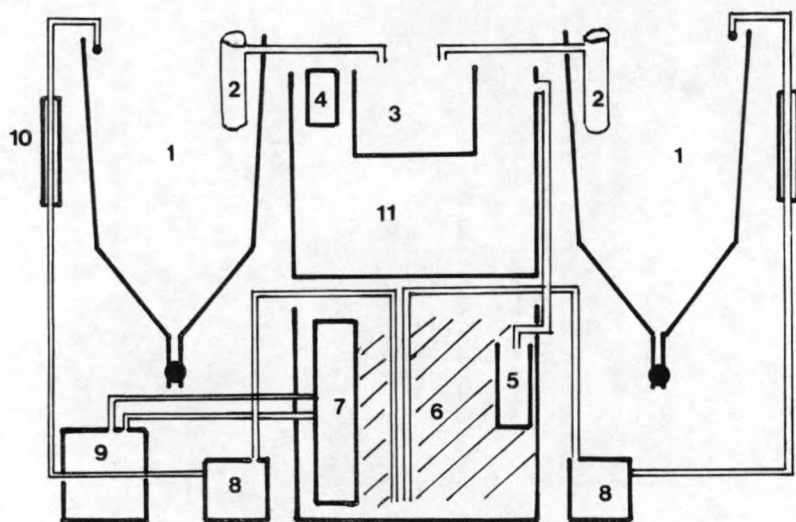
Een belangrijk detail in deze opstelling zijn de zeven die zich in de tanks bevinden, met als doel de vislarven evenals de zoöplanktonorganismen in de tanks te houden. De eerste jaren gebruikten we gelijkaardige zeven als beschreven door Girin (1979) (fig. 9a). Deze zeven laten echter niet het wegstromen van het oppervlakte water toe, zodat we opteeden voor een ander type zeef (fig. 9b) waarbij het oppervlaktewater en vuil gemakkelijker verwijderd kon worden. Voor de verschillende stappen van de larvenkweek werden verschillende gaasopeningen gebruikt:

- incubatie van de eieren: 750 μm ;
- ontluiking van de larven: 250 μm ;

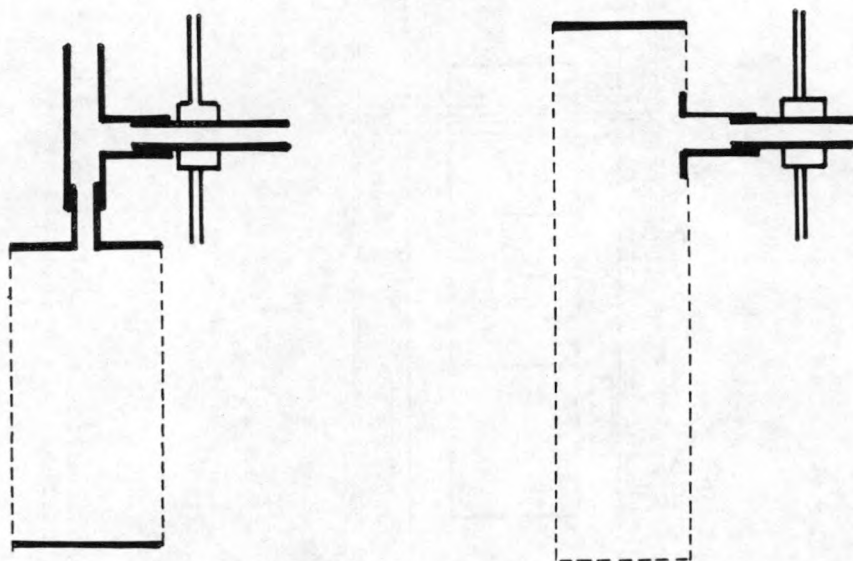


1. Larvetanks
2. Zeef 1
3. Mechanische filtertank
4. Afschuimer + ozon
5. Wollen filterzak (3-5 micron)
6. Biologische filter
7. Koude spiraal
8. Pomp
9. Afkoelinstallatie
10. U.V.-filter
11. Bovenste filtertank
12. Zeef 2
13. Glaswol
14. Aktieve kool
- Kraan

Figuur 8: Schematische voorstelling van de installatie voor de kweek van zeebaarslarven (A. Bovenzicht)



Figuur 88: Zijaanzicht



Figuur 9: Schematische voorstelling van de verschillende types zeven

- rotiferen voedingsperiode: 100 μm ;
- *Artemia*-voedingsperiode: 250 μm ; en
- voedingsperiode met korrels: 750 μm .

Aanvankelijk werden er tijdens de voeding met rotiferen 50 μm zeven gebruikt. Omwille van verstopping en problemen met de oppervlaktespanning werden deze later vervangen door 100 μm zeven. Bij het gebruik van deze laatste ontsnapt een deel van de rotiferen uit de tanks. Deze worden echter opgevangen door een secundaire zeef (50 μm) in de mechanische filtertank. Het gebruik van de grotere zeven heeft bovendien het voordeel dat tijdens de nacht de rotiferen die zich reeds lang in de tank bevinden, verwijderd worden.

II.2.1.3. Fysische en chemische variabelen

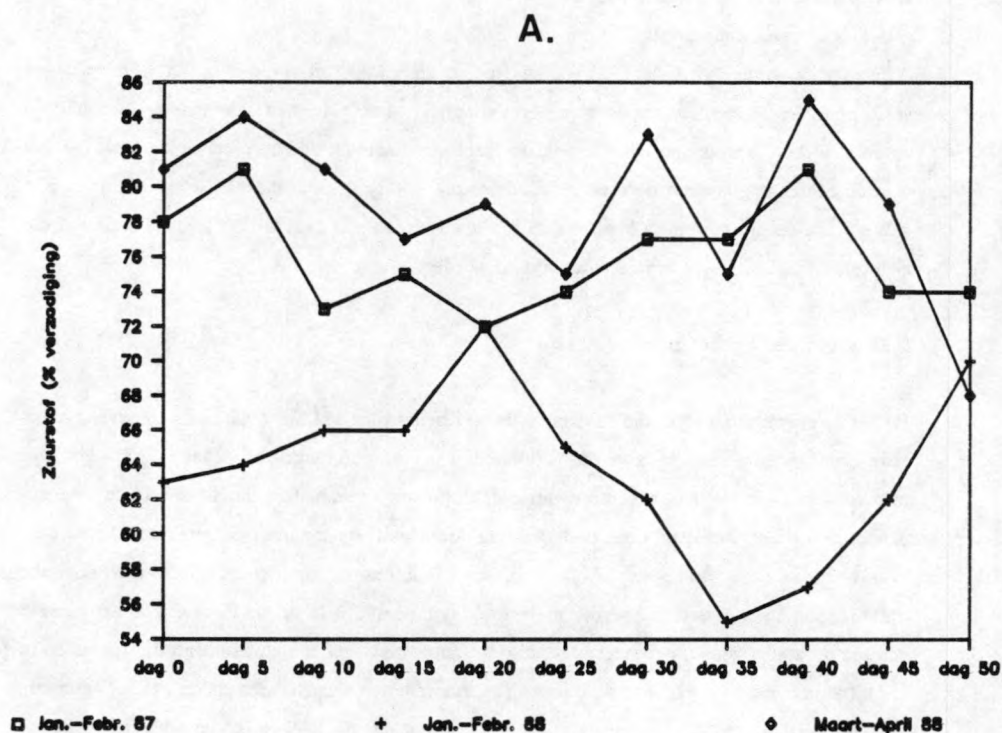
Bij het opstellen van de fysische en chemische variabelen voor de kweek van zeebaarslarven tijdens onze experimenten baseerden we ons voornamelijk op literatuurgegevens (tabel 6, 7, 8). Het was in deze studie niet de bedoeling deze variabelen opnieuw te evalueren, hoewel we in de loop van de proeven en op basis van onze ondervinding de invloed van sommige variabelen relativeerden. Wel werd in deze studie de invloed van de lichtintensiteit op de groei, de morfologische ontwikkeling en de overleving verder onderzocht (zie deel V). In figuur 10 geven we het verloop van temperatuur, debiet, lichtintensiteit, nitriet-, ammoniak-, en zuurstofconcentratie (gemeten in het uitstromende water) tijdens de laatste drie experimenten waar telkens goede overlevingscijfers behaald werden (dag 40: jan.-maart. 87, 1-7,1%; jan.-maart 88, 24,9-66,7% en april-mei 88, 32,5-46,6%).

Andere variabelen niet weergegeven in de figuren zijn:

- belichting: continu;
- larvendensiteit: 60-100 larven/liter;
- beluchting: 17-35 ml/min.80 liter.

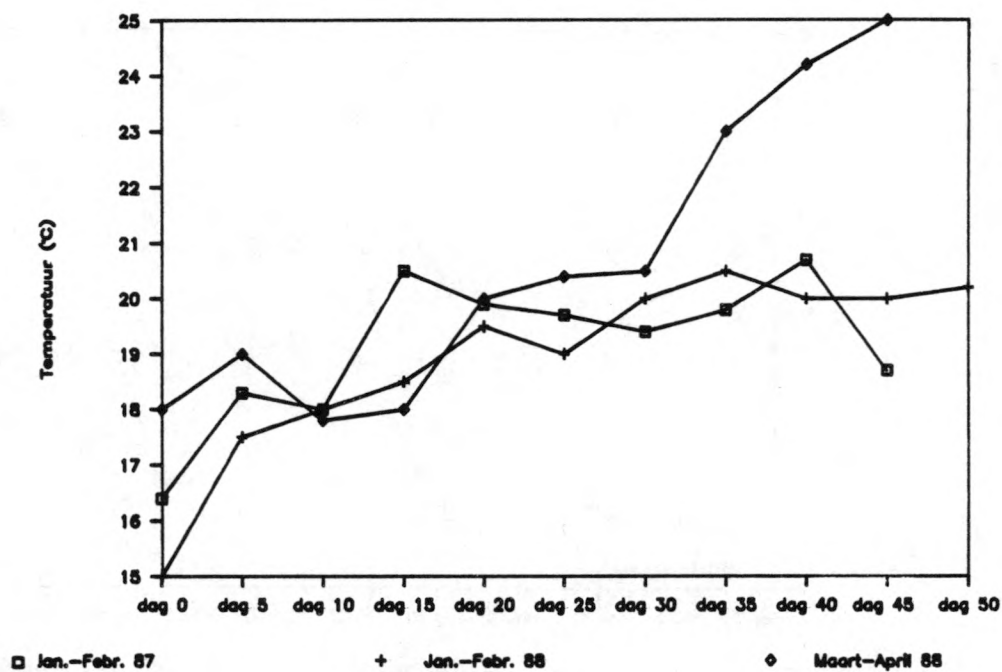
Bespreking

Uit figuur 10 blijkt dat we tijdens de laatste experimenten een vrij goede controle hadden over de verschillende fysische en chemische variabelen. Zoals eerder gesteld, volgden we de in de literatuur als optimaal opgegeven waarden. In verband met de zuurstofconcentratie zien we dat tijdens het experiment januari-februari 88 de concentraties vrij laag waren. In hoeverre dit de overleving beïnvloedt, is niet geweten. De ammoniak- en nitrietconcentraties zijn zeer laag, met enkele uitschieters. Meestal vinden we een stijging van de nitriet- en ammoniakconcentratie rond de vijftiende dag (overgang naar *Artemia* nauplii) en de veertigste dag (overgang naar korrelvoedsel). Deze stijging wordt tegengewerkt door het debiet te verhogen. Uit de analyse van

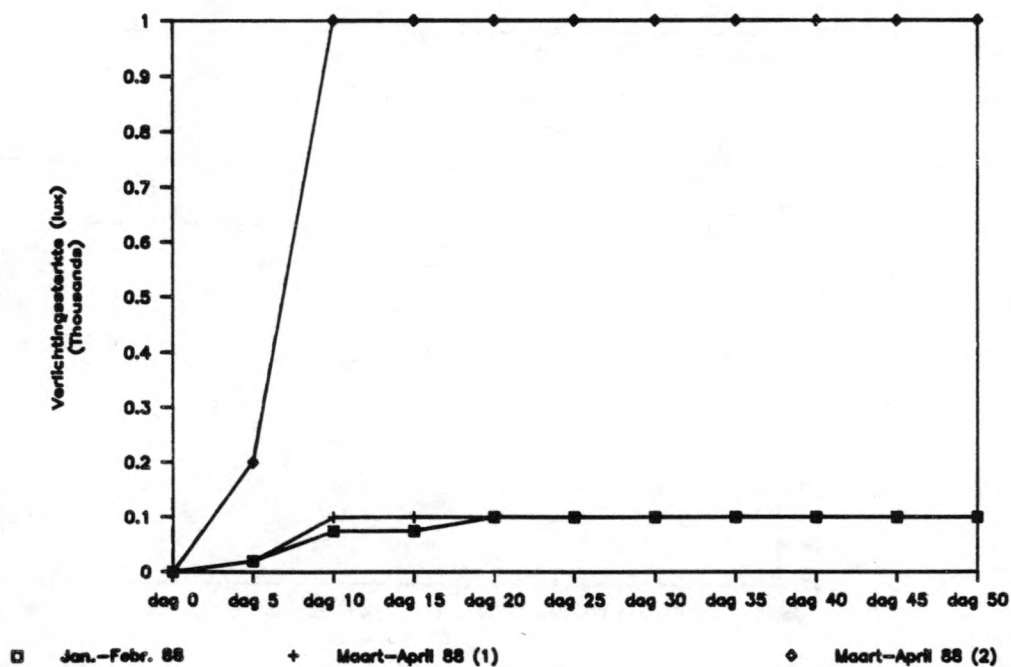


Figuur 10: Fluctuaties van de verschillende fysische en chemische variabelen tijdens de kweek van zeebaarslarven voor de periode januari-maart 87, januari-maart 88, en maart-mei 88 (A. Zuurstof, B. Temperatuur, C. Verlichtingssterkte, D. Debiet, E. Saliniteit, F. Nitriet, G. Totale ammoniak).

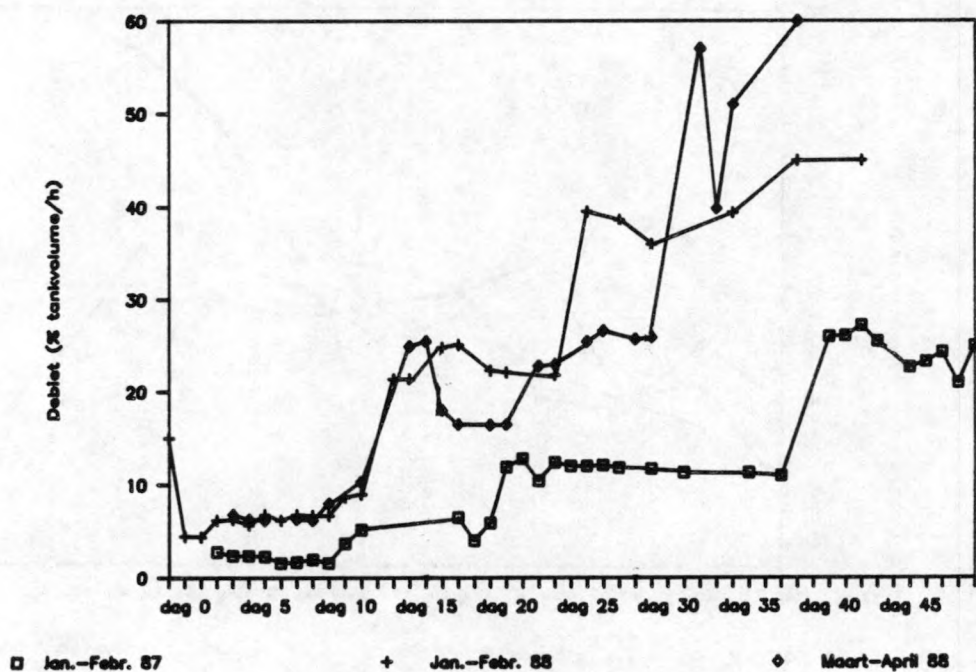
B.



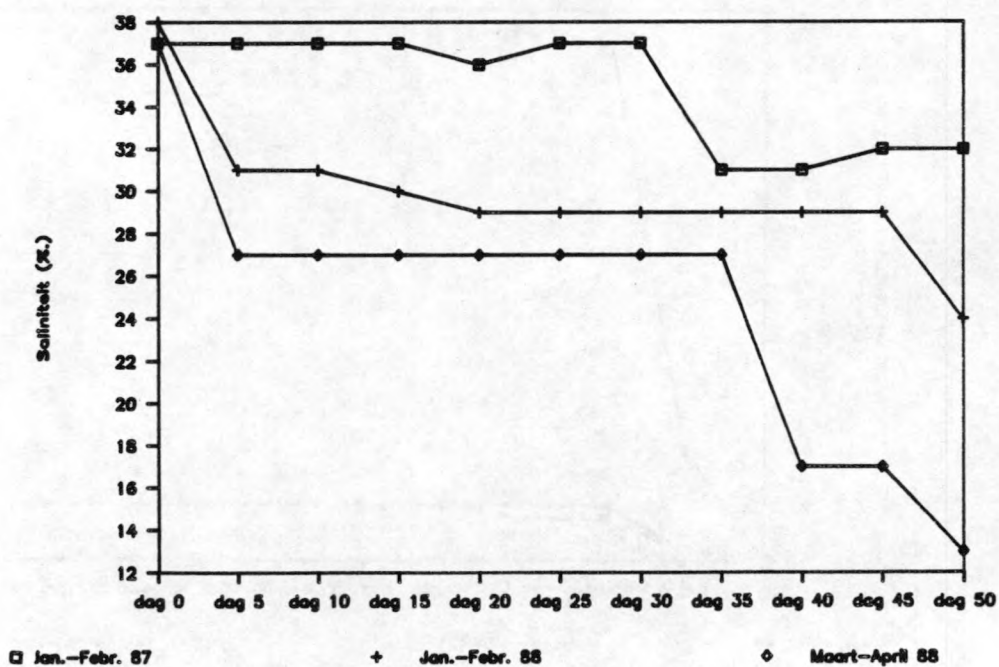
C.



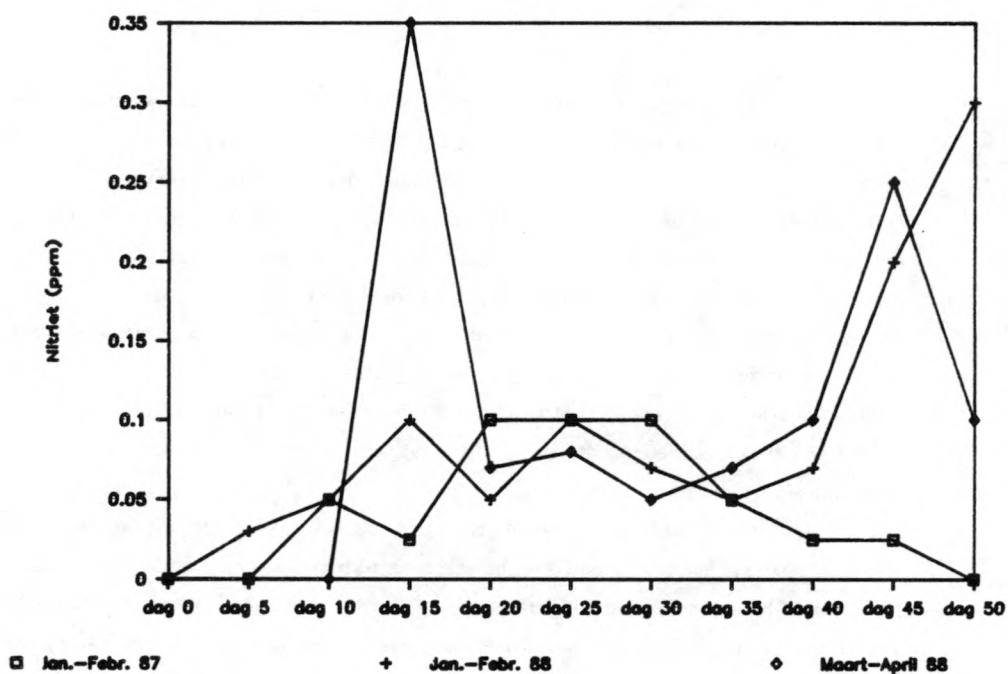
D.



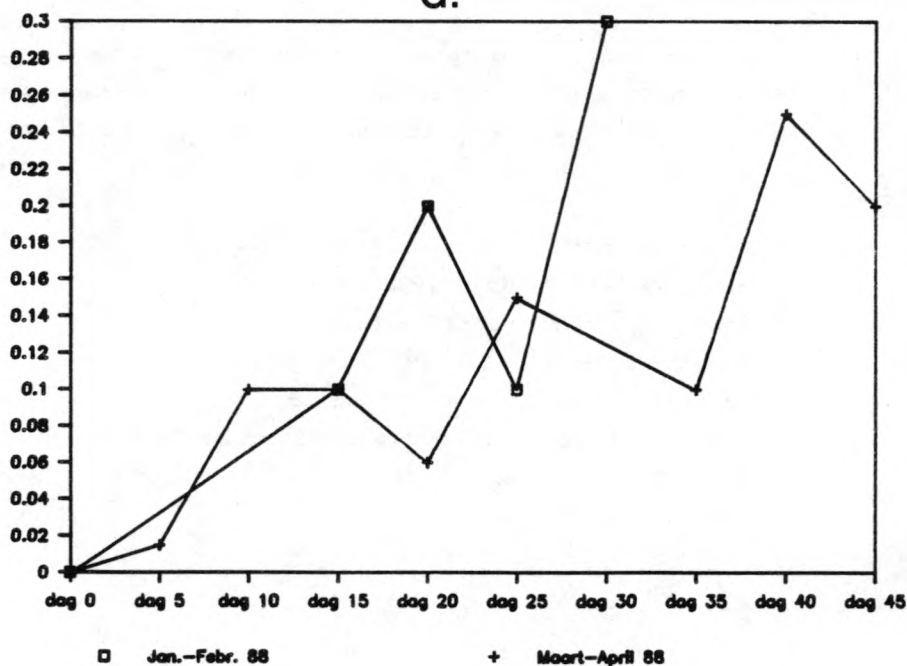
E.



F.



G.



het verloop van de fysische en chemische variabelen blijkt dat de installatie een optimale waterkwaliteit toelaat.

II.2.1.4. Bacterieel onderzoek

De negatieve invloed van de bacteriënconcentratie in het kweekwater op de overleving bij de larven van mariene vissen is zeer omstreken. Volgens Blaxter (1968) was er geen enkele correlatie aantoonbaar tussen het aantal bacteriën en de mortaliteit bij haringlarven. Barahona-Fernandes (1978) daarentegen stelde vast dat in tanks met een lage beluchting de bacteriënconcentratie tienmaal hoger was dan in de tanks met medium of hoge beluchting. In deze tanks met lage beluchting was de sterfte van de zeebaarslarven veel hoger dan in de andere condities. Daar de fysische en chemische variabelen (zoals bvb. zuurstofconcentratie, nitriet, ammoniak) niet verschilden tussen de verschillende tanks, werd gesuggereerd dat dit hogere kiemgetal verantwoordelijk zou zijn voor de hogere sterfte. Nash en Kuo (1975) onderstreepten het belang van de bacteriënconcentratie in de tanks onder controle te houden teneinde de overleving van larven van *Mugil cephalus* te verzekeren.

Tijdens deze studie volgden we zowel kwalitatief als kwantitatief de evolutie van het bacteriënbestand in het kweekwater. Daarbij wilden we nagaan of er een verband bestaat tussen het aantal bacteriën of de bacteriënsoorten en de overleving in de verschillende kweekexperimenten. Bovendien volgden we de concentratie van de bacteriën tijdens de individuele proeven om de invloed van de verschillende voedselstadia na te gaan.

II.2.1.4.1. Materiaal en methoden

De kwantitatieve bacteriologische bepaling van de waterstalen werd uitgevoerd op basis van de klassieke methode, namelijk uitplaten en tellen van de kolonievormende eenheden. Wekelijks werd er uit de verschillende tanks en filtereenheden een waterstaal genomen. Daarvan werden er verdunningsreeksen in TSB (Tryptic Soy Broth) gemaakt:

- onverdund;
- 1/10 verdunning (9 ml TSB + 1 ml onverdund staal);
- 1/50 verdunning (4 ml TSB + 1 ml 1/10 verdunning);
- 1/250 verdunning (4 ml TSB + 1 ml 1/50 verdunning);
- 1/2500 verdunning (9 ml TSB + 1 ml 1/250 verdunning);
- 1/25000 verdunning (9 ml TSB + 1 ml 1/2500 verdunning).

Van elke verdunning werd er 100 microliter op een TSB petriplaat (2% NaCl) uitgestreken. Na 24 uur incubatie bij 26°C werd het aantal kolonies geteld en het aantal C.F.U./100 ml (Colony Forming Units) berekend.

Voor elk van de kolonies die visueel weinig van elkaar verschilden, zette men KTA-testen (Kligler Iron Agar) in om na te gaan of het gaat om verschillende bacteriën of kolonievariatie binnen één bacteriesoort. Deze test is gebaseerd op 4 kenmerken: glucosefermentatie, lactosefermentatie, H₂S-vorming en gasvorming. Na 24 uur incubatie bij 26°C kunnen de resultaten afgelezen worden. De identificatie van de bacteriën gebeurde via het API 20 NE-systeem (voor gram-negatieve bacteriën) of via het API 20 E-systeem (voor Enterobacteriaceae), na 48 uur incubatie bij 26 °C (Versught, 1988).

II.2.1.4.2. Resultaten

De resultaten worden weergegeven in tabel 14 en 15. Tijdens de larvale kweek van januari-maart 87 zien we zeer duidelijke stijgingen van het aantal bacteriën. Zeer opvallend is eveneens de toename van het aantal bacteriën bij een tweede en derde kweek in hetzelfde gesloten systeem. Tijdens de laatste twee experimenten zijn er echter geen uitgesproken verschillen in de bacteriënconcentraties tussen het begin en het einde van de larvekweek. Uit de kwalitatieve analyse (tabel 14) blijkt dat de bacteriën meestal behoren tot het genus *Vibrio* en het genus *Pseudomonas*. *Aeromonas*-soorten werden weinig aangetroffen. Obligaat pathogene bacteriën werden nooit aangetroffen in de waterstalen. Er is geen verband waarneembaar tussen de hoge bacteriënconcentraties tijdens de twee laatste experimenten en verhoogde mortaliteit.

II.2.1.4.3. Bespreking

Bij de opkweek van zeebaarslarven dienen we steeds grotere maar ook toenemende hoeveelheden prooiorganismen toe. Dit gaat gepaard met grotere vervuiling van de tanks. Na dag 20 is het noodzakelijk om dagelijks het vuil (dode larven, dode *Artemia*, faeces) van de bodem af te hevelen. In dit opzicht verwachtten we dan ook een sterke toename van de bacteriënconcentraties in de tanks. Tijdens het eerste opgemeten experiment (jan.-maart 87) was deze toename merkbaar. In dit experiment was de waterversing in de tanks gedurende de eerste veertig dagen steeds zeer laag (1,6 tot 12% tankvolume/uur). In de andere experimenten, vooral in het experiment maart-mei 1988, was de beginconcentratie aan bacteriën reeds zeer hoog, en vinden we geen grote stijging van het kiemgetal tijdens het verloop van de kweekexperimenten. Nochtans werd in elk nieuw kweekexperiment gestart met vers aangemaakt zeewater. In tegenstelling met het eerste experiment (januari-maart 1987) werd in het tweede en derde experiment het waterdebiet na veertien dagen sterk verhoogd (25%) en kort daarop (dag 30-40) naar 40 à 50% van het tankvolume per uur. Deze debietsverhoging veroorzaakt een verdunning van de bacteriënconcentratie en compenseert in enige mate de verhoogde ontwikkeling van de bacteriën.

Tabel 14 : Overzicht van de kwantitatieve analyses van de bacteriën in drie verschillende experimenten met zeebaarslarven (uitgedrukt in C.F.U.).

Periode/	jan.-maart 87			jan.-maart 88			april-juni 88		
O.L.	x ± S.E.	N		O.L.	x ± S.E.	N	O.L.	x ± S.E.	N
				-3	$24 \cdot 10^4 \pm 13 \cdot 10^4$	5			
3	500 ± 90	3		3	$12 \cdot 10^5 \pm 12 \cdot 10^5$	7			
10	$15 \cdot 10^3 \pm 6340$	5		9	$11 \cdot 10^4 \pm 46 \cdot 10^3$	7			
16	$10 \cdot 10^3 \pm 4710$	6							
							16	$57 \cdot 10^6 \pm 25 \cdot 10^6$	7
							21	$20 \cdot 10^6 \pm 8 \cdot 10^6$	7
							35	$3 \cdot 10^6 \pm 10 \cdot 10^5$	6
40	$11 \cdot 10^4 \pm 77670$	6		32	$37 \cdot 10^5 \pm 10 \cdot 10^5$	6	49	$14 \cdot 10^7 \pm 13 \cdot 10^7$	6
50	$83 \cdot 10^3 \pm 15900$	6		60	$13 \cdot 10^4 \pm 61 \cdot 10^3$	7	56	$13 \cdot 10^7 \pm 6 \cdot 10^6$	2
							70	$38 \cdot 10^6 \pm 20 \cdot 10^6$	6

(O.L.: Ouderdom Larven, N.: aantal tanks per staal, x ± S.E.: gemiddelde ± Standard error)

Tabel 15 : Overzicht van alle bacteriesoorten gevonden in de verschillende experimenten met zeebaarslarven (periode 4/85 tot 5/88).

Periode:	4/85	1/86	3/86	4/86	12/86	1/87	3/87	1/88	5/88
<i>Vibrio alginolyticus</i>			*		*	*	*	*	*
<i>Vibrio vulnificus</i>								*	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>									*
<i>Vibrio fluvialis</i>									*
<i>Aeromonas caviae</i>		*							
<i>Aeromonas sobria</i>									*
<i>Pseudomonas putida</i>		*	*		*				
<i>Pseudomonas stutzeri</i>								*	
<i>Pseudomonas maltophilia</i> *						*			
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>						*			*
<i>Pseudomonas cepacia</i> *									
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *									
<i>Pseudomonas mendocina</i>		*							
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>		*							
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		*							
<i>Pseudomonas pickettii</i>			*						
<i>Pseudomonas vesicularis</i>				*					*
<i>Acinetobacter calco. var lwoffii</i>		*	*						
<i>Citrobacter freundii</i>		*							
CDC-gr IV C-2-Bordetella				*					
<i>Flavo meningoseptica</i>								*	
<i>Moraxella phenylpyruvica</i>									*
<i>Pasteurella sp.</i>								*	

De hogere waarden van de bacteriënconcentraties tijdens de twee laatste experimenten is moeilijk te verklaren. Aanvankelijk weten we dit verschijnsel aan een mogelijk verminderde efficiëntie van de U.V.-installatie (omwille van de beperkte levensduur van de U.V.-lampen). Bij uittesting van de U.V.-installatie (mei 88) bleek dat de verhouding van het aantal bacteriën voor en na de U.V.-bestraling ongeveer 100 bedraagt. Daar we echter geen gegevens hebben over de efficiëntie van de U.V.-installatie bij de ingebruikname, is het niet mogelijk deze vermoedens te bevestigen. Andere variabelen zoals de temperatuur en voedingsschema's waren zeer gelijkaardig aan deze toegepast in het eerste experiment zodat ook deze hiervoor geen verklaring kunnen bieden.

De kwalitatieve analyse toont de bijna continue aanwezigheid van *Vibrio* species en *Pseudomonas* species aan. *Aeromonas* werd tweemaal aangetroffen over een periode van drie jaar. *Aeromonas* en *Vibrio*, beide van de familie der Vibrionaceae, behoren tot de normale flora van alle waterdieren (Austin, 1988). In zoutwater domineren de *Vibrio*-soorten, waarbij natriumionen vereist zijn voor de groei (Versucht, 1988). Er werden geen obligaat pathogene bacteriën aangetroffen, wel een aantal soorten die als opportuun pathogeen beschreven zijn. Zowel *Vibrio alginolyticus* als *Vibrio vulnificus* kunnen vibriosis veroorzaken (Austin, 1988). *Pseudomonas putrefaciens* kan hemorrhagische septikemie veroorzaken bij vissen.

Hoewel we een groot aantal bacteriënsoorten aangetroffen hebben tijdens de verschillende experimenten, hebben we geen enkele aanwijzing voor een positief verband tussen hoge bacteriënconcentraties in het kweekmilieu en de mortaliteit bij de zeebaarslarven. In jan.-maart 87 bedroeg de overleving op dag 40 1 tot 7,1% in de verschillende tanks terwijl in jan.-maart 88 en maart-mei 88 de overleving respectievelijk 25 tot 67% en 33 tot 47% bedroeg. Literatuurgegevens omtrent deze problematiek zijn zeer schaars. Recent echter werd wel een verband aangetoond en tussen de bacteriënconcentratie in het kweekmilieu en de mortaliteit bij tarbotlarven (Guillaume, 1987; Gatesoupe, 1987; Nicolas, 1988). Gatesoupe (1987) toonde aan dat de bacteriën geassocieerd met de rotiferen een zeer nadelig effect uitoefenen op de overleving van tarbotlarven. Desinfektie van de rotiferen met antibiotica verhoogde de overleving van tarbotlarven (6 tot 22% op dag 10 t.o.v. 1,2 tot 1,5% met niet-behandelde rotiferen).

