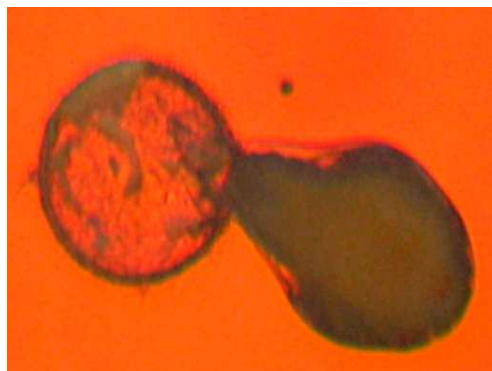


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Διερεύνηση της επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων στη
διαμόρφωση της εκκολαψιμότητας κύστεων
Artemia franciscana (GSL)**



ΘΕΟΛΟΓΙΔΗΣ ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΣ

ΒΟΛΟΣ 2007

Διερεύνηση της επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων στη διαμόρφωση της εκκολαψιμότητας κύστεων *Artemia franciscana* (GSL)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Σπυρίδων Κλαουδάτος, Καθηγητής, Υδατοκαλλιέργειες, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων.
2. Χρήστος Νεοφύτου, Καθηγητής, Ιχθυολογίας-Υδροβιολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.
3. Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργειες, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κάτωθι αναφερομένους αλλά και θα τους θυμάμαι σαν τους πρωτεργάτες της εισαγωγής μου στον όμορφο τομέα της έρευνας που είναι για μένα η πραγματική ουσιώδης για τη ζωή επιστήμη.

Τον κ. **Σπυρίδωνα Κλαουδάτο**, Καθηγητή του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος και επιβλέποντα της παρούσας εργασίας, για την εποικοδομητική βοήθεια και συμπαράσταση που μου πρόσφερε.

Τους σεβαστούς και αγαπητούς Καθηγητές κ. **Χρήστο Νεοφύτου** και κ. **Γιάννη Γεωργουλάκη**, καθώς και τον λέκτορα κ. **Μάριο Σαπουντζή** για τις γνώσεις τις οποίες μου μετέδωσαν, την κατανόηση και τη συμπαράσταση στις προσωπικές μου δυσκολίες.

Επίσης, την Επίκουρο καθηγήτρια κ. **Παναγιώτα Παναγιωτάκη** για τις εύστοχες υποδείξεις ως προς τη βελτίωση του τελικού κειμένου.

Τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου, στη Διεύθυνση του τμήματος Αλιείας Κύπρου και το προσωπικό του ερευνητικού σταθμού υδατοκαλλιέργειας, Μενεού, Λάρνακας για την παροχή υπηρεσιών κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της εργασίας μου.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην οικογένεια μου για τα όσα μου πρόσφεραν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής μου. Ιδιαίτερα στον πατέρα μου, ο οποίος λόγω της επαγγελματικής και επιστημονικής του κατάρτισης ως γιατρός με βοήθησε στην αποπεράτωση της εργασίας αυτής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Από το τέλος της δεκαετίας του '70, όπου άρχισε η ανάπτυξη του τομέα των υδατοκαλλιεργειών σε όλο το κόσμο, παρατηρήθηκε μια αύξηση της ζήτησης κύστεων *Artemia* sp. (Dhont and Sorgeloos, 2002).

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 25 ετών η περιοχή της Great Salt Lake της Utah (GSL) αποτέλεσε τον βασικότερο προμηθευτή κύστεων της *Artemia* στην παγκόσμια αγορά υδατοκαλλιέργειας (Lavens and Sorgeloos, 2000). Το είδος *Artemia franciscana* (GSL) παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των υπολοίπων ειδών, γεγονός που την καθιστά περιζήτητη τροφή στις εκτροφές ψαριών. Στην συγκεκριμένη ερευνητική εργασία το είδος *Artemia franciscana* (GSL) επιλέχθηκε ως το καταλληλότερο στέλεχος για την μελέτη των συνθηκών αποκελύφωσης και εκκόλαψης.

Η αποκελύφωση είναι μια τεχνική μέσω της οποίας διευκολύνεται η απομάκρυνση του κελύφους. Είναι μια ευρέως εφαρμοσμένη τεχνική στα εκκολαπτήρια με πολλά πλεονεκτήματά. Το μεγαλύτερο μέρος της παρούσας εργασίας εστιάστηκε στην ευεργετική επίδραση της τεχνικής αυτής στην εκκόλαψη (Sorgeloos *et al.*, 2001).

Για τις ανάγκες της τεχνητής αποκελύφωσης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αποκελύφωσης σε συγκεντρώσεις από 0,25 g μέχρι και 1,75 g ενεργού χλωρίου ανά 14 ml διαλύματος. Ελέγχθηκαν τα εκκολαπτικά χαρακτηριστικά, εκκολασιμότητα και το ποσοστό εκκόλαψης, σε σχέση με το χρόνο επώασης μεταξύ της 14^{ης} - 24^{ης} ώρας από την έναρξη της ενυδάτωσης (ανά δυο ώρες). Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι:

- ✦ τόσο η εκκολασιμότητα όσο και το ποσοστό εκκόλαψης αυξάνονται σε σχέση με αυτές του μάρτυρα ανεξάρτητα της συγκέντρωσης του χλωρίου στο διάλυμα και των υπό εξέταση χρόνων.

- ▲ η εκκολαψιμότητα για κάθε συγκέντρωση χλωρίου εξαρτάται από το χρόνο παραμονής των κύστεων στο διάλυμα αποκελύφωσης. Ελάχιστη παράταση του χρόνου παραμονής των κύστεων στο διάλυμα αποκελύφωσης προκαλεί καταστροφή των εμβρύων.
- ▲ οι μεγαλύτερες τιμές εκκολαψιμότητας παρατηρήθηκαν στις χαμηλές συγκεντρώσεις χλωρίου (0,25-0,75g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης). Η συγκέντρωση 0,25 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης για την 22^η ώρα εκκόλαψης προτιμάται έναντι των υπολοίπων, για πρακτικούς και οικονομικούς λόγους.

Το δεύτερο μέρος της εργασίας, αφορά τη μελέτη της επίδρασης **φυσικών παραμέτρων εκκόλαψης** στη διαμόρφωση της εκκολαψιμότητας και του ποσοστού εκκόλαψης την 24^η ώρα από την έναρξη της ενυδάτωσης. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν η αλατότητα, η θερμοκρασία και ο φωτισμός.

Αλατότητα. Οι μεγαλύτερες τιμές εκκολαψιμότητας και ποσοστού εκκόλαψης παρατηρήθηκαν στην αλατότητα 5 psu με 253.365 και ποσοστό 90,82 % αντίστοιχα. Όσο προχωρούμε σε μεγαλύτερες τιμές αλατότητας τόσο περισσότερος χρόνος και ενέργεια χρειάζεται (σύνθεση της γλυκερόλης) από τις κύστες για να εκκολαφθούν. Παρόλο ότι η αλατότητα 5 psu δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα εκκολαψιμότητας, εντούτοις προτιμάται το θαλασσίνο νερό για πρακτικούς και οικονομικούς λόγους.

Θερμοκρασία. Οι μεγαλύτερες τιμές εκκολαψιμότητας και ποσοστού εκκόλαψης παρατηρήθηκαν στη θερμοκρασία των $26,5 \pm 1$ °C με 226.085 και ποσοστό 81,17 % αντίστοιχα. Κάτωθεν της θερμοκρασίας αυτής παρατηρήθηκε καθυστέρηση της εκκόλαψης λόγω αργού μεταβολισμού, ενώ αυξανόμενης της θερμοκρασίας άνω των 28 °C έχουμε ανάλογη αύξηση καταστροφής των εμβρύων άρα και αντιστρόφως ανάλογο ποσοστό εκκόλαψης.

Φωτισμός. Η έλλειψη φωτισμού δεν επηρέασε σημαντικά την εκκολαψιμότητα και το ποσοστό εκκόλαψης, πράγμα που αποδεικνύει ότι οι κύστεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αφενός, κύστεις οι οποίες είχαν την ικανότητα αποθήκευσης ενέργεια από φωτισμό και αφετέρου ότι είχαν εκτεθεί σε φως. Συνιστάται οι αποξηραμένες κύστεις να παραμένουν σε σκοτεινό μέρος γιατί η επανειλημμένη ή η συνεχής έκθεση στο φως ενεργοποιεί τους μηχανισμούς μεταβολισμού, με απρόβλεπτες συνέπειες. Διατηρώντας τις κύστεις σε συνθήκες σκότους, η παρουσία φωτισμού κατά την εκκόλαψη πρέπει να θεωρείται αναγκαία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά	9
1.2. Ταξινομική και κυτταρογενετική	12
1.3. Γεωγραφική κατανομή και οικολογία	16
1.4. Μορφολογία	20
1.5. Αναπαραγωγή	25
1.6. Η χρήση της <i>Artemia</i> στις υδατοκαλλιέργειες	27
1.5.1 <i>Βιοενσωμάτωση</i>	33
1.7. Κύστες	
1.7.1. <i>Γενικά</i>	38
1.7.2. <i>Αφυδάτωση κύστεων</i>	44
1.7.3. <i>Ενυδάτωση και εκκόλαψη κύστεων</i>	48
1.7.4. <i>Τεχνητή αποκελύφωση κύστεων</i>	52
1.7.5. <i>Συνθήκες εκκόλαψης</i>	57
1.8. Σκοπός της εργασίας	64

Κεφάλαιο 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Γενικά	66
2.2. Παράμετροι αποφασιστικής σημασίας για άριστη εκκολαψιμότητα των κύστεων <i>Artemia</i>	67
2.2.1. <i>Διαδικασία εκκόλαψης</i>	70
2.2.2. <i>Διαδικασία αποκελύφωσης κύστεων</i>	73
2.2.3. <i>Συγκομιδή κύστεων</i>	75
2.3. Στατιστική ανάλυση	75

Κεφάλαιο 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Επίδραση φυσικοχημικών παραμέτρων στην εκκολαψιμότητα (Hatching Efficiency) και στο ποσοστό εκκόλαψης (Hatching Percentage) *Artemia franciscana* (GSL)

3.1.1. Συγκεντρώσεις χλωρίου	76
3.1.2. Φυσικοχημικές παράμετροι επώασης	106
3.1.2.1. Αλατότητα	107
3.1.2.2. Θερμοκρασία	110
3.1.2.3. Φως	113

Κεφάλαιο 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Επίδραση φυσικοχημικών παραμέτρων στην εκκολαψιμότητα (Hatching Efficiency) και στο ποσοστό εκκόλαψης (Hatching Percentage) *Artemia franciscana* (GSL)

4.1.1. Συγκεντρώσεις χλωρίου	115
4.1.2. Φυσικοχημικές παράμετροι επώασης	121
4.1.2.1. Αλατότητα	124
4.1.2.2. Θερμοκρασία	126
4.1.2.3. Φως	128

Κεφάλαιο 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 129

Κεφάλαιο 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 132

Κεφάλαιο 7. ABSTRACT 145

Κεφάλαιο 8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 148

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά

Η *Artemia* διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατροφή των εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών. Οι ναύπλιοι της *Artemia* αποτελούν μια εξαιρετική τροφή για τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια ιχθύων και καρκινοειδών, ικανοποιώντας σε μεγάλο βαθμό τις διατροφικές απαιτήσεις τους. Το μικρό μέγεθος των ναυπλίων (ικανοποιεί τις απαιτήσεις του στόματος των ιχθυδίων), η περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά (πρωτεΐνες, PUFA της σειράς ω-3), το υψηλό ενεργειακό απόθεμα, η καθαρότητα (τεχνική της αποκελύφωσης), η δυνατότητα βιοενσωμάτωσης (θρεπτικών και θεραπευτικών ουσιών) και η ευκολία με την οποία αφομοιώνεται και προσλαμβάνεται από τους θηρευτές (εύκολα αντιληπτή, εύγεστη και ελκυστική), αποτελούν τα κύρια χαρακτηριστικά που τοποθετούν το ζωοπλαγκτονικό οργανισμό *Artemia* σε πλεονεκτική θέση έναντι των συνθετικών και ζωντανών τροφών.

Από το τέλος της δεκαετίας του '70, όπου άρχισε η ανάπτυξη του τομέα των υδατοκαλλιεργειών σε όλο το κόσμο, η ζήτηση για τις κύστες *Artemia* αυξήθηκε βαθμιαία από μερικούς μετρικούς τόνους σε περίπου 800 μετρικούς τόνους το χρόνο, αντιπροσωπεύοντας το 40% της συνολικής κάλυψης σε τροφή στα νυμφικά στάδια. Το 1997 περίπου 6.000 εκκολαπτήρια παγκοσμίως χρησιμοποίησαν 1500 μετρικούς τόνους κύστεων *Artemia* (Dhont and Sorgeloos, 2002), ενώ εικάζεται ότι μέχρι το 2010 η ποσότητα αυτή θα φθάσει τους 2500 μετρικούς τόνους.

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 25 ετών η περιοχή της Great Salt Lake της Utah αποτέλεσε τον βασικότερο προμηθευτή (90 %) κύστεων *Artemia* στην παγκόσμια αγορά υδατοκαλλιέργειας (Lavens and Sorgeloos, 2000). Η *Artemia franciscana* της Great Salt

Lake παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των υπολοίπων ειδών, γεγονός που την καθιστά περιζήτητη. Χαρακτηριστικά, όπως το λεπτό κέλυφος των κύστεων, το μικρό μέγεθος, η καλή θρεπτική αξία των ναυπλίων, ο συγχρονισμός της εκκόλαψης, η υψηλή αποδοτικότητα και το υψηλό ποσοστό εκκόλαψης, συνιστούν την αξία του είδους αυτού. Οι λόγοι αυτοί, μας οδήγησαν στην επιλογή της *Artemia franciscana* από τη Great Salt Lake ως το καταλληλότερο στέλεχος για την μελέτη συνθηκών αποκελύφωσης και εκκόλαψης.

Από το 1991 μέχρι το 2006 παρατηρείται μια τρομακτική μείωση των αποθεμάτων της *Artemia* σε παγκόσμιο επίπεδο, μεταβάλλοντας μια σταθερή κατάσταση 35.000.000 ετών σε μια κατάσταση αβεβαιότητας για την επιβίωση του είδους. Η μείωση αυτή οφείλεται κυρίως σε τρεις αιτίες, στις κλιματικές αλλαγές, στην ληστρική εκμετάλλευση και στην εξάλειψη ενδημικών ειδών *Artemia* (π.χ Ισραήλ) από την εισαγωγή άλλων στελεχών κυρίως *Artemia franciscana*. Το ξενικό είδος μπορεί να κυριαρχεί σε ποιότητα και στην φυσική επιλογή, η προσαρμογή του όμως στο νέο βιότοπο θα κριθεί με το πέρασμα του χρόνου. Μια ασήμαντη κλιματική μεταβολή για το ενδημικό είδος μπορεί να φανεί μοιραία γι' αυτό.

Η πτώση της αλατότητας της Great Salt Lake εξαιτίας του φαινομένου El-Nino (1982-1984) και η προώθηση στην αγορά μαζικής ποσότητας κύστεων *Artemia franciscana* οδήγησε σε σταδιακή μείωση των αποθεμάτων της περιοχής. Η πτώση της παραγωγής σε συνδυασμό με την τεχνική έλλειψη την οποία δημιούργησαν συγκεκριμένες εταιρίες ώστε να αποκομίσουν περισσότερα κέρδη, δημιούργησαν μια κατάσταση αβεβαιότητας με παράλληλη άνοδο των τιμών. Οι εταιρίες συλλογής και εμπορίας *Artemia* άρχισαν να ανησυχούν για την παραγωγικότητα της Great Salt Lake από το 1994 και μετά. Έτσι άρχισε

η αναζήτηση περιοχών όπως Κίνα, Ρωσία κ.ο.κ. για πληθυσμούς που μπορούν να συμβάλλουν στην αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής. Ως οριστική λύση αντιμετώπισης της κατάστασης αυτής θεωρείται η αντικατάσταση των ζωντανών τροφών από συνθετικές, η οποία σύμφωνα με τους Sorgeloos και συνεργάτες (2001) προβλέπεται μέχρι το 2010. Αυτό όμως είναι αδύνατο να γίνει χωρίς επίπτωση στο κόστος, στο χρόνο ανάπτυξης, στην παραγωγή και στην ποιότητα των παραγόμενων ιχθυδίων.

Η χρήση της *Artemia* δεν εστιάζεται μόνο τομέα των υδατοκαλλιέργειών. Η “εκμετάλλευση” του οργανισμού αυτού για την αύξηση της αλατοπαραγωγικότητας των αλυκών είναι εφικτή και αποφέρει τεράστια κέρδη. Η *Artemia*, ως μη επιλεκτικός διηθηματοφάγος οργανισμός, έχει την ικανότητα να μειώνει την ποσότητα της οργανικής ύλης στο υπεραλμυρό μέσο, με δυο άμεσα αποτελέσματα: α) τη μείωση του σημείου κρυστάλλωσης και επομένως την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας αλατιού, και β) την παραγωγή καθαρού αλατιού, πολύ καλής ποιότητας (Davis, 1980). Σε περιπτώσεις εμπλουτισμών που έγιναν στον Παναμά, την Κόστα Ρίκα, τη Βούρμα, την Ταϊλάνδη, τις Φιλιππίνες, το Βιετνάμ και την Ινδονησία (Vanhaecke *et al.*, 1987), η εισαγωγή πληθυσμών του ζώου σε αλυκές έδειξε θεαματικά αποτελέσματα στην αλατοπαραγωγική διαδικασία. Όταν μάλιστα οι εμπλουτισμοί συνοδεύονται και από ορθολογική διαχείριση, τα αποτελέσματα αναμένονται ακόμη καλύτερα (Quynh and Lam, 1987).

Επομένως, είναι προφανές πως η χρήση της *Artemia* στις υδατοκαλλιέργειες είναι απαραίτητη και οι δυνατότητες εκμετάλλευσής της πολλές (Tackaert and Sorgeloos, 1991). Γι’ αυτό το λόγο υπάρχει ανάγκη βελτίωσης της ποιότητας των ήδη υπάρχοντων αποθεμάτων με την αύξηση της εκκολαψιμότητας και του ποσοστού εκκόλαψης.

1.2. Ταξινόμηση και Κυτταρογενετική

Το γένος *Artemia* (Leach 1819) αποτελεί ένα εξαιρετικά ευνοϊκό βιολογικό σύστημα για τη μελέτη της εξελικτικής πορείας. Η ευκολία με την οποία μπορούν να προσδιοριστούν οι περιβαλλοντικοί παράμετροι που το επηρεάζουν, η δυνατότητα αποθήκευσης των κύστεων και διατήρησης των ναυπλίων στο εργαστήριο, κάνει τον οργανισμό αυτό ιδανικό για τη μελέτη της εξελικτικής προσαρμοστικότητας. Η εξελικτική γενετική δίνει τη δυνατότητα σύγκρισης των διπλοειδών και πολυπλοειδών μορφών του γένους. Από τα συγγενικά είδη, στελέχη και τη διαδοχική ακολουθία των εξελικτικών σταδίων δίνεται η δυνατότητα παρακολούθησης της προόδου του γένους αυτού μέσα από την εξελικτική του πορεία, επηρεαζόμενο κυρίως από τους βιότοπους στους οποίους έζησε (Lenz *et al.*, 1991).

Ο Schlosser (1755) αναφέρθηκε για πρώτη φορά στο γένος *Artemia* που παρατήρησε σε αλίπεδα του Lymington της Αγγλίας (Sorgeloos, 1980) και ο Leach (1819) περιέγραψε λεπτομερώς τη μορφολογία του ζώου και του απέδωσε το όνομα *Artemia salina* (Abreu - Grobois, 1983).

Η ταξινόμηση του γένους *Artemia* είναι η εξής :

Φύλο : *Arthropoda* (Αρθρόποδα)

Κλάση : *Crustacea* (Καρκινοειδή)

Υποκλάση : *Branchiopoda* (Βραγχιόποδα)

Τάξη : *Anostraca* (Ανόστρακα)

Οικογένεια : *Artemiidae*

Γένος : *Artemia*, Leach 1819

Από τα μέσα του 19^{ου} αιώνα υπάρχει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον για το συγκεκριμένο οργανισμό που ζει σε αλμυρά και υπέραια νερά και για το λόγο αυτό το κοινό όνομά του είναι “γαρίδα της άλμης” (brine shrimp).

Χρησιμοποιείται σε πειραματικό επίπεδο κυτταρογενετικής, βιοχημείας, οικολογίας, τοξικολογίας, γι' αυτό αποκαλείται και «Δροσόφιλα του νερού». Ήδη από τη δεκαετία του 1930 υπάρχουν σημαντικά οικονομικά οφέλη από την εκμετάλλευση των αποθεμάτων κύστεων και βιομάζας *Artemia* σε εκτροφές ψαριών και καρκινοειδών.

Τα αμφιγονικά και παρθενογενετικά είδη της *Artemia* χαρακτηρίζονται από μια εκτεταμένη γενετική απόκλιση στα κληρονομικά τους χαρακτηριστικά καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Υπό εργαστηριακές συνθήκες η διάρκεια ζωής τους, η γονιμότητα και η ηλικία της πρώτης αναπαραγωγής φαίνεται να διαφέρουν ανάμεσα στα είδη και στους πληθυσμούς της *Artemia*. Το εύρος ανεκτικότητας σε αλατότητα και σε θερμοκρασία διαφέρει σημαντικά, με τη γενετική απόκλιση προς την καταλληλότερη θερμοκρασία να μπορεί να επιλεγθεί τόσο από το εργαστήριο όσο και από το πεδίο.

Μέσα από το πέρασμα των χρόνων η *Artemia* δέχθηκε πολλές πιέσεις από το περιβάλλον, πράγμα που αντικατοπτρίζεται στα σημερινά χαρακτηριστικά της. Είναι αποδεκτό πως η ιστορία ζωής της *Artemia* εξελίχθηκε σε απόκριση των χαρακτηριστικών των βιοτόπων στα οποία έζησε. Όσο λιγότερα γνωρίζουμε για τις επιλεκτικές πιέσεις που δέχθηκαν τα κληρονομικά γνωρίσματα του γένους αυτού κατά τη διάρκεια της ζωής του, τόσο περισσότερη “δουλειά” χρειάζεται, ώστε να κατανοήσουμε την εξελικτική πορεία του γένους αυτού.

Το γεγονός ότι η μορφολογία του είδους επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες δημιουργεί την εντύπωση ότι υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη. Σύμφωνα με

τον Abreu-Grobois (1983), ο Daday de Dees (1910) ήταν ο πρώτος που κατέταξε όλα αυτά τα “είδη” στο γένος *Artemia*. Ακολούθησε ο Arton το 1931, ο οποίος θεώρησε την *Artemia salina* ως “πολυτυπικό είδος”, το οποίο συγκροτούν διαφορετικές οντότητες, οι λεγόμενοι “βιοτόποι” (Αμπατζόπουλος, 1988). Στο 1^ο Διεθνές Συνέδριο για την *Artemia* (1979) στο Corpus Christi (Τέξας, ΗΠΑ) ο Barigozzi διέκρινε το γένος αυτό σε αμφιγονικά και παρθενογενετικά είδη βάση μορφολογικών και κυτταρολογικών χαρακτηριστικών. Συνοψίζει την ταξινόμηση *Artemia* ως εξής: “.....το γένος *Artemia* πρέπει να υποδιαιρεθεί σε έναν αριθμό αμφιγονικών αδελφών ειδών και ένα σύνολο παρθενογενετικών πληθυσμών που διαφέρουν σημαντικά ως προς τα χρωμοσωματικά φαινόμενα”. Επίσης στο ίδιο συνέδριο αποφασίστηκε να ταυτοποιηθούν τα διαφορετικά είδη του γένους *Artemia*, να χρησιμοποιείται μόνο το γένος και όχι η ονοματολογία *Artemia salina* Leach, που δυστυχώς προκαλεί ακόμη και σήμερα τραγική σύγχυση.

Με βάση τον γράφοντα, ο όρος “στελέχος” ταυτίζεται με το βαθμό πλοειδίας και την περιοχή στην οποία εμφανίζεται το είδος.

Σήμερα, με τη χρήση μορφομετρικών, βιοχημικών και γενετικών χαρακτηριστικών έχει διαπιστωθεί πως υπάρχουν 7 αμφιγονικά είδη και μια πληθώρα παρθενογενετικών στελεχών με διάφορους βαθμούς πλοειδίας. Τα παρθενογενετικά στελέχη χαρακτηρίζονται με τον όρο *Artemia parthenogenetica* για την αποφυγή διαφωνιών σε ταξινομικό επίπεδο. Τα αμφιγονικά είδη που έχουν βρεθεί είναι τα ακόλουθα: *Artemia franciscana*, *A. persimilis*, *A. salina*, *A. urmiana*, *A. Sinica*, *Artemia sp.* από το Καζακστάν (Triantaphyllidis *et al.*, 1998), *A. tibetiana* (Abatzopoulos *et al.*, 1998).

Τα στελέχη των αμφιγονικών ειδών είναι διπλοειδή (π.χ. *Artemia franciscana* $2n=42$), ενώ τα παρθενογενετικά μπορεί να έχουν διάφορους βαθμούς πλοειδίας

(διπλοειδία: $2n$, πολυπλοειδία: $3n$, $4n$, $5n$, $9n$, $10n$, όπου $n=21$). Στα πολυπλοειδή παρθενογενετικά στελέχη η κυτταρογενετική μελέτη είναι ακόμη πιο περίπλοκη, καθώς εμφανίζονται πολύ συχνά φαινόμενα ετεροπλοειδίων ή ανευπλοειδίων, ακόμα και μέσα στο ίδιο άτομο (Abatzopoulos *et al.*, 1986).

Το γεγονός ότι η κατανομή των διάφορων πληθυσμών είναι ασυνεχής (δηλαδή ισχύει η γεωγραφική απομόνωση) δυσκολεύει την ταξινόμησή τους. Η ιδιόμορφη αυτή κατανομή σε απομονωμένους βιότοπους, ο καθένας από τους οποίους χαρακτηρίζεται από το δικό του συνδυασμό οικολογικών συνθηκών, έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη πολυάριθμων γεωγραφικών στελεχών ή γενετικά διαφοροποιημένων πληθυσμών, που μπορεί να ανήκουν και στο ίδιο είδος.

Ακόμη και αν είναι εφικτός ο έλεγχος της διασταύρωσης δυο αμφιγονικών πληθυσμών, στο εργαστήριο τα πράγματα δεν είναι τόσο εύκολα για τους παρθενογενετικούς πληθυσμούς.

Προκειμένου να αποφεύγονται οι παρερμηνείες και οι συγχύσεις, πολλοί ερευνητές έχουν καταλήξει να μιλούν για τα διάφορα στελέχη του γένους *Artemia*, και όχι για τα είδη (Αμπατζόπουλος, 1988; Vanhaecke and Sorgeloos, 1980). Μεταξύ αυτών των στελεχών έχει παρατηρηθεί υψηλός βαθμός γενετικής διαφοροποίησης, όπως επίσης και μεγάλη ποικιλομορφία σε πολλά ποσοτικά χαρακτηριστικά. Πολλά από αυτά (π.χ. το λιπιδικό περιεχόμενο των ναυπλίων) εξαρτώνται κυρίως από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και αλλάζουν εποχιακά ή από έτος σε έτος. Άλλα (π.χ. η διάμετρος των κύστεων, ο ρυθμός ανάπτυξης, η αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες) παραμένουν σχετικά σταθερά σε κάθε στέλεχος. Αυτή η ποικιλία φαινοτύπων ανάμεσα στα διάφορα στελέχη, των στελεχο - ειδικών χαρακτηριστικών, πιστεύεται ότι οφείλεται σε προσαρμογές που μέσα από

γενετικές αλλαγές έχουν καταγραφεί στην εξελικτική ιστορία του καθενός (Vanhaecke and Sorgeloos, 1980).

1.3. Γεωγραφική κατανομή και Οικολογία

Σε ότι αφορά τη φυλογένεση και την εξέλιξη του γένους *Artemia*, τα περισσότερα πειραματικά αποτελέσματα σήμερα οδηγούν στο συμπέρασμα, ότι το γένος αρχικά αποτελείτο μόνο από αμφιγονικές μορφές. Παρθενογενετικές μορφές εμφανίστηκαν και επικράτησαν, σε απομονωμένους πληθυσμούς, την εποχή της εξάτμισης και της αύξησης της αλατότητας στη Μεσόγειο ("salinity crisis"). Πιο συγκεκριμένα, η εμφάνιση των παρθενογενετικών στελεχών τοποθετείται στη λεκάνη της Ανατολικής Μεσογείου, κατά τη μεγάλη περίοδο ξηρασίας (πριν από 6×10^6 χρόνια) (Αμπατζόπουλος, 1988). Η παρθενογένεση είναι ένα χαρακτηριστικό φαινόμενο για την *Artemia* και μπορεί να υφίσταται χωρίς να δημιουργεί εξελικτικά αδιέξοδα (Browne, 1980b, 1982: Browne *et al.*, 1984: Browne and Spencer, 1987: Abatzopoulos *et al.*, 1993).

Τα αμφιγονικά είδη χωρίζονται σε αυτά του Παλαιού κόσμου και εκείνα του Νέου κόσμου. Στον παλιό κόσμο έχουμε στη λεκάνη της μεσογείου (π.χ Κύπρος) την *Artemia salina* Leach, 1819, στο Ιράν την *Artemia urmiana* (Gunther, 1899), στην Κίνα την *Artemia sinica* (Cai, 1989), στο Θιβέτ την *Artemia tibetiana* (Abatzopoulos *et al.*, 1998) και την *Artemia sp.* (Pilla and Beardmore, 1994) στο Καζακστάν. Στον Νέο κόσμο απαντάται η *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) στη βόρεια Αμερική και Νότια Αμερική, ενώ στη Νότια Αμερική την *Artemia persimillis* (Piccinelli and Prosdocimi, 1968). Τα παρθενογενετικά στελέχη συναντώνται μόνο στον Παλαιό κόσμο (Triantaphyllides *et al.*, 1998). Πολύ πιθανόν εξαιτίας των γεωλογικών ανακατατάξεων δεν έγινε εποικισμός του

Νέου Κόσμου από παρθενογενετικά στελέχη (Lenz, 1987).

Η κατανομή της *Artemia* είναι κοσμοπολίτικη, αλλά όχι συνεχής, η παρουσία της περιορίζεται σε υδροβιότοπους, όπου επικρατούν συνθήκες αντίξοες για τη διαβίωση και αναπαραγωγή των περισσότερων άλλων ζωντανών οργανισμών. Οι βιότοποί της είναι συνήθως απομονωμένοι και δεν είναι δυνατή η ενεργητική μεταφορά ατόμων από έναν πληθυσμό σε άλλον, έστω και κοντινό. Ωστόσο, η διασπορά τους εξασφαλίζεται έμμεσα μέσω παθητικής μεταφοράς π.χ με τον άνεμο, τα πουλιά και τον άνθρωπο (Persoone and Sorgeloos, 1980). Οι κύστεις κολλάνε στο σώμα κυρίως στα πόδια των πουλιών ή μπορούν να παραμείνουν άπεπτες στα στομάχια τους για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα μέσα στο οποίο τα πουλιά πιθανόν να έχουν μεταναστεύσει, μεταφέροντας έτσι τις κύστεις σε πολύ μακρινές αποστάσεις, καθώς και η συνειδητή εισαγωγή ειδών *Artemia* σε επιλεγμένες περιοχές είναι αιτίες εποίκισμού νέων βιοτόπων από το γένος *Artemia* (Carpelan, 1957: MacDonad, 1980). Σχεδόν όλοι οι κατάλληλοι βιότοποι που βρίσκονται πάνω σε μεταναστευτικά μονοπάτια πουλιών έχουν εποίκιστεί με *Artemia*, κάτι που δε συμβαίνει με βιότοπους που δεν αποτελούν πέρασμα πουλιών (π.χ. ιδανικά αλίπεδα και υπεραλμυρές υδατοσυλλογές στη Βραζιλία της Νοτίου Αμερικής). Ιδανικοί βιότοποι για την *Artemia*, όπως οι ακτές της Βραζιλίας, που δεν αποτελούν μεταναστευτικά μονοπάτια δε θα είχαν ποτέ εποίκιστεί από πληθυσμούς *Artemia*, αν δεν είχε παρέμβει ο άνθρωπος (Persoone and Sorgeloos, 1980). Από πολύ παλιά γίνεται μεταφορά της *Artemia* από τον άνθρωπο για οικονομικούς λόγους.

Το κοινό γνώρισμα όλων των βιοτόπων της *Artemia* είναι η υψηλή αλατότητα. Η *Artemia* συναντάται σε ένα εύρος τιμών αλατότητας από 30-300 psu , αλλά το ενεργειακό κόστος είναι μεγάλο για τις οριακές τιμές. Η μελέτη των φυσιολογικών προσαρμογών του

ζώου και των συνθηκών που επικρατούν στους βιότοπους όπου εντοπίζονται οι πληθυσμοί του, οδήγησε παλιότερα στο συμπέρασμα ότι η *Artemia* "προτιμάει" τις υψηλές τιμές αλατότητας. Το συμπέρασμα αυτό όμως εγκαταλείφθηκε, καθώς το άριστο της ανάπτυξης ορισμένων πληθυσμών της στο εργαστήριο παρατηρείται σε αλατότητες κοντά στα 35%, περίπου αυτή του θαλασσινού νερού (Reeve, 1963). Η εναλλακτική εξήγηση, που φαίνεται πιο σωστή, είναι ότι η *Artemia* ανέχεται, δεν «προτιμάει» τις υψηλές τιμές αλατότητας γιατί εκεί βρίσκει καταφύγιο από τους θηρευτές της (*Titanias* sp., κέφαλοι (*Mugil* sp.) και πολλά καρκινοειδή, ενώ και το βραγχιόποδο *Branchinella spinosa* έχει αναφερθεί να θηρεύει ναυπλίους και μεταναυπλίους *Artemia* (Abatzopoulos *et al.*, 1999), καθώς ελάχιστοι υδρόβιοι οργανισμοί μπορούν να αντέξουν το ενεργειακό κόστος πάνω από τα 200 psu (Nimura, 1987). Επίσης και η απουσία μηχανισμών άμυνας περιορίζει την *Artemia* σε υπέραλα νερά αλυκών, λιμνών και λιμνοθαλασσών. Λίγοι οργανισμοί αντέχουν σε τέτοιο εύρος αλατότητας. Παραδείγματα τέτοιων οργανισμών είναι το μικρό ψάρι *Aphanius fasciatus*, που ζει σε λιμνοθάλασσες και είναι θηρευτής της *Artemia*, το δινομαστιγιωτό *Dunaliella salina*,, προνόμφες του δίπτερου εντόμου *Ephydra* sp. και αλόφιλα βακτήρια (π.χ. *Halobacterium*) (Davis, 1980). Έτσι, μπορούμε να πούμε ότι τα μεγάλα μεγέθη που επιτυγχάνουν οι πληθυσμοί της σε τέτοιους βιότοπους δεν είναι απλά αποτέλεσμα των προσαρμογών της, αλλά κυρίως της απουσίας θηρευτών. Η διαπίστωση αυτή, οδήγησε τους Persoone και Sorgeloos (1980) στη διαμόρφωση του εμπειρικού κανόνα, που γενικά ισχύει για την αλατότητα των υδατοσυλλογών όπου εντοπίζονται πληθυσμοί *Artemia* ότι “το κατώτερο όριο αλατότητας όπου επιβιώνει η *Artemia* είναι το μέγιστο για τους θηρευτές της που ζουν εκεί”. Ωστόσο, η *Artemia* δε μπορεί να προστατευτεί από το πλήθος των παρυδάτινων πτηνών, ιδιαίτερα αν η στήλη του νερού

που ζει είναι μικρή.

Η ανθεκτικότητα της *Artemia* σε υψηλές τιμές αλατότητας οφείλεται σε τρεις προσαρμοστικές ικανότητες (Persoone and Sorgeloos, 1980):

- α) στην ικανότητα ταχείας αύξησης της αιμοσφαιρίνης. Όσο αυξάνεται η τιμή της αλατότητας τόσο μειώνεται το σημείο κορεσμού του διαλυμένου στο νερό οξυγόνου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ανοξικών συνθηκών. Για να μπορέσει το ζώο να αντεπεξέλθει σε αυτές τις συνθήκες απέκτησε την ικανότητα να αυξάνει τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης ώστε να επιτυγχάνει αποτελεσματικότερη πρόσληψη του λιγοστού οξυγόνου,
- β) στο εξαιρετικό ωσμωρυθμιστικό σύστημα που διαθέτει (ευρύαλο καρκινοειδές) και
- γ) στη δυνατότητα παραγωγής διαπαυσιακών κύστεων, όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι δυσμενείς και θέτουν σε κίνδυνο τον πληθυσμό (Lavens and Sorgeloos, 1987).

Οι βιότοποι της *Artemia* μπορούν να διακριθούν σε δυο κατηγορίες (Persoone and Sorgeloos, 1980) :

- α) βιότοποι που επικοινωνούν με τη θάλασσα δηλαδή τις παραθαλάσσιες (συνήθως) υδατοσυλλογές με νερά θαλάσσιας προέλευσης αυξημένης αλατότητας, όπου το επικρατέστερο άλας είναι το χλωριούχο νάτριο. Επειδή δεν υπάρχει συνήθως άμεση ανταλλαγή νερών με τη θάλασσα, οι περιοχές αυτές είναι κυρίως αβαθείς λιμνοθάλασσες με έντονη εξάτμιση. Τη θερινή περίοδο οι βιότοποι αυτοί που καλούνται αλίπεδα (salt pans), χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αλατιού. Στην Ελλάδα όλοι οι βιότοποι στους οποίους έχουν εντοπιστεί πληθυσμοί *Artemia* ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία και είναι κυρίως οργανωμένες αλυκές (Αμπατζόπουλος, 1988).
- β) βιότοποι της *Artemia* που βρίσκονται στην ηπειρωτική χώρα, δηλαδή τις μεσόγειες υδατοσυλλογές υψηλής αλατότητας, με νερό μη θαλάσσιας προέλευσης, όπου τα

επικρατέστερα άλατα είναι διαφορετικά από το χλωριούχο νάτριο. Τα επικρατέστερα άλατα (ανθρακικά άλατα, τα άλατα θείου, καλίου) διαφέρουν ανάλογα με τις φερτές ύλες, τις κατακρημνίσεις και τη γεωλογία του υποστρώματος. Στη λίμνη Mono (Καλιφόρνια) επικρατούν τα ανθρακικά άλατα, στη λίμνη Charlín (Καναδάς) τα άλατα θείου και στις λίμνες της Nebraska (ΗΠΑ) τα άλατα καλίου (Cole and Brown, 1967).

Οι λόγοι για τους οποίους η *Artemia* δε συναντάται στην ανοικτή θάλασσα είναι: α) η ανατομική κατασκευή της και η έλλειψη αμυντικών μηχανισμών έναντι των θηρευτών (Persoone and Sorgeloos, 1980) και β) το μεγάλο σχετικά χρονικό διάστημα μέχρι την αναπαραγωγική ωριμότητα (Nimura, 1980).

1.4. Μορφολογία και τροφοληψία

Η αλατότητα και η περιεκτικότητα της τροφής σε καροτενοειδή μπορεί να καθορίσει το χρωματισμό του σώματος της *Artemia*. Η παρουσία έντονου κόκκινου χρώματος αποδίδεται κυρίως στη μεγάλη συγκέντρωση αιμοσφαιρινών που εξυπηρετούν την αποτελεσματική μεταφορά οξυγόνου σε περιβάλλον με χαμηλά επίπεδα οξυγόνου. Συνεπώς, όσο μικρότερη είναι η περιεκτικότητα του νερού σε οξυγόνο (συνήθως υψηλές αλατότητες) τόσο πιο έντονο κόκκινο γίνεται το χρώμα του ατόμου. Σε καλά οξυγονωμένα νερά το χρώμα είναι ελαφρώς πορτοκαλόχρουν ως και πράσινο για κάποια αρσενικά. Το πράσινο χρώμα εμφανίζεται κυρίως όταν η διαίτα του ζώου βασίζεται σε χλωροφύκη ενώ το χρυσοκόκκινο οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση καροτενοειδών στην τροφή.

Στο κεφάλι του ενήλικου ατόμου μπορούμε να παρατηρήσουμε, με γυμνό μάτι ένα ζεύγος σύνθετων έμμισχων οφθαλμών, την οφθαλμική κηλίδα στο μέσο, και δυο ζεύγη κεραιών, εκ των οποίων το ένα ζεύγος αποτελεί διακριτικό γνώρισμα μεταξύ των δυο

φύλων, στους αμφιγονικούς πληθυσμούς. Στα θηλυκά άτομα διατηρείται η απλή μορφολογία του ζεύγους αυτού, ενώ στα αρσενικά οι κεραίες (2^ο ζεύγος - antenna) διαφοροποιούνται σε ισχυρά όργανα σύλληψης για συγκράτηση του θηλυκού κατά το ζευγάρισμα. Η τελική μορφή των διαφοροποιημένων κεραιών του αρσενικού διαφέρει από είδος σε είδος.

Στους ναυπλίους *Artemia* διακρίνονται τρία ζεύγη εξαρτημάτων: α) ένα ζεύγος κεραιών που χρησιμεύουν στην κίνηση, β) ένα ζεύγος μικρότερων αισθητηρίων κεραιών, και γ) στοιχειώδη στοματικά μόρια.

Το σώμα καλύπτεται από λεπτό εξωσκελετό χιτίνης. Το μήκος των ζώων κυμαίνεται από 8 ως 12 mm στα διπλοειδή αμφιγονικά στελέχη, ενώ στα πολυπλοειδή παρθενογενετικά μπορεί να φτάσει τα 20 mm (Abatzopoulos, 1988: Lavens and Sorgeloos, 1996). Το ενήλικο ζώο κινείται συνέχεια με αρμονικές κινήσεις, αποτέλεσμα του συντονισμού των 11 ζευγών θωρακικών ποδιών. Τα πόδια εξυπηρετούν όχι μόνο την κίνηση, αλλά και την αναπνοή και την τροφοληψία. Το κάθε πόδι αποτελείται από το εξωπόδιο που λειτουργεί ως βράγχιο (όργανο αναπνοής) (Schrehardt, 1987b), το ενδοπόδιο που χρησιμεύει για τη μετακίνηση (Schrehardt, 1987b), ενώ η συντονισμένη κίνηση των ποδιών επιτρέπει στα τελοπόδια να σχηματίζουν στο εσωτερικό μια αποτελεσματική συσκευή συλλογής και διήθησης σωματιδίων θρεπτικών ή μη (τροφοληψία) (Barlow and Sleight, 1980: Schrehardt, 1987b: Persoone and Sorgeloos, 1980). Η *Artemia* είναι μη επιλεκτικός διηθηματοφάγος οργανισμός, που προσλαμβάνει ασταμάτητα αιωρούμενα σωματίδια, μικροφύκη, πρωτόζωα και βακτήρια μεγέθους ως 50 μm (Dobbeleir *et al.*, 1980) από τη στήλη του νερού. Η διήθηση του νερού γίνεται διαρκώς και με αυξανόμενο ρυθμό που φτάνει στα τελευταία στάδια της ανάπτυξης το 90% της μέγιστης τιμής (Tobias

et al., 1979).

Μετά τη στοματική κοιλότητα ακολουθεί ο οισοφάγος, το έντερο και τέλος η έδρα που εκβάλλει μεταξύ των δύο κερκοποδίων του τέλους (απόληξη της ουράς).

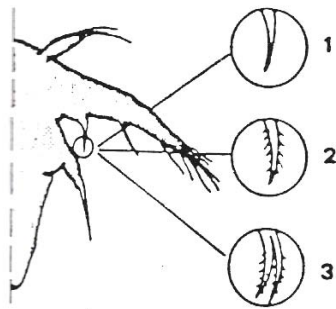
Η τροφοληψία στην *Artemia* υποδιαιρείται σε 3 μέρη: α) παραγωγή ρεύματος νερού με τη συγχρονισμένη κίνηση των φυλλοποδίων, β) συλλογή σωματιδίων τροφής από το ρεύμα νερού και γ) μεταφορά τροφής στο στόμα. Η *Artemia* καθώς κινείται συλλέγει τροφή με τη βοήθεια ενός ζεύγους κεραιών και των φυλλοποδίων, δημιουργεί ένα ρεύμα νερού που προωθείται προς το στόμα όπου εκεί γίνεται η μη επιλεκτική διήθηση (Barlow and Sleight, 1980; Schrehardt, 1987a). Τα φυλλοπόδια φέρουν στη βάση τους ένα αδένια που εκκρίνει μια οργανική ουσία η οποία βοηθά στη συγκόλληση των σωματιδίων της τροφής σε μεγαλύτερα συσσωματώματα (Schrehardt, 1987a).

Στη συνέχεια η τροφή διαπερνά τον οισοφάγο χωρίς να υφίσταται μηχανική επεξεργασία. Η πέψη της τροφής (παραγωγή πεπτικών ενζύμων), η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών και η αποθήκευση γλυκογόνου και λιπιδίων γίνεται στο επιθήλιο του μεσαίου εντέρου (Schrehardt, 1987a).

Στα πρώτα δυο μεταμερή της κοιλιάς βρίσκονται οι γονάδες. Οι αναπαραγωγικοί ιστοί του θηλυκού εντοπίζονται στις δυο ωοθήκες που εκβάλλουν σε ένα διογκωμένο ωόσακο και του αρσενικού σε ένα ζεύγος όρχεων και δυο πέη. Στο τέλος της κοιλιάς σχηματίζεται το τέλος. Αυτό αποτελείται από δυο κερκοπόδια που φέρουν σμήριγγες και ανάμεσά τους βρίσκεται η έδρα. Τόσο το μέγεθος όσο και ο αριθμός των σμηριγγών πάνω στο τέλος εξαρτάται από την αλατότητα (Amat, 1980).

Η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση των προνυμφών πραγματοποιείται σε 15 διαδοχικές εκδύσεις. Τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια χαρακτηρίζονται ως στάδια I, II και III

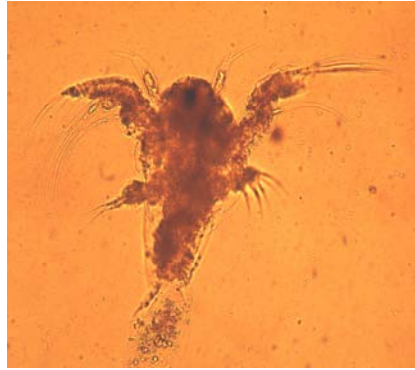
(instars -I, -II, -III), και είναι αυτά που κυρίως έχουν μεγάλη σημασία εμπορική και οικονομική. Η διάκριση των τριών αυτών πρώτων σταδίων γίνεται μικροσκοπικά με τον έλεγχο της γναθοβασικής προεξοχής (Εικ. 1).



