

ONDERZOEK OP HET PEKELKREEFTJE ARTEMIA TER VERBETERING VAN ZIJN GEBRUIK ALS VOEDSELBRON IN DE AQUACULTUUR

Eindverslag opgesteld door:

Dr. Patrick Lavens en medewerkers
Laboratorium voor Aquacultuur & Artemia Reference Center
Rozier 44, 9000 Gent

Indeling

1. Voedingsbiologie van Artemia
2. Karakterisatie van de ontluiking by Artemia cysten
3. Alternatieve benaderingen van de intensieve teelt van Artemia
4. Het gebruik van Artemia biomassa in de aquacultuur
5. Bepaling van de vitamine C gehaltes in Artemia

1. Voedingsbiologie van Artemia

Tot op heden wordt Artemia biomassa gekweekt in intensieve systemen op basis van landbouwafvalprodukten (rijstekaf, sojapellen,...). Deze droge voeders geven evenwel suboptimale kweekresultaten door hun minder gunstige samenstelling en fysische karakteristieken. Daarenboven werd de kweekmethode hierbij d.m.v. "trial and error" experimenten op punt gesteld, en dit vooral als gevolg van een gebrekkige kennis van de voedingsbiologie van het pekelkreeftje onder dergelijke kweekomstandigheden. Daar de voeding bij Artemia tot op heden uitsluitend werd bestudeerd aan de hand van ééncellige wieren en artificiële media, leverde de literatuur hier inderdaad weinig relevante informatie op.

Gisten vertonen gunstige eigenschappen als voedsel voor intensieve Artemia kweek (hoog proteïnegehalte, constante samenstelling, geschikte partikelgrootte, goedkope massaproductie). Bovendien laten gisten als "Single-Cell Proteins" (vergelijkbaar met ééncellige wieren) toe de voedingsbiologie van Artemia onder gecontroleerde omstandigheden te karakteriseren.

De doelstelling van de huidige studie is aldus tweeledig:

- ontwikkeling van een dieet op basis van gist
- karakterisatie van de voedingsbiologie van Artemia gevoed met een dieet op basis van gist

1.1. Studie van de verteerbaarheid van gist voor Artemia:

Evaluatie van celwandmutanten van Saccharomyces cerevisiae

Tijdens voorgaand onderzoek (Coutteau, 1987; Coutteau et al., 1990) werd aangetoond dat bakkersgist ongeschikt is als voedsel voor Artemia als gevolg van de onverteerbaarheid van de celwand. De verteerbaarheid van gist kon evenwel verbeterd worden door middel van een chemische behandeling, die op punt werd gesteld aan de hand van gestandaardiseerde Artemia kweektesten (Coutteau, 1988). Uit een literatuurstudie omtrent in vitro vertering van gist kon afgeleid worden dat de scheikundige behandeling specifiek inwerkt op de externe laag van de gistcelwand. Deze mannoproteïnenlaag fungeert als permeabiliteitsbarrière zowel voor extracellulaire enzymen (vb. bacteriële mycolytische enzymen, spijsverteringsenzymen), als voor periplasmatische enzymen (vb. invertase). De impermeabiliteit van de gistcelwand verhindert aldus niet alleen een efficiënte vertering, doch tevens de secretie van heterologe eiwitten die in gist worden gesynthetiseerd via genetische manipulatie. Vooral dit laatste probleem heeft geleid tot een aantal genetische studies waarin mutanten met een gemodificeerde celwandstructuur werden geselecteerd. In dit verband bieden de osmotisch fragiele mutanten (Venkov en Stateva, 1980) en gistmutanten die een verhoogde gevoeligheid voor de enzymextracten van Helix pomatia vertonen (Mehta en Gregory, 1981) interessante perspectieven.

De volgende mutanten werden geëvalueerd op hun verteerbaarheid voor Artemia in een gestandaardiseerde kweektest:

- Saccharomyces cerevisiae mutant RM4 (Gregory, Univ. of Guelph, Canada) werd vergeleken met de niet-gemuteerde giststam (wild type Y5 α). De hogere groei en overleving bekomen met de mutant (Verslag 1989, I.1.-Fig. 1) toonden aan dat deze mutant ook voor Artemia een hogere verteerbaarheid vertoont. Het lage produktierendement ($\pm 25\%$ van dat van de industriële giststam) maakte de RM4-stam echter ongeschikt voor grootschalige productie.

- De osmotisch fragiele gistmutant VY 1160 (Venkov en Stateva, 1980), welke lyseert in media met lage osmotische waarde, vertoonde tevens een betere verteerbaarheid voor Artemia (Verslag 1989, I.1.Fig. 2).
- Polyploïde fragiele giststammen, welke de mogelijkheid zouden bieden om osmotisch fragiele gist op grote schaal te produceren (Stateva et al., 1988). Dit onderzoek verliep via een samenwerking met de auteur van osmotisch fragiele gistmutanten (Prof. Venkov, Academy of Sciences, Sofia, Bulgarije) en met de firma Algist Bruggeman N.V. (Gent). Deze polyploïde mutanten bleken minder goede groei en overleving op te leveren voor het testorganisme Artemia (Verslag 1990, I.1.-Bijlage 1A). Dit was wellicht toe te schrijven aan de genetische verschillen tussen de verteerbare labostam (VY1160) en de beschikbare industriële stammen.

1.2. Studie van de voedingsbiologie bij Artemia

De studie van de voedingsbiologie bij Artemia werd uitgevoerd aan de hand van de celtellingsmethode en de radioactieve merkingsmethode. Als voedsel werd scheikundig behandelde, verteerbare bakkersgist gebruikt. In de proeven waarin het effect van de verteerbaarheidsbehandeling werd onderzocht, werd tevens onbehandelde bakkersgist gebruikt. Dit deel van het onderzoek werd afgerond met een studie van de kwantitatieve voedselvereisten bij Artemia gevoed met een gemengd dieet van ééncellige wieren Dunaliella tertiolecta en gist. Hierbij werd tevens het effect nagegaan van hoge saliniteit op de voedselvereisten van het pekelkreeftje.

1.2.1. Studie van de voedselopname by Artemia aan de hand van de celtellingsmethode

1.2.1.1. Op punt stellen van het tellen van gistcellen met de Coulter Counter

1.2.1.2. Op punt stellen van experimentele opstellingen voor het bepalen van voedingssnelheden bij Artemia

Bij het ontwikkelen van de methodiek voor de graasproeven werd rekening gehouden met de restricties van de elektronische celtelling en met de relatief hoge sedimentatiesnelheid van gistcellen. Er werd geopteerd voor korte termijn experimenten, zodat sedimentatie van de gist binnen het proefverloop verwaarloosbaar bleef. De proeven werden uitgevoerd in de volgende systemen:

- rotor, bestaande uit 170 ml proefbuizen opgesteld op een roterende staaf
- 400 ml cilindroconische buizen met een puntbeluchting
- kleinschalig recirculatiesysteem, biedt de mogelijkheid om condities die de voedingssnelheid beïnvloeden (waterkwaliteit, zuurstofgehalte, celconcentratie) beter te controleren tijdens het proefverloop in vergelijking met het vorig systeem.

1.2.1.3. Bepaling van het effect van de gistcelconcentratie op de snelheid van de voedselopname en filtratie bij diverse stadia

De optimale voedselconcentratie en het verloop ervan in functie van de ontwikkeling is een belangrijk gegeven voor de kweek van Artemia in intensieve systemen. De gegevens van onze kleinschalige experimenten (Verslag 1989, I.1.Fig. 3) leveren informatie op wat betreft de kritische celconcentratie (= minimale celconcentratie voor maximale voedingssnelheid)

en de voedingscapaciteit voor 5 ontwikkelingsstadia van het pekelkreeftje. Het effect van gistcelconcentratie op de voedings- en filtreersnelheid van adulte Artemia werd bepaald in het recirculatiesysteem (Verslag 1990, I.Fig. 1, 2).

1.2.1.4. Bepaling van het effect van diverse kweekcondities (mechanische verstoring, dierdensiteit, waterkwaliteit, lichtintensiteit) op de voedselopname

De biomassaproductie tijdens intensieve kweek van Artemia wordt in hoofdzaak bepaald door de efficiëntie van de voedselopname en assimilatie. Om praktische redenen worden kweeksystemen evenwel geoptimaliseerd op basis van de parameters groei en overleving. Tijdens deze studie werd gepoogd het rechtstreeks effect te bepalen van een aantal kweekcondities op de voedingssnelheid. Hiertoe werden een aantal condities (mechanische verstoring, dierdensiteit, NO_3^- , NO_2^- en NH_4^+ -gehalte, lichtintensiteit) gesimuleerd in een afgesloten systeem waarin de voedingssnelheid kon bepaald worden. Een hoge mate van mechanische verstoring, hoge dierdensiteiten en hoge concentraties aan NO_2^- en NH_4^+ gaven aanleiding tot significant lagere voedingssnelheden (Coutteau et al., 1989). In een afgesloten roterend systeem werd vastgesteld dat de voedingssnelheid bij Artemia reeds afgeremd werd bij een densiteit van 3/ml (Coutteau et al., 1989). Het recirculatiesysteem liet toe om interferentie van zuurstofstress en verhoogde gehalten aan metabolieten tijdens de bepaling van het densiteitseffect uit te sluiten. Hierbij trad geen significante afname van de voedingssnelheid op bij dierdensiteiten tot 6,7/ml. Vanaf 8,3 dieren/ml werd een sterke daling in de voedingsactiviteit en het optreden van mortaliteit waargenomen.

1.2.1.5. Bepalen van het effect van de gistverteerbaarheid op de voedingssnelheid en retentietijd in de darm (Verslag 1990, I.Fig. 4, 5)

Door middel van een chemische behandeling kunnen onverteerbare gistcellen omgezet worden in verteerbare partikels met dezelfde samenstelling (Coutteau et al., 1990). Aldus wordt een uniek testsysteem bekomen voor de studie van het effect van verteerbaarheid op de kinetiek van de voeding bij een filter-organisme. Preliminair testen wezen uit dat behandelde gist sneller werd geklaard uit suspensie door het pekelkreeftje en gedurende kortere tijd verbleef in het spijsverteringskanaal.

1.2.1.6. Bepalen van het effect van de gistcelconcentratie op de groeiëfficiëntie tijdens de eerste week na ontluiking

In het recirculatiesysteem werd gepoogd Artemia gedurende een week op te groeien bij diverse, constante gistcelconcentraties (Verslag 1990, I.Fig. 6). Hierbij werd het effect nagegaan van de gistcelconcentratie op overleving, groei en voedingssnelheid (Verslag 1990, I.Fig. 7, 8, 9).

1.2.2. Studie van voedselopname en assimilatie in Artemia aan de hand van radioactief gemerkte gisten

Door middel van kweekproeven werd indirect aangetoond dat de efficiëntie van de gistvertering in Artemia kan verbeterd worden door een chemische behandeling van de gist. Voorgaande proeven hebben uitgewezen dat het pekelkreeftje onbehandelde bakkergist slechts aan zeer lage snelheden opneemt (2.1.5.). De celtellings-methode bepaalt echter niet

de werkelijke voedingssnelheid in het geval van slecht verteerbare voedselpartikels, welke mogelijks intact door het spijsverteringskanaal passeren en terug in de voedselsuspensie terecht komen. Deze methodologische fouten kunnen worden vermeden door het gebruik van directe methodes die de hoeveelheid opgenomen voedsel rechtstreeks in het dier bepalen. Er werd geopteerd voor de directe bepaling van de voedingssnelheden aan de hand van radioactieve merking van het voedsel, daar deze tevens een kwantitatieve studie toelaat van de assimilatieëfficiëntie.

1.2.2.1. Ontwikkeling van een methodologie voor de kweek en chemische behandeling van radioactief gemerkte bakkersgist Saccharomyces cerevisiae

In de literatuur werd tot nog toe geen ^{14}C -merking van gist toegepast omwille van de geringe efficiëntie van de opname van deze merker door heterotrofe organismen. In een eerste reeks experimenten werd de specifieke activiteit van de gist op een voldoende hoog peil gebracht door de keuze van een minimaal medium (YNBG) i.p.v. een complex medium (YPG), en door het verhogen van de concentratie van ^{14}C -glucose in het medium (Verslag 1991, I.Fig. 1 & 2). Het effect van diverse chemische behandelingen, die worden toegepast om de verteerbaarheid van gist te verbeteren voor het pekelkreeftje, werd nagegaan door een bepaling van de hoeveelheid ^{14}C die vrijkomt uit gemerkte gist tijdens de behandeling (Verslag 1991, I.Fig. 3). De behandelingen waarvan de efficiëntie reeds in groeitesten werd aangetoond bleken aanleiding te geven tot een verlies van $\pm 25\%$ van de cellulaire koolstof.

1.2.2.2. Effect van de concentratie van behandelde en onbehandelde gist op de voedingssnelheid

Aan de hand van de celtellingsmethode werd aangetoond dat Artemia de onbehandelde gist aan een significant lagere snelheid opneemt uit suspensie dan de behandelde gist. Het tegendeel werd geobserveerd in proeven met radioactief gemerkte gist, waar 2 tot 5 maal hogere voedingssnelheden werden vastgesteld bij Artemia die zich voedt met behandelde gist. De schijnbaar contradictorische resultaten tussen de indirecte (celtelling) en de directe (^{14}C) bepaling van de voedingssnelheid wezen op het recycleren van uitgescheiden gistcellen bij de voeding van Artemia met onbehandelde gist. Dit resulteerde in een onderschatting van de voedingssnelheid bepaald met de celtellingsmethode.

1.2.2.3. Bepaling van de voedingssnelheid en de retentietijd van behandelde en onbehandelde gist in de darm van Artemia bij hoge voedselconcentraties

De retentietijd van de gist in de darm werd gevolgd door een 'time-series' experiment waarbij de hoeveelheid radioactiviteit wordt gemeten in Artemia in functie van de tijd na transfer van een niet-gemerkte naar een gemerkte gistsuspensie (Verslag 1991, I.Fig. 4). De knik in de opname curve stemt overeen met de start van de defaecatie, d.i. na verloop van de tijd die het voedsel nodig heeft voor het passeren van de darm. Hieruit bleek dat de onbehandelde gist ongeveer dubbel zo snel doorheen de darm passeert als de behandelde gist.

1.2.2.4. Bepaling van de koolstofbalans en de assimilatie-efficiëntie in Artemia: effect van acclimatisatie op het experimenteel dieet

De koolstofbalans werd bepaald door de dieren na een korte merking door incubatie in een

radioactief gemerkte gistsuspensie over te brengen naar een ongemerkte suspensie voor 2 h. Vervolgens worden de diverse koolstoffracties (dieren, opgelost anorganisch, opgelost organisch, particulier koolstof) gescheiden en de radioactiviteit ervan bepaald. Dit laat toe te bepalen in welke mate de tijdens de merkingsfase opgenomen ^{14}C (I) in de dieren werd geïncorporeerd (P) of werd gerespireerd (R), geëxcreteerd (U) of gedefaceerd (F). De totale koolstofbalans wordt dan gegeven door:

$$I = P + R + F + U$$

De assimilatiesnelheid (A) en de assimilatieëfficiëntie (a) worden dan gegeven door:

$$A = P + R$$
$$a = A/I \times 100$$

De koolstofbalans werd bepaald voor juveniele Artemia voor diverse concentraties van de onbehandelde en behandelde gist (Verslag 1991, I.Fig. 5). Op basis van deze ^{14}C -budgetten werden A en a berekend (Verslag 1991, I.Fig. 6).

Het effect van de voedselconcentratie op de assimilatieëfficiëntie was afhankelijk van het gistpreparaat en de condities van de acclimatisatie voor de aanvang van de proef. Na een acclimatisatie van de dieren aan de experimentele voedselconcentratie daalde de assimilatieëfficiëntie voor de onbehandelde gist met toenemende voedselconcentraties, terwijl een hoge assimilatieëfficiëntie ($> 72\%$), onafhankelijk van de voedselconcentratie, werd waargenomen voor behandelde gist. Een acclimatisatie aan hoge voedselconcentraties resulteerde in een lage assimilatieëfficiëntie ($< 37\%$) voor de onbehandelde gist onafhankelijk van de gistconcentratie. Het effect van de acclimatisatie is mogelijks het gevolg van een respons van de spijsverteringsenzymes bij Artemia.

Het verloop van de assimilatiesnelheid in functie van de voedselconcentratie vertoonde een saturaties'pons voor Artemia die zich voedt met behandelde gist en daalde met een toenemende concentratie aan onbehandelde gist. Deze waarnemingen lieten toe om het concept van "superfluus feeding" in zoöplankton te koppelen aan de verteerbaarheid van het voedsel. De variatie van de assimilatiesnelheid en assimilatieëfficiëntie in functie van de voedingsnelheid liet bovendien toe om een kritische waarde voor deze laatste parameter te bepalen (ongeveer $10 \mu\text{g C ind}^{-1} \text{h}^{-1}$; Verslag 1991, I.Fig. 7). Deze drempelwaarde werd overschreden door Artemia die zich voedt op onbehandelde gist, wat een daling van de snelheid en efficiëntie van de assimilatie impliceerde. Een compenserend mechanisme waarbij de voedingsnelheid aangepast wordt in functie van de assimilatie werd voorgesteld om de verhoogde voedingsnelheid te verklaren bij Artemia die zich voedt met weinig verteerbare gistcellen.

1.2.3. Studie van de kwantitatieve voedselvereisten bij Artemia gevoed met een gemengd dieet van ééncellige wieren Dunaliella tertiolecta en gist

Voorgaand onderzoek heeft aangetoond dat Artemia kan opgekweekt worden op laboratoriumschaal met een gemengd dieet van levende ééncellige wieren (Dunaliella tertiolecta) en een gemanipuleerd gistvoeder (Tabel 1.1). Het huidige onderzoek beoogt een verdere optimalisatie van de kweek van Artemia op dit mengdieet door een betere afstemming van het voederregime op de kwantitatieve vereisten van het pekelkreeftje tijdens de kweek.

Een kweektest werd uitgevoerd waarbij het effect van diverse voederregimes op groei, overleving en maturatiesnelheid werd geëvalueerd (Tabel 1.2). De gestandaardiseerde kweektest werd uitgevoerd zoals beschreven in Coutteau et al. (1992).

De kans op het instorten van een cultuur bleek het hoogst wanneer een hoger regime (130%) werd aangehouden tijdens de eerste week na ontluiking (één op zes cultures <25% overleving op dag 8). De andere voederregimes resulteerden in overlevingspercentages van > 70% bij het beëindigen van de proef (dag 26, Verslag 1992, I.Fig. 1). De hogere voedseldensiteit resulteerde in een hogere belasting van het kweekmedium en de lagere waterkwaliteit verhoogde aldus mogelijks de kans op het mislukken van de kweek. De groeisnelheid van Artemia nam toe met toenemende voederdosering (Verslag 1992, I.Fig. 2). Opmerkelijk was de onmiddellijke respons van de groei op een omschakeling van het voederregime na de eerste week. Zo leidde een reductie van het voederregime van 100% naar 70% (behandeling C) in een lagere groei tijdens de tweede week. De finale lichaamslengte op dag 26 varieerde tussen 8.77 (B) en 10.14 (G) voor wijfjes en tussen 5.98 (B) en 7.82 (G) voor mannetjes. Sexuele differentiatie, gemeten als percentage graviede vrouwtjes, bleek significant vertraagd bij de lagere voederregimes (A, B, C) dan bij de overige (Verslag 1992, I.Fig. 3).

Deze proef wees uit dat het referentieregime nagenoeg optimaal is voor de kweek van Artemia op laboratoriumschaal. Groei- en maturatiesnelheid kan evenwel verhoogd worden door het voederregime met 30% te verhogen. Dit laatste gebeurt evenwel best na de eerste week na ontluiking om de kans op een "crash" te minimaliseren.