II.2.2. Optimalisatie van het voedselschema

II.2.2.1. Invloed van de kleur van de rotiferen op de opname door de zeebaarslarven

Dendrinós *et al.* (1984) toonden aan dat tonglarven (*Solea solea*) sneller metanauplii van *Artemia* opnamen wanneer deze aangerijkt waren met donkere kleurstoffen dan wanneer niet-gekleurde metanauplii werden aangeboden. Daar *Brachionus plicatilis* doorzichtig is, werd het nuttig geacht in onze proeven de stelling te toetsen of aanrijking van deze raderdiertjes met verschillende gekleurde substanties de graad van zichtbaarheid voor de vislarven zou verhogen. De

aanrijkingsprodukten (wiercellen, bloed- en gistcellen, actief koolpoeder) stapelen zich op in de maag (mastax) van de rotiferen. Dit leidt tot een intens kleuren van de maag wat bij de doorzichtige *Brachionus* uitwendig zeer duidelijk waarneembaar is. In drie opeenvolgende experimenten werd nagegaan of de kleur van de levende prooien een invloed heeft op het tijdstip van de overgang dooierresorptie en eerste voedselopname.

II.2.2.1.1. Materiaal en methoden

Drie dagen na de ontluiking werden de zeebaarslarven overgebracht in donkere poly-ethyleen bekken van één liter (densiteit 50 larven/liter). Deze bekken werden allen in een waterbad geplaatst om continu dezelfde temperatuur te handhaven in alle bekken. De temperatuur bedroeg 16 tot 18°C en er werd een continue belichting toegepast (50-100 lux). Gedurende het ganse experiment werd er geen water vervast en er werd niet belucht. Preliminair experimenten hadden reeds uitgewezen dat de larven bij deze omstandigheden tenminste twaalf dagen in leven bleven. Vierentwintig uur nadat de mond geopend was en de ogen van de larven gepigmenteerd waren, werden de aangerijkte rotiferen toegediend.

Twee uur voor het toedienen aan de vislarven werden de rotiferen verzameld en werd de densiteit bepaald, waarna het aanrijkingsmedium toegevoegd werd. De rotiferen werden aangerijkt met groenwiercellen (*Tetraselmis suecica*), zodat de maag een diepgroene kleur verkreeg, of met verse rode bloedcellen van karper (rode maag), met gemalen actieve kool (zwarte maag), met gistcellen (grijze maag) en als controle geen aanrijking (volledig transparant). De bloedcellen werden verkregen via hartpunctie bij de karper waarna het bloed gecentrifugeerd werd (2000 cpm, 2 minuten). Via een binoculair werd nagegaan of de rotiferen voldoende gekleurd waren vooraleer ze toegediend werden aan de vislarven. Om de vier uur na de start van het experiment werden uit de verschillende condities een zestal larven genomen om na te gaan of er reeds rotiferen opgenomen waren. Vanaf het moment dat er één larve gevonden werd met rotiferen in de darm, werden uit elke conditie 10 tot 30 larven gecontroleerd.

De gegevens werden statistisch verwerkt met behulp van variantie-analyse en via "rank scores" (Wilcoxon test).

II.2.2.2. Resultaten (Tabel 16)

Uit de statistische analyse (variantie-analyse) blijkt dat in de drie experimenten in de conditie wiercellen een significant groter aantal zeebaarslarven ($p = 0,03$) reeds rotiferen opgenomen heeft dan in de condities bloed, gist en controle. Er werden met variantie-analyse geen verschillen waargenomen tussen de condities wier en actieve kool. Rank-analyse met de Wilcoxon test gaf nipt geen duidelijke verschillen aan tussen de verschillende kleurcondities ($p = 0,07$).

Uit de waarnemingen bleek dat bij continue belichting de zeebaarslarven zich eveneens voeden tijdens de nacht.

Tabel 16: Procentueel aantal larven met voedsel in de darm in drie verschillende experimenten op het tijdstip waarbij voor het eerst larven met voedsel in de darm waargenomen werden

Experiment:	1	2	3	$\bar{x} \pm \text{S.D.}$
Groenwier:	21,8	21,4	37,5	$26,9 \pm 9,2$
Aktieve Kool:	/	8	20,0	$14,0 \pm 8,5$
Gist:	0	4,6	/	$2,3 \pm 3,3$
Bloedcellen:	5,6	0	12,5	$6,0 \pm 6,3$
Kontrole:	15,8	0	6,7	$7,5 \pm 7,9$

II.2.2.1.3. Discussie

Gedragsstudies uitgevoerd bij zeebaarslarven tonen aan dat de larven reeds vanaf de eerste dag van voedselopname hun prooien actief opnemen (Barnabé, 1978). Bij waarneming van een prooi richt de zeebaarslarve zich naar deze, zwemt ernaar toe, waarna de uiteindelijke captatie volgt. Vier tot vijf dagen na de ontluijing zijn de ogen van de zeebaarslarven gepigmenteerd en opvallend groot. Vermoedelijk is de visuele waarneming dan ook essentieel voor de prooicaptatie. Dendrinós *et al.* (1984) vond bij tonglarven de hoogste voedslefficiëntie indien zwart gekleurde metanauplii van *Artemia* aangeboden werden en een minimale efficiëntie bij niet-gekleurde *Artemia*. De ogen van tonglarven zijn het gevoeligst in het groen-geel gebied van het spectrum (500-600 nm) (Blaxter, 1969).

De resultaten bekomen in onze experimenten tonen duidelijk aan dat zeebaarslarven, die rotiferen toegediend krijgen aangerijkt met donker gekleurde substanties, sneller starten met voedselopname dan zeebaarslarven gevoed met *Brachionus* aangerijkt met lichter gekleurde substanties. Dit is mogelijks te wijten aan het feit dat deze rotiferen beter zichtbaar zijn voor de vislarven. Naar analogie hiermee rapporteerden verschillende onderzoekers het belang van de kleur van de kweektankwand; bij gebruik van zwarte tanks i.p.v. licht gekleurde tanks zijn larven

van zeebaars, pladijs en haring beter in staat hun prooien te onderscheiden wat leidt tot een efficiëntere prooicaptatie (Blaxter, 1962; Houde en Ramsay, 1971; Coves, 1985).

Volgens Ré *et al.* (1985) situeert zich de voeding van de zeebaarslarven gekweekt bij een natuurlijke belichting voornamelijk tijdens de dag. In onze proeven vonden we dat bij continue belichting de larven zich ook 's nachts voeden. Aangezien de verteringstijd slechts 60 tot 90 minuten bedraagt zijn deze waarnemingen niet toe te schrijven aan resten van voedselopnames tijdens de dag. Volgens Barahona-Fernandes (1979) heeft continue belichting een negatief effect op de groei alhoewel de overleving begunstigd wordt.

II.2.2.2. Geoptimaliseerd voedselschema

Op basis van de bevindingen met *Artemia* (deel I.2.2.) en baserend op de resultaten in verband met de invloed van de kleur op het startmoment van voederen, werd een meer aangepast voedselschema toegepast in de twee laatste experimenten met zeebaarslarven.

Voedselschema:

Dag 0-5: dooierzakresorptie

Dag 6-8: *Brachionus plicatilis* (aanrijking: *Tetraselmis suecica*)

Dag 9-12: *Brachionus plicatilis* (aanrijking: SELCO)

Dag 11-20: nauplii van *Artemia* (San Francisco Bay)

Dag 19-47: metanauplii van *Artemia* (Great Salt Lake; aanrijking: SELCO)

Dag 40-eind: korrelvoedsel (PROVIMI, Nederland)

De algemene samenstelling van het PROVIMI-korrelvoedsel was als volgt: eiwitten 48%, vet 5%, koolhydraten 11%, as 11%, en vocht 9%.

II.2.3. Overleving

Tijdens deze studie werden elf experimenten verricht (tabel 17). De overleving van de zeebaarslarven werd bepaald door vanaf dag 20 dagelijks alle dode larven te tellen. Tussen dag 0 en 20 is evenwel geen juiste bepaling mogelijk daar de zeer kleine larven na het afsterven zeer snel desintegreren en op die manier niet terug gevonden worden. Uit tabel 17 blijkt dat de overleving van de zeebaarslarven zeer gering was tijdens onze eerste drie werkingsjaren. In experiment 7 en 8 werd voor het eerst een redelijke overleving vastgesteld. In experiment 7 trad er echter na één maand een massaal rondtollen op van de larven, waarbij alle larven stierven binnen één week. In experiment 8 was de maximale overleving 7,1% op dag 40. In tabel 18 vinden we een overzicht van

Tabel 17 : Overzicht van de overleving en de leeftijdsspecifieke overleving (l_x) van zeebaarslarven tijdens drie experimenten (januari-maart 87, januari-maart 88, maart -mei 88).

Experiment 8: januari-maart 87

Tank	A1		A2		A3		A4		A5	
	N	l_x	N	l_x	N	l_x	N	l_x	N	l_x
Start	6250	1000	6250	1000	6250	1000	6250	1000	6250	1000
dag 20	614	98	391	62	426	68	194	31	423	76
dag 30	518	844	273	698	337	791	142	732	344	813
dag 40	442	853	195	714	230	683	62	437	185	538
*										
dag 50	225	509	85	435	115	500	0	0	32	173

Experiment 10: januari-maart 88

Tank	A1		A2		A3		A4		A5		A6	
	N.	l_x	N.	l_x	N.	l_x	N.	l_x	N.	l_x	N.	l_x
Start	4200	1000	4200	1000	4200	1000	4200	1000	4200	1000	4200	1000
dag 30	1453	346	3581	853	1070	255	3400	810	3010	717	2519	600
dag 40	1415	974	2296	641	1047	979	2496	734	2801	931	2500	993
*												
dag 60	548	338	142	62	545	521	135	54	515	184	540	216

Experiment 11: maart-mei 88

Tank	A1		A2		A3		A4		A5		A6	
	N.	l_x	N.	l_x	N.	l_x	N.	l_x	N.	l_x	N.	l_x
Start	4400	1000	4400	1000	4400	1000	4400	1000	4400	1000	4400	1000
dag 30	1554	353	1735	394	1607	365	2156	490	1964	446	1629	370
dag 38	1521	979	1697	978	1462	910	2049	950	1834	934	1431	878
	#		#		#							
dag 40	707	465	1265	745	705	482	1968	960	1724	940	1316	920
*												
dag 60	612	922	1051	831	628	891	1283	652	956	555	625	475

(#: pompuitval op dag 39, *: overgang levend zoöplankton-korrelvoedsel)

Tabel 18 : Overzicht van alle experimenten en overlevingscijfers bekomen tijdens onze studie over de kweek van zeebaarslarven

Exp.	Start	Eind	Afkomst	ei/larve	Aantal	Ontluik. dag	Maximale Overleving		
							Dag 30	Dag 40	Dag 60
1	1/ 3/85	4/ 3/85	Castellon	ei	2.10 ⁶	3/ 3	0		
2	15/ 4/85	22/ 4/85	DEVA-SUD	ei	50.000	16/ 4	0		
3	15/ 5/85	1/ 6/85	C.O.Brest	larven	45.000	13/ 5	/	/	0,04
4	18/12/85	18/ 2/85	DEVA-SUD	ei	50.000	17/ 2	10,6	8,3	2,5
5	20/ 3/86	25/ 3/86	SEPIA	ei	50.000	21/ 3	0		
6	9/ 4/86	7/ 6/86	DEVA-SUD	ei	100.000	10/ 4	1,9	1,4	0
7	18/11/86	23/12/86	DEVA-SUD	ei	50.000	21/11	2,3	0	
8	20/ 1/87	20/ 3/87	C.O.Brest	larven	50.000	17/ 1	8,2	7,1	3,6
9	6/ 5/87	26/ 5/87	DEVA-SUD	larven	30.000	6/ 5	0		
10	8/ 1/88	21/ 3/88	Ferme Mar. de Douhet	ei larven	82.000	8/ 1	71,7	66,7	12,3
11	25/ 3/88	4/ 6/88	Ferme Mar. de Douhet	larven	44.000	22/ 3	49	44,7	29,2

Deva-Sud (Palavas-les Flots, Frankrijk; SEPIA (Marseille, Frankrijk); Castellon (Spanje)

/: geen gegevens

de overleving in de afzonderlijke tanks tijdens de experimenten 8, 10, en 11. Een eerste opvallend feit is de grote verbetering van de uiteindelijke overleving in experiment 10 en 11 t.o.v. de vorige experimenten. In deze experimenten was de overleving op dag 60 hoog, respectievelijk 12,3 tot 13% en 13,9 tot 29,2%. In experiment 11 viel er op dag 38 een pomp uit waardoor in tank A1-3 een grote sterfte optrad. De overlevingsresultaten bekomen in de laatste twee experimenten kunnen terecht beschouwd worden als zeer hoog. Jones (1987) stelde in zijn openingsrede in Istanbul (23-25 november 1987, Turkije) dat de meeste zeebaarskwekerijen zeer tevreden zijn met een gemiddelde overleving van 10%. In de Franse centra zou de uiteindelijke overleving bij zeebaarslarven 20 tot 25% bedragen, met als gevolg zeer rendabele ondernemingen (Chatain, 1988, pers. mededeling). Sweetman (1988) gaf 20% op als een regelmatig bekomen overlevingspercentage bij de kweek van zeebaarslarven.

Uit de leeftijdsspecifieke overleving blijkt dat in experiment 8 een zeer hoge sterfte optrad tijdens de eerste twintig levensdagen van de larven. Een tweede mortaliteitspiek situeert zich tussen dag 40 en 50, met name tijdens de overschakelingsperiode levend voedsel-inert voedsel. Deze twee mortaliteitspieken werden ook in de vorige experimenten vastgesteld. In experiment 10 en 11 is de leeftijdsspecifieke overleving veel hoger tijdens de eerste levensmaand van de larven, respectievelijk 255 tot 853 en 353 tot 490. Een verklaring voor deze opvallende verbetering is wellicht te wijten aan een hele reeks veranderingen in ons kweekproces (kweken van de larven bij zeer lage lichtsterkte tijdens de eerste week, optimalisatie van het voedselschema, verlaging van de saliniteit). Een tweede opvallende verbetering is merkbaar tijdens de overgang levende prooien-korrelvoedsel. De leeftijdsspecifieke overleving tussen dag 40 en 60 bedraagt in experiment 10 en 11 respectievelijk 184 tot 521 en 475 tot 891. In experiment 10 is de overleving in deze tussenperiode nog vrij laag in vergelijking met die van experiment 11. In experiment 10 werd de dagelijkse hoeveelheid korrelvoedsel per tank te laag ingeschat (6g/dag t.o.v. 25g/dag in exp. 11), waardoor een deel van de larven verhongerden. In experiment 11 was de leeftijdsspecifieke overleving tijdens deze periode zeer hoog in vergelijking met de resultaten behaald in andere centra (gemiddeld 50% sterfte, zie II.1.3.2.3.3.). Daarbij dient wel opgemerkt te worden dat op dag 38 in tank A1-3 een pomp uitviel, gevolgd door accidentiële sterfte. Toch dienen we op te merken dat bij de uitval van de pomp, met zuurstofgebrek als gevolg, eerst en vooral de zwakkere larven stierven (larven zonder zwemblaas). De overblijvende larven in deze tanks waren beter in staat deze overgangperiode te overbruggen. De leeftijdsspecifieke overleving in de tanks A4-A6 is dan ook objectiever als vergelijkingspunt (475 tot 652). Dan nog blijken we een eerder gunstige overleving te bekomen in vergelijking met andere centra.

Hoofdstuk 3: MORFOLOGISCHE ONTWIKKELING EN PATHOLOGIE VAN DE ZEEBAARSLARVEN

II.3.1. Ontwikkeling van de zwemblaas en invloed van de zwemblaasontwikkeling op de groei van de zeebaarslarven

II.3.1.1. Inleiding

In deze studie volgden we de ontwikkeling van de zwemblaas zowel bij larven met en zonder functionele zwemblaas. Daarbij bestudeerden we de invloed van de al of niet aanwezigheid van een functionele zwemblaas op de groei van de zeebaarslarven.

II.3.1.2. Materiaal en methoden

Tijdens de experimenten januari-maart 1987 (experiment 8), januari-maart 1988 (exp. 10) en maart-mei 1988 (exp. 11) werd de groei van de zwemblaas, de groei van de larven en de dooierzakresorptie gevolgd. De larven werden verdoofd met phenoxy-ethanol (concentratie 1ppt, FLUKA) en de afmetingen van de larven en de verschillende organen werden opgemeten met behulp van een binoculaire loupe (vergroting 50 maal) met meetoculair. De verschillende organen zijn tot aan dag 45 (ca 20mm) gemakkelijk te onderscheiden daar de larven doorschijnend zijn.

De resultaten werden statistisch verwerkt op basis van ongepaarde t-test en lineaire regressie. Voor de specifieke groeisnelheid (SGR) werd de lengtetoenamen gebruikt i.p.v. de gebruikelijke gewichtstoename, daar deze laatste in onze opmetingen te sterk beïnvloed wordt door de darmvulling. De specifieke groeisnelheid werd als volgt berekend:

$$SGR = \frac{\ln L_T - \ln L_t}{T - t} \times 100$$

(L_T is de totale lengte van de larve op dag T, L_t is de totale lengte van de larven op dag t).

II.3.1.3. Resultaten en bespreking

De ontwikkeling van de zwemblaas wordt weergegeven in tabel 19-20 en figuur 11-12. Zowel in het experiment 9 (mei 87) als in het experiment 10 (jan.-maart 1988) zien we de primordiale zwemblaas verschijnen op dag 5 na de ontluiking. Enkele dagen later (dag 7) grijpt de primaire inflatie plaats, wat zich uit door het ontstaan van een kleine gasbel in de primordiale zwemblaas.

Tabel 19 : Toename van de zwemblaaslengte (mm) bij zeebaarslarven met een al dan niet geïnflateerde zwemblaas tijdens de experimenten 8 (januari-maart 87), 10 (januari-maart 88), en 11 (maart-mei 88).

Experiment 8:	Dag 5	(N)	Dag 12	(N)	Dag 18	(N)	Dag 27	(N)	Dag 39	(N)
Functionele zwemblaas:	0	10	0,24±0,12	8	0,37±0,07	20	0,86±0,05	50	2,21±0,07	24
Niet-funct. zwemblaas:	/		0	8	0,30±0,08	15	0,50±0,06	30	0,85±0,05	41
p:	/		/		N.S.		0,0001		0,0001	
Experiment 10:	Dag 7	(N)	Dag 12	(N)	Dag 19	(N)	Dag 27	(N)	Dag 40	(N)
Functionele zwemblaas:	0,27±0,10*	11	0,69±0,07	26	1,26±0,11	9	2,10±0,06	29	3,44±0,06	35
Niet-funct. zwemblaas:	/		0,49±0,09	13	0,56±0,06	30	0,81±0,07	27	1,79±0,08	18
p:	/		N.S. (0,08)		0,0001		0,0001		0,0001	
Experiment 11:			Dag 9	(N)	Dag 21	(N)			Dag 41	(N)
Functionele zwemblaas:			0,47±0,08	17	1,40±0,11	9			3,98±0,04	59
Niet-funct. zwemblaas:			0,26±0,10	11	0,45±0,05	37			1,09±0,06	26
p:			N.S.		0,0001				0,0001	

(*: gemiddelde ± S.E.; N: aantal larven per staal)

Tabel 20: Toename van de zwemblaashoogte (mm) bij zeebaarslarven met een al dan niet geïnflateerde zwemblaas tijdens de experimenten 8 (januari-maart 87), 10 (januari-maart 88), en 11 (maart-mei 88).

Experiment 8:	Dag 18 (N)	Dag 27 (N)	Dag 39 (N)
Functionele zwemblaas:	0,18±0,03 20	0,28±0,02 50	0,67±0,02 24
Niet-funct. zwemblaas:	0,12±0,03 15	0,18±0,02 30	0,29±0,02 41
p:	N.S.	0,0001	0,0001

Experiment 10:	Dag 7 (N)	Dag 12 (N)	Dag 19 (N)	Dag 27 (N)	Dag 40 (N)
Functionele zwemblaas:	0,12±0,04* 11	0,26±0,02 26	0,61±0,04 9	0,81±0,02 29	0,94±0,02 35
Niet-funct. zwemblaas:	/	0,18±0,02 14	0,22±0,02 30	0,27±0,03 27	0,65±0,03 18
p:	/	0,08	0,0001	0,0001	0,0001

Experiment 11:	Dag 9 (N)	Dag 21 (N)	Dag 41 (N)
Functionele zwemblaas:	0,27±0,03 17	0,60±0,04 9	0,95±0,01 59
Niet-funct. zwemblaas:	0,14±0,03 11	0,20±0,02 37	0,32±0,02 26
p:	0,0021.	0,0001	0,0001

(*: gemiddelde ± S.E.; N: aantal larven per staal)

Tabel 21 : Logaritmische vergelijkingen van de groei van de zwemblaas (lengte en hoogte, mm) in functie van de lengtegroei van de zeebaarslarven, al dan niet met een correct geïnflateerde zwemblaas tijdens de experimenten 8 (januari-maart 87), 10 (januari-maart 88), en 11 (maart-mei 88).

	Vergelijking lengte zwembl.	Vergelijking hoogte zwembl.
Experiment 8:		
Functionele zwemblaas:	$\text{Log Lzwbl} = -2,04 + 1,90 \text{ Log Llarv}$	$\text{Log Hzwbl} = -1,92 + 1,34 \text{ Log Llarv}$
Niet-funct. zwemblaas:	$\text{Log Lzwbl} = -1,65 + 1,38 \text{ Log Llarv}$	$\text{Log Hzwbl} = -1,77 + 1,33 \text{ Log Llarv}$
Experiment 10:		
Functionele zwemblaas:	$\text{Log Lzwbl} = -1,92 + 1,83 \text{ Log Llarv}$	$\text{Log Hzwbl} = -2,11 + 1,67 \text{ Log Llarv}$
Niet-funct. zwemblaas:	$\text{Log Lzwbl} = -1,60 + 1,35 \text{ Log Llarv}$	$\text{Log Hzwbl} = -1,85 + 1,16 \text{ Log Llarv}$
Experiment 11:		
Functionele zwemblaas:	$\text{Log Lzwbl} = -1,83 + 1,84 \text{ Log Llarv}$	$\text{Log Hzwbl} = -1,36 + 1,67 \text{ Log Llarv}$
Niet-funct. zwemblaas:	$\text{Log Lzwbl} = -1,61 + 1,28 \text{ Log Llarv}$	$\text{Log Hzwbl} = -1,41 + 1,04 \text{ Log Llarv}$
GLOBAAL:		
Functionele zwemblaas:	$\text{Log Lzwbl} = -2,01 + 1,95 \text{ Log Llarv}$	$\text{Log Hzwbl} = -1,97 + 1,51 \text{ Log Llarv}$
Niet-funct. zwemblaas:	$\text{Log Lzwbl} = -1,63 + 1,35 \text{ Log Llarv}$	$\text{Log Hzwbl} = -1,81 + 1,10 \text{ Log Llarv}$
p:	0,0001	0,0001

De zwemblaas vertoont dan een eerder ovoïde vorm met lengte-as parallel aan de lengte-as van de larve. Vanaf deze periode kunnen we een onderscheid maken tussen larven met een geïnflateerde zwemblaas en een niet-geïnflateerde zwemblaas. Bij deze laatste larven is de zwemblaas kleiner, wat reeds in experiment 10 meetbaar was bij de 12 dagen oude larven, zowel qua zwemblaaslangte als qua zwemblaashoogte. In het elfde experiment (maart-mei 1988) vonden we zelfs al significante verschillen in hoogte vanaf de negende dag ($p=0,0021$; geïnflateerde zwembl.: $0,27 \pm 0,03$ mm; niet-geïnflateerde zwembl.: $0,14 \pm 0,03$ mm). Naast deze twee extreme situaties werden eveneens larven (18-20 dagen oud) opgemerkt met een niet-geïnflateerde zwemblaas maar waarvan de zwemblaasafmetingen deze benaderden van de functionele zwemblaas (intermediaire zwemblaas). Volgens Chatain (1986) zou bij zeebaars de primaire inflatie niet meer mogelijk zijn na de tiende dag. Bij *Morone saxatilis* zou de zwemblaas eveneens niet meer ontwikkelen indien de primaire inflatie niet plaatsgrijpt tussen dag 5 en 7 (Doroshev en Cornacchia, 1979). De vraag blijft open of de zwemblaas van larven met een intermediaire zwemblaas nog kan inflateren dan wel volledig degenereert.

Rond de twaalfde dag treedt de tweede fase van de zwemblaasvorming op nl. de secundaire expansie. Rond deze periode merkten we een tweede kleinere gasbel op, die zich steeds achter de eerste bevindt. Aanvankelijk liggen deze twee gasbellen tegen elkaar waarna ze versmelten. We vinden dan larven met een peervormige zwemblaas. Vanaf dit stadium verlengt de zwemblaas progressief met de ouderdom en met de lengte van de larven. Op dag 40 bedraagt de zwemblaaslangte 14 tot 19% van de totale lengte van de larven. Bij larven met een niet-functionele zwemblaas is dit gemiddeld slechts 7% (6 tot 10%).

De eerste dag na de ontluijing van de larven is de dooierzak vrij groot en de lengte bedraagt ongeveer één derde van de totale lengte van de larven. Deze dooierzak kan men beschrijven als een ellipsoïde ($\text{Volume} = \pi a b^2/6$; $a = \text{max. hoogte}$, $b = \text{max. lengte}$) met daarin de oliedruppel in de vorm van een bol ($\text{Volume} = 4 \pi r^2/3$). De dooierzak neemt snel af in volume en is op dag 5 reeds gereduceerd tot één tiende ($0,06 \text{ mm}^3$) van zijn oorspronkelijk volume ($0,61 \text{ mm}^3$). De oliedruppel daarentegen vermindert weinig tijdens die periode zodat op dag 8 de oorspronkelijke dooierzak praktisch volledig opgevuld wordt met de oliedruppel. Rond dag 10 zijn zowel de dooierzak als de oliedruppel grotendeels opgebruikt, en de larven dienen dan ook op dit tijdstip levend voedsel op te nemen. Ondertussen is de aanmaak van spijsverteringsenzymen gestart, zodat de larve ook fysiologisch in staat is te leven op basis van levende prooien (Vu, 1983). Dit tijdstip komt zowat overeen met de definitieve ontwikkeling van de zwemblaas. Aldus beschikken de larven op dit tijdstip over een functionele zwemblaas, die hen toelaat zich gemakkelijker te stabiliseren in het water, wat de prooicaptatie ten goede komt.

Uit tabel 19 blijkt dat de lengte van de zwemblaas sterk varieert rond dag 40 in de 3 beschreven experimenten (exp. 8: $2,21 \pm 0,07$ mm; exp. 10: $3,44 \pm 0,06$ mm; exp. 11: $3,98 \pm 0,04$ mm). Indien we echter de zwemblaaslangte beschouwen in functie van de lengte van de larven dan zien we dat een

zwemblaaslength van 2,2 mm telkenmale overeenkomt met een larvenlength van ca 15 mm (exp. 8 op dag 39: 15,73 mm; exp. 10 op dag 28: 15,73 mm; exp. 11 op dag 27: 14,5 mm). We hebben dan ook de vergelijking opgesteld van de groei van de zwemblaas in functie van de lengtetoe name van de larven. De groei van de zwemblaas kent een exponentieel verloop. De vergelijkingen van de lengte en de hoogte van de zwemblaas in functie van de lengte van de larven wordt weergegeven in tabel 21, dit zowel voor de larven met als zonder functionele zwemblaas. Tussen de drie beschouwde experimenten werden er geen verschillen gevonden in het verloop van de lengtetoe name van de zwemblaas, noch tussen de groepen larven met functionele zwemblaas (lineaire regressie, $p = 0,34$), noch tussen de groepen larven erzonder ($p = 0,56$). Globaal kunnen we dan de lengtetoe name van de zwemblaas als volgt uitdrukken:

bij larven met een functionele zwemblaas

$$\text{Log } L_{\text{zwbl}} = -2,01 + 1,95 \log L_{\text{larve}}$$

bij larven met een niet-functionele zwemblaas

$$\text{Log } L_{\text{zwbl}} = -1,63 + 1,35 \log L_{\text{larve}}$$

De toename van de zwemblaashoogte in de drie experimenten was echter wel verschillend (funct. zwemblaas: $p = 0,0001$, niet-funct. zwemblaas $p = 0,0001$). Globaal werden de volgende vergelijkingen voor de hoogtetoe name opgesteld:

bij larven met een functionele zwemblaas

$$\text{Log } H_{\text{zwbl}} = -1,97 + 1,51 \log L_{\text{larve}}$$

bij larven met een niet-funct. zwemblaas

$$\text{Log } H_{\text{zwbl}} = -1,81 + 1,10 \log L_{\text{larve}}$$

Uit deze vergelijkingen blijkt duidelijk dat de niet-functionele zwemblaas trager expandeert dan de functionele zwemblaas en dit zowel in de lengte ($p = 0,0001$) als in de hoogte ($p = 0,0001$). De groei van de zwemblaas is sterk gecorreleerd met de lengte van de larven ($r=0,94$). Chatain (1987) beschrijft deze groei in functie van de ouderdom. Daar de groei sterk beïnvloed wordt door de temperatuur, de saliniteit en de voeding (zie hoger) vinden wij het veel logischer de zwemblaasontwikkeling voor te stellen in functie van de lengte van de larven.

De invloed van de zwemblaas op de groei van de larven wordt weergegeven in tabel 22-23. In de verschillende experimenten zien we duidelijk dat larven zonder functionele zwemblaas trager groeien dan larven met een functionele zwemblaas. In het tiende en elfde

Tabel 22: Verschillen in lengtegroei bij zeebaarslarven met een al dan niet geïnflateerde zwemblaas tijdens de experimenten 8 (januari-maart 87), 10 (januari-maart 88), en 11 (maart-mei 88).

Experiment 8:	Dag 5 (N)	Dag 12 (N)	Dag 18 (N)	Dag 27 (N)	Dag 39 (N)
Functionele zwemblaas:		6,19±0,53 8	6,61±0,53 20	10,8±0,22 50	15,7±0,31 24
Niet-funct. zwemblaas:	5,25±0,34 20	5,50±1,07 8	7,05±0,39 15	9,58±0,39 30	12,4±0,24 41
p:	/	N.S.	N.S.	N.S.	0,0001
Experiment 10:	Dag 7 (N)	Dag 12 (N)	Dag 19 (N)	Dag 27 (N)	Dag 40 (N)
Functionele zwemblaas:	5,53±0,28*11	7,79±0,18 26	12,2±0,31 9	15,7±0,17 29	20,4±0,15 35
Niet-funct. zwemblaas:	/	7,31±0,25 13	10,9±0,17 30	14,1±0,18 27	17,4±0,22 18
p:	/	N.S.	0,0002	0,0001	0,0001
Experiment 11:		Dag 9 (N)	Dag 21 (N)		Dag 41 (N)
Functionele zwemblaas:		6,43±0,26 17	11,2±0,36 9		21,3±0,14 59
Niet-funct. zwemblaas:		6,03±0,33 11	9,68±0,17 37		17,4±0,21 26
p:		N.S.	0,0002		0,0001

(*: gemiddelde ± S.E.)

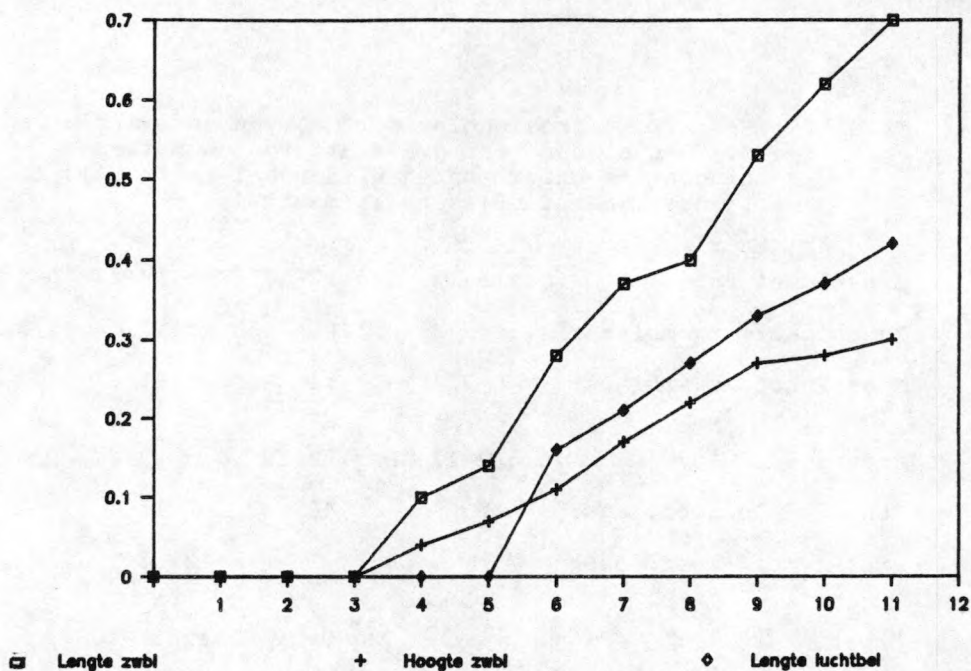
Tabel 23: Toename van het gewicht (mg) bij zeebaarslarven met een al dan niet geïnflateerde zwemblaas tijdens de experimenten 8 (januari-maart 87), 10 (januari-maart 88), en 11 (maart-mei 88).