1. Στάδιο I: απλή μορφολογία της γναθοβασικής προεξοχής
2. Στάδιο II: εμφάνιση τριχιδίων
3. Στάδιο III: χαρακτηριστικός σχηματισμός “διχάλας”

Εικόνα 1. Μορφολογία της γναθοβασικής προεξοχής σε ναυπλίους των τριών πρώτων σταδίων (Αμπατζόπουλος, 1988)

Ο ναύπλιος παραμένει στο στάδιο I (μήκος 400-500 μm) για 6 περίπου ώρες, έχει έντονο πορτοκαλί χρώμα εξαιτίας των αποθεμάτων λεκίθου, είναι αδιαφανής και ανθεκτικός σε απότομες διακυμάνσεις αλατότητας, θερμοκρασίας και pH. Παρουσιάζει αργή διακοπτόμενη κίνηση, η οποία γίνεται με ένα ζεύγος κεραιών. Υπάρχουν στοιχειώδη στοματικά μόρια (Schrehardt, 1987a), αλλά ο πεπτικός του αγωγός είναι ακόμη τυφλός, πράγμα που απομονώνει τον οργανισμό από το εξωτερικό περιβάλλον. Δεν τρέφεται αλλά καταναλώνει δικά του αποθέματα ενέργειας (λέκιθο) (Benijts *et al.*, 1976). Σημειωτέον είναι η εντυπωσιακή ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν οι νάυπλιοι του σταδίου I σε απότομες μεταβολές των περιβαλλοντικών παραμέτρων. Μεταξύ των δυο αισθητήριων κεραιών βρίσκεται η οφθαλμική κηλίδα (φωτοτακτικό αισθητήριο) (Εικ. 2).



Εικόνα 2. Ναύπλιος σταδίου I *Artemia franciscana* (GSL)

Στο στάδιο II (που διαρκεί 10 περίπου ώρες) ο ναύπλιος αυξάνει σε μήκος, συνεχίζει να τρέφεται με την αποθηκευμένη λέκιθο, μειώνονται τα αποθέματα λεκίθου, οπότε γίνεται πιο διαφανής και ευάλωτος ενώ αρχίζει η δημιουργία του στόματος και της έδρας. Στο τέλος αυτού του σταδίου αρχίζει τη μη επιλεκτική διήθηση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βιοενσωμάτωση φαρμάκων, αντιβιοτικών, προβιοτικών, βιταμινών, λιπαρών οξέων, στερεοειδών, κερατινοειδών κ.α. Η βιοενσωμάτωση στην *Artemia* γίνεται, γιατί τα εκτρεφόμενα είδη μπορεί να μην έχουν την ικανότητα βιοσύνθεσης ορισμένων ουσιών ή να εφαρμόζεται για θεραπευτικούς λόγους.

Από το στάδιο III (40 περίπου ώρες) και μετά, ο ναύπλιος διπλασιάζεται σε μέγεθος, είναι διαφανής, ολοκληρώνεται ο πεπτικός του σωλήνας (λειτουργικός) και αρχίζει πλέον να τρέφεται κανονικά ως διηθηματοφάγος οργανισμός. Μετά το στάδιο αυτό ονομάζεται μεταναύπλιος. Στις υπόλοιπες εκδύσεις συμπληρώνεται η διαφοροποίηση σε αρσενικό ή θηλυκό εφόσον πρόκειται για αμφιγονικό στέλεχος και ο σχηματισμός των υπόλοιπων δομών του ενήλικου. Στις 12 εκδύσεις αποκτά 11 ζεύγη θωρακικών ποδιών και λειτουργικά αναπαραγωγικά όργανα. Λεπτομερή αναφορά στη μορφολογία της *Artemia* γίνεται από τον Schrehardt (1987a, b). Κάθε άτομο εκδύεται 15 φορές από τη στιγμή της

εκκόλαψης μέχρι την αναπαραγωγική ωριμότητα.

Τα στάδια I, II και III έχουν ιδιαίτερο οικονομικό ενδιαφέρον στις υδατοκαλλιέργειες, γιατί χρησιμοποιούνται ως τροφή υψηλής θρεπτικής αξίας. Οι κυριότεροι λόγοι είναι η μεγάλη θερμιδική αξία, το μικρό και ποικίλο μέγεθος, η αργή και συνεχής κίνηση, η απουσία αμυντικών μηχανισμών (εύκολο θήραμα) και η δυνατότητα μεταφοράς ουσιών μέσω της βιοενσωμάτωσης (τέλος σταδίου II).

1.5. Αναπαραγωγή

Οι δυο τύποι αναπαραγωγής που παρατηρούνται στην *Artemia* είναι ο εγγενής και ο αγενής (βασικό κριτήριο διάκρισης) για τα αμφιγονικά και παρθενογενετικά είδη αντίστοιχα (Barigozzi, 1974; Abreu-Grobois, 1987). Ένα ενήλικο άτομο *Artemia* καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του εμφανίζει μόνο έναν από τους δυο τύπους. Στο Νέο Κόσμο (Αμερική) υπάρχουν μόνο αμφιγονικά στελέχη, τα οποία ταξινομούνται σε δυο είδη : στην *Artemia franciscana* και στην *Artemia persimilis* (αποκλειστικά του Νέου Κόσμου) ενώ στο παλαιό κόσμο (Ευρώπη) υπάρχουν και οι δυο αναπαραγωγικές στρατηγικές: αμφιγονικά (*Artemia salina*) (Triantaphyllidis *et al.*, 1997a), και παρθενογενετικά στελέχη (*Artemia parthenogenetica*). Στην Ελλάδα έχει παρατηρηθεί μόνο το είδος *Artemia parthenogenetica* (Abatzopoulos *et al.*, 1986, 1987; Αμπατζόπουλος, 1988; Triantaphyllidis *et al.*, 1998).

Ανεξάρτητα του τύπου αναπαραγωγής η *Artemia* μπορεί να παράγει είτε κύστεις (ωοτοκία) είτε ναύπλιους (ζωοτοκία). Η ύπαρξη δυο τρόπων αναπαραγωγής είναι χαρακτηριστικό του γένους *Artemia*: έτσι, ενώ όλα τα ανόστρακα καρκινοειδή των γλυκών νερών είναι αποκλειστικά ωοτόκα εξαιτίας της ύπαρξης μεγαλύτερης σταθερότητας στους

βιοτόπους τους, η *Artemia* παρουσιάζει εναλλαγή ανάμεσα στην παραγωγή κύστεων (ωοτοκία) και την παραγωγή ναυπλίων (ζωοτοκία) (Persoone and Sorgeloos, 1980). Η δυνατότητα εναλλαγής μεταξύ ωοτοκίας / ζωοτοκίας μπορεί να αποτελεί το καθρέφτη των συνθηκών που αντιμετώπισε η *Artemia* κατά την εξελικτική της πορεία (Lenz, 1987).

Τα ωάρια (γονιμοποιημένα ή όχι) από τις ωοθήκες περνούν στη μήτρα, συμπληρώνοντας ένα κύκλο που συνήθως διαρκεί 24 με 48 ώρες. Τα ωάρια παραμένουν για 3-5 μέρες στη μήτρα και απελευθερώνονται ως κύστεις (ωοτοκία) ή ως ναύπλιοι (ζωοτοκία) (D'Agostino, 1980). Έχει επίσης παρατηρηθεί σύγχρονη απελευθέρωση κύστεων και ναυπλίων. Ο αριθμός των απογόνων ανά γέννα ποικίλλει από 200-300 και συνολικά φτάνει μέχρι 1.600 (Lenz, 1987).

Η ικανότητα εναλλαγής από την ωοτοκία στην ζωοτοκία και αντίστροφα προέκυψε πιθανά από την εποίκιση της *Artemia* σε “ασταθές” περιβάλλον (Lavens and Sorgeloos, 1987). Η παραγωγή ναυπλίων (ζωοτοκία) αποτελεί μια τακτική για γρήγορη αύξηση του πληθυσμού σε περιόδους ευνοϊκές για αυτόν. Επιτρέπει τη δημιουργία ενός πληθυσμού δομημένο από διάφορα αναπτυξιακά στάδια (επικαλυπτόμενες γενιές), πράγμα πολύ σημαντικό για την επιβίωση του πληθυσμού, η ευαισθησία κάθε αναπτυξιακού σταδίου έναντι σε απότομες διακυμάνσεις των περιβαλλοντικών συνθηκών διαφέρει. Φαίνεται πως η ταυτόχρονη παρουσία διάφορων αναπτυξιακών σταδίων καθιστά τον πληθυσμό πιο ευέλικτο και επομένως εξασφαλίζει το μέλλον του.

Από την άλλη, η απελευθέρωση κύστεων (ωοτοκία) από την *Artemia* νωρίς κατά την αναπαραγωγική περίοδο ή η υψηλή αναλογία ωοτοκίας / ζωοτοκίας δίνει πλεονέκτημα σε ένα πληθυσμό που ζει σε έντονα ασταθή περιβάλλοντα (Αμπατζόπουλος, 1988).

1.6. Η χρήση της *Artemia* στις υδατοκαλλιέργειες

Το ζωοπλαγκτό, είναι η τροφή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα πρώτα στάδια ζωής των εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών (ψάρια, καρκινοειδή), γι' αυτό και σήμερα πραγματοποιείται ελεγχόμενη μαζική παραγωγή διάφορων ειδών ζωοπλαγκτικών οργανισμών, οι οποίοι μάλιστα χορηγούνται στις εκτροφές σε διάφορες φάσεις του βιολογικού τους κύκλου των εκτρεφόμενων ψαριών, όπως η *Artemia sp.* (ως αυγά - προνυμφικά άτομα – ενήλικα άτομα).

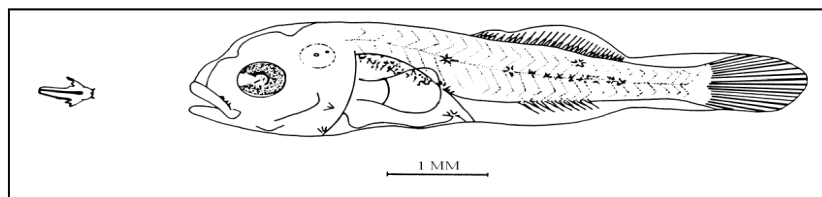
Εκτός από τις κύστες *Artemia* στις υδατοκαλλιέργειες χρησιμοποιείται και βιομάζα *Artemia* (ανώριμα και ενήλικα άτομα) που συλλέγεται από τους φυσικούς βιότοπους και τις αλυκές ή από καλλιέργειες (Tackaert and Sorgeloos, 1991). Εξαιτίας αυτής της χρήσης της παρουσιάζει μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον.

Η χρήση ναυπλίων της *Artemia* ως ζωντανή τροφή για τις νύμφες των ψαριών και των καρκινοειδών είναι πολύ διαδεδομένη στις θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες αλλά και στις υδατοκαλλιέργειες γλυκών υδάτων ή σε εργαστήρια, για πειραματικούς σκοπούς (Kolkovski *et al.*, 2000).

Η ανακάλυψη το 1933 από τον Seale στις Η.Π.Α. και το 1939 από τον Rollefsen στη Νορβηγία ότι οι ναύπλιοι της *Artemia* συνιστούν μια εξαιρετική τροφή για τις νύμφες των ψαριών, αποτέλεσε ένα πολύ σημαντικό βήμα προόδου για την παραγωγή ιχθυδίων και επομένως για την ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών. Αν και η *Artemia* δεν είναι μια φυσική τροφή καθώς οι φυσικοί χώροι παρουσίας της χαρακτηρίζονται από την απουσία πιθανών θηρευτών, χρησιμοποιήθηκε και χρησιμοποιείται από τότε ευρύτατα και με επιτυχία ως τροφή για διάφορους υδρόβιους οργανισμούς (π.χ. ψάρια, καρκινοειδή, ανεμώνες) (Sorgeloos, 1980).

Το πιο δύσκολο στάδιο στην εκτροφή υδρόβιων ζωικών οργανισμών, είναι αναμφίβολα η ανάπτυξη των νυμφικών τους σταδίων. Πρωτεύουσας σημασίας είναι η επιλογή κατάλληλης τροφής για τις νεαρές νύμφες έτσι ώστε να ικανοποιήσουν τις τροφικές απαιτήσεις κατά την μετάβαση από την ενδογενή, στην εξωγενή διατροφή.

Το μέγεθος των ζωοπλαγκτικών οργανισμών που καταναλώνονται εξαρτάται από το άνοιγμα του στόματος των ψαριών το οποίο εξαρτάται από το "είδος" του ψαριού και από το μήκος του. Σε γενικές γραμμές, ο σπουδαιότερος περιοριστικός παράγοντας είναι το πλάτος της τροφής, αλλά επειδή συχνά το πλάτος είναι συνάρτηση του μήκους και τα δύο αυτά μεγέθη λαμβάνονται υπ' όψιν για τον προσδιορισμό της "κατάλληλης τροφής" (Κεντούρη, 1990). Η χορήγηση ως τροφή μεγάλου μεγέθους ειδών *Artemia* μπορεί να προκαλέσει μια ελλιπή ανάπτυξη στις νύμφες των ψαριών, ή και θάνατο (Εικ. 3).



Εικόνα 3. Νύμφη Red drum και πρόσφατος εκκολαπτόμενος ναύπλιος *Artemia* (Treece, 2000)

Οι ναύπλιοι της *Artemia* μπορούν να ζουν με τη λέκιθο και να διατηρούν αποθέματα μέχρι και για 5 ημέρες αλλά το περιεχόμενό τους σε θερμίδες και πρωτεΐνες μειώνεται κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου (Treece, 2000). Στα στάδια II και III παρατηρείται μείωση κατά 39 % σε ενέργεια και 34 % σε ξηρό βάρος διότι έχει λάβει χώρα η κατανάλωση αρκετής ποσότητας λεκίθου χωρίς παράλληλα ο οργανισμός να τρέφεται από το περιβάλλον (Sorgeloos *et al.*, 1986; Leger *et al.*, 1986).

Οι ναύπλιοι του σταδίου I και II της *Artemia* αποτελούν τις δυο περισσότερο διαδεδομένες μορφές που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες. Είναι σημαντικό να

χρησιμοποιούνται ναύπλιοι σταδίου I ως τροφή, παρά ναύπλιοι σταδίου II. Εάν οι ναυπλίοι του σταδίου I μπορούν να καταναλωθούν τότε αυτό συνεπάγεται με ενεργειακό κέρδος, δεδομένου ότι οι νύμφες εκμεταλλεύονται όλη τη διαθέσιμη λέκιθο και τα υπόλοιπα αποθέματα που έχουν αποθηκευτεί στους πρόσφατα εκκολαπτόμενους ναυπλίους σταδίου I. Στην περίπτωση καθυστέρησης όπου οι νύμφες έχουν μεγαλώσει απαιτείται η χορήγηση εμπλουτισμένων ναυπλίων σταδίου II για την κάλυψη της ενεργειακής τους απώλειας (Sorgeloos *et al.*, 1986: Leger *et al.*, 1986).

Επίσης το σκούρο πορτοκαλί χρώμα που φέρουν οι πρόσφατα εκκολαπτόμενοι ναύπλιοι (σταδίων I και II) κάνει πιο εύκολο το έργο των θηρευτών σε αντίθεση με τους ναύπλιους των υπόλοιπων σταδίων που είναι διαφανείς άρα λιγότερο ορατοί (Treece, 2000).

Τα ψάρια που παράγουν μικρά αυγά, όπως ο σπάρρος, το καλκάνι κ.ά τρέφονται αρχικά με τροχόζωα εξαιτίας του μικρού μεγέθους του στόματος τους. Το μέγεθος των ναυπλίων της *Artemia* είναι αυτό που καθορίζει πότε τα ψάρια μπορούν να οδηγηθούν από μια διατροφή με τροχόζωα σε μια διατροφή με *Artemia*. Εφ' όσον όμως το μέγεθος των θηραμάτων δεν αποτελεί πρόβλημα, η πρόσληψη και η χρήση μεγαλύτερων ναυπλίων (με υψηλότερο ενεργειακό περιεχόμενο) θα είναι ευεργετική δεδομένου ότι ο θηρευτής θα ξοδέψει λιγότερη ενέργεια για να λάβει έναν μικρότερο αριθμό μεγαλύτερων ναυπλίων για να ικανοποιήσει τις ενεργειακές του απαιτήσεις παρά ένα μεγάλο αριθμό μικρών ναυπλίων.

Ένας οργανισμός που χρησιμοποιείται ως τροφή πρέπει πρώτα απ' όλα να καλύπτει τις ανάγκες του καταναλωτή του. Η *Artemia* παρουσιάζει σημαντικό προβάδισμα έναντι των άλλων οργανισμών που χρησιμοποιούνται ως ζωντανή τροφή, καθώς ανταποκρίνεται πολύ καλά σε απαιτήσεις καλλιεργητών και θηρευτών. Διαθέτει τα εξής πλεονεκτήματα

(Leger *et al.*, 1986, 1987a) :

- ✦ Συνεχή διαθεσιμότητα: οι κύστεις της είναι ανενεργά έμβρυα τα οποία είναι δυνατό να αποθηκευθούν και να διατηρηθούν σχετικά εύκολα για μεγάλο χρονικό διάστημα.
- ✦ Απλή διαδικασία παραγωγής: δε χρειάζεται να συντηρούνται συνεχείς καλλιέργειες, όπως στα τροχόζωα και στα μικροφύκη. Όταν χρειαστούν ακόμη και μεγάλες ποσότητες ναυπλίων είναι δυνατό να παραχθούν εύκολα και γρήγορα (σε 24 περίπου ώρες) από τις κύστεις.
- ✦ Ανθεκτικότητα και ευκολία εκτροφής: οι ναύπλιοι της *Artemia* αντέχουν σε σχετικά μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και αλατότητας (σε σύγκριση με άλλους οργανισμούς) και δε χρειάζονται εξαιρετικά προσεγμένους χειρισμούς.
- ✦ Κυρίως καθαρή τροφή, απ' όπου απουσιάζουν ξένοι οργανισμοί και προσμίξεις, παράλληλα δε, δεν είναι φορέας μεταδοτικών ασθενειών
- ✦ Εύκολη απομάκρυνση μικροβίων: αυτό γίνεται κυρίως κατά την αποκελύφωση των κύστεων με χρήση χλωρίνης, έτσι ώστε να αποφεύγονται μολύνσεις από επικίνδυνους μικροοργανισμούς.
- ✦ Μειώνει τα ποσοστά θνησιμότητας των ιχθυδίων λόγω της χρήσης αποκελυφωμένων κύστεων που δεν αποφράσσουν τις αναπνευστικές οδούς αφενός και αφετέρου λόγω της παρουσίας ναυπλίων μήκους μεγέθους μικρότερου από 480 μm, το πλάτος των οποίων είναι μικρότερο από το άνοιγμα του στόματος των νυμφών των περισσότερων θηρευτών.
- ✦ Ελκυστική και εύληπτη ως τροφή: το φωτεινό χρώμα και η διαρκής κίνηση που την χαρακτηρίζουν, έχουν ως αποτέλεσμα, να γίνεται αμέσως αντιληπτή και κατά συνέπεια εύκολα προσλήψιμη από τους θηρευτές. Οι ναύπλιοι της γίνονται εύκολα αντιληπτοί

και καθώς δε διαθέτουν μηχανισμούς άμυνας συλλαμβάνονται χωρίς δυσκολία από τους θηρευτές.

- ▲ Είναι εύπεπτη τροφή: περιέχει ορισμένα πεπτικά ένζυμα όπως η αμυλάση και η θρυψίνη, που μεταφέρονται στο έντερο του ιχθυδίου και παίζουν σημαντικό ρόλο στην υδρόλυση και αφομοίωση της τροφής
- ▲ Επιτρέπει την επιλογή κατάλληλου συνδυασμού μεγέθους και θρεπτικού περιεχομένου: υπάρχουν πολλά στελέχη *Artemia* που διαφέρουν στο μέγεθος των κύστεων και ναυπλίων τους, καθώς και στο θρεπτικό περιεχόμενό τους, με αποτέλεσμα να δίνεται η δυνατότητα στον καλλιεργητή να επιλέγει το στέλεχος με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Επίσης, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια της *Artemia*, σε πιο προχωρημένα αναπτυξιακά στάδια θηρευτών, όπως επίσης και αποκελυφωμένες κύστεις για την περίπτωση καταναλωτών που χρειάζονται σωματίδια τροφής μικρού μεγέθους, αλλά πλούσια σε ενέργεια.
- ▲ Έχει υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο: θα πρέπει όμως, να αναφερθεί ότι παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση στην ανάπτυξη των ιχθυδίων, αν χρησιμοποιηθούν στελέχη *Artemia* από διαφορετικούς γεωγραφικούς τόπους εξαιτίας της διαφοράς τους σε ενεργειακό περιεχόμενο και σε ξηρό βάρος

Γι' αυτό συνίσταται η χρησιμοποίηση στελεχών *Artemia* με μεγάλο ενεργειακό περιεχόμενο όπως και η χρησιμοποίηση ναυπλίων σταδίου I. Για την επιλογή του καταλληλότερου, στελέχους *Artemia* σαν τροφή για τα καλλιεργούμενα ιχθύδια πρέπει να εξετάζονται:

- I. η ποιότητα και ποσότητα εκκόλαψης των κύστεων,
- II. το μέγεθος των ναυπλίων που παράγονται και

III. η θρεπτική αξία των ναυπλίων (σε πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, ακόρεστα λιπαρά οξέα).

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αποκελυφωμένες κύστεις *Artemia* αποτελούν την πιο πλούσια ενεργειακά μορφή της και καλύπτουν τις ενεργειακές ανάγκες όλων των ειδών ακόμη και εκείνων που τρέφονται αποκλειστικά με κινούμενη λεία.

- ▲ Παρέχει όλα τα απαιτούμενα συστατικά στους περισσότερους θηρευτές: Σε γενικές γραμμές η χημική ανάλυση των κύστεων και κυρίως των ναυπλίων της *Artemia* την αναδεικνύει σε ισορροπημένη δίαιτα, σε πρωτεΐνες και λιπίδια, ικανοποιητική για τους περισσότερους θηρευτές.

Σε εργαστηριακές αναλύσεις και μελέτες στο πεδίο, παρατηρήθηκε ότι η *Artemia* ικανοποιεί τις διατροφικές απαιτήσεις των περισσότερων εκτρεφόμενων ειδών σε πρωτεΐνες. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα που προσλαμβάνουν τα ιχθύδια από τη συγκεκριμένη τροφή, είναι σημαντικά για την καλή υγεία, ανάπτυξη και επιβίωσή τους. Η ιδανική τροφή πρέπει να διαθέτει υψηλά ποσά σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) της σειράς ω-3. Αναλύσεις που έχουν γίνει στα περισσότερα στελέχη *Artemia*, έδειξαν την ύπαρξη του εικοσιπεντανοϊκού 20:5(ω-3) και του εικοσιδυοεξανοϊκού 22:6(ω-3) σε επίπεδα χαμηλότερα από τα απαιτούμενα για τα ιχθύδια. Οι ανάγκες καλύπτονται με εμπλουτισμό. Βέβαια, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται στελέχη *Artemia*, που ήδη περιέχουν μεγαλύτερα ποσά πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Στον Ελλαδικό χώρο, οι ιχθυογεννητικοί σταθμοί χρησιμοποιούν στελέχη *Artemia* (π.χ Great Salt Lake) που έχουν εισαχθεί από το εξωτερικό και παρουσιάζουν σημαντικές ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές.

Σε γενικές γραμμές το θρεπτικό περιεχόμενο της *Artemia* είναι: 51-55% πρωτεΐνες, 14-15 % υδατάνθρακες, 13-19% λίπους, και 3-15% PUFA της σειράς ω-3 (Trecee, 2000).

Σήμερα, οι ερευνητές προκειμένου να εκτιμήσουν την καταλληλότητα ενός στελέχους που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε υδατοκαλλιέργειες, εκτός από το λιπιδικό περιεχόμενο, μελετούν επίσης το πρωτεϊνικό περιεχόμενο (και' τα ελεύθερα αμινοξέα), τα καροτενοειδή και τις βιταμίνες (κυρίως την C), που περιέχονται στις κύστες, τους ναύπλιους και τα ενήλικα άτομα των διάφορων στελεχών (Lavens and Sorgeloos, 1996).

Από έρευνες που έγιναν σε εκκολαπτήρια της Ελλάδας βρέθηκε ότι η διάρκεια εκτροφής με εμπλουτισμένη *Artemia* είναι περίπου 34 ημέρες για τα ιχθύδια τσιπούρας και 42 ημέρες για τα ιχθύδια λαβρακιού ενώ η διάρκεια εκτροφής με μη εμπλουτισμένη *Artemia* είναι γύρω στις 10 ημέρες για τα ιχθύδια και των δύο ειδών. Αυτό είναι πολύ σημαντικό γιατί περιορίζει τη χορήγηση τυποποιημένης τροφής (Καστρίτση-Καθάρου και συν., 1998).

▲ Παρέχει τη δυνατότητα βιοενσωμάτωσης. Ζωντανοί ναύπλιοι *Artemia* έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς ενώσεων διαφορετικής θρεπτικής ή/και θεραπευτικής αξίας στα νυμφικά στάδια των υδρόβιων (Gomez-Gil *et al.*, 1998).

1.6.1 Βιοενσωμάτωση

Την τελευταία δεκαετία παρατηρείται μεγάλο ενδιαφέρον από επιστήμονες για τη βελτίωση μεθόδων και μέσων εμπλουτισμού ζωντανών τροφών λόγω των σημαντικών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν έναντι των τυποποιημένων.

Διαφορετικά είδη ζωντανού θηράματος έχουν χρησιμοποιηθεί ως τροφή για τις νύμφες θαλασσίων οργανισμών. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα κωπήποδα, τροχόζωα, ναύπλιοι *Artemia* κ.ά.

Μέχρι σήμερα, οι ναύπλιοι *Artemia* θεωρούνται η καλύτερη διατροφή για τη θρέψη των σαρκοφάγων οργανισμών και χορηγούνται ως ζωντανή τροφή σε περισσότερα από τα 85% των εκτρεφόμενων ειδών (Gelabert, 2003). Στις περισσότερες νύμφες θαλασσίων ψαριών, ο εμπλουτισμός των ναυπλίων σε *Artemia* χρησιμοποιείται συνήθως δεδομένου ότι ενισχύει την αύξηση και την επιβίωση των νυμφών (Kolkovski *et al.*, 2000).

Μια από τις σημαντικότερες ιδιότητες της *Artemia* είναι ότι παρέχει τη δυνατότητα βιοενσωμάτωσης. Οι ναύπλιοι της *Artemia*, από κάποιο στάδιο και μετά, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν ως φορείς θρεπτικών ουσιών, προβιοτικών, χρωστικών, στεροειδών, ανοσοενισχυτικών και αντιβιοτικών που δεν είναι δυνατό ή είναι δύσκολο να χορηγηθούν με άλλον τρόπο σε νύμφες ψαριών και καρκινοειδών, μέσω μια διαδικασίας γνωστή ως βιοενσωμάτωση (Gomez-Gil *et al.*, 1998). Οι περισσότερες από τις εκθέσεις για την βιοενσωμάτωση αναφέρονται στον εμπλουτισμό της *Artemia* στο στάδιο του ναυπλίου.

Στο τέλος του σταδίου II, όπου οι ναύπλιοι έχουν ολοκληρώσει την ανάπτυξη του πεπτικού τους συστήματος (στόμα-έδρα) και έχουν αρχίσει τη μη επιλεκτική διήθηση μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βιοενσωμάτωση ουσιών (Léger *et al.*, 1986a).

Οι ναύπλιοι μεταφέρονται στη δεξαμενή εμπλουτισμού με μια πυκνότητα 100-300 ναυπλίων/ml για μια περίοδο εμπλουτισμού 24 ή και μέχρι 48 ωρών αντίστοιχα. Το εμπλουτιστικό μέσο προστίθεται σε διαδοχικές δόσεις των 0,3 g/l κάθε 12 ώρες. Απαιτείται ισχυρός αερισμός χρησιμοποιώντας παρόλιθους ή καθαρό οξυγόνο για να διατηρηθούν τα επίπεδα του διαλυμένου οξυγόνου πάνω από 4 mg/l. Οι εμπλουτισμένοι

ναύπλιοι περισυλλέγονται μετά από 24 ή 48 ώρες (Lavens and Sorgeloos, 1996).

Οι παράγοντες που παίζουν το σημαντικότερο ρόλο σε μια επιτυχή βιοενσωμάτωση είναι η γεωγραφική προέλευση της *Artemia* (καταγωγή, παρτίδα), το εμπλουτιστικό μέσο (σύνθεση), οι συνθήκες του εμπλουτισμού (αρχικό στάδιο ανάπτυξης του ναυπλίου, ο χρόνος και η διάρκεια του εμπλουτισμού, της δόσης) και οι διαφορετικές τεχνικές που ποικίλλουν ανάλογα με τις συνθήκες εκκόλαψης και τον χρόνο που μεσολαβεί μεταξύ της εκκόλαψης και της προσθήκης του εμπλουτιστικού μέσου (Han *et al.*, 2000).

Από τα αποτελέσματα της έρευνας του Reeve (1963) και του Gelabert (2003) εξάγεται το συμπέρασμα ότι η βιοενσωμάτωση θα πρέπει να πραγματοποιείται λαμβάνοντας κυρίως υπόψη το μέγεθος των οργανισμών καθώς και τη συγκέντρωση της τροφής ώστε να μπορεί να επιτευχθεί ένα κατάλληλο επίπεδο κορεσμού της πεπτικής οδού, χωρίς πλεόνασμα της τροφής που θα μπορούσε τελικά να λειτουργήσει ενάντια στην ποσότητα του μέσου.

Η *Artemia* παρουσιάζει μικρή μετατρεψιμότητα της τροφής δηλαδή μόνο το 10 – 20 % που περνάει από τον πεπτικό σωλήνα αφομοιώνεται σε βιομάζα, το υπόλοιπο αποβάλλεται αχώνευτο με τη μορφή συσσωματώματος περιβαλλόμενο από βλέννα. Ο Reeve έδειξε ότι όσο αυξάνεται η διαθεσιμότητα της τροφής, η μεταφορά διαμέσου του εντέρου της *Artemia* γίνεται ταχύτερα, ο δε ρυθμός μεταφοράς καθορίζει την αποτελεσματικότητα της αφομοίωσης (Reeve, 1963). Η ανάπτυξη της *Artemia* καθυστερεί με πλεόνασμα τροφής, πιθανόν εξαιτίας μειωμένης απορρόφησης θρεπτικών συστατικών κατά την πέψη (Nimura, 1980).

Σήμερα, υπάρχουν πολλά προϊόντα εμπλουτισμού όπως: ζωντανά μικροφύκη, γαλακτώματα ιχθυελαίων (Super Selco, DC Selco, Algamac 2000, Red Pepper, Arti-Kol

κλπ), λιποσώματα, διάφοροι τύποι συντηρημένων μικροφυκών όπως οι μικροσωματιδιακές δίαιτες (micro-encapsulated), δίαιτες βασισμένες σε μαγιά με διαφορετικά επίπεδα και ποσοστά απαραίτητων λιπαρών οξέων (κυρίως PUFA), αντιβακτηριακών μέσων, βιταμινών, αμινοξέων κ.λπ. (Gelabert, 2003).

Η βιοενσωμάτωση στην *Artemia* γίνεται, γιατί τα εκτρεφόμενα είδη μπορεί να μην έχουν την ικανότητα βιοσύνθεσης ορισμένων ουσιών ή να εφαρμόζεται για θεραπευτικούς λόγους.

Έχουν γίνει πειράματα βιοενσωμάτωσης σε *Artemia*, ώστε να αποκτήσει την επιθυμητή σύσταση σε θρεπτικά συστατικά, κυρίως στα απαραίτητα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, εικοσιπεντανοϊκό 20:5 (ω-3) γνωστό ως EPA και εικοσιδυοεξανοϊκό 22:6 (ω-3) γνωστό ως DHA.

Τα τελευταία όμως χρόνια το ενδιαφέρον και η έρευνα στο τομέα αυτό εστιάζεται στη συσχέτιση της βιοενσωμάτωσης με τη θεραπεία, κι αυτό γιατί το κύριο μέλημα ενός καλλιεργητή και ενός επιχειρηματία εκτός από την βελτιστοποίηση της θρεπτικής ποιότητας των ψαριών είναι και η εξασφάλιση συνθηκών επιβίωσης του μέγιστου δυνατού παραγόμενου πληθυσμού, πράγμα που θα επιφέρει και τα αναμενόμενα οικονομικά κέρδη.

Αν και τα επίπεδα των θεραπευτικών ουσιών που βιοενσωματώνονται στους ναύπλιους είναι χαμηλά σε σύγκριση με τα φάρμακα που προστίθενται στο εμπλουτιστικό μέσο, όλο το ποσό του φαρμάκου που έχει βιοενσωματωθεί φθάνει στους οργανισμούς στόχους, δηλαδή στις νύμφες ψαριών. Επίσης η απ' ευθείας θεραπεία νοσημάτων δια μέσου της τροφικής αλυσίδας αποδεικνύεται εν πολλοίς δραστικότερη, οικονομικότερη αλλά και φιλικότερη προς το περιβάλλον. Προκειμένου να θεραπευθεί ο ίδιος αριθμός νυμφών μέσω λουτρού απαιτείται οκταπλάσια αύξηση στα επίπεδα θεραπευτικής ουσίας

από αυτή που χρησιμοποιήθηκε μέσω της διαδικασίας της βιοενσωμάτωσης σε ναύπλιους *Artemia* (Verpaert *et al.*, 1992: Touraki *et al.*, 1994, 1999).

Τα προβιοτικά παρέχουν αντιμικροβιακή προστασία τόσο στην ίδια την *Artemia* (π.χ το βακτήριο *B. subtilis*) όσο και στις νύμφες που τρέφονται με αυτές (π.χ το βακτήριο *Saccharomyces boulardii*) (Μουρελάτος και συν., 1999: Κοζιώτης και συν., 2005: Καραβίδα και συν., 2005). Με τη χρησιμοποίηση προβιοτικών ουσιών διαμέσου των ναυπλίων *Artemia* περιορίζεται η ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών που συμβαίνει σε ένα μεγάλο βαθμό από την αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών (Verpaert *et al.*, 1992: Touraki *et al.*, 1994, 1999). Είναι μια φτηνή και εύκολη διαδικασία που δε ρυπαίνει τη στήλη του νερού, εφόσον δεν υπάρχουν απώλειες (Gelabert, 2003).

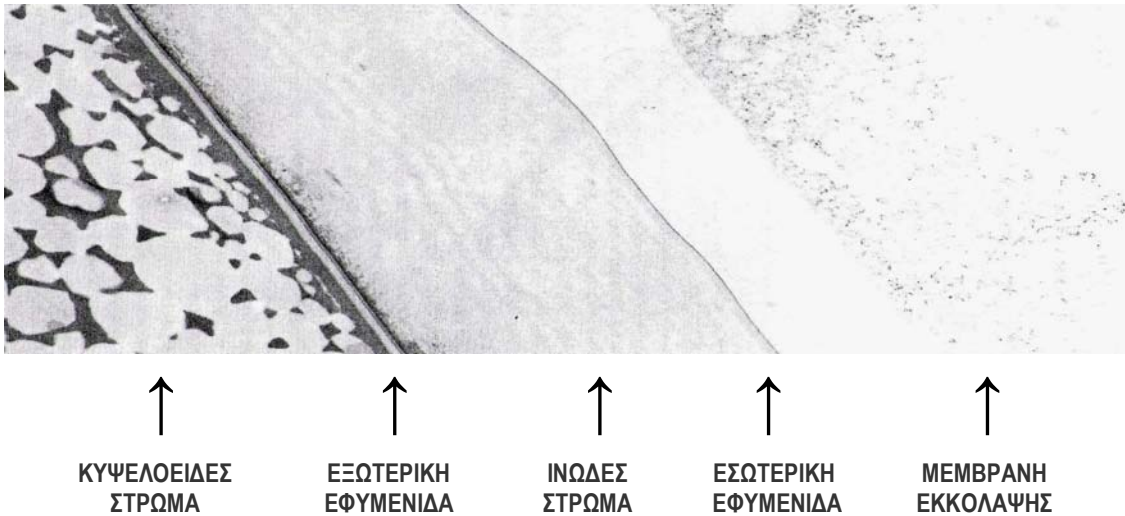
Οι ναύπλιοι της *Artemia franciscana* είναι ανεπαρκείς στα αμινοξέα ιστιδίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη και θρεονίνη ενώ τα ενήλικα είναι πλούσια με όλα τα απαραίτητα αμινοξέα (Watanabe *et al.*, 1982). Μια προσέγγιση για τον εμπλουτισμό της *Artemia* με απαραίτητα αμινοξέα (FAA), είναι να χρησιμοποιηθούν τα λιπосώματα (Tonheim, 2000). Μελέτες που έγιναν έχουν δείξει ότι οι ναύπλιοι *Artemia* μπορούν επιτυχώς να εμπλουτιστούν με το απαραίτητο αμινοξύ μεθειονίνη (Tonheim, 2000). Πρόσφατα έχει εφαρμοστεί (Morais *et al.*, 2004) μέθοδος ραδιοσήμανσης της *Artemia* με προσθήκη ^{14}C στο εκκολαπτικό μέσο, ώστε να λαμβάνονται πληροφορίες για τη λήψη τροφής, την πεπτικότητα και το μεταβολισμό των πρωτεϊνών και αμινοξέων.

Τα τελευταία χρόνια γίνεται μια προσπάθεια βιοενσωμάτωσης ορμονών σε *Artemia* ώστε να κατευθύνουμε τη φυλετική διαφοροποίηση και να επιλέγουμε το φύλο εκείνο που παρουσιάζει τα καλύτερα χαρακτηριστικά (Baghel, 2004: Stewart *et al.*, 2001).

1.7. Κύστεις

1.7.1. Γενικά

Οι κύστεις είναι εγκυτωμένα έμβρυα των οποίων ο μεταβολισμός σταμάτησε στο στάδιο του βλαστιδίου (D' Agostino, 1980) ή του γαστριδίου (Lavens and Sorgeloos, 1987). Το συγκύτιο περιέχει περίπου 4.000 πυρήνες (Nakanishi *et al.* 1962) και περιβάλλεται από πολύπλοκα στρώματα (Lavens and Sorgeloos, 1987). Εξωτερικά περιβάλλεται από ένα εξαιρετικής αντοχής, σκουροκαφέ περίβλημα που καλείται κέλυφος. Το περίβλημα αυτό εκκρίνεται από τους κελυφικούς αδένες της μήτρας. Έχει πάχος 5 – 10 μm και αποτελείται από μια σειρά στρωμάτων με βασικά συστατικά την αιματίνη, την χιτίνη και διάφορες λιποπρωτεΐνες (Moiris and Afzelius, 1967: Αμπάτζοπουλος, 1988). Η αιματίνη αποτελεί προϊόν καταβολισμού των αιμοσφαιρινών και ανάλογα με την ποσότητα της, προσδίδει το χρώμα των κύστεων. Έχει ένα μεγάλο αριθμό αεροφόρων καναλιών που είναι σε συνεχή επικοινωνία με την επιφάνεια του φλοιώδης στρώματος (cortical layer). Επίσης, το κυψελοειδές στρώμα (alveolar layer) συμβάλλει σημαντικά στην πλευστότητα των κύστεων (Sorgeloos *et al.*, 1977). Υπάρχουν 4 εμβρυονικές μεμβράνες που βρίσκονται εσωτερικά του περιβλήματος, οι οποίες από το εξωτερικό προς το εσωτερικό της κύστης κατανέμονται ως εξής : η εξωτερική εφυμινίδα, το ινώδες στρώμα, η εσωτερική εφυμινίδα και η μεμβράνη εκκόλαψης (περιβάλλει το έμβρυο) (Clegg and Conte, 1980: Abatzopoulos *et al.*, 1997) (Εικ. 4).



Εικόνα 4. Κάθετη τομή κύστης που περιέχει έμβρυο 18 ωρών. Η μεμβράνη εκκόλαψης δεν έχει αποχωριστεί από την εσωτερική εφυμένιδα (Trotman, 1991)

Η ιδιομορφία τους σε σχέση με τα αβγά άλλων οργανισμών είναι ότι όταν απελευθερώνονται στο περιβάλλον βρίσκονται σε μια κρυπτοβιοτική κατάσταση. Γενικά με τον όρο κρυπτοβίωση αναφερόμαστε σε εκείνες τις καταστάσεις ενός οργανισμού, όπου η μεταβολική δραστηριότητα είναι πολύ δύσκολο να προσδιοριστεί και δεν υπάρχουν εμφανή σημάδια ζωής. Συχνά, παρατηρείται σύγχυση των όρων «διάπαυση» και «νάρκη», γι αυτό απαιτείται η διευκρίνιση των όρων αυτών.

Σύμφωνα με Lavens και Sorgeloos (1987) υπάρχουν οι εξής μορφές κρυπτοβίωσης.

- ♣ Διάπαυση: με τον όρο διάπαυση εννοείται το “κλειδώμα” του μεταβολισμού. Πρόκειται για μια συγκεκριμένη μορφή κρυπτοβίωσης με ενδογενή ρύθμιση της εκκόλαψης (ενδογενή έλεγχο του μεταβολισμού και της ανάπτυξης) που συμβαίνει ενώ η κύστη (έμβρυο) βρίσκεται μέσα στη μήτρα, άσχετα με το αν στο περιβάλλον επικρατούν άριστες συνθήκες ή όχι .
- ♣ Νάρκη: πρόκειται για εξωγενή έλεγχο του μεταβολισμού και της ανάπτυξης (π.χ.

δυσμενείς περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως ακραίες τιμές θερμοκρασίας) που εισάγει μια κατάσταση καθυστερημένης ανάπτυξης. Σε περίπτωση όμως που οι συνθήκες ξαναγίνουν ευνοϊκές τότε η ανάπτυξη του εμβρύου συνεχίζεται.

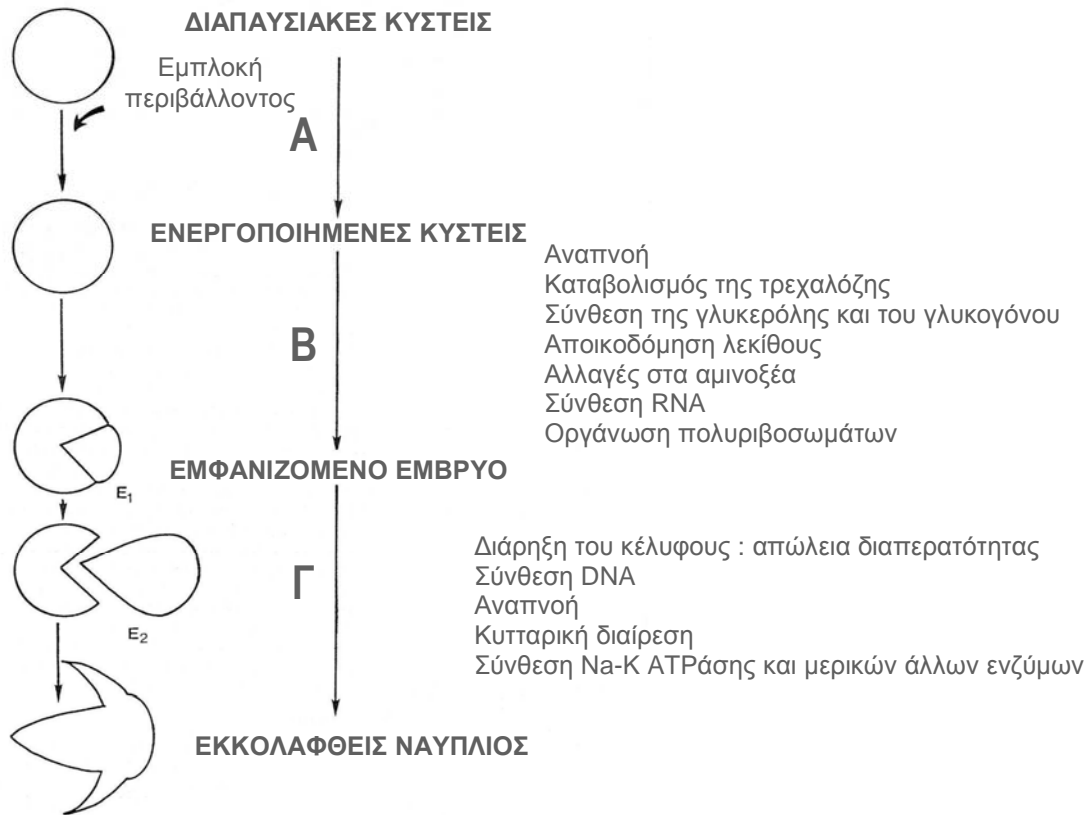
Φαίνεται ότι ορθώς χρησιμοποιείται ο όρος «διάπαυση» για την περίπτωση της *Artemia*, αφού τόσο η αναστολή του μεταβολισμού όσο και της ανάπτυξης ελέγχεται από ενδογενείς παράγοντες, ανεξάρτητα από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Στην ωοτοκία, ανάπτυξη του εμβρύου σταματάει μέσα στη μήτρα και η επαγωγή της διάπαυσης είναι αυστηρά προγραμματισμένη στο αναπτυξιακό πρότυπο της *Artemia*, ανεξάρτητα από το στέλεχος ή τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Olson and Clegg, 1976; Lavens and Sorgeloos, 1987). Οι διαπαυσιακές κύστεις δεν εμφανίζουν ανιχνεύσιμο μεταβολισμό (Finamore and Clegg, 1969; Clegg, 1974) και δεν πρόκειται να εκκολαφθούν ακόμα και αν οι κλιματικές συνθήκες είναι κατάλληλες για εκκόλαψη. Όσο οι συνθήκες γίνονται όλο και πιο αντίξοες τόσο μειώνεται η παραγωγή ναυπλίων και αυξάνεται η παραγωγή κύστεων.