1.2.4. Studie van de voedselvereisten bij Artemia gekweekt bij hogere zoutgehaltenes

Voor de studie van de rassendiversiteit bij het pekelkreeftje levert de kweek bij hogere saliniteiten vaak belangrijke gegevens op wat betreft het effect van natuurlijke omgevingsfactoren op biometrie, groei en reproductie. Voor deze karakterisatieproeven dient evenwel de bestaande kweektechniek aangepast te worden wat betreft de kwalitatieve en kwantitatieve aspecten van het voederregime. Preliminair proeven hebben uitgewezen dat de kweek van het pekelkreeftje bij hogere zoutgehaltenes resulteert in een verschuiving van de kwantitatieve voedselbehoeften. Bovendien is het standaardregime bestaande uit levende wieren (D. tertiolecta) en gisten niet even geschikt bij hogere zoutgehaltenes als bij 35 ppt. De hogere saliniteit beïnvloedt de beschikbaarheid van D. tertiolecta, die wordt gekweekt bij 35 ppt en dus niet osmotisch is aangepast aan een hogere saliniteit. Dit probleem kan mogelijks opgelost worden door het gebruik van "inerte wieren" (vb. onder gevriesdroogde vorm) of wiersoorten die gekweekt kunnen worden bij zeer hoge zoutgehaltenes (vb. Dunaliella salina). Een kweektest werd uitgevoerd waarbij het effect van diverse types wieren (levende en gevriesdroogde D. tertiolecta, levende D. salina) werd uitgetest op groei, overleving en maturatiesnelheid tijdens de kweek van Artemia bij een zoutgehalte van 150 ppt (Tabel 1.3). Overleving was afhankelijk van zowel het voederregime als de aard van het dieet. Het lagere voederregime leverde steeds de beste overleving op, wat er op wijst dat de kwantitatieve voedselvereisten afnemen bij hoge saliniteit. De snellere maturatie (hogere ratio graviede/niet-graviede wijfjes) bij Artemia die de hoogste voederdosering werden toegediend bevestigde de resultaten van de voorgaande test. De gevriesdroogde D. tertiolecta bleek niet geschikt als wiercomponent in het mengdieet en resulteerde in zeer geringe overleving op het einde van de proef, en een trage groei en maturatie (Verslag 1992, I.Fig. 4, 5, 6). Zeer stabiele cultures werden bekomen met levende D. tertiolecta (75% overleving, Verslag 1992, I.Fig. 4). De levende D. salina resulteerde in een snellere groei en maturatie in vergelijking

met het mengdieet met D. tertiolecta. Verdere proeven zijn nodig om na te gaan of een verdere reductie van het D. salina regime (vb. 50% van standaardregime) resulteert in een hogere overleving. Dit laatste zou toelaten het dieet voor de kweek van Artemia bij hogere saliniteiten te optimaliseren zowel in termen van overleving als van groei en maturatie.

1.3. Uitbreiding van het gebruik van gist als wiersubstituut naar andere filtreer-organismen: Streptocephalus proboscideus versus Artemia

Het gebruik van gist als wiersubstituut voor de kweek van Artemia en Streptocephalus proboscideus op laboschaal werd vergeleken in een reeks proeven waarbij beide Anostraca met een gelijkaardige methodiek gekweekt werden (Coutteau et al., 1992). Voor deze proeven werd gebruik gemaakt van chemisch behandelde bakkergist, hetzij onder de verse vorm, hetzij onder een gedroogde vorm. Voor Artemia werd bij een substitutie van 75 % of 95 % door, respectievelijk, de droge of de verse gist een gelijkaardige overleving en zelfs betere groei bekomen in vergelijking met de wiercontrole. Een 75 % wiersubstitutie leidde bij S. proboscideus tot vergelijkbare overleving doch gereduceerde groei.

1.4. Op punt stellen van het bepalen van de lengte van zooplankton organismen m.b.v. een digitizeertablet

Het bepalen van de lengte van zooplankton, waarvan het lichaam gebogen is, dient in verscheidene stappen te gebeuren. De dieren worden d.m.v. een binoculair, die uitgerust is met een camera lucida, geprojecteerd op papier en de lichaamslengte wordt vastgelegd onder de vorm van een lijn. Het probleem is dan gereduceerd tot het exact bepalen van de lengte van een gebogen lijn. Hiervoor kan een curvimeter gebruikt worden, doch de accuraatheid en reproduceerbaarheid van deze eenvoudige en goedkope methode is inferieur aan deze van een digitizeertablet (Verslag 1989, I.Fig. 4). Voor het efficiënt gebruik van deze laatste werd in samenwerking met ir. E. Debaere (Lab. Electronica en Meettechniek, RUG) software geschreven die toelaat lengtemetingen snel en accuraat uit te voeren, de data op schijf te bewaren en er eenvoudige bewerkingen op uit te voeren. De instellingen van de digitizer werden gekozen met het oog op een maximale accuraatheid. Het programma wordt momenteel door diverse laboratoria gebruikt in België, alsook voor extensieprojecten van het ARC in China, Thailand en Chili.

Literatuurlijst

Coutteau, P., 1987. Het gebruik van bakkergist Saccharomyces cerevisiae voor de kweek van het pekelkreeftje Artemia. Licentiaatsthesis. Rijksuniversiteit Gent, België. 119 pp.

Coutteau, P., 1988. Studie van de nutritionele behoeften van het pekelkreeftje Artemia aan de hand van dieten op basis van Single-Cell Proteins. Deel I: Studie van de verteerbaarheid van gist voor Artemia. IWONL-jaarverslag 1987-1988. 43 pp.

Coutteau, P., Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1989. Feeding the brine shrimp Artemia on yeast: effect of mechanical disturbance, animal density, water quality and light intensity. Aquaculture Europe 1989, International Aquaculture Conference, Bordeaux (France), 2-4 october 1989. European Aquaculture Society, Special Publication 10. pp. 75-76.

Coutteau, P., Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1990. Baker's yeast as a potential substitute for live algae in aquaculture diets: Artemia as a case study. *Journal of the World Aquaculture Society* 21(1): 1-9.

Coutteau, P., Brendonck, L., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1992. The use of manipulated baker's yeast as an algal substitute for the laboratory culture of Anostraca. *Hydrobiologia* 234: 25-32.

Mehta, R.D. and Gregory, K.F., 1981. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* with increased susceptibility to digestive enzymes. *Applied Environmental Microbiology* 41(4):992-999.

Stateva, L.I., Venkov, P.V., Hadjiolov, A.A., Koleva, L.A. and Lyudskahov, N.L., 1988. Polyploid fragile strains of *Saccharomyces cerevisiae* - a novel source of proteins for nutritional purposes. *Yeast* 4:219-225.

Venkov, P.V. and Stateva, L.I., 1980. Osmotic dependant fragile mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. In: Stewart, G.G. and Russell, I. (Eds.), *Current developments in yeast research, Advances in biotechnology*, Pergamon Press, Oxford. pp. 447-431.

Tabel 1.1.: Standaard voederregime voor de kweek van *Artemia* op laboratoriumschaal met een gemengd dieet van levende ééncellige wieren (*Dunaliella tertiolecta*) en een gemanipuleerd gistvoeder (Coutteau et al., 1992).

dag	<i>Dunaliella tertiolecta</i> 10 ³ cellen dag ⁻¹ individu ⁻¹	gistdieet µg dag ⁻¹ individu ⁻¹
1	38	13.6
2,3,4	75	27.1
5,6	113	40.6
7	149	53.6
8	189	68.3
9	306	110.5
10,11	360	130.0
12,13	450	162.5
14,15	540	195.0
16,17	630	227.5
18,19	765	276.3
20,21, e.v.	900	325.0

Tabel 1.2.: Voederregimes (uitgedrukt als percentage van standaardvoederregime in Tabel 1.1).

code	dag 1 t.e.m. 7	dag 8 e.v.
A	70	70
B	70	100
C	100	70
D	100	100
E	100	130
F	130	100
G	130	130

Tabel 1.3.: Voederregimes (uitgedrukt als percentage van standaardvoederregimes in Tabel 1.1).

code	type wieren in mengdieet wieren/gist	dag1 t.e.m. 7	dag 8 e.v.
A1	<u>D. tertiolecta</u> (levend)	70	70
A2	<u>D. salina</u> (levend)		
A3	<u>D. tertiolecta</u> (gevriesdroogd)		
B1	<u>D. tertiolecta</u> (levend)	70	100
B2	<u>D. salina</u> (levend)		
B3	<u>D. tertiolecta</u> (gevriesdroogd)		

of zelfs een negatief effect bleek te hebben, werd de proef overgedaan bij een lagere H₂O₂-dosis. De ontluikingsresultaten zijn hieronder samengebracht:

<u>Code staal</u>	<u>aankomst ARC</u>	<u>blanco</u>	<u>peroxide</u> <u>5 % 5 min.</u>	<u>peroxide</u> <u>1 % 3 min.</u>
GSL 70	begin '70	34.1 ± 2.6	29.8 ± 4.2	38.4 ± 2.9
Macau 5/78	mei '78	72.8 ± 4.8	70.7 ± 5.2	75.0 ± 3.3
Macau 872112	april '79	47.9 ± 5.1	27.1 ± 3.3	47.1 ± 5.2
Macau 870191	20/11/78	51.7 ± 3.3	40.2 ± 6.3	37.4 ± 5.2
Macau 973060	1978	64.7 ± 3.3	29.2 ± 7.1	65.5 ± 7.6
Macau 977090	1978	48.1 ± 5.6	12.5 ± 3.9	70.8 ± 6.5
Macau 971030	1978	80.3 ± 4.3	71.1 ± 5.3	83.5 ± 3.0
Australië	03/05/78	80.8 ± 4.2	85.5 ± 5.6	83.5 ± 4.1

Opmerkelijk zijn de hoge ontluikingscijfers voor de niet behandelde stalen : meer dan 50 % voor 5 van de 8 monsters ; de standaard behandeling met peroxide (5 % 5 min.) blijkt echter in de meeste gevallen een toxisch effect te geven ; zelfs bij een gevoelig lagere dosis (1 % 3 min.) is het effect in de meeste gevallen minimaal of onbestaande ; slechts in 1 geval (Macau 977090) wordt een merkelijke toename van de ontluiking waargenomen. Deze gegevens staan in scherpe tegenstelling met waarden bekomen voor recente monsters (zie boven). In hoeverre dit inherent is aan stalen die gedurende lange tijd in quiescentie of 'dormancy' bewaard worden valt niet te achterhalen ; hiervoor zijn bijkomende experimenten, zo mogelijk met andere oude stalen, vereist.

Om de leefbaarheid van de instar I-larven na te gaan werden uithongeringsproeven uitgevoerd volgens de in de literatuur beschreven methodiek. De overleving van de pas ontloken larven werd gevolgd bij 20°C en 30°C ; een referentiestaal (GSL) werd in de proef opgenomen. Een vergelijking met gegevens van identieke proeven, uitgevoerd op recente stalen van Macau en GSL-cysten toont aan dat er geen verschillen optreden met waarden bekomen voor recente monsters, en dit voor beide temperaturen. In tegenstelling met wat wellicht verwacht kon worden, wordt na een langdurige stockering (meer dan 10 jaar) de leefbaarheid van de larven, geëvalueerd aan de hand van een uithongeringsproef, niet aangetast.

Om de ontluikingskwaliteiten van deze monsters verder te evalueren werd de ontluikingsnelheid bepaald. Hoewel het patroon vrij sterk varieert van staal tot staal, wijken deze gegevens enigszins af van recente stalen, zoals beschreven in de literatuur : verder statistisch onderzoek en herhalingen in de tijd zouden moeten uitwijzen of het latere beginpunt van de ontluiking (t_0), zoals waargenomen voor een aantal stalen (20-25 uur), evenals de geringere synchronie (± 10 uur) significant verschilt van recente monsters ; aangezien de ontluikingskarakteristieke functie zijn van ondermeer bewaringscondities, kan men verwachten dat in het geval van langdurige bewaring het patroon van ontluiking verschuift.

2.2. Onderzoek van diapauze-desactivatie bij Artemia-cysten

2.2.1. Onderzoek van diapauze bij cysten geproduceerd onder standaardomstandigheden in een recirculatiesysteem

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 de factoren die de ontluikbaarheid van cysten bepalen of die de kwalitatieve en kwantitatieve voedingswaarde van Artemia-nauplii beïnvloeden. Standaardcysten, verkregen onder specifieke en goed gecontroleerde omstandigheden, zijn wellicht beter geschikt voor de studie van de invloed van de afleg, dan cysten afkomstig uit natuurlijke biotopen, met variabele karakteristieken en weinig beschikbare achtergrondinformatie.

Een gedetailleerde beschrijving van de proefopstelling is opgenomen in het jaarverslag 1988. Opeenvolgende verbeteringen aan het systeem hadden betrekking op de mechanische zuivering van het kweekmedium, beveiliging van het systeem tegen onvoorziene problemen in het circuit, perfectionering en automatisering van de O₂-stress die de cystenproduktie induceert, en algehele standaardisering van de abiotische parameters. Om bacteriële problemen onder controle te houden werd de nodige routine in acht genomen om de hygiëne te verzekeren.

De geproduceerde cysten, opgevangen in een cystencollectortank, werden dagelijks afgeogst en voor de duur van de proef, met het oog op diapauze-experimenten, apart gestockeerd in het medium bij matige aeratie.

Verschillende processings- en stockeringstechnieken werden toegepast op deze cysten : laagdrogen, pekelinclusie, peroxide-behandeling, diepvriesbewaring ; het effect van deze behandelingen werd geëvalueerd aan de hand van het ontluikingspercentage.

Een reeks proeven (jaarverslag 1989) i.v.m. optimale voedselconcentratie, in functie van de densiteit van de Artemia-populatie, wezen op het belang van de voedselconcentratie voor de cystenvorming : de cystenafleg wordt bevorderd door een daling van de zuurstofconcentratie bij toenemende voedselconcentraties, die optreden bij verminderde voedselopname in het geval van hoge mortaliteit. Deze onrechtstreekse invloed kan slechts vermeden worden door het handhaven van een constante en gelijke zuurstofconcentratie in alle aquaria.

Binnen de uitgeteste behandelingen geven lagere voedselhoeveelheden een betere overleving.

In het jaarverslag 1989 wordt uitgebreid melding gemaakt van de studie van de ontluikingskwaliteit van de de cysten, geproduceerd onder deze standaardomstandigheden. Specifieke factoren werden hierbij geanalyseerd, zoals stockering bij verschillende temperaturen en gedurende verschillende perioden, invloed van produktieomstandigheden en -tijdstippen, effect van diapauze-desactiveringstechnieken (dehydratie, aestivatie, hibernatie, peroxide).

Deze resultaten kunnen kort als volgt samengevat worden :

Artemia-rassen : enorme verschillen bestaan tussen de ontluikbaarheid van de diverse rassen, en zelfs binnen eenzelfde geografische populatie : 0 tot 31 % voor Lavalduc, 0 tot 69 % voor Great Salt Lake, 37 tot 64 % voor San Francisco Bay, 40 tot 71 % voor Macau ; gecontroleerde cystenprodukties van Tientsin, Chaplin Lake of Margherita di Savoia bereikten zelfs geen 5 % ontluiking na uittesten van de verschillende technieken.

Produktie-omstandigheden : er bestaat een duidelijke interactie tussen de hoeveelheid voedsel die beschikbaar is voor de adulte populatie en de ontluiking van de geproduceerde cysten. Optimale voeding van de moederpopulatie resulteert in significant hogere cijfers dan suboptimale.

Produktietijdstip : cysten, afgelegd aan het begin van de reproductieve periode, produceren significant minder nauplii na desactivatie door dehydratatie in pekel of ovendrogen.

Dehydratatie : het succes hangt af van de gebruikte techniek ; verzadigde NaCl-pekkel, die resulteert in een finaal intracystair watergehalte van 20 % geeft praktisch steeds het laagste rendement. Een medium met hogere osmotische kracht, zoals $MgCl_2$ (watergehalte 6 %) geeft in 2 van de 3 gevallen significant hogere waarden. Ook het drogen der cysten in dunne lagen bij 35°C (watergehalte 4 %) geeft meestal beduidend hogere resultaten. De graad van dehydratatie heeft dus een belangrijke invloed op de diapauze-desactivering.

Aestivatie : wanneer de gedehydrateerde cysten gestockeerd worden gedurende lange periodes zonder specifieke behandeling blijkt de ontluikbaarheid significant toe te nemen voor de helft van de onderzochte monsters.

Hibernatie : een duidelijke invloed is waar te nemen van de stockering bij lage temperaturen indien de incubatieperiode voldoende lang is (meestal minstens 14 dagen bij 25°C). Voor de incubatie bij 4°C lijkt in een aantal gevallen een langere tijdsduur vereist.

Peroxide : voor 80 % van de onderzochte monsters neemt de ontluikbaarheid significant toe na behandeling met peroxide. Alleen voor labo-geproduceerde cysten van het ras afkomstig uit de baai van San Francisco (SFB en Mac) treedt er geen positief effect op. Bovendien heeft de incubatieduur en waarschijnlijk ook de concentratie aan peroxide een belangrijke invloed op het desactiveringsproces.

Uit het onderzoek van de verschillende processing- en stockeringstechnieken, toegepast op de geproduceerde cysten, komt duidelijk tot uiting dat de studie van de cryptobiotische toestand van *Artemia* een complexe materie is. Zo interfereren in de eerste plaats de productie-omstandigheden met de diapauze van *Artemia*-cysten. Aan de hand van de proefresultaten en de literatuurstudie kunnen we talrijke factoren aanduiden die een invloed hebben op de ontluikbaarheid van de geëncysteerde embryo's, en die kunnen gegroepeerd worden als volgt :

- genotypische factoren
- kweekomstandigheden
- reproductiefactoren
- diapauze-inhibitoren
- exploitatie-factoren
- ontluikingsomstandigheden.

Overlapping en interactie tussen deze groepen factoren is mogelijk tijdens de verschillende fasen van de reproductie. Het diapauzeproces speelt hier blijkbaar de sleutelrol. Aangezien dit proces een belangrijke rol vervult voor de overleving van de populatie wanneer het biotoop tijdelijk ongunstig is, en het mogelijk maakt om de populatie-ontwikkeling te synchroniseren met de biotoopwijzigingen, lijkt het evident dat het diapauzeproces en/of de stopzetting ervan geadapteerd is aan de lokale omgeving. Dit kan geleid hebben tot

rasspecifieke eigenschappen, bv. met betrekking tot de sensitiviteit voor diapauze-desactivering. Men kan aannemen dat, afhankelijk van het geografisch ras of species, verschillende minimale drempelwaarden bestaan voor diapauze-desactivering. Zo bijvoorbeeld is de drempelwaarde laag voor SFB-populaties : onder optimale omstandigheden is een eenvoudige dehydratatie in pekkel gedurende 24 u. reeds voldoende om maximale quiescentie te verkrijgen. GSL daarentegen heeft een veel hogere drempelwaarde ; daarom is dehydratatie alleen onvoldoende en is bv. hibernatie vereist. Op deze wijze kunnen de ontluikingsresultaten bekomen na droging van cysten van diverse rassen en geproduceerd onder analoge, optimale labo-omstandigheden verklaard worden. De biochemische achtergrond van deze hypothese is echter voorlopig onduidelijk. Interdisciplinair onderzoek op wel gedefinieerd materiaal is een vereiste om het fundamenteel proces van diapauze te ontrafelen.

2.2.2. Diapauze-onderzoek op cysten afkomstig uit semi-natuurlijke produkties

Teneinde meer gegevens te verzamelen betreffende de werking van peroxide op het diapauze-proces werd een uitgebreid onderzoek (zie jaarverslag 1990) aangevat met cystenmateriaal afkomstig uit semi-natuurlijke produkties : Kazakstan, Vung Tau (Vietnam), Piura (Peru), San Francisco Bay (USA).

In eerste instantie werd het optimale activiteitgebied van peroxide vastgelegd. De resultaten van dit onderzoeksdeel zijn samengevat in tabellen 2.1. en 2.2. en figuur 2.1. De gegevens tonen aan dat de invloed van peroxide kwantitatief is : bij lage concentraties is een langere incubatietijd nodig dan bij hoge concentraties om eenzelfde ontluiking te garanderen. Niettegenstaande de experimenten steeds in standaardomstandigheden werden uitgevoerd, trad er regelmatig een zekere variabiliteit op in effect van de peroxide-behandeling binnen eenzelfde ras, hetgeen het vastleggen van het activiteitsgebied bemoeilijkte. Deze problematiek leidde ertoe dat het effect van enkele incubatieomstandigheden nader onderzocht werd :

- een voorafgaandelijke incubatie in zeewater gedurende maximaal 3 uur beïnvloedt het effect van de peroxide behandeling significant op positieve wijze,
- de pH van het medium tijdens de peroxide-behandeling heeft een kleine maar significante invloed op de desactivering van Peru-cysten,
- de cystendensiteit tijdens de behandeling heeft geen invloed op het inhibitieproces d.m.v. peroxide.

Om de economische toepasbaarheid te evalueren van het effect van peroxide-behandeling werd een stockeringsproef in verschillende omstandigheden uitgevoerd met Vung Tau-cysten, vooraf behandeld met peroxide ; als conclusie mocht gesteld worden dat het effect van de diapauze-inhibitie gedurende minstens 3-4 maanden voelbaar bleef, voor zover de stockeringsomstandigheden optimaal gehouden werden (watergehalte, temperatuur).

