



**RIJKSUNIVERSITEIT GENT**

**FACULTEIT VAN DE LANDBOUWWETENSCHAPPEN**

**Centrum voor Artemia - Onderzoek**

---

**Academiejaar 1988 - 1989**

**INTENSIEVE PRODUCTIE EN KWALITEITSONDERZOEK  
VAN ARTEMIA ADULTEN EN HUN NAKOMELINGEN**

door

**Patrick Lavens**

Proefschrift voorgedragen tot het bekomen van de graad van

Doctor in de Landbouwkundige Wetenschappen

op het gezag van

Rector Prof. Dr. L. DE MEYER

Decaan :  
Prof. Dr. Ir. F. PAUWELS

Promotor :  
Prof. Dr. G. PERSOONE

Co-Promotor :  
Prof. Dr. P. SORGeloos

opgedragen  
in dank  
aan mijn ouders

## DANKWOORD

Bij het voorleggen van dit proefschrift is het mij een aangename taak om alle mensen en instanties te danken die bijgedragen hebben tot het welslagen van deze studie :

Prof. Dr. Ir. F. Pauwels, Decaan van de Faculteit Landbouwwetenschappen, voor de mogelijkheid deze verhandeling te verdedigen aan zijn faculteit.

mijn promotors Prof. Dr. G. Persoone en Prof. Dr. P. Sorgeloos voor alle faciliteiten die mij verleend werden om dit proefschrift te realiseren in het Centrum voor Artemia-onderzoek en het Labo voor Maricultuur. Hun belangstelling tijdens het verloop van het onderzoek en vooral de talloze, wetenschappelijke discussies met Prof. Sorgeloos werden uitermate geapprecieerd.

mijn collega's, vrienden en laatstejaarsstudenten van het labo voor de aangename werksfeer en de prettige samenwerking. Zij hebben mij bijgebracht dat 'Team spirit' niet enkel in de sport maar ook in de wetenschap in belangrijke mate bijdraagt tot het bereiken van het beoogde doel.

het Instituut ter Bevordering van Wetenschappelijk Onderzoek in Nijverheid en Landbouw, Artemia Systems N.V., en het Algemeen Bestuur voor Ontwikkelingssamenwerking die het mogelijk maakten deze studie uit te voeren.

de verschillende mensen die instonden voor het eindeloze typ- en layout-werk waardoor deze versie tot stand kwam.

Patrick Lavens  
Gent, mei 1989

## INHOUDSTAFEL

- Lijst der tabellen
- Lijst der figuren
- Lijst der foto's

Hoofdstuk I : Inleiding	1
Hoofdstuk II : Biologische gegevens met betrekking tot <i>Artemia</i>	
II.1. Ontwikkeling, levenscyclus en voorkomen	9
II.2. Problematiek van de systematische classifikatie	17
Hoofdstuk III : Kweek van <i>Artemia</i> tot het preadulte stadium in een intensief kweekstelsel	
III.1. Literatuurstudie	21
III.1.1. Fysico-chemische kweekcondities	21
1. Temperatuur en saliniteit	21
2. Samenstelling van het teeltmedium	23
3. Zuurtegraad	24
4. Zuurstofgehalte	24
5. Waterkwaliteit	24
6. Licht	25
III.1.2. Voedingskarakteristieken	27
1. Morfologie van het filtreerapparaat	27
2. Filtratie-eigenschappen	30
3. Factoren die de voedselopname reguleren	31
Voedselconcentratie	31
Voedseltype	36
Ontwikkelingsstadium van <i>Artemia</i>	36
Niet-trofische omgevingscondities	37
4. Factoren die de assimilatie- efficiëntie regelen	38
5. Nutritionele behoeften	43
6. Geschikte <i>Artemia</i> diëten	45
Interferentie van microorganismen	46
Levende microalgen	47

Single Cell Proteins	48
Droge voeders op basis van bijprodukten van de landbouw	51
Microcapsules	52
III.1.3. Densiteit van <i>Artemia</i>	52
III.1.4. Keuze van geschikte <i>Artemia</i> rassen	52
III.1.5. Technologische aspecten van de massakweek van <i>Artemia</i>	53
Stagnerende teeltsystemen	55
Doorstroom-teeltsystemen	57
III.2. Ontwikkeling van een doorvloeï-kweekstelsel met recirculatie van het kweekwater	61
III.2.1. Doelstelling	61
III.2.2. Ontwerp van de doorvloeï- kweekeenheid	63
1. Kweektanks en watervoorziening	63
2. Voedseldistributie-systeem	69
3. Alarmsysteem	71
III.2.3. Ontwerp van de recirculatie-eenheid	71
1. Inleiding	71
2. Primaire zuivering	74
3. Secundaire zuivering	76
4. Desinfectie	81
5. Verversing	81
III.2.4. Het kweekmedium	82
1. Samenstelling	82
2. Zoutgehalte, temperatuur en pH	83
3. Waterkwaliteit	84
4. Zuurstofgehalte	87
III.3. Experimentele kweek	88
III.3.1. De kweekprocedure : algemene materialen en methoden	88
1. Ontluiting der cysten en incubatie der larven	88
2. Doorvloeï- en filterinstelling	90
3. Voeding	90
4. Afoogsting en verwerking van de geproduceerde <i>Artemia</i> biomassa	91
5. Onderhoud	92

6. Kwantitatieve bepaling van produktie-karakteristieken	92
7. Verwerking der produktiegegevens	94
III.3.2. Ontwikkeling van een basisdieet	94
III.3.3. kweekdensiteit	107
III.3.4. Raskeuze	109
III.3.5. Optimalisatie en standaardisatie van de kweekprocedure	113
1. Bestrijding van infecties	113
2. Afstelling van optimale debieten en voederregimes	118
3. Prognose van de populatie- karakteristieken	120
III.4. Gebruik van intensief geproduceerde <i>Artemia</i> juvenielen en adulten in de aquacultuur	123
 <b>Hoofdstuk IV : Gecontroleerde produktie van nakome- lingen in recirculatiesystemen</b>	
IV.1. Doelstellingen	133
IV.2. Literatuurstudie	136
IV.2.1. Voortplantingscyclus	136
IV.2.2. Ovovivipariteit versus ovipariteit	136
IV.2.3. Inductie van ovipariteit	141
IV.2.4. Kwantitatieve reproductiekenmerken	144
IV.3. Het kweekstelsel voor gecontroleerde cystenproduktie	149
IV.3.1. Algemene beschrijving en werking van de installatie	149
1. De kweekmodule	149
2. Het recirculatiesysteem	151
3. De kweekprocedure	153
4. Populatiekarakteristieken	156
IV.3.2. Adaptatie van de kweektechnologie voor het in stand houden van adulte populaties	157
IV.3.3. Inductie tot ovipariteit	161
1. Toedienen van voederstress	163
2. Toedienen van zuurstofstress gecombineerd met Fe-EDTA	164

IV.3.4.	Afoogsten en zuiveren der cysten	171
1.	Recuperatie der geproduceerde cysten	171
2.	Behandeling der geproduceerde cysten	173
IV.3.5.	Slotbemerkingen	176
IV.4.	Kweekprocedure voor gecontroleerde naupliiproduktie	179
IV.4.1.	Algemene methodiek	179
IV.4.2.	Resultaten en bespreking	180
IV.4.3.	Recuperatie der larven	182
IV.4.4.	Besluit	187
Hoofdstuk V : Karakterisatie van de kwaliteit van de nakomelingen		
V.1.	Materiaal en algemene methoden	189
V.1.1.	Cysten	189
V.1.2.	Ovovivipaar afgelegde nauplii	189
V.1.3.	Het test-medium : zeewater	192
V.1.4.	Incubatie van de cysten en oogst der nauplii	192
V.1.5.	Decapsulatie der cysten	193
V.1.6.	Voorstelling en statistische verwerking der gegevens	193
V.2.	Ontluikingskarakteristieken der cysten	195
V.2.1.	Literatuurstudie	195
1.	Inleiding	195
2.	Terminologie	196
3.	Cryptobiosis bij <i>Artemia</i>	197
4.	Ecologische significantie	201
5.	Mechanismen verantwoordelijk voor de inductie en/of het opheffen van de diapauze bij <i>Artemia</i>	202
6.	Factoren die de ontluikbaarheid beïnvloeden	204
a.	Invloeden vóór de afleg der cysten	205
b.	Effect van het milieu op afgelegde diapauze-cysten	207
c.	Effect van het milieu op quiëscente cysten	226

V.2.2. Materiaal en methoden	242
1. Onderzochte cystenmonsters	242
2. Specifieke behandelingen	242
3. Bepaling van het ontluikingspercentage	245
4. Verwerking van de resultaten	246
V.2.3. Resultaten en bespreking	247
1. Invloed van produktie-omstandigheden	249
2. Invloed van het produktietijdstip	253
3. Diapauze-desactiveringstechnieken	255
Effect van dehydratie	255
Effect van dehydratie/hydratatie-cycli	259
Invloed van stockeringsduur of aestivatie	259
Effect van U.V.-bestraling	262
Effect van hibernatie	263
Effect van peroxide	273
Effect van $KMnO_4$ en $NaOCl$	285
Gecombineerd effect van diapauze-desactiveringstechnieken	288
Invloed van anoxie	291
V.2.4. Algemene besluiten	292
V.3. Biometrische kenmerken van de cysten	298
V.3.1. Materiaal en methoden	298
V.3.2. Resultaten en bespreking	300
V.4. Biochemische samenstelling	310
V.4.1. Vetzuursamenstelling	310
1. Materiaal en methode	310
2. Resultaten en discussie	311
V.4.2. Aminozuursamenstelling	318
1. Materiaal en methode	318
2. Resultaten en bespreking	319
V.3.4. Koolhydraatsamenstelling	321
1. Materiaal en methode	321
2. Resultaten en bespreking	321
V.4.4. Pigmentsamenstelling	324
1. Materiaal en methode	324
2. Resultaten en discussie	324
V.5. De leefbaarheid van labo-geproduceerde nakomelingen	328
V.5.1. Materiaal en methoden	328



1. Uithongeringsproeven	328
2. Groeiproeven	329
3. Resistentieproeven	330
V.5.2. Resultaten en bespreking	332
1. Uithongeringsproeven	332
2. Standaard-groeiproef met <i>Dunaliella</i> als voedselbron	336
3. Temperatuur/saliniteitspreferenda	341
V.5.4. Conclusies	346
<b>Hoofdstuk VI : Algemene besluiten</b>	
1. Ontwikkeling van een doorstroom- techniek voor de kweek van preadulten	349
2. Ontwikkeling van een standaard systeem voor de gecontroleerde produktie van cysten	352
3. Ontwikkeling van een standaard systeem voor de gecontroleerde produktie van nauplii	354
4. Ontluikbaarheid en diapauze-desacti- vering van de geproduceerde cysten	355
5. Biometrische en biochemische karak- terisatie van de geproduceerde cysten en nauplii	357
6. Leefbaarheid van het geproduceerde broed	360
<b>Hoofdstuk VII : Samenvatting</b>	363
<b>Hoofdstuk VIII : Summary</b>	369
<b>Résumé</b>	374
<b>Literatuurlijst</b>	379

## LIJST DER TABELLEN

1. Wereld aquacultuurproduktie in 1985	1
2. Kenmerken van de ontwikkelingsstadia van <i>Artemia</i>	11
3. Samenstelling van enkele artificiële zeewaters geschikt voor <i>Artemia</i> kweek	22
4. Voedselopnamesnelheid en filtreersnelheid bij <i>Artemia</i>	34
5. Overzicht van literatuurgegevens in verband met bruto groei- en assimilatie-efficiëntie bij <i>Artemia</i>	39
6. Gehaltes aan essentiële aminozuren en vitamines in enkele SCP in vergelijking met tarwe, ei en de optimale waarden voorgesteld door FAO	49
7. Standaardkweekproef met SFB <i>Artemia</i> voor twee verschillende kweekmedia	83
8. Periodieke waterkwaliteitsmetingen van het kweekmedium onder standaard operationele omstandigheden	85
9. Specificaties van de gebruikte <i>Artemia</i> rassen	89
10. Samenstelling van de aangewende dieetcomponenten	96
11. Chronologisch overzicht van de uitgevoerde experimenten betreffende biomassa-productie in het doorvloeisysteem	98
12. Vergelijking van produktiekarakteristieken van GSL <i>Artemia</i> gekweekt op het Protibel-dieet bij verschillende doorzichtigheden en densiteiten	101
13. Produktiekarakteristieken van GSL populaties die voor een bepaalde startdensiteit aan <i>Artemia</i> een maximale biomassa-output opleverden	108
14. Produktiekarakteristieken voor twee <i>Artemia</i> rassen gevoed met de standaarddiëten in functie van twee startdensiteiten	110
15. Produktiekarakteristieken van diverse rassen gekweekt op het basisdieet PG-SP	112
16. Effect van H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - puntdosering op de gemiddelde overleving en infectiegraad van preadulte GSL <i>Artemia</i> na 7 dagen	116
17. "Colony Forming Units" van het influent- en effluentwater van de U.V.-filter	117

18. Standaardgegevens voor de kweek van <i>Artemia</i> onder doorvloei-omstandigheden	119
19. Biochemische samenstelling van intensief gekweekte preadulten in vergelijking met pas ontloken nauplii van het GSL ras	125
20. Vetzuur- en aminozuurprofiel van GSL preadulten, gekweekt in het recirculatiesysteem met PG-SP als standaardvoedsel	126
21. Overzicht van literatuurgegevens met betrekking tot het effect van labo-kweekomstandigheden op de inductie van ovipariteit bij <i>Artemia</i>	142
22. Overleving, reproductiekenmerken en kleur van LVD pekelkreeftjes in functie van dichtheid	154
23. Populatiekarakteristieken voor drie <i>Artemia</i> rassen, gekweekt onder verschillende voederregimes	158
24. Effect van voederstress op LVD populaties met verschillende dichtheiden	162
25. Effect van gecombineerde zuurstofstress en Fe-EDTA toevoeging op de reproductiekarakteristieken van diverse stadia van twee <i>Artemia</i> populaties	168
26. Reproductiewijze en hemoglobinesamenstelling bij LVD <i>Artemia</i> , gekweekt onder zuurstofstress-omstandigheden	169
27. Populatiekarakteristieken van GSL <i>Artemia</i> , gekweekt in het nauplii-productiesysteem onder verschillende concentraties en voederomstandigheden	181
28. Lijst van de bestudeerde <i>Artemia</i> nakomelingen geproduceerd onder specifieke labo-omstandigheden	190
29. Overzicht van literatuurgegevens met betrekking tot de ontluiking van <i>Artemia</i> cysten in functie van productieomstandigheden	208
30. Literatuuroverzicht van de technieken voor desactivering van de diapauze in cysten van Crustacea (andere dan <i>Artemia</i> ) en Rotifera; effect op ontluikingspercentage en -snelheid	212
31. Effect van diverse technieken voor ontwatering op de ontluikingkarakteristieken van <i>Artemia</i> cysten	216
32. Effect van verschillende dehydratie/hydratatiecycli op de ontluikbaarheid van <i>Artemia</i> cysten geproduceerd onder gecontroleerde omstandigheden	219

33. Literatuuroverzicht van de aangewende hibernatie-omstandigheden als diapauze-inhibitoren voor <i>Artemia</i> cysten afkomstig van diverse oorsprong	221
34. Mogelijke effecten van exploitatie-omstandigheden de ontluikingskwaliteit van <i>Artemia</i> cysten	228
35. Lijst en specificaties van de onderzochte <i>Artemia</i> cystenmonsters, geoogst uit (semi-)natuurlijke biotopen	243
36. Ontluikingskarakteristieken van de cystenmonsters, geproduceerd onder gecontroleerde omstandigheden en gedehydreerd volgens de standaardmethoden	248
37. Invloed van de saliniteit van <i>Artemia</i> kweekvijvers op de ontluiking der geproduceerde cysten	253
38. Effect van diverse drogingstechnieken op diapauze-desactivering van de geproduceerde cysten	256
39. Effect van dehydratie/hydratatie-cycli op de diapauze-desactivering van geproduceerde cysten	260
40. Invloed van stockeringsduur op de diapauze-desactivering van geproduceerde cysten	261
41. Effect van U.V.-bestraling op de ontluikbaarheid van geproduceerde <i>Artemia</i> cysten	263
42. Effect van hibernatie op de diapauze-desactivering van geproduceerde cysten	264
43. Effect van hibernatie op cysten uit Kazakstan in functie van temperatuur en incubatieduur	266
44. Effect van hibernatie op cysten uit Peru in functie van temperatuur en incubatieduur	267
45. Effect van hibernatie op cysten uit Vietnam in functie van temperatuur en incubatieduur	268
46. Effect van peroxide op de diapauze-desactivering van labo-geproduceerd cystenmateriaal	274
47. Activiteitsgebied van peroxide voor cysten afkomstig uit Kazakstan en Piura	277
48. Invloed van de concentratie aan peroxide op de ontluikbaarheid van <i>Artemia</i> cysten afkomstig van diverse geografische oorsprong	279
49. Effect van prehydratatie bij kamertemperatuur op de diapauze-desactivering door middel van peroxide	281

50. Invloed van stockering onder diverse omstandigheden op de ontluikbaarheid van VT cysten behandeld met peroxide	283
51. Effect van peroxide-behandeling op de diapauze-desactivering van enkele commerciële cystenmonsters	284
52. Effect van diverse NaOCl-concentraties op de diapauze-desactivering van cysten afkomstig uit Kazakstan, Peru en Vietnam	286
53. Effect van diverse $\text{KMnO}_4$ -concentraties en incubatieperiodes op de diapauze-desactivering van cysten afkomstig van Kazakstan, Peru en Vietnam	287
54. Gecombineerd effect van peroxide en hypochloriet op de diapauze-desactivering	288
55. Gecombineerd effect van diapauze-desactiveringstechnieken op de ontluikbaarheid van <i>Artemia</i> cysten geproduceerd onder gecontroleerde omstandigheden	289
56. Gecombineerd effect van diapauze-desactiveringstechnieken op de ontluikbaarheid van GSL 841 cysten	290
57. Invloed van de stockering onder anoxische omstandigheden op de diapauze-desactivering van cysten afkomstig van Kazakstan, Peru en Vietnam	291
58. Ontluikbaarheid van gedroogde cysten van diverse geografische oorsprong, geproduceerd in standaard labo-omstandigheden	296
59. Biometrische kenmerken van diverse cystenmonsters, geproduceerd onder gecontroleerde omstandigheden in het laboratorium	301
60. De diameter van cystenmonsters geproduceerd onder gecontroleerde omstandigheden in intensieve kweeksystemen of geïnoculeerde biotopen	306
61. Biometrische kenmerken van labo-geproduceerde cysten van twee LVD populaties, geoogst over verschillende tijdstippen	308
62. Kwalitatieve en kwantitatieve vetzuursamenstelling van de experimentele diëten vervoederd aan <i>Artemia</i> culturen	312

63. Kwalitatieve en kwantitatieve vetzuursamenstelling van de <i>Artemia</i> entcysten en deze geproduceerd onder diverse dieetomstandigheden in standaard kweekcondities	314
64. Kwalitatieve en kwantitatieve vetzuursamenstelling van Great Salt Lake entcysten en van de ovovivipare afleg geproduceerd in standaard kweeksystemen onder verschillende dieetomstandigheden	316
65. Aminozuursamenstelling van <i>Artemia</i> cysten geproduceerd in het standaard labosysteem	320
66. Koolhydraatgehaltes in LVD cysten geproduceerd onder diverse voedingsomstandigheden in het standaard labosysteem	322
67. Canthaxanthine-gehaltes in de geproduceerde afleg van <i>Artemia</i>	326
68. Resultaten van de overlevingstesten bij 20 °C en 30 °C	333
69. $LT_{50}$ -waarden van de overlevingstesten bij 20 °C en 30 °C met nakomelingen geproduceerd op <i>Dunaliella</i> in het labo-systeem van Dhert	336
70. Groei en overleving van diverse labo-geproduceerde <i>Artemia</i> onder standaard kweekomstandigheden	337
71. Overleving en groei van ovovivipaar geproduceerde nakomelingen van LVD populaties geteeld onder specifieke labo-omstandigheden	340
72. Overleving en groei van de geproduceerde <i>Artemia</i> nakomelingen onder diverse temperatuur/saliniteitscombinaties	341
73. Overlevingspercentages in functie van temperatuur/saliniteitscombinaties voor diverse <i>Artemia</i> rassen	345

## LIJST DER FIGUREN

1. Algemeen overzicht van het onderzoeksprogramma	4
2. Scanning elektronenmicroscopische opnamen van diverse stadia van <i>Artemia</i>	10
3. Detail van het mannelijk en vrouwelijk voortplantingsstelsel	13
4. De geografische distributie van <i>Artemia</i>	14

5. Schets van de beweging van de setae van mandibels en antennes in het instar II-stadium bij <i>Branchinecta ferox</i> (Anostraca)	26
6. Schets van de afzonderlijke bewegingen der thoracopoden bij Anostraca en de hieruit voortvloeiende waterstromingen	28
7. Frequentiedistributie naar grootte van microsferen aangeboden in het medium en opgenomen door instar 3-4 nauplii en adulte <i>Artemia</i>	32
8. Relatie tussen assimilatie en voedselconcentratie bij adulte <i>Artemia</i>	41
9. Schema's van diverse renbaansystemen voor de kweek van <i>Artemia</i>	54
10. Schema's van een platenbezinker en een 'cross flow'-zeef	56
11. Schematische voorstelling van de filters gebruikt in doorvloeikweek	58
12. Schematische voorstelling van de vloeibed-reactor voor <i>Artemia</i> kweek	60
13. Schema van het recirculatiesysteem voor intensieve <i>Artemia</i> teelt	62
14. Detail van het watertoevoersysteem naar de kweekmodule	64
15. Schema van het nieuwe filtersysteem	66
16. Schematische voorstelling van de 'Trislot'-filter	66
17. Ontwerp van eenvoudige doorzichtigheidsmeter ter preventie van overvoeding in de kweektanks	70
18. Algemeen basisplan van een recirculatiesysteem voor de teelt van aquatische organismen	73
19. Schema van de lamellaire platenbezinker	75
20. Schema van de gebruikte biodisc	78
21. B.O.D.-verwijdering in een biodisc-zuiverings-systeem in functie van de graad van vervuiling en de hydraulische belasting	80
22. Overleving en groei van GSL <i>Artemia</i> gekweekt op Protibel-diëten	102
23. Vergelijking van de beste produktiekenmerken na 14 dagen teelt van GSL <i>Artemia</i> op verschillende samengestelde diëten	104

24. Overleving en groei van GSL <i>Artemia</i> geteeld in verschillende doorvloeisystemen	121
25. Schematische voorstelling van de toediening van partikulaire componenten aan predatorlarven via bioencapsulatie in <i>Artemia</i>	127
26. $\omega$ 3 - HUFA gehalte van aangerijkte en niet aangerijkte GSL juvenielen in vergelijking met 12 u aangerijkte nauplii	128
27. Schematische illustratie van verticale integratie van <i>Artemia</i> in de aquacultuur	131
28. Schema van de ultrastructuur van de cysteschaal van <i>Artemia</i> embryo's	140
29. Verloop van de worpgrootte in functie van het broednummer voor verschillende <i>Artemia</i> species	147
30. Schema van het recirculatiesysteem voor de productie van <i>Artemia</i> cysten	148
31. Schema van de kweekrecipiënt	150
32. Schema van de U.V.-filter	152
33. Zuurstofconcentratie in al of niet afgedekte kweekaquaria in functie van de duur van toevoeging van stikstofgas	165
34. Schema van de recuperatiefilter voor cysten	171
35. Schematische voorstelling van de verwerking van afgeogste cysten	172
36. Schema van een wervelbed-apparaat voor het drogen van <i>Artemia</i> cysten	175
37. Schema van het systeem voor de afoogsting van nauplii	185
38. Schema van het systeem voor de scheiding van de nauplii van partikulaire afval	187
39. Schematische illustratie van de specifieke terminologie met betrekking tot cryptobiosis bij <i>Artemia</i>	198
40. Ontluikingspercentage en -snelheid van Mono Lake <i>Artemia</i> cysten, geïncubeerd bij 10 °C en 90 g/l zoutgehalte; dit in functie van diverse preïncubatie-periodes bij 4 °C	222
41. Het cellulaire metabolisme in ontwikkelende <i>Artemia</i> cysten in functie van de hydratatiegraad	230



42. Schematisch overzicht van de relatie tussen incubatietemperatuur en ontluikingskarakteristieken van <i>Artemia</i> cysten	236
43. Ontluikingspercentage van <i>Artemia</i> cysten in functie van incubatietemperatuur en 'sibling species'	236
44. Invloed van de hoeveelheid voedsel toegediend aan de moederculturen op de ontluikingskwaliteit van de afgelegde cysten	251
45. Invloed van het produktietijdstip op de ontluikingskwaliteit van de afgelegde cysten	254
46. Evolutie van het vochtgehalte van GSL cysten tijdens twee drogingsprocessen bij 35 °C.	258
47. Effect van hibernatie-omstandigheden op de diapauze-desactivering van gepekelde cysten afkomstig van Kazakstan, Peru en Vietnam	270
48. Effect van hibernatie-omstandigheden op de diapauze-desactivering van gedroogde cysten afkomstig van Kazakstan, Peru en Vietnam	271
49. Effect van peroxide op de ontluikbaarheid van cysten afkomstig van Kazakstan en Peru	278
50. Mogelijke interacties van groepen factoren op de ontluikbaarheid van <i>Artemia</i> cysten	293
51. Overleving bij 20 °C en 30 °C van <i>Artemia</i> nakomelingen geproduceerd in de installatie voor cystenproductie	335

#### LIJST DER FOTO'S

1. Ontluiking van het instar I-stadium bij <i>Artemia</i>	8
2. Adult <i>Artemia</i> mannetje	8
3. Adult <i>Artemia</i> wijfje	8
4. Opstelling van de 'Trislot'-filter in de kweektank	67
5. Algemeen overzicht van de kweekeenheid	68
6. Detailopname van een kweektank	68
7. Overzicht van het recirculatiesysteem	78
8. <i>Artemia</i> preadult met 'black disease' ter hoogte van de thoracopoden	106

9. Detailopname van een <i>Leucothrix</i> infectie op <i>Artemia</i> thoracopoden en van de filamenteuze bacterie zelf	114
10 tot 14. Voortplantingscyclus bij <i>Artemia</i>	137
15 en 16. Overzicht van het kweekstelsel voor produktie en afoogsting van nauplii	184

## HOOFDSTUK I

### INLEIDING

Gedurende het laatste decennium is in Europa de visserij-opbrengst gestagneerd; eenzelfde situatie op wereldvlak wordt voorspeld binnen maximum 30 jaar (Sandifer, 1988). Nochtans blijft de vraag naar visserij-producten verder toenemen en overstijgt ze nu reeds het aanbod. Mede door deze ontwikkeling en de toenemende kosten voor verdere exploitatie van de visgronden heeft de aquacultuur zich in de jaren '80 bevestigd als een rendabel alternatief voor de visvangst.

Aquacultuur kan gedefinieerd worden als de manipulatie van de aquatische omgeving om tot hogere produkties te komen van aquatische organismen zoals wieren, vissen en schaaldieren die belangrijk zijn voor de mens (Jones, 1986). De statistieken van de wereldvoedselorganisatie FAO vermelden voor 1985 een totale aquacultuurproduktie van 10,6 miljoen ton (Tabel 1).

Tabel 1 : Wereld aquacultuurproduktie in 1985 (naar Nash, 1988)

	VISSEN	CRUSTACEEEN	MOLLUSCEN	ZEEWIEREN	ANDERE
AFRIKA	60 600	100	400	0	0
N-AMERIKA	197 800	33 800	160 800	200	0
Z-AMERIKA	28 500	32 900	1 900	4 900	0
AZIE	3 792 600	198 500	2 120 000	2 767 500	28 200
EUROPA	340 800	300	496 000	4 500	0
OCEANIE	1 200	100	20 000	100	100
U.S.S.R.	296 000	0	0	0	0
<b>TOTAAL</b>	<b>4 717 500</b>	<b>265 700</b>	<b>2 798 600</b>	<b>2 777 200</b>	<b>28 300</b>
<b>PERCENTAGE</b>	<b>44.5</b>	<b>2.5</b>	<b>26.5</b>	<b>26.2</b>	<b>0.3</b>
<b>TOTAAL : 10 587 300 ton</b>					

In vergelijking met 1979 betekent dit volgens Nash (1988) een stijging van 12,6 %. Deze toename is wellicht overschat daar vanaf 1979 de produkties van bijkomende landen en in het algemeen juistere gegevens werden verzameld voor deze aquacultuur-statistieken (Nash, 1988). Toch mag verwacht worden dat de aquacultuurproduktie verder zal toenemen met  $\pm 6$  % per jaar waardoor in het jaar 2 000 ongeveer 22,2 miljoen ton zou geproduceerd worden, wat 25 % bedraagt van de totale (te verwachten) visvangst (Jones, 1986; Nash, 1987 in Sandifer, 1988).

Deze sterke groei zal zich echter niet zonder enige problemen doorzetten. Zo is de aquacultuur van garnalen en vissen duidelijk in een overgangsfase van artisanale produktie (gebruik van larven geoogst uit de natuur) naar volledig gecontroleerde teelt : domesticatie van de dieren door middel van geïnduceerde rijping en eiafleg gevolgd door kweek van embryo's tot larven en/of pootvis onder kunstmatige omstandigheden. Dergelijke artificiële produktie van aquatische organismen wordt reeds met succes toegepast in vele grootschalige, commerciële projecten waar de afhankelijkheid van larven uit de natuur te beperkt en/of onvoorspelbaar is. Zo b.v. heeft de uitbouw van meer dan 90 000 ha garnalenvijvers in Ecuador geleid tot een uitputting van de natuurlijke stocks aan garnalenlarven (de jaarlijkse vereisten aan larven bedraagt momenteel meer dan 10 miljard stuks); de gecontroleerde produktie van garnalenlarven door broedhuizen (nu reeds meer dan 50 operationeel) was dan ook vereist om de capaciteit van de beschikbare vijvers maximaal te kunnen benutten. Ook in Europa is het aantal larven van zeebaars en zeebrasem geproduceerd in broedhuizen sterk gestegen tussen 1982 en 1986 (toename met een factor 2,5 tot 7,5 miljoen stuks : Sweetman, persoonlijke mededeling). Dit alles heeft voor gevolg dat de vraag naar en de interesse in larvale voedsels sterk toegenomen is. Volgens de voorzitter van de "World Aquaculture Society", Dr. J.J. Manzi tijdens zijn openingsvoordracht van het recente wereldcongres "Aquaculture '89" (Los Angeles, CA-VSA; - februari 1989) vormt de

ontwikkeling van commercieel toepasbare larvale diëten een prioritair onderzoeksprogramma voor de verdere uitbouw van de aquacultuur.

Het pekelkreeftje *Artemia* wordt reeds gedurende enkele decennia gebruikt als een geschikte, levende voedselbron voor de kweek van allerlei aquatische predatoren. Pekelkreeftjes hebben namelijk de unieke eigenschap dat ze cysten produceren die gedroogd en bewaard kunnen worden zonder hun leefbaarheid te verliezen. Uit dit droge poeder ontluiken na rehydratatie in zoutwater binnen één etmaal vrijzwemmende larfjes die bijzonder gegeerd worden door de jonge stadia van vissen en garnalen. Het is dan ook begrijpelijk dat de vraag naar *Artemia*, als geschikt en gemakkelijk te produceren voedsel, parallel met de expansie van (en de accentverschuiving binnen) de aquacultuur sterk toegenomen is. Hierdoor zijn ook enkele schaduwzijden van het gebruik van deze levende voedselbron aan het licht gekomen :

- de kostprijs van *Artemia* is door de vraag sterk gestegen (20-50 US \$ per kg cysten) waardoor de voedselkost (waarvan tot 50 % voor rekening van *Artemia*) tijdens de larvale teelt van vissen en garnalen tot ongeveer 15 % van de totaal kost opgelopen is ! (*Artemia Systems*, persoonlijke mededeling). Daarenboven is de ontluikingskwaliteit van de diverse cystenloten niet gegarandeerd waardoor de kostprijs per miljoen pekelkreeftlarven eventueel nog gevoelig hoger kan liggen.
- de voedingswaarde van *Artemia* nauplii afkomstig van diverse, commercieel beschikbare cystenloten (al of niet van dezelfde geografische oorsprong) is niet constant waardoor in sommige gevallen nutritionele insufficiënties kunnen optreden, dit vooral voor mariene predatoren.

Deze beperkingen zijn dan ook kritisch voor de verdere ontwikkeling van de aquacultuur. Gezien artificiële substituediëten nog geen volwaardig alternatief bieden voor *Artemia*, is een optimalisering en betere kennis van dit levend voedsel dringend gewenst.

In dit kader hebben we ons tot doel gesteld om enerzijds verbeterde teelttechnieken te ontwikkelen voor de gecontroleerde massaproductie van *Artemia* (pre-)adulten, cysten en nauplii, en anderzijds om vergelijkend onderzoek te verrichten op het labo-geproduceerd materiaal ten opzichte van *Artemia* verkregen uit de natuur (zie figuur 1).

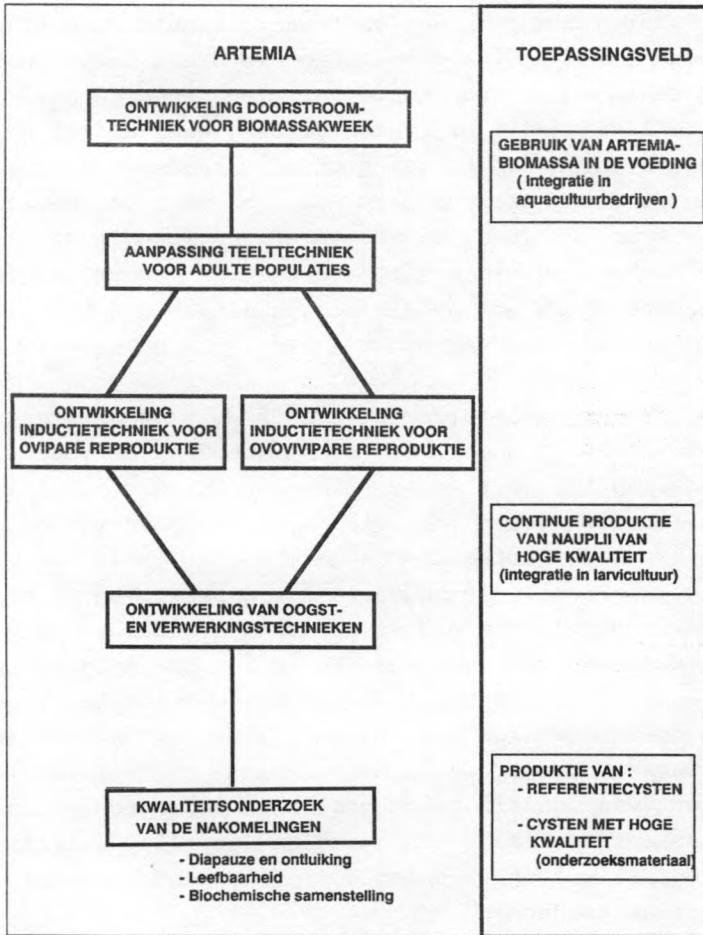


Fig. 1 : Algemeen overzicht van het onderzoeksprogramma.

De ontwikkeling van een installatie voor de produktie van voldoende kwantiteiten cysten onder gecontroleerde kweekomstandigheden kan in de eerste plaats helpen om een beter inzicht te verwerven in b.v. de factoren die de ontluikbaarheid van cysten bepalen of die de kwalitatieve en kwantitatieve voedingswaarde van *Artemia* nauplii beïnvloeden. Uit de vele biologische en biochemische studies is immers gebleken dat vele vaststellingen niet causaal verklaard konden worden bij gebrek aan goed gedefinieerd onderzoeksmateriaal : de cysten zijn afkomstig uit natuurlijke biotopen, hebben erg variabele karakteristieken en bovendien is niet genoeg achtergrondinformatie beschikbaar. Standaardcysten, verkregen onder specifieke en goed gecontroleerde omstandigheden voldoen wellicht aan de gestelde eisen om het onderzoek te kunnen starten naar de invloed van abiotische en biotische factoren op de karakteristieken van de afleg.

Er wordt vooral aandacht besteed aan de studie van de factoren die de nutritionele (biometrische en biochemische) karakteristieken en de ontluikingseigenschappen van de geëncysteerde afleg beïnvloeden. In verband met dit laatste onderzoekspunt wordt ook de toestand van diapauze, een aspect dat wetenschappers uitermate fascineert, in detail bestudeerd.

Daarenboven zou de cystenproduktie-installatie in een latere fase na schaalvergroting kunnen instaan voor de oogst van voldoende cysten met specifieke eigenschappen voor gecoördineerd onderzoek (b.v. in de ecotoxicologie) of voor inoculatie in geschikte biotopen. Hierdoor zouden grotere kwantiteiten kwaliteitscysten geproduceerd kunnen worden (b.v. produktie van cysten die een kleine naupliuslarve opleveren, of die heel hoge gehalten aan essentiële vetzuren bevatten) voor specifieke aquacultuurtoepassingen. Om tot een standaardprocedure voor cystenproduktie onder gecontroleerde omstandigheden te kunnen komen, hebben wij volgende noodzakelijke ontwikkelingen geïdentificeerd als belangrijk voor ons thesiswerk :

- een intensieve kweekinstallatie voor de kweek van hoge densiteiten aan *Artemia* juvenielen en het in stand houden van hoge densiteiten aan adulte pekeltkreeften met garanties voor maximale overleving, groei en vitaliteit gedurende enkele maanden. Doorvloeikweek lijkt daarvoor aangewezen omdat hierdoor een maximum aan parameters in de hand kunnen gehouden worden;
- een geschikte inductietechnologie voor ovipare reproductie, die niet interfereert met de andere kweekparameters en met de populatiekarakteristieken zoals overleving en fecunditeit;
- een systeem voor continue afoogsting van de pas geproduceerde cysten zonder dat dehydratie, anoxie, enz... kan optreden.

Vervolgens was het onze bedoeling om na te gaan of de reproductiewijze bij *Artemia* kan gemanipuleerd worden naar ovovivipariteit. Hierdoor zouden unieke kansen geschapen worden voor vergelijkend onderzoek van de karakteristieken van ovovivipare en ovipare afleg geproduceerd onder identieke omstandigheden. Hierover zijn tot op heden nog geen gegevens bekend. Bovendien zou een naupliiproductie-installatie na schaalvergroting kunnen geïntegreerd worden in aquacultuur-broedhuizen waardoor een onafhankelijkheidspositie ten opzichte van de cystenmarkt kan opgebouwd worden. Dergelijke toepassing van gecontroleerde naupliiproductie in combinatie met een biomassaproductie-installatie zou de verticale integratie van *Artemia* teelt in kwekerijen vergemakkelijken. Het doorvloeisysteem lijkt ons immers een geschikte technologie die als concept kan dienen voor de commerciële productie van *Artemia* prooidieren van verschillende grootte voor vervoeding aan diverse stadia tijdens de larvale cultuur, en eventueel van afleg met een hoge nutritionele kwaliteit. Dit heeft niet alleen het voordeel dat de totaalcost voor larvale voeding kan gedrukt worden maar ook dat enkele moeilijke teeltfazen (b.v. speenfase en metamorfose-fase) beter kunnen beheerst worden wat uiteindelijk de rentabiliteit van het aquacultuurbedrijf kan verhogen.



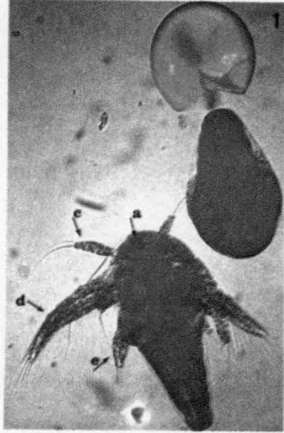


Foto 1 : Ontluikingsstadia van *Artemia*.

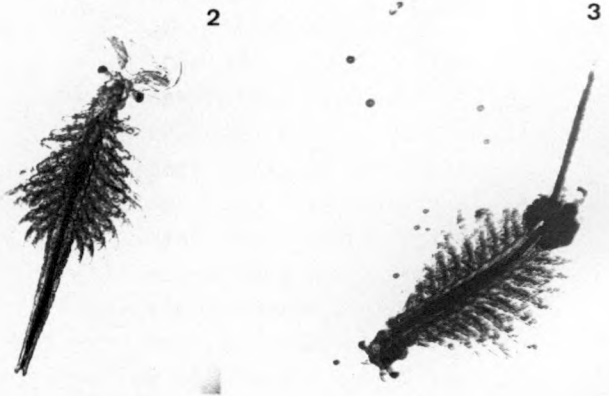


Foto 2 en 3 : Adult mannetje en wijfe van *Artemia*.

## HOOFDSTUK II

### BIOLOGISCHE GEGEVENS MET BETREKKING TOT ARTEMIA

#### II.1. ONTWIKKELING, LEVENSCYCLUS EN VOORKOMEN

Een gedetailleerde beschrijving en de specifieke terminologie van de morfologische ontogenese is terug te vinden in Hentschel (1968), Benesch (1969) en Schrehardt (1987a). De aspecten in verband met reproductie en ontluiking der cysten worden uitvoerig behandeld in respectievelijk hoofdstuk IV.2. en V.2.1. Wat hier volgt is slechts een beknopt overzicht van de morfologische, postembryonale ontwikkeling en levenscyclus van *Artemia* (zie ook tabel 2 en figuur 2).

Het eerste, vrijzwemmende stadium bij het pekelkreeftje is een 0,5 mm lange nauplius gekenmerkt door drie paar kopextremiteiten : de antennules, de antennes en de larvale mandibels. Tijdens de opeenvolgende larvale stadia ondergaan deze aanhangsels morfologische transformaties die geleidelijk leiden tot een sexueel dimorfisme van de anten-nae, de totale reductie van de larvale mandibels en de ontwikkeling van adulte mandibels. Tijdens de metanaupliaire en post-metanaupliaire stadia wordt het larvale filtreerapparaat vervangen door maxillulen, maxillen en 11 paar thoracopoden die zich ontwikkelen in de post-mandibulaire regio. Laatstgenoemde extremiteiten zijn multifunctioneel : protopodiet en telepodiet staan in voor de voortbeweging en voedselverzameling (Barlow en Sleight, 1980; Schrehardt, 1987b), de exopodiet voor de osmoregulatie (Copeland, 1967) en de epipodiet voor de respiratie (Schrehardt, 1987a). De postlarvale stadia worden vooral gekenmerkt door de ontwikkeling van de genitale structuren ter hoogte van de eerste twee (van de acht) abdominale segmenten en de omvorming van de antennae, respectievelijk tot grote kaakvormige grijpers bij de mannetjes en tot gereduceerde, filiforme antennae

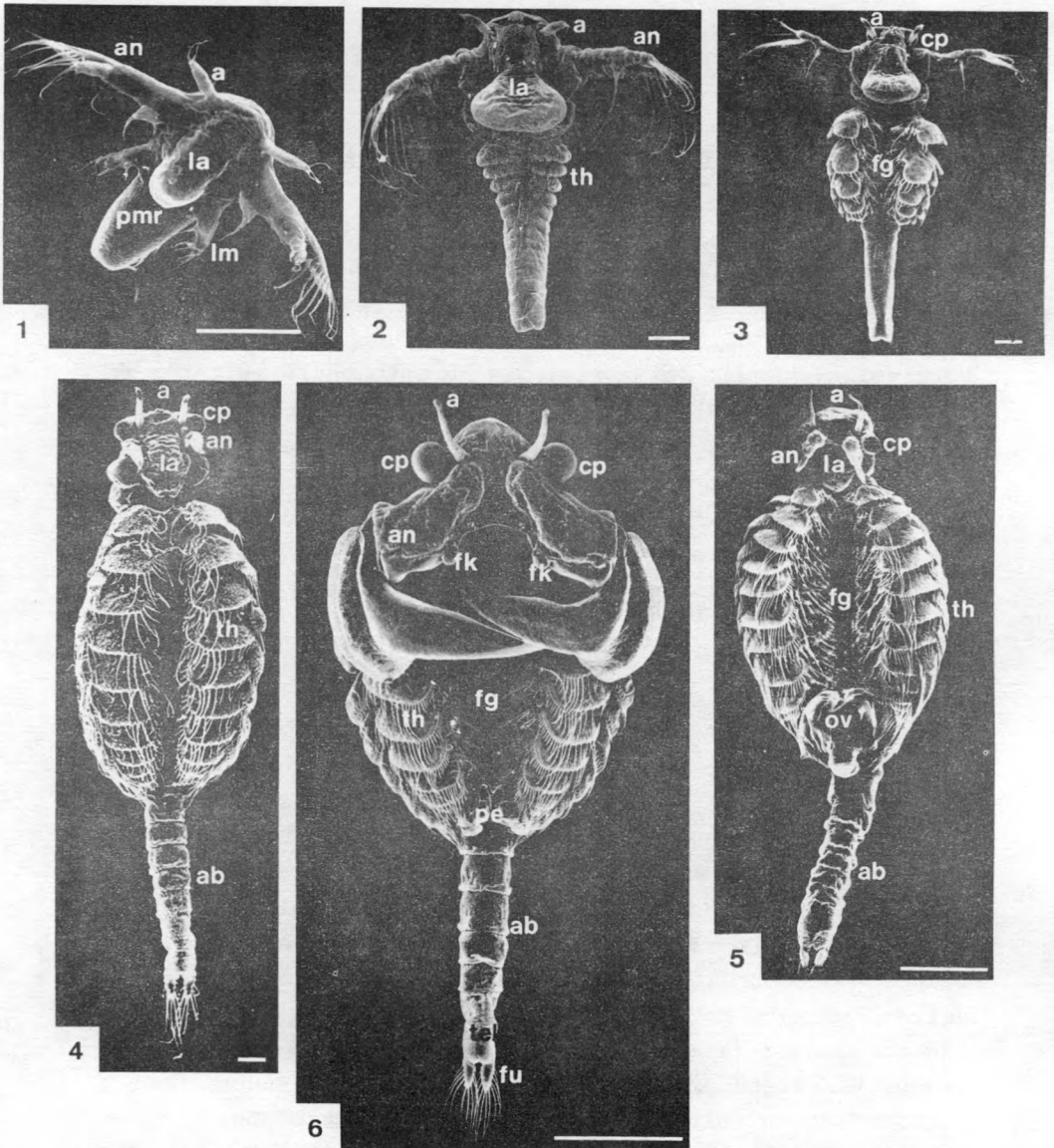


Fig. 2 : Scanning elektronenmicroscopische opnamen van diverse stadia van *Artemia* (Schrehardt, 1987a).

(1) : instar I-nauplius; (2) instar V-metanauplius; (3) postmetanauplius II; (4) preadult; (5) adult wijfje; (6) adult mannetje (a = antennule; an = antenne; la = labrum; lm = mandibel; pmr = postmandibulaire streek; th = thoracopod; cp = complexoog; fg = voedselgroeve; ab = abdomen; ov = ovarium; pe = penis; tel = telson; fu = furca; fk = frontale knop).

Tabel 2 : Kenmerken van de ontwikkelingsstadia van *Artemia*

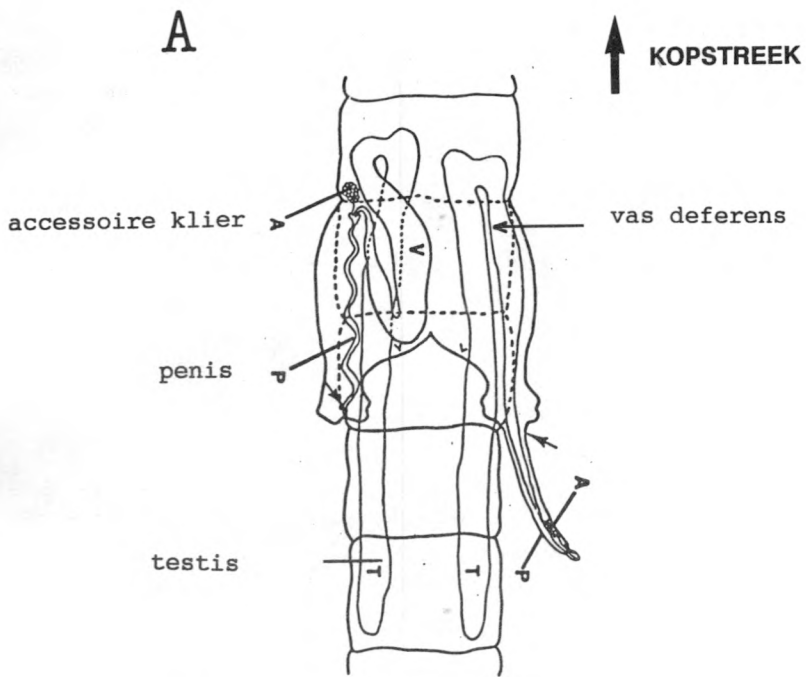
Ontwikkelingsstadium (naar Schrehardt, 1987)	Vervellingsstadium (naar Hentschel, 1968)	Voornaamste morfologische veranderingen
Nauplius	instar I	
Metanauplius I-IV	instar II-V	aanleg van postmandibulaire someten en thoracopodale lobben
Post-metanauplius I-VII	instar VI-XII	- 1 tot 11 thoracopale lobben worden functioneel - ontwikkeling van 1 paar complexogen
Postlarva I-V	instar XIII-XVII	- segmentatie van de romp is compleet - antennes verliezen zwemfunctie en ondergaan differentiatie - genitale structuren ontwikkelen
Adult	verveling vindt plaats tussen twee reproductiecycli	volledig ontwikkelde genitale structuren

bij de vrouwelijke dieren. Afhankelijk van het ras en de omgevingsomstandigheden bereiken pekelkreeften het reproductief actieve stadium (bij een lengte van  $\pm 1$  cm) na ongeveer 2 tot 3 weken groei.

Het mannelijk voortplantingsstelsel bestaat uit parige testes, *vasa deferentia*, accessoire klieren en parige penissen (Wolfe, 1971, Versichele, 1983). *Artemia* wijfjes bezitten daarentegen twee ovaria, twee oviducten en een mediane uterus of broedzak met trosvormige schalklieren (Criel, 1980) (Fig. 3 a en b).

Pekelkreeftjes hebben daarenboven de eigenschap zich op twee verschillende wijzen te kunnen voortplanten. In functie van de omgevingsomstandigheden worden ofwel vrijzwemmende larven afgelegd (ovovivipariteit) ofwel cysten gevormd in de uterus, waarbij de embryonale ontwikkeling tijdens het gastrula-stadium stilgelegd wordt en het embryo daarop omgeven wordt met een chitineuze schaal (ovipariteit). Deze mogelijkheid tot variatie in het soort nakomelingen laat toe dat pekelkreeftjes zich in extreme biotopen kunnen handhaven.

Tot op heden zijn reeds meer dan 360 vindplaatsen van het pekelkreeftje gekend, verspreid over de vijf continenten (Vanhaecke *et al.*, 1987; Fig. 4). Een predominant kenmerk van al deze biotopen is het hoog zoutgehalte dat de tolerantiegraad van de plaatselijk voorkomende *Artemia* predatoren overschrijdt. De verspreiding is dan ook duidelijk bepaald door het klimaat : 97 % van de biotopen zijn namelijk gelokaliseerd in die gebieden waar de evaporatie hoger is dan de precipitatie en dit gedurende praktisch het volledige jaar (Vanhaecke *et al.*, 1987). Niet alle dergelijke gebieden bezitten echter pekelkreeftpopulaties en dit vanwege extreme temperatuursomstandigheden, de afwezigheid van dispersievectoren, of het voorkomen van andere koloniatoren zoals *Parartemia* (Geddes, 1980, 1981). Andere abiotische en biotische kenmerken van de zoutmeren spelen slechts een beperkte rol in het verspreidingspatroon van



**B**

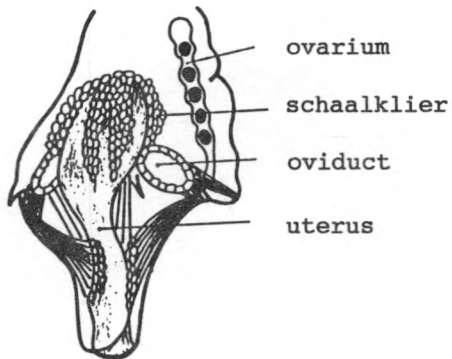


Fig. 3 : Detail van het mannelijk (A) en vrouwelijk (B) voortplantingsstelsel.

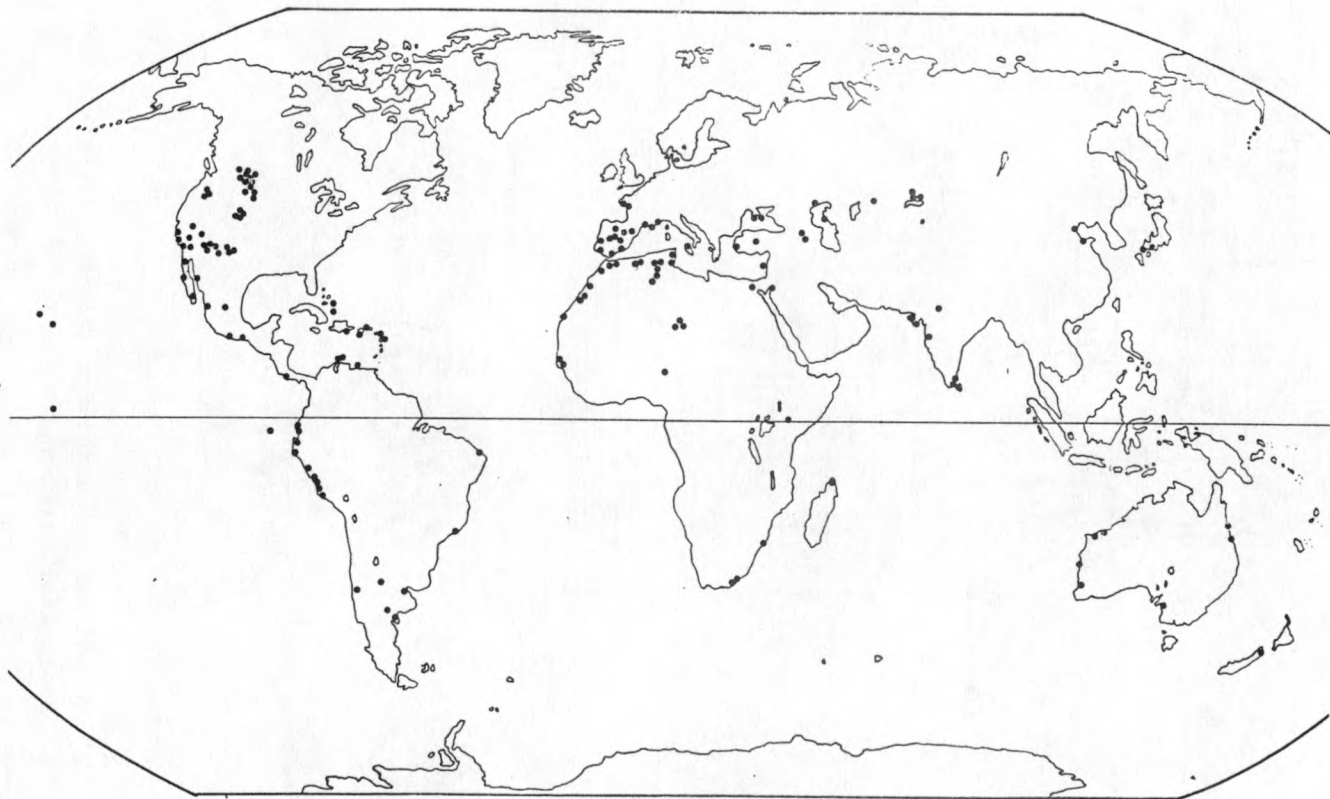


Fig. 4 : De geografische distributie van *Artemia*. (naar Vanhaecke, 1983)

*Artemia*, maar hebben wel een duidelijk effect op kwantitatieve populatiekenmerken. Deze euryplasticiteit van pekelkreeftjes ten opzichte van habitatcondities is een gevolg van enkele unieke adaptaties. Vooreerst bezit *Artemia* een heel efficiënt osmoregulatorisch systeem (Croghan, 1958; Schmidt-Nielsen, 1974) en een flexibel respiratorisch systeem, waarbij verschillende ademhalingspigmenten gebiosynthetiseerd worden zodat de  $O_2$ -opname constant blijft tot bij zeer lage zuurstofgehaltenes (Gilchrist, 1954; Geddes, 1981). Daarenboven is de mogelijkheid tot creatie van een sluimerend levensstadium, de cyste, een belangrijk overlevingsmechanisme voor populaties die biotopen bewonen die gekarakteriseerd zijn door al of niet voorspelbare, seizoensale variaties die de overleving van het individu hypothekeerders zoals extreme temperaturen of uitdroging. Immers, deze geëncysteerde embryo's kunnen dergelijke periodes overbruggen zonder hun leefbaarheid te verliezen en geven aanleiding tot een nieuwe populatie wanneer zich opnieuw gunstige omstandigheden aftekenen. Daar de beide reproductievormen (ovipariteit versus ovovivipariteit) elkaar vlug kunnen opvolgen, zonder b.v. eerst de produktie van mictische wijfjes te vereisen (cf. sommige *Daphnia* soorten), is een vlugge respons op extreem fluctuerende omstandigheden verzekerd.

Het feit dat *Artemia*, in tegenstelling tot de zoetwateranostracen, ook ovovivipaar is, betekent een extra adaptief voordeel daar zodoende een vlugge kolonisatie van het biotoop verzekerd is wanneer de omgevingsomstandigheden optimaal worden.

Tot slot blijken de rassen specifieke 'life-history'-strategieën te hebben ontwikkeld in functie van hun biotopen die kunnen verschillen van permanent tot slechts heel tijdelijk bewoonbaar, van seizoenaal tot a-seizoenaal, van voorspelbaar tot onvoorspelbaar. Vooral de reproductiekarakteristieken duiden op een ecologische significantie (Lenz, 1987). Zo zijn de bewoners van seizoenale habitaten



zoals Great Salt Lake en Mono Lake geadapteerd om in de lente het zoutmeer opnieuw vlug te bevolken en om kort daarop massa's cysten te produceren om het overleven te garanderen tijdens het daaropvolgende onleefbaar seizoen. De reproductiestrategie van deze rassen houdt dus een hoge fecunditeit in. Anderzijds vertonen populaties van permanente, relatief a-seizoenale habitaten (b.v. Laysan Lagoon op Hawaii, VSA) een dominante ovovivipariteit en een lage maar gestage reproductieve output (zeer lage worpgrootte, lange intervallen tussen twee worpen, lange reproductieve periode), wat leidt tot een veelvuldigheid van asynchrone generaties per jaar (Lenz en Dana, 1987). In hoeverre parthenogenese, dat fylogenetisch uit een zygo-genetisch ras ontstaan is (Barigozzi, 1957) een ecologische significantie heeft, is tot op heden echter onduidelijk.

Gezien de hoge graad van verscheidenheid van *Artemia* biotopen, die daarenboven geografisch geïsoleerd zijn, is het niet verwonderlijk dat Vanhaecke (1983) in zijn vergelijkende studie van diverse geografische rassen tot de vaststelling kwam dat naast species-specifieke kenmerken ook meerdere rasspecifieke karakteristieken optreden.

## II.2. PROBLEMATIEK VAN DE SYSTEMATISCHE CLASSIFICATIE VAN ARTEMIA

De systematische classificatie van het pekelkreeftje tot op het genus kan als volgt voorgesteld worden (naar Flössner, 1972) :

Klasse	: Crustacea
Subklasse	: Branchiopoda
Superorde	: Anostraca
Familie	: Artemiidea
Genus	: Artemia

Het al of niet samenbrengen van de verschillende geografische rassen van het pekelkreeftje onder één enkel of meerdere species is echter een probleem dat zich reeds stelde kort nadat de soort voor het eerst beschreven werd door Schlosser (1756). Dit leidde tot een vaak verwarrende taxonomische classificatie en nomenclatuur waarvan wij reeds in 1979 een gedetailleerd overzicht hebben gepubliceerd (Lavens, 1979). Hier volgt dan ook enkel een bondige samenvatting aangevuld met recente ontwikkelingen die de huidige stand van zaken dienen te verduidelijken.

Aanvankelijk werd binnen het genus *Artemia* slechts één species beschreven, namelijk *Artemia salina*, genaamd naar Leach (1819). Microscopische observaties van morfologische verschillen tussen de diverse populaties (Baird, 1852; Verrill, 1869; Daday, 1910) leidden gedurende enkele decennia tot een chaos van species en species-namen tot bleek dat deze morfologische verschillen vooral verband hielden met verschillende omgevingsomstandigheden (Schmankewitch, 1875; Artom, 1905) waarin de soorten werden aangetroffen.

Vanaf de 20ste eeuw gaf de studie van de reproductiewijze, samen met cytologisch onderzoek van de populaties een nieuwe impuls aan de classificatie. Verschillende 'biotypes' werden onderscheiden met als specifieke

karacteristieken : zygogenetisch (met  $2n$  of  $2n+2$  chromosomen) of parthenogenetisch (met  $2n$ ,  $3n$ ,  $4n$  of  $5n$  chromosomen) (Artom, 1931; Piccinelli *et al.*, 1968; Barigozzi, 1974).

Kruisingsproeven tussen zygogenetische populaties toonden aan dat sommige onderling reproductief geïsoleerd waren (Kuenen, 1939; Barigozzi en Tosi, 1959; Gilchrist, 1960; Bowen, 1965). Op basis van dit criterium, aangevuld met biochemische karakterisatie via elektroforese van isoenzymes (Bowen en Sterling, 1978) en hemoglobines (Bowen *et al.*, 1978) werd het genus *Artemia* Leach (Melville, 1985) opgesplitst in 6 'sibling' species die morfologisch praktisch niet te onderscheiden zijn (Bowen *et al.*, 1978) :

*Artemia franciscana*, Kellog (1906) :

oorspronkelijk natuurlijk voorkomen in Amerika

*Artemia tunisiana*, Bowen en Sterling (1978) :

mediterraan gebied

*Artemia urmiana*, Gunther (1900) : Iran

*Artemia monica*, Verrill, (1869) : Mono Lake

*Artemia persimilis*, Piccinelli en Prosdocimi (1968) :  
Argentinië

*Artemia parthenogenetica*, Bowen en Sterling (1978) :  
Eurazië en Australië.

Deze indeling komt grotendeels overeen met de onderlinge graad van genetische differentiatie zoals vastgesteld door Abreu-Grobois en Beardmore (1980, 1982).

Toch dienen nog een aantal vraagtekens geplaatst bij deze systematische classificatie. *Artemia parthenogenetica* is immers een species-complex dat parthenogenetische populaties groepeerd die nochtans duidelijk gescheiden genetische karakteristieken kunnen hebben. Zo is b.v. de inter-genotypische differentiatie ten opzichte van de triploïde rassen uitgesproken terwijl deze tussen de tetraploïde en pentaploïde groep relatief gering blijft (Abreu-Grobois en Beardmore, 1982). Volgens Abreu-Grobois (1987) is een opsplitsing van dit species in taxa op sub-species niveau volgens ploïdie aangewezen, terwijl Bari-

gozzi (1980) geneigd is de varianten te typeren volgens de verschillen in chromosomale fenomenen die optreden tijdens de oögenesis.

Recente studies uitgevoerd door de groep van Barigozzi (*Artemia Newsletter* N° 7, 1988) wijzen erop dat *Artemia urmiana* niet zygogenetisch is waardoor de speciesnaam zou vervallen en de populatie bij *Artemia parthenogenetica* moet gebracht worden. Alhoewel Abreu-Grobois (1987) de populatie als zygogenetisch karakteriseert, blijkt uit het door hem opgemaakte dendrogram dat de Urmia populatie juist ten opzichte van *Artemia parthenogenetica* de kleinste genetische afstand heeft.

Wat *Artemia monica* en *Artemia franciscana* betreft, hebben recente kruisingsproeven, uitgevoerd in media met specifieke ionensamenstelling, aangetoond dat beide species niet reproductief geïsoleerd zijn. De geringe genetische afstand is een verder bewijs dat deze rassen in feite tot dezelfde taxonomische eenheid behoren (Abreu-Grobois en Beardmore, 1982). Toch lijkt genentransfer tussen beide groepen niet mogelijk vanwege een ecologische isolatie (Bowen *et al.*, 1985). Deze onderzoekers toonden verder aan dat dergelijke ecologische isolatie geen alleenstaand geval is in *A. franciscana* en gaven dan ook de voorkeur aan een nieuwe taxonomische orde met *A. franciscana* als super-species dat diverse semi-species bevat, gekarakteriseerd door hun graad van tolerantie voor het chloride-anion.

Tot slot stellen de meeste genetici dat de oorspronkelijke naam voor het Europees zygogenetisch ras *Artemia salina* niet kan weerhouden worden. Immers, de 'type' populatie uit Lymington (Engeland) komt niet meer voor en kan zodoende niet meer vergeleken worden met de huidige Europese niet-parthenogenetische species (Bowen en Sterling, 1978; Barigozzi, 1980; Bowen *et al.*, 1980; Abreu-Grobois, 1987). Deze problematiek in verband met de *Artemia* nomenclatuur heeft eind 1988 enkele onderzoekers (Abreu-Grobois, Belk, Bowen en Coomans) ertoe aangezet om dit taxonomisch vraagstuk te ontrafelen (persoonlijke mededelingen). Volgende standpunten worden hierbij ingenomen :

- *A. salina* is een bruikbare naam en is reeds aanvaard door de internationale commissie voor zoologische nomenclatuur in 1985. Bovendien lijkt de kans te bestaan om exemplaren van de oorspronkelijke Lynington-populatie op te sporen en opnieuw te beschrijven. Indien dit mogelijk is, kan *A. salina* als 'type'-species aanvaard worden.
- *A. tunisiana* is een *nomen nudum* en dient volgens de regels van de taxonomische code beschreven te worden om aanvaard te kunnen worden. Toch bestaat de mogelijkheid dat er voldoende bewijs geleverd wordt dat dit species conspecifiek is met *A. salina*. Dit zou dan betekenen dat *A. tunisiana* een junior synoniem wordt.

## HOOFDSTUK III

### KWEEK VAN ARTEMIA TOT HET PREADULTE STADIUM IN EEN INTENSIEF KWEEKSYSTEEM

#### III.1.LITERATUURSTUDIE

##### III. 1.1. Fysico-chemische kweekcondities

###### 1. *Temperatuur en saliniteit*

Temperatuur en zoutgehalte bepalen in sterke mate de groei en overleving van het pekelkreeftje (Wear en Haslett, 1986). Deze parameters dienen in feite samen in beschouwing te worden genomen daar er volgens Kinne (1970) bij aquatische invertebraten een interactie bestaat tussen beide factoren. Von Hentig (1970) bevestigde dit voor *Artemia* en vond een reciproke interrelatie tussen temperatuur en saliniteit. Alhoewel algemeen aangenomen wordt dat *Artemia* zowel eurytherm als euryhalien is (Carpelan, 1957; Stephens en Gillespie, 1972), blijkt dat diverse geografische rassen duidelijke tolerantieverschillen vertonen (Sorgeloos *et al.*, 1976; Claus *et al.*, 1977; Collins, 1980; Vanhaecke *et al.*, 1984). Toch kan, met uitzondering van het Chaplin Lake ras, een gemeenschappelijk preferentiegebied vastgelegd worden waarbij de mortaliteit geringer is dan 10 % in de temperatuurgrenzen 19-25 °C en de saliniteitslimieten 35-110 g/l (Vanhaecke *et al.*, 1984).

Wanneer echter produktie (d.i. biomassatoename en voedselconversie) als evaluatiecriterium gekozen wordt, kan het preferentieel temperatuursinterval wel verschillen. De groeisnelheid en de voedselconversie stijgen immers met stijgende temperatuur, terwijl de mortaliteit vlug toeneemt boven de 30 °C. Person-Le Ruyet (1976b) en Wear en Haslett (1986) situeren de optimale kweektemperatuur tussen 20 en 30°C, Reeve (1963d) geeft 25-30 °C aan en volgens Dutrieu

Tabel 3 : Samenstelling van enkele artificiële zeewaters geschikt voor *Artemia* kweek

Dietrich en Kalle			Instant Ocean			ARC		
A*:	NaCl	: 23,9 g	Cl <sup>-</sup>	: 18,4 g	NaCl	: 31,08 g		
	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	: 10,83 g	Na <sup>+</sup>	: 10,22 g	MgCl <sub>2</sub>	: 6,09 g		
	CaCl <sub>2</sub> (anhydrisch)	: 1,15 g	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	: 2,516 g	CaCl <sub>2</sub>	: 1,53 g		
	SrCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	: 0,004 g	Mg <sup>2+</sup>	: 1,238 g	KCl	: 0,97 g		
	KCl	: 0,682 g	K <sup>+</sup>	: 0,39 g	MgSO <sub>4</sub>	: 7,74 g		
	KBr	: 0,099 g	Ca <sup>2+</sup>	: 0,37 g	NaHCO <sub>3</sub>	: 1,80 g		
	gedistilleerd H <sub>2</sub> O	: 856 ml	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	: 0,142 g	H <sub>2</sub> O	: 1000 ml		
			H <sub>2</sub> O	: 1000 ml				
B*:	NaSO <sub>4</sub> .10H <sub>2</sub> O	: 9,06 g						
	NaHCO <sub>3</sub>	: 0,02 g						
	NaF	: 0,0003 g						
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	: 0,0027 g						
	gedistilleerd H <sub>2</sub> O	: 100 ml						
* Na het volledig oplossen van de zouten worden beide oplossingen samengevoegd en 24 u krachtig doorborreld met lucht								

1960), Teramoto en Kinoshita (1961) en Hernandorena (1976) is 28-30 °C optimaal. Een vergelijkende studie van verschillende populaties (Vanhaecke, 1983) wees uit dat het best geschikte temperatuursinterval voor produktie varieert volgens het ras : zo prefereren de Europese zygogetische populaties lagere temperaturen (20-25 °C) terwijl de parthenogenetische, evenals het Great Salt Lake ras hogere temperaturen (25-30 °C) verkiezen.

Wat de parameter zoutgehalte betreft als groeibepalende factor, worden uiteenlopende waarden opgegeven in de literatuur (zie overzicht van Sorgeloos, 1971). Reeve (1963c) en Person-Le Ruyet (1976b) rapporteren een maximale groeiefficiëntie bij 25 à 35 g/l terwijl meerdere auteurs hogere waarden aangeven (45 tot boven 100 g/l : Ivleva, 1969; Jahnig, 1977; Dwivedi et al., 1980; Dana en Lenz, 1986; Wear en Haslett, 1986; Balasundaram en Kumaragura, 1987; Bhargava et al., 1987). Zoutgehaltes lager dan 20 g/l zouden nefast zijn voor de overleving (Balasundaram en Kumaragura, 1987).

## 2. Samenstelling van het kweekmedium

Voor de kweek van pekelkreeften worden behalve natuurlijk zeewater frequent enkele artificiële media gebruikt zoals b.v. het 'Dietrich & Kalle'- medium, het 'Instant Ocean' - medium, en het 'ARC' - kweekwater. De respectievelijke samenstellingen van deze media zijn weergegeven in tabel 3 . Vanhaecke en Sorgeloos (1980b) stellen dat het artificieel zeewater (D & K) bij diverse rassen betere groeieresultaten oplevert dan het natuurlijke zeewater. Kweektesten met GSL *Artemia* in licht gemodificeerde 'ARC'-artificiële zeewaters wezen uit dat KCl overbodig is en dat  $MgCl_2$  en  $MgSO_4$  in lagere concentraties analoge overleving en groei opleveren tot het preadulte stadium (De Meulemeester, 1983). Een recente studie uitgevoerd door de onderzoeksgroep van Bowen met *A. franciscana* rassen bevestigde enerzijds dat  $K^+$  mag ontbreken, maar toonde anderzijds aan dat minimum 20 mg/l  $Ca^{++}$  vereist is voor



chloride-habitat populaties terwijl carbonaat-habitat rassen  $\text{Ca}^{++}$ -concentraties lager dan 10 mg/l prefereren (Bowen *et al.*, 1988). In het laatste geval mogen zelfs geen  $\text{Mg}^{++}$ -ionen aanwezig zijn daar die interfereren met de opname van lage  $\text{Ca}^{++}$ -concentraties (Bowen *et al.*, 1988).

### 3. Zuurtegraad

Volgens Seki (1964) is een pH van ongeveer 6,5 de onderste tolerantiegrens voor *Artemia*. Dit wordt bevestigd door Provasoli en D'Agostino (1969) die geen groei meer konden verkrijgen bij zuurtegraden lager dan 6,8. McShan *et al.* (1974) geven als tolerantie-interval voor pH het gebied 6,5 à 8 aan.

### 4. Zuurstofgehalte

Pekelkreeftjes kunnen overleven bij zeer lage zuurstofspanningen, namelijk 1 mg/l (Ivleva, 1969) en zelfs tot 0,5 mg/l (Dutrieu, 1960). Volgens Declair *et al.* (1980) zouden echter waarden lager dan 2 mg/l limiterend zijn; alle hogere concentraties tot de saturatiewaarde kunnen als geschikt worden bestempeld voor kweek. *Artemia* bezit immers de mogelijkheid om zich te adapteren aan variërende zuurstofgehaltenes, dit o.a. door de aanmaak van verschillende hemoglobines met specifieke zuurstofaffiniteiten (Van den Branden *et al.*, 1978). Recent onderzoek (Platon, 1985) toont echter wel aan dat de biomassa-productie toeneemt wanneer hogere zuurstofconcentraties in de kweektanks aangehouden worden.

### 5. Waterkwaliteit

De waterkwaliteit van een kweekmedium kan beïnvloed worden door zowel partikulaire als opgeloste stoffen. Wat de eerste categorie betreft zijn er in de literatuur geen gegevens bekend omtrent partikeldensiteiten die een negatieve invloed uitoefenen op de zuurstof- en voedselopname, of de voortbeweging bij *Artemia*. Voor de opgeloste

stoffen kunnen vooral de stikstofverbindingen een toxische invloed hebben. Deze laatste worden gevormd door oxydatieve desaminatie van de voedingseiwitten met verdere afbraak van de complexe N-verbindingen tot  $\text{NH}_3$ , en worden eveneens geëxcreteerd onder de vorm van  $\text{NH}_3$  door de ammonotelische *Artemia* (Bellini en De Vincentis, 1960; Moffett en Fisher, 1978).

Volgens Hanaoka (1973) zou een concentratie van 4,2 mg/l  $\text{NH}_4^+$ -N reeds de voedselopname en vertering gevoelig vertragen. Seki (1964) rapporteerde letale gevolgen bij waarden hoger dan 5,3 mg/l  $\text{NH}_4^+$ -N. Veel hogere tolerantieniveaus voor ammonium-ionen (>50 mg/l) werden geobserveerd in de kweekexperimenten van Bossuyt (1976) en Sorgeloos *et al.* (1979). Wickins (1981) durft dan ook algemeen stellen dat "... in aquaculture, many of the published limited concentrations are overstated in that production can be maintained at much higher levels". Acute toxiciteitstesten (48 u) op SFB nauplii geven  $\text{LC}_{50}$ -waarden voor  $\text{NH}_4^+$ -N en  $\text{NO}_2$ -N van 310 mg/l, respectievelijk 1 180 mg/l (Chen *et al.*, 1988). Aangezien het gehalte aan  $\text{NH}_4^+$ -N functie is van tal van parameters zoals pH, temperatuur en saliniteit, die de evenwichtsreactie tussen  $\text{NH}_3$  en  $\text{NH}_4$  bepalen (Bower en Bidwell, 1978), is het moeilijk zich uit te spreken over de toxiciteitsdrempel. Ammoniak wordt wel als de meest toxische component beschouwd daar het apolair en lipofiel is waardoor de permeabiliteit doorheen biologische membranen veel hoger is. Nitraat daarentegen is de minst toxische component van de geproduceerde stikstofmetabolieten.

## 6. Licht

Ook wat de invloed van deze factor betreft vindt men in de literatuur uiteenlopende meningen. Kweken in duisternis resulteert volgens Provasoli en Pintner (1980) in tragere groei en hogere mortaliteit, dit in tegenstelling met de bevindingen van Sorgeloos (1972) en Royan (1976) die een versnelde groei aantoonde. Aangezien Person-Le Ruyet

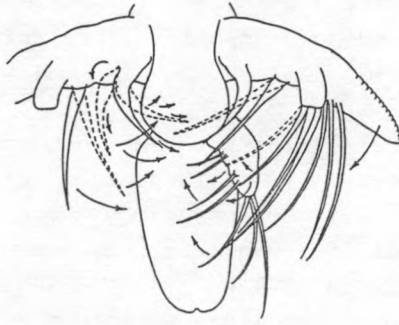


Fig. 5 : Schets van de beweging van de setae van mandibels en antennes in het instar II-stadium bij *Branchinecta ferox* (Anostraca). (naar Fryer, 1983)

(1976b) geen verschillen waarnam onder *ad libitum* voedselomstandigheden, concludeerde Sorgeloos (1979) dat *Artemia* in duisternis minder energie verbruikt voor zijn metabolisme : "de zwemactiviteit is hier geringer zodat een groter deel der opgenomen energie kan resulteren in groei".

### III. 1.2. Voedingskarakteristieken

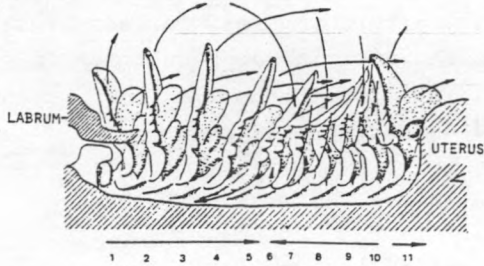
#### 1. Morfologie van het filtreerapparaat

Het instar I-stadium is gekenmerkt door een niet-functioneel spijsverteringskanaal; het organisme verbruikt zijn dooierreserves. De voedselopname vangt aan vanaf het instar II-stadium (Weisz, 1947; Anderson, 1967). Van de drie paar aanhangsels dragen alleen de antennes bij tot de filtratie van voedsel : tijdens de propulsieve slag van 180° worden partikels gecapteerd door de setae, afgekamd door de mandibels en naar de mond gebracht (Barlow en Sleight, 1980) (Fig. 5). De maaswijdte van het larvale filtreerapparaat bedraagt 350 nm, dit is de afstand tussen de setulae die in rijen staan ingeplant op de setae (Schrehardt, 1987a). Dit systeem wordt vanaf het instar VI-stadium gradueel, en vanaf instar XI volledig, vervangen door de thoracopoden, die een medioventrale voedselgroef begrenzen.

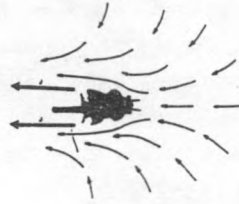
Cannon (1933) deelt de filtervoeding bij Anostraca in drie processen in : produktie van een waterstroming, verzamelen van de voedselpartikels uit deze stroming en transfer van het verzameld materiaal naar de mond.

De waterstroming wordt onderhouden door de metachrone beweging van de thoracopoden die aldus partikels ventraal in de voedselgroef aanvoeren. De thoracopoden bewegen bij een adulte *Artemia* met een frequentie van 3 à 4 Hz en met een onderling faseverschil van ongeveer 1/9 van de volledige cyclus. Propulsiekrachten zijn het gevolg van het wegpersen van het gefiltreerde water tussen de thoracopoden (Barlow en Sleight, 1980) (Fig. 6 A,B,C).

A



B



C



Fig. 6 : Schets van de afzonderlijke bewegingen der thoracopoden bij Anostraca (A) en de hieruit voortvloeiende waterstromingen (B en C). (naar Völlmer, 1952; Barlow en Sleigh, 1980).

In de hier geschetste bewegingsfaze staan de thoracopoden 1 tot en met 5, en 11 in voor de beweging van het dier, terwijl de andere een aanzuiging van water in de tussenruimten creëren, waarbij voedselpartikels gefiltreerd kunnen worden.

Het filtreerapparaat wordt gevormd door de setulae die op de setae der protopodiet en endiet ingeplant staan op een afstand van 500 nm van elkaar (Schrehardt, 1987b). Louter zeven wordt omschreven als 100 % capteren van de partikels die groter zijn en 0 % van deze die kleiner zijn dan de poriënwiidte van de zeef (Pick, 1966). Filtervoeders kunnen echter ook filtreren volgens andere mechanismen die toelaten dat partikels met een kleinere diameter dan de zeefporiën worden gevangen (Rubenstein en Koehl, 1977). Voorbeelden daarvan zijn de afscheiding van kleverige stoffen die adsorptie van de partikels veroorzaken, of het vertragen van de afkammingsnelheid van de filter zodat een gedeeltelijke verstopping optreedt. Aldus zou de setulaire filter van nauplii (350 nm) en van adulten (500 nm) in staat zijn tot een efficiënte retentie van bacteriën.

Over de wijze waarop de afgefilterde partikels via de voedselgroef de mond bereiken bestaat discussie. Barlow en Sleigh (1980) stellen dat een rostraal gerichte waterstroming aan de basis van de voedselgroef hiervoor verantwoordelijk is. Schrehardt (1987b) daarentegen meent dat bij iedere thoracopodenslag tijdens de herstelfase een extremitetenpaar de partikels van het caudaal gelegen paar afkamt, en vervolgens gedurende de volgende slagfase concentreert met het eigen filtraat. De metachrone beweging geeft aldus een netto voorwaarts voedseltransport. Het samenklitten van de partikels door een secreet van klieren, gelegen aan de basis van de thoracopoden, zou hierbij helpen. De maxillae en maxillulae nemen de voedselpartikels over van het voorste thoracopodenpaar en geven ze via de paragnaatkanalen door aan de getande mandibels. Deze zouden de partikels vermalen en finaal deponeren in de mond die ventraal en onder het labrum gelegen is.

Het spijsverteringsstelsel bestaat uit drie delen : de oesophagus (stomodeum), de middendarm (mesenteron) en de einddarm (proctodeum). De middendarm bezit aan de voorste rand twee laterale, globulaire protrusies : de hepatopancreas of maagcaeca. De darm wordt pas functioneel in het instar II-stadium, na verbinding van proctodeum en mesente-

ron (Anderson, 1967; Schrehardt, 1987a). De terminale anus wordt afgesloten door een sfincter, die functioneert in antagonisme met radiale spieren. De faeces worden omgeven door een peritroof membraan, dat gesecreteerd wordt over de volledige lengte van de middendarm (Reeve, 1963a; Snyder en Wolfe, 1980). Deze chitineuze huls maakt de faecale propjes onverteerbaar en reduceert bovendien de kans op heropname door *Artemia* vanwege het snel bezinken van de gepakte faeces. Het is mogelijk dat de synthesesnelheid van het peritroof membraan de passagesnelheid van het voedsel door de darmtractus limiteert (Reeve, 1963c).

## 2. Filtratie-eigenschappen

Het pekelkreeftje is een continu, niet-selectief maar obligaat partikulair filtrerend organisme.

De koppeling van propulsie, respiratie en filtratie via de thoracopoden resulteert in een continue filtervoeding. Voedselopname wordt echter ontkoppeld bij hoge voedselconcentraties : de mandibels en maxillae stoppen dan hun beweging, de voedselbolus accumuleert achter het labrum en wordt door het eerste thoracopodenpaar terug in het medium geslingerd (Reeve, 1963a; Yanase en Shiraishi, 1972).

Verder vertoont het pekelkreeftje geen specifieke mogelijkheden wat betreft de selectie qua aard of grootte van opneembare partikels. Dit blijkt vooral uit het onderzoek van Reeve (1963b) die suspensies aangeboden heeft bestaande uit diverse wierspecies en zand, en het werk van Dobbeleir *et al.* (1980) die glazen microsferen met een verschillende diameter vervoederd hebben : de distributiepatronen van de partikels in suspensie en van de in de darm opgenomen fractie zijn identisch.

Wat de maximale partikelgrootte betreft die door *Artemia* kan opgenomen worden, vermeldt Takano (1967) dat deeltjes met een grootte van maximum 10  $\mu\text{m}$  opneembaar zijn voor instar II-nauplii. Volgens Dobbeleir *et al.* (1980) zou de opnamelimiet voor instar III-IV larven ongeveer 30  $\mu\text{m}$  en

voor adulten 50  $\mu\text{m}$  bedragen. Deze conclusie, getrokken aan de hand van de gegevens afgebeeld in figuur 7 A & B, lijkt ons echter voorbarig : het nagenoeg samenvallen van de frequentie-distributies van aangeboden en opgenomen partikels bij adulten sluit in feite de opname van partikels groter dan 50  $\mu\text{m}$  niet uit. Het geschikte partikelspectrum kan bovendien verschillend zijn van ras tot ras, gezien de variaties in lichaamsgrootte (D'Agostino, 1980) en andere allometrische kenmerken (Amat, 1980).

*Artemia* voedt zich wel uitsluitend met partikels, ten minste voor het voldoen van zijn proteïne- en koolhydraat-behoefte (D'Agostino, 1980). Zo blijkt dat partiële substitutie van partikulair albumine door opgeloste aminozuren in steriele media resulteert in een 60 maal minder efficiënte opname van de oplosbare fractie. Micronutriënten kunnen aangeboden worden in opgeloste vorm, maar dan wel in zeer hoge concentraties. Mogelijke adsorptie op de gesuspendeerde fractie speelt in de opname slechts een geringe rol (Provasoli en D'Agostino, 1969). In media met een lage concentratie aan opgeloste nutriënten wordt *Artemia* als obligaat fagotroof beschouwd (D'Agostino, 1980).

### 3. Factoren die de voedselopname reguleren

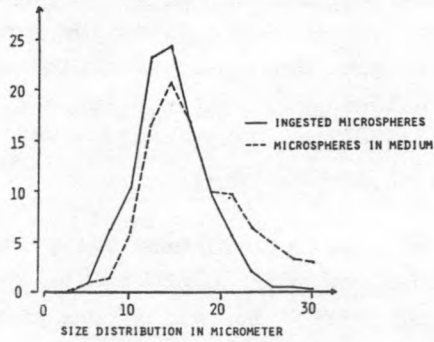
Ondanks de eigenschap van continue filtervoeder kunnen diverse factoren de voedselopname bij *Artemia* beïnvloeden en dit via hun effect op de snelheid van filtratie (F), ingestie (I) en/of assimilatie (A). Voorbeelden hiervan zijn de aangeboden voedselkwaliteit en -kwantiteit, het ontwikkelingsstadium van het organisme, en niet-trofische omgevingsfactoren.

#### Voedselconcentratie

De filtratiesnelheid (F), gedefinieerd als het volume medium dat per tijdseenheid gefiltreerd wordt (Yanase en Shiraishi, 1972), blijft constant bij lage partikelconcentraties (Reeve, 1963a). Vanaf een bepaalde kritische con-

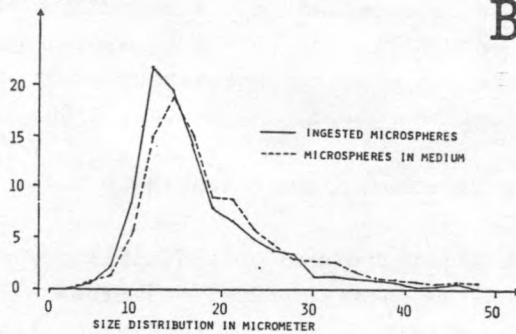


% DISTRIBUTION



A

% DISTRIBUTION



B

Fig. 7 : Frequentiedistributie naar grootte van microsferen aangeboden in het medium (stippellijn) en opgenomen (volle lijn) door instar 3-4 nauplii (A) en adulte *Artemia* (B). (naar Dobbeleir *et al.*, 1980)

centratie  $C_f$  (zie tabel 4), verschillend naargelang de algensoort die als voedsel aangeboden wordt, gaat de filtratiesnelheid echter dalen door de verstopping van de thoracopoden. Hierdoor vermindert immers de slagfrequentie van de thoracopoden (Reeve, 1963a; Yanase en Shiraishi, 1972; Braun, 1980; Nimura, 1980). Minimum celconcentraties zijn praktisch nergens vermeld in de literatuur. Enkel Tobias *et al.* (1979) geven een minimum densiteit van 4 600 *Chaetoceros c.* cellen per ml op als laagste waarde waarop filtratie van cellen nog kan plaatsvinden.

De talrijke studies naar de relatie tussen de voedselopnamesnelheid (I) en partikeldensiteit bij *Artemia* leverden bijna steeds een saturatiecurve op, wat typisch is voor filtervoeders (Sushchenya, 1962; Reeve, 1963a; Yanase en Shiraishi, 1972; Samain *et al.*, 1975; Pechen'-Finenko *et al.*, 1978).  $I_{\max}$  wordt bij het pekelkreeftje bepaald door de fysische limieten van de voedselopname en aldus door het totaal opgenomen volume aan voedselpartikels (Reeve, 1963a, b; Yanase en Shiraishi, 1972; Sick, 1976). Voor copepoden is een acclimatisatie-hypothese voorgesteld, waarbij  $I_{\max}$  afhankelijk is van het niveau van de spijsverteringsenzymes, dat op zijn beurt in verband staat met het kwantitatieve voedselaanbod tijdens de voorgaande periode (Mayzaud en Poulet, 1978).

Kritische celconcentraties en maxima voor de parameters F en I, verkregen bij het voederen van *Artemia* met verschillende partikels, worden weergegeven in tabel 4. De kritische celconcentraties voor I en F (respectievelijk  $C_i$  en  $C_f$ ) kunnen samenvallen (Yanase en Shiraishi, 1972; Nimura, 1980) of onderling verschillen (Reeve, 1963a). Deze laatste auteur vond dat de filtratiesnelheid reeds daalde voordat een maximale voedselopname bereikt werd.

Tabel 4 : Voedselopnamesnelheid en filtreersnelheid bij *Artemia*

Auteur	Temperatuur (°C)	<i>Artemia</i> ras; stadium; lengte; droog-(DW) of natgewicht (WW)	Voedseltype (aard, diameter of volume)	Ci (10 <sup>3</sup> cellen per ml)	Cf (10 <sup>3</sup> cellen per ml)	I <sub>max</sub> (10 <sup>6</sup> /24u per dier)	F <sub>max</sub> (ml/24u per dier)
Sushchenya (1962)	20	?; juveniel; 0,175g DW ?; adult; 0,590g DW	gist gist	1200		10,08	
				1200		33,60	
Reeve (1963a)	20	GSL; 0,5 mm 1 mm 2 mm 5 mm 7,5 mm 10 mm 10 mm	<i>Phaeodactylum</i> (113 μm <sup>3</sup> ) " " " " " <i>Dunaliella</i> (345 μm <sup>3</sup> ) <i>Chlorella</i> (31 μm <sup>3</sup> )	220	160		
				180	90		
				210	100		
				120	55		
				145	70		
				160	15	9,6	
						3,6	
		36					
Reeve (1963b)	20	GSL; 9 mm 9 mm	zand (3-40 μm ) <i>Phaeodactylum</i>		1000	9,6	
					50	13	
Nimura (1967, 1980)	28	SFB; 5 mm	<i>Chlamydomonas</i> (10-15 μm x 6-9 μm)		120	7	
Sushchenya (1970)	25	?; 4,2g WW	<i>Dunaliella</i>				2,15 mg WW

Yanase en Shiraishi (1972)	20	?; 11 mm ?; 11 mm	<i>Chaetoceros</i> (46 $\mu\text{m}^3$ ) <i>Dunaliella</i> (251 $\mu\text{m}^3$ )	400 30	400 30	14,4 0,96	408 408
Sick (1976)	25	?; 5 mm ?; 5 mm	<i>Chlamydomonas</i> (1017 $\mu\text{m}^3$ ) <i>Chlorella</i> c. (14 $\mu\text{m}^3$ )	170		0,31 20,4	
Braun (1980)	20	?; nauplius ?; juveniel ?; preadult ?; adult	<i>Phaeodactylum</i> " " "				0,8 17 35-37 60-70

$I_{\text{max}}$  = maximale voedselopnamesnelheid

$F_{\text{max}}$  = maximale filtratiesnelheid

$C_i$  = kritische celconcentratie voor maximale voedselopname

$C_f$  = kritische celconcentratie voor maximale filtratie

? = niet vermeld door auteur

## Voedseltype

Uit tabel 4 blijkt duidelijk dat, naargelang het type voedsel dat beschikbaar is, de voedselopname-eigenschappen (I) variëren; de filtratiesnelheid (F) daarentegen blijft stabiel (Reeve, 1963a). In feite is dit te wijten aan het verschil in volume van de diverse wiercellen en is het maximum opneembaar volume per individu wel hetzelfde ( $470 \times 10^5 \mu\text{m}^3/\text{u}$  bij  $20^\circ\text{C}$ : Reeve, 1963a): "... the upper limit to the amount of food ingested seems to be largely mechanical..." (Conover, 1964). Yanase en Shiraishi (1972) daarentegen detecteerden toch nog hogere waarden ( $\times 2,5$ ) in opgenomen volumes voor de kleinere *Chaetoceros* cellen dan voor *Dunaliella*.

Conover maakte in 1964 de veronderstelling dat de samenstelling van de voedselpartikel de voedselopname kan reguleren. Dit werd voor *Artemia* aangetoond door kweekexperimenten met eenzelfde wiersoort (*Tetraselmis suecica*), maar gekweekt in verschillende omstandigheden zodat de eiwit- en koolhydraatgehaltes verschilden. *Artemia*, gekweekt op wiercellen rijk aan eiwitten, nam deze cellen tegen een lagere snelheid op dan wanneer gevoed met de minder eiwitrijke wieren. Finaal werd in beide gevallen bijna eenzelfde hoeveelheid proteïnen opgenomen (Samain et al., 1981). De eiwitopname is hier blijkbaar de factor die de ingestie bepaalt. Regulatie van voedselopname in functie van chemische samenstelling van het dieet, zoals hier gedemonstreerd, steunt mogelijk op een saturatie gestuurde feed-back regulatie.

Ontwikkelingsstadium van *Artemia*

Diverse studies (Tabel 4) toonden aan dat zowel F als I afhankelijk zijn van de ouderdom van de pekelkreeften (Reeve, 1963a; Nimura, 1963, 1980; Yanase en Shiraishi, 1972; Sick, 1976; Braun, 1980). "Brine shrimp could ingest enormously large amounts of food in a day: 3, 5 and 10 mm shrimp could ingest 794, 282 and 102 % of their body mass, respectively" (Nimura, 1980). De toename van filtratie-

snelheid en filtreerefficiëntie vanaf het instar VIII-stadium wordt verklaard door de vervanging van het antennale filtreerapparaat door het efficiëntere, thoracopodale systeem (Reeve, 1963a, Yanase en Shiraishi, 1972; Tobias *et al.*, 1979; Brune en Anderson, 1986). Brune en Anderson (1984) wijten de groeiverschillen binnen eenzelfde *Artemia* cohort toe aan de verschillen in ontluikingstijd waardoor de eerst ontloken larven vlugger een hogere filtreerefficiëntie halen. Volgens Braun (1980) verdubbelt F (36 ml/preadult/dag) en neemt I met meer dan 30 % toe bij de transitie van juveniel naar adult. Wel daalt F opnieuw met de ouderdom van adulten. Ook Reeve (1963a) observeert variaties voor F en I bij adulten en schrijft die toe aan de reproductie-activiteit.

De minimale concentratie voor maximale voedselopname ( $C_i$ ) is niet afhankelijk van het ontwikkelingsstadium (Sushchenya, 1962; Reeve, 1963a), in tegenstelling tot  $C_f$ , die varieert volgens de capaciteit van het filtreerapparaat en aldus afneemt met de lengte (Reeve, 1963a; Nimura, 1980). Opmerkelijk is wel dat de minimale concentratie voor filtratie onafhankelijk is van het stadium (Tobias *et al.*, 1979).

#### Niet-trofische omgevingscondities

Nimura (1963) stelde geen effect vast van de saliniteit van het kweekmedium op I en F tussen 25 en 100 g/l, terwijl Braun (1980) een lagere filtratiesnelheid rapporteerde bij een zoutgehalte van 17 g/l ten opzichte van 35 g/l. Een temperatuursdaling van 5 °C binnen het interval 15-25 °C geeft een afname van F en I met 30 tot 40 %, en dit voor alle ontwikkelingsstadia en onafhankelijk van de voedseldensiteit (Yanase en Shiraishi, 1972). De grootte van het experimentele vat kan eveneens de filtratiesnelheid beïnvloeden (Braun, 1980). Dit 'volume-effect' werd tevens gedemonstreerd voor copepoden (Cushing, 1958; Anraku, 1963). Nimura daarentegen detecteerde dit effect niet bij het

pekelkreeftje en weet dit aan "... the smooth swimming of the shrimp..., while copepods swam in a jerkey way".