Experiment 8:	Dag 12 (N)	Dag 18 (N)	Dag 27 (N)	Dag 39 (N)
Functionele zwemblaas:	0,72±2,56 8	0,98±1,62 20	5,70±1,02 50	26,9±1,58 24
Niet-funct. zwemblaas:	/ /	1,49±1,94 15	3,84±1,32 30	17,6±1,15 41
p:	/	N.S.	N.S.	0,0001
Experiment 10:	Dag 12 (N)	Dag 19 (N)	Dag 27 (N)	Dag 40 (N)
Functionele zwemblaas:	1,22±1,06 26	6,23±1,80 9	15,9±1,00 29	48,2±0,96 35
Niet-funct. zwemblaas:	0,93±1,44 14	4,61±1,00 30	9,24±1,04 27	23,2±1,35 18
p:	N.S.	N.S.	0,0001	0,0001
Experiment 11:		Dag 21 (N)		Dag 41 (N)
Functionele zwemblaas:		6,24±2,45 24		70,3±1,41 59
Niet-funct. zwemblaas:		4,60±4,01 9		22,5±3,80 26
p:		N.S.		0,0001

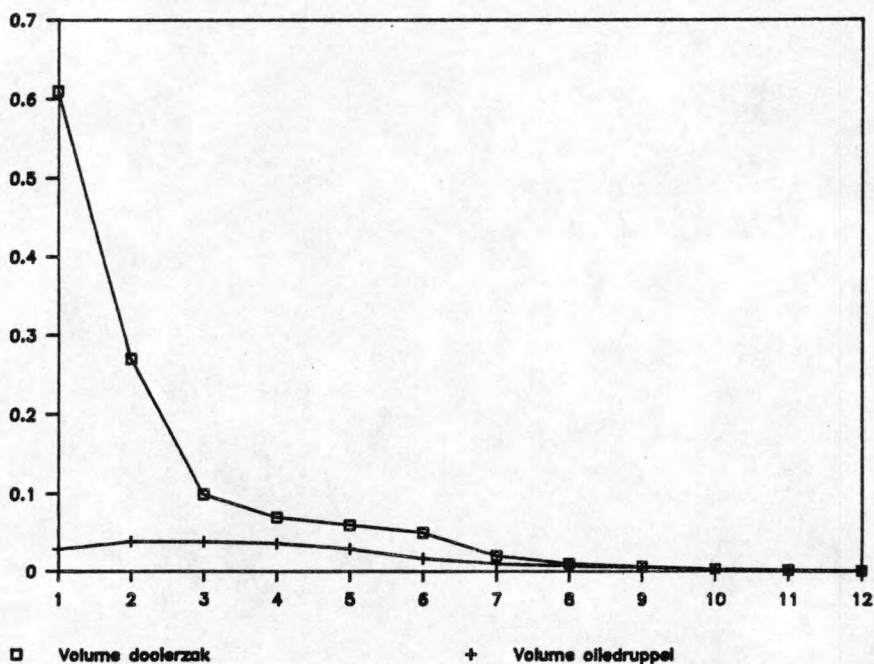
(*: gemiddelde ± S.E.)

Tabel 24: Specifieke groeisnelheid (SGR) van zeebaarslarven met een al dan niet geïnflateerde zwemblaas tijdens de experimenten 8 (januari-maart 87), 10 (januari-maart 88), en 11 (maart-mei 88).

Experiment 8:	Dag 5-12	Dag 12-18	Dag 18-27	Dag 27-39
Functionele zwemblaas:	/	1,09	5,40	3,16
Niet-funct. zwemblaas:	0,7	4,14	3,41	2,18
Experiment 10:	Dag 7-12	Dag 12-19	Dag 19-27	Dag 27-40
Functionele zwemblaas:	6,85	6,40	2,13	1,98
Niet-funct. zwemblaas:	/	5,71	2,13	1,6
Experiment 11:	Dag 9-21		Dag 21-40	
Functionele zwemblaas:	4,61		3,22	
Niet-funct. zwemblaas:	3,93		2,92	



Figuur 11: Groei van de zwemblaas (lengte, hoogte, in mm) en de luchtbel in zeebaarslarven in functie van de leeftijd (dagen)



Figuur 12: Resorptie van de dooierzak en de oliedruppel (diameter, mm) bij zeebaarslarven in functie van de leeftijd (dagen)

experiment stelden we bij deze laatste groep reeds een significant betere groei ($p=0,002$) vast, na respectievelijk 19 en 21 dagen. Na 40 dagen is de lengte van de larven met een geïnflateerde zwemblaas 15 tot 21% groter, terwijl de verschillen in gewicht op deze tijdstippen nog sterker uitgesproken zijn (exp. 10 na 40 d.: 107 %, exp. 11 na 41 d.: 212 %, tabel 23). In de drie experimenten vinden we globaal een hogere SGR voor de larven met een functionele zwemblaas (tabel 24). Deze verschillen in groei zijn vermoedelijk niet enkel te wijten aan een negatief effect van een functionele zwemblaas op de prooicaptatie (stabilisatie van de larve), daar we steeds werkten met intensieve systemen waar de prooidensiteit vrij hoog is (4 tot 5/ml). Een verhoogde energieconsumptie zou hier evenzeer een verklaring kunnen bieden. De larven met een niet-functionele zwemblaas moeten immers continu in beweging blijven, want bij iedere rustpauze zinken ze naar de bodem. Kitajima (1987) toonde aan dat larven met een niet-ontwikkelde gasblaas een hogere densiteit hebben, 1,07 t.o.v. 1,03 voor larven met een correct gevormde blaas. Chatain (1987) beschreef recent de groeiverschillen die optreden bij de larven van zowel zeebaars als goudbrasem onder invloed van de al of niet-ontwikkelde zwemblaas. Voor zeebaars stelde ze een groeivertraging vast die tot uiting kwam rond dag 41 ($19,43 \pm 0,29$ mm t.o.v. $18,08 \pm 0,41$ mm). De groeivertraging gevonden in onze experimenten treedt tweemaal zo vroeg op. Verdonck *et al.* (1986) stelden bij oudere zeebaarzen een gewichtstoename vast van 4 tot 170 g over een periode van 14 maanden. Zeebaarzen zonder functionele zwemblaas bereikten in dezelfde periode onder identieke omstandigheden slechts 66 g. Deze groeivertragingen zijn ook bekend bij salmoniden (Tait, 1960).

Bij de commerciële produktie van mariene vislarven is het belangrijk zo snel mogelijk een inzicht te hebben over de verhouding larven met en zonder functionele zwemblaas in elke tank. Dit laat toe bepaalde tanks te ledigen waarin slechts een beperkt percentage larven een goed ontwikkelde zwemblaas bezit. Larven zonder zwemblaas zijn commercieel waardeloos, maar verbruiken niettemin dure levende voedsels. Uit deze studie blijkt dat men reeds na een tiental dagen (dit is vóór de voedingsperiode met *Artemia*) deze verhouding kan bepalen, enerzijds op basis van de visuele zichtbaarheid van een gasbel in de zwemblaas, maar ook op basis van de effectieve hoogte van de zwemblaas. Deze studie beklemtoont nog eens het belang van een functionele zwemblaas, daar afwezigheid van deze reeds na amper 20 dagen resulteert in significante groeiverschillen.

II.3.2. Ziektebeelden

II.3.2.1. Introductie

Het doel van deze studie omtrent de ziektebeelden is voornamelijk het opmaken van een inventaris van de morfologische afwijkingen van zeebaars die voorkomen tijdens de kweek van de larvale

stadia op ons laboratorium. We wilden daarbij ook nagaan in welke mate deze morfologische afwijkingen verantwoordelijk zijn voor de grote sterfte die we aantreffen tijdens de kweek van zeebaarslarven. We gingen bovendien na of er correlaties bestaan tussen onderlinge ziektebeelden.

II.3.2.2. Materiaal en methoden

Deze studie gebeurde volledig op basis van visuele waarnemingen met een binoculaire loupe (vergroting: 50 maal). Tot dag 40 kan men zonder noemenswaardige problemen de interne organen onderscheiden. Operculumafwijkingen en misvormingen van de wervelkolom werden pas op dag 40 nagegaan, daar deze pas vanaf dit stadium tot uiting komen.

II.3.2.3. Resultaten

Het procentueel voorkomen van morfologische afwijkingen bij de larven van de zeebaars in experiment 8, 10 en 11 wordt weergegeven in tabel 25. Daaruit blijkt dat vooral een niet-functionele zwemblaas en de verlenging van de onderkaak de meest voorkomende afwijkingen zijn. Toch zien we dat de afwijkingen van de zwemblaas sterk afnemen in deze drie experimenten. Tijdens het experiment januari-maart 1987 hadden bijna 60 % van de larven een niet-geïnflateerde zwemblaas. In de laatste twee experimenten (januari-maart en maart-mei 1988) was dit gedaald tot respectievelijk 28 en 23%. In het laatste experiment werden alleen de larven beschouwd gekweekt bij 100-1000 lux (zie deel V).

In het experiment januari-maart 1988 troffen we op dag 12 een groot aantal larven aan met een kristal in de urineblaas (30%). Op de dag 19, 27, en 40 was dit maximaal 7%. Afwijkingen van de wervelkolom (xyphose, scoliose, lordosis, spongilose) en verkortingen of ontbreking van de opercula werden slechts weinig aangetroffen in de verschillende experimenten. Verlenging van de onderkaak daarentegen kwam massaal voor en dit in de drie experimenten. Vergroting van de galblaas werd vooral opgemerkt tijdens het experiment januari-maart 1988 en dit uitsluitend in de conditie waarin de larven gevoed werden met een dieet arm aan HUFA.

II.3.2.4. Bespreking

In de kweekexperimenten door ons uitgevoerd vinden we, met uitzondering van de onderkaakverlenging, relatief weinig skeletmisvormingen. Nochtans zijn skeletafwijkingen zeer bekend bij verschillende gekweekte mariene vissoorten zoals de Japanse zeebrasem (*Pagrus major*) (Fujita, 1979; Kitajima et al., 1981; Kitajima, 1987; Foscarini, 1988), bij de Europese zeebaars en goudbrasem (Paperna, 1978; Weppe en Bonami, 1983; Chatain, 1987; Francescon et al., 1988).

↑
nonsadige
zwelling v/b huid

Tabel 25: Procentueel voorkomen van morfologische afwijkingen bij zeebaarslarven gekweekt tijdens de experimenten 8, 10, 11 op dag 40 (tenzij anders aangegeven)

	Niet-Funct. zwembl.	Wervelkolom- afwijking	Onderkaaks- verlenging	Operculum- verkorting	Urinaire calculosis	Galblaas- vergroting
Experiment 8:	58,6 (87)*	/	27,6 (87)	/	/	/
Experiment 10:	27,8 (172)	0,6 (172)	72,7 (172)	1,7 (172)	30,8 (120) (dag 12)	9,3 (172)
Experiment 11:	23,0 (151)	2,4 (170)	44,1 (170)	3,5 (170)	0,8 (133) (dag 9)	2,4 (170)

(/: geen waarnemingen; *: aantal waarnemingen)

Volgens Fujita (1979) vindt men bij de gekweekte larven van de Japanse zeebrasem meestal 5 tot 50 % wervelkolomafwijkingen. In onze experimenten stelden we op dag 40 maximaal 2,4% larven met lordosis (foto 10) vast. Slechts enkele gevallen van scoliosis werden over de verschillende experimenten waargenomen. Volgens Kitajima *et al.* (1981) komt lordosis pas tot uiting vanaf de veertigste dag. De larven geproduceerd in ons laboratorium werden echter verder opgekweekt in de visplant te Doel. Volgens Denayer (pers. mededeling, 1988) werden er ook bij de oudere zeebaarsen weinig dieren aangetroffen met lordosis of scoliosis. Bij de opkweek van de larven uit het laatste experiment (± 4000 stuks) werd wel vastgesteld dat plus minus 10% van de pootvissen een gedrongen vorm vertoonde. Dit werd eerst toegeschreven aan de ontbreking van een functionele zwemblaas, maar uit later onderzoek bleek dat de larven allen over een goed functionerende zwemblaas beschikten. Vermoedelijk is deze gedrongen vorm dan ook een afwijking van de wervelkolom (spongiosis).

Anderzijds vinden we weinig dieren met ontbrekende of verkorte opercula. Bij het bezoek aan de kwekerij "Valli da pesca" in de omgeving van Venetië (Italië) in februari 1988, bemerkten we dat een aanzienlijk deel van de geproduceerde goudbrasems verkorte opercula had (20-30 %). Nochtans wordt dit probleem zelden vermeld bij de productie van mariene vislarven.

Bij de kweek van zeebaarslarven in ons laboratorium vonden we een zeer hoog aantal larven met verlenging van de onderkaken (foto 12). Deze verlenging treedt op rond de twintigste dag en is gemakkelijk waarneembaar bij gesloten muilstand, daar de onderkaak langer is dan de bovenmuil. Bij navraag in verschillende larvekweekcentra bleek dat niemand deze afwijking ooit had vastgesteld. Alhoewel deze afwijking duidelijk waarneembaar is, hebben we geen enkele aanduiding dat deze afwijking de larven hindert. Francescon *et al.* (1988) vond op een totaal van 1483 goudbrasems slechts 2 vissen met een afwijking van de muilstand (prognathe muilstand) en slechts drie dieren met een verkorting van de opercula.

In het algemeen komen afwijkingen van de wervelkolom zelden voor in natuurlijke vispopulaties ($< 1\%$) (Möller en Anders, 1986). Bij gekweekte vissen is dit percentage veel hoger. In dezelfde studie van Francescon *et al.* (1988) werd in een wilde populatie goudbrasems slechts 1 % skeletmisvormingen aangetroffen, terwijl in de gekweekte populaties het aantal varieerde tussen 5 en 48 %.

Volgens verschillende onderzoekers is lordosis direct gecorreleerd met een niet-functionele zwemblaas (Fujita, 1979; Kitajima *et al.*, 1981; Olesen, 1986; Kitajima, 1987) (zie III.1.1.3.2.). In onze studie zien we geen enkel verband tussen beide afwijkingen. Vervormingen van de wervelkolom zijn eerder zeldzaam (0,6 en 2,4 % op dag 40), terwijl een niet-geïnflateerde zwemblaas in veel grotere mate voorkomt (27,8 en 23 %).

Vervormingen van de wervelkolom werden wel verschillende malen in grote aantallen vastgesteld bij de pas ontloken larven (experiment 6, april-juni 1986: 25 %; experiment 10, januari-maart 1988: 50 %; experiment 11, maart-mei 1988: 8 %). Deze larven vertoonden ofwel een totale kromming

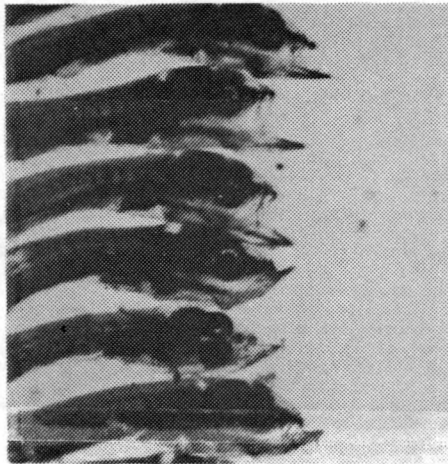
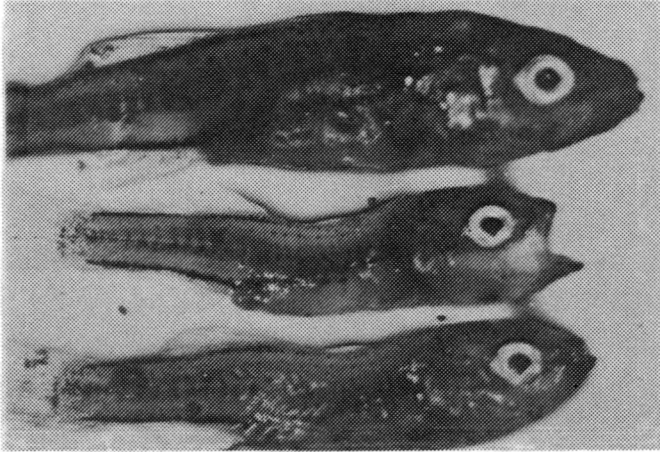
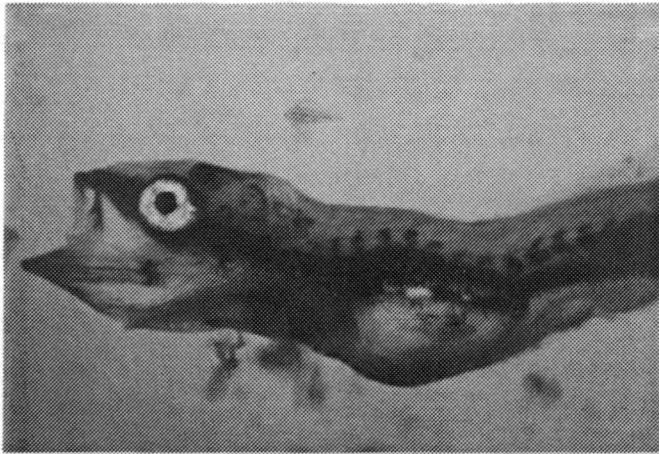


Foto 10: Zeebaarslarve met hyperextensie van de zwemblaas en lordosis

Foto 11: Zeebaarslarven met een al dan niet geïnflateerde zwemblaas gekoppeld aan lordosis

Foto 12: Zeebaarslarven met een verlengde onderkaak

van de wervelkolom (foto 6), waarbij ze continu rondtolden, ofwel alleen een kromming van de staartwervels. Tijdens de eerste twee levensweken analyseerden we de dode larven op de bodem van de tank (in de spui). Totaal gekromde larven vonden we alleen op de eerste dag na de ontluijing. De larven waarvan alleen de staarttip gekromd was, vonden we tijdens de eerste vijf levensdagen. Vermoedelijk stierven de larven met een totale kromming af binnen 24 uur na ontluijing wegens totale uitputting, terwijl de anderen maximaal vijf dagen in leven bleven. Dezelfde afwijkingen bij de ontluijing van de larven werden eveneens beschreven door Devauchelle en Chopin (1986). Het hoge aantal larven met skeletmisvormingen in het experiment 10 was vermoedelijk te wijten aan slechte transportomstandigheden (36 uur i.p.v. de normale 18 uur). Ondertussen waren de larven reeds ontloken. Bij deze ontluijing komen vele schadelijke metaboliëten in het water, waarbij er zeer snel verslechtering van de waterkwaliteit optreedt, met als mogelijk gevolg misvormingen van de later ontluikende larven. Verschillende onderzoekers wijten het voorkomen van malformaties bij de pas ontloken larven aan een niet aangepast dieet voor de broedstockdieren (Fujita, 1979; Kitajima, 1987; Guillaume, 1987). De kwaliteit van het voedsel toegediend aan de ouderdieren beïnvloedt rechtstreeks de kwaliteit van de eieren. Zowel de hoeveelheid proteïnen als de vetzuurpatronen worden rechtstreeks weerspiegeld in de samenstelling van de eieren (Foscarini, 1988). Watanabe *et al.* (1985) vonden een reductie van het aantal abnormale eieren en larven na toediening van supplimenten krill aan de broedstockdieren in de periode juist voor de voortplanting. Volgens Devauchelle (1987b) is het verband tussen voedselregime van de broedstockdieren en de eikwaliteit niet duidelijk. Het voedselregime van de ouderdieren zou daarentegen wel een bepalende factor zijn voor het succes van de larvale kweek. Het voorkomen van skeletmisvormingen zou eerder veroorzaakt worden door niet-optimale incubatieomstandigheden. Bij de incubatie van de bevruchte eieren van de tong en de tarbot veroorzaakt een te lage saliniteit (kleiner dan 15 pro mille) een groot aantal malformaties van de larven (Devauchelle, 1987a).

Naast skeletmisvormingen is de niet-ontwikkeling van de zwemblaas (foto 10) de meest voorkomende afwijking bij de larven gekweekt in onze experimenten (tabel 25). Zoals gesteld in II.3.1.3.1. hadden tot voor kort 90 % van de larven geproduceerd in de meeste kweekcentra deze misvorming, wat dan ook terecht beschouwd werd als het hoofdstruikelblok voor de commerciële productie. Tijdens het laatste jaar bedroeg het percentage larven met een niet-functionele zwemblaas minder dan 30 %. Het was echter niet mogelijk in deze studie onderzoek te verrichten naar de redenen van deze sterke daling van deze afwijking. In de experimenten van het laatste jaar werden volgende variabelen aangepast: lage verlichtingssterkte, vermindering van de saliniteit na dag 5, toediening van voedsels voldoende aangerijkt met HUFA's, en gebruik van een ander type uitstroomezeel waardoor de continue verwijdering van het oppervlaktewater plaats vindt (zie hoofdstuk 2). Het is niet mogelijk te concluderen welke factor of factoren verantwoordelijk zijn voor de sterke verbetering van de zwemblaasontwikkeling, daar elk van deze factoren volgens

verschillende onderzoekers een invloed hebben op de zwemblaasinflatie. Wel kunnen we stellen dat het hoge percentage larven met een functionele zwemblaas (72 tot 77%) in onze experimenten bekomen tijdens het laatste werkingsjaar vergelijkbaar is met de resultaten van de Franse centra (80 tot 90 %; Chatain, pers. mededeling, 1988).

Een andere vorm van zwemblaasafwijking is de hyperinflatie van de zwemblaas (foto 11). Deze afwijking is eerder zeldzaam: in het voorlaatste experiment werden slechts elf gevallen vastgesteld op een totaal van 781 waarnemingen of 1,4 %. Deze zwemblaasafwijking kan echter bij gestresseerde larven massaal voorkomen en een totale sterfte van de populatie veroorzaken (Bagarino en Kungvankij, 1986). Beide afwijkingen van de zwemblaas (niet- en hyperinflatie) leiden meestal tot de dood van de getroffen larven. Bij hyperinflatie wordt zowel de lever als het darmkanaal platgedrukt waardoor de larven zich niet meer kunnen voeden en aldus verhongeren.

Larven met een niet-functionele zwemblaas sterven meestal tijdens de overgang naar korrelvoedsel. Tijdens deze overgang worden er progressief kleinere hoeveelheden levende prooien aan de zeebaarslarven toegediend. Larven met een functionele zwemblaas die nog niet overgeschakeld zijn op korrelvoedsel kunnen deze periode beter overbruggen dan larven zonder functionele zwemblaas. Deze laatsten zullen zeer snel uitgeput raken en afsterven.

Urinaire calculosis werd met uitzondering van dag 12 in het experiment januari-maart 1988 weinig aangetroffen (<1 %). Op dag 12 van experiment 10 vinden we bijna één derde van de larven met een kristal in de urineblaas. De vraag stelt zich of deze larven afsterven of in leven blijven. Zoals vermeld in III.1.1.3. zou volgens Chatain (pers. mededeling, 1987) deze afwijking wel leiden tot afsterving van de larven. In hetzelfde experiment 10 vinden we één week later slechts 7,5 % van de larven met urinaire calculosis. Deze daling kan verklaard worden doordat de kristallen terug oplossen ofwel doordat deze larven grotendeels afsterven. De overlevingscijfers in tabel 18 laten niet toe te stellen dat de larven allen afsterven daar op dag 30 in tank 2, 4, en 5 nog meer dan 70 % van de larven in leven zijn. Verder onderzoek is nodig om een definitief uitsluitsel te krijgen over de invloed van deze afwijking op de overleving. Larven met een kristal in de urineblaas vertonen ook geen significant lagere darmvulling dan de normale larven (N.S.; "zieke" larven: $28,8 \pm 20,5$ % en gezonde dieren: $36,6 \pm 25,5$ %), wat aldus aansluit bij de bevindingen van Giavenni (1986).

De laatste te vermelden afwijking is de abnormale vergroting van de galblaas. De vergroting manifesteert zich door een vertienvoudiging van het volume (normaal: $0,0056 \text{ mm}^3$, vergroot $0,058 \text{ mm}^3$). Deze afwijking viel vooral op in het experiment 10. In de tanks waar de larven gevoed werden met een dieet arm aan HUFAs werden viermaal meer larven gevonden met een galblaasvergroting dan bij de larven gevoed met een dieet met HUFAs ($p = 0,02$). Bij rondtollende larven bedroeg deze groep zelfs 42% (zie deel IV). In experiment 11 werd deze afwijking veel minder aangetroffen.

Hoofdstuk 4: INVLOED VAN POLY-ONVERZADIGDE VETZUREN OP DE OVERLEVING, GROEI EN MORFOLOGISCHE ONTWIKKELING VAN DE ZEEBAARSLARVEN

II.4.1. Analyse van vetzuurmethylesters

II.4.1.1. Extractie van vetzuren

Voor de analyse van vetzuren in een weefsel (via gaschromatografische technieken) is het noodzakelijk deze eerst te extraheren uit de weefsels en daarna te veresteren tot vetzuurmethylesters. Tijdens deze studie werd een deel van de stalen (experiment 1) zelf bepaald op het laboratorium van Dr. C. Agius (Kingston Polytechnics, Groot Brittannië), terwijl een ander deel (experiment 2) bepaald werd op het laboratorium van Dr. P. Sorgeloos (Artemia Reference Center, R.U.Gent). Twee extractie- methoden werden gebruikt:

- op het laboratorium van Dr. P. Sorgeloos: de gemodificeerde methode van Bligh en Dyer (Fishwick and Wright, 1977) , en
- op het laboratorium van Dr. C. Agius: de methode van Folch (1957).

Beide methodes die grote gelijkenissen vertonen, blijken zeer geschikt te zijn voor de extractie van lipiden uit dierlijk weefsel (Sheppard *et al.*, 1973).

II.4.1.1.1 De gemodificeerde methode van Bligh en Dyer (1959)

Bij deze extractiemethode wordt het staal na het toevoegen van een mengsel methanol, chloroform en water (2:1:0,8) gehomogeniseerd en over een celitefilter gebracht. Vervolgens wordt de laag achtergebleven op de celitefilter afgeschept en terug in oplossing gebracht, gehomogeniseerd en terug over de celitefilter gegoten. Deze bewerking wordt nog éénmaal herhaald. Het filtraat wordt gewassen met een zoutoplossing (1 g NaCl in 40 ml gedestilleerd water) en vervolgens gescheiden met behulp van een scheitrechter. De chloroformlaag wordt vervolgens over watervrij natrium-sulfaat gebracht. Het residu hiervan op de celitefilter wordt nog eens gehomogeniseerd in aceton en geëxtraheerd met petroleumether (werkwijze labo Dr. Sorgeloos). De lipidenhoudende lagen worden vervolgens ingedampt met een rotavapor. Na bepaling van het gewicht van de lipiden worden deze opgelost in benzeen en samen met gedestilleerd water en kaliumhydroxide gedurende 40 minuten in een kokend waterbad geplaatst (verzeping). Na afkoeling wordt er HCl (2 M) toegevoegd en extraheert men met petroleumether. Na indampen voegt men aan de vetzuren methanol, benzeen en boortrifluoride (14%) toe. Deze oplossing wordt vervolgens

gedurende acht minuten in een kokend waterbad gebracht. Uiteindelijk worden de vetzuurmethylesters afgezonderd via een water-petroleum-etherextractie. Na een laatste maal droogdampen voegt men 1 mg interne standaard toe en bewaart men het staal in iso-octaan.

II.4..1.1.2 De methode van Folch (1957)

Na individuele weging van de zeebaarslarven worden ze in kleine stukjes geknipt, overgebracht in methanol (10 ml per gram weefsel) en gedurende 30 seconden gehomogeniseerd met een ultraturrax homogenisator. Daarna wordt chloroform (20 ml per gram weefsel) toegevoegd en nog eens één minuut gehomogeniseerd. Vervolgens wordt het homogenaat in een celbreker geplaatst teneinde de celmembranen te breken om de fosfolipiden vrij te maken. Na filtratie over een papierfilter wordt het residu van de filter geschraapt, terug in chloroform-methanol (2:1) opgelost en verder gehomogeniseerd, het filtraat wordt andermaal in een celbreker gebracht en daarna terug gefilterd. Na spoeling met chloroform wordt het filtraat tesamen met 20 % petroleumether in een scheitrichter gebracht en gescheiden. De onderste fase (chloroform) wordt afgenomen en de bovenste fase wordt driemaal geëxtraheerd met chloroform (2:1 verhouding nastreven). De chloroformlagen worden samengevoegd en gewassen met gedestilleerd water, vervolgens over watervrije natriumsulfaat gebracht en ingedampt met een rotavapor in een vooraf gewogen kolf. De hoeveelheid lipiden kan dan afgeleid worden uit de gewichtstoename van de kolf.

De methylesterificatie gebeurt rechtstreeks door toevoeging van 25 ml natriummethoxide per staal. De natriummethoxide wordt bereid door het oplossen van 0,4226 g zuiver natrium in 100 ml methanol. Het reactiemengsel laten overnachten (24 uur) bij kamertemperatuur onder stikstof ofwel refluxen bij 64°C gedurende 30 minuten. Daarna wordt het mengsel met 20 ml petroleumether en 5 ml gedestilleerd water geëxtraheerd. De methanol-waterlaag wordt vervolgens nog driemaal geëxtraheerd met petroleumether waarna de petroleumether-lagen terug gecombineerd worden en driemaal gewassen met gedestilleerd water. Na filtratie over watervrij natrium-sulfaat en toevoeging van één mg interne standaard (C19) wordt alles ingedampt met de rotavapor. De gemethyleerde vetzuuresters worden uiteindelijk in geredestilleerd hexaan gestockeerd.

II.4.1.2. Gaschromatografische bepaling van vetzuren

II.4.1.2.1. Analysetoestellen

Voor de identificatie van de vetzuurmethylesters op het laboratorium van Dr. Agius werd een Sigma 3B gaschromatograaf (Perkin Elmer) gebruikt, verbonden met een Perkin Elmer recorder 56. De gegevens werden verwerkt door een Perkin Elmer 3600 Data Station (Chromatographic Intelligent Terminal). Deze laatste berekent voor elke analyse de oppervlakte van elke piek volgens in te stellen condities (tabel 26).

Voor de analyse van de vetzuurmethylesters gebruikten we een WCOT-kolom (Wall Coated Open Tubular Column) specifiek ontworpen voor "fatty acids methyl esters" (FAME, Chrompack).