Volgens het OOA-verslag van 1989 kon uit de proeven besloten worden dat het desactiveringsproces d.m.v. hibernatie geen on/off-reactie is, maar wel van kwantitatieve aard. Om de behandelingsprocedure nog beter te standaardiseren werden enkele cystenloten onderworpen aan verschillende vormen van koudebehandeling bij diverse temperaturen, watergehalten en bewaringsduur. De resultaten zijn grafisch voorgesteld in de figuren 2.2 en 2.3. 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 cysten resp. uit Kazakstan, Piura en Vung Tau. De toestand waarin de cysten de hibernatie ondergaan (gedroogd of gepekeld) heeft een significante invloed op de ontluikbaarheid, in die zin dat het effect geringer is voor gepekeldes cysten. Globaal kan gesteld worden dat de rassen, gevoelig voor inhibitie van diapauze door hibernatie, meestal afkomstig zijn uit streken met een gematigd klimaat, hetgeen toelaat te veronderstellen dat deze gevoeligheid het gevolg kan zijn van ecologische adaptatie aan het lokale milieu.

2.3. Invloed van processing-behandelingen op de cryptobiotische toestand van Great Salt Lake (GSL) cysten

2.3.1. Doelstelling

Rasspecifieke verschillen t.o.v. diapauzesdesactivering werden aangetoond met Artemia-cysten van verschillende geografische oorsprong, geproduceerd onder analoge omstandigheden in het laboratorium (zie 2.2.) Rasspecifieke verschillen in diapauzesdesactivering, die in relatie kunnen staan met de natuurlijke biotoomomstandigheden, zouden dan kunnen uitgelegd worden door verschillen in minimale drempelwaarde voor diapauzesdesactivering. Meerdere auteurs bewezen reeds dat een koudebehandeling (hibernatie) de diapauze van GSL-Artemia-cysten desactiveert.

Doel van deze studie is het verder onderzoek naar de omgevingsfactoren die een invloed uitoefenen op cryptobiotische cysten van het GSL-ras, en meer bepaald in functie van de omstandigheden waarbij de produktie en verwerking van deze cysten verloopt. Optimale factoren voor bewaring op lange termijn verkleinen het risico op verlies aan leefbaarheid. Preliminare tests wijzen uit dat cysten beter (koud) bewaren in niet-verwerkte toestand dan in gezuiverde vorm, of dat een minimale periode van bewaring in niet-gezuiverde vorm de latere leefbaarheid, na zuivering, ten goede komt. De temperatuur waarbij de bewaring van deze cysten optimaal gebeurt, is echter niet gekend.

Deze materie wordt nog gecompliceerd door het feit dat het Great Salt Lake geen homogeen biotoop is, maar eerder een verzameling van min of meer verschillende biotypes. Cysten afkomstig uit bepaalde delen van het meer vertonen bv. stelselmatig een afwijkend EFA-patroon. De aanwezigheid van diverse industrieën langs de oevers (met lozing van afvalwater in het meer) draagt bij tot de mogelijke variatie in cystenkwaliteit.

2.3.2. Proefopstelling

Ten einde een beter inzicht te krijgen in de manier waarop diverse omgevingsfactoren tegelijk en waarschijnlijk interactief een rol spelen bij het doorbreken van de diapauze bij GSL-cysten, en bij de bewaring van het quiescente produkt (na doorbreken van de diapauze), werd een schema opgesteld waarbij het experimenteel cystenmateriaal (afkomstig van verschillende oogstplaatsen en -tijdstippen) onderworpen wordt aan een combinatie van factoren (zie tabel 2.3.) De resulterende ontluikingskwaliteit werd geëvalueerd door bepaling van het ontluikingspercentage.

Na elke bewaringsperiode (na bepaling van de ontluikingskwaliteit), wordt van elk staal de 'shelf life' of bewaarbaarheid gevolgd : de stalen worden aeroob en bij gelijk blijvend watergehalte bij +4 en +20°C bewaard, en na 3, 6 en 12 maanden wordt opnieuw het ontluikingspercentage bepaald.

Een apart onderdeel van de processingproeven behelsde het gebruik van de wervelbeddroger (fluidized bed dryer, FBD, zie jaarverslag 1991), waarbij het mogelijk is voor relatief grote hoeveelheden cysten (10-20 kg natgewicht) in een zo kort mogelijke tijd (2-3 uur) een optimaal watergehalte ($< 5\%$) te verkrijgen. Om een nauwkeuriger beeld te verkrijgen van de optimale drogingsnelheid en het optimale finale watergehalte, gekoppeld aan de bewaarbaarheid van het resulterend produkt, werden GSL-stalen waarvan voldoende hoeveelheden voorradig waren onderworpen aan droging in de FBD bij verschillende combinaties van drogingsnelheid en watergehalte. De gedroogde stalen werden bewaard bij $+4^{\circ}\text{C}$ en $+25^{\circ}\text{C}$ gedurende 1 jaar, en na regelmatige tijdsintervallen werd de ontluikbaarheid gecontroleerd.

2.3.2. Resultaten en bespreking

Voor een alle proefresultaten en een gedetailleerde bespreking verwijzen we naar het jaarverslag 1992.

Hoewel de verschillende stalen niet in gelijke mate reageren op de beproefde behandelingen, kunnen toch een aantal tendenzen aangestipt worden:

- temperatuur: bij iedere behandeling blijkt $+4^{\circ}\text{C}$ de beste resultaten te geven; bewaring bij -10°C resulteert in minder goede ontluiking dan bij $+15^{\circ}\text{C}$.
- watergehalte: een hoger watergehalte heeft een verminderde kwaliteit voor gevolg na verloop van tijd; vooral de directe bewaring (zonder enige vorm van ontwatering) vertoont een gevoelige afname.
- bewaringsduur: een aanzienlijke afname treedt slechts op na 4 maanden bewaring; na 6 maanden is de vermindering in vele gevallen slechts marginaal.
- aanwezigheid van zuurstof: had bij de uitgeteste behandelingen geen invloed op de ontluikingskwaliteit.

Het soms uiteenlopende reactie van de verschillende stalen op de omstandigheden van bewaring onderlijnt het belang van de evaluatie van verschillende lokaties; in de toekomst dient dus het onderzoek uitgebreid te worden tot andere stalen, afkomstig uit andere lokaties en van andere oogsttijdstoppen.

De proeven met de FBD wezen uit dat er pas een maximale afname in de ontluikbaarheid optreedt na 6 maanden bewaring; deze eventuele afname was echter in de meeste gevallen de eerste 4 maanden beperkt tot $\pm 10\%$, in uitzonderlijke gevallen was er een afname met 30% na 6 maanden.

De combinatie van snelle droging (1,5-2 uur) + laag watergehalte ($< 5\%$) + lage bewaringstemperatuur (4°C) leverde nooit een lagere ontluiking op na een bepaalde bewaringsduur dan enige andere combinatie van factoren; vooral de bewaringstemperatuur ($+4$ versus $+25^{\circ}\text{C}$) bleek de factor te zijn die het meest het uiteindelijke ontluikingscijfer bepaalt. Gezien de verschillende manier waarop de experimentele stalen (= verschillende oogstplaats en -tijdstop) reageerden op de verschillende factoren, moet men aannemen dat de antecedenten van de cysten vóór droging een niet geringe rol spelen bij de manier waarop de reactie op de droging verloopt.

Literatuurlijst

LAVENS, P.; SORGELOOS, P.-1984

Controlled production of Artemia cysts under standard conditions in a recirculating culture system.

Aquacultural Eng., 3: 221-235.

LAVENS, P.; SORGELOOS, P. 1987

The cryptobiotic state of Artemia cysts, its diapause deactivation and hatching: a review: p. 27-63.

In: Artemia research and its applications. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Sorgeloos, P.; Bengtson, D.A.; Declair, W.; Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, 556 p.

LAVENS, P.; TACKAERT, W.; SORGELOOS, P.-1986

International Study on Artemia: XLI. The influence of culture conditions and specific diapause deactivation methods on the hatchability of Artemia cysts, produced in a standard culture system.

Mar. Ecol. Progr. Ser., 31: 197-203.

Tabel 2.1.

Activiteitsgebied van peroxide voor cysten afkomstig uit Kazakstan en Piura (waarden uitgedrukt in ontlukingspercentage met standaardafwijking)

H ₂ O ₂ - oplossing	Ontluikingspercentage na een incubatieduur van		
	1 min	5 min	15 min
blanco KAZ	18,4 ± 4,9		
1 I	31,1 ± 5,9	36,2 ± 5,5	48,4 ± 4,4
5 I	50,4 ± 5,4	64,4 ± 5,2	75,1 ± 5,8
10 I	62,2 ± 5,1	69,1 ± 4,9	76,0 ± 3,6
F interactie = 3,68			
blanco PIU	20,1 ± 5,3		
1 I	37,9 ± 4,5	58,6 ± 6,0	73,8 ± 5,8
5 I	57,1 ± 5,2	67,6 ± 6,4	75,2 ± 7,4
10 I	63,3 ± 6,9	71,4 ± 4,9	70,2 ± 5,7
F interactie = 14,677			

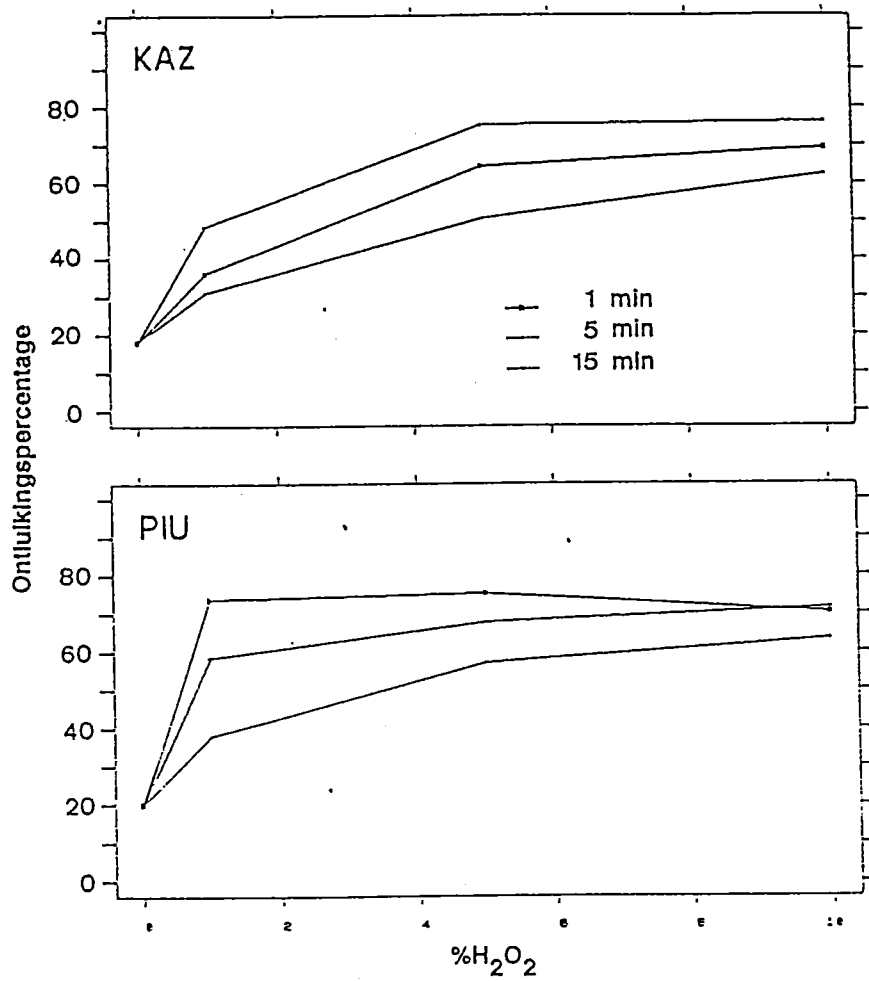
Tabel 2.2.

Invloed van de concentratie aan peroxide op de ontlukbaarheid van *Artemia* cysten afkomstig van diverse geografische oorsprong (waarden uitgedrukt in ontlukingspercentage met standaardafwijking)

H ₂ O ₂ - concentratie (%) gedurende 5 min behandeling	Artemia 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	69,0 ± 4,1	40,9 ± 4,9	85,4 ± 4,5
10	80,9 ± 6,7	-	-
27	79,5 ± 8,2	-	72,4 ± 5,4
F interactie	38,6	92,8	347,6

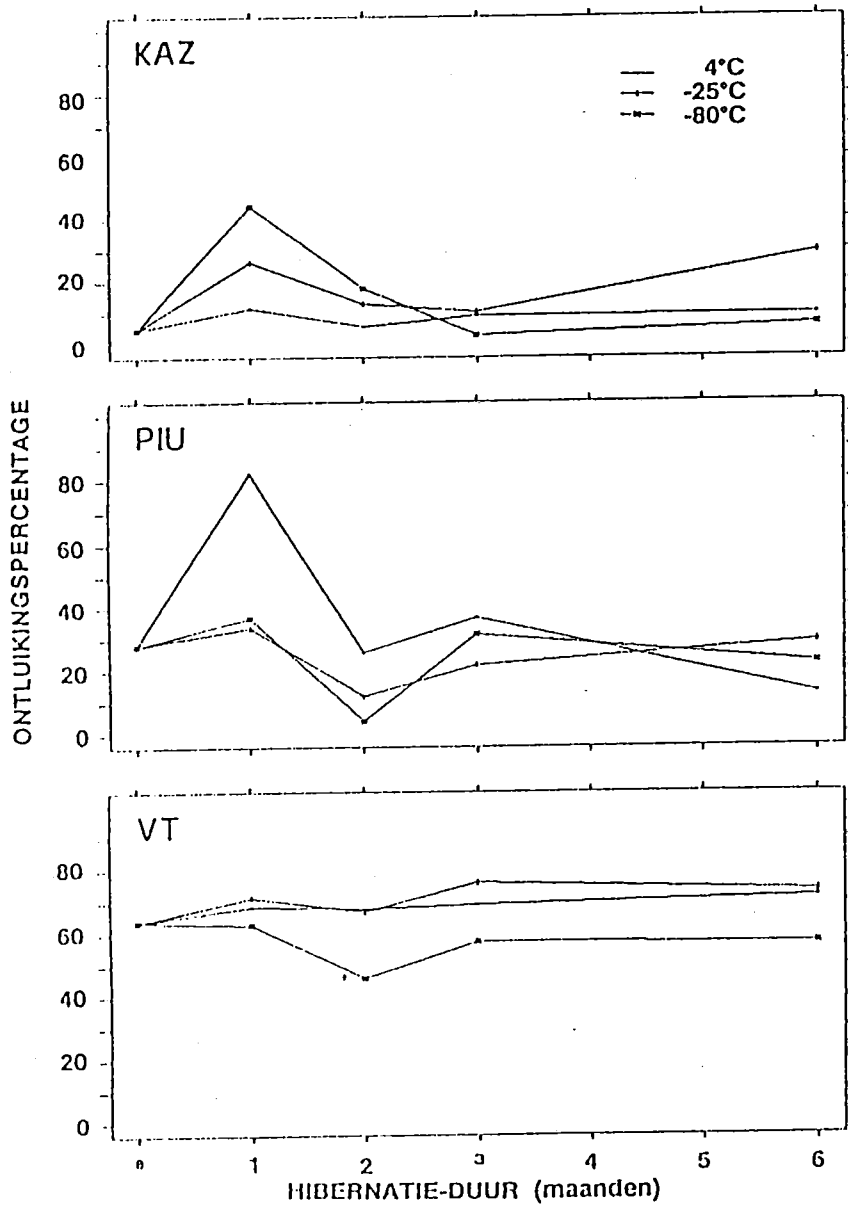
Tabel 2.3. Overzicht van het proefschema

RUW STAAL									
- verschillende locaties									
- verschillende oogsttijd									
Ruw staal (licht/vacuüm)		onverzadigde pekkel (licht)			verzadigde pekkel (licht)			gedroogd 24 u. 35°C (licht)	
-10°C	+4°C	+15°C	-10°C	+4°C	+15°C	-10°C	+4°C	+15°C	+15°C
0 maand									
2 maanden									
4 maanden									
6 maanden									
12 maanden									



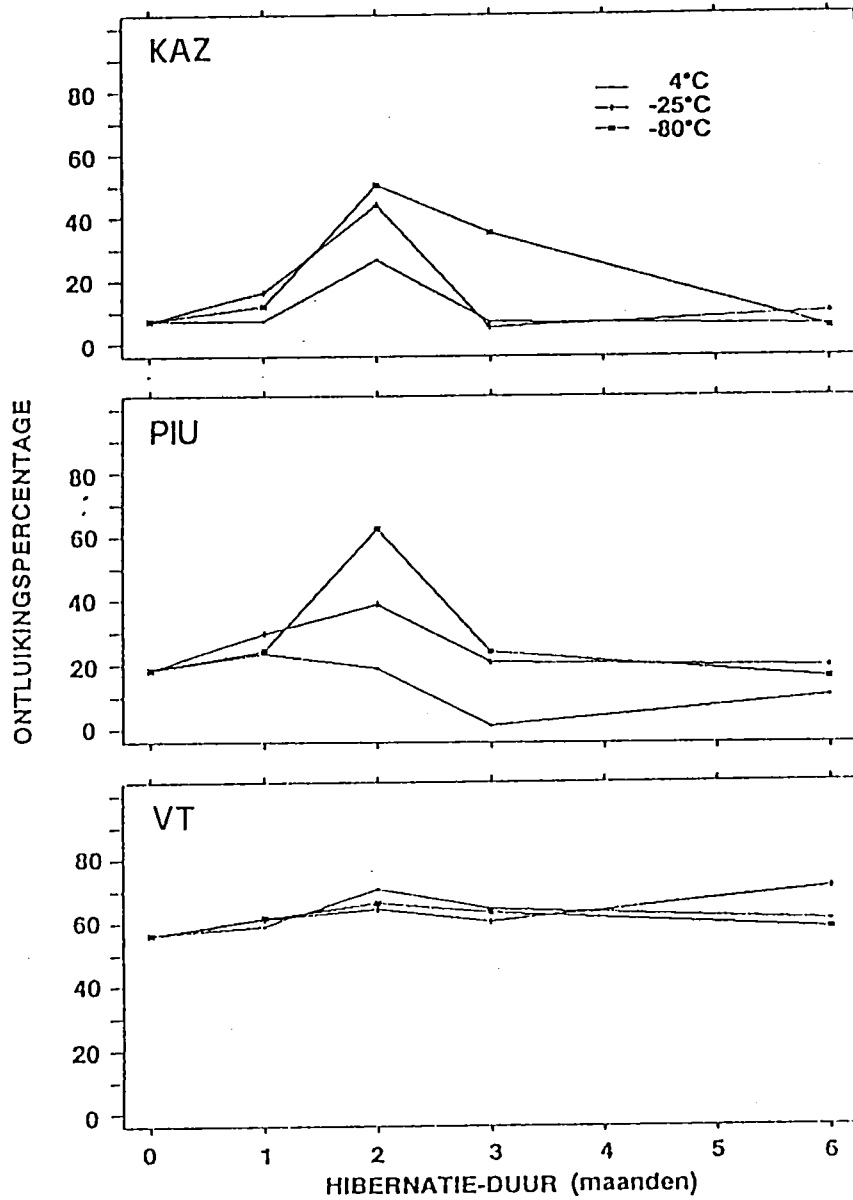
Effect van peroxide op de ontluikbaarheid van cysten afkomstig van Kazakstan en Peru.

Figuur 2.1.



Figuur 2.2.

Effect van hibernatie-omstandigheden op de diapauze-deactivering van gepekelde cysten afkomstig van Kazakstan, Peru en Vietnam.



Figuur 2.3.

Effect van hibernatio-omstandigheden op de diapauze-desactivering van gedroogde cysten afkomstig van Kazakstan, Peru en Vietnam.

3. Alternatieve benaderingen van de intensieve teelt van Artemia

3.1. Uitwerken van een eenvoudige techniek voor intensieve productie van Artemia juvenielen

3.1.1. Doel

Het gebruik van Artemia nauplii en adulte biomassa in de larvale kweek van mariene vissen en garnalen is zeer algemeen. Hoewel het gebruik van Artemia juvenielen t.o.v. voorgenoemde stadia voordelen biedt op nutritioneel, energetisch en bedrijfseconomisch vlak is hun toepassing zeer beperkt voornamelijk door het gebrek aan een goedkope en betrouwbare kweektechniek die dit gebruik verantwoord zou maken.