Διακοπή της διάπαυσης και είσοδος σε κατάσταση νάρκης μπορεί να επιτευχθεί μόνο αν οι ενδογενείς μηχανισμοί που ελέγχουν τη διάπαυση διακοπούν. Από τη στιγμή που διακόπτεται η διάπαυση οι κύστεις υπόκεινται πλέον σε εξωγενή έλεγχο της εκκόλαψης δηλαδή όταν επικρατούν οι κατάλληλες συνθήκες για εκκόλαψη επιταχύνεται ο μεταβολισμός, οι διαιρέσεις, η διαφοροποίηση και μετά από μερικές ώρες ακολουθεί το σπάσιμο του εξωτερικού περιβλήματος. Το τελικό στάδιο της εκκόλαψης, το σπάσιμο της κύστης και της εκκολαπτικής μεμβράνης εξαρτάται από δυο παράγοντες, τον καθαρά χημικό και το χημειοσμωτικό (Lavens and Sorgeloos, 1987). Ως παράγοντες διακοπής της διάπαυσης στο φυσικό περιβάλλον θεωρούνται διαδοχικοί κύκλοι αφυδάτωσης-ενυδάτωσης, η παρατεταμένη παραμονή σε χαμηλές θερμοκρασίες (διαχείμαση) κ.λπ (Εικ.

5, 6).

Η ιδιότητα ενός οργανισμού να διανύει κάποια περίοδο της ζωής του σε κρυπτοβιοτική κατάσταση είναι ένας μηχανισμός επιβίωσης πληθυσμών που ζουν σε βιότοπους με ασταθείς, δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Η παραγωγή διαπαυσιακών εμβρύων με τη μορφή κύστεων είναι η στρατηγική που ακολουθεί η *Artemia* για να αντεπεξέλθει στις δύσκολες, απρόβλεπτες και συνεχώς μεταβαλλόμενες συνθήκες των βιοτόπων της (Lenz, 1987: Lenz and Dana, 1987). Οι κύστεις αυτές αντέχουν κάτω από εξαιρετικά αντίξοες συνθήκες και θα αποτελέσουν την απαρχή ενός νέου πληθυσμού όταν οι αβιοτικοί και βιοτικοί παράμετροι στο περιβάλλον γίνουν πάλι ευνοϊκές. Έτσι, η απελευθέρωση διαπαυσιακών κύστεων αποτελεί την εγγύηση της ύπαρξης του πληθυσμού και στο μέλλον (Lavens and Sorgeloos, 1987).

Η διάπαυση, ως μορφή κρυπτοβίωσης, εκτός από τη δυνατότητα επιβίωσης που δίνει στον πληθυσμό σε μη ιδανικές συνθήκες, εξασφαλίζει και συγχρονισμό στον πληθυσμό, προκειμένου να αντεπεξέλθει στις μεταβολές του περιβάλλοντος. Ο ενδογενής έλεγχος του μεταβολισμού και της ανάπτυξης εξασφαλίζει σύγχρονη εκκόλαψη, που θα έχει ως αποτέλεσμα μια γρήγορη και με ταχείς ρυθμούς εποίκιση του βιοτόπου, όταν οι συνθήκες θα γίνουν ευνοϊκές (Lavens and Sorgeloos, 1987).

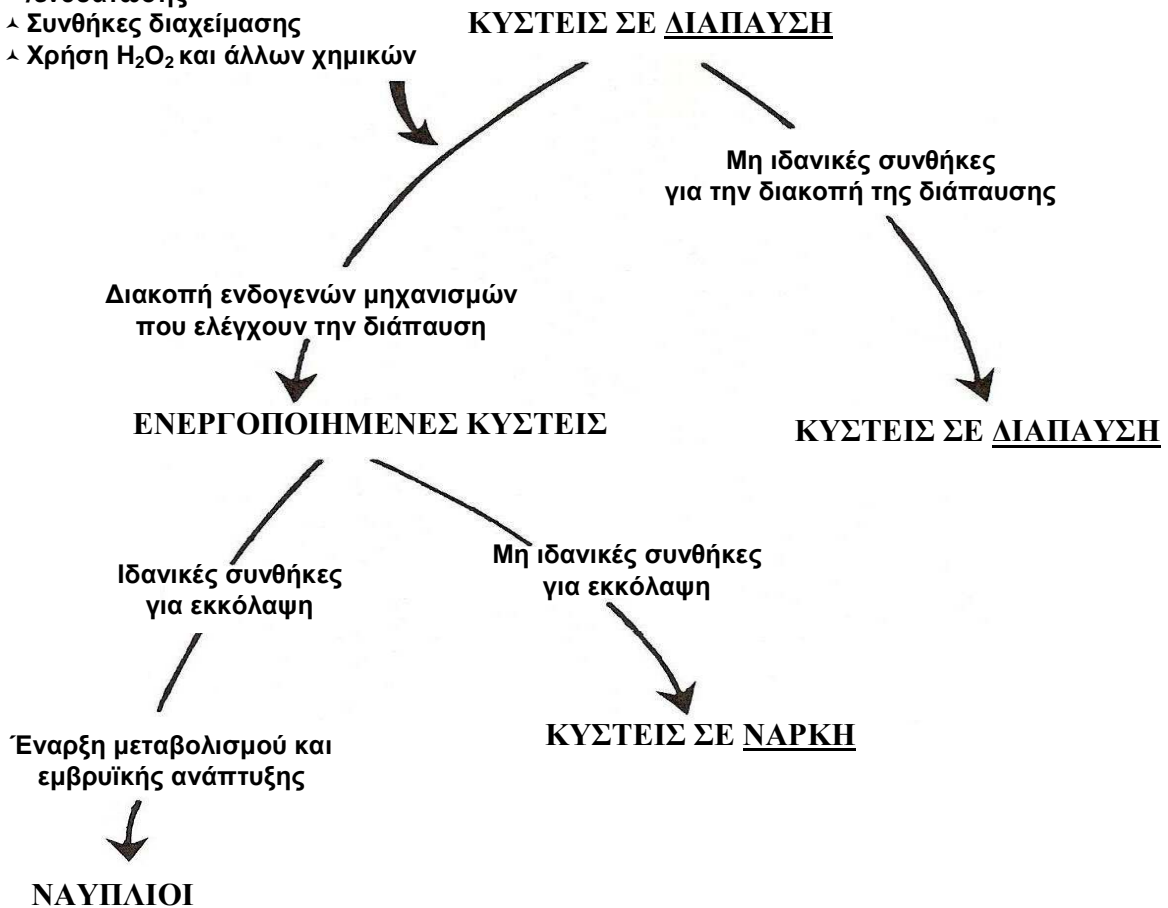


Εικόνα 5. Γεγονότα μεταβολισμού σε διάφορα στάδια ανάπτυξης της *Artemia*. Τρία αξιοσημείωτα στάδια : (A) ενεργοποίησης (B) εμφάνισης εμβρύου (Γ) εκκόλαψης. (Bengston, 1991)

Εκτός από τις τυπικές διαπαυσιακές κύστες υπάρχουν και τα καλοκαιρινά αυγά που εκκολάπτονται αμέσως όταν βρεθούν στις κατάλληλες συνθήκες, επομένως παράγονται σε κατάσταση νάρκης και όχι διάπαυσης (Αμπατζόπουλος, 1988). Όπως και αναφέρθηκε, για να μεταπέσουν οι διαπαυσιακές κύστες σε νάρκη πρέπει να συμβεί αφυδάτωση, γεγονός ιδιαίτερα εύκολο στα υπέρλα νερά (Clegg and Conte, 1980). Πιστεύεται ότι το φαινόμενο αυτό οφείλεται σε δυσλειτουργία των κελυφικών αδένων (ή έμβρυα με ασθενές περίβλημα), χωρίς όμως αυτό να έχει αποδειχτεί (Lavens and Sorgeloos, 1987).

Περιβαλλοντικοί παράγοντες

- ^ Αφυδάτωση
- ^ Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αφυδάτωσης /ενυδάτωσης
- ^ Συνθήκες διαχείμασης
- ^ Χρήση H₂O₂ και άλλων χημικών



Εικόνα 6. Μορφές κρυπτοβίωσης στο γένος *Artemia*: α) διάπαυση και β) νάρκη

Αν και η χρησιμοποίηση κύστεων *Artemia* φαίνεται να είναι απλή, διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν την εκκόλαψη των κύστεων. Οι παράγοντες αυτοί επιδρούν στη διαμόρφωση του ποσοστού εκκόλαψης, στη δυνατότητα μεγιστοποίησης της παραγωγής (εκκολασιμότητα) και φυσικά στο κόστος παραγωγής *Artemia*. Αναλυτικά:

A) Γενοτυπικοί, αν και δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που να το αποδεικνύουν (Browne *et al.*, 1984; Lavens and Sorgeloos, 1987).

B) Το περιβάλλον των μητρικών ατόμων π.χ διαθεσιμότητα και ποιότητα τροφής,

αλατότητα, τοξικές ουσίες, ακτινοβολία.

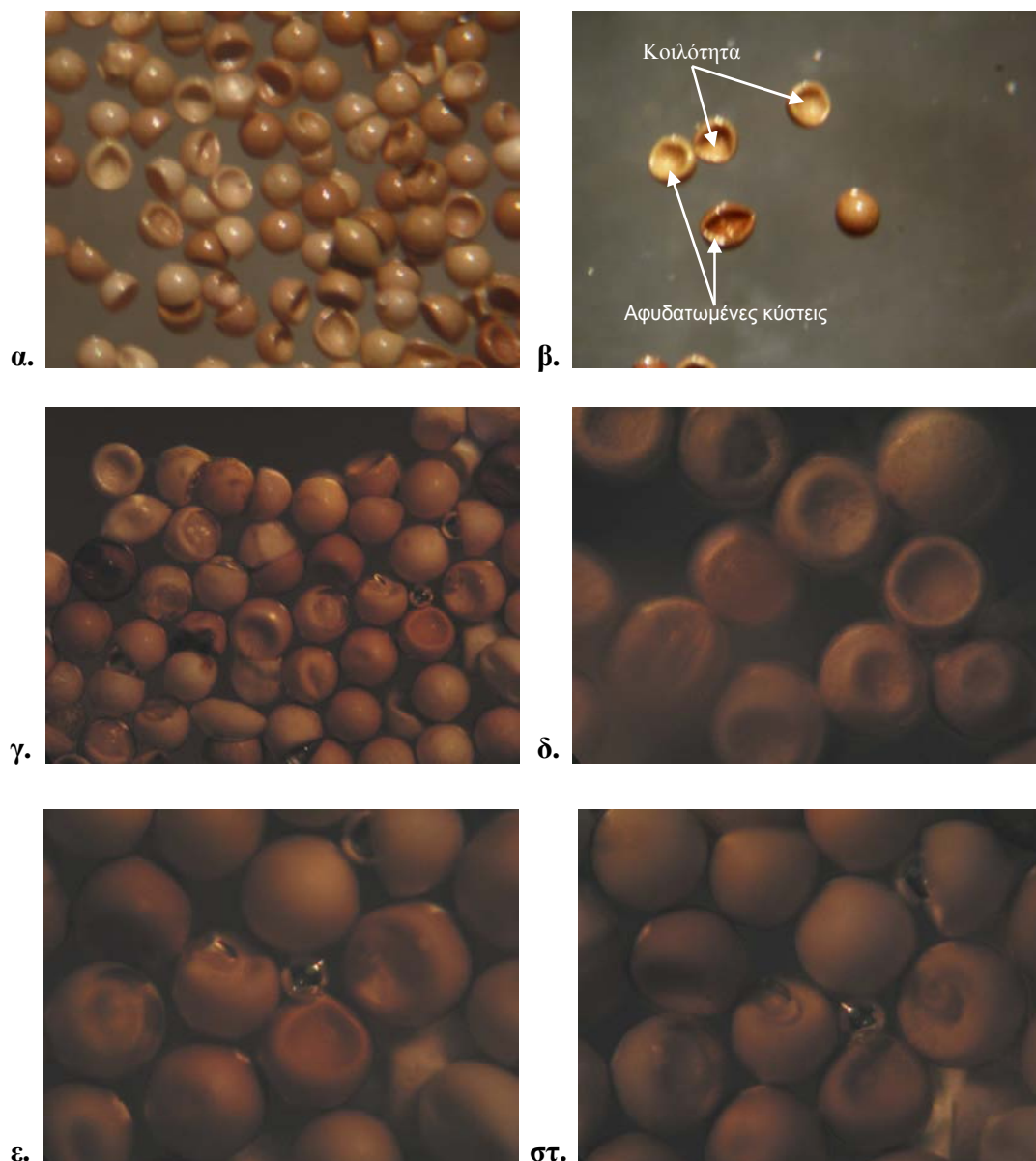
Γ) Η επεξεργασία των κύστεων πριν την εκκόλαψη (αποκελύφωση, μηχανισμοί διακοπής της διάπαυσης π.χ. αφυδάτωση, επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αφυδάτωσης - ενυδάτωσης, διαχείμαση, υπεροξειδίο του υδρογόνου, ιονίζουσες ακτινοβολίες, μόνιμα μαγνητικά πεδία, φωτισμός κύστεων σε πλήρη ενυδάτωση και αερόβιες συνθήκες) (Lavens and Sorgeloos, 1987).

Δ) Οι συνθήκες εκκόλαψης π.χ αλατότητα, pH, θερμοκρασία, συγκέντρωση οξυγόνου, πυκνότητα κύστεων, φωτισμός (Lavens and Sorgeloos, 1987).

1.7.2. Αφυδάτωση κύστεων

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας δεν χρησιμοποιήθηκε καμία τεχνική διακοπή διάπαυσης λόγω της εξασφάλισης αφυδατωμένων κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) από την αγορά. Κάποια στοιχεία που αφορούν τη διεργασία αυτή και έχουν καταγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία είναι απαραίτητα να αναφερθούν έτσι ώστε να γίνει αντιληπτή η σημασία της αφυδάτωσης στην εκκολαπτική ικανότητα κύστεων *Artemia franciscana* (GSL).

Οι κύστεις έχουν σφαιρικό σχήμα πριν αφυδατωθούν με διάμετρο που κυμαίνεται από 200-330 μm (Αμπατζόπουλος, 2003). Σε αλατότητες πάνω από 200 psu οι αφυδατωμένες κύστεις μοιάζουν με ξεφούσκωτη μπάλα (Εικ. 7) και επιπλέουν στην επιφάνεια του νερού, παρασύρονται προς τις όχθες των υδατοσυλλογών μέσω του ανέμου και σχηματίζουν καστανέρυθρα στρώματα πάχους λίγων ή πολλών εκατοστών σε μεγάλη έκταση (Αμπατζόπουλος, 1988).



Εικόνα 7. Αφυδατωμένες κύστεις *Artemia franciscana* (GSL). Παρουσία κοιλότητας. Μεγέθυνση: x 40 (α, β, γ), x 100 (δ, ε, στ)

Αφού αφυδατωθούν οι κύστεις ζυγίζουν 3-3,5 μg και είναι πολύ πιο ανθεκτικές από τις ενυδατωμένες κύστεις. Οι αφυδατωμένες κύστεις αντέχουν από τους -273°C ως τους 80°C για αρκετές ώρες, για μια ώρα στους 100°C ή για λίγα λεπτά στους 360°C , χωρίς να ελαττώνεται η βιωσιμότητά τους (Clegg and Trotman, 2002) ενώ οι ενυδατωμένες κύστεις

είναι σφαιρικές, πιο ευαίσθητες γι αυτό και αντέχουν από 0 μέχρι 40°C. Το περίβλημα των κύστεων συντελεί στις μοναδικές αυτές ιδιότητες ενώ προστατεύει και το έμβρυο από διάφορες ακτινοβολίες και ιδιαίτερα την υπεριώδη.

Τόσο ο μηχανισμός όσο και ο ρόλος της αφυδάτωσης μελετήθηκε εκτενώς σε αμφιγονικούς πληθυσμούς *Artemia franciscana*.

Η αφυδάτωση είναι μια κατάσταση εξαιρετικά αντίξοχη για τις βιολογικές δομές. Οι κύστεις της *Artemia* ανταποκρίνονται στην αφυδάτωση εξαιτίας των σημαντικών ποσοτήτων τρεχαλόζης (15% επί του ξηρού βάρους), αντιοξειδωτικών ουσιών και ενζύμων που εμπεριέχουν. Ο ρόλος της τρεχαλόζης ως «υποκατάστατο του νερού» είναι η προστασία των μεμβρανών και των πρωτεϊνών των κύστεων (αντοχή των κύστεων) κατά την αφυδάτωση και την ενυδάτωση και οδήγησε στη διατύπωση της υπόθεσης αντικατάστασης νερού. Ο δισακχαρίτης αυτός αρχίζει να συντίθεται 2 μέρες μετά τη γονιμοποίηση και ολοκληρώνεται μόλις 5 μέρες μετά τη γονιμοποίηση με το σχηματισμό του διαπαυσιακού εμβρύου. Υπάρχει ακόμα μια μικρή αύξηση της συγκέντρωσης για λίγες μέρες μετά την ωοτοκία (Clegg, 1965; Clegg *et al.* 1999). Η σύνθεση της τρεχαλόζης σταματά ταυτόχρονα με τη διακοπή του μεταβολισμού του εμβρύου. Ο ρόλος της τρεχαλόζης στην ανθεκτικότητα των κύστεων δεν εστιάζεται μόνο στην «υπόθεση αντικατάστασης νερού», αλλά λειτουργεί και ως πηγή ενέργειας για το μεταβολισμό των κύστεων, όταν αυτός αρχίσει μετά τη διακοπή της διάπαυσης για την εκκόλασή τους (Clegg and Conte, 1980).

Τα βιολογικά συστήματα σε κατάσταση αφυδάτωσης είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στο μοριακό οξύγονο (Crowe and Clegg, 1973; Clegg, 2001). Απαραίτητη για την επιβίωση των κύστεων είναι η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αντιοξειδωτικών ουσιών

(καροτενοειδή, βιταμίνες A, C, E, αρτεμίνη) και ενζύμων, που να συμμετέχουν στους μηχανισμούς εκείνους (αντιοξειδωτικούς) για την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και την καταστροφική δράση του μοριακού οξυγόνου (Clegg and Trotman, 2002).

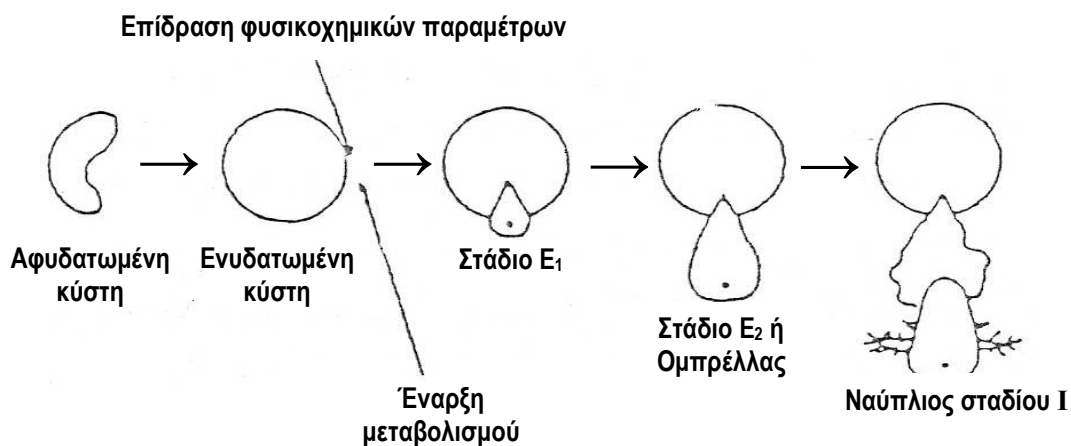
Όπως έχει αναφερθεί η αφυδάτωση των κύστεων είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος διακοπής της διάπαυσης. Η αφυδάτωση των κύστεων μπορεί να επιτευχθεί είτε σε θερμοκρασίες που δεν ξεπερνούν τους 40°C, είτε με εναιώρηση των κύστεων σε άλμη. Ωστόσο, μετά τη διαδικασία της αφυδάτωσης, η σχετική υγρασία στην οποία θα αποθηκευτούν οι κύστες παίζει σημαντικότατο ρόλο, καθώς είναι τρομερά υγροσκοπικές. Σύμφωνα με τους Versichele και Sorgeloos (1980) απαιτείται ένα ελάχιστο ποσοστό αφυδάτωσης, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη εκκολαψιμότητα. Όμως, η αφυδάτωση πέρα από ένα ορισμένο όριο (περιεχόμενο νερό < 10% του ξηρού βάρους των κύστεων) δεν αυξάνει τα αποτελέσματα της εκκόλαψης (Lavens and Sorgeloos, 1987). Επίσης, φαίνεται ότι η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την αφυδάτωση (κλίβανος, άλμη ή στεγνωτήρας) (Bosteels *et al.* 1996) αλλά και η ταχύτητα απομάκρυνσης του νερού από τις κύστες παίζει σημαντικό ρόλο στη διακοπή της διάπαυσης και στο αποτέλεσμα της εκκόλαψης : όσο πιο γρήγορη είναι αυτή, τόσο πιο βελτιωμένη είναι η εκκολαψιμότητα.

Πρέπει να τονιστεί τελικά ότι η τεχνική που θα εφαρμοστεί για την αφυδάτωση των κύστεων και το αποτέλεσμά της εξαρτάται από την ιστορία των κύστεων που χρησιμοποιούνται. Αυτό ερμηνεύει και τις διαφορές που έχουν παρατηρηθεί στα αποτελέσματα, όταν η ίδια τεχνική εφαρμόζεται σε διαφορετικούς πληθυσμούς *Artemia* (όχι απαραίτητα διαφορετικών ειδών) (Lavens and Sorgeloos, 1987).

1.7.3. Ενυδάτωση και εκκόλαψη κύστεων

Ο ρόλος της ενυδάτωσης είναι η έναρξη των μεταβολικών διαδικασιών και εν συνεχεία η εκκόλαψη. Όταν το ποσοστό υγρασίας των κύστεων ξεπεράσει το 30% αρχίζει ο μεταβολισμός (ενεργοποίηση των υπεύθυνων ενζύμων) και τα κύτταρα έχουν πλέον επανέλθει στη φυσιολογική τους λειτουργία (Εικ. 8) (Clegg, 1964; Slegers, 1991).

Κατά την διάρκεια της ενυδάτωσης ελευθερώνονται μεγάλες ποσότητες γλυκερόλης (από τη διάσπαση της τρεχαλόζης των κύστεων σε γλυκογόνο και γλυκερόλης) με αποτέλεσμα την αύξηση της οσμωτικής πίεσης στο εσωτερικό της μεμβράνης εκκόλαψης και τελικά τη ρήξη του κελύφους της κύστης οπότε το έμβryo βρίσκεται στο στάδιο E₁ (15-20 ώρες σε θαλασσινό νερό) (Αμπατζόπουλος, 1988; Clegg, 1964). Η βαθμίδωση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού της κύστης ρυθμίζει την μετακίνηση του νερού μέσω παθητικής διάχυσης. Ο ρόλος της γλυκερόλης είναι η επαναφορά των μεμβρανών στην υδάτινη κατάσταση και η παραγωγή ATP.

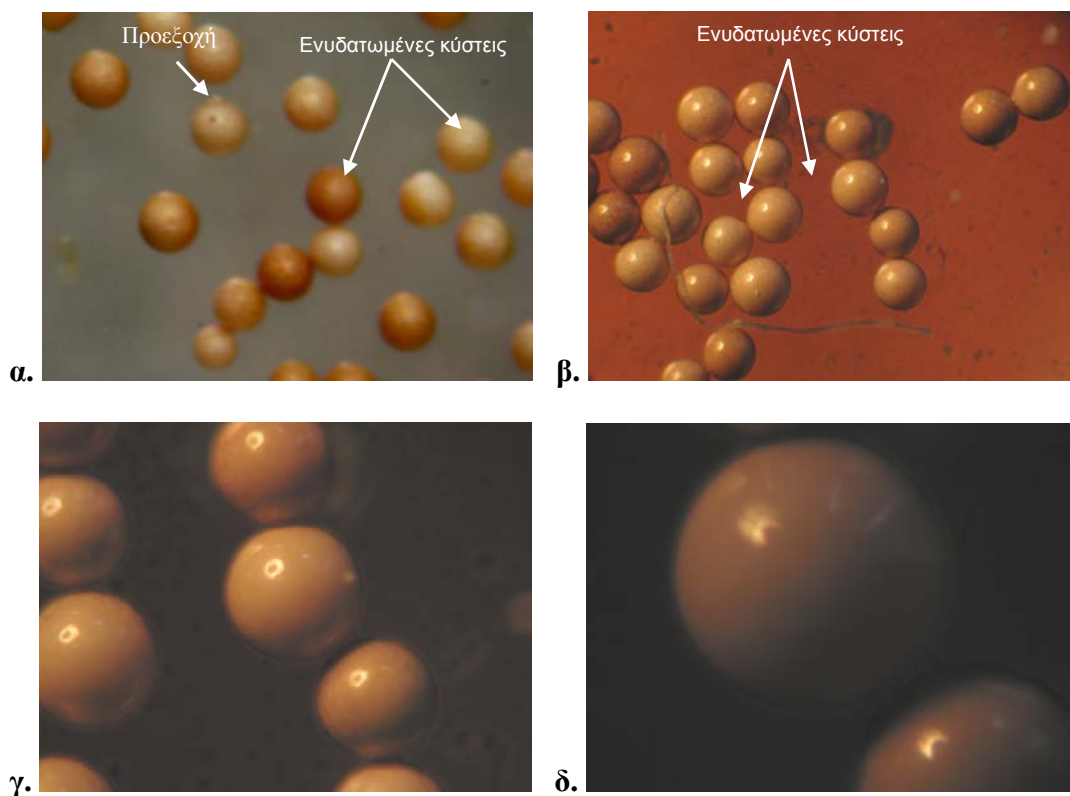


Εικόνα 8. Η εξέλιξη της εκκόλαψης από την αρχή της ενυδάτωσης ως και την απελευθέρωση του ναυπλίου (Lavens and Sorgeloos, 1996).

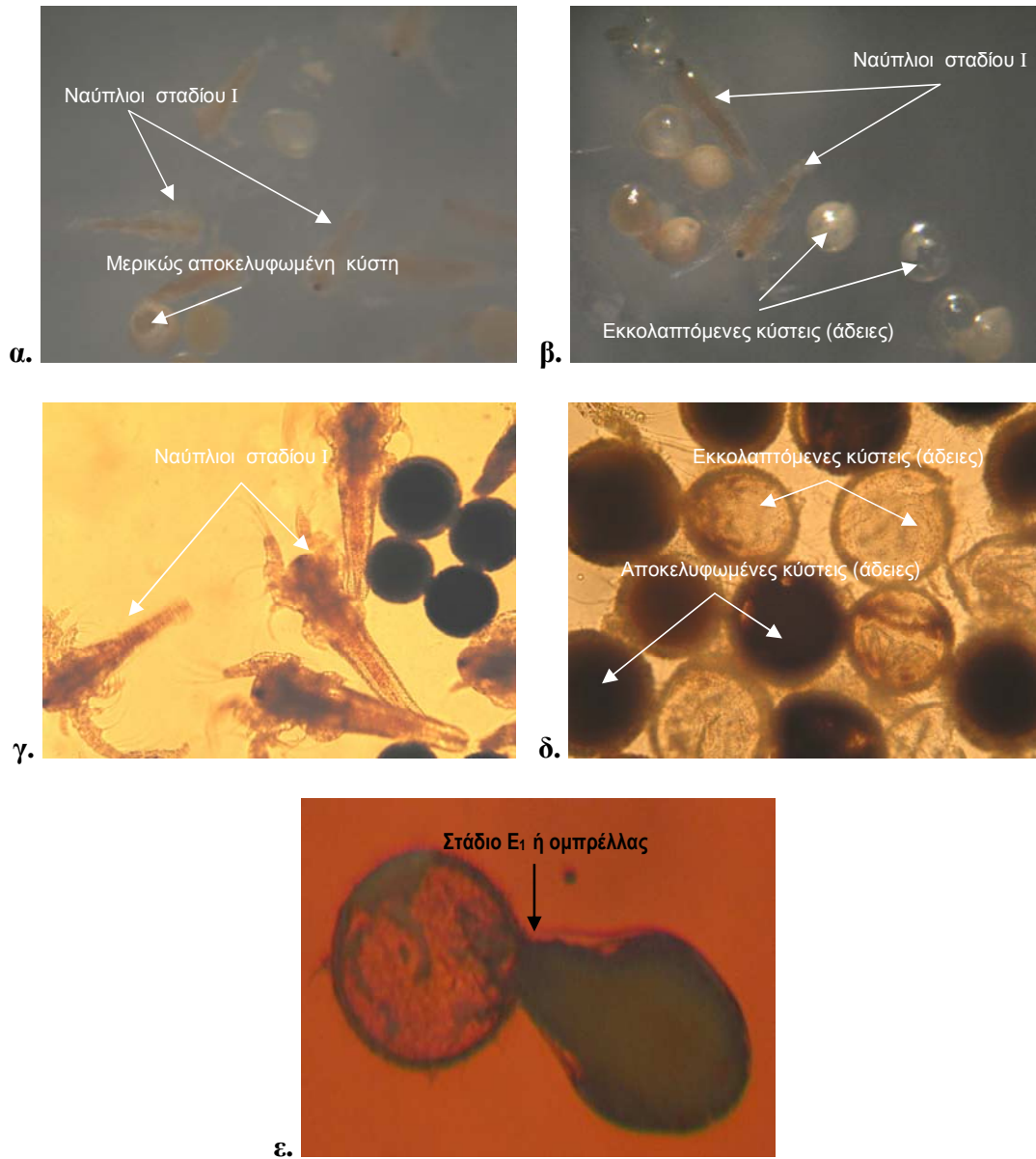
Ο Sato πρότεινε τη συμμετοχή ενός ενζύμου “εκκόλαψης” στη διαδικασία της ενεργοποίησης της εκκόλαψης (Εικ. 8). Στο στάδιο E₁ το έμβρυο εκκρίνει το ένζυμο εκκόλαψης (πρωτεάσες) το οποίο διασπά τη μεμβράνη και εμφανίζεται ο ναύπλιος μέσα στη μεμβράνη εκκόλαψης. Σιγά - σιγά εμφανίζεται όλη η προνύμφη η οποία συνεχίζει να βρίσκεται μέσα στη μεμβράνη, ενώ καθώς κρέμεται από το κέλυφος δίνει την εντύπωση ανοιχτής ομπρέλλας (στάδιο E₂) (Εικ. 8 και 10ε) (Lavens and Sorgeloos, 1996; Slegers, 1991). Παραμένει στο στάδιο E₂ για λίγες ώρες και στην συνέχεια ελευθερώνεται ως ναύπλιος σταδίου I (εικόνες 10α-ε).

Στην περίπτωση που θα πραγματοποιηθεί η τεχνική της αποκελύφωσης, ο άμεσος στόχος της ενυδάτωσης είναι οι αφυδατωμένες κύστεις να αποκτήσουν σφαιρικό σχήμα (Εικ. 9α-δ). Με το τρόπο αυτό διευκολύνεται η απομάκρυνση του κελύφους κατά την αποκελύφωση εφόσον το χλώριο μπορεί ενεργήσει ισόνομα επί του συνόλου της εξωτερικής επιφάνειας, το οποίο ήταν πολύ δύσκολο να επιτευχθεί εξαιτίας της κοιλότητας που φέρουν οι αφυδατωμένες κύστεις στο κέλυφος τους (Εικ. 7α-στ).

Για το σκοπό αυτό, οι κύστεις πρέπει να ενυδατώνονται σε διηθημένο γλυκό νερό στους 25 °C για 60-90 λεπτά. Όσο χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία τόσο περισσότερο χρόνο χρειάζονται οι κύστεις για να ενυδατωθούν. Ανεξάρτητα όμως από τη θερμοκρασία δεν πρέπει σε καμία περίπτωση να ενυδατωθούν περαιτέρω των δυο ωρών γιατί αυτό μπορεί οδηγήσει σε μείωση του ποσοστού των αποκελυφωμένων κύστεων και του ρυθμού εκκολαψιμότητας εξαιτίας στο ότι μερικές κύστεις που έχουν αρχίσει ήδη το μεταβολισμό δεν θα καταφέρουν να επιβιώσουν κατά τη αποκελύφωση (Sorgeloos et al., 1977).



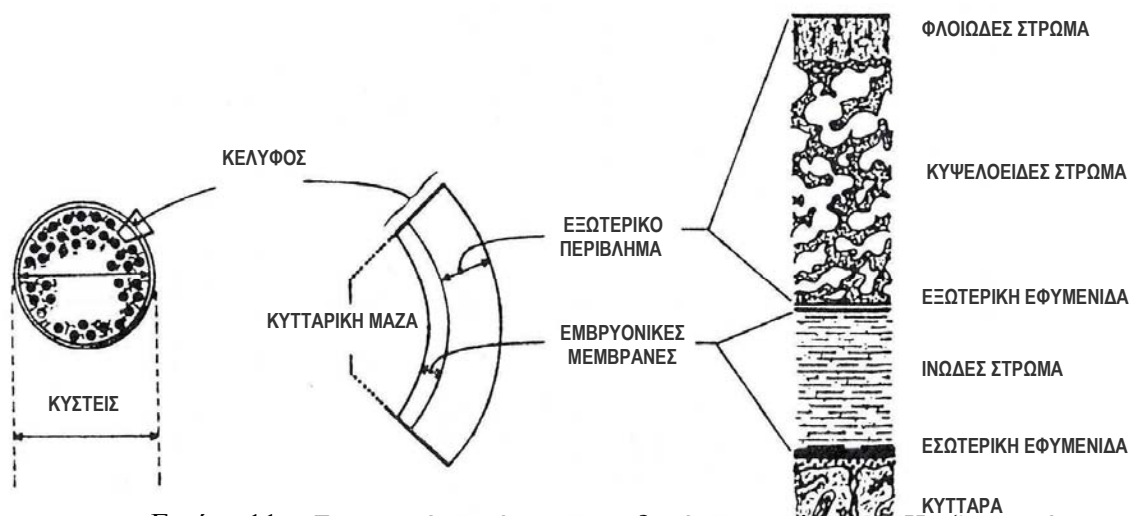
Εικόνα 9. Ενυδατωμένες κύστεις *Artemia franciscana* (GSL). Παρουσία προεξοχής στο σημείο που υπήρχε το κοίλωμα. Μεγέθυνση: x 40 (α, β), x 100 (γ), x 200 (δ)



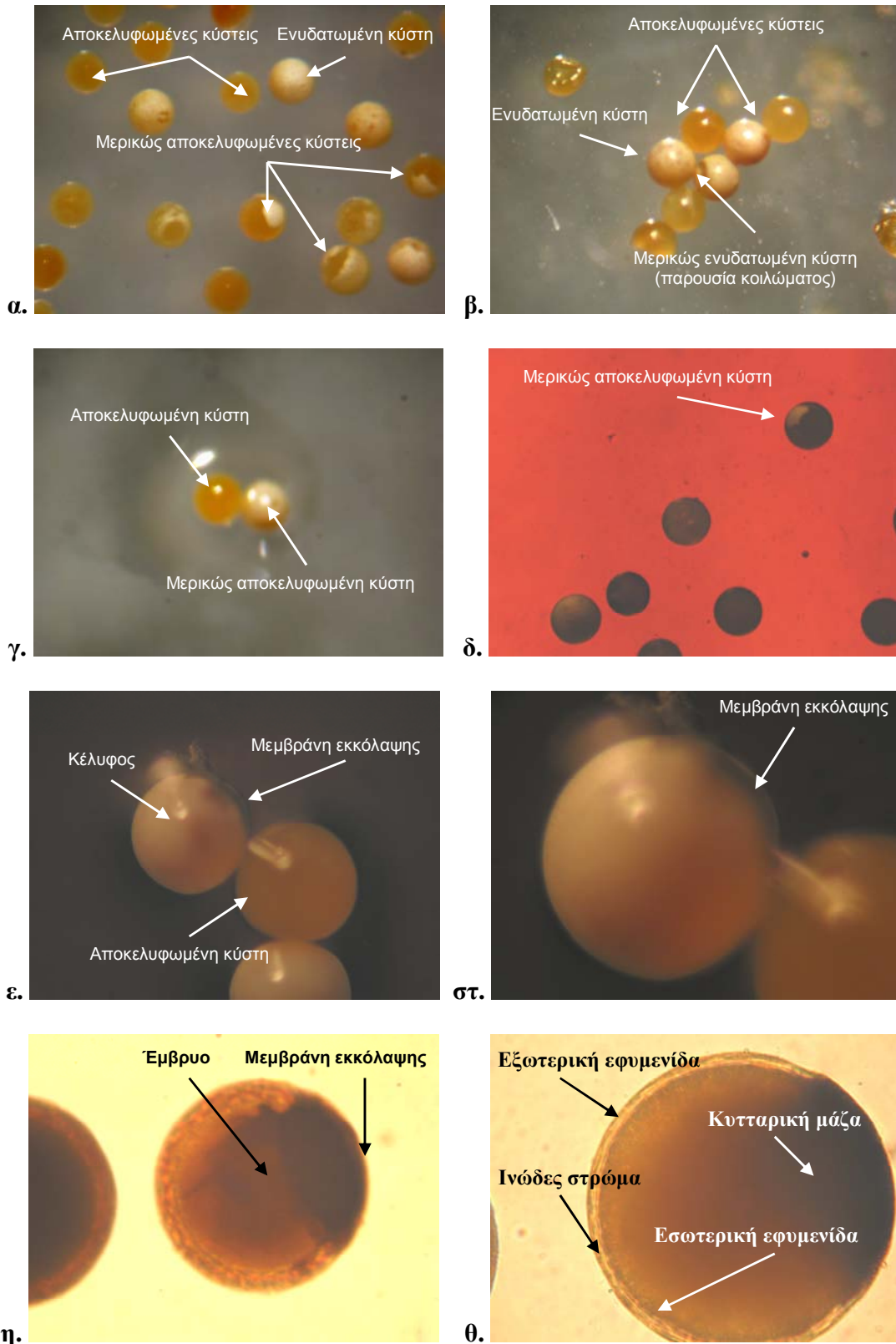
Εικόνα 10. Εκκόλαση αποκελυφωμένων κύστεων *Artemia franciscana* (GSL). Μεγέθυνση: x 40 (α, β), x 100 (γ, δ), x 200 (ε)

1.7.4. Τεχνητή αποκελύφωση (αποχορίωση) κύστεων

Οι κύστεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διατροφή των νυμφών ιχθύων και καρκινοειδών ως τροφή σε γόνιο ψαριών, για να γίνει όμως αυτό θα πρέπει να προηγηθεί η αποκελύφωση. Το σκληρό περίβλημα που περιβάλλει την κύστη μέσα στην οποία βρίσκεται το ναρκωμένο έμβρυο μπορεί να απομακρυνθεί με χημικά μέσα (π.χ NaOCl) δια μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται αποκελύφωση. Στην ουσία απομακρύνεται το εξωτερικό περίβλημα του κέλυφους (φλοιώδες και κυψελοειδές στρώμα) και μένει εκτεθειμένη η μεμβράνη εκκόλασης. Το περίβλημα αυτό αν δεν αφαιρεθεί εμποδίζει την πέψη των νυμφών των εκτρεφόμενων νυμφών των ψαριών και καρκινοειδών στις οποίες προσφέρονται για τροφή (Εικ. 11 και 12).



Εικόνα 11. Σχηματική παράσταση τη δομής του κελύφους. Η εξωτερική εφυμενίδα αποτελεί φραγμό διαπερατότητας. Με την αποκελύφωση απομακρύνεται το φλοιώδες και κυψελοειδές στρώμα (Bengston *et al.*, 1991)



Εικόνα 12. Αποκελυφωμένες κύστεις *Artemia franciscana* (GSL). Απομάκρυνση κελύφους και έκθεση της μεμβράνης εκκόλαψης (η, θ). Μεγέθυνση: x 40 (α, β, γ, δ), x 100 (ε, δ) x 200 (στ, θ)

Το εξωτερικό περίβλημα του κελύφους μπορεί να οξειδωθεί γιατί περιλαμβάνει διάφορες λιποπρωτεΐνες (Brown, 1950). Η εμβρυονική μεμβράνη που βρίσκεται κάτω από το εξωτερικό περίβλημα καλείται εξωτερική εφυμενίδα και δεν πρέπει να αντιδράσει με το υποχλωριώδες διάλυμα (αδιαπέραστο φράγμα) (Linder, 1960), γιατί διαφορετικά θα θανατωθεί το έμβρυο (Morris and Afzelius, 1967).

Μόνο το υποχλωριώδες ιόν έχει την ικανότητα να προσβάλλει και να διαλύει το εξωτερικό περίβλημα του κελύφους, ενώ παραμένει ανέπαφο από την επίδραση ισχυρών οξέων, βάσεων και οργανικών διαλυτών και αδιαπέρατο από ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους (διαπερατό σε CO₂, NH₄Cl, H₂O και O₂) (Sorgeloos *et al.* 1977).

Συνοπτικά η διαδικασία της αποκελύφωσης περιλαμβάνει την ενυδάτωση των κύστεων, την απομάκρυνση του εξωτερικού περιβλήματος του κελύφους με υποχλωριώδες διάλυμα και εξουδετέρωση του εναπομείναντος χλωρίου με αποχλωριστικό διάλυμα (Θειώδους Νατρίου).

Οι αποκελυφωμένες κύστεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα ως τροφή σε εκτροφές διακοσμητικών ψαριών ή να αφυδατωθούν σε κορεσμένη άλμη και να αποθηκευτούν για μελλοντική χρήση (Lim *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2003). Μπορούν να αποθηκευτούν για μερικές μέρες σε ψυγείο στους 0-4 °C χωρίς να επηρεαστεί η εκκολαψιμότητά τους. Αν απαιτείται αποθήκευση για μεγαλύτερες περιόδους (εβδομάδες ή μερικούς μήνες), οι κύστεις τοποθετούνται σε διάλυμα άλμης με αλατότητα μεγαλύτερη των 220 psu, πριν μπουν στο ψυγείο. Το διάλυμα αυτό ανανεώνεται μετά τις πρώτες 24 ώρες. Κατά την ολονύκτια αφυδάτωση (με αερισμό για την διατήρηση ομοιογενούς αιωρήματος) οι κύστεις συνήθως χάνουν το 80% του νερού που υπάρχει στα κύτταρα τους. Με τη διακοπή του αερισμού, οι αποκελυφωμένες κύστεις που έχουν πλέον τη μορφή

κόκκου καφέ αναδύονται στην επιφάνεια. Αφού συλλεχθούν με ένα κόσκινο, οι αφυδατωμένες κύστεις πρέπει να φυλαχτούν σε παγωμένη άλμη.

Δεδομένου ότι οι κύστεις χάνουν την εκκολασιμότητα τους όταν εκτίθενται στην υπεριώδη ακτινοβολία, προτείνεται η αποθήκευση τους σε χώρους όπου θα προστατεύονται από την άμεση ακτινοβολία. (Lavens and Sorgeloos, 1996).

Οι αποκελυφωμένες κύστεις μπορούν είτε να παραμείνουν σε θαλασσινό νερό και να εκκολαφθούν σε ναυπλίους σταδίου I είτε να χορηγηθούν ως έχουν. Οι αποκελυφωμένες κύστεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ευκολία ακόμη και από ερασιτέχνες (ιδιοκτήτες ενυδρείων) χωρίς να απαιτείται η διαδικασία της εκκόλαψης (Garcia-Ortega *et al.*, 1998).

Η χρήση αποκελυφωμένων κύστεων είναι πολύ πιο περιορισμένη από αυτή των ναυπλίων, αν και το ενεργειακό τους περιεχόμενο είναι κατά μέσο όρο 30 - 40% υψηλότερο. Όμως, το κυριότερο μειονέκτημά τους είναι ότι βυθίζονται στον πυθμένα και λόγω της απουσίας της κίνησης, δεν έλκουν τον θηρευτή.

Σε ευρεία κλίμακα οι αποκελυφωμένες κύστεις χρησιμοποιούνται κυρίως σε εκκολαπτήρια καρκινοειδών και ιδιαίτερα γαρίδων, που τρέφονται από το βυθό της δεξαμενής και έτσι χρησιμοποιούν όλη την ποσότητα κύστεων που τους παρέχεται. Αντίθετα, στα ψάρια που τρέφονται στη στήλη του νερού δεν συνιστάται η χορήγηση αποκελυφωμένων κύστεων (Garcia-Ortega *et al.*, 1998). Επίσης για την αποφυγή βύθισης των κύστεων εφαρμόζεται έντονος αερισμός κυρίως σε εκτροφές γαρίδων του γένους *Penaeus* sp. που είναι γνωστό ότι δεν επηρεάζονται από την παρουσία φυσαλίδων, κάτι που δεν ισχύει για τις νύμφες των ψαριών, όπου ο έντονος αερισμός μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη της νηκτικής κύστης (Sorgeloos *et al.*, 1986).

Τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η τεχνητή αποκελύφωση είναι πολλά.

Πρώτον, επιτυγχάνεται η απομάκρυνση παθογόνων βακτηρίων (*Vibrio sp.* κλπ), φυκών και οργανικών ακαθαρσιών που έχουν προσκολληθεί στο κέλυφος κατά συνέπεια αποφεύγεται η είσοδος μολυσματικών εστιών στις δεξαμενές εκτροφής (Sorgeloos *et al.*, 2001).

Δεύτερον, επιτυγχάνεται πλήρης διαχωρισμός των ναυπλίων από τα κελύφη των κύστεων με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η μεταφορά των κελυφών στις δεξαμενές εκτροφής των ψαριών. Οι μη εκκολαπτόμενες κύστεις και τα άδεια κελύφη που εισέρχονται στις δεξαμενές εκτροφής των νυμφικών σταδίων μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές διαταραχές αν προσληφθούν από τους θηρευτές όπως απόφραξη του γαστρικού σωλήνα (έντερο) κ.λπ. Επίσης οι νύμφες των ψαριών τρώγοντας τα άδεια κελύφη έχουν την αίσθηση πως χορταίνουν και σταματούν να προσλαμβάνουν τροφή, χωρίς όμως να έχουν προσλάβει την απαιτούμενη θρεπτική αξία.

Τρίτον, οι ναύπλιοι σταδίου I που εκκολάπτονται από αποκελυφωμένες κύστεις έχουν υψηλότερο ενεργειακό περιεχόμενο (30-55% ανάλογα με τον πληθυσμό) γιατί δεν καταναλώνουν ενέργεια για να σπάσουν το κέλυφος (Sorgeloos *et al.*, 1986).

Τέταρτον, οι αποκελυφωμένες κύστεις απαιτούν λιγότερο φωτισμό για εκκόλαψη.