Op het laboratorium van Dr. Sorgeloos maakt men gebruik van een Carlo Erba Fractovap 2330 gaschromatograaf (GC) verbonden met een Hewlet Packard 3390 A (data station). De condities voor de gaschromatografische analyses worden weergegeven in tabel 26

Tabel 26: Condities voor de gaschromatografische analyse van vetzuurmethylesters in twee laboratoria

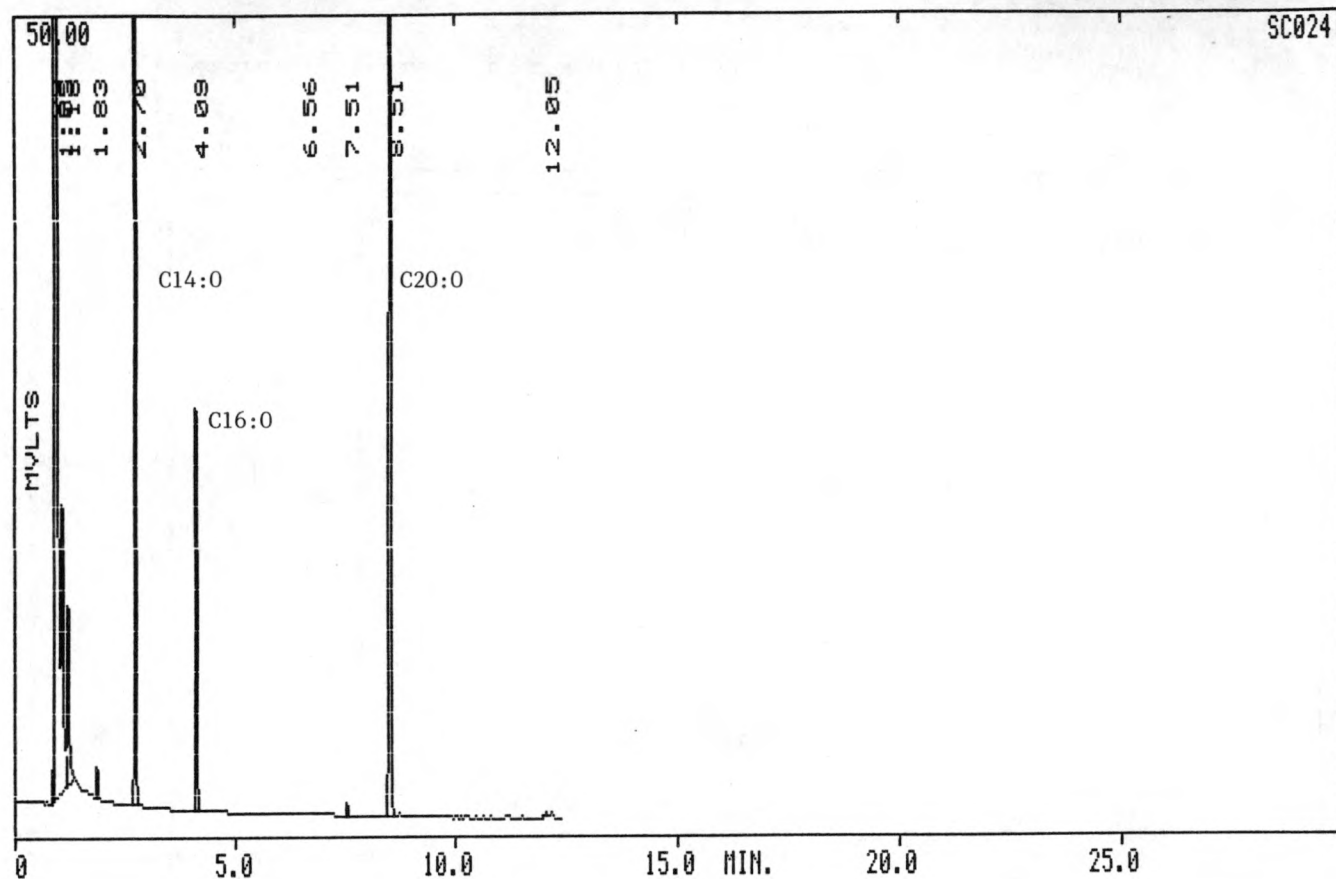
Laboratorium	Dr. Agius	Dr. Sorgeloos
Begintemperatuur:	140°C	154°C
Eindtemperatuur:	220°C	200°C
Begin tijd:	0 min	0 min
Eind tijd:	10 min	0 min
Temperatuursverhoging:	4°C/min	1.5°C/min
Injectietemperatuur:	260°C	250°C
Detectietemperatuur:	260°C	250°C
Split:	52ml/min	solid inj.
Waterstofdruk:	110 kPa	60 kPa
Luchtdruk:	200 kPa	82 kPa
Recordersnelheid:	10 mm/min	5 mm/min

II.4.1.2.2. Standaarden

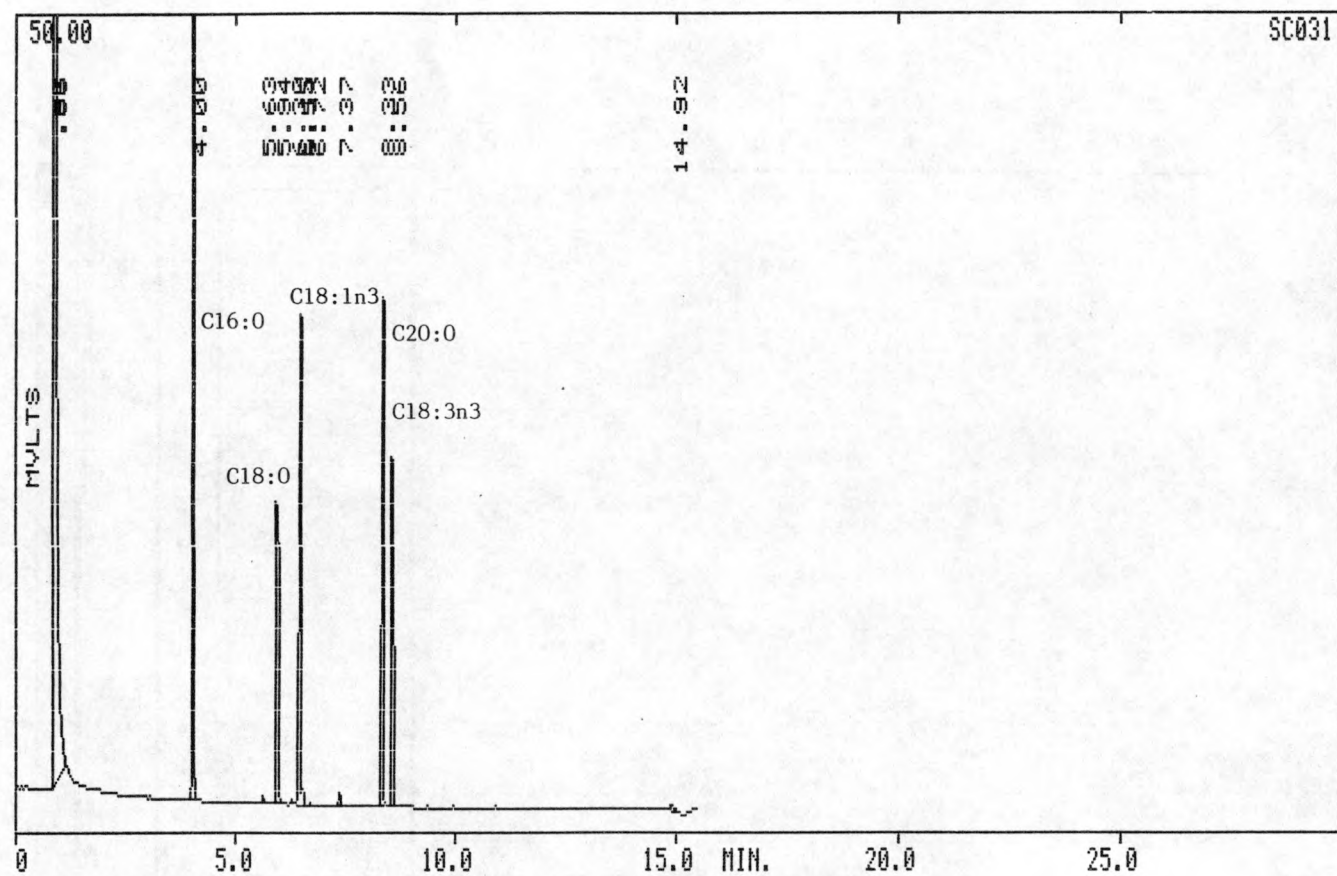
Op het laboratorium van Dr. Sorgeloos zijn de retentietijden van de individuele vetzuurmethylesters bekend. Op het laboratorium van Dr. Agius dienden we eerst de retentietijden te bepalen van elke komponent afzonderlijk ter identificatie van de individuele pieken in de diagrammen. Daartoe werden volgende standaard-oplossingen geïnjecteerd:

- standaardoplossing 6: 100 mg C12:0
250 mg C18:1n3
100 mg C19
- standaardoplossing 11: 250 mg C14:0
25 mg C16:0
120 mg C20:0
- standaardoplossing 12: 65 mg C14:0
250 mg C18:2n3
- standaardoplossing 14: 20 mg C16:0
20 mg C18:0
20 mg C18:1n3
20 mg C18:2n3
20 mg C18:3n3
- standaardoplossing 16: 20 mg C16
20 mg C18:0
20 mg C18:1n3
20 mg C18:3n3
20 mg C20:0
- standaardoplossing 17: 25 mg C16
25 mg C18:0
25 mg C20:0
25 mg C22:0

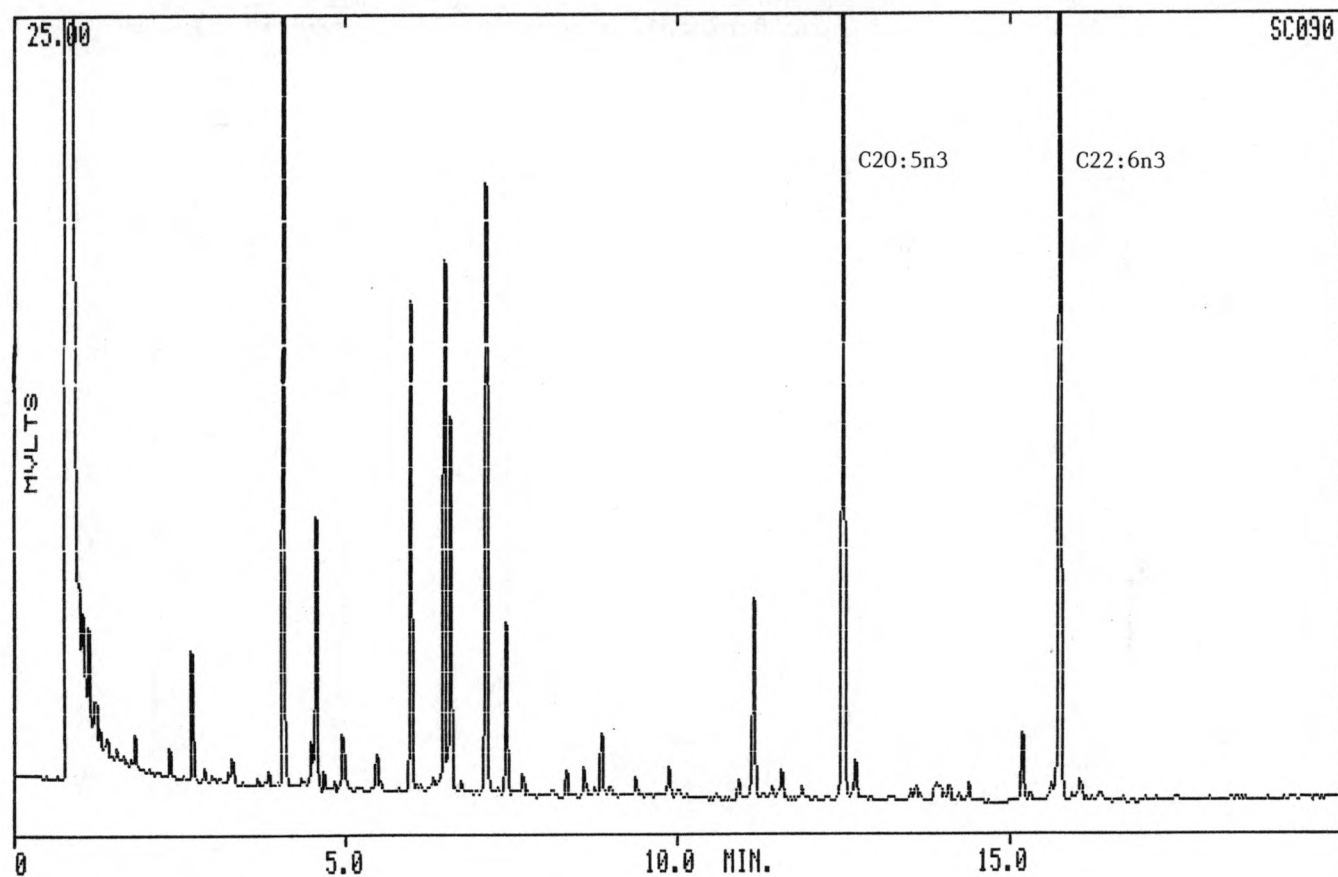
De diagrammen van de standaardoplossingen 11 en 16, staal 4 (wildgevangen larven) en staal 12 (één dag oude dooierzaklarven) worden weergegeven in figuur 13 tot 15. Aanvullende informatie werd verkregen door de vergelijking van de diagrammen van éénzelfde staal geanalyseerd zowel in het laboratorium van Dr. Sorgeloos als in het laboratorium van Dr. Agius. Piekidificatie van het diagram in het laboratorium van Dr. Sorgeloos kon dan geëxtrapoleerd worden naar de diagrammen verkregen in het laboratorium van Dr. Agius. Op die manier werd zekerheid



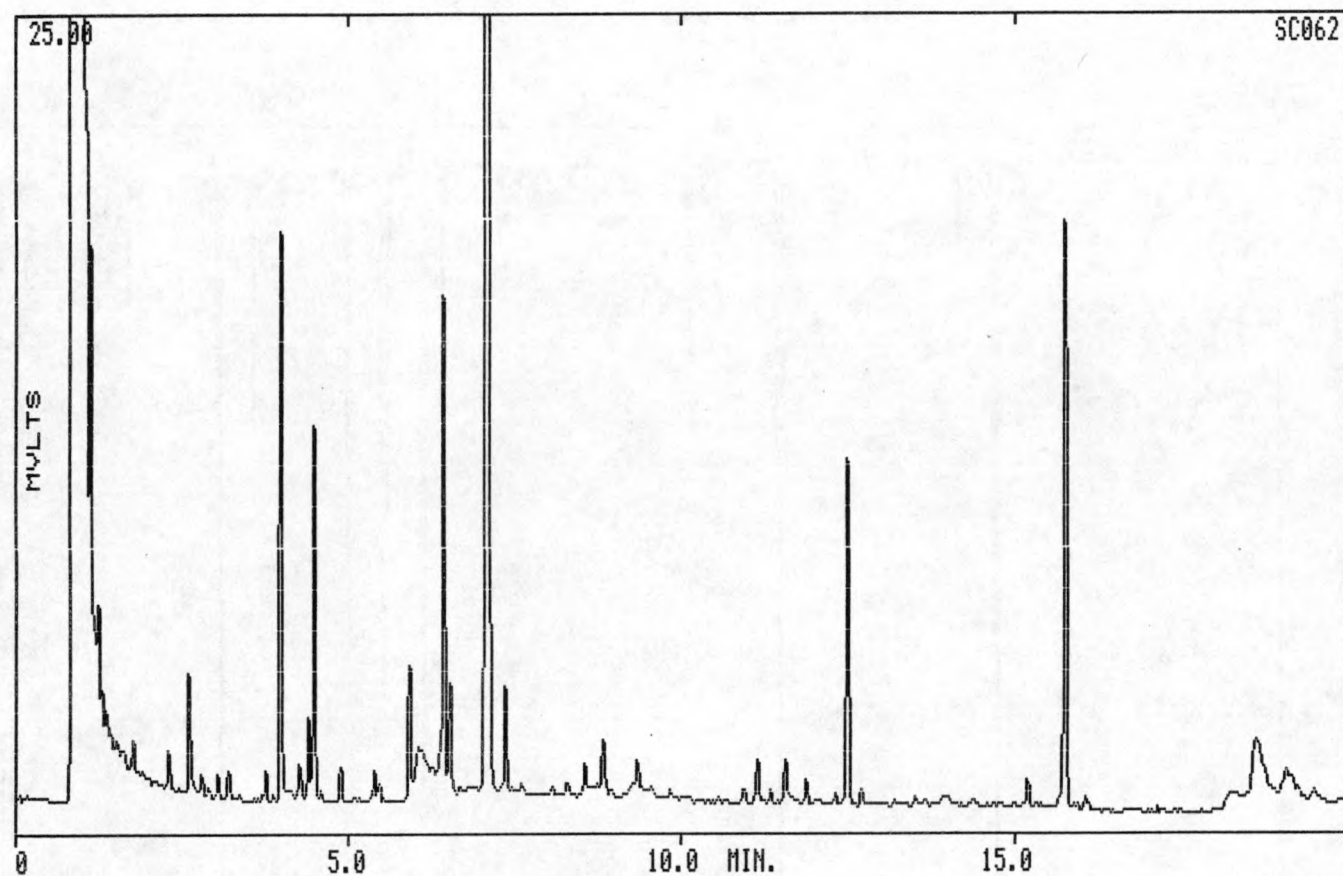
Figuur 13 : Diagram (GC) van de standaardoplossing 11



Figuur 14: Diagram (GC) van de standaardoplossing 16



Figuur 15 : Diagram (GC) van staal 4 (wildgevangen larven)



Figuur 16 : Diagram (GC) van staal 12 (één dag oude dooierzaklarven)

verkregen over de retentietijden van andere belangrijke vetzuren (C16:1n7/9; C20:5n3; C22:4n6/3; C22:5n3 en C22:6n3).

II.4.2. Natuurlijke vetzuurpatronen in zeebaarslarven

II.4.2.1. Doelstelling

In een eerste fase werd nagegaan in welke mate de twee hogere vetzuren C20:5n3 en C22:6n3 belangrijk zijn voor de larven van de zeebaars (*Dicentrarchus labrax*). Daartoe gingen we de procentuele verdeling van de vetzuren na in wilde zeebaarslarven en in dooierzaklarven. In de natuur voeden de jonge zeebaarsen zich met hun natuurlijk dieet, namelijk zoöplanktonorganismen (copepoden, nematoden). Dit natuurlijk dieet wordt aanzien als het optimaal dieet (Léger *et al.*, 1986). Daar de vetzuurpatronen van het voedsel zich weerspiegelen in de vetzuurpatronen van de larven (Gatesoupe *et al.*, 1984; Watanabe *et al.*, 1985), veronderstellen we dan ook dat de vetzuurpatronen van de geanalyseerde larven een aanduiding geven van de belangrijkheid van bepaalde vetzuren. Wat de dooierzaklarven betreft, veronderstellen we eveneens dat de larven in het dooiermateriaal de noodzakelijke bouwstenen meekrijgen, in hoeveelheden die evenredig zijn met de belangrijkheid en de noodzaak, zodat hier dezelfde redenering opgaat als voor wilde larven. Ter vergelijking werden eveneens eigen gekweekte larven geanalyseerd.

II.4.2.2. Materiaal

Op 24/4/87 werden zeebaarslarven (althoewel men hier ook kan spreken van pootvisjes) met behulp van een sleepnet gevangen in de Slackmonding te Ambleteuse (Frankrijk). Vijf zeebaarslarven (natgewicht: 1,9; 1,7; 2,6; 2,8; en 3,9g) werden levend getransporteerd naar het laboratorium en onmiddellijk diepgevroren.

Dooierzaklarven afkomstig van verschillende centra werden eveneens verzameld. Een eerste reeks was afkomstig van het C.O.B. (Brest, Frankrijk; mei 87), terwijl de tweede reeks afkomstig was van Ferme Marine de Douhet (Douhet, Frankrijk; januari 88). Voor elk staal werden 150 tot 200 larven verzameld en ingevroren (natgewicht: 0,05 tot 0,1 mg/larve).

Zestig dagen oude larven gekweekt op het laboratorium werden eveneens bewaard. Deze larven namen tussen dag 50 en 60 actief Trouvit forellenkorrels 000 op (Trouw, Putten, Nederland).

Alle stalen werden onmiddellijk vervroren in vloeibare stikstof en gestockeerd bij -70°C tot aan de analyse. De dooierzaklarven van de tweede reeks (Douhet) werden geanalyseerd op het laboratorium van Dr. Sorgeloos. Voor elke conditie werden 150 tot 200 larven gemixt en éénmalig geanalyseerd. Van de andere stalen, bepaald op het laboratorium van Dr. Agius, werden ter

kontrole drie tot vijf mixen van larven geanalyseerd, waarbij elke mix uit tenminste 3 en maximaal 200 larven bestond, afhankelijk van het gewicht (ouderdom) van deze larven.

II.4.2.3. Resultaten

Tabel 27 geeft de procentuele verdeling van de bijzonderste vetzuren in de larven van de zeebaars van verschillende oorsprong. In wildgevangen zeebaarslarven is de vetzuurverdeling als volgt: 35% verzadigde vetzuren (voornamelijk palmitinezuur), 17% monoënen (16:1 en 18:1 isomeren) en bijna 35% HUFA's (16,4% C20:5n3 en 16,3% C22:6n3). De vetzuren in één en drie dagen oude dooierzaklarven, afkomstig van het C.O.B. bestaan uit respectievelijk 25 en 19% onverzadigde vetzuren, 26 en 28% monoënen, en 35 en 37% HUFA's. Het vetzuurpatroon van één en vijf dagen oude dooierzaklarven afkomstig van Ferme Marine de Douhet vertoont een gelijkaardige verdeling: respectievelijk 22 en 27% onverzadigde vetzuren, 29 en 38% monoënen, en 30 en 34% HUFA's. C22:6n3 vertegenwoordigt in de 5 beschouwde groepen plus minus 50% van de HUFA's (46,6 tot 68,9%). Linol- en linoleenzuur zijn in deze larven slechts in zeer geringe mate of niet aanwezig. De HUFA's nemen bovendien procentueel toe in de 3 en 5 dagen oude dooierzaklarven t.o.v. de één dag oude larven (larven Brest: 35% HUFA op dag 1 en 37,3% op dag 3; larven Douhet: 29,6% HUFA op dag 1 en 34,1% op dag 5).

De larven gekweekt op het laboratorium vertonen een veel lagere HUFA-aanwezigheid, slechts 10,2%. Daarentegen vinden we in deze twee maanden oude larven een veel hoger linolzuurspiegel (15,7%).

II.4.2.4. Discussie

Analyse van de wildgevangen zeebaarslarven en de dooierzaklarven toont aan dat verhoudingsgewijze hogere poly-onverzadigde vetzuren sterk vertegenwoordigd zijn, hoofdzakelijk C20:5n3 en C22:6n3 (steeds in de totale vetten). Daarentegen zijn de essentiële vetzuren voor zoetwatervissen, linol- en linoleenzuur, slechts in zeer beperkte mate aanwezig. Bij de dooierzaklarven is de procentuele aanwezigheid van C22:6n3 zelfs tweemaal hoger dan C20:5n3. Eenzelfde verdeling vinden we ook bij de dooierzaklarven van de haring, namelijk 15,6% C22:6n3 t.o.v. 6,8% C20:5n3 (Tocher *et al.*, 1985). In de dooier van tongeieren is dit nog veel meer uitgesproken, C22:6n3 vertegenwoordigt 21,5% van de vetzuren, terwijl C20:5n3 slechts 4,5% bedraagt (Dendrinou en Thorpe, 1987). Een opvallend feit is ook de toename van de HUFA's in de enkele dagen oude larven. Een verklaring hiervoor is niet voorhanden, wel vinden we eenzelfde verschijnsel bij de haringlarven (Tocher *et al.*, 1985).

Tabel 27: Procentuele verdeling van de vetzuren in de dooierzaklarven van de zeebaars afkomstig van het C.O.Brest en van Ferme Marine de Douhet, alsook van larven gevangen in het wild (Ambleteuse, Frankrijk) en eigen gekweekte larven (uitgedrukt in oppervlakte procent van het elutiepatroon).

	DOOIERZAKLARVEN		WILD		EIGEN	
	Douhet		Brest			
	dag 1	dag 5	dag 1	dag 3		
F.A.M.E						
14:0	4,1	3,7	3,4	1,7	3,3	2,9
14:1	1,9	1,9				
15:0	0,8	1,1				
15:1	0,3	0,6				
14:2		0,2				
16:0	12,1	13,6	17,1	14,3	24,4	22,2
16:1n9	0,6	0,7				
16:1n7	2,6	8,9	15,4	17,6	11,1	3,1
17:0	0,6	0,7				
16:2	0,4	0,1				
16:3	0,7	0,9				
17:1	0,2	0,4				
18:0	4,8	7,9	4,5	2,9	7,0	6,8
18:1n9	17,4	17,2	15,4	17,6	11,1	12,6
18:1n7	4,4	2,7				
19:0	0,3	0,2				
18:2	6,2	6,8	3,0	5,8	tr	15,7
20:0	0,2	0,3				
18:3n6	0,2	1,1				
20:1	2,3	2,8				
18:3n3	1,4	1,5	tr	tr	tr	2,0
18:4	1,3	1,4				
20:2	0,8	0,4				
20:3n6		0,1				
20:3n3	0,2	0,3				
20:4n6		0,2				
22:1	1,9	2,5				
20:?	0,8	0,9				
21:5	0,8	0,7				
20:?	0,2	0,3				
20:5n3	7,6	7,8	11,0	10,2	16,4	4,0
22:3n3	0,3	0,4				
22:4n6	0,3	0,7	tr	tr	tr	1,7
22:4n3	0,4	0,5				
22:5n6						
22:5n3	1,1	1,3	tr	1,4	0,3	0,7
22:6n3	16,0	18,5	24,0	25,7	16,3	5,5
HUFA:	29,6	34,1	35,0	37,3	33,0	11,9

(tr: sporen)

Deze gegevens laten toe de vermoedelijke behoefte aan hogere vetzuren, specifiek voor zeebaarslarven af te leiden. Op zijn minst bevestigen deze gegevens de belangrijkheid van poly-onverzadigde vetzuren van het lange type voor zeebaarslarven. Bovendien benadrukken zij het belang van C22:6n3. Dit vetzuur zou proportioneel bekeken ten minste even belangrijk zijn als C20:5n3. De belangrijkheid van C22:6n3 t.o.v. C20:5n3 blijkt ook uit de studie van Culkin en Morris (1970). Deze onderzoekers vonden dat C22:6n3 in 8 mariene vissen gemiddeld driemaal meer voorkwam dan C20:5n3 (tabel 11).

De larven gekweekt op het laboratorium vertonen een eerder lage HUFA-aanwezigheid in vergelijking met de wildgevangen larven. In hoeverre deze lage concentratie alsnog voldoende is voor een normale groei en ontwikkeling van de larven is niet bekend. De lage HUFA-aanwezigheid is waarschijnlijk ondermeer te verklaren doordat de larven op dit moment reeds een tiental dagen volledig overgeschakeld waren op Trouvit forellenvoedsel 000. Dit voedsel bevat zeer weinig HUFA's, daarentegen bevat dit voedsel wel hoge hoeveelheden linol- en linoleenzuur, essentiële vetzuren voor forellen. Vandaar een waarschijnlijke uitleg ook voor de hoge hoeveelheid linolzuur in deze larven.

II.4.3. Invloed van HUFA's op groei, overleving en morfologische ontwikkeling van de zeebaarslarven

II.4.3.1. Doelstellingen

In een tweede fase van dit onderzoek bestudeerden we de invloed van n3 poly-onverzadigde vetzuren van het lange type (de essentiële vetzuren: C20:5n3 en C22:6n3) op de groei, de overleving en de morfologische ontwikkeling. De invloed van de HUFA's op de groei en de overleving van zeebaarslarven werd reeds gedeeltelijk onderzocht door Van Ballaer *et al.* (1985) en Franicevic *et al.* (1987) waarbij deze eerst vermelde onderzoeksgroep wel verschillen vonden in overleving maar niet in groei. Franicevic *et al.* (1987) vond zowel verschillen in groei als in overleving (zie I.4.). In deze twee studies werd telkens de overgang naar *Artemia* nauplii genomen als starttijdstip. In de studie door ons verricht bestudeerden we eveneens de invloed van HUFA's op de groei en de overleving. Daartoe werden drie experimentele condities opgesteld (elke conditie bestond uit twee tanks met zeebaarslarven) die elk gevoed werden met hetzelfde basisdieet maar met aanrijkingsmedia verschillend in HUFA-concentraties, dit reeds vanaf de eerste voedselopname. Om echter een duidelijk idee te verkrijgen van de invloed van de HUFA's, gingen we op regelmatige tijdstippen de vetzuurpatronen na van de larven in de drie condities. In deze studie werd bovendien nagegaan of er correlaties zijn tussen HUFA-concentraties in het dieet en het voorkomen van morfologische afwijkingen zoals verkorting van de opercula, verlenging

van de onderkaken, vergroting van de galblaas, niet-functionele zwemblaas, lordosis, urinaire calculosis en afwijkend zwemgedrag. Door de regelmatige analyse van de vetzuurpatronen, wensten we na te gaan of er een verband was tussen dalingen van de HUFA-concentraties en mortaliteitspieken, groeiverschillen en morfologische afwijkingen.

II.4.3.2. Materiaal en methoden

Kweek van de zeebaarslarven

Vijfentwintigduizend pas ontloken larven kwamen aan op 8/1/87 en werden verdeeld over zes tanks (4200/tank). De larven werden gekweekt volgens de methode beschreven in deel I, met continue maar geringe verlichtingsterkte (dag 0-6: 0 lux, dag 7-45: 100 lux). Het globaal voedselschema was als volgt:

- dag 0- 5: geen voedseltoediening (dooierzakresorptie)
- dag 5-12: *Brachionus plicatilis* met de verschillende aanrijkmmedia
- dag 11-22: *Artemia nauplii* (SFB)
- dag 20-45: *Artemia metanauplii* (GSL) met de verschillende aanrijkmmedia
- dag 38-eind: Korrelvoedsel PROVIMI (Nederland)

De experimentele voedselcondities werden als volgt opgesteld:

- tank A1 en A5: aanrijking van de levende prooien met kokosnootvet (geen HUFA's, kokosdieet),
- tank A2 en A4: aanrijking van de levende prooien met visolie (hoge HUFA's, SELCO-dieet),
- tank A3 en A6: aanrijking van de levende prooien met visolie extra rijk aan HUFA's (SUPERSELCO-dieet).

De levende prooien werden in drie beurten toegediend: om 10, 15 en om 22 uur. De levende prooien werden gedurende ten minste 5 uur en meestal overnacht aangerijkt met de verschillende oliën. Het vetzuurpatroon van deze oliën wordt weergegeven in tabel 28.

Tabel 28: Relatieve hoeveelheid hogere vetzuren in de verschillende oliën toegepast bij de aanrijking van de levende prooien

	20:5n3		22:6n3		Tot. HUFA	
	%	mg/g	%	mg/g	%	mg/g
Kokosolie	tr	tr	tr	tr	tr	tr
SELCO	± 10	± 80	± 9	± 70	± 20	± 175
SUPERSELCO	± 30	± 150	± 35	± 185	± 70	± 370

Staalnames

Op regelmatige tijdstippen (dag 7, 12, 19, 27, en 40) werden uit elke tank 20 tot 30 larven genomen, waarvan volgende parameters bepaald werden:

- lengte,
- gewicht,
- lengte en hoogte van de zwemblaas.

Verder werd nagegaan in welke mate volgende afwijkingen in de verschillende experimentele condities voorkwamen:

- niet-functionele zwemblaas,
- verkorting van de opercula,
- verlenging van de onderkaken,
- vergroting van de galblaas,
- lordosis,
- urinaire calculosis,
- rondtollend zwemgedrag.

Op verschillende tijdstippen (dag 1, 5, 11, 17, 28, 40) werden uit elke tank 2 stalen genomen met larven (30 tot 200 larven/staal) ter bepaling van de vetzuurpatronen.

II.4.3.3. Resultaten

De veranderingen van de voornaamste vetzuren in de totale vetten van zeebaarslarven (C18:3n3; C20:5n3; C22:6n3 en totale HUFA) in de drie experimentele condities worden weergegeven in de figuren 17-20. Opvallend is de zeer sterke daling van de hogere poly-onverzadigde vetzuren reeds één week na de start van de voedselopname (dag 11). In vijf dagen oude dooierzaklarven vertegenwoordigen de HUFA's ongeveer één derde van de vetzuren (fig. 20). In elf dagen oude larven is dit slechts 13 tot 17% (niet significant verschillend in de drie experimentele condities) en op dag 40 is dit verder gedaald tot 9 à 12 % in de conditie waarin de larven gevoed werden met een HUFA-rijk dieet. Daarentegen merken we vanaf de zeventiende dag een sterke procentuele stijging van linoleenzuur, en dit in de drie experimentele groepen. De daling van de totale HUFA-concentratie in de zeebaarslarven is in de drie experimentele groepen toe te schrijven aan de scherpe daling van C22:6n3 (dag 5: 18,5%; dag 40: 0,3 tot 3,1 %) en in veel beperktere mate aan de relatief kleine daling van de C20:5n3 (dag 5: 7,8 %; dag 40: 3,9 tot 6,9 %). Op dag 40 vinden we dat de procentuele aanwezigheid van C22:6n3 in de larven gevoed met het kokosdieet extreem laag is (0,25 %) en sterk verschillend van de zeebaarslarven gevoed met het SELCO-dieet (3,1 %;

$p=0,09$) en met het SUPERSELCO-dieet (2,6 %; $p=0,01$). Zowel wat de individuele HUFA's als wat de totale HUFA's betreft vinden we geen verschil tussen de zeebaarslarven gevoed met SELCO of SUPERSELCO.

De groei van de larven in de verschillende experimentele condities wordt weergegeven in de figuren 21 en 22. In tegenstelling met de vetzuurpatronen vinden we reeds duidelijke verschillen in de lengtegroei bij de larven vanaf dag 19. De larven gevoed met het kokosdieet hebben op deze dag een significant kleinere lengte ($11,23 \pm 0,57$; $p<0,01$) dan de larven gevoed met de HUFA-rijke diëten ($12,38 \pm 0,35$). Deze groeiachterstand is eveneens aanwezig op dag 27 en 40. Op dag 40 is het significante groeiverschil ($p = 0,001$) tussen de larven gevoed met het SELCO-dieet en het kokosdieet eerder klein ($18,01 \pm 0,12$ versus $18,68 \pm 0,16$ mm). De verschillen tussen de zeebaarslarven gevoed met het HUFA-loos en het HUFA-super dieet zijn wel zeer uitgesproken op dag 40 ($18,01 \pm 0,12$ versus $20,64 \pm 0,15$ mm). Groeiverschillen tussen larven gevoed met de verschillende HUFA-diëten zijn alleen aanwezig op de veertigste dag ($p=0,0001$).

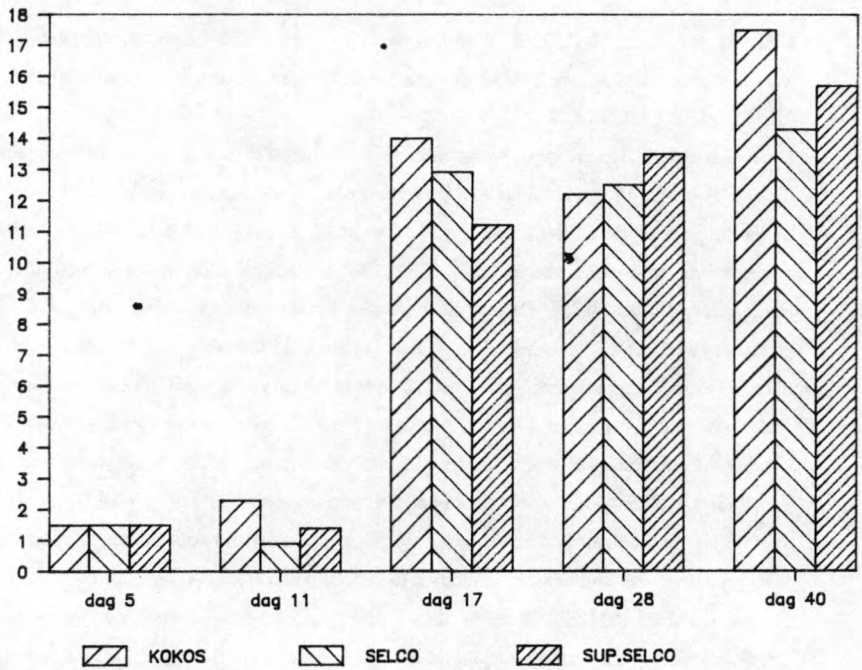
Wat het gewicht betreft komen we tot dezelfde vaststellingen als voor de lengtegroei, maar met dat verschil dat we pas significante verschillen in gewicht aantreffen op dag 27.