In een eerste fase wensen we daarom een gestandaardiseerde kweektechniek uit te werken waarmee we, na 7 kweekdagen, een overleving van minstens 75% en een groei van 2.5 mm bereiken en dit zonder waterversing.

Na deze fase kan nagegaan worden hoe deze kweek optimaal kan geïntegreerd worden in de larvale kweek van mariene vissen en garnalen.

3.1.2. Experimenteel werk

3.1.2.1. Algemene materialen en methoden

De kweek wordt uitgevoerd in polyethyleen bakken van 100 liter, ze worden belucht door een geperforeerde pvc-arm. De cysten (GSL) worden bij 25°C ontloken en na 24 uur afgeogst en overgebracht in de kweektanks à ratio van 10.000 nauplii/l (tenzij anders vermeld). De gebruikte voedsels zijn gemikroniseerde landbouwafvalstoffen (80% sojapellen en 20% maïsbloem). Voedsel- suspensies worden dagelijks aangemaakt en d.m.v. een peristaltische pomp continu gedistribueerd. Elk experiment duurt 7 dagen. Dagelijks worden lengte, overleving en andere parameters (O₂, pH, stikstofcomponenten e.d.) bepaald.

3.1.2.2. Uitwerken van een gestandaardiseerde kweektechniek

Vergelijken van continue met diskontinue voeding

Groei en overleving zijn merklijk hoger met continue voeding. Ook de waterkwaliteit blijft beter : minder vlokvorming en een hogere helderheid, terwijl het zuurstofgehalte wel geleidelijk daalt doch voldoende boven het kritische niveau blijft. Continue voeding komt de stabiliteit van het systeem duidelijk ten goede. Gezien de blijvende grotere helderheid van het kweekwater en de beter gespreide voedselopname kan men ook de voedsel dosissen opdrijven teneinde een snellere groei te bereiken zonder de waterkwaliteit in het gedrang te brengen.

Effekt van het beluchterstype

Met een verbeterde beluchter waarmee de bodem over het gehele oppervlak wordt belucht treedt er bijna geen bezinking op en ontstaan er geen voorkeursstromingen waardoor de stroomsnelheid laag blijft. Groei en overleving zijn hierdoor toegenomen.

Effekt van de versheid van het voedsel

Het gebruikte voedsel is een mengsel van 20% gemikroniseerde maïsbloem en 80% gemikroniseerde sojapellen. Doorgaans wordt driemaandelijks een verse lading gemikroniseerd zodat het gebruikte voedsel in het beste geval hoogstens drie maand oud is. Met vers mengsel worden merkkelijk betere resultaten geboekt. Na verloop van tijd treedt ranzigheid op wat blijkbaar verminderde kweekresultaten tot gevolg heeft.

3.1.2.3. Sturing van de biomassaproductie

Dankzij de gewijzigde aeratie en het gebruik van vers voedsel staat nu een kweektechniek op punt die goede en reproduceerbare resultaten oplevert. Er kan nu werk gemaakt worden van de sturing van de voortgebrachte biomassa.

Het is de bedoeling om, binnen verschillende vooropgestelde kweekduren, pekelkreeftjes te produceren met verschillende afmetingen door zowel voederdosissen als pekelkreeften densiteit te wijzigen. Hiermee wordt het mogelijk om gedurende een larvale viskweek steeds te beschikken over de gewenste hoeveelheid levend larvaal voedsel met de gewenste lengte.

Vier voederregimes, gaande van 100% tot 200% van het standaard regime, worden uitgetest. Met hogere voedseldosissen wordt inderdaad een snellere groei bereikt doch dit gaat ten koste van de stabiliteit van de kweek (Fig.3.1). Bij de hogere voederregimes zien we namelijk hoe enkele kweektanks binnen deze reeksen in de loop van de kweekperiode uitvallen.

Vier reeksen met resp. 5000, 10.000, 15.000 en 20.000 dieren per liter krijgen allen het standaard voedselregime. De overleving is uitstekend in alle reeksen ($> 80\%$) maar de groei neemt af met toenemende densiteit (Fig.3.2). De biomassa, die uiteraard initieel hoger is bij een hogere densiteit, neemt sneller toe bij de laagste densiteiten om rond dag 5 samen te vallen en verder uit te lopen tot dag 7.

3.1.2.4. Ontwikkelen van een gestandaardiseerde aanrijkingsprocedure

Het belang van hoog onverzadigde vetzuren (HUFA's) voor vislarven is reeds uitvoerig gedocumenteerd (Léger et al.,1986). Artemia nauplii, en zeker Artemia larven die werden opgekweekt op (vetarme) gemikroniseerde landbouwafvalprodukten, bevatten onvoldoende essentiële HUFA's (Grymonpré,1982) wat een directe weerslag heeft op de overleving en de korrekte ontwikkeling van mariene vislarven. Dankzij aanrijkingsmethoden kan het vetzuurpatroon van nauplii worden verbeterd en bereikt men significant betere resultaten in de larvale viskweek van verschillende species (Léger,1989). Artemia nauplii worden traditioneel aangerijkt door een HUFA-rijk, zelfemulsifiërend mengsel toe te voegen aan een sterk doorborrelde nauplii suspensie.

Het vetzuurprofiel werd bepaald door capillaire gaschromatografie van de vetzuur-methylesters (Léger,1989)

Experiment en resultaten (zie Tabel 3.1.)

Om aan de specifieke omstandigheden van de juvenielenkweek tegemoet te komen, worden enkele aanpassingen aan de klassieke aanrijkingsmethoden uitgetest. Een aanrijkingsmiddel (DRY SELCO (DS), Artemia Systems NV, België) waarin de lipiden op droge partikels

gebonden zijn (en niet onder de vorm van een emulsie) wordt gedurende de kweekduur continu via het voedsel toegediend. De bereikte HUFA niveaus liggen hiermee vijfmaal hoger dan bij de controle waarbij de gekumuleerde hoeveelheid aanrijkingsmiddel op klassieke wijze wordt toegediend na het beëindigen van de kweek. Deze hogere waarden kunnen verklaard worden doordat bij de geleidelijke opname de lipiden worden gemetaboliseerd en opgestapeld in het weefsel terwijl bij de klassieke methode enkel de darmtractus wordt volgestouwd.

Ze vertoont het bijkomend voordeel dat Artemia, die op gelijk welk moment tijdens de kweek worden afgeogst, ook reeds voldoende zijn aangerijkt. Tenslotte is deze methode eenvoudiger en minder riskant (O_2 -tekort) dan de klassieke methode.

Nadat werd aangetoond dat geleidelijke aanrijking beter resultaat opleverde werden twee distributiepatronen vergeleken. Enerzijds een Dagelijks Constante Dosis (DCD) waarbij dagelijks een gelijke fractie van de totale dosis (0.6gDS/l of 0.2gSS/l) aan het voedsel werd toegevoegd en semi-continu aan de kweekbakken werd toegediend. Anderzijds een Dagelijks Toenemende Dosis (DTD) waarbij men aan een lagere dosis startte en deze lineair opvoerde teneinde uiteindelijk eenzelfde totale dosis te bekomen bij het beëindigen van de kweek.

De gecombineerde kweek en aanrijking leverde herhaalbare en bevredigende kweekresultaten op, het verleggen van het zwaartepunt van de aanrijking naar het einde van de proef toe (DTD) komt de overleving ten goede vermoedelijk omdat deze distributiewijze beter overeenstemt met de opname door de groeiende pekelkreeftjes. Hierdoor blijft minder emulsie in het kweekmedium achter en blijft de waterkwaliteit beter behouden.

Met DTD bereikt men een hoger aanrijkingsniveau dan met DCD en dit is het duidelijkst bij DS. Zoals hierboven reeds werd vermeld zijn de betere resultaten met DTD toe te schrijven aan het feit dat de distributie er beter is afgestemd op de opname.

Opvallend hierbij is dat geen verschillen gevonden werden tussen de niveaus op dag 5 en dag 7.

3.1.2.5. Schaalvergrotingstesten

De laboschaal waarop de kweekexperimenten tot nu toe werden uitgevoerd beantwoorden helemaal niet aan de werkelijke situatie waarin 'Artemia op maat' zal toegepast worden. De geschiktheid van de uitgewerkte kweekprocedure moet daarom getoetst worden op grotere schaal.

Op het labo beschikken we slechts over één tank die in aanmerking komt voor schaalvergrotingstesten. Het betreft een gemetste 2 m³ tank (3x1x0.7m) met centraal tussenschot voorzien van een tiental AWL (air water left). Dit 'renbaansysteem' wordt gebruikt voor de semi-intensieve (< 5000 dieren/l) kweek van adulten en is daarom voorzien van continue cirkulatie over een planparallele platenbezinker (PPS) voor het verwijderen van partikels.

Experimenten

In een eerste schaalvergrotingstest wordt bij 10.000 Artemia/l de platenbezinker verwijderd en wordt het standaard voederregime aangepast i.f.v. de turbiditeit.

Resultaten

Groei en overleving blijven vrijwel gelijk zonder platenbezinker maar de bedenkelijke waterkwaliteit laat duidelijk geen langere kweekduur toe. Het voederregime komt vrij goed overeen met de standaard die voor 100l tanks werd opgesteld, i.t.m. het voederregime voor een kweek met platenbezinker. Dit wijst erop dat, indien geen waterverversing wordt toegepast, het voederregime gemakkelijk kan geëxtrapoleerd worden voor een grotere schaal.

3.1.3. Conclusies

- * De intensieve kweek van Artemia zonder waterverversing is mogelijk mits het gebruik van een geschikte beluchting en het continu toedienen van vers voedsel. Dit met een overleving van gemiddeld méér dan 75% en een groei van 2.5 mm na 7 dagen;
- * Het verhogen van de voedseldosissen is geen geschikte methode om de groei te versnellen. Het standaard voederregime is het hoogste regime waarbij de stabiliteit van de kweek niet wordt aangetast;
- * De dichtheid bepaalt de individuele voedselhoeveelheid en bijgevolg de groeisnelheid zodat het mogelijk is om binnen eenzelfde kweekduur pekalkreeften voort te brengen met verschillende afmetingen door de startdichtheid te wijzigen. De overleving blijft hoog, bij een lagere dichtheid neemt de biomassa sneller toe;
- * Toedienen van het aanrijkmiddel gedurende de kweek vereenvoudigt de aanrijksprocedure, verlaagt het risico op zuurstofdepletie en vervijfoudigt het bereikte aanrijksniveau;
- * De kweektechniek kan zonder wezenlijke aanpassingen geëxtrapoleerd worden naar grotere volumes.

3.2. Semi-doorvloeisysteem voor de intensieve productie van Artemia

3.2.1. Inleiding

Super-intensieve kweekmethoden voor de kweek van Artemia werden begin 1970 geïntroduceerd met enerzijds de "batch" kweek waarbij rijstekaf als voedselbron gebruikt werd (Bossuyt & Sorgeloos, 1980, 1981), en anderzijds een doorvloeisysteem waar microwieren als voedsel gebruikt werden (Tobias et al., 1979, 1980). In de doorvloeiweek werd vlug overgestapt op het gebruik van goedkopere voedsels afkomstig uit de landbouw (Brisset et al., 1982; Lavens et al., 1985). Afhankelijk van de kweekcondities en de gebruikte voedsels, werden na een kweekperiode van 2 weken opbrengsten van respectievelijk 5 kg/m³ en 25 kg/m³ bekomen voor batch en doorvloeisystemen.

Ondanks de grote vooruitgang in de intensieve productie van Artemia, werden deze technieken niet opgenomen in het productieproces van commerciële broedhuizen; waarschijnlijk omwille van de vrij complexe kweektechnieken en de daarmee gepaard gaande noodzaak aan expertise in de intensieve productie van Artemia. Teneinde de bestaande kweektechnieken te vereenvoudigen en aldus de integratie van intensieve kweektechnieken in de broedhuizen te bevorderen werd gezocht naar een praktische en eenvoudige kweekmethode.

3.2.2. Proefopstelling en methodiek

De pilootinstallatie bestond uit zes ovale raceways met een nuttige inhoud van 1000 l en zes voedselreservoirs van eenzelfde inhoud (Fig. 3.3.). De voedselreservoirs werden een à twee maal daags voorzien van voedsel en zeewater. Een hevel met een specifieke diameter zorgde voor een continue voorziening van water en voedsel in de kweektank. Het effluent met de faecaliën en het afvalwater werd afgelaten door een cilindrische metalen filter die Artemia in het water hield (Lavens et al., 1985). De filters werden geregeld vervangen door gelijkaardige filters met een grotere maaswijdte naarmate de pekelkreeftjes groeiden. In totaal werden 5 verschillende maasopeningen gebruikt gaande van 150 tot 400 μm .

Het voedsel bestond uit een rijstekaf suspensie die opgemaakt werd door het mengen van 1 volume rijstekaf met 4 volumes zeewater. Deze suspensie werd door een planktongaas met een maaswijdte van 60 μm geperst alvorens toegediend te worden (Dobbeleir et al. 1980; Lavens & Sorgeloos, 1991). De concentratie van de gesuspendeerde rijstekaf schommelde tussen de 20 en 30 g/l, afhankelijk van de kwaliteit van het uitgangsmateriaal en de kracht waarmee de suspensie door het planktongaas geperst werd. De exacte waarde van de rijstekafconcentratie werd bekomen door het gewichtsverschil van een maatkolpje gevuld met gesuspendeerd rijstekaf en hetzelfde kolpje gevuld met zeewater. De voedseldistributie werd gespiegeld aan de vereisten van de gekweekte Artemia en werd gecontroleerd door regelmatige turbiditeitsmetingen in de kweektank (Bossuyt & Sorgeloos, 1980)(Tabel 3.2).

3.2.3. Groei en overleving

In een tweede proefreeks werd het effect van verhoogde/verlaagde rijstekaf concentraties (voor Artemia densiteiten van 2000, 5000 en 8000 dieren per l) uitgetest op de groei van Artemia (Fig. 3.4.). Het spreekt vanzelf dat dieren van gelijke lengte kunnen geproduceerd worden door verschillende combinaties van enerzijds voedselconcentraties en anderzijds larvale densiteit. In ieder geval moet bij hoge larvale densiteiten rekening gehouden worden met een verlengde kweekperiode om dieren met eenzelfde lengte te bekomen. Bovendien resulteert een verhoogd voedselaanbod in het begin van de kweekperiode niet in een directe groei van de individuele larven. Dit is hoogstwaarschijnlijk een direct gevolg van de geringe filtreercapaciteit van de jonge larven. Het is pas na het verschijnen van de thoracopoden (dag 4) dat meer voedsel kan opgenomen worden en dat het aanbod van hogere voedselhoeveelheden resulteert in een bijkomende groei (lijnen met negatieve hellingen). Maximale biomassa toename werd bekomen in water met een lage turbiditeit, maar dit resulteerde ook in verlaagde overlevingscijfers (Fig. 3.5.). Daarenboven werden voor lage larvale densiteiten (2000 dieren per liter) en voedselconcentraties van meer dan 140 g/m³ ook aanzienlijke mortaliteiten genoteerd.

De groei van de pekelkreeftjes was lineair en werd bij alle mogelijke combinaties van zowel voedsel- als larvale densiteit aangetoond aan de hand van lineaire vergelijkingen (tabel 3.3.). Bovendien vertoonden alle dieren uniforme afmetingen (standaard afwijkingen kleiner dan 15%) onafhankelijk van de kweekdensiteit waarbij ze gekweekt werden.

De overleving was afhankelijk van de initiële stockeringsdensiteit (Fig. 3.5.). Bij een lage larvale densiteit, werd de overleving negatief beïnvloed door een toegenomen voedselconcentratie en resulteerde zelfs in overvoeding. Bij larvale concentraties van 5000 dieren per liter en bij verhoogde voedselconcentraties werden lagere overlevingscijfers

bekomen voor dag 4 en hogere overlevingscijfers na dag 4. Artemia gekweekt bij zeer hoge densiteiten kende een aanzienlijk verhoogde mortaliteit boven de 140 g/m³.

3.2.4. Maximalisatie van de biomassaproduktie

Het effect van de voedselconcentratie en de startdensiteit werd onderzocht op juvenielen met een lengte van 5 mm. De hoogste biomassaopbrengst werd bekomen bij; 140 g rijstekaf/m³ in het kweekstelsel met een lage larvale densiteit, terwijl bij een concentratie van 180 g/m³ de beste resultaten bekomen werden bij densiteiten van 5000 en 8000 dieren per liter (Tabel 3.4.).

Dit optimaal voedselregime werd aangehouden in de volgende proeven waarbij het tijdstip voor maximale oogst werd onderzocht. Hiervoor werden culturen die op een zelfde ogenblik werden opgestart (zelfde larvale densiteit) afgeogst op verschillende dagen en onderzocht op hun biomassaproduktie. Figuur 3.6. geeft de gemiddelde lengte van de individuele dieren en de bekomen opbrengst voor achtereenvolgende afoogstingstijdstippen. De beste tijd voor het afoogsten werd bepaald als zijnde het tijdstip waarop de laatste extra voedseltoediening gecompenseerd werd door een extra output in biomassa. Dit is wanneer een evenwijdige aan de voedselconsumptiekromme (gearceerde lijn in Fig. 3.6b) precies raakt aan de kromme die de biomassaproduktie voorstelt.

Iedere kromme bekomen bij verschillende larvale densiteiten kent een gebied waarbij maximale opbrengst mogelijk is (Dag 9, 10 en 12 voor densiteiten van 2000, 5000 en 8000 dieren per liter)(Fig. 3.6b). Bij het gebruik van een korte kweekperiode (minder dan 1 week) kunnen enkel hoge opbrengsten bekomen worden bij een lage initiële densiteit aan Artemia. Bij een kweekperiode waarbij de dieren afgeogst worden op een leeftijd van 7 a 10 dagen is de opbrengst maximaal wanneer gestart wordt met een densiteit van 5000 larven. Bij initiële densiteiten van 8000 larven is de produktiviteit het hoogst na 10 dagen. De hogere absolute produktiviteit bij een hoge larvendensiteit moet echter ook vertaald worden naar een economisch optimum. In deze context kunnen de prijs van het cystenmateriaal en de duur van de kweek van primordiaal belang zijn. Wanneer deze twee parameters geëlimineerd worden door de opbrengst uit te drukken per eenheid van inbreng blijkt dat het systeem waarbij lage densiteiten gebruikt worden economisch het interessantst zijn (Tabel 3.5.).

3.2.5. Besluit

Het is duidelijk dat het gebruik van dit semi-doorvloeijsysteem voor de intensieve kweek van Artemia dienst kan doen als een alternatief voor de reeds bestaande veel duurere systemen waar de investeringskosten veel hoger liggen (Bossuyt & Sorgeloos, 1980; Brisset et al., 1982; Lavens et al., 1985). Dit kweekstelsel heeft als voornaamste troeven, zijn uitzonderlijke betrouwbaarheid en de mogelijkheid tot de produktie van Artemia op maat.

3.3. Evaluatie van Palm Oil Mill Effluent (POME) als potentiële voedselbron voor de intensieve kweek van Artemia

3.3.1. Doelstelling

POME ("Palm Oil Mill Effluent") is het plantaardig afval dat vrijkomt bij het winnen van palmolie. In Maleisië, bijvoorbeeld, wordt jaarlijks 4 miljoen ton liquide POME geproduceerd. Deze enorme hoeveelheid afval vormt een ernstige bron van pollutie en de

lozing is thans onderworpen aan strenge normen.

In dit onderzoeksonderdeel wordt POME uitgetest als een potentieel voer voor het pekelkreeftje Artemia. Als obligaat filtervoeder kan het pekelkreeftje worden ingezet om het afvalwater te zuiveren. Het afvalproduct zou aldus worden omgezet in een interessante, verhandelbare eiwitbron.

3.3.2. Experimenteel werk

3.3.2.1. Kweektesten met onbehandelde POME

POME is een suspensie van vnl. intacte mesocarpcellen uit de vruchten van de oliepalm. De cellulaire fraktie bezinkt vlug en in het supernatans resteren kleine, zwevende partikels (20 μm), waarschijnlijk afkomstig uit beschadigde cellen. Deze acellulaire fraktie bevat weinig cellulose. Het gehalte aan opgeloste stoffen (40g/l) is 50% van het totale droge stof gehalte.

In een eerste serie testen werd aangetoond dat POME niet toxisch is en nutritionele waarde heeft voor het pekelkreeftje. Uit microscopische observaties kon worden afgeleid dat de POME-cellen worden opgenomen maar onverteerd met de faeces worden uitgescheiden. Hieruit blijkt dat de voedingswaarde van POME vooral bepaald wordt door de acellulaire fraktie. Dit werd bevestigd door een kweektest waarin cellulaire en acellulaire POME werden vergeleken (zie tabel 3.6).