Πέμπτον, εάν οι αποκελυφωμένες κύστεις επωαστούν για εκκόλαψη ναυπλίων σταδίου I, η εκκολαψιμότητα βελτιώνεται σημαντικά αφού σχεδόν όλες οι κύστεις υφίσταται αποκελύφωση χωρίς να απαιτείται η φυσιολογική ρήξη του κελύφους. Ακόμα και εάν οι κύστεις έχουν χαμηλό ενεργειακό περιεχόμενο η εκκολαψιμότητα μπορεί να βελτιωθεί, εξαιτίας της λιγότερης ενέργειας που απαιτείται για να εξέλθουν τα έμβρυα από τις ήδη αποκελυφωμένες κύστεις (Bengston *et al.*, 1991).

Εφαρμόζοντας την τεχνητή αποκελύφωση, προσπαθούμε να μειώσουμε το χρόνο εκκόλαψης αλλά κυρίως να πάρουμε σε 24 ώρες (από την έναρξη της ενυδάτωσης) αριθμό ναυπλίων ίσο ή μεγαλύτερο από αυτόν του μάρτυρα, κερδίζοντας ταυτόχρονα τα πιο πάνω οφέλη.

Οι τυπικές διαδικασίες αποκελύφωσης όπως περιγράφονται από το Sorgeloos και τους συνεργάτες του (1977) δίνουν καλά αποτελέσματα για τα περισσότερα στελέχη *Artemia* που υπάρχουν στην αγορά. Εντούτοις όμως, μερικά στελέχη είναι ευαίσθητα στη διαδικασία της αποκελύφωσης και απαιτούν μια τροποποιημένη τεχνική (De Wolf *et al.*, 1998).

1.7.5 Συνθήκες εκκόλαψης

Ως συνέπεια συγκεκριμένων χαρακτηριστικών κάθε πληθυσμού, οι επιδράσεις των παραμέτρων εκκόλαψης διαφέρουν (αν και ελάχιστα) από πληθυσμό σε πληθυσμό, αυτό όμως οδηγεί σε διαφορετικά αποτελέσματα εκκόλαψης για κάθε πληθυσμό. Σε γενικές γραμμές, τα αβιοτικά στοιχεία του περιβάλλοντος που επιδρούν στην εκκόλαψη και στην ανάπτυξη της *Artemia* αναφέρονται παρακάτω:

Αλατότητα – θερμοκρασία. Η ανάπτυξη και επιβίωση της *Artemia* επηρεάζεται κυρίως από τη αλατότητα και την θερμοκρασία. Και οι δυο παράμετροι πρέπει να μελετούνται μαζί εφόσον παρατηρείται μια αμοιβαία αλληλεπίδραση τους στα υδρόβια ασπόνδυλα, που ισχυροποιείται στην *Artemia*. Αν και είναι αποδεκτό πως η *Artemia* αποτελεί ένα ευρύθερμο και ευρύαλο γένος, τα διάφορα στελέχη της παρουσιάζουν διαφορετική ικανότητα επιβίωσης. Ο Vanhaecke και οι συνεργάτες του (1987) αναφέρουν πως για τα περισσότερα στελέχη, για ένα εύρος θερμοκρασιών μεταξύ 19 και 25 °C και

αλατότητας μεταξύ 35 και 110 psu η θνησιμότητα που παρατηρείται είναι μικρότερη του 10 %.

Το ανώτερο και κατώτατο όριο αλατότητας στο οποίο έχει βρεθεί *Artemia* είναι υπέρκορα νερά (άλμες) αλατότητας 340 και 12 psu (Ιράν) αντίστοιχα (Abatzopoulos *et al.*, 2006). Το ανώτερο όριο αλατότητας που ανέχεται η *Artemia* σε κάθε συγκεκριμένο βιότοπο καθορίζεται στην πράξη από την ανώτατη τιμή που ανέχονται οι θηρευτές της στο συγκεκριμένο βιότοπο (Van Stappen, 2002). Βέβαια σε πολύ υψηλά επίπεδα αλατότητας εξαιτίας του μεγάλου μεταβολικού κόστους και της έλλειψης τροφής του περιβάλλοντος μέσου, η *Artemia* αντιμετωπίζει σημαντικές δυσκολίες στην επιβίωση της (Van Stappen, 2002).

Πάνω από το ανώτατο όριο αλατότητας απορροφούνται υπερβολικά ποσά νερού από τις κύστεις. Το όριο αυτό διαφέρει από πληθυσμό σε πληθυσμό, κυμαίνεται περίπου μεταξύ 85-90 psu για τους περισσότερους πληθυσμούς. Το πρόβλημα αυτό σχετίζεται με τα επίπεδα ενυδάτωσης των κύστεων. Ένα δεύτερο πρόβλημα σχετίζεται με την συγκέντρωση γλυκερόλης που χρειάζεται να σχηματιστεί έτσι ώστε να επιτευχθεί η κρίσιμη ωσμωτική πίεση που απαιτείται εντός της εξωτερικής εφυμενίδας. Σε μειωμένες τιμές οι ναύπλιοι εκκολάπτονται γρηγορότερα αφού λιγότερη γλυκερόλη απαιτείται να σχηματιστεί. Επίσης οι κύστεις πολλών πληθυσμών σε χαμηλή αλατότητα εμφανίζουν μεγαλύτερη αποδοτικότητα εκκόλαψης και οι ναύπλιοι έχουν μεγαλύτερο ενεργειακό περιεχόμενο. Το προτεινόμενο εύρος αλατότητας για εκκόλαψη κυμαίνεται από 5 έως 35 psu. Για πρακτικούς λόγους συνήθως χρησιμοποιείται θαλασσινό νερό (30-40 psu).

Το ευνοϊκότερο εύρος θερμοκρασίας για τη βέλτιστη αύξηση της *Artemia* θεωρείται αυτό των 25-28 °C (Lavens and Sorgeloos, 1996). Οι θερμοκρασίες στις οποίες

παρουσιάζει ανοχή είναι 6-35 °C, αν και η *A. tibetiana* έχει προσαρμοστεί σε μέση ετήσια θερμοκρασία 1,6 °C (Abatzopoulos *et al.*, 1998). Η ανοχή σε μεταβολές της θερμοκρασίας αποτελεί ένα ακόμη ιδιαίτερο χαρακτηριστικό που βρίσκει εφαρμογή στις υδατοκαλλιέργειες. Η *Artemia* μπορεί να συντηρηθεί σε χαμηλές θερμοκρασίες ώστε να μειώνεται ο μεταβολισμός και να χορηγηθεί ως τροφή αρκετές ώρες μετά την εκκόλαψη ενώ οι κύστες της *Artemia* ανέχονται μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών (Van Starpen, 2002).

Ποιότητα του νερού (ιοντική σύνθεση). Οι αναλογίες ιόντων στις οποίες έχει βρεθεί να ζει η *Artemia* είναι πραγματικά εντυπωσιακές. Αυτό φαίνεται από μια απλή σύγκριση με το θαλασινό νερό. Όσο αφορά την αναλογία Cl^-/CO_3^{2-} παρατηρείται 137 στη θάλασσα έναντι 101-810 στο περιβάλλον της *Artemia*, για την αναλογία Na^+/K^+ 28 έναντι 8-173 και για την αναλογία Cl^-/SO_4^{2-} 7 έναντι 0,5-90.

Διαλυμένο οξυγόνο. Το εύρος των συγκεντρώσεων του διαλυμένου οξυγόνου στο οποίο ζει η *Artemia* είναι 1 έως 150 mg/ℓ. Η *Artemia* έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται γρήγορα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου μέσω της παραγωγής διαφορετικών αιμογλοβίνων με εξειδικευμένη έλξη προς το οξυγόνο. Μπορεί να ζήσει σε πολύ χαμηλά επίπεδα οξυγόνου (ανοξικές συνθήκες). Μόνο τιμές οξυγόνου μεγαλύτερες των 2 mg/ℓ μπορούν να περιορίσουν την παραγωγή βιομάζας. Οι ιδιαίτερα χαμηλές τιμές οξυγόνου βλάπτουν κυρίως τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια των ναυπλίων στα οποία δεν έχουν αναπτυχθεί ακόμη οι λειτουργικές αναπνευστικές δομές.

Η χρησιμοποίησή ενός στελέχους *Artemia* στις υδατοκαλλιέργειες απαιτεί πρώτα μια μελέτη συγκεκριμένων χαρακτηριστικών όπως τις βιομετρικές παραμέτρους, το ενεργειακό περιεχόμενο, την αναλογία των θρεπτικών συστατικών κυρίως όμως τα

εκκολαπτικά χαρακτηριστικά. Οι κύστεις χρειάζονται περίπου 18-24 ώρες για να εκκολαφθούν αν και μπορεί να εκκολάπτονται μέχρι και 48 ώρες σε περιπτώσεις όπου χρησιμοποιούνται χαμηλής ποιότητας κύστεις ή εφαρμόζονται μη ευνοϊκές συνθήκες. Είναι χαρακτηριστικό πως στις εμπορικές συσκευασίες αναγράφεται κυρίως το ποσοστό εκκόλαψης και η εκκολαψιμότητα των κύστεων, συχνά όμως παρατηρούνται διαφοροποιήσεις από τις τιμές αυτές. Προκειμένου να εκτιμηθεί η εκκολαπτική ποιότητα μιας συγκομιδής κύστεων χρησιμοποιούνται, ως κριτήρια, μεταξύ άλλων τα ακόλουθα *εκκολαπτικά χαρακτηριστικά* (Lavens and Sorgeloos, 1996).

1. Ποσοστό εκκόλαψης (*Hatching Percentage*), εκφράζει τον αριθμό των κύστεων που εκκολάπτονται κάτω από σταθερές συνθήκες από 100 "ακέραιες" (γεμάτες) κύστεις. Το κριτήριο αυτό αναφέρεται μόνο στην εκκολαπτική δυνατότητα των γεμάτων κύστεων και εξαρτάται από:

- α) τον αριθμό των κύστεων που βρίσκονται σε διάπαυση και δεν εκκολάπτονται ακόμα και σε άριστες συνθήκες,
- β) το ενεργειακό περιεχόμενο των κύστεων που μπορεί να είναι πολύ χαμηλό για να σχηματιστούν οι απαραίτητες ποσότητες γλυκερόλης
- γ) τον αριθμό των νεκρών εμβρύων που καταστράφηκαν, πιθανώς εξαιτίας ακατάλληλης μεταχείρισης και αποθήκευσης.

Πρακτικά, το ποσοστό εκκόλαψης υπολογίζεται ως εξής: $HP = N \times 100 / (N+C+U)$, όπου:

HP = το ποσοστό της εκκόλαψης

N = ο αριθμός των ναυπλίων

C = ο αριθμός των κύστεων που δεν εκκολάπτονται και

U = ο αριθμός των κύστεων στο στάδιο της "ομπρέλλας" (έτοιμοι για εκκόλαψη).

Στο ποσοστό της εκκόλαψης οφείλεται κυρίως η διαφορά στην αξία (τιμή) των κύστεων κάθε παρτίδας (π.χ μια παρτίδα με 80 % εκκόλαψη αξίζει περισσότερο έναντι μιας παρτίδας με 20 %) (Lavens *et al.*, 1987), επομένως το ποσοστό της εκκόλαψης αποτελεί βασικό κριτήριο ελέγχου της ποιότητας κύστεων.

2. Εκκολαψιμότητα (*hatching efficiency*) αναφέρεται στον αριθμό των ναυπλίων που μπορούν να παραχθούν από την εκκόλαψη 1g ξηρών κύστεων. Η εκκολαψιμότητα σχετίζεται με το ποσοστό εκκόλαψης, αφού από την μελέτη του ποσοστού εκκόλαψης (HP) υπολογίζεται ο αριθμός των ναυπλίων (N). Έτσι, με βάση τα στοιχεία που συλλέγονται από τις μετρήσεις μπορεί να υπολογιστεί η εκκολαψιμότητα. Η εκκολαψιμότητα μπορεί να φθάνει και σε πολύ χαμηλά επίπεδα όπως 100.000 ή και πολύ υψηλά όπως οι προνομιούχες κύστες από τη Great Salt Lake της Utah με άνω των 250.000 (-270.000) ναυπλίων ανά γραμμάριο κύστεων ή αυτές από την Βραζιλία και το Βιετνάμ με περίπου 300.000 (Lavens *et al.*, 1987).

3. Ρυθμός εκκόλαψης (*Hatching Rate*) αναφέρεται στη διακύμανση του ποσοστού εκκόλαψης κατά το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την πλήρη εκκόλαψη των κύστεων από την αρχή της ενυδάτωσης μέχρι και την απελευθέρωση του τελευταίου ναυπλίου (Vanhaecke and Sorgeloos, 1982).

Κάποιες συγκεκριμένες χρονικές στιγμές παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη μελέτη του ρυθμού εκκόλαψης:

T₀: ο χρόνος εκκόλαψης μέχρι την εμφάνιση του πρώτου κινούμενου ναυπλίου (στοιχείο πολύ σημαντικό αλλά όχι απαραίτητο)

T₁₀: ο χρόνος εκκόλαψης μέχρι την εμφάνιση του 10% του συνόλου των ναυπλίων.

T₉₀: ο χρόνος εκκόλαψης μέχρι την εμφάνιση του 90% του συνόλου των ναυπλίων.

Από τις σχέσεις των T_{90} και T_{10} βγαίνει η έννοια του συγχρονισμού της εκκόλαψης (Hatching synchrony) η οποία αναφέρεται στο χρονικό εκείνο διάστημα μέσα στο οποίο εκκολάπτονται οι περισσότεροι ναύπλιοι $T_s = T_{90} - T_{10}$

Το T_s δείχνει πόσο συγχρονισμένη είναι η εκκόλαψη στο συγκεκριμένο πληθυσμό : όσο μικρότερος είναι ο χρόνος αυτός, τόσο πιο συγχρονισμένη είναι η εκκόλαψη δηλαδή όταν η επώαση γίνεται σε συνθήκες 35 psu και 25 °C, ο πρώτος ναύπλιος εμφανίζεται μετά από 13-16 ώρες (T_0) και ο τελευταίος ναύπλιος το αργότερο 8 ώρες μετά τον πρώτο δηλαδή 21-24 ώρες (T_{90}).

Έτσι επιτυγχάνεται η συλλογή ενός μεγάλου αριθμού ναυπλίων σταδίου I και η χορήγηση τους το συντομότερο δυνατόν στις δεξαμενές των ψαριών. Από τη άλλη εάν ο συγχρονισμός είναι χαμηλός (δηλαδή το T_s είναι μεγάλο), τότε ο πρώτος ναύπλιος θα έχει ήδη καταναλώσει πολύ ενέργεια μέχρι και την εκκόλαψη του τελευταίου, μειώνοντας έτσι την θρεπτική αξία του (διαφορετικού μεγέθους ναύπλιοι). Με το πέρασμα κάθε ώρας οι ναύπλιοι καταναλώνουν την λέκιθο τους για την κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών, με συνέπεια να ελαττώνουν το ενεργειακό περιεχόμενο τους, ενώ ταυτόχρονα αυξάνουν το μέγεθος και την κινητικότητα τους με αποτέλεσμα να κάνουν πιο δύσκολη την θήρευση τους. Για να αποφευχθούν αυτά θα πρέπει οι ναύπλιοι να συλλέγονται πιο συχνά, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συλλογή ενός μικτού πληθυσμού ναυπλίων σταδίων I, II και III τη χρονική στιγμή T_{90} . Στις υδατοκαλλιέργειες οι μόλις εκκολαπτόμενοι ναύπλιοι δίνονται στους θηρευτές χωρίς καθυστέρηση, γιατί αλλιώς μειώνεται το ενεργειακό περιεχόμενο και η θρεπτική τους αξία αρκεί το μέγεθος των νυμφών να είναι κατάλληλο για την πρόσληψη τους. Εισάγονται στις δεξαμενές εκτροφής των νυμφικών σταδίων είτε μαζικά είτε σε δόσεις, ώστε να υπάρχει πάντα διαθέσιμη ποσότητα στο νερό (Sorgeloos *et al.*, 1986).

Εναλλακτική λύση είναι η διατήρηση των ναυπλίων το πολύ για 48 ώρες (συνήθως 24ωρη αποθήκευση) πριν δοθούν ως τροφή, οπότε μειώνεται ο μεταβολισμός τους και διατηρείται η θρεπτική τους αξία. Πυκνότητες μέχρι και 8000 ναυπλίου / ml σε μια θερμοκρασία 2-4 °C μπορούν να διατηρηθούν σε καλά αεριζόμενες κυλινδρικές δεξαμενές (Sorgeloos *et al.*, 2001; Leger *et al.*, 1983).

Η χρονική διάρκεια T_s παρέχει σημαντική πληροφορία για το ιδανικό χρονικό διάστημα εκκόλαψης ώστε οι ναύπλιοι που συλλέγονται να περιέχουν το υψηλότερο ενεργειακό περιεχόμενο. Επομένως, αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο και καθοριστικό κριτήριο για την καταλληλότητα των κύστεων ενός πληθυσμού *Artemia*, που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στις υδατοκαλλιέργειες (Vanhaecke and Sorgeloos, 1982).

Μια καλή στρατηγική για ένα καλλιεργητή που θέλει να χρησιμοποιήσει μεγάλες ποσότητες κύστεων για εκκόλαψη είναι να αγοράσει αρχικά μια μικρή ποσότητα από αυτή τη παρτίδα και να την εξετάσει δηλαδή να ελέγξει την εκκολαψιμότητα και τη θρεπτική αξία της και τέλος να αποφασίσει εάν αξίζει. Με αυτόν το τρόπο θα αποφευχθούν οι άσκοπες σπατάλες της εταιρείας.

1.8. Σκοπός της εργασίας

Στην συγκεκριμένη εργασία διερευνήθηκαν οι ιδανικότερες συνθήκες που προκαλούν τη μεγιστοποίηση της **εκκολαψιμότητας (Hatching Efficiency)** και του **ποσοστού εκκόλαψης (Hatching Percentage)** κύστεων *Artemia franciscana* της Great Salt Lake της Utah.

I. Μέσω της **Τεχνητής Αποκελύφωσης** επιτυγχάνεται η βελτίωση της ποιότητας των κύστεων (θρεπτική αξία, εκκολαψιμότητα, ποσοστό εκκόλαψης), καθώς και η αντιμετώπιση διαφόρων προβλημάτων που παρατηρούνται κατά την εκτροφή του ζωοπλαγκτονικού οργανισμού *Artemia* και τη χρησιμοποίησή του ως τροφή στις νύμφες ψαριών και καρκινοειδών (απομάκρυνση παθογόνων οργανισμών, ευκολότερος διαχωρισμός κελυφών από ναυπλίους κ.λπ)

Η αποκελύφωση απαιτεί μια συγκεκριμένη συγκέντρωση χλωρίου, η οποία πρέπει να είναι δραστική για το κέλυφος αλλά όχι φονική για το έμβρυο. Ανάλογα με τη συγκέντρωση χλωρίου που χρησιμοποιείται μπορεί να προκληθεί είτε ολική ή μερική απομάκρυνση του κελύφους των κύστεων είτε ακόμη και καταστροφή των εμβρύων σε διαφορετικό βαθμό. Ο βαθμός καταστροφής εξαρτάται από τη συγκέντρωση του χλωρίου σε σχέση με το χρόνο παραμονής των κύστεων στο διάλυμα αποκελύφωσης. Ένας σωστός συνδυασμός συγκέντρωσης χλωρίου και χρόνου αποκελύφωσης οδηγεί σε καλύτερα αποτελέσματα εκκόλαψης.

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η επίδραση διάφορων συγκεντρώσεων ενεργού χλωρίου από 0,25 μέχρι 1,75 g (ανά 0,25 g) σε 14 ml διαλύματος αποκελύφωσης, στη διαμόρφωση του ποσοστού εκκόλαψης και της εκκολαψιμότητας στο χρονικό διάστημα μεταξύ της 14^{ης} και της 24^{ης} ώρας (ανά 2 ώρες) από την έναρξη της ενυδάτωσης.

- ✦ Από την εκτίμηση των αποτελεσμάτων επιλέχθηκε η ιδανικότερη συγκέντρωση ενεργού χλωρίου στον αντίστοιχο χρόνο εκκόλαψης.
- ✦ Μελετήθηκε επίσης η σχέση του χρόνου αποκελύφωσης και της συγκέντρωσης του ενεργού χλωρίου καθώς και η σημασία του χρόνου αυτού στη διαμόρφωση του αποτελέσματος της εκκόλαψης.

II. Για να επιτευχθεί όσον το δυνατό καλύτερη εκκόλαψη σε σύντομο χρονικό διάστημα και με μέγιστο αριθμό ναυπλίων, καθοριστικό ρόλο διαδραματίζουν διάφορες **φυσικοχημικές παράμετροι επώασης.**

Για τις ανάγκες της εργασίας διερευνήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας, της αλατότητας και του φωτισμού στη διαμόρφωση της εκκολαψιμότητας και του ποσοστού εκκόλαψης την 24^η ώρα από την έναρξη της ενυδάτωσης.

Στόχοι ήταν:

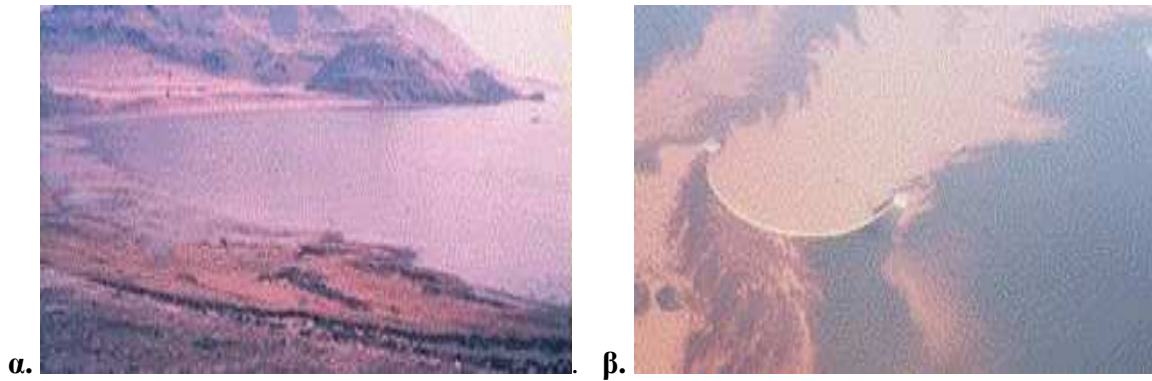
- ✦ Η εύρεση της ιδανικότερης τιμής της θερμοκρασίας και της αλατότητας για την καλύτερη εκκόλαψη.
- ✦ Η διαπίστωση ή όχι της παρουσίας φωτισμού στην εκκόλαψη.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης επιλέχθηκε ο καταλληλότερος συνδυασμός.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Γενικά

Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν κύστες *Artemia franciscana* της Great Salt Lake της Utah (USA) (Εικ. 13α, β) της εταιρεία Koudis International Inc. NY, USA, που χρησιμοποιούνταν στον ερευνητικό σταθμό Θαλάσσιας Υδατοκαλλιέργειας επαρχίας Λάρνακας Κύπρου (Εικ. 14) όπου πραγματοποιήθηκε το πειραματικό μέρος της εργασίας.



Εικόνα 13. Απόθεση (α) και συγκομιδή (β) κύστεων από τη Great Salt Lake της Utah, USA (www.google.com)



Εικόνα 14. Αεροφωτογραφία των εγκαταστάσεων του ερευνητικού σταθμού θαλάσσιας υδατοκαλλιέργειας Μενεού της Λάρνακας, Κύπρου (www.googleearth.com)

2.2. Παράμετροι αποφασιστικής σημασίας για την άριστη εκκόλαψιμότητα των κύστεων της *Artemia*

Προκειμένου να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα των πειραμάτων και η αξιόπιστη σύγκριση των αποτελεσμάτων, οι πειραματικές συνθήκες διατηρήθηκαν σταθερές (με εξαίρεση την υπό μελέτη μεταβλητή) ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εκκόλαψης που προτάθηκε από τους Sorgeloos και συν. (1978, 1986) αλλά με τις απαραίτητες τροποποιήσεις για τις ανάγκες των πειραμάτων.

Η εκκόλαψη μικρών ποσοτήτων (μερικών γραμμαρίων) κύστεων *Artemia* είναι στην ουσία απλούστερη διαδικασία, σε αντίθεση με μεγαλύτερες ποσότητες (Kg). Και στις δυο όμως περιπτώσεις για να εξασφαλιστεί η μέγιστη απόδοσή της εκκόλαψης θα πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπόψη οι παρακάτω παράμετροι :

- ✦ δοχεία εκκόλαψης
- ✦ εκκολαπτικό μέσο
- ✦ θερμοκρασία
- ✦ αερισμός
- ✦ πυκνότητα κύστεων
- ✦ φωτισμός

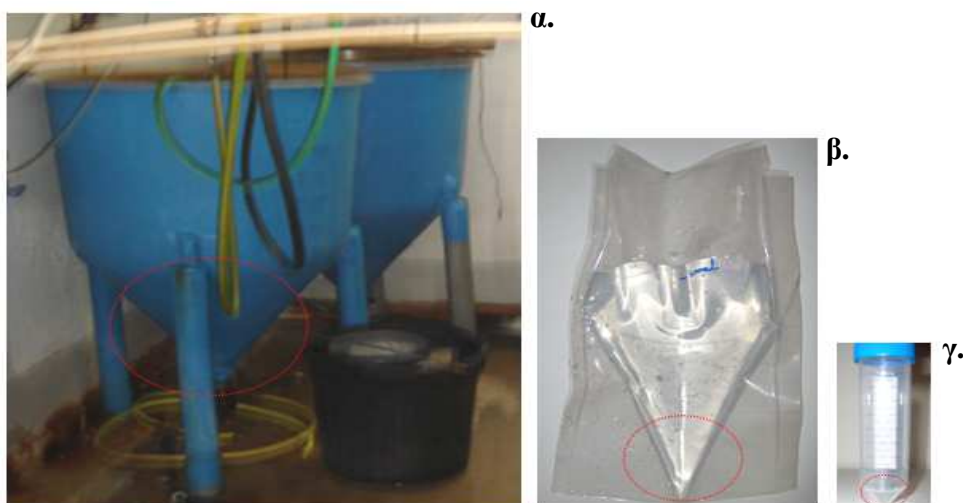
Δοχεία εκκόλαψης

Χρησιμοποιήθηκαν πλαστικοί σωλήνες Falcon και πλαστικές σακούλες με κωνική βάση (Εικ. 37α, β). Τα δοχεία αυτά πληρούν τους όρους για μια ιδανική εκκόλαψη.

Η εκκόλαψη των κύστεων *Artemia* σε εμπορικό επίπεδο (μεγάλες ποσότητες) οι κύστεις επιτυγχάνεται σε κυλινδροκωνικές δεξαμενές (Εικ. 15γ).

Οι συγκεκριμένοι σωλήνες Falcon είναι διαφανείς, κυλινδροκωνικού σχήματος με μέγιστη χωρητικότητα 50 ml, κατάλληλοι για μικρές ποσότητες κύστεων. Το πλαστικό πώμα των σωλήνων έχει διαμορφωθεί κατάλληλα με οπή, έτσι ώστε να διέρχεται από αυτό εύκαμπτος σωλήνας παροχής αέρα, στο άκρο του οποίου ενσωματώθηκε το κομμένο άκρο μιας μικροπιπέτας, για καλύτερη ανάδευση των κύστεων αλλά και για τέλεια εφαρμογή, προκειμένου να ελαχιστοποιούνται οι απώλειες του εκκολαπτικού μέσου εξαιτίας της εξάτμισης. Στην περίπτωση που η σύνδεση παρουσίαζε διαρροή χρησιμοποιήθηκε πλαστική μεμβράνη (parafilm) γύρω από τις πιπέτες Pasteur και στους κυλινδροκωνικούς σωλήνες.

Οι πλαστικές σακούλες είναι διαφανείς, κυλινδροκωνικού σχήματος με μέγιστη χωρητικότητα 500 ml, κατάλληλες για μεγαλύτερη ποσότητα κύστεων. Αν η στάθμη του νερού έπεφτε, εξαιτίας της εξάτμισης, γινόταν προσθήκη απεσταγμένου νερού για τη διατήρηση της στάθμης και της αλατότητας του εκκολαπτικού μέσου σε σταθερά επίπεδα.



Εικόνα 15. Ειδικές κυλινδροκωνικές δεξαμενές (α), πλαστικές σακούλες με κωνική βάση (β) και σωλήνες falcon (γ) για την εκκόλαψη κύστεων *Artemia*

Εκκολαπτικό μέσο

Για την εκκόλαψη των κύστεων χρησιμοποιήθηκε νερό με μέσο όρο αλατότητα 29-30 psu, του οποίου το pH πρέπει να διατηρείται πάνω από 8 (με καλύτερη τιμή αυτή των 8,85) (Treece, 2000). Κατά τη διάρκεια της εκκόλαψης το pH ρυθμιζόταν συνεχώς με τη χρήση διαλύματος Na_2CO_3 για αύξηση της τιμής του pH ή με διάλυμα NaHCO_3 για τη μείωση της. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται νερό χαμηλής αλατότητας (5-10 psu) ή εκκολάπεται μεγάλη ποσότητα κύστεων (εξαιτίας της μεγάλης παραγωγής μεταβολιτών π.χ CO_2) κρίνεται απαραίτητη η προσθήκη μέχρι και 2 g NaHCO_3/ℓ (κουταλάκι τσαγιού) έτσι ώστε το pH να διατηρείται άνω του 8 κατά της διάρκεια της εκκόλαψης.

Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία του εκκολαπτικού μέσου πρέπει να διατηρείται σταθερή στους 27 ± 2 °C (Treece, 2000). Για να μπορεί να επιτευχθεί αυτή η θερμοκρασία χρησιμοποιήθηκε υδατόλουτρο με θερμοστάτη και με δυνατότητα ρύθμισης ανά 0,5 °C. Η απώλεια νερού από το υδατόλουτρο λόγω της εξάτμισης, αναπληρωνόταν.

Αερισμός (σε επίπεδα κορεσμού)

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν αντλίες και εύκαμπτοι σωλήνες για το συνεχή και ήπιο αερισμό του εκκολαπτικού μέσου, για να επιτυγχάνεται ομοιογενής κατανομή των κύστεων και να αποφεύγεται η συσσωμάτωσή τους στον πυθμένα των δοχείων εκκόλαψης. Ο μέσος όρος του οξυγόνου υπολογίστηκε στα 7,2 mg/ℓ (ιδανικότερη τιμή με βάση τα διεθνή πρότυπα είναι αυτή των 7 mg/ℓ).

Πυκνότητα κύστεων

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε πυκνότητα κύστεων 1,7 g (πείραμα I) και 2 g (πείραμα II) αφυδατωμένων κύστεων ανά λίτρο εκκολαπτικού μέσου. Η πυκνότητα των κύστεων στο νερό θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 1,5 g/ℓ και μικρότερη από 5 g /ℓ (Sorgeloos *et al.*, 1977, 1991).

Φωτισμός

Χρησιμοποιήθηκε τεχνητός φωτισμός 1000 lux. Για τις ανάγκες του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν λάμπες φθορίου (καταλληλότερη φασματική κατηγορία των 400-600 nm (Van Der Linden *et al.*, 1985), ώστε να αποφεύγεται η μεταβολή της θερμοκρασίας του εκκολαπτικού μέσου εξαιτίας της εκπεμπόμενης θερμότητας. Οι λάμπες τοποθετήθηκαν 20 cm πάνω από τα δοχεία εκκόλαψης και παρέμειναν ανοικτές για όλη την διάρκεια της εκκόλαψης.

2.2.1. Διαδικασία εκκόλαψης

Σε ένα δοχείο εκκόλαψης με 45 ml νερού προστέθηκαν 0,0765 g κύστεις. Εφαρμόστηκε έντονος αερισμός, απαραίτητος για μια σωστή δειγματοληψία και λήφθηκαν 16 δείγματα των 250 μℓ, από τα οποία μετρήθηκε ο αριθμός των κύστεων σε κάθε δείγμα. Από το μέσο όρο των 16 δειγμάτων υπολογίστηκε η ποσότητα των κύστεων στα 45 ml (0,0765 g) και ακολούθως στο ένα γραμμάριο. Ο συνολικός αριθμός των κύστεων (γεμάτων και μη) που εκτιμήθηκε σε ένα γραμμάριο ξηρής μάζας κύστεων αναφέρεται στα αποτελέσματα μας.

Η διαδικασία της εκκόλαψης που εφαρμόστηκε ήταν η ακόλουθη (πείραμα I):

1. Ξηρές κύστεις *Artemia franciscana* (GSL) ζυγίστηκαν σε ζυγό (με ακρίβεια τέταρτου δεκαδικού ψηφίου) σε ποσότητα τέτοια ώστε η πυκνότητά τους να μην υπερβαίνει το 1,7 g/ℓ εκκολαπτικού μέσου. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 0,0765 g κύστεων σε 45 ml εκκολαπτικού μέσου.
2. Αρχικά 0,0765 g ξηρών κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) τοποθετήθηκαν σε δοχεία εκκόλαψης (σωλήνες falcon) μέγιστης χωρητικότητας 50 ml που εμπεριείχαν 15 ml γλυκού νερού για τις ανάγκες της ενυδάτωσης. Αφού παρέμειναν για 1 ώρα και 40 λεπτά στην συνέχεια ξεπλύθηκαν και προστέθηκε εκκολαπτικό μέσο μέχρι τελικό όγκο 45 ml για τις ανάγκες της εκκόλαψης. Από την έναρξη της ενυδάτωσης εφαρμόστηκε συνεχής αερισμός.
3. Οι υπόλοιποι παράμετροι παρέμεναν σταθεροί εκτός της μεταβλητής που εξεταζόταν (θερμοκρασία ή αλατότητα ή φωτισμός).
4. Κάθε 10 ώρες ελεγχόταν η στάθμη του νερού για τη ρύθμιση τόσο της αλατότητας όσο και της πυκνότητας των κύστεων (αποφυγή σφαλμάτων στους υπολογισμούς) στην περίπτωση που αυξάνονταν λόγω εξάτμισης. Σε περίπτωση που η στάθμη έπεφτε γινόταν προσθήκη νερού μέχρι την συμπλήρωση του όγκου των 45 ml.
5. Για τον προσδιορισμό της εκκολαψιμότητας και του ποσοστού εκκόλαψης λαμβάνονταν δείγματα την 24^η ώρα από την έναρξη της ενυδάτωσης
6. Απαραίτητη προϋπόθεση για μια σωστή και τυχαία δειγματοληψία είναι ο συνεχής αερισμός. Με τη χρήση μικροπιπέτας λήφθηκαν 16 δείγματα όγκου 250 μl. Συνολικά 48 δείγματα (16 x 3 επαναληπτικές εκκολάψεις). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικά χαραγμένα τρυβλία καταμέτρησης και προστέθηκαν λίγες σταγόνες Lugol για το

χρωματισμό και τη θανάτωση των ναυπλίων. Εναλλακτική λύση για την θανάτωση και την διατήρηση ναυπλίων *Artemia* είναι η προσθήκη λίγων σταγόνων φορμαλδεύδης. Σημειωτέον ότι, η παραμονή των ναυπλίων σε φορμαλδεύδη για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα προκαλεί αφυδάτωση με αλλοίωση των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών. Επίσης, η χρησιμοποίηση της φορμαλδεύδης θα πρέπει να γίνεται με προσοχή για την αποφυγή αναπνευστικών προβλημάτων εξαιτίας των αναθυμιάσεων.

7. Ακολούθησε παρατήρηση στο στερεοσκόπιο και καταμέτρηση αρχικά των ναυπλίων (βάση των ναυπλίων υπολογίστηκε η εκκολασιμότητα), των εμβρύων στο στάδιο «ομπρέλας» και ακολούθως των γεμάτων κύστεων που δεν είχαν εκκολαφθεί, με επεξεργασία σε NaOCl. Με αυτό το τρόπο καταστρεφόταν το κέλυφος των κύστεων και γίνονταν ορατά τα έμβρυα που δεν εκκολάφθηκαν.
8. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS. Στην περίπτωση που τα δεδομένα (κύστεις, έμβρυα στο στάδιο της ομπρέλας και ναύπλιοι) εμφάνιζαν μια ομοιόμορφη κατανομή τότε ακολουθούσε ο υπολογισμός της εκκολασιμότητας και του ποσοστού εκκόλαψης.

Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Για καθεμία από τις τρεις επαναλήψεις υπολογιζόταν ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση της εκκολασιμότητας. Από τις τρεις επαναλήψεις προέκυπτε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση για το σύνολο του πειράματος.

Η παραπάνω διαδικασία ακολουθείται στην περίπτωση που δεν εφαρμόζεται τεχνητή αποκελύφωση. Όταν όμως εφαρμόζεται η προαναφερόμενη τεχνική τότε ακολουθείται η εξής διαδικασία :

2.2.2. Διαδικασία τεχνητής αποκελύφωσης (αποχορίωσης) κύστεων (πείραμα II)

1. Σε ζυγό ακριβείας ζυγίστηκαν 1 g ξηρών κύστεων και τοποθετήθηκαν σε κυλινδροκωνική φιάλη μέγιστης χωρητικότητας 500 ml. Προστέθηκαν 500 ml γλυκού νερού και οι κύστεις αφέθηκαν για ενυδάτωση για 1 ώρα και 40 λεπτά, σε θερμοκρασία 25 °C και με έντονο αερισμό
2. Στη συνέχεια, οι ενυδατωμένες κύστεις συλλέχθηκαν με ηθμό διαμέτρου 125 μm και αφού ξεπλύθηκαν καλά με τρεχούμενο νερό μεταφέρθηκαν στο διάλυμα αποκελύφωσης.

Το διάλυμα αποκελύφωσης περιλαμβάνει υγρό διάλυμα 12.5 % NaOCl, στερεό NaOH και νερό αλατότητας 35 psu (που είχε αποστειρωθεί με τη χρήση υπερϊόδους ακτινοβολίας - UV).

Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις χλωρίου 0,25 - 1,75 g (ανά 0,25 g)/14 ml τελικού διαλύματος αποκελύφωσης [2 -14 ml (ανά 2 ml) 12.5% NaOCl/14 ml τελικού διαλύματος αποκελύφωσης).

Η αποκελύφωση ξεκινά αφότου εφαρμοστεί έντονος αερισμός. Η αποκελύφωση είναι εξώθερμη αντίδραση με τη θερμοκρασία να αυξάνεται συνεχώς προς τους 40 °C. Για να διατηρηθεί η θερμοκρασία σε επιθυμητά επίπεδα (15-20 °C) το δοχείο της αποκελύφωσης τοποθετείται σε πάγο έτσι ώστε να αποφευχθεί ο θάνατος των εμβρύων (πάνω από 40 °C).

Επειδή δεν υπάρχει σταθερή προτεινόμενη διάρκεια αποκελύφωσης κρίνεται απαραίτητη η παρακολούθηση του χρώματος των κύστεων. Το χρώμα διαφέρει κατά την διάρκεια της αποκελύφωσης και αλλάζει από καφέ σε γκρι και τέλος σε πορτοκαλί.

Η αποκελύφωση ολοκληρώνεται όταν το 95% των κύστεων αποκτά λαμπερό

πορτοκαλί χρώμα. Αυτό διαπιστώνεται μακροσκοπικά, ενώ μέσω στερεοσκοπικής εξέτασης επιβεβαιώνεται η απομάκρυνση του κελύφους (φθάνει ο χρόνος της αποκελύφωσης να είναι τέτοιος ώστε να δίνεται η δυνατότητα δειγματοληψίας και παρατήρησης). Ο χρόνος της αποκελύφωσης κυμαίνεται από μερικά δευτερόλεπτα ως λίγα λεπτά ανάλογα με την ισχύ των χημικών μέσων (συγκέντρωση χλωρίου) και το πάχος του κελύφους.

3. Με την ολοκλήρωση της αποκελύφωσης οι αποκελυφωμένες κύστει συλλέχθηκαν με ηθμό διαμέτρου οπών 125 μm και ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια χλωρίου. Ήταν σημαντικό να μην παραμείνουν τα έμβρυα στο διάλυμα της χλωρίνης περισσότερο από ότι ήταν απαραίτητο για την ολοκλήρωση της αποκελύφωσης γιατί αυτό θα μπορούσε να επηρεάσει σημαντικά την βιωσιμότητα τους. Για να απομακρυνθούν και τα τελευταία υπολείμματα υποχλωριώδες νατρίου που παρέμειναν στις κύστει ήταν απαραίτητη η τοποθέτησή τους για μερικά δευτερόλεπτα (λιγότερο του ενός λεπτού) σε αποχλωριστικό διάλυμα 0.1% Na_2SO_3 και στην συνέχεια ξέπλυμα τους με άπλετο νερό. Έχει βρεθεί πως 0.2 mg NaOCl/g κύστει παραμένει εάν δεν ξεπλυθεί με αποχλωριστικό διάλυμα (Sorgeloos *et al*, 1977).
4. Αφότου ολοκληρώθηκε η διαδικασία της αποκελύφωσης οι κύστει μεταφέρθηκαν μέσα σε πλαστική σακούλα εκκόλαψης μέχρι τελικό όγκο 500 ml.
5. Ακολούθως ήταν δυνατό να προχωρήσει η διαδικασία της εκκόλαψης, δειγματοληψίας, καταμέτρησης και στατιστικής επεξεργασίας όπως στο πείραμα I με τη διαφορά ότι οι δειγματοληψίες γίνονταν σε τακτά διαστήματα δηλαδή από την 14^η μέχρι την 24^η ώρα (ανά 2 ώρες) από την έναρξη της ενυδάτωσης.

2.2.3. Συγκομιδή κύστεων

Όταν η εκκόλαψη της *Artemia* δεν γίνεται σε πειραματικό επίπεδο αλλά για εμπορικούς σκοπούς τότε η διαδικασία περισυλλογής διαφέρει. Αφότου εκκολαφθούν οι ναύπλιοι απαιτείται ο διαχωρισμός τους από τα υπολείμματα της εκκόλαψης πριν χορηγηθούν στις νύμφες των ψαριών.

Ο τρόπος συλλογής βασίζεται στο ότι οι ναύπλιοι παρουσιάζουν θετικό φωτοτροπισμό. Είναι δυνατή η συλλογή τους με τη χρήση φωτεινής πηγής και κάλυψη της υπόλοιπης επιφάνειας με μαύρο κάλυμμα. Με την τοποθέτηση φωτισμού στο πάνω μέρος των δεξαμενών οι ναύπλιοι προσελκύονται από το φως και κινούνται προς την επιφάνεια, όπου συλλέγονται με ένα δίχτυ. Ακολούθως πλένονται για την απομάκρυνση ακαθαρσιών και μεταφέρονται είτε προς εμπλουτισμό είτε απευθείας στις δεξαμενές ψαριών. Οι ακαθαρσίες, τα κελύφη και οι μη εκκολαπτόμενες κύστεις βυθίζονται και παραμένουν στο πάτο των δεξαμενών (Bengston *et al.*, 1991).

2.3. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τα στατιστικά πακέτα MICROSOFT EXCEL 7.0 και

SPSS 14.0 FOR WINDOWS

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Επίδραση φυσικοχημικών παραμέτρων στη διαμόρφωση του ποσοστού εκκόλαψης και της εκκολαψιμότητας κύστεων *Artemia franciscana* (GSL)

3.1.1. Συγκέντρωση χλωρίου

Στους Πίνακες 1α, 1β, και 2 δίνονται τα αποτελέσματα της εκκόλαψης όπως διαμορφώθηκαν για τις συγκεντρώσεις χλωρίου 0,25 - 1,75 g (ανά 0,25 g)/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης την χρονική περίοδο μεταξύ της 14^{ης} – 24^{ης} ώρας (ανά 2 ώρες).

Ο Πίνακας 1α παρουσιάζει τις τιμές της εκκολαψιμότητας, δηλαδή τον αριθμό των εκκολαπτόμενων ναυπλίων ανά γραμμάριο κύστεων. Για τη διευκόλυνση των παρατηρήσεων γίνεται αναγωγή των τιμών της εκκολαψιμότητας σε ποσοστά εκκόλαψης επί του ολικού αριθμού αφυδατωμένων κύστεων (**γεμάτων και άδειων**) που εμπεριέχονται σε ένα γραμμάριο ξηρής μάζας κύστεων (Πίν. 1β). Ο ολικός αριθμός των κύστεων (γεμάτων και άδειων) που μετρήθηκε σε ένα γραμμάριο καθαρής ξηρής μάζας κύστεων είναι 309.458 με τυπική απόκλιση 23.147.

Ο Πίνακας 2 παρουσιάζει το ποσοστό εκκόλαψης γεμάτων κύστεων, δηλαδή το ποσοστό των γεμάτων κύστεων που έχει εκκολαφθεί μέχρι τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή που μελετούμε.

Πίνακας 1α. Μέσος όρος (Μ.Ο) εκκόλαπιμότητας κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) για διάφορες συγκεντρώσεις χλωρίου τη χρονική περίοδο μεταξύ της 14^{ης} και της 24^{ης} ώρας από την έναρξη της ενυδάτωσης.

Χρόνος εκκόλαψης (ώρες)		14	16	18	20	22	24
g Cl / 14 ml διαλ. αποκ.							
0	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	171333	179875	204208	218917	224292	224417
	Τυπική απόκλιση ±	26859	27803	27937	51619	39151	41091
0,25	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	189042	197125	222458	231958	247542	250083
	Τυπική απόκλιση ±	28167	30719	26751	40304	46950	25452
0,5	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	195417	211792	226583	237958	249500	251208
	Τυπική απόκλιση ±	31371	30506	34959	30125	39793	33249
0,75	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	205167	215792	230542	238708	246708	247917
	Τυπική απόκλιση ±	30939	49286	33832	25364	50099	32420
1,0	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	210208	220292	226292	234417	237542	239167
	Τυπική απόκλιση ±	30939	220292	36924	36707	46950	35753
1,25	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	213833	225875	232833	233042	237000	237917
	Τυπική απόκλιση ±	34849	37599	30280	38746	28206	32420
1,5	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	216708	224708	229500	230667	231000	231375
	Τυπική απόκλιση ±	30842	30842	29163	31583	38632	31891
1,75	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	219958	222333	225458	225708	226958	227167
	Τυπική απόκλιση ±	30448	43220	39793	32318	34016	37976

Πίνακας 1β. Μέσος όρος (Μ.Ο) ποσοστού εκκόλαψης ολικού αριθμού κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) για διάφορες συγκεντρώσεις χλωρίου τη χρονική περίοδο μεταξύ της 14^{ης} και της 24^{ης} ώρας από την έναρξη της ενυδάτωσης.