De invloed van het HUFA-dieet op de overleving van de larven wordt weergegeven in tabel 18. Uit de resultaten komt naar voor dat de leeftijdsspecifieke overleving bij de larven gevoed met het kokosdieet in de periode 30 tot 40 dagen significant lager is van deze gevoed met een HUFA-rijk dieet ($p<0,01$). In de periode dag 40 tot 60, vinden we opnieuw grote verschillen (N.S., $p=0,09$) tussen deze twee groepen. Er werden evenwel geen significante verschillen gevonden tussen de leeftijdsspecifieke overleving van de groep gevoed met het SELCO en het SUPERSELCO-dieet.

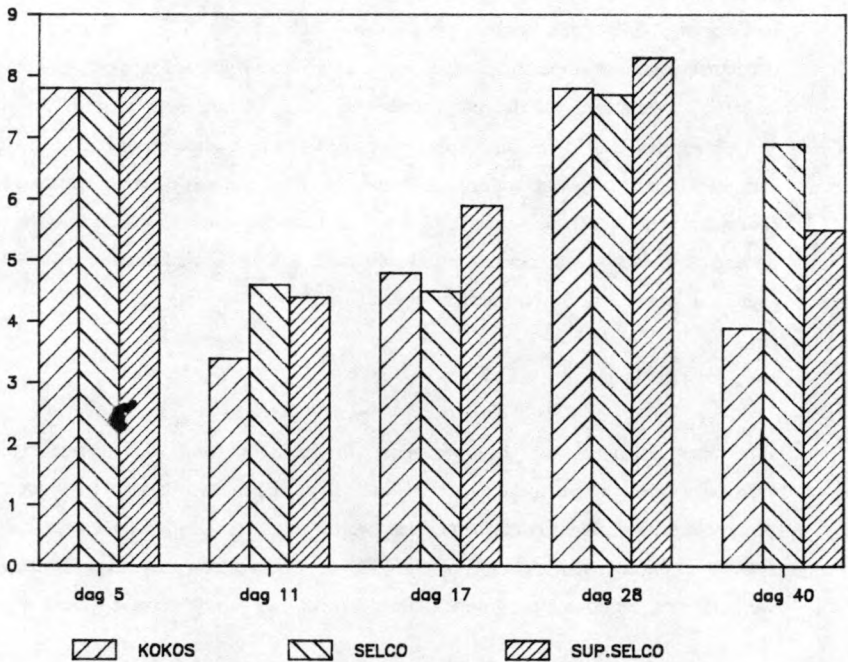
Het dieet blijkt geen enkele invloed te hebben op het voorkomen van lordosis (skeletmisvormingen), operculum-afwijkingen, en urinaire calculosis bij veertig dagen oude larven (tabel 29). Verlenging van de onderkaken werd wel significant meer geconstateerd bij de larven gevoed met een HUFA-rijk dieet ($p<0,001$). Er werd bovendien op dag 12 geen enkele invloed vastgesteld van het dieet op het procentueel aantal larven met een correct geïnflateerde zwemblaas (kokosgroep: 68 % inflatie; Selco: 75 %; Superselco: 65 %). De HUFA-concentratie blijkt wel een invloed te hebben op het voorkomen van galblaasvergroting. In de kokosdieetconditie hadden een significant groter aantal larven deze afwijking ($p=0,03$).

II.4.3.4. Bespreking

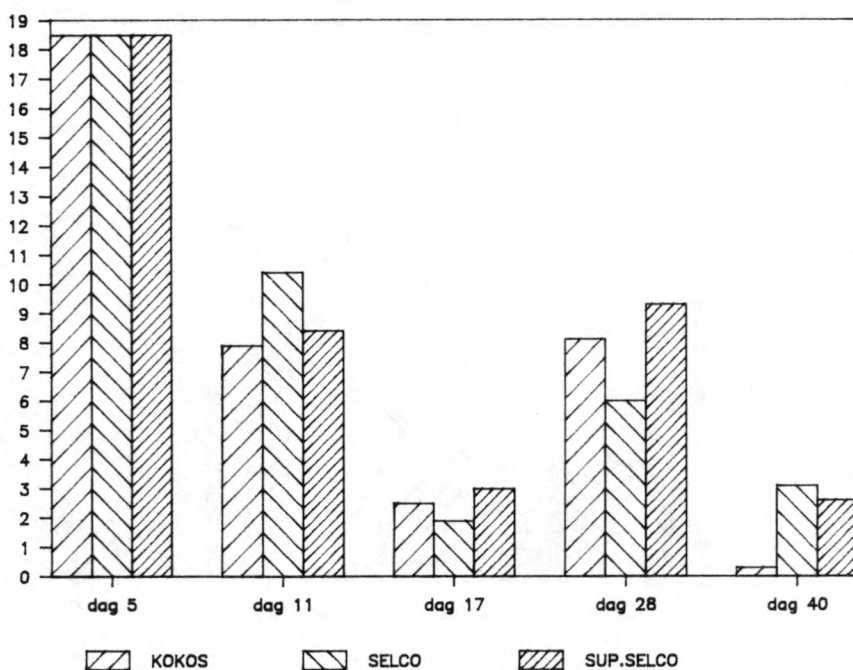
De vetzuurpatronen van de geanalyseerde zeebaarslarven weerspiegelen ten dele de vetzuurpatronen van het toegediende voedsel. In elf dagen oude larven vinden we een zeer lage procentuele hoeveelheid linoleenzuur, wat overeenstemt met de lage linoleenzuurconcentratie in *Brachionus plicatilis* (0,6 tot 3,1%, tabel 9). Bij analyse van zeventien dagen oude larven merken we in de drie experimentele groepen een sterke stijging van dit vetzuur. Deze zeventien dagen



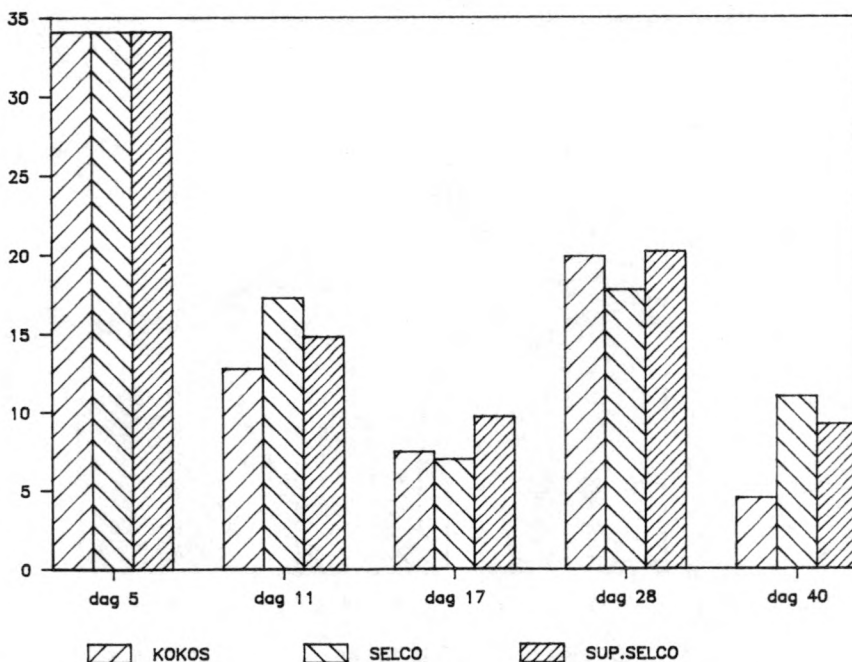
Figuur 17 : Veranderingen van de relatieve verhouding C18:3n3 in drie groepen zeebaarslarven gevoed met verschillende diëten (KOKOS, SELCO, SUPERSELCO)



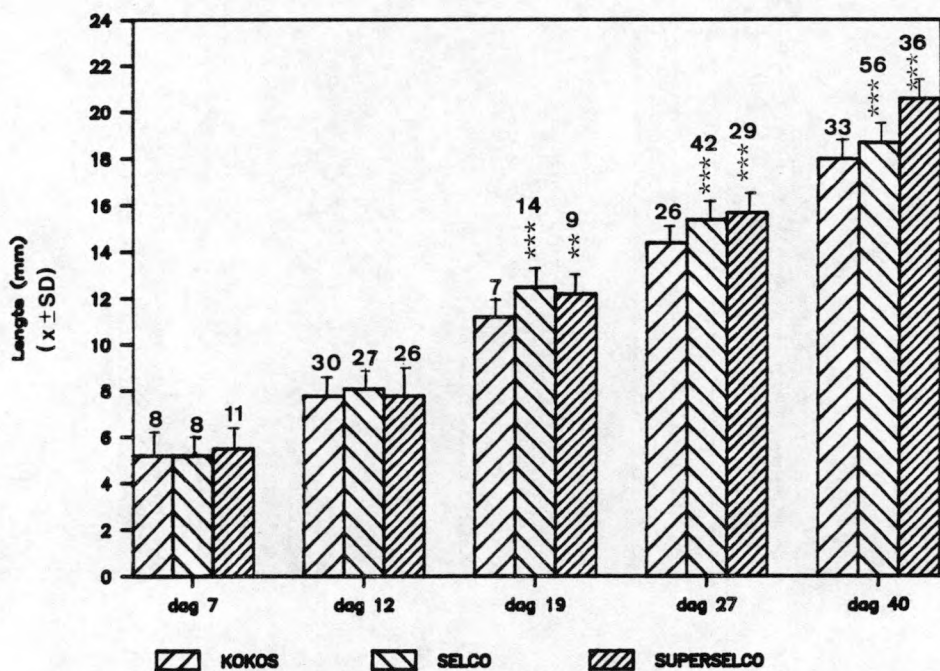
Figuur 18 : Veranderingen van de relatieve verhouding C20:5n3 in drie groepen zeebaarslarven gevoed met verschillende diëten (KOKOS, SELCO, SUPERSELCO)



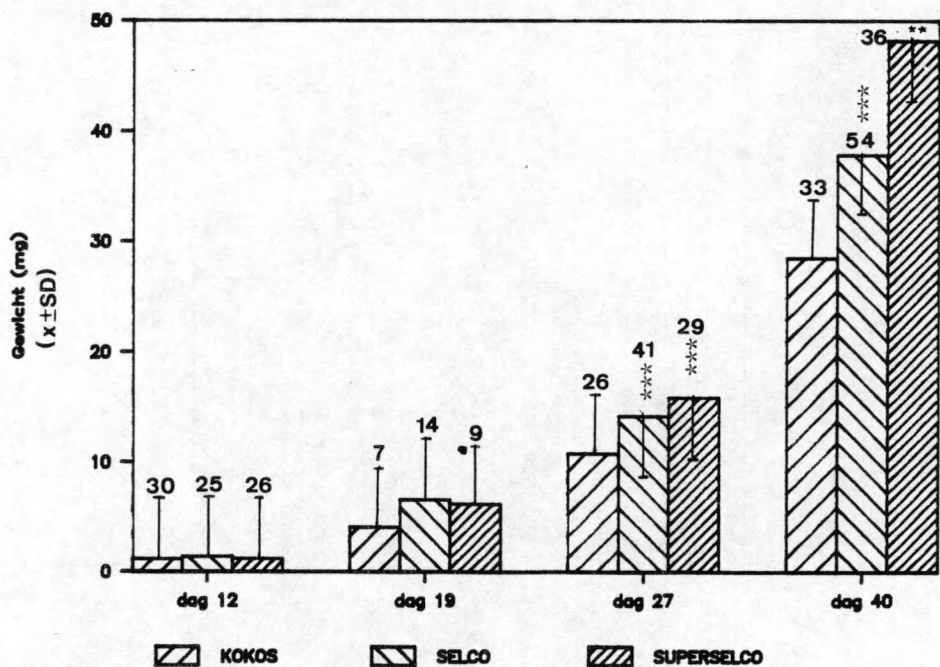
Figuur 19 : Veranderingen van de relatieve verhouding C22:6n3 in drie groepen zeebaarslarven gevoed met verschillende diëten (KOKOS, SELCO, SUPERSELCO)



Figuur 20 : Veranderingen van de relatieve concentratie aan totale HUFA's in drie groepen zeebaarslarven gevoed met verschillende diëten (KOKOS, SELCO, SUPERSELCO)



Figuur 21: Groei (lengte, mm) van zeebaarslarven in functie van de tijd bij voeding met verschillende diëten (KOKOS, SELCO, SUPERSELCO)



Figuur 22: Groei (gewicht, mg) van zeebaarslarven in functie van de tijd bij voeding met verschillende diëten (KOKOS, SELCO, SUPERSELCO)

Tabel 29: Invloed van het dieet op het voorkomen van morfologische afwijkingen bij veertig dagen (tenzij anders aangegeven) oude zeebaarslarven (Tank A2 en A4: koskosnootvet; Tank A1 en A5: visolie; Tank A3 en A6: visolie extra rijk in poly-onverzadigde vetzuren)

	Lordosis	Verlengde Onderkaak	Operculum	Urinaire calculosis	Galblaas- vergroting	Zwemblaas- inflatie (dag 11)
KOKOS:						
Normaal:	57	27	57	53	50	27
Afwijking:	0	29	0	4	10	13
SELCO:						
Normaal:	58	5	56	56	49	30
Afwijking:	1	55	3	3	2	10
SUPERSELCO:						
Normaal:	58	13	55	50	54	26
Afwijking:	1	43	1	6	3	14
p:	N.S.	<0,001	N.S.	N.S.	0,03	N.S.

oude zeebaarslarven voeden zich met nauplii van *Artemia* (SFB), die een relatief hoge concentratie aan linoleenzuur bevatten (5,2 tot 28,6%, tabel 10). Eenzelfde verhoging van linoleenzuur werd vastgesteld bij de kweek van tarbotlarven, bij de overschakeling van rotiferen naar *Artemia* nauplii (Witt *et al.*, 1984). De monoënen C16:1 en C18:1 zijn over het ganse experiment hoog zowel in zeebaarslarven als in rotiferen en in *Artemia*. Hierbij dienen we wel op te merken dat deze monoënen bekende eindprodukten zijn van de endogene vetzuursynthese in vertebraten (Stryer, 1981), zodat het effect van de voeding minder duidelijk is.

Anderzijds vinden we slechts minieme verschillen in de relatieve concentratie aan hogere vetzuren tussen de drie experimentele groepen. Dit is mogelijks te wijten aan het feit dat de toegediende hogere poly-onverzadigde vetzuren vrij snel geoxydeerd worden voor de energievoorziening bij deze intens groeiende vislarven. Deze hypothese wordt gesteund door het feit dat we reeds op dag 19 significante groeiverschillen merken tussen de larven gevoed met een HUFA-rijk en een HUFA-arm dieet alhoewel we geen verschillen vinden in de vetzuurprofielen. Op dag 17 merken we in de vetzuurpatronen van de drie experimentele groepen een sterke daling van C22:6n3 (en dus ook van de totale HUFA's) alhoewel de relatieve hoeveelheid C20:5n3 praktisch konstant blijft. Op dit moment werden de zeebaarslarven reeds een zestal dagen nauplii van *Artemia* (SFB) toegediend. Deze nauplii kunnen geen voedsel opnemen, waardoor ze ook niet aanrijkbaar zijn met de drie experimentele diëten. Deze nauplii zijn enerzijds deficiënt voor C22:6n3 wat de verdere daling van C22:6n3 en totale HUFA's in de zeebaarslarven kan verklaren, maar bevatten anderzijds wel C20:5n3 (2,2 tot 12,4%). Dit laatste verklaart dan ook de stagnatie van C20:5n3 in de drie groepen vislarven. Vanaf dag 20 werden de zeebaarslarven gevoed met metanauplii van *Artemia* (GSL) die wel voedsel opnemen en aldus aanrijkbaar zijn. Voor de sterke stijging van C22:6n3, C20:5n3 en totale HUFA's op dag 28 ligt niet direkt een verklaring voor de hand. Op dag 40 zijn de relatieve concentraties hogere vetzuren bij de larven gevoed met een HUFA-rijk dieet weinig verschillend van deze op dag 17. De zeebaarslarven gevoed met het kokosdieet hebben een relatief vergelijkbaar gehalte aan C20:5n3 wat vermoedelijk te wijten is aan de aanwezigheid van C20:5n3 in de metanauplii van *Artemia* (GSL; 3,6 %; tabel 10). Daarentegen is de relatieve hoeveelheid C22:6n3 extreem laag (0,25 %). In deze tanks, waar de larven gevoed werden met een dieet laag in HUFA's, stelden we vanaf dag 32 tot aan dag 45 vele larven vast met een rondtollend zwemgedrag (zie II.4.4.).

Vergelijking van de chronologische veranderingen van vetzuurpatronen in de zeebaarslarven met andere gegevens is vrij moeilijk daar gepubliceerde vetzuurpatronen van zeebaars- en goudbrasemlarven ontbreken. De enige vergelijkingsbron is het vetzuurpatroon van de wildgevangen zeebaarslarven in Ambleteuse beschreven in II.4.2.. De relatieve HUFA-concentratie is in deze wilde larven driemaal hoger dan in de larven gevoed met het extra-rijk HUFA dieet. Dit manifesteert zich vooral in de concentratie aan C22:6n3 (zesmaal hoger) en in C20:5n3 (tweemaal hoger). Evenmin is bekend welke de minimale absolute hoeveelheid HUFA's

is die in het dieet aanwezig moeten zijn voor een normale groei en ontwikkeling van zeebaarslarven. Het is dan ook niet mogelijk om na te gaan of de lagere HUFA-hoeveelheid in onze gekweekte larven aanleiding geeft tot verminderde groei, lagere overleving en een hoger aantal misvormingen t.o.v. de larven opgegroeid in de natuur. Bij tarbotlarven werd de vetzuurbehoefte iets grondiger bestudeerd. De behoefte aan HUFA's zou voldaan zijn wanneer 1,3 % (droog gewicht) van het dieet hogere poly-onverzadigde vetzuren bevat (Le Millinaire *et al.*, 1983), bij de oudere dieren zou dit 0,8 % bedragen (Bell *et al.*, 1985). Witt *et al.* (1984) vergeleken de groei, de overleving en het vetzuurpatroon bij 2 groepen tarbotlarven tussen dag 1 en 21. De eerste groep werd gevoed met *Brachionus plicatilis* en nauplii van *Artemia*, aangerijkt met *Nannochloris* sp., terwijl aan de tweede groep copepodelarven toegediend werden. Deze auteurs konden aantonen dat het vetzuurprofiel van de voedingsorganismen weerspiegeld werd in het vetzuurpatroon van de tarbotlarven. In de eerste groep bedroeg het relatieve gehalte C20:5n3 en C22:6n3 respectievelijk 8,8 % en 0,6 %. In de tweede groep was dit aanzienlijk hoger, respectievelijk 14,9 en 12,6 %. De overleving en de groei bij de groep gevoed met de copepoden was dan ook hoger. Bij zeebaarsen werden eveneens betere groei- en overlevingsresultaten verkregen na extra aanrijking van de prooidieren met diëten rijk aan HUFA's (Robin, 1982; Robin *et al.*, 1981; Franicevic *et al.*, 1987). Robin (1982) stelde sterke verschillen vast, zowel in groei als in overleving onder invloed van het dieet. Metanauplii van *Artemia* werden gedurende twee dagen

Tabel 30: Verschillende media (YA en Y) gebruikt voor de kweek van metanauplii van *Artemia* en de samenstelling van het extra aanrijkmiddel (in g/100g) (naar: Robin, 1982)

Voedingsstoffen	YA (%)	Y (%)	Aanrijkmiddel	E (%)
Biergist	89,4	100	Visautolysaat	73
Kabeljauwleverolie	4	0	Kabeljauwleverolie	10
DL-Methionine	1	0	Vitaminemix (2)	10
Chloorcholine	2	0	Chloorcholine	4
Vitaminemix (1)	3	0	DL-Methionine	2
CaHPO ₄	0,5	0	CaHPO ₄	0,8
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	0	FeCl ₂ ·7H ₂ O	0,2

(1) Gatesoupe en Luquet, 1981

(2) Gatesoupe en Robin, 1982

gevoed met verschillende diëten: biergist (Y) en biergist gekweekt op een gesupplementeerde voedingsbodem (YA). Daarbij werden nog 2 extra condities gecreëerd door de twee groepen *Artemia* al dan niet nog eens extra aan te rijken (YE en YAE; tabel 30).

De groei was significant hoger in de larven gevoed met *Artemia* gekweekt op basis van gesupplementeerde gisten en al dan niet extra aangerijkt (dag 48: Y, 39 tot 42 mm; YE, YA, YAE, 70 tot 84 mm). Het effect van de aanrijking was ook merkbaar in de overleving van de zeebaarslarven: op dag 58 was de overleving bij de larven gevoed met de Y-*Artemia* groep lager dan in de andere groepen. Deze verschillen in groei en overleving zijn vermoedelijk toe te schrijven aan de verschillen in HUFA-samenstelling, hoewel ook andere voedingselementen een betekenisvolle invloed kunnen hebben. Robin (1987) toonde immers aan dat extra mineralen toegediend aan rotiferen een positief effect hebben op de groei en overleving van tarbotlarven. In een gelijkaardige studie van Robin (1981) werden zeebaarslarven gevoed met 2 geografische rassen van *Artemia* (SFB en een Braziliaans ras). Voorafgaandelijk waren de metanauplii van deze *Artemia*-rassen gedurende twee dagen opgekweekt op basis van een *Spirulina*-dieet al dan niet extra aangerijkt (kabeljauwleverolie 4 %, cholesterol 0,5 %, vitaminemix 3,6 %, DL-methionine 1 %, chloorcholine 2 %). De extra aanrijking van het SFB-ras had een positief effect op de groei van de zeebaarslarven, terwijl geen verschillen geconstateerd werden bij aanwending van het Braziliaanse ras. Dit laatste ras is evenwel zeer bekend om zijn hoge HUFA-spiegels.

Zoals gemeld in I. 4. 5. vonden Franicevic *et al.* (1987) een betere groei en overleving bij voeding van zeebaarslarven met metanauplii van *Artemia* extra aangerijkt met HUFA's. Eenzelfde fenomeen stelden Van Ballaer *et al.* (1985) vast maar vonden alleen betere overlevingsresultaten. In tegenstelling met andere studies, werd in ons experiment reeds vanaf het rotiferenstadium gestart met verschillende diëten variërend in HUFA-samenstelling. Daarbij dient benadrukt te worden dat tijdens de strikte voedingsperiode met nauplii van *Artemia* (dag 12-20) de drie experimentele groepen vislarven hetzelfde dieet kregen, daar de nauplii niet aanrijkbaar zijn in dit stadium. Deze nauplii van *Artemia* (SFB) bevatten echter het hogere vetzuur C20:5n3 (zie hoger). De larven van de drie groepen werden vervolgens gevoed met metanauplii van *Artemia* (GSL) die ook, zij het in beperkte mate, C20:5n3 bevatten. De verschillen in groei en overleving zijn dan ook vermoedelijk in belangrijke mate te wijten aan concentratieverschillen van het vetzuur C22:6n3 in de diëten, zoals uiteindelijk blijkt uit de vetzuurprofielen van de zeebaarslarven. De significante lengteverschillen die we op dag 19 constateerden tussen de verschillende groepen zeebaarslarven kunnen evenwel te wijten zijn aan de verminderde aanwezigheid van C20:5n3 en anderzijds aan de totale afwezigheid van C20:6n3 in de eerste twintig dagen van voeding bij de zeebaarslarven in de kokosconditie. De groeiverschillen komen nog duidelijker tot uiting bij achtentwintig en veertig dagen oude zeebaarslarven. We hebben evenwel geen duidelijke verklaring waarom we pas op dag

40 groeiverschillen vinden tussen larven gevoed met het HUFA-rijk en het HUFA-extra rijk dieet. Mogelijks speelt de nauplii-voedingsperiode hier een vertragende rol.

Duidelijke alhoewel niet significante verschillen in gewicht van de larven vinden we op dag 19. De larven 's ochtends opgemeten hebben dikwijls een hogere darmvulling dan de larven die we later op de dag opmeten, met als gevolg een grotere gewichtsspreiding, met een negatief gevolg op de statistische interpretatie van de resultaten. Het is niet mogelijk om de larven tijdens de dag van opmeten niet te voeden zoals gebruikelijk bij oudere vissen. Deze verhogering heeft onmiddellijk kannibalisme tot gevolg, en brengt een sterke groeivertraging met zich mee. Vandaar dat de lengte van de larven in deze studies een betrouwbaarder parameter is dan het gewicht.

Bij de mariene vissen gekweekt in Japan (ayu-vis, "yellow tail", Japanse zeebrasem) zijn de negatieve effecten van te lage HUFA-concentraties in het dieet op de groei en overleving van de larven reeds meerdere malen aangetoond (Watanabe, 1982; Watanabe *et al.*, 1980; Watanabe *et al.*, 1982; Watanabe *et al.*, 1983).

De overleving in onze proef wordt sterk beïnvloed door het dieet. De larven gevoed met een HUFA-arm dieet vertonen een veel lagere leeftijdsspecifieke overleving (aantal individuen die overleven bij het bereiken van een bepaalde leeftijdsgrens startend van 1000 individuen) zowel tussen dag 30 en 40 als tussen dag 40 en 60. De hogere mortaliteit die we vaststellen tussen dag 30 en 40 in de tanks met het kokosdieet, was gekoppeld aan het massaal voorkomen van rondtollende larven, terwijl dit in de andere tanks zeer zeldzaam was (enkele gevallen). De hogere mortaliteit die we echter aantreffen tussen dag 40 en 60 heeft vermoedelijk veeleer te maken met de verzwakking van de larven in deze tanks waardoor ze minder in staat zijn de zware overgangperiode naar korrelvoedsel te overbruggen. Tijdens deze overgangperiode (dag 40-60) wordt progressief minder levend voedsel en progressief meer korrelvoedsel toegediend. Meestal duurt het enkele dagen vooraleer een gedeelte van de larven dit korrelvoedsel opneemt. Larven zonder energiereserves zijn waarschijnlijk minder in staat deze hongerperiode door te maken. Deze hypothese wordt gesteund door de hoge leeftijdsspecifieke overleving die we aantreffen in alle groepen tussen dag 60 en 75. M.a.w. éénmaal de zwakkere larven het korrelvoedsel opnemen, vinden we in deze "zwakkere" groep geen verschillen meer in leeftijdsspecifieke overleving in vergelijking met de andere groepen.

Belangrijk in deze studie is het voorkomen van pathologische afwijkingen onder invloed van de HUFA-concentratie in het dieet. Zoals reeds vermeld in I.3.2.1. stelde Kitajima (1987) dat de larven van de Japanse zeebrasem gevoed met een dieet arm aan HUFA's onvoldoende energie zouden bezitten om naar het wateroppervlak te komen voor de vulling van de zwemblaas. Uit onze resultaten (tabel 29) blijkt op dag 12 geen invloed van het dieet op het procentueel aantal zeebaarslarven met een correct geïnflateerde zwemblaas. Bovendien stelden we vast dat bij 65 tot 75 % van de larven de zwemblaas geïnflateerd was, wat als een bevredigend resultaat mag beschouwd worden. Dit percentage stijgt nog lichtjes naar het einde van het experiment toe (dag

40: 72%), daar meestal de larven zonder zwemblaas zwakker zijn en dan ook in grotere getale sterven tijdens de eerste veertig dagen. Uit de resultaten blijkt verder dat de concentratie HUFA's in het dieet geen invloed heeft op het voorkomen van wervelkolomafwijkingen (lordosis, scoliosis), urinaire calculosis en operculaverkortingen. Wel stellen we vast dat larven gevoed met de HUFA-rijke dieten in een veel hogere mate verlengingen van de onderkaak vertonen, waarvoor we geen plausible verklaring kunnen geven.

Bij de zeebaarslarven gevoed met het kokosdieet komen er groter aantallen larven voor met een abnormale vergroting van de galblaas (17 %). Bovendien was dit percentage bij de geanalyseerde rondtollende larven dubbel zo hoog (36 %). Bij de gezonde larven is de galblaas uitwendig niet zichtbaar. Bij de zieke larven was de galblaas aanzienlijk vergroot (diameter 0,4 tot 0,7 mm), en intens geel van kleur. Bij vertebraten is het hormoon cholecystokinine verantwoordelijk voor de vrijstelling van de gal uit de galblaas. Mogelijks vormen de HUFA's een trigger voor de vrijstelling van dit hormoon. Bij de larven in de kokosconditie zou deze trigger ontbreken met als mogelijk gevolg een abnormale opstapeling van de gal in de galblaas.

II.4.4. Rondtollend zwemgedrag

II.4.4.1. Introductie

Rondtollend zwemgedrag is een ziektebeeld dat vroeger massaal voorkwam bij de kweek van de larven van zeebaars en zeebrasem (Zanuy, 1987, persoonlijke mededeling). Coves (1985b) vermeldt het frequent voorkomen van twee anomalieën waaronder rondtollend zwemgedrag, dat meestal optreedt tussen dag 20 en 30 en gepaard gaat met spiraalsgewijs zwemmen van de larven gekoppeld aan een verlies van de eetlust en productie van witte faeces. De getroffen larven sterven binnen de 24 uur. Coves (1985b) vond dit rondtollen alleen in de conditie waarin een hoge verlichtingsterkte werd toegepast (1800 lux).

Dit afwijkend gedrag werd ook aangetroffen in combinatie met andere ziektebeelden zoals hyperextensie van de zwemblaas en de galblaas en witte faeces (Bonami et al., 1984). In de zieke dieren werd een virus aangetroffen, aanverwant aan het Birnavirus. Op basis van gelijkaardige symptomen bij salmoniden te wijten aan het IPN-virus (infectious pancreatic necrosis virus), suggereerden ze dat dit virus verantwoordelijk zou zijn voor deze gedragsziekte. Deze onderzoekers stellen dat deze ziekte een groot probleem vormt voor de ontwikkeling van de kweek van mariene vislarven in Europa. In rondtollende "menhaden fish", (*Brevoortia tyrannus*), een haringachtige, werden er virussen aangetroffen in de hersenen en in de pancreas. Deze virussen kwamen sterk overeen met het IPN-virus (Stephens et al., 1980).

Tixerant (1986) beschrijft dezelfde ziektesymptomen en wijt de uiteindelijke dood van de zeebaarslarven aan de compressie van vitale organen. In het centrum DEVA-SUD te Palavas-les

Flots werd deze ziekte niet meer aangetroffen sinds men lagere lichtintensiteiten toepast en onmiddellijk na de ontluijing van de eieren start met de waterversing, zodat men steeds beschikt over water met een optimale kwaliteit voor de larven (Coves, 1985b). In Cephalonian fisheries (Griekenland) werd rondtollen niet meer aangetroffen sinds men de levende prooien aanrijkt met hogere vetzuren (Frentzos, persoonlijke mededeling, 1987).

Bij salmoniden is rondtollen dikwijls te wijten aan de sporozoot, *Myxosoma cerebralis*. Deze parasiet veroorzaakt degeneratieve veranderingen in de beenderen, ongecoördineerd zwemgedrag, verdonkering van de staart en verkorting van de opercula. Bij de kweek van *Tilapia* in kooien in Taiwan werden eveneens grote verliezen gemeld te wijten aan rondtollen. De geaffecteerde vissen vertoonden opgezwollen galblaas en pancreas, witte levers, beschadigingen van de hersencortex, en lage hematocrietwaarden. Volgens Chen *et al.* (1987) zouden de rode bloedcellen een lagere affiniteit voor zuurstof vertonen met een beschadiging van de hersenen als gevolg, wat leidt tot abnormaal zwemgedrag en uiteindelijk tot de dood. Er werd evenwel niet vermeld waarop deze hypothese steunde.

In onze experimenten (exp. 7: november-december 1986; exp. 10: januari-maart 1988) werden we vrij regelmatig gekonfronteerd met vrij grote aantallen rondtollende larven. Het doel van deze studie was dan ook een verklaring te vinden voor dit afwijkend zwempatroon. Daartoe werden morfologische gegevens van gezonde en rondtollende larven verzameld en vergeleken, werden er bacteriële en virale analyses verricht, en werden de vetzuurpatronen van de rondtollende larven geanalyseerd.

II.4.4.2. Materiaal en methoden

Groeigegevens

In verschillende experimenten werden rondtollende larven opgemeten. Pas in experiment 10 werden voldoende larven opgemeten om een onderscheid te maken tussen gezonde en rondtollende larven met en zonder functionele zwemblaas.