3.3.2.2. Kweektesten met behandelde POME

Om Artemia in te schakelen in de biologische zuivering van POME moet de fraktie met nutritionele waarde, namelijk de acellulaire fraktie, worden vergroot. Om de niet-cellulaire fraktie van de POME te verhogen werd getracht de mesocarpcellen mechanisch te verbrijzelen. In dit verband werd ook fermentatie van POME-cellen onderzocht. Hierop volgden kweekproeven in 400 ml proefbuizen en in 300 liter kweektanks.

POME cellen kunnen mechanisch zowel door droge als natte micronisatie snel en in grote kwantiteiten worden gedisperseerd.

Droge micronisatie werd uitgetest met gedroogde decantor-cake in een Septu Ultrafine micronisator (type V5-S). De disruptie-snelheid was 20 kg/uur voor een gemiddelde partikelgrootte van 50 μm . Natte micronisatie was succesvol met een industriële parelmolen (Susmeyer HML S). In dit proces diende decantor-cake te worden aangelengd met leidingwater (50/50). De cellen werden maximaal verbrijzeld bij een disruptiesnelheid van 3 kg suspensie per minuut.

Fermentatieproeven werden uitgevoerd op kleine schaal in 500 ml volumes. Uit de inleidende proeven bleek dat anaerobe in vgl. tot aerobe fermentatie sneller tot desintegratie van POME cellen leidt. Anaerobe fermentatie nam gem. 10 dagen in beslag t.o.v. 20 dagen of meer voor aerobe fermentatie.

Droog gemicroniseerde POME leidde algemeen tot slechte kweek-resultaten door een te snelle bezinking van het produkt, zodat het niet mogelijk was om voldoende hoeveelheden voedsel toe te dienen. Dit verklaart de totale mortaliteit in 400 ml kultuurtesten en het uitblijven van groei in de 300 l test. Supplementatie met YM20 en verlagen van de startdensiteit konden hierin geen echte verbetering brengen (Tabel 3.6.).

Natte gemicroniseerde POME (NMP) kan in tegenstelling tot DMP gemakkelijk in suspensie worden gehouden. Desalniettemin was de groei zeer traag zowel in 400 ml als in 300 liter kultuurtesten (resp. 1.7 mm en 1.2 mm). Supplementatie met rijstekaf gaf slechts een geringe verbetering.

De resultaten met gefermenteerde POME (FP) waren bevredigend in de 400 ml kultuurtesten. Wegens gebrek aan voldoende produkt was er maar 1 kultuurtest in 300 liter mogelijk, die negatief uitviel (overleving 11%). De resultaten in puntbuis wettigen echter de hoop dat door fermentatie de cellulaire fraktie nutritionele waarde verkrijgt.

3.3.2.3. Kweektesten met niet-cellulaire POME

Tijdens het proces van palmolie-winning wordt een deel van het POME-afval verwijderd onder de vorm van 'decantor cake' d.i. als het min of meer vast bezinksel dat door decantatie van de palmolie-emulsie kan worden gescheiden. Het overige POME wordt door centrifugatie verwijderd als een waterig ruw effluent.

Uit de samenstelling van beide types POME blijkt dat het ruwe effluent een betere grondstof is voor het bekomen van niet-cellulaire POME, aangezien het minder opgeloste stoffen bevat en de celfraktie beduidend kleiner is. Niet-cellulaire POME kan worden bekomen door een POME suspensie uit te wringen in een 20 μ m zeefzak of door decantatie.

De eerste methode levert een meer geconcentreerd produkt op (40 g/l tegenover 24 g/l) en de cellen zijn volledig verwijderd. Decantatie is echter minder arbeidsintensief.

Kweektesten in 300l tanks tonen een goede groei en overleving bij verschillende densiteiten (tabel 3.7). In vergelijking tot YM20 worden minder goede resultaten geboekt. Het is mogelijk dat relatief meer POME als voedsel moet worden toegediend t.g.v. het hoog gehalte aan opgeloste stof.

Toevoegen van een supplement YM20 aan de niet-cellulaire POME (sNCP) resulteert in een opmerkelijk beter resultaat. Verdere kultuurtesten zijn nodig om een optimaal dieet op basis van gesupplementeerde POME te ontwikkelen. Gezien de grote hoeveelheden POME hiervoor nodig moeten verdere 300l kultuurtesten in Maleisië zelf worden uitgevoerd.

3.3.2.4. Gebruik van Artemia gekweekt op POME

Een bio-assay test met Macrobrachium rosenbergii larven als testorganismen toonde een goede overleving op een dieet van met POME gevoederde Artemia (Tabel 8). In vergelijking tot de controle (Artemia-biomassa gekweekt op rijstekaf) was de gemiddelde lengte van de proefdieren kleiner (geringere groei-toename) doch dit was waarschijnlijk te wijten aan het grootteverschil tussen de Artemia gekweekt op POME en de controle.

Uit vetzuuranalyse blijkt een hoger lipidegehalte voor Artemia gevoederd met POME. Het vetzuur-patroon vertoont een treffende overeenkomst met deze van palmolie (hoge gehalten aan palmvetzuur, oleïnezuur en linoleenzuur). HUFA-niveau is laag en vergelijkbaar met de controle.

3.3.2.5. Kweektesten met Streptocephalus

Uit vakliteratuur en persoonlijke mededelingen van aanverwante onderzoekers blijken er interessante perspectieven te bestaan voor de kweek van het kieuwpootkreeftje

Streptocephalus proboscideus, een zoetwaterkreeftje morfologisch vergelijkbaar met Artemia, dat o.m. in Zuid-Afrika op experimentele schaal wordt gekweekt in het effluent van waterzuiveringsstations.

Onderzoek op de biomassa-productie is slechts verdedigbaar wanneer er voldoende aanwijzingen zijn dat Streptocephalus proboscideus a. kan gekweekt worden bij voldoende hoge densiteiten d.i. minimum 200 volgroeide dieren/l; b. kan gevoerd worden met landbouwafvalprodukten; en c. dat een continue biomassaproductie van Streptocephalus proboscideus kan verzekerd worden, aangezien slechts minieme hoeveelheden cysten in de natuur beschikbaar zijn.

Experimenten werden uitgevoerd in het Artemia cysten-productiesysteem (Beschrijving cfr. doctoraatsverhandeling P. Lavens, 1989). De dieren werden gehouden in 10-l aquaria met continue waterverversing. In tegenstelling tot Artemia werd een zachte beluchting aangehouden d.m.v. beluchtungsstenen.

In een eerste reeks experimenten werden de dieren gekweekt bij verschillende densiteiten op een dieet van YM-20 (gemiconiseerde landbouwafval) gesupplementeerd met wieren (Selenastrum capricornutum).

Aan de hand van wekelijkse bepalingen konden we vaststellen dat de waterkwaliteit in de kweekrecipiënten niet optimaal was spijs het dagelijks afsiphoneren van de bodem, een continue doorvloeï en een goedfunctionerende biofilter. Verschillende keren werden hoge nitriet-waarden genoteerd.

De groeisnelheid van de dieren was meer uitgesproken bij de lagere densiteiten (tot 150/l). Bij de hogere densiteiten werd een tragere groeisnelheid vastgesteld gedurende de gehele testperiode (38 dagen).

Uit de waarnemingen kan niet besloten worden dat het voorkomen van 'black disease' en de mortaliteit van de test-organismen gevolg zijn van densiteitsstress. Integendeel, onder de gegeven kweek-omstandigheden werden, in termen van overleving en conditie, betere resultaten geboekt met de hogere densiteiten.

In een tweede reeks experimenten werd het gebruik van rijstekaf en POME als monodiet uitgetest. Inleidende testen hadden aangetoond dat YM-20 en POME nutritionele waarde hebben voor Streptocephalus en micro-algen kunnen vervangen in het dieet.

In dit experiment werden de dieren direct na ontluiking in de aquaria gebracht bij een densiteit van 50/l. Vanaf de derde dag werd het doorvloeï-systeem aangeschakeld. De dieren werden gevoerd met gedecanteerde rijstekaf of niet-cellulaire POME.

Met POME als voeder werd meer dan 60% overleving bekomen in 4 van de 7 aquaria, maar de gemiddelde lengte bleef beneden 1 cm. Cystproductie werd slechts bij enkele wijfjes waargenomen; de produktie van oöcyten was echter algemeen. In alle aquaria vertoonden bijna alle dieren symptomen van 'black disease'. Uit deze resultaten blijkt dat POME waarschijnlijk een compleet voedsel is voor Streptocephalus (recente resultaten in het cystproductiesysteem bevestigen dit, dixit L. Brendonck). Het hoge gehalte aan opgeloste stof in de POME resulteerde waarschijnlijk in de algemene ondervoeding (black disease).

3.3.3. Conclusies

* POME, in het bijzonder de acellulaire fraktie, kan gebruikt worden als een mono-diet voor de intensieve kultuur van Artemia-biomassa. Echter, om Artemia in te schakelen in

de biologische zuivering van POME moet deze fraktie met nutritionele waarde worden vergroot;

- * uit de kweekresultaten blijkt dat beide types gemicroniseerde POME ongeschikt zijn in een dieet voor Artemia-kweek, hetzij omwille van slechte fysische eigenschappen (DMP) of onvoldoende nutritionele kwaliteit (NMP). Voorlopig kan alleen niet-cellulaire POME gebruikt worden in een dieet;
- * supplementatie met rijstekaf of YM-20 geeft een wezenlijke verbetering van de kweekresultaten;
- * er zijn aanwijzingen dat de cellulaire fraktie van de POME door anaerobe fermentatie omgezet wordt in een produkt met betere voedingswaarde;
- * de kweek van Streptocephalus proboscideus met POME lijkt mogelijk mits een goede waterkwaliteit kan gegarandeerd worden. Aan twee van de drie voorwaarden voor verder onderzoek van de biomassa-productie van is voldaan:
 - a. We hebben aanwijzingen dat biomassakweek mogelijk is bij densiteiten hoger dan 200/l.
 - b. We konden aantonen dat rijstekaf en ook POME potentiële voeders zijn voor de biomassakweek.

Referentielijst

Bossuyt, E. and P. Sorgeloos. 1980.

Technological aspects of the batch culturing of Artemia in high densities. In : Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds). The brine shrimp Artemia. Vol.3. Universa Press. Wetteren, Belgium. p.133-152.

Bossuyt, E. and P. Sorgeloos. 1981;

Batch production of adult Artemia in 2 m³ and 5 m³ air-water-lift operated raceways. In : Book of Abstracts. World Conference on Aquaculture. September 21-25, 1981. Venice, Italy.

Brisset, P.J.; Versichele, D.; Bossuyt, E.; De Ruyck, L. and P. Sorgeloos. 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.

Dobbeleir, J.; Adam, N.; Bossuyt, E.; Bruggeman, E. and P. Sorgeloos. 1980.

New aspects of the use of inert diets for high density culturing of brine shrimp. In : Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds). The brine shrimp Artemia. Vol.3. Universa Press. Wetteren, Belgium. p.165-174.

Grymonpre, D.; 1982

Evaluatie van de nutritionele waarde van verschillende landbouwprodukten als voedsel voor het pekelkreeftje Artemia.

Thesis. Rijksuniversiteit van Gent. Ghent, Belgium. 158 pp.

Lavens, P.; 1989

Intensieve produktie en kwaliteitsonderzoek van Artemia adulten en hun nakomelingen.
Doktoraatsthesis. Rijksuniversiteit Gent. Gent België. 435 pp.

Lavens, P.; Baert, P.; De Meulemeester, A.; Van Ballaer, E. and P. Sorgeloos. 1985.
New developments in the high density flow-through culturing of brine shrimp Artemia.
Journal of World Mariculture Society 16:498508.

Léger, P.; 1989.

De nutritionele waarde van Artemia in de aquacultuur.
Doctoraatsthesis, Rijksuniversiteit Gent, Belgium.

Leger, P.; Bengtson, D.A.; Simpson, K.L. & Sorgeloos, P.; 1986

The use and nutritional value of Artemia as a food source.
Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.. 24:521-623.

Lepage, G. & Roy, C.C.; 1984

Improved recovery of fatty acids through direct trans-sterification without prior extraction
or purification.

J. Lipid Res.. 20. 1391-1396.

Tobias, W.J.; Sorgeloos, P.; Bossuyt, E. and O.A. Roels. 1979.

The technical feasibility of mass-culturing Artemia salina in the St. Croix "artificial
upwelling" mariculture system. Proc. World Maricult. Soc. 10:203-214.

Tobias, W.J.; Sorgeloos, P.; Roels, O.A. and B.A. Sharfstein. 1980. International study on
Artemia. XIII. A comparison of production data of 17 geographical strains of Artemia in the
St. Croix artificial upwelling- mariculture system. In : Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels,
O., Jaspers, E. (Eds). The brine shrimp Artemia. Vol.3. Universa Press. Wetteren, Belgium.
p.383-392.

Tabel 3.1. Vetzuurpatronen van aanrijkingsexperimenten

Methode	DRY SELCO				SUPER SELCO				Blanko	
	DCD		DTD		DCD		DTC			
	mg/g	st.afw.	mg/g	st.afw.	mg/g	st.afw.	mg/g	st.afw.		
dag 5										
20:5n3	40.4	5.1	46.8	2.4	15.0	4.2	13.2	0.4	3.7	
22:6n3	18.3	3.0	20.6	0.9	4.5	2.3	2.7	1.4	0.7	
$\Sigma n \geq 3$	62.5	9.0	71.5	3.4	20.3	6.9	16.6	2.0	4.5	
dag 7										
20:5n3	42.4	16.9	50.3	12.7	9.6	1.4	12.0	1.2	6.9	
22:6n3	14.1	8.5	18.9	7.9	1.1	0.3	2.0	0.7	3.1	
$\Sigma n \geq 3$	59.6	26.9	73.4	21.3	10.9	1.7	14.6	2.0	10.4	

Tabel 3.2. Voederschema en groei van pekelkreeften gedurende kweek in semi-doorvloeisysteem (startdensiteit: 2000 *Artemia*/l).

Day of culture	Culture medium transparency (in cm)	Number of refillings of the 300 l food reservoir	Daily food supply (in g)	Average food concentration per filling (in g/l)	Animal length (in mm)
0	15	0	14		0.57 ± 0.09
1	15-20	1	35	0.12	1.02 ± 0.09
2	15-20	2	87	0.15	1.54 ± 0.12
3	15-20	2	89	0.15	1.88 ± 0.10
4	20-25	4	182	0.15	2.73 ± 0.27
5	20-25	4	140	0.12	3.96 ± 0.60
6	20-25	4	140	0.12	4.35 ± 0.43
7	> 30	4	177	0.15	5.39 ± 0.25
8	> 30	4	140	0.12	5.80 ± 0.46

Tabel 3.3. Vergelijkingen en correlatiecoëfficiënten (r) verkregen door lineaire regressie van lengte (y) t.o.v. leeftijd (x) van Artemia gevoederd met verschillende rijstekaf concentraties and gekweekt aan 3 verschillende densiteiten.

Rice bran conc. (g/m ³)	<u>Artemia</u> stocking density (n/l)		
	2000	5000	8000
60	y = 0.382 x + 0.51 r = 0.99		
100	y = 0.518 x + 0.209 r = 0.99		
110	y = 0.578 x + 0.19 r = 0.99		
120	y = 0.587 x - 0.081 r = 0.98		y = 0.266 x + 0.617 r = 0.98
130	y = 0.604 x + 0.058 r = 0.98		y = 0.314 x + 0.553 r = 0.98
140	y = 0.702 x - 0.201 r = 0.97	y = 0.352 x + 0.779 r = 0.98	y = 0.291 x + 0.528 r = 0.97
150	y = 0.707 x - 0.177 r = 0.95	y = 0.370 x + 0.819 r = 0.98	y = 0.322 x + 0.547 r = 0.97
160		y = 0.338 x + 0.831 r = 0.98	y = 0.332 x + 0.451 r = 0.99
170		y = 0.376 x + 0.791 r = 0.98	y = 0.323 x + 0.513 r = 1.00
180		y = 0.388 x + 0.786 r = 0.97	y = 0.321 x + 0.549 r = 0.99
190		y = 0.409 x + 0.749 r = 0.95	y = 0.345 x + 0.534 r = 0.99
200		y = 0.426 x + 0.669 r = 0.95	y = 0.326 x + 0.635 r = 0.99
210		y = 0.432 x + 0.658 r = 0.98	y = 0.399 x + 0.541 r = 0.99

Tabel 3.4. Biomassa produktie (kg WW) i.f.v. voedselconcentratie en Artemia densiteit.

Rice bran concentration (g/m ³)	<u>Artemia</u> density (animals/l)		
	2000	5000	8000
100	2.3	n.m.	n.m.
120	2.4	3.7	4.9
140	3.5	4.3	5.8
160	+	4.1	7.0
180	+	5.2	7.7
200	+	5.1	7.3
220	+	+	+

n.m. : not measured

+ : collapse of the culture

Tabel 3.5. Rentabiliteit van een semi-doorvloei kweekstelsel bij drie verschillende Artemia densiteiten.

Stocking density (animals/l)	2000	5000	8000
Yield (kg)	3.3	5.4	6.2
Duration of production cycle (days)	9	10	12
Cyst consumption (g)	10	25	40
Rentability (biomass prod. d ⁻¹ . g ⁻¹)	37	20	12

Tabel 3.6a. Samenvatting van cultuurtesten met gedisperseerde POME in 400 ml puntbuizen. Begindensiteit 200 dieren per buis. Parameters genoteerd op dag 7. (NMP= natte gemicroniseerde POME; FP= gefermenteerde POME; n= aantal cultuurtesten uitgevoerd; VCE = Voedsel conversie efficiëntie)

POME-type	n	lengte (mm)	overleving (%)	biomassa (mg WW)	voedsel (mg DW)	VCE
NMP	5	1.7	70.0	11.0	142	13.1
FP	20	2.6	36.5	15.5	173	11.6

Tabel 3.6b. Samenvatting van cultuurtesten met gedisperseerde POME in 300 liter tanks. Parameters genoteerd op dag 5. (DMP= droog gemicroniseerde POME ; sDMP= DMP met supplement YM20 ; NMP= natte gemicroniseerde POME ; sNMP= NMP met supplement rijstekaf ; FP= gefermenteerde POME)

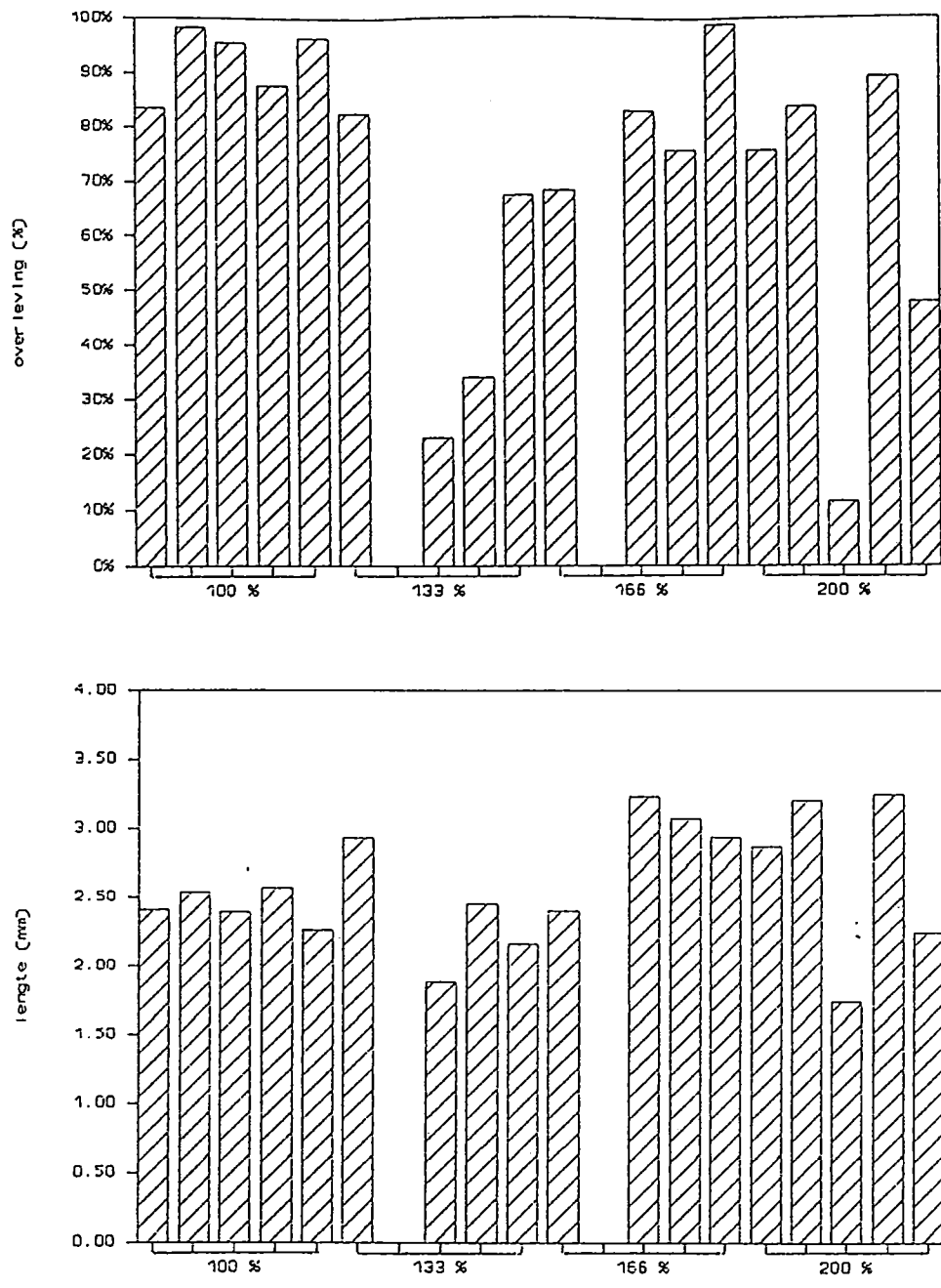
POME type	n	lengte (mm)	overl. (%)	Stard. (per l)	Biom. (gWW/l)	voedsel (gDW/l)	VCE
DMP	1	1.17	58	7400	0.17	1.27	7.70
sDMP	1	1.56	69	4600	0.21	1.39	6.71
NMP	5	1.20	69	4000	0.12	0.51	5.49
sNMP	3	1.39	51	4800	0.13	0.50	3.89
FP	1	1.55	11	4000	0.03	0.85	15.7