Bij de intensieve kweek van *Artemia* dient men bovendien rekening te houden met het dalen van de filtreerefficiëntie door de agitatie van het kweekmedium, dit als gevolg van het verlies van partikels uit de voedselgroef (Bond, 1933; Nimura 1967). De waterkwaliteit is eveneens belangrijk daar vanaf 100 µM ammoniak de voedselopname wordt gereduceerd tot 1/3 à 1/2 van de normale intensiteit (Hanaoka, 1977). Tenslotte hangt de filtratiesnelheid ook af van de densiteit aan *Artemia* in het kweekstelsel (Nimura, 1980) : die blijkt maximaal te zijn bij 20 dieren per liter (Braun, 1980).

#### 4. Factoren die de assimilatie-efficiëntie regelen

De mate van assimilatie van het opgenomen voedsel zal begrijpelijkerwijze de groei sterk beïnvloeden. Tabel 5 is een compilatie van de literatuurgegevens met betrekking tot groei- en/of assimilatie-efficiënties voor de diverse stadia van *Artemia*. De hoge variatie voor de efficiëntie waarmee opgenomen voedsel in dierlijke biomassa omgezet wordt, is gedeeltelijk te wijten aan verschillen in toegepaste analysetechnieken of uitdrukkingvormen.

Volgende termen kunnen aangewend worden (Conover, 1964) :

$$\text{Assimilatie-efficiëntie} = \frac{A}{I} \times 100$$

$$\text{Bruto groeiefficiëntie} = \frac{G}{I} \times 100$$

$$\text{Netto groeiefficiëntie} = \frac{G}{A} \times 100$$

Met I = gewicht of energie opgenomen

A = gewicht of energie geassimileerd

G = gewicht of energie geïnvesteerd in groei

Tabel 5 : Overzicht van literatuurgegevens in verband met bruto groei- en assimilatie-efficiëntie bij *Artemia*

Auteur	Voedsel	<i>Artemia</i> ras en stadium	Groei-(*) of assimilatie-efficiëntie **(%)
Gibor (1957)	<i>Dunaliella viridis</i>	?; dag 1-9	11-53 *
Sushchenya (1962)	Gist	?; groei tot 0,107 à 162 mg DW	33-78 **
Mason (1963)	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	SFB; verschillende stadia Mono Lake; adult	8,7-20 * 12-22 **
Reeve (1963d)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	GSL; verschillende stadia	tot 79 *
Sushchenya (1970)	<i>Dunaliella salina</i> <i>Ankistrodesmus</i>	? ?	66 ** 57-70 **
Sick (1976)	<i>Chlorella conductrix</i> <i>Chlamydomonas sphagnicolo</i>	?; gemiddelde voor 0,95 5 en 6,3 mm	11 ** 59 **
Braun (1980)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	?; adult ; nauplius	37-38*; 91-92** 21*; 56**
Nimura (1980)	<i>Chlamydomonas sp.</i>	SFB; groei tot ± 7 mm	20-52 *
Samain et al. (1980)	<i>Tetraselmis suecica</i>	SFB; dag 1-26	12-60 *

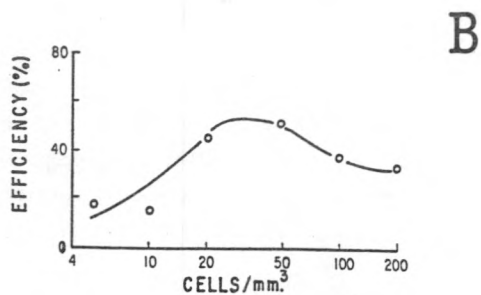
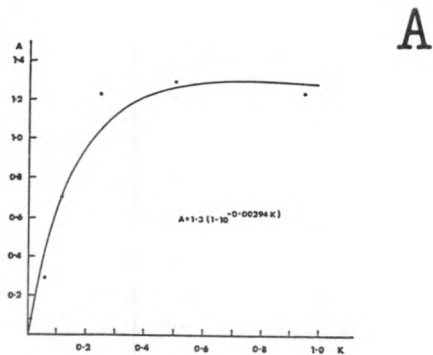
? = niet vermeld door auteur



Bij *Artemia* wordt de efficiëntie van de spijsvertering beïnvloed door enerzijds de per tijdseenheid opgenomen hoeveelheid voedsel en anderzijds de enzymactiviteit. Wanneer de voedselopname (I) varieert, resulteert dit in twee antagonistische effecten. Enerzijds het kwantiteitseffect daar meer of minder voedsel per tijdseenheid blootgesteld wordt aan vertering, anderzijds het retentie-effect daar de inwerkingsduur van de enzymes varieert met de retentietijd van het voedsel in de darm. Zolang het eerste effect doorweegt op het tweede kan de netto assimilatiesnelheid toenemen met de celconcentratie in het kweekmedium (Reeve, 1963a,d).

Dit wordt bevestigd door de theoretische benadering van Khmeleva in Sushchenya (1970) (Fig. 8A). Vanaf een bepaalde concentratie daalt de assimilatie-efficiëntie en stagneert pas als de maximale opnamesnelheid ( $I_{\max}$ ) bereikt wordt (Reeve, 1963d) (Fig. 8B). Dat te hoge wierdensiteiten finaal in een slechtere groei resulteerden, werd tevens waargenomen door Gibor (1957), Reeve (1963d), Mason (1963), Takano (1967) en Nimura (1980). Reeve (1963a) en Provasoli en D'Agostino (1969) concludeerden hieruit dat indien de retentietijd van het voedsel in de darm te kort is in feite uithongering optreedt wat de geringe groei verklaart.

Voor een moeilijk verteerbaar voedsel verwachten we dat het retentie-effect reeds bij relatief lage concentraties een rol zal spelen. Zo vond Sick (1976) een lage assimilatie- en groeiefficiëntie bij maximale opname van *Chlorella conductrix* door *Artemia*, terwijl met andere wieren veel hogere waarden bekomen werden, niettegenstaande het feit dat eenzelfde volume wieren per tijdseenheid werd opgenomen. Deze auteur schreef de geringe nutritionele waarde van *Chlorella* toe aan de moeilijk verteerbare celwand. De specifieke enzymes nodig voor de celwandvertering zullen inderdaad een langere inwerkingstijd nodig hebben om een dikke wand te verteren. Bij overschrijding van een bepaalde celconcentratie wordt deze kritische retentietijd niet meer bereikt en zullen de assimilatie-efficiëntie en de groei abrupt afnemen, terwijl een optimaal voedsel bij



**Fig. 8 : Relatie tussen assimilatie en voedselconcentratie bij adulte *Artemia*.**

A. Assimilatie (A) uitgedrukt in mg voedsel per dier per dag en concentratie K in g natgewicht *Dunaliella* per liter (naar Sushchenya, 1970)

B. Assimilatie-efficiëntie in functie van celconcentratie (naar Reeve, 1963d)

een hogere voedselopnamesnelheid toch nog een maximale groei garandeert.

In verband met deze theorie van retentie-effect dient toch opgemerkt te worden dat de gegevens omtrent faecale produktie hiermee niet lijken overeen te stemmen. Volgens Reeve (1963c) zouden immers het aantal en het volume aan 'faecal pellets' geproduceerd per dier en per dag (1-2 voor larven, 10 voor adulten) niet variëren met verschillende voedsels en/of partikelconcentraties. Hieruit zou kunnen afgeleid worden dat de retentietijd in feite weinig fluctueert. Wat echter wel een invloed kan hebben, is de enzymactiviteit (zie verder).

De assimilatie-efficiëntie is verder nog gecorreleerd met temperatuur (optimum =  $\pm 30$  °C) en saliniteit (optimum = 35 g/l) (Reeve, 1963d), en tevens met de ontwikkelingsfase van *Artemia*. Zo bereikt de assimilatie tijdens de exponentiële groeifase maximale waarden, die tot 79 % kunnen oplopen en die corresponderen met de hoge voedselbehoefte gedurende deze periode, terwijl ze gedurende de stationaire fase stabiliseert op een lagere 'reproductie-efficiëntie' (Reeve, 1963d; Samain *et al.*, 1980).

Zoals hoger reeds aangestipt krijgt de enzymactiviteit een belangrijke regulerende rol toegemeten in de voedselasimilatie bij *Artemia*. Deze wordt echter op haar beurt beïnvloed door de samenstelling van het voedsel alsook de partikelconcentratie. Hanaoka (1973) en Sick (1976) stelden dat de groei positief gecorreleerd is met het gehalte aan ruw eiwit in the dieet. Zo werd bij pekelkreeftlarven, gekweekt op *Tetraselmis* bij concentraties hoger dan  $38 \times 10^3$  cellen/ml, achtereenvolgens een saturatie en een daling van de specifieke amylase en protease-activiteit gemeten (Samain *et al.*, 1975). De impact van de voedselkwaliteit op de enzymactiviteit is nagegaan met twee *Tetraselmis suecica* diëten die verschillen in biochemische samenstelling. Niettegenstaande de verschillen in opname van koolhydraten (tot een factor 12) en proteïne is de groeisnelheid op

beide wierculturen identisch. Significante verschillen in de enzymactiviteiten tussen beide groepen wijzen op een inverse relatie tussen de opname van koolhydraten en eiwitten, en het niveau van respectievelijk amylase en trypsine. Het uitbalanceren van de opname van een component en de activiteit van het corresponderend enzym resulteert aldus in een constante assimilatie die beantwoordt aan de vereisten van het dier (Samain *et al.*, 1981).

Een mechanisme dat de enzymrespons op de dieetsamenstelling verklaart, werd door de onderzoeksgroep van Samain als volgt voorgesteld. Koolhydraten en proteasen zouden gereguleerd worden op basis van de hemolymfe-concentraties aan suikers, respectievelijk aminozuren en oplosbare proteïnen, welke gehandhaafd worden op een niveau overeenkomstig de momentane behoeftes van het dier. Daling onder dit niveau heeft enzyminductie tot gevolg, overschrijding ervan repressie. De eerste afbraakprodukten, die ontstaan ten gevolge van residuele enzymactiviteit in de darm, vormen de signalen voor de detectie van bepaalde componenten van de voedselbolus en zijn noodzakelijk voor het op gang brengen van de enzymrespons (Samain *et al.*, 1985; Samain, persoonlijke mededeling, 1987).

##### 5. *Nutritionele behoeften*

Een compilatie van de literatuurgegevens hieromtrent is terug te vinden in het overzichtswerk van D'Agostino (1980). Provasoli en D'Agostino (1969) stelden als eersten een volledig artificieel, axenisch kweekmedium samen voor *GSL Artemia*. De optimale koolhydraat:eiwit verhouding voor *Artemia* valt tussen 5 en 3:1 wat waarschijnlijk atypisch is voor Crustacea (Conklin en Provasoli, 1978). Bij hoge saliniteiten dalen echter de behoeftes aan energieleverende componenten (zetmeel, lecithine) en AMP, en verhoogt de eiwitvereiste (Hernandorena, 1974a, 1975). Dit ten gevolge van een omwisseling van energiebron, namelijk het vervangen van de koolhydraten en vetten door niet-essentiële aminozuren zoals glutaarzuur, alanine, glycine en threonine. In

functie van de temperatuur wijzigen zich de verhoudingen tussen de AMP, eiwit- en koolhydraatvereisten voor een optimale groei (Hernandorena, 1976). Wolvekamp en Waterman (1960) verklaren dan ook dat "... in adult *Artemia* metabolism is fueled opportunistically with carbohydrates, proteins or lipids depending on their availability".

Voor Crustacea worden de volgende aminozuren als essentieel beschouwd : arginine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptofaan en valine (Claybrook, 1983). Voor methionine en tryptofaan werd dit experimenteel bevestigd voor *Artemia* (Kanazawa et al., 1982; Hernandorena, 1987).

Gebruik makend van artificiële kweekmedia kon eveneens de noodzaak van exogene nucleotiden aangetoond worden; zo hebben Clegg et al. (1967) aangetoond dat *Artemia* niet in staat is tot *de novo* synthese van de purine-ring. Polyploïde rassen vereisen bovendien meer nucleotiden (Hernandorena, 1983). Thymidine kan echter worden gesynthetiseerd uit folinezuur, dat essentieel is in de voeding (Hernandorena, 1972a). Deficiënte nucleotidenconcentraties of -verhoudingen in het dieet leiden tot een abnormale morfogenese (Hernandorena, 1972a,b; 1974a). Bij afwezigheid van pyrimidines, waarvan de *de novo* synthese gelimiteerd is, blijkt de overleving bij *Artemia* bepaald te worden door de beschikbaarheid van purines. Bij een constante koolhydraat : proteïne ratio is daarenboven de groei afhankelijk van de purine : pyrimidine verhouding (Hernandorena, 1983).

Net zoals alle Crustacea is het pekelkreeftje niet in staat tot synthese van de sterol-kern (Dadd, 1970). Cholesterol kan als exogene bron in artificiële kweekmedia partieel gesubstitueerd worden door ergosterol, stigmasterol en beta-sitosterol. De bioconversie van deze fytosterolen in cholesterol werd aangetoond door Teshima en Kanazawa (1971).

De vitamines die essentieel zijn voor een normale ontwikkeling zijn in volgorde van belangrijkheid : thiamine, pyridoxamine, riboflavine, nicotinezuur, pantotheenzuur, aminobenzoëzuur, biotine, putrescine (d.i. uniek binnen de Crustacea) en folinezuur (Provasoli en D'Agostino, 1962; D'Agostino, 1980). Carnitine, inositol en choline zijn niet essentieel maar beïnvloeden, net als de hoogwaardige onverzadigde vetzuren, wel de fecunditeit (Provasoli en Pintner, 1980; Kanazawa *et al.*, 1982).

Naargelang het geografisch ras kunnen substantiele verschillen gedetecteerd worden in de nutritionele behoeftes (Gibor, 1956). Het artificieel medium van Provasoli en Pintner (1980) b.v. voldeed voor het Great Salt Lake ras maar liet geen groei toe van de Comacchio-populatie uit Italië.

#### 6. *Geschikte Artemia diëten*

Gezien de niet-selectieve filtratie-eigenschappen van *Artemia*, komt een enorme diversiteit van producten in aanmerking als potentieel geschikt kweekvoeder : zo b.v. microalgen, bacteriën en gisten ('Single Cell Proteins', SCP), en bijprodukten van landbouwgewassen. Het opsporen van hun nutritionele geschiktheid voor *Artemia* is echter geen simpele zaak daar het moeilijk is om groeiexperimenten onder axenische omstandigheden uit te voeren; dit is zonder (nutritionele) interferentie met een gediversifieerde microflora die nieuwe nutriënten kan aanbrengen (D'Agostino, 1980). Daarbij mogen we ook én de produktiekost én de toepassing van *Artemia* kweek op grote schaal niet uit het oog verliezen, in feite twee belangrijke criteria daar de nutritionele behoeftes van *Artemia* blijkbaar toch afhankelijk zijn van de situatie. Dit wordt vooral duidelijk wanneer de invloed van bacteriën op het kweekproces belicht wordt.

## Interferentie van microorganismen

Bacteriën en protozoa kunnen essentiële nutriënten biosynthetiseren op basis van het aangeboden organisch materiaal en aldus mogelijke deficiënties in de dieetcompositie compenseren. Zo observeerde Gibor (1956) een geringere groei van *Artemia* wanneer gevoed met wieren onder axenische versus xenische culturomstandigheden. Ook met gisten en gedroogde algen werd dit effect geconfirmeerd bij *Artemia* en bij andere invertebraten (Hirayama en Watanabe, 1973; Hirayama en Funamoto, 1983; Douillet, 1987; Langis *et al.*, 1988). Dit fenomeen is wellicht nog kritischer voor de landbouwafvalvoedsels, waarvan de samenstelling waarschijnlijk niet voldoet aan de nutritionele vereisten : "...success of such cultures is strictly dependent of the instantaneous establishment of a microflora fortuitously harmless to the *Artemia* and supplemental to the nutrient deficient natural products... Neither the latter nor the microbes alone can provide adequate sustenance for *Artemia*..." (Jahnig, 1977). Dit wordt bevestigd door de studie van Douillet (1987) die verder aantoonde dat het enten van axenische culturen met microorganismen van goede, xenische kweektanks resulteerde in een betere groei.

Het positieve effect van microorganismen is overigens niet beperkt tot supplementatie van nutriënten via het dieet. De bacteriële microflora speelt ongetwijfeld een niet te onderschatten rol in de vertering van het opgenomen voedsel (Dussart, 1966). Post en Youssef (1977) vonden een procaryote symbiont in het darmepitheel van *Artemia* afkomstig van Great Salt Lake (Utah) maar konden geen functionele verklaring geven. Tenslotte kan de epiflora van het exoskelet een functie uitoefenen in de opname van opgeloste nutriënten (Anderson en Stephens, 1969).

Negatieve effecten kunnen het gevolg zijn van het voorkomen van pathogene bacteriën en schimmels (Tyson, 1974; Solangi *et al.*, 1979; Gunther en Catena, 1980;

Johnson, 1983) of van een explosieve microbiële ontwikkeling in het kweekmedium. Een hoge bacteriële belasting leidt tot daling van het zuurstofgehalte, daling van de pH ten gevolge van overmaat aan CO<sub>2</sub> (toxisch voor Crustacea : Wolvekamp en Waterman, 1960), accumulatie van (eventueel toxische) metabolieten, enz... Tenslotte zal de competitie voor de voedselbron zeker ook de voedselconversie-efficiëntie negatief beïnvloeden.

#### Levende microalgen

Een massa publikaties berichten over de groei van *Artemia* op talloze wiersoorten; een overzicht van de resultaten van monoxenische kweekexperimenten is gegeven in het overzichtswerk van D'Agostino (1980). Daar de nutritionele geschiktheid (b.v. eiwitgehalte) van het algenspecies echter afhankelijk is van de kweekomstandigheden (Landau *et al.*, 1985; Becker, 1986), heeft het weinig zin hierop verder in te gaan. Wel belangrijk is dat sommige wiersoorten niet geschikt zijn ten gevolge van specifieke karakteristieken zoals een onverteerbare, dikke celwand (b.v. *Stichococcus* : Gibor, 1956; *Chlorella* : Sick, 1976), een gelatineachtige substantie die interfereert met de opname (Takano, 1967), of de secretie van toxische bestanddelen (b.v. dinoflagellaten : D'Agostino, 1980).

Indien het wierspecies geschikt is, mag wel gesteld worden dat "...as far as growth rate and production are concerned, best results have always been achieved with a diet of live algae" (Dobbeleir *et al.*, 1980). De massakweek van geschikte wieren als voedselbron voor *Artemia* blijkt echter economisch niet realiseerbaar zodat slechts in bepaalde gevallen, waar de wierproduktie een nevenfacet is van de eigenlijke activiteit, dit dieet kan overwogen worden.

Verschillende commercieel beschikbare, maar erg prijzige algenmeelsoorten zijn geëvalueerd als potentieel voer voor het pekelkreeftje en geven goede kweekresultaten



indien culturomstandigheden (vooral waterkwaliteit) optimaal gehouden worden :

*Scenedesmus* (Sorgeloos, 1973a)

*Spirulina* (Bossuyt, 1976; Cognie, 1976; Person-Le Ruyet, 1976a; Paulsen, 1978)

*Gracilaria* (Klein en Ibarra Su, 1986)

Naast de hoge kostprijs (> 500 BF/kg), blijken deze producten echter ook het kweekmedium te belasten : een gedeelte van de proteïnes komt vrij en zorgt voor hoge  $\text{NH}_3$ -gehaltenes.

#### Single Cell Proteins (SCP)

SCP zijn microbiële cellen of biomassa die doelbewust gekweekt worden om hun eiwitgehalte. In eerste instantie lijken zij een goed alternatief voor wieren, en dit niet enkel voor *Artemia* kweek, maar ook voor toepassing met diverse andere aquacultuurorganismen (b.v. rotiferen, bivalven, penaeïden en vissen). In vele gevallen gelden volgende voordelen :

- kleine celgrootte (< 20  $\mu\text{m}$ )
- nutritionele samenstelling is vrij compleet (Tabel 6);
- celwanden verhinderen dat opgeloste nutriënten vrijkomen en het kweekmedium pollueren;
- commercieel en universeel beschikbaar aan aanvaardbare kostprijzen (o.a. gebruik in veevoeders : Pepler en Stone, 1976; Litchfield, 1980).

Ondanks deze voordelen garanderen SCP-diëten niet altijd goede kweekresultaten met *Artemia* of andere cultuurorganismen. Laboculturen werden in stand gehouden met verse of 'instant' bakkers- en brouwerijgist door o.a. Bond (1937), Weisz (1946), Bowen (1962 en later), Browne (1980 en later), enz... Shimaya *et al.* (1967) en Kawano *et al.* (1976) evalueerden een aantal mariene gisten voor biomasakweek en bekwamen adulten na 10 tot 14 dagen met overlevingscijfers variërend van 10 tot 80 %. Bij voeding van een mariene gist aan een *Artemia* ras uit Thailand werd een maximale groei en overleving opgetekend tot dag 8; na-

Tabel 6 : Gehaltes aan essentiële aminozuren (in g per 15 g N) en vitamines (mg/kg) in enkele SCP (gekweekt op diverse substraten) in vergelijking met tarwe, ei en de optimale waarden voorgesteld door FAO (naar Vandamme en Demey, 1980)

SCP	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (melasse)	<i>Kluyveromyces fragilis</i> (wort)	<i>Candida utilis</i> (sulfitloog)	<i>Candida lipolytica</i> (gas-olie)	Tarwe	ei	FAO
<b>AMINOZUUR</b>							
Lysine	7,7	8,8	7,1	7,8	2,8	6,5	4,2
Threonine	4,8	5,5	6,2	5,4	2,9	5,1	2,8
Methionine	1,7	1,5	1,6	1,6	1,5	3,2	2,2
Cystine	-	?	0,4	0,9	2,5	2,4	2,0
Tryptofaan	1,0	1,5	1,5	1,3	1,1	1,6	1,4
Isoleucine	4,6	5,5	6,0	5,3	3,3	6,7	4,2
Leucine	7,0	9,9	9,1	7,8	6,7	8,9	4,8
Valine	5,3	6,6	7,3	5,8	4,4	7,3	4,2
Fenylalanine	4,1	3,9	5,3	4,8	4,5	5,8	2,8
<b>VITAMINE</b>							
Thiamine	10 - 150	50 - 360	3 - 5	3 - 5			
Riboflavine B2	10 - 85	36 - 42	20 - 90	120 - 140			
Pyridoxine B	20 - 65	25 - 100	15 - 60	10 - 15			
Vitamine B12	-	-	-	0,01 - 0,05			
Biotine	1 - 36	5 - 18	2,3	-			
Nicotinezuur	200 - 700	320 - 1000	200 - 500	250 - 400			
Pantotheenzuur	70 - 280	100	100 - 190	100 - 160			
Foliumzuur	20 - 80	15 - 80	3 - 30	5			
Inositol	3000 - 5000	4000 - 5000	3000	800 - 3000			
Choline chloride	2000 - 5000	4000 - 5000	2100	2000 - 6000			

dien vertraagde de verdere ontwikkeling merkelijk en werd het volwassen stadium niet bereikt indien geen sojaboonmeel toegevoegd werd (Nimmannit en Assawamunkong, 1985). Mariene *Candida* gaf in grote kweektanks (5-10 m<sup>3</sup>) biomassa-opbrengsten tot 7 kg/m<sup>3</sup> natgewicht *Artemia* in 14 dagen (James et al., 1987). Dendrinos en Thorpe (1986 : persoonlijke communicatie) beweerden echter dat dit een slecht groeidieet is voor *Artemia*. Ook *Rhodotorula* leverde geringe produkties op in renbaan-kweeksystemen (Johnson, 1980). Talloen (1978) evalueerde 1:1 mengsels van bakkersgist met afvalvoedsels en verkreeg adulte dieren na 11 tot 13 dagen. Andere mengdiëten van bakkers- of brouwerijgist met *Spirulina* of tarwemeel gaven evenzeer goede kweekresultaten (James en Makkeya, 1981; Robin et al., 1981; Canler, persoonlijke mededeling). Supplementatie met DL-methionine, choline of een vitaminepremix verbeterde volgens de groep van Robin gevoelig de groei op methanol gist (IFP).

Levende bacteriën blijken volgens D'Agostino (1980) ongeschikt. Seki (1964) vond dat de groei van het pekelkreeftje op een *Achromobacter* cultuur enkel mogelijk was indien ook protozoa aanwezig waren die mogelijk een nutritionele deficiëntie compenseerden. Yasuda en Taga (1980) daarentegen bekwamen met *Acinobacter sp.* bijna even goede kweekresultaten als met *Chlamydomonas*. Suhair et al. (1982) gebruikten een microbiële detritus, gevormd door groei van chitinovore bacteriën op afvalprodukten, en verkregen na twee weken kweek adulten. De overleving bedroeg echter slechts 25 %, waarschijnlijk als gevolg van de accumulatie van ammoniak in het water.

Als besluit van dit summier gehouden literatuuroverzicht in verband met SCP kunnen we stellen dat de toepassing van bacteriën en gisten als kweekvoedsel niet zo evident is als men op het eerste zicht zou kunnen vermoeden. Eerst en vooral zijn er aanwijzingen dat SCP nutritionele deficiënties vertonen voor *Artemia*. Het ineensstorten van aanvankelijk goed gestarte culturen op gisten als monodieet, positieve effecten bij supplementatie, en

succesvolle kweken op samengestelde SCP-diëten staven deze hypothese. Ook de voederexperimenten met SCP voor rotiferen (Hirayama en Watanabe, 1973) en regenboogforellen (Beck et al., 1978) wijzen in dezelfde richting. Het gebruik van gisten als voedsel voor bivalven (Epifanio, 1979; Urban en Langdon, 1984) en vissen (Beck et al., 1978; Johnson et al., 1980) heeft bovendien nog een tweede probleemstelling opgeleverd die naar alle waarschijnlijkheid ook voor *Artemia* opgaat, namelijk de moeilijke verteerbaarheid van diverse SCP. De dikke celwand, en meer specifiek de samenstelling ervan (Farkas, 1985), blijkt een moeilijk te overwinnen hindernis te zijn om de nutritieve cytoplasmatische inhoud te kunnen aanspreken (Coutteau et al., 1989).

#### Droge voeders op basis van bijprodukten van de landbouw

Weinig oplosbare restprodukten van de verwerking van landbouwgewassen of voedingsindustrieën (b.v. rijstvoerschroot, sojapellen, lactoserum, suikerrietmolasse) blijken geschikt te zijn als *Artemia* voeder en hebben als belangrijke voordelen dat ze goedkoop en in grote hoeveelheden beschikbaar zijn (Dobbeleir et al., 1980, Sorgeloos et al., 1980). Experimenten uitgevoerd in intensieve kweeksystemen in Indonesië en de Filipijnen toonden reeds eind de jaren '70 aan dat hoge biomassaproducties bereikt konden worden (Sorgeloos, 1975; Talloen, 1978). Wel is het noodzakelijk de fractie groter dan 50  $\mu\text{m}$  af te zeven voor gebruik. Ofwel dient een micronisatieproces (dit is een specifieke en relatief dure maaltechniek) aangewend te worden zodat partikelgroottes hoofdzakelijk kleiner dan 70  $\mu\text{m}$  verkregen worden en geen voorsortering van het eindprodukt meer dient te gebeuren. Zo leverden testen met gemicroniseerd rijstvoerschroot in renbaankweeksystemen biomassaproducties op van 2 tot 5 kg natgewicht per  $\text{m}^3$  in 14 d bij een bruto voedselconversie-efficiëntie van ongeveer 1 (Bossuyt en Sorgeloos, 1980; 1981). Analoge proeven, maar uitgevoerd in doorvloeï-omstandigheden, leverden zelfs oogsten op tot 25 kg natgewicht per  $\text{m}^3$  na 2 weken (Brisset et al., 1982), wat

vergelijkbaar is met de produktie cijfers bekomen met levende algen (Tobias *et al.*, 1979).

### Microcapsules

Een tweetal publikaties vermelden de toepassing van artificiële diëten onder vorm van microcapsules als voedselbron voor *Artemia* (Jones *et al.*, 1974; Kanazawa *et al.*, 1982). Dergelijke diëten hebben als uitgesproken voordeel dat ze nutritioneel meer compleet zijn en dat er geen afbraak in het milieu zou plaatsvinden. Toch werden slechts lage overlevingscijfers (20 tot 35 %) gehaald en was de groei maar matig (groei-index 7 en 13) na 18 dagen kweek (respectievelijk Jones *et al.*, 1974 en Kanazawa *et al.*, 1982). Bovendien zijn microcapsules heel duur zodat commerciële toepassing voor *Artemia* produktie niet overwogen wordt.

#### III.1.3. Densiteit aan *Artemia*

In tegenstelling tot andere vertegenwoordigers van de Crustacea wordt bij *Artemia* de groeisnelheid weinig beïnvloed door de densiteit aan dieren in het kweekmilieu. Kweeksystemen zonder of met waterverversing kunnen zonder problemen startdensiteiten aan tot respectievelijk 5 000 (Bossuyt en Sorgeloos, 1981) en 18 000 (Tobias *et al.*, 1979) larven per liter. Kritische maximumdensiteiten werden tot op heden nog niet gerapporteerd. Blijkbaar treden er geen gedragsinterferenties op zoals dit wel het geval is voor de meeste andere pelagische Crustacea (b.v. zoetwater-Anostraca, Copepoda,...)

#### III. 1.4. Keuze van geschikte *Artemia* rassen

Raskeuze daarentegen is wel een belangrijke factor die interfereert met de biomassa-produktie. Immers, de groeisnelheid van de nauplii is verschillend van ras tot ras (Gilchrist, 1960; Sorgeloos, 1975; Tobias *et al.*, 1980; Vos en De la Rosa, 1980). Zo toonden Bossuyt en Sorgeloos

(1980) aan dat het gebruik van GSL in plaats van SFB larven aanzienlijke produktieverhogingen tot gevolg had. Een vergelijkende studie van diverse rassen op twee soorten voedsel (levende algen en rijstvoerschroot) bevestigde niet alleen deze bevinding (GSL produceert 50 % meer biomassa dan SFB) maar toonde tevens aan dat de verschillen in groeisnelheid (lengte en drooggewicht) tussen de rassen onafhankelijk zijn van het gebruikte voedsel (Vanhaecke, 1983).

### III.1.5. Technologische aspecten van de massakweek van *Artemia*

Alhoewel de vereisten voor fysico-chemische en voedings-parameters laten veronderstellen dat intensieve teelt van pekelkreeftjes - in vergelijking met andere aquatische organismen - relatief gemakkelijk is, moet een geschikt kweekstelsel voor *Artemia* toch aan enkele specifieke technologische vereisten voldoen.

De circulatie van het kweekmedium moet instaan voor een maximale benutting van het totale kweekvolume (*Artemia* 'evenredig' gedistribueerd in de volledige waterkolom), een homogene suspensie van de voedselpartikels, en een optimale zuurstofvoorziening het medium zonder interferentie op overleving en/of groei. De vorm en oppervlakte/volume verhouding van de kweektanks zullen hier een belangrijke rol vervullen. Aangewende agitatiesystemen bij *Artemia* zijn b.v. schepraden in ondiepe bekkens (Dohse, 1971), beluchtingspunten of -ringen in kolommen of cilindroconische tanks (Sorgeloos, 1973a; Person-Le Ruyet, 1976b; Tobias *et al.*, 1979; Milligan *et al.*, 1980, Brisset *et al.*, 1982), of renbaantanks met luchtwaterpompen (Bossuyt en Sorgeloos, 1980; 1981) (Fig. 9).

Een renbaan-kweekstelsel bestaat essentieel uit een langwerpig bekken waarin in de lengteas een centrale tussenwand geplaatst is die voorzien is van luchtwaterpompen. Door hun specifieke plaatsing en bij een waterdiepte

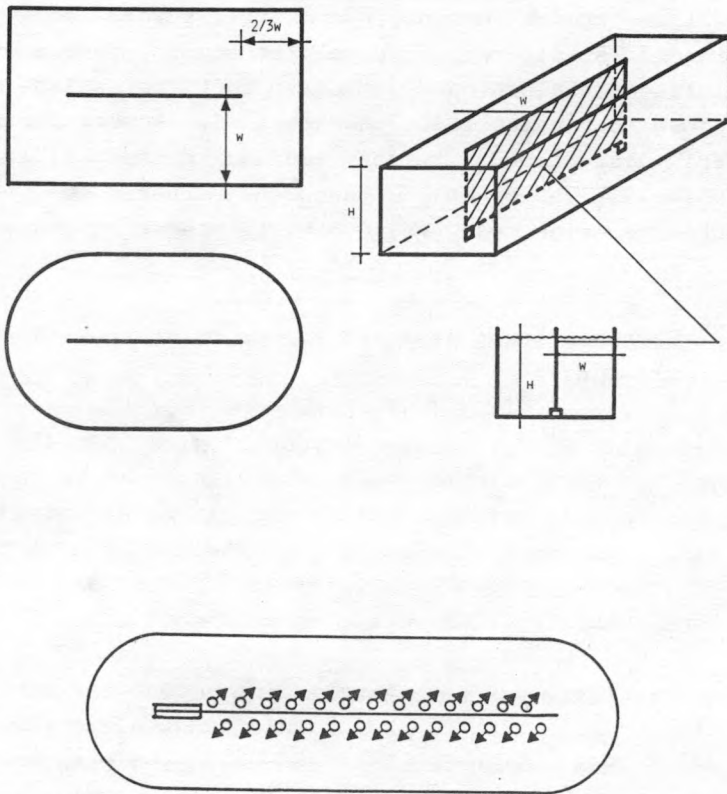


Fig. 9 : Schema's van diverse renbaansystemen voor de kweek van *Artemia*.

van 0,7 tot 1 m veroorzaken deze luchtwaterpompen een voortstuwende en schroefvormige circulatie van het medium. Alhoewel de agitatie door deze beluchtingssystemen vrij intens is, worden noch de overleving noch de biomassa-productie op een negatieve wijze beïnvloed : "... even with the relatively high levels of turbulence associated with the higher aeration levels, the biomass production was not effected negatively... this shows the capability of the brine shrimp to adapt to such relatively hostile environment" (Platon, 1985).

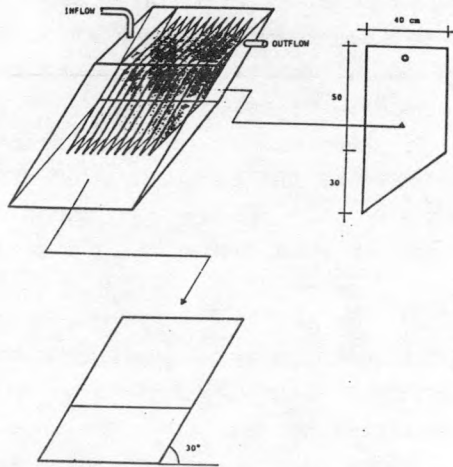
De meest kritische parameter is wellicht de waterkwaliteit die zo optimaal mogelijk moet gehouden worden, t.t.z. minimale concentraties aan opgeloste en partikulaire metabolieten ter voorkoming van toxiciteitsproblemen, proliferaties van microorganismen en interferenties met de concentratie aan voedselpartikels.

#### Stagnerende kweeksystemen

Met stagnerende kweeksystemen wordt geen enkele vorm van waterverversing toegepast zodat de waterkwaliteit tijdens het kweekproces progressief vermindert : bijgevolg kunnen slechts lage densiteiten (tot 5 000 dieren per liter) geïncubeerd worden en bekomt men na twee weken cultuur een overleving van slechts 35 % (Bossuyt en Sorgeloos, 1980; 1981; Sorgeloos *et al.*, 1986). Hulpmiddelen die hier aangewend worden ter verbetering van de waterkwaliteit zijn het afhevelen van bezonken, partikulaire afvalstoffen (Dohse, 1971) of de inschakeling van een 'tube-separator' (Sorgeloos *et al.*, 1979), een aparte platenbezinker en/of een 'cross flow'-zeef (Bossuyt en Sorgeloos, 1980; Baert, 1982) die partikulair materiaal zoals faeces, voedselaggregaten en exuvia verwijderen (Fig. 10). De hoogste produkties voor stagnerende kweeksystemen werden verwezenlijkt in renbaaninstallaties, namelijk tot 5 kg levend gewicht per  $m^3$  kweekvolume (Bossuyt en Sorgeloos, 1981).



A



B

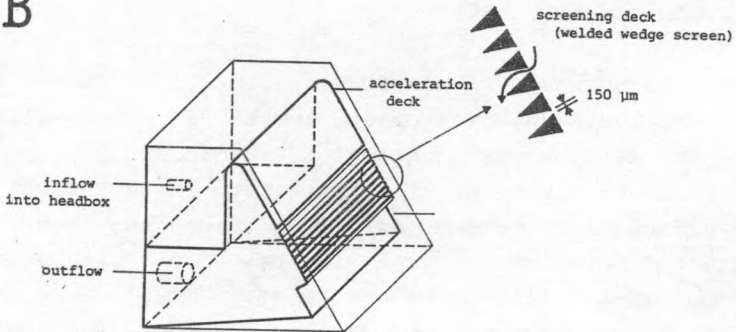


Fig. 10 : Schema's van een platenbezinker (A) en een 'cross flow'-zeef (B)..(naar Sorgeloos et al., 1986)

## Doorstroom-kweeksystemen

Dit zijn produktiesystemen waarbij het kweekmedium discontinu of continu (in doorvloei) ververst wordt ter verdunning van de concentraties aan partikulaire en opgeloste metabolieten. Dit vereist echter voldoende hoeveelheden water bij een gepaste temperatuur en in de meeste gevallen tevens een filtersysteem dat zonder negatieve interferentie de pekelkreeftjes in de kweekeenheid weerhoudt en slechts het effluent draineert. Cognie (1976) en Person-Le Ruyet (1976b) voorkwamen dit laatste door dagelijks het produktievolume op te drijven en zo de densiteit te verlagen door enkel vers water toe te voegen. Bij discontinue waterverversing (Sorgeloos, 1973a; Paulsen, 1978; Landau *et al.*, 1985) worden eenvoudige filters aangewend, maar is de arbeidsinspanning hoog en hierdoor automatisatie moeilijk te verwezenlijken. Tenslotte zijn er nog de doorvloei- en recirculatiesystemen uitgerust met specifieke filters die autonoom over langere periodes (> 24 u) een vlotte evacuatie van het kweekeffluent verzekeren (Tobias *et al.*, 1979; Brisset *et al.*, 1982; Brune, 1982). Tobias *et al.* (1979) gebruikten verticale filterbuizen met variërende maaswijdtes in functie van de grootte der dieren. Een aëratiering ter hoogte van het grondvlak vermijdt verstopping (Fig. 11 A). Een variant hierop, door ons ontworpen ter recuperatie van geproduceerde cysten (zie verder) werd met succes toegepast in een doorvloei-module met rijstvoerschroot als dieet (Brisset *et al.*, 1982). Daar met dit voedsel verstopping van de filter zich veel vlugger voordoet dan met wieren, werd het grondvlak van de filter kleiner gemaakt dan het bovenvlak : op deze manier zullen de vanuit de aëratiering opstijgende luchtballen een grotere contactweerstand ondervinden met de schuine wanden van de filter en aldus een meer efficiënte reiniging van het gaas verzekeren (Fig. 11 B).

Brune (1982) daarentegen ontwikkelde een vloeibed-concept waarbij de bodem van de kweektank bestaat uit een hellend vlak waarover glasparels van verschillende diameter

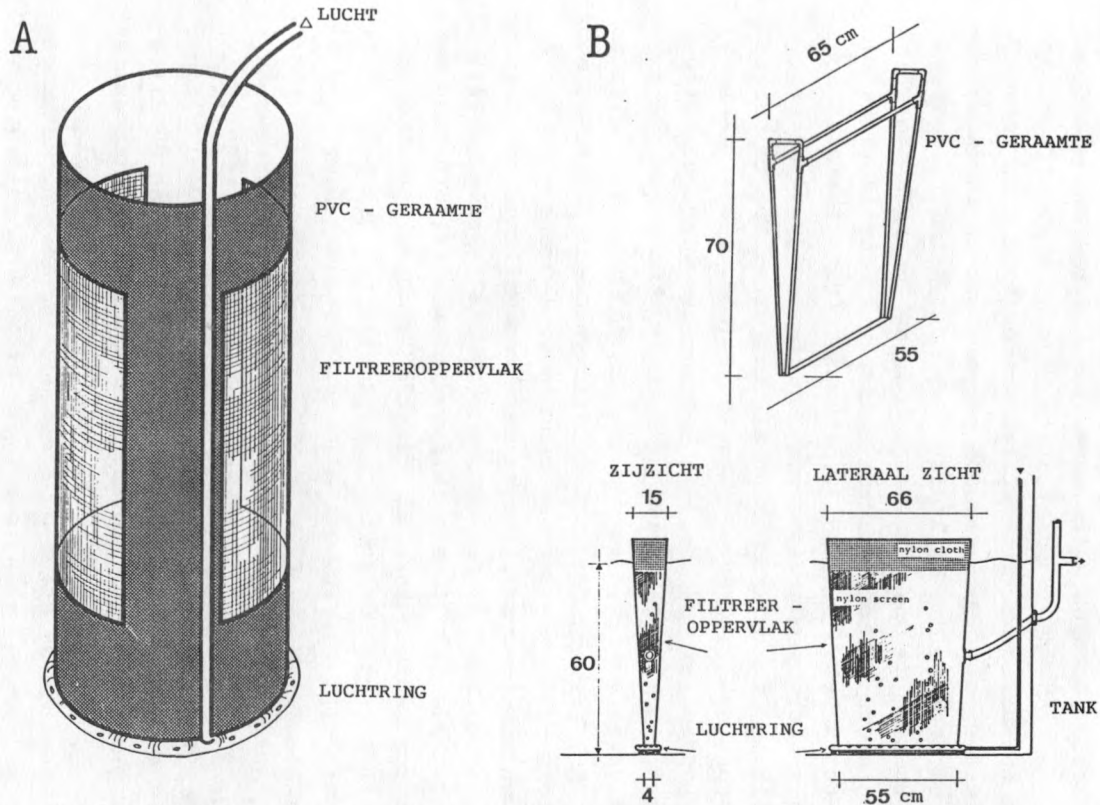


Fig. 11 : Schematische voorstelling van de filters gebruikt in doorvloeikweek. (naar Sorgeloos et al., 1986)  
 (A) : verticale filterbuis; (B) filter met schuine wanden

afschuiven en in hun beweging effluent en partikels, maar niet de pekelkreeftjes, afvoeren (Fig.12). Deze reactor is zelfreinigend daar de parels, eventueel gecontamineerd met afval, continu afgevoerd, gereinigd en gerecycleerd worden.

Met de doorstroom-kweeksystemen kunnen hoge productiecapaciteiten gehaald worden : densiteiten tot 18 000/l en 25 g natgewicht aan biomassa per liter na 14 dagen opkweek (Tobias *et al.*, 1979). Met een kleinschalige doorvloeimodule hield Nimura (1967) zelfs densiteiten aan van 40 tot 60 pekelkreeftjes per ml voor een overlevingspercentage van  $\pm$  40 % na 3 weken kweek. In tegenstelling tot de stagnerende kweeksystemen kunnen bij doorvloeit de fysico-chemische en biotische parameters beter in de hand gehouden worden : o.a. door een efficiënte evacuatie van faeces, metabolieten, enz... via het overtollige water zodat proliferaties van bacteriën en protozoa in de kweektanks minder gemakkelijk optreden. Bovendien biedt deze techniek de mogelijkheid om microalgen-suspensies te valoriseren als gecombineerd kweekmedium en -voedsel : zo b.v. effluenten rijk aan wiercellen afkomstig van tertiaire waterzuivering (McShan *et al.*, 1974; Trieff *et al.*, 1976; Milligan *et al.*, 1980) of OTEC ('Ocean Thermal Energy Conversion')-systemen (Tobias *et al.*, 1979; 1980).

Bij de aanvang van ons doctoraatswerk was ons slechts één kweekstelsel bekend dat het recirculatieprincipe toepaste : Cognie (1976) behandelde namelijk per dag tot 1/3 van het kweekvolume over een zandfilter, maar bereikte slechts geringe produkties van  $1,3 \text{ kg/m}^3$  na 20 dagen voeding met *Spirulina* en vismeel.

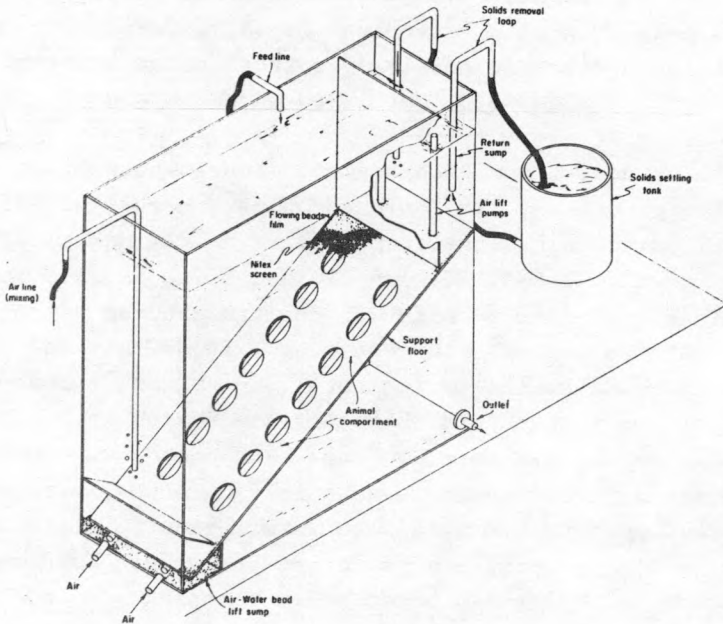


Fig. 12 : Schematische voorstelling van de vloeibed-reactor voor *Artemia* kweek. (naar Brune, 1982)

## III.2. ONTWIKKELING VAN EEN DOORVLOEI-KWEEKSYSTEEM MET RECIRCULATIE VAN HET KWEEKWATER

### III.2.1. Doelstelling

In de eerste plaats wensen we een productie-installatie voor hoge densiteiten aan *Artemia* te ontwikkelen die garanties biedt voor maximale overleving, groei en vitaliteit gedurende lange kweekperiodes. Dit is een essentiële vereiste om een studie over de invloed van omgevingsomstandigheden op de kenmerken van de kwalitatieve en kwantitatieve reproductie bij *Artemia* te kunnen aanvatten (zie hoofdstukken IV. en V.).

Anderzijds beogen we een kweektechnologie te ontwerpen die als concept kan aangewend worden voor diverse toepassingen in de aquacultuurindustrie. De uitgevoerde literatuurstudie wijst namelijk uit dat de bestaande intensieve productiesystemen enkele nadelen vertonen die commercialisatie ervan beperken. Renbanen zonder waterverversing geven te lage productiecijfers om steeds economisch rendabel te zijn (Bossuyt en Sorgeloos, 1980) en de doorvloeikweektechnologie van Tobias *et al.* (1979) kan slechts daar toegepast worden waar voldoende hoeveelheden warm zeewater en microalgen beschikbaar zijn. Toch biedt dit doorvloeiconcept enkele ontegensprekelijke voordelen zoals de hoge densiteiten die aangehouden kunnen worden zonder de overleving of groei te affecteren, en de mogelijkheden tot automatisatie.

We hebben dan ook geopteerd voor het doorvloei-principe ter ontwikkeling van een standaard kweekprocedure maar met behandeling van het effluent zodat het opnieuw als cultuurmedium kan gerecirculeerd worden in de *Artemia* kweekeenheid. Hierdoor wordt het verbruik aan zeewater geminimaliseerd en wordt een stabiliserend effect gecreëerd op de kweekparameters eenmaal het recirculatiesysteem in equilibrium is. Zodoende biedt dergelijk systeem "... bet-

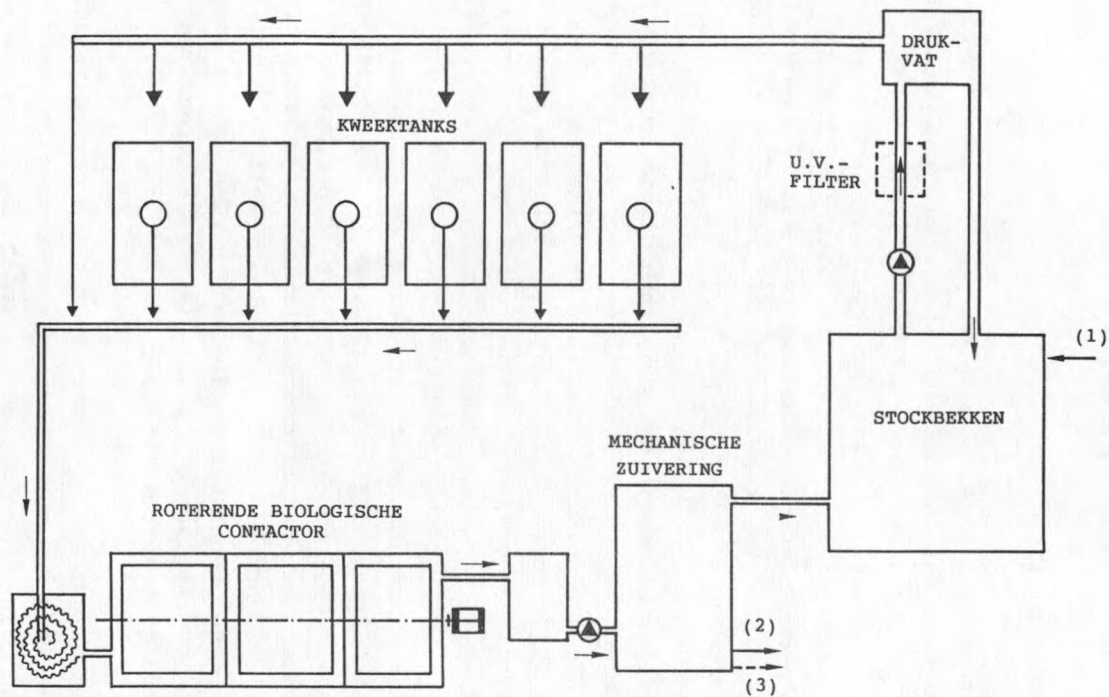


Fig. 13 : Schema van het recirculatiesysteem voor intensieve *Artemia* teelt.

(1) : periodieke toevoeging van vers zeewater;  
 (2) en (3) : mogelijkheid tot spuien van het bezonken slib of het verversen van water

ter possibilities for monitoring and controlling essential environmental factors than open or semi-open systems..." (Kinne, 1976).

### III.2.2. Ontwerp van de doorvloei-kweekeenheid

#### 1. Kweektanks en watervoorziening

De kweekmodule (Fig. 13) bestaat uit 6 PVC-tanks met een inhoud van 350 l ieder (90 x 65 x 60 cm). De water-toevoer geschiedt via een centrale aanvoerbuis ( $\emptyset$  4 cm) die aan het ene uiteinde verbonden is met een drukvat. Deze PVC-cilinder ( $\emptyset$  40 cm) is boven het niveau van de kweek-recipiënten geplaatst en behoudt een waterhoogte van 1 m door enerzijds de continue toevoer van voldoende water via een pomp (Eheim 1042) en anderzijds de evacuatie van overtollig water via een overloop naar het stockbekken. Hierdoor kan een constante druk in de toevoerleiding aangehouden worden zodat het debiet per *Artemia* tank exact afstelbaar is (Fig. 14). Dit gebeurt door elke aftakking naar de kweekvaten toe te voorzien van een kraan die terminaal afgesloten wordt met een set van vervangbare PVC-plaatjes. Deze laatste hebben ieder een welbepaald aantal openingen van 1 mm waardoor een specifiek debiet gehandhaafd wordt. Elke kweektank bevat tevens halverwege één der zijwanden een afvoeropening ( $\emptyset$  3 cm) waarin een overloopbuis past die uitmondt in een collector-goot, gemonteerd juist onder het waterniveau der tanks, en die finaal de recirculatie-eenheid voedt.

Heel belangrijk is de filteruitrusting die zich in de kweektanks bevindt en verbonden is met de afvoeropening. Die moet immers de pekelkreeftjes binnen de kweektank houden en een optimale evacuatie van het overtollige, gepollueerde kweekmedium en de afvalpartikels verzekeren. Verstopping van de filter is dus heel kritisch voor doorvloeiteelt. Daar het in de bedoeling ligt gemicroniseerde of SCP voeders uit te testen die veel vlugger een obstructie van gewezen zeefilters veroorzaken (Brisset *et al.*,



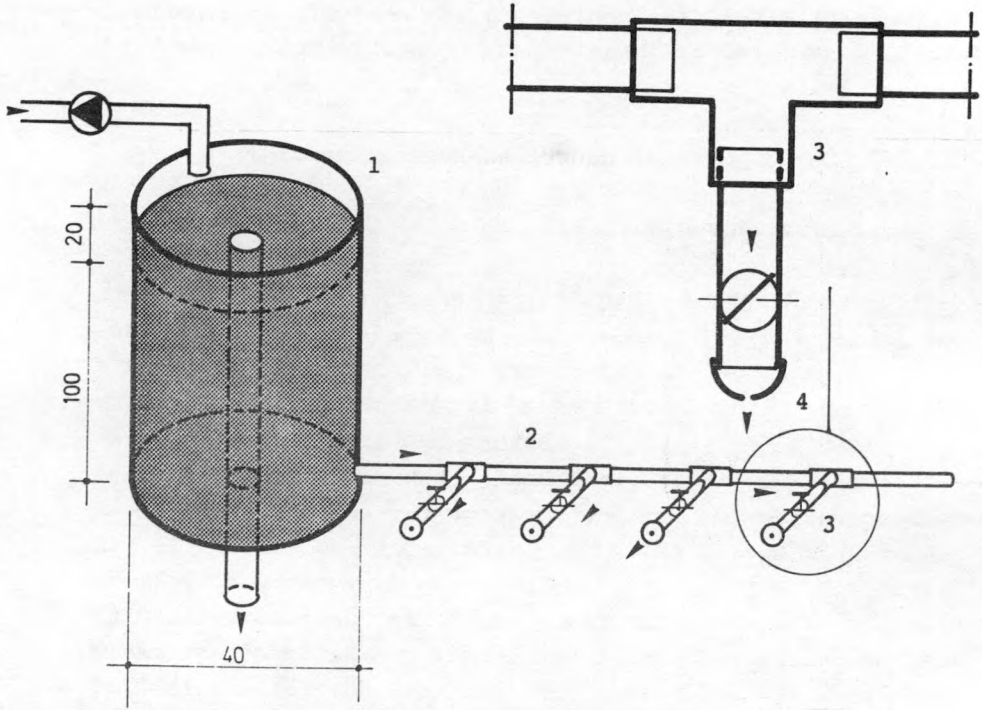


Fig. 14 : Detail van het watertoevoersysteem naar de kweekmodule.

(1) : drukvat met overloop; (2) : toevoerleiding naar de individuele kweektanks; (3) aftakking met kraan en terminaal PVC-stuk voorzien van openingen (4)

1982 en eigen observaties), lijkt ons het 'standpipe'-procédé van Tobias *et al.* (1979) hier niet van toepassing. Alhoewel de adaptatie tot omgekeerd kegelvormige structuur (Brisset *et al.*, 1982) de autonome werking van de fijne zeefilters sterk verhoogde, zijn we toch op zoek gegaan naar een nieuw concept dat hogere garanties biedt wat betreft filtratiecapaciteit (= hoeveelheid gefiltreerd water per tijdseenheid vooraleer verstopping optreedt) en beter geschikt is voor schaalvergroting.

Het door ons ontwikkelde filtersysteem (Fig.15) bestaat uit een rechtopstaande cilinder ( $\emptyset = 13,7$  cm;  $h = 60$  cm) uit roestvrij staal ('Trislot Systems') waarvan de basis, met uitzondering van een centrale opening, afgedicht is met een PVC-plaat. Een flexibele darm ( $\emptyset 3$  cm) verbindt deze afvoeropening met de uitstroomopening van de tank. De 'Trislot'-cilinder zelf is geconstrueerd uit een V-profiel gewonden rond verticale steunassen, waarbij een spiraalvormige spleet met een specifieke breedte ontstaat (Fig. 16). Verder is er ter hoogte van de bodemplaat een aëratiering gespannen zodat de opwaarts bewegende luchtbelletjes het externe, effen filteroppervlak continu vrijmaken van eventuele deeltjes die de spleetjes verstoppen. Teneinde afschuiming van pekalkreeftjes door de werking van de beluchtingsring zoveel mogelijk te minimaliseren, hebben we rond het bovenste deel van de filtercilinder een plastic huls aangebracht die reikt tot juist onder het wateroppervlak. Eventueel afgeschuimde dieren kunnen hierdoor teruggliden in het kweekmedium.

Dit 'Trislot'-systeem biedt in vergelijking met de traditionele netzeven de volgende voordelen qua filtereigenschappen :

- grotere (vooral meer langwerpige) partikels worden toch nog verwijderd via de spleten (meer oriëntatie-opportunities voor filtratie);
- partikels die slechts nipt kleiner zijn dan de spleetopening worden door de speciale V-vormige profielen doorheen de filter gezogen (zogenaamd 'Coanda'-effect) en veroorzaken geen obstructie;

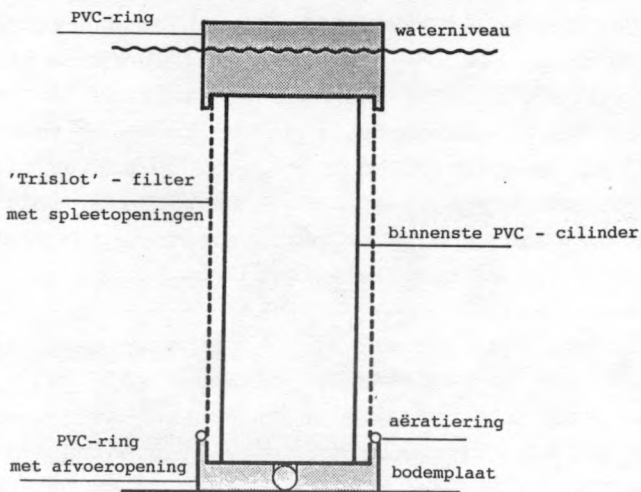


Fig. 15 : Schema van het nieuwe filtersysteem.

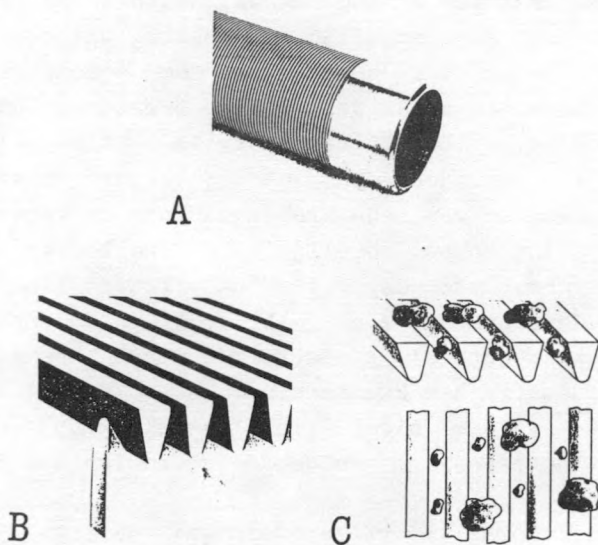


Fig. 16 : Schematische voorstelling van de 'Trislot'-filter.

(A) : uitwendig zicht; (B) : V-profielen gelast op steunas; (C) : schematische voorstelling van filtrerende werking

- grotere partikels vinden slechts twee contactpunten in plaats van vier bij gewezen zeven; hierdoor is de verankering zwakker en loskomen (+ heroriëntatie) door de werking van de aëratiering gemakkelijker;
- de V-vormige profielen reduceren tevens de verstoppingskans binnenin de filter. Door het inbrengen van een PVC-huls met overloop kan bovendien binnenin de filter een opwaartse stroming gecreëerd worden die zorgt voor een extra reinigend effect.

Vergelijkende testen uitgevoerd in onze doorvloei-installatie toonden aan dat de autonome werking van deze nieuwe filters ten opzichte van de gewezen filters gevoelig langer is, en dit vooral voor de fijnspletige. Dit resulteert verder in het feit dat slechts een kleiner filtreeroppervlak en -volume per kweekvolume nodig zijn en dus meer effectieve kweekruimte in de tank beschikbaar is. Bovendien is het kosten-effectief ondanks de hogere prijs van het basismateriaal : de filter heeft namelijk een onverslijtbaar karakter, dit terwijl de netzeven wel regelmatig vernieuwd moeten worden.

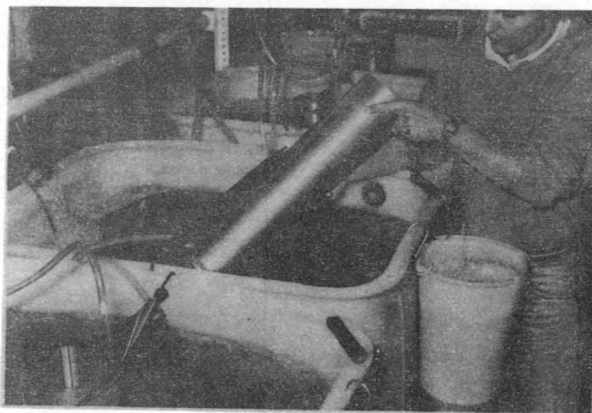


Foto 4 : Opstelling van de 'Trislot'-filter in de kweek-tank.

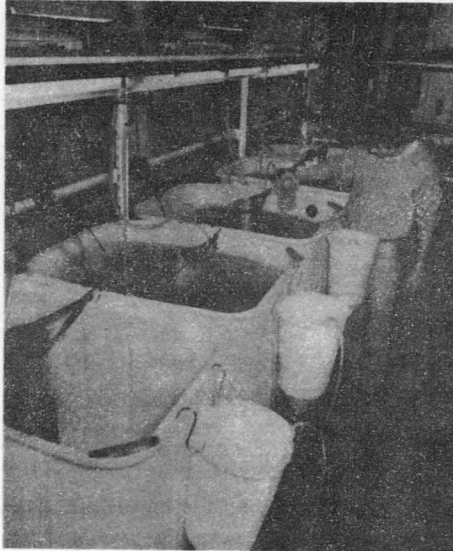


Foto 5 : Algemeen overzicht van de kweekeenheid.

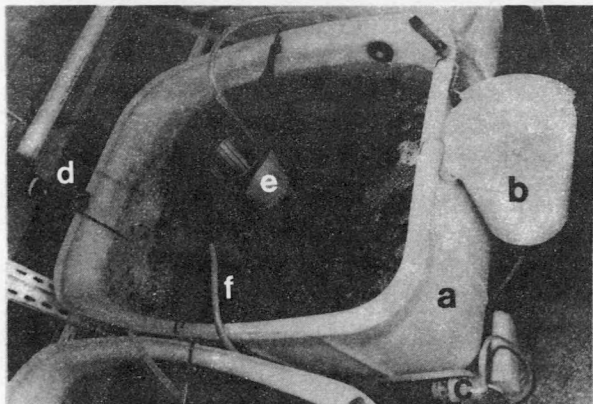


Foto 6 : Detailopname van een kweektank (a), met filter (e), watertoevoer (d) en voedseltoevoer (f) via pomp (c) uit voedselcontainer (b).

De positieve resultaten verkregen met dit innovatief filtersysteem hebben geleid tot de toepassing ervan bij de teelt van andere organismen in de aquacultuur zoals b.v. larvenkweek van penaeïden.

## 2. Voedseldistributie-systeem

Daar uit de literatuurstudie bleek dat maximale assimilatie plaatsgrijpt bij specifieke voedselconcentraties werd gepoogd de suspensiedichtheid voor voedselpartikels zo constant mogelijk te houden rond het optimaal niveau. Bovendien veronderstelden we dat doorvloeiomstandigheden een uitwassingseffect creëren en dat hogere densiteiten aan *Artemia* aangehouden kunnen worden ten opzichte van renbaankweek, waardoor het ons essentieel leek dat een frequent opererende, automatische voeding per tank geïnstalleerd werd.

In navolging van Bossuyt en Sorgeloos (1980) werd de natte voedingstechniek toegepast : de dieetsuspensie werd vooraf intens vermengd met zoutwater (zie verder onder III.3.1.) en vervolgens in individuele cilindroconische tanks gebracht voorzien van een zachte puntbeluchting. Via een pomp (Eheim-1024), gestuurd door een elektronische tijdschakelaar (TELE TR3) waarvan zowel de activerings- als de dode periode vrijwel traploos instelbaar is, wordt een specifieke kwantiteit voedsel naar de kweektank overgeheveld.

Daar overvoeding de produktie negatief kan beïnvloeden als gevolg van stressomstandigheden, hebben we tevens getracht een controle in te bouwen in het distributiesysteem. Hiervoor werd een eenvoudige doorzichtigheidsmeter ontworpen en geïnstalleerd ter hoogte van de uitstroomopening van de tank (Fig. 17). Hierdoor vloeit er continu effluent van het kweekvat doorheen de meetmodule, wat een vlugge detectie van eventueel variërende doorzichtigheden toelaat. Het toestel bestaat uit een overloopbuis met onderaan een lichtbron en bovenaan een lichtreceptor

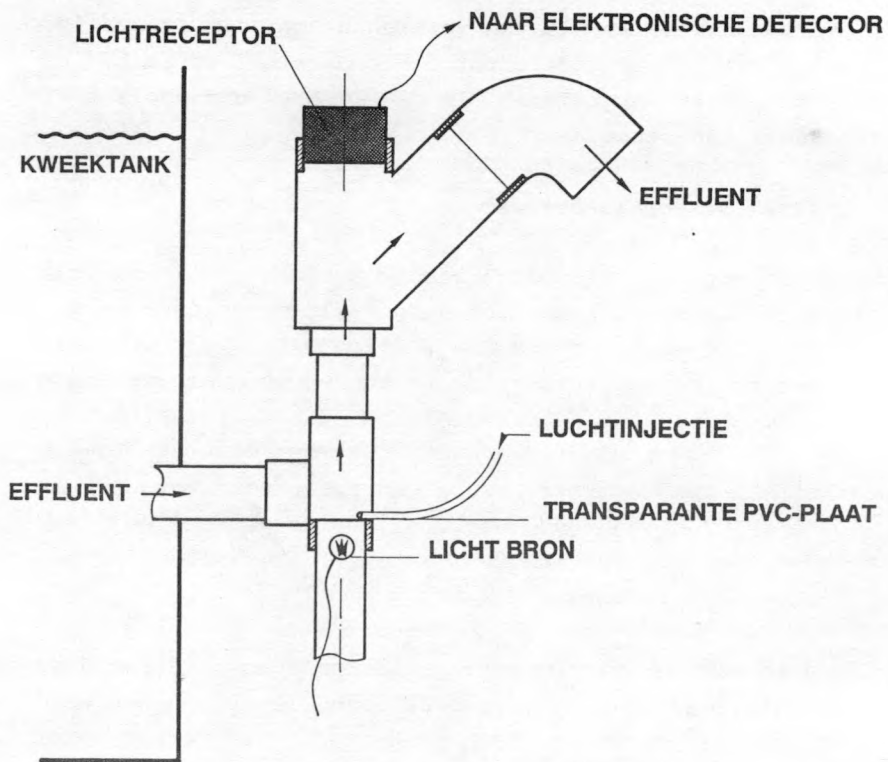


Fig. 17 : Ontwerp van eenvoudige doorzichtigheidsmeter ter preventie van overvoeding in de kweektanks.

die verbonden is met een afstelbare elektronische detector. Wanneer een te lage doorzichtigheid van het kweekmedium geregistreerd wordt, zorgt de detector voor een onderbreking van de elektriciteit naar de voedselpomp. Alhoewel dit toestel voorzien is van een extra luchtinjectie die sedimentatie ter hoogte van de lichtbron verhindert, treedt er toch na verloop van tijd verstoring op in de aflezing en dient de instelling van het apparaat gecorrigeerd te worden.

### 3. Alarmsysteem

Aangezien doorvloeisystemen veel dynamischer van aard zijn dan b.v. renbaaninstallaties en hierdoor o.a. een hogere graad van automatisering toelaten, betekent dit ook dat een verstoring van het doorvloeipatroon meestal grote schade aan de kweken kan toebrengen. Daarom werd een eenvoudig alarmsysteem geïntegreerd dat de watertoevoer naar de kweektanks controleert. Het bestaat uit een water-niveaudetector, geïnstalleerd in het drukvat, en verbonden met een alarmbel en een relais dat het elektriciteitsnet van het voedseldistributiesysteem kan onderbreken. Bij te geringe toevoer ten gevolge van een technisch falen (b.v. stroomonderbreking, uitvallen pomp, enz...) gaat het waterniveau in het drukvat dalen tot onder het detectiepunt en wordt het alarm ingesteld en tegelijkertijd de voeding onderbroken. Het medium der kweektanks wordt weliswaar niet meer ververst, maar overvoeding is uitgesloten en er is niet direct een nefaste invloed op de culturen.

## III.2.3. Ontwerp van de recirculatie-eenheid

### 1. Inleiding

Toepassing van een intensieve kweekprocedure brengt met zich mee dat de waterkwaliteit drastisch geaffecteerd wordt. Zo b.v. zullen de concentraties aan bepaalde gassen ( $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $NH_3$ ), anionen ( $CO_3^{--}$ ,  $HCO_3^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ , ...) en kationen ( $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ , ...) zich sterk wijzigen. Ook de



gehalten aan partikels en opgeloste, organische stoffen zullen gevoelig toenemen. Een essentieel kenmerk van een optimaal kweekproces is dan ook dat de concentraties van de meest kritische (mogelijk toxische) componenten binnen de tolerantiegrenzen van het kweekorganisme gehouden worden. Daar het de taak is van de zuiveringsinstallatie om de gehalten van dergelijke stoffen zo laag mogelijk te houden gedurende lange periodes, vormt deze eenheid een belangrijke schakel in het totaal concept.

Ondanks de groeiende interesse sedert de jaren '70 voor het gebruik van gesloten systemen voor de intensieve kweek van aquatische organismen (Kinne, 1976; Spotte, 1979; diverse presentaties tijdens een speciaal ICES/EIFAC congres in Stavanger, 1980; Chiba, Fridman, Mayo, Rosenthal, alle 1981) bestaat er nog steeds "...a lack of basic knowledge to design a well balanced recirculating system..." (Chiba, 1981), zodat "... good management of closed systems is more in the category of an art than a science..." (Rosenthal, 1981b). De zuivering moet immers in staat zijn om een lage concentratie aan organisch materiaal en N-componenten bij een hoge hydraulische belasting te kunnen behandelen (Rogers en Klemetson, 1985). De overdracht van kennis uit het domein van huishoudelijke en industriële afvalwaterzuivering lijkt dus niet zo vanzelfsprekend. We hebben dan ook in eerste instantie geput uit persoonlijke ervaringen met experts ter zake (C. Mock, E. Bossuyt, E. Van Vaerenbergh) om een installatie te ontwikkelen die niet alleen een optimale zuivering van het zee-water verzekert, maar die tevens voldoende flexibel is zodat diverse (a-)biotische factoren onderzocht kunnen worden bij *Artemia*.

Uit de diverse, toepasbare technologiën werd het volgende basisplan weerhouden (Fig. 18). De effluenten van de kweektanks worden integraal doorheen het recirculatiesysteem gestuurd, waardoor steeds eenzelfde debiet aangehouden wordt tussen de diverse onderdelen. Een biologische filtratie werd verkozen als hoofdcomponent van de installatie

boven een chemische en/of mechanische (Epifanio *et al.*, 1973). Verder zijn nog een sedimentatiesysteem en stocktank geïntegreerd en werd de optie opengelaten om een desinfectie-eenheid in te passen. Periodisch is er een additie van vers zeewater ter compensatie van de verdamping én ter verversing van een gedeelte van het kweekmedium.

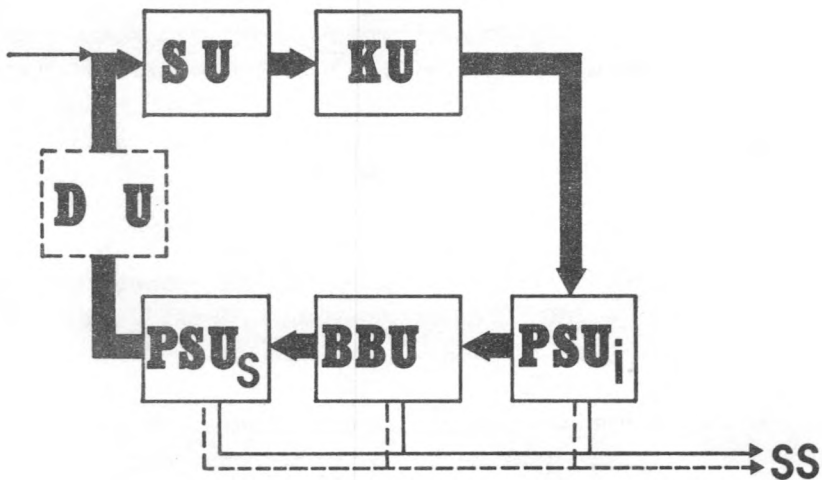


Fig. 18 : Algemeen basisplan van een recirculatiesysteem voor de teelt van aquatische organismen.

KU = kweekeenheid; PSU = initiële (i) of secundaire (s) eenheid voor zuivering van partikulair afval BBU = eenheid voor biologische zuivering; DU = desinfectie-eenheid; SU = stock-eenheid; SS = spuien van slib

## 2. Primaire zuivering

In de opstartfase was geen initiële primaire zuivering voorzien daar de werking van onze biologische zuiverings-eenheid (de biodisc) niet negatief beïnvloed wordt door de extra belasting met zwevende stoffen (Antonie, 1978). Daar dit ons later toch problemen opleverde, vooral in verband met de reiniging in de biodisc-unit, werd beslist een kleine decantatietank (120 l) juist voor de biologische zuiveringseenheid op te stellen teneinde een fractie van de zwevende stoffen te weerhouden. Het is een variante van de platenbezinker, bestaande uit een PVC-vat dat spiraalvorming gekanaliseerd is door middel van een verticaal opgestelde plastieken golfplaat, zodat het influent vanuit het centrum naar de uitstroomopening over een lange afstand vloeit en dus sedimentatie kan optreden.

De eigenlijke decantatie gebeurt voordat het zeewater teruggestuurd wordt naar de stocktank. Een combinatie van twee systemen wordt hier toegepast, namelijk de ontwateringszeef en een lamellaire platenbezinker. De 'cross flow'-zeef is relatief klein (70 x 55 x 40 cm) en bevat een compartiment waarin continu water wordt gepompt vanuit de collector-tank na de biodisc. Langs een overstort vloeit dit water als een film over een versnellingsvlak naar de vlakke spleetzeef (oppervlakte = 200 cm<sup>2</sup>). Door de speciale constructie van de zeefprofielen (die analoog zijn aan deze in de 'Trislot'-filters, zie hoger) verdwijnt door iedere spleet (150 µm opening) een 'snede' vloeistof terwijl partikels, gezien hun grotere kinetische energie, hun rechtlijnige voortbeweging vervolgen. Onderaan de vlakke spleetzeef resteert een kleine hoeveelheid water met verhoogd slibgehalte; dit wordt opgevangen en verder gezuiverd in de platenbezinker. Hierdoor kan de schaalgrootte van deze laatste proportioneel aangepast worden (reductie in volume). Het gezuiverde water dat doorheen de zeef komt, vloeit rechtstreeks in de stocktank. Het maximaal debiet dat over de zeef kan gaan is ongeveer 30 l/min waaruit

minimum 90 % van de gesuspendeerde stoffen wordt verwijderd.

De lamellaire platenbezinker (Bossuyt en Sorgeloos, 1980; Fig. 19) bestaat uit een schuin opgestelde, veelhoekige bak die onderverdeeld is in twee ruimtes. Het instroomcompartiment is hierbij via het conisch bodemdeelte verbonden met het sedimentatiecompartiment. In deze laatste ruimte zijn 21 PVC-platen (totale oppervlakte =  $5,54 \text{ m}^2$ ) aangebracht op een onderlinge afstand van 2 cm en onder een inclinatie van  $60^\circ$  in de richting van het vloeipatroon. Een afvoergoot boven de platen draineert het

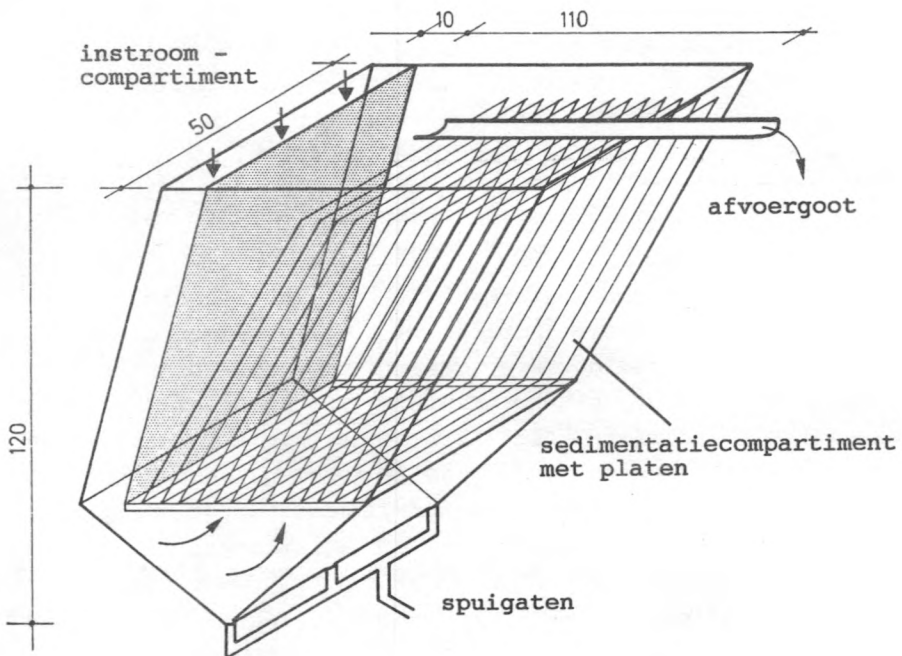


Fig. 19 : Schema van de lamellaire platenbezinker.

gezuiverde kweekwater naar de stocktank. Deze specifieke constructie, verfijnd voor *Artemia* renbaankweek tijdens de thesisstudie van Baert (1982), laat een optimale verwijdering toe van faeces, voedselresten, slib afkomstig van de biologische zuivering, enz... De bouw van de twee compartimenten voorziet dat het instromende water onderaan de bezinkingskamer homogeen verdeeld wordt over de ruimtes tussen de platen. Hierdoor bereikt men een laag getal van Reynolds (= laminair vloeipatroon) zodat tijdens de opwaartse beweging sedimentatie op de platen optreedt. De studie van Baert wees tevens uit dat een retentietijd van minimum 15 minuten maximale decantatie verzekert van de zwevende stoffen uit *Artemia* kweekwater. Van dit gegeven werd uitgegaan voor de dimensionering van de separator gebruikt in ons systeem (650 l). Verder wordt om de drie dagen, na het tijdelijk onderbreken van de doorvloeï, het geaccumuleerd slib verzameld in het conisch bodemgedeelte door de platen op te schudden. Het bezonken slib wordt finaal verwijderd via de voorziene spuigaten.

### 3. Secundaire zuivering

De biologische waterbehandeling valt hoofdzakelijk terug op de bacteriële afbraak van het opgelost organisch materiaal via oxidatieve desaminatie tot complexe N-verbindingen en de verdere omzetting tot ammoniak, nitrieten en nitraten. Aldus zorgen deze mineralisatie- en nitrificatieprocessen voor de zuivering van opgeloste voedselresten en excretieproducten, maar wordt er finaal geen stikstof verwijderd. De accumulatie van  $\text{NO}_3\text{-N}$ , die slechts in hoge concentraties toxisch is voor aquatische organismen (Wickins, 1981), kan meestal slechts tegengegaan worden door (partiële) verversing van het zeewater.

De efficiëntie van zuivering is afhankelijk van vele factoren, maar niet in het minst van de totale substraatoppervlakte en het gehalte aan opgeloste zuurstof beschikbaar voor de filtrerende microorganismen. Beide parameters zijn cruciaal bij het ontwerpen van eender welke waterbe-

handelingsinstallatie voor aquacultuurtoepassing (Kinne, 1976; Spotte, 1979).

Wij hebben geopteerd voor een roterende biologische contactor (RBC) of biodisc als biologisch zuiveringssysteem, enerzijds op basis van de positieve resultaten hiermee verkregen bij intensieve penaeïdenkweek (Mock *et al.*, 1977; Kennedy, 1980) en viskweek (Lewis en Buynak, 1976; Van Gorder en Fritch, 1980; Parker, 1981) en anderzijds omdat deze techniek voor ons enkele interessante eigenschappen inhoudt :

- het proces is relatief stabiel en zodoende weinig onderhevig aan variaties in debiet, organische belasting of temperatuur (Clark *et al.*, 1977; Autotrol Corp., 1978; Antonie 1978). Concreet betekent dit dat het zuiveringspercentage constant blijft ongeacht het aantal kweekunits in werking, de hoeveelheid toegediend voedsel, enz...;
- zeer hoge zuiveringswaarden worden verkregen in aquacultuurtoepassingen : Miller en Libey (1985) en Rogers en Klemetson (1985) hebben recent verschillende zuiveringssystemen vergeleken en bevestigden dat de beste nitrificatie-efficiënties met de RBC bekomen worden (> 90 %  $\text{NH}_3$ -N verwijdering);
- de RBC is zelfreinigend en voorkomt aldus anaëroob metabolisme (Lewis en Buynak, 1976). Door de continue rotatie slibben immers overtollig dikke biofilmen af (>70 tot 200  $\mu\text{m}$  : Famularo *et al.*, 1978) die verder in het proces tijdens de decantatiefase kunnen gecollec-teerd worden;
- een dergelijke biofilter vergt weinig energie (het water biedt slechts een minimum aan weerstand) en interfereert niet met het gravitair verloop van het medium.

De opstelling voor biologische zuivering (Fig. 20) bestaat uit een rechthoekige tank die onderverdeeld is in drie ongelijke compartimenten die elk een reeks van 40 ruwe PVC-schijven ( $\emptyset$  100 cm) bevatten die het aanhechtingsoppervlak vormen voor de microorganismen. De schijven zijn per

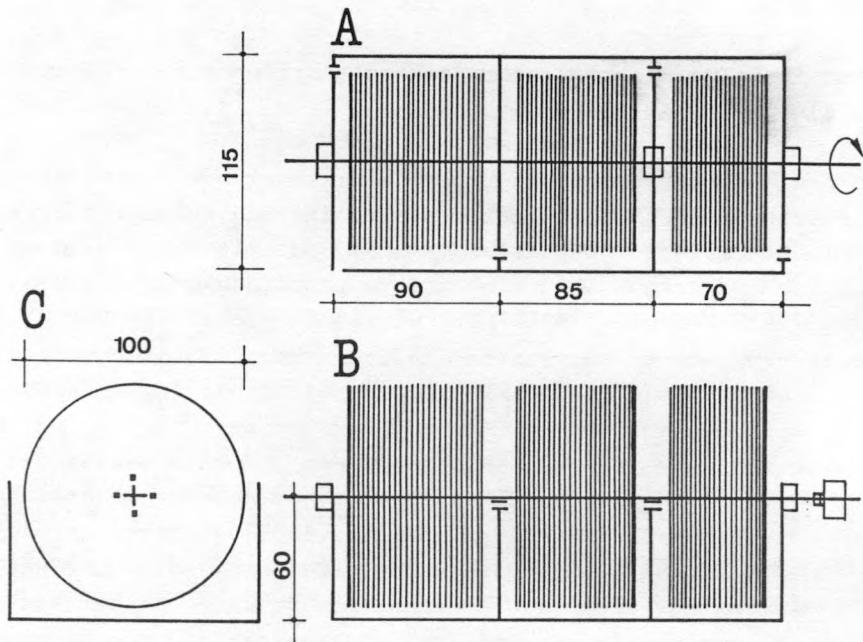


Fig. 20 : Schema van de gebruikte biodisc.  
 (A) : bovenzicht; (B) : overlangse doorsnede;  
 (C) : dwarse doorsnede

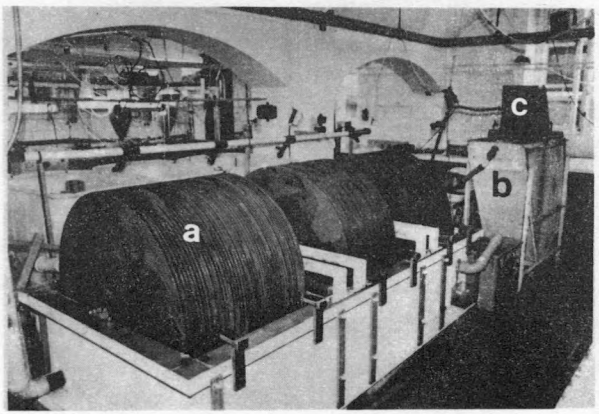


Foto 7 : Overzicht van het recirculatiesysteem (a: biodisc; b: platenbezinker; c: 'cross-flow' zeef).

unit onderling gefixeerd via zes PVC-staven voorzien van tussenringen van 1 à 2 cm. Alle schijven zitten bovendien vast op een centrale as die, aangedreven door een elektrische motor, roteert in drie kogellagers met een snelheid van zes toeren per minuut (Lewis en Buynak, 1976; Kennedy, 1980).

Door de rotatie wordt de actieve biofilm alternerend ondergedompeld in het te zuiveren effluent en de zuurstofrijke atmosfeer. Dit garandeert een efficiënte opname van beide componenten zodat een hoge graad van biologische afbraak kan plaatsvinden. Deze behandeling gebeurt progressief daar het kweekeffluent de opeenvolgende compartimenten doorloopt waar specifieke microculturen de biofilm opbouwen. De eerste unit krijgt inderdaad de hoogste concentratie aan organisch materiaal waardoor heterotrofe bacteriën domineren; verdere stadia bevatten vooral autotrofe, nitrificerende bacteriën en geleidelijk ook protozoa en rotiferen (Mueller, 1980). De alternerende doorstroomopeningen tussen de compartimenten creëren een vloeipatroon dat een uniform contact verzekert tussen het medium en de biofilm.

Wellicht de belangrijkste parameter waar men rekening mee moet houden voor een goede graad van zuivering is de hydraulische belasting (Liao, 1981), uitgedrukt in de hoeveelheid aangeboden water per eenheid van tijd en per eenheid van beschikbare biofilmoppervlakte. We hebben dan ook gepoogd om de constructie te dimensioneren in functie van de verwachte belasting van het influent :

- bij een belasting van 30 mg/l BOD<sub>5</sub> (1)  
(geschat aan de hand van preliminaire proeven)
- stel dat het effluent maximum 5 mg/l BOD<sub>5</sub> mag bevatten (2)
- stel een gemiddeld doorvloedebiet van 150 l/u per kweektank, of in totaal 900 l/u (3)



Uit de grafiek (Fig. 21) volgt voor (1) en (2) een hydraulische lading van  $\pm 4$  gpd/ft<sup>2</sup>. Het doorvloeidebiet van 900 l/u komt overeen met 5 400 gpd. Uit deze laatste twee gegevens kan men de oppervlakte berekenen :

$$\frac{5\,400}{4} = 1\,350 \text{ ft}^2 = 124 \text{ m}^2$$

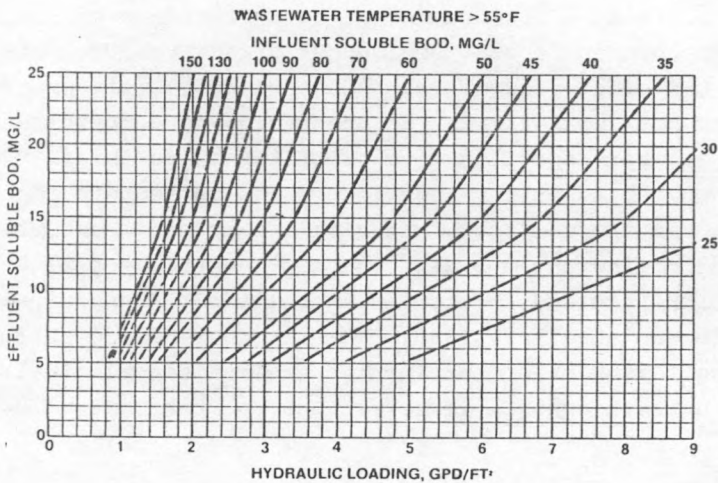


Fig. 21 : B.O.D.-verwijdering in een biodisc-zuiveringssysteem in functie van de graad van vervuiling en de hydraulische belasting. (naar Autotrol Corporation, 1978)  
(GPD/FT<sup>2</sup> = gallons per dag per vierkante voet)

De door ons geconstrueerde roterende biocontactor heeft een beschikbare oppervlakte van  $180 \text{ m}^2$ , zodat gesteld mag worden dat de biologische zuivering berekend is op een maximaal gebruik van de kweekinstallatie.

#### 4. Desinfectie

Deze laatste stap in de recirculatie werd slechts naar het einde van het onderzoek toe geïntegreerd in ons systeem. Als partiële sterilisatie werd geopteerd voor ultravioletstraling, die vooral bij 254 nm, uitgesproken kiemdodend werkt en die als bijkomend voordeel heeft dat overdosering van straling niet kan optreden (Flatow, 1981). Hiervoor werd een industriële installatie aangekocht van het type 'Belgonucleaire P-4A', bestaande uit 4 U.V.-lampen van 50 Watt omgeven door kwartsbuizen en met een maximaal debiet van  $9 \text{ m}^3/\text{u}$ . De stroomsnelheid wordt echter veel lager gehouden ( $\pm 3 \text{ m}^3/\text{u}$ ) daar de penetratie van U.V.-stralen door zeewater en turbiede media wordt gereduceerd (Flatow, 1981; Rosenthal, 1981a). Daarbij dient nog opgemerkt te worden dat U.V.-behandeling niet in een totaal steriel milieu resulteert (Rosenthal, 1981a; Spotte en Adams, 1981).

#### 5. Verversing

Op regelmatige tijdstippen wordt een gedeelte van het water gespuid en ververst. Dit gebeurt niet op vaste tijdstippen en is afhankelijk o.a. van de vervuilingsgraad van de platenbezinkers, het oogsten van culturen, enz... Gemiddeld op weekbasis betekent dit dat ongeveer 25 % van het totaal volume vervangen wordt door toevoeging van  $\pm 1 \text{ m}^3$  vers zeewater aan de stocktank. Dit spuidebiet is arbitrair ingesteld en niet ingegeven door de capaciteit van de zuiveringseenheid (zie verder). Tijdens de opstartperiode van de installatie ligt het verversingsritme wel hoger ( $\pm 33 \%$ ) daar de biologische filter een activatieperiode nodig heeft van ongeveer 3 weken (Lewis et al., 1981).

## III.2.4. Het kweekmedium

## 1. Samenstelling

Drie soorten zeewater werden tijdens dit onderzoek gebruikt : hoofdzakelijk een artificieel zeewater, en daarnaast twee natuurlijke zeewaters die aangevoerd werden per tankwagens vanuit Breskens (De Hoofdplaat) of Knokke (Het Zoute). Het Knokke zeewater wordt ter plaatse gefiltreerd over een zandfilter voor gebruik in het kuuroord. Sinds 1987 wordt dit zeewater in routine aangewend op het ARC.

Het artificieel zeewater biedt als voordelen dat het goedkoper is dan het aangevoerde zeewater en dat het niet gepollueerd is. Toch kan de samenstelling wel variëren daar er technische zouten aangewend worden. Voor de opmaak worden de volgende kwantiteiten aan zouten in de gegeven orde aan leidingswater toegevoegd :

NaCl (zeezout)	:	31,08 g/l
MgCl <sub>2</sub>	:	6,09 g/l
CaCl <sub>2</sub>	:	1,53 g/l
KCl	:	0,97 g/l
MgSO <sub>4</sub>	:	7,74 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	:	1,80 g/l

Deze zouten worden eerst afzonderlijk opgelost in een 'brinomat'-systeem (Sorgeloos *et al.*, 1983) en nadien vermengd in 8 m<sup>3</sup> stockbekkens. Dit zeewater wordt vervolgens gedurende minimum enkele dagen belucht, waarna het kan aangewend worden voor kweekdoeleinden.

De geschiktheid van dit medium voor *Artemia* kweek is uitgetest met de standaard *Artemia* kweekproef zoals beschreven in Vanhaecke en Sorgeloos (1980b). Als vergelijking is natuurlijk zeewater genomen. De resultaten van vijf kweektesten zijn hieronder weergegeven.

Tabel 7 : Standaard kweekproef met SFB *Artemia* voor twee verschillende kweekmedia

Natuurlijk zeewater		Artificieel zeewater		
overleving (%)	lengte (mm)	overleving (%)	lengte (mm)	
90	2,34	90	3,41	
100	2,79	90	3,52	
100	2,59	100	3,80	
90	2,63	70	3,51	
90	2,80	-	-	
$\bar{x}$	94	2,63	88	3,56

Hieruit blijkt dat de overleving praktisch dezelfde is voor de twee media, maar dat de groei significant hoger is bij gebruik van artificieel zeewater. We nemen dan ook aan dat dit elementair, synthetisch zeewater voldoende geschikt is om *Artemia* kweken te onderhouden.

## 2. Zoutgehalte, temperatuur en pH

Het zoutgehalte van de gebruikte zeewaters bedraagt  $34 \pm 1$  g/l. Bij de start werd de saliniteit opgevoerd door toevoegen van een pekeloplossing van natuurlijk zeezout. Tijdens de kweekexperimenten wordt een eventuele stijging van het zoutgehalte ten gevolge van evaporatie gecompenseerd door regelmatig toevoegen van kleine hoeveelheden leidingwater in het stockbekken.

De temperatuur wordt constant gehouden op  $25 \pm 1$  °C enerzijds door twee porceleinverwarmers van 2 kW ieder, geplaatst in de tank met de bioschijven, en anderzijds door onderdompelbare verwarmers met ingebouwde thermostaat in de kweektanks.

Daar de nitrificatieprocessen tijdens de recirculatie een lagere pH induceren, is het essentieel de buffercapaci-

teit van het medium op peil te houden (Wickins en Helm, 1981). In ons systeem gebeurt dit door op regelmatige tijdstippen, dit is wanneer de pH tot  $\pm 7,7$  terugvalt, kleine hoeveelheden opgelost bicarbonaat toe te voegen. Op deze wijze zijn de fluctuaties in zuurtegraad beperkt tot het gebied 7,6 - 8,2, wat optimaal is voor de groei bij *Artemia*.

### 3. Waterkwaliteit

Een grondige evaluatie van de capaciteit en de efficiëntie van ons zuiveringssysteem werd tot op heden nog niet uitgevoerd. Toch hebben we enkele testen verricht die ons moeten toelaten te veronderstellen dat de fysico-chemische compositie van het gerecirculeerd water als geschikt mag beschouwd worden voor *Artemia* kweek (Tabel 8).

Teneinde de efficiëntie van het zuiveringssysteem na te gaan, werden BOD<sub>5</sub>-bepalingen (zuurstofvraag van micro-organismen die de biologische afvalstoffen mineraliseren gedurende 5 dagen bij 20 °C) uitgevoerd op het kweekeffluent en -influent zonder dat een extra ent toegevoegd werd. De metingen werden bepaald met een 'WTW'-apparaat (type BSB 601) waarvan het principe berust op de fixatie van het geproduceerde CO<sub>2</sub> zodat een manometrisch afleesbare onderdruk ontstaat die als BOD<sub>5</sub>-gehalte kan geïnterpreteerd worden. De vastgestelde waarden na minimum drie weken recirculatie bereiken maximaal 30 mg/l BOD<sub>5</sub> voor het kweek-effluent en 3,5 g/l BOD<sub>5</sub> voor het influent. De zuiveringsefficiëntie bedraagt dus meer dan 80 %. Er mag echter niet vergeten worden dat de hydraulische belasting kan variëren daar :

- totale en individuele NH<sub>3</sub>-excretie door *Artemia* afhankelijk is van densiteit, stadium en ras van gebruikte *Artemia*, evenals van temperatuur en voedselkwaliteit of -kwantiteit (Moffet en Fisher, 1978; Buyukisik en Koray, 1983; Geldiay et al., 1983);
- het totale debiet verschilt naargelang het aantal kweekbakken in gebruik en hun toevoerdebieten, die variëren in functie van het kweekstadium;

Tabel 8 : Periodieke waterkwaliteitsmetingen van het kweekmedium onder standaard operationele omstandigheden

Waarneming (1)	Parameter				
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/l)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N (mg/l)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/l)	Zwevende stoffen (mg/l)	Totaal aan opgeloste, organische koolstof (mg/l)
a	10,9 ± 1,5	-	-	110 ± 80	20,4 ± 1,4
b	5,0 ± 2,5	0,6 ± 1,0	0,0	-	12,7 ± 7,6
c	10,8 ± 1,7	-	-	380 ± 400	22,5 ± 4,0
d	8,0 ± 5,5	0,4 ± 0,2	0,0	250 ± 330	14,4 ± 6,8

(1) Staalnames werden genomen op willekeurige tijdstippen over een kweekperiode van zes maanden

- de voederbelasting varieert in functie van de samenstelling en hoeveelheid toegediend voedsel.