Virale analyse

De virale analyses werden verricht door het laboratorium van Dr. C. Agius. Vijf tot zes larven (50-100 mg elk) worden samen met zand in een mortier gehomogeniseerd, waarna dit homogenaat verdund wordt door toevoeging van HBSS (1/10 "Hanks Balanced Salt Solution"). Dit mengsel wordt vervolgens gedurende 10 minuten gecentrifugeerd (950 g). Het supernatans wordt opnieuw met een factor 10 verdund (HBSS) en over een 0,45 micrometer millipore gefilterd ter verwijdering

van alle contaminantia. RTG-2 cellen (Rainbow Trout Gonad type 2) worden 24 uur op voorhand in leighton-buisjes gebracht. Na 24 uur wordt het groeimedium verwijderd en voegt men 0,2 ml inoculum toe. Men laat dit één uur staan bij 20°C opdat eventuele virussen geabsorbeerd kunnen worden door de cellen, waarna men 2 ml bewaringsmedium toevoegt. De cellen worden dan gedurende tien dagen geïncubeerd bij 20°C. Na tien dagen brengt men opnieuw een 1/10 verdunning van het supernatans aan op verse RTG-2 cellen volgens dezelfde procedure als beschreven. Om de vijf dagen controleert men de cellen op sporen van cytopathologische effecten. Alle stalen worden in duplo ingezet. De aanwezigheid van positieve virussen (IPNV) en negatieve virussen wordt nagegaan.

Bacteriële analyse

Van gezonde en rondtollende larven werden huidstrijkjes gemaakt. De bacteriën werden geanalyseerd volgens dezelfde methode als beschreven in II.2.1.4.1..

Vetzuuranalyse

In experiment 8 (40 dagen oude larven) en 10 (35 dagen oude larven) werden naast gezonde ook rondtollende larven verzameld voor vetzuuranalyse en geanalyseerd volgens de methode beschreven in II.4.1.

II.4.4.3. Resultaten

Vergelijking van de groeigegevens (lengte en gewicht) toont geen enkel verschil aan in groei tussen rondtollende en normaal zwemmende larven (tabel 31). Groeiverschillen in zwemblaas (lengte en hoogte) waren niet aanwezig tussen rondtollende en normaalzwemmende larven met een functionele zwemblaas, evenmin als bij deze twee groepen zonder functionele zwemblaas. Daarentegen merken we sterke verschillen in darmvulling. Rondtollende larven hebben een significant lagere darmvulling dan normaal zwemmende larven (met zwemblaas: $p=0,0001$; zonder zwemblaas: $p=0,006$). Uit tabel 31 blijkt dat larven met een functionele zwemblaas ook rondtollen.

Bij de virale analyse werden er noch in de gezonde noch in de rondtollende larven enig spoor van virussen aangetroffen. Huiduitstrijken van deze twee groepen toonden geen verschillen aan in bacteriële populaties.

De vetzuurpatronen van rondtollende larven uit experiment 8 en uit experiment 10 worden weergegeven in tabel 32. Uit deze relatieve vetzuurprofielen blijkt de lage HUFA-aanwezigheid en vooral de lage concentratie aan C22:6n3.

Tabel 31: Verschillen in lichaamslengte en gewicht, lengte en hoogte van de zwemblaas en darmvulling bij normaal zwemmende en rondtollende zeebaarslarven op dag 35 (experiment januari-maart 1988)

	Lengte larven (mm)	Gewicht (mg)	Lengte Zwembl (mm)	Hoogte Zwembl (mm)	Darmvull. (%)	N
Met functionele zwemblaas:						
Normaal	17,5 ± 0,4	/	2,69 ± 0,07	0,87 ± 0,07	73,9 ± 6,9	4
Rondtollend	17,2 ± 0,3	23,5 ± 1,3	2,47 ± 0,31	0,99 ± 0,12	2,2 ± 4,7	9
p:	N.S.	/	N.S.	N.S.	0,0001	
Niet-functionele zwemblaas:						
Normaal	15,5 ± 0,3	13,6 ± 1,6	0,76 ± 0,09	0,22 ± 0,07	17,1 ± 5,3	7
Rondtollend	15,3 ± 0,2	12,1 ± 0,9	0,90 ± 0,39	0,28 ± 0,11	0,2 ± 2,8	26
p:	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0,006	

Tabel 32: Vetzuurpatronen van rondtollende zeebaarslarven (uitgedrukt in oppervlakteprocent) verzameld in experiment 8 en 10 en gezonde larven op dag 40 (SUPERSELCO-groep)

	Exper. 8	Exper. 10	Gezonde
14:0	0,8	2,1	1,4
16:0	17,1	14,1	10,8
16:1n7/9	1,0	4,1	5,8
18:0	7,8	5,9	6,4
18:1n7/9	17,8	27,8	24,4
18:2n6	18,2	7,6	7,3
20:0		0,3	
18:3n6		0,3	0,5
18:3n3	10,3	17,4	16,3
20:3n3		0,1	0,6
20:4n6		0,3	
20:5n3	2,8	4,7	5,7
22:3n3		0,1	
22:4n6	tr	0,1	0,6
22:4n3		0,1	
22:5n3	tr	0,3	0,6
22:6n3	tr	0,8	2,7
HUFA	2,8	6,5	10,2

(tr: sporen)

II.4.4.4. Bespreking

Analyse van de groeieresultaten laat toe te besluiten dat de rondtollende larven tot aan dag 35 eenzelfde groei kennen als de niet-rondtollende "gezonde" larven. Deze opgemeten larven waren allen afkomstig uit tank 2, waarin de larven gevoed werden met een HUFA-arm dieet. De groei van deze larven is significant lager dan de groei van de larven gevoed met de HUFA-rijke diëten (zie II.4.3.). Het is mogelijk dat de vertraagde groei van deze larven een uiting is van een ziektebeeld, door bijvoorbeeld een niet optimale voedingssituatie, waarbij het rondtollen een plotse climax aangeeft. De larven met dit afwijkend zwemgedrag hebben allen een weinig gevulde en meestal een ledige darmtractus, en sterven snel.

Bij de bespreking van rondtollend zwemgedrag is het belangrijk de verschillende gedragingen aan te geven van rondtollende larven al dan niet met een functionele zwemblaas. In vorige proeven werden nooit rondtollende larven met een correct ontwikkelde zwemblaas aangetroffen, zodat we aanvankelijk dachten dat rondtollend zwemgedrag een gevolg was van de zwemblaasafwijking. Bij studie van het gedrag van de rondtollende larven stelden we ook rondtollende larven vast met een goede zwemblaas, maar met een verschillend gedragspatroon. Zeebaarslarven vertonen een afwisselend ritme van zwemactiviteit en rustperiodes. Rondtollende larven zonder zwemblaas zinken tijdens de rustperiodes naar de bodem. De larven zwemmen vervolgens terug naar de oppervlakte, en vertonen tijdens die zwemactiviteit de karakteristieke spiraalsgewijze manier van zwemmen. Deze verschillende periodes volgen elkaar snel op (periodes van 10 tot 20 seconden). Bij rondtollende larven met een functionele zwemblaas zijn deze periodes langer (enkele minuten rust en korte zwemfases). Tijdens de rustfases drijven de larven op hun zij of op hun rug aan het wateroppervlak. Bij overgang naar een actieve zwemperiode draaien ze zich eerst in de normale zwempositie en zwemmen dan op een normale wijze. Bij deze larven is het rondtollend zwemgedrag zeldzaam en beperkt tot enkele seconden, meestal bij de overgang van rust- naar zwemfaze.

De vraag stelt zich welke de oorzaak is van dit afwijkend zwemgedrag. Rondtollen van vissen werd reeds meerdere malen gecorreleerd met de aanwezigheid van virussen (Stephens *et al.*, 1980; Bonami *et al.*, 1984). Virale analyse van onze rondtollende en normaal zwemmende zeebaarslarven bracht geen enkel spoor van virussen aan het licht. Er werden ook geen verschillen gevonden in bacteriesoorten tussen gezonde en rondtollende larven. Daarbij zou een bacteriële en/of een virale infectie mogelijks tot gevolg hebben dat ook in de andere tanks grote aantallen rondtollende larven voorkomen. Dit was niet het geval, alleen in de tanks waar de larven gevoed werden met een dieet deficient in HUFA's (tank A2 en A4) vonden we grote aantallen zieke larven. Vandaar dat we de vetzuurpatronen vergeleken tussen de larven gekweekt bij verschillende voedselcondities. Zoals gemeld in II.4.3. was de relatieve concentratie van C22:6n3 significant lager in de larven gevoed met het kokosdieet (0,3 %). De geanalyseerde rondtollende

larven in experiment 8 bevatten slechts sporen van C22:6n3 en deze van experiment 10 slechts 0,8 %. We durven dan ook suggereren dat rondtollen optreedt wanneer het percentage hogere vetzuren en meer specifiek C22:6n3 onder een zeker niveau daalt. Er moet daarbij opnieuw benadrukt worden dat alle larven gevoed werden met het zelfde basisdieet (*Brachionus plicatilis*, nauplii en metanauplii van *Artemia*) maar met een verschillende aanrijking. Uit deze studie kunnen we evenwel niet besluiten dat deze lage concentratie aan het essentiële vetzuur C22:6n3 een directe of indirecte aanleiding vormt voor rondtollen. Een oorzaak-gevolg relatie is niet duidelijk.

Hoofdstuk 5: INVLOED VAN DE VERLICHTINGSSTERKTE OP DE OVERLEVING, GROEI EN MORFOLOGISCHE ONTWIKKELING VAN DE ZEEBAARSLARVEN

II.5.1. Inleiding

Alhoewel licht aanzien wordt als zowat de belangrijkste factor in de ecologie (Odum, 1971), zijn er tot nu toe weinig studies verricht over de invloed van het licht bij vissen. De meeste studies behelzen de invloed van de fotoperiode op de circadiane en circanuele ritmen van de hormonen en plasmacomponenten (zie Corneillie, 1984) en op de gonadale ontwikkeling bij een groot aantal vissoorten (karper: Davies *et al.*, 1986; zalmachtigen: Nakari *et al.*, 1987, McCornick *et al.*, 1987; mariene vissen zoals tarbot, zeebaars en goudbrasem: Devauchelle, 1984, 1987, Kadman *et al.*, 1985). Daarentegen is de invloed van de verlichtingssterkte op de groei, overleving en morfologische ontwikkeling van mariene vislarven nauwelijks onderzocht. Nochtans zijn er summiere verwijzingen in de literatuur dat hogere verlichtingssterktes een negatieve invloed hebben op de zwemblaasinflatie (Barnabé, 1987) en een verhoging induceren van bepaalde pathologische verschijnselen. Zo stelde Coves (1985b) een groter aantal rondtollende larven, en een groter aantal larven met galblaasvergroting en zwemblaashypertrofie vast in de conditie waar een hoge verlichtingssterkte werd toegepast (1800 lux). Volgens Weppe en Joassard (1986) heeft een lage verlichtingssterkte (70 lux) een positief effect op de zwemblaasinflatie.

Het was dan ook de bedoeling de invloed van de verlichtingssterkte na te gaan op de groei en overleving van zeebaarslarven, en tevens te onderzoeken of de verlichtingssterkte een rol speelt bij het voorkomen van bepaalde morfologische afwijkingen.

II.5.2 Materiaal en methoden

Experiment 8

Een eerste experiment omtrent de invloed van de verlichtingssterkte werd uitgevoerd in januari-maart 1987. Twee dagen oude zeebaarslarven, afkomstig van het C.O.B. te Brest, kwam aan op 20 januari 1987. De larven werden verdeeld over 5 tanks. De verlichtingssterkte in de eerste drie tanks startte bij 20 lux en werd progressief verhoogd naar 100 lux op dag 10. De zeebaarslarven in de twee overige tanks (A4 en A5) werden gekweekt bij lagere verlichtingssterkte, startend op 0 lux en progressief verhogend naar 20 lux op dag 10. De kweekomstandigheden waren dezelfde als deze beschreven in deel II. Op dag 12, 18, 27 en 39 werden larven uit de verschillende tanks genomen voor de bepaling van de lengte, het gewicht en de zwemblaasontwikkeling.

Experiment 11

Een tweede experiment werd uitgevoerd in maart-mei 1988. Drie dagen oude zeebaarslarven, afkomstig van Ferme Marine de Douhet (Frankrijk), kwamen aan op 25/3/88. De larven werden verdeeld over 6 tanks en werden tot op dag 5 in volledige duisternis gehouden. Vanaf dag 6 werden in de tanks A1, A2 en A4 de verlichtingssterkte over vier dagen verhoogd naar 1000 lux. In de tanks A3, A5, en A6 werd vanaf dag 6 de verlichtingssterkte progressief verhoogd tot 100 lux. De kweekomstandigheden waren dezelfde als deze beschreven in deel II. Op dag 9, 21, en 41 werden uit de verschillende tanks larven genomen ter bepaling van de lengte, het gewicht, de darmvulling, de zwemblaasontwikkeling en de morfologische afwijkingen (onderkaakverlenging, verkorte opercula, lordosis, urinaire calculosis, en galblaasvergroting).

II.5.3. Resultaten

Experiment 8

De resultaten van dit experiment worden weergegeven in tabel 33 en 36. Larven gekweekt bij minimale verlichtingssterkte (0-20 lux) groeien duidelijk trager dan larven gekweekt bij hogere verlichtingssterkte (20-100 lux). Dit is reeds vanaf de zeventwintigste dag merkbaar in de lengte van de zeebaarslarven. Op dag 40 was de overleving in de conditie met de laagste verlichtingssterkte significant lager ($p = 0,046$). De zwemblaasinflatie op dag 12 was lager in de conditie met de laagste verlichtingssterkte, dit werd echter slechts nagegaan in twee tanks bij ca 12 larven, waardoor dit niet statistisch interpreteerbaar was.

Experiment 11

De resultaten van dit experiment worden weergegeven in tabel 34, 35 en 36. We stellen vast dat op dag 21 de larven in de conditie met de hoogste verlichtingssterkte de beste groei vertonen, terwijl dit op dag 41 juist omgekeerd is. Verschillen in gewicht zijn niet aanwezig noch op dag 21 noch op dag 41. De tegengestelde groeieresultaten uitten zich ook in de specifieke groeisnelheid die tussen dag 9-21 hoger is in de conditie 100-1000 lux en tussen dag 21-41 hoger is in de conditie 20-100 lux. Nochtans vinden we in de conditie met de hoogste verlichtingssterkte telkenmale een hogere darmvulling (dag 9: $p = 0,0001$; dag 21: N.S.; dag 41: $p = 0,0001$). Er werden geen significante verschillen in overleving en zwemblaasinflatie gevonden, alhoewel in de conditie met de hoogste verlichtingssterkte op dag 10 20 % meer larven een functionele zwemblaas hadden dan in de andere conditie. Larven gekweekt bij hogere verlichtingssterkte vertoonden evenwel een significant hoger aantal afwijkingen van de onderkaak en de opercula.

Tabel 33: Groei in lengte (mm) en gewicht (mg), en specifieke groeisnelheid van zeebaarslarven gekweekt bij lage (0-20 lux) en hogere verlichtingssterkte (20-100 lux) tijdens de periode januari-maart 1987

Lengte:	dag 12	(N)	dag 18	(N)	dag 27	(N)	dag 39	(N)
Donker (0-20 lux)	6,09±0,40*	8	6,44±0,32	22	9,58±0,39	15	12,20±0,39	15
Licht (20-100 lux)	6,19±0,53	14	6,61±0,34	20	10,77±0,21	50	15,73±0,31	24
p:	N.S.		N.S.		0,01		0,0001	
Gewicht:								
Donker	0,63±2,18	8	0,97±1,58	21	3,54±1,87	15	9,80±1,94	14
Licht	0,73±2,56	11	0,98±1,62	20	5,70±1,02	50	26,88±1,54	22
p:	N.S.		N.S.		N.S.		0,0001	
Specifieke groei-								
snelheid:	dag 12-18		dag 18-27		dag 27-39			
Donker	0,93		4,4		2,01			
Licht	1,09		5,4		2,12			

(*: gemiddelde ± S.E.; N: aantal geanalyseerde larven)

Tabel 34: Groei in lengte (mm) en gewicht (mg), darmvulling en specifieke groeisnelheid van zeebaarslarven gekweekt bij lage (0-100 lux) en hogere verlichtingssterkte (100-1000 lux) tijdens de periode maart-mei 1988

Lengte:	dag 9	(N)	dag 21	(N)	dag 41	(N)
Licht (100-1000 lux)	6,66±0,22*	24	12,00±0,20	29	20,51±0,13	73
Donker (0- 100 lux)	6,43±0,26	17	11,18±0,36	9	21,30±0,14	59
p:	N.S.		0,05		0,0001	
Gewicht:						
Licht	/		6,24±2,45	24	70,25±1,41	73
Donker	/		4,61±4,01	9	73,73±1,56	59
p:			N.S.		N.S.	
Darmvulling (%)						
Licht	54,58±4,60	7	27,60±4,50	25	85,11±2,69	70
Donker	26,47±5,46	17	26,70±8,51	7	62,14±2,93	59
p:	0,001		N.S.		0,001	
Specifieke groeisnelheid:						
	dag 9-21		dag 21-41			
Licht	4,9		2,7			
Donker	4,6		3,2			

(*: gemiddelde ± S.E.; N: aantal geanalyseerde larven)

Tabel 35: Morfologische afwijkingen bij zeebaarslarven gekweekt bij twee verlichtingssterktes (0-100, 100- 1000 lux) tijdens de periode maart-mei 1988

	O.V.	Op.	Lord.	U.C.	Galb.
Licht:					
Afwijking	66	6	2	1	4
Normaal	24	84	88	89	86
Donker:					
Afwijking	47	0	2	0	1
Normaal	39	86	84	86	85
p:	0,02	0,04	N.S.	N.S.	N.S.

(O.V.: verlenging van de onderkaak; Op.: opercula-verkortingen; Lord.: lordosis; U.C.: urinaire calculosis; Galb.: galbblaasvergroting)

Tabel 36: Overleving (%) en zwemblaasinflatie (%) van zeebaars larven in twee experimenten, telkenmale bij verschillende verlichtingssterktes (exp. 8: 0 -20, 20-100 lux; exp. 11: 0-100, 100-1000 lux)

OVERLEVING:	Licht	(N)	Donker	(N)
Experiment 8 (dag 40):	7,76±2,08*	(3)	3,20±1,63	(2)
p:	0,046			
Experiment 11 (dag 38):	39,95±3,53	(3)	36,10±2,77	(3)
p:	N.S.			

ZWEMBLAASINFLATIE:

Experiment 8 (dag 12):	92,9	(1)	80,0	(1)
p:	/			
Experiment 11 (dag 10):	81,30±6,81	(3)	61,00±5,50	(3)
p:	N.S.			

(*: gemiddelde ± S.E.; N: aantal waarnemingen)

II.5.4. Algemene bespreking

Uit experiment 8 blijkt dat een lage verlichtingssterkte een negatieve invloed heeft op de groei van de zeebaarslarven. De larven gekweekt bij 20 tot 100 lux hebben vanaf dag 27 een significant grotere lengte. Vanaf dag 39 is zowel de lengte als het gewicht significant verschillend. De specifieke groeisnelheid is telkenmale hoger. Bij larven, gekweekt bij hogere verlichtingssterktes (0-100 en 100-1000 lux) heeft de verlichtingssterkte geen invloed op de groei. Enerzijds vinden we geen verschillen in gewicht en anderzijds zijn de verschillen in lengtegroei tegenstrijdig op dag 21 en 41. Eenzelfde patroon vinden we voor de specifieke groeisnelheid. De darmvulling is evenwel steeds hoger bij hogere verlichtingssterkte (N.S. op dag 21). Uit deze twee experimenten komt naar voor dat de groei negatief beïnvloed wordt onder een bepaalde lage verlichtingssterkte maar niet vanaf een minimale verlichtingssterkte. Een verlichtingssterkte van 100 lux lijkt voldoende te zijn voor een normale groei. De lagere groeieresultaten bij de minimale verlichtingssterkte zou mogelijks te wijten zijn aan de verminderde waarneming van de levende prooien. Reeds vroeger (deel I.2.) hadden we het belang van visuele waarneming bij mariene vislarven onderstreept. Volgens Blaxter (1966) stoppen de meeste vissen met eten vanaf een minimale verlichtingssterkte, waardoor men deze vissen omschrijft als "visuele eters". Aan de andere kant zijn er extreem hoge verlichtingssterktes nodig voor het stopzetten van de voedselopname. Verschillende onderzochte vislarven vertoonden een diurnaal patroon van voedselopname met een dieptepunt tijdens de nacht (haring: Blaxter, 1966; zeebaars: Ré *et al.*, 1985). Blaxter (1966) stelde vast dat de minimale verlichtingssterkte (waarbij slechts 10 % van de haringlarven voedsel opnemen) 0,19 mc (metre candle) of 80 lux bedraagt, bij de voeding van haringlarven met nauplii van *Balanus* en 0,13 mc of 65 lux bij de voeding met nauplii van *Artemia*.

De invloed van de verlichtingssterkte op de overleving van de zeebaarslarven was eveneens verschillend voor de twee experimenten. In de eerste proef merken we dat de larven gekweekt bij minimale verlichtingssterkte een significant lagere overleving vertonen. In het tweede experiment was er geen enkel verschil. Opnieuw geeft dit een aanduiding dat een minimale verlichtingssterkte nodig is voor een normale ontwikkeling van de larven.

In de beide experimenten hebben we geen aanduidingen voor een negatieve invloed van hoge verlichtingssterkte op de zwemblaasinflatie van zeebaarslarven. Deze resultaten sluiten aan bij deze van Coves (1985b), waarbij eveneens geen verschillen gevonden werden bij toepassing van verlichtingssterktes variërend tussen 70 en 1800 lux. Barnabé (1987) vond het wel noodzakelijk de verlichtingssterkte te beperken tot maximum 500 lux teneinde een voldoende zwemblaasinflatie te bekomen. In experiment 11 werd wel vastgesteld dat onderkaaksverlenging en operculafwijkingen talrijker voorkwamen bij zeebaarslarven gekweekt bij 100-1000 lux. Deze observatie vraagt echter bevestiging daar deze relatie nog niet eerder beschreven werd.

SAMENVATTING

In het kader van de groeiende interesse voor de kweek van mariene vissen in Europa, werd een wetenschappelijke studie verricht over enkele factoren die de overleving van mariene vislarven beïnvloeden en waarbij de zeebaars (*Dicentrarchus labrax*) als studiedier gekozen werd.

1. Kweek van zoö- en fytoplanktonorganismen

Daar de larvale stadia van de zeebaars zich aanvankelijk uitsluitend voeden met levende zoöplanktonorganismen, werd in een eerste deel de kweek en produktie van de verschillende zoöplanktonorganismen (*Brachionus plicatilis*, Rotatoria; nauplii en metanauplii van *Artemia*, Branchiopoda) gerealiseerd. Er werd nagegaan welk voedsel (bakkersgist, biergist, gedroogde of verse wieren) bruikbaar was voor de massakweek van de rotiferen. Op basis van de maximaal bekomen reproductiesnelheden van de rotiferen met deze voedsels en de kostprijs werd een combinatie van levende wiercellen en bakkersgist verkozen.

Bij de produktie van nauplii en metanauplii van *Artemia* werd de decapsulatietechniek en de techniek voor het koud stockeren toegepast. Ter verhoging van de nutritionele waarde werden de metanauplii van *Artemia* steeds aangerijkt met produkten rijk aan poly-onverzadigde vetzuren vooraleer het toedienen aan de zeebaarslarven (bio-incapsulatie).

Het groenwier (*Tetraselmis suecica*) werd gekweekt als aanvullend voedsel voor de rotiferen en als aanrijksprodukt voor de rotiferen tijdens de eerste dagen waarop de zeebaarslarven levende prooien opnemen.

2. Kweek van de larvale stadia van de zeebaars

De zeebaarslarven werden vanaf het bevrucht eistadium opgekweekt in volledig gesloten recirculatie-systemen met artificieel zeewater. Voor het kweken van de fragiele larven werden twee installaties opgesteld met een uitgebreide filtereenheid voor het handhaven van een optimale waterkwaliteit. Het dagelijks volgen van de fysische en chemische variabelen laat toe te stellen dat de installatie een behoorlijke waterkwaliteit garandeert gedurende de ganse larvale kweekperiode. Uit de bacteriële analyse van het water tijdens de verschillende experimenten blijkt dat vooral *Vibrio* en *Pseudomonas* species aanwezig waren. Er werd geen verband aangetroffen tussen deze bacteriënconcentraties en mortaliteit van de zeebaarslarven. Bij de overgang dooierzakresorptie naar levend voedsel werd vastgesteld dat de zeebaarslarven sneller donker gekleurde rotiferen opnemen dan lichter gekleurde rotiferen. Tijdens de laatste experimenten bedroeg de overleving bij optimale condities gemiddeld 16,9 % op dag 60 (minimaal 12,3 en maximaal 29,2 %), waarbij 70 tot 80 % van de zeebaarslarven een correct geïnflateerde zwemblaas hadden.

3. Morfologische ontwikkeling en pathologie van de zeebaarslarven.

In een derde deel werd de ontwikkeling van de zwemblaas beschreven in functie van de groei van de larven. Reeds na 9 dagen merkten we significante verschillen in grootte tussen wel en niet geïnflateerde zwemblazen. Larven met een geïnflateerde zwemblaas vertonen reeds na 19 dagen een verbeterde groei t.o.v. larven met een niet-geïnflateerde zwemblaas. Larven met een niet-geïnflateerde zwemblaas groeien niet alleen trager maar zijn minder in staat de moeilijke overgang naar korrelvoedsel (dag 40-60) te doorstaan.

Studie van de pathologische verschijnselen bij de eigen gekweekte zeebaarslarven toont aan dat een niet-geïnflateerde zwemblaas en de verlenging van de onderkaak de meest voorkomende afwijkingen zijn. Wervelkolomafwijkingen (lordosis, scoliosis) en verkorting van de opercula werden weinig vastgesteld. Vergroting van de galblaas werd vooral opgemerkt in de condities waar de larven gevoed werden met een HUFA-arm dieet.

4. Invloed van poly-onverzadigde vetzuren op de overleving, groei en morfologische ontwikkeling van de zeebaarslarven.

De studie van de poly-onverzadigde vetzuren (deel 4) toonde aan dat in wildgevangen zeebaarslarven en dooierzaklarven de essentiële vetzuren C20:5n3 en C22:6n3 in zeer hoge mate aanwezig zijn. Uit voedingsexperimenten bleek dat de vetzuurpatronen van het voedsel weerspiegeld worden in de vetzuurpatronen van de zeebaarslarven. Larven gevoed met een dieet met een lage concentratie aan deze essentiële vetzuren vertoonden een aanzienlijk tragere groei en een veel hogere mortaliteit. De al of niet aanwezigheid van de essentiële vetzuren in het dieet had, noch op de zwemblaasinflatie noch op het voorkomen van wervelkolomafwijkingen, enige invloed. Wel stelden we een hoger aantal larven met een abnormale vergroting van de galblaas vast in de conditie waar de larven gevoed werden met een HUFA-arm dieet. Op basis van verschillende waarnemingen durven we suggereren dat rondtollend zwemgedrag gecorreleerd is met een lage concentratie C22:6n3 in de zeebaarslarven, en niet aan virale infecties zoals vroeger verondersteld.

5. Invloed van de verlichtingssterkte op de overleving, groei en morfologische ontwikkeling van de zeebaarslarven.

In een laatste deel stelden we vast dat zeer lage verlichtingssterkten de groei en overleving van de larven negatief beïnvloeden, terwijl vanaf een zekere verlichtingssterkte (100 lux) deze negatieve invloed verdwijnt. Er werden geen aanduidingen gevonden voor een negatieve invloed van een hoge verlichtingssterkte (1000 lux) op de zwemblaasinflatie van de zeebaarslarven.

SUMMARY:

We investigated different factors influencing the survival of marine fish larvae and those of seabass in particular.

1. Culture of zoo- and phytoplankton

During their first month of life the larval stages of seabass accept only live food. In order to rear them, we cultured different zooplankton organisms (*Brachionus plicatilis*, Rotatoria; nauplii and metanauplii of *Artemia*; Branchiopoda). We investigated which kind of food such as baker's yeast, brewer's yeast, dried and living algae was suitable for the culture of rotifers. On the basis of the reproduction rate obtained and the production costs, we choose a combination of fresh baker's yeast and fresh algae (*Tetraselmis suecica*) as food for the mass production of rotifers.

For the production of nauplii and metanauplii of *Artemia* we applied the decapsulation technique and the cold storage technique. Before supplying the metanauplii to the fish larvae, we enriched the metanauplii with highly unsaturated fatty acids (bio-encapsulation).

Fresh algae (*Tetraselmis suecica*) were cultured as supplementary food for the rotifers.

2. Culture of the larvae of seabass

The seabass larvae were cultured in completely closed recirculation systems with artificial seawater. Two separate installations were used, both with an extended filter to obtain an optimal water quality. The physical and chemical parameters of the water quality were carefully monitored during every experiment. A three year survey of the bacterial population in this system revealed the permanent presence of *Vibrio alginolyticus* and *Pseudomonas* species. No causal relationship was found between the concentration of these bacteria and the mortality of fish larvae.

In some food experiments, we found that the uptake of the first food by the seabass larvae was improved when *Brachionus* was enriched with dark coloured substances (green algae), due to the greater conspicuousness of these preys. In the latter experiments, mean survival rate was 17% after weaning (minimal 12%, maximal 29%); swimbladder inflation was about 70-80%.

3. Morphological development and pathology of the seabass larvae.

In a third part, we followed carefully the development of the swimbladder and the relation between swimbladder development and growth in seabass larvae. Already after 9 days we found significant differences in swimbladder development between larvae with and without a filled swimbladder. After 19 days, we could already demonstrate the significantly faster growth rate of larvae with an

inflated swimbladder. Most of the larvae with a non-inflated swimbladder die during the weaning from live to dry food (day 40-60).

Study of the pathological phenomena showed that lack of inflation of the swimbladder (in the first three years only) and elongation of the lower jaw were very common. Skeletal malformations such as lordosis and scoliosis were rarely found, so was shortening of the gill operculae.

4. Influence of highly unsaturated fatty acids on the survival, growth and morphological development of seabass larvae.

Measurement of the poly-unsaturated fatty acids (HUFA) showed that the essential fatty acids C20:5n3 and C22:6n3 are very important in wildcaught seabass larvae and yolk sac larvae (30% of total fatty acids). Food experiments demonstrated that the fatty acid pattern of the food is reflected in the body composition of sea bass larvae. Larvae fed with a diet low in HUFA's were growing slowly and had a very high mortality rate compared to larvae fed with HUFA-rich diets. The best growth was obtained with the food containing the highest amount of HUFA's. The amount of HUFA's in the diet had no influence on swimbladder inflation or skeletal deformities. However, hyperextension of the gallbladder was often found when larvae were fed a HUFA-poor diet.

A relationship was demonstrated between the spinning syndrome of the sea bass larvae (whirling disease) and a very low concentration of C22:6n3 in their total body composition. No viruses or bacteria were found, responsible for this disease.

5. Influence of lightintensity on the survival, growth and morphological development of seabass larvae.

We found that very low light intensities (0-100 lux) had a negative influence on the growth and survival of the seabass larvae. We could not demonstrate any influence of the light intensity on the swimbladder inflation, although maximal light intensities applied, were only 1000 lux.

Lijst Tabellen:

- Tabel 1: Eidiameter, larvale lengte en gewicht bij de ontluiking van een aantal vissoorten
- Tabel 2: Opeenvolgende voedsels toegediend aan verscheidene gekweekte mariene vislarven (A. zeebaars, *Dicentrarchus labrax*; B. zeebrasem, *Sparus aurata*; C. tarbot, *Scophthalmus maximus*; D. heilbot, *Hippoglossus hippoglossus*; E. tong, *Solea solea*)
- Tabel 3: Overzicht van enkele vissoorten waarbij rotiferen toegediend worden als eerste voedsel aan de larven.
- Tabel 4: Ontluikingskarakteristieken van cysten en biometrische gegevens over nauplii van *Artemia* afkomstig van verschillende geografische plaatsen (naar Vanhaecke, 1983)
- Tabel 5: Overzicht van de kweekomstandigheden toegepast bij de eerste succesvolle productie van zeebaarslarven: A. Ei-incubatie B. Larvekweek (Barnabé, 1974)
- Tabel 6: Overzicht van enkele abiotische en biotische variabelen toegepast bij de kweek van zeebaarslarven over de voorbije twintig jaar
- Tabel 7: Overzicht van enkele abiotische en biotische variabelen toegepast bij de kweek van zeebaarslarven over de voorbije twintig jaar
- Tabel 8: Overzicht van enkele abiotische en biotische variabelen toegepast bij de kweek van zeebaarslarven over de voorbije twintig jaar
- Tabel 9: Vetzuurpatronen (in oppervlakte-procent) van bakkersgist en verschillende prooidieren al of niet aangerijkt met verschillende substanties Bron: (1) Watanabe et al., 1983; (2) Dendrinios en Thorpe, 1987
- Tabel 10: Vetzuurpatronen van pas ontloken nauplii van *Artemia* afkomstig van verschillende geografische oorsprong (uitgedrukt in oppervlakte-procent). (Bronnen: (1) Schauer et al., 1980; (2) Dendrinios en Thorpe, 1987)
- Tabel 11: Vetzuurpatronen (oppervlakte-procent) van acht mariene niet-commerciële vissoorten uit de oostelijke zone van de N-Atl. Oceaan, alsook van haring en tong (dooier). (bron; 1-8: Culkin en Morris, 1970; 9: Linko et al., 1985; 10: Dendrinios en Thorpe, 1987; 11: Tocher et al., 1985)
- Tabel 12: Samenstelling van het medium van Provasoli (Mollo en Tudesq, 1984)
- Tabel 13: Samenstelling van het medium van Walne (Mollo en Tudesq, 1984)
- Tabel 14: Overzicht van de kwantitatieve analyses van de bacteriën in drie verschillende experimenten met zeebaarslarven (uitgedrukt in C.F.U.).
- Tabel 15: Overzicht van alle bacteriesoorten gevonden in de verschillende experimenten met zeebaarslarven (periode 4/85 tot 5/88).
- Tabel 16: Procentueel aantal larven met voedsel in de darm in drie verschillende experimenten op het tijdstip waarvoor het eerst larven met voedsel in de darm waargenomen werden
- Tabel 17: Overzicht van alle experimenten en overlevingscijfers bekomen tijdens onze studie over de kweek van zeebaarslarven
- Tabel 18: Overzicht van de overleving en de leeftijdsspecifieke overleving (l_x) van zeebaarslarven tijdens drie experimenten (januari-maart 87, januari-maart 88, maart-mei 88).
- Tabel 19: Toename van de zwemblaaslengte (mm) bij zeebaarslarven met een al dan niet geïnflateerde zwemblaas tijdens de experimenten 8 (januari-maart 87), 10 (januari-maart 88), en 11 (maart-mei 88).