Tabel 3.7. Samenvatting van kultuurtesten met niet-cellulaire POME en YM-20 in 300 liter tanks. Parameters genoteerd op dag 7. (NCP= niet-cellulaire POME ; YM20= standaardvoedsel ; sNCP= NCP met supplement YM20)

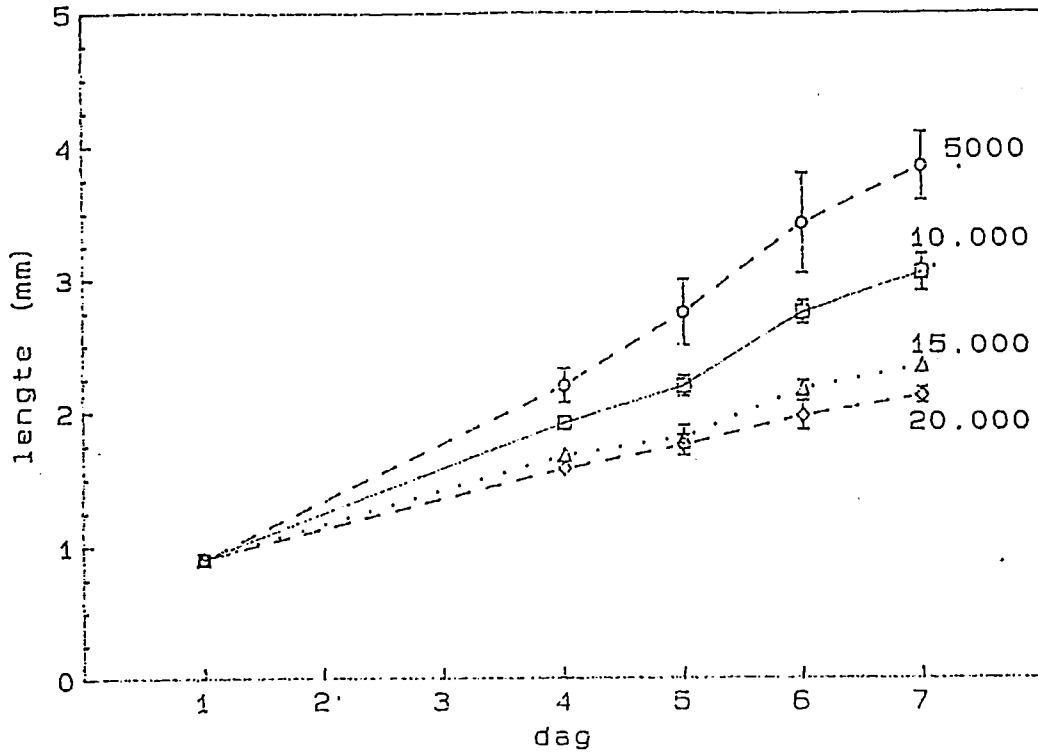
voedsel type	Lengte (mm)	Overl. (%)	Startd. (per l)	Biom. (gNW/l)	Voedsel (gDW/l)	VCE
NCP	2.2	60	500	0.04	0.9	22.8
NCP	2.7	53	2000	0.25	1.2	9.1
NCP	2.2	56	4000	0.29	0.8	2.8
sNCP	3.4	83	2000	0.63	2.1	3.3
YM20	3.5	99	4700	1.81	3.0	1.7

Tabel 3.8. Resultaten bio-assay met Macrobrachium rosenbergii larven als testorganisme.

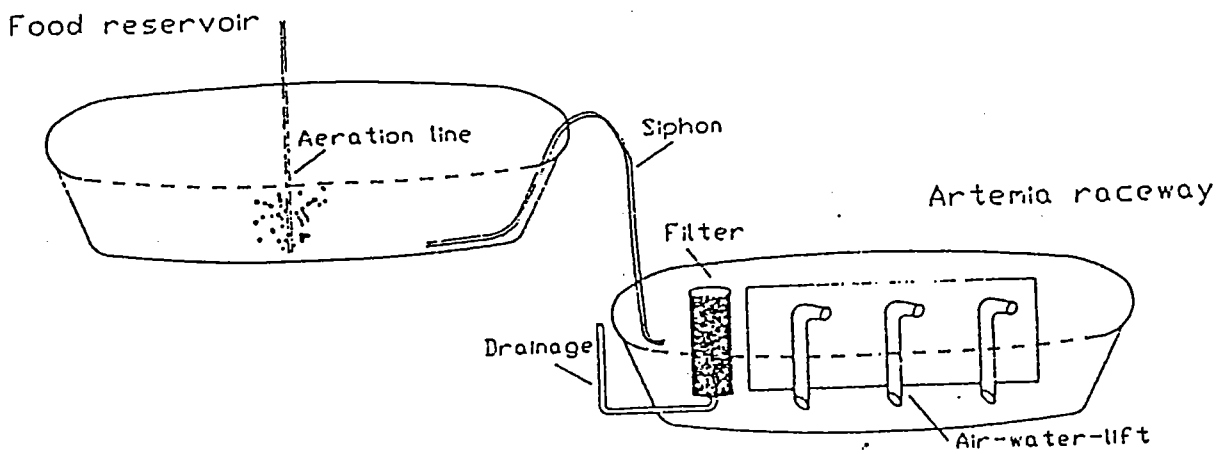
typering	lengte Artemia	% groei Macrobrachium	% overleving
POME	2.2 mm	+ 34 %	86.7 %
Rijstekaf	3.0 mm	+ 47 %	85.3 %



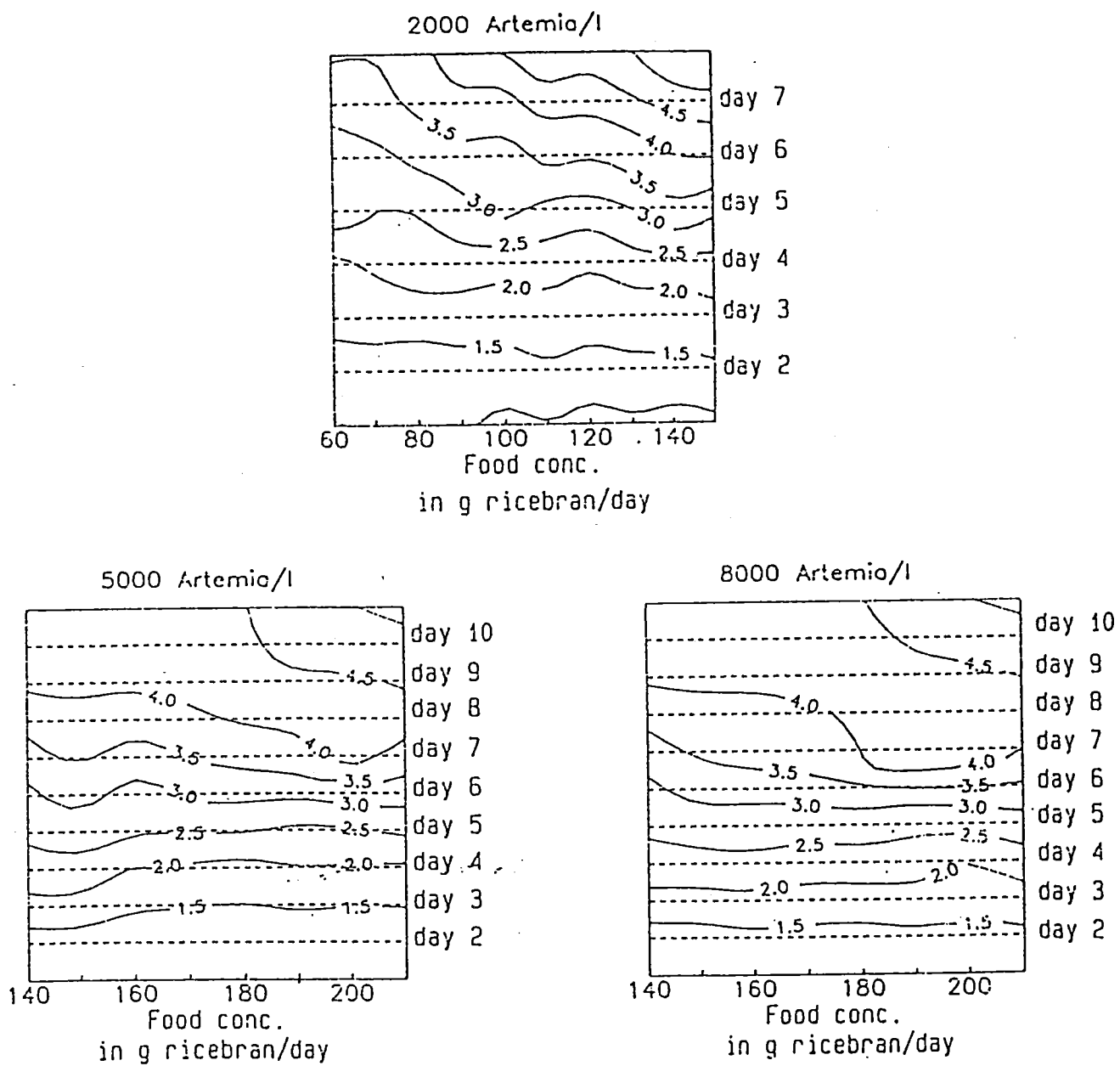
Figuur 3.1. Groei en overleving van individuele tanks bij verschillende voederregimes (100 tot 200% van het standaard voederregime).



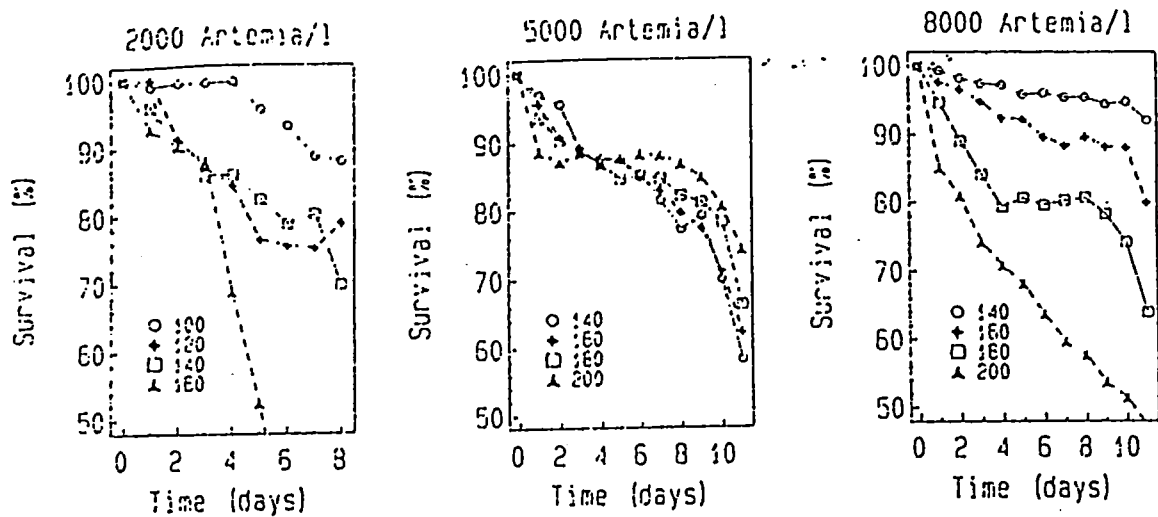
Figuur 3.2. Groeikurven bij verschillende densiteiten en identieke voederregimes.



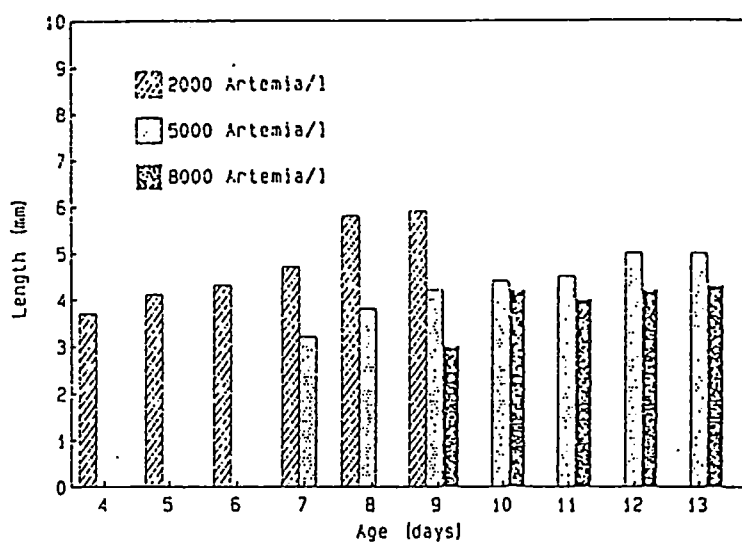
Figuur 3.3. Semi-doorvloei kweekstelsel voor Artemia



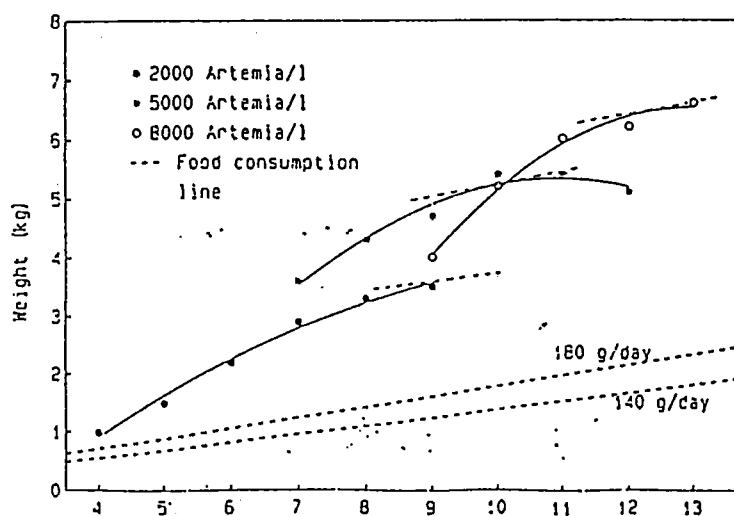
Figuur 3.4. Groei van *Artemia* gekweekt aan verschillende startdensiteiten en verschillende voederregimes (kurven verbinden punten met gelijke groei).



Figuur 3.5. Overleving van pekelkreeften gekweekt aan verschillende voederdensiteiten (g rijstefak/dag) and verschillende startdensiteiten (2,5 en 8/ml).



Figuur 3.6a. Gemiddelde lengte van pekelkreeften i.f.v. leeftijd en densiteit.



Figuur 3.6b. Biomassa productie i.f.v. leeftijd en densiteit

4. Het gebruik van Artemia biomassa in de aquacultuur

4.1. Inleiding

In tegenstelling tot Artemia nauplii die in praktisch alle broedhuizen als levend voeder gebruikt worden, is de toepassing van opgegroeide pekelkreeftjes als voeder erg beperkt, en in de meeste gevallen zelfs gerespecteerd tot deze productiecentra die gelocaliseerd zijn dichtbij een (natuurlijk) Artemia productiegebied. Dit komt vooral omdat de technieken die aangewend worden om Artemia biomassa te conserveren (en toepassingen op andere plaatsen mogelijk moet maken) voorlopig te duur zijn of zelfs niet toepasbaar zijn op de afgelegen plaatsen waar zich de pekelkreeftbiotopen bevinden (bvb. schilferdrogen of 'blast'-vriezen). Niettemin biedt die biomassa een aantal interessante mogelijkheden, zoals zijn uitstekende algemeen nutritionele waarde (o.a. 60% proteïnen) of het bevatten van interessante micronutriënten voor specifieke toepassingen (bvb. maturatie-hormonen).

Als doel stelden we dan ook om in eerste instantie een goedkope techniek te ontwikkelen voor de bewaring van biomassa onder omgevingstemperaturen en die toepasbaar is onder veldomstandigheden. Daarnaast werden een aantal kweekproeven opgezet met aquacultuursoorten waarbij de Artemia biomassa, behandeld volgens het ontwikkelde techniek, zowel als rechtstreekse voedselbron diende of geïncorporeerd werd als ingrediënt in artificiële diëten.

4.2. Ontwikkeling van een representatieve bewaringstechniek

Als eenvoudige en veld-toepasbare techniek werd ensilering vooropgesteld, een gekende techniek in de visserij. Nochtans is de toepassing niet dezelfde: visensilering heeft tot doel een enzymatische hydrolyse van de proteïnen te bewerkstelligen, terwijl onze toepassing juist de oplosbaarheid van het eindprodukt wil vermijden daar dit nefaste gevolgen heeft voor de waterkwaliteit van de broedhuizen bij vervoeding én een daling van de nutritionele waarde van het dieet veroorzaakt. Bijgevolg is er vooral aandacht besteed aan de ontwikkeling van een zuurbehandeling die de proteolytische activiteit en autolysis bij Artemia stillegt en de fysische integriteit behoudt, terwijl de microbiële activiteit geremd wordt. Verschillende zuurbehandelingen (mengsels van propionzuur en zoutzuur) in combinatie met diverse pH omstandigheden (van pH 1 tot 5) door toevoeging van NaOH werden hierbij bestudeerd. Evaluatiecriteria waren visuele en organoleptische controle van de microbiële contaminatie, het uitlekkingspercentage na suspensie in water, en de graad van solubilisatie van proteïnestikstof ten gevolge van endogene enzymatische hydrolyse van eiwitten (= DoL).

De resultaten kunnen als volgt worden samengevat :

Bewaring

- 3% HCl aangezuurde Artemia (pH \leq 1) kan voor minstens 10 maanden bewaard worden bij omgevingstemperatuur zonder dat er enige visuele contaminatie optreedt
- De producten aangezuurd tot pH 3, 4 en 5 kunnen ook tenminste 4 weken bewaard worden door toevoegen van respectievelijk 0,2, 0,5 en 1,0 % PA en HCl (Tabel 4.1). Voor langdurige bewaring (minstens 10 maanden) van biomassa aangezuurd tot pH 3,0 moet 1,0 % (v/w) PA toegevoegd worden.

Waterstabiliteit en DoL (Tabel 4.2.)

- Na 40 weken stockering vertonen zowel HCl 2 % + PA 1 % als HCl 3 % aangezuurde Artemia een betere waterstabiliteit dan diepgevroren produkt.
- Aangezuurde biomassa vertoont echter een hogere DoL dan diepgevroren product in het geval van langdurige stockering.
- Het gebruik van antioxydantia heeft geen duidelijk effect op de waterstabiliteit en DoL van de produkten.