Daarnaast werden ook de N-componenten gevolgd; dit zijn de meest kritische parameters in een recirculatiesysteem. Dit gebeurde in samenwerking met het 'Laboratorium voor Industriële Microbiologie' aan de R.U.G. Een Kjeltec (type 1002, Tecator) werd gebruikt voor zowel de bepaling van ammonium-stikstof als van nitriet-nitraatstikstof door middel van de stoomdestillatie-methode (Verstraete, 1986). Voor de bepaling van nitriet- en nitraatstikstof wordt na de ammoniumbepaling een reductans (Devarda-reagens) in overmaat toegediend zodat alle stikstof tot ammonium wordt omgezet. MgO zorgt voor een hoge pH, waardoor ammonium omgezet wordt tot ammoniakstikstof. Bij een hoge temperatuur wordt de ammoniak uit het water verwijderd en opgevangen. Door titratie met zwavelzuur in aanwezigheid van een boorzuurindicator kan het gehalte aan  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  bepaald worden (Verstraete, 1986). Het nitrietgehalte wordt gemeten via de colometrische methode van Montgomery en Dymock. Bij 550 nm wordt de intensiteit van het gevormde complex van diazosulfanilzuur met (naftyl)ethyleendiamine hydrochloride afgelezen (Verstraete, 1986).

De waarden voor  $\text{NH}_4^+$ -N en  $\text{NO}_2^-$ -N bleken lager te liggen dan 10,9 mg/l, respectievelijk 0,6 mg/l. Er werd geen  $\text{NO}_3^-$ -N gedetecteerd (Le Roy, 1988). Deze niveau's voor  $\text{NH}_4^+$ -N en  $\text{NO}_2^-$ -N blijken hoger te liggen dan de aangenomen tolerantiewaarden voor diverse aquacultuur-species ( $\text{NH}_3$ - $\text{NH}_4^+$ -N niet meer dan 0,1 mg/l,  $\text{NO}_2^-$ -N ook 0,1 mg/l, en  $\text{NO}_3^-$ -N ongeveer 10 mg/l : Kinne, 1980; Wickins, 1981). Acute (24 u) en chronische (8 d) toxiciteitstesten op GSL larven toonden echter aan dat de tolerantieniveau's voor dit *Artemia* ras véél hoger liggen. Wij vonden namelijk letale concentratiewaarden met 50 % mortaliteit ( $\text{LC}_{50}$ ) hoger dan 1 000 mg/l voor de  $\text{NH}_4^+$  en  $\text{NO}_2^-$  N-componenten. Enkel de 8 dagen  $\text{LC}_{50}$  voor  $\text{NO}_2^-$ -N bedroeg 830 mg/l en een significant lagere groei werd vastgesteld bij 320 mg/l (zie eindejaarsverhandeling van Le Roy, 1988). Ook Chen et al. (1988)

geven hogere toleranties op. Bijgevolg kan besloten worden dat de concentraties aan ammoniak en nitrieten in de kweek-tanks geen enkel nadelig effect uitoefenen op het produk-tieproces.

Wat de organische stoffen betreft zijn metingen uit-gevoerd op zwevende stoffen (ZS) en totale hoeveelheid opgeloste, organische koolstof (TOC) in het teeltinfluent. De TOC-analyse berust op de verbranding bij 800 °C van de aanwezige koolstofverbindingen tot CO<sub>2</sub> ('TOCOR 2 Maihak AG'-toestel) en de detectie ervan met een 'UNOR-GN' infra-rood analysator (Le Roy 1988). Het gehalte aan ZS werd bepaald door filtratie op een getarreerde 'Whatman'-filter, naspoeling met gedemineraliseerd water en droging bij 110 °C gedurende 2 u. Enkele resultaten zijn weergegeven in tabel 8. Het is echter niet mogelijk die te interpreteren daar geen doseringslimieten gekend zijn. Op zichzelf levert het gehalte aan organische stof geen direct gevaar op; indirect kan het de ontwikkeling van microorganismen stimuleren waardoor een verhoogd gevaar op infecties bestaat en zuurstoflimiterende omstandigheden en verminderde nitrifi-catie kunnen optreden.

#### 4. Zuurstofgehalte

De concentratie aan zuurstof in het kweekmedium wordt voornamelijk bepaald door de beluchtingsintensiteit (debiet van de luchtdoorborreling via de aëratiering), het verbruik door *Artemia* en de consumptie door bacteriële afbraak. Gezien deze verbruiken niet gekend zijn en variëren naar-gelang de omstandigheden, werd de beluchtingsintensiteit dagelijks aangepast teneinde minimum zuurstofgehaltes van 3 à 4 mg/l te waarborgen. De metingen werden uitgevoerd met een 'WTW OXI-191' zuurstofdetector.



### III.3. EXPERIMENTELE KWEEK

#### III.3.1. De kweekprocedure : algemene materialen en methoden

##### 1. Ontluiking der cysten en incubatie der larven

De verschillende types *Artemia* cysten gebruikt voor onze proeven werden steeds tot ontluiking gebracht onder standaardomstandigheden (zie V.2.1.6. en Sorgeloos *et al.*, 1986). Aan de hand van de literatuurgegevens met betrekking tot ontluikingsefficiëntie werd vooraf de hoeveelheid cysten bepaald die nodig is om de vereiste aantallen larfjes te produceren (Tabel 9). Om eventuele contaminatie van de kweken te verhinderen, werden de cysten gedesinfecteerd vóór de ontluiking door ze gedurende 30 min onder te dompelen in een hypochlorietoplossing van 200 mg/l NaOCl en vervolgens grondig te wassen met leidingwater (Sorgeloos *et al.*, 1986). Incubatie gebeurde in doorzichtige cilindroconische PVC-containers gevuld met zeewater (35 g/l) en onder continue belichtingsomstandigheden (twee 30 Watt TL-lampen). Een puntbeluchting vanop de bodem zorgde voor voldoende zuurstof en menging van de suspensie (< 3 g cysten/l). De temperatuur bedroeg  $25 \pm 0,5$  °C. Hierdoor konden na 24 u (36 u voor het ras uit China) uitsluitend instar I-nauplii aangevoed worden. Dit gebeurde door de aëratie af te zetten waardoor de lege cysteschalen gaan drijven, en het onderste gedeelte van het vat te belichten zodat de positief fototactische larfjes zich onderaan concentreren. Na een 15-tal min kon de afoogsting plaatsvinden. Indien de nauplii-suspensie nog gecontamineerd was met volle cysten die mede bezonken, werd een tweede decantatie in schuin opstaande aquaria uitgevoerd.

Vooraleer de pekelkreeftjes te distribueren in de kweektanks werden monsters (200 µl) genomen van de larvensuspensie, vervolgens gefixeerd met lugol en onder een stereomicroscoop geteld om de juiste concentratie te kunnen bepalen. De ontluikingsprocedure werd zo gesynchroniseerd

Tabel 9 : Specificaties van de gebruikte *Artemia* rassen

Ras	Lot- of Codenummer	Ontluikings- efficiëntie (aantal larven/ per g cysten)	Ontluikings- snelheid (T90, uren) <sup>1</sup>
Great Salt Lake, Utah, VSA : Zuid-arm	GSL 185	182 000	22
Noord-arm	GSL-N 508	201 200	22
Noord-arm	GSL-N 563	198 000	22,5
San Francisco Bay, Californië, VSA	SFB 522 SPB 1628	229 000 259 200	23,2 20,1
Macau, Brazilië	RAC 1980	304 000	23,7
Chaplin Lake, Canada	CHL 1979	65 600	33,0
Galerazamba, Colombië	GZ 1977	81 600	37,5
Tientsin, China	TIE 474	156 200	27,2
Lavalduc, Frankrijk	LVD 1980	120 000	33,5
Margherita di Savoia, Italië	MDS 1986	± 130 000	± 33
Moekba, U.S.S.R.	MOE 1983	± 150 000	± 24

<sup>1</sup>tijdsduur sinds de incubatie van de cysten waarop 90 % van de ontluikbare nauplii uitgekomen zijn

dat de incubatie der nauplii in de kweektanks steeds in de late namiddag (16-18 u) plaatsvond (= dag 0). Er werd zorg voor gedragen dat alle culturen steeds met instar I-larven opgestart werden daar de *Artemia* in dit ontwikkelingsstadium het meest resistent zijn aan allerlei stressomstandigheden (b.v. verschillen in zoutgehaltes) (Vanhaecke, 1983).

## 2. Doorvloei- en filterinstelling

Vanaf dag 1, dit is de dag na de incubatie, werden de kweektanks ingeschakeld in het doorvloEICircuit. Het debiet werd gedurende de kweekperiode van 14 dagen in functie van de groei van de larven trapsgewijs opgedreven, dit teneinde de toenemende waterbelasting het hoofd te kunnen bieden. Daar overstroming ten gevolge van filterverstopping echter absoluut moet vermeden worden, hebben we het doorvloei ritme mede afhankelijk gesteld van de spleetwijdte der filters, die op haar beurt afhankelijk is van de grootte der pekelkreeften.

Gestart werd met een 120  $\mu\text{m}$  filter en een debiet van 80 l/u of een retentietijd van ongeveer 4 u op dag 1, om te eindigen met een 350  $\mu\text{m}$  'Trislot'-zeef en een debiet van 300 l/u op dag 14. Een volledige reeks filters bestaat uit een 120, 150, 200, 250, 300 en 350  $\mu\text{m}$  'Trislot'-pijp. Meer details hierover zijn terug te vinden in hoofdstuk III.3.5.

## 3. Voeding

Diverse soorten voedsels werden uitgetest in dit recirculatiesysteem: een overzicht van hun karakteristieken is gegeven in tabel 10 (zie verder).

De dieetsuspensie werd opgemaakt door intense vermenging van het poeder met zeewater door middel van een mixer, en verdere aanlenging tot een suspensiedichtheid van 25 g drooggewicht voedsel per liter; hogere voedselconcentraties leiden immers dikwijls tot verstopping van het distributiesysteem. Teneinde bacteriële degradatie te verhinderen, werd pekell gebruikt als suspensievloeistof. We stelden

echter vast dat deze procedure een invloed had op de ionenbalans van het kweekmedium. Er werd dan ook beslist om de pekels te vervangen door zeewater. Dagelijks werd vers voedsel aangemaakt en werden de voedseldistributiekkanalen gereinigd ('s morgens en eventueel 's avonds).

De instelling van de automatische voedseldistributie is afhankelijk van de momentane kweekomstandigheden in iedere tank. Als algemene doseringsparameter werd de transparantie van het kweekmedium genomen, dit in navolging van Bossuyt en Sorgeloos (1980) die hiermee zeer positieve resultaten behaalden. De aflezing gebeurde met een vereenvoudigde 'Secchi'-schijf en de voedselbeurten werden zo afgestemd dat, tenzij anders medegedeeld, een transparantie van 20-25 cm verkregen werd. Enkele manuele bijvoedingen hielpen daarbij om dit niveau verder op punt te houden. Wat de voederfrequentie betreft, startten we meestal met een voedselbeurt om het half uur en dreven we dit op tot om de 10 min naar het einde van de kweekproef toe. Hierdoor werd getracht de fluctuaties in voedselbeschikbaarheid minimaal te houden wat tot maximale produkties zou moeten leiden (zie literatuurstudie).

#### 4. *Afoogsting en verwerking van de geproduceerde Artemia biomassa*

Het afoogsten van pekelskreeften kan op een relatief eenvoudige manier gebeuren door gebruik te maken van hun oppervlakte-respiratie gedrag. Wanneer de doorvloeï, aëratie en voeding afgezet worden, daalt het zuurstofgehalte vlug waardoor de organismen zich binnen 15 tot 30 minuten aan het wateroppervlak concentreren. Ondertussen zijn alle afvalpartikels (faeces, voedselaggregaten, enz.) bezonken. Met een schepnet (maaswijdte  $\pm$  1 mm) wordt de zuivere biomassa verzameld en tenslotte gespoeld met leidingwater om de zouten te verwijderen. Alvorens in te vriezen wordt de pekelskreeftenpasta in het net zacht samengeperst om zoveel mogelijk water te verwijderen. Proeven wezen uit dat een optimale kwaliteit verkregen wordt wan-

neer de dieren in levende toestand snel ingevroren worden bij  $-25^{\circ}\text{C}$ . Dit gebeurt door de pasta over een dunne laag van maximum 1 cm te verdelen in polyethyleenzakken vooraleer in te vriezen. Hierdoor blijft het *Artemia* exoskelet vrij van beschadiging zodat na ontvriezing geen lichaamsstoffen vrijkomen en het milieu verontreinigen.

### 5. Onderhoud

Dagelijks worden temperatuur, zuurstofgehalte, doorzichtigheid, watertoevoer en -recirculatie gecontroleerd. Ook de vitaliteit en algemene toestand van de pekelkreeftjes wordt microscopisch geobserveerd. Indicaties wat betreft N-gehaltenes worden verkregen met behulp van 'Merck' test-kits. Tot de routine behoort tevens het dagelijks reinigen van de 'Trislot'-filters met behulp van een hogedrukspuit. Terzelfdertijd wordt nagegaan of een nieuwe filter met bredere spleetopening kan geïnstalleerd worden. Alle metingen, observaties en handelingen worden bijgehouden op specifieke protocols zodat evoluties die een ingrijpen vereisen kunnen voorzien worden.

Voorts worden op regelmatige tijdstippen de diverse onderdelen van het recirculatiesysteem gereinigd of onderhouden.

### 6. Kwantitatieve bepaling van produktiekarakteristieken

Densiteit en individuele lengte worden om de 24 à 48 u bepaald. Drie bekertjes van 25 ml worden op willekeurige plaatsen ondergedompeld (geen schepbeweging), waarna twee druppels lugol-fixatief (Sorgeloos, 1975b) toegevoegd worden. Deze bemonstering is vrij accuraat gedurende de eerste kweekweek daar de larven homogeen gedistribueerd blijven als gevolg van de beluchting. Vanaf de tweede week echter ontwikkelen de dieren een efficiënter zwemgedrag en groeperen zich in 'wolken' zodat de geschatte overlevingswaarden minder representatief zijn.

De overleving is de procentuele verhouding van de actuele densiteit met de oorspronkelijke densiteit bepaald op dag 1.

De individuele lengte wordt bepaald aan de hand van een dissectiemicroscoop uitgerust met een tekenspiegel. De lijn tussen het proximaal deel van de kop en de basis van de caudale furca, daarbij de darm volgend, wordt hierbij overgetekend. Met behulp van een curvimeter wordt de relatieve lengte van de larven bepaald. De exacte vergrotingsfactor wordt bepaald met een gegradueerd micrometerplaatje (2 mm onderverdeeld in 200 eenheden). Om tot de werkelijke lengte te komen dient de relatieve waarde vermenigvuldigd te worden met deze vergrotingsfactor. De gerapporteerde individuele lengte is het gemiddelde van 30 metingen per tank; de metingen werden steeds zo vlug mogelijk na de fixatie uitgevoerd om inkrimping te vermijden (Vanhaecke, 1983).

De gemiddelde biomassaproductie wordt geschat door het afwegen van het uitgelekt natgewicht aan *Artemia*, gecollec-teerd door 1 l kweekmedium te zeven over een kleine, getarreeerde filter met gepaste maaswijdte (uitgevoerd in 3 herhalingen). Soms wordt het drooggewicht bepaald door nadien het materiaal gedurende 24 u te drogen bij 60 °C. Het individueel drooggewicht wordt geschat door dit laatste gegeven te delen door de momentane densiteit.

Tenslotte wordt op het einde van de geslaagde experimenten de efficiëntie van voedselconversie (FCE) als volgt berekend :

$$\text{FCE} = \frac{\text{totaal drooggewicht aan werkelijk toegediend voedsel}}{\text{totaal geogst natgewicht aan Artemia biomassa}}$$

### 7. Verwerking der produktiegegevens

Gelet op :

- het beperkt aantal kweektanks waardoor de mogelijkheid tot opzetten van een groot aantal herhalingen gelimiteerd wordt;
- de relatief hoge variatie die optreedt tussen de onderlinge kweken;
- de interferenties die plaatsvinden door onvoorziene omstandigheden (b.v. technisch of menselijk falen, infecties, ...);
- het simultaan uittesten van verschillende kleine technische verbeteringen die mogelijk interfereerden met de produktieresultaten;

lijkt het ons te gewaagd om statistische vergelijkingen uit te voeren.

Niettemin leveren de vele uitgevoerde proeven voldoende indicaties op om tot het formuleren van tendenzen te kunnen overgaan en om een standaardkweekprocedure voorop te stellen. Slechts in enkele specifieke gevallen werden gemiddelden bepaald, onderzocht op hun normale verdeling en vergeleken met behulp van een t-test. We hebben dan ook besloten om enkel de resultaten van die proeven weer te geven waar geen interferenties waargenomen werden, daar slechts die een betekenis kunnen hebben in het vastleggen van eventuele tendenzen (zie tabel 11).

### III. 3.2. Ontwikkeling van een basisdieet

Uit de literatuurstudie blijkt duidelijk dat diverse voedselbronnen in aanmerking komen als dieet voor *Artemia*. Gezien rijstekaf (in feite rijstvoerschroot) positieve resultaten opleverde in de renbaan- of open doorvloeisystemen (Bossuyt en Sorgeloos, 1980; Brisset *et al.*, 1982) leek dit een voor de hand liggend voedsel voor ons systeem. Het kweeksucces bleek echter afhankelijk te zijn van het gebruikte lot rijstekaf. Volgens Dobbeleir *et al.* (1980) fluctueert de compositie van het produkt naargelang de oor-

sprong, oogst, verwerking, enz... en kan deze daarenboven gecontamineerd zijn met pesticiden (stockbehandeling). Een andere handicap is de moeilijkheidsgraad voor micronisatie zodat de fractie aan partikels groter dan 70  $\mu\text{m}$  hoog blijft (Tabel 10).

Daarom werd in deze studie getracht alternatieven te identificeren en te evalueren in het gesloten doorvloeisysteem. De volgende basiscriteria werden gebruikt voor de selectie :

- prijs;
- granulometrie, eventueel na micronisatie;
- constante samenstelling;
- bewaarbaarheid;
- suspensiekaracteristieken : oplosbaarheid, gedrag tijdens bereiding, slijm- of schuimvorming in de tanks,...;
- nutritionele geschiktheid voor adulten : bepaalde diëten kunnen misschien voldoen om preadulten op te kweken maar ongeschikt zijn om adulte populaties langdurig in stand te houden.

Op basis van kleinschalige kweekexperimenten van zeven dagen in een flessenrolsysteem met zes herhalingen per behandeling (Van Stappen, 1981; Grymonpré, 1982) konden enkele monodiëten weerhouden worden voor grootschalige testen. De karakteristieken van deze produkten zijn terug te vinden in tabel 10.

In eerste instantie werden ze geëvalueerd als zuivere diëten. Daarna hebben we samengestelde voedsels opgemaakt met dezelfde componenten, dit om een nutritioneel meer gevarieerd dieet te verkrijgen. Alle resultaten met enige significantie zijn weergegeven in tabel 11, met vermelding van de mogelijke andere variabelen zoals *Artemia* ras en densiteit.

Deze resultaten zijn misschien vrij moeilijk te interpreteren maar toch komen enkele duidelijke indicaties tot



Tabel 10 : Samenstelling van de aangewende dieetcomponenten

Voedsel + oorsprong	Afkorting	Beschrijving	Granulometrie (% < 70 µm)	Oplosbaarheid	Procentuele samenstelling (1) in :			
					Proteïnen	Lipiden	koolhydraten	As
RIJSTVOERSCHROOT (= rijstekaf) Foblets, Brasschaat	RB	afval bekomen bij het polieren van de rijstkorrels	± 50 na micronisatie	heel gering	11-12	11-13	25-33 +3-13% vezels	8-12
PRAIRY GOLD Amylum, Aalst	PG	mengafval van de maïsverwerking	± 80 na micronisatie	gering	62	6	20-27 +3-10% vezels	2
MAISPOEDER Amylum, Aalst	UNICA	mengafval van de maïsverwerking	90 na micronisatie	gering	20	4	20 +40% vezels	7
SOJAPELLEN Vamo Mills, Izegem	SP	mengafval van de soja-industrie niet getoast	± 65 na micronisatie	heel gering	8-9	1	80-86 (hoofdzakelijk cellulose)	4
TARWEKIEMEN Verzele Laga, Deinze	TK		? na micronisatie	?	25	8	50 +3% vezels	4
TARWEZEMELEN Verzele Laga, Deinze	TZ		± 65 na micronisatie	8%	15	3	50 +11% vezels	6
PROVAMEL (sojabloem) Vamo Mills, Izegem	PROV	ongemiconiseerd bij- produkt van de indus- triële vetextractie van sojabonen	± 90	30%	49-52	0,5-1,5	28-32 + 3% vezels	4-8

SOJASLIB Vamo Mills, Izegem	SS	ongemiconiseerd bij produkt van de produktie van Provamel (DS=20%)	100	30%	30	1	?	?
ARP Vamo Mills, Izegem	ARP	ongemiconiseerd bijprodukt van de sojaverwerking	100	17%	70	5	?	?
PROTIBEL (Bel Industries, Parijs)	PROT	geplasmolyseerde <i>Kluyveromyces</i> gist, gekweekt op wei	95	28%	48	6-8	28-33 (vooral man- nanen en glu- canen)	7-9
BAKKERSGIST Bruggeman, Gent	BG	verse <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> (DS=30%)	100	heel gering	48-54	1-2	30	6
SPIRULINA Sosa Texcoco, Mexico	SPIR	gesproeidroogde <i>Spirulina</i> wieren	100	± 15%	60-71	6-7	13-16	7-9

(1) : gegevens bekomen van de producent

Tabel 11 : Chronologisch overzicht van de uitgevoerde experimenten betreffende biomassaproduktie in het doorvloeijsysteem

Code N°	Ras	Densiteit bij de start	Toegediend voedsel <sup>1</sup>	Kweekresultaten na 14 dagen			
				Overleving %	Lengte mm	Biomassa g/l	FCE
1a	GSL 185	15 000	PROV	29	3,2	6,5	1,46
1b	GSL 185	15 000	PROV	34	3,8	10,0	1,17
2	SFB 2149	22 000	PROV	9	-	-	-
3	LVD 1980	24 000	PROV	26	-	5,5	-
4	GSL 185	10 000	PG	50	6,2	10,5	0,95
5	SFB 2149	24 000	PG	25	-	3,8	-
6	SFB 2149	21 000	RB	16	-	-	-
7	GSL 185	40 000	PG	0	-	-	-
8	GSL 185	15 000	TK-RB 1:1	20	-	3,5	-
9	GSL 508	15 000	PG-RB 1:1	41	-	7,8	-
10	GSL 508	12 000	PROV-SS 3:1	26	5,8	-	-
11	GSL 508	8 000	PG-RB 1:1	56	5,2	14,5	0,75
12	GSL 508	10 000	PG-SS 1:1	69	-	-	-
13	GSL 508	12 000	PG-SS 1:1	60	-	-	-
14	GSL 185	18 000	PG-RB 1:1	29	-	5,8	1,34
15	GSL 508	13 000	PG-RB 1:1	28	-	8,0	1,13
16	GSL 508	11 000	SP	27	-	3,5	2,04
17	GSL 508	4 000	SS	9	-	-	-
18	GSL 185	10 000	PG-RB 1:1	31	4,7	7,6	1,16
19	GSL 185	10 000	PG-RB 1:1	72	3,5	11,6	0,67
20	GSL 185	10 000	PG-RB 1:1	49	3,9	11,1	0,66
21	GSL 185	10 000	PG-RB 1:1	48	5,2	10,5	1,14
22	GSL 185	10 000	PG-RB 1:1	24	5,7	9,2	1,26
23	GSL 185	10 000	PG-SP 1:1	41	3,6	4,0	1,27
24	GSL 185	10 000	PG-SP 1:4	59	3,9	5,5	1,09
25	GSL 185	8 000	PG-SP 1:4	34	5,1	5,6	1,07
26	GZ 1977	7 000	PG-SP 1:4	44	6,6	6,0	1,19
27	GZ 1977	7 000	PG-SP 1:4	65	5,5	5,0	1,17

28	GSL 185	12 000	PG-SP 1:4	27	3,8	2,3	3,01
29	GSL 185	12 000	PG-SP 1:1	23	3,3	1,4	5,0
30	GSL 185	15 000	PROT	38	3,8	6,4	0,83
31a	GSL 185	10 000	PROT	15	5,1	2,6	2,05
31b	GSL 185	10 000	PROT	19	4,3	5,0	0,98
32	GSL 185	5 000	PROT	63	4,3	6,0	0,52
33	GSL 185	8 000	PG-TZ 1:1	53	6,1	8,5	0,81
34	GSL 185	15 000	BG	16	4,3	1,5	3,78
35	GSL 185	15 000	PG-TZ 1:1	18	5,8	7,6	1,29
36	GSL 185	10 000	PG-TZ 1:1	10	8,3	8,9	1,16
37	GSL 185	12 000	PG-TZ 1:1	16	7,8	8,1	1,48
38	GSL 185	10 000	PG-PROT 1:1	14	7,0	7,5	1,22
40	GSL 508	5 000	PG-SP 1:4	70	5,4	8,0	1,23
41	GSL 508	4 000	PG-SP 1:4	68	7,2	9,0	0,94
42	GSL 508	5 000	SP-PROT 1:1	53	7,6	11,5	0,72
43	GSL 508	4 000	SP-PROT 1:1	48	7,3	9,8	0,83
44	GSL 508	5 000	PG-SP 1:4	58	6,1	15,5	0,66
45	GSL 508	5 000	PG-PROT 1:3	36	6,7	10,0	0,90
46	GSL 508	5 000	SP-PROT 1:3	63	5,7	12,0	0,72
47	GSL 508	10 000	SP-PROT 1:1	23	5,7	9,0	0,99
48	GSL 508	10 000	PG-SP 1:4	60	5,2	10,7	0,90
49	GSL 508	5 000	PG-SP 1:4	64	5,5	9,7	0,70
50	TIE 474	5 000	PG-SP 1:4	48	5,2	8,3	0,78
51	TIE 474	10 000	PG-SP 1:4	42	4,6	7,6	0,88
52	GSL 508	5 000	PG-SP 1:4	44	5,5	8,5	1,09
53	GSL 508	5 000	PG-SP 1:4	63	4,9	7,5	1,24
54	TIE 474	5 000	PG-SP 1:4	50	5,8	9,0	1,33
55	TIE 474	5 000	PG-SP 1:4	44	5,5	7,5	1,49
56	GSL 508	5 000	PG-SP 1:4	53	6,8	12,0	0,97
57	GSL 508	5 000	PG-SP 1:4	56	6,1	6,5	1,04
58	SFB 522	5 000	PG-SP 1:4	22	5,1	3,0	1,83
59	SFB 522	5 000	PG-PROT 1:1	66	5,9	11,0	0,93
60	SFB 522	8 000	PG-PROT 1:1	52	5,0	9,5	0,76
61	GSL 563	5 000	PG-SP 1:4	61	4,4	4,0	1,46
62	GSL 563	5 000	PG-SP 1:4	57	5,1	8,4	0,73

<sup>1</sup>Afkortingen zie tabel 10

uiting. Het sojaslib, wat kostprijs en partikeltextuur betreft ideaal, doet het niet als monodieet noch als samengesteld voeder : er treedt geen tot geringe (SS-PROV) groei op, met hoge mortaliteiten vanaf dag 5-6. Analoge resultaten werden verkregen voor al dan niet gemengde tarwekiemen (TK; TK-RB) en bakkersgist. In het laatste geval is dit hoogstwaarschijnlijk te wijten aan de onmogelijkheid van *Artemia* larven om de dikke celwand van de *Saccharomyces cerevisiae* te verteren. Observaties leerden ons immers dat de faeces volgepakt waren met onverteerde cellen. Daarenboven gaf de proef waarbij de bakkersgist vooraf behandeld was met  $\text{CaCl}_2$  dat de celwand aantast, reeds een relatief goede groei (maximum 4,3 mm) alhoewel de overleving laag bleef (16 %). Recent onderzoek aan ons laboratorium heeft deze hypothese bevestigd en leverde tevens een effectieve behandelingsmethode op die echter wel nog op grote schaal geëvalueerd dient te worden (Lavens *et al.*, 1988; Coutteau *et al.*, 1989).

Ook het andere gistpreparaat (PROT) gaf problemen tijdens de kweek, alhoewel die zich pas in de tweede helft van de kweekfase manifesteerden terwijl initieel een zeer goede groei en overleving bekomen werden (Fig. 22). Daar microscopische observaties ook een goede verteerbaarheid aanduiden, liet dit ons toe te veronderstellen dat hier ofwel een nutritionele deficiëntie optreedt, ofwel dat voedingsomstandigheden niet gunstig zijn : SCP zijn immers veel beter beschikbaar dan gemicroniseerde diëten vanwege hun optimale granulometrie en drijfvermogen zodat bij analoge doorzichtigheidswaarden overvoeding kan optreden. Proeven met hogere transparentieniveaus en/of verschillende populatiedensiteiten (Tabel 12) confirmeerden deze tweede stelling : de overleving steeg van 15 tot 60 %. Toch bleef de totale biomassa-productie eerder gering (< 6,4 g/l) als gevolg van de groeistop en de mortaliteit vanaf dag 10, wat te wijten kan zijn aan een nutritionele deficiëntie. Zo konden Robin *et al.* (1981) een betere groei op methanolgist bewerkstelligen door aanvulling met methionine en vitamines. Hirayama en Funamoto (1983), Hirayama (1987) en Urban

Tabel 12 : Vergelijking van produktiekarakteristieken van GSL *Artemia* gekweekt op het Protibel-dieet bij verschillende doorzichtigheden en densiteiten

Code N°	Specifieke kweekcondities		Overleving (%)			Gemiddelde lengte (mm)			Biomassaproduktie (g/l)			FCE		
			Dag	Dag	Dag	Dag	Dag	Dag	Dag	Dag	Dag	Dag	Dag	
	Densiteit ( <i>Artemia</i> /l)	Doorzichtigheid van het kweek- medium (cm)	7	10	14	7	10	14	7	10	14	7	10	14
31a	10 000	20-25	76	56	15	2,1	3,6	5,1	4,1	4,3	2,6	0,48	0,58	2,05
31b	10 000	30-35	63	69	19	2,8	3,8	4,3	3,8	7,7	5,0	0,52	0,60	0,98
30	15 000	40-45	75	65	38	2,7	3,6	3,8	3,5	6,5	6,4	0,46	0,54	0,83
32	5 000	40-45	87	87	63	2,9	4,3	4,3	2,0	3,7	6,0	0,55	0,57	0,52

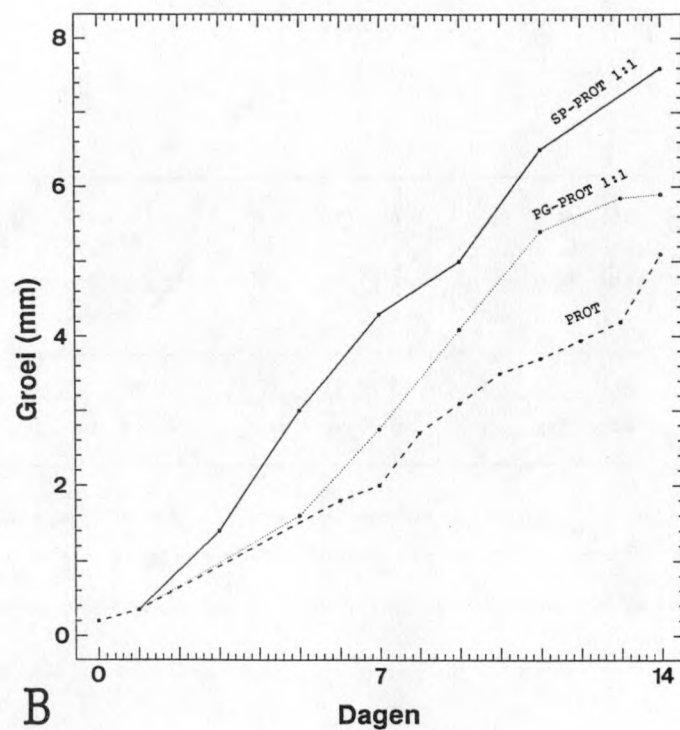
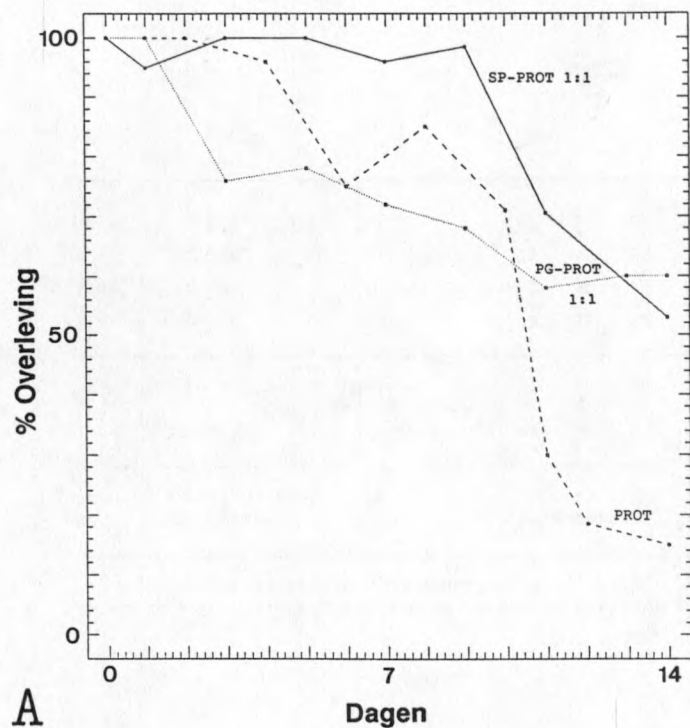


Fig. 22 : Overleving (A) en groei (B) van GSL *Artemia* gekweekt op Protibel-diëten.

en Langdon (1984) formuleerden eenzelfde hypothese voor de kweken van *Brachionus*, respectievelijk *Crassostrea* met gisten. Mogelijk interfereert in ons geval ook nog de hoge oplosbaarheid van het Protibel-produkt en het feit dat er tamelijk vlug slijmvorming optreedt.

Aan de hand van de verkregen resultaten vonden we het interessant om na te gaan of mengdiëten, gedeeltelijk bestaande uit Protibel, de negatieve aspecten van dit voedsel kunnen opheffen. De resultaten van deze proeven met uitzondering van experiment 38 waar de overleving op het einde sterk afnam, geven inderdaad allemaal heel goede produktiecijfers (zie tabel 11).

Figuur 22, die een compilatie is van de produktiekenmerken van de beste kweekreeksen, toont aan dat niet alleen de overleving op peil blijft, maar dat tevens de reeds goede groei bij het Protibel-monodiet verbeterd wordt en dit reeds vanaf dag 5. Bovendien wordt hier een bruto voedselconversie-efficiëntie gehaald van gemiddeld 0,83. Alle SCP-diëten scoren bovendien erg goed wat betreft FCE gedurende de eerste 10 dagen : namelijk 0,5 tot 0,6 terwijl gemicroniseerde voedsels boven de 1,0 blijven. Deze gegevens laten ons toe te veronderstellen dat de *Kluyveromyces* gist wel een interessante grondstof is voor een *Artemia* mengdieet, tenminste wat de biomassa-produktie betreft. Dit stemt overeen met de bevindingen van diverse onderzoekers zoals aangegeven in de literatuurstudie (zie hoofdstuk III.1.2.6.). Wat de aard van de andere component dient te zijn, kan hier moeilijk afgeleid worden. Onze voorkeur gaat uit naar sojapellen in plaats van het maïs-derivaat; het totaal proteïnegehalte van 55 % (PG-PROT) is hier mogelijk te hoog, maar dat blijft zeer speculatief.

Ook andere gemengde diëten blijken goede tot zeer goede produktiekenmerken op te leveren, met uitzondering voor TK-RB zoals hoger reeds vermeld. Vergelijking van de beste proefresultaten per dieet (Fig. 23) toont aan dat er in feite weinig verschillen waarneembaar zijn qua overleving (53-66 %) en lengte (5,2-6,1 mm).



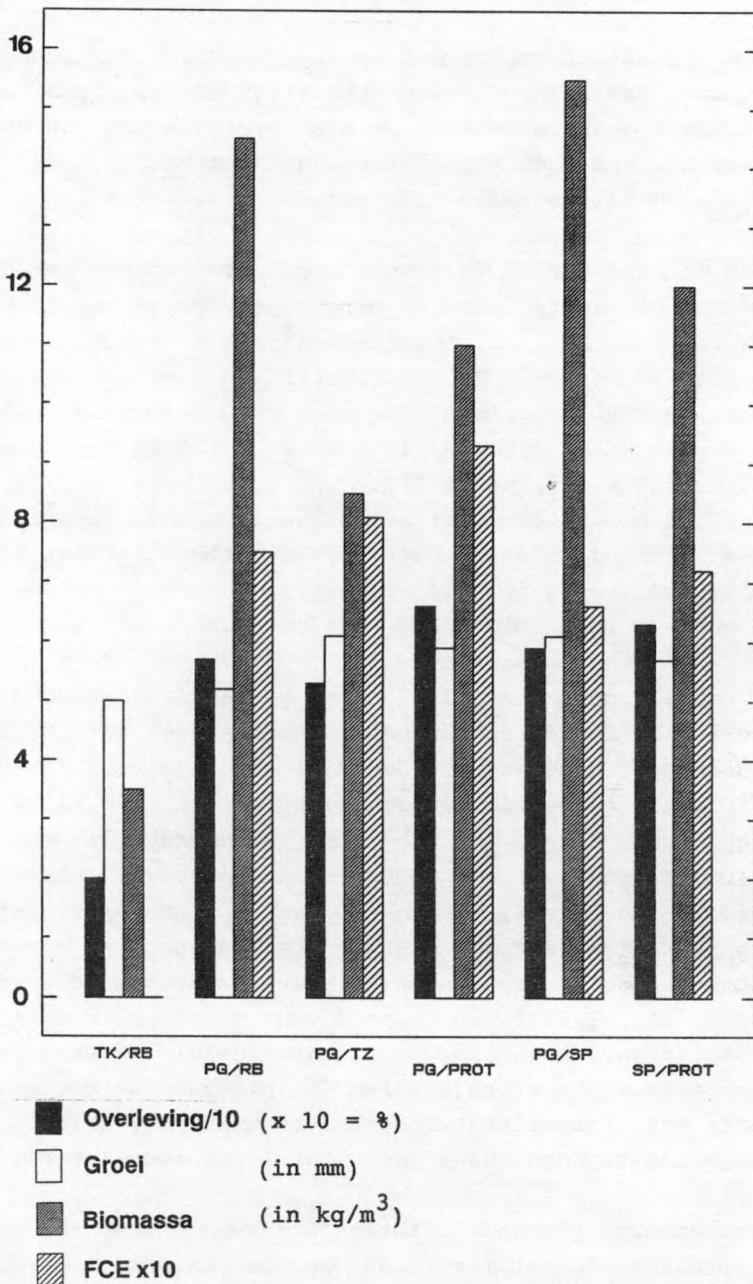


Fig. 23 : Vergelijking van de beste produktiekarakteristieken na 14 dagen teelt van GSL *Artemia* op verschillende samengestelde diëten.

Toch valt (naast TK-RB) de PG-TZ combinatie eerder negatief uit vanwege zijn lage biomassa-productie, overleving, en in mindere mate FCE. Verschillende herhalingen met dit voedsel gaven steeds een piek in mortaliteit omstreeks dag 5-6, dit is tijdens de overgang naar de volledig thoracopodale voortbeweging (= juveniel stadium). De resterende populatie groeit echter snel zodat toch nog 8 kg natgewicht biomassa geproduceerd wordt. De beste kweken werden verkregen met de mengdiëten PG-RB (1:1) en PG-SP (1:4) bij densiteiten lager dan 10 000 larven/l, met produkties aan levend gewicht van pekelkreeften tot 15 kg per m<sup>3</sup> kweekvolume! Opvallend is hier ook dat zowel PG als SP onder de vorm van monodiëten slechts zelden in een goede produktie resulteren: verschillende culturen evolueerden slecht vanaf het begin wegens uitvlokking van het voedsel met als gevolg slechte waterkwaliteit en vroege mortaliteit.

Algemeen kan er geen verband gelegd worden tussen de produktieresultaten en de benaderende biochemische samenstelling van de aangewende diëten (zie tabel 10). De beperkte reproduceerbaarheid van de kweken onder zogenaamde standaardomstandigheden doet veronderstellen dat het succes van *Artemia* teelt op dergelijke restprodukten wel degelijk beïnvloed wordt door de aanwezige microflora die eventuele nutriëntendeficiënties kan aanvullen, zoals ook aangegeven door D'Agostino (1980) en recent door Douillet (1987). Dit verklaart ook waarom het plotseling doch weinig frequent optreden van de zogenaamde "black disease" in ons systeem niet kon gecorreleerd worden met een bepaald voedseltype. Volgens Hernandorena (1974b, 1987) is deze ziekte, waarbij de cuticula van de epidermis loskomt en gemelaniseerde hemocyten gevormd worden (Foto 8), immers een gevolg van nutritionele deficiënties (zoals voor tryptofaan) waardoor het lipidenmetabolisme verstoord wordt.

De resultaten suggereren wel dat het proteïnegehalte op zich niet erg belangrijk is; vezels (SP, RB, PG) daarentegen lijken een optimale biomassa-productie te garanderen. Verder konden er geen significante correlaties

gelegd worden tussen biomassa, groei, overleving of FCE. Uit de resultaten (b.v. experiment 56 versus 57) blijkt zelfs dat lengte als groeicriterium weinig zegt en in feite individueel drooggewicht een beter kenmerk zou zijn. Dit is in tegenstelling tot Reeve (1963d) die een correlatie vastlegde tussen lengte en droge stof bij pekelkreeftjes.

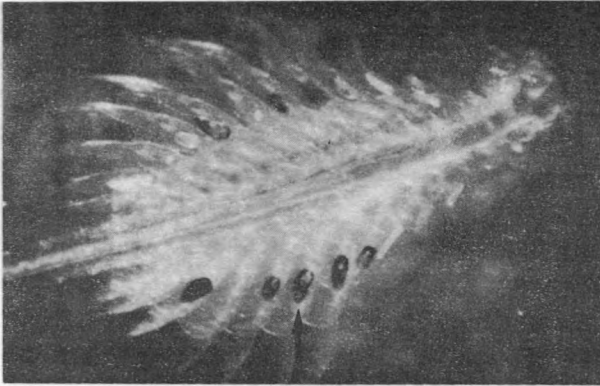


Foto 8 : *Artemia* preadult met 'black disease' ter hoogte van de thoracopoden.

Als conclusie stellen we dat verschillende diëten geschikt zijn voor het kweken van pekelkreeftlarven. Onze voorkeur gaat echter naar mengdiëten van het type PG-SP, PROT-SP en PG-RB vanwege hun :

- goede produktiekarakteristieken;
- relatief goed gedrag in het kweekmedium (lage contaminatie van de waterkwaliteit);
- bevordering van een snelle groei in de beginfase die ervoor zorgt dat vlugger minder kritische zeefopeningen van de 'Trislot'-filter kunnen aangewend worden, wat de waterkwaliteit gunstig beïnvloedt;

Het PG-RB voedsel heeft wel als nadeel dat de samenstelling van de rijstekaf-component varieert naargelang het lot (zie hoger) zodat dit produkt niet in aanmerking komt als standaard kweekvoedsel.

### III.3.3. Kweekdensiteit

Alle testen, ongeacht het ras of voedsel, uitgevoerd bij startdensiteiten hoger dan 15 000 nauplii per liter geven minder goede tot slechte produktieresultaten (b.v. experimenten 2, 3, 5, 6, 7, en 14 in tabel 11).

De proefresultaten waarbij de hoogste biomassakwantiteit verkregen werd voor een gegeven densiteit der GSL populatie zijn samengevat in tabel 13. Bij vergelijking van deze produktiekarakteristieken kunnen we duidelijk enkele tendenzen vastleggen. Densiteiten hoger dan 10 larven per ml vertonen namelijk in de tweede kweekweek duidelijk een hogere mortaliteit, zodat de biomassa-produktie finaal nooit waarden boven de  $10 \text{ kg/m}^3$  bereikt. Lage densiteiten (5 of 8 individuen/l) lijken hier bovendien een hogere initiële groei te geven. Het is onwaarschijnlijk dat dit verschil in groeisnelheid zich verder doorzet naarmate de kweekperiode evolueert. Dit alles heeft voor gevolg dat bij *Artemia* concentraties hoger dan 10/ml de bruto voedselconversie-efficiëntie gevoelig daalt ( $>1,1$ ).

Uit deze gegevens kan men veronderstellen dat het recirculatiesysteem een maximale draagcapaciteit per kweektank oplegt die in ons geval ongeveer 10 000 dieren per liter bedraagt als startdensiteit.

Een meer gedetailleerde vergelijking van twee densiteiten, namelijk 5 en 10 per ml, voor culturen van hetzelfde ras en gevoed met het standaard kweekvoedsel (PG-SP of PG-RB) is gegeven in tabel 14. Hieruit blijkt dat voor het Great Salt Lake ras enkel significante verschillen ( $p = 0,05$ ) in groeisnelheid optreden gedurende de tweede kweekweek (dag 10 en 14). Gemiddelde overleving, biomassa-aanwas en bruto voedselconversie zijn echter gelijklopend. Bij de Tientsin populatie zijn op geen enkel vlak significante verschillen merkbaar. Dit wijst erop dat densiteiten van 10 nauplii/ml nog steeds maximale produktieniveau's kunnen halen na 14 dagen kweek. *Artemia* blijkt dus tot bij

Tabel 13 : Produktiekarakteristieken van GSL populaties die voor een bepaalde startdensiteit aan *Artemia* een maximale biomassa-output opleverden

Code N°	Densiteit (aantal/l)	Overleving (%)			Gemiddelde lengte (mm)			Biomassa (g/l)	FCE
	Dag 1	Dag 7	Dag 10	Dag 14	Dag 7	Dag 10	Dag 14	Dag 14	Dag 14
44	5 000	82	77	58	3,3	4,7	6,1	15,5	0,66
11	8 000	66	50	56	3,2	4,8	5,2	14,5	0,75
19	10 000	95	73	72	1,8	2,9	3,5	11,6	0,67
15	13 000	62	32	28	-	-	-	8,0	1,13
1b	15 000	55	41	34	2,0	2,9	3,8	10,0	1,17
14	18 000	58	37	29	-	-	-	5,8	1,34
7	40 000	74	12	-	1,5	2,3	-	-	-

zeer hoge densiteiten weinig onderhevig te zijn aan het "crowding effect".

Dit wordt bevestigd door de experimenten in de doorvloeikweekinstallatie op de 'Virgin Islands, U.S.A.' met *Chaetoceros c.* als levende voedselbron : hier trad namelijk geen interferentie op met overleving en groei wanneer densiteiten tot 18 pekelkreeftjes/ml aangehouden werden (Tobias *et al.*, 1979; 1980). We veronderstellen dan ook aan de hand van bovenstaande, zij het relatieve gegevens, dat ons recirculatiesysteem sub-optimale omstandigheden creëert waardoor de densiteit voor optimale produktie gelimiteerd wordt tot  $\pm 10\ 000$  dieren per liter. Hoogstwaarschijnlijk is dit te wijten aan de minder optimale waterkwaliteit dan in het St-Croix systeem ten gevolge van het voederen met gemalen diëten.

#### III.3.4. Raskeuze

Slechts enkele geografische rassen werden geëvalueerd met betrekking tot hun toepasbaarheid voor biomassa-produktie in intensieve kweeksystemen (Tabel 15). De kweektesten met *Artemia* afkomstig van Great Salt Lake, Galerazamba en Tientsin leveren geen significante verschillen op met betrekking tot groeisnelheid, overleving, biomassa-produktie en bruto voedselconversie. Voor het San Francisco Bay ras is slechts één kweekresultaat beschikbaar dat qua overleving en biomassa-produktie erg laag scoort. Bossuyt en Sorgeloos demonstreerden voor stagnerende kweeksystemen dat bij het gebruik van GSL in plaats van SFB larven gevoelige produktietoenames optraden. GSL en GZ behoren volgens Vanhaecke (1983) tot de beste rassen voor biomassa-produktie; vergelijkende proeven met rijstekaf als voedselbron bij 21 rassen gaven voor de beide populaties een hoge overleving en groeisnelheid na zeven dagen. Het TIE ras daarentegen vertoonde slechts een matige groei, die zelfs geringer was dan die bekomen voor SFB. Analoge experimenten maar in 2 l doorvloeiaquaria en met *Chaetoceros* als dieet (Tobias *et al.*, 1980) leverden identieke cijfers op voor GSL en GZ na 14 dagen kweek : meer dan 95 % overleving en

Tabel 14 : Produktiekarakteristieken voor twee *Artemia* rassen gevoed met de standaarddiëten in functie van twee startdensiteiten

Code N°	Ras/Voedsel	Densiteit (aantal/l)	Overleving (%)				Groei (mm)			Biomassa (g/l)	FCE
			Dag 1	Dag 7	Dag 10	Dag 14	Dag 7	Dag 10	Dag 14	Dag 14	Dag 14
40	GSL/PG-SP	5 000	100	-	70	2,3	4,0	5,4	8,0	1,23	
44			82	77	58	3,3	4,7	6,1	15,5	0,66	
49			87	71	64	3,2	4,4	5,5	9,7	0,70	
52			74	66	44	2,8	4,3	5,5	8,5	1,09	
56			82	69	53	3,2	5,4	6,8	12,0	0,97	
57			69	62	56	3,7	5,2	6,1	6,5	1,04	
62			90	69	57	1,9	2,4	5,1	8,4	0,73	
			$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	
			83,4	69,0	57,4	2,91	4,34	5,79	9,80	0,92	
			s	s	s	s	s	s	s	s	
			10,3	5,0	8,2	0,63	0,90	0,58	3,03	0,22	
24	GSL/PG-SP	10 000	92	64	59	-	2,8	3,9	5,5	1,09	
48			52	60	60	3,6	4,4	5,2	10,7	0,90	
18	GSL/PG-RB		69	46	31	1,4	2,7	4,7	7,6	1,16	
19			95	73	72	1,8	2,9	3,5	11,6	0,67	
20			90	53	49	2,0	2,9	3,9	11,1	0,66	
21			55	46	48	3,5	4,2	5,2	10,5	1,14	
					$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$
			75,5	57,0	53,2	2,46	3,32	4,00	9,50	0,93	
			s	s	s	s	s	s	s	s	
			19,4	10,7	13,9	1,02	0,68	0,73	2,41	0,23	

50	TIE/PG-SP	5 000	88	66	48	3,1	4,0	5,2	8,3	0,78
54			78	67	50	-	3,8	5,8	9,0	1,33
			$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$		$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$
			83,0	66,5	49,0		3,90	5,50	8,65	1,06
			s	s	s		1,41	0,42	0,49	0,39
<hr/>										
55	TIE/PG-SP	10 000	78	60	44	-	3,9	5,5	7,5	1,49
51			93	64	42	2,3	2,9	4,6	7,6	0,88
			$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$		$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$
			85,5	62	43		3,40	5,05	7,55	1,19
			s	s	s		0,71	0,64	0,07	0,43
<hr/>										



Tabel 15 : Produktiekenarakteristieken van diverse rassen gekweekt op het basisdieet PG-SP

Code N°	Ras	Startdensiteit (aantal/l) Dag 1	Overleving (%)			Gemiddelde lengte (mm)			Biomassa (g/l) FCE	
			Dag 7	Dag 10	Dag 14	Dag 7	Dag 10	Dag 14	Dag 14	Dag 14
40	GSL	5 000	100	-	70	2,3	4,0	5,4	8,0	1,23
44	N-arm		82	77	58	3,3	4,7	6,1	15,5	0,66
49			87	71	64	3,2	4,4	5,5	9,7	0,70
52			74	66	44	2,8	4,3	5,5	8,5	1,09
56			82	69	53	3,2	5,4	6,8	12,0	0,97
57			69	62	56	3,7	5,2	6,1	6,5	1,04
62			90	69	57	1,9	2,4	5,1	8,4	0,73
			$\bar{x}$ 83,4	$\bar{x}$ 69,0	$\bar{x}$ 57,4	$\bar{x}$ 2,91	$\bar{x}$ 4,34	$\bar{x}$ 5,79	$\bar{x}$ 9,80	$\bar{x}$ 0,92
			s 10,3	s 5,0	s 8,2	s 0,63	s 0,90	s 0,58	s 3,03	s 0,22
50	TIE	5 000	88	66	48	3,1	4,0	5,2	8,3	0,78
54			78	67	50	-	3,8	5,8	9,0	1,33
55			78	60	44	-	3,9	5,5	7,5	1,49
			$\bar{x}$ 81,3	$\bar{x}$ 64,3	$\bar{x}$ 47,3	$\bar{x}$ 3,1	$\bar{x}$ 3,9	$\bar{x}$ 5,5	$\bar{x}$ 8,27	$\bar{x}$ 1,20
			s 5,8	s 3,8	s 3,1	s -	s 0,1	s 0,3	s 0,75	s 0,37
26	GZ	7 000	44	44	44	3,7	5,3	6,6	6,0	1,19
27			71	81	65	2,4	3,8	5,5	5,0	1,17
			$\bar{x}$ 57,7	$\bar{x}$ 62,5	$\bar{x}$ 54,5	$\bar{x}$ 3,05	$\bar{x}$ 4,55	$\bar{x}$ 6,05	$\bar{x}$ 5,5	$\bar{x}$ 1,18
			s 19,1	s 26,2	s 14,8	s 0,92	s 1,06	s 0,78	s 0,7	s 0,01
58	SFB	5 000	42	33	22	2,5	3,5	5,1	3,0	1,83

een totaal levend gewicht van respectievelijk 23,5 en 18,5 g/l.

Alhoewel onze proeven zeker te beperkt zijn om tot definitieve conclusies te kunnen overgaan, hebben we toch het GSL ras geselecteerd als standaardras voor biomassa-kweek.

### III.3.5. Optimalisering en standaardisatie van de teelt-procedure

Behalve de arbitrair ingestelde kweekomstandigheden, geïnspireerd door de literatuur terzake (zie III.2.4. en III.3.1.) en de proefondervindelijk vastgestelde densiteitsoptima, basisdiëten en rasselectie (zie hoger), dienen nog andere parameters geëvalueerd te worden om tot een standaard kweekprocedure te komen. Vooral het weren van ziektekiemen en het instellen van toevoerdebieten en voederregimes zijn hierbij erg belangrijk.

#### 1. Bestrijding van infecties

Op diverse tijdstippen tijdens het onderzoeksprogramma hebben we geregeld onverklaarbare, plotse mortaliteiten vastgesteld, zelfs in de vroege kweekstadia. Microscopische observaties brachten aan het licht dat de pekeltkreeftjes geïnfecteerd waren met een filamenteuze bacterie, die hoogstwaarschijnlijk overeenstemt met het *Leucothrix mucor* species beschreven door Solangi *et al.* (1979). De infectie door en identificatie van *Leucothrix* kan pas duidelijk vanaf het juveniele instar VI-VII stadium vastgesteld worden. Dit is waarschijnlijk te wijten aan de kortere tijdspanne tussen de opeenvolgende vervellingen in de larvale stadia waardoor *Leucothrix* de kans niet krijgt om zich te ontwikkelen op het exoskelet. In een later larvaal stadium zijn de pekeltkreeftjes totaal overwoekerd (Foto 9). Volgens Solangi vindt infectie slechts plaats wanneer het medium zeer rijk is aan nutriënten, wat bij ons zeker het geval is. Deze draadvormende bacterie zet zich

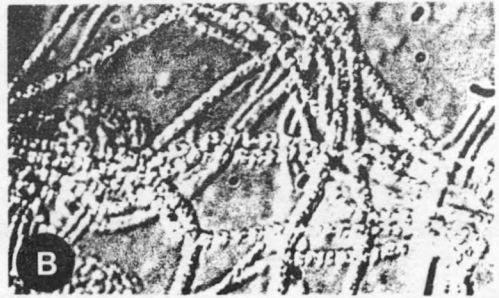


Foto 9 : Detailopname van een *Leucothrix* infectie op *Artemia* thoracopoden (A) en van de filamenteuze bacterie zelf (B).

vast op het exoskelet, bij voorkeur ter hoogte van de thoracopoden, maar schijnt niet te penetreren doorheen de cuticula van het pekelkreeftje. Als gevolg hiervan ondervindt *Artemia* fysische hinder en kan dus minder efficiënt voortbewegen; na een tijd wordt de voedselopname sterk belemmerd en vertraagt de vervellingsnelheid. Er treedt weinig groei op, de kans op overvoeding neemt sterk toe en de pekelkreeftjes sterven uiteindelijk af.

Andere vormen van infecties konden niet geïdentificeerd worden, alhoewel de literatuur nog verschillende types meldt : Procaryota (Post en Youssef, 1977; Gunther en Catena, 1980; Planells, 1987), Fungi (Kamienski, 1899; Lachance *et al.*, 1976; Overton en Bland, 1981), Spirochaeta (Tyson, 1970) en Cestoda (Heldt, 1926; Young, 1952; Maksimova, 1973).

De bestrijding van infecties in een recirculatiesysteem is niet zo eenvoudig. Gezien er een biologisch zuiveringssysteem geïntegreerd is, kunnen we geen gebruik maken van therapeutica zoals Solangi *et al.* (1979), daar die de bacteriële flora volledig zouden elimineren. Bovendien mag de behandeling niet toxisch zijn voor *Artemia*. Daarom hebben we geopteerd voor een andere aanpak van het probleem.

Proeven werden uitgevoerd met waterstofperoxide ( $\pm 1$  mg/l) en actieve chloor ( $\pm 0,1$  mg/l), die selectief toxisch zijn voor draadvormige microorganismen en algemeen toegepast worden in afvalwaterzuivering. De resultaten kunnen als volgt kort samengevat worden :

- na 3 dagen behandeling waren alle preadulten in de blanco erg geïnfecteerd en trad hoge mortaliteit op, terwijl ook reeds 100 % lichte infectie waargenomen werd in het bekken met de actieve chloor-behandeling;
- na 6 dagen waren ook in het bekken met de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandeling 2 op 10 organismen zeer licht geïnfecteerd; de organismen bleven hier echter zeer vitaal; bij het accidenteel uitvallen van de peroxide-dosering

werd na 24 u ook hier een hoge infectie vastgesteld bij alle dieren;

- In de twee behandelde bekkens was de 'fouling' op de wand en op de filters tengevolge van microorganismen miniem.

Uit deze proef kunnen we besluiten dat peroxide-behandeling het meest efficiënt is in de onderdrukking van de filamenteuze bacteriën. Er kon tevens vastgesteld worden dat ook bij het stopzetten van de voeding de infectie teruggedrongen werd.

Een tweede proef, waarbij puntdosering met  $H_2O_2$  toegediend werd aan geïnfecteerde kweektanks, bevestigde een rechtstreeks verband tussen de  $H_2O_2$ -dosering en de afname van de aantallen geïnfecteerde organismen (Tabel 16).

Tabel 16 : Effect van  $H_2O_2$  - puntosering op de gemiddelde overleving en infectiegraad van preadulte GSL *Artemia* na 7 dagen.

$H_2O_2$ (mg/l)	Overleving (%)	Geïnfecteerde dieren (%)
0	80	69
1	95	59
5	95	52
10	85	53
15	95	52
20	85	40
50	100	15

Daar een continue behandeling met  $H_2O_2$  de kweekprocedure erg compliceert, hebben we gepoogd een ander alternatief te ontwikkelen. We hebben namelijk nagegaan of een eenvoudiger methode zoals de toename van het zoutgehalte in het kweekmedium niet voldoende kan zijn om infecties te onderdrukken. Daarom werd de saliniteit geleidelijk opgedreven met NaCl-pekkel tot 50 g/l zonder verstoring van het biologisch zuiveringssysteem. Dergelijke ingreep heeft volgens

Vanhaecke *et al.* (1984) geen negatieve implicaties op de biomassa-productie. Daarenboven werd het wekelijks verversingsdebiet opgetrokken van 10 % naar 25 %. Hoewel geen vergelijkende proefresultaten beschikbaar zijn, werden er sinds de verhoging van de saliniteit geen systematische infecties meer waargenomen. We menen dus te mogen aannemen dat de saliniteitsstress in combinatie met een hogere verversingsgraad voldoende effectief is om *Leucothrix* contaminaties te vermijden.

Dit systeem biedt wellicht toch nog mogelijkheden aan opportunistische bacteriën die zich progressief kunnen ontwikkelen. Daarom hebben we recent (1987) geopteerd voor de inbouw van een U.V.-filterinstallatie ter hoogte van de toevoertoren. De bacteriënverwijdering door deze U.V.-filter werd opgemeten op enkele willekeurig gekozen tijdstippen over een kweekperiode van acht weken. Na steriele bemonstering werd het staal verdund met fysiologische oplossing (7,5 % NaCl). De uitplatingen gebeurden in duplo op strijkplaten met Bacto Marine Agar 2216 (Difco). Deze is bij een pH = 7,6 en een temperatuur van 25 °C geschikt voor de algemene uitplating van heterotrofe, mariene bacteriën; na 4 dagen bereikte de "Colony Forming Unit" (CFU) een constante waarde. De resultaten hiervan vindt men terug in tabel 17.

Tabel 17. "Colony Forming Units" (CFU = aantal/ml) van het influent- (I) en effluentwater (E) van de U.V.-filter

Waarneming*	I	E	% bacteriënverwijdering
a	$3 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	33
b	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	0
c	$1 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^5$	95
d	$3 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	67

\* De monsternamen gebeurden op willekeurige tijdstippen over een periode van twee maanden.

Deze preliminaire gegevens tonen aan dat de bacteriënverwijdering slechts partieel is en daarenboven in hoge mate varieert. Dit kan o.a. te wijten zijn aan de doorzichtigheid van het medium ten gevolge van resterende zwevende stoffen, die een "shading effect" creëren. Bovendien wordt aangenomen dat U.V.-filtratie bacteriostatisch en niet volledig kiemdodend werkt (Rosenthal, 1981a; Spotte en Adams, 1981). Verder onderzoek is hier echter vereist om na te gaan of de installatie van een U.V.-eenheid verantwoord is.

## *2. Afstelling van optimale debieten en voederregimes*

Zoals hoger reeds gemeld wordt de doorvloeijsnelheid ingesteld in functie van de grootte der pekelkreeftjes en de daarmee samenhangende spleetopening der geïnstalleerde 'Trislot'-filter (zie tabel 18). Gedurende de eerste kweekweek is de lage filtrereercapaciteit van de 120-250  $\mu\text{m}$  filters de limiterende factor voor het aanhouden van maximale debieten. Vanaf een 300  $\mu\text{m}$  filter kunnen veel hogere debieten ingesteld worden dan vereist voor een optimale waterkwaliteit; een beperking is hier echter aangewezen daar anders teveel voedsel geëvacueerd wordt met het effluent. Proeven wezen namelijk uit dat onder analoge kweekomstandigheden maar bij verschillende doorvloeijsnelheden de groei en biomassa-productie (en dus voedselconversie-efficiëntie) lager was bij de hoogste debieten (experiment 52-53).

Aan de hand van opgedane kweekervaring hebben we geopteerd voor het volgende doorvloeijschema waar tijdens de eerste zeven dagen de maximum toegestane debieten (in functie van filtratiecapaciteit) aangehouden worden en daarna een instelling plaatsvindt die een compromis is tussen optimale waterkwaliteit (evacuatie van afvalstoffen) en maximale voedselbeschikbaarheid (Tabel 18).

Een doorzichtigheid van ongeveer 20-25 cm leverde de beste resultaten op wat betreft biomassa-productie en voedselconversie-efficiëntie. Tabel 18 geeft het gemiddelde

Tabel 18 : Standaardgegevens voor de kweek van *Artemia* onder doorvloeï-omstandigheden

Kweekdag	Spleetbreedte der filter ( $\mu\text{m}$ )	Debiet (l/u)	Retentietijd in tank (u)	Voedselregime (tijdsduur tussen distributies van telkens 100 ml) (min)	Voedsel per dag toegediend (g)
1	120	80	4	36	100
2	150	100	3	30	120
3 - 4	200	100	3	24	150
5 - 7	250	150	2	20	180
8 - 9	300	150	2	18	200
10 - 12	350	200	1,5	15	240
13 - 14	350	300	1	12	300



weer van de automatische instellingen van het voederregime voor het standaardvoedsel PG-SP om deze doorzichtigheids-waarde te handhaven. Deze waarden zijn echter slechts een richtlijn en kunnen van kweek tot kweek variëren, mede door de ongecontroleerde ontwikkeling van microorganismen.

### 3. Prognose van de populatiekarakteristieken

Teneinde een algemene indruk van de overleving en de groeikarakteristieken onder standaardomstandigheden te kunnen opmaken, is het gemiddelde genomen van de waarden voor dagen 2, 4, 6, 8, 10, 12 en 14 van alle geslaagde kweekproeven met GSL bij startdensiteiten <10/ml en met een standaarddieet (experimenten 11, 19, 20, 21, 42, 44, 45, 46, 48 en 56). Deze gegevens zijn grafisch weergegeven in figuur 24, samen met de bekende literatuurgegevens van open doorvloei-experimenten met wieren en rijstekaf als voedsel. Hieruit blijkt dat  $55 \pm 10$  % der pekelkreeftjes de 14 dagen durende kweekperiode overleven en tot  $5,6 \pm 1,3$  mm groeien. Mortaliteit treedt geleidelijk op tussen dag 3 en 8; bij Brisset (1981) is dit tussen dag 1 en 6. Waarschijnlijk is deze mortaliteit te wijten aan de transitie tijdens deze periode van het nauplius naar juveniel stadium waar voortbeweging, voedselopname en ademhalingsfuncties door de thoracopoden overgenomen worden. Alhoewel dit proces geen plotse metamorfose is, kan ze toch voldoende radicaal zijn om de gevoeligheid der larven ten overstaan van omgevingsfactoren te verhogen. Deze omgevingsparameters zijn blijkbaar minder kritisch bij open doorvloei met *Chaetoceros* als levend voedsel daar Tobias *et al.* (1979) slechts een geringe mortaliteit noteerden tijdens deze kweekfase. Vergelijken met stagnerende renbaan-kweeksystemen (Sorgeloos *et al.*, 1986) is niet alleen de daling tijdens die kritische fase minder spectaculair (68 % overleving ten opzichte van 55 %), maar blijft de overleving ook op peil gedurende de tweede kweekweek (55 % tegenover 30 %), wat opnieuw te wijten is aan waterkwaliteitsverschillen. Wat de groei betreft blijkt de lengtetoe name in ons kweekstelsel ongeveer lineair te verlopen, terwijl voor de andere systemen

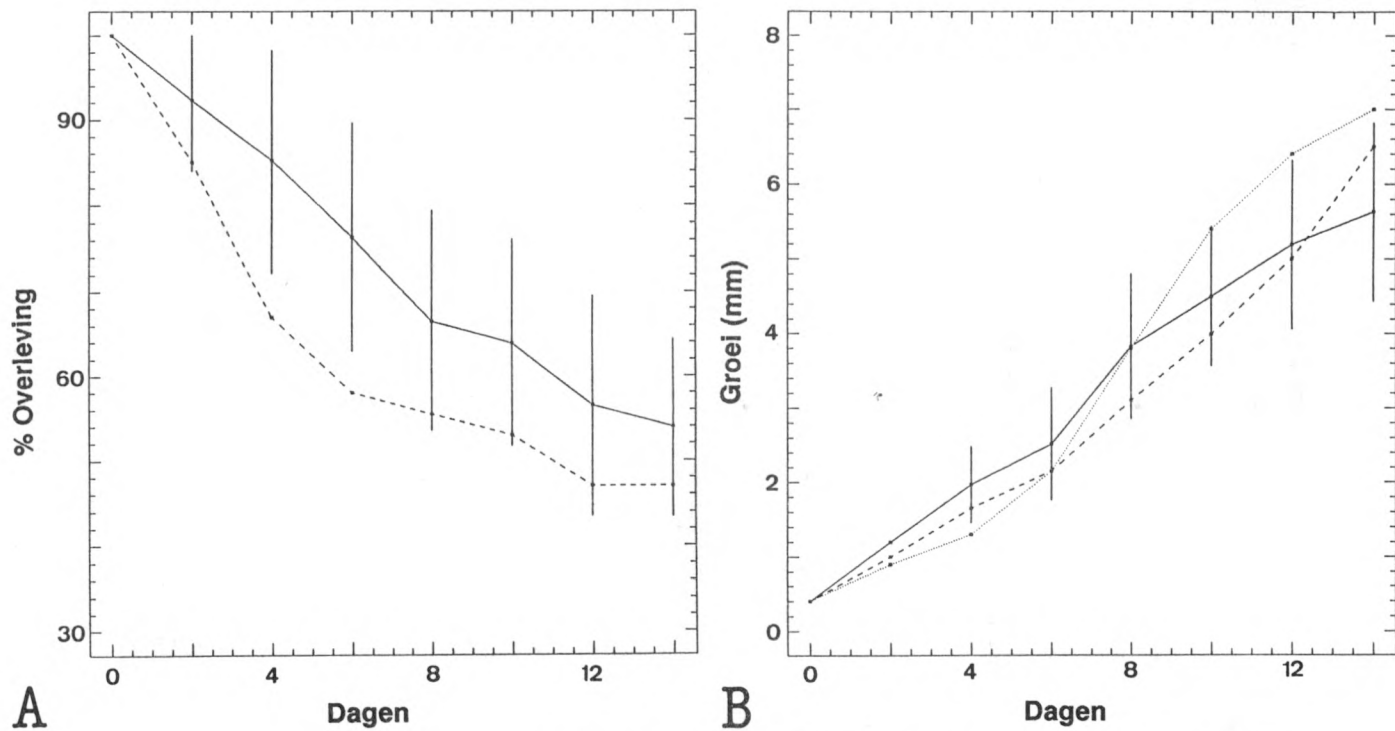


Fig. 24 : Overleving (A) en groei (B) van GSL *Artemia* geteeld in verschillende doorvloeisystemen.

- : eigen proeven met standaarddiëten (gemiddelde waarden; verticale lijn = standaardafwijking)
- - - : open doorvloei met rijstekaf (Brisset *et al.*, 1982)
- .... : open doorvloei met *Chaetoceros* (Tobias *et al.*, 1979, 1980).

een tragere start geldt maar een exponentiële groei tijdens de tweede cultuurweek, zodat finaal zelfs hogere waarden bereikt worden. Niettemin dient opgemerkt te worden dat de variabiliteit tussen de kweektanks en binnen een *Artemia* kweek zelf heel hoog is (tot 25 %).

Opmerkelijk is wel dat pekelkreeftjes in een periode van 14 dagen groeien met een factor 15 terwijl de biomassa toeneemt met een factor 120 (van 2,5  $\mu\text{m}$  naar 300  $\mu\text{m}$  individueel drooggewicht of 3 mg natgewicht).

We mogen dan ook besluiten dat het hier voorgestelde doorvloei-recirculatiesysteem onder standaardomstandigheden kan instaan voor de kweek van hoge concentraties *Artemia* larven met een voldoende groeisnelheid en uiteindelijk een hoge biomassa-productie.

### III.4. GEBRUIK VAN INTENSIEF GEPRODUCEERDE ARTEMIA JUVENIELEN EN ADULTEN IN DE AQUACULTUUR

Alhoewel pas ontloken nauplii sinds enkele decennia als een voortreffelijk levend voedsel gebruikt worden in de larvale aquacultuur, is de toepassing van opgegroeide pekelkreeften slechts recent echt in de belangstelling gekomen. Nochtans hadden in de jaren '70 meerdere onderzoekers aangetoond dat *Artemia* juvenielen en adulten een betere voedselbron waren dan instar I-nauplii voor de grotere larven van diverse aquacultuurspecies : *Macrobrachium rosenbergii*, *Penaeus kerathurus*, *Palaemon serratus*, *Homarus americanus*, *Pleuronectes platessa*, *Solea solea*, *Scophthalmus maximus*, *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, enz. (zie review van Léger et al., 1986). De redenen voor deze desinteresse waren de gelimiteerde commerciële beschikbaarheid van levende of diepgevroren *Artemia* biomassa, de hoge kostprijs en de variabele kwaliteit (Lai en Lavens, 1987). Volgens Brouillet (1977) maakte een dieet van preadulte *Artemia* 20 à 30 % uit van de produktiekost van tong- en zeebaarsjuvenielen na metamorfose.

De toepassing van intensieve kweek van *Artemia* in de nabijheid van het aquacultuurbedrijf zelf, naast inoculaties in potentieel geschikte (tijdelijke) biotopen, hebben de interesse voor dit produkt sterk doen toenemen. Daarbij wint intensief geproduceerde *Artemia* biomassa, ondanks de hogere produktiekost, aan belang omwille van de volgende, onmiskenbare voordelen :

- intensieve *Artemia* kweek is weinig afhankelijk van het klimaat en kan het gehele jaar door plaatsvinden (= continue beschikbaarheid van levend voer);
- specifieke stadia (juvenielen, preadulten, adulten) van geselecteerde afmetingen kunnen geogst worden in functie van eventuele grootte-restricties voor de predator;
- kwaliteit (b.v. nutritioneel, vrij van ziektes; zie verder) kan gemanipuleerd worden.

De pro's en contra's van de verschillende kweekprocédés zijn vroeger uiteengezet; de selectie zal uiteindelijk afhangen van de lokale mogelijkheden en wensen in verband met integratie, automatisatie en rentabiliteit.

Wat de nutritionele karakteristieken van intensief geproduceerde pekelkreeften betreft kan uit de literatuur opgemaakt worden dat die ongeveer analoog zijn met deze van natuurlijke populaties, met uitzondering van het vetzuurpatroon. Daar preadulte pekelkreeften een extreem dun exoskelet hebben (= Anostraca), interfereert dit niet met de verteerbaarheid van het gehele dier door predatoren. Ten opzichte van instar I-larven is het proteïnegehalte in adulten merkbaar hoger (gemiddeld 60 % in plaats van 47 %) en vooral rijker aan essentiële aminozuren. Dit is onafhankelijk van de eiwitsamenstelling van het toegediende dieet (Tabel 19 en 20; Sorgeloos, 1979; Ronsivalli en Simpson, 1987). Het lipidenprofiel daarentegen wordt wel beïnvloed door het aangeboden dieet : is dit laatste arm aan hoogwaardige onverzadigde vetzuren (H.U.F.A.), zoals in de standaarddiëten, dan zal de *Artemia* biomassa ook opmerkelijk lage concentraties vertonen, hoewel er bij *Artemia* toch enige biosynthese kan optreden om aan de metabolische vereisten te voldoen (Tabel 20; Léger *et al.*, 1986).

Nochtans is volgens Watanabe *et al.* (1980) en Léger *et al.* (1986) juist de lipidenamenstelling de meest kritische factor die de voedselwaarde van *Artemia* bepaalt.

Daar de H.U.F.A. en meer bepaald 20:5 $\omega$ 3 (eicosapentaeenzuur) en 22:6 $\omega$ 3 (docosahexaeenzuur) echter essentiële vetzuren zijn voor mariene predatoren (Watanabe *et al.*, 1980), mag verondersteld worden dat de geproduceerde *Artemia* biomassa nutritioneel ongeschikt is om te voederen aan mariene vissen en garnalen. Toch is hier een vlugge en relatief eenvoudige methode voorhanden om deze H.U.F.A.-niveau's te verhogen tot zelfs 'supra-natuurlijke' concentraties, door toepassing van de aanrijgings- of bioëncapsulatie-procedures (Sakamoto *et al.*, 1982; Léger *et al.*, 1987). Volgens deze techniek wordt vóór het oogsten aan de *Artemia* cultuur een H.U.F.A.-rijke suspensie (b.v. een

Tabel 19 : Biochemische samenstelling (in % van het drooggewicht) van intensief gekweekte preadulten in vergelijking met pas ontloken nauplii van het GSL ras

<i>Artemia</i> karakteristieken	Proteïnen	Lipiden	N-vrij extract	As	Referentie
nauplii	41,6 - 47,2	20,8 - 23,1	10,5 - 22,7	9,5	Von Hentig 1971; Claus <i>et al.</i> , 1979; Schauer <i>et al.</i> , 1980
preadulten gekweekt op PG/SP(1:4) in het recirculatiesysteem	55,2	17,6	10,4	16,8	Abelin, pers. meded., 1988
preadulten gekweekt op RB in het stagnerend renbaansysteem	56,5	19,5	-	9	Dobbeni, 1983

Tabel 20 : Vetzuur- en aminozuurprofiel van GSL preadulten, gekweekt in het recirculatiesysteem met PG-SP als standaardvoedsel (persoonlijke mededeling, Abelin)

A. VETZUREN <sup>(1)</sup>		B. AMINOZUREN <sup>(2)</sup>	
verzadigd	16,20	essentiële	26,94
14:0	0,70	tryptofaan	
15:0	0,50	lysine	4,23
16:0	9,10	histidine	1,30
17:0	0,70	arginine	2,69
18:0	5,20	threonine	2,42
19:0		valine	3,20
20:0		methionine	0,71
24:0		isoleucine	2,96
		leucine	4,52
		tyrosine	2,16
		phenylalaline	2,75
onverzadigd	46,70	niet essentiële	25,71
14:1	1,20		
14:2			
15:1	0,30	asparagine	5,82
16:1 $\omega$ 7 + 16:1 $\omega$ 9	4,30	serine	2,63
16:2		glutamine	7,54
16:3	0,30	proline	3,29
17:1		glycine	2,68
18:1 $\omega$ 7 + 18:1 $\omega$ 9	18,30	alanine	3,61
18:2	15,90	cysteine	0,14
18:4	0,10		
19:4			
20:1	4,00		
21:5	0,30		
22:1	2,00		
24:1			
onverzadigd $\omega$ 3	9,00		
18:3			
20:3	0,30		
20:4			
20:5	2,80		
22:3	0,90		
22:4			
22:5	0,40		
22:6	4,60		
Onverzadigd $\omega$ 6	0,40		
18:3			
20:3			
20:4			
22:4	0,40		
22:5			

(1) waarden uitgedrukt  
mg/g droge stof

(2) waarden uitgedrukt  
in g/100 g droge stof

fijnkorrelige emulsie op basis van levertraanolie) toegediend. Indien de suspensieconcentratie voldoende hoog is, vult de niet-selectieve filtervoeder *Artemia* binnen een periode van 1 u zijn darm volledig met deze lipidendruppels (De Rouck, 1987; Fig. 25 en 26). Bij opname van deze aangerijkte *Artemia* door de predator worden tegelijkertijd deze lipiden geïncorporeerd.

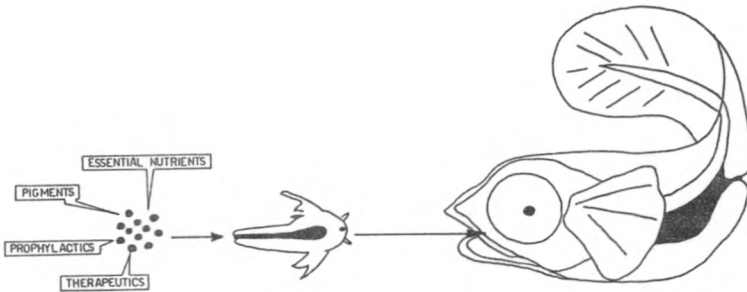


Fig. 25 : Schematische voorstelling van de toediening van partikulair componenten aan predatorlarven via bioëncapsulatie in *Artemia*. (naar Léger et al., 1986)

In feite opent deze techniek interessante perspectieven om tevens essentiële nutriënten, pigmenten of therapeutica toe te dienen aan specifieke predatoren (Léger et al., 1986). Een belangrijke rol kan hier weggelegd zijn voor intensief geproduceerde pekelkreeften, daar de kweekinfrastructuur ook voor de aanrijking kan aangewend worden en geen acclimatisatie voor hoge densiteiten en/of lagere zoutgehaltenes doorgevoerd moet worden (zoals voor produkties uit de natuur). Zo werden aan het aquacultuurdepartement van SEAFDEC, Filippijnen, reeds experimenten aangevat waarbij 'milkfish' larven (*Chanos chanos*) gevaccineerd werden door middel van intensief gekweekte *Artemia*



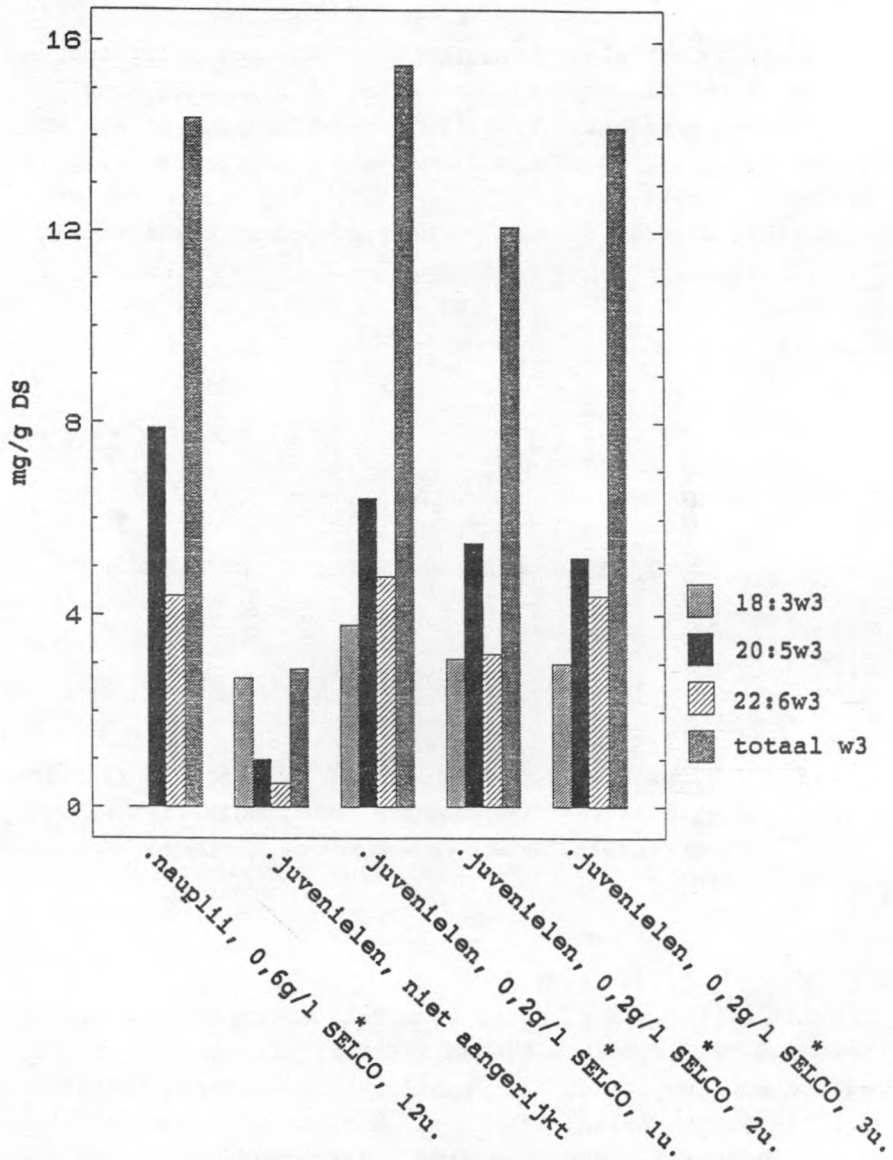


Fig. 26 :  $\omega$ 3 - HUFA gehalte van aangerijkte en niet aangerijkte GSL juvenielen (7 dagen oud) in vergelijking met 12 u aangerijkte nauplii. (in mg/g droge stof)

(\*) : produkt van Artemia Systems, N.V.

juvenielen die vooraf verzwakte bacteriënstammen gebioëncapsuleerd hadden (Liu-Po, persoonlijke mededeling).

Opgegroeide *Artemia* zijn voor de larvale cultuur van vissen en kreeftachtigen niet alleen vanuit nutritioneel maar ook vanuit energetisch oogpunt interessant. De predatorlarven dienen immers minder prooidieren te jagen en te consumeren om per tijdseenheid eenzelfde kwantiteit voedsel te assimileren in vergelijking met het voederen met pas ontloken larven. Dit resulteert op zijn beurt in een betere netto-energiebalans en heeft positieve gevolgen voor groei en ontwikkelingssnelheid, zoals aangetoond door Sick en Beaty (1975) en Purdom en Preston (1977) voor respectievelijk *Macrobrachium* en *Scophthalmus* larven. Het stadium waarop progressief *Artemia* juvenielen tot adulten kunnen gevoederd worden, is afhankelijk van de fysische opnamebeperkingen der predator : b.v. 2 mm *Artemia* vanaf PL V bij *Penaeus monodon* (Dhert, persoonlijke mededeling), adulten voor larven van *Homarus americanus* (Chang en Conklin, 1983).

Volgens Zmora (Artemia Newsletter N° 6, 1987) leidde de introductie van preadulte *Artemia* tijdens de larvale produktie van *Sparus aurata* tot zeer kost-effectieve resultaten door een significant hogere produktie van uitpootbare zeebrasem-juvenielen en het reduceren van het cystenverbruik tot ongeveer 1/3. Daarnaast toonden experimenten met zowel opgekweekte als gevangen *Chanos chanos* en *Siganus guttatus* juvenielen aan dat, vooraleer deze dieren uit te zetten in de produktievijvers, een tijdelijke voeding met levende pekelkreeftadulten tot veel hogere oogstcijfers leidt. Deze visjuvenielen zijn immers resistenter tegen de transportomstandigheden en de fluctuerende parameters in de kweekvijvers (de los Santos et al., 1980; SEAFDEC, persoonlijke mededeling).

Samengevat hebben nu reeds verschillende aquacultuurbedrijven intensieve *Artemia* produktiesystemen geïntegreerd in hun broedhuizen, zoals b.v. :

- Ferme Marine du Croisic, France : *Penaeus japonicus*;
- Giant Prawn Hatchery, Vung Tau, Vietnam : *Macrobrachium rosenbergii*;
- Aquaculture Sud Tunisien, Tunesië : *Dicentrarchus labrax* + *Sparus aurata*;
- Seafdec AQD, Tigbauan, Filippijnen : *Penaeus monodon*, *Lates calcarifer*, *Siganus guttatus*, *Chanos chanos*;
- Southern Seafarms Ltd., Perth, Australië : *Coryphaena hippurus*.

Hoewel ons geen rentabiliteitsstudies van dergelijke toepassingen bekend zijn, zal het succes mede bepaald worden door de verticale integratie van *Artemia* in het totale productieproces van vissen en Crustacea (Fig. 27). Zo kunnen de preadulten verder opgekweekt worden tot reproductief actieve dieren, die op hun beurt geïnduceerd worden tot naupliiproductie (zie verder). Recent werd tevens gerapporteerd dat de voeding van reproductief actieve *Artemia* de maturatie van penaeïde garnalen induceert (zonder het wegknippen van oogstelen) (Camara en De Medeiros Rocha, 1987), wat een belangrijke innovatie kan betekenen in het sluiten van de levenscyclus bij deze species. Het kweken van verschillende stadia van pekelkreeften kan aldus de produktiekost drukken en de economische haalbaarheid ervan verzekeren. Dit was ook één van de conclusies van de werkgroep 'Artemia as a business perspective' tijdens het *Artemia* congres in 1985 (Lai en Lavens, 1987).

Tenslotte werden in het laatste decennium diverse *Artemia* installaties opgezet om aan de lokale marktpraak van de aquarium-hobbyisten te voldoen, daar transportkosten vanuit de natuurlijke biotopen waar afoogsting mogelijk is te hoog zijn. In feite mag die toepassing niet onderschat worden want "... today more than 3 500 tonnes of *Artemia* biomass are harvested on an annual basis from natural systems and commercialized as a live or frozen product mostly to the tropical and ornamental pet fish industry" (Lai en Lavens, 1987). Voor Singapore b.v. is recent zelfs

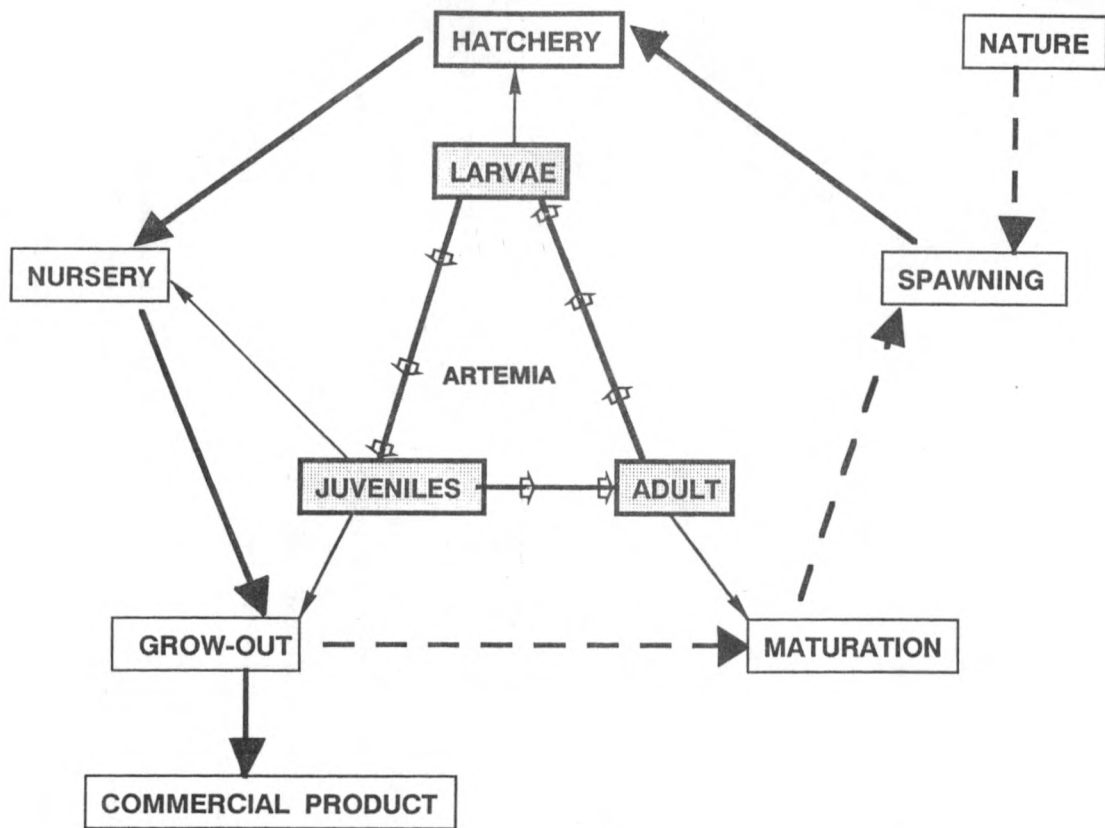


Fig. 27 : Schematische illustratie van verticale integratie van *Artemia* in de aquacultuur.

een flessehalssituatie ontstaan : "the tropical aquarium industry worth nearly 50 million US dollar to Singapore, is being threatened by a shortage of live foods" (Shim, 1988). Voorbeelden van bestaande intensieve *Artemia* boerderijen voor deze markttoepassing zijn :

- Yorkshire Brine Shrimp Suppliers, Leeds, Engeland;
- Darquene, Brussel, België;
- Victorian Brine Shrimp Growers, Adelaide, Australië;
- Brintech International Ltd., Perth, Australië;
- Kimcul Ltd., Derby, Australië;
- San Francisco Bay Brand Cy., San Diego, V.S.A;

Afhankelijk van de gekozen kweektechnologie en inplantingsfaciliteiten zou de produktiekost tussen de 100 en 450 BF per kg levend gewicht aan *Artemia* liggen; verkoopprijzen liggen echter minimum 10 maal hoger!

Alhoewel in de literatuur nog verschillende toepassingsmogelijkheden in verband met het gebruik van *Artemia* biomassa beschreven zijn, lijkt het ons weinig realistisch dat deze marktsegmenten door intensieve kweekprocédés kunnen ingenomen worden. De concurrentie van goedkope biomassa geogst uit natuurlijke produktiebiotopen is hier immers te groot. Dergelijke toepassingen zijn b.v. :

- diepgevroren of gevriesdroogde biomassa als intermediair dieet om de transitie van levende naar artificiele voedsels beter te overbruggen, dit vooral bij vis- sen (= 'weaning')(Barahona-Fernandes *et al.*, 1977);
- als dieetcomponent of reuk- en smaakstof in artificiële, larvale voedsels;
- gemalen, gevriesdroogde biomassa als substitutiedieet voor *Artemia* nauplii (Guimaraes en Lira Do Rego, 1987);
- als dierlijke proteïnebron voor terrestrische organismen (b.v. kippen : Corazza en Saylor, 1983) en zelfs de mens (Ronsivalli en Simpson, 1987) (eventueel voor intraveneuze opname : zie overzicht Léger *et al.*, 1986).

## HOOFDSTUK IV

### GECONTROLEERDE PRODUCTIE VAN NAKOMELINGEN IN RECIRCULATIESYSTEMEN

#### IV.1. DOELSTELLINGEN

Eind de jaren '70 werd het duidelijk dat binnen eenzelfde *Artemia* 'sibling' species populaties duidelijk onderscheiden kunnen worden die erg verschillende karakteristieken bezitten wat betreft biometrie, biochemische samenstelling, fysiologie, enz. (zie Vanhaecke, 1983). Deze problematiek wees op de noodzaak van beter gedefinieerd biologisch studiemateriaal. Veel vaststellingen konden immers niet causaal verklaard worden daar het onderzoeksmateriaal afkomstig was van commercieel verkrijgbare cysten, waarvan enerzijds geen precieze of onvoldoende achtergrondinformatie bekend was, en anderzijds de variabiliteit tussen de monsters zeer hoog was. Voorbeelden hiervan zijn de vele vraagtekens omtrent de factoren die de ontluikbaarheidsverschillen of de nutritionele geschiktheid voor predatoren bepalen tussen diverse cystenmonsters. We verwijzen hiervoor naar hoofdstuk V.

Productie van voldoende kwantiteiten cysten onder specifieke en goed gecontroleerde omstandigheden kan hier een oplossing brengen. Intensieve kweek lijkt daarvoor aangewezen omdat een maximum aan parameters in de hand kunnen gehouden worden.

Reeds in 1980 ontwikkelden Versichele en Sorgeloos een techniek voor cystenproductie in stagnerende renbaansystemen. Hun systeem biedt echter geen garantie voor een constante overleving, optimale productie-omstandigheden en een snelle afoogsting van de pas afgelegde, niet gedeshydrateerde cysten. We hebben dan ook geopteerd voor het ontwikkelen van een nieuw systeem dat deze variabelen wel controleert en bovendien voldoende kwantiteiten cysten produceert voor verder onderzoek. De uiteindelijke

bedoeling is namelijk om de invloed te bestuderen van diverse produktie-omstandigheden zoals voedselkwaliteit en -kwantiteit, saliniteit, densiteit, enz... op kenmerken zoals ontluiking, biometrie, nutritionele samenstelling en resistentie van de geproduceerde nakomelingen.

Eventueel zou deze installatie ook de mogelijkheid van schaalvergroting moeten bieden zodat in een latere fase voldoende cysten met typische kenmerken (die eventueel niet in de natuurlijke populaties aangetroffen worden) geproduceerd kunnen worden voor meer specifiek onderzoek of voor inoculatie in geschikte vijvers. Dit zou er moeten toe leiden grote kwantiteiten te produceren van een superkwaliteit materiaal voor specifieke aquacultuurtoepassingen. Een ander domein waarin dergelijke cysten van nut zouden zijn is het ecotoxicologisch onderzoek : de 'Environmental Protection Agency of the United States' postuleert dat het gebruik van cysten geproduceerd in gecontroleerde kweeksystemen een essentiële vereiste is om tot standaardtesten te kunnen overgaan (EPA-rapport, 1983).

In tweede instantie wensen we ook na te gaan of de reproductiewijze bij *Artemia* niet gemanipuleerd kan worden in de richting van ovovivipariteit. Dit zou interessante toepassingsvelden in de larvale aquacultuur kunnen openleggen. Plaatselijke produktie van nauplii zou immers de onafhankelijkheidspositie van de kwekerijen versterken ten overstaan van de internationale cystenmarkt met zijn fluctuerende prijzen, kwantiteiten en kwaliteiten. Eventueel kan zelfs een larvaal voedsel met unieke eigenschappen afgeleverd worden, zoals b.v. superkleine nauplii. Daarenboven kan dergelijke techniek de integratie van *Artemia* kweek in de broedhuizen vergemakkelijken (zie hoofdstuk III.4.).