- Tabel 20: Toename van de zwemblaashoogte (mm) bij zeebaarslarven met een al dan niet geïnflateerde zwemblaas tijdens de experimenten 8 (januari-maart 87), 10 (januari-maart 88), en 11 (maart-mei 88).
- Tabel 21: Logaritmische vergelijkingen van de groei van de zwemblaas (lengte en hoogte, mm) in functie van de lengtegroei van de zeebaarslarven, al dan niet met een correct geïnflateerde zwemblaas tijdens de experimenten 8 (januari-maart 87), 10 (januari-maart 88), en 11 (maart-mei 88).
- Tabel 22: Verschillen in lengtegroei bij zeebaarslarven met een al dan niet geïnflateerde zwemblaas tijdens de experimenten 8 (januari-maart 87), 10 (januari- maart 88), en 11 (maart-mei 88).
- Tabel 23: Toename van het gewicht (mg) bij zeebaarslarven met een al dan niet geïnflateerde zwemblaas tijdens de experimenten 8 (januari-maart 87), 10 (januari-maart 88), en 11 (maart-mei 88).
- Tabel 24: Specifieke groeisnelheid (SGR) van zeebaarslarven met een al dan niet geïnflateerde zwemblaas tijdens de experimenten 8 (januari-maart 87), 10 (januari-maart 88), en 11 (maart-mei 88).
- Tabel 25: Procentueel voorkomen van morfologische afwijkingen bij zeebaarslarven gekweekt tijdens de experimenten 8, 10, 11 op dag 40
- Tabel 26: Conditie voor de gaschromatografische analyse van vetzuurmethylesters in twee laboratoria
- Tabel 27: Procentuele verdeling van de vetzuren in de dooierzaklarven van de zeebaars afkomstig van het C.O.Brest en van Ferme Marine de Douhet, alsook van larven gevangen in het wild (Ambleteuse, Frankrijk) en eigen gekweekte larven (uitgedrukt in oppervlakte procent van het elutiepatroon).
- Tabel 28: Relatieve hoeveelheid hogere vetzuren in de verschillende oliën toegepast bij de aanrijking van de levende prooien
- Tabel 29: Invloed van het dieet op het voorkomen van morfologische afwijkingen bij zeebaarslarven met verschillende ouderdom (Tank A2 en A4: kokosnootvet; Tank A1 en A5: visolie; Tank A3 en A6: visolie extra rijk in poly- onverzadigde vetzuren)
- Tabel 30: Verschillende media gebruikt voor de kweek van metanauplii van *Artemia* en de samenstelling van het extra aanrijkmiddel (in g/100g)
- Tabel 31: Verschillen in lichaamslengte en gewicht, lengte en hoogte van de zwemblaas en darmvulling bij normaal zwemmende en rondtollende zeebaarslarven op dag 35 (experiment januari-maart 1988)
- Tabel 32: Vetzuurpatronen van rondtollende zeebaarslarven (uitgedrukt in oppervlakte-procent) verzameld in experiment 8 en 10
- Tabel 33: Groei in lengte (mm) en gewicht (mg), en specifieke groeisnelheid van zeebaarslarven gekweekt bij lage (0-20 lux) en hogere verlichtingssterkte (20-100 lux) tijdens de periode januari-maart 1987 (exp. 8)
- Tabel 34: Groei in lengte (mm) en gewicht (mg), darmvulling en specifieke groeisnelheid van zeebaarslarven gekweekt bij lage (0-100 lux) en hogere verlichtingssterkte (100-1000 lux) tijdens de periode maart-mei 1988 (exp. 11)
- Tabel 35: Morfologische afwijkingen bij zeebaarslarven gekweekt bij twee verlichtingssterktes (0-100, 100- 1000 lux) tijdens de periode maart-mei 1988

Tabel 36: Overleving (%) en zwemblaasinflatie (%) van zeebaarslarven in twee experimenten, telkenmale bij verschillende verlichtingssterktes (exp. 8: 0-20, 20-100 lux; exp. 11: 0-100, 100-1000 lux)

Lijst Figuren:

- Figuur 1: Enkele typische skeletafwijkingen bij vissen: A. Bultvorming, B. Verkorting van de wervelkolom, C. Lordosis, D. Onderkaakvervorming, F. Verkorting van het operculum, G. Pseudodeformatie van de wervelkolom door een spierafwijking te wijten aan parasieten (bron: Möller en Anders, 1986)
- Figuur 2: Verschillende bewegingen van de fosfolipiden in de celmembraan
- Figuur 3: Dubbele bindingen in de vetzuurketens verhogen de vloeibaarheid van de celmembraan door het samenpakken van de ketens te bemoeilijken
- Figuur 4: Verlenging en desaturatie van de vetzuurketens startend vanaf de respectievelijke C18-precursoren
- Figuur 5: A. Procentuele terugkaatsing van het invallend licht in functie van de invalshoek (i) (tussen haakjes: % gebroken licht, andere waarden: teruggekaatst licht) B. Breking van het licht op het wateroppervlak (I: invallende lichtstraal, R: teruggekaatste lichtstraal, G: gebroken lichtstraal)
- Figuur 6: Toename van het aantal raderdiertjes (*Brachionus plicatilis*) bekomen in verschillende kweekexperimenten bij toediening van verschillende voedsels (bakkersgist, biergist, gedroogde en verse wieren)
- Figuur 7: Toename van de celconcentraties van *Tetraselmis suecica* (miljoen cellen per ml) over zeven dagen in vier verschillende kulturen (erlenmeyers, 5 liter)
- Figuur 8: Schematische voorstelling van de installatie voor de kweek van zeebaarslarven (A. Bovenzicht, B. Zij aanzicht)
- Figuur 9: Schematische voorstelling van de verschillende typen zeven
- Figuur 10: Fluctuaties van de verschillende fysische en chemische variabelen tijdens de kweek van zeebaarslarven voor de periode januari-maart 87, januari-maart 88, en maart-mei 88 (A. Zuurstof, B. Temperatuur, C. Verlichtingssterkte, D. Debiet, E. Saliniteit, F. Nitriet, G. Totale ammoniak)
- Figuur 11: Groei van de zwemblaas (lengte, hoogte, in mm) en de luchtbel in zeebaarslarven in functie van de leeftijd (dagen)
- Figuur 12: Resorptie van de dooierzak en oliedruppel (diameter, mm) bij zeebaarslarven in functie van de leeftijd (dagen)
- Figuur 13: Diagram (GC) van de standaardoplossing 11
- Figuur 14: Diagram (GC) van de standaardoplossing 16
- Figuur 15: Diagram (GC) van staal 4 (wildgevangen larven)
- Figuur 16: Diagram (GC) van staal 12 (één dag oude dooierzaklarven)
- Figuur 17: Verandering van de relatieve concentratie C18:3n3 in drie groepen zeebaarslarven gevoed met verschillende diëten (KOKOS, SELCO, SUPERSELCO)
- Figuur 18: Verandering van de relatieve concentratie C20:5n3 in drie groepen zeebaarslarven gevoed met verschillende diëten (KOKOS, SELCO, SUPERSELCO)
- Figuur 19: Verandering van de relatieve concentratie C22:6n3 in drie groepen zeebaarslarven gevoed met verschillende diëten (KOKOS, SELCO, SUPERSELCO)
- Figuur 20: Veranderingen van de relatieve concentratie aan totale HUFAs in drie groepen zeebaarslarven gevoed met verschillende diëten (KOKOS, SELCO, SUPERSELCO)

Figuur 21: Groei (totale lengte, mm) van zeebaarslarven gevoed met verschillende diëten (KOKOS, SELCO, SUPERSELCO)

Figuur 22: Groei (gewicht, mg) van zeebaarslarven gevoed met verschillende diëten (KOKOS, SELCO, SUPERSELCO)

REFERENTIES

ANONYMUS, 1978a.

Fiche 1-L'aquaculture du loup: la production de juveniles.
Technique de production.

Supplément au Bulletin CNEXO, N° 114

ANONYMUS, 1978b.

Fiche 2 - L'aquaculture du loup: la production de juvéniles.
Eléments économiques.

Supplément au Bulletin CNEXO, N° 117-118

ANONYMUS, 1982.

Considerations and practical advices on rearing and feeding
of sea-fish species.

Fish Technical Notes, TROUW Italia Spa.

ANONYMUS, 1986.

Report of the ad hoc study group on first feeding of fish
larvae for mariculture.

International Council for the Exploration of the sea, C.M.
1986/F: 55.

ANONYMUS, 1987.

Bass and bream go commercial.

Fish farmer September/October, p. 30-32.

ALDERSON R. and BROMLEY P.J., 1973.

A method for rearing larvae of the turbot, Scophthalmus
maximus L. to metamorphosis

ICES C.M. E/20

ALESSIO G., 1975.

Riproduzione artificiale di orata, Sparus auratus (L)
(Osteichthyes, Sparidae). 5. Primi risultati
sull'allevamento ed alimentazione delle larve e degli
avanotti.

Boll. Pesca Piscic. Idrobiol., 30 (1), p. 71-92

ALESSIO G., GANDOLFI G. and SCHREIBER B., 1976.

Induction de la ponte, élevage et alimentation des larves et
des alevins des poissons euryhalins.

Studies and reviews n° 55 of FAO, " Ponte controlée et
élevage des larves d'espèces marines sélectionnées de la
méditerranée

AL-KHARS ABDUL M., KAMEL SUSAN M. and KAWANO T., 1980.

Mass production of rotifer, Brachionus plicatilis, by using
marine yeasts; Part 2: Out-door culture.

Lecture at the symposium on coastal aquaculture, p. 12-18
January 1980, Cochín, India

ALLIOT E., PASTOUREAUD A. and THEBAULT H., 1983.
Influence de la température et de la salinité sur la croissance et la composition corporelle d'alevins de Dicentrarchus labrax.
Aquaculture 31, p. 181-194.

ATCHINSON G.J., 1975.
Fatty acid levels in developing brook trout (Salvelinus fontinalis) eggs and fry.
J. Fish Res. Board Can., Vol. 32(12), p. 2513-2515

AUSTIN B., 1988.
Methods in aquatic bacteriology.
J. Wiley and Sons, Chichester, pp. 425.

BAGARINO T. and KUNGVANKIJ P., 1986.
An incidence of swimbladder stress syndrome in hatchery-reared sea bass (Lates calcarifer) larvae.
Aquaculture, 51, p. 181-188

BARAHONA-FERNANDES M.H. and GIRIN M., 1977.
Effect of different food levels on the growth and survival of laboratory-reared sea-bass larvae (Dicentrarchus labrax L.)
3rd meeting of the I.C.E.S. working group on mariculture, Brest, France, May 1977, Actes de colloques du C.N.E.X.O.

BARAHONA-FERNANDES M.H., 1978.
Effect of aeration on the survival and growth of sea-bass (Dicentrarchus labrax L.) larvae: a preliminary study.
Aquaculture, 14, 67-74

BARAHONA-FERNANDES M.H., 1979.
Some effects of light intensity and photoperiod on the sea bass larvae (Dicentrarchus labrax) reared at the Centre Océanologique de Bretagne.
Aquaculture, 17, p. 311-322.

BARAHONA-FERNANDES M.H., 1981.
Growth and survival of the sea bass larvae (Dicentrarchus labrax L.) according to the date of spawning and the batch of spawners, at the Centre Océanologique de Bretagne.
Publicacao do Museu e Laboratorio Zoologico e Antropologico Vol. 1, n° 2

BARAHONA-FERNANDES M.H., 1982.
Problèmes liés au sevrage du bar (Dicentrarchus labrax L.).
La pisciculture française n° 65.

BARNABE G., 1974.
Mass rearing of the bass Dicentrarchus labrax.
In: The life history of Fish. Symp. Oban, Scotland, p. 749-753, May 1973.

BARNABE G., 1976.

Elevage larvaire du loup (Dicentrarchus labrax (L.)); Pisces, Serranidae) a l'aide d'aliment sec composé.
Aquaculture 9, p. 237-252

BARNABE G., 1978.

Etude dans le milieu naturel et en captivité de l'éco-éthologie du loup Dicentrarchus labrax (L.) (poisson serranidae) a l'aide de nouvelles techniques.
Annales des Sciences Naturelles, Zoologie, Paris, 12 série, vol. 20, p. 423-502.

BARNABE G., 1986.

L'élevage du loup et de la daurade.

In: L'aquaculture, Vol. 2, Barnabé G. (Ed.), p. 627-666, ISBN Paris cedex pp 1120.

BARNABE G., 1987.

L'élevage du loup et de la daurade: aspects techniques et réalités économique.

Océanis, vol. 13, Fasc. 1, p. 59-68.

BARNABE G. and RENE F., 1972.

Reproduction contrôlée du loup Dicentrarchus labrax L. (Linné) et production en masse d'alevins.

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 275, p. 2741-2744.

BARNABE G. and RENE F., 1973.

Reproduction contrôlée et production d'alevins chez la dorade Sparus auratus Linné 1758.

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 276, p. 1621-1624.

BARNABE G. and BARNABE-QUET R., 1985.

Avancement et amélioration de la ponte induite chez le loup (Dicentrarchus labrax L.) a l'aide d'un analogue de LHRH injecté.

Aquaculture, 49, p. 125-132.

BARNES R.D., 1982.

Invertebrate zoology.

Saunders College, Philadelphia, pp. 1089.

BEDIER E., CHATAIN B., COVES D. and WEPPE M., 1984.

Contribution à la production intensive de juvéniles de dorade (Sparus auratus).

In: Aquaculture du Bar et des Sparidés. Ed. Barnabé G. & Billard R.; I.N.R.A. publ., Paris, 1984

BELL M.V., HENDERSON R.J., FIRIE B.J.S. and SARGENT J.R., 1985.

Effects of dietary polyunsaturated fatty acid deficiencies on mortality, growth and gill structure in the turbot, Scophthalmus maximus.

The fisheries Society of the British Isles, 11, p. 181-191.

- BLACKWELL M.J., 1966.
Radiation meteorology in relation to field work.
In "Light as an ecological factor", p. 17-39, Ed. R. Bainbridge, G.C. Evans, O. Rackham, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 452.
- BLAXTER J.H.S., 1962.
Herring rearing IV. Rearing beyond the yolk-sac stage.
Mar. Res. Scot., 1, p.18.
- BLAXTER J.H.S., 1966.
The effect of light intensity on the feeding ecology of herring.
In "Light as an ecological factor", p. 393-409, ed. R. Bainbridge, G.C. Evans, O. Rackham, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 452.
- BLAXTER J.H.S., 1968.
Rearing herring larvae to metamorphosis and beyond.
J. Mar. Biol. Assoc., UK, 48, p. 17-28.
- BLAXTER J.H.S., DANIELSSEN D., MOKSNESS E. and OIESTAD V., 1983.
Description of the early development of the halibut Hippoglossus hippoglossus and attempts to rear the larvae past feeding.
Marine Biology 73, 99-107.
- BONAMI J.R., COUSSERANS F., WEPPE M., and HILL B.J., 1983.
Mortalities in hatchery-reared sea-bass associated with a birnavirus.
Bulletin of the EAEP, 3, p. 41-42.
- BOUSSIBA S., SANDBANK E., G. SHELEF, COHEN Z., VONSHAK A., BEN-AMOTZ A., ARAD S. and RICHMOND A., 1988.
Outdoor cultivation of the marine microalga *Isochrysis galbana* in open reactors.
Aquaculture, 72, p. 247-253.
- BROMLEY P.J., SYKES P.A. and HOWELL B.R., 1986.
Egg production of turbot (Scophthalmus maximus L.) spawning in tank conditions.
Aquaculture 53, p. 287-293.
- BRUGGEMAN E., BAEZA-MESA M., BOSSUYT E. and SORGELLOOS P., 1977.
Improvements in the decapsulation of Artemia cysts.
Proceedings of the Conference of Aquaculture on Cultivation of Fish Fry and its live Food, Szymbark (Poland, September 23-28, 1977)

BRUNEL G., 1987.

Marine fish hatcheries: site - production programme - dimensioning.

In: "Production in marine hatcheries"; p. 49-60; MEDRAP publication, 1987, Ed. B. Loix, 385 pp.

BUCHSBAUM R., 1969.

De ongewervelde dieren. Deel 1.

Uitgeverij het Spectrum, Utrecht/Antwerpen, 230 pp.

BUYL H., 1983.

Huidige stand van het onderzoek over Brachionus plicatilis Müller (Rotatoria).

Eindverhandeling, R.U.G., pp. 140.

CAMBRE M., MAREELS G., CORNEILLIE S., MOONS L., OLLEVIER F. and VANDESANDE F., (submitted 1988).

Chronological appearance of the different hypophyseal hormones in the pituitary of sea bass larvae (Dicentrarchus labrax L.) during their early development. A immunohistological demonstration.

Gen. and Comp. Endocrinology.

CAMUS P. and KOUTSIKOPOULOS C., 1984.

Incubation experimentale et developpement embryonnaire de la daurade royale, Sparus aurata L., a differentes temperatures.

Aquaculture 42, p. 117-128.

CASTELL J.D., SINNHUBER R.O., LEE D.J. and WALES J.H., 1972.

Essential fatty acids in the diet of rainbow trout (Salmo gairdneri): physiological symptoms of EFA deficiency.

J. Nutr., 102, p. 87-92.

CASTLEDINE A.J. and BUCKLEY J.T., 1982.

Incorporation and turnover of essential fatty acids in phospholipids and neutral lipids of rainbow trout.

Comp. Biochem. Physiol., Vol 71B, p. 119-126.

CASSIERS B., 1988.

De invloed van de vetzuursamenstelling van het rantsoen op de vetzuursamenstelling van de Europese paling Anguilla anguilla L.

Eindverhandeling K.U.L., pp. 127.

CHARLON N. and BERGOT P., 1984.

Rearing system for feeding fish larvae on dry diets. trial with carp (Cyprinus carpio L.) larvae.

Aquaculture 41, p. 1-9.

CHATAIN B., 1986.

La vessie natatoire chez Dicentrarchus labrax et Sparus auratus. I. Aspects morphologiques du development.

Aquaculture, 53, 303-311.

CHATAIN B., 1987.

La vessie natatoire chez Dicentrarchus labrax et Sparus auratus. II. Influence des anomalies de développement sur la croissance de la larve.

Aquaculture 65, p. 175-181.

CHEN J.-C., WU T.-E. and CHANG M.-S., 1987.

Whirling symptom of cage-cultured Tilapia in the Tsengwen reservoir.

Abstract in Book of papers presented at The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture; Bangkok, Thailand, 16-20 March 1987.

CHERVINSKY J. and LAHAV M., 1979.

Fresh water feed of young European sea bass (Dicentrarchus labrax L.).

Bamidgeh. 31, p. 44-48.

CHOTIYAPUTTA C. and HIRAYAMA K., 1978.

Food selectivity of the rotifer Brachionus plicatilis feeding on phytoplankton.

Marine Biology, 45, p. 105-111.

CHRISTENSEN N.O., 1978.

Whirling disease (myxosomiasis) in salmonids.

EIFAC/T17, p. 218-224.

COLLINGBOURNE R.H., 1966.

General principles of radiation meteorology.

In "Light as an ecological factor", p. 1-15, Ed. R. Bainbridge, G.C. Evans, O. Rackham, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 452.

CORRAO D., 1984.

Sevrage du loup, Dicentrarchus labrax L., en élevage intensif. Influence de la taille des alevins et de la séquence alimentaire.

Thèse Université d'Aix Marseille II

CORNEILLIE S., 1984.

Studie van de hypothalamo-hypofysaire rennale as en cirdaciane ritmiek van enkele plasmacomponenten in de karper, Cyprinus carpio Linnaeus 1867.

Eindverhandeling K.U.L., pp. 137.

CORNEILLIE S. and OLLEVIER F., 1988.

Le développement de la vessie natatoire chez les larves de poissons marins en élevage.

Abstract of the symposium "La recherche océanographique en Méditerranée", Luik, 17-18 March 1988.

COUSIN J.C.B., BALOUET G. and BAUDIN-LAURENCIN F., 1986.

Alterations histologiques observées chez des larves de turbot (Scophthalmus maximus L.) en élevage intensif.

Aquaculture 52, p. 173-189.

COVES D., 1985a.

Elevage du loup, Ecloseries: taux de survie à la hausse. Equinoxe, 1, p. 16-22.

COVES D., 1985b.

Etat actuel de l'élevage du loup, Dicentrarchus labrax, en écloserie.

Aqua revue, 3, p. 26-30.

COWEY C.B., OWEN J.M., ADRON J.W. and MIDDLETON C., 1976.

Studies on the nutrition of marine flatfish. The effect of different dietary fatty acids on the growth and fatty acid composition of turbot (Scophthalmus maximus).

Br. J. Nutr., 36, p. 479-486.

CULKIN F. and MORRIS R.J., 1970.

The fatty acids of some marine teleosts.

J. Fish Biol., 2, p. 107-112.

DABROWSKI K., 1979.

The role of proteolytic enzymes in fish digestion.

In: E. Styczynska-Jurewicz, T. Backiel, E. Jaspers and G. Persoone (Ed.), Cultivation of fish fry and its live food, Vol. 4. European Mariculture Society, Bredene, Belgium, p. 107-126.

DABROWSKI K. and BARDEGA R., 1982.

The changes of fish larvae dimensions due to fixation in different preservatives.

Zool. Jb. Anat. 108, p. 509-516.

DABROWSKI K. and BARDEGA R., 1984a.

Mouth size and predicted food size preferences of larvae of three cyprinid fish species.

Aquaculture 40, p. 41-46

DABROWSKI K. and KAUSHIK S. J., 1984b.

Rearing of coregonid (Coregonus schinzi palea cuv. et val.) larvae using dry and live food. II. Oxygen consumption and nitrogen excretion.

Aquaculture 41, p. 333-344

DAVIES P.R., HANHYU I., FURUKAWA K. and NOMURA M., 1986.

Effects of temperature and photoperiod on sexual maturation and spawning of the common carp. III. Induction of spawning by manipulating photoperiod and temperature.

Aquaculture, 52, p. 137-144.

DENDRINOS P., DEWAN S. and THORPE J.P., 1984.

Improvement in the feeding efficiency of larval, postlarval and juvenile dover sole (Solea solea) by the use of staining to improve the visibility of Artemia used as food.

Aquaculture, 38, 137-144

DENDRINOS P. and THORPE J.P., 1987.

Experiments on the artificial regulation of the amino acid and fatty acid contents of food organisms to meet the assessed nutritional requirements of larval, post-larval and juvenile Dover sole (Solea solea L.).

Aquaculture 61, p. 121-154.

DE PAUW N., 1981.

Use and production of microalgae as food for nursery bivalves. In C. Claus, N. De Pauw and E. Jaspers (eds.), Eur. Maric. Soc. Spec. Publ. 7, Bredene, Belgium, p. 35-69.

DE PAUW N., MORALES J. and PERSOONE G., 1984.

Mass culture of microalgae in aquaculture systems: Progress and constraints.

Hydrobiologia 116/117, p. 122-123.

DE PAUW N. and PRUDER G., 1987.

Use and production of microalgae as food in aquaculture: a review on practices, problems and research needs.

In: "Realism in aquaculture", Ed. Bilo M., Rosenthal H. and Sideman C.J., I.S.B.N., pp. 585.

DEPUYDT P., 1984.

Studie van het voedingsgedrag en van de groei van de zeebaars Dicentrarchus labrax Linnaeus.

Eindverhandeling K.U.L., pp. 190.

DEVAUCHELLE N., 1984.

L'incubation des oeufs de bar (Dicentrarchus labrax L.) et de daurade (Sparus aurata).

In: Aquaculture du Bar et des Sparidés. Ed. Barnabé G. & Billard R.; I.N.R.A. publ., Paris, 1984

DEVAUCHELLE N., 1987.

Four marine spawners in European hatcheries.

In: "Production in marine hatcheries"; p. 302-347; MEDRAP publication, 1987, Ed. B. Loix, 385 pp.

MEDRAP

DEVAUCHELLE N. and CHOPIN T., 1982.

Présentation de techniques d'incubation pour oeufs pélagiques de poissons marins.

Aquacultural Engineering 1: 227-233

DEVAUCHELLE N., LETTI Y. and QUERE M., 1986.

Experimental units for incubation and larval rearing with special reference to four marine fish species.

Aquaculture 58, p. 297-304.

DIVANACH P. and KENTOURI M., 1983.

Influence des conditions trophiques initiales sur la résorption des réserves lipidiques, la croissance et la survie des larves de daurades, Sparus auratus, en élevage extensif.

Aquaculture 35, p. 43-55

DOROSHEV S.I. and CORNACCHIA J.W., 1979.

Initial swim bladder inflation in the larvae of Tilapia mossambica (Peters) and Morone saxatilis (Walbaum).

Aquaculture, 16, p. 57-66.

EDELMAN K., STELWAGEN P. and OURA E., 1980.

The influence of temperature and availability of oxygen on the carbohydrates of stored baker's yeast.

In "Proceedings of the fifth Int. Yeast Symp.", London, Canada, 20-25 July 1980.

EZZAT A., RAMADAN A. and HAFEZ S., 1982.

Embryonic and larval development of Sparus auratus.

Vie mar. 4, p. 59-66.

FABREGAS J., ABALDE J., HERRERO C., CABEZAS B. and VEIGA M., 1984.

Growth of the marine microalgae Tetraselmis suecica in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations.

Aquaculture, 42, p. 207-215.

FANCIULLI G., 1987.

Production of phyto and zooplankton.

In: "Production in marine hatcheries"; p. 99-114; MEDRAP publication, 1987, Ed. B. Loix, 385 pp.

FERRARI I. and CHIERGATO, 1981.

Feeding habits of juvenile stages of Sparus auratus L., Dicentrarchus labrax L. and mugilidae in a brackish embayment of the Po river delta.

Aquaculture 25, p. 243-257.

FONDS M., 1979.

Laboratory observations on the influence of temperature and salinity on development of the eggs and growth of the larvae of Solea solea (Pisces).

Mar. Ecol. Prog. Ser., vol. 1, p. 91-99

FOSCARINI R., 1988.

A review: Intensive farming procedure for red sea bream (Pagrus major) in Japan.

Aquaculture, 72, p. 191-246.

FRANCESCON A., FREDDI A., BARBARO A. and GIAVENNI R., 1988
Daurade Sparus auratus L. Reproduite artificiellement et
daurade sauvage. Expériences paralleles en diverses
conditions d'élevage.
Aquaculture, 72, p. 273-285.

FRANICEVIC V., LISAC D., BUBLE J., LEGER Ph., and SORGEOLOS
P., 1987.

International study on Artemia. XLII. The effect of the
nutritional quality of Artemia on the growth and survival of
sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae in a commercial
hatchery.

In: "Production in marine hatcheries"; MEDRAP publication,
p. 139-145, 1987. Ed. B. Loix.

FUJITA S., 1979.

Culture of red sea bream, Pagrus major, and its food.

In: E. Styczynska-Jurewicz, Backiel T., Jaspers E. and
Persoone G. (Ed.); Cultivation of fish fry and its live
food. Spec. Publ. Eur. Maricult. Soc., n° 4, p. 183-197.

FUKUSHO K. and IWAMOTO H., 1980.

Cyclomorphosis in size of the cultured rotifer Brachionus
plicatilis.

Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult. 1, p. 29-37.

GATESOUPÉ F.J., 1987.

Introduction of live bacteria into the food chain for the
larval rearing of turbot.

I.C.E.S. Working Group on Mass rearing of Juveniles Marine
Fish; IFREMER, Brest, 24-26th June 1987.

GATESOUPÉ 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, p. 149-163

GATESOUPÉ F.J. and ROBIN J.H., 1982.

The dietary value for sea bass larvae (Dicentrarchus labrax)
of the rotifer Brachionus plicatilis fed with or without a
laboratory-cultured algae

Aquaculture 27, p. 121-127

GIAVENNI R., 1986.

Pathology of sea-bass and sea-bream.

In: "Pathology of marine species reared in the
mediterranean", MEDRAP-report, Ed. BRUNO A., p. 116-123.

GIRIN M., 1975a.

Point des techniques d'élevage larvaire du bar en Octobre
1975.

Centre Océanologique de Bretagne, N° 426

GIRIN M., 1976.

La ration alimentaire dans l'élevage larvaire du bar, Dicentrarchus labrax (L.).

Proceedings of the 10th European Symposium on Marine Biology, Ostend, Belgium, Sept. 17-23, G. Persoone and E. Jaspers (Eds.), Universa Press, Wetteren, Belgium, Vol. 1, p. 171-188.

GIRIN M., 1979.

Méthodes de production des juveniles chez trois poissons marins, le bar, la sole et le turbot

Publications du Centre National pour l'Exploitation des Océans, n° 39, pp.202.

GIRIN M., BARAHONA-FERNANDES M.H. and LE ROUX A., 1975.

Larval rearing of sea bass (Dicentrarchus labrax L.) with a high survival.

I.C.E.S. C.M. 1975/G: 14; Contribution n° 406 du Departement Scientifique du Centre Océanologique de Bretagne.

GIRIN M. and DEVAUCHELLE N., 1978.

Fiche 1: L'aquaculture du loup: la production de juveniles. Technique de production.

Bulletin d'information Suppl. au Bull. CNEXO 114: 1-16

GIRIN M. and PERSON-LE RUYET J., 1977.

L'élevage larvaire des poissons marins: chaines alimentaires et aliments composés.

Contribution n° 503 du Departement Scientifique du Centre Océanologique de Bretagne.

GRAY R.H., SAROGLIA M.G. and SCARANO G., 1985.

Comparative tolerance to gas supersaturated water of two marine fishes, Dicentrarchus labrax L. and Mugil cephalus. Aquaculture 48, p. 83-89.

GREENE D.H.S. and SELIVONCHICK D.P., 1987.

Lipid metabolism in fish.

Prog. Lipid Res., Vol. 26, p. 53-85

GUILLAUME J., 1987.

National status report, France.

I.C.E.S. Working Group on Mass rearing of Juveniles Marine Fish; IFREMER, Brest, 24-26th June 1987.

HALVER J.E., 1980.

Lipids and fatty acids.

In "Fish feed technology"

ADCP/REP 80/11, p. 42-53

HASAN M.R. and MACINTOSH D.J., 1986.

Acute toxicity of ammonia to common carp fry.

Aquaculture, 54, p. 97-107.

- HENDERSON R.J., BELL M.V. and SARGENT J.R., 1985.
The conversion of polyunsaturated fatty acids to prostaglandins by tissue homogenates of the turbot, Scophthalmus maximus (L.).
J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 85, p. 93-99.
- HENRY S.A., 1982.
Membrane lipids of yeast: biochemical and genetic studies.
In "The molecular biology of the yeast Saccharomyces", p. 101-158, Eds. Strathern J.N., Jones E.W., Broach J.R., C.S.H.
- HILL B., 1986.
Viral diseases.
In "Pathology of marine species reared in the mediterranean" Ed. Bruno A., Medrap publication, p. 74-99.
- HINO A. and HIRANO R., 1980.
Relationship between body size of the rotifer Brachionus plicatilis and the maximum size of particles ingested.
Bull. Jap. Soc. Fish., 46, p. 1217-1222.
- HINO A. and HIRANO R., 1984a.
Relation between body size of the rotifer Brachionus plicatilis and the minimum size of particles ingested.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 50 (7), p. 1139-1144.
- HINO A. and HIRANO R., 1984b.
Relation between water temperature and bisexual reproduction rate in the rotifer Brachionus plicatilis.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 50 (9), p. 1481-1485.
- HIRATA H., 1974.
An attempt to apply an experimental microcosm for the mass culture of marine rotifer Brachionus plicatilis.
Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ. 23, p. 163-172.
- HIRATA H., 1979.
Rotifer culture in Japan.
Spec. Publ. Europ. Maricult. Soc., 4, p. 361-388.
- HIRATA H., 1980.
Culture methods of the marine rotifer Brachionus plicatilis.
Min. Rev. Data File Fish. Res., 1, p. 27-46.
- HIRATA H., YAMASAKI S., KAWAGUCHI T. and OGAWA M., 1983.
Continuous culture of the rotifer Brachionus plicatilis fed recycled algal diets.
Hydrobiologia, 104, p. 71-75.
- HIRAYAMA K. and KUSANO T., 1972.
Fundamental studies on physiology of rotifer for its mass culture. II. Influence of water temperature on population growth of rotifer.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 38, p. 1357-1363.