Samenstelling

- Na 10 maanden stockering bij omgevingstemperatuur blijft het eiwitgehalte in HCl (3 %) en HCl (2 %) + PA (1%) geënsileerde biomassa vergelijkbaar met dit van ingevroren produkt.
- Een gelijkaardig fenomeen wordt geobserveerd in de behandelingen aangezuurd met PA en bewaard bij verschillende pH voor een periode van 4 weken, met uitzondering van de behandeling 0,2 % PA, pH 3.
- Het gebruik van antioxydantia lijkt een positief effect te hebben op het proteïnegehalte van 3 weken HCl (3%) aangezuurde biomassa.

4.3. Gebruik van geënsileerde biomassa als rechtstreekse voedselbron of diëtingrediënt

4.3.1. Penaeïde garnalen

De voedingswaarde van geënsileerde Artemia werd geëvalueerd in 2 weken durende kweektesten met postlarvale penaeïde garnalen (gestockeerd aan 10 ind./l) in een kweekstelsel bestaande uit twintig 20 l aquaria (3 herhalingen per behandeling), elk voorzien van een afzonderlijke recirculatie van zeewater (saliniteit 30 ppt; temperatuur $28 \pm 1^\circ\text{C}$) over een zandfilter.

In een eerste voedertest werd 3 weken HCl (3%)-geënsileerde biomassa vergeleken met ingevroren Artemia in een 15 dagen durende kweektest met 15 dagen oude postlarven (PL 15) van P. monodon. Beide voeders werden bovendien uitgetest in 3 verschillende voederfrequenties.

In een tweede test, uitgevoerd met P. vannamei (PL 30) werd een dieet bestaande uit HCl (3%)-geënsileerde Artemia nauplii vergeleken met levende en ingevroren nauplii en werd het effect van de duur van zuurconditionering en neutralisatie met CaO op de nutritionele kwaliteit van de nauplii geëvalueerd.

In een derde kweektest werd opnieuw geënsileerde biomassa vergeleken met diepgevroren biomassa zowel als totaalvoedsel als een 50% substitutie van het standaardvoedsel voor een derde garnaalsoort: P. merguensis. Postlarven werden getest gedurende de stadia PL 20 tot PL 43. In een vierde kweektest werden 4 weken HCl (3%)-aangezuurde biomassa, 4 weken PA (1%) + HCl tot pH 3 aangezuurde biomassa, en ingevroren biomassa gebruikt als diëtingrediënt (à ratio van 10 % droge stof) in een kappa-carrageenan microgebonden dieet (MBD) met een identieke samenstelling als het commercieel ZM-dieet (Artemia Systems NV, België), en dit voor P. vannamei. Een vergelijkbare test werd tevens uitgevoerd met P. japonicus.

De resultaten kunnen als volgt worden samengevat (voor tabellen: zie verslag 1992):

- 3 weken HCl (3%) geënsileerde biomassa produceert een betere groei (respectievelijk 1,6 mg DW, 14,5 mm versus 1,2 mg DW, 13,5 mm) en overleving (62% versus 40%) dan ingevroren biomassa in P. monodon postlarven.
- Bij het gebruik van Artemia nauplii voor P. vannamei, wordt een betere groei (46 mg DW versus 41 mg DW) en overleving (96% versus 80%) bekomen met een dieet van levende in plaats van geënsileerde nauplii. Geënsileerde HCl (3%) nauplii resulteren in een betere overleving dan ingevroren nauplii (74%). In vergelijking tot deze laatste wordt een betere groei bekomen in de behandeling bestaande uit nauplii welke aangezuurd zijn gedurende een korte periode (tot 3 dagen) (41 mg DW versus 33 mg DW). Neutralisatie van de geënsileerde nauplii met CaO lijkt een negatief effect te hebben op groei en overleving van de postlarven. De verminderde nutritionele waarde bij het gebruik van PA aangezuurde biomassa met pH 3 als dieet ingrediënt voor postlarvale garnalen heeft waarschijnlijk te maken met de enzymatische hydrolyse (tgv endogene proteolytische activiteit) van eiwitten in dergelijk produkt. De daaruit resulterende hogere gehalten aan vrije aminozuren worden waarschijnlijk minder efficiënt gebruikt dan eiwitgebonden aminozuren in de weefselsynthese van garnalen en lekken bovendien gemakkelijker uit het dieet in het kweekwater.
- Bij P. merguensis werden significante lagere overleving- en groeicijfers opgetekend voor het geënsileerde dieet. Gezien echter de kwaliteit van het geënsileerde produkt niet optimaal bleek te zijn (verhoogde graad van 'liquefaction', lagere waterstabiliteit,...), zijn de resultaten wellicht hieraan te wijten aan niet aan de species-specifieke nutritionele vereisten. Het duidt wel aan dat de bewaring van geënsileerde biomassa voor voeding beperkt is in de tijd.
- Bij het gebruik van geënsileerde biomassa als dieet ingrediënt worden de beste resultaten, vooral voor wat betreft groei, bekomen met HCl (3%) geënsileerd produkt. Bij P. japonicus blijkt opnieuw dat de groei sneller is tov. wanneer ingevroren ingrediënt gebruikt wordt. De overlevingsresultaten waren hier echter beduidend lager voor de geënsileerde ingrediënt.

4.3.2. Andere commerciële species

Preliminare testen werden verder uitgevoerd met de reuzezoetwatergarnaal Macrobrachium rosenbergii en met siervissen. De bekomen resultaten zijn echter te beperkt, ook vanwege een gebrekkige proefopstelling, en meerdere experimenten dienen gepland om de nutritionele waarde van dit type dieet te evalueren (zie verslag 1992).

TREATMENTS	pH value									
	days	1	3	5	7	8	10	12	14	28
0.0% PA + HCl										
pH 1		0.98	1.07	1.12	1.31	1.41	1.46	1.65	1.76	****
pH 2		2.02	<u>1.41</u>	1.74	1.88	2.15	****			
pH 3		3.00	<u>1.65</u>	2.64	3.20	3.18	****			
pH 4		4.10	<u>2.54</u>	3.69	3.93	4.58	****			
pH 5		5.00	3.05	****						
0.2% PA + HCl										
pH 1		0.98	1.35	1.31	1.51	1.66	1.63	1.57	1.60	1.42
pH 2		2.01	2.03	2.02	2.21	2.35	2.35	2.25	2.10	1.99
pH 3		3.00	2.98	2.71	2.92	3.04	3.08	2.96	3.02	2.73
pH 4		4.11	<u>3.20</u>	3.76	4.24	4.56	****			
pH 5		4.97	<u>3.95</u>	4.66	5.43	5.80	****			
0.5% PA + HCl										
pH 1		0.97	1.30	1.10	1.39	1.52	1.51	1.25	1.60	1.25
pH 2		1.97	<u>1.65</u>	1.93	1.97	2.23	1.99	2.10	2.30	1.90
pH 3		3.07	3.36	3.40	3.63	3.69	3.70	3.77	3.96	3.65
pH 4		4.10	<u>2.60</u>	3.71	3.96	4.07	4.09	4.13	4.14	4.15
pH 5		4.91	<u>3.58</u>	4.39	4.84	4.90	4.21	5.17	****	****
1.0% PA + HCl										
pH 1		1.01	1.14	1.11	1.39	1.24	1.63	1.62	1.79	1.27
pH 2		2.00	<u>1.67</u>	1.98	2.32	2.30	2.10	2.17	2.56	2.08
pH 3		3.06	<u>2.74</u>	3.07	3.49	3.45	3.11	3.30	3.47	3.19
pH 4		4.17	<u>2.60</u>	3.58	3.87	3.96	3.77	4.00	3.97	3.79
pH 5		5.10	<u>3.88</u>	4.42	4.71	4.79	4.57	4.80	4.74	4.56

The pH values underlined were adjusted with drops of NaOH 40%.

Values followed by **** were contaminated.

Biomass (GSL strain) is derived from raceway culture fed YM 20.

Tabel 4.1. Bewaringstest van diverse geënsileerde preparaten: controle van pH en microbiële contaminatie.

TREATMENTS	Storage (weeks)	% Protein (N x 6.25)		% Sol. N		Degree of ¹ Liquefaction	
		AVG	SD	INT ²	HOM ³	INT ²	HOM ³
(batch 1)							
HCl 2% + PA 1%	40	57.3	2.95	2.56	2.75	27.8	30.0
HCl 3%	40	57.0	0.07	3.24	3.26	35.6	35.8
FROZEN	40	59.9	0.15	1.54	2.18	16.0	22.8
(batch 2)							
HCl 3%	20	55.8	0.11	3.21	3.33	35.9	37.3
(batch 3)							
HCl 3%	3	47.8	3.13	1.31	-	17.2	-
HCl 3% + ET/BHT/BHA	3	53.7	2.63	1.41	1.72	16.4	20.0
HCl 3% + BHT/BHA	3	52.9	0.23	1.46	2.11	17.2	24.9
HCl 3% + ET	3	50.1	1.02	1.47	1.93	18.3	24.1

¹ Degree of liquefaction = percentage of soluble nitrogen / total nitrogen.

² INT = intact Artemia after 1 hour immersion in water.

³ HOM = homogenized Artemia after 1 hour immersion in water.

Tabel 4.2. Het effect van bewaringsvorm van Artemia biomassa op het proteïnegehalte en uitlekkingsgraad.

5. Bepaling van de vitamine C gehaltes in Artemia

5.1. Ascorbinezuur en ascorbinezuursulfaat tijdens de levenscyclus van Artemia

5.1.1. Situering

Gezien de hoge concentraties aan ascorbinezuursulfaat (AAS) die in de cysten van Artemia gedetecteerd worden, werd nagegaan of vrouwelijke adulten een reserve aan ascorbinezuur (AA) aanleggen, en op welk ogenblik precies het AAS gevormd wordt bij ovipare reproductie.

5.1.2. Materiaal en methoden

Adulte Artemia biomassa (Great Salt Lake cystenmateriaal) werd geproduceerd in een doorvloeijsysteem (Lavens *et al.*, 1985). De dieren werden in een eerste experiment gevoed met YM20 (dieet op basis van gemicroniseerde erwtenpeulen en maïsafval, INVE Aquaculture, Baasrode), aangerijkt met 10% Lansy PZ (gistpreparaten, INVE Aquaculture, Baasrode), een voedsel dat weinig tot geen vitamine C bevat.

In een volgende proef werd de Artemia biomassa gevoed met hetzelfde dieet maar gesupplementeerd met 1% en 5% ascorbyl palmitaat (AP, Roche, Basel, Zwitserland) als bron van vitamine C. De controlereeks bevatte geen vitamine C.

In een derde reeks werden de dieren met algen (Dunaliella tertiolecta) gekweekt.

Het gehalte aan AA en AAS in de adulten en de cysten werd bepaald d.m.v. HPLC (Nelis *et al.*, in prep., 1994, respectievelijk).

5.1.3. Resultaten en bespreking

Tijdens de eerste proef werd een gehalte aan AA van respectievelijk 126 en 122 $\mu\text{g/g}$ DW in vrouwelijke en mannelijke adulten gedetecteerd. In de cystendragende vrouwelijke pekelkreeften kon geen AAS worden gedetecteerd. Het lage gehalte aan vitamine C in het dieet kon waarschijnlijk niet instaan voor de opbouw van een reserve aan AA en de omzetting ervan tot AAS bij de cystenvorming, aangezien er geen AAS detecteerbaar was in de cysten geproduceerd door dergelijke vrouwelijke adulten.

De analyse van AA gedurende de AP-gesupplementeerde kweek toonde aan dat het AP geassimileerd werd en omgezet tot het vrij AA (Tabel 5.1.). In vrouwelijke adulten met cysten in de broedzak konden lage gehalten aan AAS worden gedetecteerd, 34 en 57 μg AAS/g DW respectievelijk voor de 1% en de 5% AP-reeks. In mannelijke dieren en in vrouwelijke zonder cysten werd geen AAS gevonden. Dit en het feit dat in cystendragende vrouwtjes minder AA werd bepaald dan bij ovovipare reproductie (1% AP-groep: 752 t.o.v. 904 μg AAS/g DW), wees in eerste instantie op een gedeeltelijke omzetting van het AA tot AAS in de ovaria bij ovipariteit. Bij verder verifiëren bleek de kleine piek, beschouwd als AAS bij ♀ adulten met cysten toch geen AAS te zijn: toevoeging van zuiver AAS aan het extract gaf een piek met een verschillende retentietijd. Bijkomende dissectie van adulte ♀ wees er bovendien op dat er geen ♀ met cysten in de 1% en 5% groep waren. De ♀ eerder beschouwd als cystendragend, vertoonden eieren met lichtbruine kleur die aanzien werden als cysten. Dat enkel ovovipare reproductie optrad, zou mogelijks op een toxisch effect van de hoge dosis AP op het reproductiemechanisme kunnen wijzen (geen cystenvorming mogelijk).

Ook in de dieren die met Dunaliella werden gevoed (wel cystenvorming), kon geen AAS worden gedetecteerd. Dat geen AAS kon worden aangetoond in cystendragende ♀, rekening gehouden met het verdunningseffect omdat volledige dieren werden geanalyseerd, doet vermoeden dat de omzetting van AA naar AAS pas in een later stadium in de embryonale ontwikkeling doorgaat. Verder onderzoek op de vorming van het AAS in de levenscyclus wordt uitgevoerd.

5.2. Aanrijking van Artemia met vitamine C

5.2.1. Situering

Eén van de belangrijkste recente verbeteringen bij de productie van vis- en garnaallarven is de optimalisatie van de voedingsstrategie in functie van het voedingsgedrag en de nutritionele vereisten van de predatorlarven (Sorgeloos en Léger, 1992). Gedurende de laatste decennia werden verschillende studies en methodes ontwikkeld om de nutritionele vereisten te bepalen vanaf de juveniele fase. Nutritioneel onderzoek m.b.t. larven blijft echter beperkt, hoofdzakelijk door de complexiteit van het 'hatchery'-kweekproces met variabele produktieresultaten, het groot aantal dieren nodig voor de evaluatie, en de afhankelijkheid van levende voedsels als dieet i.p.v. geformuleerde voedsels met een volledig gekende samenstelling.

De ontwikkeling van een aanrijkingstechniek (Léger et al., 1987) maakte de manipulatie van het vetzuurpatroon in Artemia nauplii mogelijk, en aldus ook de studie van de behoeftes aan essentiële vetzuren tijdens de larvale stadia van vissen en garnalen. Terwijl deze vereisten nu relatief goed gedocumenteerd zijn, blijft er een gebrek aan informatie over andere belangrijke componenten in het dieet tijdens de larvale fase. Vitamine C, meer specifiek ascorbinezuur (AA), wordt in die zin als een potentieel essentieel nutriënt beschouwd. Verschillende biologische (vb. preventie van misvormingen, groei, overleving) en fysiologische (vb. resistentie t.o.v. toxicanten en stress, immuno-activiteit) functies kunnen waarschijnlijk ook in larven positief beïnvloed worden door supplementair AA (Dabrowski, 1992). Een verdere kwaliteitsverbetering van Artemia m.b.t. vitamine C supplementatie werd dan ook onderzocht via een aanpassing van de eerder vermelde aanrijkingprocedure. De betrachting was een procedure te ontwikkelen waarbij welbepaalde concentraties aan vitamine C in het levend voedsel konden worden ingebracht (ingestie en assimilatie) via de bioencapsulatie techniek van Léger et al. (1987). Ascorbyl palmitaat (AP) werd geselecteerd als bron van vitamine C o.w.v. z'n stabiele en lipofiele eigenschappen die de incorporatie ervan in bestaande aanrijkingsemulsies mogelijk maken.

Initiële testen in verband met aanrijking (Van Hauwaert, 1991) tonen een mogelijke interactie aan tussen het gehalte aan vitamine C opgenomen uit de emulsie en het lipidenmetabolisme van Artemia. In die zin werd in de aanrijkingsexperimenten nagegaan of vitamine C supplementatie een effect had op de opname en/of biobeschikbaarheid van andere essentiële voedingscomponenten nl. onverzadigde vetzuren.

5.2.2. Algemene materialen en methoden

Artemia-cysten (Great Salt Lake) werden aan een densiteit van 2g/l geïncubeerd in geaëreerd natuurlijk zeewater (35g/l, 28°C) en de instar I nauplii afgeogst. De larven werden over de aanrijkingstanks verdeeld (300 nauplii/ml) en de aanrijkingsemulsie (0,3g/l) toegevoegd. Na 12u gebeurde nog een tweede aanrijking (0,3g/l) (cfr. standaardprocedure voor HUFA-

aanrijking).

Verskillende concentraties ascorbyl palmitaat (AP, ROCHE, Basel, Zwitserland) werden toegevoegd aan de emulsies: Superselco[®] of een basisemulsie met 50% HUFA (E50) (INVE Aquaculture, Baasrode).

In een eerste reeks aanrijkingen werden Superselco[®] (SS) en AP afzonderlijk afgewogen en met water tot een suspensie gemixed; bij de tweede reeks werd het AP vooraf in de olie-emulsie E50 geïncorporeerd en werd een bepaalde hoeveelheid emulsie afgewogen en met water gemixed vóór het toevoegen in de aanrijkingstank.

Een sterke aëratie zorgde voor een opgelost zuurstofgehalte van minimum 5mg/l; de temperatuur bij de aanrijking werd op $\pm 27^{\circ}\text{C}$ gehouden.

Op regelmatige tijdstippen werden stalen genomen voor vitamine C-analyse (Nelis *et al.*, in prep.). Na 24u (standaard aanrijkingperiode voor HUFA-aanrijking van *Artemia nauplii*) werd ook bemonsterd voor vetzuuranalyse (Coutteau en Sorgeloos, 1994).

5.2.3. Initiële experimenten

In een eerste reeks experimenten werden de niveaus van AA bepaald die in *Artemia nauplii* konden worden geïncorporeerd door verschillende concentraties AP aan de aanrijkingsemulsie toe te voegen (mogelijkheid om verschillende gehalten aan vitamine C te doseren in *Artemia*) en de reproduceerbaarheid van die niveaus werd bepaald.

Zes aanrijkingconcentraties werden geëvalueerd: SS, SS-10% AP, SS-20% AP, SS-30% AP, particulier AP en een controle zonder aanrijking.

Stalen voor vitamine C analyse werden genomen bij het begin van het experiment (instar I nauplii) en na 6, 12, 18 en 24 uur aanrijking.

Van de behandeling SS gesupplementeerd met 20% AP werden de nauplii na 24 uur (aanrijkingduur bij standaardprocedure voor HUFA-aanrijking) vanuit het aanrijkingmedium, na spoelen over een zeef, overgebracht in vers zeewater. Stalen voor vitamine C analyse werden hierbij genomen na 30, 42 en 54 uur en lieten toe de tijdsduur waarbij het gehalte aan vitamine C constant blijft in het levend voedsel na aanrijking te volgen.

20% AP additie gaf 2000 $\mu\text{g/g}$ vitamine C incorporatie na 18 u, terugvallend tot 1500 $\mu\text{g/g}$ na 42 u (Fig. 5.1.). 10% inclusie gaf tot 900 $\mu\text{g AA/g}$ (24 u) en 30% tot 3000 $\mu\text{g AA/g}$ (Fig. 5.2.), maar deze laatste veroorzaakte zeer veel afschuiming. Directe aanrijking (zonder emulsie) van AP resulteerde in zeer hoge aanrijkingen (tot 15000 $\mu\text{g/g}$ na 24 u). Het gehalte aan AA in de controle (niet aangerijkt) en in met SS aangerijkte nauplii nam af tijdens de aanrijkingperiode (verbruik van endogeen AA).

Herhaling van deze testen gaven analoge resultaten: bepaalde gehalten aan AA kunnen gedoseerd worden in *Artemia* via aanrijking met bepaalde concentraties aan AP.

Dat 30 uur na transfer uit het aanrijkingmedium naar vers zeewater nog een gehalte van 1200-1500 $\mu\text{g AA/g}$ in de nauplii werd genoteerd, wijst erop dat het AP niet enkel wordt opgenomen (ingestie) maar ook wordt geassimileerd.

De vetzuuranalyses wezen echter niet op een verhoogde aanrijking van HUFA door vitamine C supplementatie in het aanrijkingmedium (Tabel 5.2.). Een effect van vitamine C op de opname van onverzadigde vetzuren (desaturatie-functie van antioxidans AA) zoals eerder gesuggereerd (Van Hauwaert, 1991) kon dus niet worden bevestigd.