Naast deze industriële toepassingsmogelijkheden biedt gecontroleerde nauplii-produktie ook een unieke gelegenheid om vergelijkend onderzoek te verrichten tussen ovipaar en ovovivipaar geproduceerde nakomelingen, verkregen onder

identieke kweek-omstandigheden. In de literatuur is immers praktisch niets vermeld omtrent morfologische, fysiologische en biochemische karakteristieken van levend geboren larven.

In het kader van dit onderzoeksdeel hebben we vooral oog gehad voor innovaties met betrekking tot drie aspecten:

- optimalisatie van de kweektechnologie zodat adulte populaties langdurig in kweek kunnen gehouden worden;
- ontwikkelen van geschikte inductietechnieken zodat slechts één reproductievorm voorkomt binnen de populatie en zonder dat andere populatiekarakteristieken geschaad worden zoals overleving, fecunditeit, enz...;
- ontwikkelen van een technologie voor continue afoogsting van de pas afgelegde  $F_1$ -generatie.



## IV.2. LITERATUURSTUDIE

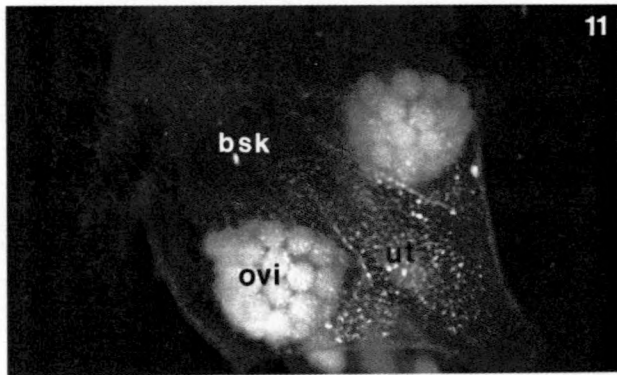
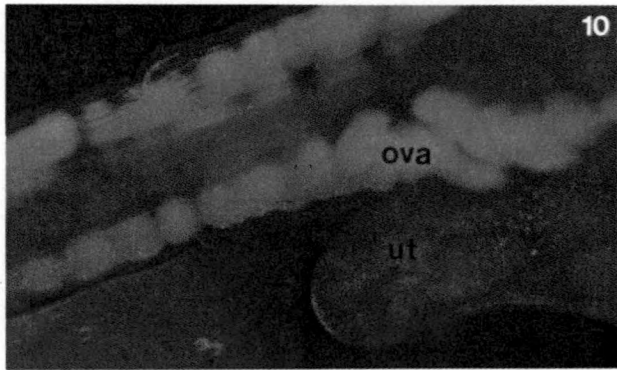
### IV.2.1. Voortplantingscyclus

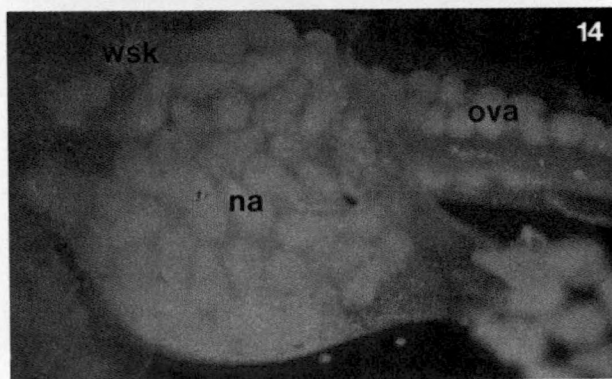
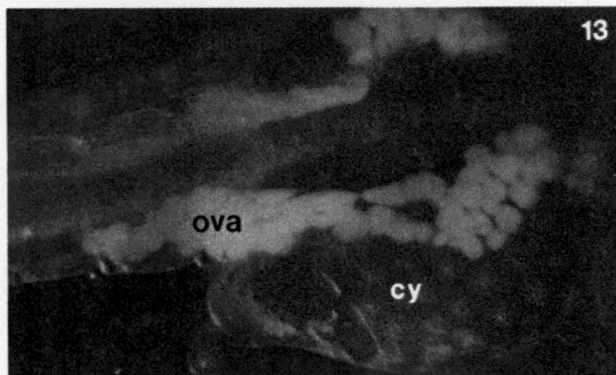
Een overzicht van de reproductiesystemen bij *Artemia* mannetjes en wijfjes is opgenomen in hoofdstuk II.2. Hier volgt slechts een bondige samenvatting van de voortplantingscyclus (voor meer details verwijzen we naar Versichele, 1983).

Na oögenese en vitellogenese in de ovaria komen de oöcyten door ovulatie in de oviducten terecht waar gedurende  $\pm$  40 u een verdere rijping plaatsvindt (Criel, 1980). Pas na copulatie (bij de zygogenetische populaties) dalen ze verder af naar de uterus waar de uiteindelijke bevruchting gebeurt (Lochhead, 1941; Von Hentig, 1971). De verdere embryonale ontwikkeling duurt ongeveer drie tot vijf dagen en is synchroon binnenin eenzelfde worp (Fautrez en Fautrez-Firlefijn, 1977). Een gedetailleerde beschrijving van de opeenvolgende klievingen is terug te vinden in het standaardwerk van Benesch (1969). Van zodra de eieren afgedaald zijn in de uterus en het moederdier een nieuwe vervelling doorgemaakt heeft, kan een volgende reproductiecyclus aanvangen (Bowen, 1962; Metalli en Ballardin, 1972). Hierdoor kunnen gelijktijdig twee voortplantingscycli bij eenzelfde wijfje waargenomen worden. Bevruchting kan echter pas optreden na een nieuwe copulatie. De ontwikkeling van de embryo's in de uterus kan op twee verschillende wijzen plaatsvinden : ovovivipariteit of ovipariteit, en dit ongeacht het partheno- of zygogenetisch karakter van de *Artemia* populatie en de aard van de laatste worp (nauplii of cysten). Binnenin hetzelfde broed is maar één ontwikkelingspatroon mogelijk.

### IV.2.2. Ovovivipariteit versus ovipariteit

In het geval van ovovivipare ontwikkeling worden de embryo's in de uterus omgeven door een embryonair cuticulum





Foto's 10 tot 14 : Voortplantingscyclus bij *Artemia* : (10) vorming van oöcyten in de ovaria (ova); (11) afdaling in oviducten (ovi); en (12) uterus (ut) waar uiteindelijk (13) cysten (cy) of (14) nauplii (na) gevormd worden. (13) en (14) tonen eveneens de superpositie van twee cyclussen. (wsk) = witte schaalklier; (bsk) = bruine schaalklier; (da) = darm.

(zie Benesch, 1969). Dit cuticulum bestaat uit een binnenste cuticulair membraan afgescheiden door het embryo zelf en een buitenste membraan dat gevormd wordt door het moederdier; tussenin bevindt zich een fibreuze laag (Lochhead en Lochhead, 1940). Volgens De Chaffoy *et al.* (1978) is het buitenste cuticulair membraan, dat hoogstwaarschijnlijk afgescheiden wordt door de witte schaalnier (Criel, 1980), essentieel voor de verdere ontwikkeling tot nauplius. Na ongeveer 100 u doorbreekt de nu volledig ontwikkelde larve het cuticulum; enkele minuten later wordt de larve uit de uterus in het medium gedreven (Benesch, 1969).

Het alternatief in de embryonale ontwikkeling is ovi-pariteit. Hierbij wordt de embryogenese stilgelegd (=diapauze) tijdens het gastrula II-stadium (Benesch 1969). Rondom de cuticula wordt door de bruinrode schaalnieren een bruine schaal of tertiair omhulsel afgezet (Anderson *et al.*, 1970; Criel, 1980). Na opbouw en differentiatie bestaat de cysteschaal (Fig. 28) van binnen naar buiten uit een alveolaire laag, een corticale laag en een buitenste membraan (Morris en Afzelius, 1967; Anderson *et al.*, 1970; Khalaf *et al.*, 1978). Binnenin is ondertussen een koolhydratenreserve aangelegd van trehalose (tot 17 % van het totaal drooggewicht der cyste : Clegg, 1965). Samen met het tertiair hulsel zal deze trehalose een belangrijke rol spelen in het helpen vrijwaren van de leefbaarheid van het embryo ~~na nabouwingen~~ in het biotoop (zie hoofdstuk V.2.1.). Na opheffing van het diapauze-mechanisme en na overbrenging in optimale ontluikingsomstandigheden ontwikkelt het embryo zich op ongeveer analoge wijze als de ovovivipare embryo's tot een vrijzwemmende instar I-nauplius (Benesch, 1969).

Dutrieu (1962) veronderstelde dat het verschil tussen ovipariteit en ovovivipariteit enkel te wijten was aan de schaalvorming. Volgens haar zou ook ovovivipariteit een korte ontwikkelingsfase met diapauze, geïnduceerd door

carotenoproteïnebindingen, doormaken. Doordat echter geen schaal gevormd wordt, zou het embryo in contact blijven met

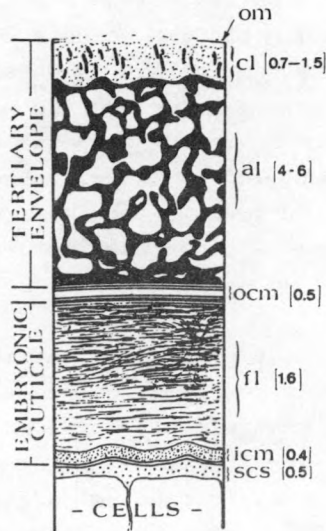


Fig. 28 : Schema van de ultrastructuur van de cysteschaal van *Artemia* embryo's. (naar Clegg en Conte, 1980)  
 om : buitenste membraan; cl : corticale laag;  
 al : alveolaire laag; ocm : buitenste cuticulair membraan; fl : fibreuze laag; icm : binnenste cuticulair membraan; scs : subcuticulaire ruimte (getallen tussen haakjes geven de dikte aan van de lagen in  $\mu\text{m}$ )

het uitwendig milieu; bepaalde stoffen zouden kunnen penetreren waardoor de diapauze doorbroken kan worden en zodoende de embryogenese verder kan gaan.

Volgens Criel (1980) kan uitzonderlijk nog een derde alternatief in de embryonale ontwikkeling voorkomen waarbij de witte schalklieren een dunne schaal secreteren rond het embryo; deze schaal zou echter een directe ontluiking niet kunnen verhinderen. Ook Dutrieu (1960), D'Agostino (1965), Von Hentig (1971), Voronov (1971) en Versichele (1983) rapporteerden het voorkomen van 'subitaneous egg'-productie.

#### IV.2.3. Inductie van ovipariteit

Terwijl algemeen aangenomen wordt dat de schaalklier een belangrijke rol speelt in het reproductieproces staat tot op heden niet vast welke factoren het type van secretie beïnvloeden. De literatuur hieromtrent is zeer verwarrend en tegenstrijdig : tal van determinerende parameters worden aangeduid, meestal slechts gebaseerd op observaties van één biotoop of labopopulatie. Een uitgebreid overzicht hiervan werd opgesteld door Versichele (1983) en Berthélémy-Okazaki (1986) die hun doctoraatsstudie wijdden aan het opsporen van cysteninducerende factoren bij *Artemia*. In deze uiteenzetting zullen wij ons beperken tot enkele essentiële aspecten.

De meest aangeduide parameters zijn zoutgehalte, temperatuur, fotoperiode, zuurstofgehalte, voedselkwaliteit en -kwantiteit. Gezien de tegenstrijdige, vaak onnauwkeurige of oppervlakkige rapporteringen, hebben we enkel die gegevens samengevat die bekomen werden door vergelijkend onderzoek van de invloed van verschillende kweekfactoren op de reproductiewijze onder gecontroleerde labo-omstandigheden (zie tabel 21). Ondanks het feit dat ook hier nog tegenstrijdige bevindingen voorkomen, vallen toch twee zaken op :

- 1) het voorkomen van interacties tussen verschillende factoren en
- 2) het belang van hypoxie en ijzer-additie, die tevens de hemoglobineproductie induceren (Gilchrist en Green, 1960; Bowen *et al.*, 1969).

Daar de bruine schaalklier ook hemoglobine bevat (Criel, 1980) en een rol vervult bij de eliminatie ervan, waarbij o.a. hematine afgezet wordt in de tertiaire huls van de cysten (Dutrieu, 1960; Gilchrist, 1960; Gilchrist en Green, 1960), werd door diverse onderzoekers het volgende inductiemodel gesuggereerd voor ovipariteit : lage zuurstofgehalten, eventueel in combinatie met hoge ijzergehalten in het milieu, induceren de produktie van een specifiek hemoglobine (cf. R2 bij Dutrieu, 1960) dat door de schaal-

Tabel 21 : Overzicht van literatuurgegevens met betrekking tot het effect van labo-kweekomstandigheden op de inductie van ovipariteit bij *Artemia*

Referentie	Ras	Parameter	Inductie van ovipariteit (+ : effect; - : geen effect)
HOLMAN (1975)	GSL	Fotoperiode	< 12 u : + 0 u : -
		Voedselkwantiteit	-
SORGeloos <i>et al.</i> (1976)	GSL	Fotoperiode	-
		Hypoxie	+
VERSICHELE en SORGeloos (1980)	SFB	Cyclische hypoxie	+
		Fe-EDTA	+
		Cyclische hypoxie + Fe-EDTA	+
		Voedselkwaliteit	-
		Saliniteit	-
ALIALY (1984)	SFB	FeSO <sub>4</sub>	+
		FeCl <sub>3</sub>	+
CHOO (1986)	GSL	FeNa-EDTA	+
		Fe-EDTA	-
BALASUNDARAM en KUMARAGURA (1987)	Tuticorin	Saliniteit	> 50 g/l : +
		Fe-EDTA	+
BERTHELEMY-OKAZAKI en HEDGECOCK (1987)	SFB	Saliniteit	+
		Densiteit	+
		Voedselkwaliteit	-
			gistdieet : +
		Voedselkwantiteit	-
		Fotoperiode	< 12 u licht : +
		+ temperatuur	< 22 °C : +
		Hypoxie	+/-
		Fe-EDTA	+
		Fotoperiode	-
+ saliniteit			

klier afgebroken wordt tot hematine om tenslotte gebruikt te worden als essentiële substantie voor de cysteschaal (Dutrieu, 1960; Versichele en Sorgeloos, 1980). Hypoxie stimuleert niet enkel de hemoglobineproductie (Bowen *et al.*, 1969) maar specifiek het homodimeertype Hb-III (cf. Hb-X bij Bowen *et al.*, 1977) dat een hogere bindingscapaciteit heeft voor zuurstof (Bowen *et al.*, 1978; Heip *et al.*, 1978, 1980; Van den Branden *et al.*, 1978; Declair *et al.*, 1980). Daarenboven zou de synthese van Hb-III afhankelijk zijn van de concentratie aan gecheleerd ijzer in het milieu (Lebherz, 1966; Grigliatti, 1969).

In hoeverre bepaalde andere cysteninducerende factoren zoals fotoperiode in dit proces passen blijft een raadsel. Volgens Berthélémy-Okazaki en Hedgecock (1987), die bovenstaande stelling niet bijtreden, treedt bijna steeds een interactie van factoren op die in hun complexiteit een stress veroorzaken op de *Artemia* individuen. Deze stress zou dan fysiologisch of biochemisch gecorreleerd zijn met een inwendige stress zoals metabolische acidose, die finaal cystenproductie als reproductiewijze zou induceren.

Terugkerend naar de factoren die ovipariteit kunnen determineren, mogen we zeker naast de fenotypische ook de genotypische interacties niet uit het oog verliezen :  
 "... The ability to switch reproductive mode has a high degree of genetic determination" (Gajardo en Beardmore, in druk). Zo konden Browne *et al.* (1984) en Dhert (1986) onafhankelijk van elkaar aantonen dat de reproductiewijze bij 12, respectievelijk 8 populaties, in belangrijke mate gecorreleerd is met de geografische oorsprong van het ras. Tegelijkertijd konden verbanden aangetoond worden tussen de voortplantingswijze en andere karakteristieken van de levensloop zoals tijdstip waarop maturatie bereikt wordt, broednummer, enz., die op hun beurt zowel genotypisch als fenotypisch bepaald zijn. Zelfs binnen een populatie kunnen variaties optreden die te wijten zijn aan de graad van heterozygositeit. Zo observeerden Gajardo en Beardmore (in druk) dat wijfjes met een hogere graad van heterozygositeit



encystering prefereren. De auteurs stelden dan ook volgende ecologische significantie voorop : onder extreme omstandigheden treedt een reductie van de *Artemia* populatie op waardoor de genetische variabiliteit sterk daalt; door de produktie van geëncysteerde embryo's wordt echter deze genetische variabiliteit weerhouden.

#### IV.2.4. Kwantitatieve reproductiekenmerken

De kwantitatieve voortplantingskenmerken hebben betrekking op de worpgrootte (= aantal nakomelingen, cysten of nauplii, per broed) en de fecunditeit (= aantal worpen x worpgrootte) per wijfje. Het aantal reproductie-cycli is afhankelijk van o.a. levensduur, pre- en postreproductieve periode, frequentie van afleggen, enz.

De literatuurgegevens over de worpgrootte variëren in grote mate : Bowen (1962) en Browne *et al.* (1984) geven waarden op van 40 tot 75, respectievelijk 20 tot 110 nakomelingen. Sorgeloos (1975b) en Grosch (1980) observeerden gemiddelde worpgroottes van 180 à 200 terwijl maximale waarden gerapporteerd worden door Barigozzi (1974) en Yashiro (1985) met respectievelijk 300 en 400 nakomelingen per worp. De oorzaak voor deze uiteenlopende waarden dient gezocht te worden in verschillen tussen de kweekomstandigheden en het gebruik van diverse geografische rassen.

Temperatuur en saliniteit blijken zowel de broedselgrootte als het aantal broedsels te beïnvloeden (Gilchrist, 1956; Grosch, 1962; Ivleva, 1969; Collins, 1977; Amat *et al.*, 1987). Als optima worden waarden vooropgesteld van 25 °C (Iwasaki, 1976; Lozovskii, 1977) of 20-28 °C (Wear *et al.*, 1986), respectievelijk 60 g/l zoutgehalte (D'Agostino en Provasoli, 1968; Grosch, 1973), 75 g/l (Dana en Lenz, 1986) en 90 g/l (Yashiro, 1985). Volgens Von Hentig (1971) bestaat er een interactie tussen beide abiotische parameters en wordt het optimaal gebied begrensd door 20-30 °C en 32-70 g/l. Duisternis zou volgens Sorgeloos *et al.* (1976) eveneens de fecunditeit verhogen.

Daarnaast beïnvloedt ook het voedselaanbod, kwalitatief en kwantitatief gezien, de voortplantingskarakteristieken. Dat een lagere voedselbeschikbaarheid in negatieve effecten resulteert (Bowen, 1962; Reeve, 1963d; Browne, 1982, Versichele, 1983) lijkt vanzelfsprekend daar de energie-kost voor de voortplanting stijgt met het aantal geproduceerde nakomelingen. Alhoewel Balasundaram en Kumaraguru (1987) geen verschillen in broedselgrootte detecteerden voor de uitgeteste diëten, is er toch voldoende bewijsmateriaal om aan te nemen dat de voedselsamenstelling belangrijk is. Zo observeerde Iwasaki (1976) een lagere reproductiviteit bij pekelkreeftjes gevoederd met gist in plaats van wieren; analoge verschillen werden bekomen met gedroogde wieren in plaats van rijstekaf (Sumitra-Vijayaraghan et al., 1988). In dit verband vermelden Provasoli en Pintner (1980) dat lipiden essentieel zijn voor een continue fertiliteit, evenals carnitine en de vitamines inositol, choline, B12 en folinezuur (D'Agostino, 1980; Hernandez, 1983).

Naast omgevingsfactoren zijn echter ook genotypische parameters bepalend (Amat, 1982). Chapman (1968) en Browne et al. (1984) bestudeerden de invloed van omgeving en erfelijkheid op diverse kwantitatieve reproductiekenmerken en kwamen tot de vaststelling dat de invloed van beide factoren ongeveer even groot is. De worpgrootte varieert niet alleen in functie van het reproductietijdstip (Bowen, 1962; Nimura, 1967; Dhert, 1986) maar ook volgens species: *A. tunisiana* (= 'Old World Sexuals') geven een gering maar gelijkmatig broed, terwijl *A. franciscana* + *A. persimilis* (= 'New World Sexuals') en de parthenogenetische rassen vooral in het begin een stijgende worpgrootte kennen (Fig. 29). Wat de fecunditeit betreft, scoort *A. tunisiana* opnieuw laagst (100 tot 200 nakomelingen) omdat de worpgrootte gering en de reproductieve periode kort is (20-40 dagen). *A. franciscana* en *A. parthenogenetica* daarentegen produceerden 600 tot 1 600 embryo's dankzij een hogere worpgrootte (50 à 110) en een langere reproductieve periode.

Niet enkel inter-species en intra-species variabiliteit zijn aangetoond, maar ook verschillen binnenin de populatie kunnen optreden. Zo observeerden Gajardo en Beardmore (in druk) dat bij Great Salt Lake *Artemia* de fecunditeit stijgt met de graad van heterozygositeit. Browne en Spencer (1987) vonden zelfs significante verschillen voor vijf klonale groepen van de *A. parthenogenetica* populatie van 'Salin de Giraud'.

Tot slot dient nog vermeld te worden dat de worpgrootte afhankelijk is van de voortplantingswijze. Bij ovipariteit worden namelijk minder nakomelingen geproduceerd (volgens Browne tot -30 %). Als verklaring hiervoor is het verschil in reproductiekost opgegeven. Daar een schaal 22 % van de totale droge stof van een geëncysteerd embryo uitmaakt, vereist de produktie van een cyste meer energie dan de aanmaak van een ovovivipaar geproduceerd embryo (Amat *et al.*, 1987; Gajardo en Beardmore, in druk).

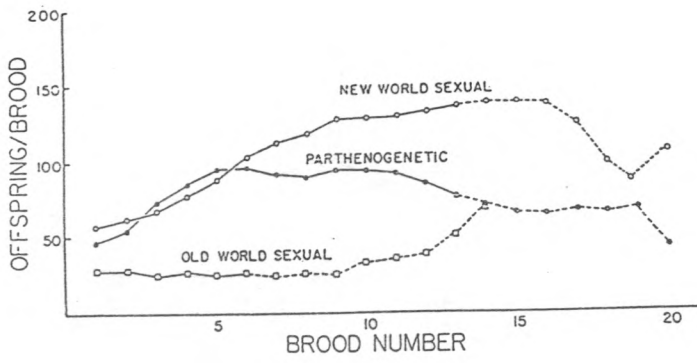


Fig. 29 : Verloop van de worpgröote in functie van het broednummer voor verschillende *Artemia* species.

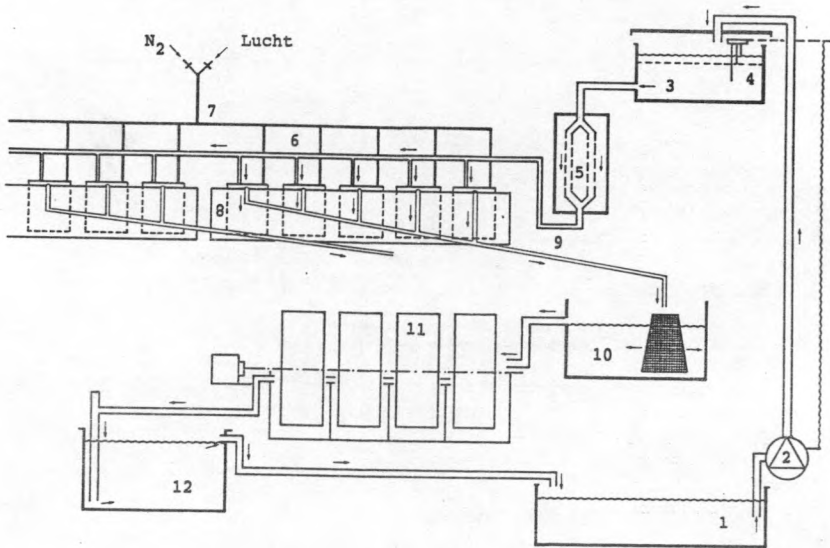


Fig. 30 : Schema van het recirculatiesysteem voor de productie van *Artemia* cysten.

(1) reservoir; (2) pomp die geactiveerd wordt door niveauregelaar (4); (3) drukvat; (5) U.V.-filter; (6) watertoevoer; (7) lucht/stikstofgas toevoer; (8) teelteenheid bestaande uit vijf aquaria; (9) afvoergoot; (10) verzamelvat met recuperatiefilter voor cysten; (11) biodisc; (12) decantatietank.

### IV.3. HET KWEESYSTEEM VOOR GECONTROLEERDE CYSTENPRODUKTIE

#### IV.3.1. Algemene beschrijving en werking van de installatie

De recirculatie-installatie (Fig. 30) is in feite een kleinschalige kopie van diegene beschreven in hoofdstuk IV. De hiernavolgende voorstelling zal dan ook summier gehouden worden en vooral de verschillen uittekenen. Daar het reproductiesysteem in het verloop van de thesis eerder werd opgesteld, hebben we de bevindingen van de biomassa-productie-experimenten slechts in een later stadium kunnen toepassen op deze eenheid.

##### 1. De kweekmodule

De productie-eenheid bestaat uit 20 glasklare PVC-aquaria met een individuele inhoud van 10 l. Deze zijn per vijf gegroepeerd in vier gescheiden compartimenten die onafhankelijk van elkaar kunnen opereren. Dit is essentieel om vergelijkend onderzoek in verband met de invloed van verschillende parameters zoals temperatuur, voedselcondities, enz. op de cystenkaracteristieken te kunnen uitvoeren. De centrale watertoevoerleiding heeft per aquarium twee aftakkingen voorzien van 'Eheim'-kraantjes. Gezien de aangehouden debieten laag zijn, is deze ontubbeling van de toevoer essentieel om het uitvallen van de doorvloeit ten gevolge van verstopping te vermijden. Verder is elke kweekrecipiënt uitgerust met een verticale cilindervormige filter met beluchtingsring (Fig. 31). Hiervoor werden twee vensters gezaagd uit een halfopen PVC-buis ( $\emptyset = 6$  cm en 20 cm hoog) die daarna met 'Monodur'-gaas met een specifieke maaswijdte (300, 400, 550 of 800  $\mu\text{m}$ ) bespannen werd. Pas sedert 1984 werden ook hier kleine 'Trislot'-filters opgesteld in plaats van de traditionele, geweven zeven.

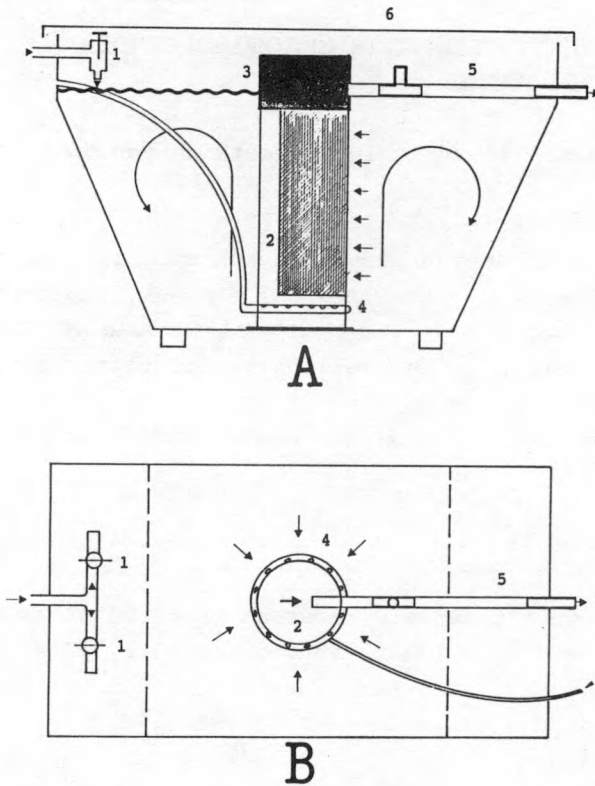


Fig. 31 : Schema van de kweekreceptiënt.

(A) lateraal zicht; (B) bovenzicht  
 (1) watertoevoer met kraantjes; (2) filter met  
 PVC-ring (3) en aëratie-ring (4); (5) watertoe-  
 voer; (6) deksel

Teneinde een optimale aëratie en circulatie te garanderen en de dieren zo weinig mogelijk te verstoren door de beluchting werden de aquaria gebouwd volgens een specifiek model waarbij de smalle, opstaande zijden een helling van  $60^\circ$  vertonen (zie Fig. 31). Afstelling van de beluchting gebeurt met kraantjes en de centrale luchtleiding is verbonden met zowel een luchturbine als een stikstoffles via een elektrisch driewegventiel (zie verder).

Het effluentwater uit de filter wordt gravitair afgevoerd via een afvoerbuis die voorzien is van een opwaarts gericht T-stuk dat eventuele verstopping met luchtbellen verhindert. Eenmaal buiten het kweekvat vloeien de effluenten per compartiment in een verzamelgoot die alles afvoert naar de cysten-recuperatiefilters en verder naar de zuivering.

## 2. Het recirculatiesysteem

Dit bestaat uit een vierdelige, roterende biologische contactor (RBC), een bezinkingstank en een reservoir met respectievelijke inhoud van 350, 450 en 2 000 l. De schijven van de RBC-eenheid hebben een totale oppervlakte van  $25 \text{ m}^2$ , wat volgens de berekeningen in hoofdstuk III.2.3.3. voor deze installatie een geschikte dimensionering is voor optimale zuivering.

Daarnaast hebben we juist achter het drukvat een zelf-ontworpen U.V.-filter ingebouwd (Fig. 32). Deze bestaat uit twee U.V.-lampen (Philips TUV 30W) waarrond telkens een glasmantel gemonteerd is waardoor water circuleert. Het directe contact van de lampen met het kweekwater heeft voor gevolg dat de lampen bij een suboptimale temperatuur (28 in plaats van  $40^\circ \text{C}$ ) slechts een beperkte levensduur hebben : bijgevolg moeten de lampen om de drie maanden vervangen worden. De U.V.-filter werd slechts gedurende het eerste anderhalf jaar in werking gesteld omdat latere proeven het nut ervan niet konden bevestigen.



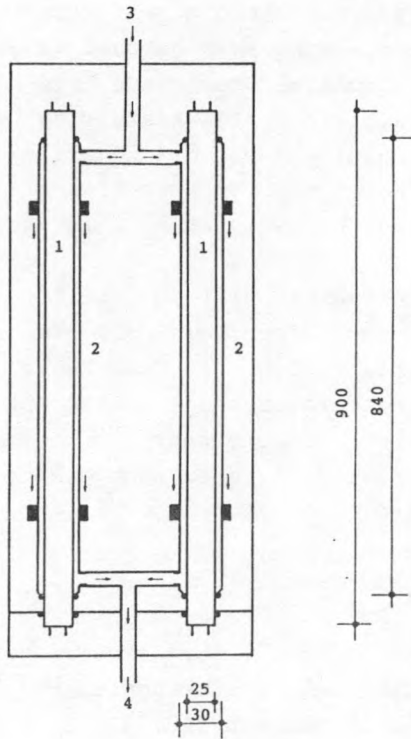


Fig. 32 : Schema van de U.V.-filter.

(1) U.V.-lamp; (2) glasmantel; (3) watertoevoer; (4) waterafvoer (afmetingen in mm).

Het totale systeem is zo geconstrueerd dat één circulatiepomp voldoende is om de gesloten doorvloeit te realiseren : het water vloeit namelijk gravitair vanaf het drukvat tot in het reservoir. Een 'Callens'-pomp, gestuurd door een niveauregelaar, pompt het water vanuit het reservoir naar het drukvat.

### 3. De kweekprocedure

Gezien de aard van het onderzoek is een precieze instelling van zoveel mogelijk parameters noodzakelijk. Zo worden fluctuaties van temperatuur minimaal gehouden ( $25 \pm 0,5$  °C) doordat de aquaria in een waterbad met gethermostatiseerde verwarmers geplaatst zijn. Het kweekmedium bestaat uit artificieel zeewater waarvan het zoutgehalte opgedreven werd door toevoeging van zeezout tot 50, 75 of  $90 \pm 3$  g/l naargelang het uitgevoerde experiment. De doorvloeisnelheden per aquarium zijn arbitrair afgesteld op 5 l/u. Preliminare proeven toonden aan dat bij een retentietijd van 2 u de waterkwaliteit voldoende hoog bleef door het instellen van gemodificeerde voederregimes (zie verder) en dat de geproduceerde cysten voldoende vlug verwijderd werden. De aquaria zijn opgesteld in duisternis : de waterbaden zijn ondoorzichtig evenals de PVC-plaat die de vijf kweekrecipiënten afdekt. Enkel tijdens het onderhoud zijn de *Artemia* culturen gedurende korte tijdspannes blootgesteld aan kunstlicht.

De voedseldistributie gebeurt door middel van een peristaltische pomp met 20 kanalen. De frequentie van toediening wordt geregeld door een elektronische klok. Het voederregime zelf verschilt met dit van de biomassa-productie; dit aspect wordt echter *in extenso* behandeld in hoofdstuk IV.3.2. Als dieet werd vooral rijstvoerschroot gebruikt. In bepaalde gevallen supplementeerden we dit dieet met gedroogde *Spirulina* teneinde een meer gevarieerd voedsel aan te bieden aan de adulte populaties. De dieetkarakteristieken zijn opgesomd in tabel 10 van hoofdstuk III.3.2.

Tabel 22 : Overleving, reproductiekenmerken en kleur van LVD pekelkreeftjes  
in functie van densiteit

Densiteit	10 000	10 000	10 000	15 000	15 000	20 000	20 000	20 000
Overleving (%)								
DAG 8	100	100	100	100	100	100	100	100
13	100	100	100	89	96	100	96	100
17	100	100	100	100	100	87	89	100
20	100	83	79	92	86	69	90	83
Reproductie-activiteit (%)								
DAG 21	5	30	30	5	5	10	1	1
Reproductiewijze eerste broed	ovovivi- paar	ovovivi- paar	ovovivi- paar	ovovivi- paar	ovovivi- paar	ovovivi- paar	ovovivi- paar	ovovivi- paar
Pigmentatie	donker rood	weinig rood	rood	donker rood	weinig rood	weinig rood	weinig rood	weinig rood

De kweekeenheden werden steeds geïnoculeerd met acht dagen oude *Artemia* juvenielen die gekweekt werden in 150 l renbaansystemen volgens de methode van Bossuyt en Sorgeloos (1980). Starten met juvenielen in plaats van nauplii biedt verschillende voordelen :

- minder risico's voor mortaliteit, die vooral optreedt bij de transitie van naupliaire naar juveniele voortbeweging (zie hoofdstuk III.3.5.);
- minder vervuiling en aanlading van de wanden der kweekvaten aangezien de voedselopname bij juvenielen veel efficiënter is dan bij nauplii;
- snellere opeenvolging van proeven aangezien de kweek kan gebeuren in een afzonderlijk systeem.

Het aantal *Artemia* per aquarium werd beperkt tot maximum 10 000 per liter : vergelijkende testen uitgevoerd met hogere concentraties aan dieren resulteerden wel in analoge cijfers voor overleving (> 80 % na 3 weken) en lengte ( $\pm$  5 mm), maar de reproductie-activiteit (dit is het aantal wijfjes met eieren) was gevoelig lager (Tabel 22). De aard van de voortplanting bleef dezelfde, namelijk ovovivipaar. Of deze lagere fertiliteit een gevolg is van een 'crowding effect' is niet duidelijk. Het kan ook te wijten zijn aan voedselgebrek aangezien analoge voederregimes aangehouden werden (dus minder voedsel per individu in de reeks met hoge densiteit).

Als standaardras gebruikten we het parthenogenetische Lavalduc ras (LVD). We verkozen een parthenogenetisch boven een zygogetisch ras omwille van de volgende redenen :

- ieder parthenogenetisch dier is in principe in staat nakomelingen te produceren, waar in zygogetische culturen dit tot ongeveer de helft herleid is; dit betekent concreet hogere opbrengsten aan cysten in onze installatie;
- de exuviae van de tweede antennes der mannetjes zijn vanwege hun grootte moeilijk te verwijderen met het effluent en vormen daardoor een geschikt substraat voor bacteriën in de kweekaquaria;

- het is mogelijk dat de sterke circulatie in de aquaria copulatie bemoeilijkt en zodoende de produktie van onbevuchte eieren bij zygotenetische rassen in de hand werkt.

Cysten van het Camargue ras waren bovendien commercieel beschikbaar (tot 1983) en daar het biotoop relatief dichtbij was, hadden we de mogelijkheid het habitat verschillende malen te inspecteren (Lavens, 1982). Dit laatste kan belangrijk zijn bij de interpretatie van de proefresultaten.

In functie van het onderzoek werden ook nog andere rassen gebruikt :

- *Artemia franciscana*
  - + Great Salt Lake, V.S.A. (GSL)
  - + San Francisco Bay, V.S.A. (SFB)
  - + San Pablo Bay, V.S.A. (SFB)
  - + Macau, Brazilië (MAC)
  - + Chaplin Lake, Canada (CHL)
- *Artemia parthenogenetica*
  - + Tientsin, Volksrepubliek China (TIE)
  - + Moekba, U.S.S.R. (MOE)
  - + Margherita di Savoia, Italië (MDS)

#### 4. Populatiekarakteristieken

Overleving, lengte en biomassa werden bepaald volgens de methodes beschreven in hoofdstuk III.3.1. Voor de kwalitatieve en kwantitatieve schatting van de reproductie hebben we de volgende procedures gevolgd :

- voor de geslachtsverhouding en de graad van sexuele rijpheid bij wijfjes (= wijfjes met volle ovaria, oviducten of uteri) werden *ad random* 100 dieren per aquarium bemonsterd, gefixeerd en onderzocht onder een dissectiemicroscoop. Volgens Versichele (1983) geeft dergelijke staalgrootte een representatief beeld van de populatie;
- voor de bepaling van de reproductiewijze bij deze wijfjes waar de embryo's niet direct te onderscheiden waren als cysten of nauplii, werden de dieren met

volle broedzakken microscopisch bestudeerd op de activiteit van hun schaalklier. Een rode schaalklier impliceert volgens Criel (1980) bijna altijd een ovipare reproductie terwijl een transparante of witte schaalklier geen schaalelementen secreteert en resulteert in ovovivipariteit;

- de broedselgrootte werd bepaald na dissectie van de uterus bij 10 wijfjes. Het bekomen gemiddelde geeft een schatting van het aantal nakomelingen per reproductiecyclus. Dit is enkel een richtcijfer daar de variabiliteit binnen de populatie erg hoog ligt en 10 waarden te weinig zijn voor statistische interpretatie. Meer analyses zijn echter niet haalbaar wegens tijdsgebrek.

#### IV.3.2. Adaptatie van de kweektechnologie voor het in stand houden van adulte populaties

Om een *Artemia* populatie gedurende lange tijd in leven te houden moet de kwaliteit van het kweekmedium en de samenstelling van het toegediende dieet zo optimaal mogelijk zijn; dit is een ware uitdaging aangezien hoge voedseldensiteiten dienen aangehouden te worden. Tenminste dat hadden wij geëxtrapoleerd uit onze ervaring met intensieve opkweek van preadulten. De eerste culturen van volwassen stierven echter steeds af nadat de thoracopoden der dieren volledig beladen waren met voedsel : hun darm bleek leeg te zijn en ze konden zich praktisch niet meer voortbewegen.

Aangezien volwassen minder frequent vervellen dan juvenielen hebben kleverige partikels (b.v. gemicroniseerd rijstafval) meer kans om te blijven vastzitten op het filtererapparaat van de pekelkreeftjes en zodoende dit progressief meer en meer te gaan verstoppen. Bij juvenielen wordt het exoskelet met zijn aanladingen dagelijks afgezet, bij volwassen slechts om om de 4 à 7 dagen (Metalli en Ballardin, 1972; Van Beek, 1988). Dit alles heeft voor gevolg dat de voederschema's niet meer kunnen ingesteld

Tabel 23 : Populatiekarakteristieken voor drie *Artemia* rassen, gekweekt onder verschillende voederregimes (waarden zijn gemiddelden per compartiment)

RAS	SFB	SFB	SFB	LVD	LVD	LVD	GSL	GSL	GSL
DENSITEIT(N/l)	6 000	6 000	6 000	5 000	5 000	5 000	5 000	5 000	5 000
DIET	PG-RB 1:1	PG-RB 1:1	PG-RB	PG-RB 1:1	PG-RB 1:1	RB	BG	BG	BG
VOEDERREGIME <sup>1</sup>	10%	15%	17%	6%	10%	15%	25 cm	10%	15%
<b>OVERLEVING (%)</b>									
na 1 week	100	100	100	-	-	100	-	-	-
2 weken	100	85	66	100	100	73	100	100	100
3 weken	46	46	29	67	86	33	-	-	-
4 weken	35	31	<10	54	73	<10	80	92	84
5 weken	22	22	-	56	67	-	40	74	62
<b>REPRODUKTIE- ACTIVITEIT (%)</b>									
na 1 week	0	0	-	-	-	-	-	-	-
2 weken	14	23	5	0	0	0	0	<5	<5
3 weken	48	44	35	10	26	10	<5	8	17
4 weken	73	76	-	45	35	32	30	44	66
5 weken	80	93	-	84	89	-	10	67	88
<b>OVIPARITEIT (%)</b>									
na 4 weken	70	75	80	90	90	90	-	-	-
♂ (%) na 4 weken	± 50	± 50	-	-	-	-	30	35	37
<b>WORPGROOTTE</b>									
na 4 weken	67	64	51	34	39	45	31	64	76

<sup>1</sup> uitgedrukt in percent drooggewicht aan voedsel ten overstaan van levendgewicht aan *Artemia* biomassa, of in cm doorzichtigheid

worden op basis van dezelfde graad van doorzichtigheid als voor de ~~op~~kweek van larven. Daar lagere doorzichtigheden niet meer praktisch meetbaar zijn, hebben we dan ook geopteerd voor een nieuw criterium: het vervoederen in functie van het biomassagewicht der populatie. Om fluctuaties in partikeldensiteit te vermijden werd daarenboven de voederfrequentie opgevoerd tot drie minuten.

Vergelijkende proeven werden opgesteld waarbij voor drie geografische rassen verschillende voederdosages aangehouden werden. Gemiddelde resultaten met betrekking tot overleving en reproductiviteit zijn samengevat in tabel 23. De hoge variaties binnenin de populatie en tussen de replica's zelf laten geen statistische interpretatie toe. Toch valt op dat bij LVD, GSL en SFB de hoogste voederregimes steeds hoge mortaliteiten veroorzaken na de tweede kweekweek. Bij vermindering van de voedseldosering tot 10 % (drooggewicht voedsel over levendgewicht biomassa) per dag stijgt de overleving tot meer dan 60 % voor vijf weken oude culturen van LVD en GSL. Bovendien traden onder dergelijke omstandigheden nooit thoracopodiale aanladingen op, dus ook geen overvoederingsverschijnselen.

Deze vaststellingen bevestigen dan ook onze hogervermelde hypothese. Toch is voorzichtigheid geboden wat het toepassen van een vast ratio betreft daar dit dieetgebonden kan zijn: met bakkersgist b.v. kan tot 15 % per dag vervoederd worden zonder hogere mortaliteiten te veroorzaken (62 % overleving na 5 weken). Voor het SP-PG standaarddieet hebben we nog lagere ratio's (8 %) moeten toepassen wegens het gevaar voor overvoeding.

Een uitzondering wat betreft overleving is het SFB ras dat laag scoort onder alle voederomstandigheden. Dit kan erop wijzen dat dit ras minder geschikt is voor dit kweekstelsel. In kleinschalige kweekproeven met *Dunaliella* als levende voedselbron vond Dhert (1986) eveneens beduidend lagere overlevingscijfers (-25 %) voor SFB tegenover GSL en LVD adulten. Waar hij echter een differentiële mortaliteit van wijfjes optekende bij SFB en GSL is dit in ons geval



niet zo : de sex-ratio blijft 1 bij SFB terwijl voor GSL de mannetjes vlugger afsterven.

Wat de reproductie-activiteit betreft zijn er indicaties dat het 10 % voederregime voldoende is om de maturatie maximaal te laten verlopen onder de gegeven omstandigheden. Enkel GSL adulten, gegroeid op verse bakkersgist aan een ratio van 15 %, bereiken vlugger het tijdstip waarop 50 % maturatie in de populatie optreedt en produceren daarbij een grotere worp.

We hebben dan ook besloten om de 10 % ratio als standaardvoederregime aan te houden bij de reproductie-experimenten. De voederfrequentie werd ingesteld op drie minuten.

Als begeleidende maatregel werd tevens de doorvloei-snelheid opgedreven tot 5 l/u in plaats van de oorspronkelijke 3 l/u. Samen met de (latere) invoering van de 'Trislot'-filters resulteerde dit in een efficiëntere verwijdering van partikulaire afval en in het bijzonder de exuviae.

Aangezien de nutritionele behoeften van *Artemia* adulten niet gekend zijn en we veronderstellen dat de gebruikte landbouwafval geen compleet dieet kan zijn, hebben we enkele experimenten uitgevoerd met aanrijkingsdiëten : gebruik van een 10 % emulsie van levertraanolie of een mengsel van levertraanolie, pigmenten, vitamines en cholesterol, opgemaakt volgens de procedure van Léger *et al.* (1987). De resultaten waren helaas negatief wat de overleving betreft : na 3 weken ~~op~~week traden mortaliteiten op tot 80 %. De adsorptie van levertraanolie op de rijstvoerschrootpartikels volgens de techniek beschreven in Léger *et al.* (1985) leverde daarentegen wel goede resultaten op : de overleving was even goed als voor het niet-aangerijkte produkt en de fecunditeit was beduidend beter. Uit de proeven met het LVD ras bleek dat zowel een vluiggere maturatie (70 % der wijfjes reproductief actief na vier weken) als grotere broedsels ( $\pm$  85 nakomelingen per worp) verkregen werden. Dit bevestigt de hypothese van Provasoli

en Pintner (1980) dat lipiden de reproductiviteit bij *Artemia* gunstig beïnvloeden.

Tot op heden zijn we er dus niet in geslaagd betere diëten te formuleren dan de standaardvoedsels beschreven in hoofdstuk III.3.2. Dit betekent concreet dat niet alle kweektesten even succesvol waren als vermeld in de tabellen 22, 23 en 25. Dit wisselend succes is waarschijnlijk mede beïnvloed door de variërende bacteriële activiteit die de basisdiëten kan completeren tot een geschikt voedsel voor adulte *Artemia*. Dit effect is reeds voor opgroeiende pekelkreeften beschreven (zie hoofdstuk III.1.2.6.) maar is waarschijnlijk nog veel kritischer voor adulten. Om deze problematiek te kunnen verhelpen, hebben we ons gedurende het laatste jaar vooral toegelegd op de ontwikkeling van een SCP-dieet met verbeterde nutritionele karakteristieken (zie licentiaatsthesis Coutteau, 1987). De eerste resultaten met dit nieuw dieet blijken veelbelovend te zijn zodat wellicht in de nabije toekomst een duidelijke vooruitgang mag verwacht worden.

Tot slot dienen we hier ook te vermelden dat van tijd tot tijd infecties optraden met *Leucothrix* of schimmels die de vervelling bij adulten blokkeerden (Criel, persoonlijke mededeling), zodat mortaliteit geïnduceerd werd. Opdrijven van de saliniteit bij infectie resulteerde echter niet altijd in een totale verwijdering van deze organismen.

#### IV.3.3. Inductie tot ovipariteit

Twee verschillende technieken werden uitgetest om tot een standaardisatie te kunnen komen van de inductie van de reproductiewijze naar ovipariteit : namelijk voederstress en zuurstofstress. De keuze van de technieken gebeurde op basis van literatuurgegevens (zie hoofdstuk IV.1.) en de mogelijkheid tot integratie van de methode in het doorvloeiconcept.



### 1. Toedienen van voederstress

LVD juvenielen werden onder standaardomstandigheden opgegroeid in het kweekstelsel tot het adulte stadium, waarna de automatische voeding vervangen werd door een manuele voorziening. Hiervoor werd viermaal per dag en per aquarium een 50 ml suspensie toegediend, bestaande uit 1 g rijstvoerschroot en 0,25 g *Spirulina* poeder. Deze hoeveelheid bleef dezelfde ongeacht de dichtheid in de recipiënten (10, 15 tot 20 individuen per ml). De tijdstippen van voeding waren 9 uur, 12 uur, 15 uur en 18 uur. Gezien de doorvloeioomstandigheden betekende dit dat de pekelkreeften slechts gedurende korte tijdspannes konden foerageren bij voldoende hoge partikelconcentraties. Bovendien was de stresstoestand intenser voor de hoogste dichtheiten aan *Artemia* (minder voedsel beschikbaar per individu).

De resultaten voor overleving, reproductiviteit en aard der nakomelingen zijn weergegeven in tabel 24. Hieruit valt duidelijk op dat de aangewende techniek niet bruikbaar is voor onze doeleinden. Niet alleen is de inductie der ovipariteit minimaal daar de reproductievorm dominant ovovivipaar blijft, maar bovendien is de mortaliteit hoog. Slechts in enkele aquaria werd een kleine kwantiteit aan cysten geproduceerd. Dit staat in tegenstelling tot de beweringen van Ballardin en Metalli (1963), D'Agostino (1965, 1980), Lenz (1980) en Amat *et al.* (1987); "... The incidence of encysted broods is invariably correlated with brief periods of starvation which coincided with ovulation ... (D'Agostino en Provasoli, 1968). Er waren geen verschillen in reproductie merkbaar voor de diverse gradaties van stress, uitgedrukt in voedselbeschikbaarheid per individu. Wel daalde de overleving gevoelig met stijgende dichtheid en werden in verschillende aquaria "black disease" waargenomen. Volgens Hernandez (1987) treedt deze anomalie op wanneer de dieren in ongunstige nutritionele omstandigheden verkeren.

Extra argumenten om deze inductiemethodiek niet te weerhouden zijn de observaties van een heel lage reproductie-activiteit (steeds minder dan 20 %) en worpgrootte (<30). Dit doet ons veronderstellen dat de reproductiekost voor de ontwikkeling van normale broedsels hoger is dan de hier toegediende energie via het voedsel.

## *2. Toedienen van zuurstofstress, gecombineerd met Fe-EDTA*

### Zuurstofstress

De standaardtechniek van Versichele en Sorgeloos (1980) ligt aan de basis van ons concept; hun methode bestaat er in om met cyclische intervallen van 1 u de beluchting te onderbreken gedurende 15 min. Wij kunnen dit niet toepassen in ons doorvloeisysteem aangezien het zou resulteren in een verhoogde verstoppingskans van de cilindrische filters met verlies van de culturen als gevolg. Bovendien werken wij met veel hogere densiteiten aan dieren en mag dus de stress niet zo acuut ingesteld worden. Een laatste negatief aspect dat we wensen te vermijden is de mogelijke sedimentatie van de toegediende voedselpartikels.

Als alternatief hebben we een methode uitgewerkt waarbij de aëratiering in de kweektanks blijft functioneren. De centrale luchttoevoer naar de aquaria wordt hiervoor door een drieweg magnetisch ventiel (Niscon BN 7755) gestuurd dat via zijn andere inlaat verbonden is met een gasfles voor stikstof (A28 Air Liquide). Bij onderbreking van de elektriciteit door middel van een kloksysteem sluit dit magnetisch ventiel de luchttoevoer af en opent de stikstoftoevoer. Volgens de wet van Henry zal nu door de verhoging van de partiële druk van stikstofgas de concentratie aan zuurstofgas in het medium verminderen.

Figuur 33 illustreert het verloop van de zuurstofgehalten in functie van tijdsduur wanneer stikstof geblazen wordt in de kweekbekkens die al of niet afgedekt zijn. De

curven zijn steeds een gemiddelde van diverse metingen uitgevoerd met een  $O_2$ -meter (WTW-apparaat) met recorder op populaties met densiteiten van  $\pm 10$  LVD adulten per ml.

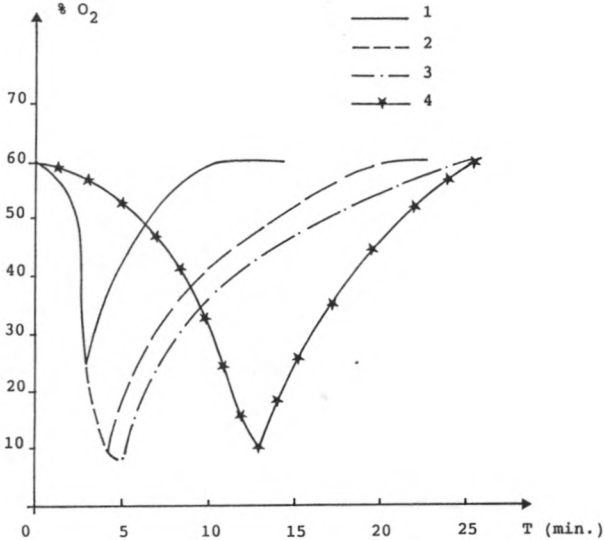


Fig. 33 : Zuurstofconcentratie in al of niet afgedekte kweekaquaria in functie van de duur van toevoeging van stikstofgas.

(1) 3 min  $N_2$ -toevoer; (2) 4 min  $N_2$ -toevoer; (3) 5 min  $N_2$ -toevoer; (4) 13 min  $N_2$ -toevoer in een niet afgedekt aquarium

Hieruit blijkt dat wanneer de kweekvaten afgedekt zijn de zuurstofuitdrijving door stikstofgas zeer efficiënt is : na vier minuten daalt de  $O_2$ -concentratie tot slechts 10 % saturatie. Open aquaria daarentegen vereisen een veel langere doorborreling met  $N_2$  om analoge waarden te bereiken; dit is het gevolg van een verminderde interactie ter hoogte van het wateroppervlak. Vergeleken met de methode van Versichele (1983) is deze zuurstofstress veel intenser : veel lagere waarden (0,5 mg/l, ten opzichte van 4 mg/l  $O_2$  bij 25 °C en 50 g/l zoutgehalte) worden bereikt in kortere

tijdspannes (4 min in plaats van 15 min). De totale stress-duur blijft wel voldoende lang : namelijk ongeveer 20 min.

Teneinde een maximale inductie tot ovipariteit te bewerkstelligen met een minimum aan  $N_2$ -verbruik werd volgend stress-schema arbitrair vastgelegd : omschakeling naar  $N_2$ -toevoer om de 3 u gedurende 4 min, waarbij de kweekbekkens continu afgedekt zijn.

#### Fe-EDTA additie

In navolging van Versichele en Sorgeloos (1980) hebben we de hogervernoemde zuurstofstress steeds gecombineerd met de toevoeging van Fe-EDTA in het kweekmedium. De methode van deze onderzoekers werd daarbij rechtstreeks overgenomen zonder enig onderzoek naar de biologische absorptiemogelijkheden en wel om volgende redenen.

De biologische beschikbaarheid van metalen voor waterorganismen is namelijk zeer complex en wordt vooral bepaald door de fysico-chemische toestand van het metaal in het milieu en niet door de oorspronkelijke concentratie (Blust, 1988). Daarenboven was geen wetenschappelijke basis voorhanden bij de aanvang van deze studie om gefundeerde testen uit te voeren : "... despite its importance in biological systems, surprisingly little is known about absorption of iron within the body of any invertebrate" (Crowe en Cooper, 1982). Volgens deze auteurs is opname van verdunde concentraties aan gecheleerd  $Fe^{3+}$ , met ascorbinezuur als ligand, door adulte *Artemia* wel mogelijk; de absorptie is echter wel afhankelijk van saliniteit en zuurstofgehalte.

$Fe^{3+}$ -ionen werden in oplossing gebracht door chelatatie met het ligand ethyleendiaminetetraäcetaat (EDTA). De stockoplossing bestaat uit (Baker, 1966) :

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	2,40 g
$Na_2EDTA$	1,86 g
gedesioniseerd $H_2O$	1 liter

Deze oplossing werd op verschillende tijdstippen toegevoegd aan het doorvloeïmedium ter hoogte van de stocktank. Verwacht werd dat geleidelijk een concentratie opgebouwd en onderhouden werd tot 30 mg/l Fe-EDTA zonder interferentie op de overleving der pekelkreeften en de werking der roterende biologische contactor. Gedurende de periode juni-augustus 1981 werden watermonsters genomen en geanalyseerd met een plasmaspectrometer op hun ijzergehalte (Blust, 1988) : de waarden varieerden van 0,45 tot 2,48 mg/l ijzer.

#### Gecombineerd effect op de reproductiewijze

De hierboven vermelde inductietechniek werd initieel uitgetest op twee species, *A. parthenogenetica* (LVD) of *A. franciscana* (GSL) en drie ontwikkelingsstadia : juvenielen, preadulten of adulten. Alle culturen werden opgekweekt op rijstekaf/*Spirulina* (3:1) bij 50 g/l zoutgehalte en densiteiten van  $\pm 10$ /ml. Overleving en reproductiekenmerken na twee maanden kweek zijn samengevat in tabel 25.

Hieruit volgt dat, in tegenstelling tot voederstress, een cyclische daling van het zuurstofgehalte in aanwezigheid van  $Fe^{3+}$ -ionen, de pekelkreeftjes induceert tot cystenproductie. Zonder onderscheid tussen de twee rassen zijn gemiddeld 87 % van de reproductief actieve wijfjes dominant ovipaar. Verder laten deze resultaten uitschijnen dat de gevolgde inductiemethodiek geen invloed heeft op de overleving, noch op de kwantitatieve reproductiekenmerken der populaties. Na twee maanden cultuur wordt overal minstens 65 % overleving genoteerd met daarbij een gemiddelde reproductie-activiteit van 50 %. Tellingen van worpgroottes geven waarden variërend tussen 40 tot 90 embryo's per worp, wat bevredigend genoemd kan worden.

Uit dezelfde tabel blijkt daarenboven dat het tijdstip waarop de stress gestart wordt bepalend is voor de aard van het eerste broed. Het is niet voldoende om de pekel-



Tabel 25 : Effect van gecombineerde zuurstofstress en Fe-EDTA toevoeging op de reproductiekarakteristieken van diverse stadia van twee *Artemia* populaties

Ras	LVD	LVD	LVD	LVD	LVD	GSL	GSL	GSL
Ontwikkelingsstadium bij de start	juveniel	juveniel	juveniel	juveniel	preadult	adult	adult	adult
Overleving na 2 maanden (%)	86	66	87	79	100	100	63	67
Aard van de eerste afleg	ovipaar	ovipaar	ovipaar	ovipaar	ovovivi-paar	ovovivi-paar	ovovivi-paar	ovovivi-paar
% ovipariteit na 2 maanden	85	94	79	90	83	91	95	80
% reproductiviteit na 2 maanden (bij ♀♀)	42	77	46	34	81	31	39	69
kleur der adulte ♀♀	diep rood	diep rood	diep rood	diep rood	rood	licht rood	licht rood	licht rood

kreeften slechts enkele dagen vóór hun reproductiecyclus te induceren om een dominante cystenproductie te bekomen. In de uitgevoerde proeven legden enkel de populaties die reeds vanaf het juveniel stadium cyclische stress ontvingen, cysten af als eerste worp. Deze bevindingen zijn contradictoir met de theorie van D'Agostino (1980) die stelt dat het eerste broed onvoorwaardelijk ovovivipaar is. Pekelkreeften in een later stadium geïnduceerd (als preadulte en adulte dieren), produceerden inderdaad slechts cysten vanaf de tweede worp. Deze resultaten suggereren dat na inductie eerst een bepaalde substantie dient aangemaakt te worden die dan pas de omschakeling naar ovipariteit mogelijk maakt. Volgens de literatuur zou het hemoglobine-III hiervoor verantwoordelijk kunnen zijn (zie hoofdstuk IV.2.3.). Een preliminaire proef uitgevoerd in samenwerking met het Labo voor Biochemie (RUCA) ondersteunt inderdaad verder deze hypothese (Tabel 26).

Tabel 26 : Reproductiewijze en hemoglobinesamenstelling bij LVD *Artemia*, gekweekt onder zuurstofstress-omstandigheden

Ouderdom populatie (dagen)	Reproductiewijze	Hemoglobinegehalte (%) <sup>1</sup>		
		Hb-I	Hb-II	Hb-III
8	-	5,8	85,8	8,4
10	-	3,2	79,3	17,3
14	-	2,1	70,0	27,3
21	ovipaar	30,3	54,3	15,5
29	ovipaar	73,6	26,3	-
36	ovipaar	79,9	20,0	0,1
42	ovovivipaar	81,2	18,7	0,1
50	ovovivipaar	89,6	10,4	-
56	ovovivipaar	86,8	13,0	-

<sup>1</sup>gemiddelden van telkens drie stalen minimum

De elektroforese-resultaten tonen aan dat het procent Hb-III stijgt vanaf de inductie (dit naar analogie met Heip *et al.*, 1978, 1980 en Van den Branden *et al.*, 1978), om later te verdwijnen tijdens de ovipare reproductie (transfer naar de cysten ?). Ondanks de aangehouden inductie veranderde in

een tweede fase van deze proef de voortplantingswijze naar ovovivipariteit. Dit zou als volgt kunnen verklaard worden : gezien een vetrijk dieet aangeboden werd, was de fecunditeit erg hoog (zie hoger) waardoor onvoldoende hoeveelheden Hb-III geïnduceerd kon worden zodat na anderhalve maand ovovivipariteit opnieuw dominant werd. Merkwaardig is wel dat de gehalten aan Hb-I en Hb-II respectievelijk in sterke mate toenamen en afnamen en dit vanaf de start tot reproductie. Meerdere experimenten hieromtrent zijn echter vereist om tot een meer sluitende bewijsvoering te komen.

Dat hemoglobines in het algemeen (dit is ongeacht het type) de reproductiewijze niet beïnvloeden wordt verder bevestigd door de volgende observaties. Enerzijds produceren rood gepigmenteerde pekelkreeften nauplii en anderzijds blijven pekelkreeften met verschillende pigmentatie onveranderlijk ovipaar (zie tabel 25) alhoewel volgens Chow (1968) de kleur der organismen een indicatie vormt van het totaal hemoglobine-gehalte.

Als besluit mag gesteld worden dat op zijn minst voor onze kweekinstallatie de inductie tot ovipariteit door middel van cyclische stikstofdoorborreling in combinatie met Fe-EDTA additie geschikt is op voorwaarde dat de stresstoestanden starten vanaf het juveniel stadium. Er treden wel verschillen op tussen de diverse rassen : het LVD ras geeft b.v. steeds een maximale ovipariteitsratio ( $\pm 9$ ) terwijl die bij SFB populaties terugvalt tot ongeveer 3 (zie ook tabel 23). Ook Dhert (1986) observeerde dergelijke verschillen voor beide rassen. Tussen deze extremen bevinden zich de andere populaties. Dit duidt erop dat genetische factoren een rol spelen in de inductie tot ovipariteit, zoals bevestigd door Browne *et al.* (1984), Dhert (1986) en Gajardo en Beardmore (in druk).

#### IV.3.4. Afoogsten en zuiveren der cysten

##### 1. Recuperatie der geproduceerde cysten

Na 'trial and error' proeven met diverse systemen hebben we in een eerste fase volgend captatiesysteem weerhouden : per unit van vijf aquaria wordt het effluent via een goot afgevoerd naar een recuperatiefilter (Fig. 34) die opgesteld staat in een verzamelvat (zie fig. 30). Deze filter heeft een voldoende fijne maaswijdte ( $180 \mu\text{m}$ ) om de cysten te weerhouden maar is zodanig geconstrueerd dat verstopping door de hoge partikulaire belasting van de effluenten zoveel mogelijk voorkomen wordt : het PVC-geraamte van de filter heeft de vorm van een afgeknotte

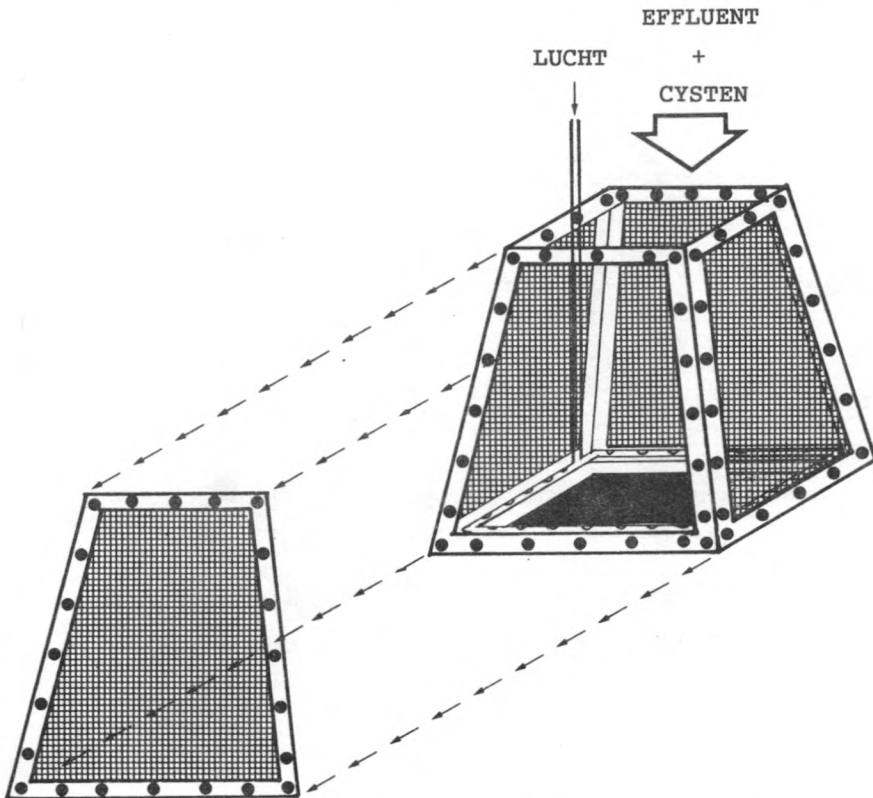


Fig 34 : Schema van de recuperatiefilter voor cysten.

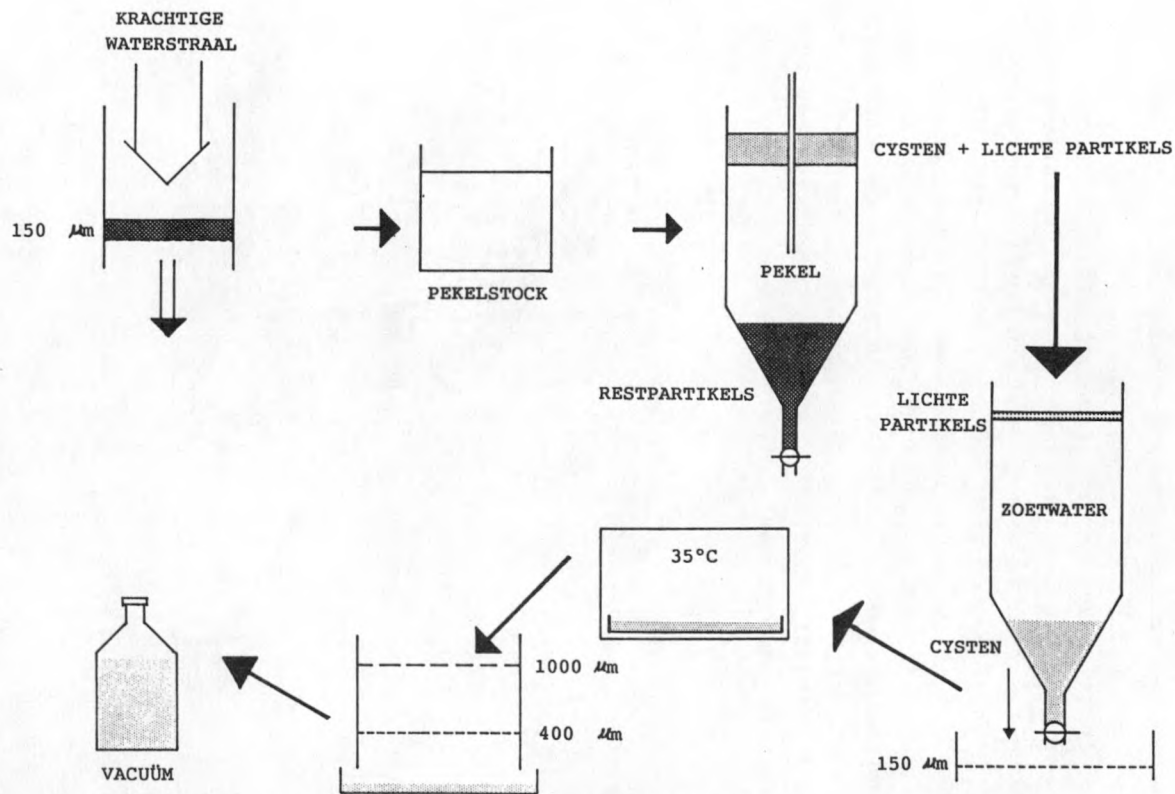


Fig. 35 : Schematische voorstelling van de verwerking van afgeogste cysten.

kegel en de zijvlakken zijn bespannen met roestvrij metaalgaas met een maaswijdte van 150  $\mu\text{m}$  (Gondrexon-AISI 316). Ongeveer 5 cm boven het grondvlak en tegen het gaas gedrukt, is binnenin een aëratiering bevestigd : het continu botsen van de luchtbelllen tegen de schuinopgerichte vlakken heeft een optimale reiniging als gevolg waardoor verstopping van de filter vermeden wordt. In ons doorvloei-systeem kunnen deze filters gedurende 24 u autonoom werken. De inhoud wordt dagelijks geoogst waarna de filter met een hogedrukspuit gereinigd wordt.

Later zijn we overgeschakeld op inverse 'Trislot'-filters (zie hoofdstuk III.2.2.) met een spleetopening van 180  $\mu\text{m}$  : hun filtratiecapaciteit is hoger en ze kunnen makkelijker gereinigd worden.

## 2. *Behandeling der geproduceerde cysten (Fig. 35)*

De dagelijks afgeogste cystenmassa wordt op een 150  $\mu\text{m}$  filter gespoeld onder een krachtige waterstraal. Onmiddellijk daarna wordt dit materiaal gestockeerd in verzadigde NaCl-pekkel (300 g/l) tot voldoende cysten verzameld zijn om een verdere behandeling uit te voeren. Voor bepaald onderzoek in verband met diapauze-desactivering kan deze stap ook gebeuren met zeewater van dezelfde saliniteit als het kweekmedium, dit om elke vorm van dehydratie te vermijden (zie verder). In tegenstelling tot Versichele (1983) hebben we nooit het imploderen geobserveerd van pas afgelegde cysten na overbrenging in de pekelplossing.

De opzuivering van de cystenfractie van de rest van het partikulair materiaal (faeces, voedelresten, exuviae, enz.) vindt plaats door middel van een differentiële sedimentatie in twee stappen naar analogie met Sorgeloos *et al.* (1978). De stocksuspensie wordt opnieuw afgezeefd en overgebracht in een cilindroconische tank met gesatureerde pekkel. Een puntbeluchting, die gedurende het eerste uur tot bijna beneden en nadien tot halfweg de recipiënt steekt,

zorgt ervoor dat cysten, vastgeklit aan voedselaggregaten, kunnen loskomen. De geëncysteerde embryo's en licht materiaal drijven in deze pekeloplossing terwijl zwaardere partikels bezinken en afgeheveld worden. Het totale proces duurt ongeveer 24 u. De drijvende cystenmassa wordt afzonderlijk afgeogst en gespoeld met leidingswater om eventuele zoutkristallen te verwijderen, alvorens ze over te brengen in een identieke recipiënt, maar ditmaal gevuld met leidingswater. Volle cysten bezinken hier direct terwijl andere onzuiverheden gaan drijven. Na 30 min is de scheiding compleet en worden de cysten verzameld op een 150  $\mu\text{m}$  zeef waarna ze klaar zijn voor dehydratie. Als standaardtechniek gebruikten we ovendrogen in dunne lagen; volgens Versichele (1983) garandeert deze techniek de beste ontluikingsresultaten voor gedroogde cysten. Wel werd de drogingstemperatuur op 35 °C in plaats van 40 °C gehouden om de letale grens zeker niet te overschrijden. Na 24 u desiccatie worden de samengeklitte cysten geïndividualiseerd door ze te granuleren doorheen een 500  $\mu\text{m}$  en vervolgens een 300  $\mu\text{m}$  zeef. De cysten worden finaal gestockeerd in penicillineflesjes onder vacuüm.

Gezien deze behandelingen de diapauze-desactivering en eventueel op de leefbaarheid der cysten kunnen beïnvloeden, hebben we naast deze standaardprocedure verschillende varianten uitgetest, zoals :

- het vervangen van de pekелstap door incubatie in een medium met een zoutgehalte van 90 g/l om de dehydratie van de diapauze cysten te beperken (geen desactivering); stockering na zuivering gebeurt hier vanzelfsprekend in hetzelfde medium.
- dehydratie door middel van incubatie in verzadigde NaCl- of  $\text{MgCl}_2$ -pekел. Hiervoor wordt het materiaal gesuspendeerd in de pekел onder agitatie en pas na 24 u overgebracht in vers, hypersalien milieu.
- wervelbed-drogen, waarbij de cysten gefluïdiseerd en zodoende individueel gedroogd worden in een opwaartse luchtstroom (35 °C). Hiervoor hebben we een eenvoudig

prototype ontworpen in glasheldere PVC, gevoed met lucht afkomstig van een luchturbine (Fig. 36).  
 Voor verder details verwijzen we naar hoofdstuk V.2.3.

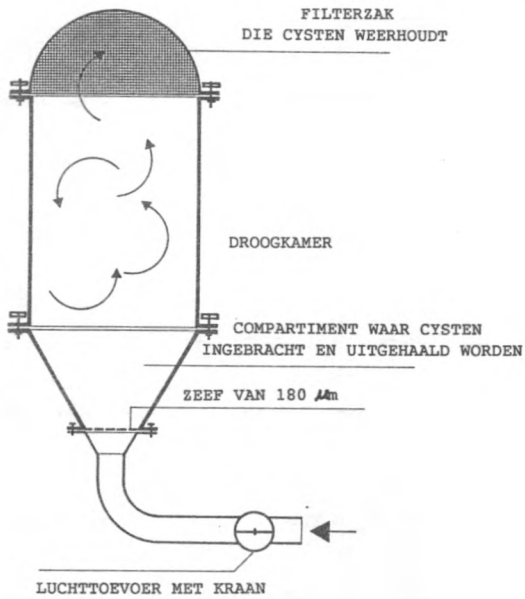


Fig. 36 : Schema van een wervelbed-apparaat voor het drogen van *Artemia* cysten.



## IV.3.5. Slotbemerkingen

Het ontwikkelde labosysteem voor de gecontroleerde productie van cysten beantwoordt in grote lijnen aan de door ons gestelde verwachtingen, namelijk het verkrijgen van voldoende cysten onder standaard kweekomstandigheden. Het doorvloei-concept laat toe dat de nadelen of interferenties verbonden aan het procédé, uitgewerkt door Versichele (1983), konden vermeden worden. Dit kan als volgt samengevat worden :

---

*Systeem Versichele*


---



---

*Systeem Lavens*


---

- |   |  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- stagnerende kweekinstallatie               <ul style="list-style-type: none"> <li>-&gt; progressief slechtere waterkwaliteit                   <ul style="list-style-type: none"> <li>-&gt; continue mortaliteit</li> <li>-&gt; lage densiteiten</li> </ul> </li> <li>-&gt; fluctuaties van omgevingsfactoren minder controleerbaar</li> </ul> </li> <li>- zuurstofstress door interruptie watercirculatie               <ul style="list-style-type: none"> <li>-&gt; bezinking afvalstoffen                   <ul style="list-style-type: none"> <li>-&gt; progressief slechtere waterkwaliteit</li> </ul> </li> <li>-&gt; adulten vormen massa aan wateroppervlak                   <ul style="list-style-type: none"> <li>-&gt; mortaliteit</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>- manuele afoogsting cysten</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- doorvloei-installatie               <ul style="list-style-type: none"> <li>-&gt; waterkwaliteit blijft goed                   <ul style="list-style-type: none"> <li>-&gt; hoge overleving</li> <li>-&gt; hoge densiteiten</li> </ul> </li> <li>-&gt; kweekparameters goed in de hand te houden</li> </ul> </li> <li>- zuurstofstress door N<sub>2</sub>-doorborreling               <ul style="list-style-type: none"> <li>-&gt; continue doorborreling                   <ul style="list-style-type: none"> <li>-&gt; maximale stress</li> <li>-&gt; geen nadelige effecten</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>- continue en automatische afoogsting</li> </ul> |
|---|--|

Met deze installatie hebben we onder gecontroleerde omstandigheden voldoende kwantiteiten cysten kunnen produceren voor verder onderzoek. Zo werden b.v. voor het LVD

ras bij densiteiten van 10 dieren per ml maximale oogstcijfers van 150 000 cysten per 10 l-aquarium per dag bekomen. Dit stemt overeen met de produktie van 15 g drooggewicht aan geëncysteerde embryo's per unit van vijf tanks in een periode van 14 dagen. Toch kan men deze cijfers niet veralgemenen daar de kwantiteit nakomelingen erg varieert naargelang de ouderdom der populatie, omgevingsomstandigheden, ras, enz...

In navolging van Browne *et al.* (1984) en Dhert (1986) kunnen we inderdaad bevestigen dat de raskeuze zeer kritisch is. In feite lijkt het erop dat we een eerder gelukkige, alhoewel toch gefundeerde keuze gemaakt hebben door het Lavalduc ras als standaardpopulatie te nemen in onze kweekexperimenten. Volgens Dhert (1986) scoort LVD namelijk hoog in de reproductietesten vanwege de hoge overlevingskansen, lange levensduur en preferentie tot ovipariteit. Dit wordt bevestigd door onze observaties : andere rassen, met uitzondering van GSL, geven steeds hogere mortaliteiten en lagere ovipariteitsratio's.

Negatieve aspecten verbonden aan het gebruik van LVD populaties zijn de lange pre-reproductieve periodes (gemiddeld 35 dagen), de lage frequentie van nakomelingen en de geringe worpgrootte (zie tabel 23). Vooral de niet-parthenogenetische rassen zoals SFB en GSL zijn in dit opzicht beter zoals ook aangegeven door Bowen *et al.* (1969, 1978), Provasoli en Pintner (1980), Browne *et al.* (1984) en Dhert (1986).

Slechte produktieresultaten werden in ons systeem bekomen met *Artemia* afkomstig van het Chaplin Lake en Moekba (overleving lager dan 40 % en geringe produktie van nakomelingen na 1 maand). Het is dus essentieel dat bij de keuze van pekelkreeftstrassen voor cystenproduktie onder massaweeksituaties naast overleving en groei ook de reproductiekenmerken in aanmerking genomen worden.

Zoals eerder vooropgesteld heeft het geen zin een dergelijk systeem te ontwikkelen tot een economisch verantwoorde methode voor de massaproduktie van cysten. Een

kweekinstallatie voor gecontroleerde cystenproductie kan omwille van het lage rendement en hoge infrastructuur- en werkingskosten immers niet wedijveren met de exploitatie van natuurlijke vindplaatsen of geïnoculeerde biotopen. Bovendien worden ondanks de toenemende vraag geen tekorten aan cysten in het vooruitzicht gesteld. Wel kan het interessant zijn om enkele kilogrammen hoogwaardig cystenmateriaal (b.v. van veredelde rassen door kruising bekomen) te produceren onder welbepaalde omstandigheden om nadien te enten in geschikte biotopen. Dergelijke massaproducties openen, vanwege hun specifieke toepassingsmogelijkheden, interessante perspectieven voor de ontwikkeling van de aquacultuur. Bovendien zouden op deze wijze referentiecysten van constante kwaliteit geproduceerd kunnen worden als intercalibratiemateriaal voor b.v. ecotoxicologische onderzoeken.

#### IV.4. KWEKPROCEDURE VOOR GECONTROLEERDE NAUPLIIPRODUKTIE

##### IV.4.1. Algemene methodiek

Twee rechthoekige 100 l tanks werden geïntegreerd in de bestaande biomassa-kweekinstallatie, die in hoofdstuk III.3. uitvoerig beschreven is. 'Trislot'-zeven werden gebruikt om de effluënten efficiënt te verwijderen; de spleetbreedtes bedroegen 450 en 550  $\mu\text{m}$  voor respectievelijk preadulte en adulte populaties. GSL pekelkreeften werden in de 300 l doorvloeitanks onder standaardomstandigheden opgekweekt tot het preadulte stadium en na 14 dagen getransfereerd naar de kleinere kweekbakken. Net zoals voor de cystenproductie (hoofdstuk IV.3.2.) werd vanaf dit ogenblik het voedsel gedoseerd volgens het natgewicht aan *Artemia* biomassa aanwezig in de kweektank.

Daar tot nu toe in de literatuur geen factoren vermeld zijn die specifiek ovovivipariteit induceren, hebben we gekozen voor een zo optimale kweekprocedure met minimale stresssituaties of fluctuaties van omgevingsparameters, met vooral aandacht voor de zuurstofomstandigheden in het kweekmedium. De instelling van hogere luchtdebieten dan toegepast bij biomassaproductie verzekerden zuurstofconcentraties in het kweekmedium van ongeveer 3,5 mg/l (of 50 % verzadiging). Bovendien werd het bacterieel zuurstofverbruik in de hand gehouden door een efficiënte verwijdering van potentiële substraten (b.v. exuviae, voedselaggregaten, faeces) door middel van hoge doorvloeisnelheden (30 min retentietijd) en het gebruik van de 'Trislot'-filters. Belasting van het medium bleef verder minimaal door een aangepaste voedselstrategie waarbij heel frequente voederdistributies (om de 5 min) ingevoerd werden.

Als dieet opteerden we voor gisten. We veronderstelden namelijk dat deze SCP het kweekmedium het minst zouden contamineren door hun optimale fysische eigenschappen : de

kleine cellen hebben een goed zweefvermogen en blijven relatief lang als individuele partikels aanwezig in het kweekmedium. Hun structurele integriteit verlaagt bovendien de kans op bacteriële afbraak. De commerciële bakkersgist (BG) en de stokerijgist (SG) waren steeds vers produkt afkomstig van de firma Bruggeman, Gent, terwijl de gedroogde *Torula*-gist (TOR) afkomstig was van de firma Alcafood, Waddinxveen (NL).

Al deze aanpassingen leidden ertoe dat bijna constante zuurstofgehaltenes van  $3,5 \pm 0,5$  mg/l aangehouden konden worden in de experimentele kweektanks.

#### IV.4.2. Resultaten en bespreking

De uitgevoerde proeven met GSL populaties (tabel 27) leerden ons dat de opgezette inductiestrategie in de meeste gevallen een dominante ovovivipare reproductiewijze oplevert. Opvallend daarbij is de tendens dat pekelkreeften gevoed met gist gemakkelijker tot totale larvenproductie aangezet worden dan deze gevoed met gemicroniseerde diëten. Partiële substitutie (1:1) van dergelijk dieet met commerciële *Torula*-gist (*Candida utilis*) geeft intermediaire waarden. Deze observaties kunnen mogelijk verklaard worden doordat de SCP-voeders minder interfereren met de waterkwaliteit, waardoor dus de omgevingsparameters stabiel blijven, zoals hierboven aangehaald. Toch blijft dit erg hypothetisch, vooral omdat andere auteurs tot analoge bevindingen komen in kleine testrecipiënten waarbij gisten als voedsel meestal vergeleken worden met levende algen (Lochhead, 1961; Baker, 1966; Browne, 1982; Berthélémy-Okazaki en Hedgecock, 1987). Deze systemen hebben namelijk weinig hinder van waterkwaliteitsproblemen of variërende abiotische parameters zodat een andere factor hier bepalend kan zijn. Dutrieu (1962) verklaart deze observaties aan de hand van haar cystenproductie-hypothese : bij caroteenvrije voedsels kan geen carotenoproteïne-binding optreden, waardoor encytering uitgesloten is en enkel de alternatieve weg openblijft. Anderzijds konden wij tijdens onze expe-

Tabel 27 : Populatiekarakteristieken van GSL *Artemia*, gekweekt in het nauplii-productiesysteem onder verschillende concentraties en voederomstandigheden

Ras	GSL 185	GSL 185	GSL 185	GSL 508	GSL 508	GSL 508	GSL 508	GSL 185	GSL 185	GSL 185	GSL 185
Densiteit(N/l)	5 000	5 000	5 000	5 000	5 000	5 000	9 000	7 000	9 000	9 000	7 000
Dieet	BG-SG 1:1	BG-SG 1:1	BG-SG 1:1	BG+E <sup>(2)</sup>	BG+E <sup>(2)</sup>	BG+E <sup>(2)</sup>	BG+E <sup>(2)</sup>	SP-TOR 1:1	SP-TOR 1:1	PG-SP 1:1	PG-SP 1:1
+ dosering (1)	10 ‰	15 ‰	20 ‰	10 ‰	15 ‰	10 ‰	15 ‰	10 ‰	15 ‰	10 ‰	15 ‰
<b>Overleving (in ‰)</b>											
dag 14	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
dag 21	97	87	100	-	-	100	100	100	82	61	74
dag 28	92	84	80	84	67	73	76	60	56	42	57
dag 35	74	62	40	72	62	40	60	57	56	40	59
<b>Groei (lengte in mm)</b>											
dag 14	6,1	6,1	4,0	-	-	4,5	4,5	-	-	-	-
dag 21	-	-	5,8	6,6	7,0	5,8	5,7	5,8	5,8	5,0	5,0
dag 28	7,0	7,4	7,1	6,6	7,2	5,9	5,9	8,3	6,8	6,3	6,6
dag 35	7,3	7,8	-	-	-	5,8	6,0	9,1	7,7	7,0	7,7
<b>Reproductie</b>											
activiteit (‰ reproductief actieve wijfjes)											
dag 21	8	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dag 28	44	66	28	-	-	-	-	-	-	-	-
dag 35	67	88	10	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Ovovivipariteit (in ‰)</b>											
dag 35	95	90	50	90	90	80	80	85	80	70	50
<b>worpgrootte</b>											
dag 35	64,4±14,7	75,6±16,5	31,0±14,2	-	-	-	-	-	-	-	-

(1) : percent gewicht aan voedsel (drooggewicht) ten overstaan van levendgewicht aan *Artemia* biomassa

(2) : 6 ‰ toevoeging van een SELCO emulsie (hoogwaardige, onverzadigde vetzuren)

rimenten opmerken dat de *Artemia* gevoed met bakkersgist steeds bleker waren dan de andere. Dit doet ons veronderstellen dat hemoglobines, en meer specifiek Hb-III, moeilijk aangemaakt kunnen worden wegens gebrek aan een bepaalde component. Verdere vergelijkende proeven, inclusief bijhorende hemoglobine-analyses, zijn echter vereist vooraleer hieromtrent meer gefundeerde bewijsvoering kan geleverd worden.

Merkwaardig voor deze proeven is wel dat verse bakkersgist en/of stokerijgist geen negatieve invloed uitoefenen op overleving en groei van de *Artemia* culturen en dus een geschikt dieet lijken te zijn. Dit staat in contrast met de resultaten van de biomassa-kweekexperimenten en kan volgens ons op twee manieren verklaard worden. Ofwel bezitten pekelkreeftjes vanaf het preadulte stadium wel de vereiste enzymen om de celwand van *Saccharomyces cerevisiae* te verteren, ofwel was er via het recirculatiesysteem een aanvoer van andere voedselcomponenten komende van gelijktijdig lopende biomassatesten waarbij gemicroniseerde voedsels toegediend werden.

Tussen de verschillende voederdosages, opgesteld in functie van het biomassagewicht der populatie, zijn de verschillen tussen de resultaten relatief gering, met uitzondering voor de 20 % ratio. Wel is het ons opgevallen dat het 15 % voederdosage meestal een hogere vervuilingsgraad creëert waardoor kweekomstandigheden minder optimaal zijn en finaal minder wijfjes tot ovovivipariteit geïnduceerd worden. Mede door de resultaten bekomen in de cystenproductie-installatie hebben we besloten ook hier het 10 % voederregime te handhaven als standaard, dit ondanks de tendens tot lagere reproductie-activiteit en worpgrootte.

#### IV.4.3. Recuperatie der larven

Een geschikte techniek om de pas afgelegde larfjes continu te kunnen afoogsten moet op twee punten verschillen met het systeem voor cystenrecuperatie. Enerzijds dient

de filter een fijnere spleetbreedte te hebben (vergrootte verstoppingskans !) gezien de breedte van de nauplii (wanneer de antennes tegen het lichaam gedrukt zijn) kleiner is dan de diameter van de cysten. Anderzijds kan de scheiding nauplii/ zwevende stoffen niet gebeuren op basis van zoutgradiënten.

Na diverse 'trial- and error' testen hebben we het volgende concept weerhouden (Fig. 37 en foto's 15 & 16). Het recuperatiesysteem bestaat uit een invers type van de 'Trislot'-cilinder, met een spleetbreedte van 120  $\mu\text{m}$ , die geplaatst is in een PVC-buis van iets grotere afmetingen ( $\emptyset = 17 \text{ cm}$ ;  $h = 40 \text{ cm}$ ). De filter weerhoudt alle geproduceerde nauplii en partikels groter dan 120  $\mu\text{m}$  uit het kweekeffluent, terwijl het water en de kleinere stoffen via de PVC-container gedraineerd worden naar de recirculatie-eenheid. De filtreercapaciteit is onder dergelijke omstandigheden echter onvoldoende om een autonome werking te garanderen. Daarom werd een mechanische reiniging ingebouwd. Deze bestaat uit twee cilindrische borstels die juist passen in de nauwe ruimte tussen de filter en het PVC-vat, en die via een centrale as aangedreven worden door een elektrische 'Crouzet'-rotor. Door de specifieke constructie schuren deze borstels continu langs het buitenste, oneffen oppervlak van de filter en zorgen zodoende voor een efficiënte reiniging. Verder is de filter slechts voor de helft ondergedompeld door de uitstroomopening van het recuperatievat op halve hoogte te monteren. Hierdoor is er de mogelijkheid om het waterpeil te laten stijgen in de filter, wat een verhoogde druk creëert zodat de filtratie opnieuw beter verloopt. Als gevolg van deze aanpassingen is een autonome werking gedurende  $\pm 24 \text{ u}$  verzekerd.

De gecollecteerde larven worden daarna gescheiden van de partikulaire onzuiverheden door gebruik te maken van hun positief fototactisch gedrag. Twee verschillende ontwerpen bleken voor een relatief goede separatie in te staan. Een eerste opstelling bestaat uit een rechthoekige tank die verdeeld is in twee compartimenten door middel van een



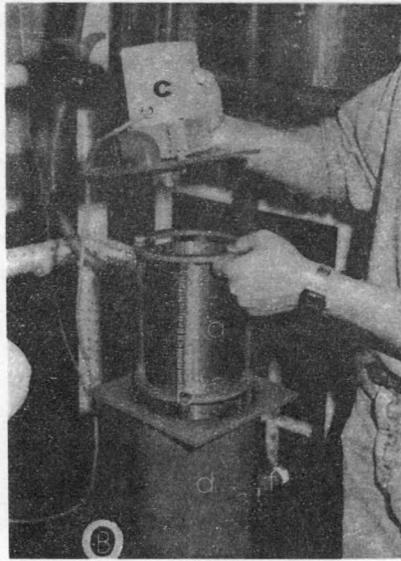
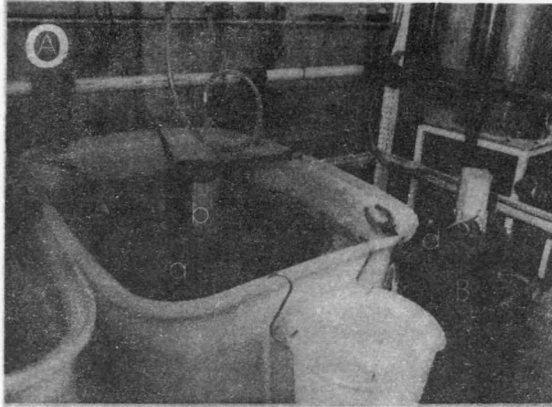


Foto 15 en 16 : Overzicht van het kweekstelsel voor  
produktie en afoogting van nauplii.  
(Legende : zie figuur 37).

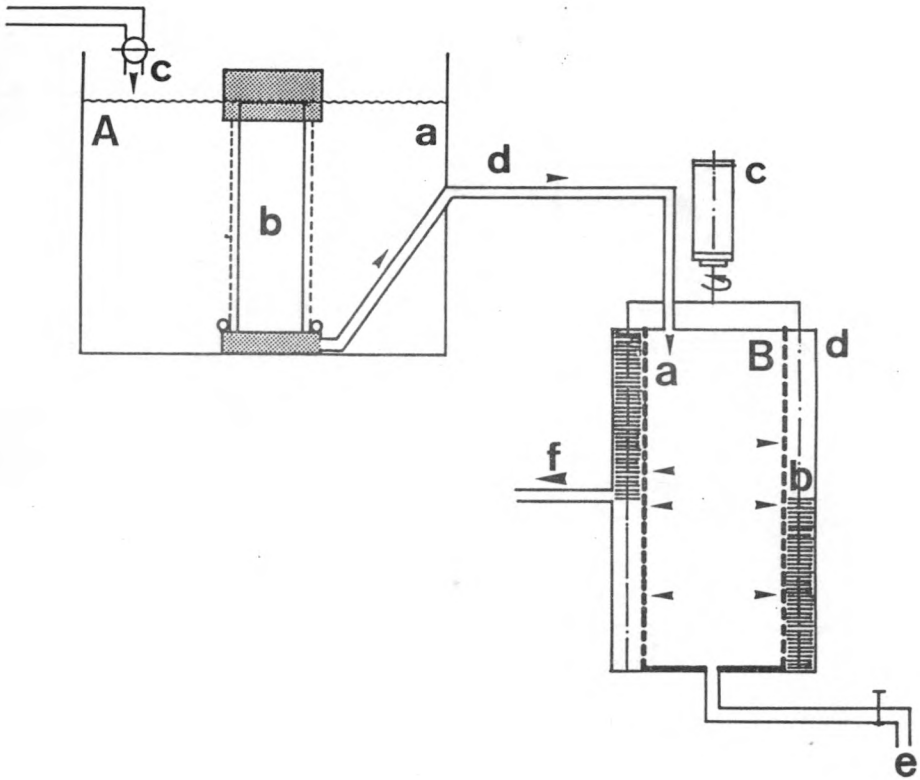


Fig. 37 : Schema van het systeem voor de afoogsting van nauplii.

(A) : teelttank (a) met 'Trislot'-filter (b) watertoevoerbuiss (c), en waterafvoerbuiss (d);  
 (B) : recuperatiesysteem met container (d), inverse 'Trislot'-filter (a), borstels (b) aangedreven door rotor (c), oogstkanaal (e), en effluentbuiss (f).

schuin opgestelde PVC-plaat (Fig. 38). Een groot gedeelte van het oppervlak van deze plaat bevat open PVC-buisjes ( $\emptyset = 16$  mm;  $l = 5$  cm), die voor een direct contact zorgen tussen beide deelruimtes. Nadat de tank gevuld is met zeewater wordt de filtersuspensie in het ene compartiment gebracht, dat daarna afgedekt wordt met een ondoorzichtig deksel. Het andere compartiment daarentegen wordt belicht met een Tl-lamp zodat de positief fototactische nauplii actief migreren doorheen het schuin opgerichte buisjessysteem naar de verlichte ruimte. Zwevende stoffen daarentegen kunnen dergelijke migratie niet uitvoeren en sedimenteren. Na verloop van tijd worden de twee compartimenten volledig gescheiden door het inschuiven van een volle PVC-plaat en kan de larvensuspensie afzonderlijk geogst worden.

De tweede opstelling omvat een cilindroconische tank met centrale overlooppijp. Het vat is opnieuw ondoorzichtig afgedicht met uitzondering van een opening ter hoogte van de overloop, waarboven een lamp hangt. De nauplii-suspensie wordt in de tank gebracht en na een vijftal minuten wordt de doorvloeï ingesteld. De debietafstelling (retentietijd) is zo gekozen dat partikels bezinken terwijl de larven, aangetrokken door het licht, geëvacueerd worden met het effluent via de overloop en finaal geconcentreerd worden op een zeef.

De ontwikkelde recuperatietechniek werkt vrij efficiënt. Preliminair produktietesten leverden ongeveer 30 g natgewicht aan larven op per 100 l kweektank per dag; dit komt theoretisch neer op een dagelijkse produktie per wijfje van  $\pm 6$  nauplii. Dit stemt overeen met de geobserveerde worpgroottes voor een reproductiecyclus van één week zodat verondersteld mag worden dat praktisch alle larven afgeogst worden. Bovendien bestond de oogst (na 12 u) uitsluitend uit instar I-stadia, wat opnieuw wijst op een efficiënte recuperatie.