- HIRAYAMA K. and WATANABE K., 1973.
Fundamental studies on physiology of rotifer for its mass culture. IV. Nutritional effect of yeast on population growth of rotifer.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 39 (11), p. 1129-1133.
- HIRAYAMA K. and NAKAMURA K., 1976.
Fundamental studies on the physiology of rotifers in mass culture. V. Dry Chlorella powder as a food for rotifers.
Aquaculture, 8, p. 301-307.
- HIRAYAMA K., TAKAGI K. and KIMURA H., 1979.
Nutritional effect of eight species of marine phytoplankton on population growth of the rotifer Brachionus plicatilis.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 45, p. 11-16.
- HIRAYAMA K. and YU J.-P., 1985.
A consideration of why mass culture of the rotifer Brachionus plicatilis with baker's yeast is unstable.
Abstract of the IVth international rotifer symposium, 19 - 24 August 1985, Scotland.
- HOUDE E.D. and RAMSAY A.J., 1971.
A culture system for marine fish larvae.
Progr. Fish Cult., vol. 33, no 3, p. 156-157.
- HOWELL B.R., 1973.
Marine fish culture in Britain. VIII. A marine rotifer Brachionus plicatilis Müller, and the larvae of the mussel Mytilus edulis L. as foods for larval flatfish. J. Cons. Int. Explor. Mer, 35, p. 1-6.
- HUET M., 1979.
Textbook of fish culture, Breeding and cultivation of fish.
Fishing News Books Ltd, Farnham, England, pp. 436.
- HUNTER J.R. and SANCHEZ C., 1976.
Diel changes in swim bladder inflation of the larvae of the northern anchovy, Engraulis mordax.
Fishery Bulletin, 74, 4, p. 847-848.
- IIZAWA M., 1984.
Corrélations entre la densité de proies et la quantité consommée par les larves du loup Dicentrarchus labrax (L.).
In: Aquaculture des Bar et des Sparidés, Barnabé G. and Billard R. (Ed.), INRA publ., Paris, p. 161-173.
- ITO T., 1960.
On the culture of the mixohaline rotifer Brachionus plicatilis O.F. Müller in seawater.
Rep. Fac. Fish. Pref. unif. Mie 3, p. 708-740.

JAMES C.M., BOU-ABBAS M., AL-KHARS A.M., AL-HINTY S. and SALMAN A.E., 1983.

Production of the rotifer Brachionus plicatilis for aquaculture in Kuwait.

Hydrobiologia 104, p. 77-84.

JERLOV N.G., 1966.

Aspects of light measurement in the sea.

In "Light as an ecological factor", p. 91-98, Ed. R. Bainbridge, G.C. Evans, O. Rackham, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 452.

JOHNSON D.W. and KATAVIC I., 1986.

Survival and growth of sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae as influenced by temperature, salinity, and delayed initial feeding.

Aquaculture, 52, 11-19

JOHNSON D.W. and KATAVIC I., 1984.

Mortality, growth and swimbladder stress syndrome of sea bass (Dicentrarchus labrax L.) larvae under varied environmental conditions.

Aquaculture 38, p. 67-78.

JONES A., 1972.

Studies on egg development and larval rearing of turbot, Scophthalmus maximus L., and brill, Scophthalmus rhombus L., in the laboratory.

J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 52 (4), p. 965-968.

JONES A. and HOUDE E.D., 1987.

Mass rearing of fish fry for aquaculture.

In: "Realism in aquaculture", p. 351-373, Eds. Bilio M., Rosenthal H. and Sindermann C.J., I.S.B.N., pp. 585.

JUARJO J.V. and STORCH V., 1984.

Biological evaluation of phytoplankton (Chlorella sp., Tetraselmis sp. and Isochrysis galbana) as food for milkfish (Chanos chanos) fry.

Aquaculture 40, 193-198.

KADMON G., YARON Z. and GORDIN H., 1985.

Sequence of gonadal events and oestradiol levels in Sparus auratus L. under two photoperiod regimes.

J. Fish Biol., 26, p. 609-620.

KAHAN D. and APPEL Z., 1975.

The value of Panagrellus sp. (Nematoda) as food for fish.

Proceedings of the 10th European Symposium on Marine Biology, Ostend, Belgium, Sept. 17-23, G. Persoone and E. Jaspers (Eds.), Universa Press, Wetteren, Belgium, Vol. 1, p. 243-254.

- KAHAN D., RIGBI M. and OLAND B., 1980.
Free-living nematodes as a dietary supplement in the rearing of fish fry in hatcheries.
FAO report, 1980, Aspects of brackishwater fish and crustacean culture in the mediterranean.
- KAITARANTA J.K., LINKO R.R. and VUORELA R., 1986.
Lipids and fatty acids in plankton from the finnish coastal waters of the baltic sea.
Comp. Biochem. Physiol., 85B, 2, p. 427-433.
- KANAZAWA A., 1985.
Essential fatty acid and lipid requirement of fish.
In: Nutrition and Feeding in Fish, Academic Press London, p. 281-298
- KANAZAWA A., TESHIMA S., INAMORI S., SUMIDA S. and IWASHITA T., 1982.
Rearing of larval red seabream and ayu with artificial diets.
Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ., 31, p. 185-192.
- KATAVIC I., 1986.
Diet involvement in mass mortality of sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae.
Aquaculture, 58, p. 45-54.
- KENTOURI M., 1981.
Données préliminaires sur les facultés d'adaptation a un aliment inerte (Zooplankton congelé) des post-larves de 11 espèces de poissons et crustace marins.
Aquaculture 23, p. 73-82.
- KENTOURI M., DIVANACH P., BATIQUE O. and ANTHOUARD M., 1986.
Role des individus conditionnes dans l'initiation a l'auto-nourrissage et dans l'adaptation a la captivité du loup ,Dicentrarchus labrax L., O+ sauvage, en periode hivernale.
Aquaculture 52, p. 117-124.
- KING E.C. and MIRACLE M.R., 1980.
A perspective on aging in rotifers.
Hydrobiologia, 73 (1-3), p. 13-19.
- KINNE O., 1977.
Marine ecology. Vol. 3: Cultivation.
Wiley & sons, New York, 1293 pp.
- KINNE O., 1984.
Pathobiology of the stress response: fish diseases.
In "Diseases of marine animals", Vol. IV, part I, p. 428-431, Ed. Kinne O., pp. 540.

KITAJIMA C., 1987.

Fry producing techniques of red sea bream, Pagrus major, in Japan.

In: "Production in marine hatcheries", MEDRAP, Ed. B. LOIX, p. 272-301.

KITAJIMA C., FUJITA S., OHWA F., YONE Y. and WATANABE T., 1979.

Improvement of dietary value for red sea bream larvae of rotifers Brachionus plicatilis cultured with baker's yeast Saccharomyces cerevisiae.

Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 45 (4), p. 469-471.

KITAJIMA C., TSUKASHIMA Y., FUJITA S., WATANABE T. and YONE Y., 1981.

Relationship between uninflated swimbladders and lordotic deformity in hatchery-reared red sea bream Pagrus major.

Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 47 (10), p. 1289-1294.

KITAJIMA C., TSUKASHIMA Y. and TANAKA M., 1985.

The voluminal changes of swim bladder of larval red sea bream Pagrus major

Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 51 (5), p. 759-764.

KITTAKA J., 1977.

Rotifer, Brachionus plicatilis, as food for larvae of shrimp and fish. Paper submitted at the Poland Conference on Aquaculture, Sept. 1977, Sygmbark, Poland.

KLAUDATOS S. and APOSTOLOPOULOS J., 1986.

Food intake, growth, maintenance and food conversion efficiency in the gilthead sea bream (Sparus auratus).

Aquaculture 51, p. 217-224.

KOLB F.H., 1984.

De zwemblaas.

OVB rapport, 1984.

KUHN E.R., CORNEILLIE S. and OLLEVIER F., 1986.

Circadian variations in plasma osmolality, electrolytes, glucose and cortisol in Carp (Cyprinus carpio).

Gen. and Comp. Endocrinology, 61, 459-468

LAGOS P.J., 1987.

Economic performance at Cephalonia.

Fish Farmer, November/December, 24-26

LAGOS P.J., 1987.

An integrated marine fish farm in Cephalonia Greece: an analysis and evaluation of economic performance.

Proceedings of the EAS-conference, 2-5 June 1987, Amsterdam

LASKER R., FEDER H., THEILACKER G. and MAY R., 1970.
Feeding, growth, and survival of Engraulis mordax larvae
reared in the laboratory.
Marine Biology 5, p. 345-353.

LAVENS P., BAERT P., DE MEULEMEESTER A., VAN BALLAER E. and
SORGELOOS P., 1985.
New developments in the high density flow-through culturing
of brine shrimp, Artemia
J. World Maricult. Soc. 16: p. 498-508

LAVENS P., LEGER P. and SORGELOOS P., 1986.
Production, utilization and manipulation of Artemia as food
source for shrimp and fish larvae.
Océanis, Vol. 12, Fasc. 4, p. 229-247.

LAUFF M. and HOFER R., 1984.
Proteolytic enzymes in fish development and the importance
of dietary enzymes.
Aquaculture, 37, p.335-346.

LEGER P. and SORGELOOS P., 1984.
International study on Artemia XXIX. Nutritional evaluation
of Artemia nauplii from different geographical origin for
the marine crustacean Mysidopsis bahia.
Marine Ecology Progress Series 15: 307-309

LEGER P., NAESSENS-FOUCQUAERT E. and 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.
In: Artemia Research and its Applications. 1987, Vol. 3.
Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Eds: P. Sorgeloos,
D.A. Bengtson, W. Decleir and E. Jaspers; Universa Press,
Wetteren, Belgium

LEGER P., BIEBER J. and SORGELOOS P., 1985.
International study on Artemia XXXIII. Promising results in
larval rearing of Penaeus Stylirostris using a prepared diet
as algal substitute and for Artemia enrichment.
J. of World Maricul. Soc., vol. 16, p. 354-367

LEGER P., BENGTON 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, p.521-623.

LEHNINGER A.L., 1982.
Biochemistry.
Worth Publishers Inc., New York, pp. 1105.

LINCOLN E.P., HALL T.W. and KOOPMAN B., 1983.
Zooplankton control in mass algal cultures.
Aquaculture, 32, p. 331-337.

- LINKO R.R., J.K. KAITARANTA and R. VUORELA, 1985.
Comparison of the fatty acids in baltic herring and available plankton feed.
Comp. Biochem. Physiol., Vol. 82B, No. 4, p. 699-705
- LISAC D., FRANICEVIC V., VEJMEKKA Z., BUBLE J., LEGER PH., and SORGELOOS P., 1986.
International study on Artemia: effect of live food fatty acid content on growth and survival of seabream (Sparus auratus) larvae.
In book of abstract of the international symposium "Ichthyopathology in aquaculture", Dubrovnik, October 21-24 1986
- LUBZENS E., 1985.
Raising rotifers for use in aquaculture.
Paper given at the IVth Rotifer Symposium, Edinburgh, Scotland, Aug. 1985.
- LUBZENS E., MINKOFF G. and MAROM S., 1985
Salinity dependence of sexual and asexual reproduction in the rotifer Brachionus plicatilis.
Mar. Biol., 85, p. 123-126.
- LUBZENS E., ROTHBARD S., BLUMENTHAL A., KOLODNY G., PERRY B., OLUND B., WAX Y. and FARBSTEN H., 1987.
Possible use of Brachionus plicatilis (O.F. Müller) as food for freshwater cyprinid larvae.
Aquaculture, 60, p. 143-155.
- LUCET PH., 1983.
Quelles perspectives en Méditerranée.
La pêche maritime, Février 1983, p. 79-82
- MACE G., 1988.
Marine fish in Europe, present and future.
Fish Farmer, July-August.
- MANGOR-JENSEN A., 1988
Domestication of atlantic halibut.
Joint Workshop I.C.E.S./E.I.F.A.C. "Mass rearing of fish fry for aquaculture" , June 6-9, Vigo, Spain.
- MAUREL P., 1984.
Les circuits fermés en aquaculture: technologies et domaines d'application.
In: Aquaculture du Bar et des Sparidés. p. 251-276, Ed. Barnabé G. & Billard R.; I.N.R.A. publ., Paris, 1984
- MAY R.C., 1971.
An annotated bibliography of attempts to rear the larvae of marine fishes in the laboratory.
NOAA technical report NMFS SSRF-632, 26 p.

MCCORMICK S., SAUNDERS R., HENDERSON E. and HARMAN P., 1987.
Photoperiod control of parr-smolt transformation in Atlantic salmon (*Salmo salar*): changes in salinity tolerance, gill Na^+ - K^+ -ATPase activity, and plasma thyroid hormones.
Can. J. of Fisheries and Aquatic Sciences., 44 (8), p. 1462-1468.

MENU B., 1987
Larval rearing, weaning and first fattening of sole and turbot.
In: "Production in marine hatcheries"; p. 256-301; MEDRAP publication, 1987, Ed. B. Loix, 385 pp.

METAILLER R., CADENA-ROA M. and PERSON-LE RUYET J., 1983.
Attractive chemical substances for the weaning of dover sole (*Solea vulgaris*): qualitative and quantitative approach.
J. World Maricul. Soc. 14: p. 679-684.

MOK T.K., 1985.
Induced spawning and larval rearing of the white seabream, *Mylio berda*.
Aquaculture 44, p. 41-49.

MOLLER H. and ANDERS K., 1986.
Diseases and parasites of marine fishes.
Kiel, Möller, pp. 365

MOLLO P. and TUDESQ M., 1984.
Etude sur cultures d'algues en milieu stérile.
Rapport de l'Unité Pilote de l'E.A.M. et Conchylicole "Paul Bousquet". 34 pp.

NASH C.E., 1977.
The breeding and cultivation of marine fish species for mariculture.
3e Meeting of the ICES Working Group on Mariculture, Brest, May 10-13, Actes des Colloques du CNEXO, 4: 1-10

NASH C.E. and KUO C., 1975.
Hypothesis for problems impeding the mass propagation of grey mullet and other finfish.
Aquaculture, 5: 119-133

NASH C.E., KUO C-M., MADDEN W.D. and PAULSEN C.L., 1977.
Swim bladder inflation and survival of *Muqil cephalus* to 50 days.
Aquaculture 12, p. 89-94.

NEW M., INSULL D., E. RUCKES and M. SPAGNOLO, 1987.
The markets for the prime mediterranean species - sea bass, sea bream, mullets and eel - and their links with investment.
ADCP/MEDRAP Workshop, ESAV, 9-11 December 1986, 46 p.

NICOLAS J.L., 1988.

Bacteria associated with cultures in hatchery: influence on the performances, new methods of control.
Joint Workshop I.C.E.S./E.I.F.A.C. "Mass rearing of fish fry for aquaculture", June 6-9, Vigo, Spain.

ODUM E.P., 1971.

Fundamentals of ecology.

W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 574.

OKAUCHI M.T., OSHIRO S., KITAMURA A., TSUJIGADO A. and FUKUSHO K., 1980.

Numbers of rotifers, Brachionus plicatilis, consumed daily by a larvae and juvenile of porgy, Acanthopagrus schlegelii.
Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult., 1, p. 39-45.

OLESEN J., 1986.

Will sea bass and giltheads share turbot's potential?
Fish farmer, p. 18-20.

OLESEN J.O. and MINCK F., 1983.

A technical solution to the mass-culturing of larval turbot Scophthalmus maximus L. .
Aquacultural engeneering 2: 1-12

OLSEN Y., RODRIQUEZ J. and VADSTEIN O., 1987.

Changes in fatty acids and total lipid content in Brachionus plicatilis upon changes in diet and starvation.
I.C.E.S. Working group on mass rearing of juveniles marine fish. IFREMER, Brest, 24-26 June 1987.

OWEN J.M., ADRON J.W., SARGENT J.R. and COWEY C.B., 1972.

Studies on the nutrition of marine flatfish. The effect of dietary fatty acids on the tissue fatty-acids of the plaice Pleuronectes platessa.
Mar. Biol., 13, p. 160-166.

OWEN J.M., ADRON J.W., MIDDLETON C. and COWEY C.B., 1975.

Elongation and desaturation of dietary fatty acids in turbot Scophthalmus maximus L. and rainbow trout, Salmo gairdnerii Rich.
Lipids, 10, 9, p. 528-531.

PAPERNA I., 1978.

Swimbladder and skeletal deformations in hatchery bred Sparus aurata.
J. Fish Biol. 12, p. 109-114.

PARSONS T.R., STEPHENS K. and STRICKLAND J.D.H., 1961.

On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters.
J. Fish. Res. Bd. Canada, 18 (6).

PERSON-LE RUYET J., 1976.

Techniques d'élevage en masse d'un rotifère (Brachionus plicatilis Müller) et d'un crustacé (Artemia salina L.).
Proceedings of the 10th European Symposium on Marine Biology, Ostend, Belgium, Sept. 17-23, G. Persoone and E. Jaspers (Eds.), Universa Press, Wetteren, Belgium, Vol. 1, p. 171-188.

PERSON-LE RUYET J., 1987.

L'élevage des poissons marins en éclosérie: données de base et tendances actuelles.
Océanis, Vol. 13, Fasc. 1, p. 5-23

PERSON-LE RUYET J. and BEDIER E., 1984.

La production de juvéniles de poissons marins en éclosérie.
La pêche maritime, avril 84, p. 215-222.

PERSON-LE RUYET J. and GUILLAUME J., 1988.

Early weaning of sea bass larvae, Dicentrarchus labrax L. with microparticles.
Rapport of the joint workshop I.C.E.S./EIFAC on "Mass rearing of fish fry for Aquaculture", Vigo, Spain, 6-8 June 1988.

PIONETTI J.M., DUCIEL C. and VERINI J.J., 1983.

La consommation d'oxygène au cours du développement embryonnaire du loup Dicentrarchus labrax L..
Oceanis, vol. 9, Fasc. 3, p. 219-224

PONTICELLI A., 1987.

Microorganisms used in aquaculture. The natural zooplankton yield.

In: "Production in marine hatcheries"; p. 115-130; MEDRAP publication, 1987, Ed. B. Loix, 385 pp.

RE P., ROSA C., DINIS M., 1985.

Diel rhythms in Dicentrarchus labrax (L., 1758) larvae under controlled conditions: swim bladder inflation, feeding and otolith growth.

Inv. Pesq. 49 (3), p. 411-418.

REGUERA B., SOLA E. and FERNANDEZ-PATO C., 1982.

The production of ammonia in mass cultures of the rotifer, Brachionus plicatilis O.F. Müller, feeding on bread yeast.
I.C.E.S., C.M., F: 18., pp. 12.

ROBIN J.H., 1982.

Comparaison de deux méthodes d'amélioration de la valeur alimentaire d' Artemia salina pour nourrir des larves de bar (Dicentrarchus labrax L.)
Conseil International pour l'exploration de la mer C.M.
1982/F: 13, 11 p.

ROBIN J.H., 1984.

II. Elevages annexes: Algues.
Rapport interne de C.O.B., pp. 16.

ROBIN J.H., 1987.

The quality of living preys for larval fish culture: preliminary results on mineral supplementation.
In the book of abstracts of the European Aquaculture Conference, 2-5 June 1987, Amsterdam, The Netherlands.

ROBIN J.H., GATESOUBE F.J. and RICARDEZ R., 1981.

Production of brine shrimp (Artemia salina), using mixed diet: consequences on rearing of sea bass larvae (Dicentrarchus labrax L.).

J. Word Maricult. Soc. 12 (2): p. 119-120

ROZAND P., 1972.

Induced spawning of gilt-head bream and sea bass.
FAO Aquaculture Bulletin 4(3), p. 3.

RUTTNER-KOLISKO A., 1972.

Der Einfluss von Temperatur und Salzgehalt des Mediums auf Stoffwechsel- und Vermehrungsintensität von Brachionus plicatilis (Rotatoria).

Dt. Zool. Ges., 65, p. 89-95.

SAKAMOTO M., HOLLAND D.L. and JONES D.A., 1982.

Modification of the nutritional composition of Artemia by incorporation of poly-unsaturated fatty acids using micro-encapsulated diets.

Aquaculture, 28, p. 311-320.

SCHAUER P.S., JOHNS D.M., OLNEY C.C. and SIMPSON K.L., 1980.

International study of Artemia IX. Lipid level, energy content and fatty acid composition of the cysts and newly hatched nauplii from five geographical strains of Artemia.

In: G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers (Editors), The brine shrimp Artemia, Vol. 3, Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Universa Press, Wetteren, Belgium, p. 365-374.

SCHLUTER M. and GROENEWEG J., 1981.

Mass production of freshwater rotifers on liquid wastes. II. Mass production of Brachionus rubens Ehrenberg 1838 in the effluent of high-rate algal ponds used for the treatment of piggy waste.

Aquaculture 25, p. 25-33.

SCHLUTER M. and GROENEWEG J., 1985.

The inhibition by ammonia of population growth of the rotifer, Brachionus rubens, in continuous culture.

Aquaculture 46, p. 215-220.

- SCOTT A.P. and BAYNES S.M., 1978.
Effect of algal diet and temperature on the biochemical composition of the rotifer, Brachionus plicatilis.
Aquaculture, 14, p. 247-260.
- Seale A., 1933.
The brine shrimp (Artemia) as a satisfactory live food for fishes.
Am. Fish. Soc., 63, p. 129-130.
- SHARMA B.K., 1979.
Rotifers from West Bengal. III Further studies on the Eurotatoria.
Hydrobiologia, 64 (3), p. 244-256.
- SHELBOURNE J.E., 1956.
The abnormal development of plaice embryos and larvae in marine aquaria.
J. Mar. Biol. Ass. U.K. 35, p. 177-192.
- SHEPPARD A.J., HUBBARD W.D. and PROSSER A.R., 1974.
Evaluation of eight extraction methods and their effects upon total fat and gas liquid chromatographic fatty acid composition analyses of food products.
Journal of the American Oil Chemists' Society, 51, p. 416-418.
- SIDDALL S.E., 1979.
The culture of marine fish larvae.
Aquarium Nov. 1979, p. 31-82.
- SLOBIN L.I. and MOLLER W., 1976.
Characterization of developmentally regulated forms of elongation factor 1 in Artemia salina. I. Purification and structural properties of the enzymes.
Eur. Journ. Bioch., 69 (1), p. 351-366.
- SNELL T.W., BIEBERICH C.J. and FUERST R., 1983.
The effects of green and blue-green algal diets on the reproductive rate of the rotifer Brachionus plicatilis.
Aquaculture, 31, p. 21-30.
- SNELL T.W. and CARRILLO K., 1984.
Body size variation among strains of the rotifer Brachionus plicatilis.
Aquaculture, 37, p. 359-367.
- SORGELOOS P., 1979.
Het gebruik van het pekelkreeftje Artemia spec. in de aquakultuur.
Aggregatie-proefschrift, pp. 319.

SORGELOOS P. and PERSOONE, 1975a.

Technological improvements for the cultivation of invertebrates as food for fishes and crustaceans. II.

Hatching and culturing of the brine shrimp,

Artemia salina L.

Aquaculture, 6, p. 303-317.

SORGELOOS P., BAEZA-MESA M., BENIJTS F. and PERSOONE G., 1975b.

Research on the culture of the brine shrimp Artemia salina L. at the State University of Ghent (Belgium).

Proceedings of the 10th European Symposium on Marine Biology, Ostend, Belgium, Sept 17-23, Vol. 1, p. 473-495.

SORGELOOS P., BOSSUYT E., LAVINA E., BAEZA-MESA M. and PERSOONE G., 1977.

Decapsulation of Artemia cysts: a simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture.

Aquaculture, 12, p. 311-315.

SORGELOOS P., REMICHE-VAN DER WIELEN C. and PERSOONE G., 1978.

The use of Artemia nauplii for toxicity tests-a critical analysis.

Ecotoxicology and Environmental Safety, 2, p. 249-255.

SORGELOOS P., BAEZA-MESA M., BOSSUYT E., BRUGGEMAN E., DOBBELEIR J., VERSICHELE D., LAVINA E., and BERNARDINO A., 1977.

Culture of Artemia on rice bran: the conversion of a waste-product into highly nutritive animal protein.

Aquaculture, 21, p. 393-396.

SORGELOOS P., BOSSUYT E., LAVENS P., LEGER P., VANHAECKE P. and VERSICHELE D., 1982.

The use of brine shrimp Artemia in crustacean hatcheries and nurseries.

In: CRC Handbook of Mariculture, Vol. I Crustacean aquaculture, Mc VEY J.P. (Ed.); CRC Press, Inc.; Boca Raton, Florida; p. 71-95.

SPECTOROVA L.V. and DOROSHEV S.Q.I., 1976.

Experiments on the artificial rearing of the black sea turbot (Scophthalmus maeoticus maeoticus).

Aquaculture 9, p. 275-286.

STEPHENS E.B., NEWMAN M.W., ZACHARY A.L. and HETRICK, 1980.

A viral aetiology for the annual spring epizootics of atlantic menhaden Brevoortia tyrannus (Latrobe) in Chesapeake Bay.

J. Fish Diseases, 3, p. 387-398.

SUZUKI H., OKAZAKI K., HAYAKAWA S., WADA S. and TAMURU S., 1986.

Influence of commercial dietary fatty acids on polyunsaturated fatty acids of cultured freshwater fish and comparison with those of wild fish of the same species.

J. Agric. Food Chem., 34, p. 58-60

SWEETMAN J., 1988.

The use of modern reproduction technologies in the production of juveniles of the species Sparus auratus and Dicentrarchus labrax.

Council of Europe, "Biological and technical aspects of modern aquaculture"; 22-29 february 1988; Viterbo and Motta di Livenza, Italy.

TAIT J.S., 1960.

The first filling of the swimbladder in salmonids.

Can. J. Zool., 38, p. 179-187.

TAKAKUWA M. and WATANABE Y., 1980.

Degradation of phospholipids in cell membrane during storage of pressed baker's yeast.

In "Proceedings of the fifth Int. Yeast Symp.", London, Canada, 20-25 July 1980.

TANDLER A. and HELPS S., 1985.

The effects of photoperiod and water exchange rate on growth and survival of gilthead sea bream (Sparus aurata, Linnaeus; Sparidae) from hatching to metamorphosis in mass rearing systems.

Aquaculture 48, p. 71-82.

THEILACKER G.H. and McMASTER M.F., 1971.

Mass culture of the rotifer Brachionus plicatilis and its evaluation as a food for larval anchovies.

Marine Biology 10, p. 183-188.

TIXERANT G., 1986.

Mediterranean fish diseases.

In "Pathology of marine species reared in the mediterranean"

Ed. Bruno A., Medrap publication, p. 225

TOCHER D.R. and SARGENT J.R., 1984.

Analyses of lipids and fatty acids in ripe roes of some northwest European marine fish.

Lipids, 19, no. 7, p. 492-499

TOCHER D.R., FRASER A.J., SARGENT J.R. and GAMBLE J.C., 1985a.

Fatty acid composition of phospholipids and neutral lipids during embryonic and early larval development in Atlantic herring (Clupea harengus, L.).

Lipids, 20, no. 2, p. 69-74

TOCHER D.R., FRASER A.J., SARGENT J.R. and GAMBLE J.C., 1985b.

Lipid class composition during embryonic and early larval development in Atlantic herring (Clupea harengus, L.).
Lipids, 20, 2, p. 84-89.

TROTTA P., 1983.

An indoor solution for mass production of the marine rotifer Brachionus plicatilis Müller fed on the marine microalgae Tetraselmis suecica
Aquacultural Engineering, 2, p. 93-100.

VAN BALLAER E., AMAT F., HONTORIA F., LEGER P. and SORGELOOS P., 1985.

Preliminary results on the nutritional evaluation of w3-HUFA-enriched Artemia nauplii for larvae of the sea bass, Dicentrarchus labrax.
Aquaculture, 49, p. 223-229

VANHAECKE P. and SORGELOOS P., 1980.

International study on Artemia. IV. The biometrics of Artemia strains from different geographical origin. In: G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers (Eds.); The brine shrimp Artemia. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 393-405.

VANHAECKE P. and SORGELOOS P., 1983.

International study on Artemia. XIX. Hatching data for ten commercial sources of brine shrimp cysts and re-evaluation of the "hatching efficiency" concept.
Aquaculture, 30, p. 43-52.

VAN WORMHOUDT A. and CECCALDI H.J., 1975.

Influence de la qualité de la lumière en élevage intensif de Palaemon serratus Pennant.
Proceedings of the 10th European Symposium on Marine Biology, Ostend, Belgium, Sept. 17-23, G. Persoone and E. Jaspers (Eds.), Universa Press, Wetteren, Belgium, Vol. 1, p. 505-521.

VERDONCK W., BELPAIRE C., TOPS A. and OLLEVIER F., 1986.

Mogelijkheden voor commerciële viskweek in thermische brakwatereffluenten.
Water 27, p. 37-40

VERSUGHT J., 1988.

Kwantitatieve en kwalitatieve analyse van bacteriën in een marien opkweekstelsel voor zeebaarslarven (Dicentrarchus labrax L.).
Eindverhandeling K.I.H. De Nayer, Mechelen, pp. 89.

VILLANI P., 1976.

Ponte induite et élevage des larves de poissons marins dans les conditions de laboratoire.

F.A.O., Studies and reviews n° 55; "Ponte contrôlée et élevage des larves d'espèces marines sélectionnées de la méditerranée", p. 117-133.

VU T.T., 1983.

A histoenzymological study of protease activities in the digestive tract of larvae and adults of sea bass,

Dicentrarchus labrax L.

Aquaculture, 32, p. 57-69.

WALFORD J. and LAM T.J., 1987.

Effects of feeding with microcapsules on the content of essential fatty acids in live foods for the larvae of marine fishes.

Aquaculture 61, p. 219-229.

WATANABE T., 1982.

Lipid nutrition in fish.

Comp. Biochem. Physiol., Vol 73B, no 1, p. 3-15

WATANABE T., ARAKAWA T., KITAJIMA C., FUKUSHO K. and

FUJITA S., 1978.

Nutritional quality of living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish.

Bull. Jap. Soc. Scient. Fisheries, 44 (11), p. 1223-1227.

WATANABE T., OOWA F., KITAJIMA C., FUJITA S. and Yone Y., 1979.

Relationship between the dietary value of rotifers Brachionus plicatilis and their content of n3 highly unsaturated fatty acids.

Bull. Jap. Soc. Scient. Fisheries, 45 (7), p. 883-889.

WATANABE T., OOWA F., KITAJIMA C., and FUJITA S., 1980.

Relationship between dietary value of brine shrimp Artemia salina and their content of w3 highly unsaturated fatty acids.

Bull. Jap. Soc. Scient. Fisheries, 46 (1), p. 35-41.

WATANABE T., OHTA M., KITAJIMA C., and FUJITA S., 1982.

Improvement of the dietary value of brine shrimp Artemia salina for fish larvae by feeding them on w3 highly unsaturated fatty acids.

Bull. Jap. Soc. Scient. Fisheries, 48 (12), p. 1775-1782.

WATANABE T., TAMIYA T., OKA A., HIRATA M., KITAJIMA C., and FUJITA S., 1983a.

Improvement of dietary value of live foods for fish larvae by feeding them on 3 highly unsaturated fatty acids and fat-soluble vitamins.

Bull. Jap. Soc. Scient. Fisheries, 49 (3), p. 471-479.

- WATANABE T., KITAJIMA C., and FUJITA S., 1983b.
Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review.
Aquaculture 34, p. 115-143.
- WEPPE M. and BONAMI J.R., 1984.
Non-inflation of the swimbladder in hatchery-reared sea bass and sea bream: a significant problem in marine aquaculture.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 3(4), p. 59-60.
- WEPPE M. and JOASSARD L., 1986.
Preliminary study: effects of light on swimbladder's inflation of cultured seabass ((Dicentrarchus labrax L.) larvae.
In Proceedings of the first international colloquium on Pathology in marine aquaculture, Eds. Vivarès C.P., Bonami J.-R. and Jaspers E., European Aquaculture Society, Special Publication No. 9, Bredene, Belgium.
- WITT U., QUANTZ G. and KUHLMANN D., 1984.
Survival and growth of turbot larvae Scophthalmus maximus L. reared on different food organisms with special regard to long-chain polyunsaturated fatty acids.
Aquacultural Engineering 3, p. 177-190.
- YAMASAKI S. T., NISHIHARA T. and HIRATA H., 1984.
Influence of marine Chlorella density on food consumption and growth rate of rotifer, Brachionus plicatilis.
Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ., 33, p. 57-61.
- YUFERA M., 1982.
Morphometric characterization of a small-sized strain of Brachionus plicatilis in culture.
Aquaculture, 27 (1), p. 55-63.
- ZANUY S. and CARRILLO M., 1985.
Annual cycles of growth, feeding rate, gross conversion efficiency and hematocrit levels of sea bass (Dicentrarchus labrax L.) adapted to two different osmotic media.
Aquaculture, 44, p. 11-25.