Χρόνος εκκόλαψης (ώρες)		14	16	18	20	22	24
g Cl / 14 ml διαλ. αποκ.							
0	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	55,7	58,4	66,4	70,7	72,8	72,7
	Τυπική απόκλιση ±	9,6	10,2	10,4	15,8	13,7	12,8
0,25	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	61,2	64,0	72,3	75,4	80,5	81,3
	Τυπική απόκλιση ±	9,0	11,4	10,3	14,6	11,5	10,9
0,5	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	63,4	68,9	73,6	77,2	81,0	81,6
	Τυπική απόκλιση ±	10,3	11,5	12,6	10,3	13,9	12,1
0,75	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	66,5	70,2	75,1	77,4	79,8	80,5
	Τυπική απόκλιση ±	9,8	17,1	13,6	8,6	15,2	11,5
1,0	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	68,4	71,6	73,3	75,9	76,7	77,3
	Τυπική απόκλιση ±	12,6	12,4	11,8	11,3	13,4	10,0
1,25	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	69,3	73,5	75,6	75,6	76,9	77,2
	Τυπική απόκλιση ±	11,0	13,4	10,8	12,7	9,7	11,4
1,5	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	70,4	73,0	74,5	74,9	74,9	74,9
	Τυπική απόκλιση ±	11,6	11,7	10,8	11,4	12,6	9,6
1,75	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	71,3	72,1	73,0	73,3	73,6	73,8
	Τυπική απόκλιση ±	10,0	14,3	12,2	11,2	11,5	13,8

Πίνακας 2. Μέσος όρος (Μ.Ο) ποσοστού εκκόλαψης γεμάτων κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) για διάφορες συγκεντρώσεις χλωρίου τη χρονική περίοδο μεταξύ της 14^{ης} και της 24^{ης} ώρας από την έναρξη της ενυδάτωσης.

Χρόνος εκκόλαψης (ώρες)		14	16	18	20	22	24
g Cl / 14 ml διαλ. αποκ.							
0	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	61,5	64,4	73,2	77,9	80,3	80,5
	Τυπική απόκλιση ±	11,3	11,3	12,2	17,3	16,2	16,8
0,25	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	67,4	70,6	79,8	83,3	88,9	89,8
	Τυπική απόκλιση ±	9,7	13,1	12,8	17,1	14,9	13,4
0,5	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	69,8	75,8	81,1	85,1	89,4	89,9
	Τυπική απόκλιση ±	11,5	12,7	14,7	12,3	17,0	13,8
0,75	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	75,0	79,0	84,7	87,2	89,8	90,8
	Τυπική απόκλιση ±	12,8	19,6	16,3	10,6	17,2	15,4
1,0	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	80,1	83,7	85,7	88,8	89,8	90,5
	Τυπική απόκλιση ±	16,0	14,8	14,1	14,0	16,9	12,7
1,25	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	82,9	88,0	90,4	90,3	92,0	92,7
	Τυπική απόκλιση ±	13,4	17,0	13,7	14,4	12,5	16,6
1,5	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	87,9	91,1	93,1	93,4	93,4	93,6
	Τυπική απόκλιση ±	16,0	16,2	15,9	16,2	16,9	15,0
1,75	Μ.Ο ποσοστού εκκόλαψης %	89,5	90,8	91,6	92,2	92,7	92,9
	Τυπική απόκλιση ±	13,2	20,0	15,7	15,8	16,6	19,3

Χρησιμοποιώντας ως κριτήριο το μέσο όρο των πιο πάνω αναφερθέντων εκκολαπτικών χαρακτηριστικών παρατηρήθηκε μια άνοδο των τιμών συνυφασμένη με την αύξηση του χρόνου (14-24 ώρες), για όλες τις κατηγορίες.

Χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα SPSS και συγκεκριμένα μέσω της δοκιμασίας paired-sample t-test ελέγχθηκε αν η διαφορά των τιμών κάθε κατηγορίας (g Cl) είναι στατιστικά σημαντική με πιθανότητα επιτυχίας 95%.

Βάση της δοκιμασίας έχουμε $H_0: \mu_i - \mu_j = 0 \rightarrow \mu_i = \mu_j$

$H_1: \mu_i - \mu_j \neq 0 \rightarrow \mu_i \neq \mu_j$

Ως μ_i βάζουμε για κάθε κατηγορία τη μεταβλητή που κρατούμε σταθερή και ως μ_j εναλλάσσουμε τις υπόλοιπες μεταβλητές για κάθε κατηγορία ξεχωριστά. Όταν η τιμή της σημαντικότητας είναι μικρότερη του 0,05 τότε απορρίπτουμε την υπόθεση H_0 και δεχόμαστε την εναλλακτική υπόθεση της H_1 ότι οι μέσοι είναι άνισοι και ότι υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά των 2 εξεταζομένων μέσων.

Στους πίνακες δοκιμασίας paired-sample t-test το θετικό πρόσημο δηλώνει την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ($p < 0,05$) μεταξύ των τιμών σε αντίθεση με το αρνητικό πρόσημο.

Όπου αναφέρεται η λέξη μάρτυρας εννοούμε την κατάσταση εκείνη στην οποία δεν είχε προηγηθεί η τεχνική της αποκελύφωσης.

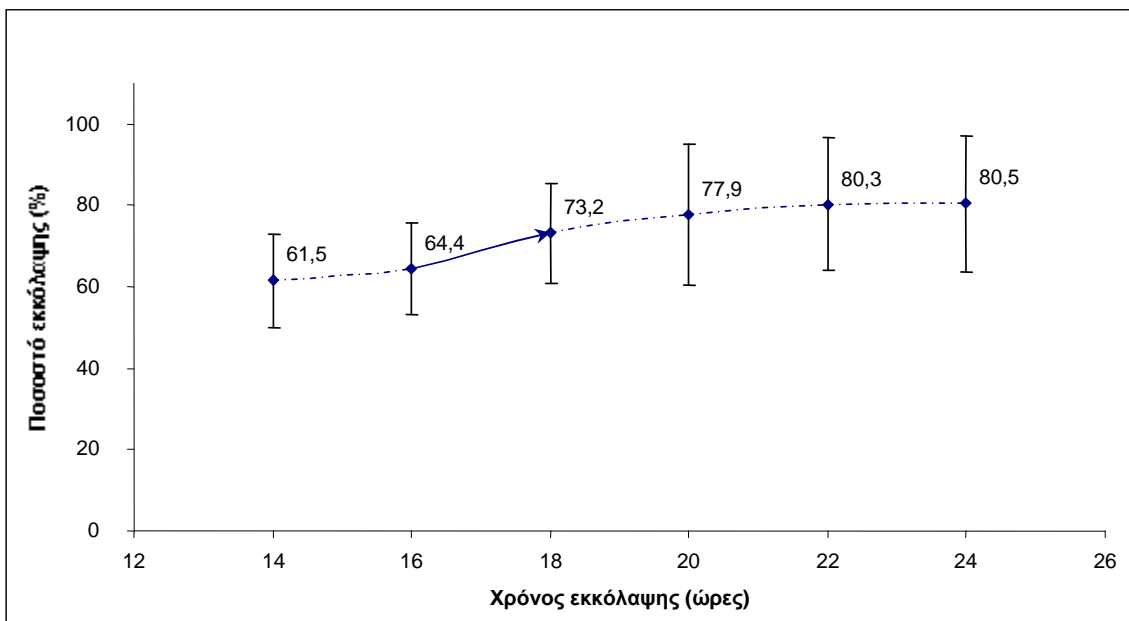
Για τις ανάγκες του πειράματος μελετήθηκαν τα εξής εκκολαπτικά χαρακτηριστικά: εκκολαπιμότητα και ποσοστό εκκόλαψης.

A. Ποσοστό εκκόλαψης

A.1. Η μεταβολή του ποσοστού εκκόλαψης κύστεων *Artemia franciscana* που υπέστησαν τεχνητή αποκελύφωση και κύστεων που δεν υπέστησαν τη τεχνική αυτή φαίνεται στις παρακάτω εικόνες, ενώ στους πίνακες δίνονται τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας.

Πίνακας 3. Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας (t-test, $p < 0,05$) για τα ποσοστά εκκόλαψης κύστεων που δεν υπέστησαν τεχνητή αποκελύφωση.

Χρόνος εκκόλαψης (ώρες)	14	16	18	20	22	24
14	----	-	+	+	+	+
16	-	----	+	+	+	+
18	+	+	----	-	+	+
20	+	+	-	----	-	-
22	+	+	+	-	----	-
24	+	+	+	-	-	----



Εικόνα 16. Καμπύλη του ποσοστού εκκόλαψης σε συνάρτηση με το χρόνο για κύστες που δεν υπέστησαν τεχνητή αποκελύφωση.

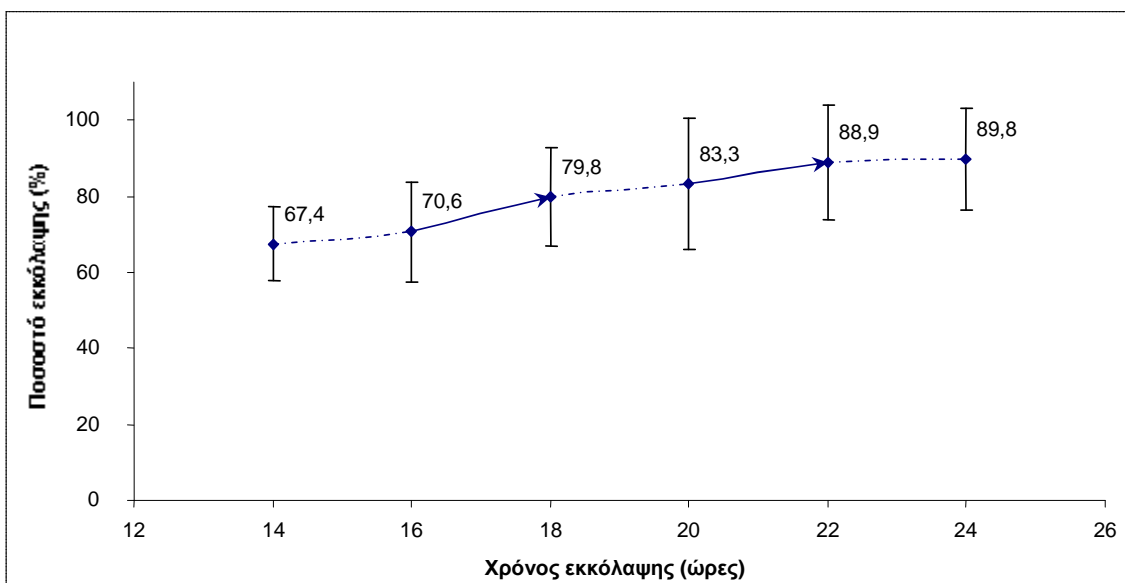
Στον Πίνακα 3 και στην Εικόνα 16 παρατηρείται η εξής διαδοχική συσχέτιση του ποσοστού εκκόλαψης την χρονική περίοδο μεταξύ της 14^{ης} ώρας και της 24^{ης} ώρας (ανά δυο ώρες):

- ✦ από 14^η μέχρι τη 16^η ώρα δεν υφίσταται στατιστικά σημαντική αύξηση στο ποσοστά εκκόλαψης.
- ✦ από τις 16^η μέχρι τη 18^η ώρα παρατηρείται αξιόλογη αύξηση.
- ✦ μεταξύ της 18^{ης} – 20^{ης} , της 20^{ης} – 22^{ης} και της 22^{ης} – 24^{ης} ώρας, παρόλο ότι παρατηρείται πολύ μικρή αύξηση στατιστικά μη σημαντική, εντούτοις από τη 18^η μέχρι την 24^η ώρα θεωρείται αξιόλογη. Σημειωτέον ότι, η στατιστικά σημαντική αυτή αύξηση κατά κύριο λόγο οφείλεται στην εκκόλαψη της 18^{ης} και 20^{ης} ώρας.

Εκτιμάται ότι υπάρχουν περιθώρια αύξησης του ποσοστού εκκόλαψης πέραν της 24^{ης} ώρας εφόσον δεν υφίστανται εμφανή αίτια καταστροφής των κύστεων.

Πίνακας 4. Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας (t-test, $p < 0,05$) για τα ποσοστά εκκόλαψης κύστεων που υπέστησαν τεχνητή αποκελύφωση με συγκέντρωση 0,25 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης.

Χρόνος εκκόλαψης (ώρες)	14	16	18	20	22	24
14	----	-	+	+	+	+
16	-	----	+	+	+	+
18	+	+	----	-	+	+
20	+	+	-	----	+	+
22	+	+	+	+	----	-
24	+	+	+	+	-	----



Εικόνα 17. Καμπύλη του ποσοστού εκκόλαψης σε συνάρτηση με το χρόνο για κύστες που υπέστησαν τεχνητή αποκελύφωση με συγκέντρωση 0,25 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης.

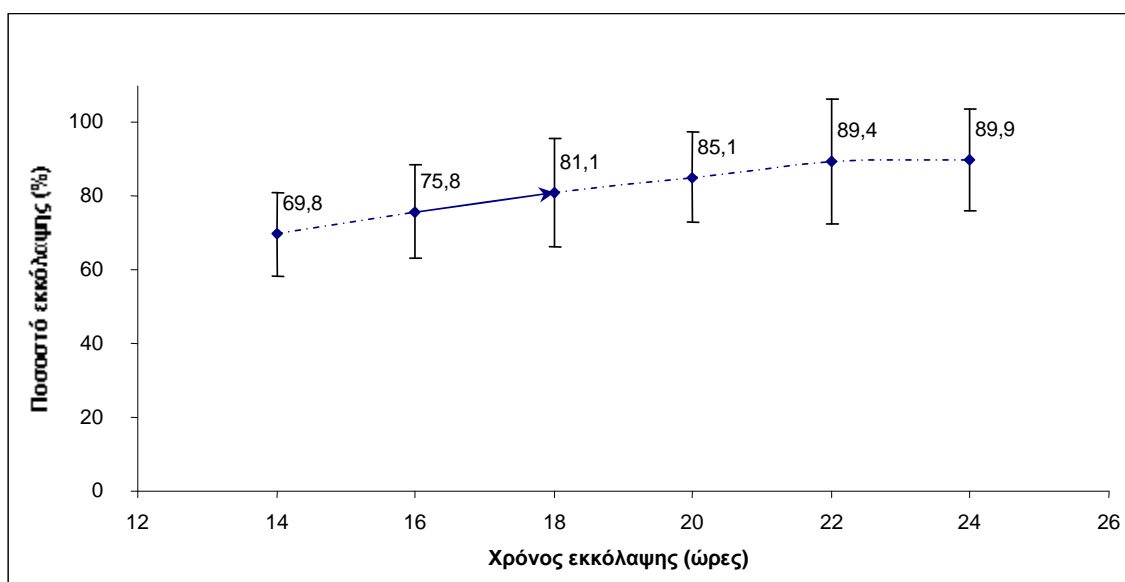
Στον Πίνακα 4 και στην Εικόνα 17 παρατηρείται η εξής διαδοχική συσχέτιση του ποσοστού εκκόλαψης την χρονική περίοδο μεταξύ της 14^{ης} ώρας και της 24^{ης} ώρας (ανά δυο ώρες):

- ✦ από τη 14^η μέχρι 16^η ώρα δεν υφίσταται στατιστικά σημαντική διαφορά.
- ✦ από τη 16^η μέχρι 18^η ώρα παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση.
- ✦ από τη 18^η μέχρι 20^η ώρα δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση.
- ✦ από την 20^η μέχρι 22^η ώρα παρατηρείται πάλι σημαντική στατιστική αύξηση.
- ✦ από την 22^η και μετά παρατηρείται μια σταθερότητα τιμών μέχρι την 24^η ώρα

Από τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι με τη χρησιμοποίηση της συγκέντρωσης 0,25 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης πέραν της 22^{ης} ώρας το ποσοστό εκκόλαψης πλησιάζει τη μέγιστη τιμή.

Πίνακας 5. Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας (t-test, $p < 0,05$) για τα ποσοστά εκκόλαψης κύστεων που υπέστησαν τεχνητή αποκελύφωση με συγκέντρωση 0,5 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης.

Χρόνος εκκόλαψης (ώρες)	14	16	18	20	22	24
14	----	-	+	+	+	+
16	-	----	+	+	+	+
18	+	+	----	-	+	+
20	+	+	-	----	-	-
22	+	+	+	-	----	-
24	+	+	+	-	-	----



Εικόνα 18. Καμπύλη του ποσοστού εκκόλαψης σε συνάρτηση με το χρόνο για κύστες που υπέστησαν τεχνητή αποκελύφωση με συγκέντρωση 0,25 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης

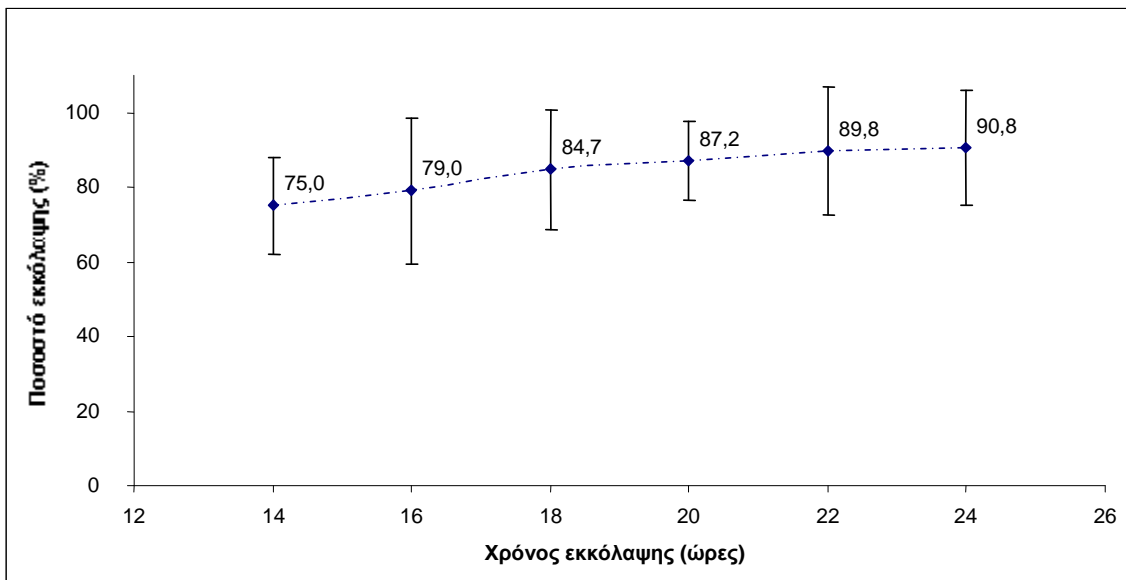
Στον Πίνακα 5 και στην Εικόνα 18 παρατηρείται η εξής διαδοχική συσχέτιση του ποσοστού εκκόλαψης την χρονική περίοδο μεταξύ της 14^{ης} ώρας και της 24^{ης} ώρας (ανά δυο ώρες):

- ✦ από τη 14^η μέχρι 16^η ώρα δεν υφίσταται στατιστικά σημαντική διαφορά.
- ✦ από τη 16^η μέχρι τη 18^η ώρα παρατηρείται αξιόλογη αύξηση

- α μεταξύ της 18^{ης} – 20^{ης} , της 20^{ης} – 22^{ης} και της 22^{ης} – 24^{ης} ώρας, παρόλο ότι παρατηρείται πολύ μικρή αύξηση στατιστικά μη σημαντική, εντούτοις από τη 18^η μέχρι την τελική 24^η ώρα θεωρείται αξιόλογη. Σημειωτέον ότι η στατιστικά σημαντική αυτή αύξηση κατά κύριο λόγο οφείλεται μεταξύ των 18^{ης} και 22^{ης} ώρας.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας (t-test, $p < 0,05$) για τα ποσοστά εκκόλαψης κύστεων που υπέστησαν τεχνητή αποκελύφωση με συγκέντρωση 0,75 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης.

Χρόνος εκκόλαψης (ώρες)	14	16	18	20	22	24
14	----	-	+	+	+	+
16	-	----	-	+	+	+
18	+	-	----	-	-	+
20	+	+	-	----	-	-
22	+	+	-	-	----	-
24	+	+	+	-	-	----



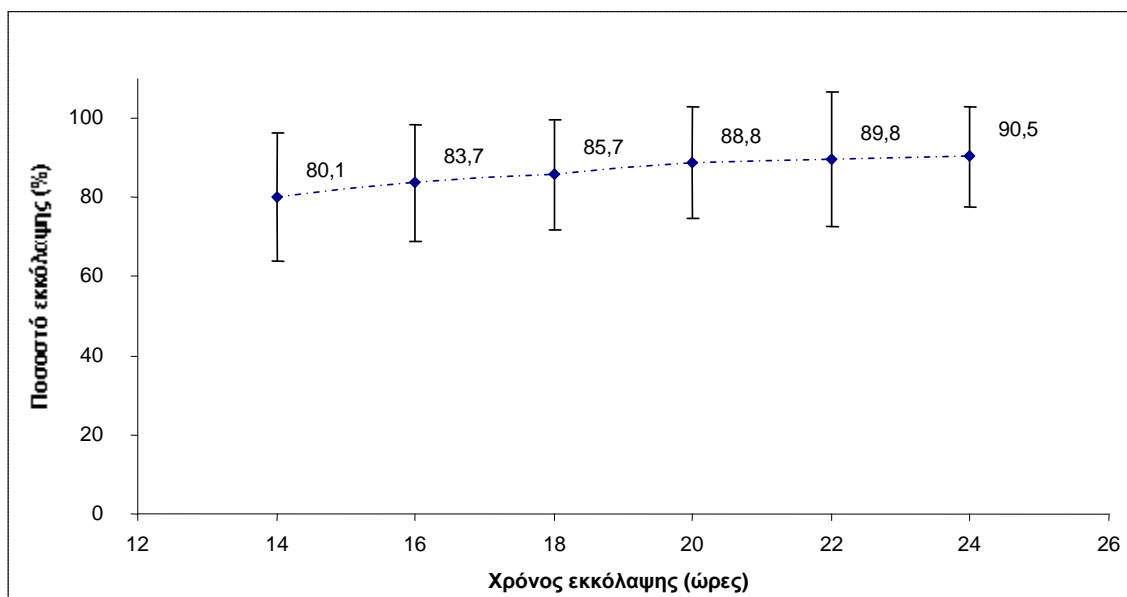
Εικόνα 19. Καμπύλη του ποσοστού εκκόλαψης σε συνάρτηση με το χρόνο για κύστες που υπέστησαν τεχνητή αποκελύφωση με συγκέντρωση 0,75 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης.

Στο Πίνακα 6 και στην Εικόνα 19 παρατηρείται η εξής διαδοχική συσχέτιση του ποσοστού εκκόλαψης την χρονική περίοδο μεταξύ της 14^{ης} ώρας και της 24^{ης} ώρας (ανά δυο ώρες):

- ▲ μια σταδιακή ομαλή αύξηση της εκκολασιμότητας από τη 14^η μέχρι την 24^η ώρα
- ▲ μεταξύ 14^{ης} και 16^{ης} όπως και 16^{ης} και 18^{ης} ώρας παρόλο ότι δεν υφίσταται στατιστικά σημαντική διαφορά εντούτοις υπάρχει μεταξύ της 14^{ης} και 18^{ης}.
- ▲ μεταξύ της 18^{ης} – 20^{ης} , της 20^{ης} – 22^{ης} και της 22^{ης} – 24^{ης} ώρας, παρόλο ότι δεν υφίσταται στατιστικά σημαντική διαφορά, εντούτοις υπάρχει μεταξύ 18^{ης} και 24^{ης}
- ▲ συγκρίνοντας τα παραπάνω η αύξηση από τη 14^η μέχρι 18^η ώρα είναι πιο στατιστικά σημαντική από αυτήν της 18^{ης} μέχρι την 24^η ώρα

Πίνακας 7. Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας (t-test, $p < 0,05$) για τα ποσοστά εκκόλαψης κύστεων που υπέστησαν τεχνητή αποκελύφωση με συγκέντρωση 1,0 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης

Χρόνος εκκόλαψης (ώρες)	14	16	18	20	22	24
14	----	-	+	+	+	+
16	-	----	-	+	+	+
18	+	-	----	-	+	+
20	+	+	-	----	-	-
22	+	+	+	-	----	-
24	+	+	+	-	-	----



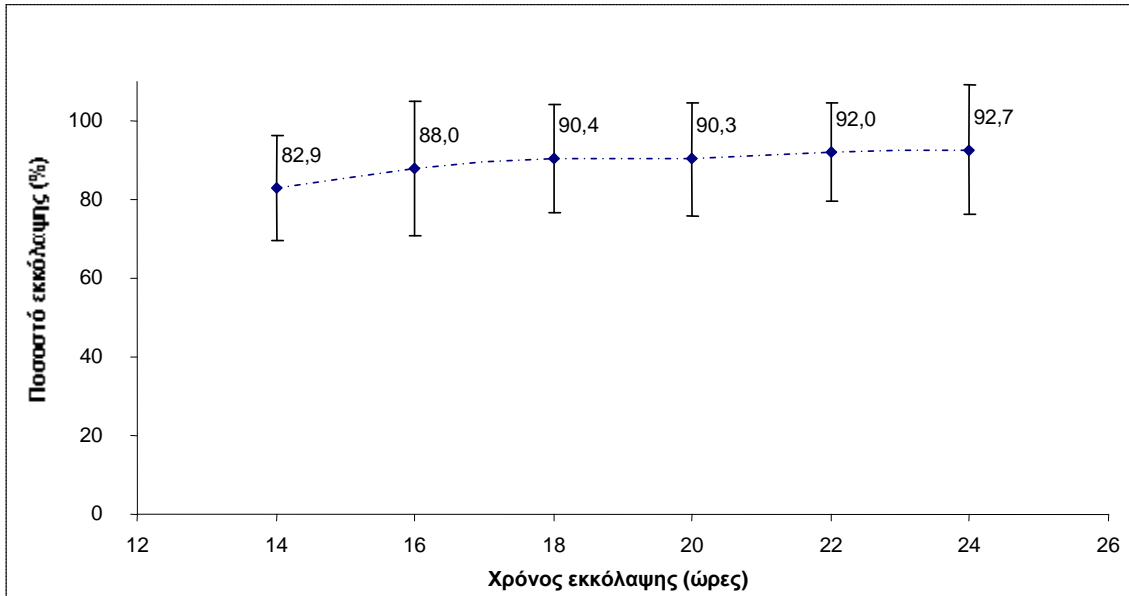
Εικόνα 20. Καμπύλη του ποσοστού εκκόλαψης σε συνάρτηση με το χρόνο για κύστες που υπέστησαν τεχνητή αποκελύφωση με συγκέντρωση 1,0 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης

Συνοπτικά, στο Πίνακα 7 και στην Εικόνα 20 παρατηρούνται τα εξής:

- ▲ την 14^η ώρα παρατηρείται υψηλό του ποσοστό εκκόλαψης της τάξεως του 80,1%
- ▲ από τη 14^η ώρα και μετά παρατηρείται μια ομαλή σταδιακή άνοδος μέχρι της ανωτάτης τιμής των 90,5% για την 24^η ώρα.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας (t-test, $p < 0,05$) για τα ποσοστά εκκόλαψης κύστεων που υπέστησαν τεχνητή αποκελύφωση με συγκέντρωση 1,25 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης

Χρόνος εκκόλαψης (ώρες)	14	16	18	20	22	24
14	----	-	+	+	+	+
16	-	----	-	-	-	-
18	+	-	----	-	-	-
20	+	-	-	----	-	-
22	+	-	-	-	----	-
24	+	-	-	-	-	----



Εικόνα 21. Καμπύλη του ποσοστού εκκόλαψης σε συνάρτηση με το χρόνο για κύστες που υπέστησαν τεχνητή αποκελύφωση με συγκέντρωση 1,25 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης

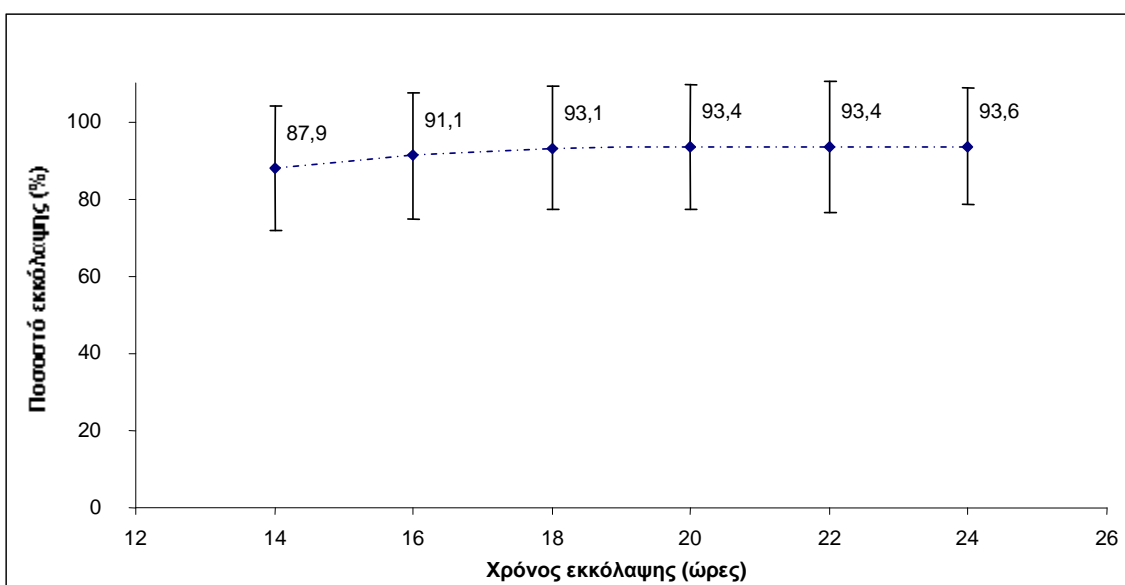
Συνοπτικά, στο Πίνακα 8 και στην Εικόνα 21 παρατηρούνται τα εξής:

- ▲ ταχεία αύξηση του ποσοστού εκκόλαψης μέχρι την 14^η ώρα της τάξεως του 82,9 %
- ▲ πέραν της 14^{ης} ώρας μια σταδιακή μικρή αύξηση που φθάνει στο 92,7 % την 24^η ώρα.
- ▲ δεν υφίσταται όμως στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό εκκόλαψης μεταξύ των υπό μελέτη χρόνων εκκόλαψης

Στις συγκέντρωσεις 0,75, 1,0 και 1,25 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης παρατηρήθηκαν περίπου τα ίδια γεγονότα.

Πίνακας 9. Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας (t-test, $p < 0,05$) για τα ποσοστά εκκόλαψης κύστεων που υπέστησαν τεχνητή αποκελύφωση με συγκέντρωση 1,5 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης.

Χρόνος εκκόλαψης (ώρες)	14	16	18	20	22	24
14	----	-	-	-	-	-
16	-	----	-	-	-	-
18	-	-	----	-	-	-
20	-	-	-	----	-	-
22	-	-	-	-	----	-
24	-	-	-	-	-	----

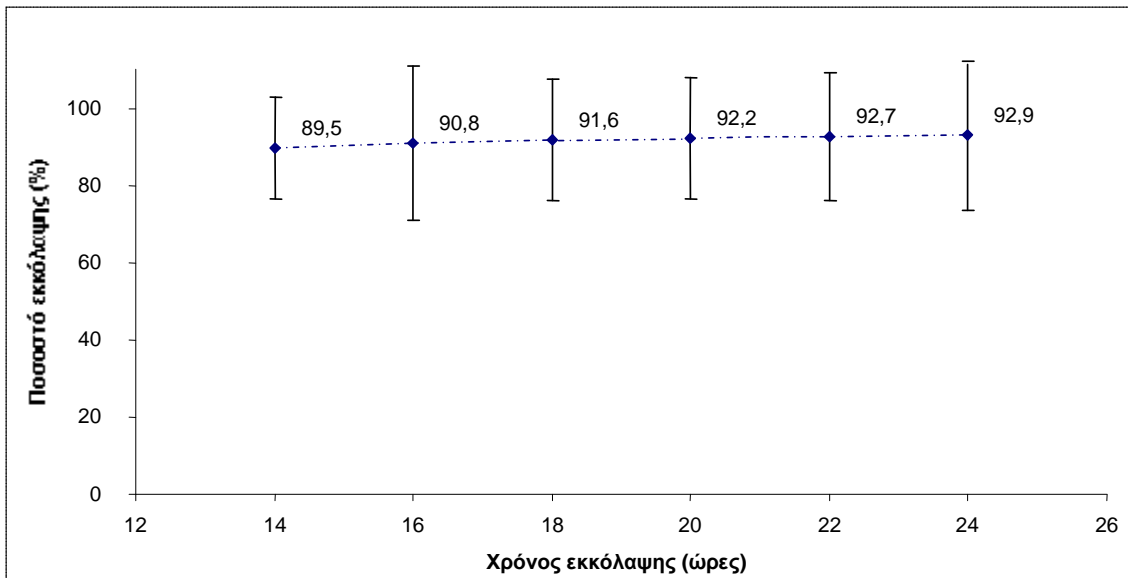


Εικόνα 22. Καμπύλη του ποσοστού εκκόλαψης σε συνάρτηση με το χρόνο για κύστες που υπέστησαν τεχνητή αποκελύφωση με συγκέντρωση 1,5 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης

Χρόνος εκκόλαψης (ώρες)	14	16	18	20	22	24
-------------------------	----	----	----	----	----	----

Πίνακας 10. Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας (t-test, $p < 0,05$) για τα ποσοστά εκκόλαψης κύστεων που υπέστησαν τεχνητή αποκελύφωση με συγκέντρωση 1,75 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης

14	----	-	-	-	-	-
18	-	-	----	-	-	-
20	-	-	-	----	-	-
22	-	-	-	-	----	-
24	-	-	-	-	-	----



Εικόνα 23. Καμπύλη του ποσοστού εκκόλαψης σε συνάρτηση με το χρόνο για κύστες που υπέστησαν τεχνητή αποκελύφωση με συγκέντρωση 1,75 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης

Στους Πίνακες 9, 10 και στις Εικόνες 22, 23 παρατηρείται η εξής διαδοχική συσχέτιση του ποσοστού εκκόλαψης την χρονική περίοδο μεταξύ της 14^{ης} ώρας και της 24^{ης} ώρας (ανά δυο ώρες):

- ▲ την 14^η ώρα εκκόλαψης αρχίζει μια μαζικά αυξημένη εκκόλαψη (87,9 % και 89,5 % αντίστοιχα) η οποία ελάχιστα αυξάνεται μέχρι την 24^η ώρα (93,6 % και 92,9 % αντίστοιχα).
- ▲ παρόλα αυτά δεν υφίσταται στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό εκκόλαψης μεταξύ των διάφορων χρόνων εκκόλαψης

A.2. Επίδραση της τεχνητής αποκελύφωσης στο ποσοστό εκκόλαψης κύστεων *Artemia franciscana* (Πίν. 11).

Πίνακας 11. Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας (t-test, $p < 0,05$) για τα ποσοστά εκκόλαψης (ίδια και για την εκκολαψιμότητα) κύστεων μεταξύ του μάρτυρα και των συγκεντρώσεων χλωρίου για τους παρακάτω χρόνους εκκόλαψης.

		Χρόνος εκκόλαψης (ώρες)					
		14	16	18	20	22	24
Συγκέντρωση χλωρίου (g Cl / 14 ml διαλ. αποκ.)	0,25	+	+	+	+	+	+
	0,5	+	+	+	+	+	+
	0,75	+	+	+	+	+	+
	1,0	+	+	+	+	+	+
	1,25	+	+	+	+	+	+
	1,5	+	+	+	+	+	+
	1,75	+	+	+	+	+	+

Στον Πίνακα 11 παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό εκκόλαψης μεταξύ του μάρτυρα και όλων των συγκεντρώσεων χλωρίου (0,25-1,75 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης) που χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνητή αποκελύφωση. Αυτό υφίσταται εξαιτίας της καταστροφικής επίδρασης του ενεργού χλωρίου επί του κέλυφου

με αποτέλεσμα τη διευκόλυνση της εξόδου των ναυπλίων (δυνατών και αδύναμων) από τις κύστεις.

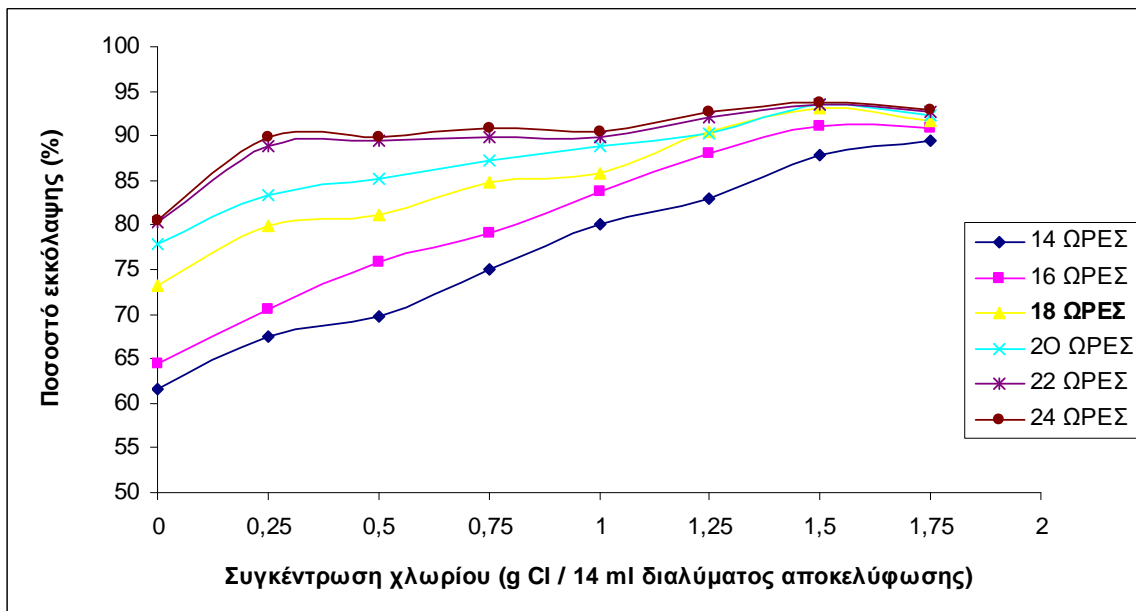
A.3. Σύγκριση του ποσοστού εκκόλαψης μεταξύ της μέγιστης τιμής της συγκέντρωσης ενεργού χλωρίου για κάθε χρόνο εκκόλαψης και των υπόλοιπων ποσοστών εκκόλαψης αποκελυφωμένων κύστεων (Πιν. 12).

Πίνακας 12. Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας (t-test, $p < 0,05$) για τα ποσοστά εκκόλαψης αποκελυφωμένων κύστεων μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων χλωρίου και αυτής της μέγιστης τιμής για κάθε χρόνο εκκόλαψης

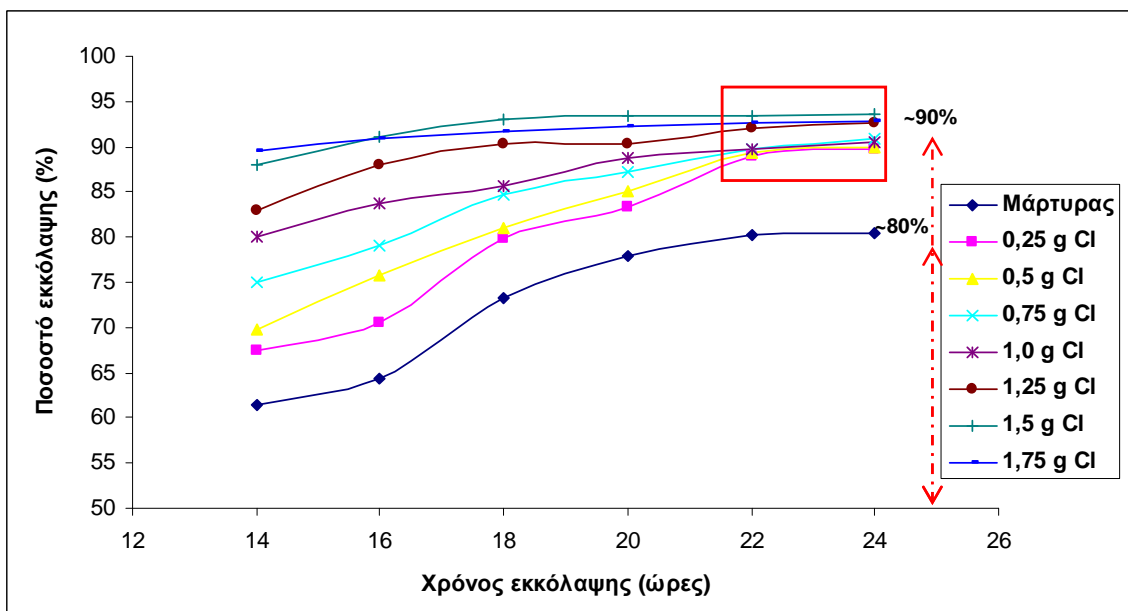
Ώρες	14	16	18	20	22	24
g Cl /14 ml	1,75	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
0,25	+	+	+	+	-	-
0,5	+	+	+	+	-	-
0,75	+	+	+	+	-	-
1,0	+	+	+	-	-	-
1,25	+	-	-	-	-	-
1,5	-	----	----	----	----	----
1,75	----	-	-	-	-	-

Στον Πίνακα 12 παρατηρείται μια τάση σταδιακής μείωσης της διαφοράς στο ποσοστό εκκόλαψης μεταξύ των υψηλών συγκεντρώσεων 1,5 και 1,75 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης και των χαμηλών με το πέρασμα του χρόνου. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ενώ στις υψηλές συγκεντρώσεις η εκκόλαψη σχεδόν ολοκληρώνεται (~90 %) νωρίς (-14^η ώρα), στις χαμηλές συγκεντρώσεις όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση τόσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος ολοκλήρωσης της εκκόλαψης (~90 %). Με τα παραπάνω είναι εμφανής η αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης χλωρίου και του χρόνου ολοκλήρωσης (~90 %) εκκόλαψης.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα του ποσοστού εκκόλαψης γεμάτων κύστεων απεικονίζονται στις παρακάτω γραφικές παραστάσεις (Εικ. 24, 25).



Εικόνα 24. Καμπύλες μεταβολής του ποσοστού εκκόλαψης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση χλωρίου για κάθε χρόνο εκκόλαψης.



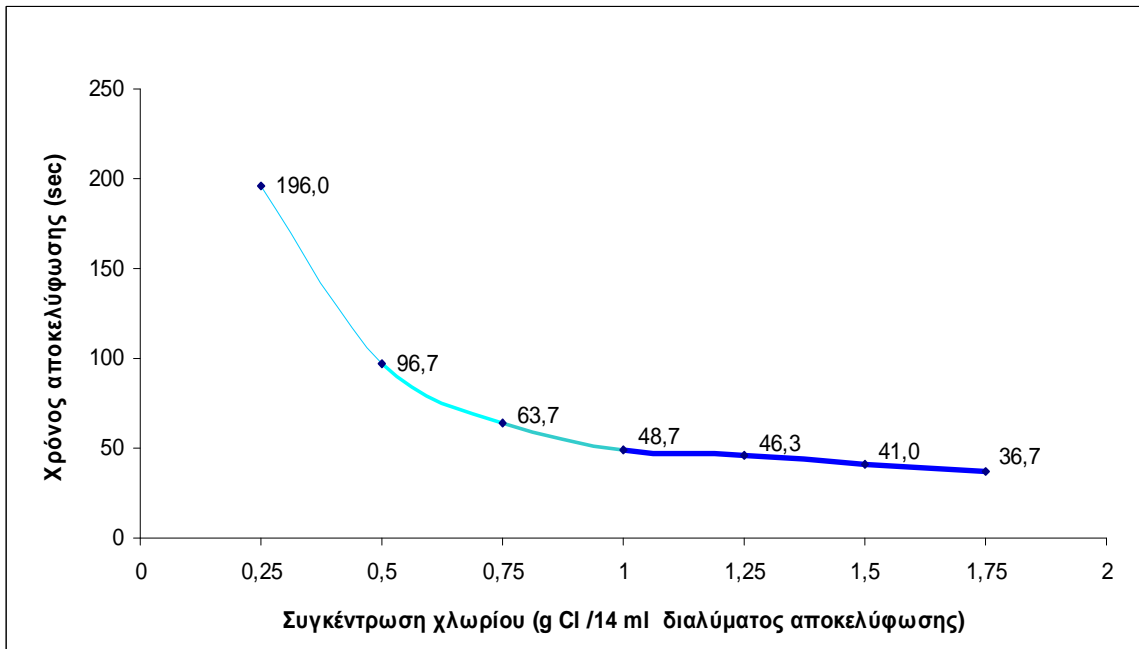
Εικόνα 25. Εξέλιξη του ποσοστού εκκόλαψης για τη χρονική περίοδο μεταξύ της 14^{ης} και 24^{ης} ώρας (από την έναρξη της ενυδάτωσης).

B. Εκκολαψιμότητα

B.1. Μελέτη του χρόνου ολοκλήρωσης της αποκελύφωσης των κύστεων (πορτοκαλί χρώμα) για κάθε συγκέντρωση χλωρίου (0,25-1,75 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης) (Πίν. 13).

Πίνακας 13. Χρόνος αποκελύφωσης (sec) σε σχέση με τη συγκέντρωση χλωρίου (g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης)

Συγκέντρωση χλωρίου (g Cl/14 ml διαλ. αποκ.)	Χρόνος αποκελύφωσης (sec) -Πορτοκαλί χρώμα-
0,25	196,0
0,5	96,7
0,75	63,7
1	48,7
1,25	46,3
1,5	41,0
1,75	36,7



Εικόνα 26. Καμπύλη χρόνου αποκελύφωσης (sec) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση χλωρίου (g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης)

Στην Εικόνα 26 παρατηρείται ότι ο χρόνος αποκελύφωσης είναι αντιστρόφως ανάλογος με τη συγκέντρωση χλωρίου. Στις υψηλές συγκεντρώσεις παρατηρείται ελάχιστη διαφορά στο χρόνο αποκελύφωσης μεταξύ τους εν αντιθέσει με τις χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτό οφείλεται στην ισχυρή και μαζική δράση του ενεργού χλωρίου άνωθεν μιας τιμής (1 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης) (Εικ. 26).

B.2. Μελέτη της εκκολασιμότητας την χρονική περίοδο μεταξύ της 14^{ης} και 24^{ης} ώρας (ανά δυο ώρες) από την έναρξη της ενυδάτωσης .