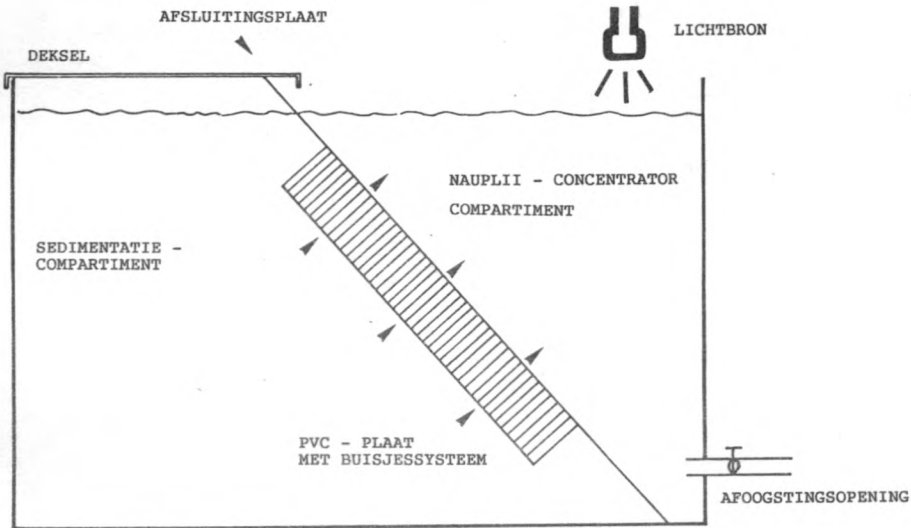


Fig. 38 : Schema van het systeem voor de scheiding van de nauplii van partikulaire afval.

#### IV.4.4. Besluit

Voor zover wij weten is dit de eerste beschrijving van een intensief kweekstelsel voor gecontroleerde naupliiproductie. Toch moeten de gegevens als preliminair beschouwd worden en zijn verdere testen essentieel om tot een standaardtechniek te komen. Zo dienen b.v. meerdere rassen geëvalueerd te worden op hun ovovivipare reproductiekenmerken. Interessant hierbij kan de selectie zijn van obligaat ovovivipare *Artemia* populaties die genotypisch geïmpregeerd zijn aan een nauplii-reproductie, zoals beweerd wordt voor de populaties van Dry Creek Salt Field (Adelaide, Australië : Mitchell en Geddes, 1977; Jones *et al.*, 1981), Lake Grassmere (Nieuw-Zeeland : Wear en Haslett, 1977) en het Laysan meer (Hawaii, V.S.A. : Lenz en Dana,

1987). Verder dient het standaarddieet op basis van gist geoptimaliseerd te worden en het effect van de kweekduur bestudeerd te worden.

Een kosten-baten analyse van dit produktiesysteem zal de uiteindelijke commerciële toepasbaarheid in aquacultuur-bedrijven bepalen.

## HOOFDSTUK V

### KARAKTERISATIE VAN DE KWALITEIT VAN DE NAKOMELINGEN

#### V. 1. MATERIAAL EN ALGEMENE METHODEN

##### V.1.1. Cysten

Een gedetailleerde lijst met specificaties van de cysten, geogst uit de installatie voor intensieve cystenproductie is opgegeven in tabel 28. Bij elk staal is tevens een code vermeld die verder zal gebruikt worden bij de bespreking van de diverse experimenten. Tenzij anders vermeld, werd steeds gebruik gemaakt van de standaardprocedure voor opzuivering en stockering van cysten zoals beschreven in hoofdstuk IV.3.4.

##### V.1.2. Ovovivipaar afgelegde nauplii

Voor de nutritionele analyses werden de larven tweemaal ('s morgens en 's avonds) in plaats van éénmaal daags geogst via het recuperatiefiltersysteem. Dit liet ons toe hoofdzakelijk (>80 %) instar I - stadia te verzamelen. Na een spoeling met leidingwater werden de nauplii gezeefd op een 100  $\mu\text{m}$  zeefje, in 'Eppendorfer'-buisjes gebracht onder stikstof, en direct ingevroren bij  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Voor de groei- en overlevingstesten was het noodzakelijk pas afgelegde nauplii te gebruiken daar de ouderdom van de larven de proefresultaten sterk kan beïnvloeden. De volgende techniek werd toegepast : gedurende 1 u werd de watertoevoer van de kweektanks met adulten verhoogd teneinde praktisch alle afgelegde larven weg te spoelen, daarna werd de nauplii-recuperatieunit gereinigd en terug opgesteld gedurende de daaropvolgende 2 u. De pas afgelegde nauplii werden na het afoogsten gewassen met zeewater vooraleer ze aan te wenden als entmateriaal in de proeven.

Tabel 28 : Lijst van de bestudeerde *Artemia* nakomelingen geproduceerd onder specifieke labo-omstandigheden

Geografische oorsprong	Code entmateriaal <sup>1</sup>	Specifieke produktiekarakteristieken			Code afleg	
		zoutgehalte (g/l)	densiteit juvenielen (N/l)	dieet <sup>1</sup> andere		
Lavalduc, Frankrijk	LVD 256	50	10 000	RB	LVD 811	
	LVD 1980	50	10 000	RB-SPIR 3:1	LVD 821	
		50	10 000	RB	LVD 822	
		50	5 000	RB-SPIR 3:1	LVD 823	
		50	10 000	RB-SPIR 3:1	LVD 824	
		50	10 000	RB-SPIR 3:1	LVD 825	
		75	5 000	RB	LVD 826	
		75	5 000	RB-A 6Z*	LVD 827	
		75	2 000	RB-A 6Z*	continue belichting LVD 828	
		75	2 000	RB-A 6Z*	maximale duisternis LVD 829	
		75	2 000	RB-A 6Z*	maximale duisternis LVD 8210	
		90	2 000	PROV-A 6Z*	LVD 831	
		90	5 000	PROV-A 6Z*	LVD 832	
	Great Salt Lake, Utah, V.S.A.	GSL 185	50	10 000	RB	GSL 811
			35	10 000	RB	GSL 812
			35	10 000	RB	GSL 813
			50	10 000	RB-SPIR 3:1	GSL 822
35			10 000	RB-SPIR 3:1	GSL 823	
75			2 000	ARP	GSL 831	
75			5 000	ARP	GSL 832	
35			2 000	ARP	GSL 833	
50			2 000	RB	GSL 821	
GSL labo- geproduceerde cysten GSL 568			35	5 000	BG	GSL 840
		90	5 000	PG-RB 1:4	GSL 841	
	50	5 000	PG-SP 1:4	GSL 861		
	75	2 000	PG-SP 1:4	GSL 881		

San Pablo Bay, Californië, V.S.A.	SPB 1628	50	5 000	RB-SPIR 3:1		SPB 821
San Francisco Bay, Californië, V.S.A.	SFB 2149	90	5 000	PROV-A 6%*		SFB 831
		90	2 000	PROV-A 6%*		SFB 832
		90	5 000	RB-PG 4:1	voedingsregime 10%	SFB 841
		90	5 000	RB-PG 4:1	voedingsregime 15%	SFB 842
		90	1 000	<i>Dunaliella</i>	suboptimale voeding	SFB 851
Macau, Brazilië	RAC 1980	90	1 000	<i>Dunaliella</i>	optimale voeding	SFB 852
		90	2 000	SPIR-UNICA 1:1		MAC 831
Chaplin Lake, Canada	CHL 1979	90	3 000	PROV-UNICA 1:1		MAC 832
		50	10 000	RB-SPIR 3:1		CHL 821
Tientsin, China	TIE 1978	75	10 000	RB		TIE 821
Moekba, U.S.S.R.	MOE 1983	75	6 000	RB-PG 4:1	voedingsregime 15%	MOE 841
Margherita di Savoia, Italië	MDS 1986	75	3 000	PG-SP 1:4		MDS 881

<sup>1</sup> verklaring der gebruikte afkortingen in tabel 9 en 10.

\* : aanrijking van het dieet met levertraanolie volgens de procedure van Léger *et al.* (1985)



### V.1.3. Het test-medium : zeewater

Aanvankelijk werden de ontluikingstesten en groeiproeven uitgevoerd in natuurlijk zeewater, afkomstig uit de Golf van Biscaye, met een saliniteit van  $34 \pm 1$  g/l en een pH schommelend tussen 7,9 en 8,2. Daar de waterkwaliteit echter soms te wensen overliet, werd besloten een artificieel zeewater te gebruiken. Eerst werd gekozen voor het medium van Sorgeloos *et al.* (1983) (zie hoofdstuk III.2.4.) doch ook hier traden variaties in kwaliteit op zodat uiteindelijk geopteerd werd voor een aangepast Dietrich en Kalle water waarvan de geschiktheid voor *Artemia* testen meerdere malen bewezen is (Sorgeloos, 1975b; Vanhaecke, 1983). De bereidingswijze van dit artificieel zeewater is terug te vinden in Vanhaecke (1983); er werd wel een extra hoeveelheid  $\text{NaHCO}_3$  toegevoegd om het bufferend vermogen te verhogen (Spotte, 1979). De diverse aangewende zoutgehaltenes werden bekomen door verdunning van de 120 g/l stockoplossing met gedestilleerd water.

### V.1.4. Incubatie van de cysten en oogst der nauplii

Daar ontluikingsrendement en -snelheid beïnvloed worden door talrijke abiotische factoren (zie hoofdstuk V.2.) werden de incubatieomstandigheden gestandaardiseerd. De cysten werden steeds gesuspendeerd in een cilindroconische, glazen buis (inhoud 100 of 500 ml) gevuld met zeewater van 35 g/l. De incubatie-densiteit bedroeg meestal 250 mg cysten per liter medium (uitzonderlijk 500 mg). Een continue aëratie door middel van een puntbeluchting vanop de bodem van de recipiënt zorgde voor een homogene verdeling van de cysten in het ontluikingsmilieu en voor voldoende zuurstof. De ontluikingsbuizen werden opgesteld in een gethermostatiseerde kamer bij  $25,0 \pm 0,5$  °C en onder continue belichting bij een intensiteit van 1000 lux.

Voor de groeiproeven of de analyses werden enkel pas ontloken larven (instar I-stadium) aangewend. Meestal was hiervoor slechts een 24 u incubatieperiode vereist.

Afoogsting gebeurde door de aëratie stop te zetten en de nauplii die zich concentreren in de punt van de buis af te sifoneren. In de gevallen waar geen strikte scheiding mogelijk was tussen de larven en de (vele) niet ontloken cysten, werd het procédé van de separatorbox (Persoone en Sorgeloos, 1972) toegepast. Hierbij wordt het positief fototactisch gedrag der nauplii benut om de larven te laten zwemmen naar een verlicht compartiment gevuld met zuiver zeewater.

#### V.1.5. Decapsulatie der cysten

Met deze techniek wordt door oxidatie met een NaOCl-oplossing het buitenste gedeelte van de cysteschaal (soms verkeerdelijk chorion genoemd : cf. Gilchrist, 1978) verwijderd. De toegepaste decapsulatietechniek is gebaseerd op de methode van Bruggeman *et al.* (1979, 1980) en kan summier als volgt beschreven worden :

- hydrateren der cysten gedurende 2 u zoals bij de ontluikingsprocedure;
- per gram cysten wordt 0,33 ml NaOH (40 %) en 0,5 g actief hypochloriet toegevoegd; de totale hoeveelheid decapsulatiemedium (NaOCl + NaOH + zeewater) bedraagt 13 ml. Het ontschalingsproces duurt  $\pm$  10 min en wordt nauwgezet gevolgd onder een dissectie-microscop;
- de reagentia worden onmiddellijk weggespoeld wanneer het proces voltooid is; met een 0,1 N HCl-oplossing worden restanten  $\text{OCl}^-$  gedesactiveerd.

#### V.1.6. Voorstelling en statistische verwerking der gegevens

Om te voorkomen dat een overmaat aan cijfermateriaal de overzichtelijkheid van de resultaten zou schaden, werden in de meeste gevallen enkel de gemiddelden van de resultaten en hun standaardafwijking vermeld.

Voor de statistische verwerking van de resultaten werden de handboeken van Snedecor en Cochran (1967) en

Sokal en Rohlf (1969) geraadpleegd. De resultaten werden verwerkt met het computerprogramma 'Statgraphics' van 'STSC'

De normaalverdeling van de steekproefgegevens en de homogeniteit van de varianties werden getest met respectievelijk de methode van Kolmogorov - Smirnov en de Bartlett's-test. Beide voorwaarden moeten vervuld zijn voor het toepassen van een variantie-analyse. Voor de analyse van experimenten met meerdere behandelingen werd dan een variantie-analyse (model 1) gebruikt.

Naargelang de behandelingen ingedeeld werden volgens één of twee criteria werd een variantie-analyse met één, respectievelijk twee factoren gebruikt. Significante verschillen werden onderzocht bij een significantieniveau  $p < 0,05$ . Om alle gemiddelden van een experiment twee aan twee te vergelijken werd gebruik gemaakt van de toetsingsprocedure van Duncan of de test van Tukey voor de meervoudige vergelijking van gemiddelden.

Gegevens van experimenten die niet aan de basisvoorwaarden voldeden, werden getransformeerd met een Arcsin-transformatie. In sommige experimenten, waarvoor de behandelingen volgens één criterium werden ingedeeld, bleken de resultaten ook na deze transformatie niet aan de voorwaarden te voldoen. Voor deze experimenten werden volgende alternatieven toegepast :

- de methode van Games en Howell om de gemiddelden te vergelijken indien de resultaten normaal verdeeld waren maar de varianties niet homogeen waren;
- de Kruskal-Wallis test om de gemiddelden te vergelijken indien de gegevens niet normaal verdeeld waren.

De vergelijking van de gemiddelden van twee reeksen waarnemingen werd uitgevoerd aan de hand van een t-toets.

## V.2. Ontluikingskarakteristieken der cysten

### V.2.1. Literatuurstudie

#### 1. Inleiding

De produktie van latente levensvormen is een veel voorkomende adaptatie van zowel planten als dieren aan een onstabiel habitat. Het reversibel stilleggen van het metabolisme en de ontwikkeling zorgt er immers voor dat de eisen die gesteld worden aan het milieu minimaal zijn, waardoor de resistentie ten opzichte van extreme condities veel hoger kan zijn. Reeds in 1702 observeerde Van Leeuwenhoek dat rotiferen ('Animalcules') "... upon water given to them can unfold their bodies and move about in the usual manner..." (in Jardel, 1986). Toch duurde het nog anderhalve eeuw alvorens een wetenschappelijke commissie van de "Société Biologique de Paris" finaal erkende dat organismen die een toestand van uitdroging ondergaan nadien opnieuw kunnen herleven (Broca, 1860). Ondertussen werden verschillende vormen van latent leven beschreven voor al of niet specifieke, ontogenetische stadia (b.v. sporen, eieren, larven, enz.) van wijd uiteenlopende taxa van planten en dieren zoals protozoa, rotiferen, tardigraden, nematoden, crustaceeën en insecten (Lees, 1961; Crowe en Clegg, 1973, 1978; Crowe en Madin, 1974; Gilbert, 1974; Belk en Cole, 1975; Lui, 1978; Wurdak *et al.*, 1978). Het is dan ook niet verwonderlijk dat hierdoor een complexe en vaak verwarrende terminologie ontstond die de juiste inschatting van literatuurgegevens met betrekking tot cryptobiotische stadia, waaronder de *Artemia* cysten, erg moeilijk maakt. We vinden het dan ook essentieel om eerst uniforme definities vast te leggen en 'het geval *Artemia*' in een bredere context te situeren om zo tot een beter inzicht te komen in de factoren die cryptobiosis en de ontluikbaarheid van cysten beïnvloeden.

## 2. Terminologie

Uit de literatuur blijkt dat de verwantschap tussen de verschillende types van cryptobiosis afhankelijk van de gebruikte terminologie op diverse wijzen ingeschat werden (Keilin, 1959; Hinton, 1960; Sussman en Halvorson, 1966; Gilbert, 1974; Belk en Cole, 1975; Clegg, 1978a; Grice en Marcus, 1981; Crowe *et al.*, 1987). Bij vergelijking van al deze definities valt op dat ze steeds op dezelfde twee pijlers rusten : enerzijds de metabolische activiteit van het latente levensstadium, en anderzijds de invloed van de omgeving op dit rustproces. Uitgaande van deze basis hebben we geprobeerd de terminologie te uniformiseren zodat de verschillende staten van onderbroken of vertraagde ontwikkeling in eieren of embryo's van Rotifera en Crustacea, en meer specifiek *Artemia* cysten, kunnen onderscheiden worden

- : - **Cryptobiosis** is een algemene term die, overeenkomstig Keilin (1959), de staat van een organisme beschrijft waarbij geen enkel teken van leven zichtbaar is en waarin de metabolische activiteit nauwelijks meetbaar of zelfs reversibel stilgelegd is. Het omvat zowel 'dormancy' als quiëscentie.
- 'Dormancy' is een speciale vorm van cryptobiosis waarbij de inductie van het metabolisme en de ontwikkeling endogeen, en zodoende onafhankelijk van de heersende omgevingsomstandigheden gecontroleerd wordt.
- **Quiëscentie** daarentegen refereert naar de exogene (omgevings-) controle van metabolisme en ontwikkeling. Zo kunnen b.v. temperatuurs- of zuurstofextremen de verdere ontwikkeling stilleggen; de embryogenese kan dan enkel starten wanneer deze omgevingsomstandigheden opnieuw optimaal worden. Naargelang de factor die ongunstig is, onderscheidt men verschillende types van quiëscentie zoals anhydrobiosis (tekort aan voldoende hoeveelheden water), cryobiosis (te lage temperaturen), anoxybiosis of anaërobiosis (tekort aan zuurstof, of lucht), enz.

- De term *diapauze*, die men vaak terugvindt in verband met *Artemia* cysten, refereert naar een vorm van 'dormancy' waarbij een inhibitie van de ontwikkeling geïnitieerd wordt door interne factoren vooraleer de omgevingsomstandigheden ongunstig evolueren.

Deze terminologie zal dan ook verder aangehouden worden in dit doctoraatswerk.

### 3. *Cryptobiosis bij Artemia* (Fig. 39)

Tijdens de ovipare reproductie wordt in de uterus van het moederdier de embryogenese stilgelegd tijdens het laat-gastrula stadium (G II : Benesch, 1969), dit is wanneer de tertiaire schaal reeds volledig afgezet is rondom het embryo (Anderson et al., 1970). Hoewel in de literatuur meestal (zomaar) aangenomen wordt dat deze cysten 'dormant' zijn bij het afleggen is het precieze moment waarop de diapauze intreedt in feite niet gekend.

De start tot 'dormancy' lijkt wel "... rigidly programmed into the development of this organism... independently of geographic and environmental conditions" daar het aantal nucleï per cyste in diapauze steeds constant is ( $\pm 4\ 000$  : Nakanishi et al., 1962).

Recent ultrastructureel onderzoek van Jardel (1986) op pas afgelegde cysten toonde echter aan dat de geëncysteerde G II- gastrula's tot minstens 24 u na het afleggen nog metabolisch actief zijn en tegelijkertijd een modificatie van de cellulaire organisatie optreedt : het endoplasmatisch reticulum wordt glad (zonder ribosomen), de mitochondriale complexiteit neemt toe, organellen en glycogeen-concentraties worden herverdeeld, enz. Volgens Jardel is dit een 'preadaptieve periode' voorafgaand aan de ontwatering die zeker vóór het intreden van de diapauze dient plaats te vinden. Toch doen zijn bevindingen naar onze mening geen afbreuk aan de algemene hypothese dat de diapauze reeds in het moederdier optreedt, en dit om volgende redenen :

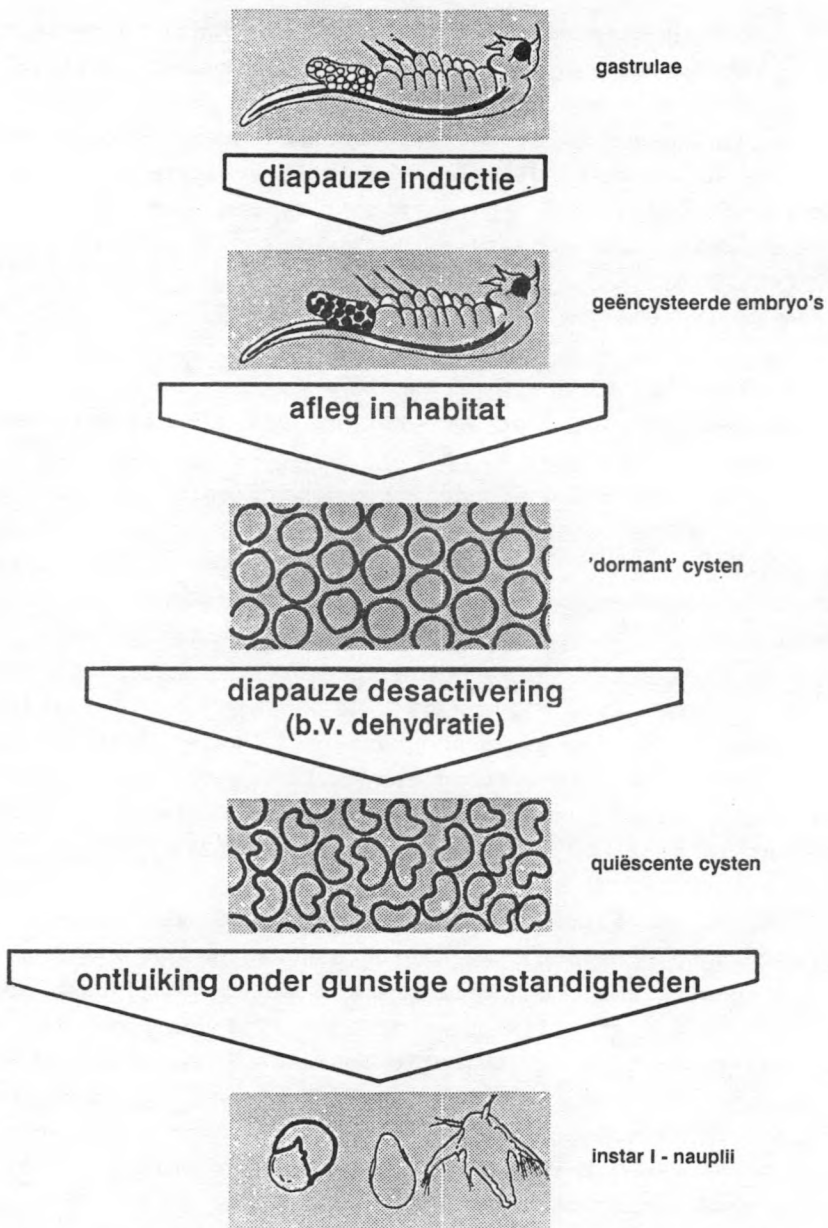


Fig. 39 : Schematische illustratie van de specifieke terminologie met betrekking tot cryptobiosis bij *Artemia*.

- het zogenaamd pas afgelegd cystenmateriaal is waarschijnlijk vervroegd afgelegd wegens het manipuleren van de moederdieren, een feit dat we zelf tijdens onze studie meermaals geobserveerd hebben. Dit zou betekenen dat de geregistreerde metabolische activiteit tijdens de 24 u periode in feite in de uterus had moeten plaatsvinden. Kortom, het moment van diapauze-instelling kan niet juist gedefinieerd worden.
- de ontwikkeling blijft stilgelegd en de metabolische activiteit is hoe dan ook sterk gereduceerd. Daarenboven bepaalde Jardel deze activiteit op totaal-homogenaten met als indicator enkel het cytochroom c-oxidase wat mogelijk tot verkeerde resultaten kan geleid hebben.

De term diapauze wordt hier wel terecht gebruikt :

- ovipariteit treedt soms op lang voordat omgevingscondities extreem worden (b.v. Great Salt Lake *Artemia* : Lenz, 1987; Lenz en Dana, 1987) of zelfs wanneer geen externe fluctuaties optreden (b.v. laboculturen onder continu gunstige condities : Tackaert *et al.*, 1987).
- na het afleggen ontluiken de cysten niet direct.

Verdere ontwikkeling van het sluimerende embryo is slechts mogelijk wanneer het (de) endoge(e)n(e) mechanisme(n) verantwoordelijk voor de inductie van de diapauze gedesactiveerd word(t)(en). In natuurlijke omstandigheden vindt dit meestal plaats door een dehydratie van de cysten als gevolg van de hoge osmotische waarden van de biotopen (zoutmeren) en/of het blootstaan aan ariede omstandigheden eenmaal de drijvende cysten accumuleren op de oevers (Persoone en Sorgeloos, 1980). Daar de endogene controle door het drogingsproces opgeheven wordt, kan men niet meer van 'dormante' gastrulae spreken; de verdere embryogenese blijft echter wel afhankelijk van externe factoren zoals watergehalte. Daar er nog steeds geen meetbare metabolische activiteit is (Dutrieu, 1960; Finamore en Clegg, 1969;



Clegg, 1974b) zijn de cysten in een quiëscente fase getreden. Mogelijke vormen van quiëscentie bij *Artemia* zijn o.a. anhydrobiosis, anoxybiosis, cryobiosis, ... (Crowe et al., 1987). In tegenstelling tot de diapauze-cysten is reeds veel onderzoek uitgevoerd op anhydrobiotische cysten; dit heeft tot belangrijke bevindingen geleid betreffende :

- ultrastructurele en biochemische adaptaties aan deze vorm van quiëscentie (Morris, 1968; Clegg, 1962, 1965, 1967, 1974a; Crowe en Clegg, 1973, 1978; Clegg et al., 1982; Jardel, 1986; Crowe et al., 1987)
- resistentie ten opzichte van extreme omgevingsomstandigheden (zie overzicht in Clegg en Conte, 1980)
- langdurige stockeerbaarheid (Bowen, 1963; Clegg, 1967, 1973, 1978a; Vanhaecke, 1983).

Finaal zal de cryptobiotische toestand opgeheven worden zodra omgevingscondities 'optimaal' zijn. In de zoutmeren zal dit b.v. plaatsgrijpen wanneer door regenval een drijvende waterfilm van lage saliniteit gevormd wordt waarin de hygroscopische, anhydrobiotische cysten opnieuw hydrateren. Metabolisme en differentiatie kunnen nu starten zodat binnen een periode van ongeveer 1-2 dagen vrijzwemmende nauplii ontwikkeld worden.

Om het overzicht in verband met cryptobiosis bij *Artemia* volledig te maken, dienen we hier nog de observaties te vermelden van Mathias (1937), Lochhead (1941), Dutrieu (1960), D'Agostino (1965), Anderson et al. (1970), Von Hentig (1971), Voronov (1971), Versichele (1983), Amat et al. (1987) en Drinkwater en Crowe (1987) waarbij een tweede type van cysten gesignaliseerd wordt : de zogenaamde 'subitaneous' of 'summer eggs' die direct na het afleggen ontluiken. Dit eerder ongewoon fenomeen is volgens ons te wijten aan het slecht functioneren van het inductiemechanisme van de diapauze tijdens de ovipare reproductie waardoor wel degelijk een cysteschaal gevormd wordt, maar waar de embryogenese niet stilgelegd wordt tijdens het laat-gastrula stadium. Wellicht treedt dit enkel op wanneer

het *Artemia* wijfje haar reproductiewijze plotseling wijzigt van ovovivipaar naar ovipaar of omgekeerd. In hoeverre ontwikkeling en metabolisme hier reversibel stilgelegd kunnen worden door extreme omgevingsomstandigheden, zodat de 'summer eggs' quiëscen worden, kan niet opgemaakt worden uit de geciteerde literatuur.

#### 4. *Ecologische significantie*

Naast *Artemia* en andere Anostracen worden diapauze-cysten ook afgelegd door sommige Notostracen, Conchostracen, Cladoceren en calanoïde Copepoden, alsook monogononte Rotiferen (zie Species-lijst in tabel 30).

Zoals reeds hoger aangehaald is de belangrijkste functie van cryptobiosis hoogstwaarschijnlijk het verzekeren van de overleving van de populatie onder temporeel slechte omgevingsomstandigheden (Belk en Cole, 1975; Grice en Marcus, 1981). Vanuit ecologisch oogpunt bekeken lijkt 'dormancy' een betere strategie in biotopen met voorspelbare cyclische stresstoestanden, terwijl quiëscentie optimaal zou zijn in niet-cyclische omstandigheden (Belk en Cole, 1975). Door de produktie van nakomelingen in een toestand van diapauze kunnen de organismen zich voorbereiden op de te verwachten sub-optimale biotoopomstandigheden. Verder kan 'dormancy' relevant zijn als een strategie voor de populatiedynamiek doordat het de levenscycli synchroniseert met variaties die in het habitat voorkomen: de endogene controle over metabolisme en differentiatie verzekert een synchrone ontluiking van de cysten en dit resulteert in een vlug opstarten en een snelle opbouw van de populatie kort nadat omgevingsparameters gunstig geworden zijn. Het is vooral deze synchronie die een effectieve kolonisatie van temporele biotopen mogelijk maakt.

De 'dormante' *Artemia* cysten bieden nog een tweede belangrijke mogelijkheid: het overwinnen van dispersiemoeilijkheden die te wijten zijn aan de discontinue biogeografische distributie van het pekelkreeftje. Het feit dat

cryptobiotische cysten erg extreme omstandigheden kunnen weerstaan (zie overzicht van Clegg en Conte, 1980), maakt deze levensstadia erg geschikt voor passief en actief transport naar geschikte biotopen via wind, watervogels en mens (Horne, 1966; MacDonald, 1980; Persoone en Sorgeloos, 1980).

##### 5. *Mechanismen verantwoordelijk voor de inductie en/of het opheffen van de diapauze bij Artemia*

Gezien het onderscheid tussen diapauze-cysten en quiëscence cysten slechts recent de nodige aandacht kreeg (Busa en Crowe, 1983; Crowe *et al.*, 1987; Lavens en Sorgeloos, 1987), werd het onderzoek vooral op (quiëscence) anhydrobiotisch materiaal uitgevoerd. Literatuurgegevens hieromtrent zijn dan ook schaars en verwarrend : het proces is nog niet ontrafeld, maar toch zijn reeds enkele hypothesen vooropgesteld.

Anderson *et al.* (1970) suggereerden dat de graad van impermeabiliteit van de cysteschaal de diapauze reguleert. Volgens dezelfde auteurs wordt de doorlaatbaarheid ervan gecontroleerd door de dikte, densiteit, microstructuur of chemische compositie van de specifieke lagen in de schaal. Morris en Afzelius (1967) veronderstelden dat in feite het 'outer membrane' de penetratiebarrière vormt : na dehydratie van de cysten in de uterus zou deze 'sealing envelope' gevormd worden en verdere embryonale ontwikkeling kan enkel starten nadat dit membraan aangetast of verwijderd is. Eigen observaties van pas afgelegde cysten uit het gecontroleerd cystenproductie-systeem onthulden echter dat de geëncysteerde embryo's niet altijd gedehydrerd waren, en dat niet-intacte membranen veelvuldig voorkwamen zonder dat de diapauze opgeheven was. Volledige verwijdering van het membraan en de schaal bracht daarenboven het metabolisme niet opnieuw op gang. Deze permeabiliteitsstelling werd verder ondergraven door De Chaffoy *et al.* (1978) die aantoonde dat enerzijds de schaal reeds gevormd wordt tijdens de gastrulatie, en anderzijds de permeabiliteit

gereguleerd wordt door het embryonale 'outer cuticular membrane' (Belk, 1987) dat ook aanwezig is bij de ovovivipare voortplantingswijze waar geen diapauze optreedt.

In haar overzichtswerk formuleerde Dutrieu (1960) de hypothese dat een inhibitie van de ontwikkeling tot nauplius-larve plaatsvindt wanneer de aanwezige caroteno-proteïnen niet opsplitsen in vrije carotenoïden en proteïnen. Een bewijs voor deze theorie of een verklaring van het mechanisme dat verantwoordelijk is voor de splitsing werd echter niet gegeven. Recente bevindingen van Nelis et al. (1984a, b, 1987, 1988a, b) werpen mogelijk een nieuw licht op deze hypothese. Het voorkomen van het hoogst ongewone cis-canthaxanthine dat reversibel in de trans-vorm kan overgaan, en de aanwijzingen dat de activiteit van deze component specifiek in de cryptobiotische cysten gesitueerd moet zijn, doen de vraag rijzen of de cis/trans-omzetting niet interfereert met de biochemische gebeurtenissen die aan de basis liggen van het diapauze-proces. Naar analogie met wat Dutrieu (1960) vooropstelde, kan gespeculeerd worden dat het cis-canthaxanthine tijdelijk als een slot op bepaalde eiwitten dienst doet totdat, door een conformationele wijziging van het carotenoid (cis naar trans), proteïnen vrijkomen zodat hun activiteit kan starten (Nelis et al., 1988a). Ook hier zijn enkele argumenten in tegenspraak met de aangehaalde stelling: zo is b.v. de cis/trans-omzetting reversibel terwijl de diapauze-toestand dit juist niet is.

Een derde hypothese werd naar voren gebracht door de groep van John Crowe (Universiteit van Davis, Californië) in de eerste helft van de jaren '80 en betreft de regulatie van de werking van specifieke enzymen via een wijziging van de intracellulaire pH ( $pH_i$ ). Busa et al. (1982) en Busa en Crowe (1983) toonden aan de hand van NMR aan dat "...alkalinization of dormant embryo  $pH_i$  (= 6.3) with the weak base  $NH_3$  (to  $pH_i$  = 7.5) terminates natural dormancy..." waardoor respiratie en carbohydraat-metabolisme terug starten.

Recent werden het trehalase en het hexokinase geïdentificeerd als de regulatiepunten die beïnvloed worden door de intracellulaire pH (Carpenter en Hand, 1986; Hand en Carpenter, 1986). Helaas bleek uit verder onderzoek dat de onderzochte GSL cysten zich in feite niet meer in diapauze maar in cryobiosis bevonden. Metingen op echte diapauze-cysten duiden op een hogere ( $>7,9$ ) in plaats van lagere  $\text{pH}_i$ . Dit veronderstelt een omgekeerd proces, namelijk aanzuring (Crowe *et al.*, 1987). Toch wordt hierdoor de hypothese niet volledig ontkracht: "... there is a suggestion in the data of the presence of a minor acidic compartment that may be important in terminating dormancy" (Crowe *et al.*, 1987). Volgens Drinkwater en Crowe (1987) is de kans dat de intracellulaire pH de cryptobiotische toestand determineert echter minimaal: proeven uitgevoerd op Mono Lake diapauze-cysten waarbij een lage pH geïnduceerd werd via  $\text{CO}_2$ -toediening leverden immers geen desactivering op.

Alhoewel deze laatste auteurs erkenden dat ook zij niet de werkelijke mechanismen hebben ontrafeld die de diapauze reguleren, maakten ze toch enkele assumpties betreffende de aard van het mechanisme. In de diapauze-embryo's zouden, als antwoord op specifieke externe factoren (b.v. dehydratieprocessen) biofysische processen optreden (b.v. hydrofobe interacties); deze interfereren ofwel direct bij het opheffen van de 'dormancy', via 'irreversible biophysical alteration', ofwel indirect via het metabolisme. Dit laatste lijkt volgens Drinkwater en Crowe minder logisch gezien de afwezigheid van een detecteerbaar metabolisme.

#### 6. Factoren die de ontluikbaarheid beïnvloeden

Uit het voorgaande blijkt duidelijk dat in de meeste gevallen geen rekening gehouden werd met de voorgeschiedenis van de voor onderzoeksdoeleinden gebruikte cysten en bijgevolg met het type cryptobiotische toestand. De gebrekkige kennis met betrekking tot het herkennen van het

juiste stadium (diapauze *versus* quiëscentie) en de precieze overgang ervan, heeft voor gevolg dat niet altijd juiste conclusies getrokken werden wat betreft de invloed van abiotische en biotische omstandigheden op de ontluikbaarheid van de afgelegde cysten.

Dit probleem stelt zich ook nadrukkelijk bij het doornemen van publikaties betreffende andere cysten-producerende species (zie tabel 30). Dit impliceert dat we slechts die gegevens die, naar onze mening, voor interpretatie vatbaar zijn hieronder weergeven; toch blijft voorzichtigheid geboden gezien de informatie dikwijls beperkt was.

#### a. Invloeden vóór het afleggen der cysten

Bij rotiferen werd vastgesteld dat de ontluikingskarakteristieken van de 'resting eggs' beïnvloed werden door de kweekomstandigheden waaronder ze geproduceerd werden. Voorbeelden hiervan zijn het zoutgehalte (Ito, 1960), de hoeveelheid voedsel (Gilbert, 1974) en de samenstelling van het dieet voor de moederdieren (Gilbert, 1980; Pourriot en Snell, 1983). Zo toonde Gilbert (1980) aan dat de cysten van rotiferenpopulaties die met *Euglena* gevoed werden maximaal ontloken (96 %) terwijl die van populaties met een *Rhodotorula* dieet 'slechts' 83 % ontluiking gaven, verspreid over een veel langere periode.

Bij *Artemia* bracht een vergelijkende studie van ontluikingskarakteristieken tussen diverse rassen significante verschillen aan het licht, niet alleen tussen de geografische rassen maar ook tussen diverse cystenmonsters binnen dezelfde populatie (Vanhaecke, 1983). Bij gebrek aan enige kennis van de voorgeschiedenis van deze cystencollecties kon geen verklaring gegeven worden aan deze variaties; verondersteld werd dat de oorzaak vooral te wijten was aan de behandeling van de cysten (oogstmethode, verwerkings- en/of stockeringstechniek : Vanhaecke en Sorgeloos, 1982; Vanhaecke 1983). Diverse onderzoekers beweren echter dat de ontluikingskwaliteit varieert in functie van het seizoen waarin de cysten geproduceerd worden (Cunningham en

Grosch, 1978; Sarasquete Reiriz, 1979; Bohra, 1980). Uit een studie waarbij verschillende reproductie- en levensverloop-karakteristieken met elkaar vergeleken werden, bleek dat de ontluiking sterk gecorreleerd is met de omgeving (Browne *et al.*, 1984). Produktietesten met het San Francisco Bay ras in kweekvijvers in Thailand, India en de Filippijnen, die een betere controle over productie- en oogstomstandigheden der cysten toelieten, gaven inderdaad indicaties dat biotoopkenmerken mogelijk interfereren met de ontluikbaarheid : de opbrengst per gram cystenmateriaal varieerde immers van 214 000 tot 339 200 larven (Vos *et al.*, 1984). Welke omgevingsfactoren precies interfereerden kon men echter niet achterhalen. Enkele studies waarbij cysten op laboratoriumschaal en onder gekende condities geproduceerd werden, maakten het wel mogelijk de eventuele invloed van productie-omstandigheden te detecteren. Gegevens daaromtrent werden samengevat in tabel 29.

Bij vergelijking van de ontluikingspercentages uit deze tabel blijkt dat van de onderzochte parameters in feite enkel het zoutgehalte een beduidend effect heeft. Volgens Versichele en Sorgeloos (1980) ontluiken SFB cysten geproduceerd bij lage saliniteit (35 g/l) tot 50 % minder dan deze uit culturen gekweekt bij 90 g/l. Versichele (1983) stelde hierbij een directe correlatie vast tussen de lagere ontluikbaarheid en de afname van de concentratie aan hematine in de cystenschalen geproduceerd bij lagere salinititeiten. De lagere ontluikingscijfers zouden daardoor te wijten zijn aan een hogere mortaliteit bij de geëncysteerde embryo's ten gevolge van een verminderde resistentie ten opzichte van extreme omstandigheden. Hoge zoutgehalten (>150 g/l) daarentegen schijnen opnieuw een drastische invloed uit te oefenen op de ontluikbaarheid van cystenmateriaal afkomstig van San Francisco Bay of Mono Lake (-35 à 50 % : respectievelijk Versichele en Sorgeloos, 1980 en Dana en Lenz, 1986).

Opvallend is wel dat Tobias (persoonlijke mededeling) de lagere ontluikingscijfers kon vermijden door de cysten, geproduceerd in 35 g/l, te incuberen in ontluikingsmedia

met een geringere saliniteit. Deze vaststelling is in samenspraak met Ito (1960) die stelde dat de saliniteit waarbij rotiferencysten geproduceerd worden, bepaalt welk zoutgehalte het ontluikingsmedium mag hebben. Pourriot en Snell (1983) besluiten dan ook dat "... resting egg formation conditions do not modify the hatching pattern, but have an effect on the relation between external factors and hatching rates".

Andere factoren zoals temperatuur en dieetsamenstelling lijken volgens de gegevens uit tabel 29 geen beduidende invloed uit te oefenen op het ontluikingspatroon van *Artemia* cysten. Enkel wanneer droge *Scenedesmus* vervoederd wordt in plaats van *Spirulina* daalt de ontluikbaarheid van de afgelegde cysten (van  $\pm 80$  tot 45 %). Versichele (1983) rapporteerde een opmerkelijke reactie met betrekking tot de invloed van de dieetsamenstelling : onmiddellijk na het overschakelen van *Spirulina* naar rijstekaf werden cysten geproduceerd die significant minder larven geven (-18 %). Opnieuw stelde men een zwakkere schaalvorming vast. Daarenboven nam ook de ontluikingsnelheid af met 6 u.

Een verminderde ontluikbaarheid van pekelkreeftcysten werd tevens gerapporteerd voor culturen blootgesteld aan niet-letale dosissen van toxische producten of irradiatie (Grosch, 1966, 1973; Squire en Grosch, 1970; Cunningham en Grosch, 1978).

#### b. Effect van het milieu op afgelegde diapauze-cysten

Twee klassen van invloeden kunnen onderscheiden worden : omstandigheden die niet interfereren met de toestand van diapauze *sensu stricto* (b.v. extreme, letale factoren) en factoren die het diapauze proces kunnen opheffen.

Wat de eerste klasse betreft kunnen we heel kort zijn. In natuurlijke omstandigheden ondergaan de pas afgelegde *Artemia* cysten meestal vlug een dehydratie ten gevolge van de osmotische druk van het pekewater (in het biotoop)



Tabel 29 : Overzicht van literatuurgegevens met betrekking tot de ontluiking van *Artemia* cysten in functie van produktieomstandigheden.

Type kweekstelsysteem	Geënte ras	Experimentele kweekparameters			Ontluiking (%)	Referentie
		voedsel	saliniteit (g/l)	temperatuur (°C)		
Renbaaninstallatie	SFB	<i>Spirulina</i>	35	20	28	Versichele en Sorgeloos, 1980
			35	28	26	
			90	20	76	
			90	28	72	
			180	20	38	
		Rijstekaf	35	20	19	
			35	28	22	
			90	20	66	
			90	28	78	
			180	20	40	
			Renbaaninstallatie	SFB	<i>Spirulina</i>	
<i>Spirulina/</i>						
bakkersgist	90	25			83	
<i>Scenedesmus</i>	90	25			45	
<i>Dunaliella</i> (levend)	90	25			85	
Kweektank zonder waterverversing	GSL	Rijstekaf/ kipmest	90	-	90	Choo, 1986

Fles-culturen	ML	<i>Spirulina</i> / landbouwfal	76	-	62	Dana en Lenz, 1986
			88	-	66	
			97	-	58	
			118	-	66	
			133	-	64	
			159	-	15	
open doorvloei- installatie	MAC	<i>Chaetoceros</i> (levend)	35	25 - 28	61	Tobias
					84 (5 g/l)	(pers. meded)

---

en/of de blootstelling aan droge lucht na het aanspoelen van de drijvende cysten op de oevers. Dit betekent dat het diapauze-stadium in deze gevallen slechts kortstondig is daar "...one of the most effective treatments in terminating dormancy is dehydration..." (Clegg en Conte, 1980); effecten van extreme condities blijven dus minimaal. Verder is er tot op heden geen onderzoek verricht op de resistentie van gehydrateerde diapauze-cysten ten opzichte van extreme omstandigheden.

In de gevallen waar dehydratie niet in quiëscentie resulteert lijkt het erop dat de tolerantie analoge vormen aanneemt als voor anhydrobiotische cysten (zie verder). Over de tweede groep factoren is veel meer gepubliceerd. In tabel 30 hebben we een overzicht gegeven van literatuurgegevens in verband met mogelijke diapauze-inhibitie technieken voor cysten van diverse crustaceëen- en rotiferenspecies. Hieruit kan men afleiden dat verschillende methodes de rusttoestand kunnen opheffen en dit bij meerdere cystenproducerende species. *Artemia* vormt hierop zeker geen uitzondering.

#### Dehydratie

Samenvattend kunnen voor de cystenproducerende organismen (zonder *Artemia*) (tabel 30) volgende effecten geobserveerd worden :

- de relatieve vochtigheid tijdens de droging beïnvloedt de ontluikbaarheid. De optimale waarde is verschillend naargelang het species (Hall, 1961; Hempel-Zawitkowska, 1971a; Khalaf *et al.*, 1977; Scott en Grigarick, 1979). Een finaal laag watergehalte kan resulteren in een vorm van euryplasticiteit : bij *Triops* bijvoorbeeld zijn de cysten die maximaal gedroogd werden veel resistenter voor intense temperatuurvariatiën (Carlisle, 1968; Hempel-Zawitkowska en Klekowska, 1968; Hempel-Zawitkowska, 1971a);
- de invloed van de drogingsduur op de inhibitie van de diapauze is zeer significant voor cysten van *Streptocephalus* (Moore, 1967; Bernice, 1972), *Chirocephalus* (Hall,

1953, 1961; Khalaf *et al.*, 1977), *Limnadia* (Bishop, 1968) en *Triops* (Takahashi, 1977). Zo rapporteerde Bernice (1972) bij *Streptocephalus* de vereiste van een dehydratieperiode van ongeveer twee weken lang om tot een 80 % ontluikbaarheid te komen. Wanneer echter een langere drogingsduur aangehouden werd (>60 dagen), resulteerde dit in zowel lagere ontluikingspercentages als -snelheden. Analoge bevindingen zijn gerapporteerd voor *Triops* door Takahashi (1977), waarbij de optimale drogingsduur 16 dagen is;

- de diapauze-desactivering (of leefbaarheid?) van *Streptocephalus* of *Triops* cysten is merkbaar geringer wanneer het drogingsproces direct na de afleg werd ingezet (respectievelijk Prophet, 1963 en Hempel-Zawitkowska, 1967). Bij *Triops* resulteert het inpassen van een rustperiode van vijf dagen vóór de dehydratie in een 90 % ontluikbaarheid in plaats van 5 %.

Gelijkaardige tendenzen zijn geobserveerd voor *Artemia* cysten. In hun overzichtsartikel betogen Clegg en Conte (1980) dat de verwijdering van intracystair water wellicht één van de meest effectieve behandelingen is die leidt tot desactivering van de diapauze-toestand. Dit wordt bijgetreden door diverse auteurs (o.a. Bond, 1934; Dutrieu, 1960; Godeluck, 1980; Versichele en Sorgeloos, 1980). Afhankelijk van de toegepaste drogingstechniek blijken echter wel variaties op te treden in inhibitie-efficiëntie. Alhoewel de drogingsproblematiek duidelijk bestudeerd is, zijn de meeste gegevens weinig waardevol daar slechts zelden met diapauze-materiaal gewerkt werd (zie hoger). De genoteerde effecten zijn dan ook meestal niet te wijten aan de drogingsprocédés maar wel aan bijvoorbeeld het aantal dehydratie/hydratatie-cycli (Vanhaecke en Sorgeloos, 1982 : zie verder).

Uit tabel 31 blijkt duidelijk dat de graad van ontwatering in grote mate de effectiviteit van de diapauze-desactivering bepaalt. Volgens Versichele en Sorgeloos (1980) wordt met SFB cysten een maximale desactivering (80



	Conchostraca	<i>Eulimnadia antlei</i>	+		Belk '72
		<i>Limnadia stanleyana</i>	+		Bishop '68
		<i>Caenestheriella gynecia</i>	0	-	Mattox en Velardo '50
	Cladocera	<i>Daphnia magna</i>	-		Van de Vel '84
			+		Doma '79
		<i>pulex</i>	-	-	Pancella en Stross '63
			+/-		Schwartz en Hebert '87
DEHYDRATIE/	Notostraca	<i>Triops cancriformis</i>	+		Fox '49; Hempel-Zawitkowska '67
HYDRATATIE		<i>longicaudatus</i>	+		Takakashi '77
LAGE TEMPERATUREN	Anostraca	<i>Eubranchipus vernalis</i>	+		Weaver '43
		<i>Chirocephalus stagnalis</i>	+		Nourisson '61
	Notostraca	<i>Lepidurus apus</i>	+		Braswell '67
		<i>Triops cancriformis</i>	0/+		Hempel-Zawitkowska '71b
		<i>granarius</i>	0/+		Takahashi '77
		<i>longicaudatus</i>	0		Takahashi '77
	Cladocera	<i>Daphnia spp.</i>	+		Stross '71
			0/-		Schwartz en Hebert '87
	Copepoda	<i>Pontella meadi</i>	+		Grice en Gibson '77
	(Calanoida)	<i>Labidocera aestiva</i>	+	+	Marcus '79, '80, '84;
					Grice en Marcus '81
		<i>Tortanus forcipatus</i>	0		Kasahara en Uye '79
LICHT en/of U.V.	Notostraca	<i>Triops cancriformis</i>	0/+	+	Hempel-Zawitkowska '70;
					Takahashi '75; '77
		<i>longicaudatus</i>	+		Takahashi '75; '77
		<i>en granarius</i>			
	Conchostraca	<i>Eulimnadia antlei</i>	+		Belk '72
		<i>Limnadia stanleyana</i>	+		Bishop '67

Tabel 30 : vervolg

Methode ter inhibitie van de diapauze	Species	HZ		Effect	Referenties
			HR		
	Cladocera	<i>Daphnia pulex</i>		+	Stross '66,'69,'71
		<i>Pleuroxus denticulatus</i>		+	Shan '70
	Copepoda (Calanoida)	<i>Labidocera aestiva</i>		+	Marcus '82
DUISTERNIS	Cladocera	<i>Daphnia obtun</i> <i>pulex</i>		+ +	Schwartz en Hebert '87 Davison '69; Schwartz en Hebert '87
OSMOTISCHE SCHOK	Anostraca	<i>Branchipus stagnalis</i>		+	Mathias en Bouat '34
DECAPSULATIE	Notostraca	<i>Triops granarius</i>		+	Takahashi '77
	Cladocera	<i>Daphnia magna</i> <i>pulex</i>		+ +	+ + Van de Vel '84 Pancella en Stross '63
ORGANISCHE CHEMICALIA	Anostraca	<i>Branchipus stagnalis</i>		+	Mathias en Bouat '34
CO <sub>2</sub>	Cladocera	<i>Daphnia pulex</i>		+	Stross '71
ORGANISCHE DETRITUS	Anostraca	<i>Chirocephalus bundyi</i>		+	Broch '65
ANAEROBIOSIS	Anostraca	<i>Chirocephalus bundyi</i>		+	Broch '65
	Notostraca	<i>Triops cancriformis</i>		+	Hempel-Zawitkowska '71a

ZOETWATER	Anostraca	<i>Chirocephalus diaphanus</i>	+		Hall '59a
WATERDIEPTE	Anostraca	<i>Chirocephalus bundyi</i>	0		Broch '65
		<i>diaphanus</i>	-	-	Hall '59a, '59b
		<i>Streptocephalus dichotomus</i> <i>and seali</i>	0		Moore '67; Bernice '72
<b>ROTIFERA</b>					
DROGEN	Monogononta	<i>Brachionus plicatilis</i>	+		Lubzens <i>et al.</i> '80
HIBERNATIE		<i>Asplanchna spp.</i>	+	+	Nipkow '61; Birky '64
		<i>Brachionus plicatilis</i>	-	+	Blanchot en Pourriot '82b
			+		Lubzens <i>et al.</i> '80
		<i>rubens</i>	+		Minkoff <i>et al.</i> '83 Blanchot en Pourriot '82a
LICHT		<i>Brachionus plicatilis</i>	+		Minkoff <i>et al.</i> '83; Hagiwara <i>et al.</i> '85
		<i>rubens</i>	-		Ito '60
			+		Blanchot en Pourriot '82a
OSMOTISCHE SCHOK		<i>Brachionus plicatilis</i>	+		Hagiwara <i>et al.</i> '85



Tabel 31 : Effect van diverse technieken voor ontwatering op de ontluikingskarakteristieken van *Artemia* cysten

Ras	Specifieke produktiekarakteristieken van het cystenmateriaal	Aangewende dehydratietechnieken	Ontluikingspercentage	Referentie
SFB	geproduceerd op laboschaal (90 g/l)	verzadigde NaCl-pekels gedurende 1 u	6	Versichele en Sorgeloos, 1980
		verzadigde NaCl-pekels gedurende 7 u	17	
		verzadigde NaCl-pekels gedurende 6 u	27	
		verzadigde NaCl-pekels gedurende 12 u	49	
		verzadigde NaCl-pekels gedurende 24 u	76	
		verzadigde NaCl-pekels gedurende 48 u	79	
		ovendrogen bij 30 °C gedurende 24 u	20	
		ovendrogen bij 30 °C gedurende 48 u	60	
		ovendrogen bij 40 °C gedurende 48 u	81	
	drogen over CaCl <sub>2</sub> gedurende 24 u	72		
	drogen over CaCl <sub>2</sub> gedurende 48 u	23		
LVD	rechtstreeks geoogst van het meeroppervlak (180 g/l)	NaCl-pekels	37	Godeluck, 1980
		ovendrogen bij 35 °C	41	
		wervelbed-drogen bij 35 °C	90	
ML	rechtstreeks geoogst van het meeroppervlak (90 g/l)	zonder dehydratie (bij 4 °C)	17	Dana, 1981
		verzadigde NaCl-pekels	40	
ML	geproduceerd op laboschaal (50 g/l)	1,25 M NaCl-pekels (bij 4 °C)	75	Drinkwater en Crowe, 1987
		2 M NaCl-pekels (bij 4 °C)	40	
		3,5 M NaCl-pekels (bij 4 °C)	10	
SFB	geproduceerd op laboschaal (70 g/l)	1,25 M NaCl-pekels	5	Drinkwater en Crowe, 1987
		2 M NaCl-pekels	40	
		3,5 M NaCl-pekels	75	

% ontluiking) slechts bereikt wanneer de cysten gedurende minimum 24 u in een verzadigde NaCl-pekelplossing gesuspenderd werden. Hierdoor zouden de geëncysteerde embryo's volgens Clegg (1978b) nog slechts 20 % H<sub>2</sub>O bevatten. Recent toonden Drinkwater en Crowe (1987) aan dat de grens van diapauze-inhibitie ongeveer bij een intracystair watergehalte van 35 % (2 M NaCl) ligt; dit is eveneens de waarde waarop geen vrije watermoleculen meer voorkomen in de cellen (Clegg 1978a, 1981). Verdere extractie van het water tot een waarde lager dan 10 % geeft blijkbaar geen betere diapauze-desactivering (Versichele en Sorgeloos, 1980; Godeluck, 1980) en kan zelfs tot negatieve effecten leiden bij extreme behandeling zoals drogen over CaCl<sub>2</sub> gedurende 48 u. Iwasaki (1958) en Engel en Fluke (1962) wijten dit aan een hogere gevoeligheid van de sterk ontwaterde cysten voor bijvoorbeeld stralingseffecten.

Wat de Mono Lake cysten betreft zijn de gegevens tegenstrijdig: Dana (1981) meldt een toename van de ontluikbaarheid na dehydratie in NaCl-pekkel terwijl Drinkwater en Crowe (1987) een negatieve correlatie vaststellen tussen drogingsgraad en ontluikbaarheid. Een opmerkelijk gegeven hierbij is dat ML cysten in hun biotoop (90 g/l) geen ontwateringscyclus doormaken daar ze direct bezinken (Lenz en Dana, 1987).

Tabel 31 laat tevens uitschijnen dat het type drogingstechniek interfereert met de diapauze-inhibitie. Bij een verhoogde drogingstemperatuur of gebruik van wervelbed-drogen werd door Versichele en Sorgeloos (1980) en Godeluck (1980) een significante toename genoteerd van de ontluikbaarheid met respectievelijk 20 % en 50 %. Daar beide technieken resulteren in een vlugge droging laat dit ons veronderstellen dat de snelheid waarmee water onttrokken wordt aan de cysten interfereert met het desactiveringsproces.

In tegenstelling tot de quiëscente cysten (Vanhaecke en Sorgeloos, 1982) kon Versichele (1983) geen correlatie aantonen tussen de aangewende drogingstechniek en de

ontluikingssnelheid van labo-geproduceerde SFB cysten : zowel het entmateriaal als gepekelde of ovengedroogde cysten gaven analoge ontluikingscurves.

#### Dehydratie/hydratatie-cycli

Fox (1949), Hempel-Zawitkowska (1967) en Takahashi (1977) demonstreerden dat *Triops* cysten die na een eerste droging niet ontloken wel geactiveerd konden worden door een tweede of zelfs derde dehydratie/hydratatie-cyclus (D/H). Analoge observaties worden voor *Artemia* gerapporteerd door Barigozzi (1939), Morris (1971) en Metalli en Ballardin (1972), waarbij deze zogenaamde 'delayed hatching cysts' na diverse D/H-cycli uiteindelijk ontluikingspercentages tot 70 % bereikten. Volgens Morris (1971) zijn deze cysten te onderscheiden van de 'normale' cysten aan de hand van structurele verschillen : "... cysts examined had the space between the shell and the embryo filled in most regions with rosette-like particles assumed to be glycogen". Meer recent onderzoek door de groep van Browne toonde aan dat het effect van deze diapauze-desactiveringstechniek functie is van het aantal D/H-cycli en het geografisch ras (Tabel 32). Algemeen kan gesteld worden dat *A. parthenogenetica* en *A. franciscana* slechts twee cycli nodig hebben terwijl *A. persimilis* en *A. tunisiana* tot vijf D/H-beurten vereisen. Opvallend is wel dat slechts zelden een maximale desactivering bereikt wordt.

Na twee D/H-cycli ontluiken de cysten initieel vlugger wat verklaard wordt door de cumulatieve ontwikkelingstheorie van Morris (1971). Meerdere opeenvolgende D/H-cycli kunnen echter resulteren in een negatief effect op de ontluikingssnelheid, dit vooral wanneer de behandelde cysten langdurig onder een droge vorm gestockeerd worden. Zo vonden Sorgeloos *et al.* (1976) en Vanhaecke en Sorgeloos (1982) dat voor dergelijk cystenmateriaal reeds 2 u extra incubatietijd vereist is. De snelheid van drogen zou hier opnieuw interfereren.

Tabel 32 : Effect van verschillende dehydratie/hydratatie-cycli op de ontluikbaarheid van *Artemia* cysten geproduceerd onder gecontroleerde omstandigheden

Geografisch ras	Ontluikingspercentage na 1 tot 5 opeenvolgende dehydratie/hydratatie-cycli (niet-cumulatieve ontluikingswaarden)					Cumulatieve ontluikings- percentages	Referenties
	1	2	3	4	5		
?	0	50-70	-	-	-	50-70	Morris (1971)
San Francisco Bay, V.S.A.	19	50	0	0	0	69	Browne (1980) en
Puerto Rico, V.S.A.	6	9	8	0	0	23	Browne <i>et al.</i> (1984)
Hidalgo, Argentinië	19	12	8	12	2	53	
Chott Ariana, Tunezië	2	5	2	3	2	14	
Larnaca, Cyprus	14	1	2	37	7	27	
Santa Pola, Spanje	17	4	0	0	12	33	
Tuticorin, Indië (geciteerd als Madras)	7	29	8	1	0	45	
Kutch, Indië	0	17	1	0	0	18	
Cadiz, Spanje	1	12	1	0	12	26	
Izmir, Turkije	21	0	0	0	1	22	
Macau, Brazilië	40	44	-	-	-	88	Versichele (1983)

## Hibernatie

De nood aan een koudeperiode om de diapauze te doorbreken is voor verschillende taxa aangetoond (zie tabel 30). Weaver stipuleerde reeds in 1943 dat niet-gedroogde *Eubbranchipus vernalis* cysten slechts ontloken (tot 33 %) na een geleidelijk invriezen en ontdooien. Een ander species behorend tot de Anostraca, *Chirocephalus stagnalis*, vereiste dagelijkse cycli van 3 à 18 u bij 4 °C (Nourisson, 1961). Opmerkelijk is het gegeven voor *Triops* sp. dat, alhoewel hibernatie niet essentieel is, een vriesperiode het negatief effect van een onefficiënte droging opnieuw kan herstellen (Hempel-Zawitkowska, 1971a; Takahashi, 1977). Bij *Daphnia* varieert de optimale desactiverings-temperatuur naargelang het species : voor rassen afkomstig uit gematigde klimaatzones geeft 4 °C een maximaal effect, terwijl lagere temperaturen gewenst zijn voor arctische populaties (Stross, 1971). Marcus (1979, 1980) demonstreerde een maximale én synchrone ontluiking voor cysten van de copepood *Labidocera aestiva* na een overwinteringsperiode van minimum 30 dagen bij 5 °C. Synchrone ontluiking is eveneens een frappant effect van hibernatie bij rotiferen : wanneer de cysten voorafgaandelijk gestockeerd werden bij 5 °C gedurende drie maanden onder gunstige omstandigheden wordt 50 % ontluiking bereikt in twee dagen in plaats van drie maanden (Blanchot en Pourriot, 1982b).

Ook voor *Artemia* wordt hibernatie door diverse auteurs als een bruikbare techniek aangeduid ter inhibitie van (al of niet ontwaterde) diapauze-cysten (overzicht in tabel 33).

Ondanks de heterogene resultaten kan men uit deze tabel afleiden dat stockeringsperiodes van minimum anderhalve maand bij temperaturen lager dan 5 °C een effect teweegbrengen. Enkel de (weinig gespecificieerde) verklaringen van Mason (1967) en Sorgeloos (1979) vormen hierop een uitzondering. De invloed van temperatuur en behandelingsduur op de doeltreffendheid van de techniek

Tabel 33 : Literatuuroverzicht van de aangewende (optimale) hibernatieomstandigheden als diapauze-inhibitoren voor *Artemia* cysten afkomstig van diverse oorsprong

Geografisch ras	Doeltreffende hibernatie-parameters	Referentie
Great Salt Lake, V.S.A.	7 maanden in de natuur	Rackowicz, 1975
	? bij -25 °C	Van der Haegen, 1981
	? bij -20 °C*	Karmiol, 1981
San Francisco Bay, V.S.A	? bij -20 °C	Bowen, 1963
	3 maanden bij 7,5°C	Drinkwater en Crowe, 1987
Saskatchewan, Canada	2 maanden in de natuur	Sorgeloos, 1979 Sawchyn, 1987
Chaplin Lake, Canada	? bij -25 °C	Van der Haegen, 1981
Mono Lake, V.S.A.	5 maanden bij -15 °C	Mason, 1987
	3 maanden bij -5 °C*	Dana, 1981, 1982
	3 maanden bij -4 °C*	Thunn en Starrett, 1987; Dana en Lenz, 1986
	5 maanden bij -4 °C	Drinkwater en Crowe, 1987
Lavalduc, Frankrijk	3 dagen bij -18 °C	Sorgeloos, 1979
	2 maanden bij -30 °C	Godeluck, 1980
Shivash, U.S.S.R.	40 dagen bij 2-7 °C	Voronov, 1973
	80 dagen bij -5 °C	Voronov, 1976

\* onder anoxische condities

wordt bevestigd door vergelijkende studies uitgevoerd op Mono Lake cysten : incubatietemperaturen van 10 °C of hoger enerzijds, en hibernatieperiodes korter dan 3 maand anderzijds, resulteren in een significant dalende ontluikbaarheid (Dana, 1981; Thun en Starlett, 1987) (zie ook figuur 40). Drinkwater en Crowe (1987) observeerden zelfs verschillen in ontluiking voor stockeringsperiodes tot 150 dagen. Figuur 40 onthult tevens dat de ontluikingssnelheid op een analoge wijze gecorreleerd is met de hibernatieduur.

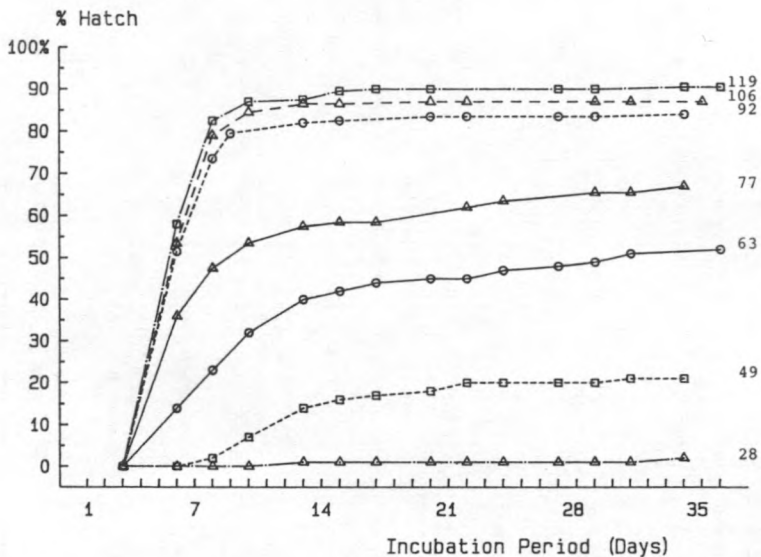


Fig. 40 : Ontluikingspercentage en -snelheid van Mono Lake *Artemia* cysten geïncubeerd bij 10 °C en 90 g/l zoutgehalte; dit in functie van diverse pre-incubatie-periodes (28, 49, 63, 77, 92, 106, 119 dagen) bij 4 °C (naar Thun en Starrett, 1987).

Daartegenover geeft Voronov (1976) aan dat temperaturen lager dan -5 °C de ontluikbaarheid van Russische cysten doen dalen en de levenskracht van de ontloken larven aantasten. Als reden voor deze mortaliteiten wordt interne

kristalvorming opgegeven. Hieruit volgt dat een derde parameter, namelijk het watergehalte in de cysten, erg belangrijk is tijdens de hibernatie. Volgens Voronov zijn waarden rond de 40 %  $H_2O$ -inhoud optimaal. Crowe *et al.* (1980, 1981) bevestigen dat intracystaire ijsvorming niet optreedt wanneer de cysten geen vrij water (<65 %  $H_2O$ ) bevatten. Voronov's bevinding dat het drogen van de cysten tot een watergehalte van 10 % geen hibernatie-effect meer kan opleveren, zou betekenen dat enkel het interstitieel water (noch vrij, noch gebonden) een rol kan spelen in het desactiveringsproces.

#### Peroxide behandeling

Reeds in 1937 rapporteerde Mathias het positief effect van een  $H_2O_2$ -behandeling voor *Artemia* cysten die normaliter niet ontloken. Recente publikaties van Bogatova en Shmakova (1980) en Bogatova en Erofeeva (1985) staven die bevinding voor pekelkreeftpopulaties afkomstig van meren in de Altai en Zwarte Zee regio. De ontluikbaarheid van gedroogde cysten nam zelfs toe van 5 % tot 90 % door ofwel de cysten gedurende een kwartier in een 3 %  $H_2O_2$  - oplossing onder te dompelen, ofwel door 30 tot 230 mg/l  $H_2O_2$  toe te voegen aan het ontluikingsmedium. In functie van de concentratie werden kleine doch significante verschillen in ontluikingspercentage én -snelheid bemerkt.

Volgens Bogatova kan het effect van peroxide-behandeling op de diapauze-desactivering als volgt verklaard worden : de aanrijking met actieve, atomaire zuurstof beïnvloedt op een gunstige wijze het oxydatie-reductie proces waarbij trehalose omgezet wordt in glycerol en glycogeen, hetwelke essentieel is voor de verdere embryogenese (Muramatsu, 1960; Emerson, 1963).

#### Behandeling met andere chemicaliën

In de literatuur zijn verschillende andere chemicaliën beschreven die het diapauze-proces blijken uit te schakelen



: de carcinogenen ethyl-N-methyl-N-nitrosocarbamaat, 1-methyl-1-nitrosureum, en ethyl-diazoacetaat (Buu-Hoi en Pham-Huu-Chanh 1970), Tween 60 of 80 (Caujolle *et al.*, 1963), en hypochloriet oplossingen (Bruggeman *et al.*, 1980; Vanhaecke en Sorgeloos, 1983). Daar dit laatste produkt eveneens gebruikt wordt om de schaal van de cysten weg te nemen, is het in feite niet duidelijk of hier sprake is van een echte diapauze-inhibitie of van een positief effect op het metabolisme tijdens de embryogenese. De verwijdering van de dikke schaalbarrière of de aantasting van het resistente, buitenste cuticulair membraan kan immers voor gevolg hebben dat het 'breaking stage' vlugger bereikt wordt omdat de interactie met het milieu sneller plaatsgrijpt of omdat er minder energie noodzakelijk is om tot ontluiking te komen. Deze hypothese vindt bewijskracht in het onderzoek bij *Daphnia* waarbij de hypochloriet-behandeling van het ephippium resulteerde in het vrijkomen van de individuele 'Dauereier' in het milieu. Daardoor ontstond een beter contact met de omgeving waaruit een gevoelige toename van ontluikingspercentage en -snelheid resulteerde (Pancella en Stross, 1963; Van De Vel, 1984).

#### Andere technieken

In de literatuur is slechts sporadisch wat informatie beschikbaar betreffende de mogelijke inwerking van de volgende behandelingen op de diapauze-toestand :

- ionenbestraling (Metalli en Ballardin, 1972);
- permanente magnetische velden van 2 000 Oersted gedurende maximum 24 u (Dolgopol'skaya *et al.*, 1969, 1970; Taneyeva en Dolgopol'skaya, 1973);
- anoxie : alhoewel hogere ontluikingscijfers genoteerd werden bij de Branchiopoden *Chirocephalus* en *Triops* (zie tabel 30), bleek dit bij *Artemia* niet in een positief effect te resulteren (Mason, 1967; Drinkwater en Crowe, 1987; Hempel-Zawitkowska, 1971b);

- CO<sub>2</sub>-behandeling : een opvallende diapauze-desactivering werd gerealiseerd bij 'Dauereier' van *Daphnia pulex* :

"... after CO<sub>2</sub> elevation ... they behaved as though CO<sub>2</sub> was the stimulus triggering activation" (Stross, 1971). Bij *Artemia* bleek de behandeling van SFB cysten gedurende 40 dagen met 20 % CO<sub>2</sub> de beste resultaten op te leveren (50 % ontluiking in plaats van 10 %); bij ML cysten werd echter geen verhoging van de ontluiking bekomen (Crowe et al., 1987; Drinkwater en Crowe, 1987). Volgens observaties van Newman (persoonlijke mededeling, 1987), resulteerde een 'gewone' zuurbehandeling van SFB cysten in hogere ontluikingswaarden;

- belichting : Vanhaecke et al. (1981) demonstreerden een toename in ontluikbaarheid van Chaplin Lake cysten wanneer de lichtintensiteit verhoogd werd tot 1 000 lux. Doordat Belk (1972) onthulde dat de lichtstimulus niet essentieel is indien de cysten van *Eulimnadia antlei* op een goede manier gedroogd zijn, veronderstelden Vanhaecke en medewerkers dan ook dat "... the light effect on cyst hatching in branchiopods could be a diapauze inhibitor rather than a trigger of hatching metabolism". Uit recent onderzoek concludeerden Van der Linden et al. (1988) eveneens dat "... these cysts, which do not hatch in darkness because of deprivation of light activation are still in diapause. A short period of illumination is the only physical treatment necessary to break dormancy". Zij baseerden zich hierbij hoofdzakelijk op het irreversibel karakter van zowel het diapauze-proces als het licht-effect. Toch zijn er enkele gegevens in de literatuur die niet overeenstemmen met deze beweringen als zou belichting een desactivering van de diapauze veroorzaken :

+ Volgens Sorgeloos et al. (1976) is het belichtingsproces wel degelijk reversibel : SFB cysten, in

gehydrateerde toestand belicht, nadien gedroogd en gestockeerd gedurende enkele weken, gaven opnieuw significant lagere ontluikingscijfers in duisternis dan onder lichtomstandigheden. Bij *Daphnia* kan de activering via wit licht eveneens teniet gedaan worden door ze te bestralen met blauw licht (Davison en Stross, 1986);

- + licht schijnt niet gesubstitueerd te kunnen worden door een andere diapauze-inhibitor (b.v. drogen); dit veronderstelt dat desactivering steeds tweeledig moet zijn zoals opgegeven voor *Daphnia* door Stross in 1971 (een inhibitor voor de 'photorefractory phase' en licht als inhibitor voor de daaropvolgende 'photosensitive phase'). In de literatuur zijn slechts twee uitzonderingen bekend waarbij een andere desactiveringstechniek licht kan substitueren : hibernatie heft namelijk de noodzaak op voor licht bij CHL en ML cysten (respectievelijk Van der Haegen, 1981 en Dana, 1982). Mogelijk kunnen in deze gevallen lichtquanta de cysten toch bereikt hebben tijdens de specifieke behandelingen;

Gezien deze argumentatie leunen we eerder aan bij de hypothese waarin licht als een ontluikingsconditie voor quiëscence cysten aanzien wordt. Wij geven dan ook de voorkeur om dit onderwerp in detail te behandelen onder het hoofdstuk ontluikingscondities in plaats van bij de diapauze-desactiveringstechnieken.

#### c. Effect van het milieu op quiëscence cysten

In de eerste plaats dient vermeld te worden dat anhydrobiotische cysten (dit is de meest voorkomende vorm van quiëscence bij *Artemia* en tevens de meest bestudeerde) een uitgesproken resistentie vertonen ten opzichte van extreme omgevingscondities.

Droge cysten schijnen geen onderste limiet voor temperatuurtolerantie te kennen : incubatie bij  $-190^{\circ}\text{C}$  gedurende 24 u (Whitaker, 1940),  $-271^{\circ}\text{C}$  gedurende 2 u (Iwasaki, 1973) of gedurende 6 dagen onder verlaagde druk (Skoultchi en Morowitz, 1964) had geen daling van de leefbaarheid tot gevolg. Wat de hoge temperaturen betreft, blijven de geëncysteerde embryo's leefbaar tot  $80^{\circ}\text{C}$  (Mathias, 1929, 1932; Dutrieu, 1960); Hinton (1954, 1968) stelde vast dat vanaf  $90$  à  $100^{\circ}\text{C}$  het ontluikingspercentage omgekeerd evenredig is met de duur der verhitting. Gedetailleerde studies van Iwasaki (in Clegg en Conte, 1980) leverden analoge resultaten op : als kritische temperatuurgrens werd  $60$  à  $70^{\circ}\text{C}$  opgegeven voor incubatieperiodes van 5 à 9 u. Vacuumcondities schijnen evenmin de leefbaarheid aan te tasten : waarden tot  $9 \times 10^{-7}$  Torr gedurende 38 u veroorzaakten geen daling van de ontluikbaarheid (Whitaker 1940; Iwasaki, 1973; Gaubin-Blanquet *et al.*, 1976; Clegg *et al.*, 1978).

Tazawa en Iwanami (1974), Iwanami *et al.* (1975) en Smith en Siegel (1975) stelden geen invloed vast van de blootstelling aan diverse, organische solventen op de leefbaarheid der embryo's. Enkel methanol bleek toxisch. Deze uiterst geringe gevoeligheid is volgens Morris en Afzelius (1967) te wijten aan de selectieve doorlaatbaarheid van het buitenste cuticulair membraan.

Diverse studies naar de tolerantie van droge cysten tegenover verschillende bestralingsbehandelingen wijzen opnieuw op een unieke vorm van resistentie (overzicht van Metalli en Ballardin, 1972; Iwasaki, 1973; Planel *et al.*, 1975; 1980; Gaubin *et al.*, 1980). Cysten met heel geringe watergehaltes schijnen echter, net als gehydrateerde, veel gevoeliger te zijn (Engel en Fluke, 1962).

In feite geldt in alle opgegeven gevallen dat de resistentie gradueel daalt met hogere, intracystaire watergehaltes. Hieruit volgt dat de wijze waarop *Artemia* cysten geoogst worden in hun natuurlijke vindplaatsen, en hun verdere verwerking (zuiveren, drogen en verpakken) een belangrijke invloed kunnen hebben op de leefbaarheid van de

Tabel 34 : Mogelijke effecten van exploitatie-omstandigheden op de ontluikingskwaliteit van *Artemia* cysten

Exploitatiestap en/of -techniek		Mogelijke effecten
Afoogsten	Van het meeroppervlak + op regelmatige tijdstippen	dehydratiegraad van de diapauze- (of reeds quiescente) cysten is bepaald door de saliniteit van het vijverbiotoop
	+ op onregelmatige tijdstippen	- risico van blootstelling aan dehydratie/ hydratiecycli t.g.v. regenval of saliniteits-fluctuaties in het biotoop - risico voor menging met cysten die tijdelijk aangespoeld waren op de oevers
	Vanop de oevers	- (complete) voorafgaandelijke dehydratie - risico voor rehydratie (regenval, luchtvochtigheid) en rehydratie/ dehydratie-cycli - risico van blootstelling aan hoge temperaturen (> 40 °C) in de zon - risico van blootstelling aan U.V.-straling
Stockeren	In het vijverwater	geen effect wanneer het zoutgehalte niet verandert; effecten op lange termijn niet gekend
	In verzadigde NaCl-pekels Als nat-droog produkt	ontwatering tot ± 20 % watergehalte watergehaltes tussen 20 en 35 %

Zuiveren	In verzadigde NaCl-pekkel of in zout/glycerine-oplossing In zoetwater	ontwatering tot $\pm$ 20% watergehalte vlotte rehydratatie (60 % H <sub>2</sub> O-gehalte na 15 min bij 20 °C)
	Eventueel verschillende cycli	dehydratie/rehydratatie cycli
Drogen	Diverse technieken	- variërende dehydratie-snelheden en finale dehydratie-graden - mogelijke blootstelling aan hoge temperaturen of U.V.-straling
Stockeren	Diverse technieken	watergehalte in cysten en blootstelling aan O <sub>2</sub> bepaalt invloed stockeringsduur op ontluikingskwaliteit

---

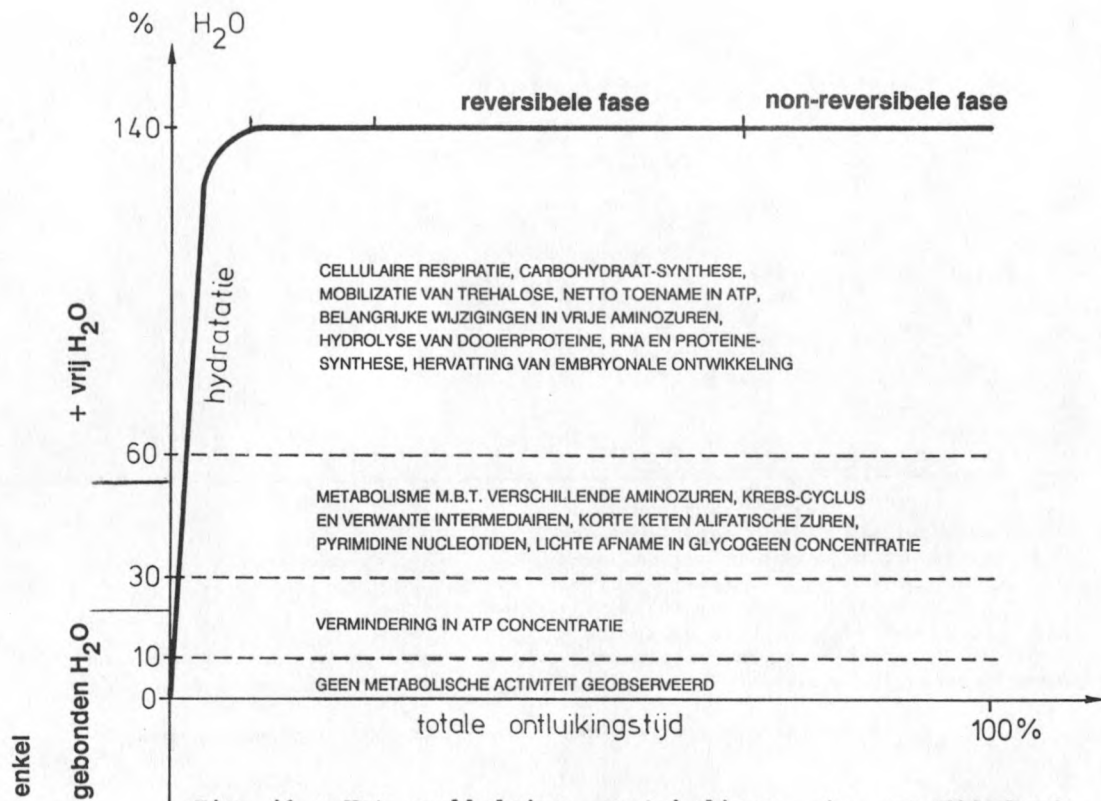


Fig. 41 : Het cellulaire metabolisme in ontwikkelende *Artemia* cysten in functie van hydratatiegraad.

embryo's. Verschillende verwerkingstechnieken zijn in detail beschreven door Dempster (1946a, b), Helfrich (1973), Sorgeloos et al. (1976, 1986), Sorgeloos (1979) en Godeluck (1980). Tabel 34 illustreert de mogelijke effecten van deze exploitatie-omstandigheden. Hieruit blijkt dat de effecten meestal te herleiden zijn tot dehydratie, hydratatie of D/H-cycli. Teneinde de invloed hiervan op quiëscente cysten beter te kunnen evalueren is in figuur 41 de metabolische activiteit van *Artemia* cysten grafisch uitgezet in functie van het watergehalte in de cysten. Samenvattend kunnen we uit al deze gegevens het volgende afleiden :

- cysten die gedurende lange tijd blootgesteld zijn aan watergehaltes hoger dan 65 % zullen hun 'pre-emergence development' beeïndigd hebben waardoor een eventuele ontwatering niet meer resulteert in een reversibele onderbreking van het ontluikingsmetabolisme (Morris, 1971; Olson, 1979), maar in een hoge mortaliteit onder de reeds gedifferentieerde embryo's (De Chaffoy et al., 1977);
- intracystaire watergehaltes van 30 tot 65 %, bekomen door het onvoldoende drogen of rehydrateren der cysten, veroorzaken metabolische activiteiten die de energiereserves uitputten. Eenmaal de kritische grens bereikt, kan de embryonale ontwikkeling bij optimale ontluikingsomstandigheden niet meer voltooid worden;
- analoge effecten zijn het resultaat van periodische D/H-cycli (Rakowicz, 1975; Vanhaecke en Sorgeloos, 1982). Langdurige bewaring van dergelijk materiaal vernietigt tevens het cumulatief effect op de ontwikkeling (Morris, 1971);
- De ontluikingskwaliteit vermindert geleidelijk wanneer de watergehaltes in de cysten 10 à 35 % bedragen. Clegg en Cavagnaro (1976) vonden indicaties van enzyme-activiteit en een sterke daling van de ATP con-



centratie. Deze processen kunnen vertraagd worden wanneer de cysten bij lage temperaturen gestockeerd worden (Vanhaecke en Sorgeloos, 1982). Bij bewaring in té vochtige omstandigheden kunnen zich bovendien ascomyceten (*Penicillium* en *Aspergillus*) ontwikkelen die doorheen de schaal het embryo binnendringen en mortaliteit veroorzaken (Oleynikova, 1973). In de literatuur wordt niet gespecificeerd vanaf welk watergehalte geen negatieve effecten meer optreden;

- Embryo's die voldoende gedroogd zijn (<10 % H<sub>2</sub>O) behouden hun leefbaarheid gedurende lange periodes (jaren) zolang ze niet in contact komen met zuurstof : dit wil zeggen bij bewaring onder vacuüm of stikstof (Dempster en Hanna, 1956; Dempster, 1958; Clegg, 1962, 1967; Vanhaecke en Sorgeloos, 1982). Volgens Crowe (1971) en Crowe en Clegg (1973) veroorzaakt O<sub>2</sub> de vorming van schadelijke, vrije radicalen en is de verminderde leefbaarheid niet het gevolg van een daling van de energie-inhoud zoals gepostuleerd door Clegg (1962).

Dat anhydrobiotische *Artemia* cysten uitzonderlijk lange bewaarperiodes kunnen doorstaan zonder hun leefbaarheid volledig te verliezen, hebben we kunnen bevestigen : 1900 jaar oude cysten afkomstig uit sedimenten van het 'Great Salt Lake' bleken nog steeds leefbare embryo's te bevatten (Sorgeloos et al., 1989). Naar ons weten is dit zelfs uniek binnen de dierenwereld !

Een tweede, belangrijke reeks effecten van het milieu op quiescente cysten zijn de condities die het ontluikingsproces kunnen laten starten. Om de inwerking van deze abiotische parameters te verklaren, is een goed inzicht vereist in de metabolische processen die zich afspelen tijdens de ontwikkeling van de gastrula tot nauplius (zie ook het overzichtswerk van Clegg en Conte, 1980) : Muramatsu (1960) en Emerson (1963) stipuleren dat in eerste instantie het carbohydraatmetabolisme geactiveerd wordt

indien zuurstof aanwezig is. De koolhydraatreserve, vooral bestaande uit trehalose (Dutrieu, 1959; Clegg, 1962), wordt omgezet in glycogeen en glycerol. Het trehalose heeft een protectieve functie in anhydrobiotische cysten : "this molecule appears to be capable of replacing water around polar residues in membrane phospholipids and proteins and thereby to maintain the membrane in a fluid state..." (Crowe et al., 1987). Het glycogeen levert energie voor de respiratie (Clegg, 1962; Boulton en Huggins, 1977) terwijl de accumulatie van glycerol leidt tot een stijging van de intracystaire osmotische druk (Clegg, 1962, 1964, 1967). Bij een kritisch verschil met de buitendruk resulteert dit in het openbarsten van de embryonale cuticula en schaal (= "breaking" : Morris en Afzelius, 1967). Volgens Funke en Spindler (1987) zijn hier echter ook twee chitinyolytische enzymen werkzaam. Het embryo differentieert verder tot een instar I-nauplius binnenin een "hatching membrane". Door inwerking van het ontluikingsenzyme dat ter hoogte van de kopstreek gesecreteerd wordt (Sato, 1967), wordt dit membraan doorbroken waarop de vrijzwemmende larve vrijkomt.

Als gevolg van rasspecifieke adaptaties aan het lokale biotoop kunnen de interacties van de ontluikingsparameters variëren van ras tot ras waardoor de ontluikingsoptima eveneens kunnen verschillen.

#### Prehydratatie

Spectorova en Syomik (1979) observeerden een optimale ontluiking wanneer de cysten gedurende 5 u in zoetwater (voor het ras afkomstig van de Kaspische Zee) of in zee-water van 17 g/l zoutgehalte (voor SFB en van de Krim *Artemia*) geprehydrateerd werden. Dit wordt bevestigd door Castritsi-Catharios et al. (1983) die na 24 u pre-incubatie in een milieu met een relatieve vochtigheid van 95 %, een maximale ontluiking waarnamen. Een verklaring voor dit fenomeen is niet gekend. Misschien hebben we hier te maken met onnauwkeurige observaties, bijvoorbeeld wanneer het aantal vrijgekomen larven bepaald werd vooraleer de

ontluiking beëindigd was : een vluggere ontluiking ten gevolge van prehydratatie kan bijgevolg de oorzaak zijn van de opgemerkte verschillen.

#### Zoutgehalte

De kwalitatieve ionensamenstelling van het incubatiemedium kan interfereren met :

- de tolerantiegebieden van het embryo voor bepaalde ionen ( $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ) en voor zware metalen (Sato, 1966b; Saliba en Krzyz, 1976; Bagshaw *et al.*, 1986; Rafiee *et al.*, 1986). Een relatieve toxiciteitsreeks voor zware metalen is opgesteld door Liu en Chen (1986);
- de osmotische capaciteit van de uitsluipende pre-nauplius (Conte *et al.*, 1977; Trotman *et al.*, 1987);
- de activiteit van het 'hatching'-enzyme (Sato, 1966a, b, 1967). Volgens Sato wordt dit enzyme geïnhibeerd door  $Fe^{++}$  of  $Cu^{++}$ ; dit kan echter voorkomen worden door toevoeging van  $HCO_3^-$  of chelaterende produkten. Trotman *et al.* (1987) trekken deze bewering evenwel in twijfel en suggereren dat  $HCO_3^-$  rechtstreeks inwerkt op het osmotisch mechanisme. Geen enkel ander ion, uitgezonderd  $Na^+$  en  $Cl^-$ , zou verder interfereren met het ontluikingsproces, alhoewel Sato (1966a) toch een activerend effect van het 'hatching'-enzyme toekent aan  $Ca^{++}$ .

Kwantitatieve effecten van de saliniteit van het incubatiemedium op de ontluiking staan in de eerste plaats in verband met de maximale hydratatiegraad die bereikt kan worden : boven een bepaalde drempelwaarde wordt onvoldoende water opgenomen door de cyste zodat het ontluikingsmetabolisme niet kan starten. Deze drempelwaarde blijkt te variëren volgens het *Artemia* ras. Voor de meeste populaties is 85-90 g/l de maximum saliniteit waarbij ontluiking nog mogelijk is : GSL (D'Agostino, 1965; Von Hentig, 1971), SFB

(Jennings en Whitaker, 1941; Sorgeloos, 1975b), Bonaire (Kristensen en Hulscher-Emeis, 1972), LVD (Sorgeloos, 1979), Kiatuthlana Green and Red Ponds (Cole en Whiteside, 1965), Shivash Lake (Voronov, 1971). Lake Ontario en Mono Lake *Artemia* ontluiken nog bij nog hogere zoutgehaltes : respectievelijk hoger dan 95 g/l (Ivanovskii *et al.*, 1981) en van 125 tot 190 g/l (Dana, 1981; Thun en Starrett, 1987). Lagere waarden daarentegen werden vastgesteld voor rassen uit Tuticorin (75 g/l : Royan, 1975), Penley Lake en Jesse Lake (58, respectievelijk 32 g/l : Collins, 1977), en Korea (32 g/l : Hyung-Sun Kim, 1987).

Daarnaast interfereert de incubatiesaliniteit met de vereiste hoeveelheid glycerol om de kritische hyperosmotische, intracystaire druk te bereiken. Dit impliceert dat de ontluikingssnelheid zal stijgen bij lage zoutgehaltes daar het 'breaking'-stadium vlugger kan optreden. De bekomen waarden van Jennings en Whitaker (1941) en Voronov (1971) staven deze hypothese. Bij rassen met onvoldoende carbohydraat-reserves is het zelfs mogelijk dat enkel de lage zoutgehaltes maximale ontluiking geven : <40 g/l voor Mono Lake (Dana 1981), 25-40 g/l voor Spaanse cysten (Sarasquete, 1981), 5-15 g/l voor Chaplin Lake (Kurata, 1967; Smith, 1969; Provenzano en Goy, 1976; Vanhaecke en Sorgeloos, 1983), en 5 g/l voor Buenos Aires (Vanhaecke en Sorgeloos, 1983). Bij incubatie in sulfaat-media ontluiken Chaplin Lake cysten bij andere saliniteitsoptima (Provenzano en Goy, 1976; Vanhaecke, 1983, Sawchyn, 1987); dit is te wijten aan kwantitatieve osmotische verschillen en niet aan kwalitatieve verschillen (Vanhaecke, 1983) : een 35 g/l  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  oplossing heeft namelijk een lagere osmotische waarde dan een 35 g/l NaCl medium (Weast, 1973) waardoor enkel dit laatste medium verdund dient te worden om optimale ontluiking te garanderen.

De daling in ontluiking bij lage zoutgehaltes (<25 g/l zoals gerapporteerd door Cardenas (1977) voor Venezolaanse cysten is wellicht te wijten aan een gebrekkige buffering van het incubatiemilieu (pH daling : zie verder).

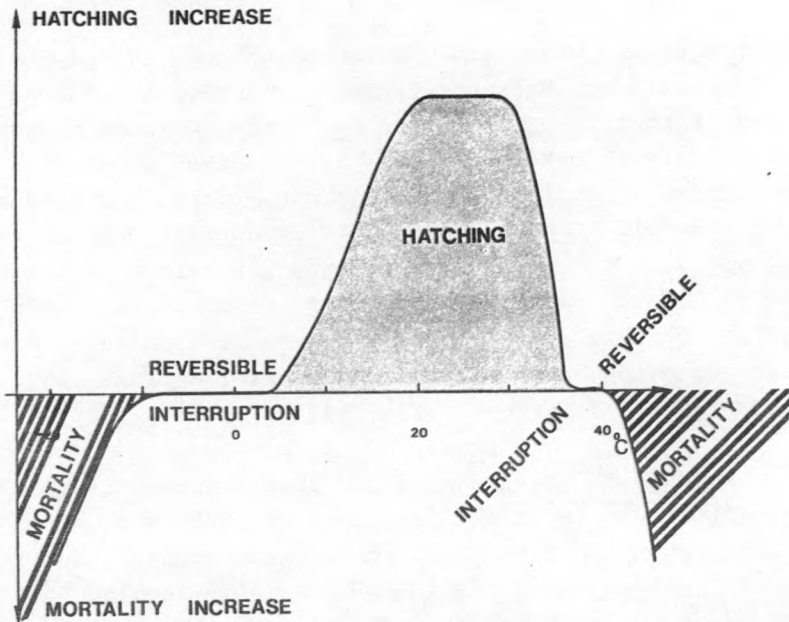


Fig. 42 : Schematisch overzicht van de relatie tussen incubatietemperatuur en ontluikingskarakteristieken van *Artemia* cysten. (Y-as geeft enkel relatieve ontluikingseenheden)

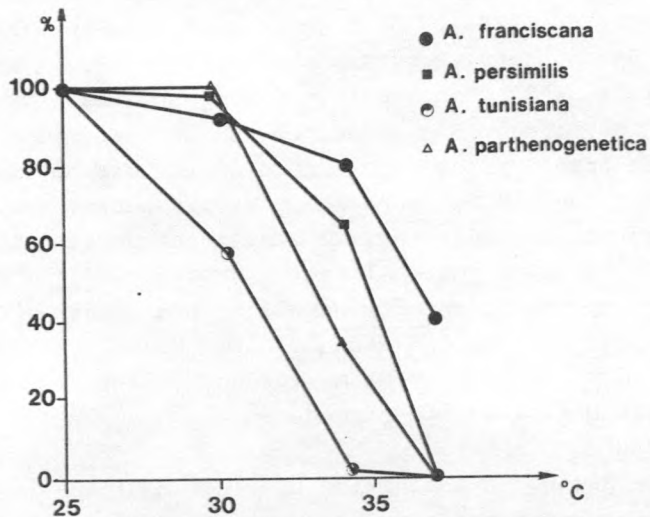


Fig. 43 : Ontluikingspercentage van *Artemia* cysten in functie van incubatietemperatuur en 'sibling species'.

## Temperatuur

De effecten van de temperatuur op de ontlukbaarheid van *Artemia* cysten zijn schematisch weergegeven in figuur 42. Gehydrateerde *Artemia* embryo's weerstaan niet aan temperaturen lager dan  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  à  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$  of hoger dan  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (respectievelijk Hempel-Zawitkowska, 1971b en Voronov 1974). Verder kan de metabolische activiteit tijdens de vroege ontwikkeling reversibel stilgelegd worden in de temperatuursintervallen  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  tot  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Iwasaki, 1964; Iwasaki en Nakanishi, 1966; Sarasquete, 1981) en  $33-37\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Sorgeloos, 1975b; Sarasquete, 1981; Vanhaecke, 1983). Dit fenomeen schijnt te worden gecontroleerd door de moleculaire sensor cytochrom oxidase waarvan het activiteitspatroon op een analoge wijze beïnvloed wordt door deze temperaturen (Vallejo *et al.*, 1980). Von Hentig (1971) gaf als optimale temperaturen waarbij ontluking optreedt het interval  $15-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  op. Beperkttere gebieden werden vastgelegd door Jones (1972), Sorgeloos (1975b), Sarasquete (1981) en Ivanovskii *et al.* (1981) (respectievelijk  $20-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $20-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $20-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  en  $26-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Dana (1981) bestudeerde vier *Artemia* populaties en stelde vast dat grote variaties kunnen optreden in temperatuuroptima:  $15-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  voor SFB,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  voor Salt Island (Hawaii, V.S.A.),  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  voor Fallon Ponds (V.S.A.) en  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  voor Mono Lake. Experimenten uitgevoerd door Vanhaecke (1983) op cysten van diverse geografische oorsprong (in totaal 17 rassen) onthulden een gelijkaardig optimaal temperatuursgebied van  $25-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  voor de meeste rassen. Uitzonderingen hierop waren Larnaca en Chaplin Lake cysten die respectievelijk een 65 % en 30 % lagere ontluking gaven bij  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en Tuticorin *Artemia* die significant beter ontloken (+30 %) bij deze temperatuur ten opzichte van  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dit laatste gegeven bevestigt de resultaten van Royan (1975). De ontlukingssnelheid blijft binnen deze intervallen wel temperatuursafhankelijk: vluggere ontluking treedt op bij hogere temperaturen, wat opnieuw verklaard kan worden door het 'trehalose-glycerol hyperosmotic regulatory system' (Sorgeloos, 1979).