5.2.4. Vergelijking 2x aanrijken - 3x aanrijken

Daar in de eerste experimenten het maximaal geïncorporeerde AA niveau meestal na 18u aanrijking (t_{18}) werd bereikt, en anderzijds het tijdstip van afoogsten normaal na 24u aanrijking (t_{24}) ligt (standaardprocedure HUFA aanrijking), werd gepoogd een plateau te bekomen tussen t_{18} en t_{24} door 3 x 0,2 g/l aan te rijken in plaats van de klassieke 2 x 0,3 g/l. Er werd enkel gewerkt met de concentratie van 20% AP. De aanrijking gebeurde in het ene geval zoals voorheen (t_0 en t_{12}), in het geval van een derde aanrijking op t_0 , t_{12} en t_{18} .

De resultaten van beide aanrijkingprocedures (Fig. 5.3.) zijn analoog, bij 3 x aanrijken werd het maximale niveau iets langer behouden. Tot 24 uur na afoogsten blijft het niveau boven 1500 $\mu\text{g AA/g}$.

Herhaling van deze vergelijking resulteerde in gelijkaardige waarden en een gelijklopend patroon van het gehalte aan AA in functie van de tijd (voor beide regimes).

5.2.5. Incorporatie van AP in de olie-emulsie

Uit praktische overwegingen werd het AP direct in de emulsie geïntegreerd (in plaats van het afzonderlijk afwegen). Hierbij werd een experimentele olie-emulsie met 50% HUFA (E50) gebruikt. Ook met deze emulsie werd de vergelijking 2 x aanrijking - 3 x aanrijking gemaakt. Op t_{24} werden de behandelingen bovendien opgesplitst : een deel van de nauplii werden bij 28°C gehouden, het ander deel onder 'cold storage' omstandigheden (4°C) (beide na transfer naar vers zeewater).

De vitamine C niveaus (Fig. 5.4.) vertonen in de beide gevallen een analoog patroon als voorheen: een gehalte van $> 2000 \mu\text{g AA/g}$ werd bereikt. Dat na het afoogsten (t_{24}) nog een toename van het AA-gehalte werd vastgesteld, is te wijten aan een verdere assimilatie van het AP dat zich nog in de darm bevond op t_{24} : $< 300 \mu\text{g AP/g DW}$ (Fig. 5.5.). Stockering bij 4°C i.p.v. 28°C resulteerde niet in een significant effect op het vitamine C gehalte. HUFA-analyse kon hier evenmin verschillen aantonen tussen de beide aanrijkingregimes (Tabel 5.3.). Ook de resultaten van dit experiment waren reproduceerbaar, zowel i.v.m. vitamine C als m.b.t. HUFA.

5.2.6. Stockeringstest

De emulsie met geïncorporeerd AP werd gestockeerd bij 4°C met de bedoeling de stabiliteit van het geïncorporeerde AP na te gaan i.f.v. de tijd. Na 10 maand stockering blijkt de emulsie nog steeds stabiel: waarden hoger dan 2000 $\mu\text{g AA/g DW}$ worden gedetecteerd in de 24u aangerijkte Artemia nauplii.

5.2.7. Besluit

Een standaardprocedure voor de aanrijking van Artemia nauplii met vitamine C onder vorm van AP werd ontwikkeld. 20% AP geïncorporeerd in de olie-emulsie (E50) resulteerde in een gehalte van $> 2000 \mu\text{g AA/g DW}$ (t_{24}), terwijl deze vitamine C supplementatie geen effect had op de opname van HUFA in de nauplii.

Dergelijke aanrijking resulteert dus in uiterst hoge waarden aan AA in het levend voedsel (cfr. normale visdiëten hebben een gehalte van $\pm 200 \mu\text{g AA/g DW}$).

Referentielijst

COUTTEAU, P. & P. SORGELOOS (1994)

Intercalibration exercise on the qualitative and quantitative analysis of fatty acids in Artemia and marine samples.
ICES Cooperative Research Report, in press.

DABROWSKI, K. (1992)

Ascorbate concentration in fish ontogeny.
Journal of Fish Biology, 40, 273-279.

LAVENS, P., P. BAERT, A. DE MEULEMEESTER, E. VAN BALLAER & P. SORGELOOS (1985)

New developments in the high density flow-through culturing of brine shrimp Artemia.
Journal of the World Mariculture Society, 16, 498-508.

LEGER, PH., E. NAESSENS-FOUCAERT & P. SORGELOOS (1987)

International Study on Artemia. XXXV. Techniques to manipulate the fatty acid profile in Artemia nauplii and the effect on its nutritional effectiveness for the marine crustacean Mysidopsis bahia (M.).
In: Artemia Research and its Applications, 3. P. Sorgeloos, D.A. Bengston, W. Declair & E. Jaspers (Eds.). Universa Press, Wetteren, Belgium, 556pp.

NELIS, H., P. LAVENS, G. MERCHIE, P. SORGELOOS, B. VAN LIEDEKERKE, P. DEBEUF & A. DE LEENHEER (in prep.)

Liquid chromatographic determination of ascorbic and dehydroascorbic acid in the brine shrimp, Artemia.

NELIS, H.J., G. MERCHIE, P. LAVENS, P. SORGELOOS & A.P. DE LEENHEER (1994)

Solid phase extraction of ascorbic acid-2-sulfate from cysts of the brine shrimp Artemia franciscana.
Analytical Chemistry, in press.

SORGELOOS, P. & PH. LÉGER (1992).

Improved larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn.
Journal of the World Aquaculture Society, 23, 251-264.

VAN HAUWAERT, A. (1991)

Nutritionele behoeften van de larven van Macrobrachium sp.
Afstudeerwerk, Faculteit van de Landbouwwetenschappen, Universiteit Gent, 104pp.

Tabel 5.1: Gehalte aan AA ($\mu\text{g/g DW}$) in Artemia biomassa

	0% AP	1% AP	5% AP
DAG 5	49	1528	6290
DAG 8	34	1209	6280
DAG 12		♀ 904 ♀ met cysten 752	3062

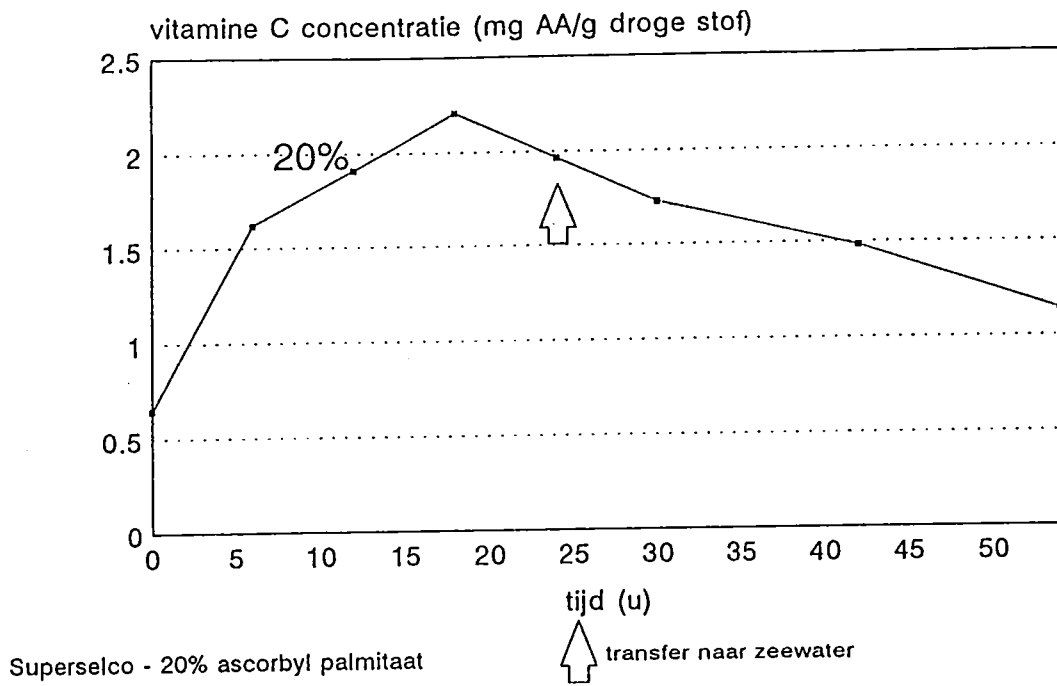
Tabel 5.2: Gehalte van de belangrijkste essentiële onverzadigde vetzuren (mg/g DW) in nauplii aangerijkt (24u) met Superselco^o (SS), SS-10%AP, SS-20%AP, SS-30%AP

	SS	SS-10% AP	SS-20% AP	SS-30% AP
20:4n-6	4,0	4,3	3,4	0,2
20:5n-3	28,7	29,0	24,2	24,0
22:6n-3	16,3	17,1	19,8	14,9
HUFA 3 > 20:3n-3	47,7	48,9	46,7	41,2

Tabel 5.3: Gehalte van de belangrijkste essentiële onverzadigde vetzuren (mg/g DW) in nauplii aangerijkt (24u) met E50, E50-20%AP 2x aanrijking (E50-20/2x), E50-20%AP 3x aanrijking (E50-20/3x)

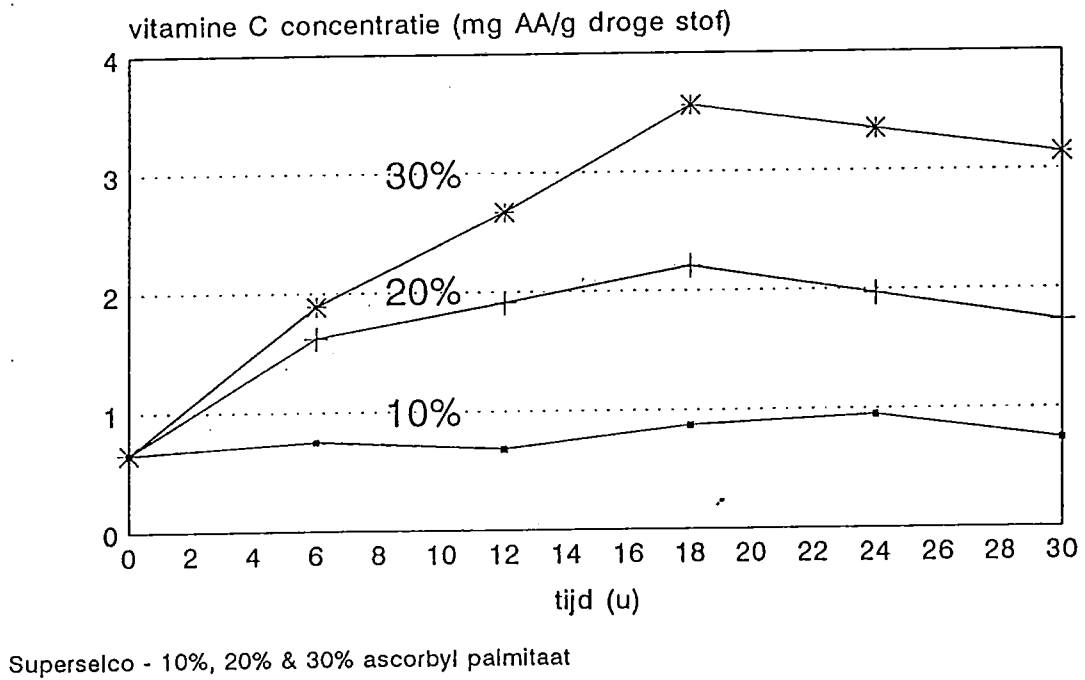
	E50	E50-20/2x	E50-20/3x
20:4n-6	4,6	4,2	3,9
20:5n-3	34,3	38,9	39,2
22:6n-3	12,4	13,0	14,0
HUFA 3 > 20:3n-3	49,5	54,6	56,2

Vitamine C aanrijking in Artemia nauplii



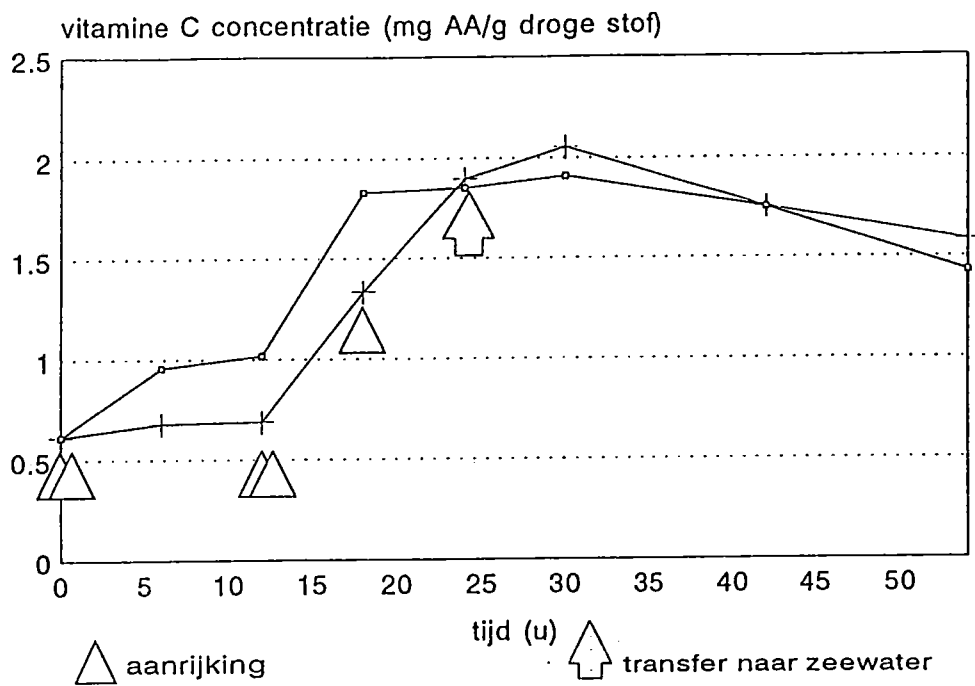
Figuur 5.1

Vitamine C aanrijking in Artemia nauplii



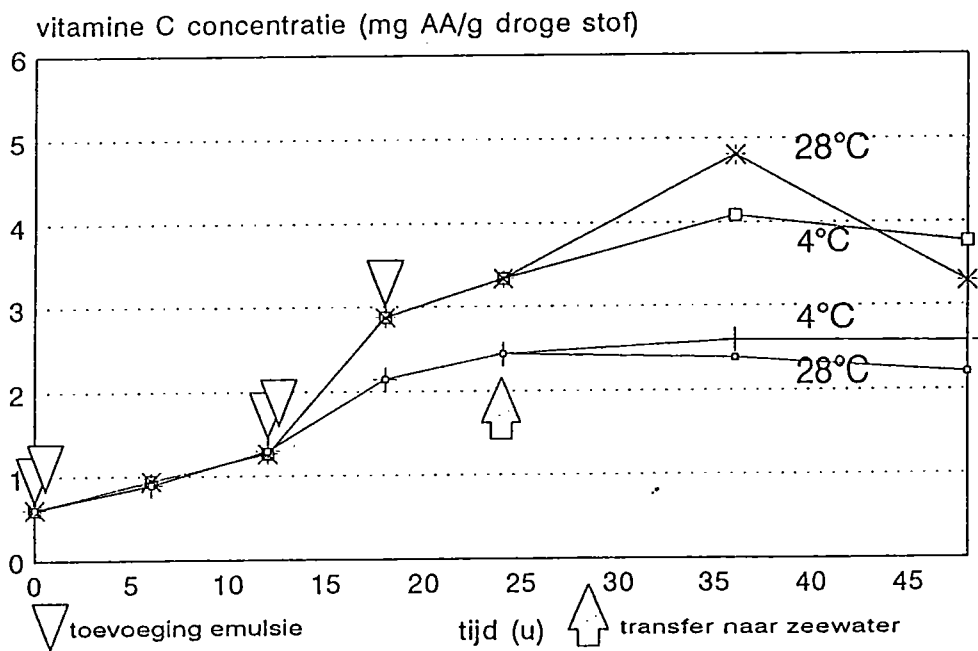
Figuur 5.2

Vitamine C aanrijking in Artemia nauplii

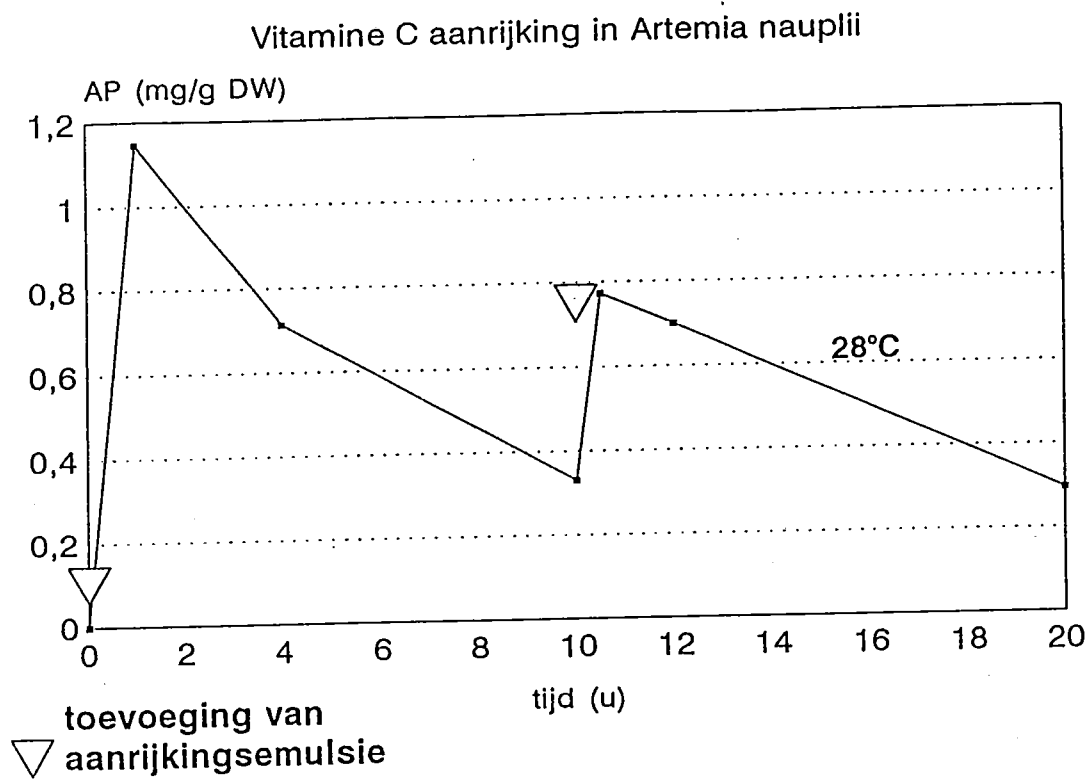


Figuur 5.3

Vitamine C aanrijking in Artemia nauplii



Figuur 5.4



Figuur 5.5

Referenties van publicaties verkregen uit het OOA project

Coutteau, P., Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1989. Feeding the brine shrimp Artemia on yeast: effect of mechanical disturbance, animal density, water quality and light intensity. Aquaculture Europe 1989, International Aquaculture Conference, Bordeaux (France), 2-4 october 1989. European Aquaculture Society, Special Publication 10. pp. 75-76.

Coutteau, P., Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1990. Baker's yeast as a potential substitute for live algae in aquaculture diets: Artemia as a case study. Journal of the World Aquaculture Society 21(1): 1-9.

Coutteau, P., Brendonck, L., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1992. The use of manipulated baker's yeast as an algal substitute for the laboratory culture of Anostraca. Hydrobiologia 234: 25-32.

Dhert, Ph., Bombeo, R.B., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1992. A simple semi flow-through culture technique for the controlled super-intensive production of Artemia juveniles and adults. Aquacultural Eng. 11:107-119.

Dhont, J., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1991. Development of a lipid-enrichment technique for Artemia juveniles produced in an intensive system for use in marine larviculture: 51-55. In : Larvi '91. Fish & Crustacean Larviculture Symposium, P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers, F. Ollevier (Eds), European Aquaculture Society, Special Publication N°15, Ghent, Belgium, 1991, 427 pp.

Merchie, G., Lavens, P., Radull, J., Nelis, H., Sorgeloos, P., A., De Leenheer, 1993. Effect of feeding vitamin C-enriched live food on the hatchery production of Macrobrachium rosenbergii. In: Book of Abstracts of the 'World Aquaculture '93' Conference, Torremolinos, Spain, May 26-28, 1993, p. 149. Paper submitted.

Nelis, H., Lavens, P., Merchie, G., Sorgeloos, P., Van Liedekerke, B., Debeuf, P., De Leenheer, A. (in prep.). Liquid chromatographic determination of ascorbic and dehydroascorbic acid in the brine shrimp, Artemia.

Nelis, H., Merchie, G., Lavens, P., Sorgeloos, P., De Leenheer, A., 1994. Solid phase extraction of ascorbic acid-2-sulfate from cysts of the brine shrimp Artemia franciscana. Analytical Chemistry, in press.