Στους Πίνακες 1α, 1β και 11 παρατηρείται η εξής διαδοχική συσχέτιση της εκκολασιμότητας στην συγκέντρωση χλωρίου για κάθε χρόνο εκκόλαψης:

- ✦ για τη 14^η ώρα παρατηρείται σταδιακή άνοδο των τιμών από 0,25 μέχρι 1,75 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης η οποία ελαχιστοποιείται από 1,25 μέχρι 1,75. Αυτό οφείλεται στο ότι από τη συγκέντρωση 1 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης και άνω προκαλείται σχεδόν η ίδια μαζική εκκόλαψη λόγω της έντονης επίδρασης του χημικού μέσου στο κέλυφος των κύστεων.
- ✦ για την 16^η ώρα παρατηρείται σταδιακή μικρή άνοδο των τιμών από 0,25 μέχρι 1,25 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης και ακολούθως μικρή μείωση από 1,25 μέχρι 1,75. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στις υψηλές συγκεντρώσεις 1,5 και 1,75 η εκκόλαψη ολοκληρώνεται πιο νωρίς. Δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών όλων των συγκεντρώσεων και της μέγιστης τιμής στη συγκέντρωση 1,25 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης, εξαιρουμένης της τιμής στη συγκέντρωση 0,25 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης, της οποίας η επίδραση χρήζει περισσότερου χρόνου.

- ♣ για την 18^η ώρα παρατηρείται ελάχιστη άνοδο των τιμών από 0,25 μέχρι 1,25 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης και ακολούθως μείωση από 1,25 μέχρι 1,75. Στατιστικά όμως δεν υφίσταται διαφορά στις τιμές όλων των συγκεντρώσεων.
- ♣ για την 20^η ώρα παρατηρείται ελάχιστη άνοδο των τιμών από 0,25 μέχρι 0,75 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης και ακολούθως μείωση από 0,75 μέχρι 1,75. Στατιστικά δεν παρατηρείται καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών όλων των συγκεντρώσεων και της μεγίστης τιμής στη συγκέντρωση 0,75 εξαιρουμένης της συγκέντρωσης 1,75.
- ♣ για την 22^η και 24^η ώρα παρατηρούνται υψηλές τιμές στις χαμηλές συγκεντρώσεις 0,25 - 0,75 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης και ακολούθως αρχίζει η μείωση αυξανόμενης της πυκνότητας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στις χαμηλές συγκεντρώσεις εξακολουθεί να υπάρχει εκκόλαψη ενώ στις υψηλές συγκεντρώσεις ο μηχανισμός εκκόλαψης ολοκληρώθηκε.

B.3. Σύγκριση της εκκολασιμότητας μεταξύ των υπό μελέτη χρόνων εκκόλαψης για κάθε συγκέντρωση χλωρίου (Πίν. 1α).

Για όλες τις συγκεντρώσεις η μέγιστη εκκολασιμότητα παρατηρείται την 24^η ώρα. Ακολουθεί σύγκριση της μέγιστης τιμής (24^η ώρας) με τις τιμές των υπολοίπων χρόνων μέσω της δοκιμασίας paired sample t-test για τον έλεγχο της σημαντικότητας. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας αυτής παρουσιάζονται ως ίδια με αυτά για τα ποσοστά εκκόλαψης.

B.4. Ένας δεύτερος έλεγχος είναι εάν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της μέγιστης τιμής εκκολαψιμότητας που παρατηρείται στη συγκέντρωση χλωρίου 0,5 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης με τις μέγιστες τιμές των υπολοίπων συγκεντρώσεων χλωρίου (24^η ώρα) (Πίν. 14, 15).

Πίνακας 14. Μέγιστες τιμές εκκολαψιμότητας ανά συγκέντρωση χλωρίου

Συγκέντρωση χλωρίου (g Cl/14 ml διαλ. αποκ.)	Εκκολαψιμότητα	Τυπική απόκλιση
0,25	250083	25452
0,5	251208	33249
0,75	247917	32420
1,0	239167	35753
1,25	237917	32420
1,5	231375	31891
1,75	227167	37976

Πίνακας 15. Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας (t-test, $p < 0,05$) για την εκκολαψιμότητα μεταξύ της μέγιστης τιμής στη συγκέντρωση 0,5 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης με τις τιμές των υπόλοιπων συγκεντρώσεων χλωρίου για την 24^η ώρα εκκόλαψης.

Συγκέντρωση χλωρίου (g Cl/14 ml διαλ. αποκ.) 24 ^η	0,25	0,5	0,75	1,0	1,25	1,5	1,75
0,5	-	---	-	-	-	+	+

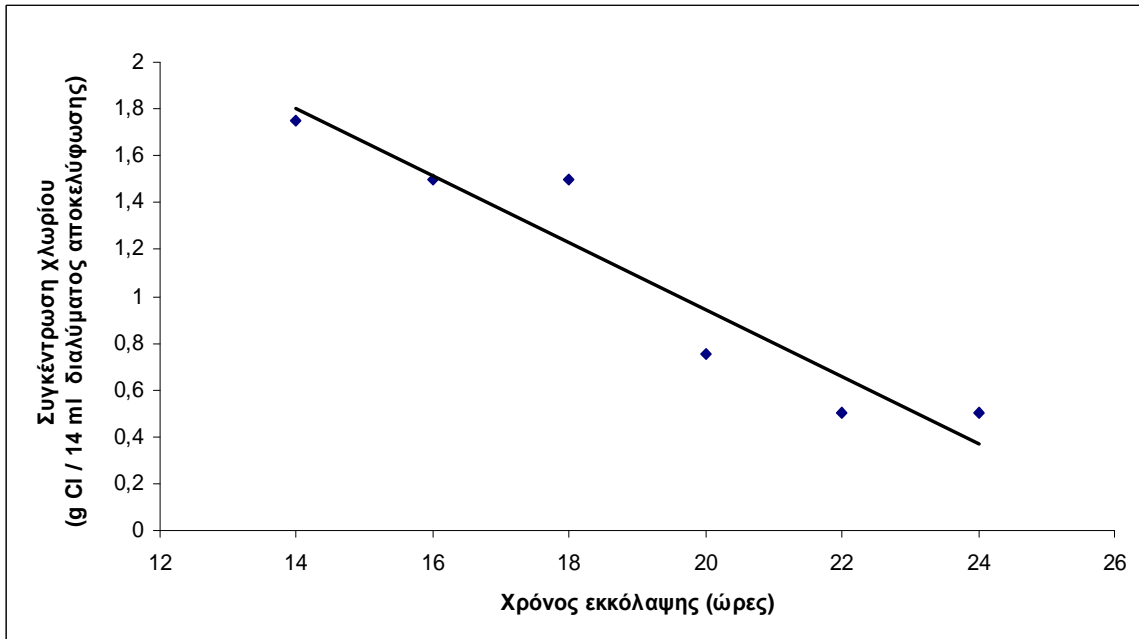
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 15 την 24^η ώρα δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($\text{Sig} > 0,05$) μεταξύ της μέγιστης τιμής στη συγκέντρωση 0,5 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης και της αντίστοιχης μέγιστης τιμής στις

συγκεντρώσεις χλωρίου 0,25-1,25 εξαιρουμένων των τιμών στις υψηλές συγκεντρώσεις χλωρίου 1,5 και 1,75. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, στις υψηλές συγκεντρώσεις η δραστηριότητα του χημικού μέσου στο κέλυφος ήταν τέτοια που προκάλεσε μια γρήγορη εκκόλαψη αλλά συγχρόνως κατέστρεψε ένα σημαντικό αριθμό ναυπλίων. Με αυτά τα δεδομένα δεν μπορούμε να πούμε πως η συγκέντρωση 0,5 δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα, αλλά ένα εύρος συγκεντρώσεων μεταξύ μια κατωτάτης τιμής που εμφανίζεται να αρχίζει κάτω της συγκέντρωσης χλωρίου 0,25 μέχρι μιας ανωτάτης συγκέντρωσης που βρίσκεται μεταξύ των συγκεντρώσεων χλωρίου 1,25-1,5 g Cl/14 ml διαλύματος αποκλειφωσης. Άνω της συγκέντρωσης αυτής όπως αναφέραμε, η ισχυρή επίδραση του χημικού μέσου επί του κελύφους των κύστεων έχει και καταστρεπτικές συνέπειες με αποτέλεσμα την παραμονή των τιμών στα χαμηλά επίπεδα.

B.5. Αξιολόγηση της ανωτάτης τιμής εκκολασιμότητας που παρατηρείται σε κάθε χρόνο εκκόλαψης με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις χλωρίου (Πίν. 16).

Πίνακας 16. Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας (t-test, $p < 0,05$) για την εκκολασιμότητα μεταξύ της μέγιστης τιμής και των τιμών των υπόλοιπων συγκεντρώσεων χλωρίου για κάθε χρόνο εκκόλαψης

		Συγκέντρωση χλωρίου (g Cl/14 ml διαλ. αποκ.) με τη μέγιστη τιμή εκκολασιμότητας για κάθε χρόνο εκκόλαψης					
		1,75 14 ⁿ	1,5 16 ⁿ	1,5 18 ⁿ	0,75 20 ⁿ	0,5 22 ⁿ	0,5 24 ⁿ
Συγκέντρωση χλωρίου (g Cl/14 ml διαλ. αποκ.)	0,25	+	+	-	-	-	-
	0,5	+	-	-	-	----	-
	0,75	+	-	-	----	-	-
	1,0	-	-	-	-	-	-
	1,25	-	----	----	-	-	-
	1,5	-	-	-	-	+	+
	1,75	----	-	-	+	+	+



Εικόνα 27. Χρόνος εμφάνισης της μέγιστης τιμής εκκολασιμότητας για κάθε συγκέντρωση χλωρίου.

Στην Εικόνα 27 παρατηρείται αύξηση του χρόνου εμφάνισης της μέγιστης τιμής (ολοκλήρωσης της εκκόλαψης) με τη μείωση της συγκέντρωσης χλωρίου. Ναι μεν παρατηρείται σχετική καθυστέρηση στην εκκόλαψη αλλά με μεγαλύτερο κέρδος.

B.6. Σύγκριση της μέγιστης τιμής εκκολασιμότητας (0,5 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης / 24^η ώρα) με τη μέγιστη τιμή των υπολοίπων συγκεντρώσεων χλωρίου για κάθε χρόνο εκκόλαψης.

Πίνακας 17. Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας (t-test, $p < 0,05$) για την εκκολασιμότητα μεταξύ της μέγιστης τιμής σε ολικό επίπεδο και των συγκεντρώσεων χλωρίου που αντιστοιχούν στις μέγιστες τιμές για κάθε χρόνο εκκόλαψης

		Συγκέντρωση χλωρίου (g Cl/14 ml διαλ. αποκ.) με τη μέγιστη τιμή εκκολασιμότητας για τον υπό μελέτη χρόνο				
		14 ^η	16 ^η	18 ^η	20 ^η	22 ^η
		1,75	1,25	1,25	0,75	0,5
Συγκέντρωση χλωρίου (g Cl/14 ml διαλ. αποκ.) με τη μέγιστη τιμή εκκολασιμότητας σε ολικό επίπεδο	0,5 24 ^η	+	+	+	-	-

Στον Πίνακα 17 δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της μέγιστης τιμής (σε ολικό επίπεδο) εκκολασιμότητας στη συγκέντρωση 0,5 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης την 24^η ώρα και των μέγιστων τιμών (σε κάθε χρόνο εκκόλαψης) στην συγκέντρωση 0,75 την 20^η και 22^η ώρα, ενώ υφίσταται στατιστικά σημαντική διαφορά με τη συγκέντρωση 1,25 την 18^η και 16^η ώρα και τη συγκέντρωση 1,75 στη 14^η ώρα. Η διαφορά αυτή οφείλεται στη σημαντική απώλεια κύστεων που προκλήθηκε κατά την τεχνητή αποκελύφωση εξαιτίας της καταστροφικής επίδρασης του ενεργού χλωρίου.

B.7. Επίδραση της τεχνητής αποκελύφωσης στην εκκολασιμότητα κύστεων *Artemia franciscana* (Πίν. 18).

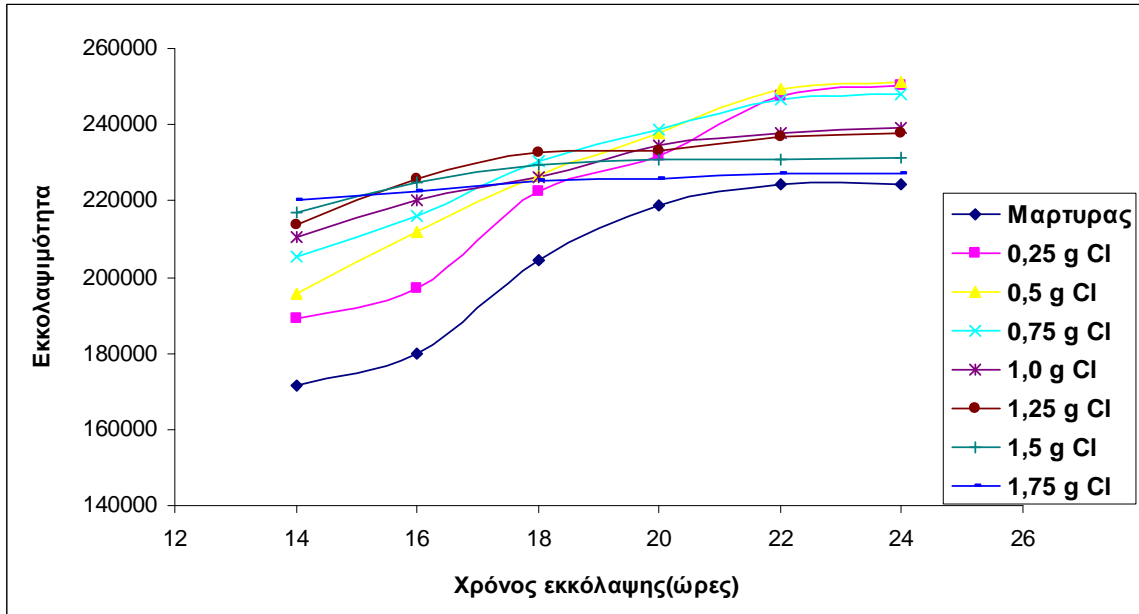
Πίνακας 18. Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας (t-test, $p < 0,05$) για την εκκολασιμότητα μεταξύ του μάρτυρα και των συγκεντρώσεων χλωρίου για τους παρακάτω χρόνους εκκόλαψης

		Μάρτυρας (0 g Cl/14 ml διαλ. αποκ.)					
		14 ^η	16 ^η	18 ^η	20 ^η	22 ^η	24 ^η
Συγκέντρωση χλωρίου (g Cl/14 ml διαλ. αποκ.)	0,25	+	+	+	-	+	+
	0,5	+	+	+	+	+	+
	0,75	+	+	+	+	+	+
	1,0	+	+	+	-	-	+
	1,25	+	+	+	-	-	-
	1,5	+	+	+	-	-	-
	1,75	+	+	+	-	-	-

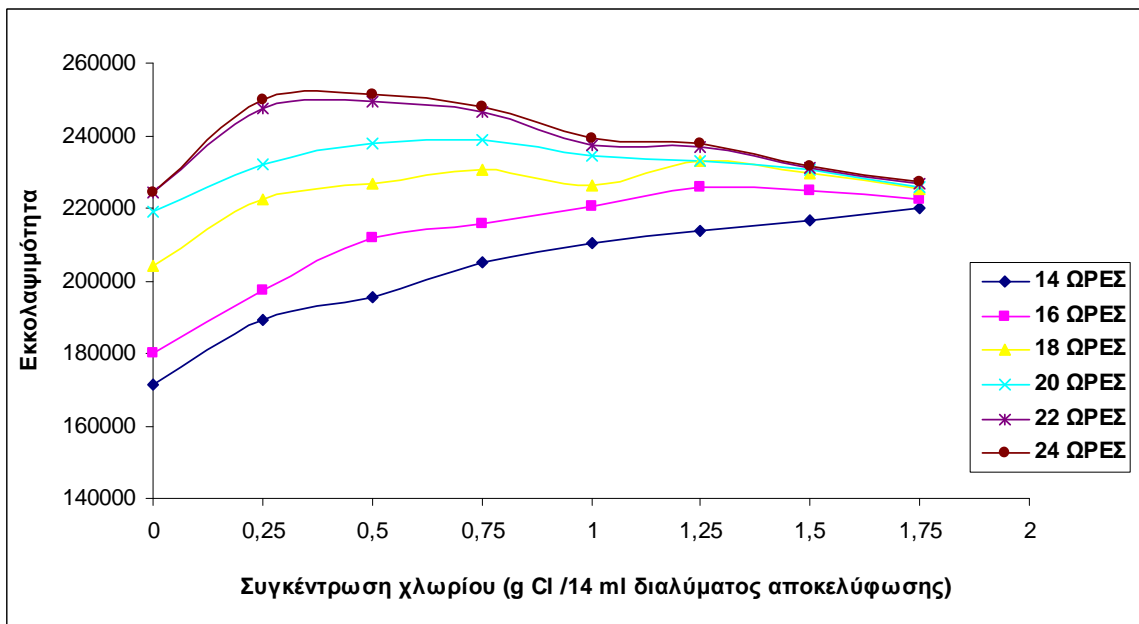
Στον Πίνακα 18 παρατηρείται ότι οι τιμές της εκκολασιμότητας που προκύπτουν από την εφαρμογή της τεχνητής αποκελύφωσης για διάφορες συγκεντρώσεις χλωρίου (0,25-1,75 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης) εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με τη τιμή του μάρτυρα, με εξαίρεση τις υψηλές συγκεντρώσεις χλωρίου τη χρονική περίοδο μεταξύ της 20^{ης} και 24^{ης} ώρας.

Το γεγονός όμως ότι στις υψηλές συγκεντρώσεις χλωρίου τη χρονική περίοδο μεταξύ της 14^{ης} και 18^{ης} ώρας παρατηρείται σημαντική αύξηση σε σχέση με την αύξηση που παρατηρείται μετά την 18^η ώρα, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο επιπλέον αριθμός των ναυπλίων που εκκολάφθηκε ήταν περίπου ο ίδιος με τον αριθμό που καταστράφηκε λόγω αποκελύφωσης (Πίν. 1α).

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της εκκολαψιμότητας απεικονίζονται στις παρακάτω γραφικές παραστάσεις (Εικ. 27, 28).



Εικόνα 27. Εξέλιξη της εκκόλαψης τη χρονική περίοδο μεταξύ της 14^{ης} και 24^{ης} ώρας (από την έναρξη της ενυδάτωσης).



Εικόνα 28. Καμπύλες μεταβολής της εκκολαψιμότητας σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση χλωρίου για κάθε χρόνο εκκόλαψης.

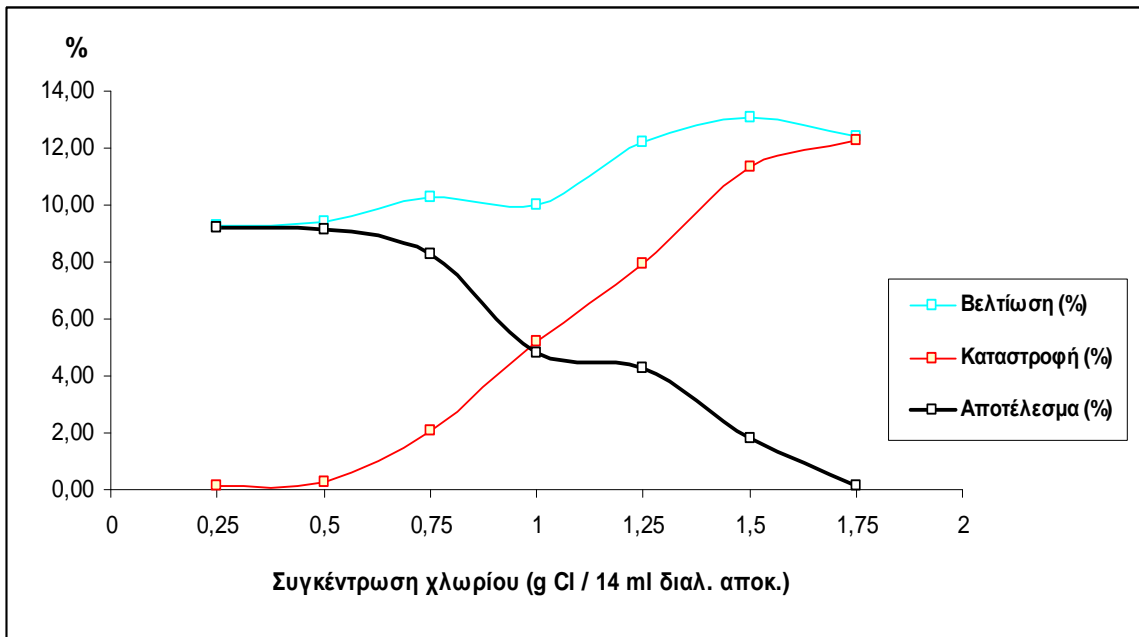
Στις εικόνες 27 και 28 εξάγεται το συμπέρασμα ότι αυξανόμενης της συγκέντρωσης χλωρίου να μεν παρατηρείται μείωση του χρόνου εκκόλαψης αλλά με χαμηλότερα επίπεδα εκκολαψιμότητας.

Γ. Διαμόρφωση του αποτελέσματος θετικού ή αρνητικού που προκάλεσε η επίδραση της τεχνητής αποκελύφωσης στην εκκόλαψη κύστεων *Artemia franciscana* (GSL)

Πίνακας 19. Διαμόρφωση του αποτελέσματος (θετικού ή αρνητικού) που προκάλεσε η επίδραση της τεχνητής αποκελύφωσης (συγκεντρώσεις 0,25-1,75 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης) στην εκκόλαψη κύστεων *Artemia franciscana* (GSL).

Συγκέντρωση χλωρίου (g Cl/14 ml διαλ. αποκ.)	Ποσοστό κύστεων στο οποίο προκλήθηκε βελτίωση της εκκολαπτικής ικανότητας (%) (β)	Ποσοστό κατεστραμμένων κύστεων (%) (κ)	Αποτέλεσμα της τεχνητής αποκελύφωσης (%) (β-κ)
0,25	9,30	0,10	+9,20
0,50	9,40	0,00	+9,40
0,75	10,30	2,06	+8,24
1,00	10,00	5,20	+4,80
1,25	12,20	7,94	+4,26
1,50	13,10	11,33	+1,77
1,75	12,40	12,29	+0,11

Στον Πίνακα 19 παρατηρείται το αποτέλεσμα της επίδρασης της τεχνητής αποκελύφωσης στην εκκόλαψη κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) (την 24^η ώρα από την έναρξη της ενυδάτωσης) όπως διαμορφώνεται από την διαφορά του ποσοστού των γεμάτων κύστεων που προκλήθηκε βελτίωση της εκκολαπτικής ικανότητας και του ποσοστού των γεμάτων κύστεων που υπέστη καταστροφή, ο προσδιορισμός των οποίων επιτυγχάνεται με την ανάλυση των τιμών της εκκολαψιμότητας σε συνδυασμό με τις αυτές του ποσοστού εκκόλαψης των γεμάτων κύστεων.



Εικόνα 29. Επίδραση της τεχνητής αποκελύφωσης για κάθε συγκέντρωση χλωρίου στην εκκόλαση κύστεων *Artemia franciscana* (GSL).

Στην Εικόνα 29 παρατηρείται αύξηση της εκκολαπιμότητας για όλες τις συγκεντρώσεις χλωρίου, η οποία μειώνεται αυξανόμενης της συγκέντρωσης χλωρίου. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στις υψηλές συγκεντρώσεις χλωρίου προκαλείται μεγαλύτερος βαθμός καταστροφής εξαιτίας της ισχυρής και μαζικής δράσης του ενεργού χλωρίου άνωθεν της συγκέντρωσης 1,0 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης. Στις χαμηλές συγκεντρώσεις 0,25, 0,5 και 0,75 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης δεν παρατηρείται σημαντική καταστροφή κύστεων.

Παρόλο ότι, σε όλες τις συγκεντρώσεις χλωρίου παρατηρείται σημαντική βελτίωση της εκκολαπτικής ικανότητας η καταστροφή ενός σημαντικού ποσού κύστεων εξαιτίας της παρατεταμένης παραμονής των κύστεων στο διάλυμα αποκελύφωσης οδήγησε σε μη αναμενόμενα αποτελέσματα.

3.1.2. Φυσικοχημικές παραμέτροι επώασης

Το δεύτερο πειραματικό μέρος της εργασίας περιλαμβάνει παρουσίαση και ανάλυση των αποτελεσμάτων από την μελέτη επίδρασης των παραμέτρων επώασης: θερμοκρασίας, αλατότητας και φωτισμού στην διαμόρφωση της εκκολαψιμότητας και ποσοστού εκκόλαψης κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) με σκοπό την επιλογή του καταλληλότερου συνδυασμού τιμών που δίνει μέγιστη εκκολαπτική αποδοτικότητα.

Για την διευκόλυνση των παρατηρήσεων έγινε αναγωγή των τιμών της εκκολαψιμότητας σε ποσοστά εκκόλαψης ολικού αριθμού αφυδατωμένων κύστεων (γεμάτων και άδειων) που εμπεριέχονται σε ένα γραμμάριο ξηρής μάζας κύστεων (πίνακας 2β). Ο ολικός αριθμός των κύστεων (γεμάτων και άδειων) που μετρήθηκε σε ένα γραμμάριο καθαρής ξηρής μάζας κύστεων είναι 309.458 με τυπική απόκλιση 23147.

Η δυνατότητα συγκριτικής μελέτης των τιμών κάθε παραμέτρου επιτυγχάνεται και από το ποσοστό εκκόλαψης των γεμάτων κύστεων (Hatching Percentage), φυσικά με τα ίδια συμπεράσματα όπως από την μελέτη της εκκολαψιμότητας. Από τη μελέτη όμως του ποσοστού εκκόλαψης γεμάτων κύστεων δίνεται η δυνατότητα προσδιορισμού του ποσοστού των γεμάτων κύστεων που δεν κατάφεραν να εκκολαφθούν υπό ιδανικές συνθήκες, εκτίμησης της ποιότητας των κύστεων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και ταυτοποίησης των αποτελεσμάτων της εργασίας αυτής με άλλες ερευνητικές εργασίες (Lavens *et al.*, 1987).

Με τη χρήση του προγράμματος SPSS έγινε η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων (μέσου όρου, τυπικής απόκλισης, τυπικού σφάλματος, διάστημα εμπιστοσύνης, έλεγχος κανονικής κατανομής κλπ). Σε όλες τις δοκιμασίες τα δεδομένα ακολούθησαν την κανονική κατανομή (κατά Gauss). Στην συνέχεια έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων

μέσω της παραμετρικής δοκιμασίας paired-sample t-test (έλεγχος ανά ζεύγη). Ελέγχθηκε αν ο μέσος όρος του ποσοστού εκκόλαψης κάθε μεταβλητής για την συγκεκριμένη κατηγορία που μελετήθηκε, παρουσιάζε στατιστικά σημαντική διαφορά με το μέσο όρο του ποσοστού εκκόλαψης κάθε μιας από τις υπόλοιπες μεταβλητές. Η ιδανικότερη τιμή για κάθε κατηγορία εκτιμήθηκε από τη σύγκριση της μεγίστης τιμής με τις υπόλοιπες.

Με βάση το **t-test** ελέγχθηκαν οι υποθέσεις με επίπεδο σημαντικότητας 95%.

3.1.2.3. Αλατότητα

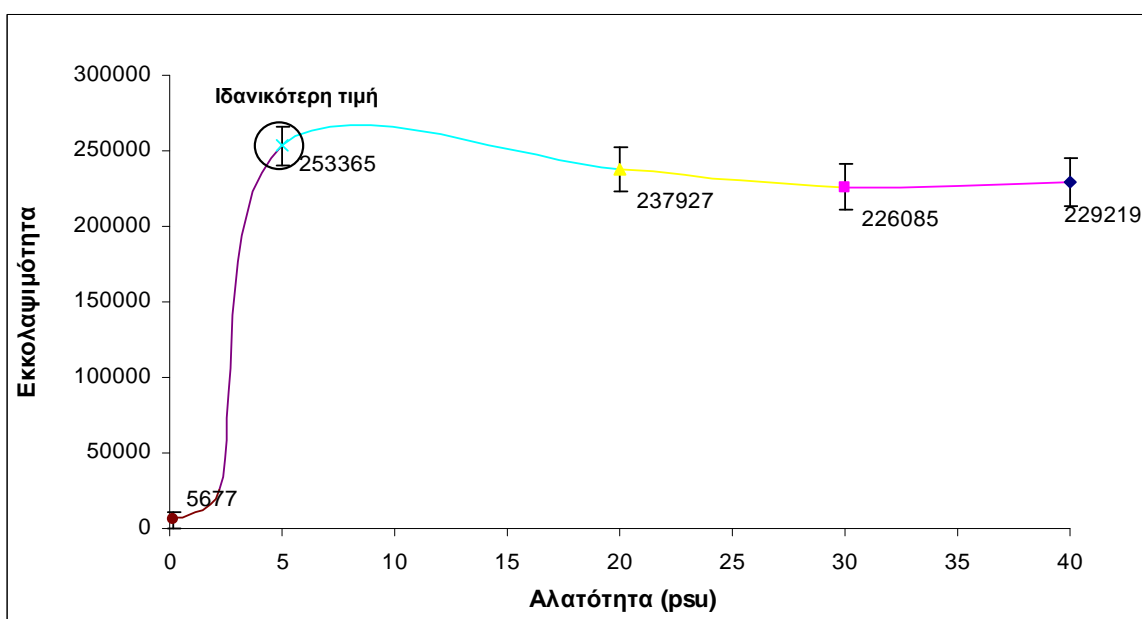
Για τη μελέτη επίδρασης της αλατότητας στην εκκόλαψη κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) χρησιμοποιήθηκαν οι εξής τιμές: 0, 5, 20, 30, 40 psu (Πίν. 20, 21 και Εικ. 30, 31).

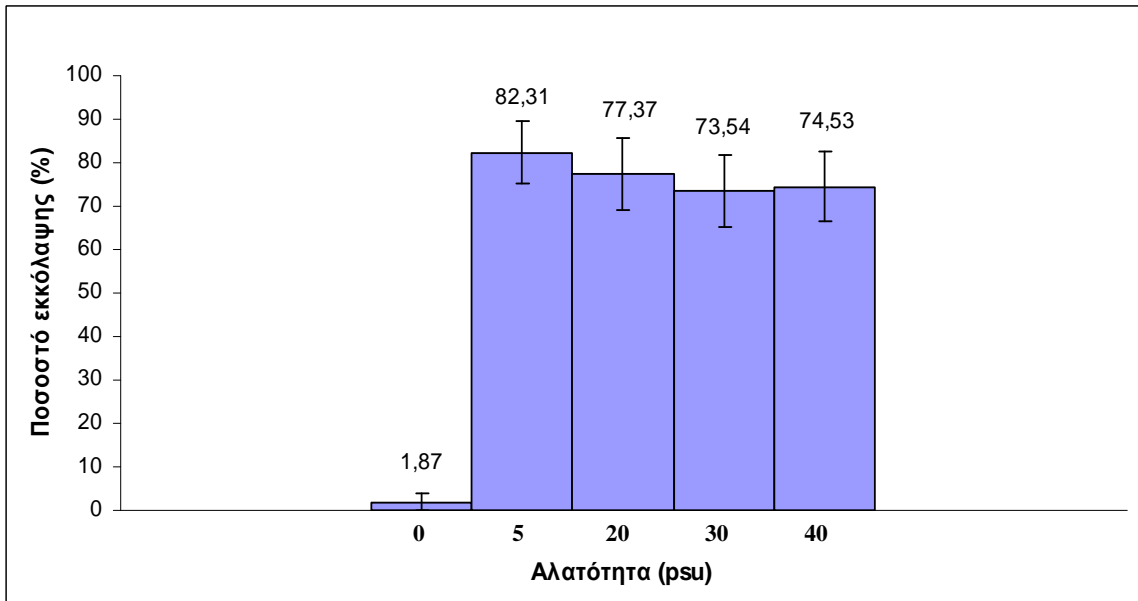
Πίνακας 20. Εκκολασιμότητα και ποσοστά εκκόλαψης (συνολικού αριθμού και γεμάτων) κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) σε συνθήκες διαφορετικής αλατότητας εκκολαπτικού μέσου (24^h ώρα).

Αλατότητα (psu)	0	5	20	30	40
Εκκολασιμότητα	5677	253365	237719	226085	228594
Τυπική απόκλιση	5713	12864	16275	15363	15934
Ποσοστό εκκόλαψης (%) (γεμάτων και άδειων)	1,87	82,31	77,29	73,54	74,32
Τυπική απόκλιση	1,94	7,27	8,22	8,22	7,97
Ποσοστό εκκόλαψης (%) (γεμάτων)	2,03	90,82	85,31	81,17	82,03
Τυπική απόκλιση	2,09	9,78	10,90	10,61	10,61

Πίνακας 21. Αποτελέσματα της δοκιμασίας paired-sample t-test (επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$)

Αλατότητα (psu)	0	5	20	30	40
0	-----	+	+	+	+
5	+	-----	+	+	+
20	+	+	-----	+	+
30	+	+	+	-----	-
40	+	+	+	-	-----

Εικόνα 30. Εξέλιξη της εκκολαψιμότητας κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) σε σχέση με τη αλατότητα (24^η ώρα)



Εικόνα 31. Διαμόρφωση του ποσοστού εκκόλαψης γεμάτων κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) σε σχέση με την αλατότητα (24^η ώρα)

Στους Πίνακες 20, 21 και στις Εικόνες 30, 31 παρατηρείται η εξής διαδοχική συσχέτιση των τιμών της εκκολαψιμότητας και του ποσοστού εκκόλαψης στις παραπάνω τιμές αλατότητας:

- ✦ στην αλατότητα 0 psu η τιμή εκκολαψιμότητας και το ποσοστό εκκόλαψης είναι ελάχιστα.
- ✦ στην αλατότητα 5 psu παρατηρούνται οι μέγιστες τιμές εκκολαψιμότητας και ποσοστού εκκόλαψης.
- ✦ με την αύξηση της αλατότητας σε 20 psu παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της εκκολαψιμότητας και του ποσοστού εκκόλαψης όπως θεωρητικά αναμενόταν.
- ✦ στην αλατότητα 30 psu παρατηρείται συνέχιση της μείωσης της εκκολαψιμότητας και του ποσοστού εκκόλαψης αλλά σε μικρότερο βαθμό.

- ▲ στην αλατότητα 40 psu παρατηρείται μια μικρή αύξηση έναντι των 30 psu. Έπειτα από στατιστικό έλεγχο δεν παρατηρείται καμία σημαντική διαφορά. Η μικρή αυτή αύξηση αντί της αναμενόμενης μείωσης δυνατό να οφείλεται στο ότι, οι κύστες που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από διαφορετική συγκομιδή (άλλη συσκευασία).

Κατά τη διάρκεια του πειράματος παρατηρήθηκε επίσης μια σταδιακή μείωση της θρεπτικής αξίας των ναυπλίων (πιο αδύναμοι), αυξανόμενης της αλατότητας.

3.1.2.3. Θερμοκρασία

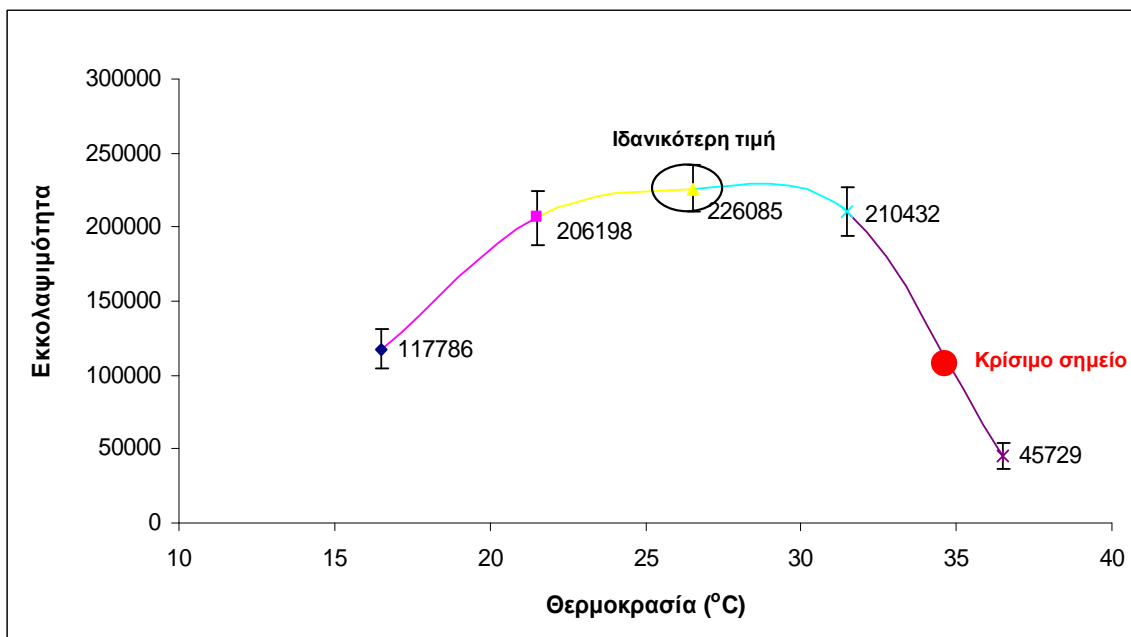
Για τη μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας στην εκκόλαψη κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος τιμών από 15,5 μέχρι 37,5 °C (Πίν. 22, 23 και Εικ. 32, 33).

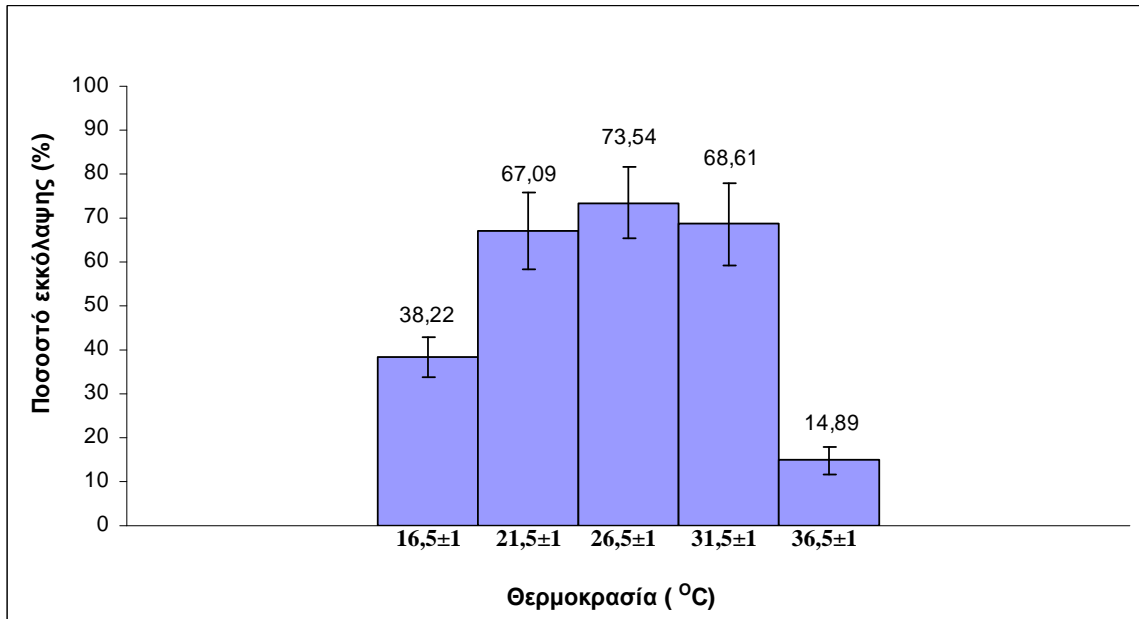
Πίνακας 22. Εκκολασιμότητα και ποσοστά εκκόλαψης *Artemia franciscana* σε συνθήκες διαφορετικής θερμοκρασίας (24^η ώρα)

Θερμοκρασία (°C)	16,5 ±1	21,5 ±1	26,5 ±1	31,5±1	36,5±1
Εκκολασιμότητα	117786	206198	226085	210432	45729
Τυπική απόκλιση	13004	18676	15363	16119	8728
Ποσοστό εκκόλαψης (%) (γεμάτων και άδειων)	38,22	67,09	73,54	68,61	14,89
Τυπική απόκλιση	4,63	8,64	8,22	9,34	3,16
Ποσοστό εκκόλαψης (%) (γεμάτων)	42,18	73,99	81,17	75,71	16,38
Τυπική απόκλιση	5,72	10,19	10,61	11,40	3,37

Πίνακας 23. Αποτελέσματα της δοκιμασίας paired-sample t-test (επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$)

Θερμοκρασία (°C)	16,5 ±1	21,5 ±1	26,5 ±1	31,5±1	36,5±1
16,5 ±1	----	+	+	+	+
21,5 ±1	+	----	+	+	+
26,5 ±1	+	+	----	+	+
31,5±1	+	+	+	----	+
36,5±1	+	+	+	+	----

Εικόνα 32. Εξέλιξη της εκκολαψιμότητας κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) σε σχέση με τη θερμοκρασία (24^η ώρα)



Εικόνα 33. Διαμόρφωση του ποσοστού εκκόλαψης γεμάτων κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) σε σχέση με τη θερμοκρασία (24^η ώρα)

Στους Πίνακες 22, 23 και στις Εικόνες 32, 33 παρατηρείται η εξής διαδοχική συσχέτιση των τιμών της εκκολαψιμότητας και του ποσοστού εκκόλαψης στις παραπάνω τιμές θερμοκρασίας:

- ♣ όλες οι τιμές της θερμοκρασίας που μελετήθηκαν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους (Πίν. 23).
- ♣ από τους $16,5 \pm 1$ °C μέχρι και τους $21,5 \pm 1$ °C υπάρχει μια σημαντική συνεχής αύξηση.
- ♣ από τους $21,5 \pm 1$ °C μέχρι $26,5 \pm 1$ °C συνεχίζεται η άνοδος αλλά σε μικρότερο βαθμό. Βιβλιογραφικά, από 25° C μέχρι 28 °C παρατηρείται μια σταθερότητα στην εκκολαψιμότητα (Lavens and Sorgeloos, 1996).
- ♣ η θερμοκρασία $26,5 \pm 1$ °C παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα εκκολαψιμότητας και ποσοστού εκκόλαψης.

- ▲ από τους 28 °C αρχίζει μια σταδιακή κάθοδος η οποία είναι σε μικρό βαθμό μέχρι 31,5 ± 1 °C και πολύ μεγαλύτερη από αυτό το σημείο και άνω.
- ▲ στους 31,5 ± 1 °C το ποσοστό εκκόλαψης βρίσκεται στο 81,17 % ενώ στους 36,5 ± 1 °C είναι μόνο 16,38 %. Από αυτό συμπεραίνουμε ότι από τους 36,5 ± 1 °C και άνω οι κύστες βαδίζουν προς ολική καταστροφή.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος παρατηρήθηκε επίσης σταδιακή μείωση της θρεπτικής αξίας των ναυπλίων (πιο αδύναμοι) αυξανόμενης της θερμοκρασίας άνω των 31,5 ± 1 °C.

3.1.2.3. Φως

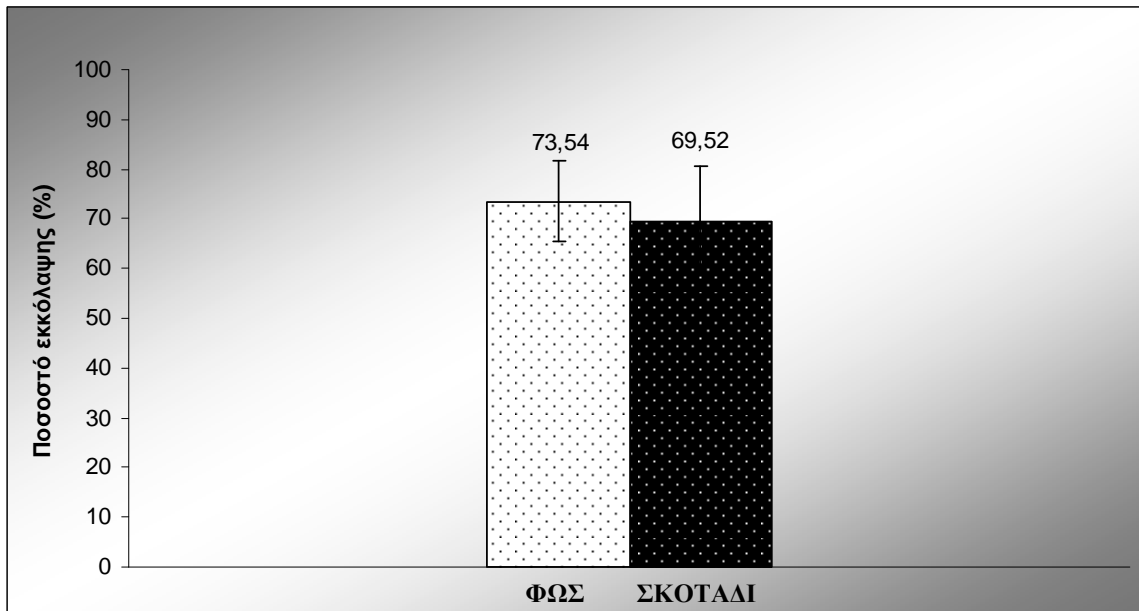
Για τις ανάγκες του συγκεκριμένου πειράματος το ποσοστό εκκόλαψης εξετάστηκε σε συνθήκες πλήρους συσκότισης σε σχέση με τεχνητό φως 1000 Lux (Πίν. 24, 25 και Εικ. 34)

Πίνακας 24. Εκκολαψιμότητα και ποσοστά εκκόλαψης (συνολικού αριθμού και γεμάτων) κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) σε συνθήκες φωτισμού και σκότους

Φωτισμός	1000 lux	Σκοτάδι
Εκκολαψιμότητα	226085	214271
Τυπική απόκλιση	15363	32396
Ποσοστό εκκόλαψης (%) (γεμάτων και άδειων)	73,54	69,52
Τυπική απόκλιση	8,22	10,99
Ποσοστό εκκόλαψης (%) (γεμάτων)	81,17	76,48
Τυπική απόκλιση	10,61	11,67

Πίνακας 25. Αποτελέσματα της δοκιμασίας paired-sample t-test (επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$)

Φωτισμός	Σκοτάδι
1000 lux	-

Εικόνα 34. Διαμόρφωση του ποσοστού εκκόλαψης γεμάτων κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) σε συνθήκες φωτισμού και σκότους (24^η ώρα)

Στους Πίνακες 24, 25 και στην Εικόνα 34 παρατηρείται η εξής συσχέτιση των τιμών της εκκολασιμότητας και του ποσοστού εκκόλαψης υπό συνθήκες τεχνητού φωτισμού 1000 Lux και πλήρους συσκότισης:

Κατά την διεξαγωγή του πειράματος με παρουσία φωτισμού οι τιμές της εκκολασιμότητας και του ποσοστού εκκόλαψης την 24^η ώρα φαίνονται να είναι ελάχιστα μεγαλύτερες σε σχέση με το σκοτάδι. Έπειτα από στατιστικό έλεγχο διαπιστώθηκε πως η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Σημειωτέον ότι, οι ναύπλιοι που εκκολαφθήκαν σε συνθήκες σκότους ήταν πιο αδύναμοι (μικρότερης θρεπτικής αξίας) σε σχέση με αυτούς που εκκολαφθήκαν σε συνθήκες τεχνητού φωτισμού.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Επίδραση φυσικοχημικών παραμέτρων στην εκκολαψιμότητα (Hatching Efficiency) και στο ποσοστό εκκόλαψης (Hatching Percentage) κύστεων *Artemia franciscana* (GSL)

4.1.1. Συγκέντρωση χλωρίου

Στο πρώτο μέρος της εργασίας διερευνήθηκε η σχέση ανάμεσα στη συγκέντρωση του ενεργού χλωρίου (0,25 - 1,75 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης) και των εκκολαπτικών χαρακτηριστικών: ποσοστού εκκόλαψης και εκκολαψιμότητας στη χρονική περίοδο μεταξύ της 14^{ης} και 24^{ης} ώρας (ανά δυο ώρες) από την έναρξη της ενυδάτωσης.