Vanhaecke (1983) kon verder aantonen dat de tolerantie ten overstaan van hoge temperaturen specifiek is voor elk 'sibling species'. Zoals blijkt uit figuur 43 is de proportionele daling van de ontluijing bij 35 °C klein bij *A. franciscana* en *A. persimilis*, maar drastisch bij *A. parthenogenetica* en *A. tunisiana*. Er kon geen correlatie vastgelegd worden tussen deze tolerantieverschillen en de specifieke temperatuurregimes in de natuurlijke biotopen van *Artemia*.

#### Zuurtegraad of pH

Maximale ontluijingsefficiënties worden bereikt in een medium met een alkalische pH van 8 tot 8,5 (Jennings en Whitaker, 1941; Nimura, 1968; Jones, 1972; Metalli en Ballardin, 1972). Sato (1967) correleerde deze bevinding met het pH optimum (8-9) van het 'hatching-enzym' (het enzyme dat het gedifferentieerde, cuticulair membraan aantast zodat de nauplius zich kan bevrijden). Opmerkelijk is wel dat Hyung-Sun Kim (1987) nog steeds een maximale ontluijing noteerde bij incubatie van uit de natuur geogste Korea cysten in zeewater met pH 5; dit terwijl materiaal van eenzelfde oorsprong maar geproduceerd onder labo-omstandigheden deze 'uitzonderlijke' capaciteit niet meer had. Daarenboven merkte deze onderzoeker op dat een pH van 10 de tolerantiedrempel voor saliniteit verlaagt.

De verbeterde ontluijing na toevoeging van  $\text{NaHCO}_3$  aan artificiële of verdunde zeewaters wordt door diverse auteurs toegeschreven aan de bufferende werking van het bicarbonaat dat voorkomt dat de pH onder invloed van het cystenmetabolisme snel daalt tot waarden lager dan 7,5 (Jones, 1972; Rogers en Johnston, 1977; Sorgeloos *et al.*, 1983). Volgens Trotman *et al.* (1987) heeft de toevoeging van bicarbonaat echter een rechtstreeks effect op het osmotisch mechanisme.

### Zuurstofgehalte

Alhoewel algemeen aanvaard wordt dat zuurstof essentieel is voor de embryonale ontwikkeling, bevat de literatuur toch weinig gegevens omtrent de precies vereiste partiële zuurstofdruk. Kurata beschreef in 1967 een lineair effect op het ontluikingspercentage, terwijl Nimura (1968) en Sorgeloos en Persoone (1975) dit beaamden voor het interval 0,6 - 2 mg/l O<sub>2</sub>. Boven deze waarde wordt maximale ontluiking verkregen. De minimum vereiste concentratie aan zuurstof blijkt dezelfde te zijn voor het ontwikkelingsmetabolisme van de anostrac *Chirocephalus seali* (Moore, 1963, 1967) en de conchostrac *Limnadia stanleyana* (Bishop, 1967).

### Densiteit aan cysten

Deze factor interfereert slechts indirect met het ontluikingsproces via inwerking op abiotische factoren zoals belichting, zuurstofgehalte en/of pH. Indien deze parameters optimaal gehouden worden zal het ontluikingsproces niet beïnvloed worden door hoge (tot 17 g/l) cystendensiteiten (Kurata, 1967; Sorgeloos, 1975b).

### Belichting

Ontluikingstesten uitgevoerd bij de cladoceren *Daphnia* en *Pleuroxus* en de conchostrac *Limnadia* gaven de eerste indicaties dat licht een essentiële ontluikingsparameter is (respectievelijk Pancella en Stross, 1963, Shan, 1970 en Bishop, 1967). Voor *Artemia* werd het belang van licht voor de eerste maal aangetoond door Sorgeloos (1973b) : in vergelijking met controles in volledige duisternis bereikten cysten van San Francisco Bay, Great Salt Lake en Bulgarije tot 50 % hogere ontluikingswaarden onder lichtomstandigheden. Dit fotoquiëscentie-fenomeen werd bevestigd voor diverse rassen : SFB (Meade, 1976; Spectorova en Syomik, 1979; Van der Haegen, 1981; Van der Linden et al., 1988), Tuticorin (Royan, 1976), Larnaca (Person-Le Ruyet en



Salaun, 1977); Kaspische Zee en Krim (Spectorova en Syomik, 1979), Spanje (Sarasquete, 1981), Korea (Hyung-Sun Kim, 1987), en GSL (Van der Linden *et al.*, 1988). Toch konden steeds een gedeelte van de embryo's volledig ontwikkelen in duisternis. Ook blijkt uit enkele referenties dat bepaalde cystencollecties van SFB, LVD (Fuchs, 1976) of GSL (Van der Haegen, 1981) absoluut niet fotosensitief waren. Volgens Sorgeloos (1973b) demonstreerde dit dat cysten "...in some way respond to an anteriorly received light stimulus...". Uitgebreide belichtingsproeven op *Daphnia ephippia* bevestigden de thesissen waarbij licht gestockeerd kan worden in de eieren tot ontluikingsomstandigheden optimaal zijn (Stross, 1971).

*Artemia* cysten zijn gevoelig voor licht vanaf het ogenblik dat zij onder aërobe omstandigheden volledig gehydrateerd zijn (Sorgeloos en Persoone, 1975). Het precieze ogenblik waarop de lichtstimulus essentieel is, werd tot op heden niet achterhaald: Van der Linden (1988) geeft wel aan dat het metabolisme niet start vooraleer de embryo's belicht zijn. Bij *Daphnia* blijken twee sensitiviteitsperiodes te bestaan namelijk bij de start en  $\pm 14$  u na incubatie, wat in relatie lijkt met de thermocyclus van natuurlijke biotopen (Stross, 1971). Ook Sorgeloos en Persoone (1975) en Sorgeloos *et al.* (1976) konden aantonen dat een minimale dosis aan lichtenergie vereist is om de embryonale ontwikkeling te vervolledigen. Takahishi (1975) bevestigde dit tevens voor *Triops*. 'Dose-response' gegevens van Van der Linden *et al.* (1985) confirmeerden de relatie tussen lichtintensiteit en blootstellingsduur enerzijds en ontluikingsefficiëntie anderzijds: nauplius-ontwikkeling bij SFB vereist ongeveer  $21\ 600\ \mu\text{E}/\text{m}^2$ . Deze waarden kunnen echter variëren van ras tot ras: Chaplin Lake cysten bijvoorbeeld ontluiken slechts bij een continue belichting van minstens 1 000 lux (Spectorova en Syomik, 1979; Vanhaecke *et al.*, 1981; Hyung-Sun Kim, 1987). Daarenboven kan de ontluikingssnelheid van de cysten afhankelijk zijn van de lichtintensiteit: de accumulatieperiode die nodig is om de specifieke drempelwaarde te bereiken kan immers verschil-

lend zijn. De rasverschillen kunnen veroorzaakt worden door de dikte van de schaal of het gehalte aan geïmpregneerde hematine, die de lichtinfiltratie kunnen vertragen (Hempel-Zawitkowska, 1970; Vanhaecke *et al.*, 1981; Van der Linden *et al.*, 1987). Dit wordt bevestigd door de waarneming van Vanhaecke *et al.* (1981) dat na decapsulatie de drempelwaarde voor lichtintensiteit bij San Pablo Bay cysten verlaagd werd van 100-500 lux tot 20-100 lux. Aan de hand van gedetailleerde studies demonstreerden Van der Linden *et al.* (1985, 1987) dat de meest effectieve belichting gebeurt bij golflengtes tussen 400 en 600 nm en dat een hemopigment, gelokaliseerd in de gastrula, als fotoreceptor optreedt.

## V.2.2. Materiaal en methoden

### 1. Onderzochte cystenmonsters

In de mate van het mogelijke werd steeds gebruik gemaakt van de cysten geproduceerd in het kweeklabo onder gecontroleerde omstandigheden (opsomming in tabel 28, zie ook onder V.1.1.). De stockeringscondities gedurende de proeven zijn terug te vinden in hoofdstuk IV.3.4. Ter confirmatie van bepaalde resultaten en voor specifieke onderzoekspunten waren echter grotere hoeveelheden cysten vereist. In deze gevallen werden cystenmonsters afkomstig uit extensieve produktiesystemen of natuurlijke biotopen geselecteerd. De selectie vond plaats op basis van :

- de beschikbaarheid van voldoende informatie met betrekking tot produktie-omstandigheden;
- de uitgevoerde behandeling voor afoogsting, zuivering en stockering.

Een gedetailleerde lijst van deze cystenmonsters is opgenomen in tabel 35. Meer informatie omtrent specifieke produktiekarakteristieken wordt bij de individuele experimenten vermeld.

### 2. Specifieke behandelingen

#### Dehydratie/hydratatie-cycli

De eerste dehydratie vond plaats tijdens de zuivering en de verwerking van de geproduceerde cysten (zie IV.3.4.). De daarop volgende ontwateringen gebeurden door de cysten af te zeven en te drogen gedurende 24 u bij 35 °C. De hydratatiestappen waren analoog met de normale incubatie-procedure voor ontluiking (zie V.1.4.) maar duurden slechts 3 u. Deze werden onmiddellijk gevolgd door een dehydratie.

Tabel 35 : Lijst en specificaties van de onderzochte *Artemia* cystenmonsters, geoogst uit (semi-) natuurlijke biotopen

Geografische oorsprong	oogstjaar	Specificaties	Code
Malindi, Kenya	1985	Vijverproductie van SFB <i>Artemia</i> bij 85 g/l zoutgehalte; onbehandeld	MAL 1
Malindi, Kenya	1985	Vijverproductie van SFB <i>Artemia</i> bij 155 g/l zoutgehalte; onbehandeld	MAL 2
Kazakstan, U.S.S.R.	1986	Productie in natuurlijk biotoop; gezuiverde en gedroogde cysten; endemisch ras	KAZ
Vung Tau, Vietnam	1986	Vijverproductie van GSL bij 105 g/l zoutgehalte; gezuiverde en gedroogde cysten	VT
Piura, Peru	1987	vijverproductie bij 60 g/l zoutgehalte; onbehandelde cysten; endemisch ras	PIU
San Francisco Bay, V.S.A.	1987	productie in natuurlijk biotoop onbehandelde cysten; endemisch ras	SFB

## Stockering bij verschillende temperaturen

Cysten, gestockeerd in afgesloten penicillineflesjes, werden voor bepaalde periodes in de koelkast (4 °C) of in diepvriezers (-25 °C of -80 °C) gebracht of in een vat met vloeibare stikstof gedompeld (-196 °C). Na hibernatie werden de cysten geacclimatiseerd gedurende één week bij kamertemperatuur alvorens het ontluikingspercentage te bepalen.

## Stockering onder anoxische omstandigheden

Vooraleer de cysten in anoxische omstandigheden te brengen, werden ze gedesinfecteerd in een 0,2 mg/l NaOCl-oplossing gedurende 1 u en vervolgens gewassen met geautoclaveerd, gedestilleerd water. De cysten werden in penicillineflesjes, gevuld met artificieel zeewater (35 g/l), gebracht. De recipiënten werden vervolgens gedurende 1 u doorborreld met stikstofgas teneinde de anoxische voorwaarden te bekomen, hermetisch afgesloten en gestockeerd bij kamertemperatuur en duisternis gedurende drie maanden.

Behandeling met  $H_2O_2$ , NaOCl of  $KMnO_4$ 

Tenzij anders vermeld, werden de cysten eerst gehydrateerd gedurende 2 u. Na deze periode werd het medium vervangen door een  $H_2O_2$ -oplossing terwijl de andere parameters niet varieerden. Na de behandeling werden de cysten afgezeefd, grondig gespoeld met water en opnieuw geïncubeerd voor verdere ontluiking. Voor NaOCl en  $KMnO_4$  werd dezelfde methode toegepast. De incubatieconcentraties en -periodes zijn voor elk experiment vermeld bij de resultaten.

In eerste instantie werd het peroxide gekocht in een apotheek. Door de variabele resultaten werd later overgestapt op het geconcentreerde produkt afkomstig van UCB (N° 6171). We bewaarden het peroxide steeds in het donker en

bij 4 °C. Regelmatig werden concentratiebepalingen uitgevoerd volgens de analysemethoden beschreven in de Europese Farmacopee (1969).

#### U.V.- of ozonbehandeling

De U.V.-behandeling gebeurde door de cysten in een dunne laag op 20 cm afstand onder een U.V.-lamp van 30 Watt te plaatsen.

Voor de ozonbehandeling werden de cysten geïncubeerd onder standaardomstandigheden, maar werd de luchtdoorborreling vervangen door een doorborreling met O<sub>3</sub>-gas afkomstig van een kleine ozonisator (Eheim) met een capaciteit van 50 mg O<sub>3</sub> per uur.

### *3. Bepaling van het ontluikingspercentage*

De bepaling van de ontluikbaarheid van cysten werd volgens twee verschillende methodes uitgevoerd. De eerste en meest gebruikte techniek vereist dat het geïncubeerde cystenmateriaal geen lege cysteschalen bevat; met andere woorden het monster moet vooraf gezuiverd zijn (volgens de methode beschreven onder IV.3.4.). Indien echter de zuiveringsprocedure de onderzoeksresultaten kan beïnvloeden (b.v. via extra dehydratie/hydratatie) werd de tweede methode toegepast, waarbij lege cysten niet interferen met de bepaling.

#### 1° methode

Ongeveer 250 mg volle cysten worden samen met 100 ml zeewater (35 g/l) in een cilindroconische buis gebracht zoals beschreven onder V.1.4. Na 2 u hydratatie worden met een automatisch micropipet 10 monsters van 100 à 150 embryo's genomen en op een filtreerpapiertje gebracht. Na de exacte telling onder een dissectiemicroscoop worden de cysten met 10 ml geaëreerd zeewater (35 g/l zoutgehalte) overgespoeld in glazen petriplaatjes en vervolgens in een

gethermostatiseerde kamer gebracht bij 25 °C en 1 000 lux. Na 48 u incubatie wordt de inhoud van elk petriplaatje gefixeerd met enkele druppels lugoloplossing (Sorgeloos, 1975b) en het aantal ontloken larfjes geteld. Toepassing van een eenvoudige formule geeft dan finaal het ontluikingspercentage (HP) :

$$\text{HP} = \frac{\text{aantal ontloken nauplii}}{\text{aantal geïncubeerde cysten}} \times 100$$

Per experiment worden 10 herhalingen verricht.

#### 2° methode

De incubatie verloopt analoog aan de eerste methode, maar de ontluiking blijft verder gaan in dezelfde recipiënt. Na 48 u worden met een automatisch micropipet 10 deelmonsters genomen van  $\pm 250 \mu\text{l}$  en gefixeerd met lugoloplossing. Observatie onder de dissectiemicroscoop laat toe de ontloken nauplii te tellen. Vervolgens worden de resterende cysten gedecapsuleerd door toevoeging van één druppel NaOH (40 %) en vijf druppels NaOCl (5 %). Na een vijftal minuten kunnen de niet ontloken embryo's geteld worden en vindt de berekening van het ontluikingspercentage plaats als volgt :

$$\text{HP} = \frac{\text{aantal ontloken nauplii} \times 100}{\text{aantal ontloken nauplii} + \text{resterende embryo's}}$$

#### 4. Verwerking van de resultaten

In vele gevallen zijn de gegevens niet per experiment weergegeven maar herschikt in klassen om besluitvormig mogelijk te maken. Dit heeft voor gevolg dat variantieanalyse niet altijd mogelijk is omdat verschillende factoren variabel zijn. In deze gevallen zijn we aangewezen op de t-test om de resultaten twee aan twee te vergelijken.

In de andere gevallen hebben we de resultaten verwerkt volgens de methoden besproken in V.1.6.

### V.2.3. Resultaten en bespreking

Een overzicht van de ontluikingspercentages, bekomen na zuivering en dehydratie van de diverse geproduceerde cystenloten, is gegeven in tabel 36. Om het geheel overzichtelijk te houden zijn hier enkel de monsters vermeld met een ontluikingscore hoger dan 5 %; de niet vermelde cystencodes werden ook geanalyseerd maar ontloken slechts minimaal (< 5 %).

Uit deze gegevens blijkt duidelijk dat er enorme verschillen optreden in ontluikbaarheid, niet alleen tussen de diverse rassen, maar ook binnen éénzelfde geografische populatie. De waarden variëren immers van 0 tot 31 % voor LVD, 0 tot 69 % voor GSL, 37 tot 64 % voor SFB en 40 tot 71 % voor MAC. Gecontroleerde cystenproducties van TIE, CHL of MDS bereikten zelfs geen 5 % ontluiking na het uittesten van verschillende dehydratietechnieken. Ook Grosch (1966, 1973) en Cunningham en Grosch (1978) observeerden grote variaties in ontluikbaarheid van SFB cysten, geproduceerd onder labo-omstandigheden. Daar de cysten na afoogsting uniform behandeld werden (zie IV.3.4.), duidt dit op interferenties van de produktie-omstandigheden, eventueel in combinatie met genotypische factoren, op het diapauze-desactiveringsproces. Het systeem voor gecontroleerde produktie van cysten op zich lijkt echter de ontluikingswaarden niet te beïnvloeden daar voor verschillende rassen toch tot 70 % ontluiking bekomen wordt. Dit zou erop wijzen dat de aangewende inductietechniek van  $N_2$ -doorborreling de ontluikingskwaliteit weinig tot niet aantast. Ook de vrees dat zygogenetische populaties niet tot copulatie zouden kunnen komen omwille van verstoring van het milieu door de continue doorborreling of de hoge densiteiten lijkt ongegrond. Het zijn namelijk de cysten van deze rassen die de grootste aantallen instar I - nauplii opleveren na incubatie onder optimale omstandigheden.



Tabel 36 : Ontluikingskarakteristieken van de cystenmonsters, geproduceerd onder gecontroleerde omstandigheden en gedehydrateerd volgens de standaardmethoden. (Enkel de cystenmonsters met meer dan 5 % ontluiking zijn vermeld)

Code	Produktieomstandigheden (saliniteit van kweekmedium - aantal dieren per liter - toegediend voedsel <sup>1</sup> )	Ontluiking	
		%	s
LVD 811	50 - 10 000 RB	20,8 ±	5,1
LVD 821	50 - 10 000 RB-SPIR (3:1)	31,0 ±	14,0
LVD 822	50 - 10 000 RB	20,8 ±	1,9
LVD 831	90 - 2 000 PROV-A	20,4 ±	7,8
LVD 832	90 - 5 000 PROV-A	14,5 ±	2,8
GSL 811	50 - 10 000 RB	14,7 ±	2,8
GSL 822	50 - 10 000 RB-SPIR (3:1)	12,9 ±	2,2
GSL 833	35 - 2 000 ARP	68,9 ±	5,6
SPB 821	50 - 5 000 RB-SPIR (3:1)	41,9 ±	8,1
SFB 831	90 - 5 000 PROV-A	42,4 ±	5,4
SFB 832	90 - 2 000 PROV-A	53,0 ±	4,4
SFB 841	90 - 5 000 RB-PG (4:1)	44,5 ±	6,1
SFB 842	90 - 5 000 RB-PG (4:1)	49,6 ±	5,8
SFB 851	90 - 5 000 <i>Dunaliella</i>	36,6 ±	6,5
SFB 852	90 - 1 000 <i>Dunaliella</i>	63,7 ±	7,8
MAC 831	90 - 2 000 SPIR-UNICA (1:1)	71,1 ±	7,9
MAC 832	90 - 3 000 PROV-UNICA (1:1)	39,9 ±	7,9
MOE 841	75 - 10 000 RB	15,8 ±	5,0

<sup>1</sup>Afkortingen zoals in tabel 10

De variabele resultaten noopten ons ertoe een grondige literatuurstudie aan te vatten van het cryptobiosisfenomeen. Wij verwijzen hiervoor naar hoofdstuk V.2.2. Deze studie toonde o.a. aan dat diverse factoren de toestand van diapauze van pas afgelegde cysten kunnen beïnvloeden. We hebben dan ook getracht om met behulp van onze opstelling voor cystenproductie meer duidelijkheid te scheppen in deze problematiek.

### 1. Invloed van produktie-omstandigheden

Bij vergelijking van de algemene ontluikingscijfers met de specifieke produktie-omstandigheden (tabel 28) is men geneigd de volgende veronderstellingen te maken :

- er bestaat geen éénduidig verband tussen het zoutgehalte van het kweekmedium en de ontluikbaarheid der cysten. Bij alle saliniteiten komen zowel erg lage tot hoge ontluikingswaarden voor;
- ook de voedselsamenstelling interfereert weinig; enkel de diëten op basis van 'Provamel' of levende *Dunaliella* wieren geven onder alle omstandigheden relatief goede ontluikingscijfers;
- alhoewel niet overal duidelijk, lijkt de *Artemia* densiteit de ontluiking wel te beïnvloeden; vooral de lage concentraties geven betere cijfers voor ontluiking, een uitzondering hierop is echter LVD waar bij de hoogste densiteit de hoogste ontluiking gevonden wordt.

Een gedetailleerde vergelijking van de ontluikingswaarden van cysten afkomstig van enkele specifieke produktie-experimenten leidt echter tot een duidelijker beeld. Tijdens de diverse proefnemingen was het ons namelijk duidelijk geworden dat ons cystenproductie-systeem toch niet volledig gestandaardiseerd was : de kwantiteit aan voedsel toegediend per dag en per aquarium, was immers afgesteld op doorzichtigheid van het kweekmedium, en varieerde zowel dagelijks als tussen de verschillende

experimenten (zie hoofdstuk IV.3.2.). Daarom werden experimenten uitgevoerd waarbij de invloed van de voedselbeschikbaarheid per individu kon onderzocht worden. In een eerste reeks kregen moederculturen met een densiteit van 2 000 ofwel 5 000 *Artemia*/l éénzelfde hoeveelheid voedsel toebedeeld. In een tweede reeks proeven werd een verschillend voederregime toegepast terwijl dezelfde densiteit aan adulte pekelkreeften aangehouden werd. Dit voederregime werd ingesteld op basis van het gemiddeld natgewicht aan *Artemia* biomassa in de kweekaquaria (zie IV.3.2.).

De resultaten van deze specifieke experimenten zijn grafisch weergegeven in figuur 44. Hieruit kan men afleiden dat er een duidelijke interactie bestaat tussen de hoeveelheid voedsel die beschikbaar is voor de adulte populaties en de ontluikingskarakteristieken van de geproduceerde cysten (na dehydratie). Ontluikingspercentages namen in drie van de vier onderzochte gevallen significant toe ( $p < 0,05$ ) wanneer de adulten per individu meer voedsel beschikbaar hadden. Het effect was het meest uitgesproken voor het SFB ras, gekweekt bij de laagste densiteit (1 000 dieren/l) : ten opzichte van het 10 % voederregime gaf het 15 % schema een relatieve toename in ontluiking van maar liefst 74 % !

Recent werden in ons laboratorium deze bevindingen opnieuw bevestigd door middel van kleinschalige kweekproeven met diverse *Artemia* rassen en met levende wieren als voedsel (Tackaert *et al.*, 1987). Optimale *versus* suboptimale voeding van de populaties resulteerde opnieuw in significant hogere ontluikingspercentages : voor Chaplin Lake cysten verdubbelde de ontluiking, voor Tientsin en Shark Bay cysten was er een toename van respectievelijk 73 % en 13 %.

Deze bevindingen laten ons toe te veronderstellen dat de voedselbeschikbaarheid voor de moederdieren de ontluikbaarheid van de geproduceerde nakomelingen in grote mate beïnvloedt. Hierdoor kunnen de onsamenhangende resultaten uit tabel 36 enigzins verklaard worden : die zouden te

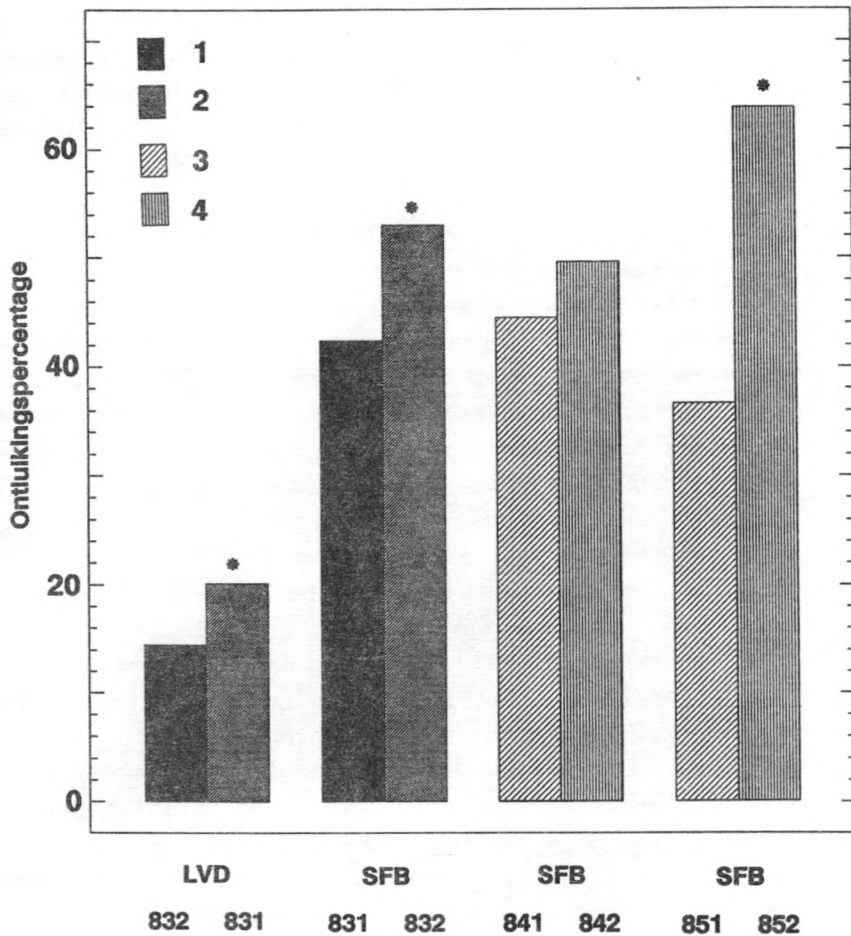


Fig. 44 : Invloed van de hoeveelheid voedsel toegediend aan de moederculturen op de ontluikingskwaliteit van de afgelegde cysten (\* : significant verschillend).

Voedselverdeling ingesteld volgens de densiteit aan dieren per kweektank (1 = 5000 ind./l; 2 = 2000 ind./l) of in verhouding tot de biomassa in de kweektank (3 = dagelijks 10 % van het natgewicht aan *Artemia* biomassa; 4 = 15 %)

wijten zijn aan de niet gestandaardiseerde voedingsomstandigheden door het niet toedienen van vaste hoeveelheden voedsel of, indirect, door verschillende densiteiten aan te houden.

Een verklaring voor deze interactie tussen de voedselbeschikbaarheid in adulte culturen en de ontluikbaarheid van hun nakomelingen is erg speculatief :

- een eerste hypothese veronderstelt dat er een rechtstreekse invloed is op de diapauze-toestand zelf. Dit zou betekenen dat deze vorm van 'dormancy' diverse gradaties kan ondergaan; dit wil zeggen dat de intensiteit van diapauze kan variëren naargelang de situatie, waardoor de desactivering ervan niet een 'on/off'-reactie is, maar afhankelijk blijft van het type inhibitieproces (zie verder). Deze hypothese wordt ondersteund door Bogoslavsky (in Gilbert, 1974) : hij stelt dat de tijd die nodig is om de 'dormancy' bij rotiferen te doorbreken afhankelijk is van de fysiologische toestand van de reproducerende moederorganismen. Een ander voorbeeld hierbij is de observatie van Versichele (1983) dat zowel het ontluikingspercentage als de -snelheid van *Artemia* cysten tijdelijk lager is (- 18 %, respectievelijk + 6 u) indien plotseling een ander dieet toegediend wordt aan de adulte populatie.
- de tweede hypothese veronderstelt een direct effect op de leefbaarheid, *sensu stricto*, van de geproduceerde cysten. Dit kan gebeuren door b.v. verschillen in biochemische samenstelling, morfologische afwijkingen of een abnormale embryogenese. Tot op heden zijn er echter geen zichtbare verschillen ontdekt door middel van elektronenmicroscopisch of biochemisch onderzoek tussen cysten die geproduceerd zijn onder optimale, respectievelijk sub-optimale voederomstandigheden (zie verder).

De uitgevoerde literatuurstudie (V.2.1.) doet veronderstellen dat ook het zoutgehalte van het kweekmedium de ontluikbaarheid van de geproduceerde cysten kan beïnvloeden. Uit onze experimenten kan dit echter niet afgeleid worden, waarschijnlijk mede ten gevolge van de hogervermelde interferentie met de variërende voederomstandigheden. Dit zou erop wijzen dat de saliniteit slechts een secundair effect uitoefent, dat eventueel gecompenseerd kan worden wanneer andere parameters optimaal gehouden worden. Ook de hoger beschreven experimenten van Tackaert *et al.* (1987) bevestigen deze stelling : voor CHL en TIE populaties werden slechts minieme verschillen vastgesteld tussen zoutgehaltenes van 35 en 90 g/l, terwijl GSL cysten wel significant verschillend ontloken.

De invloed van de saliniteit blijkt echter wel sterk uitgesproken bij cystenmateriaal, verkregen uit semi-gecontroleerde produktievijvers in Kenya en Vietnam (Tabel 37).

Tabel 37 : Invloed van de saliniteit van *Artemia* kweekvijvers op de ontluiking der geproduceerde cysten

Herkomst van het cystenlot	Geïnoculeerd ras	Saliniteit kweekvijver (g/l)	Ontluiking na drogen %
Malindi, Kenya, 1984	SFB	85	27,0 ± 5,1
		155	58,5 ± 7,4
Cam Ranh, Vietnam, 1985	GSL	95 - 100	30,5 -
		120 - 150	85,6 -
Colan, Peru, 1988	-	50	11,5 ± 2,2
		75	62,5 ± 5,4
		185	66,0 ± 5,2

## 2. Invloed van het produktietijdstip

Daar kwantitatieve reproductiekenmerken variëren in functie van het broednummer (zie IV.2.4.), werd nagegaan of of er een verband bestaat tussen de kwaliteit van ontlui-

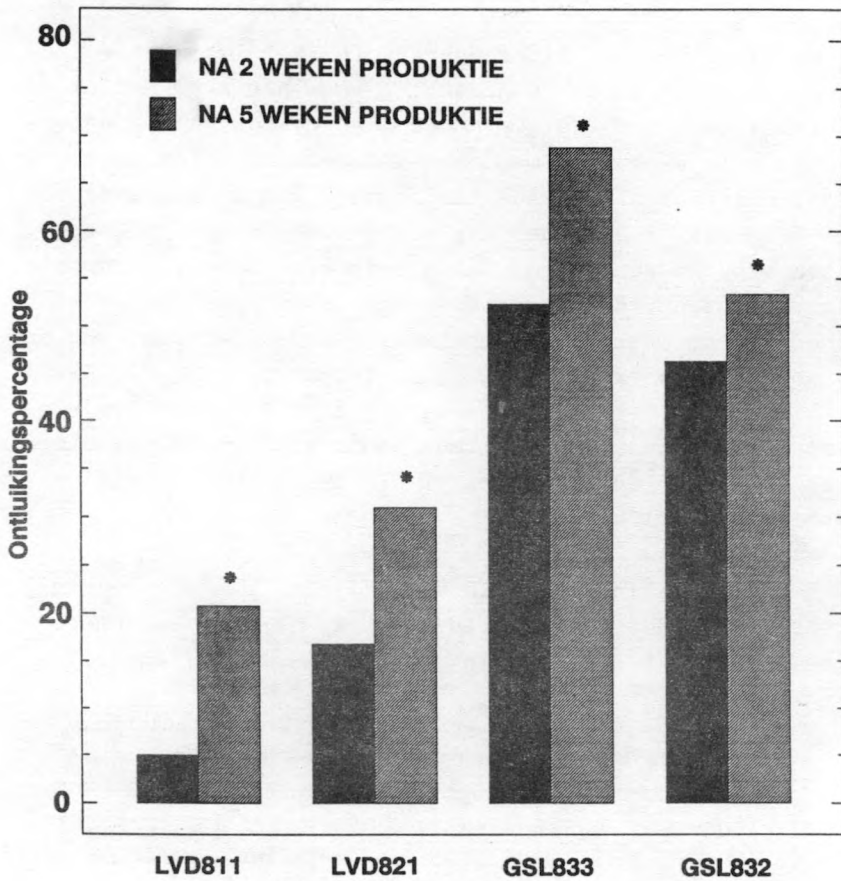


Fig. 45 : Invloed van het produktietijdstip op de ontluikingskwaliteit van de afgelegde cysten (\* : significant verschillend).

king en het tijdstip van afleg. Hiervoor werden de afgeogste cysten per produktieperiode apart gestockeerd en gezuiverd. De ontluikingsresultaten voor twee verzameltijdstippen zijn grafisch weergegeven in de volgende blokdiagrammen (Fig.45).

Uit deze figuur kan men afleiden dat het produktietijdstip een significante invloed ( $p < 0,05$ ) heeft op de ontluikbaarheid van gedehydrerde cysten. Voor alle onderzochte monsters van de twee *Artemia* species (*A. franciscana* en *A. parthenogenetica*) blijkt dat in het begin van de reproductieve periode cysten afgelegd worden die na diapauze-desactivering door middel van dehydratie in pekkel of ovendrogen beduidend minder nauplii produceren. Dit kan dan ook een tweede reden zijn voor de grote variaties die optreden tussen cystenloten geproduceerd onder analoge omstandigheden : de onderzochte cystenloten zijn immers bijna steeds mengsels van diverse reproductie-cycli.

Een verklaring voor dit geobserveerde fenomeen ligt niet voor de hand. Een variërende energie-inhoud tengevolge van verschillen in reproductiekost tijdens de voortplantingsperiode lijkt niet de reden te zijn : volgens Browne *et al.* (1984) worden immers in het begin van de reproductiefase juist minder nakomelingen geproduceerd door beide species.

### 3. Diapauze-desactiveringstechnieken

#### Effect van dehydratie

Daar algemeen aanvaard wordt dat dehydratie de meest doeltreffende techniek is om de toestand van diapauze bij *Artemia* op te heffen, hebben we in eerste instantie gepoogd om het effect van ontwateringsmethoden in te schatten. Uit de literatuurstudie kan immers verondersteld worden dat het effect van dehydratie voornamelijk bepaald wordt door de snelheid van wateronttrekking en de bereikte graad van dehydratie. We hebben dan ook verschillende technieken voor



Tabel 38 : Effect van diverse drogingstechnieken op diapauze-desactivering van de geproduceerde cysten

Code cystenmonster	Drogingstechniek	Ontluiking*	
		Z	s
LVD 821	NaCl - pekel ovendrogen (35 °C/24u)	5,5 ± 1,6 <sup>a</sup>	
		31,0 ± 14,0 <sup>b</sup>	
LVD 831	NaCl - pekel ovendrogen (35 °C/24u)	20,1 ± 4,7 <sup>a</sup>	
		20,4 ± 7,8 <sup>a</sup>	
GSL 811	NaCl - pekel MgCl <sub>2</sub> - pekel	1,8 ± 1,3 <sup>a</sup>	
		14,7 ± 2,8 <sup>b</sup>	
GSL 822	NaCl - pekel MgCl <sub>2</sub> - pekel	1,8 ± 1,3 <sup>a</sup>	
		12,9 ± 2,2 <sup>b</sup>	
GSL 833	NaCl - pekel ovendrogen (35 °C/24u)	46,3 ± 5,0 <sup>a</sup>	
		68,9 ± 5,6 <sup>b</sup>	
GSL 841	90 g/l - medium	0,6 ± 0,7 <sup>a</sup>	
	NaCl - pekel	3,7 ± 1,5 <sup>b</sup>	
	MgCl <sub>2</sub> - pekel	2,7 ± 0,9 <sup>b</sup>	
	Ovendrogen (35 °C/24u)	11,0 ± 2,4 <sup>c</sup>	
	wervelbed- drogen (35 °C/4u)	10,7 ± 3,1 <sup>c</sup>	
SFB 831	NaCl-pekkel ovendrogen (35 °C/24u)	42,4 ± 5,4 <sup>a</sup>	
		51,6 ± 5,5 <sup>b</sup>	
MAC 832	NaCl - pekel ovendrogen (35 °C/24u)	35,1 ± 4,5 <sup>a</sup>	
		39,9 ± 4,1 <sup>b</sup>	

\* waarden met eenzelfde letter per monster zijn niet significant verschillend

wateronttrekking uitgetest op diverse geproduceerde cysten-monsters. De ontluikingsresultaten voor de specifieke behandelingen zijn weergegeven in tabel 38.

De opgetekende waarden bevestigen inderdaad dat het succes van de inhibitie van het diapauze-proces afhankelijk is van de toegepaste techniek. Dehydratie in verzadigde NaCl-pekkel blijkt in praktisch alle gevallen het laagste rendement te geven. Deze behandeling is het minst drastisch en resulteert in intracystaire watergehaltes van 20 % (Clegg, 1978b). Wanneer de geproduceerde cysten in een medium met een hogere osmotische kracht gebracht worden ( $MgCl_2$ -pekkel), waarbij het finaal watergehalte slechts 6 % bedraagt (Clegg, 1977), stijgt de ontluikbaarheid significant voor twee van de drie onderzochte monsters (GSL 811 en GSL 822). Ook het drogen der cysten in dunne lagen bij 35 °C tot intracystaire watergehaltes van  $\pm 4$  % geeft opnieuw beduidend betere resultaten (significant op het  $p < 0,05$  niveau voor vijf van de zes onderzochte monsters). Hieruit kunnen we besluiten dat de graad van dehydratie een belangrijke invloed heeft op de diapauze-desactivering. Opmerkelijk is wel dat de minimale watergehaltes voor maximale desactivering lager liggen dan de opgesomde waarden in de literatuur (Versichele en Sorgeloos, 1980; Drinkwater en Crowe, 1987). De grens voor inhibitie van de diapauze door dehydratie blijkt dus afhankelijk te zijn van andere (produktie-?) omstandigheden. Voorafgaandelijke stockering in een oplossing met een analoge saliniteit als het kweekmedium of in media waarvan het zoutgehalte geleidelijk toeneemt, geven evenmin aanleiding tot een goede desactivering na dehydratie.

Wat de invloed van drogingsnelheid betreft, hebben we tot dusver slechts één experiment kunnen uitvoeren : cysten van het lot GSL 841 werden gedroogd in dunne lagen, of in een warm wervelbed; alhoewel de dehydratiecurves (figuur 46) wijzen op verschillende drogingsnelheden blijkt uit tabel 38 dat er geen significant verschil in ontluikbaarheid bestaat tussen deze drogingstechnieken. Meerdere

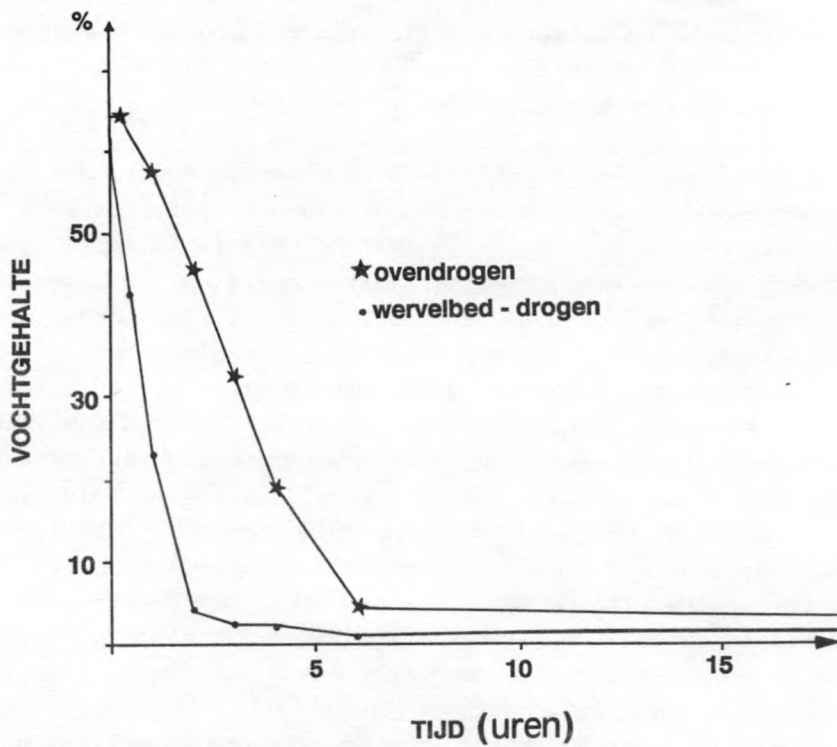


Fig. 46 : Evolutie van het vochtgehalte van GSL cysten tijdens twee drogingsprocessen bij 35°C.

proeven zijn niettemin vereist voor een meer gegronde besluitvorming.

#### Effect van dehydratie/hydratatie-cycli (D/H)

De resultaten van enkele D/H-experimenten zijn samengevat in tabel 39. Hieruit blijkt dat in twee gevallen een significant effect te noteren valt hoewel slechts in één geval dit echt duidelijk is: een extra D/H-cyclus levert voor de LVD cysten een toename van de ontluiking op met 65 %. Het uitvoeren van meerdere cycli geeft geen betere resultaten voor de uitgeteste cystenloten. Ook voor de cysten verkregen uit vijverproducties in Kenya zijn de resultaten wisselvallig : alhoewel in beide gevallen een verhoging merkbaar is, neemt de ontluiking enkel voor MAL 1 significant toe.

#### Invloed van stockeringsduur of aestivatie

Daar we tijdens ons onderzoek enkele malen geconfronteerd werden met een stijging van de ontluiking van het onbehandelde cystenmonster (= inwendige standaard) hebben we het criterium stockeringsduur onderzocht voor diverse geproduceerde cystenloten. Doordat dit onderzoek slechts *a posteriori* geconcipieerd werd, zijn de stockeringsomstandigheden van de onderzochte monsters niet gestandaardiseerd, wat de interpretatie van de gegevens bemoeilijkt.

Wanneer de gedehydrateerde cysten gestockeerd blijven gedurende lange periodes zonder specifieke behandeling blijkt de ontluikbaarheid significant toe te nemen voor 50 % van de onderzochte monsters (Tabel 40). Slechts in drie omstandigheden is er een duidelijke daling merkbaar. Dit zou kunnen duiden op een tweede, tegengesteld effect : uit de literatuurstudie (V.2.) is namelijk gebleken dat stockeringsomstandigheden de leefbaarheid van (quiëscente) geëncysteerde embryo's kunnen aantasten. Dit kan de oorzaak zijn van de geobserveerde dalingen en staat dus in feite los van de diapauze-desactivering zelf. Dit wordt bevestigd

Tabel 39: Effect van dehydratie/hydratatie-cycli op de diapauze-desactivering van geproduceerde cysten

Code cystenmonster	Behandeling	Ontluiking*	
		Z	s
LVD 811	(D/H)1	29,6 ± 3,8 <sup>a</sup>	
	(D/H)2	49,2 ± 2,0 <sup>b</sup>	
	(D/H)3	49,5 ± 5,7 <sup>b</sup>	
GSL 822	(D/H)1	1,8 ± 1,3 <sup>a</sup>	
	(D/H)2	2,9 ± 1,9 <sup>a</sup>	
GSL 841	(D/H)1	1,7 ± 0,9 <sup>a</sup>	
	(D/H)2	4,8 ± 1,9 <sup>b</sup>	
	(D/H)3	4,7 ± 1,5 <sup>b</sup>	
GSL 841 (2x4 w bij -25 °C)	(D/H)1	40,6 ± 6,9 <sup>a</sup>	
	(D/H)2	39,1 ± 5,1 <sup>a</sup>	
	(D/H)3	40,1 ± 5,5 <sup>a</sup>	
MAL 1	(D/H)1	11,5 ± 1,9 <sup>a</sup>	
	(D/H)2	27,0 ± 5,1 <sup>b</sup>	
MAL 2	(D/H)1	56,2 ± 3,7 <sup>a</sup>	
	(D/H)2	69,5 ± 7,1 <sup>b</sup>	

\* waarden met eenzelfde letter per monster zijn niet significant verschillend.

Tabel 40 : Invloed van stockeringsduur op de diapauze-desactivering van geproduceerde cysten.

Code cystenmonster	Ontluiking na dehydratie (zo kort mogelijk na afleg)		Stockerings- duur (jaren)	Ontluiking na stockering	
	z	s		z	s
LVD 811	5,0 ±	2,6	2 7	29,6 ±	3,8 0
LVD 821	5,5 ±	1,6	5	0	
LVD 822	20,8 ±	1,9	5	66,2 ±	5,4
LVD 826	1,9 ±	1,2	5	0	
LVD 827	1,4 ±	1,1	5	10,1 ±	2,9
LVD 831	20,4 ±	7,8	4	58,1 ±	4,8
TIE 821	< 5		5	41,7 ±	5,4
CHL 821	< 5		5	0	
SPB 821	41,9 ±	8,1	5	0	
SFB 852	63,7 ±	7,8	2	40,9 ±	4,1
MAC 832	39,9 ±	4,1	4	41,4 ±	4,9
GSL 831	< 5		4	28,8 ±	4,3
GSL 832	< 5		4	41,3 ±	4,6
GSL 833	68,9 ±	5,6	4	44,8 ±	5,6
GSL 841	< 5		3	68,4 ±	4,7
GSL 861	< 5		1	26,5 ±	5,7

door proeven uitgevoerd op ander cystenmateriaal : na één jaar stockering steeg de ontluiking van GSL en TIE cysten met 25 % terwijl de stijging bij LVD en SFB cysten maximum 3 % was.

Deze gegevens laten ons toe te veronderstellen dat een verouderingsproces de diapauze-toestand kan opheffen. Het effect van desactivering lijkt wel afhankelijk van bepaalde omstandigheden of rassen. Het stockeren onder gepekelde of gedroogde vorm heeft geen invloed op dit proces.

Conclusies omtrent de minimale of maximale duur die voor stockering noodzakelijk is, kunnen niet getrokken worden uit deze experimenten. Voor een commercieel monster van SFB verkregen we na de afoogsting en droging slechts 10 % ontluiking, maar na 1 maand verouderen (bij omgevingstemperaturen) liep het percentage op tot 80 % ! In een persoonlijke mededeling bevestigt Newman (San Francisco Bay Brand Cy) dat SFB cysten enkele maanden gestockeerd worden om een optimale ontlukbaarheid te verkrijgen.

Ook voor materiaal geogst uit vijvers in Vietnam werd een invloed opgetekend : na respectievelijk 2, 12 en 33 weken stockering bedragen de ontlukingspercentages 35, 47 en 77 % (Vu Do Quynh *et al.*, 1988).

#### Effect van U.V.-bestraling

De resultaten bekomen voor twee *Artemia* rassen blijken niet verschillend te zijn voor al of niet U.V.-behandelde cysten (tabel 41). Hieruit volgt dat de U.V.-behandeling gedurende maximaal zes uur niet resulteert in een opheffing van de diapauze bij beide rassen. Mogelijk kan dit te wijten zijn aan een verkeerde dosering (intensiteit/periode) van de U.V.-bestraling. Meer uitgebreid onderzoek in verband met dosis/tijd-effecten zijn vereist om tot formele conclusies te kunnen komen.

Tabel 41 : Effect van U.V.-bestraling op de ontluikbaarheid van geproduceerde *Artemia* cysten.

Ras + code	Behandeling	Ontluiking	
		%	s
LVD 821	gedroogd	31,0 ± 14,0	
	+ U.V. 30W/2u	29,8 ± 12,5	
GSL 841	NaCl-pekel	0,6 ± 0,7	
	+ U.V. 30W/6u	4,2 ± 1,1	

#### Effect van hibernatie

Uit de resultaten samengevat in tabel 42 kan men een duidelijke invloed waarnemen van de stockering bij lage temperaturen indien de incubatieperiode voldoende lang is. Voor beide onderzochte rassen van LVD en GSL treedt er geen effect op indien de invriesperiode bij -25 °C minder dan 14 dagen bedraagt. Hierop is er wel een uitzondering, namelijk LVD 811, waar na twee weken reeds een lichte doch significante verhoging van de ontluikbaarheid vastgesteld wordt. Bovendien lijkt voor de incubatie bij 4 °C een langere tijdsduur vereist daar na twee maanden slechts een lichte verhoging geconstateerd wordt bij GSL 841. Drie maanden stockering in een koelkast geeft wel beduidend hogere ontluikingswaarden bij het LVD ras. De invloed van temperatuur en behandelingsduur op de doeltreffendheid van de overwinteringstechniek wordt bevestigd door de literatuurgegevens (V.2.1.). De creatie van extreme hibernatieomstandigheden door de cysten in vloeibare stikstof te dompelen (-196 °C) daarentegen veroorzaakt geen inkorting van de minimale incubatieperiode.

Het desactiveringsproces door middel van hibernatie lijkt niet een 'on/off'-reactie te zijn, maar heeft een kwantitatieve invloed. De ontluikbaarheid neemt immers toe naarmate de cysten langer bij -25 °C gestockeerd worden. Indien deze periode voldoende lang is, bereikt men zelfs



Tabel 42 : Effect van hibernatie op de diapauze-desactivering van geproduceerde cysten

Code cystenmonster	Behandeling (temperatuur in °C/ tijdsduur in dagen (d) of weken (w))	Ontluiking*	
		$\bar{x}$	s
LVD 821	controle	16,8 ±	5,9 <sup>a</sup>
	-25 / 2 w	15,2 ±	1,5 <sup>a</sup>
LVD 822	controle	20,8 ±	1,9 <sup>a</sup>
	-25 / 2 w	18,4 ±	3,6 <sup>a</sup>
LVD 827	controle	1,0 ±	1,0 <sup>a</sup>
	-25 / 2 w	0,7 ±	0,8 <sup>a</sup>
LVD 811	controle	5,0 ±	2,6 <sup>a</sup>
	-25 / 2 d	7,4 ±	2,1 <sup>a</sup>
	-25 / 1 w	8,8 ±	4,3 <sup>a</sup>
	-25 / 2 w	18,4 ±	3,6 <sup>b</sup>
	4 / 12 w	41,4 ±	4,3 <sup>c</sup>
	+ -25 / 1 w	52,6 ±	6,1 <sup>d</sup>
+ -25 / 1 w	77,4 ±	3,8 <sup>e</sup>	
GSL 822	controle	1,8 ±	1,3 <sup>a</sup>
	4 / 1 w	0,9 ±	1,1 <sup>a</sup>
	-25 / 1 w	1,7 ±	0,6 <sup>a</sup>
	-196 / 1 w	2,9 ±	2,8 <sup>a</sup>
GSL 841	controle	0,6 ±	0,7 <sup>a</sup>
	4 / 8 w	5,6 ±	1,7 <sup>b</sup>
	-25 / 4 w	30,9 ±	3,7 <sup>c</sup>
	+ -25 / 4 w	38,5 ±	4,2 <sup>d</sup>
	+ -25 / 12 w	42,1 ±	6,1 <sup>d</sup>
	+ -25 / 24 w	71,1 ±	6,3 <sup>e</sup>
-25 / 8 w	49,1 ±	3,8 <sup>f</sup>	

\*waarden met eenzelfde letter per monster zijn niet significant verschillend.

meer dan 70 % ontluiking, wat optimaal kan genoemd worden. De optimale behandelingsduur kan echter uit deze experimenten niet nauwkeurig bepaald worden omdat er telkens één of meerdere onderbrekingen van één week ingebouwd werden door de cysten te laten acclimatiseren bij kamertemperatuur. De gegevens uit tabel 42 laten ons toch toe te veronderstellen dat voor de onderzochte rassen een optimale hibernatieperiode ongeveer drie maanden bedraagt. Dit kwantitatief effect wordt verder bevestigd door recente gegevens van Thun en Starrett (1977) voor Mono Lake cysten (zie figuur 40 in literatuurstudie). In welke mate die acclimatisaties het overwinteringsproces beïnvloeden is niet duidelijk. Het lijkt erop dat ze de desactivering vertragen: acht weken hibernatie van GSL cysten resulteert in een significant hogere ontluikbaarheid indien er geen onderbreking ingelast wordt (49 % in plaats van 39 %). De acclimatisatie van ongeveer één week na de hibernatieperiode is een strikte vereiste: we hebben namelijk regelmatig kunnen vaststellen dat slechts een geringe ontluiking plaatsgrijpt indien de cysten binnen de 72 u na de koudebehandeling geïncubeerd worden in optimale ontluikingsomstandigheden. Dit bevestigt de observatie van Kinne (1977) maar kan niet verder verklaard worden.

Teneinde de behandelingsprocedure nog beter te standaardiseren hebben we enkele cystenloten onderzocht afkomstig van produkties uit specifieke biotopen. De experimenten werden zodanig opgesteld dat een variantie-analyse met twee factoren kon uitgevoerd worden (Tabel 43, 44 en 45). Teneinde de interpretatie te vergemakkelijken werden de resultaten grafisch voorgesteld in de figuren 47 en 48.

Opnieuw blijkt dat hibernatie een doeltreffende methode is om de diapauze van *Artemia* cysten te desactiveren. Ten opzichte van de blanco stijgt de ontluiking maximaal met 54 %, 43 % en 15 % voor respectievelijk cysten uit Kazakstan (KAZ), Piura (PIU) en Vung Tau (VT). Dit resulteert uiteindelijk in ontluikingspercentages tot 50 %, 82 % en 76 % naargelang het ras. Wellicht is de relatief

Tabel 43 : Effect van hibernatie op cysten uit Kazakstan in functie van temperatuur en incubatieduur (waarden uitgedrukt in ontluikingspercentage met standaardafwijking)

Duur van de hibernatie	Hibernatie-temperatuur		
	4 °C	-25 °C	-80 °C
<b>A. GEDROOGDE CYSTEN</b>			
0 maanden	7,4 ± 3,0		
1 maand	7,2 ± 2,1	16,4 ± 5,3	12,1 ± 2,7
2 maanden	26,7 ± 5,2	44,0 ± 6,1	50,2 ± 14,8
3 maanden	7,0 ± 3,5	5,5 ± 2,2	35,0 ± 6,1
6 maanden	5,8 ± 1,8	9,7 ± 2,5	5,0 ± 1,6
<b>F interactie = 26,894</b>			
<b>B. GEPEKELDE CYSTEN</b>			
0 maanden	4,8 ± 2,0		
1 maand	11,7 ± 6,3	26,3 ± 6,5	44,3 ± 5,0
2 maanden	5,6 ± 2,0	12,8 ± 3,3	18,0 ± 5,8
3 maanden	9,2 ± 3,8	10,4 ± 1,9	2,9 ± 1,9
6 maanden	9,6 ± 2,2	29,1 ± 6,3	6,2 ± 3,4
<b>F interactie = 58,289</b>			

Tabel 44 : Effect van hibernatie op cysten uit Peru in functie van temperatuur en incubatieduur (waarden uitgedrukt in ontlukingspercentage met standaardafwijking)

Duur van de hibernatie	Hibernatie-temperatuur		
	4 °C	-25 °C	-80 °C
<b>A. GEDROOGDE CYSTEN</b>			
0 maanden	18,5 ± 7,4		
1 maand	23,0 ± 4,2	29,8 ± 6,8	24,6 ± 6,8
2 maanden	19,0 ± 4,1	39,0 ± 7,0	62,4 ± 10,8
3 maanden	1,4 ± 1,0	21,0 ± 4,6	24,2 ± 5,3
6 maanden	10,8 ± 3,8	19,8 ± 8,2	16,4 ± 4,8
<b>F interactie = 27,666</b>			
<b>B. GEPEKELDE CYSTEN</b>			
0 maanden	28,0 ± 5,1		
1 maand	(82,2 ± 6,9)	33,5 ± 3,9	36,7 ± 4,5
2 maanden	25,6 ± 5,6	12,1 ± 3,0	4,1 ± 1,9
3 maanden	36,6 ± 7,2	21,8 ± 4,9	31,4 ± 3,4
6 maanden	12,5 ± 3,9	28,8 ± 5,5	22,2 ± 7,3
<b>F interactie = 85,642</b>			

Tabel 45 : Effect van hibernatie op cysten uit Vietnam in functie van temperatuur en incubatieduur (waarden uitgedrukt in ontlukingspercentage met standaardafwijking)

Duur van de hibernatie	Hibernatie-temperatuur		
	4 °C	-25 °C	-80 °C
<b>A. GEDROOGDE CYSTEN</b>			
0 maanden	56,0 ± 4,3		
1 maand	58,9 ± 5,4	61,0 ± 6,0	61,6 ± 10,7
2 maanden	70,5 ± 6,4	64,2 ± 6,7	66,1 ± 9,3
3 maanden	64,4 ± 6,7	60,2 ± 6,7	63,0 ± 5,0
6 maanden	60,6 ± 6,9	70,9 ± 4,1	58,0 ± 7,3
<b>F interactie = 3,950</b>			
<b>B. GEPEKELDE CYSTEN</b>			
0 maanden	63,5 ± 6,7		
1 maand	68,6 ± 6,4	71,2 ± 6,2	62,6 ± 6,8
2 maanden	67,8 ± 4,3	66,9 ± 4,3	45,8 ± 4,1
3 maanden	69,0 ± 4,0	75,8 ± 5,1	57,4 ± 6,4
6 maanden	71,4 ± 2,6	73,5 ± 3,6	57,1 ± 6,5
<b>F interactie = 5,123</b>			

geringe toename bij het VT ras te wijten aan het feit dat door dehydratie reeds meer dan de helft van het oorspronkelijk materiaal gedesactiveerd was.

De toestand waarin de cysten de hibernatie ondergaan (onder droge vorm of in een verzadigde NaCl-pekeloplossing) heeft een significante invloed op de ontluikbaarheid. Algemeen is het effect geringer voor de gepekeldde cysten uit Kazakstan en Piura. Eén waarde valt volledig buiten de geschetste situatie (PIU 4° C/1 m) en is waarschijnlijk te wijten aan een foutieve bepaling. In sommige gevallen worden zelfs negatieve effecten genoteerd voor de Peru en Vietnam cysten, gestockeerd in pekels bij -25 °C en/of -80 °C. Verklaringen voor deze fenomenen blijven erg speculatief : mogelijk is het intra- en/of het extracystair watergehalte verantwoordelijk voor een daling van de leefbaarheid :

- extreem lage temperaturen kunnen mortaliteit veroorzaken bij de reeds quiëscente cysten (= blanco waarden : slechts 5 % bij KAZ maar reeds 30 % en 60 % bij respectievelijk PIU en VT) die 20 % water bevatten (= stockering in pekels).
- de vorming van groeiende (uitwendige) ijskristallen aan het cystenoppervlak kan mechanische beschadiging teweegbrengen aan het embryonale omhulsel of zelfs het embryo doorprikken en daardoor de leefbaarheid aantasten. Vorming van inwendige ijskristallen kan volgens Crowe *et al.* (1980; 1981) niet aan de basis liggen van de mortaliteit omdat de cysten te weinig water bevatten.

De (tijdelijke) stijging van de ontluikbaarheid na twee maanden kan dan een gevolg zijn van de desactivering van de oorspronkelijke 'dormant cysts' zonder dat de quiëscente cysten reeds aangetast zijn. Deze resultaten zijn in tegenspraak met de bevindingen van Voronov (1976) : Russische cysten met een watergehalte lager dan 10 % H<sub>2</sub>O kunnen niet meer gedesactiveerd worden door middel van hibernatie.

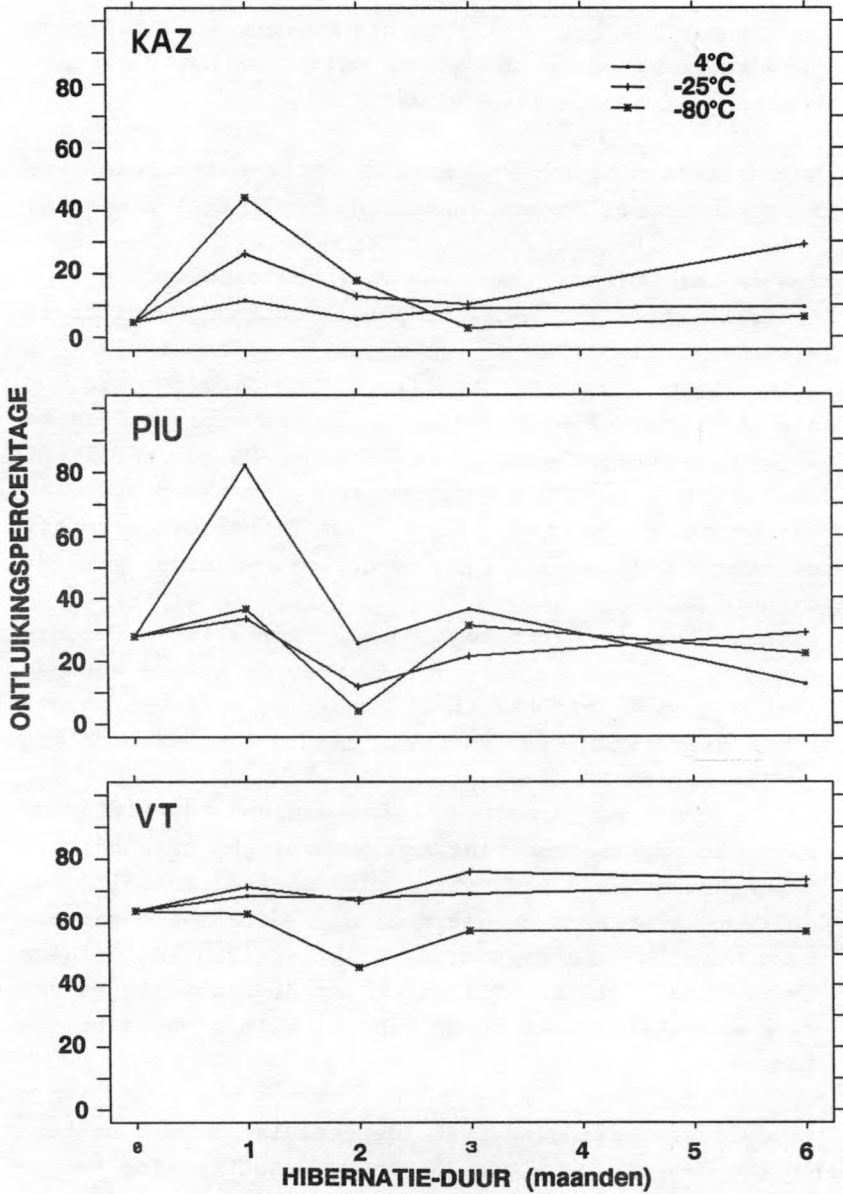


Fig. 47 : Effect van hibernatie-omstandigheden op de diapauze-desactivering van gepekelde cysten afkomstig van Kazakstan, Peru en Vietnam.

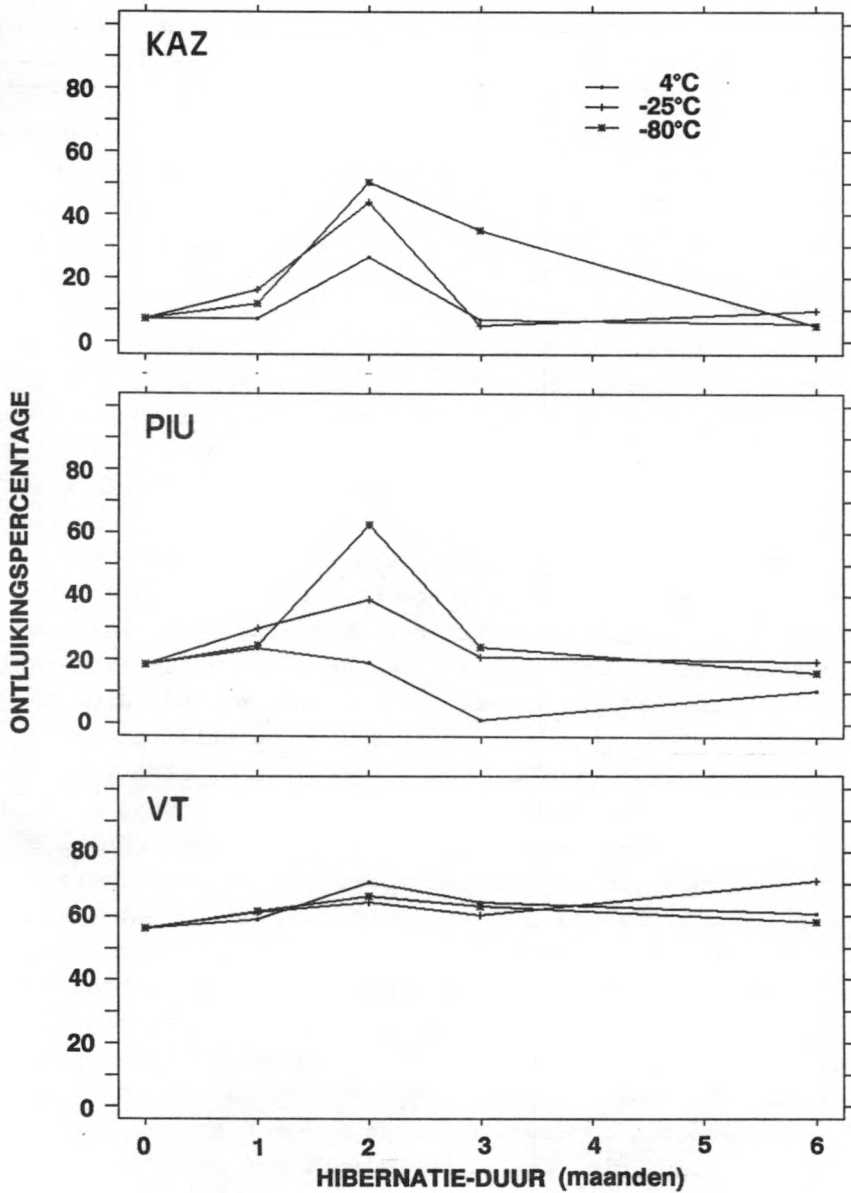


Fig. 48 : Effect van hibernatie-omstandigheden op de diapauze-desactivering van gedroogde cysten afkomstig van Kazakstan, Peru en Vietnam.



Figuur 47 en 48 bevestigen opnieuw de significante interactie van de incubatietemperatuur en -duur op de diapauze-inhibitie bij de rassen uit de Sovietunie en Peru. Voor periodes tot twee maanden geeft  $-80^{\circ}\text{C}$  steeds de hoogste waarde voor ontluikbaarheid, daarna de behandeling bij  $-25^{\circ}\text{C}$  en uiteindelijk deze bij  $4^{\circ}\text{C}$ . Voor de populatie uit Vietnam is dit kwantitatieve effect veel minder duidelijk. Tot slot blijkt uit een preliminair experiment, waarbij cysten van Kazakstan bij hogere temperaturen ( $60^{\circ}\text{C}$ ) gestockeerd werden, dat een inverse temperatuurschok geen effect geeft. Blijkbaar is dus enkel een verlaging van de temperatuur effectief voor de opheffing van de diapauze.

Wanneer nagegaan wordt welke rassen gevoelig zijn voor de inhibitie van de diapauze door hibernatie valt op dat de meeste populaties afkomstig zijn uit streken met een gematigd klimaat (b.v. Sovietunie, Lavalduc, Mono Lake, Great Salt Lake : zie ook literatuurstudie). Dit laat toe te veronderstellen dat hibernatie het gevolg kan zijn van een ecologische adaptatie aan het lokale milieu. Hierdoor is het immers mogelijk dat de *Artemia* populatie tijdens de zomer cysten produceert die niet kunnen ontluiken tijdens de herfst (niettegenstaande een eventuele dehydratie), maar die een nieuwe populatie kunnen opstarten éénmaal de winter voorbij is. Bovendien zorgt het hibernatie-effect ervoor dat alle cysten quiëscen zijn op het ogenblik dat de omgevingsomstandigheden opnieuw gunstig worden, zodat een synchrone ontluiking plaatsvindt en vlugge opbouw van de populatie verzekerd is. Dit laatste is essentieel voor organismen die tijdelijke biotopen bevolken. Een gelijkaardige adaptatie wordt gerapporteerd door Marcus (1979, 1980) voor de calanoïde copepode *Labidocera aestiva*. Dat sommige *Artemia* rassen uit de warme regio's ook gevoelig kunnen zijn voor hibernatie-inhibitie (b.v. Piura) zou een aanwijzing kunnen zijn voor het niet rassen-specifiek karakter van deze diapauze-desactiveringstechniek.

### Effect van peroxide

De ontluikingswaarden in tabel 46 leren ons dat voor 80 % van de onderzochte monsters de ontluikbaarheid significant toeneemt wanneer de cysten behandeld werden met peroxide. Bij Lavalduc, Tientsin en Great Salt Lake *Artemia* desactiveert  $H_2O_2$  in grote mate de diapauze van de geëncysteerde embryo's : de ontluiking stijgt met respectievelijk 32 %, 36 % en 77 %. Enkel voor de labo-geproduceerde cysten van het ras afkomstig van de baai van San Francisco (SFB en MAC populaties) treedt er geen positief effect op.

Bovendien heeft de incubatieduur, en hoogstwaarschijnlijk ook de concentratie aan  $H_2O_2$ , een belangrijke invloed op het desactiveringsproces. Zo worden bij LVD en GSL maximale inhibitie-effecten genoteerd voor behandelingsperiodes van meer dan 30 min, respectievelijk 60 min. Indien de  $H_2O_2$ -concentratie van het incubatiemedium toeneemt tot 5 à 10 %, vermindert de optimale duur bij GSL cysten tot ongeveer 15 min. Naargelang de herkomst van het peroxide bekwamen we afwijkende resultaten : het produkt dat wekelijks afgehaald werd bij de apotheek gaf totaal verschillende effecten bij hetzelfde cystenmonster. We hebben dan ook geopteerd voor het geconcentreerde 'UCB'-produkt dat veel consistentere gegevens opleverde. Mogelijk is dit te wijten aan de hogere stabiliteit van het 'UCB'-peroxide (industriële produkten bevatten namelijk een stabilisator).

Een hydratatie van de gedroogde cysten juist vóór de peroxide-behandeling heeft bij LVD slechts een geringe toename van de ontluikbaarheid tot gevolg. Nochtans lijkt het intracystair watergehalte wel belangrijk : vers geproduceerde GSL cysten die niet gedehydriseerd zijn, kunnen beduidend beter gedesactiveerd worden dan deze gestockeerd in NaCl-pekkel (GSL 881). Opvallend is wel dat dit verschil minimaal wordt na één maand stockering van de gepekkelde cysten!

Tabel 46 : Effect van peroxide op de diapauze-desactivering van labo-geproduceerd cystenmateriaal

CODE cystenmonster	PEROXIDE-BEHANDELING			ONTLUIKING**	
	concentratie (%)	duur (min)	prehydratatie (+ = uitgevoerd)	(%)	s
LVD 821 - droge cysten				31,0 ± 14,0 <sup>a</sup>	
	3*	12		47,0 ± 4,0 <sup>b</sup>	
LVD 822 - droge cysten				20,8 ± 1,9 <sup>a</sup>	
	3*	5		39,4 ± 10,8 <sup>b</sup>	
	3*	10		41,4 ± 14,2 <sup>b</sup>	
	3*	20		37,1 ± 17,3 <sup>b</sup>	
	3*	30		42,9 ± 11,1 <sup>b</sup>	
	3*	60		52,0 ± 9,0 <sup>c</sup>	
	3*	120		51,2 ± 8,5 <sup>c</sup>	
	3*	15		30,4 ± 3,8 <sup>x</sup>	
	3*	15	+	35,8 ± 9,0 <sup>x</sup>	
	(15 min O3)			(23,8 ± 6,7) <sup>a</sup>	
	(15 min O3)		+	(20,3 ± 9,3) <sup>a</sup>	
LVD 827 - droge cysten				10,1 ± 2,9 <sup>a</sup>	
	5	5	+	14,4 ± 3,9 <sup>b</sup>	
LVD 831 - droge cysten				58,1 ± 4,8 <sup>a</sup>	
	5	5	+	64,1 ± 2,5 <sup>b</sup>	
GSL 831 - NaCl-pekkel				28,8 ± 4,3 <sup>a</sup>	
	5	5	+	49,8 ± 3,7 <sup>b</sup>	
GSL 832 - NaCl-pekkel				41,3 ± 4,6 <sup>a</sup>	
	5	5	+	52,8 ± 5,4 <sup>b</sup>	
GSL 833 - NaCl-pekkel				44,8 ± 5,6 <sup>a</sup>	
	5	5	+	22,3 ± 1,6 <sup>b</sup>	

CODE cystenmonster	PEROXIDE-BEHANDELING			ONTLUIKING** (%) . s
	concentratie (%)	duur (min)	prehydratatie (+ = uitgevoerd)	
<b>GSL 841 - NaCl-pekel</b>				
	3	10		0,6 ± 0,7 <sup>a</sup>
	3	30		18,0 ± 2,8 <sup>b</sup>
	3	60		77,4 ± 6,9 <sup>c</sup>
	3			74,8 ± 3,3 <sup>c</sup>
<b>GSL 841 - NaCl pikel + 2x4 w/ -25 °C</b>				
	3	10		38,5 ± 4,2 <sup>a</sup>
	3	30		56,4 ± 4,8 <sup>b</sup>
	3	60		85,6 ± 8,9 <sup>c</sup>
	3			85,0 ± 4,1 <sup>c</sup>
<b>GSL 861 - NaCl-pekel</b>				
	5	5	+	26,5 ± 5,7 <sup>a</sup>
				71,8 ± 5,7 <sup>b</sup>
<b>GSL 881 - 75 g/l NaCl</b>				
	5	15	+	3,9 ± 2,1 <sup>a</sup>
	5	30	+	59,1 ± 3,7 <sup>b</sup>
	5			51,0 ± 5,5 <sup>b</sup>
	10	15	+	61,3 ± 3,4 <sup>c</sup>
<b>GSL 881 - NaCl-pekel</b>				
	5	15	+	3,0 ± 3,0 <sup>a</sup>
	5	30	+	17,0 ± 4,0 <sup>b</sup>
	5			18,0 ± 5,0 <sup>b</sup>
	10	15	+	20,1 ± 6,2 <sup>b</sup>
<b>GSL 881 - 1 maand NaCl-pekel</b>				
	5	15	+	1,7 ± 1,2 <sup>a</sup>
				48,8 ± 6,5 <sup>b</sup>
<b>TIE 821 - droge cysten</b>				
	5	5	+	41,7 ± 5,4 <sup>a</sup>
				78,1 ± 4,4 <sup>b</sup>
<b>MAC 832 - NaCl-pekel</b>				
	5	5	+	41,1 ± 4,9 <sup>a</sup>
				34,2 ± 5,2 <sup>b</sup>
<b>SFB 852 - NaCl-pekel</b>				
	5	5	+	40,9 ± 4,1 <sup>a</sup>
				46,4 ± 10,0 <sup>a</sup>

\* afkomstig van apotheek

\*\* waarden met eenzelfde letter zijn niet significant verschillend

Aangezien Bogatova en Schmakova (1980) atomaire zuurstof identificeren als de actieve component voor de inhibitie van de diapauze, hebben we in een preliminaire proef nagegaan of ozon-behandeling ook effectief kan zijn. De resultaten bleken echter niet significant verschillend te zijn van de blanco.

Teneinde toch meer gegevens te kunnen inzamelen betreffende de werking van  $H_2O_2$  op het diapauze-proces, hebben we een uitgebreid onderzoek aangevat met cysten-materiaal afkomstig uit (semi-) natuurlijke produkties (Tabel 35).

In eerste instantie hebben we getracht het optimale activiteitsgebied van  $H_2O_2$  vast te leggen. De resultaten van dit onderzoeksdeel zijn samengevat in tabellen 47, 48, en figuur 49.

De grafieken tonen aan dat de invloed van het peroxide kwantitatief is : bij lage concentraties is een langere incubatietijd nodig dan bij hoge concentraties om eenzelfde ontluiking te garanderen. De statistisch significante interacties zoals berekend voor de onderzochte rassen in tabel 47 en 48 tonen aan dat de invloed van de concentratie afhankelijk is van de gebruikte incubatietijden en omgekeerd. Voor de cysten van Kazakstan kan men niet uitmaken of uiteindelijk eenzelfde maximale waarde bereikt wordt bij verschillende incubatietijden. Na 15 min stijgt immers de ontluikbaarheid nog significant ten overstaan van vijf minuten voor alle onderzochte concentraties (Fig. 49). Voor de Peru cysten daarentegen bereikt de incubatie in een 10 %  $H_2O_2$ -oplossing een maximaal effect na 5 min. Voor beide rassen is het concentratie-effect vooral uitgesproken indien de behandeling minder dan 5 min bedraagt.

Wanneer echter *Artemia* cysten geïncubeerd worden bij diverse  $H_2O_2$ -concentraties gedurende 5 min (tabel 48), treden wel significante verschillen op voor de diverse concentraties. Opnieuw neemt de diapauze-desactivering beduidend toe in het interval 0-5 % bij PIU en SFB. Hogere concentra-

Tabel 47 : Activiteitsgebied van peroxide voor cysten afkomstig uit Kazakstan en Piura (waarden uitgedrukt in ontluikingspercentage met standaardafwijking)

H2O2 - oplossing	Ontluikingspercentage na een incubatieduur van		
	1 min	5 min	15 min
blanco KAZ	18,4 ± 4,9		
1 Z	31,1 ± 5,9	36,2 ± 5,5	48,4 ± 4,4
5 Z	50,4 ± 5,4	64,4 ± 5,2	75,1 ± 5,8
10 Z	62,2 ± 5,1	69,1 ± 4,9	76,0 ± 3,6
<b>F interactie = 3,68</b>			
blanco PIU	20,1 ± 5,3		
1 Z	37,9 ± 4,5	58,6 ± 6,0	73,8 ± 5,8
5 Z	57,1 ± 5,2	67,6 ± 6,4	75,2 ± 7,4
10 Z	63,3 ± 6,9	71,4 ± 4,9	70,2 ± 5,7
<b>F interactie = 14,677</b>			

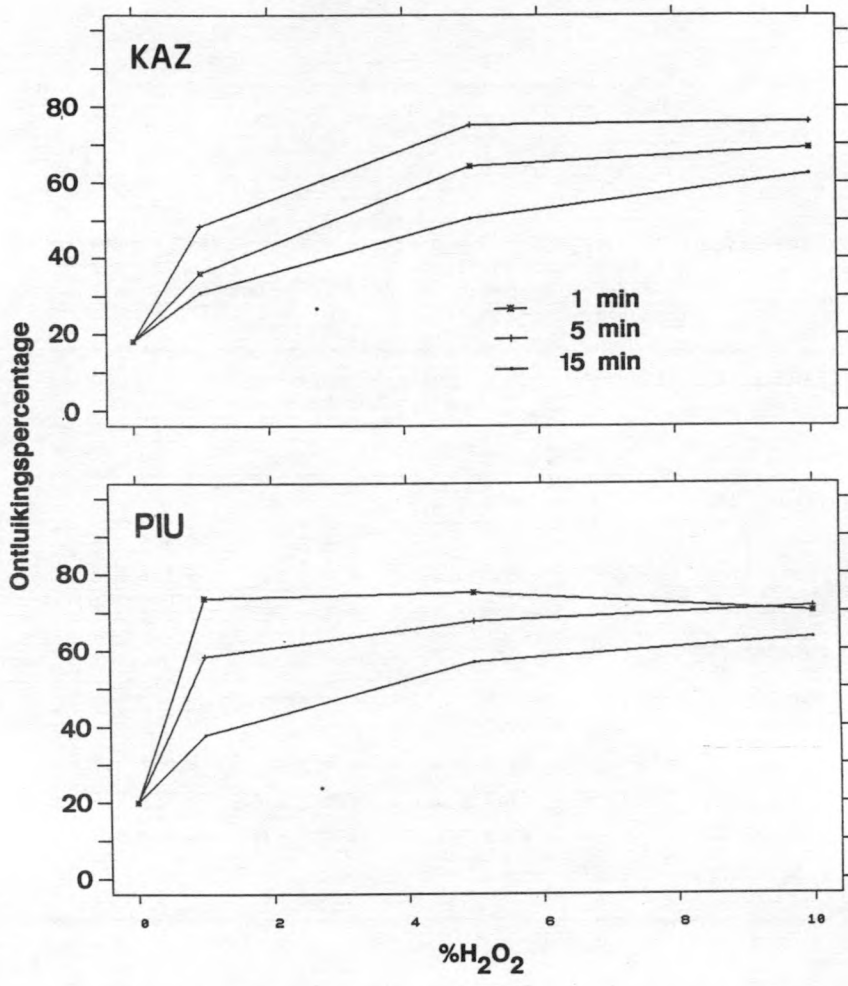


Fig. 49 : Effect van peroxide op de ontluikbaarheid van cysten afkomstig van Kazakstan en Peru.

Tabel 48 : Invloed van de concentratie aan peroxide op de ontluikbaarheid van *Artemia* cysten afkomstig van diverse geografische oorsprong (waarden uitgedrukt in ontluikingspercentage met standaardafwijking)

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - concentratie (%) gedurende 5 min behandeling	<i>Artemia</i> ras		
	SFB	VT	PIU
0	53,8 ± 7,0	58,7 ± 6,3	21,3 ± 3,7
0,5	72,7 ± 4,5	72,9 ± 4,4	58,0 ± 5,0
1	78,3 ± 4,8	-	-
5	89,0 ± 4,1	40,9 ± 4,9	85,4 ± 4,5
10	80,9 ± 6,7	-	-
27	79,5 ± 8,2	-	72,4 ± 5,4
<b>F interactie</b>	<b>38,6</b>	<b>92,8</b>	<b>347,6</b>



ties resulteren echter in significant lagere ontluikingscijfers. Blijkbaar is er een optimum-concentratie voor maximale inhibitie van de diapauze. Een andere mogelijkheid is dat er een overdosering optreedt, en bijgevolg letale omstandigheden gecreëerd worden (ten gevolge van een extreme oxidatieve werking?). Dit wordt ook gesuggereerd door de resultaten bekomen met het VT ras : het negatieve effect resulteert in een finale ontluiking die ongeveer 20 % lager ligt dan de blanco-waarde van 58,7 % zijnde de waarde voor reeds quiëscente cysten. De mortaliteit bij de (quiëscente ?) embryo's is dus beduidend hoger dan het aantal cysten waarvan de diapauze opgeheven werd. Opmerkelijk is dat de gevoeligheid van dit VT ras veel hoger is dan bij de andere onderzochte rassen : een 5 %  $H_2O_2$ -medium is hier reeds té geconcentreerd terwijl bij de andere rassen die waarde 10 % of meer bedraagt.

Tenslotte willen we nog de aandacht vestigen op het feit dat de 5 % waarde bekomen met het Peru ras verschilt tussen tabel 47 en 48. Dergelijke verschillen werden regelmatig geobserveerd, niettegenstaande de experimenten steeds onder standaardomstandigheden uitgevoerd werden. Die variabiliteit in effect van peroxidebehandeling binnen eenzelfde ras bemoeilijkt het exact vastleggen van het activiteitsgebied gezien hierdoor de waarden uit diverse experimenten niet samen getabelleerd kunnen worden per ras. Hiervoor is er geen duidelijke verklaring. Zo leverden analyses van de activiteit van de gebruikte peroxideproducten geen verschillen op (de activiteit daalde zelfs niet tijdens de behandeling).

Deze problematiek in verband met variabiliteit heeft ertoe geleid dat het effect van enkele incubatie-omstandigheden nader onderzocht werd :

- een voorafgaandelijke incubatie in zeewater gedurende maximaal 3 u beïnvloedt op een significante wijze de peroxide-behandeling bij de onderzochte *Artemia* cysten (Tabel 49). Een prehydratatieperiode van 15 min is

Tabel 49 : Effect van prehydratatie bij kamertemperatuur op de diapauze-desactivering door middel van peroxide (5 ‰ - 5 min) (waarden uitgedrukt in ontluikingspercentage met standaardafwijking)\*

Prehydratatie- periode	<i>Artemia ras</i>		
	VT	PIU	SFB
blanco	29,9 ± 4,8 <sup>a</sup>	15,0 ± 4,1 <sup>a</sup>	53,8 ± 7,0 <sup>a</sup>
15 sec	-	56,3 ± 11,4 <sup>b</sup>	92,1 ± 4,4 <sup>b</sup>
30 min	74,6 ± 7,1 <sup>b</sup>		92,7 ± 5,8 <sup>b</sup>
60 min	79,2 ± 6,6 <sup>b,c</sup>		90,9 ± 5,7 <sup>b</sup>
90 min	83,2 ± 4,5 <sup>b,c</sup>		87,0 ± 4,2 <sup>b,c</sup>
120 min	85,8 ± 6,2 <sup>c</sup>	85,4 ± 4,5 <sup>c</sup>	89,0 ± 4,1 <sup>b,c</sup>
180 min	86,1 ± 4,1 <sup>c</sup>		
240 min		88,1 ± 6,1 <sup>c</sup>	82,3 ± 4,9 <sup>c</sup>
<b>F interactie</b>	<b>118,8</b>	<b>194,0</b>	<b>65,8</b>

\*waarden met eenzelfde letter zijn niet significant verschillend

reeds voldoende om een maximaal effect te bereiken bij SFB; voor VT en PIU is ongeveer 2 u vereist. Te lange incubaties ( $> 4$  u) veroorzaken een negatief effect. Dit kan een gevolg zijn van de nefaste inwerking van het oxydans op de gestarte embryogenese. Incubatietesten met VT bij verschillende temperaturen binnen het interval 4 - 25 °C tonen aan dat een prehydratatie slechts maximaal effectief is bij temperaturen hoger dan 15 °C;

- de pH van het medium tijdens de peroxide-behandeling heeft een kleine maar significante invloed op de desactivering van Peru cysten : bij een pH van 3,5 tijdens de peroxide-behandeling (0,5 % - 5 min) stijgt de ontluikbaarheid tot 84,5 %  $\pm$  3,0, terwijl bij een pH van 7 of van 10,5 waarden van respectievelijk 77,5  $\pm$  6,0 en 78,1 %  $\pm$  3,5 opgetekend worden;
- de cystendensiteit tijdens de behandeling, heeft geen invloed op het inhibitieproces door middel van peroxide : verschillende kwantiteiten Peru cysten (0,5; 5 en 50 g/l), geïncubeerd in een 5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oplossing gedurende 5 min, geven praktisch analoge ontluikingen (respectievelijk 82 %, 73 %, en 81 %).

Teneinde de economische toepasbaarheid te evalueren van het effect van peroxide-behandeling hebben we een stockeringsproef uitgevoerd met VT cysten, behandeld met 5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gedurende 5 min (Tabel 50) : voor vijf van de zes onderzochte omstandigheden treedt geen significante daling op van de ontluikbaarheid. Enkel bij de cysten bewaard in pekkel gedurende zes maanden wordt een lichte daling (-7 %) geobserveerd ten opzichte van de vers behandelde cysten. Aangezien er positieve effecten optreden door de stockering zelf en door hibernatie (bij de pekkel-gesuspendeerde cysten) moeten deze resultaten anders geïnterpreteerd worden : wanneer de maximale waarden per kolom vergeleken worden met de waarden na zes maanden stockering treedt er steeds een daling op van 10 à 15 % bij de cysten bewaard bij 20 °C, een daling die kan verwacht worden bij dergelijke sub-

Tabel 50 : Invloed van stockering onder diverse omstandigheden op de ontluikbaarheid van VT cysten behandeld met peroxide (5 % - 5 min)  
(waarden uitgedrukt als percentages met standaardvariatie)

Stockeringstijpe	NaCl-pekcl		gedroogd			
			lucht		vacuüm	
Stockeringstemperatuur	-25 °C	20 °C	-25 °C	20 °C	-25 °C	20 °C
Stockeringstperioel (blanco : zonder H2O2 = 22,8 ± 4,7)						
0 maanden	71,8 ± 5,6		71,8 ± 13,7			
1 maand	83,6 ± 6,3	78,8 ± 2,9	76,5 ± 6,6	76,5 ± 5,5	73,3 ± 3,5	76,6 ± 6,3
3 maanden	86,3 ± 6,6	79,3 ± 4,4	76,5 ± 3,3	80,9 ± 4,5	80,9 ± 3,9	80,1 ± 7,5
6 maanden	86,1 ± 5,1	64,5 ± 7,5	81,2 ± 3,7	69,5 ± 5,7	80,4 ± 5,3	68,8 ± 6,6

optimale bewaring. Als conclusie mag dan ook gesteld worden dat de diapauze-inhibitie door middel van  $H_2O_2$  behouden blijft voor zover de stockeringsomstandigheden optimaal gehouden worden.

Algemeen mag besloten worden dat de behandeling met peroxide een zeer effectieve methode is om de diapauze bij *Artemia* cysten te doorbreken. Bovendien lijken alle onderzochte rassen (met uitzondering voor het labo-geproduceerd SFB materiaal) in meer of mindere mate gevoelig te zijn voor deze behandeling (zie ook tabel 51).

Tabel 51 : Effect van peroxide-behandeling op de diapauze-desactivering van enkele commerciële cysten-monsters

Ras + oogstjaar	Ontluikingspercentage	
	blanco	na $H_2O_2$ -behandeling
Galerazamba Colombië, 1987	2	73
Siberië, U.S.S.R., 1987	33	78
La Mala, Spanje, 1988	2	76
Colan, Peru, 1988	12	53

Steunend op de bekomen resultaten mag een behandeling met 5 %  $H_2O_2$  gedurende 15 min als optimaal beschouwd worden indien een prehydratatie uitgevoerd is gedurende 2 u bij  $\pm 25$  °C. Wel treden er (lichte) variaties op tussen de populaties wat de optimale combinatie voor concentratie-tijdsduur betreft.

Op welke wijze de  $H_2O_2$ -behandeling het diapauze-proces beïnvloedt kan niet afgeleid worden uit onze resultaten. Elektronenmicroscopisch onderzoek toonde aan dat de behandeling bij concentraties lager dan 5 % de schaal niet zichtbaar aantastte. Een opmerkelijk gegeven is de vondst

van Van der Linden (persoonlijke mededeling) dat  $H_2O_2$  de noodzaak aan lichtinductie van het ontluikingsproces blijkt op te heffen. Dit kan misschien in verband gebracht worden met de hypothese dat lichtquanta aangewend worden om oxydatie-reductie processen in de embryo's te catalyseren via de captatie door haempigmenten (Van der Linden *et al.*, 1986). Ook Bogatova en Schmakova (1980) beweren dat het  $H_2O_2$ -effect terug te brengen is tot een catalyseren van het oxydatie-reductieproces waarbij trehalose omgezet wordt in glycerol en glycogeen. In dit verband hebben we in het volgende hoofdstuk het effect van andere oxydantia nagegaan op de toestand van diapauze.

#### Effect van $KMnO_4$ en NaOCl

Uit tabel 52 blijkt dat NaOCl duidelijk een positieve invloed heeft op de ontluiking van cysten uit Kazakstan, Piura en Vung Tau : incubatie gedurende 5 min in een 1 %-oplossing na een prehydratatie van 2 u veroorzaakt een stijging van respectievelijk 25 %, 36 % en 16 %. De variantie-analyses wijzen verder uit dat het resultaat van de behandeling afhankelijk is van de concentratie aan NaOCl. Het maximaal effect wordt bereikt met de 1 %-oplossing bij de drie onderzochte *Artemia* populaties. Bij Kazakstan treedt er wel een negatief effect op bij de 3 %-concentratie, terwijl bij de andere rassen de ontluiking niet significant gewijzigd wordt.

Concentraties van 0,5 % NaOCl en hoger hebben eveneens een decapsulatie van de cysten tot gevolg. Volgens Vanhaecke en Sorgeloos (1983) is de verhoogde ontluikbaarheid via decapsulatie een gevolg van een verminderde noodzaak aan energie om de schaalstructuren te doorbreken waardoor energie-arme embryo's toch kunnen uitkomen (zie ook literatuurstudie). Daar voorafgaande experimenten met dit cystenmateriaal duidelijk een diapauze-desactivering aantonen (hibernatie,  $H_2O_2$ -behandeling), zijn we geneigd te veronderstellen dat niet een energie-kwestie (alleen) aan de basis ligt van de betere resultaten bekomen na decapsu-

Tabel 52 : Effect van diverse NaOCl-concentraties op de diapauze-desactivering van cysten afkomstig uit Kazakstan, Peru en Viëtnam  
(waarden zijn uitgedrukt in ontluikingspercentages met standaardafwijkingen)\*

CONCENTRATIE AAN NaOCl (Z)	KAZ	PIU	VT
0 (blanco)	18,4 ± 4,8 <sup>a</sup>	20,1 ± 5,3 <sup>a</sup>	58,7 ± 6,3 <sup>a</sup>
0,005 Z	14,7 ± 4,7 <sup>a</sup>	25,1 ± 7,0 <sup>a,b</sup>	65,4 ± 7,5 <sup>b</sup>
0,05 Z	24,8 ± 6,0 <sup>b,c</sup>	32,0 ± 8,5 <sup>b,c</sup>	61,9 ± 6,5 <sup>a,b</sup>
0,5 Z	26,6 ± 11,5 <sup>c</sup>	33,7 ± 6,7 <sup>c</sup>	72,2 ± 4,7 <sup>c</sup>
1 Z	43,5 ± 6,6 <sup>d</sup>	56,0 ± 7,5 <sup>d</sup>	74,0 ± 11,8 <sup>c</sup>
3 Z	19,6 ± 4,6 <sup>a,b</sup>	54,5 ± 9,1 <sup>d</sup>	75,4 ± 3,1 <sup>c</sup>
5 Z	15,2 ± 5,7 <sup>a</sup>		
<b>F interactie</b>	<b>36,595</b>	<b>40,320</b>	<b>9,188</b>

\*waarden met eenzelfde letter zijn niet significant verschillend

latie, maar wel de inhibitie van de diapauze-toestanden. Wat de invloed van  $\text{KMnO}_4$  betreft, blijkt uit de resultaten in tabel 53 dat enkel het Peru ras significant beter ontluikt na behandeling (+ 26 % voor 1 min/0,05 %  $\text{KMnO}_4$ ). Ook wanneer de cysten geïncubeerd worden bij diverse pH's treden er geen verschillen in effect op.

De resultaten van deze experimenten wijzen uit dat andere oxydantia, en dan vooral NaOCl,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (gedeeltelijk) kunnen vervangen als diapauze-inhibitor. Toch is het effect, met uitzondering voor de NaOCl behandeling van VT cysten, altijd geringer. Eventueel is de penetratie-mogelijkheid van de  $\text{OCl}^-$  en  $\text{MnO}_4^-$  ionen beperkter vanwege de selectieve doorlaatbaarheid van het buitenste cuticulair membraan. Wanneer echter een peroxide- en een hypochloriet-behandeling (of omgekeerd) na elkaar uitgevoerd worden (Tabel 54), komt men tot de vaststelling dat beide technieken elkaar aanvullen wat de inhibitie van de diapauze

Tabel 53 : Effect van diverse  $KMnO_4$ -concentraties en incubatieperiodes op de diapauze-desactivering van cysten afkomstig van Kazakstan, Peru en Vietnam (waarden zijn uitgedrukt in ontluikingspercentages met standaardafwijking)

CONCENTRATIE AAN $KMnO_4$ (%)		INCUBATIE-PERIODE				
		1 min	5 min	15 min		
KAZ	0,0		$18,8 \pm 4,8$			
	0,05		$15,8 \pm 4,0$			
	0,5	$18,1 \pm 4,4$	$21,9 \pm 5,0$	$15,6 \pm 6,4$		
	1,0		$16,2 \pm 4,7$			
F interactie = 2,440 (variantie-analyse met 1 factor blanco inbegrepen) Homogene groepen (Duncan, $\alpha = 0,05$ ) :						
	<u>15,6</u>	<u>15,8</u>	<u>16,2</u>	<u>18,1</u>	<u>18,4</u>	<u>21,9</u>
F interactie = 39,491 (variantie-analyse met 1 factor blanco inbegrepen) Homogene groepen (Duncan, $\alpha = 0,05$ ) :						
	<u>28,3</u>	<u>20,5</u>	<u>30,3</u>	<u>34,4</u>	<u>38,3</u>	<u>46,8</u>
VT	0,0		$58,7 \pm 6,3$			
	0,005		$47,5 \pm 3,8$			
	0,05	$54,7 \pm 6,8$	$56,9 \pm 6,7$	$54,3 \pm 5,4$		
	0,5		$51,2 \pm 6,8$			
F interactie = 3,634 (variantie-analyse met 1 factor blanco inbegrepen) homogene groepen (Duncan $\alpha = 0,05$ ) :						
	<u>47,5</u>	<u>51,2</u>	<u>54,3</u>	<u>54,7</u>	<u>56,9</u>	<u>58,7</u>



betreft. Voor alle onderzochte cystenmonsters geeft de gecombineerde behandeling significant hogere ontluikingen dan de afzonderlijke behandelingen. De volgorde van uitvoering van de incubaties is bovendien belangrijk : NaOCl-behandeling, onmiddellijk gevolgd door de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-techniek, resulteert in beduidend betere inhibitie van de diapauze dan wanneer de omgekeerde combinatie toegepast wordt.