Από τη μελέτη της δράσης του ενεργού χλωρίου επί του κελύφους ή και επί του εμβρύου προκύπτει το αποτέλεσμα της τεχνητής αποκελύφωσης για κάθε συγκέντρωση χλωρίου. Το ερώτημα που τίθεται και κρίνεται σημαντικό για τα αποτελέσματά μας είναι εάν η δράση της συγκεκριμένης συγκέντρωσης χλωρίου που χρησιμοποιήθηκε είναι εκτός από ευνοϊκή (προκαλεί βελτίωση της εκκολαπτικής ικανότητας) και καταστροφική. Εάν επιτρέπει δηλαδή μόνο την εξουδετέρωση του κελύφους (ιδανικές συγκεντρώσεις) ή προκαλεί και την καταστροφή του εμβρύου εξαιτίας της ισχυρής δράσης του ενεργού χλωρίου (μεγάλες συγκεντρώσεις).

Η θετική ή αρνητική επίδραση της τεχνητής αποκελύφωσης στην εκκόλαψη των κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) διαπιστώνεται από τις τιμές της εκκολαψιμότητας δηλαδή του ποσοστού των εκκολαπτόμενων ναυπλίων ως προς τον ολικό αριθμό κύστεων (γεμάτων και άδειων). Ο αριθμός των εκκολαπτόμενων ναυπλίων που προκύπτει από την εφαρμογή τεχνητής αποκελύφωσης δεν πρέπει να είναι μικρότερος από αυτό του μάρτυρα. Στην περίπτωση που παρατηρείται πτώση της τιμής της εκκολαψιμότητας τότε αυτό οφείλεται στη καταστροφική επίδραση της συγκεκριμένης συγκέντρωσης χλωρίου επί ενός σημαντικού αριθμού γεμάτων κύστεων.

Η διαμόρφωση του αποτελέσματος θετικού ή αρνητικού προκύπτει από τη διαφορά του ποσοστού των γεμάτων κύστεων στο οποίο προκλήθηκε βελτίωση της εκκολαπτικής ικανότητας και του ποσοστού των κύστεων που υπέστη καταστροφή, ο προσδιορισμός των οποίων επιτυγχάνεται από τη μελέτη των τιμών τόσο της εκκολαψιμότητας όσο και του ποσοστού εκκόλαψης γεμάτων κύστεων (Πίν. 19).

Από τις τιμές του ποσοστού εκκόλαψης γεμάτων κύστεων διαπιστώνεται η ισχύς και η δράση του ενεργού χλωρίου επί του κελύφους, όχι όμως επί του εμβρύου. Το ποσοστό εκκόλαψης σχετίζεται μόνο με την επίδραση της τεχνητής αποκελύφωσης στην εκκολαπτική ικανότητα των κύστεων και όχι με την καταστροφική της δράση. Ανεξαρτήτως συγκέντρωσης και καταστροφικής επίδρασης του ενεργού χλωρίου προκαλείται εξουδετέρωση του κελύφους και εκκόλαψη σχεδόν σε όλες τις εναπομείναντες και σώες γεμάτες κύστεις.

Ο προσδιορισμός του ποσοστού εκκόλαψης γεμάτων κύστεων απαιτεί την καταμέτρηση των εκκολαπτικών στοιχείων (ναύπλιοι, ναύπλιοι στο στάδιο της ομπρέλλας και γεμάτες κύστεις που “αναμένεται” να εκκολαφθούν), το άθροισμα των οποίων

αντιστοιχεί στο ποσοστό των γεμάτων κύστεων που διασώθηκαν μετά την επίδραση του υποχλωριώδους διαλύματος και όχι στο αρχικό ποσό κύστεων που εμπεριέχεται στο ένα γραμμάριο ξηρής μάζας κύστεων δηλαδή αναφέρεται στο ποσοστό των σών γεμάτων κύστεων που αναμένεται να εκκολαφθεί με την εφαρμογή της τεχνητής αποκελύφωσης.

Στην συγκεκριμένη εργασία η εφαρμογή της τεχνητής αποκελύφωσης προκάλεσε τη βελτίωση της εκκολαπτικής ικανότητας των κύστεων (ποσοστού εκκόλαψης των γεμάτων κύστεων) ανεξαρτήτως συγκέντρωσης χλωρίου και χρόνου εκκόλαψης (Εικ. 25).

Σε όλες τις συγκεντρώσεις χλωρίου την 22^η ώρα προκλήθηκε το 90 % της αναμενόμενης εκκόλαψης (σημαντική αύξηση του ποσοστού εκκόλαψης κατά 10 %), το οποίο διατηρήθηκε σταθερό μέχρι την 24^η ώρα (Εικ. 25).

Αυξανόμενης της συγκέντρωσης χλωρίου παρατηρήθηκε αύξηση έστω και μη στατιστικά σημαντική του ποσοστού εκκόλαψης, η οποία οφείλεται στην ισχυρότερη δράση του ενεργού χλωρίου επί του κελύφους των κύστεων (Εικ. 24).

Η διαφορά του ποσοστού εκκόλαψης μεταξύ της 14^{ης} και 24^{ης} ώρας μειωνόταν αυξανόμενης της συγκέντρωσης χλωρίου. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του χλωρίου τόσο διευκολύνεται και συντομεύει η εκκόλαψη των εμβρύων (90 %) (Εικ. 24).

Η μελέτη του ποσοστού εκκόλαψης γεμάτων κύστεων είναι εξαιρετικής σημασίας γιατί δίνει τη δυνατότητα εκτίμησης του ποσοστού των γεμάτων κύστεων (υπόλοιπο 10%) που δεν κατάφερε να εκκολαφθεί μέσω της τεχνητής αποκελύφωσης με απώτερο σκοπό την εκκόλαψη όλων των γεμάτων κύστεων χρησιμοποιώντας άλλες τεχνικές όπως χρήση H₂O₂, διαχείμαση κ.λπ. Όσο μικρότερο είναι το ποσοστό των μη εκκολαπτόμενων κύστεων τόσο επιτυχής ως προς την εκκόλαψη ήταν η τεχνητή αποκελύφωση.

Η εκκολαψιμότητα για κάθε συγκέντρωση χλωρίου εξαρτάται από το χρόνο παραμονής των κύστεων στο διάλυμα αποκελύφωσης. Ο χρόνος αποκελύφωσης είναι αντιστρόφως ανάλογος με τη συγκέντρωση χλωρίου δηλαδή αυξανόμενη της συγκέντρωσης χλωρίου ελαττώνεται και ο χρόνος αποκελύφωσης. Αυτό οφείλεται στην ισχυρή και μαζική δράση του ενεργού χλωρίου άνωθεν μιας τιμής, η οποία με βάση τα αποτελέσματα μας εκτιμήθηκε στο 1 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης (Εικ. 26).

Αυξανόμενη της συγκέντρωσης χλωρίου ελαχιστοποιείται ο χρόνος παραμονής των κύστεων στο διάλυμα αποκελύφωσης, καθώς και ο χρόνος εμφάνισης του λαμπερού πορτοκαλόχρωου χρωματισμού, ο οποίος και δηλώνει την ολοκλήρωση της αποκελύφωσης. Η εμφάνιση του λαμπερού πορτοκαλόχρωου χρωματισμού των κύστεων γίνεται σταδιακά από γκρι-πρασινολαδί σε σκούρο πορτοκαλί και τελικά σε λαμπερό πορτοκαλί. Στις υψηλές συγκεντρώσεις χλωρίου λόγω της ισχυρής δράσης του επί του κελύφους η μετάβαση αυτή γίνεται ταχύτατα παρακάμπτοντας την εμφάνιση των υπόλοιπων χρωματισμών. Αυτό οδηγεί σε αύξηση της πιθανότητας σφάλματος όσο αφορά την απομάκρυνση των κύστεων από το διάλυμα αποκελύφωσης την κατάλληλη χρονική στιγμή. Η ελάχιστη παράταση του χρόνου παραμονής των κύστεων στο διάλυμα αποκελύφωσης προκαλεί καταστροφή των εμβρύων. Αν αυτό μπορούσε να αποφευχθεί, πιθανόν να μην υφίστατο διαφορά στην εκκολαψιμότητα, ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης χλωρίου (Εικ. 26).

Εξαίρεση αποτελούν οι πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις χλωρίου (0,25 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης) οι οποίες επιδρούν ελάχιστα και μόνο σε ένα μέρος του συνολικού αριθμού των κύστεων.

Στο πείραμα μας παρατηρήθηκε πτώση της εκκολαψιμότητας (ποσοστού εκκόλαψης ολικού αριθμού των κύστεων) από την συγκέντρωση 0,5 g Cl/14 ml (ιδανικότερη με 81,6 %) και άνω. Υπό κανονικές συνθήκες χρόνου παραμονής των κύστεων στο διάλυμα αποκελύφωσης θα έπρεπε με την αύξηση της συγκέντρωσης χλωρίου η μέγιστη τιμή της εκκολαψιμότητας (81,6 %) να εμφανιζόταν νωρίτερα ή τουλάχιστον την ίδια ώρα, αντιθέτως όμως παρατηρήθηκαν μικρότερες τιμές εκκολαψιμότητας.

Το σημαντικό είναι πως αν και υπήρξε καταστροφή εμβρύων λόγω της καθυστερημένης απομάκρυνσης των κύστεων από το διάλυμα αποκελύφωσης (μεγαλύτερο του επιτρεπτού) σε όλες τις συγκεντρώσεις χλωρίου παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες τιμές εκκολαψιμότητας (1,1 - 8,9 %).

Αξιοσημείωτο είναι ότι, την 24^η ώρα η τιμή της εκκολαψιμότητας που βρέθηκε στις υψηλές συγκεντρώσεις χλωρίου είναι περίπου η ίδια με αυτή του μάρτυρα και σε χαμηλότερα επίπεδα έναντι των υπολοίπων συγκεντρώσεων. Αυτό όμως οφείλεται σε διαφορετικούς λόγους. Στον μεν μάρτυρα αναμένεται συνέχιση της εκκόλαψης πέραν της 24^{ης} ώρας, ενώ στις υψηλές συγκεντρώσεις χλωρίου η τιμή της εκκολαψιμότητας φαίνεται να σταθεροποιείται πολύ νωρίτερα λόγω μαζικής εκκόλαψης αλλά και καταστροφής μέρους των κύστεων (Εικ. 27, 28).

Στις χαμηλές συγκεντρώσεις χλωρίου, παρατηρείται επιμήκυνση του χρόνου εκκόλαψης αλλά λόγω της μη καταστροφικής επίδρασης του ενεργού χλωρίου επί των κύστεων με τη πάροδο του χρόνου (-24^η ώρα) έχουμε μεγαλύτερη εκκολαψιμότητα.

Από πειράματα τεχνητής αποκελύφωσης που έγιναν (Sorgeloos *et al.*, 1977, 1991) σε διαφορετικά στελέχη *Artemia*, διαπιστώθηκε πως ένα κατάλληλο διάλυμα αποκελύφωσης θα πρέπει περιέχει τα ακόλουθα συστατικά: για 1 g κύστεων απαιτούνται

0,15 g ενεργού NaOH (ή 2.5 ml 40% διαλύματος NaOH σε 100 ml τελικού διαλύματος αποκελύφωσης) και 0.5 g ενεργού Cl (ή 4 ml 12.5% NaOCl) ανά 14 ml τελικού διαλύματος αποκελύφωσης..

Σύμφωνα με το πείραμα μας τα καλύτερα αποτελέσματα εκκόλαψης έδωσαν οι χαμηλές συγκεντρώσεις 0,25 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης για την 22^η ώρα εκκόλαψης και 0,5 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης για την 24^η ώρα εκκόλαψης. Όπως διαπιστώνουμε, τα αποτελέσματα αυτά ταυτίζονται με αυτά του Sorgeloos και συν. (1977, 1991).

Η συγκέντρωση 0,25 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης για την 22^η ώρα εκκόλαψης προτιμάται έναντι των υπολοίπων συγκεντρώσεων για πρακτικούς και οικονομικούς λόγους. Πρώτον, παρουσιάζει μεγαλύτερη εκκολασιμότητα έναντι των υπολοίπων χρόνων εκτός της 24^{ης} ώρας εκκόλαψης με την οποία δεν υφίσταται στατιστικά σημαντική διαφορά, όμως πλεονεκτεί έναντι του χρόνου.

Δεύτερον, παρουσιάζει περίπου την ίδια εκκολασιμότητα με τις συγκεντρώσεις 0,5 και 0,75 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης για την 20^η και 22^η - 24^η ώρα εκκόλαψης, προτιμάται όμως λόγω χρήσης μικρότερης ποσότητας NaOCl.

Σημειωτέον ότι, ο χρόνος των 3 λεπτών που χρειάστηκε για την αποκελύφωση στη συγκέντρωση 0,25 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης δε θεωρείται σημαντικά αυξημένος έναντι των υπολοίπων.

Αυτό που ενδιαφέρει κυρίως τον καλλιεργητή είναι το αποτέλεσμα της εκκόλαψης να ταυτίζεται με τα αναμενόμενα εκκολαπτικά χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης συγκομιδής κύστεων που αναγράφονται στη συσκευασία δηλαδή η ποιότητα των κύστεων να αναλογεί στην τιμή αγοράς.

Στις συσκευασίες αναγράφεται το είδος της *Artemia*, η προέλευση, η εκκολασιμότητα, οι τιμές των οποίων όμως συνήθως δεν αντιπροσωπεύουν το πραγματικό περιεχόμενο.

Νοθεία υψηλής ποιότητας κύστεων όπως *Artemia fransiscana* με κατώτερης ποιότητας όπως *Artemia parthenogenetica* (μικρότερης εκκολαπτικής ικανότητας, χαμηλότερο ενεργειακό περιεχόμενο κ.λπ.) αποτελεί συχνό φαινόμενο. Αυτό διαπιστώνεται από την ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων μας με τα διεθνή πρότυπα.

Η ποιότητα της συγκεκριμένης συγκομιδής κύστεων που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας ανταποκρίνεται στα αναγραφόμενα στοιχεία. Το ποσοστό εκκόλαψης που υπολογίστηκε (80,2 %) ήταν αυτό που αναμενόταν ενώ όσο αφορά την εκκολασιμότητα η μικρή διαφορά που παρατηρήθηκε δεν οφειλόταν σε νοθεία αλλά σε πιθανά σφάλματα κατά τη διεξαγωγή του πειράματος και σε αδυναμία για ακριβή υπολογισμό της τιμής της εκκολασιμότητας κάθε συγκομιδής. Ακόμα και αν οι κύστεις προέρχονται από το ίδιο είδος και την ίδια περιοχή, η ποιότητα τους μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το χρόνο της συγκομιδής τους. Ακολουθώντας τις συνθήκες εκκόλαψης της συσκευασίας η τιμή της εκκολασιμότητας που υπολογίστηκε ήταν 225.000 (Μ,Ο) δηλαδή μια διαφορά 15.000 ναυπλίων από την αναγραφόμενη τιμή (240.000).

Για την αποτελεσματικότερη διάκριση πληθυσμών *Artemia* αλλά και για τον έλεγχο της “καθαρότητας” ενός δείγματος κύστεων, χρησιμοποιούνται τεχνικές ηλεκτροφόρησης (Triantaphyllidis *et al.*, 1998).

Χρησιμοποιώντας τους όρους εκκολασιμότητα και ποσοστό εκκόλαψης μας δίνεται η δυνατότητα σύγκρισης και ταυτοποίησης των αποτελεσμάτων μας με άλλες ερευνητικές εργασίες (Lavens *et al.*, 1987).

4.1.2. Φυσικοχημικές παράμετροι επώασης

Το δεύτερο μέρος της εργασίας αφορά την μελέτη επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων επώασης στη διαμόρφωση της εκκολαψιμότητας και του ποσοστού εκκόλαψης την 24^η ώρα. Για να εξασφαλιστεί η μέγιστη απόδοσή της εκκόλαψης θα πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπόψη τα χαρακτηριστικά και οι τιμές των εξής παραμέτρων: δοχεία εκκόλαψης, αερισμός, πυκνότητα κύστεων, εκκολαπτικό μέσο (pH και αλατότητα νερού), θερμοκρασία και φωτισμός.

Με βάση τον γράφοντα, η αλατότητα, η θερμοκρασία και ο φωτισμός θεωρούνται οι καταλληλότερες προς μελέτη παράμετροι για την εκκόλαψη κύστεων *Artemia franciscana*. Ωστόσο κρίνεται απαραίτητη μια μικρή αναφορά και σε άλλες φυσικοχημικές παραμέτρους με βάση τα διεθνή πρότυπα όπως δοχεία εκκόλαψης, πυκνότητα κύστεων, pH, αερισμός κ.λπ.

Τα καλύτερα αποτελέσματα εκκόλαψης επιτυγχάνονται με τη χρησιμοποίηση δοχείων με κωνική βάση, (π.χ κυλινδροκωνικές δεξαμενές πλαστικές σακούλες, σωλήνες falcon) στα οποία εφαρμόζεται αερισμός από τη βάση του κώνου. Στα δοχεία με επίπεδη βάση δημιουργούνται περιοχές στις οποίες παρατηρείται απουσία κινητικότητας του αέρα (“νεκρές”) άρα τροφοδοσίας οξυγόνου, με αποτέλεσμα αρνητικές επιπτώσεις στους ναυπλίους και στις κύστες. Η χρήση διαφανών ή ημιδιαφανών δοχείων επιτρέπει την είσοδο φωτός αλλά και την επίβλεψη του εναιωρήματος (Bengston *et al.*, 1991).

Για την εκτέλεση των πειραμάτων της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκαν πλαστικοί σωλήνες Falcon και πλαστικές σακούλες με κωνική βάση (Εικ. 15β, γ). Τα δοχεία αυτά πληρούν τους όρους για μια ιδανική εκκόλαψη.

Σε εμπορικό επίπεδο (μεγάλες ποσότητες) οι κύστεις *Artemia* εκκολάπτονται σε κυλινδρικές δεξαμενές (Εικ. 15α).

Για μικρούς όγκους νερού (μικρότερους των 20 ℓ), χρησιμοποιείται πυκνότητα μέχρι 5 g κύστεων /ℓ εκκολαπτικού μέσου ώστε να ελαχιστοποιείται ο τραυματισμός των ναυπλίων λόγω έλλειψης χώρου. Για μεγάλους όγκους νερού (μεγαλύτερους των 100 ℓ) χρησιμοποιείται πυκνότητα άνω των 1,5 g κύστεων /ℓ εκκολαπτικού μέσου (και μικρότερη των 5 g κύστεων /ℓ εκκολαπτικού μέσου) για την αποφυγή σφάλματος στην δειγματοληψία λόγω της μεγάλης αραιώσης του δείγματος. Σε επίπεδο παραγωγής στα εκκολαπτήρια υδρόβιων οργανισμών η πυκνότητα των κύστεων που συνήθως χρησιμοποιείται ανέρχεται περίπου στα 1,6 g κύστεων /ℓ εκκολαπτικού μέσου (Lavens and Sorgeloos, 1996).

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε πυκνότητα κύστεων 1,7 g (πείραμα I) και 2 g (πείραμα II) αφυδατωμένων κύστεων /ℓ εκκολαπτικού μέσου.

Με βάση τα διεθνή πρότυπα (Bengston et al., 1991) το εύρος ανεκτικότητας σε pH για την *Artemia* κυμαίνεται μεταξύ 7,2 και 8,95. Το προτεινόμενο pH εκκολαπτικού μέσου για μια αποδοτική εκκόλαψη είναι μεταξύ 8,65 - 8,85.

Για την εκκόλαψη των κύστεων χρησιμοποιήθηκε νερό με μέσο όρο pH 8 και αλατότητα 29-30 psu. Η διατήρηση του pH πάνω από 8 κατά τη διάρκεια της εκκόλαψης κρίθηκε απαραίτητη έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η μέγιστη δραστηριότητα των ενζύμων που συμμετέχουν στη διαδικασία της εκκόλαψης. Η ρύθμιση του pH γίνεται με διάλυμα Na_2CO_3 για αύξηση του pH ή διάλυμα NaHCO_3 για μείωση του pH.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν αντλίες και εύκαμπτοι σωλήνες για το συνεχή και ήπιο αερισμό του εκκολαπτικού μέσου έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η ομοιογενής κατανομή των κύστεων και να αποφεύγεται η συσσωμάτωσή

τους στον πυθμένα των δοχείων εκκόλαψης. Η τιμή του οξυγόνου διατηρήθηκε στη τιμή των 7,2 mg /ℓ.

Εργαστηριακά, η ένταση του αερισμού που εφαρμόζεται πρέπει να είναι επαρκής και σταθερή, ώστε τα επίπεδα του οξυγόνου να διατηρούνται σε υψηλά επίπεδα (μεγαλύτερα των 2 mg /ℓ) για να υπάρχει αυξημένη εκκολαψιμότητα (Trackaert, 1991). Η καλύτερη τιμή οξυγόνου θεωρείται αυτή των 7 mg /ℓ. Σε υψηλά επίπεδα οξυγόνου προκαλείται παραγωγή *Artemia* με λιγότερο ξηρό ατομικό βάρος και κατά συνέπεια λιγότερο ελκυστικά από τους θηρευτές (Lavens *et al.*, 1991: Van Stappen, 2002). Το οξυγόνο δεν προκαλεί στην ουσία καμιά διαταραχή σε ένα εύρος τιμών από 1-10 mg /ℓ.

Παρόλα αυτά, συχνές αυξομειώσεις οξυγόνου προκαλούν καταστροφή των ζώων λόγω της συνεχούς εναλλαγής, δημιουργίας και καύσης της αιμοσφαιρίνης.

Για την καλύτερη παροχή αερισμού (O₂) λαμβάνεται υπόψη το μέγεθος του δοχείου και η πυκνότητα των κύστεων. Ο αέρας που χορηγείται δεν πρέπει να είναι υπερβολικός αλλά θα πρέπει να επιδιώκεται μια απαλή και αρμονική κίνηση του νερού, έτσι ώστε να αποφεύγεται η προσκόλληση των ναυπλίων στα μέρη (πλευρές) των φιαλών όπου υπάρχει έλλειψη οξυγόνου (μη κίνηση αέρος). Η χρήση πορόλιθων ομαλοποιεί την κίνηση και διασπά τις φυσαλίδες.

Ο υπερβολικός αφρός πρέπει να αποφεύγεται για να μην υπάρχει ο κίνδυνος παγίδευσης των ενυδατωμένων κύστεων στις φυσαλίδες και να παρεμποδίζεται η εκκόλαψη. Επίσης, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα οι μεγάλοι ναύπλιοι να καταπιούν τις φυσαλίδες κατά συνέπεια να οδηγηθούν στην επιφάνεια και να πεθάνουν. Η αποφυγή αφρού γίνεται είτε πριν την διαδικασία της εκκόλαψης με απολύμανση (ξέπλυμα) των

κύστεων είτε κατά την διάρκεια της εκκόλαψης με την προσθήκη λίγων σταγόνων μη τοξικού αντιαφρώδους μέσου.

4.1.2.1. Αλατότητα

Οι μεγαλύτερες τιμές εκκολασιμότητας και ποσοστού εκκόλαψης παρατηρήθηκαν στην αλατότητα 5 psu. Όσο προχωρούμε σε μεγαλύτερες τιμές αλατότητας τόσο περισσότερος χρόνος χρειάζεται (σύνθεση της γλυκερόλης) από τις κύστεις για να εκκολαφθούν. Η χρησιμοποίηση του γλυκού νερού και εκκολαπτικού μέσου αλατότητας 5 psu επιλέχθηκαν για τη μελέτη της σημασίας του υποτονικού διαλύματος ως προς την εκκολασιμότητα, το ποσοστό εκκόλαψης και τη θρεπτική αξία των ναυπλίων. Οι κύστεις που προέρχονται ακόμη και από το ίδιο στέλεχος μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετικό ενεργειακό περιεχόμενο. Όταν οι κύστεις έχουν να αντιμετωπίσουν ένα υπότονο περιβάλλον, το ποσοστό των κύστεων που θα αντεπεξέλθει στις ενεργειακές ανάγκες της εκκόλαψης θα είναι μεγαλύτερο από ότι σε ένα υπέρτονο περιβάλλον, γιατί σε χαμηλότερες αλατότητες απαιτούνται μικρότερα ποσά ενέργειας.

Οι κύστεις παράγουν στο εσωτερικό τους κάποια ποσά γλυκερόλης για να αυξήσουν την εσωτερική οσμωτική πίεση και να προκαλέσουν το σπάσιμο των κύστεων. Η αύξηση όμως αυτή απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας. Για να αποφευχθεί αυτό, χωρίς σοβαρό αντίκτυπο στην θρεπτική αξία των ναυπλίων χρησιμοποιείται νερό με χαμηλή αλατότητα όσο το δυνατότερο πιο υπότονο. Αυτό οδηγεί τις κύστεις σε ένα πιο αργό ρυθμό λειτουργίας.

Κανονικά θα έπρεπε σε μηδενική αλατότητα να παρατηρούνται οι μεγαλύτερες τιμές εκκολασιμότητας και ποσοστού εκκόλαψης, εξαιτίας όμως των ωσμωρυθμιστικών

προβλημάτων που παρατηρούνται στα έμβρυα κατά το στάδιο της ομπρέλας, όπου προκαλείται λύση των κυττάρων λόγω της υπερβολικής εισόδου νερού σε αυτά (ώσμωση), η χρήση υποτονικού διαλύματος 5 psu θεωρείται η καλύτερη.

Κάτωθεν της αλατότητας 5 psu και όσο πλησιάζουμε προς το 0 psu παρατηρείται και ανάλογη ελάττωση της εκκολασιμότητας. Αυτό οφείλεται σε οσμωτικά προβλήματα που προκαλούνται στο έμβρυο εξαιτίας της υπερβολικής ροής νερού προς το εσωτερικό. Η αλατότητα 5 psu θεωρείται ιδανική για την εκκόλαψη γιατί επιτρέπει την είσοδο προς το εσωτερικό των κύστεων τόσης ποσότητας νερού, ώστε να μην καταναλώνεται επιπλέον ενέργεια για τη σύνθεση γλυκερόλης. Έτσι, στην αλατότητα 5 psu δίνεται η δυνατότητα σε περισσότερες κύστεις, δυνατές και αδύναμες να εκκολαφθούν. Με τη χρησιμοποίηση νερού αλατότητας 5 psu επιτυγχάνεται αύξηση της εκκολασιμότητας, μείωση του χρόνου εκκόλαψης αλλά και παραγωγή ναυπλίων μεγαλύτερης θρεπτικής αξίας (Εικ. 29, 30).

Με την αύξηση της αλατότητας από 5 μέχρι 40 psu παρατηρείται παράταση του χρόνου εκκόλαψης. Όσο προχωρούμε σε μεγαλύτερες τιμές αλατότητας τόσο περισσότερος χρόνος χρειάζεται (σύνθεση της γλυκερόλης) από τις κύστεις για να εκκολαφθούν.

Στην αλατότητα των 30 psu το ποσοστό εκκόλαψης φαίνεται να εξαρτάται μόνο από το ποσοστό των διαπαυσιακών και νεκρών κύστεων και καθόλου από τον παράγοντα “ενεργειακό απόθεμα” όπως και θα έπρεπε. Το ενεργειακό απόθεμα που απαιτήθηκε από τις κύστεις για να αντεπεξέλθουν στις συνθήκες εκκόλαψης, αλατότητας 30 και 40 psu δεν διέφερε σημαντικά, με αποτέλεσμα τα χαμηλότερα ποσοστά εκκόλαψης που παρατηρήθηκαν στην τιμή των 30 psu πιθανόν να οφείλονται κυρίως στο υψηλό ποσοστό νεκρών κύστεων και όχι διαπαυσιακών. Αυτές οι κύστεις είτε μπορεί να γεννήθηκαν εξ αρχής προβληματικές (π.χ χαμηλό ενεργειακό περιεχόμενο) με αδυναμία εκκόλαψης είτε

να διακόπηκε η εκκολαπτική διαδικασία για κάποιο λόγο (π.χ κακή αποθήκευση) και να τις οδήγησε στο θάνατο.

Η αλατότητα 40 psu επιλέχθηκε καθώς αντιστοιχεί στην αλατότητα του θαλασσινού νερού της περιοχής. Για πρακτικούς λόγους είναι χρήσιμο να γνωρίζουμε το ποσοστό εκκόλαψης στην αλατότητα αυτή, γιατί στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς η εκκόλαψη των κύστεων πραγματοποιείται από νερό που προέρχεται απευθείας από την θάλασσα.

Σύμφωνα με την εργασία μας αλλά και με ερευνητικές εργασίες η χρήση εκκολαπτικού μέσου αλατότητας 5 psu δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα εκκολαψιμότητας και ποσοστού εκκόλαψης (Trecee, 2000). Παρόλα αυτά, θεωρούμε, πως η χρήση του θαλασσινού νερού ως εκκολαπτικό μέσο προτιμάται για πρακτικούς και οικονομικούς λόγους.

4.1.2.2. Θερμοκρασία

Όπως και σε όλους τους οργανισμούς έτσι και στην *Artemia* τόσο η έναρξη όσο και η μέγιστη απόδοση του μεταβολισμού απαιτεί ένα εύρος θερμοκρασίας, κατάλληλο για την ενεργοποίηση των υπεύθυνων ενζύμων.

Οι θερμοκρασίες στις οποίες παρουσιάζει ανοχή η *Artemia francisana* είναι 6-35°C (Abatzopoulos *et al.*, 1998). Σύμφωνα με Bengsto και συν. (1991), το ευνοϊκότερο εύρος θερμοκρασίας για τη βέλτιστη εκκόλαψη κύστεων *Artemia* είναι 25-28 °C.

Κάτω από 25 °C οι κύστεις εκκολάπτονται πιο αργά ενώ άνω των 35 °C αρχίζει η καταστροφή τους. Εν τούτοις όμως η επίδραση ακραίων τιμών θερμοκρασίας στην εκκολαψιμότητα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από το συγκεκριμένο πληθυσμό που μελετάται. Στην περίπτωση που αναφερόμαστε στην παραγωγή βιομάζας ή στην

κατανάλωση τροφής το εύρος θερμοκρασίας μπορεί να διαφέρει από στέλεχος σε στέλεχος. Τα ερμαφρόδιτα στελέχη της Ευρώπης και ο πληθυσμός από το San Francisco Bay, Καλιφόρνιας προτιμούν ένα χαμηλό εύρος τιμών θερμοκρασιών (20-25 °C) ενώ τα παρθενογενετικά είδη και το στέλεχος από την Great Salt Lake της Utah, που χρησιμοποιήσαμε φαίνεται να προτιμούν ένα υψηλό εύρος θερμοκρασιών (25-30 °C) (Lavens *et al.*, 1991).

Στο συγκεκριμένο πείραμα, οι μεγαλύτερες τιμές εκκολαψιμότητας και ποσοστό εκκόλαψης παρατηρήθηκαν στη θερμοκρασία $26,5 \pm 1$ °C, αποτέλεσμα που φαίνεται να επιβεβαιώνεται από την βιβλιογραφία (Bengsto, 1991; Treece, 2000). Κάτωθεν των 25 °C και άνωθεν των 31,5 °C έχουμε καθυστέρηση της εκκόλαψης λόγω αργού μεταβολισμού, ενώ αυξανόμενης της θερμοκρασίας άνωθεν των 35 °C αρχίζει ανάλογη αύξηση καταστροφής των εμβρύων (Εικ. 31).

Το μειωμένο ποσοστό εκκόλαψης που παρατηρείται στις υψηλές θερμοκρασίες δείχνει πως ένας σημαντικός αριθμός ναυπλίων αναμένεται να εκκολαφθεί (28,5-35°C) ή έχει καταστραφεί (μεγαλύτερο των 35 °C). Η συνέχιση της επώασης πέραν της 24^{ης} ώρας έδειξε ότι δεν αυξήθηκε σημαντικά ο αριθμός των εκκολαπτόμενων ναυπλίων γεγονός που αποδεικνύει πως τα έμβρυα που αναμέναμε να εκκολαφθούν σε θερμοκρασία 35 °C ήταν νεκρά (Εικ. 32).

Σε θερμοκρασίες άνω των $31,5 \pm 1$ °C οι ναύπλιοι εμφάνιζαν πολύ λεπτό εξωσκελετό (μικρότερης θρεπτικής αξίας). Στην προσπάθεια τους να ανταποκριθούν και να επιβιώσουν στις υψηλές αυτές θερμοκρασίες οι ναύπλιοι καναλώνουν μεγάλα ποσά ενέργειας και σιγά σιγά οδηγούνται στο θάνατο.

4.1.2.3. Φως

Πολλοί ερευνητές με πρωτεργάτη τον Van den Linden (1985), διαπίστωσαν πως το ποσοστό εκκόλαψης κύστεων *Artemia* ήταν συχνά μεγαλύτερο όταν η διαδικασία της εκκόλαψης γινόταν υπό την παρουσία φωτός. Αυτό είχε ως συνέπεια το φως να καθιερωθεί ένας από τους απαραίτητους παράγοντες για την εκκόλαψη.

Μερικές κύστες *Artemia* έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν φωτεινή ενέργεια και να την αποθηκεύουν (συσσωρευτική) για μελλοντική χρήση. Υπό κατάλληλες συνθήκες οι κύστες κάνουν χρήση της ενέργειας αυτής ώστε να δύνανται να εκκολαφθούν έστω και υπό συνθήκες πλήρους σκότους.

Το φως μπορεί να προκαλέσει τη διακοπή της διάπαυσης (Vanhaecke *et al.*, 1981).

Το ποσό της ηλιακής ενέργειας που απαιτείται για μια μέγιστη εκκόλαψη, διαφέρει ανάμεσα σε διαφορετικές συγκομιδές κύστεων και είναι σημαντικά χαμηλότερο για τις αποκελυφωμένες κύστες και αυτό εξαιτίας της απομάκρυνσης του εξωτερικού κελύφους, με αποτέλεσμα το φως να προσεγγίζει πιο εύκολα τον φωτουποδοχέα (φυτόχρωμα ή αιματοεπινεφρίνη) (Drinkwater *et al.*, 1991).

Κατά τους Vanhaecke και συνεργάτες (1981) η μέγιστη απόδοση σε ναυπλίους παρατηρείται όταν η εκκόλαψη γίνεται σε συνεχή φωτισμό 1000 lux. Για την πρόκληση εκκόλαψης απαιτείται ένας τεχνητός φωτισμός 1000-2000 lux, κυρίως κατά τις πρώτες 3-4 ώρες της διαδικασίας, ώστε να ενεργοποιηθεί ο μηχανισμός της εκκόλαψης

Στα πειράματα, όμως, που πραγματοποιήσαμε δεν διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση της εκκολαψιμότητας και του ποσοστού εκκόλαψης με τη παρουσία φωτός (πίνακας 25). Αυτό πρέπει να οφείλεται στο ότι οι κύστες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν την ικανότητα αποθήκευσης ενέργεια από φωτισμό και παράλληλα είχαν εκτεθεί σε φως. Για το λόγο

αυτό συνιστάται όπως οι αποξηραμένες κύστεις να παραμένουν σε σκοτεινό μέρος γιατί η επανειλημμένη ή η συνεχής έκθεση στο φως ενεργοποιεί τους μηχανισμούς μεταβολισμού (κατανάλωση ενέργειας) που τις καθιστά μακροχρόνια πιο αδύναμες (μικρότερης θρεπτικής αξίας) και αυξάνει την θερμοκρασία των κύστεων με απρόβλεπτες συνέπειες.

Για το συνεχή φωτισμό του εκκολαπτικού μέσου χρησιμοποιήθηκαν λάμπες φθορίου, γιατί το φως που παράγουν ανήκει στην καταλληλότερη φασματική κατηγορία των 400-500 nm (Van den Linden *et al.*, 1985). Επίσης ο τεχνητός φωτισμός προτιμάται έναντι του ηλιακού, πιθανόν γιατί δεν περιέχει μήκη κύματος (υπεριώδη ακτινοβολία) που προκαλούν βλάβες στα κύτταρα. Διατηρώντας τις κύστεις σε συνθήκες σκότους, η παρουσία τεχνητού φωτισμού κατά την εκκόλαψη πρέπει να θεωρείται αναγκαία.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Για την επιλογή μιας συγκέντρωσης χλωρίου ως ιδανική για την βελτίωση της εκκόλαψης, θα πρέπει να μελετηθεί τόσο η επίδραση του ενεργού χλωρίου επί του κελύφους όσο και επί του εμβρύου. Ως κατάλληλη συγκέντρωση χλωρίου θεωρείται εκείνη που προκαλεί μόνο την εξουδετέρωση του κελύφους και όχι την καταστροφή του εμβρύου. Αυτό συμπεραίνεται από την μελέτη δυο εκκολαπτικών χαρακτηριστικών, του ποσοστού εκκόλαψης γεμάτων κύστεων και της εκκολαψιμότητας.

Η εκκολαψιμότητα για κάθε συγκέντρωση χλωρίου εξαρτάται από το χρόνο παραμονής των κύστεων στο διαλύμα αποκελύφωσης. Η ελαχίστη παράταση του χρόνου παραμονής των κύστεων στο πυκνό αυτό διάλυμα μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες. Στις υψηλές συγκεντρώσεις χλωρίου αυξάνεται η πιθανότητα σφάλματος εξαιτίας της ελαχιστοποίησης του χρόνου παραμονής.

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν αύξηση των δυο εκκολαπτικών χαρακτηριστικών ανεξαρτήτως συγκέντρωσης χλωρίου και του υπό εξέταση χρόνου εκκόλαψης. Την 24^η ώρα παρατηρήθηκε αύξηση 1,1 % - 9,1 % για την εκκολαψιμότητα και 9,3 % - 13,1 % για το ποσοστό εκκόλαψης γεμάτων κύστεων.

Το ποσοστό εκκόλαψης γεμάτων κύστεων δίνει τη δυνατότητα εφαρμογής και άλλων τεχνικών με στόχο τη βελτίωση της εκκολαπτικής ικανότητας δεδομένου ό,τι το ποσοστό των σών γεμάτων κύστεων που παραμένουν και δεν εκκολάπτονται αγγίζει το 10 %.

Τα καλύτερα αποτελέσματα εκκόλαψης έδωσαν οι χαμηλές συγκεντρώσεις 0,25 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης για την 22^η ώρα εκκόλαψης και 0,5 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης για την 24^η ώρα, εκ των οποίων η πρώτη προτιμάται για πρακτικούς και οικονομικούς λόγους.

Το δεύτερο μέρος της εργασίας, αφορά την μελέτη επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων εκκόλαψης στη διαμόρφωση της εκκολαψιμότητας και του ποσοστού εκκόλαψης την 24^η ώρα.

Προς αυτό μελετήθηκαν η θερμοκρασία, η αλατότητα και ο φωτισμός, εκ των οποίων βγήκαν τα κάτωθι συμπεράσματα :

I. Οι μεγαλύτερες τιμές εκκολαψιμότητας και ποσοστού εκκόλαψης παρατηρήθηκαν σε αλατότητα 5 psu με 253.365 και 90,82 % αντίστοιχα. Παρόλα αυτά προτιμάται το θαλασσινό νερό για πρακτικούς και οικονομικούς λόγους.

II. Οι μεγαλύτερες τιμές εκκολαψιμότητας και ποσοστού εκκόλαψης παρατηρήθηκαν σε θερμοκρασία $26,5 \pm 1$ °C με 226085 και 81,17 % αντίστοιχα.

III. Η έλλειψη φωτισμού δεν επηρέασε σημαντικά την εκκόλαυσιμότητα και το ποσοστό εκκόλαυσης, γεγονός που μας αποδεικνύει ότι οι κύστεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πρώτον, κύστεις οι οποίες είχαν την ικανότητα αποθήκευσης ενέργεια από φωτισμό και δεύτερον ότι είχαν εκτεθεί σε φως.

Σύμφωνα με τα ανωτέρω, μπορούμε να θεωρήσουμε ως ιδανικές συνθήκες εκκόλαυσης της *Artemia franciscana* της Great Salt Lake της Utah των Η.Π.Α τις εξής:

1. Στη τεχνητή αποκελύφωση, τη συγκέντρωση 0,25 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης κατά την οποία η μέγιστη απόδοση παρατηρείται την 22^η ώρα από την έναρξη της ενυδάτωσης.

2. Ως βέλτιστες φυσικοχημικές συνθήκες επώασης: αλατότητα 5 psu (συνιστάται όμως το θαλασσινό νερό), θερμοκρασία $26,5 \pm 1$ °C και την παρουσία τεχνητού φωτισμού 1000 lux).

Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, οι υπόλοιπες φυσικοχημικές παράμετροι του νερού εκκόλαυσης των κύστεων ήταν σταθερές και συγκεκριμένα, η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου παρέμενε στα $7,2 \pm 0,5$ mg / ℓ και του pH $8 \pm 0,5$.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αμπατζόπουλος Θ. (1988) Μελέτη πληθυσμών *Artemia* της Βόρειας Ελλάδας. Διδακτορική διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.
- Καραβίδα Π., Καραμανλίδου Χ., Κολιάς Σ., και Τουράκη Μ. (2005) Βιοενσωμάτωση του *Bacillus subtilis* σε ναυπλίους *Artemia*. Ο ρόλος της ενάντια στη δονακίωση που προκαλεί το *Vibrio anguillarum*. Πρακτικά 12^{ου} Συνεδρίου Ιχθυολόγων. Δράμα 13-16 Οκτωβρίου.
- Καστρίτση-Καθάριου Ι., Μακράκος Π., και Μωραΐτη Μ. (1998). *Artemia*: Ζωντανή τροφή ιχθυδίων στα εκκολαπτήρια. Διατροφή και ασθένειες ιχθύων εκτροφής. Νομοθεσία. Υπουργείο Γεωργίας. Γενική διεύθυνση αλιευτικών εφαρμογών και εισροών αλιευτικής παραγωγής, Αθήνα.
- Κοζιώτης Μ., Καραμανλίδου Χ., και Τουράκη Μ. (2005) ορήγηση *Lactococcus lactis* σε ιχθύδια λαβρακιού μέσω βιοενσωμάτωσης σε ναυπλίους *Artemia* με σκοπό την προστασία έναντι της δονακίωσης (*Vibrio anguillarum*). Πρακτικά 12^{ου} Συνεδρίου Ιχθυολόγων, Δράμα 13-16 Οκτωβρίου.
- Μουρελάτος Σ., Τουράκι Μ., Σαββίδης Γ., Σουλούνιας Γ., και Καστρίτσης Κ. (1999) Πειραματική δοκιμή βιοεγκύστωσης αντιμικροβιακού παράγοντα για τη θεραπεία βακτηριακής αιτιολογίας νοσημάτων σε ιχθύδια Λαυρακιού (*Dicentrarchus labrax*), Εκτίμηση διαφόρων θεραπευτικών σχημάτων. Δελτίο της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας **50** (2), 116-126
- Abatzopoulos T., Kastritsis, C. and Triantaphyllidis, C. (1986) A study of karyotypes and heterochromatic associations in *Artemia*, with special reference to two N. Greek populations. Genetica **71**, 3-10.