Tabel 54 : Gecombineerd effect van peroxide en hypochloriet op de diapauze-desactivering

RAS	BEHANDELING	ONTLUIKING*	
		Z	s
KAZ	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (5 % à 5 min)	44,2 <sup>a</sup>	± 7,3
	id + NaOCl (0,5 % à 5 min)	58,6 <sup>b</sup>	± 5,6
	omgekeerde combinatie	63,7 <sup>b</sup>	± 5,3
PIU	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 % à 5 min)	56,2 <sup>a</sup>	± 5,3
	id + NaOCl (0,05 % à 5 min)	63,9 <sup>b</sup>	± 3,8
	omgekeerde combinatie	82,5 <sup>c</sup>	± 7,7
VT	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 % à 5 min)	38,8 <sup>a</sup>	± 6,0
	id + NaOCl (2 % à 5 min)	63,1 <sup>b</sup>	± 6,8
	omgekeerde combinatie	70,0 <sup>c</sup>	± 6,0

\*waarden met eenzelfde letter zijn niet significant verschillend

#### Gecombineerd effect van diapauze-desactiveringstechnieken

In aansluiting op de resultaten bekomen met de oxydantia worden in deze experimenten verschillende behandelingen simultaan uitgetest op cystenmateriaal afkomstig van GSL, LVD, en MAL (Tabel 55 en 56). De resultaten tonen aan dat er een interactie bestaat tussen de diverse diapauze-inhibitoren. Alhoewel U.V.-behandeling geen direct resultaat oplevert bij LVD, beïnvloedt ze wel de peroxide-techniek zodat een significant hogere ontluiking bekomen wordt. Bij de Kenyaanse cysten stimuleert een extra deshydratie/hydratatie-cyclus opnieuw beduidend de desactivering

Tabel 55 : Gecombineerd effect van diapauze-desactiverings-technieken op de ontluikbaarheid van *Artemia* cysten geproduceerd onder gecontroleerde omstandigheden

Ras + code	Behandeling	Ontluiking	
		Z	s
LVD 821	Blanco (gedroogd)	31,0	14,0
	U.V. (2 u à 30 W) (1)	29,8	12,5
	H2O2 (12 min à 3 Z) (2)	47,0	4,0
	(1) + (2)	56,4	12,7
MAL 1	NaCl-pekkel (1)	11,5	1,9
	H2O2 (30 min à 3 Z) (2)	16,8	5,5
	(1) + (2)	18,3	3,6
	(D/H)1 (3)	27,0	5,1
	(3) + (2)	58,4	4,2
MAL 2	NaCl-pekkel (1)	56,2	3,7
	H2O2 (30 min à 3 Z) (2)	62,2	5,7
	(1) + (2)	65,8	7,0
	(D/H)1 (3)	69,5	7,1
	(3) + (2)	80,0	7,3

Tabel 56 : Gecombineerd effect van diapauze-desactiverings-technieken op de ontluikbaarheid van GSL 841 cysten

Diapauze - behandelingen	Onbehandelde cysten		Gehiberneerde cysten (2x4 w bij -25 °C)	
	Ontluiking		Ontluiking	
	z	s	z	s
Dehydratie in NaCl-pekkel	0,6	0,7	38,5	4,2
Dehydratie in MgCl <sub>2</sub> -pekkel	2,7	0,9	43,3	3,4
Drogen : 24 u/35 °C	11,0	2,4	55,4	7,2
dehydratie/hydratatie 3 cyclussen	4,7	1,5	40,1	5,5
U.V. : 6 u/30 W	4,2	1,1	48,9	3,7
Hibernatie				
2x4 w/-25 °C	38,5	4,2	-	-
12 w/-25 °C	-	-	42,1	6,1
24 w/-25 °C	-	-	71,1	6,3
Peroxide				
10 min à 3 z	18,0	2,8	56,4	4,8
30 min à 3 z	77,4	6,9	85,6	8,9
60 min à 3 z	74,8	3,3	85,0	4,1

van de diapauze door middel van  $H_2O_2$ . Bij de GSL cysten blijkt de U.V.-behandeling meer effectief wanneer de cysten vooraf een koudeperiode doorgemaakt hebben. Alhoewel de peroxide-behandeling in een hogere toename resulteert bij de niet ingevroren cysten (+ 77 %), resulteert de combinatie van hibernatie- en peroxide-behandeling in de hoogste ontluiking (86 % in plaats van 77 %). Dit geldt ook, maar in veel geringere mate, voor hibernatie en drogen.

Uit deze gegevens kan dus besloten worden dat sommige technieken voor diapauze-inhibitie niet een alternatief effect hebben, maar eerder een synergistische reactie tot gevolg hebben.

#### Invloed van anoxie

De resultaten van het onderzoek naar de invloed van anoxie op diapauze-inhibitie zijn weergegeven in tabel 57. Hieruit volgt dat, afhankelijk van het *Artemia* ras, er een verschillend effect optreedt na drie maanden stockering onder anoxische omstandigheden. Bij de Peru cysten stijgt de ontluiking met 40 %, terwijl bij Vietnam cysten geen significante wijzigingen optreden en bij Kazakstan zelfs een duidelijk negatief effect waargenomen wordt.

Tabel 57 : Invloed van de stockering onder anoxische omstandigheden (3 maanden) op de diapauze-desactivering van cysten afkomstig van Kazakstan, Peru en Vietnam

ras	blanco		ontluiking	
	%	s	%	s
KAZAKSTAN	15,6 ±	4,8	0,9 ±	0,9
PIURA	19,1 ±	4,3	58,1 ±	6,0
VUNG TAU	59,8 ±	15,2	63,9 ±	6,4

#### V.2.4. Algemene besluiten

Uit dit deelonderzoek met betrekking tot de ontluikingskwaliteit van cystenmateriaal geproduceerd in het standaard recirculatiesysteem komt duidelijk tot uiting dat de studie van de cryptobiotische toestand bij *Artemia* een complexe materie is. Alhoewel het produktiesysteem geschikt is om adulte populaties in stand te houden en om maximale ovipare reproductie te verkrijgen, blijkt dit niet zomaar te leiden tot de produktie van nakomelingen met een goede ontluikingskwaliteit. Zo interfereren in eerste instantie immers produktie-omstandigheden met de cryptobiotische toestand van *Artemia* cysten.

Aan de hand van de proefresultaten en de kritisch uitgevoerde literatuurstudie kunnen we vele factoren aanduiden die een invloed hebben op de ontluikbaarheid van de geëncysteerde embryo's. Deze factoren kunnen gerangschikt worden onder zes groepen (Fig. 50) :

- genotypische factoren
- kweekomstandigheden
- reproductiefactoren
- diapauze-inhibitoren
- exploitatie-factoren
- ontluikingsomstandigheden

Zoals aangeduid in figuur 50 is overlapping en interactie tussen deze groepen factoren mogelijk tijdens de verschillende fasen van het reproductieproces. Het diapauze-proces speelt hier blijkbaar de sleutelrol. Dit is niet verwonderlijk daar dit proces in feite een heel belangrijke rol vervult voor de overleving van de populatie tijdens tijdelijk ongeschikte biotoopomstandigheden. Bovendien is het een geschikte strategie van de levenscyclus om de populatie-ontwikkeling te synchroniseren met de biotoopwijzigingen. In dit verband lijkt het ons evident dat het diapauze-proces en/of de stopzetting ervan geadapteerd is/zijn aan de lokale omgeving. Dit kan dan geleid hebben tot rasspecifieke eigenschappen, b.v. met betrekking tot de sensitivi-

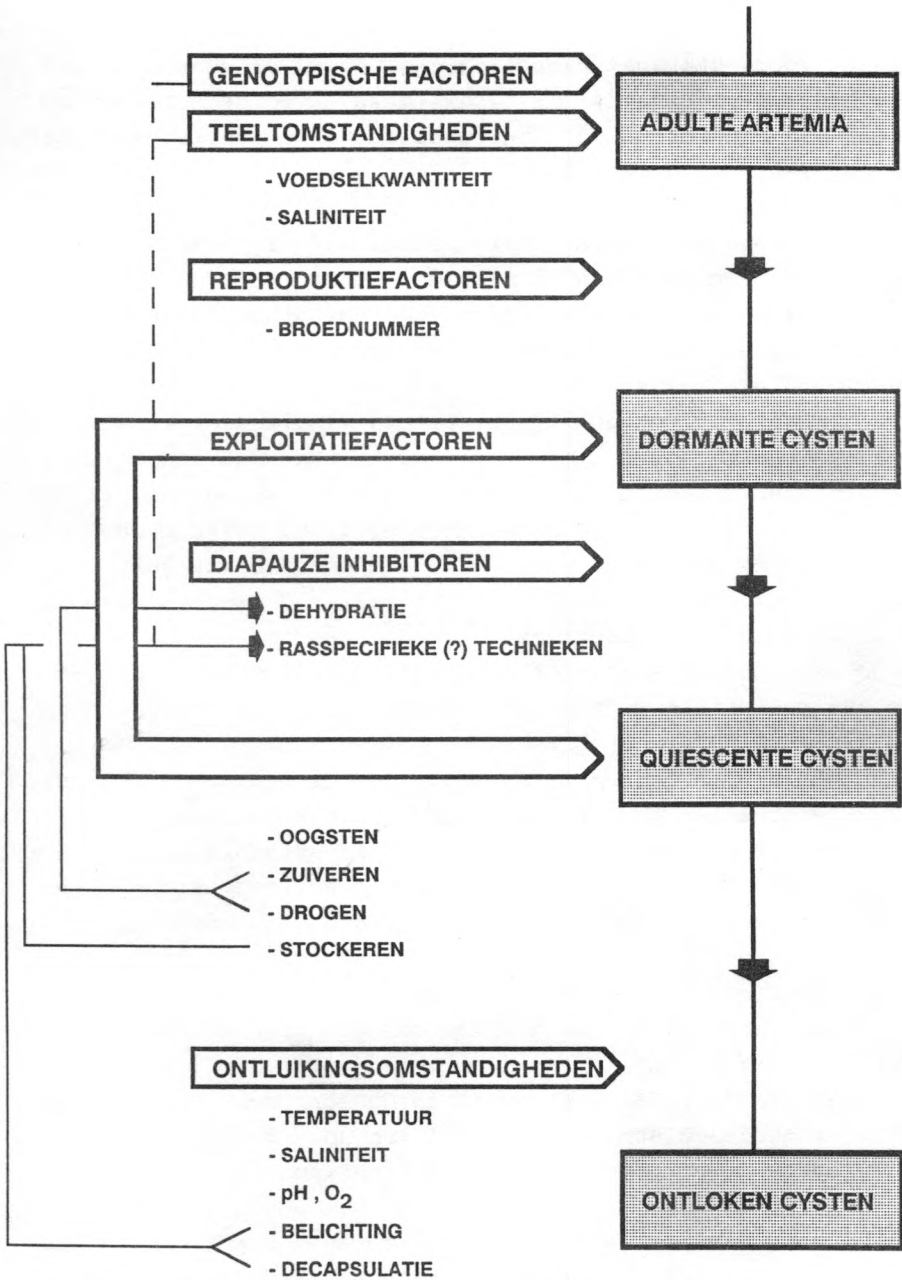


Fig. 50 : Mogelijke interacties van groepen factoren op de ontlukbaarheid van *Artemia* cysten.

viteit voor diapauze-desactivering. Daar er weinig rechtstreekse bewijskracht is voor deze hypothese blijft de vraag in hoeverre de rasspecificiteit genotypisch of fenotypisch vastgelegd is.

De inter-populatie verschillen wat diapauze betreft, kunnen op twee manieren verklaard worden : ofwel is het fundamentele, biochemisch proces dat de diapauze induceert rasspecifiek, ofwel bestaan er verschillende gradaties waarmee diapauze kan intreden (= variaties in intensiteit van diapauze). De eerste hypothese heeft waarschijnlijk weinig waarde daar men kan verwachten dat het causale mechanisme voor diapauze-instelling bij cysten universeel is binnen het genus *Artemia* en wellicht zelfs binnen de Phyllopoden. Bovendien werkt b.v. de peroxide-techniek als een universele inhibitor : voor alle onderzochte *Artemia* populaties die gedesactiveerd konden worden, was ook de  $H_2O_2$ -behandeling effectief. Anderzijds zijn er verschillende argumenten die wijzen op verschillen in gevoeligheid om de diapauze-toestand op te heffen :

- we hebben kunnen aantonen dat binnen hetzelfde ras verschillen kunnen optreden in diapauze-desactivering die te wijten zijn aan productieomstandigheden zoals voedselbeschikbaarheid en zoutgehalte. Dit betekent dat naargelang de variaties die optreden in het biotoop een verschillende intensiteit van diapauze kan ingesteld worden binnen elk ras. Of met andere woorden een verschil in resistentie ten opzichte van diapauze-desactivering;
- afhankelijk van het moment in de reproductieve periode (= fysiologische toestand ?) van het organisme worden cysten geproduceerd die verschillen in ontluikbaarheid;
- voor diverse diapauze-inhibitoren blijkt er een kwantitatief effect te bestaan en is de desactivering niet een gewone 'on/off'-reactie. Voorbeelden hiervan zijn de graad van dehydratie, de hibernatieperiode, en de dosering/tijd-interactie bij de oxydantia.

- Binnen hetzelfde cystenlot zijn er dus embryo's die vlugger hun diapauze-toestand opgeven dan andere;
- hierbij aansluitend zijn de geobserveerde positieve effecten van de gecombineerde behandelingen. De gevoeligheid binnen één produktie van cysten kan dus verschillende vormen aannemen.

Wij zijn dan ook geneigd om de tweede hypothese te aanvaarden.

Terugkomend op de rasspecificiteit van diapauze, kan aangenomen worden dat, afhankelijk van het geografisch ras of species, er een verschillende minimale drempelwaarde bestaat voor diapauze-desactivering. Zo bijvoorbeeld is die drempelwaarde laag voor SFB populaties : onder optimale omstandigheden is een 'eenvoudige' dehydratie in pekeldurende 24 u reeds voldoende om maximale quiëscentie te veroorzaken. GSL *Artemia* daarentegen heeft een hogere drempelwaarde voor de inhibitie; daarom is dehydratie alleen onvoldoende en is b.v. hibernatie vereist. Op deze wijze kunnen dan de ontluikingsresultaten bekomen na droging van cysten van diverse rassen en geproduceerd onder analoge, optimale labo-omstandigheden (Tabel 58) verklaard worden.

Hoe deze hypothese zich vertaalt op cellulair vlak blijft onduidelijk. Interdisciplinair onderzoek (met medewerking van o.a. biochemici) op wel gedefinieerd materiaal is dan ook een vereiste om het fundamenteel proces van diapauze te ontrafelen.

De verschillen in sensitiviteit ten opzichte van diapauze-desactivering kunnen verband houden met specifieke variaties in de omstandigheden van het milieu en kunnen hierdoor een ecologisch belang hebben. Zo bevindt de SFB populatie zich in een relatief stabiel milieu; een lage drempelwaarde voor de inductie van quiëscentie verhindert aldus dat de geproduceerde cysten lange periodes moeten overbruggen (tengevolge van de afwezigheid van een krachtige diapauze-inhibitor) om te kunnen ontluiken. GSL cysten daarentegen vereisen wel een hoge drempelwaarde, en dus een



Tabel 58 : Ontluikbaarheid van gedroogde cysten van diverse geografische oorsprong, geproduceerd in standaard labo-omstandigheden (voor de proefomstandigheden : zie Dhert, 1986)

ras en herkomst	ontluiking		
	%	±	s
Lavalduc, Frankrijk	64,2	±	11,2
San Francisco Bay, V.S.A.	69,8	±	14,2
Manaure, Colombië	44,3	±	9,0
Buenos Aires, Argentinië	18,6	±	8,8
Great Salt Lake, V.S.A.	37,9	±	3,6
Tientsin, Volksrepubliek China	56,6	±	5,3

specifieke diapauze-inhibitor, daar anders de cysten reeds quiëscient zouden worden vóórdat de winter intreedt en met als gevolg het verlies van de 'investering' van de populatie voor het komende jaar of zelfs het verdwijnen van het ras !

Een praktisch voorbeeld van de eventuele ecologische betekenis van specifieke diapauze-inhibitoren zijn de inoculatie-experimenten van Vu Do Quynh *et al.* (1988) in Vietnam. Uit de resultaten kan men namelijk afleiden dat de Macau populatie verdween uit de kweekvijvers na het regen-seizoen terwijl de Great Salt Lake *Artemia* wel blijft gedijen. Dit zou kunnen verklaard worden door de optredende verschillen in de karakteristieken ter beëindiging van de diapauze, zoals hierboven beschreven.

Deze ecologische adaptatie zou ook van toepassing zijn voor rassen afkomstig van Lavalduc, Mono Lake, Chaplin Lake en diverse plaatsen in de USSR. Een analoge adaptatie is gerapporteerd voor *Daphnia* species (rassen uit gematigde klimaten hebben maximale inhibitie van de diapauze bij 4 °C, deze uit arctische gebieden vereisen lagere temperatu-

ren : Stross, 1971) en voor de copepood *Labidocera aestiva* (Marcus, 1979, 1980).

Het effect van de peroxidebehandeling lijkt geen ecologische verbanden te hebben. Doordat deze techniek echter bruikbaar lijkt voor alle rassen en bovendien de andere methodes voor desactivering overtreft (b.v. bij de onderzochte monsters van KAZ, PIU en VT een toename ten opzichte van hibernatie met respectievelijk 4 %, 30 % en 40 %), kunnen we veronderstellen dat peroxide een 'artificiële' inhibitor is die rechtstreeks inwerkt op het basisproces van de diapauze.

Tot slot kunnen we stellen dat heel wat literatuurgegevens in verband met ontluikbaarheid of ontluikingskwaliteit van *Artemia* cysten dienen te worden herzien in functie van de nieuw verworven kennis terzake. Ook voor de commerciële uitbating van *Artemia* cysten kunnen deze nieuwe gegevens leiden tot interessante toepassingen. De desactivering op grote schaal van b.v. Russische of Chinese cysten kan zo leiden tot een gevoelige toename van het markt-aanbod van pekelkreeftcysten.

### V.3. Biometrische kenmerken van de cysten

#### V.3.1. Materiaal en methoden

De onderzochte cystenmonsters werden eerst gezuiverd volgens de standaardmethode beschreven in hoofdstuk IV.3.4. en vervolgens ontschaald volgens de decapsulatie-techniek beschreven in V.1.5. Voor de bepaling van de diameter van ontschaalde cysten werden de monsters vooraf volledig gedecapsuleerd volgens de hoger beschreven methode. De naakte cysten werden tenslotte gedurende 3 u gehydrateerd in een standaard ontluikingsopstelling. Het incubatiemedium bestond uit zeewater verdund tot 10 g/l zoutgehalte en een 1 % lugol-oplossing : Vanhaecke (1983) toonde aan dat in dit medium enkel een fysische zwelling optreedt, zonder embryonale metabolische activiteit.

De eerste metingen werden uitgevoerd volgens de 'Coulter Counter'-methode van Vanhaecke *et al.* (1980) : hierbij wordt gebruik gemaakt van een 'Coulter Counter z-b' voorzien van een 'Channelyzer C-1000' en een 'P64X-Y' recorder. Eén uur voor de bepaling werd de cystensuspensie afgezeefd, gespoeld en geresuspendeerd in 50 ml incubatiemedium.

De apparatuur was als volgt ingesteld :

- diameter buisopening : 560  $\mu\text{m}$
- stroomsnelheid tussen de twee elektroden : instelling 4
- maat voor gevoeligheid van de versterkers : 16
- aantal kanalen waarboven telling geschiedt (B) : 10
- aantal kanalen of grootteklassen (K) : 100
- maximum aantal cysten dat in 1 kanaal kan ondergebracht worden : 400
- einde van de meting : wanneer een kanaal het maximum aantal cysten bereikt
- vacuümdruk :  $20 \cdot 10^3$  Pa

Bij gebrek aan een commercieel beschikbare standaard gebeurde calibratie met een specifiek cystenmonster (SFB 288-2596) met gekend volume ( $V_C$ ).

De 'threshold factor' (TF) kon dan steeds bepaald worden aan de hand van volgende formule

$$TF = \frac{V_C}{K_x + B}$$

met  $K_x$  = kanaalnummer van de gemiddelde waarde van de distributiecurve voor het calibratiemateriaal

De gemeten cystenvolumes worden automatisch in kanalen verdeeld en er ontstaat een normaal verdeelde frequentie-distributie. Daar het totaal aantal gemeten cysten gegeven wordt door de C-1000 integrator kan het gemiddelde, de variantie en de standaarddeviatie van de distributie berekend worden, evenals het individueel cystenvolume ( $V_n$ ) per kanaal ( $K_n$ ) :

$$V_n = (K_n \times \frac{K}{100} + B) \times TF$$

Vervolgens kan de cystendiameter (D) bepaald worden via de formule :

$$D = \sqrt[3]{\frac{6V}{\pi}}$$

De variantie van de diameter ( $\sigma_D^2$ ) kan als volgt berekend worden (Vanhaecke *et al.*, 1980) :

$$\sigma_D^2 = \sigma_V^2 \left( \frac{2}{9\pi V^2} \right)^{2/3} \text{ waarbij } \sigma_V^2 = \sigma^2 \cdot (TF)^2$$

Vermits echter gebleken is dat de statistische interpretatie der bekomen biometrische gegevens zeer subtiel is - de methode is zo nauwkeurig dat geringe verschillen ( $\pm 2 \mu\text{m}$ ) reeds als significant gedetecteerd worden - werden per

analyse slechts 3 metingen uitgevoerd van  $\pm 6\ 000$  cysten, wat geenszins de precisie van de resultaten schaadde (Vanhaecke en Sorgeloos, 1980a).

Wegens organisatorische redenen kon de 'Coulter Counter'-methode vanaf 1985 niet meer steeds toegepast worden; de cystendiameters werden vanaf toen manueel bepaald met behulp van een microscoop uitgerust met een meetoculair. Dezelfde inwendige standaard als gebruikt bij de Coulter Counter methode werd behouden voor de manuele metingen. Per analyse werden 'slechts' 100 cysten gemeten gezien het tijdrovende karakter van deze methode. Tijdens voorafgaandelijke testen met het standaardmateriaal kon aangetoond worden dat de reproduceerbaarheid der resultaten analoog was aan de eerste methode.

### V.3.2. Resultaten en bespreking

De gemiddelde afmetingen en standaardafwijkingen van de gehydrateerde, niet-behandelde en gedecapsuleerde cysten, evenals de schaaldikte van het geproduceerde materiaal zijn samengevat in tabel 59. Ter vergelijking worden tevens de corresponderende waarden van het moedermateriaal opgegeven.

Uit deze tabel komt duidelijk tot uiting dat er verschillen kunnen optreden tussen de waarden bekomen met geproduceerd cystenmateriaal en deze verkregen op het entmateriaal. De statistische interpretatie van de verschillen is echter zeer subtiel. Zoals hoger reeds is aangestipt, kunnen zeer kleine verschillen ( $\pm 2\ \mu\text{m}$ ) als significant beschouwd worden op het 0,01 niveau bij de 'Coulter Counter'-methode (Vanhaecke, 1983). Om deze reden werden geen statistische analyses uitgevoerd en zullen slechts tendenzen aangegeven worden.

Bij een eerste vergelijking van de resultaten valt onmiddellijk op dat voor de meeste rassen afwijkende waarden bekomen worden. Vergeleken met het moedermateriaal

Tabel 59 : Biometrische kenmerken van diverse cystenmonsters, geproduceerd onder gecontroleerde omstandigheden in het laboratorium

Cystencode	Diameter onbehandelde cysten		Diameter gedecapuleerde cysten		Schaaldikte µm
	µm	s	µm	s	
LVD 256	276,3	16,8	261,5	16,9	7,4
LVD 811	278,7	14,2	265,6	19,7	6,6
LVD 1980	272,8	17,2	256,2	18,3	8,4
LVD 822	264,3	13,8	251,9	16,1	6,2
LVD 821	263,0	14,8	250,3	15,3	6,3
LVD 831	276,9	20,4	251,9	13,5	12,5
LVD 827	254,9	10,5	236,7	7,5	9,1
LVD 828	253,5	8,5	233,9	8,4	9,8
LVD 829	248,1	11,4	235,2	10,6	6,5
GSL 185 - 0	253,2	13,4	240,7	11,6	6,3
GSL 811	253,5	12,3	241,9	14,2	5,8
GSL 821	249,2	13,6	-	-	-
GSL 822	248,4	10,7	232,2	8,3	8,1
GSL 833	241,8	9,9	225,9	9,9	8,0
GSL 831	235,0	11,3	222,4	10,4	6,3
GSL 832	241,6	8,7	231,7	9,8	5,0
GSL 568	255,7	9,8	-	-	-
GSL 841	251,0	9,6	236,8	7,2	7,1
SFB 2149	224,7	12,4	210,0	12,7	7,4
SFB 841	251,6	9,3	232,0	8,6	9,8
SFB 842	237,7	19,9	222,3	11,9	7,7
SFB 851	228,7	11,2	211,5	10,0	8,6
SPB 1628	235,6	13,0	220,4	14,3	7,6
SPB 821	227,6	18,8	212,6	14,9	7,5
MAC RAC 1980	228,7	11,0	213,8	12,0	7,5
MAC 832	234,7	12,3	209,7	7,9	12,5
TIE 1978	274,4	16,9	257,8	17,0	8,4
TIE 821	265,4	10,0	238,2	6,1	13,6
CHL 1979	245,4	15,3	234,0	16,1	5,7
CHL 821	243,1	16,6	-	-	-

zijn de al of niet gedecapsuleerde cysten van LVD, TIE en GSL praktisch altijd kleiner in diameter, terwijl die van SFB steeds groter zijn. Voor de andere rassen zijn de verschillen eerder miniem. Nu is het zo dat LVD en TIE, net als de andere *Artemia parthenogenetica* populaties, normaliter de grootste eieren produceren, terwijl SFB juist de kleinste cysten aflegt in vergelijking met de andere rassen. Dit zou er misschien kunnen op wijzen dat de kweekcondities in ons systeem de tendens doen ontstaan om minder extreme cystenafmetingen te produceren.

De ontschaalde embryo's van diverse produkties van LVD, GSL, SFB en TIE variëren in diameter tussen respectievelijk 234-265  $\mu\text{m}$ , 222-242  $\mu\text{m}$ ; 212-232  $\mu\text{m}$  en 238-258  $\mu\text{m}$ . Ten opzichte van het moedermateriaal worden dus afwijkingen bekomen die oplopen tot respectievelijk 28  $\mu\text{m}$ , 19  $\mu\text{m}$ , 22  $\mu\text{m}$ . Deze waarden zijn veel hoger dan de maximale variaties bekomen tussen diverse cystenmonsters van eenzelfde ras van SFB of GSL (4 of 7  $\mu\text{m}$ : Vanhaecke en Sorgeloos, 1980a; Vanhaecke, 1983).

Ook wat de schaaldikte betreft zijn er opmerkelijke verschillen voor de geproduceerde cystenmonsters binnenin één geografisch ras. Waar dit voor het SFB ras nog beperkt is, dan is het verschil toch reeds 3  $\mu\text{m}$  voor GSL, 5  $\mu\text{m}$  voor MAC en TIE, en zelfs 6  $\mu\text{m}$  voor LVD *Artemia*. Opnieuw is de intrapopulatie-variantie voor dit kenmerk bij commerciële cystenmonsters veel geringer ( $< 2 \mu\text{m}$ : Vanhaecke, 1983). Verder is er geen correlatie per ras tussen de dikte van de schaal en de gemiddelde diameter van de gedecapsuleerde cysten.

Dit alles heeft voor gevolg dat ook de diameter van de onbehandelde cysten variaties vertoont die verschillen binnen elk *Artemia* ras. De grootte-orde van die verschillen neemt analoge proporties aan als voor de schaallose embryo's.

Deze resultaten lijken dan ook tegenstrijdig met de bewering van Vanhaecke en Sorgeloos dat de afmetingen der cysten in hoofdzaak rasspecifiek zijn en de variaties tussen de monsters van eenzelfde ras minimaal zijn. Toch veronderstellen deze onderzoekers dat "... the small variations observed in a few cases between batches of the same strain might be caused by fluctuating environmental conditions and/or cyst processing techniques"; niettemin leverden de door hen onderzochte parameters temperatuur en saliniteit geen biometrische verschillen op (zie ook tabel 60). Daar in ons geval de exacte produktie-omstandigheden gekend zijn (zie tabel 28), hebben we gepoogd te achterhalen welke factoren die hoge variaties kunnen teweegbrengen.

Uit tabel 59 kan men opmaken dat er geen éénduidige verbanden aan te tonen zijn. Toch stippen we enkele indicaties aan :

- het zoutgehalte lijkt de diameter van de gedecapsuleerde cyste te beïnvloeden en dus ook de grootte van het geproduceerde embryo. Bij lage saliniteit (50 g/l) van het kweekmedium is er geen waarneembaar effect voor LVD, CHL en GSL, terwijl bij 75 g/l zoutgehalte voor LVD, TIE en GSL en 90 g/l voor SFB wel degelijk kleinere embryo's geproduceerd worden. Mogelijk is dit een gevolg van een hoger energieverbruik voor osmoregulatie waardoor er voor de adulten minder energie beschikbaar is door reproductie (zie verder). Volgens Collins (1978) heeft bij *Artemia* de saliniteit van het milieu echter geen invloed op de grootte van het embryo;
- anderzijds worden bij LVD, TIE en MAC dikkere schalen afgezet rond de embryo's wanneer de saliniteit 75 g/l of meer bedraagt. Er zijn geen verschillen merkbaar in functie van de saliniteit voor GSL of SFB;
- de *Artemia* densiteit op zich schijnt de biometrische karakteristieken der cysten niet te beïnvloeden;
- voedingsomstandigheden kunnen eventueel een invloed uitoefenen op de grootte van de geproduceerde embryo's. De samenstelling van het dieet lijkt geen



verschillen te induceren : zo zijn er b.v. geen variaties merkbaar tussen de nakomelingen wanneer RB, RB-SPIR, of zelfs levende microalgen gevoederd werden onder analoge produktieomstandigheden. Volgens Clegg (1978b) interfereert nochtans de aard van het voedsel op de biochemische samenstelling van de cysten en bijgevolg op de sorptiecapaciteit der cysten. Toch kan er een indirect effect zijn via de invloed op de fecunditeit : RBA geeft namelijk kleinere embryo's voor grotere worpen bij het LVD ras (zie IV.3.3.); dit zou kunnen het gevolg zijn van de verdeling van de 'cost of reproduction' over een groter broed. Mogelijk kunnen optimale voedselkwantiteiten resulteren in grote embryo's en hoge fecunditeiten. In die zin zouden de grotere cystendiameters voor SFB 841 en SFB 842 kunnen verklaard worden, daar de voedingsregimes hier optimaal waren;

- alhoewel beperkt tot één experiment lijkt duisternis de behoefte aan een dikke schaal te verminderen (LVD 829 versus LVD 828). Dit kan een gevolg zijn van een geringere noodzaak om deze gevoelige levensstadia te beschermen ten opzichte van licht.

Vergelijking van onze bevindingen met literatuurgegevens voor cysten geproduceerd onder (semi-) gecontroleerde omstandigheden (tabel 60) levert in de meeste gevallen geen bevestiging op. De variaties zijn klein, niet éénduidig en kunnen bovendien niet aan één of meerdere van de bestudeerde parameters toegeschreven worden. Hierop zijn echter twee uitzonderingen.

Amat (1982) kon voor het Spaans tetraploid ras uit San Antonio beduidend kleinere cysten bekomen indien de populaties bij lage zoutgehalten gehouden werden.

Ook Tackaert *et al.* (1987) detecteerden wel degelijk grote variaties voor diverse rassen (GSL, TIE, Buenos Aires en Galerazamba), maar konden er ook zelden een reden voor opgeven. Voor de TIE experimenten blijken suboptimale voederomstandigheden of een verhoogde saliniteit ook hier in een effect te resulteren. Voor het Argentijns ras geeft

een verhoogd zoutgehalte echter een tegenovergesteld resultaat, namelijk een toename in diameter der cysten. De hypothese dat de hoeveelheid energie die beschikbaar is voor reproductie interfereert met de cystengrootte blijft hierdoor erg speculatief. Mogelijk kunnen de groei- en uithongeringsproeven als indicatoren dienen voor de energetische inhoud van de cysten en zodoende hierop een beter inzicht geven (zie hoofdstuk V.5.).

Daar geen duidelijke correlaties gelegd kunnen worden met specifieke abiotische of biotische omstandigheden hebben we voor enkele *Artemia* culturen nagegaan of er geen verschillen optreden gedurende het kweekproces. Dit gebeurde door de cysten gedurende specifieke produktieperiodes afzonderlijk te verzamelen en te zuiveren, om nadien de biometrie ervan te bepalen. Uit de bekomen resultaten voor drie LVD populaties (tabel 61) kan men afleiden dat analoge variaties optreden als voor verschillende produktieomstandigheden. Naargelang de ouderdom van de populatie kunnen de onderlinge verschillen oplopen tot 20  $\mu\text{m}$  voor de grootte van het embryo of de cyste, en tot 8  $\mu\text{m}$  voor de schaaldikte. Twee tendenzen kunnen hierbij vastgelegd worden :

- de afmetingen van het embryo blijven ongeveer dezelfde tijdens de (reproductieve) deelperiodes 0-3 weken en 5-7 weken. Enkel voor het tijdsvak 3-5 weken produceren de reproductief actieve wijfjes beduidend grotere cysten.
- de schaaldikte neemt toe naarmate de reproductieperiode vordert. Voor de geobserveerde populaties is er echter geen éénduidig verband tussen de werkelijke schaaldikte en het tijdstip van produktie.

Deze observaties kunnen moeilijk verklaard worden. Er zijn immers te weinig populaties hieromtrent onderzocht en bovendien zijn er onvoldoende reproductiekenmerken bepaald in functie van de tijd. Teneinde tot definitieve besluitvorming te kunnen overgaan, zijn dus specifieke experimenten essentieel waarbij o.a. wel belang gehecht

Tabel 60 : De diameter van cystenmonsters geproduceerd onder gecontroleerde omstandigheden in intensieve kweeksystemen (I) of geïnoculeerde biotopen (E)

Oorsprong	Entmateriaal diameter µm	Specifieke productiecondities (temperatuur, saliniteit, dieet)	Diameter van het geproduceerde materiaal		Literatuurreferentie
			µm	s	
SFB 288-2596	224,7	I; 25 °C- 35 g/l; rijstekaf	223,5	14,6	Vanhaecke en Sorgeloos 1980a; Vanhaecke, 1983
		I; 25 °C- 90 g/l; rijstekaf	223,7	16,7	
		I; 25 °C-180 g/l; rijstekaf	222,0	15,3	
		I; 22 °C- 35 g/l; rijstekaf	223,0	-	Vos <i>et al.</i> (1984)
		I; 22 °C- 90 g/l; rijstekaf	223,2	-	
		E: Mundra (Indië); 100-160 g/l natuurlijke produktiviteit	222,1	10,8	
		E: Barotac (Filippijnen); 80-170 g/l natuurlijke produktiviteit	228,0	13,0	
E: Jaro (Filippijnen); 100-140 g/l anorganische bemesting	225,2	11,7			
SFB 1728	225,8	E: Bangpakong (Thailand); 100-150 g/l natuurlijke produktiviteit	232,2	11,8	
SFB -	-	I: 25 °C- 90 g/l; <i>Dunaliella</i>	219,8	-	Tackaert <i>et al.</i> (1987)
SFB -	-	E: Macau (Brazilië); zeezoutwinningsgebied	227,8	11,7	Vanhaecke (1983)
MAC mei 1978	227,8	I; 25 °C- 35 g/l; rijstekaf	226,9	12,4	
GSL 185-0	253,2	I; 20 °C- 35 g/l; rijstekaf	226,7	14,1	
		I; 25 °C- 35 g/l; rijstekaf	250,7	13,2	

GSL	-	I; 25 °C- 35 g/l; <i>Dunaliella</i>	237,2	-	Tackaert et al. (1987)
		I; 25 °C- 90 g/l; <i>Dunaliella</i>	233,3	-	
MANAURE	237,0	I; 25 °C- 90 g/l; <i>Dunaliella</i>	218,0	-	
		I; 25 °C- 31 g/l; <i>Tetraselmis</i>	234,6	15,4	Amat (1980)
CHL	245,4	I; 25 °C- 31 g/l; <i>Tetraselmis</i>	246,7	16,5	
		I; 25 °C- 34 g/l; <i>Dunaliella</i>	240,0	14,6	Vanhaecke (1983)
BUENOS AIRES	238,2	I; 25 °C- 35 g/l; <i>Dunaliella</i>	237	12,4	
		I; 25 °C- 90 g/l; <i>Dunaliella</i>	254,6	-	Tackaert et al.(1987)
TIE	274,4	I; 25 °C- 35 g/l; <i>Dunaliella</i>	265,2	-	
		I; 25 °C- 35 g/l; <i>Dunaliella</i>	256,8	-	
		suboptimale voedingscondities			
		I; 25 °C- 90 g/l; <i>Dunaliella</i>	247,5	-	
GALERAZAMBA	249,9	I; 25 °C- 90 g/l; <i>Dunaliella</i>	231,7	-	
SAN ANTONIO	262	I; 25 °C- 20 g/l; <i>Tetraselmis</i>	239,3	-	
		I; 25 °C- 40 g/l; <i>Tetraselmis</i>	240,6	-	
		I; 25 °C- 80 g/l; <i>Tetraselmis</i>	252,2	-	
		I; 25 °C-160 g/l; <i>Tetraselmis</i>	251,9	-	

Tabel 61 : Biometrische kenmerken van labo-geproduceerde cysten van twee LVD populaties, geoogst over verschillende tijdstippen

Cystencode + productieperiode	Diameter onbehandelde cysten		Diameter gedecapsuleerde cysten		Schaaldikte $\mu\text{m}$
	$\mu\text{m}$	s	$\mu\text{m}$	s	
LVD 822					
week 1	254,6	14,2	246,8	15,8	3,9
week 3	259,2	13,5	250,6	16,1	4,3
week 5	275,1	16,8	264,5	19,5	5,3
week 7	268,3	10,5	245,7	13,1	11,3
LVD 821					
week 1	256,9	12,3	247,0	14,1	4,9
week 3	254,6	17,0	243,1	14,7	5,8
week 5	279,4	16,8	265,1	19,9	7,2
week 7	260,9	13,1	246,1	12,5	7,4
LVD 827					
week 1	255,3	11,0	235,1	8,9	10,1
week 4	254,4	10,0	238,1	6,1	8,1

wordt aan de populatiekarakteristieken tijdens de kweekfase. Zo b.v. lijkt de embryo-grootte hier niet direct bepaald te worden door de worpgrootte en bijgevolg de reproductiekost : uit literatuur-gegevens (zie IV.2.4.) is namelijk geweten dat *Artemia parthenogenetica* juist na enkele weken voortplanting de grootste worpen produceert. Wat de schaaldikte betreft is het mogelijk dat de continue activering van de schaaclklier door middel van zuurstofstress en Fe-additie in de vorming van een steeds dikkere schaal resulteert totdat een maximale activiteit van de schaaclklier bereikt is.

Als gevolg van deze variabiliteit binnen de populatie zijn de effecten van omgevingsparameters of voedingsomstandigheden hoogstwaarschijnlijk gemaskeerd. Daar inderdaad geen rekening gehouden werd met het afoogsttijdstip werden mogelijk mengsels geanalyseerd zodat geen éénduidige invloeden zichtbaar kunnen worden. Dit verklaart dan ook waarom commerciële cystenmonsters of produkties uit geïnoculeerde vijvers weinig variatie vertonen qua cystendiameter. Afoogsting vindt immers plaats op specifieke tijdstippen, maar bovendien is de populatie erg heterogeen in samenstelling wat leeftijdsklassen betreft.

Als conclusie mag gesteld worden dat de diameter der cysten en de schaaldikte niet alleen genotypisch bepaald zijn. Ook fenotypische omstandigheden kunnen hierbij een rol vervullen. In tegenstelling tot wat algemeen aanvaard wordt, zijn die eigenschappen dus niet (volledig) rasspecifiek. Verder onderzoek is echter vereist om de factoren te kennen, evenals hun graad van invloed. Dit betekent concreet dat men heel voorzichtig moet zijn bij het onderscheiden van geografische rassen op basis van de biometrische kenmerken van hun cysten. Zo b.v. werd het SPB ras uit de Napa vallei ten noorden van de baai van San Francisco als een ander geografisch ras dan SFB bestempeld; uit onze proeven blijkt nu dat de diameters van het labo-geproduceerd materiaal overlappen, wat kan duiden op eenzelfde populatie maar verschillende biotoopomstandigheden.

#### V.4. Biochemische samenstelling

##### V.4.1. Vetzuursamenstelling

###### 1. Materiaal en methode

Vetzuuranalyses werden uitgevoerd op enerzijds ovo-vivipaar geproduceerde larven, geïncubeerd binnen een interval van maximum 6 u na depositie (zie V.1.2.) en anderzijds op ontloken, vrijzwemmende larven uit het geproduceerde cystenmateriaal. Hiervoor werden de cysten gedecapsuleerd en dit voor de volgende redenen :

- desactivering van de diapauze bij labo-geproduceerde cysten is niet eenvoudig (zie V.3.); dit heeft als gevolg dat de kans groot is dat het geanalyseerde monster van de larven niet representatief was voor alle cysten : de nauplii vertegenwoordigen immers enkel de quiëscence cysten en niet deze in diapauze;
- de ontluikingssnelheid van de labo-geproduceerde cysten was meestal traag (Lavens, 1982) waardoor de afoogsting van enkel instar I-nauplii erg moeilijk was;
- preliminaire proeven met commerciële cystenmonsters brachten aan het licht dat de analyses van gedecapsuleerde cysten niet wezenlijk verschilden van deze van pas ontloken instar I-larven.

Vergelijking met het moedermateriaal gebeurde telkens door vetzuurdetectie op de instar I-larven, geogst op het tijdstip waarop 90 % ontluiking plaatsvond ( $T_{90}$  : Vanhaecke en Sorgeloos, 1983).

De vetzuurbepalingen van de diverse *Artemia* preparaten en de toegediende diëten werden uitgevoerd door middel van capillaire gaschromatografie, zoals ontwikkeld aan het 'Artemia Reference Center' door Léger (1989).

Enkele grammen van elk monster werden gehomogeniseerd met een ultrasonische 'Sonifier B12'. Daarna volgde de

extractie van lipiden volgens de procedure van Bligh en Dyer (1959) en een verzeping plus verestering volgens de methode beschreven in Schauer en Simpson (1978). Injectie van de vetzuurmethylesters (F.A.M.E.) gebeurde op een capillaire kolom (25 m 'fused silica' met interne diameter van 0,32 mm; vloeibare fase : SILAR 10C, filmdikte 0,3  $\mu\text{m}$ ) geïnstalleerd in een gaschromatograaf (Carlo Erba Fractovap 2330). De werkingscondities waren als volgt :

- 'on column injector'
- 'carrier'- gas : waterstof
- debiet : 1,9 ml/min
- FID - detectie
- oventemperatuur-programma : 154 °C tot 200 °C aan 2 °C per min

Piek-identificatie en kwantificering werden uitgevoerd aan de hand van een gecalibreerde plotter-integrator (Hewlett-Packard 3390 A) en referentie-standaarden. De vetzuursamenstelling is uitgedrukt in percent oppervlakte en in mg vetzuurmethylesters (FAME) per gram drooggewicht aan *Artemia* door toepassing van de interne standaardmethode waarbij gebruik gemaakt werd van 20:206 als standaard.

## 2. Resultaten en discussie

De vetzuurprofielen van respectievelijk de *Artemia*-diëten, de ovipaar en ovovivipaar geproduceerde nakomelingen zijn weergegeven in tabellen 62, 63 en 64.

De resultaten van deze experimenten wijzen op duidelijke verschillen in vetzuurprofielen tussen het moedermateriaal en de  $F_1$ -geproduceerde cysten (Tabel 63) of nauplii (Tabel 64). Bij vergelijking van deze gegevens met de analyses van de verschillende diëten die toegediend werden aan de adulte populaties (Tabel 62) kan men echter een duidelijk verband waarnemen.

Gemicroniseerd rijstvoerschroot (RB) bevat hoge gehalten aan vetzuren 16:0, 18:1 en 18:2. Deze vetzuren zijn ook in



Tabel 62 : Kwalitatieve en kwantitatieve vetzuursamenstelling (uitgedrukt als vetzuurmethylesters : F.A.M.E.) van de experimentele diëten gevoerd aan *Artemia* culturen  
(a): oppervlakte % F.A.M.E. (b); mg F.A.M.E. per gram droge stof;  
(sp): spoor

Vetzuur- Methylesters	Rijstvoer- schroot		Rijstvoerschroot aangerijkt met visolie		Rijstvoerschroot : <i>Spirulina</i> (3:1)	
	(RB)		(RB-A)		(RB-SPIR)	
	a	b	a	b	a	b
14:0	0.9	0.3	2.4	1.5	0.6	0.2
14:1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
14:2	-	-	0.1	0.1		
15:0	0.2	0.1	0.3	0.2	0.9	0.3
15:1	0.2	0.1	0.1	0.1	1.5	0.4
16:0	21.8	6.4	14.4	9.0	25.3	7.1
16:1 $\omega$ 7	0.6	0.2	5.3	3.3	2.9	0.8
16:1 $\omega$ 9	0.3	0.1	0.3	0.2	0.2	0.1
16:2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
16:3			0.2	0.1	0.1	0.1
17:0			0.3	0.2	0.2	0.1
18:0	3.5	1.0	2.9	1.8	3.1	0.9
18:1 $\omega$ 7	39.9	11.4	28.5	17.9	29.9	8.4
18:1 $\omega$ 9						
18:2 $\omega$ 6	27.5	8.0	10.5	6.6	24.3	6.8
18:3 $\omega$ 3	1.5	0.4	0.7	0.5	1.4	0.4
18:3 $\omega$ 6	0.1	0.1	0.1	0.1	5.0	1.4
18:4 $\omega$ 3	0.2	0.1	1.4	0.9	0.2	0.1
19:0					0.1	0.1
20:0	0.8	0.2	0.4	0.2	0.2	0.1
20:1 $\omega$ 9	0.7	0.2	5.2	3.3	0.4	0.1
20:2 $\omega$ 6						
20:3 $\omega$ 3				0.1	0.1	
20:3 $\omega$ 6	0.5	0.2	0.2	0.2	0.4	0.1
20:4 $\omega$ 3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1
20:4 $\omega$ 6	0.1	0.1				
20:5 $\omega$ 3	0.7	0.3	6.7	4.2	0.7	0.2
21:5			0.5	0.3	0.1	0.1
22:1			5.1	3.2		
22:3 $\omega$ 3			sp	sp		
22:4 $\omega$ 3			0.2	0.1		
22:4 $\omega$ 6			0.3	0.2		
22:5 $\omega$ 3			0.5	0.3	0.2	0.1
22:5 $\omega$ 6			sp			
22:6 $\omega$ 3			7.2	4.6	0.1	0.1
24:1					0.7	0.2
Niet geïdentificeerde pieken	0.1	0.1	5.7	3.5	1.1	0.5
$\Sigma$ $\omega$ 3 H.U.F.A.	0.9	0.4	14.6	9.4	1.2	0.5
Totale lipiden		5.8		6.0		6.8

hoge gehalten aanwezig in de nakomelingen van GSL en LVD populaties gekweekt op dit dieet. Bij de GSL culturen zijn de verschillen in vetzuurpatronen tussen de ovovivipaar en ovipaar geproduceerde nakomelingen heel miniem.

Een gedeeltelijke substitutie van het RB-voedsel met *Spirulina*, dat rijk is aan 16:1 en 18:3 $\omega$ 6, geeft opnieuw hoge waarden voor die vetzuren in de LVD cysten en de GSL nauplii. Bovendien zijn beide diëten deficiënt in hoogonverzadigde vetzuren (HUFA) wat opnieuw gereflecteerd wordt in de profielen van de geproduceerde nakomelingen. Incorporatie van deze HUFA's in het moederdieet via een adhesie van levertraanolie op de RB-partikels (Léger et al., 1985) verhoogt de concentraties van HUFA's in de nadien afgelegde cysten (hoge waarden voor 20:5 $\omega$ 3 en het voorkomen van 22:6 $\omega$ 3).

Hieruit kan besloten worden dat de vetzuursamenstelling van de geproduceerde nauplii of cysten afhankelijk is van de samenstelling van het dieet dat toegediend wordt aan de adulten en dus geen rasspecifiek kenmerk is. Dit bevestigt tevens de veronderstelling gemaakt door Hinchcliffe en Riley in 1972.

Deze bevinding verklaart dan ook de resultaten bekomen met SFB cysten geoogst uit diverse, geïnoculeerde kweekvijvers in Z.O.-Azië (Vos et al., 1984). Afhankelijk van de toegepaste behandeling van elke *Artemia* vijver (dit is o.a. de toediening van organische of anorganische meststoffen, watertoevoer al of niet uit mangrovegebieden,...) werden immers SFB cysten geproduceerd met een verschillend vetzuurpatroon. Dit is het gevolg van de ontwikkeling van algenpopulaties met onderling verschillende kenmerken (zowel qua species-samenstelling als nutritionele samenstelling) door het specifieke beheer van elke vijver.

Men mag dus besluiten dat de variabele, nutritionele samenstelling met betrekking tot het vetzuurgehalte van de diverse cystenmonsters van één of verschillende *Artemia* rassen, te wijten is aan de lokale voedingsomstandigheden.

Tabel 63 : Kwalitatieve en kwantitatieve vetzuursamenstelling (F.A.M.E.) van de *Artemia* encysten en deze geproduceerd onder diverse dieetomstandigheden in standaard kweekcondities (Legende : zie tabel 62)

FAME	LVD 256		LVD 811 (RB)		LVD 827 (RB-A)		LVD 821 (SPIR)		*GSL 185		GSL 811 (RB)	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
14:0	1.7	2.0			0.8	1.0	0.6		1.0	1.8	1.0	0.8
14:1	1.4	1.6	0.3	0.4	1.0	1.1	1.2		0.3	2.0	0.3	0.3
14:2									0.8	1.5	0.1	0.1
15:0	0.5	0.5	0.2	0.2	sp	sp	0.1		0.8	1.5	0.1	0.1
15:1	sp	sp	sp	sp	0.1	0.1	0.1		0.3	0.5	0.2	0.2
16:0	14.5	16.5	12.0	12.5	7.3	8.4	10.9		14.1	25.7	10.6	9.1
16:1 <sub>07</sub>	8.6	9.8	2.5	2.6	10.4	11.8	4.8		4.4	8.1	2.2	1.9
16:1 <sub>09</sub>	sp	sp										
16:2			0.8	0.8	0.7	0.8	0.3		1.0	1.8	sp	sp
16:3	2.2	2.5	0.2	0.2	0.4	0.4	1.0		1.6	2.9	0.7	0.6
17:0	0.6	0.7	0.3	0.3					0.8	1.5	0.4	0.3
18:0	3.5	4.0	3.2	3.3	1.2	1.4	2.8		3.6	6.3	3.3	2.9
18:1 <sub>07</sub>	6.4	7.3			45.5	51.9	36.3		27.3	49.8	41.6	35.8
18:1 <sub>09</sub>	18.3	20.9	40.3	41.9								
18:2 <sub>06</sub>	6.4	7.3	37.5	39.0	22.4	25.5	36.0		6.1	11.1	36.2	31.2
18:3 <sub>03</sub>	20.0	22.7	1.5	1.6	1.3	1.5	2.7		27.1	49.4	1.3	1.1
18:3 <sub>06</sub>	0.9	1.0					1.7				sp	sp
18:4 <sub>03</sub>	2.1	2.3			sp	sp	0.5		3.3	6.0	0.1	0.1
19:0	0.5	0.6									sp	sp
20:0			0.1	0.1							0.3	0.2
20:1 <sub>09</sub>	3.2	3.8	0.7	0.8	0.6	0.7			0.4	0.8	0.5	0.4
20:2 <sub>06</sub>												
20:3 <sub>03</sub>							0.1		0.4	0.7		
20:3 <sub>06</sub>											0.1	0.1
20:4 <sub>03</sub>	1.2	1.4	0.1	0.1	0.2	0.2	0.4		0.6	1.1	0.1	0.1
20:4 <sub>06</sub>												
20:5 <sub>03</sub>	5.4	6.2	0.4	0.4	7.7	8.7	0.2		2.1	3.9	0.4	0.3

21:5	0.2	0.3						sp				
22:1								0.1			0.3	0.2
22:3 $\omega$ 3								sp	0.2	0.4		
22:4 $\omega$ 3	sp	sp							sp	sp		
22:4 $\omega$ 6												
22:5 $\omega$ 3									sp	sp		
22:5 $\omega$ 6												
22:6 $\omega$ 3	0.5	0.6			0.6	0.7			sp	sp		
24:1												
niet geïdentificeerde pieken	1.9								3.0		0.2	
$\Sigma$ $\omega$ 3 H.U.F.A.	7.1	8.2	0.5	0.5	8.5	9.6	0.6		3.3	6.1	0.5	0.4
Totale lipiden	17.3					20.9				17.4		17.4

---

Tabel 64 : Kwalitatieve en kwantitatieve vetzuursamenstelling (F.A.M.E.) van Great Salt Lake entcysten en van de ovovivipare afleg geproduceerd in standaard kweeksystemen onder verschillende dieetomstandigheden (Legende : zie tabel 62)

F.A.M.E.	GSL 185		GSL 813 (RB)		GSL 823 (RB-SPiR)	
	a	b	a	b	a	b
14:0	1.1	1.7	1.6	2.2	2.5	3.9
14:1	0.9	1.5	0.9	1.3	1.1	1.7
14:2	0.3	0.4			0.3	0.5
15:0	0.3	0.5	0.6	0.8	1.3	2.0
15:1	0.9	1.4	0.6	0.8	sp	sp
16:0	12.3	19.7	12.1	16.3	16.0	25.3
16:1 $\omega$ 7	4.4	7.0	4.8	6.4	6.1	9.7
16:1 $\omega$ 9	0.4	0.7	1.0	1.4	0.9	1.4
16:2			0.1	0.2		
16:3	1.2	2.0	0.7	1.0	1.2	2.0
17:0	0.4	0.7	0.5	0.6	1.5	2.3
18:0	3.8	6.1	4.5	6.1	7.1	11.3
18:1 $\omega$ 7	10.2	16.4	35.6	47.7	26.5	47.9
18:1 $\omega$ 9	17.1	27.4				
18:2 $\omega$ 6	7.6	12.1	27.8	37.2	15.2	24.0
18:3 $\omega$ 3	29.1	46.7	1.9	2.5	1.3	2.1
18:3 $\omega$ 6	0.1	0.1	0.2	0.2	6.7	4.2
18:4 $\omega$ 3	3.8	6.0	sp	sp		
19:0	0.6	0.9	sp	sp		
20:0	0.2	0.3	sp	sp	1.6	2.6
20:1 $\omega$ 9	0.1	0.1	0.5	0.7	1.4	0.9
20:2 $\omega$ 6						
20:3 $\omega$ 3	0.1	0.1			0.1	0.2
20:3 $\omega$ 6	0.2	0.3	1.0	1.3	0.3	0.5
20:4 $\omega$ 3	0.4	0.6	0.8	1.1	1.6	2.5
20:4 $\omega$ 6	0.2	0.3				
20:5 $\omega$ 3	2.6	4.2	0.5	0.7	0.8	1.3
21:5	0.4	0.6				
22:1	0.5	0.7			0.7	1.1
22:3 $\omega$ 3						
22:4 $\omega$ 3	0.1	0.1				
22:4 $\omega$ 6						
22:5 $\omega$ 3	sp	sp				
22:5 $\omega$ 6	sp	sp				
22:6 $\omega$ 3						
24:1						
niet geïdentificeerde pieken	0.7		4.3		58	
$\Sigma\omega$ 3 H.U.F.A.	3.2	5.0	1.3	1.8	2.5	4.0
Totale lipiden		27.0				

Daar vooral het HUFA-gehalte de nutritionele geschiktheid van *Artemia* nauplii voor mariene crustaceën en vissen bepaalt (Léger *et al.*, 1986), betekent dit dat de nutritionele kwaliteit van commerciële cystenloten steeds onzeker is en een verificatie altijd aangewezen is. Dit probleem voor de aquacultuur kan niet direct opgelost worden : de controle van produktie-omstandigheden voor *Artemia* is misschien mogelijk voor kweekvijvers, maar zeker niet voor de grote (semi-) natuurlijke produktiegebieden zoals zoutmeren (Great Salt Lake, V.S.A.) of zeezout-exploitatiegebieden (San Francisco Bay, V.S.A., Macau, Brazilië). Zo b.v. is het dominante wierspecies in het Great Salt Lake steeds een *Dunaliella* soort geweest, arm aan  $\omega$ 3-HUFA's (Scott en Middleton, 1979), wat de constant lage waarden van 20:5 $\omega$ 3 en 22:6 $\omega$ 3 in GSL cysten verklaart. De variabiliteit in essentiële vetzuren van cysten afkomstig uit één zeezout-produktiegebied kan verklaard worden door de verscheidenheid aan ecologische omstandigheden in de evaporatiebekkens : verschillende saliniteiten kunnen verschillende algenspecies induceren (Carpelan, 1957; Haynes en Hammer, 1978) of het vetzuurpatroon van de aanwezige wieren beïnvloeden (Scott en Middleton, 1979; Moal *et al.*, 1978; Enright, 1984). Gecontroleerde produktie is wellicht het enige alternatief voor aquacultuurbedrijven om cysten met een hoge nutritionele waarde te verkrijgen in *Artemia* kweekvijvers. Intensieve systemen zoals beschreven in hoofdstuk IV bieden hier geen uitkomst omdat de kost voor cystenproduktie te hoog ligt.

Nochtans heeft de gecontroleerde cystenproduktie het voordeel dat HUFA-gehaltenes bereikt kunnen worden die hoger liggen dan deze van cysten uit natuurlijke biotopen. In het experiment waar aangerijkt rijstvoerschroot aangeboden werd aan de *Artemia* populatie werden immers veel hogere gehaltenes aan  $\omega$ 3-HUFA's aangetroffen dan wanneer het onaangerijkt produkt vervoederd werd (respectievelijk gehaltenes van 8,7 en 6,2 mg  $\omega$ 3-HUFA per g droge stof). Alhoewel tot op heden geen experimenten uitgevoerd zijn met het geëmulgeerde HUFA-concentraat (Léger *et al.*, 1987) verwachten we dat

deze aanrijkmethode hogere gehalten aan HUFA zal toelaten. Opmerkelijk is wel dat in de uitgevoerde proeven geen inverse relatie kan aangetoond worden tussen de concentraties aan 18:3 $\omega$ 3 en 20:5 $\omega$ 3. Dit werd nochtans duidelijk gedemonstreerd voor de natuurlijke cystenproducties van *Artemia* door Léger *et al.* (1986).

De laboratoriumtechniek voor gecontroleerde cystenproductie opent dus wel interessante perspectieven voor de produktie van 'standaard *Artemia* cysten' met een vaste (hoge) nutritionele kwaliteit, op voorwaarde dat schaalvergroting mogelijk is. Zo'n materiaal zou een alternatief betekenen voor de 'Reference *Artemia* Cysts' als standaardmateriaal voor intercalibratie van kweektesten met verschillende predatoren, zoals vooropgesteld door de 'Environmental Protection Agency' van de V.S.A. (E.P.A., 1983). Bovendien zouden cysten met een specifiek HUFA-gehalte kunnen geproduceerd worden voor onderzoek naar de HUFA-vereisten van vis- en garnaallarven.

Aangezien de nutritionele kwaliteit (vetzuursamenstelling) van ovovivipaar geproduceerde nauplii kan gemanipuleerd worden via het toegediende voedsel, kan dit een extra argumentatie zijn voor de integratie van een nauplii-productiesysteem in de larvicultuur van vissen en/of garnalen.

#### V.4.2. Aminozuursamenstelling

##### 1. Materiaal en methode

De cystenmonsters werden geanalyseerd op hun aminozuursamenstelling door Prof. L. Moens aan het Departement voor Biochemie aan de Universitaire Instelling Antwerpen. 0,5 g cysten werden gehydrolyseerd in 6 N HCl en in aanwezigheid van 1 % thiodiglucozuur gedurende 24 u bij 110 °C onder vacuümomstandigheden. Nadat de HCl verdampt was, werden de vrije aminozuren opgenomen in 0,01 N HCl en vervolgens gebonden op een korte 'Dowex 50XW8'-kolom. Na

zuivering werden de geabsorbeerde aminozuren terug opgelost in 0,1 N  $\text{NH}_4\text{OH}$  en drooggedampt. Tenslotte werd een derivatisatie uitgevoerd met phenylisothiocyanaat (PITC) en de uiteindelijke scheiding gebeurde op een 'NOVO C18'-kolom. Kwantificering vond plaats ten opzichte van een standaard bereid op basis van het 'Pierce Standaard Aminozuur' -mengsel. Per monster werden vier bepalingen uitgevoerd. De gegeven waarden zijn de gemiddelden van de afzonderlijke bepalingen (standaardafwijkingen hebben hier geen enkele zin).

## 2. Resultaten en bespreking

De resultaten zijn samengevat in tabel 65. Hieruit blijkt dat de verschillen met het moederras voor de meeste monsters beperkt zijn. Het profiel van de geproduceerde nakomelingen benadert het meest de aminozuursamenstelling van het entmateriaal indien *Spirulina* toegevoegd was aan het RB-dieet. Bij GSL zijn de waarden praktisch analoog, maar bij LVD zijn de gehalten aan asparaginezuur, glutaminezuur, serine, glycine en histidine toch merkbaar lager. Wanneer echter het proteïnegehalte van het toegediende dieet lager was dan het RB/SPIR-mengvoeder (= 26 %) liggen de gehalten aan aminozuren ook lager. LVD cysten verkregen op een puur RB-dieet (12 % proteïnen) geven zelfs concentraties die gemiddeld 1/3 lager liggen dan de waarden bekomen bij de entcysten.

Het lijkt er dus op dat het dieet dat beschikbaar is voor de adulte *Artemia* populatie de kwantitatieve samenstelling van de aminozuren bepaalt in de geproduceerde nakomelingen. Dit kan de variaties in aminozuursamenstelling verklaren tussen de commerciële monsters van één ras zoals aangetoond door Seidel *et al.* (1980).



Tabel 65 : Aminozuursamenstelling van *Artemia* cysten geproduceerd in het standaard labosysteem (waarden uitgedrukt in pmol/ $\mu$ g droge cysten)

RAS + CODE VOEDINGS- OMSTANDIGHEDEN	LVD 256 (moeder- materiaal)	LVD 821 RB:SPIR (3:1)	LVD 822 RB	GSL 185 (moeder- materiaal)	GSL 822 RB:SPIR (3:1)	GSL 841 PG:RB (1:4)
AMINOZUREN						
ASP	358,3	262,8	205,2	294,2	273,8	262,2
GLU	508,3	361,4	307,5	375,1	389,8	351,2
SER	220,9	161,3	118,4	178,3	171,8	154,6
GLY	295,7	226,8	190,5	230,4	232,1	209,9
HIS	146,8	101,5	97,6	101,5	142,1	122,5
ARG	157,2	151,6	135,9	116,7	105,0	91,7
THR	163,3	127,8	87,3	142,8	119,8	120,9
ALA	384,7	317,7	233,5	295,8	294,5	248,6
PRO	spoor	spoor	spoor	spoor	spoor	spoor
TYR	74,2	62,4	52,3	64,8	59,8	57,0
VAL	237,1	203,5	148,7	231,6	201,4	189,6
MET	44,5	35,4	31,0	38,7	49,1	50,2
CYS	spoor	spoor	spoor	spoor	spoor	spoor
ILE	187,9	161,7	122,4	184,0	155,2	138,1
LEU	266,4	229,7	177,8	253,9	218,0	195,5
PHE	105,2	90,1	70,0	101,5	76,5	73,4
LYS	232,8	229,5	156,9	208,2	170,2	165,9

### V.4.3. Koolhydraatsamenstelling

#### 1. Materiaal en methode

De bepalingen werden uitgevoerd door Dr. Bernaerts, verbonden aan het Labo voor Biochemie van het Rijksuniversitair Centrum te Antwerpen.

3 mg gedecapsuleerde *Artemia* cysten werden met een mortier gehomogeniseerd in 0,5 ml van een 80 % ethanoloplossing bij 0 °C. De extracten werden gestockeerd bij -20 °C gedurende één nacht om de proteïnenprecipitatie te bevorderen en vervolgens gecentrifugeerd gedurende 15 min bij 12 000 g om het eiwitneerslag te verwijderen. Het supernatans werd gedroogd over N<sub>2</sub> in een blokverwarmer bij 50 °C en het residu vervolgens heropgelost in 0,2 ml gedistilleerd water. Na filtratie over een 0,2 µm filter werd uiteindelijk 20 µl van het filtraat geïnjecteerd in de HPLC voor de suikerbepaling. De HPLC-apparatuur had volgende kenmerken :

- 'Altex 110A'-doseerpomp
- 'Rheodyne 7125'-injector met een 20 µl "sample loop"
- 'Hamilton HC75'-Ca-kolom, gemonteerd in een HPLC watermantel 'Altech 9502'
- 'Shimadzu C-R1B Chromatopac'-integrator
- Kolomtemperatuur = 90 °C

#### 2. Resultaten en bespreking

De resultaten van de analyses op LVD cysten zijn weergegeven in tabel 66. Alleen trehalose en glycerol zijn in de cryptobiotische cysten aanwezig. Het is duidelijk dat het trehalose-gehalte varieert tussen de verschillende monsters maar we kunnen geen correlatie vaststellen tussen de verkregen concentratie en het type voedsel dat toegediend werd aan de ouderdieren. Ook is er geen eensluidende tendens waarneembaar in de verschillen tussen de labogeproduceerde cysten en deze geogst uit de natuur : het

Tabel 66 : Koolhydraatgehaltenes in LVD cysten geproduceerd onder diverse voedingsomstandigheden in het standaard labosysteem.

Ras + code	Voedingsomstandigheden	Trehalose- gehalte (mg/g DS)	Glycerol- gehalte (mg/g DS)	Totaal koolhydraten- gehalte (mg/g DS)
LVD 256	(moederras)	162,2 ± 66,9	59,6 ± 1,5	222
LVD 811	RB	206,5 ± 6,1	18,3 ± 0,4	225
LVD 821	RB - SPIR (3:1)	199,6 ± 22,1	32,4 ± 3,5	232
LVD 827	RB - A 6Z	132,1 ± 23,9	25,3 ± 4,5	157
LVD 8210	RB - A 6Z (lage densiteit)	147,5 ± 9,2	31,3 ± 2,6	179

trehalose-gehalte is ofwel hoger, ofwel lager dan dat van het LVD 256 entmonster.

Voor het glycerol-gehalte daarentegen tonen de metingen wel een bepaalde tendens : het glycerol-gehalte van de entcysten is namelijk duidelijk hoger dan dat van de labo-geproduceerde  $F_1$ -cysten. Tenslotte varieert de glycerol-concentratie willekeurig tussen de diverse monsters, zodat ook hier geen correlatie kan gevonden worden tussen de hoeveelheid glycerol in de cysten, verkregen in het cystenproduktiesysteem, en het type voedsel dat aan de ouderdieren werd gegeven.

Het is dan ook onmogelijk om verbanden te leggen tussen de concentraties aan trehalose en glycerol enerzijds en de ontluikbaarheid van de geproduceerde cysten anderzijds. LVD 811 en 822 geven namelijk reeds 30 % en 20 % ontluiking na dehydratie terwijl de andere praktisch niet ontluiken na droging (zie tabel 36; het entmonster (LVD 256) geeft een ontluiking van  $\pm 70$  %). Verstoring van het 'trehalose-glycerol hyperosmotic regulatory system' (Conte *et al.*, 1977; zie V.2.1), kan dus niet aan de basis liggen van de moeilijkheid om de diapauze van geproduceerde, geëncysteerde embryo's stop te zetten.

Toch is het opvallend dat de cystenmonsters die een ontluikbaarheid halen (na specifieke diapauze-desactivering) van meer dan 55 %, dit zijn LVD 256, LVD 811 en LVD 821, juist ook ongeveer dezelfde waarden voor het totaal koolhydraat-gehalte halen ( $\pm 225$  mg/g droge stof). Beide andere monsters bevatten maximum 80 % van deze koolhydraat-concentratie én ontluiken (zelfs na droging en hibernatie) heel slecht (<15 %). Dit zou er kunnen op wijzen dat deze laatste cystenmonsters onvoldoende leefbaar of resistent zijn b.v. ten opzichte van droging ten gevolge van te lage gehalten aan koolhydraten (meer specifiek trehalose?). Crowe *et al.* (1987) veronderstellen namelijk dat "the ability to survive dehydration may be related directly to the interesting properties of trehalose". Deze moleculen

zouden de watermoleculen vervangen rond de polaire residu's in membraan-fosfolipiden en -proteïnen en zo het membraan in een vloeibare staat houden tijdens de droge periode.

#### V.4.4. Pigmentensamenstelling

##### 1. Materiaal en methode

Gedecapsuleerde cysten werden geanalyseerd op hun kwantitatieve carotenoïdensamenstelling door middel van de techniek ontwikkeld door Nelis *et al.* (1986, 1988a). De analyses werden uitgevoerd aan de Laboratoria voor Medische Biochemie en Klinische Analyse van de R.U.G. Samengevat omvat de carotenoïdprofilering volgende stappen.

Ongeveer 2-10 mg *Artemia* cysten werden in een Potterbuis met 150  $\mu$ l 5 % natriumdeoxycholaat voorbehandeld en geëxtraheerd met 2 ml methanol. Na centrifugatie en isolatie van het supernatans werd de inwendige standaard toegevoegd. 100  $\mu$ l van dit supernatans werd geïnjecteerd op een 'Zorbax ODS'-kolom van het chromatografie-systeem (HPLC) met als eluens een mengsel van acetonitrile-methanol-dichloormethaan (41:50:9, v/v) en met een debiet van 0,7 ml/min. Deze niet-waterige, omgekeerde fase vloeistofchromatografie-methode laat de separatie van trans- en cis-canthaxanthines toe.

Tenslotte werd er ook aandacht besteed aan de pigmentatie van de schaal der geproduceerde cystenmonsters. Hiervoor werd enkel de kleur van de schaal geobserveerd.

##### 2. Resultaten en discussie

De kleur van de schaal van de labo-geproduceerde cysten benadert heel sterk die van het moedermateriaal voor praktisch alle onderzochte rassen. Enkel de Tientsin embryo's geven een iets bruinere tint dan de lichtbruine kleur van de entcysten. Deze kleur wordt veroorzaakt door

de hematine afgescheiden door de bruine schaalklieren als een afbraakprodukt van hemoglobine (zie IV.3.3.) Daar de aanmaak van hemoglobines, en meer specifiek Hb-III, gefavoreerd wordt door toepassing van de inductietechniek in het cystenproductiesysteem, kan er hoogstwaarschijnlijk voldoende hematine geproduceerd worden voor de vorming van de schaal. De verschillen in schaal kleur tussen de diverse rassen zou het gevolg kunnen zijn van een rasspecifieke limiet voor de productiecapaciteit aan hematine. Zo zijn b.v. de cysten van SFB en MAC donkerbruin terwijl de cysten van LVD en GSL lichtbruin zijn. Bij de TIE embryo's kwamen de twee variëteiten voor wat er zou op wijzen dat dit parthenogenetisch ras in feite uit minimum twee subpopulaties (klonen) bestaat met specifieke karakteristieken. Het (gedeeltelijk) genetisch karakter van deze eigenschap wordt verder bevestigd door het feit dat er geen kleurverschillen merkbaar zijn binnen hetzelfde ras, hoewel er verschillende productie-omstandigheden toegepast werden. Toch blijft dit alles hypothetisch daar geen kwantitatieve analysemethoden toegepast werden. Vos *et al.* (1984) stelden wel kleurverschillen vast bij SFB cysten geproduceerd in diverse *Artemia* vijvers na inoculatie met hetzelfde moeder-materiaal (SFB). Volgens hen is dit te wijten aan een interactie van een aantal omgevingsfactoren met de hemoglobine-productie in de moederdieren en is de schaal kleur "certainly not a strain-dependent characteristic".

Bij de gedecapsuleerde embryo's treden echter wel grote verschillen op in kleur. De nakomelingen van moederdieren gevoed met een RB-dieet geven grijswitte embryo's terwijl de cysten verkregen na voeding met het RB/SPIR-mengsel een oranje pigmentatie vertonen. Analoge kleurverschillen worden waargenomen bij de pas ontloken larven uit dergelijk cystenmateriaal en bij de ovovivipaar geproduceerde nauplii uit de laboproduktie-eenheid.

Tabel 67 : Canthaxanthine-gehaltenes in de geproduceerde afleg van *Artemia*

Ras + code	Toegediend dieet	Gehalte aan canthaxanthine ( $\mu\text{g/g DS}$ )		
		CIS	TRANS	TOTAAL
LVD 256	(moedermateriaal)	116	177	293
LVD 821	RB-SPIR (3:1)	64	114	178
LVD 822	RB	-	-	$\pm 2^*$
GSL 185	(moedermateriaal)	105	167	272
GSL 822	RB-SPIR (3:1)	72	121	193
GSL 841	PG-RB (1:4)	-	-	$\pm 3^*$

\* detectielimiet

Kwantitatieve analyses van de carotenoïden-samenstelling bevestigen deze observaties (Tabel 67). Bij de cysten geproduceerd op carotenoïde-arme diëten (RB) is de concentratie aan carotenoïden nauwelijks detecteerbaar ( $< 3 \mu\text{g/g}$  droge stof). Wanneer *Spirulina*, dat rijk is aan carotenoïden (Choubert, 1979), toegevoegd wordt aan het dieet, stijgt het canthaxanthine-gehalte van LVD en GSL cysten tot  $\pm 190 \mu\text{g/g}$  droge stof. Deze waarden liggen wel nog meer dan  $80 \mu\text{g/g}$  droge stof verwijderd van de gehalten vastgesteld voor cysten uit de natuur.

Wat de kwaliteit van de carotenoïden betreft, kunnen er geen verschillen aangetoond worden tussen de diverse cystenmonsters. Het canthaxanthine is het enige carotenoïd dat voorkomt in aanduidbare gehalten (De precursor echinenone is nauwelijks zichtbaar op het chromatogram). Wel worden er twee stereo-isomeren aangetroffen : het cis- en het trans-canthaxanthine. De verhouding tussen beide isomeren is ongeveer dezelfde in alle onderzochte cystenmonsters ( $\pm 0,6$  cis/trans). Men mag dan ook besluiten dat

het dieet van de moederdieren slechts interfereert met de hoeveelheid carotenoïden die kan doorgegeven worden aan het embryo en niet met de vorm waarin dit gebeurt. Dit gaat niet volledig op voor de ovovivipaar geproduceerde nauplii. Een preliminaire, kwalitatieve carotenoïdbepaling op GSL 823 nauplii toonde immers aan dat er weinig cis-canthaxanthine gevormd is (de cis/trans-verhouding bedraagt slechts 0,22). Dit gegeven duidt waarschijnlijk op een biochemisch verschil tussen de ovipaar en ovovivipaar geproduceerde nakomelingen bij *Artemia*. Er zijn ten andere meerdere aanwijzingen die deze veronderstelling staven (zie Nelis *et al.*, 1988b) maar die hier niet aan de orde zijn.

Tenslotte kan er geen verband gelegd worden tussen het canthaxanthine-gehalte en de ontluikbaarheid van de geproduceerde cysten. Het monster GSL 841 b.v. bevat slechts minieme hoeveelheden carotenoïden en toch kunnen de cysten tot meer dan 80 % instar I-nauplii produceren (zie tabel 56). De leefbaarheid van de cysten is dus zeker niet aangetast door een gebrek aan carotenoïden. De veronderstelling dat carotenoïden een beschermende rol spelen tijdens de cryptobiotische toestand (Nelis *et al.*, 1988b) lijkt hierdoor weerlegd: zowel de diapauze-cysten als de quiëscente embryo's weerstaan immers droging en hibernatie (zie tabel 36 en 42)! Bovendien lijkt er geen cis/trans omzetting vereist om de diapauze te induceren of te verbreken daar dit net zo goed kan gebeuren met cysten die beide componenten nauwelijks bezitten. Deze resultaten lijken dus de hypothesen van Dutrieu (1960) en Nelis *et al.* (1988b) te weerleggen.



## V.5. DE LEEFBAARHEID VAN LABO-GEPRODUCEERDE NAKOMELINGEN

### V.5.1. Materiaal en methoden

De drie types experimenten (uithongerings-, groei- en resistentietesten) werden uitgevoerd volgens standaardproeven, ontwikkeld aan het Artemia Reference Center door respectievelijk Lavens (1979) en Vanhaecke *et al.* (1983), Vanhaecke en Sorgeloos (1980b), en Vanhaecke *et al.* (1984). De gebruikte methodieken worden hier slechts summier beschreven, voor meer uitgebreide informatie verwijzen we naar hogervermelde publikaties.

#### 1. Uithongeringsproeven

De overleving van pas ontloken larven afkomstig van diverse cystenmonsters in het standaard kweekstelsel (zie tabel 28) werd nagegaan in functie van tijd en temperatuur. Hiervoor werden steeds instar I-larven gebruikt, bekomen na 36 u incubatie van de cysten onder standaard ontluikingsomstandigheden (zie V.1.1).

Telkens werden 20 dieren met een Pasteurpipet overgebracht in glazen petrischaaltjes gevuld met 10 ml geaëreerd zeewater. De afgesloten schaaltes werden geplaatst in een niet verlichte, gemodificeerde koelkast bij respectievelijk 20 °C en 30 °C ( $\pm 0,5$  °C). Per omstandigheid werden zes herhalingen opgesteld. Dagelijks werd de mortaliteit genoteerd en de afgestorven larven verwijderd.

De methode van Litchfield en Wilcoxon (1949) werd toegepast voor het opstellen en vergelijken van de tijd-percent mortaliteitscurven, uitgezet op logaritmisch-probabiliteitspapier. Het tijdstip waarop gemiddeld 50 % mortaliteit voorkomt ( $LT_{50}$ ) werd dan bepaald volgens de methode van Litchfield (1949).  $LT_{50}$ -waarden van de ouderpopulaties werden in enkele gevallen overgenomen van Vanhaecke *et al.* (1983). Waar het mogelijk was, werden de tijdstippen waarop respectievelijk 10 % en 90 % mortaliteit

voorkwam ( $LT_{10}$  en  $LT_{90}$ ) eveneens bepaald. Statistische vergelijking van de  $LT_{50}$ -waarden kon uitgevoerd worden door toepassing van de analyse-methode beschreven door Litchfield en Wilcoxon (1949).

## 2. Groeiproeven

De standaardgroeiproeven werden uitgevoerd in zes herhalingen per reeks in proefbuisjes gevuld met 25 ml geaëreerd artificieel zeewater met een zoutgehalte van 35 g/l. Op analoge wijze als voor de overlevingsproeven werden in elke recipiënt 10 instar I-larven overgebracht, waarna de buisjes geplaatst werden in een gemodificeerde koelkast bij  $25 \pm 0,5$  °C in duisternis. De totale kweekperiode bedroeg zeven dagen. De kweekbuisjes werden niet ververst noch belucht. Voeding met het levend groenwier *Dunaliella tertiolecta* gebeurde éénmaal per dag. Het volgende voeder-schema werd aangehouden :

dag 1	12 x 10 <sup>5</sup> cellen
dag 2	24 x 10 <sup>5</sup> cellen
dag 3	24 x 10 <sup>5</sup> cellen
dag 4	24 x 10 <sup>5</sup> cellen
dag 5	36 x 10 <sup>5</sup> cellen
dag 6	36 x 10 <sup>5</sup> cellen
dag 7	48 x 10 <sup>5</sup> cellen

Dit schema levert volgens Vanhaecke (1983) de beste produktieresultaten op in termen van overleving en lengte der proeforganismen. Kweek van het *Dunaliella* wier gebeurde volgens de methode beschreven door Vanhaecke (1983). Wiercellen in exponentiële groeifase werden afgeogst met behulp van een centrifuge en geresuspendeerd in zeewater tot een uiteindelijke concentratie bekomen werd van  $12 \times 10^6$  cellen per ml. Deze suspensie kon zonder enig probleem gedurende zeven dagen gestockeerd worden in duisternis bij 4 °C zonder kwaliteits- of kwantiteitsverlies.

Op dag 8 werd de overleving en de lengte van de pekeltkreeftjes bepaald (zie hiervoor hoofdstuk III.3.1.).

Wanneer de overleving minder dan 50 % bedroeg, werd geen lengtemeting uitgevoerd. De vier herhalingen lieten toe om voldoende nauwkeurige statistische analyses uit te voeren (Vanhaecke, 1983). Om een exceptioneel lage overleving in één der parallelen te kunnen ondervangen, werd het aantal proefbuisjes per experiment uitgebreid tot zes. Statistische interpretatie van de gegevens van het LVD ras was mogelijk aan de hand van een variantie-analyse, model I. De overlevingscijfers werden genormaliseerd via een arcsin  $\sqrt{\%}$ -transformatie en de gemiddelden 2 aan 2 vergeleken door middel van de toets van Duncan. Bij de andere rassen werden de gemiddelden vergeleken door middel van een t-test.

Om eventuele groeiverschillen tussen proeven uitgevoerd op diverse tijdstippen - die te wijten kunnen zijn aan een variërende wierkwaliteit of andere, niet gekende parameters - niet te laten interfereren met de interpretatie van alle resultaten, werd steeds een SFB 288-2596 reeks meegenomen als inwendige standaard. Zodoende kan per proefreeks de gemiddelde lengte uitgedrukt worden als een percentage van de lengte van deze inwendige standaard en is vergelijking mogelijk tussen de diverse experimenten.

### 3. Resistentieproeven

De tolerantie van *Artemia* larven tegenover temperatuur- en saliniteitsextremen werd simultaan uitgetest daar bij diverse aquatische organismen, inclusief *Artemia*, beide fysico-chemische factoren kunnen interageren (Kinne, 1970; Von Hentig, 1971). In tegenstelling tot Vanhaecke *et al.* (1984) die 25 temperatuur/saliniteitscombinaties uittestten, hebben we de proeven beperkt tot de combinatie van twee temperaturen (25 °C, 30 °C) en drie zoutgehaltenes (15 g/l, 35 g/l, 120 g/l). Dit gebeurde omdat er volgens Vanhaecke (1983) blijkbaar een gemeenschappelijk temperatuur/saliniteitsgebied (20-25 °C/35-100 g/l) kan afgebakend worden voor diverse geografische rassen, waar immers de mortaliteit steeds kleiner is dan 10 %. De exploratie binnenin dit gebied leek ons dan ook overbodig.

Daarenboven was het onze hoofdbedoeling om na te gaan of er bij de lage zoutgehaltes en hoge temperaturen adaptaties optraden.

Als testrecipiënten werden cilindroconische, glazen buizen gebruikt met een inhoud van 800 ml, voorzien van een zachte puntaëratie en afgedekt met een petriplaat. Na incubatie van 50 instar I-larven (de methode is analoog als hierboven beschreven) in 250 ml artificieel zeewater (25 °C; 15 g/l, 35 g/l of 120 g/l zoutgehalte) werden de reciipiënten overgebracht in warmwaterbaden. Deze waren voorzien van een verwarmingselement gekoppeld aan een thermostaat om een constante temperatuur ( $\pm 0,5$  °C) te verzekeren. Luchtwaterpompen zorgden daarenboven voor een continue menging van het badwater. Daar het incubatiemedium steeds 25 °C bedroeg, warmde het water in de testbuizen bij 30 °C slechts geleidelijk op waardoor de larven in feite zonder bijkomende stress konden acclimatiseren. Dergelijke aanpassing aan de verschillende saliniteiten was niet noodzakelijk daar instar I-larven dergelijke schommelingen zonder problemen doorstaan (D'Agostino en Provasoli, 1968; Vanhaecke, 1983).

De proeven werden uitgevoerd in duisternis en duurden negen kweekdagen. Elke temperatuur/saliniteitscombinatie werd uitgetest in drie herhalingen. Dagelijks werden de culturen éénmaal gevoederd met een *Dunaliella tertiolecta* suspensie van  $18 \times 10^6$  cellen (zie hoger). Door Vanhaecke et al. (1984) werden de volgende aangepaste voederschema's (uitgedrukt in aantal wiercellen) ontwikkeld :

	kweektemperatuur	
	25 °C	30 °C
dag 1	$8,4 \times 10^6$	$10,8 \times 10^6$
dag 2, 3, 4	$16,8 \times 10^6$	$21,6 \times 10^6$
dag 5, 6	$25,2 \times 10^6$	$32,4 \times 10^6$
dag 7, 8	$33,6 \times 10^6$	$43,2 \times 10^6$
dag 9	$42,0 \times 10^6$	$54,0 \times 10^6$

Na stopzetting van de proef op dag 10 werd de overleving bepaald en lengtemetingen uitgevoerd (zie III.3.1.). Gezien de proeven erg variabele resultaten opleverden werd geen verdere statistische analyse uitgevoerd.

## V.5.2. Resultaten en bespreking

### 1. Uithongeringsproeven

De resultaten van de overlevingstesten en hun statistische verwerking zijn samengevat in tabel 68 en 69. In figuur 51 zijn de  $LT_{50}$ -waarden grafisch uitgezet voor beide onderzochte temperaturen.

Bij 20 °C start de mortaliteit pas na 2-4 dagen en treedt volledige mortaliteit op na 6 à 9 dagen. Bij 30 °C is er maximale overleving tot dag 2 en zijn de meeste larven dood na  $\pm$  4 dagen.

Zowel voor de  $LT_{10}$ ,  $LT_{50}$  als de  $LT_{90}$ -waarden stellen we grote variaties vast, niet alleen tussen de onderzochte rassen, maar ook tussen de entmaterialen en de  $F_1$ -generaties bekomen uit de installatie voor intensieve cystenproductie. Bovendien heeft een lage  $LT_{10}$ - of  $LT_{50}$ -waarde niet automatisch een snelle en totale mortaliteit ( $LT_{90}$ ) voor gevolg; deze laatste mortaliteitsperiode ( $LT_{90} - LT_{10}$ ) varieert dus duidelijk met het *Artemia* monster en is niet gecorreleerd met het moment waarop sterfte optreedt.

Wat de  $LT_{50}$ -waarden betreft, komen bij alle *Artemia* rassen, met uitzondering van SFB, significante afwijkingen tot uiting ten opzichte van het lot afkomstig uit de natuur. Deze variaties zijn wel veel beperkter bij 30 °C dan bij 20 °C. Zo overleven bij 20 °C LVD 822 nauplii dubbel zo lang als LVD 811 larven ( $LT_{50} = 135$  u in plaats van 66 u), maar is dit verschil praktisch nihil bij 30 °C. Bovendien zijn de tijdstippen waarop 90 % mortaliteit optreedt dezelfde voor beide rassen in beide omstandigheden. Opvallend is ook dat het Chaplin Lake monster heel lage overlevings-

Tabel 68 : Resultaten (LT-waarden in u) van de overlevingstesten  
bij 20 °C en 30 °C

Ras + Code	20 °C			30 °C		
	LT10	LT50	LT90	LT10	LT50	LT90
LVD 1980	81,4	100,6	124,4	56,5	76,6	103,9
LVD 811	23,5	65,7	183,6	63,7	80,9	102,7
LVD 821	96,0	111,6	129,8	50,3	66,5	88,0
LVD 822	101,8	135,0	178,9	68,5	84,6	104,4
LVD 826	-	127,6	-	-	75,7	-
LVD 827	-	106,1	-	44,1	63,1	90,3
GSL 185	97,5	118,0	142,8	61,3	73,3	91,5
GSL 811	84,5	103,8	127,4	50,1	72,7	105,3
GSL 832	-	156,6	-	-	85,8	-
GSL 568	105,2	129,8	160,2	22,1	49,1	109,1
GSL 861	85,2	128,1	192,6	-	89,1	-
TIE 1978*		119			63	
TIE 821	74,7	96,7	125,1	-	60,9	-
CHL 1979*		73			42	
CHL 821	39,2	56,6	81,7	19,7	30,4	46,9
SFB*		122			58	
SFB 841	73,2	124,8	212,6	47,0	67,8	97,9
SFB 842	-	117,9	-	31,0	59,1	112,6

\* waarden uit Vanhaecke, 1983

cijfers oplevert : de mortaliteit start reeds na 20 u ( $LT_{10}$  bij 30 °C), respectievelijk 40 u ( $LT_{10}$  bij 20 °C) en na ongeveer 45 u (30 °C) of 80 u (20 °C) is reeds 90 % van de populatie afgestorven. Ook de moederpopulatie is minder resistent tegen de uithongeringsomstandigheden dan andere rassen, maar geeft toch beduidend hogere waarden. Volgens Vanhaecke (1983) is de afwijkende ionensamenstelling van het cultuurmedium ten opzichte van het natuurlijke (sulfaatrijke) biotoop de meest plausibele verklaring voor de geringe levensduur van uitgehongerde CHL nauplii.

Volgens Vanhaecke (1983) zou er een significante correlatie bestaan tussen de overleving van uitgehongerde *Artemia* nauplii enerzijds en hun energie-inhoud of de globale energie-consumptie van het embryo tijdens de transitie tot instar II-III nauplius anderzijds. Uit de biochemische analyses zou verondersteld kunnen worden dat deze energie-inhoud afhankelijk is van de voederomstandigheden van de moederdieren. Nochtans duiden de resultaten op geen enkel verband tussen het type kweekvoer of de individuele voedselbeschikbaarheid voor de ouderpopulaties enerzijds en de mortaliteit in functie van de tijd van de geproduceerde nakomelingen anderzijds. Bovendien weerleggen onze resultaten de stelling van Czczuga (1980) dat de vitaliteit van de nauplii gecorreleerd is met hun gehalte aan carotenoiden. De meeste onderzochte monsters zijn immers heel arm aan canthaxanthines (zie V.4.4.) maar geven in sommige gevallen toch significant betere  $LT_{50}$ -waarden. Dit wordt eveneens bevestigd door de resultaten bekomen met cystenmateriaal vezameld uit diverse labo-culturen gevoed onder optimale omstandigheden met *Dunaliella* wieren (Tabel 69).

Ook het tijdstip waarop de cysten afgelegd zijn, interfereert niet met de leefbaarheid van de nauplii. Een éénmalige proef naar de invloed van het produktietijdstip van de nakomelingen toonde geen significante verschillen in  $LT_{50}$ -waarden bij LVD 827 : drie weken later geoogste cysten gaven bij 20 °C en 30 °C een 50 % mortaliteit na respectievelijk 109,0 u en 68,8 u.

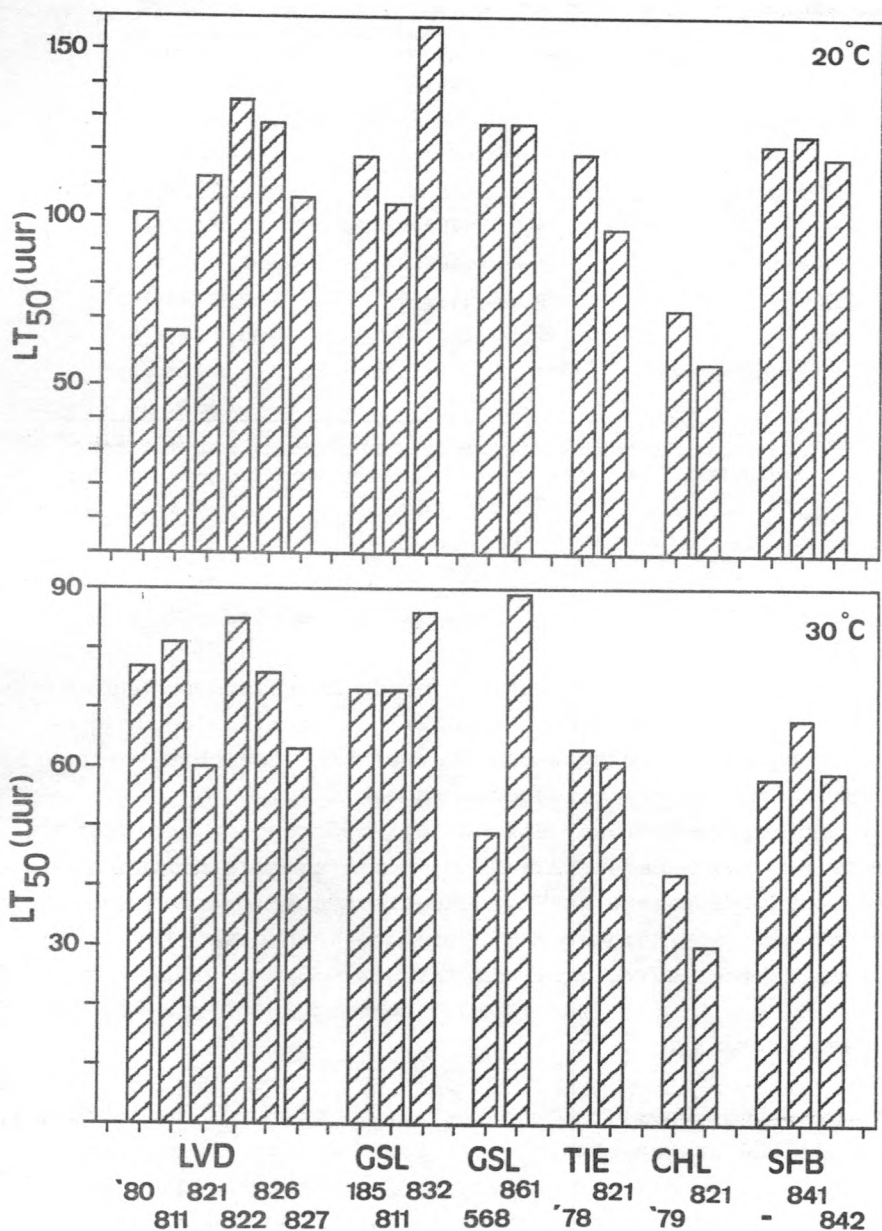


Fig. 51 : Overleving bij 20 °C en 30 °C van *Artemia* nakomelingen geproduceerd in de installatie voor cystenproductie.



Tabel 69 : LT50-waarden van de overlevingstesten bij 20 °C en 30 °C met nakomelingen geproduceerd op *Dunaliella* in het labosysteem van Dhert (1986).

Ras	TL50 (u)	
	20 °C	30 °C
LVD	24,1 (100,6) <sup>a</sup>	21,6 (76,6)
GSL	59,4 (118,0)	41,4 (73,3)
TIE	90,2 (119,0)*	63,8 (63,0)*
SFB	102,0 (122,0)*	53,0 (58,0)*
BA (Buenos Aires)	98,4 (86,0)*	52,4 (50,0)*

(a) waarden tussen haakjes zijn de LT50-gegevens voor het entmateriaal

(\* : waarden uit Vanhaecke, 1983).

## 2. Standaard-groeiproef met *Dunaliella* als voedselbron

De gemiddelde overleving van de entrassen en hun geproduceerde nakomelingen, evenals de gemiddelde lengte-groei uitgedrukt in % van de groei ten opzichte van het referentieras, zijn weergegeven in tabel 70.

Voor het referentieras (SFB 2596) bedroeg de gemiddelde lengte na zeven dagen  $3,13 \pm 0,15$  mm (gemiddelde van alle uitgevoerde proeven). Deze waarde stemt goed overeen met de bevindingen van Sorgeloos (1975b) en Vanhaecke (1983). De gemiddelde overleving voor dit ras was  $83,5 \pm 13,9$  %, wat iets lager is dan de waarde bekomen in de proeven van Vanhaecke (1983).

Wat het Lavalduc ras betreft, zijn er duidelijke verschillen waarneembaar voor zowel de overleving als de lengte. In vergelijking met het moedermateriaal is de overleving en de lengte beduidend lager voor de larven van

Tabel 70 : Groei en overleving van diverse labo-geproduceerde *Artemia* onder standaard kweekomstandigheden.

Ras + code	Overleving		Groei (ten opzichte van referentie SFB 2596)	
	%	s	%	s
LVD 256	70,0		109	
LVD 811	37,1 ± 14,7		(87,1 ± 0,12)	
LVD 1980	80,0 ± 16,7		99,4 ± 0,34	
LVD 821	58,3 ± 20,4		95,0 ± 0,15	
	98,0 ± 2,0 <sup>a</sup>		89,8 ± 0,18 <sup>a</sup>	
LVD 822	55,0 ± 12,2		89,7 ± 0,22	
	68,0 ± 14,8 <sup>a</sup>		85,6 ± 0,38 <sup>a</sup>	
LVD 826	96,7 ± 5,2		99,0 ± 0,28	
LVD 827	76,7 ± 16,3		91,7 ± 0,14	
LVD 827b (3w later)	86,7 ± 14,1		91,7 ± 0,15	
GSL 185	72		126	
GSL 811	43,3 ± 16,3		75,8 ± 0,04	
	58,0 ± 13,0 <sup>a</sup>		122,0 ± 0,29 <sup>a</sup>	
GSL 840 (ovovivi)	20,0 ± 17,3		-	
TIE 1978	96		98	
TIE 821	80,0 ± 14,1		(124,6 ± 0,32)	
CHL 1979	94		119	
CHL 821	20,0 ± 12,7		-	

homogene groepen voor LVD

overleving    LVD 822    LVD 827    LVD 1980    LVD 827b    LVD 826    LVD 821

groei

<sup>a</sup> : resultaat van een herhaling in de tijd

LVD 811 en LVD 822 cysten, geogst uit de installatie voor intensieve cystenproductie. Opvallend hierbij is dat deze beide moederpopulaties gevoerd werden met rijstvoerschroot. LVD 826 kreeg ook dit mono-dieet toegediend, maar de nakomelingen hiervan geven wel goede overlevings- en groeicijfers; voor deze LVD 826 verschillen echter de produktiekarakteristieken met die van LVD 811 en LVD 822 : de densiteit bedroeg 5 000 in plaats van 10 000 dieren per liter. Dit zou er kunnen op wijzen dat de voedselkwaliteit/kwantiteit toegediend aan de moederpopulaties interfereert met de groei-eigenschappen van de geproduceerde larven.

Opvallend is wel dat er geen correlatie te bespeuren valt tussen de produktiekarakteristieken van de diverse monsters in de standaard-groeiproef en de overlevingseigenschappen in de uithongeringstesten bij 20 °C of 30 °C : LVD 811 presteert ook slecht in de overlevingsexperimenten, LVD 822 daarentegen is gevoelig beter dan het entmateriaal in de overlevingstesten.

De LVD monsters bekomen door vervoeding van samengestelde RB-diëten geven analoge produktiecijfers als het moederras, met uitzondering van LVD 821 (RB-SPIR) waar een duidelijk maar niet significant hogere overleving en lagere groei genoteerd wordt.

De produktiekarakteristieken van de nakomelingen, bekomen op twee verschillende tijdstippen gedurende de reproductieve fase van de LVD populatie, zijn evenmin onderling significant verschillend. Dit was ook zo voor de overlevingsexperimenten.

Wat de andere *Artemia* rassen betreft, zijn in vergelijking met het moedermateriaal de overlevingscijfers van GSL en TIE ongeveer 15 % lager, terwijl de groeipercenages als gelijk mogen beschouwd worden. De hogere waarde voor de groei opgetekend met het TIE materiaal kan misleidend zijn : de lengte van het referentieras tijdens die proef was uitzonderlijk laag.

De populatie afkomstig van Chaplin Lake geeft, net zoals tijdens de overlevingstesten, een beduidend slechtere overleving dan het moedermateriaal : slechts 20 % na zeven dagen. Lengtemetingen op de *Artemia* juvenielen werden dan ook niet verricht daar de voedingsomstandigheden niet meer gestandaardiseerd waren.

Deze resultaten laten ons toe te veronderstellen dat abiotische en/of biotische omstandigheden tijdens de reproductiefase van *Artemia* interfereren met de groeicapaciteit en de leefbaarheid van de geëncysteerde embryo's. Volgens Takano (1967) zijn de nakomelingen van *Artemia* adulten gekweekt op tarwebloem en sojapellen minder leefbaar. Nakomelingen van dieren geteeld onder uithongeringomstandigheden kunnen eveneens moeilijker opgroeien (Littlepage, 1981). Ook Dana en Lenz (1986) observeerden verschillen in groei en overleving tussen nakomelingen bekomen uit de natuur of uit labo-culturen. Provasoli en D'Agostino (1969) en Provasoli en Pintner (1980) wijten de geringe leefbaarheid van de geproduceerde nakomelingen aan de afwezigheid van vetoplosbare vitamines zoals tocopherol in het aangeboden voedsel. Nochtans besluiten Vanhaecke (1983) en Vos et al. (1984) door vergelijking van SFB cystenmonsters uit geïnoculeerde biotopen dat de groeisnelheid rassen specifiek is alhoewel er geen éénduidig verband is met de genetische classificatie. Dit wordt eveneens bevestigd door de experimenten van Tarnchalanukit en Wongrat (1987).

Tot slot willen we wijzen op de lage leefbaarheid van de ovovivipaar geproduceerde nauplii, verkregen uit gist-gevoede culturen (GSL 840). Volgens Gajardo en Beardmore (1988) hebben de levend geboren nauplii steeds een lagere leefbaarheid dan de ovipaar verkregen larven. Nochtans gewagen diverse auteurs van een wisselend succes in de kweek van labo-geproduceerde larven van SFB : van 30 tot 80 % overleving na 7 tot 12 dagen (Bowen, 1962; Grosch, 1966, 1973; Browne, 1983). Dit wordt bevestigd door een aantal resultaten bekomen met ovovivipaar geproduceerde F<sub>1</sub>-generaties uit kleine reproductieproeven met LVD uitgevoerd aan

het Artemia Reference Center (Tabel 71). Uit deze preliminaire resultaten kan men opnieuw afleiden dat kweekomstandigheden (zoals o.a. het teeltsysteem en het voederaanbod) de leefbaarheid en de groei beïnvloeden. Dit zou erop wijzen dat er geen verschillen optreden in functie van het soort nakomelingen (cysten of nauplii). Vergelijkende proeven opgesteld door Vermandere (1977) tonen echter wel aan dat de temperatuur/saliniteitspreferenda verschillend zijn voor ovipaar en ovovivipaar geproduceerde larven. Levend geboren nauplii vertonen de grootste overleving bij een temperatuur/saliniteitscombinatie analoog aan deze van het milieu waarin ze afgelegd zijn; larven ontloken uit cysten daarentegen zouden euryhalien zijn.

Tabel 71 : Overleving en groei van ovovivipaar geproduceerde nakomelingen van LVD populaties geteeld onder specifieke labo-omstandigheden

Teeltomstandigheden		transparentie van het medium (cm)	Overleving		Groei	
teeltsysteem	voedsel		%	s	mm	s
renbaan	SP/PG/SPIR	15	94 ± 9		2,77 ± 0,44	
			94 ± 9		2,80 ± 0,40	
cone	SP/PG/SPIR	15	76 ± 15		2,97 ± 0,46	
cone	SP/PG/SPIR	20	34 ± 21		-	
cone	PG/PROT	15	28 ± 22		-	
			50 ± 24		3,35 ± 0,55	
cone	SP/PG/SPIR/ 5 % A	15	58 ± 19		2,30 ± 0,52	
			70 ± 10		2,18 ± 0,34	
cone	BP/PG/SPIR/10 % A	15	52 ± 11		2,02 ± 0,40	
			56 ± 11		2,19 ± 0,55	

### 3. *Temperatuur/saliniteitspreferenda*

De overlevingsresultaten voor vier temperatuur/saliniteitscombinaties zijn weergegeven in tabel 72. Gezien de grote variaties binnen dezelfde test en het gering aantal uitgevoerde herhalingen is het weinig zinvol om de resultaten aan een variantie-analyse te onderwerpen. Uit de gegevens kunnen toch enkele besluiten getrokken worden.

Eerst en vooral dient opgemerkt te worden dat de inwendige standaard, dit is het LVD entmateriaal, varieert in functie van de tijd. Dit doet ons veronderstellen dat de kweekomstandigheden niet optimaal waren. De variatie in wierkwaliteit is wellicht de hoofdoorzaak van de minder goede resultaten met het LVD entmateriaal. Bovendien zijn de geobserveerde overlevingen bijna steeds geringer dan deze gerapporteerd door Vanhaecke (1983) : zie ook tabel 73. Opvallend daarbij zijn de erg lage waarden voor de temperatuur/saliniteitscombinatie 30 °C/120 g/l (< 10 %), waar Vanhaecke nog steeds 90 % overleving observeert. Dit kan opnieuw te wijten zijn aan de minder goede kwaliteit van het *Dunaliella* voeder of aan een verlaagde leefbaarheid van de nauplii ontloken uit de reeds oude cysten (9 j gestockeerd). Bij de interpretatie van de resultaten zullen we dan ook heel voorzichtig moeten zijn.

Uit de experimenten kunnen we afleiden dat bij 25 °C, met uitzondering van het LVD 811 monster, even goede produktieresultaten bekomen worden met de labo-geproduceerde F<sub>1</sub>-generaties als met het commerciële LVD materiaal. Hogere temperaturen (30 °C) resulteren in een hoge mortaliteit terwijl het moederras ongevoelig blijft. Nochtans hebben we bij de uithongeringsproeven geen verlaagde tolerantie vastgesteld ten opzichte van hoge temperaturen (30 °C in plaats van 20 °C). De temperatuur/saliniteitscombinatie 30 °C/120 g/l geeft voor geen enkel van de onderzochte LVD monsters minder dan 90 % mortaliteit.

Tabel 72 : Overleving en groei van de geproduceerde *Artemia* nakomelingen onder diverse temperatuur/saliniteitscombinaties.

Ras	Temperatuur/saliniteitscombinaties					
	25 °C			30 °C		
	15 g/l	35 g/l		35 g/l	120 g/l	
LVD entmateriaal	82	98		72		
	90	86		86		
	60	40		68		
	--	--		--		
	77,3 % 3,8 mm	74,7 % 5,2 mm		75,3 % 5,7 mm		
LVD 811	13	10		14		
	32	40		0		
	96	36		0		
	--	--		--		
	48,7 % 3,7 mm	28,7 % 5,5 mm		4,7 % 4,5 mm		
LVD 822	92	14	90 <sup>2</sup>	0	98 <sup>2</sup>	0
	2	60	96	0	80	4
	78	92	98	2	92	6
	--	--	--	--	--	--
	87,3 % 4,7 mm	55,3 % 4,5 mm	94,7 %	0,7 %	90,0 %	3,3 %
LVD 821	92	94		2		14
	92	82		0		10
	78	84		0		6
	--	--		--		--
	87,3 % 4,7 mm	86,7 % 4,9 mm		0,7 % -		10,0 % 4,8 mm
GSL 811	68			0 <sup>1</sup>		0 <sup>1</sup>
	74			0		0
	86			0		0
	--			-		-
	76,0 % 3,4 mm			0 %		0 %

<sup>1</sup> bij 34 °C in plaats van 30 °C

<sup>2</sup> Herhaling uitgevoerd in de tijd

Tabel 72 : vervolg

Ras	Temperatuur/saliniteitscombinaties			
	25 °C		30 °C	
	15 g/l	35 g/l	35 g/l	120 g/l
LVD 827	24	80	56	0
	96	80	52	0
	46	66	26	0
	--	--	--	-
	54,3 %	75,3 %	24,7 %	0 %
	4,7 mm	5,7 mm	4,6 mm	
LVD 827 (3 w later geogst)	68	82	38	0
	10	66	32	0
	12	94	50	0
	--	--	--	-
	30,0 %	80,7 %	40,0 %	0 %
	4,2 mm	5,1 mm	4,6 mm	
LVD entmateriaal	96	86	72	14
	98	70	68	2
	96	86	74	10
	--	--	--	--
	96,7 %	80,7 %	71,3 %	8,7 %
	4,8 mm	4,6 mm	4,7 mm	
TIE 821	96	68	-	82
	98	82	68	54
	96	80	96	56
	--	--	--	--
	96,7 %	76,7 %	82,0 %	64,0 %
	5,0 mm	4,9 mm	4,4 mm	4,9 mm
CHL 821	22	6	0	0
	0	0	0	2
	42	20	0	4
	--	--	-	-
	21,3 %	8,7 %	0 %	2,0 %
	3,7 mm	3,7 mm		



Tabel 72 : vervolg

Ras	Temperatuur/saliniteitscombinaties			
	25 °C		30 °C	
	15 g/l	35 g/l	35 g/l	120 g/l
GSL entmateriaal			-	52
			82	76
			78	72
			--	--
			80,0 ‰ 6,0 mm	66,7 ‰ 4,6 mm
GSL 832	76	90	74	42
	90	92	38	-
	60	64	94	84
	--	--	--	--
	75,3 ‰	82,0 ‰	68,7 ‰	63,0 ‰
GSL 861	2	34	46	38
	74	2	34	24
	12	2	2	-
	--	--	--	--
	29,3 ‰	12,7 ‰	27,3 ‰	31,0 ‰

Volgens Vanhaecke *et al.* (1984) treedt er bij 30 °C geen hogere mortaliteit op bij zowel LVD, GSL als TIE *Artemia* (zie tabel 73). Onze resultaten bevestigen dit gedeeltelijk voor GSL en TIE : de overleving bedraagt steeds meer dan 60 %. Voor beide rassen blijken de labo-geproduceerde nakomelingen eurytherm en euryhalien voor de onderzochte gebieden. Toch is er een preferentie voor het lage zoutgehalte bij TIE 821, wat niet opgemaakt kan worden uit de bevindingen van Vanhaecke (1983).

Zowel bij de LVD als de GSL populaties is er een uitbijter, respectievelijk LVD 811 en GSL 861, die opmerkelijk lager presteert onder alle omstandigheden. Dit is waarschijnlijk te wijten aan de verminderde groeicapaciteit van de nakomelingen, zoals ook opgemaakt kan worden uit de standaard groeitesten (zie hoger). Ook de  $F_1$ -generatie van het Chaplin Lake ras vertoont een erg lage overleving; dit bevestigt eveneens wat in de vorige testen werd waargenomen.

Tabel 73 : Overlevingspercentages in functie van temperatuur/saliniteitscombinaties voor diverse *Artemia* rassen (naar Vanhaecke, 1983)

Ras	Temperatuur/saliniteitscombinatie			
	26 °C		30 °C	
	15 g/l	35 g/l	35 g/l	120 g/l
LVD	94	90	90	92
GSL	78	92	94	88
TIE	72	90	84	86
CHL	26	76	56	18

Hoewel de variabele resultaten weinig ruimte laten om tot definitieve besluiten te komen, mogen we toch veronderstellen dat er weinig tolerantieverschillen optreden voor temperatuur en zoutgehalte tussen de moederpopulaties en hun nakomelingen geproduceerd onder gecontroleerde omstandigheden bij 25 °C en relatief lage zoutgehaltenes (<90 g/l). Met andere woorden, de abiotische factoren temperatuur en zoutgehalte lijken de gevoeligheid van de  $F_1$ - (en de daarop volgende ?) generaties voor deze parameters niet sterk te beïnvloeden. Een proevenreeks uitgevoerd met LVD 822 bij 25 °C en bij 5, 10 en 15 g/l zoutgehalte ondersteunt deze hypothese : terwijl bij 15 g/l nog 70 % overleving genoteerd wordt, daalt deze aanzienlijk bij de andere zoutgehaltenes (respectievelijk 8 % en 0 % overleving).

#### V.5.4. Conclusies

De leefbaarheid en de groei van nakomelingen, geproduceerd onder gecontroleerde omstandigheden zijn in verschillende gevallen afwijkend (zowel in de positieve als in de negatieve zin) van de karakteristieken van het moedermateriaal. Tussen de verschillende proeven onderling kunnen geen éénduidige verbanden gelegd worden en treden in sommige gevallen zelfs tegenstrijdigheden op. Zo vertoont LVD 822 slechtere produktiekarakteristieken dan het entmateriaal enkel in de standaard groeiproef en niet in de resistentietesten. Voor alle LVD monsters stellen we tijdens de temperatuur/saliniteits-experimenten maar niet tijdens de uithongeringsproeven bovendien een tolerantieverlaging vast voor hoge temperaturen. Enkel de LVD 811 en CHL 821 monsters blijken minder goed te overleven en te groeien in de drie reeksen experimenten.

Overleving en groei lijken dus (ook) fenotypisch bepaald te worden : bepaalde produktie-omstandigheden beïnvloeden de leefbaarheid en de produktiekarakteristieken van de nakomelingen. Misschien kan de voedselbeschikbaarheid aangeduid worden als een specifieke factor. Er is geen

eenduidig verband met de biochemische samenstelling van de nakomelingen. Zo hebben zelfs carotenoïdvrije nauplii goede overlevings- en groeikansen. Enkel de tolerantiegebieden voor temperatuur/saliniteit zouden rasspecifiek kunnen zijn. Er treedt namelijk geen adaptatie op aan diverse milieu-omstandigheden. Een mooi voorbeeld daarvan is LVD waarvan de moedercysten geproduceerd zijn bij zeer hoge zoutgehalten ( $\pm 200$  g/l : Lavens, 1982), terwijl de cysten geproduceerd in het labo bij  $\pm 70$  g/l zoutgehalte geen gewijzigde saliniteitspreferenda vertonen.

Evenmin is er een correlatie met de ontluikingskenmerken van deze cystenmonsters : nauplii van geëncysteerde embryo's waarvan de diapauze moeilijk gedesactiveerd wordt, zijn net zo levenskrachtig als die afkomstig van 'normale' embryo's.

## HOOFDSTUK VI

### ALGEMENE BESLUITEN

De bijdrage van ons werk tot een betere fundamentele kennis van de biologie van het pekelkreeftje en tot een verbeterde toepassing van *Artemia* in de aquacultuur kan tot zes deelaspecten herleid worden.

#### 1. *Ontwikkeling van een doorstroom-techniek voor de kweek van preadulten*

Uit de literatuurstudie blijkt dat doorstroom-systemen het best geschikt zijn voor de teelt van hoge densiteiten van pekelkreeftjes : zowel kweekparameters als overleving en groei kunnen maximaal gecontroleerd worden. Wij hebben dan ook geopteerd voor het doorvloeiprincipe ter ontwikkeling van een standaard kweekprocedure waarbij het effluent gezuiverd wordt in een recirculatie-eenheid zodat het verbruik aan zeewater en de energiekost kan geminimaliseerd worden. Uit de uitgevoerde kweekproeven met de ontwikkelde installatie kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- Het toepassen van de nieuwe filtreertechniek met 'Trislot'-filters voor de evacuatie van het kweekeffluent heeft in grote mate bijgedragen tot de standaardisatie en schaalvergroting van het kweekproces : niet alleen de waterkwaliteit kan beter gecontroleerd worden, maar ook het onderhoud wordt vereenvoudigd waardoor de automatisering verder kan worden doorgedreven.
- Het recirculatiesysteem blijkt in voldoende mate het kweekeffluent te zuiveren van opgeloste stoffen : occasionele bepalingen van de totale belasting en van  $\text{NH}_4^+$ -N,  $\text{NO}_2^-$ -N en  $\text{NO}_3^-$ -N in het bijzonder, duiden op aanvaardbare zuiveringswaarden. De verwijdering van fijn partikulaire stoffen is echter niet optimaal en

levert een indirect gevaar op voor ontwikkeling van microörganismen.

- Verschillende mengdiëten op basis van gisten en/of bijprodukten van de landbouw zijn geschikt als voedsel voor de intensieve kweek van *Artemia*. Er is geen één-duidig verband tussen de produktieresultaten en de benaderende biochemische samenstelling van de toegediende diëten. De resultaten suggereren wel dat het proteïnegehalte op zich minder belangrijk is en dat vezels optimale produktiecijfers garanderen. Bovendien lijkt het succes beïnvloed te worden door de aanwezige microflora die deficiënties voor bepaalde nutriënten kan aanvullen. Uiteindelijk hebben we geopteerd voor de mengdiëten van het type Prairiegold-sojapellen en Protibel-sojapellen als standaard kweekvoedsel.
- Het maximaal aantal dieren per kweektank waarbij geen interferentie optreedt met overleving en groei bedraagt ongeveer 10 000 dieren per liter.
- Diverse *Artemia* rassen zijn geschikt als inoculum voor de produktie van biomassa.

Naast de arbitrair ingestelde kweekomstandigheden - geïnspireerd door de uitgevoerde literatuurstudie en de proefondervindelijk vastgestelde densiteitsoptima, basisdiëten en raselectie - hebben we de kweekprocedure verder gestandaardiseerd door het instellen van toevoerdebieten en voederregimes in functie van het ontwikkelingsstadium van *Artemia*. Slechts één aspect blijkt onvoldoende onder controle, namelijk het weren van infecties met de filamenteuze bacterie *Leucothrix*. Als meest praktische maatregel om dergelijke contaminaties te vermijden stellen we een saliniteitsstress voor in combinatie met een hogere verversingsgraad. Een meer complex alternatief is de puntdosering met peroxide.

Het hier voorgestelde doorvloei-recirculatiesysteem is geschikt voor de teelt van hoge densiteiten aan *Artemia* larven, die snel groeien en uiteindelijk een hoge biomassa opleveren : de overleving en de groei bedragen over een

kweekperiode van 14 dagen gemiddeld 55 %, respectievelijk 5,5 mm zodat uiteindelijk per  $m^3$  kweekvolume  $\pm$  12 kg natgewicht aan preadulten kan geoogst worden. Tijdens die periode groeien de pekelkreeftjes met een factor 15 voor de lengte en een factor 120 voor de biomassa. Dergelijke produktiecijfers zijn vergelijkbaar met deze bekomen in open doorvloeisystemen.

Deze doorstroom-installatie kan als basisconcept gebruikt worden voor de produktie van *Artemia* juvenielen en adulten in aquacultuur-broedhuizen. De nutritionele karakteristieken van dergelijke intensief geproduceerde pekeltkreeften zijn op uitzondering van het vetzuurpatroon analoog met deze van populaties uit de natuur en dus onafhankelijk van het aangeboden dieet. Het lipidenprofiel kan gemanipuleerd worden door toepassing van bioëncapsulatieprocedures. De beschikbaarheid van *Artemia* juvenielen (van diverse afmetingen) als alternatief voedsel voor nauplii voor de teelt van larvale vissen en garnalen biedt interessante mogelijkheden tot :

- het drukken van de totaalkost voor de voeding door een verminderd cystenverbruik;
- het beheersen van moeilijke teeltfasen zoals spenen of metamorfoserende door een betere fysiologische toestand van predatoren ten gevolge van een betere nutritionele en energetische balans wanneer juvenielen aangeboden worden;

wat uiteindelijk de rentabiliteit van het aquacultuurbedrijf kan verhogen.

De ontwikkelde produktietechniek voldoet daarenboven aan de gestelde eisen om te kunnen overgaan naar het tweede gedeelte van het voorgestelde onderzoek, namelijk de gecontroleerde produktie van nakomelingen.

## 2. *Ontwikkeling van een standaard systeem voor de gecontroleerde produktie van cysten*

Diverse adaptaties blijken vereist te zijn om de hoger beschreven installatie te gebruiken als een gestandaardiseerd produktiesysteem voor cysten.

Vooreerst is het noodzakelijk om de kweektechnologie aan te passen voor het in stand houden van adulte populaties. Uit de experimenten blijkt immers dat adulte pekelkreeftjes veel gevoeliger zijn dan preadulten ten opzichte van hoge partikelconcentraties waardoor voederdosering op basis van doorzichtigheid van het medium onmogelijk wordt. Daarom werd een nieuw criterium gebruikt om het effect uit te testen van verschillende voederdosages op de populatiekarakteristieken : het voederen in functie van het biomassagewicht der populatie.

Uit deze proeven blijkt dat dagelijkse voederdoseringen van maximaal 10 % drooggewicht voedsel t.o.v. levend gewicht biomassa een hoge overleving (60 %) en een optimale reproductie-activiteit garanderen van adulte pekelkreeften; hogere doseringen veroorzaken een vlugge mortaliteit tengevolge van verstopping van het thoracopodiaal filtreerapparaat. De juiste afstelling van de voederdosering is echter wel afhankelijk van het aangeboden dieet. Als begeleidende maatregelen werden hierbij de voederfrequentie opgedreven tot 3 min en de retentietijd van het medium ingesteld op 2 u.

Daarnaast dient een geschikte standaardtechniek voor de inductie van de aard van de reproductie naar ovipariteit ontwikkeld te worden. Twee technieken werden hierbij uitgetest : voederstress en zuurstofstress in combinatie met Fe-EDTA additie. De keuze van de procedures gebeurde op basis van literatuurgegevens en de mogelijkheid tot integratie van de methode in het doorstroom-concept zonder dat de andere populatie-karakteristieken beïnvloed worden.

Uit de experimenten blijkt dat toepassing van voederstress niet geschikt is : het is niet alleen inefficiënt om



maximale ovipariteit te verkrijgen, het interfereert daarenboven met de overleving van de adulten. Het cyclisch doorborrelen van het medium met stikstof (met een daling van het zuurstofgehalte tot gevolg) in aanwezigheid van  $\text{Fe}^{3+}$ -ionen is wel geschikt op voorwaarde dat de stress-inducties starten vanaf het juveniel stadium : gemiddeld 87 % van de reproductief actieve wijfjes worden dominant ovipaar terwijl de overleving en de reproductie-activiteit hoog blijven. Volgende interessante feiten kunnen eveneens vastgesteld worden :

- het effect van de inductie is afhankelijk van het *Artemia* ras, wat erop duidt dat ook genetische factoren een rol spelen
- indien de stress pas vanaf het preadulte stadium toegediend wordt, is het eerste broed onveranderlijk ovovivipaar en start de cystenproductie pas vanaf het tweede broed
- de gehalten aan hemoglobine Hb-III stijgen door de toegepaste inductie-methodiek. Dit ondersteunt (tesamen met de andere observaties) de hypothese waarbij gesteld wordt dat dit specifiek Hb-III essentieel is voor de inductie van ovipariteit bij *Artemia*.

Tenslotte is een procedure ontwikkeld om enerzijds de geproduceerde cysten continu te oogsten zonder de diapauze-toestand te beïnvloeden en anderzijds om de geëncysteerde embryo's te zuiveren en te stockeren.

Als besluit mag gesteld worden dat het ontwikkelde labo-systeem voor gecontroleerde produktie van cysten beantwoordt aan de vooropgestelde eisen, namelijk het verkrijgen van voldoende cysten onder standaard kweekomstandigheden. Voor het Lavalduc ras b.v. kunnen produkties gehaald worden van 150 000 cysten per 10 l-aquarium per dag. De kwantiteit geproduceerd broed varieert echter naargelang de ouderdom van de populatie, omgevingsomstandigheden, ras, enz...

Gezien de hoge produktiekost kan deze installatie niet wedijveren met natuurlijke exploitaties en kan dus niet ontwikkeld worden tot een economisch verantwoorde methode voor massaproductie van cysten. Wel kan het interessant zijn om enkele kilogrammen hoogwaardig cystenmateriaal (b.v. van veredelde rassen bekomen door kruising) te produceren als entmateriaal voor inoculatie in specifieke, intensieve kweekvijvers. Zo kunnen voldoende grote hoeveelheden cysten aangemaakt worden voor gebruik als referentiemateriaal in intercalibratietesten, ofwel als voedselbron met uitzonderlijke karakteristieken voor aquacultuurtoepassingen.

### *3. Ontwikkeling van een standaard systeem voor de gecontroleerde productie van nauplii*

Een techniek is ontwikkeld voor de productie van levend geboren nauplii op basis van de bestaande installaties. Daar in de literatuur geen factoren vermeld worden die specifiek ovovivipariteit induceren, hebben we gekozen voor een kweekprocedure waarbij slechts minimale stress-situaties of fluctuaties van omgevingsparameters kunnen optreden. Vooral de zuurstof- en voederomstandigheden zijn nauwkeurig ingesteld. Uit de uitgevoerde proeven kan afgeleid worden dat :

- de opgezette inductiestrategie inderdaad een dominante ovovivipare reproductiewijze oplevert;
- verse bakkersgist of stokerijgist de beste diëten blijken te zijn om ovovivipariteit als dominante reproductievorm aan te houden zonder dat de overleving aangetast wordt. Dit zou kunnen te wijten zijn aan een geringere contaminatie van het kweekmedium door dit type voedsel of aan de onmogelijkheid van de pekalkreeften om voldoende pigmenten te produceren die vereist zijn bij ovipariteit.

Verder is een efficiënte recuperatietechniek ontwikkeld voor de continue afoogsting van pas afgelegde nauplii. Deze installatie kan autonoom werken gedurende minimum 12 u.

Toch moeten de gegevens als preliminair beschouwd worden en zijn verdere testen essentieel om tot een standaardtechniek te komen. Hierbij kan gedacht worden aan :

- selectie van rassen die genotypisch geadapteerd zijn aan een nauplii-reproductie;
- ontwikkeling van een standaard dieet op basis van gisten.

Een kosten-baten analyse van dergelijk produktiesysteem zal de uiteindelijke commerciële toepasbaarheid in aquacultuur-bedrijven moeten bepalen.

#### 4. *Ontluikbaarheid en diapauze-desactivering van de geproduceerde cysten*

Uit het literatuuroverzicht blijkt dat ofwel zeer weinig geweten is ofwel misvattingen bestaan over de cryptobiotische stadia bij *Artemia* en andere cystenproducerende Crustacea of Rotifera. We hebben het dan ook noodzakelijk geacht om in eerste instantie uniforme definities vast te leggen voor de verschillende vormen van cryptobiose (diapauze, quiëscentie,...) om zo tot een beter inzicht te komen in de factoren die de cryptobiose en de ontluikbaarheid van cysten beïnvloeden. Mede aan de hand van experimenten op het cystenmateriaal geproduceerd onder gecontroleerde omstandigheden in de labo-installatie kunnen verschillende factoren aangeduid worden die een significante invloed hebben op de ontluikbaarheid van de geëncysteerde embryo's :

- genotypische factoren;
- productie-omstandigheden zoals de voedselbeschikbaarheid voor de ouderpopulatie en eventueel saliniteit van het kweekmedium. Een verklaring voor deze interacties is speculatief maar de proefresultaten laten uitschijnen dat er waarschijnlijk een rechtstreeks effect is op de intensiteit van de diapauze die optreedt tijdens het gastrula-stadium van de embryonale ontwikkeling;

- het moment van broedvorming in de totale reproductieve periode. Een verklaring voor dit fenomeen is niet voorhanden;
- omstandigheden die de toestand van diapauze opheffen :
  - + dehydratie is vaak onvoldoende; bovendien is het effect ervan afhankelijk van de drogingsgraad
  - + dehydratie/hydratatie-cycli
  - + anoxie
  - + aestivatie; onder welke vorm dit gebeurt lijkt niet belangrijk
  - + hibernatie blijkt voor vele rassen effectief te zijn; behandelingsduur, temperatuur en de toestand waarin de cysten de hibernatie ondergaan bepalen mede de doeltreffendheid
  - + peroxide-behandeling werkt als een universele inhibitor; niet alleen de concentratie aan  $H_2O_2$  en incubatieduur maar ook de prehydratatie en pH hebben een belangrijke invloed; een behandeling met 5 %  $H_2O_2$  gedurende 15 min na 2 u prehydratatie mag als optimaal beschouwd worden.
  - + behandeling met andere oxydantia zoals  $KMnO_4$  en  $NaOCl$
  - + gecombineerde behandelingen (b.v. hibernatie + peroxide) geven synergetische resultaten
- exploitatie-omstandigheden zoals oogsten, zuiveren, drogen en stockeren van de cysten;
- omstandigheden tijdens het ontluikingsproces zoals temperatuur, saliniteit, pH en zuurstofgehalte van het incubatiemedium, belichting.

Het diapauze-proces speelt blijkbaar een sleutelrol in deze problematiek van ontluikbaarheid omdat de invloed van vele hogervernoemde factoren op dit proces kan teruggebracht worden. Dit is niet verwonderlijk daar de diapauze-regulatie instaat voor enerzijds de overleving van de populatie tijdens tijdelijk ongeschikte biotoop-omstandigheden en anderzijds voor de synchronisatie van de levenscyclus met seizoensale biotoopwijzigingen.

De proefresultaten laten verder uitschijnen dat het mechanisme voor diapauze-instelling wellicht universeel is binnen het genus *Artemia* (en zelfs binnen de Phyllopoda). De optredende variaties zouden dan te wijten zijn aan het bestaan van verschillende gradaties waarmee de diapauze kan intreden of opgeheven worden. Dit zou het wisselend succes verklaren van diverse diapauze-inhibitiefactoren (zoals drogen). Tenslotte kan aangenomen worden dat, afhankelijk van het geografisch ras of species, er een verschillende minimale drempelwaarde bestaat voor diapauze-desactivering die gecorreleerd kan zijn met specifieke biotoop-eigenschappen en dus een ecologische adaptatie inhoudt. Hoe deze hypothese zich vertaalt op cellulair vlak is onduidelijk. Interdisciplinair onderzoek op goed gedefinieerd materiaal, geproduceerd onder gecontroleerde omstandigheden in labo-systemen is dan ook een vereiste om het fundamenteel proces van diapauze te ontrafelen. Voor de commerciële uitbating van *Artemia* cysten kunnen deze nieuwe gegevens leiden tot een gevoelige toename van het marktaanbod van kwaliteitscysten.

##### *5. Biometrische en biochemische karakterisatie van de geproduceerde cysten en nauplii*

De resultaten in verband met de biometrie tonen aan dat voor de meeste rassen afwijkende waarden bekomen worden. Vergeleken met het moedermateriaal zijn de al of niet ontschaalde cysten van Lavalduc, Tientsin en Great Salt Lake steeds kleiner in diameter, terwijl die van San Francisco Bay altijd groter zijn. Daar ook binnen dezelfde rassen variaties tot  $\pm 25$  m, respectievelijk  $\pm 5$  m optreden mag als conclusie gesteld worden dat de diameter der cysten en de schaaldikte niet alleen genotypisch maar ook fenotypisch bepaald zijn. Dit is in tegenstelling tot wat algemeen aanvaard wordt. Er kunnen echter geen éénduidige verbanden vastgelegd worden met de omgevingsomstandigheden; wel zijn er enkele tendenzen :

- vooral hogere zoutgehaltenes ( $> 75$  g/l) lijken de diameter van het embryo en de schaaldikte te beïnvloeden;
- de kweekdensiteit aan *Artemia* of de samenstelling van het dieet geeft geen verschillen; wel kan er een indirect effect optreden van het dieet via de fecunditeit : grotere worpen zouden kleinere cysten tot gevolg kunnen hebben indien de voedselbeschikbaarheid niet optimaal is.

Bovendien kan vastgesteld worden dat de biometrische kenmerken variëren in functie van het tijdstip in de reproductieve cyclus. De geringe verschillen tussen de commercieel beschikbare loten van eenzelfde ras zou dus te wijten kunnen zijn aan het feit dat deze steeds uit mengsels van diverse produktietijdstippen bestaan. Verder onderzoek is echter vereist om de juiste parameters verantwoordelijk voor de biometrische karakteristieken te bepalen evenals hun graad van invloed. Dit alles betekent dat men, in tegenstelling tot wat aanvaard werd, heel voorzichtig moet zijn bij het onderscheiden van geografische rassen op basis van de biometrische kenmerken van hun cysten.

Uit de biochemische analyses blijkt dat de samenstelling van het dieet toegediend aan de moederpopulatie de biochemische eigenschappen bepaalt van de geproduceerde nakomelingen (cysten of nauplii) :

- Het vetzuurpatroon van de nakomelingen is een duidelijke weerspiegeling van de vetzuren samenstelling van het aangeboden voedsel, onafhankelijk van het *Artemia* ras en de reproductiewijze. Opmerkelijk is wel dat de inverse relatie tussen de vetzuren 18:3  $\omega$ 3 en 20:5  $\omega$ 3, zoals meestal waargenomen in natuurlijke populaties, niet voorkomt in labo-geproduceerde cysten. Dit alles betekent concreet dat de geobserveerde variaties tussen de cystenloten afkomstig van diverse rassen of binnenin eenzelfde ras te wijten zijn aan de nutritionele kwaliteit van de primaire produktie in de biotopen. Daar de meeste commerciële oogstplaatsen geen mogelijkheden bieden voor een betere beheersing

van de algenkwaliteit zal het cystenaanbod voor aquacultuur-toepassingen geconfronteerd blijven met een variabiliteit in nutritionele samenstelling. Dit kan in zekere mate de toepassing van *Artemia* in larvale aquacultuur beperken omdat vooral het gehalte aan essentiële vetzuren de nutritionele waarde van *Artemia* bepaalt.

- Het aminozuurprofiel daarentegen geeft slechts beperkte verschillen. Enkel de kwantitatieve samenstelling lijkt negatief beïnvloed door diëten met een relatief laag proteïnegehalte.
- De koolhydraatgehaltenes van trehalose en glycerol variëren willekeurig tussen diverse geproduceerde broedsels. Het glycerolgehalte van geproduceerde cysten is bovendien steeds lager dan in het moedermateriaal. Er kan geen correlatie gelegd worden tussen de koolhydraatprofielen en de ontluikingspercentages; dit toont aan dat er geen verstoring optreedt van het 'trehalose-glycerol hyperosmotic regulatory system' dat een belangrijke rol speelt tijdens het ontluikingsproces. Het totaal koolhydraatgehalte is wel lager bij de geproduceerde cysten die praktisch niet ontluiken. Mogelijk kan hierdoor de resistentiecapaciteit t.o.v. extreme omstandigheden tijdens cryptobiosis aangetast zijn.
- De schaalkleur van de geproduceerde geëncysteerde embryo's verschilt praktisch nooit van deze van het entmateriaal. Dit zou er kunnen op wijzen dat dit een genetisch vastgelegd kenmerk is.
- Het kwantitatief carotenoidgehalte in de nakomelingen is duidelijk afhankelijk van het toegediende dieet. Kwalitatief zijn er slechts geringe verschillen : de cis/trans-ratio van canthaxanthine blijft ongeveer dezelfde. Opnieuw is er geen verband met de ontluikbaarheid van de geproduceerde cysten : zelfs canthaxanthine-arme embryo's bezitten de capaciteit om te ontluiken. De veronderstellingen dat carotenoïden een beschermende rol spelen tijdens de cryptobiose of

de toestand van diapauze induceren, lijken hierdoor weerlegd.

#### 6. *Leefbaarheid van het geproduceerde broed*

Uit de drie reeksen proeven die in dit kader uitgevoerd zijn (uithongerings-, groei- en resistentietesten), kan men afleiden dat de leefbaarheid en de groei van de geproduceerde nakomelingen in meerdere gevallen afwijkend zijn van de karakteristieken van het moedermateriaal. Tussen de verschillende proeven onderling kunnen geen verbanden gelegd worden tussen de karakteristieken die de leefbaarheid bepalen en treden in sommige gevallen zelfs tegenstrijdigheden op.

- De uithongeringsproeven wijzen uit dat er vooral grote variaties optreden in  $LT_{50}$ -waarden en totale mortaliteitsperiode ( $LT_{90} - LT_{10}$ ) bij 20 °C terwijl bij 30 °C de resultaten minder variabel zijn. Verder kan er geen enkel verband geobserveerd worden tussen het type dieet of de voedselbeschikbaarheid en de mortaliteit in functie van de tijd bij 20 °C en 30 °C.
- Uit de groeiproeven blijkt dat de optredende variaties in overleving verschillend zijn van deze bekomen in de uithongeringsproeven en eventueel te wijten kunnen zijn aan de voedselkwaliteit/kwantiteit toegediend aan de moederpopulatie. Er zijn geen groei- of overlevingsverschillen merkbaar tussen de ovipaar en de ovovivipaar geproduceerde nakomelingen.
- Indien de geproduceerde larven gekweekt worden bij verschillende temperatuur/saliniteits-regimes treden er relatief geringe tolerantieverschillen op. Enkel bij blootstelling aan 30 °C is in vergelijking met het moedermateriaal de mortaliteit gevoelig hoger en dit vooral voor het Lavalduc ras. Nochtans is er geen verlaagde tolerantie vastgesteld in de uithongeringsproeven.



Wij mogen dus besluiten dat overleving en groei fenotypisch bepaald worden. Als bepalende factor kan uit onze proeven enkel de individuele voedselbeschikbaarheid aangeduid worden. Er is geen éénduidig verband met de biochemische samenstelling. Enkel de tolerantiegebieden voor temperatuur/zoutgehalte zouden rasspecifiek kunnen zijn. Er treedt namelijk geen adaptatie op aan diverse milieuomstandigheden. Evenmin is er een correlatie met de ontluikbaarheid van deze cystenmonsters : de graad van diapauze interfereert dus niet met de levenskracht van de ontloken nauplii.

Tot slot van deze verhandeling menen we te mogen besluiten dat deze studie, die bijgedragen heeft tot enerzijds de ontwikkeling van technologische verbeteringen in verband met de toepassing van *Artemia* in de aquacultuur en anderzijds een betere kennis van enkele biologische aspecten van het organisme zelf, verre van beëindigd is. Het onderzoek heeft aangetoond dat diverse misvattingen bestaan in de literatuur met betrekking tot het genotypisch of fenotypisch karakter van verschillende kenmerken bij *Artemia* en de cryptobiotische toestand van de embryo's. Hierdoor werd de noodzaak onderstreept van wel gedefinieerd, uniform materiaal voor specifiek onderzoek op dit organisme. Wij zijn dan ook overtuigd dat verder interdisciplinair onderzoek op cysten of nauplii geproduceerd onder specifieke omstandigheden kan leiden tot het ontrafelen van ecologische en biochemische mechanismen bij *Artemia* zoals :

- de rol van cis-isomeren van canthaxanthine of cryptobiotische eiwitten (S18) in het reproductie-proces
- biochemische verklaring van het diapauze-proces en hoe omgevingsfactoren hierop kunnen inspelen
- de nutritionele eigenschappen van specifieke componenten

De door ons ontwikkelende techniek voor de produktie en oogst van standaardcysten onder gecontroleerde omstandigheden heeft de basis gelegd om dit onderzoeksdomein verder te exploreren. Daarnaast dient het onderzoek opgevolgd te

worden i.v.m. de toepassingsmogelijkheden van de technieken voor de intensieve produktie van *Artemia* nauplii en pre-adulten in de broedhuizen. Hiervoor dienen kostenbaten analyses uitgevoerd te worden en is het essentieel de mogelijkheden tot schaalvergroting na te gaan van het nauplii-produktiesysteem. Het onderzoek naar de algemene voedingswaarden van diverse stadia van *Artemia* (meta-nauplii, juvenielen, preadulten, adulten) tijdens specifieke produktiefazen van verschillende aquacultuur-species zal hierbij van primair belang zijn.

## HOOFDSTUK VII

### SAMENVATTING

Parallel met de explosieve ontwikkeling van de aquacultuur is ook de interesse voor het prooidier *Artemia* sterk toegenomen. Een verdere optimalisering van de toepassing van *Artemia* in de vis- en crustaceeënteelt is dan ook gewenst. Dit vereist naast de ontwikkeling van specifieke technologieën ook een betere kennis van dit organisme o.a. op het gebied van de ontluiking van de cryptobiotische cysten en van de factoren die de nutritionele karakteristieken bepalen. Het succes van dergelijk onderzoek is echter afhankelijk van goed gedefinieerd cystenmateriaal daar de variabiliteit binnen de commerciële monsters te hoog is.

Ons onderzoek spitste zich in de eerste plaats toe op de ontwikkeling van een kweekstelsel voor de gecontroleerde productie van *Artemia* cysten onder specifieke omstandigheden. Daartoe werd gestart met een grondige literatuurstudie om een inzicht te verwerven in :

- de abiotische en biotische factoren die de teeltomstandigheden en/of reproductiekarakteristieken kunnen beïnvloeden;
- de voedingsbiologie van de diverse stadia van *Artemia* (nauplii, juvenielen, adulten) met vooral aandacht voor de regulatie van de voedselopname en de nutritionele behoeften;
- bestaande kweektechnologieën voor de intensieve teelt van *Artemia* (pre-)adulten;
- de reproductiebiologie met vooral aandacht voor de inductie van de reproductiewijze.

Aan de hand van de bekomen informatie werd eerst een doorvloeï-installatie met recirculatie van het kweekwater ontwikkeld voor de teelt van nauplii tot adulten. Het systeem bestaat essentieel uit een kweekeenheid met zes 300 l tanks elk voorzien van een innovatieve filtermodule, een

recirculatie-eenheid met platenbezinkers, biodisc, 'cross flow'-zeef en U.V.-installatie, en een stockbekken. Volgende resultaten werden met deze installatie bekomen :

- de nieuwe filtreertechniek evacueert op een efficiëntere wijze het vervuilde water uit de kweektanks dan de traditionele zeven waardoor de culturomstandigheden beter in de hand kunnen gehouden worden;
- de waterkwaliteit kan op een aanvaardbaar niveau gehouden worden;
- mengdiëten op basis van sojapellen en Prairiegold of Protibel geven de hoogste produktiewaarden;
- densiteiten tot 10 000 pekelkreeften/l geven optimale populatiekarakteristieken;
- diverse *Artemia* rassen zijn geschikt als inoculum voor biomassaproduktie;
- over een kweekperiode van 14 dagen bedragen de overleving en groei gemiddeld 55 %, respectievelijk 5,5 mm zodat per m<sup>3</sup> kweekvolume ± 12 kg natgewicht aan adulten kan geoogst worden.

Dit concept werd aangepast voor de produktie van cysten onder gecontroleerde omstandigheden :

- een nieuwe voedingsstrategie op basis van het biomassagewicht der populatie werd uitgewerkt om adulte *Artemia* langdurig in cultuur te houden zonder de reproductie-activiteit te schaden;
- een geschikte inductietechniek werd ontwikkeld : in aanwezigheid van Fe<sup>3+</sup>-ionen werden cyclische zuurstofstresses toegediend via N<sub>2</sub>-doorborreling vanaf het juveniel stadium met 90 % ovipariteit tot gevolg;
- een methode voor continue afoogsting evenals zuivering der cysten werd ontwikkeld.

Met deze installatie was het mogelijk voldoende hoeveelheden standaardcysten te produceren van diverse rassen onder specifieke omstandigheden van temperatuur, saliniteit en dieet voor verder onderzoek.

Daarnaast werd gepoogd om aan de hand van hogervermelde kweektechnieken een procedure te ontwikkelen voor de continue produktie van ovovivipaar verkregen nauplii :

- als inductiestrategie werd geopteerd voor een kweekprocedure waarbij slechts minimale stresssituaties of fluctuaties van omgevingsparameters kunnen optreden;
- als voedsel bleek verse bakkersgist of stokerijgist het meest geschikt om ovovivipariteit te favoriseren;
- een efficiënte recuperatietechniek voor automatische afoogsting van de nauplii werd ontwikkeld.

Tenslotte werden de diverse cysten en/of nauplii-collecties, geproduceerd in de ontwikkelde labo-systemen, gekarakteriseerd op hun :

- diapauze-toestand en ontluikingskenmerken
- biometrische kenmerken
- biochemische samenstelling
- leefbaarheid bij twee verschillende temperaturen
- groeisnelheid
- voorkeur en tolerantie t.o.v. temperatuur en saliniteit.

De resultaten van deze studies hebben een belangrijke bijdrage geleverd tot een betere kennis van :

- de cryptobiotische toestand van de geëncysteerde embryo's en de invloed van diverse factoren hierop;
- de causale factoren voor de verschillen in nutritionele waarde tussen de nauplii van *Artemia*;
- de genotypische of fenotypische aard van enkele kenmerken.

a. In verband met de cryptobiotische toestand der cysten konden, mede aan de hand van een uitgebreide literatuurstudie, verschillende factoren aangeduid worden die de ontluikbaarheid beïnvloeden :

- genotypische factoren;
- produktie-omstandigheden (voedselbeschikbaarheid en saliniteit);
- reproductie-tijdstip;

- diapauze-inhibitoren waarvan de voornaamste dehydratie, hibernatie, aestivatie en peroxide-behandeling zijn;
- exploitatie-omstandigheden (oogsten, zuiveren, drogen, stockeren);
- incubatie-omstandigheden tijdens het ontluikingsproces.

De proefresultaten toonden verder aan dat het causale mechanisme voor diapauze niet rasgebonden is; wel zijn verschillen mogelijk wat de minimale drempelwaarde voor diapauze-instelling of -desactivering betreft.

- b. De biochemische analyses duiden aan dat het type dieet aangeboden aan de moederpopulatie enerzijds het vetzuurpatroon kwalitatief en kwantitatief en anderzijds het aminozuurprofiel, het koolhydraatgehalte en het caroteïdgehalte kwantitatief beïnvloedt. Daar het vetzuurpatroon in grote mate de nutritionele geschiktheid bepaalt van *Artemia*, kan hieruit besloten worden dat de variaties tussen de commerciële cystenloten te wijten zijn aan de kwaliteit van de primaire produktie in de biotopen.
- c. Betreffende het al of niet genetische karakter van de onderzochte kenmerken bleek uit de resultaten dat :
- de diameter der cysten en de schaaldikte niet volledig genotypisch bepaald zijn;
  - de schaalkleur mogelijk genetisch vastgelegd is;
  - de leefbaarheid en groei niet alleen genotypisch maar ook fenotypisch bepaald zijn;
  - de tolerantie voor diverse temperatuur/saliniteitscombinaties weinig beïnvloed wordt door de omgeving.

Tenslotte heeft dit doctoraatsonderzoek, naast een betere kennis van sommige fundamenteel biologische aspecten van *Artemia*, geleid tot enkele technologische verbeteringen in verband met het gebruik van dit organisme in de aquacultuur :

- technieken werden ontwikkeld voor de massaproductie van *Artemia* nauplii, juvenielen, en adulten in intensieve kweeksystemen;
- specifieke diapauze-inhibitie methodes werden opgesteld zodat het marktaanbod van cysten met een hoge ontluikingskwaliteit kan uitgebreid worden;
- technieken werden geïoptimaliseerd voor de exploitatie van cysten uit *Artemia* biotopen.

## HOOFDSTUK VIII

### SUMMARY

#### **Intensive production and quality evaluation of *Artemia* adults and their offspring**

Parallel with the explosive development of aquaculture the interest in *Artemia* has increased tremendously. However, further optimization of the application of this live food in the culture of fish and crustaceans remains essential. This implies, besides the development of specific technologies, also a better knowledge of this organism, e.g. with regard to factors controlling the hatchability of the cysts or the nutritional characteristics of the nauplii. This type of research requires, however, well defined cyst material which is not available from commercial sources, as the variability among cyst samples is too high.

In this regard a culture system was developed for the controlled production and collection of *Artemia* cysts under specific conditions. Based on a detailed literature review of biological aspects on culturing, feeding, and reproduction, a flow-through installation was developed for the production of adults in a recirculation system. The system basically consists of a culture unit of six 300 l tanks each provided with a special filter module, a recirculation unit with plate separators, a cross flow-sieve, and an U.V.-installation, and a stock tank. Using this new culture system the following results were obtained :

- the new filter technique is more efficient in evacuating the polluted water from the culture tanks compared to the traditional nylon screens; in this way culture conditions can be better controlled;
- water quality can be maintained at acceptable levels of N-components and BOD<sub>5</sub>;



- mixed diets consisting of soya bran and corn bran or a *Kluyveromyces* yeast give the highest biomass production levels;
- optimal population characteristics are obtained with culture densities up to 10,000 brine shrimp/l;
- several *Artemia* strains can be used as inoculum with this biomass production unit;
- within a culture period of 14 days survival and growth average 55 % and 5.5 mm respectively, giving yields of about 12 kg wet weight of adults per m<sup>3</sup> of tank volume.

Using the experimental data the culture procedure has been standardized by the adjustment of flow rates and feeding rates in function of the developmental stage of the *Artemia*. Only one aspect, i.e. the infection with *Leucothrix*, can hardly be controlled : contamination may be overcome by applying a salinity stress in combination with higher renewal rates of the culture medium.

This concept was adapted for the production of cysts under controlled conditions :

- based on the biomass' wet weight of the population a new feeding strategy was established to culture adult *Artemia* for long periods of time without affecting the reproduction activity;
- a suitable induction technique was developed resulting in 90 % oviparity without affecting survival, fecundity or culture conditions : from the juvenile stage onwards cyclic oxygen stresses by means of N<sub>2</sub>-flushing are applied in the presence of Fe<sup>3+</sup>-ions. If stresses are given from later stages onwards the first brood will be invariably ovoviviparous;
- a method for continuous harvesting and processing of the cysts was developed.

With this installation sufficient quantities of standard cysts were obtained from different strains and produced under specific circumstances of temperature, salinity, and diet.

In a second phase we tried to adapt the above mentioned culture techniques in order to develop a standard procedure for the continuous production of liveborn nauplii :

- a culture procedure which assured minimal stress situations or fluctuations in environmental parameters appeared to be the best induction strategy for ovoviviparity;
- best results in ovoviviparity induction were obtained with baker's yeast or alcohol yeast as food source;
- an efficient recuperation technique for automatic harvesting of the produced nauplii was established.

The different cyst and nauplii collections harvested from our laboratory installations were characterized with regard to the following characteristics :

- diapause and hatching characteristics
- biometric characteristics
- biochemical composition
- naupliar viability under starvation conditions at two different temperatures
- larval growth rate
- preference and tolerance of the larvae at different temperature/salinity combinations.

The results of these studies have contributed significantly to a better knowledge of :

- the state of cryptobiosis of encysted embryos as influenced by different factors;
- the causal factors related with differences in nutritional quality among the cyst sources of *Artemia*;
- the genotypical or phenotypical nature of different characteristics.

a. In relation with the cryptobiotic state of the cysts, several factors appear to influence the hatchability :

- genotypical factors;
- production conditions : e.g. food availability and salinity;
- reproduction period (= brood number);

- diapause inhibitors : e.g. dehydration, hibernation, aestivation, peroxide treatment;
- harvesting conditions : e.g. collecting, cleaning, processing, drying, stocking
- incubation conditions during the hatching process.

The experimental data further suggested that the causal mechanism responsible for diapause is not strain specific; however, strain differences were noticed for the minimal threshold value for diapause induction or deactivation.

- b. Biochemical analyses indicated that the type of diet offered to the parental population influences the fatty acid profile of their offspring both qualitatively and quantitatively; the amino acid, carbohydrate and carotenoid composition of the offspring vary quantitatively. Since the nutritional quality of *Artemia* is mainly affected by the amount of essential fatty acids in their diet, it can be concluded that the existing variation among commercial cyst batches of *Artemia* is related to the quality of the primary productivity in their biotopes.
- c. Concerning the phenotypical/genotypical nature of the characteristics examined it was shown that :
- the diameter of the cysts and the thickness of their shell are not exclusively under genetic control as was previously accepted;
  - the colour of the shell may have a high degree of genetic determination;
  - viability and growth of the larvae are mainly controlled by the environment. There is no correlation with the biochemical composition of the embryos;
  - the tolerance for several temperature/salinity combinations is largely under genetic control.

Last but not least this study also led to some technological improvements with regard to the application of *Artemia* in aquaculture :

- standard techniques were developed for the mass production of nauplii, juveniles, and adults in intensive culture systems;
- specific diapause deactivation methods were developed which may open new opportunities to enlarge the market supply of cysts with a high hatching quality;
- techniques for the commercial processing of *Artemia* cysts were optimized.

## RESUME

### Production intensive et évaluation de la qualité d'*Artemia* adultes et de leur progéniture

Parallèlement au développement explosif de l'aquaculture l'intérêt pour *Artemia* a grandi considérablement. L'optimilisation de son utilisation pour l'élevage des poissons et des crustacés est essentielle. Cela suppose une meilleure compréhension de son organisme et le développement de technologies spécifiques, par exemple les facteurs contrôlant l'éclosion des cystes ou les caractéristiques nutritionnelles des nauplii. Ce type de recherche nécessite des données précises et complètes sur les cystes employés, qui ne sont pas disponibles à partir des cystes commerciaux.

C'est pourquoi il fut nécessaire de développer un système de production d'*Artemia* et de cystes sous conditions contrôlées. En fonction des données disponibles dans la littérature concernant la biologie d'élevage, de la nutrition et de la reproduction, un système à circuit fermé recirculé fut construit. Il comporte six unités de production de 300 l chacune dont les effluents sont traités successivement par un filtre de type nouveau, un décanteur à plaques, un réservoir de stockage et une unité de stérilisation U.V. En utilisant ce système, il fut obtenu les résultats suivants :

- le nouveau système de filtration s'est révélé beaucoup plus efficace que les filtres traditionnels en fil de nylon;
- la qualité de l'eau peut être maintenu à des taux acceptables de  $DBO_5$  et composés nitrogénés;
- des aliments composés de son de soya et de maïs ou de levure *Kluyveromyces* donnent les plus hauts taux de production de biomasse;

- une densité de 10,000 aminaux/l s'est révélée optimale pour plusieurs souches d'*Artemia*;
- pour une durée de culture de 14 jours, il fut obtenu une survie de 55 % et une croissance de 5,5 mm, correspondant à une production de biomasse de 12 kg de poids humide par mètre cube.

Finalement les cultures expérimentales ont permis de standardiser le procès de cultivation par rapport aux débits et régimes de nutrition en fonction du stade de développement. Un seul problème est resté difficilement contrôlé : l'infection du milieu de culture par *Leucothrix*. Des chocs de salinité et un renouvellement plus important de l'eau peuvent apporter quelques améliorations.

Dans une première phase, l'ensemble du système décrit ci-dessus fut adopté pour la production de quantités suffisantes de cystes dans des circonstances bien contrôlées :

- le régime alimentaire fut modifié pour pouvoir maintenir les cultures sur des périodes plus longues sans affecter la reproduction;
- des chocs anoxiques par injection d'azote et un apport d'ions  $Fe^{+++}$  dans le milieu de culture pour des individus juvéniles et plus grands induisent une reproduction ovipare à 90 %;
- développement d'une méthode de récolte et traitement en continu.

Lors de la deuxième phase, le même système fut adapté pour la production ovovivipare de nauplii :

- un environnement non stressant assure une reproduction ovovivipare optimale;
- les levures de boulanger ou de fermentation alcoolique représentent la meilleure source de nourriture;
- récolte continue et automatique des nauplii produits;

Les nauplii et cysts produits dans les installations

du laboratoire furent analysés par l'intermédiaire des paramètres suivants :

- état de diapause et caractéristiques d'éclosion
- biométrie
- composition biochimique
- résistance au jeûne à deux températures différentes
- taux de croissance
- tolérance au jeu combiné de température et salinité

Les analyses ont contribué à une meilleure connaissance de :

- l'état de cryptobiosis des embryons encapsulés et leur dépendance vis-à-vis de différents facteurs;
- les facteurs responsable de la qualité nutritionnelle des cystes commerciaux d'*Artemia*;
- caractéristiques génotypiques et phénotypiques;

a. S'appuyant sur une vaste revue bibliographique, nos résultats nous ont permis de relever plusieurs facteurs influençant l'éclosion :

- facteurs génotypiques;
- conditions de production : disponibilité de la nourriture et salinité;
- période de reproduction;
- inhibiteurs de diapause (déshydratation, hibernation, estivation, traitement en peroxyde);
- circonstances d'exploitation : récolte, nettoyage, traitement, séchage, stockage;
- conditions d'incubation.

Nos données expérimentales suggèrent que les mécanismes responsables de l'état de diapause ne sont pas dépendants de la souche d'*Artemia* bien que certaines différences pour le seuil minimal d'induction de la diapause peuvent être observées entre différentes souches.

b. Les analyses biochimiques indiquent que le type d'alimentation reçu par les adultes influence quantitativement et qualitativement le profil des acides gras

des cystes et nauplii produits, et quantitativement seulement la composition en acides aminés et hydrates de carbone. La productivité primaire des biotopes est donc directement responsable de la qualité des *Artemia* qui y seront produits.

- c. Nos résultats concernant les caractéristiques génotypiques et phénotypiques indiquèrent que :
- le diamètre des cystes et de leur enveloppe n'est pas exclusivement sous contrôle génétique;
  - la couleur de l'enveloppe peut avoir une grande composante génétique;
  - la viabilité et la croissance des larves sont principalement contrôlées par l'environnement. Il n'y a aucune corrélation entre les facteurs précités et leur composition biochimiques;
  - les tolérances aux facteurs température/salinité sont surtout sous contrôle génétique.

Enfin cette étude a permis l'amélioration des caractéristiques techniques spécifiques à l'élevage d'*Artemia* en aquaculture :

- des techniques standardisées ont été mises au point pour la production intensive de nauplii d'*Artemia*, de juvéniles et d'adultes;
- des techniques de désactivation de la diapause sont maintenant disponibles et ouvrent un marché plus large à l'aquaculture;
- les techniques d'exploitation commerciale d'*Artemia* dans leur biotope ont été optimisées.



## LITERATUURLIJST

- Abreu-Grobois, F.A.; 1983  
Population genetics of *Artemia*.  
Ph. D. Thesis. University of Swansea, U.K. 440 p.
- Abreu-Grobois, F.A.; 1987  
A review of the genetics of *Artemia*.  
In: Sorgeloos, P.; Bengtson, D.A.; Declair, W.; Jaspers, E. (Eds). *Artemia Research and its Applications*. Vol.1. Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 61-100.
- Abreu-Grobois, F.A. & Beardmore, J.A.; 1980  
International study on *Artemia*. II. Genetic characterization of *Artemia* populations - An electrophoretic approach.  
In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., and Jaspers, E. (Eds). *The brine Shrimp Artemia*. Vol.1. Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 133-146.
- Abreu-Grobois, F.A. & Beardmore, J.A.; 1982  
Genetic differentiation and speciation in the brine shrimp *Artemia*.  
In: Barigozzi, C. (Ed.). *Mechanism of Speciation*. Progress in Clinical and Biological Research. A.R. Liss, Inc. New York, USA. p. 245-376.
- Alialy, E.O.; 1984  
A comparative study on the effect of ferrous sulfate ( $\text{FeSO}_4$ ) and ferric chloride ( $\text{FeCl}_3$ ) on cyst production on *Artemia salina* Leach: A preliminary study.  
Undergraduate Thesis. A. R. Apacible School of Fisheries. Nasugbu, Batangas, Philippines.
- Amat, F.; 1980  
Differentiation in *Artemia* strains from Spain.  
In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., and Jaspers, E. (Eds). *The brine Shrimp Artemia*. Vol.1. Universa Press, Wetteren, Belgium. p. 19-39.
- Amat, F.; 1982  
Diferenciación y distribución de las poblaciones de *Artemia* de España. III. Oviparismo y ovoviviparismo. Estudio cualitativo y cuantitativo.  
*Investigaciones Pesquera*. 46(1):3-13.
- Amat, F.; Hontoria, F. & Navarro, J.C.; 1987  
Life history of an experimental Great Salt Lake *Artemia* population kept in outdoor culture.  
In: Sorgeloos, P.; Bengtson, D.A.; Declair, W.; Jaspers, E. (Eds). *Artemia Research and its Applications*. Vol.3. Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 183-194.

- Anderson, D.T.; 1967  
Larval development and segment formation in the branchiopod crustaceans *Limnadia stanleyana* King (Conchostraca) and *Artemia salina* (L.) (Anostraca).  
Austral. J. Zool. 15:47-91.
- Anderson, E.D.; Lochhead, J.H.; Lochhead, M.S. & Huebner, E.; 1970  
The origin and structure of the tertiary envelope in the thick-shelled eggs of the brine shrimp, *Artemia*.  
J. Ultrastruct. Res. 32:497-525.
- Anderson, J.W. & Stephens, G.C.; 1969  
Uptake of organic material by aquatic invertebrates. VI. Role of epiflora in apparent uptake of glycine by marine crustaceans.  
Mar. Biol. 4:243-249.
- Anraku, M.; 1963  
Feeding habits of planktonic copepods.  
Inf. Bull. Plankton. Japan. 9:10-35.
- Antonie, R.L.; 1978  
Rotating biological contactor for secondary wastewater treatment.  
Proc. Int. Coll. on combined treatment of domestic and industrial wastewaters. 16-19 mai 1979. Université de Liège, Belgium. p. 27/1-27/10.
- Artom, C.; 1905  
Osservazioni generali sull'*Artemia salina* Leach delle saline di Cagliari.  
Zool. Anz. 29:284-291.
- Artom, C.; 1931  
L'origine e l'evoluzione della partenogenesi attraverso i differenti biotipi di una specie collettiva (*Artemia salina* L.) con speciale riferimento al biotipo diploide partenogenetico di Sete.  
Memorie della Reale Accademia d'Italia (Roma). 2:219-273.
- Autotrol Corp.; 1978  
Autotrol wastewater treatment systems. Design manual.  
Autotrol Corporation. USA. 189 p.
- Avery, J.L.; 1939  
Effect of drying on the viability of fairy shrimp eggs.  
Trans. Am. Microsc. Soc. 58:356.
- Baert, P.; 1982  
Optimalisatie van primaire zuiveringssystemen bij de intensieve teelt van het pekalkreeftje *Artemia*.  
Thesis. State University of Ghent, Belgium. 93 p.
- Bagshaw, J.C.; Rafiee, P.; Matthews, C.D. & MacRae, T.H.; 1986  
Cadmium and zinc reversibly arrest development of *Artemia* larvae.  
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 37:289-296.

- Baird, W.; 1852  
 Monograph of the family Branchiopodidae, a family of Crustacea belonging to the Division Entomostraca, with a description of a new genus and species of the family, and two new species belonging to the family Limnadiidae.  
 Zool. Soc. London. 20:18-31.
- Baker, M.J.; 1966  
 Autecology of *Artemia* : Factors influencing hemoglobin synthesis and cyst production.  
 M. S. Thesis. San Francisco State College. San Francisco, California, USA. 117 p.
- Balasundaram, C. & Kumaraguru, A.K.; 1987  
 Laboratory studies on growth and reproduction of *Artemia* (Tuticorin strain).  
 In: Sorgeloos, P.; Bengtson, D.A.; Declerck, W.; Jaspers, E. (Eds). *Artemia Research and its Applications*. Vol.3. Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 331-338.
- Ballardin, E. & Metalli, P.; 1963  
 Osservazioni sulla biologia di *Artemia salina* Leach.  
 Tecniche di coltura e fenomeni riproduttivi. Istituto Lombardo. Accad. Sci. Lett. 97:194-254.
- Barahona-Fernandes, M.H.; Girin, M.H. & Metailler, R.; 1977  
 Expériences de conditionnement d'alevins de bar (*Pisces, Dicentrarchus labrax*) à différents aliments composés.  
 Aquaculture. 10:53-63.
- Barigozzi, C.; 1939  
 La biologia di *Artemia salina* Leach studiata in aquario.  
 Att. Soc. Ital. Sci. Nat. Museo Civico. 78:137-160.
- Barigozzi, C.; 1957  
 Differentiation des génotypes et distribution géographique d'*Artemia salina* Leach: Données et problèmes.  
 Annls Biol. 33(5-6):241-250.
- Barigozzi, C.; 1974  
*Artemia*: A survey of its significance in genetic problems.  
 In: Dobzhansky, T., Hecht, M. K., and Steere, W. C. (Eds). *Evolutionary Biology*. Volume 7. Plenum Press. New York, USA. p. 221-252.
- Barigozzi, C.; 1980  
 Genus *Artemia*: Problems of systematics.  
 In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., and Jaspers, E. (Eds). *The brine Shrimp Artemia*. Vol.1. Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 147-153.
- Barigozzi, C. & Tosi, M.; 1959  
 New data on tetraploidy of amphigonic *A. salina* Leach and on triploids resulting from crosses between tetraploids and diploids.  
 Ricerca Scientifica. 29(Suppl.):129-132.

- Barlow, D.I. & Sleigh, M.A.; 1980  
The propulsion and use of water currents for swimming and feeding in larval and adult *Artemia*.  
In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., and Jaspers, E. (Eds). The brine Shrimp *Artemia*. Vol.1. Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 61-73.
- Beck, H.; Gropp, J.; Koops, H. & Tiews, K.; 1978  
Single cell proteins in trout diets.  
In: Halver, J.E.; Tiews, K. (Eds). Proc. World Symp. on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology. 20 June 1978, Hamburg, FRG. p. 269-280.
- Becker, E.W.; 1986  
Nutritional properties of microalgae : potentials and constraints.  
In: Richmond, A. (Ed.). CRC Handbook of microalgal mass culture. CRC Press, Inc., Boca Raton. FL, USA. p. 339-420.
- Belk, D.; 1972  
The biology and ecology of *Eulimnadia antlei* Mackin (Conchostraca).  
S. West. Nat. 16(3,4):297-305.
- Belk, D.; 1987  
Embryonic cuticles of *Artemia* during diapause and hatching : insights from comparison with other Branchiopoda.  
J. Crust. Biol. 7(4):691-696.
- Belk, D. & Cole, G.A.; 1975  
Adaptational biology of desert temporary-pond inhabitants.  
In: Hadley, N.F. (Ed.). Environmental Physiology of Desert Organisms. Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. p. 207-266.
- Bellini, L. & De Vincentiis, D.M.; 1960  
Observations on the end products of protein metabolism in diploid and tetraploid *Artemia salina* (Leach).  
Expl Cell Res. 19:239-241.
- Benesch, R.; 1969  
Zur Ontogenie und Morphologie von *Artemia salina* L.  
Zool. Jahrbuch Anat. 86:307-458.
- Bernice, R.; 1972  
Hatching and postembryonic development of *Streptocephalus dichotomus* Baird (Crustacea : Anostraca).  
Hydrobiol. 40(2):251-278.
- Berthélémy-Okazaki, N.; 1986  
Environmental, biochemical and genetic factors regulating oviparity in *Artemia*.  
Ph. D. Thesis. University of Davis. California, USA. 194 p.

- Berthélémy-Okazaki, N.J. & Hedgecock, D.; 1987  
Effect of environmental factors on cyst formation in the brine shrimp *Artemia*.  
In: Sorgeloos, P.; Bengtson, D.A.; Decleir, W.; Jaspers, E. (Eds). *Artemia Research and its Applications*. Vol.3. Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 167-182.
- Bhargava, S.C.; Jakher, G.R.; Saxena, M.M. & Sinha, R.K.; 1987  
Rearing *Artemia* in a salt pan near Sambhar Lake (India).  
In: Sorgeloos, P.; Bengtson, D.A.; Decleir, W.; Jaspers, E. (Eds). *Artemia Research and its Applications*. Vol.3. Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 271-274.
- Birky, C.W., Jr; 1964  
Studies on the physiology and genetics of the rotifer, *Asplanchna*. I. Methods and physiology.  
*J. Exp. Zool.* 155:273-292.
- Bishop, J.A.; 1967  
Some adaptations of *Limnadia stanleyana* King (Crustacea : Branchiopoda : Conchostraca) to a temporary freshwater environment.  
*J. Animal Ecol.* 36(3):599-609.
- Bishop, J.A.; 1968  
Resistance of *Limnadia stanleyana* King (Branchiopoda, Conchostraca) to dessication.  
*Crustaceana.* 14:35-38.
- Blanchot, J. & Pourriot, R.; 1982a  
Effets de l'intensité d'éclairement et de la longueur d'onde sur l'éclosion des oeufs de durée de *Branchionus rubens* (Rotifère).  
*C.r. Acad. Sc. Paris.* 295:123-125.
- Blanchot, J. & Pourriot, R.; 1982b  
Influence de trois facteurs de l'environnement, lumière, température et salinité, sur l'éclosion des oeufs de durée d'un clone de *Branchionus plicatilis* (O.F. Müller) Rotifère.  
*C.r. Acad. Sci., Paris.* 295:243-246.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J.; 1959  
A rapid method of total lipid extraction and purification.  
*Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.
- Blust, R.; 1988  
The biological availability of copper to the brine shrimp, *Artemia franciscana*.  
Ph. D. Thesis. University of Antwerp (UIA). Belgium. 219 p.
- Bogatova, I.B. & Erofeeva, Z.L.; 1985  
Incubation of *Artemia salina* L. diapause eggs without preliminary hatching stimulation (using hydrogen peroxide). (In Russian).  
*Gidrobiol. Zh.* 21(2):52-56.

- Bogatova, I.B. & Shmakova, Z.I.; 1980  
Activation of diapausing eggs in *Artemia salina*. (in Russian).  
Gidrobiol. Zh. 16(3):108-110.
- Bohra, O.P.; 1980  
A note on *Artemia* culture from a local strain. (Abstract).  
In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., and Jaspers, E. (Eds). The brine Shrimp *Artemia*. Vol.3. Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 131.
- Bond, R.M.; 1933  
A contribution to the study of the natural food-cycle in aquatic environments with particular consideration of the micro-organisms and dissolved organic matter.  
Yale University Bingham Oceanographic Collection. Bulletin Number 4. p. 1-89.
- Bond, R.M.; 1934  
Report on Phyllopod Crustacea (Anostraca, Notostraca and Conchostraca) including a revision of the Anostraca of the Indian Empire.  
Mem. Connecticut Acad. Arts and Sci. 10:29-62.
- Bond, R.M.; 1937  
A method for rearing *Artemia salina*.  
In: Galtoff, P. S., Lutz, F. E., Welch, P. S., and Needham, G. G. (Eds). Culture Methods for invertebrate Animals. Dover Publications. New York, USA. p. 205-206.
- Bossuyt, E.; 1976  
Technologische aspecten van de massakweek van het pekelkreeftje: *Artemia salina*.  
Thesis. State University of Ghent, Belgium. 86 p.
- Bossuyt, E. & Sorgeloos, P.; 1980  
Technological aspects of the batch culturing of *Artemia* in high densities.  
In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., and Jaspers, E. (Eds). The brine Shrimp *Artemia*. Vol.3. Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 133-152.
- Bossuyt, E. & Sorgeloos, P.; 1981  
Batch production of adult *Artemia* in 2 m<sup>3</sup> and 5 m<sup>2</sup> air-water-lift operated raceways.  
In: Book of Abstracts. World Conference on Aquaculture. September 21-25, 1981. Venice, Italy.
- Boulton, A.P. & Huggins, A.K.; 1977  
Biochemical changes occurring during morphogenesis of the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of alterations of salinity.  
Comp. Biochem. Physiol. 57A:17-22.

- Bowen, S.T.; 1962  
The genetics of *Artemia salina*. I. The reproductive cycle.  
Biol. Bull. 122:25-32.
- Bowen, S.T.; 1963  
The genetics of *Artemia salina*. III. Effects of x-irradiation and of freezing upon cysts.  
Biol. Bull. 125:431-440.
- Bowen, S.T.; 1965  
The genetics of *Artemia salina*. V. Crossing over between X and Y chromosomes.  
Genetics. 52:695-710.
- Bowen, S.T.; Buoncristiani, M.R. & Carl, J.R.; 1988  
*Artemia* habitats : ion concentrations tolerated by one superspecies.  
Hydrobiol. 158:201-214.
- Bowen, S.T.; Davis, M.L.; Fenster, S.R. & Lindwall, G.A.; 1980  
Sibling species of *Artemia*.  
In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., and Jaspers, E. (Eds). The brine Shrimp *Artemia*. Vol.1. Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 155-167.
- Bowen, S.T.; Durkin, J.P.; Sterling, G. & Clark, L.S.; 1978  
*Artemia* hemoglobins: Genetic variation in parthenogenetic and zygogenetic populations.  
Biol. Bull. 155:273-387.
- Bowen, S.T.; Fogarino, E.A.; Hitchner, K.N.; Dana, G.L.; Chow, V.H.S.; Buoncristiani, M.R. & Carl, J.R.; 1985  
Ecological isolation in *Artemia*: Population differences in tolerance of anion concentrations.  
J. Crust. Biol. 5(1):106-129.
- Bowen, S.T.; Lebherz, H.G.; Poon, M.C.; Chow, V.H.S. & Grigliatti, T.A.; 1969  
The hemoglobins of *Artemia salina*. I. Determination of phenotype by genotype and environment.  
Comp. Biochem. Physiol. 31:733-747.
- Bowen, S.T. & Sterling, G.; 1978  
Esterase and malate dehydrogenase isozyme polymorphisms in 14 *Artemia* populations.  
Comp. Biochem. Physiol. 61B:593-595.
- Bowen, S.T.; Sterling, G. & Barkan, J.; 1977  
The hemoglobins of *Artemia salina*. IV. A model for genetic control of hemoglobin 1, hemoglobin 2, and hemoglobin X.  
Biochem. Genet. 15(5/6):409-422.
- Bower, C.E. & Bidwell, J.P.; 1978  
Ionization of ammonia in seawater : Effects of temperature, pH, and salinity.  
J. Fish. Res. Bd Can. 35:1012-1016.

- Braswell, A.L.; 1967  
Preincubation treatment required for hatching of *Lepidurus apus*.  
Utah Acad. Proc. 44:344-352.
- Braun, J.G.; 1980  
The feeding of *Artemia* on *Phaeodactylum tricornutum*.  
In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., and Jaspers, E. (Eds). The brine Shrimp *Artemia*. Vol.2. Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 197-208.
- Brisset, P.J.; 1981  
Technique d'élevage en mass d'un crustacé branchipode (*Artemia*) sur nourriture inerte dans un système à renouvellement continue en eau.  
Thesis. University of Lille, France. 85 p.
- Brisset, P.J.; Versichele, D.; Bossuyt, E.; De Ruyck, L. & Sorgeloos, P.; 1982  
High density flow-through culturing of brine shrimp *Artemia* on inert feeds - Preliminary results with a modified culture system.  
Aquacultural Eng. 1(2):115-119.
- Broca, P.; 1860  
Rapport sur la question soumise a la société de biologie au sujet de la reviviscence des animaux dessechés.  
Mem. Soc. Biol., Paris. 2:1-140.
- Broch, E.S.; 1965  
Mechanism of adaptation of the fairy shrimp *Chirocephalus bundyi* Forbes to the temporary pond.  
Cornell University, Memoir 392. New York, USA. 48 p.
- Brouillet, S.; 1977  
Approche technique et économique comparée d'écloseries-nurseries de bar et de la sole.  
Mémoire de DEA Halieutique. 79 p.
- Brown, R.F.; Wildman, J.D. & Eppley, R.M.; 1968  
Temperature-dose relationships with aflatoxin on the brine shrimp, *Artemia salina*.  
J. Ass. Off. Anal. Chem. 51:905-906.
- Browne, R.A.; 1980  
Reproductive pattern and mode in the brine shrimp.  
Ecology. 61(3):466-470.
- Browne, R.A.; 1982  
The costs of reproduction in brine shrimp.  
Ecology. 63(1):43-47.
- Browne, R.A.; 1983  
Divergence of demographic and reproductive variables over 25 years in laboratory and natural populations of the brine shrimp, *Artemia*.  
Crustaceana (Leiden). 45(2):164-168.



- Browne, R.A.; Sallee, S.E.; Grosch, D.S.; Segreti, W.O. & Purser, S.M.; 1984  
Partitioning genetic and environmental components of reproduction and live span in *Artemia*.  
*Ecology*. 65(3):949-960.
- Browne, R.A. & Spencer, M.H.; 1987  
Intrapopulation differences in life history traits of obligately parthenogenetic clones of the brine shrimp *Artemia*.  
In: Sorgeloos, P.; Bengtson, D.A.; Declair, W.; Jaspers, E. (Eds). *Artemia Research and its Applications*. Vol.1. Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 115-128.
- Bruggeman, E.; Baeza-Mesa, M.; Bossuyt, E. & Sorgeloos, P.; 1979  
Improvements in the decapsulation of *Artemia* cysts.  
In: Styczynska-Jurewicz, E., Backiel, T., and Jaspers, E. (Eds). *Cultivation of Fish Fry and its live Food*. Special Publ. No 4. Eur. Maricult. Soc. Bredene, Belgium. p. 309-315.
- Bruggeman, E.; Sorgeloos, P. & Vanhaecke, P.; 1980  
Improvements in the decapsulation technique of *Artemia* cysts.  
In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., and Jaspers, E. (Eds). *The brine Shrimp Artemia*. Vol.3. Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 261-269.
- Brune, D.E.; 1982  
Design and development of a flowing bed reactor for brine shrimp culture.  
*Aquacultural Eng.* 1:63-70.
- Brune, D.E. & Anderson, T.H.; 1984  
The application of process kinetics in predicting optimum performance of batch and continuous brine shrimp cultures.  
*J. World Maricult. Soc.* 15:108-119.
- Brune, D.E. & Anderson, T.H.; 1986  
An explanation of size diversity among *Artemia* cohorts; A model of food uptake kinetics.  
Paper presented at "Aquaculture '86". Jan. 19-23, 1986. Reno, Nevada, USA.
- Busa, W.B. & Crowe, J.H.; 1983  
Intracellular pH regulates transitions between dormancy and development of brine shrimp (*Artemia salina*) embryos.  
*Science*. 22(4608):366-368.
- Busa, W.B.; Crowe, J.H. & Matson, G.B.; 1982  
Intracellular pH and the metabolic status of dormant and developing *Artemia* embryos.  
*Archs Biochem. Biophys.* 216(2):711-718.

- Buu-Hoi, N.P. & Pham-Huu-Chanh; 1970  
Effects of various types of carcinogens on the hatching of *Artemia salina* eggs.  
J. U.S. Nat. Cancer Inst. 44:795-799.
- Buyukisik, B. & Koray, T.; 1983  
Ammonia excretion in *Artemia* (Branchiopoda) culture.  
E.U. Faculty of Science J., Ser. B. p. 303-310.
- Camara, M.R. & de Medeiros Rocha, R.; 1987  
*Artemia* culture in Brazil : an overview.  
In: Sorgeloos, P.; Bengtson, D.A.; Declair, W.; Jaspers, E. (Eds). *Artemia* Research and its Applications. Vol.3.  
Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 195-200.
- Cannon, H.G.; 1933  
On the feeding mechanism of the Branchiopoda.  
Phil. Trans. R. Soc. London. 222b:267-353.
- Cardenas, H.; 1977  
Resultados preliminares comparativos en *Artemia salina* colectada de dos localida des diferentes del caribe Colombiano.  
Dicrugacion Pesquera, Bogota. 17(4,5):12 p.
- Carlisle, D.B.; 1968  
*Triops* (Entomostraca) eggs killed only by boiling.  
Science. 161:279-280.
- Carpelan, L.H.; 1957  
Hydrobiology of the Alviso salt ponds.  
Ecology. 38(3):375-390.
- Carpenter, J.F. & Hand, S.C.; 1986  
Comparison of pH-dependent allostery and dissociation for phosphofructo kinases from *Artemia* embryos and rabbit muscle : Nature of the enzymes acylated with diethylpyrocarbonate.  
Archs Biochem. Biophys. 248(1):1-9.
- Castle, W.A.; 1938  
Hatching of the eggs of the "fairy shrimp".  
Science. 87:531.
- Castritsi-Catharios, J.; Apostolopoulos, N.; Kiortsis, B. & Katsorchis, T.; 1983  
Les effets de la préhumidification sur le taux d'éclosion, l'ultrastructure du chorion, la taille de kystes d'*Artemia*.  
Rap. Comm. int. Mer Medit. 28(6):285.
- Caujolle, F.; Pham-Huu-Chanh, D. & Kan, P.; 1963  
Etude de l'action comparée des Tween 60 et Tween 80 sur l'éclosion des oeufs d'*Artemia salina*.  
Ann. Pharmaceutiques Francaises. 21(3):270.

- Chang, E.S. & Conklin, D.E.; 1983  
Lobster (*Homarus*) hatchery techniques.  
In: McVey, J.P. (Ed.). CRC Handbook of Mariculture. Vol. I. Crustacean Aquaculture. CRC Press. Boca Raton, Fl, USA. p. 271-275.
- Chapman, J.; 1968  
The relative adaptive values of parthenogenesis and zygogenesis.  
M. Sc. Thesis. San Francisco State College. San Francisco, Ca, USA. 76 p.
- Chen, J.C.; Chen, K.J. & Liao, J.M.; 1988  
Joint action of ammonia and nitrite on *Artemia salina* nauplii.  
In: Book of Abstracts. 19th Ann. Meeting World Aquacult. Soc. Febr. 1988, Honolulu, Hawaii, USA. 26 p.
- Chiba, K.; 1981  
Present status of flow-through and recirculation systems and their limitations in Japan.  
In: Tiews, K. (Ed). Aquaculture in heated effluents and recirculation systems. Vol. II. Heeneman Verlagsgesellschaft mbH. Berlin. p. 342-356.
- Choo, P.S.; 1986  
Preliminary results of some laboratory experiments in the culture of *Artemia* for cyst production.  
Bulletin Perikanan. 41:8 p.
- Choubert, G. Jr.; 1979  
Tentative utilization of *Spirulina* algae as a source of carotenoid pigments for rainbow trout.  
Aquaculture. 18:135-143.
- Chow, V.H.S.; 1968  
Physiology of *Artemia*: Effects of nutrition and oxygen tension on survival and hemoglobin production.  
M. A. Thesis. San Francisco State College. San Francisco, California, USA. 234 p.
- Clark, J.W.; Viessman, W. & Hammer, M., Eds; 1977  
Biological-disc process.  
In: Water supply and pollution control. Harper and Row. New York, USA. p. 557-562.
- Claus, C.; Benijts, F. & Sorgeloos, P.; 1977  
Comparative study on different geographical strains of the brine shrimp, *Artemia salina*.  
In: Jaspers, E.; Persoone, G. (Eds). Fundamental and applied Research on the brine Shrimp, *Artemia salina* (L.) in Belgium. EMS Special Publication No.2. Inst. Mar. Scient. Res. Bredene, Belgium. p. 91-105.

- Claus, C.; Benijts, F.; Vandeputte, G. & Gardner, W.; 1979  
The biochemical composition of the larvae of two strains of *Artemia salina* (L.) reared on two different algal foods.  
J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 36:171-183.
- Claybrook, D.L.; 1983  
Chapter 3. Nitrogen metabolism.  
In: Bliss, D.E.; Mantel, L.H. (Eds). The Biology of Crustacea. Vol.5. Internal Anatomy and Physiological Regulation. Academic Press. New York, USA. p. 163-213.
- Clegg, J.S.; 1962  
Free glycerol in dormant cysts of the brine shrimp *Artemia salina*, and its disappearance during development.  
Biol. Bull. 123:295-301.
- Clegg, J.S.; 1964  
The control of emergence and metabolism by external osmotic pressure and the role of free glycerol in developing cysts of *Artemia salina*.  
J. Exp. Biol. 41:879-892.
- Clegg, J.S.; 1965  
The origin of trehalose and its significance during the formation of encysted dormant embryos of *Artemia salina*.  
Comp. Biochem. Physiol. 14:135-143.
- Clegg, J.S.; 1967  
Metabolic studies of cryptobiosis in encysted embryos of *Artemia salina*.  
Comp. Biochem. Physiol. 20:801-809.
- Clegg, J.S.; 1973  
Do dried cryptobiontes have a metabolism?  
In: Crowe, J. H. and Clegg, J. S. (Eds). Anhydrobiosis. Dowden, Hutchinson, and Ross. Stroudsburg, Pennsylvania, USA. p. 141-146.
- Clegg, J.S.; 1974a  
Biochemical adaptations associated with the embryonic dormancy of *Artemia salina*.  
Trans. Am. Microsc. Soc. 93(4):481-490.
- Clegg, J.S.; 1974b  
Interrelationships between water and metabolism in *Artemia salina* cysts: Hydration-dehydration from the liquid and vapour phases.  
J. Exp. Biol. 61:291-308.
- Clegg, J.S.; 1977  
Interrelationships between water and cellular metabolism in *Artemia* cysts. VI. RNA and protein synthesis.  
J. Cell. Physiol. 91:143-154.

- Clegg, J.S.; 1978a  
Hydration-dependant metabolic transitions and the state of cellular water in *Artemia* cysts.  
In: Crowe, J.H., and Clegg, J.S. (Eds). Dry biological Systems. Academic Press. New York, USA. p. 117-153.
- Clegg, J.S.; 1978b  
Interrelationships between water and cellular metabolism in *Artemia* cysts. VIII. Sorption isotherms and derived thermodynamic quantities.  
J. Cell. Physiol. 94:123-138.
- Clegg, J.S.; 1981  
Metabolic consequences of the extent and disposition of the aqueous intracellular environment.  
J. Exp. Zool. 215:303-313.
- Clegg, J.S. & Cavagnaro, J.; 1976  
Interrelationships between water and cellular metabolism in *Artemia* cysts. IV. Adenosine 5'-triphosphate and cyst hydration.  
J. Cell. Physiol. 88:159-166.
- Clegg, J.S. & Conte, F.P.; 1980  
A review of the cellular and developmental biology of *Artemia*.  
In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., and Jaspers, E. (Eds). The brine Shrimp *Artemia*. Vol.2. Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 11-54.
- Clegg, J.S.; Seitz, P.; Seitz, W. & Hazlewood, C.F.; 1982  
Cellular responses to extreme water loss: The water-replacement hypothesis.  
Cryobiology. 19:306-316.
- Clegg, J.S.; Warner, A.H. & Finamore, F.J.; 1967  
Evidence for the function of P<sub>1</sub>, P<sub>4</sub>-diguanosine 5'-tetraphosphate in the development of *Artemia salina*.  
J. Biol. Chem. 242(8):1938-1943.
- Clegg, J.S.; Zettlemyer, A.C. & Hsing, H.H.; 1978  
On the residual water content of dried but viable cells.  
Experientia. 34(6):734-736.
- Cognie, D.; 1976  
Production d'*Artemia salina* Leach en grand volumes recyclés.  
In: Persoone, G., and Jaspers, E. (Eds). 10th Eur. Symp. Mar. Biol. Vol.1. Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 35-36.
- Cole, G.A. & Whiteside, M.C.; 1965  
*Kiatuthlana* - A limnological appraisal. II. Chemical factors and biota.  
Plateau. 38:36-48.

- Collins, N.C.; 1977  
Ecological studies of terminal lakes - Their relevance to problems in limnology and population biology.  
In: Greer, D. C. (Ed.). Desertic terminal Lakes. Utah Water Research Laboratory. Utah State University. Logan, Utah, USA. p. 411-420.
- Collins, N.C.; 1978  
The ecological significance of egg size differences among brine shrimp (*Artemia salina*) populations.  
Bull. Ecol. Soc. Am. 59(2):57.
- Collins, N.C.; 1980  
Comparison of *Artemia* strains: survival and growth of nauplii as a function of ionic composition, osmoticity and temperature of the medium.  
In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., and Jaspers, E. (Eds). The brine Shrimp *Artemia*. Vol.2. Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 123.
- Conklin, D.E. & Provasoli, L.; 1978  
Biphasic particulate media for the culture of filter-feeders.  
Biol. Bull. 154:47-54.
- Conover, R.J.; 1964  
Food relations and nutrition of zooplankton.  
In: Marshall, N., Jeffries, H. P., Napora, T. A., and Sieburth, J. M. (Eds). Experimental marine Ecology. Occasional Publication No. 2. University of Rhode Island. Kingston, USA. p. 81-91.
- Conte, F.P.; Droukas, P.C. & Ewing, R.D.; 1977  
Development of sodium regulation and de novo synthesis of Na<sup>+</sup>K-activated ATPase in larval brine shrimp, *Artemia salina*.  
J. Exp. Zool. 202(3):339-362.
- Copeland, E.; 1967  
A study of salt secreting cells in the brine shrimp (*Artemia salina*).  
Protoplasma. 63:363-384.
- Corazza, L. & Saylor, W.W.; 1983  
Nutritional value of *Artemia salina* in broiler starter diets.  
Poultry Science. 62:846-852.
- Coutteau, P.; 1987  
Het gebruik van bakkersgist (*Saccharomyces cerevisiae*) als voedselbron voor de kweek van het pekelkreeftje *Artemia*.  
Thesis. State University of Ghent, Belgium. 119 p.
- Coutteau, P.; Lavens, P. & Sorgeloos, P.; 1989  
Baker's yeast as a potential substitute for live algae in aquaculture diets : *Artemia* as a case study.  
J. World Aquacult. Soc.: in press.

- Criel, G.; 1980  
Morphology of the female genital apparatus: a review.  
In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., and Jaspers, E. (Eds). The brine Shrimp *Artemia*. Vol.1. Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 75-86.
- Croghan, P.C.; 1958  
The osmotic and ionic regulation of *Artemia salina* (L.).  
J. Exp. Biol. 35:219-233.
- Crowe, J.H.; 1971  
Anhydrobiosis: An unsolved problem.  
Am. Naturalist. 105:563-574.
- Crowe, J.H. & Clegg, J.S., Eds; 1973  
Anhydrobiosis.  
Dowden, Hutchinson and Ross. Stroudsburg, Pennsylvania, USA. 477 p.
- Crowe, J.H. & Clegg, J.S., Eds; 1978  
Dry biological Systems.  
Academic Press. New York, USA. 357 p.
- Crowe, J.H. & Cooper, L.C.; 1982  
Uptake of iron by brine shrimp, *Artemia salina*.  
Mol. Physiol. 2(3):171-180.
- Crowe, J.H.; Crowe, L.M.; Drinkwater, L. & Busa, W.B.; 1987  
Intracellular pH and anhydrobiosis in *Artemia* cysts.  
In: Sorgeloos, P.; Bengtson, D.A.; Declair, W.; Jaspers, E. (Eds). *Artemia* Research and its Applications. Vol.2. Universa Press. Wetteren, Belgium. p. 19-41.
- Crowe, J.H.; Crowe, L.M. & O'Dell, S.J.; 1980  
Freezing in cysts of brine shrimp with variable water contents.  
Cryobiology. 17(6):622, Abstract Number 91.
- Crowe, J.H.; Crowe, L.M. & O'Dell, S.J.; 1981  
Ice formation during freezing of *Artemia* cysts of variable water contents.  
Molecular Physiology. 1:145-152.
- Crowe, J.H. & Madin, K.A.C.; 1974  
Anhydrobiosis in tardigrades and nematodes.  
Trans. Am. Microsc. Soc. 93:513-524.
- Cunningham, P.A. & Grosch, D.S.; 1978  
A comparative study of the effects of mercuric chloride and methyl mercury chloride on reproductive performance in the brine shrimp, *Artemia salina*.  
Environmental Pollution. 15(2):83-100.
- Cushing, D.H.; 1958  
The effect of grazing in reducing the primary production: A review.  
Rap. Proc.-Verb. Cons. Int. Explor. Mer. 144:149-154.

- Czeczuga, B.; 1980  
Carotenoid content of *Artemia* eggs and vitality of the young specimens of this crustacean.  
In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., and Jaspers, E. (Eds). The brine Shrimp *Artemia*. Vol.2. Universa Press, Wetteren, Belgium. p. 609-612.
- D'Abramo, L.R.; Baum, N.A.; Bordner, C.E. & Conklin, D.E.; 1983  
Carotenoids as a source of pigmentation in juvenile lobsters fed a purified diet.  
Can. J. Fish. Aquat. Sci. 40:699-704.
- D'Agostino, A.S.; 1965  
Comparative studies of *Artemia salina* (development and physiology).  
Ph. D. Thesis. New York University. New York, USA. 83 p.
- D'Agostino, A.S.; 1980  
The vital requirements of *Artemia*: physiology and nutrition.  
In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., and Jaspers, E. (Eds), The brine Shrimp *Artemia*. Vol.2. Universa Press, Wetteren, Belgium. p. 55-82.
- D'Agostino, A.S. & Provasoli, L.; 1968  
Effects of salinity and nutrients on mono- and diaxenic cultures of two strains of *Artemia salina*.  
Biol. Bull. 134(1):1-14.
- Daday De Dees, E.; 1910  
Monographie Systematique de Phyllopoodes Anostraces.  
Ann. Sci. Nat. Zool. 11:91-489.
- Dadd, R.H.; 1970  
Arthropod nutrition.  
In: Florkin, M.; Sheer, B.T. (Eds). Chemical Zoology. Vol. 5. Academic Press. New York, USA. p. 35-95.
- Dana, G.L.; 1981  
Comparative population ecology of the brine shrimp *Artemia*.  
M.S. Thesis. San Francisco State University. San Francisco, CA, USA. 125 p.
- Dana, G.L.; 1982  
Hatching in Mono Lake *Artemia* cysts.  
In: Book of Abstracts. Mono Lake Symposium. Santa Barbara, California.
- Dana, G.L. & Lenz, P.; 1986  
Effects of increasing salinity on an *Artemia* population from Mono Lake, California.  
Oecologia (Berlin). 68(3):428-436.



- Davison, E.A.J. & Stross, R.G.; 1986  
A blue light-reversible reaction in an animal system  
*Daphnia pulex*.  
Experimenta. 42(6):620-622.
- Davison, J.; 1969  
Activation of ephippial eggs of *Daphnia pulex*.  
J. General Physiol. 53:565-575.
- De Chaffoy, D.; De Maeyer-Criël, G. & Kondo, M.; 1978  
On the permeability and formation of the embryonic cuticle  
during development in vivo and in vitro of *Artemia salina*  
embryos.  
Differentiation. 12:99-109.
- De Chaffoy, M.; Moens, L.; Heip, J. & Kondo, M.; 1977  
Reversibility of pre-emergence development in *Artemia*  
*salina* (L.).