- Abatzopoulos T., Kastritsis, C. and Triantaphyllidis, C. (1987) Preliminary studies on some *Artemia* populations from Northern Greece. In: Artemia Research and its Applications, vol. 1. Morphology, Genetics, Strain characterization, Toxicology.
- Abatzopoulos T., Kastritsis, C. and Triantaphyllidis, C. (1993) Genetic polymorphisms in two parthenogenetic *Artemia* populations from Northern Greece, Hydrobiologia **250**, 73-80.
- Abatzopoulos T., Triantaphyllidis, G., Beardmore, J., and Sorgeloos, P. (1997) Cyst membrane protein composition as discriminant character in genus *Artemia*. (International study on *Artemia* L V), 1. Marine Biology Ass. U.K **77**, 265-268.
- Abatzopoulos T., Zhang, B. and Sorgeloos, P. (1998) *Artemia tibetiana*: preliminary characterization of a new *Artemia* species found in Tibet (People's Republic of China). International Study on *Artemia*. LIX. International journal of Salt Lake Research **7** : 41-44.
- Abatzopoulos T.J., Baxevanis, A.D., Triantaphyllidis, G.V., Criel, G.R.J., Pador, E.L., Van Stappen, G. and Sorgeloos, P. (2006) Quality evaluation of *Artemia urmiana* Gunther (Urmia Lake, Iran) with special emphasis on its particular cyst characteristics. International Study on *Artemia*. LXIX, Aquaculture, in press.
- Abreu-Grobois F. A. and Beardmore, J. (1980) International study on *Artemia*. II. Genetic characterization of *Artemia* populations - an electrophoretic approach, In: The brine shrimp Artemia, vol. 1. Morphology, Genetics, Radiology, Toxicology. Persoone G., Sorgeloos, P., Roels, O. and Jaspers E. (Eds.), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 133-153.
- Abreu-Grobois A. (1987) A review of the genetics of *Artemia*. In: Artemia Research and its

- Applications, vol. 1. Morphology, Genetics, Strain characterization, Toxicology, P. Sorgeloos, D. Bengtson, W. Decler, and E. Jaspers (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 61-99.
- Amat D.F. (1980) Differentiation in *Artemia* strains from Spain. LII : The brine shrimp *Artemia*. vol. 1. Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. and Jaspers E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 19-39.
- Amat F., Hontoria, F. and Navarro, J. (1987) International Study of *Artemia*, XLiv. Preliminary nutritional evaluation of different *Artemia* nauplii as food for marine fish and prawn larvae. III: *Artemia Research and its Applications*, vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. P. Sorgeloos, D. Bengtson, W. Decler, and E. Jaspers (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 425-436.
- Baghel S.B., Lakra S.W. and Satyanarayana Rao P. G. (2004) Altered sex ratio in giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) using hormone bioencapsulated live *Artemia* feed. *Aquaculture Research* **35** : 943.
- Barlow D.I. and Sleigh, M.A. (1980) The propulsion and use of water currents for swimming and feeding in larval and adult *Artemia*. In: The brine shrimp *Artemia*, vol. 1. Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. Persoone, O., Sorgeloos, P., Roels, O. and Jaspers E. (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 1-345.
- Bengtson A. D., Leger, P. and Sorgeloos, P (1991) Use of *Artemia* as a food for aquaculture. In *Artemia* Biology. Browne, A.R, Sorgeloos, P. and Trotman, N.A.C. CRC press, Boca Raton, Florida, pp.343.
- Browne R.A., Sallee, S.E., Grosch, D.S., Segreti, W.O and Purser, S.M. (1984)

- Partitioning genetic and environmental components of reproduction and lifespan in *Artemia*. Ecology **65** : 949-960.
- Browne R.A. and Spencer, M.H. (1987) Intrapopulation differences in life history traits of obligately parthenogenetic clones of the brine shrimp *Artemia*. In: Artemia research and its applications, vol. 3. Sorgeloos P., Bengtson, D., Declair, W. and Jaspers, E. (Eds.). Universa Press, Wetteren, Belgium., pp. 115-123.
- Cai Y. (1989) A redescription of the brine shrimp (*Artemia sinica*). Wasmann journal of Biology **47** : 105-110
- Garcia-Ortega, A., Verreth, J.A.J, Coutteau, P., Segner, H., Huisman, E.A. and Sorgeloos (1998) Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. Aquaculture **161** : 501-514
- Carpelan L.H. (1957) Hydrobiology of the Alviso salt ponds. Ecology **38** : 375-390.
- Clegg J.S. (1964) The control of emergence and metabolism by external osmotic pressure and role of free glycerol in developing of *Artemia salina*. Journal of Experimental Biology **41** : 879-892.
- Clegg J.S. (1965) The origin of trehalose and its significance during the formation of encysted dormant embryos of *Artemia salina*. Comparative Biochemistry and Physiology A **14** : 135-308
- Clegg J.S. (1974) Interrelationships between water and metabolism in *Artemia salina* cysts: hydration-dehydration from the liquid and vapour phases. Journal of Experimental Biology **61** : 291-308
- Clegg J.S. (2001) Cryptobiosis – a peculiar state of biological organization. Comparative

Biochemistry and Physiology B **128** : 613-624

- Clegg J.S. and Conte, F.P. (1980) A review of the cellular and developmental biology of *Artemia*. In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. and Jaspers, E. (eds.), *The Brine Shrimp Artemia*, vol. 2. Universa Press, Wetteren, Belgium. pp 11-54.
- Clegg J.S., Willsie, J.K. and Jackson, S.A. (1999) Adaptive significance of a small heat shock/a-crystallin protein (p26) in encysted embryos of the brine shrimp, *Artemia franciscana*. American Zoologist **39** : 836-847.
- Clegg J.S. and Trotman, C.N.A. (2002) Physiological and biochemical aspects of *Artemia* ecology. In: Abatzopoulos, T.J., Beardmore, J.A., Clegg, J.S., Sorgeloos, P. (eds.), *Artemia: Basic and Applied Biology. Biology of Aquatic Organisms*, vol.1. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, pp. 129-170
- Cole G.A. and Brown, R.J. (1967) The chemistry of *Artemia* habitats. Ecology **48** : 858-861.
- Crowe J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F. and Wistrom, C.A. (1987) Stabilisation of phospholipid bilayers and proteins by sugars. Biochemistry **1. 242** : 1-10.
- Crowe J.H., and Clegg, J.S. (1973) *Anhydrobiosis*. Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg, Pennsylvania.
- D' Agostino A. (1980) The vital requirements of *Artemia* : Physiology and nutrition. In: The brine shrimp Artemia, vol. 2. Physiology, Biochemistry, Molecular Biology, Persoone G., Sorgeloos, P., Roels, O. and Jaspers E. (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 55-82.
- Davis J.S (1980) Experiences with *Artemia* at solar saltworks. In: The brine shrimp Artemia, vol. 3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture, Persoone G., Sorgeloos, P.,

- Roels, O. and Jaspers, E. (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp.51-55.
- Dhont J. and Sorgeloos, P. (2002). Applications of *Artemia*. In: Abatzopoulos, T.J., Beardmore, J.A., Clegg, J.S., Sorgeloos, P. (Eds.), *Artemia: Basic and Applied Biology*. Biology of Aquatic Organisms, vol. 1. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, pp. 251-277
- Dobbeleir J., Adam, N., Bossuyt, E., Bruggeman, E. and Sorgeloos, P. (1980) New aspects of the use of inert diets for high density culturing of brine shrimp. In: The brine shrimp *Artemia*, vol. 3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture, Persoone G., Sorgeloos, P., Roels, O. and Jaspers, E. (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 165-174
- Drinkwater E.L and Clegg S.J. (1991) Experimental biology of cyst diapause. In *Artemia* Biology. Browne, A.R, Sorgeloos, P. and Trotman, N.A.C. CRC press, Boca Raton, Florida, pp. 343.
- Fabregas J., Patifio, M., Vecino, E., Chazaro, F. and Otero, A. (1995) Productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. Applied Microbiological Biotechnology **43** : 617-621.
- Finamore, F.J and Clegg, J.S (1969) Biochemical aspects of morphogenesis in the brine shrimp, *Artemia salina*, in Padilla. G.M., Whitson, G.L. and Cameron, I.L. (eds.), *The Cell Cycle, Gene-Enzyme Interactions*. Academic Press, New York, pp. 249-278.
- Gelabert F., (2003) Bioencapsulation in *Artemia*: II. Influences of the article concentration in the enrichment process. Aquaculture **216** (1-4) :143–153.

- Gomez-Gil B., Herrera-Vega M., Abreu-Grobois A., and Roque A. (1998) Bioencapsulation of Two Different *Vibrio* Species in Nauplii of the Brine Shrimp (*Artemia franciscana*). Applied and Environmental Microbiology **64** (6) : 2318-2322
- Gunther, R.T. (1899) Contributions to the geography of lake Urmi and its neighbourhood. Geographical Journal **14** : 504-523
- Han K., Geurden, I., Sorgeloos P. (2000) Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of *n*-3 highly unsaturated fatty acids. Aquaculture **183** : 335-347.
- Kellogg V.A. (1906) A new *Artemia* and its life conditions. Science **24** : 594-596
- Kolkovski, Czesny, Yackey, Moreau, Cihla, Mahan and Dabrowski (2000) The effect of vitamins C and E in (n-3) highly unsaturated fatty acids-enriched *Artemia* nauplii on growth, survival, and stress resistance of fresh water walleye *Stizostedion vitreum* larvae. Aquaculture Nutrition **6** (3) : 199.
- Lavens P., and Sorgeloos P. (1987) The cryptobiotic state of *Artemia* cyst, its diapause deactivation and hatching: a review. In: Artemia research and its applications, vol. 3. Sorgeloos P., Bengtson, D., Declair, W. and Jaspers, E. (Eds.), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 27-63.
- Lavens P. and Sorgeloos, P. (1991) Production of *Artemia* in culture tanks. In *Artemia Biology*. Browne, A.R, Sorgeloos, P. and Trotman, N.A.C. CRC press, Boca Raton, Florida, pp.343.
- Lavens P. and Sorgeloos, P. (1996) Manual on the production and use of live food for aquaculture. Laboratory of Aquaculture and *Artemia* Reference center, Belgium, pp.

380.

- Lavens P. and Sorgeloos P. (2000) The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture* **181** : 397-403.
- Leger P., Vanhaecke P., and Sorgeloos P. (1983) International Study on *Artemia** XXIV. Cold storage of live *Artemia* nauplii from various geographical sources: Potentials and limits in aquaculture. *Aquacultural Engineering* **2** : 69-78
- Leger P., Bengston D., Simpson K., and Sorgeloos P. (1986) The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **24** : 521-623
- Lenz P., (1987) Ecological studies on *Artemia*. In : *Artemia Research and its Applications*, vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. P. Sorgeloos, D. Bengtson, W. Declair, and E. Jaspers (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 5-18.
- Lenz P. and Dana, G. (1987) Life-cycle studies of *Artemia* : a comparison between a subtropical and a temperate population. In: *Artemia Research and its Applications*, vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture, Sorgeloos, P. Bengtson, D., Declair, W. and Jaspers E. (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 89-100.
- Lenz H.P. and Browne, A.R. (1991) Ecology of *Artemia*. In *Artemia Biology*. Browne, A.R, Sorgeloos, P. and Trotman, N.A.C. CRC press, Boca Raton, Florida, pp.343.
- Lim, L.C, Cho, Y.L., Dhert, P., Wong, C.C., Nelis, H. and Sorgeloos, P. (2002) Use of decapsulated *Artemia* cysts in ornamental fish culture. *Aquaculture Research* **33** : 575-589
- Lim, L.C., Dhert, P. and Sorgeloos, P. (2003) Recent developments in the application of live feeds in the freshwater ornamental fish culture. *Aquaculture* **227** : 319-331.
- MacDonald G.H. (1980) The use of *Artemia* cysts as food by the flamingo (*phoenicopterus*

- rubber roseus*) and the shelduck (*Tadorna tadorna*). In: The brine shrimp *Artemia*, vol. 3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture, Sorgeloos P., Roels, O. and Jaspers E. (Eds.), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 97-104.
- McLennan A.G. and Miller, D. (1990) A biological role for the heat shock response in Crustacean. J. Therm. Biol. pp. 61-66.
- Morris J.E. and Afzelius, B.A. (1967) The structure of the shell and outer membranes in encysted *Artemia salina* embryos during cryptobiosis and development. J. Ultrastructure Research **20** : 244-259.
- Nakanishi, Y.H., Okigaki, T., Kato, H. and Iwasaki, T. (1962) Cytological studies of *Artemia salina*, I. Embryonic development without cell multiplication after the blastula stage in encysted dry eggs. Annotationes Zoologicae Japonenses **35**: 223-228.
- Nimura Y. (1980) Retarded growth of *Artemia salina* by overfeeding. Nippon Suisan Gakkaishi, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish **46** : 681-687.
- Nimura Y. (1987) A probable reason why *Artemia* is confined to isolated saline waters. In: Artemia Research and its Applications, vol. 3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture, Sorgeloos P., Bengtson, D., Decler, W. and Jaspers E. (Eds.), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 77-87.
- Olson, C.S. and Cleggs, J.S. (1976) Nuclear numbers in encysted dormant embryos of different *Artemia salina* populations. Experientia **32** : 864-865
- Patra K. S., and Mohamed, S.K. (2003) Enrichment of *Artemia* nauplii with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. Aquaculture International **11** : 505–514

- Persoone G. and P. Sorgeloos (1980) General aspects of the ecology and biogeography of *Artemia*. In: The brine shrimp *Artemia*, vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Persoone O., Sorgeloos, P., Roels, O. and Jaspers, E. (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 3-24
- Piccinelli, M and Prosdocimi, T. (1968) Descrizione tassonomica delle due species *Artemia salina* L. e *Artemia persimillis* n. sp. Insytuto Lombardo, Accademia di Science e Lettere, Rendiconti B **102** : 170-179.
- Pila, E.J.S and Beardmore, J.A. (1994) Genetic and morphometric differentiation in Old World bisexual species of the brine shrimp *Artemia*. Heredity **73** : 47-56
- Reeve M. (1963) Growth efficiency in *Artemia* under laboratory conditions, Biology Bull **125** : 133-145.
- Schrehardt A. (1987a) Ultrastructural investigations of the filter-feeding apparatus and the alimentary canal of *Artemia*. In : *Artemia* research and its applications, vol. 1. Sorgeloos, P., Bengtson, D., Decler, W. and Jaspers E. (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgiun, pp. 3-51.
- Schrehardt A. (1987b) A scanning electron - microscope study of the post embryonic development of *Artemia*. In: *Artemia* research and its applicaions, vol. 1. Sorgeloos P., Bengtson, D., Decler, W. and Jaspers E. (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgiun, pp.5-31.
- Slegers H. (1991) Enzyme activities through development: a synthesis of the activity and control of the various enzymes as the embryo matures. In *Artemia* Biology. Browne, A.R, Sorgeloos, P. and Trotman, N.A.C. CRC press, Boca Raton, Florida, pp.343.
- Sorgeloos P., Bossuyt, E., Lanvina, E., Baeza-Mesa, M. and Persoone, G. (1977)

- Decapsulation of *Artemia* cysts: A simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture. *Aquaculture* **12** : 311-315
- Sorgeloos P. (1980) The use of the brine shrimp *Artemia* in Aquaculture. In: The brine shrimp *Artemia*, vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture, Persoone G., Sorgeloos, P., Roels, O. and Jaspers, E. (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 2546
- Sorgeloos P., Lavens, P., Ieger, P., Tackaert, W. and Versichele, D. (1986) Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. Laboratory of Mariculture, State University of Ghent, Belgium, pp. 299-390.
- Sorgeloos P., Dhert, P. and Candreva, P. (2001) Use of the brine shrimp *Artemia sp.*, in marine fish larviculture. *Aquaculture* **200** : 147-159.
- Spotte S. and Anderson G. (1989) Chemical decapsulation of *Artemia franciscana* resting cysts does not necessarily produce more nauplii. *Journal of the world aquaculture society* **20** (2) :127-133.
- Stewart A.B., Spicer, A.V., Inskeep, E.K. and Dailey, R.A. (2001) Short communication: Steroid hormone enrichment of *Artemia* nauplii. *Aquaculture* **202** : 177-181
- Tackaert W. and Sorgeloos, P. (1991) Salt, *Artemia* and Shrimp. *World Aquaculture* **22** (3): 11-17.
- Tonheim K. S., Koven W., Rønnestad I. (2000) Enrichment of *Artemia* with free methionine. *Aquaculture* **190** : 223-235.
- Touraki M., Mourelatos S., Karamanlidou G., Kalaitzopoulou S., and Kastritsis C. (1996) Bioencapsulation of chemotherapeutics in *Artemia* as a means of prevention and

- treatment of infectious diseases of marine fish fry. *Aquacultural Engineering* **15** (2) : 133-147.
- Touraki M., Niopas I., and Kastritsis C. (1999) Bioaccumulation of trimethoprim, sulfamethoxazole and *N*-acetyl-sulfamethoxazole in *Artemia* nauplii and residual kinetics in seabass larvae after repeated oral dosing of medicated nauplii. *Aquaculture* **175** : 15-30.
- Tobias W. J., Sorgeloos, P., Bossuyt, E. and Roels, O. (1979) The technical feasibility of mass culturing *Artemia* in the St Croix 'Artificial Upwelling' Mariculture System. In: *Proc. 10th Ann. Meeting World Mariculture Society*, Ed, Avault, J.W, Louisiana, State University, Baton Rouge, IA, USA pp. 203-214.
- Treece D.G. (2000) *Artemia* Production for Marine Larval Fish Culture. SRAC Publication No. 702, www.org/publicat/usda_rac/efs/srac/702fs.pdf
- Triantaphyllidis G., Abatzopoulos, T. and Sorgeloos, P. (1997a) Review of the Biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *Journal Biogeography* (in press).
- Triantaphyllidis G., Abatzopoulos, T. and Sorgeloos, P. (1998) Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *Journal Biogeography* **25** : 213-226.
- Trotman N.A.C. (1991) Normality and abnormality in early development. In *Artemia* Biology. Browne, A.R, Sorgeloos, P. and Trotman, N.A.C. CRC press, Boca Raton, Florida, pp.343.
- Van Der Linden. A., Blust, R and Declair, W. (1985) The influence of light on the hatching of *Artemia* cysts (Anostraca: Branchiopoda: Crustacea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **92** : 207-214.

- Vanhaecke P. and Sorgeloos, P. (1980) International Study of *Artemia*. In: The biometrics of *Artemia* strains from different geographical origin. In : The brine shrimp *Artemia*. vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Persoone G., Sorgeloos, P., Roels, O. and Jaspers E (Eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 393-405.
- Vanhaecke P., Cooreman, A. and Sorgeloos, P. (1981) International Study on *Artemia* XV. Effects of light intensity on hatching rate of *Artemia* cysts from different geographical origin. Marine Ecology- Progress Series **5** : 111-114.
- Vanhaecke P. and Sorgeloos, P. (1982) International Study of *Artemia*. The hatching rate of *Artemia* cysts - a comparative study. Aquaculture Engineering **1** : 263-273.
- Vanhaecke P., Tackaert, W and Sorgeloos, P. (1987) The biogeography of *Artemia* : an updated review. In : *Artemia* Research and its Applications. vol. 1. Morphology, Genetics, Strain characterization, Toxicology. Sorgeloos P., Bengtson, D., Decler, W. and Jaspers E. (Eds), Universa press, Wetteren, Belgium, pp. 129-155.
- Van Stappen, G (2002). Zoogeography. In: Abatzopoulos, T. J., Beardmore, J. A., Clegg, J. S., Sorgeloos, P.(Eds.), *Artemia: Basic and Applied Biology*. Biology of Aquatic Organisms, vol. 1. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, pp. 171-224.
- Verpraet, R., Chair, M., Leger, P., Nelis, H., Sorgeloos, P., and De Leenheer, A. (1992) Live-food mediated drug delivery as a tool for disease treatment in larviculture. The enrichment of therapeutics in rotifers and *Artemia* nauplii. Aquacultural Engineering **11** : 133-139.
- Watanabe T., Kitajima, C. and Fujita, S. (1983) Nutritional values of live organism used in Japan for mass propagation of fish: a review. Aquaculture **34** :115-143.

www.google.com

7. ABSTACT

Since the end of the 70's, when the development of aquaculture began to expand worldwide, the demand for *Artemia* cysts increased gradually from a few metric tons to approximately 2.200 metric tons.

During the last 25 years the Great Salt lake of Utah (GSL) has become the central *Artemia* cysts supplier in the international aquaculture market. *Artemia franciscana* has significant advantages over to other species, which makes it highly sought after (Lavens and Sorgeloos, 2000). The excellent quality of *Artemia franciscana* (GSL) has lead to my choice of this strain, as the most appropriate for the study of **decapsulation or dechlorination** conditions and the conditions regarding hatching.

The improvement technique used in this work is the **decapsulation procedure**, through which the extraction of the shell is facilitated. This is a widely applied technique in hatcheries with many advantages (Sorgeloos *et al.*, 2001). The greater part of this current essay was focused on efficient effect of this technique on hatching.

For the needs of the Technical Decapsulation experiment a decapsulated solution was used in concentrations from 0,25 g to 1,75 g Cl per 14 ml solution.

During the use of the referred concentrations, the hatching characteristics: **Hatching Efficiency** and **Hatching Percentage**, were examined in relation to the time of hatching (14th -24th hours).

In conclusion, the following observations have been made:

- ▲ both the hatching efficiency and the hatching percentage increase regardless the concentration of chlorine in the solution and the time of hatching being studied.

- ✦ hatching efficiency for each concentration depends on the time the cysts remain in the decapsulated solution. It is observed that the decapsulated time is inversely proportional to the concentration of the chlorine – the more the concentration of chlorine increases, the more the decapsulated time is reduced.
- ✦ under ideal time conditions, the extraction of the cysts from the decapsulated solution is possible not to undergo any change in the hatching procedure, regardless of the density of the decapsulated solution in the chlorine.
- ✦ the greatest hatching efficiency observed at the lowest chlorine concentrations (0,25-0,75g Cl/14 ml decapsulated solution). The concentration 0,25 g Cl/14 ml of the decapsulated solution, the 22nd hour is preferred over the rest for practical and economic reasons.

The second part of this work regards the study of affect of **physiochemical factors** on hatching in the formation of the **Hatching Efficiency** and the **Hatching percentage** during the 24th hour. For the above the temperature, the salinity and the lighting have been examined.

Salinity. The greatest hatching efficiency and hatching percentage have been observed in 5 psu salinity conditions with 253.365 and 90,82 % respectively. In higher salinity rates more time is needed (composition of glycerol) from the cysts to hatch. Regardless that the 5 psu salinity rate offers better hatching results than even the sea water (39-40 psu), but the sea water is still preferred for practical and economic reasons.

Temperature. The greatest hatching efficiency and hatching percentage were observed at temperatures $26,5 \pm 1$ °C with 226.085 and 81,17 % respectively. Below such degrees of temperature there is a delay in hatching due to slow metabolism, while at higher

temperatures above 28 °C there is a proportionate increase of the destruction of the encysted embryo and therefore the inversely proportionate hatching percentage.

Lighting. The lack of light had no significant affect on the hatching procedure or on the hatching percentage which proves that the cysts used were firstly, cysts that had the capacity to store energy from light and secondly, that they were exposed to light. It is suggested that the dried cysts remain in a dark place since their repeated and continuous exposure to light activates the metabolism mechanisms with unexpected results. Keeping the cysts in dark conditions, the presence of light during hatching has to be considered necessary.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ
ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ
ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Πίνακας 1. Στατιστικά στοιχεία του ποσοστού εκκόλαξης κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) για διάφορες συγκεντρώσεις χλωρίου τη χρονική περίοδο μεταξύ της 14^{ης} και της 24^{ης} ώρας από την έναρξη της ενυδάτωσης.

	N	Mean	Std. Error	Std. Deviation
0 gr Cl / 14hrs	48	61,46	1,63	11,310
0 gr Cl / 16hrs	48	64,35	1,64	11,341
0 gr Cl / 18hrs	48	73,22	1,77	12,246
0 gr Cl / 20hrs	48	77,91	2,50	17,350
0 gr Cl / 22hrs	48	80,33	2,34	16,222
0 gr Cl / 24hrs	48	80,47	2,42	16,752
0,25 gr Cl / 14hrs	48	67,42	1,39	9,650
0,25 gr Cl / 16hrs	48	70,58	1,90	13,140
0,25 gr Cl / 18hrs	48	79,83	1,84	12,780
0,25 gr Cl / 20hrs	48	83,25	2,46	17,076
0,25 gr Cl / 22hrs	48	88,86	2,16	14,944
0,25 gr Cl / 24hrs	48	89,78	1,93	13,403
0,5 gr Cl / 14hrs	48	69,80	1,65	11,463
0,5 gr Cl / 16hrs	48	75,84	1,83	12,678
0,5 gr Cl / 18hrs	48	81,13	2,12	14,696
0,5 gr Cl / 20hrs	48	85,13	1,77	12,275
0,5 gr Cl / 22hrs	48	89,41	2,46	17,042
0,5 gr Cl / 24hrs	48	89,94	1,99	13,780
0,75 gr Cl / 14hrs	48	75,02	1,84	12,778
0,75 gr Cl / 16hrs	48	78,98	2,83	19,638
0,75 gr Cl / 18hrs	48	84,70	2,35	16,272
0,75 gr Cl / 20hrs	48	87,21	1,54	10,636
0,75 gr Cl / 22hrs	48	89,77	2,49	17,226
0,75 gr Cl / 24hrs	48	90,84	2,22	15,415
1,0 gr Cl / 14hrs	48	80,12	2,31	15,989
1,0 gr Cl / 16hrs	48	83,71	2,13	14,754
1,0 gr Cl / 18hrs	48	85,73	2,03	14,087
1,0 gr Cl / 20hrs	48	88,79	2,03	14,033
1,0 gr Cl / 22hrs	48	89,78	2,44	16,931
1,0 gr Cl / 24hrs	48	90,45	1,83	12,671
1,25 gr Cl / 14hrs	48	82,87	1,93	13,380
1,25 gr Cl / 16hrs	48	88,03	2,45	17,005
1,25 gr Cl / 18hrs	48	90,43	1,98	13,748
1,25 gr Cl / 20hrs	48	90,28	2,08	14,432
1,25 gr Cl / 22hrs	48	92,00	1,80	12,499
1,25 gr Cl / 24hrs	48	92,66	2,39	16,573
1,5 gr Cl / 14hrs	48	87,87	2,31	16,023
1,5 gr Cl / 16hrs	48	91,12	2,34	16,245
1,5 gr Cl / 18hrs	48	93,12	2,30	15,931
1,5 gr Cl / 20hrs	48	93,44	2,34	16,214
1,5 gr Cl / 22hrs	48	93,41	2,44	16,910
1,5 gr Cl / 24hrs	48	93,57	2,17	15,032
1,75 gr Cl / 14hrs	48	89,55	1,90	13,162
1,75 gr Cl / 16hrs	48	90,82	2,89	20,012
1,75 gr Cl / 18hrs	48	91,59	2,26	15,684
1,75 gr Cl / 20hrs	48	92,18	2,27	15,758
1,75 gr Cl / 22hrs	48	92,67	2,39	16,587
1,75 gr Cl / 24hrs	48	92,93	2,78	19,261

Πίνακας 2. Αποτελέσματα της δοκιμασίας Paired Samples t test ($p < 0,05$) για το ποσοστό εκκόλαξης μεταξύ του μάρτυρα και των συγκεντρώσεων χλωρίου (0,25 -1,75 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης) για τους παρακάτω χρόνους εκκόλαξης.

		Sig. (2-tailed)
Pair 1	0 gr Cl / 14hrs - 0,25 gr Cl / 14hrs	,003
Pair 2	0 gr Cl / 14hrs - 0,5 gr Cl / 14hrs	,000
Pair 3	0 gr Cl / 14hrs - 0,75 gr Cl / 14hrs	,000
Pair 4	0 gr Cl / 14hrs - 1,0 gr Cl / 14hrs	,000
Pair 5	0 gr Cl / 14hrs - 1,25 gr Cl / 14hrs	,000
Pair 6	0 gr Cl / 14hrs - 1,5 gr Cl / 14hrs	,000
Pair 7	0 gr Cl / 14hrs - 1,75 gr Cl / 14hrs	,000
Pair 8	0 gr Cl / 16hrs - 0,25 gr Cl / 16hrs	,006
Pair 9	0 gr Cl / 16hrs - 0,5 gr Cl / 16hrs	,000
Pair 10	0 gr Cl / 16hrs - 0,75 gr Cl / 16hrs	,000
Pair 11	0 gr Cl / 16hrs - 1,0 gr Cl / 16hrs	,000
Pair 12	0 gr Cl / 16hrs - 1,25 gr Cl / 16hrs	,000
Pair 13	0 gr Cl / 16hrs - 1,5 gr Cl / 16hrs	,000
Pair 14	0 gr Cl / 16hrs - 1,75 gr Cl / 16hrs	,000
Pair 15	0 gr Cl / 18hrs - 0,25 gr Cl / 18hrs	,002
Pair 16	0 gr Cl / 18hrs - 0,5 gr Cl / 18hrs	,002
Pair 17	0 gr Cl / 18hrs - 0,75 gr Cl / 18hrs	,000
Pair 18	0 gr Cl / 18hrs - 1,0 gr Cl / 18hrs	,000
Pair 19	0 gr Cl / 18hrs - 1,25 gr Cl / 18hrs	,000
Pair 20	0 gr Cl / 18hrs - 1,5 gr Cl / 18hrs	,000
Pair 21	0 gr Cl / 18hrs - 1,75 gr Cl / 18hrs	,000
Pair 22	0 gr Cl / 20hrs - 0,25 gr Cl / 20hrs	,110
Pair 23	0 gr Cl / 20hrs - 0,5 gr Cl / 20hrs	,012
Pair 24	0 gr Cl / 20hrs - 0,75 gr Cl / 20hrs	,001
Pair 25	0 gr Cl / 20hrs - 1,0 gr Cl / 20hrs	,001
Pair 26	0 gr Cl / 20hrs - 1,25 gr Cl / 20hrs	,000
Pair 27	0 gr Cl / 20hrs - 1,5 gr Cl / 20hrs	,000
Pair 28	0 gr Cl / 20hrs - 1,75 gr Cl / 20hrs	,000
Pair 29	0 gr Cl / 22hrs - 0,25 gr Cl / 22hrs	,002
Pair 30	0 gr Cl / 22hrs - 0,5 gr Cl / 22hrs	,010
Pair 31	0 gr Cl / 22hrs - 0,75 gr Cl / 22hrs	,005
Pair 32	0 gr Cl / 22hrs - 1,0 gr Cl / 22hrs	,003
Pair 33	0 gr Cl / 22hrs - 1,25 gr Cl / 22hrs	,000
Pair 34	0 gr Cl / 22hrs - 1,5 gr Cl / 22hrs	,000
Pair 35	0 gr Cl / 22hrs - 1,75 gr Cl / 22hrs	,000
Pair 36	0 gr Cl / 24hrs - 0,25 gr Cl / 24hrs	,000
Pair 37	0 gr Cl / 24hrs - 0,5 gr Cl / 24hrs	,002
Pair 38	0 gr Cl / 24hrs - 0,75 gr Cl / 24hrs	,001
Pair 39	0 gr Cl / 24hrs - 1,0 gr Cl / 24hrs	,000
Pair 40	0 gr Cl / 24hrs - 1,25 gr Cl / 24hrs	,000
Pair 41	0 gr Cl / 24hrs - 1,5 gr Cl / 24hrs	,000
Pair 42	0 gr Cl / 24hrs - 1,75 gr Cl / 24hrs	,000

Πίνακας 3. Αποτελέσματα της δοκιμασίας Paired Samples t test ($p < 0,05$) για το ποσοστό εκκόλαψης μεταξύ της μέγιστης τιμής και των τιμών των υπόλοιπων συγκεντρώσεων χλωρίου για κάθε χρόνο εκκόλαψης.

		Sig. (2-tailed)
Pair 1	0,25 gr Cl / 14hrs - 1,75 gr Cl / 14hrs	,000
Pair 2	0,5 gr Cl / 14hrs - 1,75 gr Cl / 14hrs	,000
Pair 3	0,75 gr Cl / 14hrs - 1,75 gr Cl / 14hrs	,000
Pair 4	1,0 gr Cl / 14hrs - 1,75 gr Cl / 14hrs	,000
Pair 5	1,25 gr Cl / 14hrs - 1,75 gr Cl / 14hrs	,003
Pair 6	1,5 gr Cl / 14hrs - 1,75 gr Cl / 14hrs	,454
Pair 7	0,25 gr Cl / 16hrs - 1,5 gr Cl / 16hrs	,000
Pair 8	0,5 gr Cl / 16hrs - 1,5 gr Cl / 16hrs	,000
Pair 9	0,75 gr Cl / 16hrs - 1,5 gr Cl / 16hrs	,001
Pair 10	1,0 gr Cl / 16hrs - 1,5 gr Cl / 16hrs	,007
Pair 11	1,25 gr Cl / 16hrs - 1,5 gr Cl / 16hrs	,253
Pair 12	1,5 gr Cl / 16hrs - 1,75 gr Cl / 16hrs	,926
Pair 13	0,25 gr Cl / 18hrs - 1,5 gr Cl / 18hrs	,000
Pair 14	0,5 gr Cl / 18hrs - 1,5 gr Cl / 18hrs	,000
Pair 15	0,75 gr Cl / 18hrs - 1,5 gr Cl / 18hrs	,000
Pair 16	1,0 gr Cl / 18hrs - 1,5 gr Cl / 18hrs	,005
Pair 17	1,25 gr Cl / 18hrs - 1,5 gr Cl / 18hrs	,288
Pair 18	1,5 gr Cl / 18hrs - 1,75 gr Cl / 18hrs	,576
Pair 19	0,25 gr Cl / 20hrs - 1,5 gr Cl / 20hrs	,001
Pair 20	0,5 gr Cl / 20hrs - 1,5 gr Cl / 20hrs	,001
Pair 21	0,75 gr Cl / 20hrs - 1,5 gr Cl / 20hrs	,005
Pair 22	1,0 gr Cl / 20hrs - 1,5 gr Cl / 20hrs	,077
Pair 23	1,25 gr Cl / 20hrs - 1,5 gr Cl / 20hrs	,276
Pair 24	1,5 gr Cl / 20hrs - 1,75 gr Cl / 20hrs	,687
Pair 25	0,25 gr Cl / 22hrs - 1,5 gr Cl / 22hrs	,129
Pair 26	0,5 gr Cl / 22hrs - 1,5 gr Cl / 22hrs	,155
Pair 27	0,75 gr Cl / 22hrs - 1,5 gr Cl / 22hrs	,214
Pair 28	1,0 gr Cl / 22hrs - 1,5 gr Cl / 22hrs	,303
Pair 29	1,25 gr Cl / 22hrs - 1,5 gr Cl / 22hrs	,557
Pair 30	1,5 gr Cl / 22hrs - 1,75 gr Cl / 22hrs	,815
Pair 31	0,25 gr Cl / 24hrs - 1,5 gr Cl / 24hrs	,118
Pair 32	0,5 gr Cl / 24hrs - 1,5 gr Cl / 24hrs	,143
Pair 33	0,75 gr Cl / 24hrs - 1,5 gr Cl / 24hrs	,316
Pair 34	1,0 gr Cl / 24hrs - 1,5 gr Cl / 24hrs	,201
Pair 35	1,25 gr Cl / 24hrs - 1,5 gr Cl / 24hrs	,746
Pair 36	1,5 gr Cl / 24hrs - 1,75 gr Cl / 24hrs	,834

Πίνακας 4. Αποτελέσματα της δοκιμασίας Paired Samples t test ($p < 0,05$) για το ποσοστό εκκόλαψης μεταξύ της μέγιστης τιμής σε ολικό επίπεδο και των συγκεντρώσεων χλωρίου που αντιστοιχούν στις μέγιστες τιμές για κάθε χρόνο εκκόλαψης

		Sig. (2-tailed)
Pair 1	1,5 gr Cl / 24hrs - 1,75 gr Cl / 14hrs	,108
Pair 2	1,5 gr Cl / 24hrs - 1,5 gr Cl / 16hrs	,395
Pair 3	1,5 gr Cl / 24hrs - 1,5 gr Cl / 18hrs	,849
Pair 4	1,5 gr Cl / 24hrs - 1,5 gr Cl / 20hrs	,961
Pair 5	1,5 gr Cl / 24hrs - 1,5 gr Cl / 22hrs	,953

Πίνακας 5. Στατιστικά στοιχεία της εκκολαψιμότητας κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) για διάφορες συγκεντρώσεις χλωρίου τη χρονική περίοδο μεταξύ της 14^{ης} και της 24^{ης} ώρας από την έναρξη της ενυδάτωσης.

	N	Mean	Std. Error Mean	Std. Deviation
0 gr Cl / 14hrs	48	171333	3877	26859
0 gr Cl / 16hrs	48	179875	4013	27803
0 gr Cl / 18hrs	48	204208	4032	27937
0 gr Cl / 20hrs	48	218917	7451	51619
0 gr Cl / 22hrs	48	224292	5651	39151
0 gr Cl / 24hrs	48	224417	5931	41091
0,25 gr Cl / 14hrs	48	189042	4066	28167
0,25 gr Cl / 16hrs	48	197125	4434	30719
0,25 gr Cl / 18hrs	48	222458	3861	26751
0,25 gr Cl / 20hrs	48	231958	5817	40304
0,25 gr Cl / 22hrs	48	247917	4679	32420
0,25 gr Cl / 24hrs	48	250083	3674	25452
0,5 gr Cl / 14hrs	48	195417	4528	31371
0,5 gr Cl / 16hrs	48	211792	4403	30506
0,5 gr Cl / 18hrs	48	226583	5046	34959
0,5 gr Cl / 20hrs	48	237958	4348	30125
0,5 gr Cl / 22hrs	48	249500	5696	39466
0,5 gr Cl / 24hrs	48	251208	4799	33249
0,75 gr Cl / 14hrs	48	205167	4466	30939
0,75 gr Cl / 16hrs	48	215792	7114	49286
0,75 gr Cl / 18hrs	48	230542	4883	33832
0,75 gr Cl / 20hrs	48	238708	3661	25364
0,75 gr Cl / 22hrs	48	246708	7231	50099
0,75 gr Cl / 24hrs	48	247917	4679	32420
1,0 gr Cl / 14hrs	48	210208	4960	34363
1,0 gr Cl / 16hrs	48	220292	5067	35105
1,0 gr Cl / 18hrs	48	226292	5330	36924
1,0 gr Cl / 20hrs	48	234417	5298	36707
1,0 gr Cl / 22hrs	48	237542	6777	46950
1,0 gr Cl / 24hrs	48	239167	5160	35753
1,25 gr Cl / 14hrs	48	213833	5030	34849
1,25 gr Cl / 16hrs	48	225875	5427	37599
1,25 gr Cl / 18hrs	48	232833	4371	30280
1,25 gr Cl / 20hrs	48	233042	5593	38746
1,25 gr Cl / 22hrs	48	237000	4071	28206
1,25 gr Cl / 24hrs	48	237917	4679	32420
1,5 gr Cl / 14hrs	48	216708	4452	30842
1,5 gr Cl / 16hrs	48	224708	4452	30842
1,5 gr Cl / 18hrs	48	229500	4209	29163
1,5 gr Cl / 20hrs	48	230667	4559	31583
1,5 gr Cl / 22hrs	48	231000	5576	38632
1,5 gr Cl / 24hrs	48	231375	4603	31891
1,75 gr Cl / 14hrs	48	219958	4395	30448
1,75 gr Cl / 16hrs	48	222333	6238	43220
1,75 gr Cl / 18hrs	48	225458	5744	39793
1,75 gr Cl / 20hrs	48	225708	4665	32318
1,75 gr Cl / 22hrs	48	226958	4910	34016
1,75 gr Cl / 24hrs	48	227167	5481	37976

Πίνακας 6. Αποτελέσματα της δοκιμασίας Paired Samples t test ($p < 0,05$) για τις τιμές της εκκολαμιμότητας σε κύστες που δεν υπέστησαν αποκελύφωση (0 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης) και σε κύστες που υπέστησαν αποκελύφωση (0,25-0,75 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης).

		Sig. (2-tailed)
Pair 1	0 gr Cl / 14hrs - 0 gr Cl / 16hrs	,189
Pair 2	0 gr Cl / 14hrs - 0 gr Cl / 18hrs	,000
Pair 3	0 gr Cl / 14hrs - 0 gr Cl / 20hrs	,000
Pair 4	0 gr Cl / 14hrs - 0 gr Cl / 22hrs	,000
Pair 5	0 gr Cl / 14hrs - 0 gr Cl / 24hrs	,000
Pair 6	0 gr Cl / 16hrs - 0 gr Cl / 18hrs	,000
Pair 7	0 gr Cl / 16hrs - 0 gr Cl / 20hrs	,000
Pair 8	0 gr Cl / 16hrs - 0 gr Cl / 22hrs	,000
Pair 9	0 gr Cl / 16hrs - 0 gr Cl / 24hrs	,000
Pair 10	0 gr Cl / 18hrs - 0 gr Cl / 20hrs	,090
Pair 11	0 gr Cl / 18hrs - 0 gr Cl / 22hrs	,015
Pair 12	0 gr Cl / 18hrs - 0 gr Cl / 24hrs	,011
Pair 13	0 gr Cl / 20hrs - 0 gr Cl / 22hrs	,555
Pair 14	0 gr Cl / 20hrs - 0 gr Cl / 24hrs	,559
Pair 15	0 gr Cl / 22hrs - 0 gr Cl / 24hrs	,988
Pair 16	0,25 gr Cl / 14hrs - 0,25 gr Cl / 16hrs	,101
Pair 17	0,25 gr Cl / 14hrs - 0,25 gr Cl / 18hrs	,000
Pair 18	0,25 gr Cl / 14hrs - 0,25 gr Cl / 20hrs	,000
Pair 19	0,25 gr Cl / 14hrs - 0,25 gr Cl / 22hrs	,000
Pair 20	0,25 gr Cl / 14hrs - 0,25 gr Cl / 24hrs	,000
Pair 21	0,25 gr Cl / 16hrs - 0,25 gr Cl / 18hrs	,000
Pair 22	0,25 gr Cl / 16hrs - 0,25 gr Cl / 20hrs	,000
Pair 23	0,25 gr Cl / 16hrs - 0,25 gr Cl / 22hrs	,000
Pair 24	0,25 gr Cl / 16hrs - 0,25 gr Cl / 24hrs	,000
Pair 25	0,25 gr Cl / 18hrs - 0,25 gr Cl / 20hrs	,156
Pair 26	0,25 gr Cl / 18hrs - 0,25 gr Cl / 22hrs	,000
Pair 27	0,25 gr Cl / 18hrs - 0,25 gr Cl / 24hrs	,000
Pair 28	0,25 gr Cl / 20hrs - 0,25 gr Cl / 22hrs	,030
Pair 29	0,25 gr Cl / 20hrs - 0,25 gr Cl / 24hrs	,013
Pair 30	0,25 gr Cl / 22hrs - 0,25 gr Cl / 24hrs	,742
Pair 31	0,5 gr Cl / 14hrs - 0,5 gr Cl / 16hrs	,020
Pair 32	0,5 gr Cl / 14hrs - 0,5 gr Cl / 18hrs	,000
Pair 33	0,5 gr Cl / 14hrs - 0,5 gr Cl / 20hrs	,000
Pair 34	0,5 gr Cl / 14hrs - 0,5 gr Cl / 22hrs	,000
Pair 35	0,5 gr Cl / 14hrs - 0,5 gr Cl / 24hrs	,000
Pair 36	0,5 gr Cl / 16hrs - 0,5 gr Cl / 18hrs	,035
Pair 37	0,5 gr Cl / 16hrs - 0,5 gr Cl / 20hrs	,000
Pair 38	0,5 gr Cl / 16hrs - 0,5 gr Cl / 22hrs	,000
Pair 39	0,5 gr Cl / 16hrs - 0,5 gr Cl / 24hrs	,000
Pair 40	0,5 gr Cl / 18hrs - 0,5 gr Cl / 20hrs	,068
Pair 41	0,5 gr Cl / 18hrs - 0,5 gr Cl / 22hrs	,006
Pair 42	0,5 gr Cl / 18hrs - 0,5 gr Cl / 24hrs	,001
Pair 43	0,5 gr Cl / 20hrs - 0,5 gr Cl / 22hrs	,133
Pair 44	0,5 gr Cl / 20hrs - 0,5 gr Cl / 24hrs	,060
Pair 45	0,5 gr Cl / 22hrs - 0,5 gr Cl / 24hrs	,812

Πίνακας 7. Αποτελέσματα της δοκιμασίας Paired Samples t test ($p < 0,05$) για την εκκολαυσιμότητα σε κύστες που υπέστησαν αποκελύφωση (0,75-1,25 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης).

		Sig. (2-tailed)
Pair 46	0,75 gr Cl / 14hrs - 0,75 gr Cl / 16hrs	,241
Pair 47	0,75 gr Cl / 14hrs - 0,75 gr Cl / 18hrs	,000
Pair 48	0,75 gr Cl / 14hrs - 0,75 gr Cl / 20hrs	,000
Pair 49	0,75 gr Cl / 14hrs - 0,75 gr Cl / 22hrs	,000
Pair 50	0,75 gr Cl / 14hrs - 0,75 gr Cl / 24hrs	,000
Pair 51	0,75 gr Cl / 16hrs - 0,75 gr Cl / 18hrs	,102
Pair 52	0,75 gr Cl / 16hrs - 0,75 gr Cl / 20hrs	,007
Pair 53	0,75 gr Cl / 16hrs - 0,75 gr Cl / 22hrs	,002
Pair 54	0,75 gr Cl / 16hrs - 0,75 gr Cl / 24hrs	,001
Pair 55	0,75 gr Cl / 18hrs - 0,75 gr Cl / 20hrs	,163
Pair 56	0,75 gr Cl / 18hrs - 0,75 gr Cl / 22hrs	,068
Pair 57	0,75 gr Cl / 18hrs - 0,75 gr Cl / 24hrs	,015
Pair 58	0,75 gr Cl / 20hrs - 0,75 gr Cl / 22hrs	,317
Pair 59	0,75 gr Cl / 20hrs - 0,75 gr Cl / 24hrs	,107
Pair 60	0,75 gr Cl / 22hrs - 0,75 gr Cl / 24hrs	,894
Pair 61	1,0 gr Cl / 14hrs - 1,0 gr Cl / 16hrs	,152
Pair 62	1,0 gr Cl / 14hrs - 1,0 gr Cl / 18hrs	,023
Pair 63	1,0 gr Cl / 14hrs - 1,0 gr Cl / 20hrs	,001
Pair 64	1,0 gr Cl / 14hrs - 1,0 gr Cl / 22hrs	,005
Pair 65	1,0 gr Cl / 14hrs - 1,0 gr Cl / 24hrs	,000
Pair 66	1,0 gr Cl / 16hrs - 1,0 gr Cl / 18hrs	,413
Pair 67	1,0 gr Cl / 16hrs - 1,0 gr Cl / 20hrs	,038
Pair 68	1,0 gr Cl / 16hrs - 1,0 gr Cl / 22hrs	,050
Pair 69	1,0 gr Cl / 16hrs - 1,0 gr Cl / 24hrs	,017
Pair 70	1,0 gr Cl / 18hrs - 1,0 gr Cl / 20hrs	,271
Pair 71	1,0 gr Cl / 18hrs - 1,0 gr Cl / 22hrs	,182
Pair 72	1,0 gr Cl / 18hrs - 1,0 gr Cl / 24hrs	,045
Pair 73	1,0 gr Cl / 20hrs - 1,0 gr Cl / 22hrs	,684
Pair 74	1,0 gr Cl / 20hrs - 1,0 gr Cl / 24hrs	,503
Pair 75	1,0 gr Cl / 22hrs - 1,0 gr Cl / 24hrs	,819
Pair 76	1,25 gr Cl / 14hrs - 1,25 gr Cl / 16hrs	,060
Pair 77	1,25 gr Cl / 14hrs - 1,25 gr Cl / 18hrs	,001
Pair 78	1,25 gr Cl / 14hrs - 1,25 gr Cl / 20hrs	,013
Pair 79	1,25 gr Cl / 14hrs - 1,25 gr Cl / 22hrs	,000
Pair 80	1,25 gr Cl / 14hrs - 1,25 gr Cl / 24hrs	,003
Pair 81	1,25 gr Cl / 16hrs - 1,25 gr Cl / 18hrs	,298
Pair 82	1,25 gr Cl / 16hrs - 1,25 gr Cl / 20hrs	,311
Pair 83	1,25 gr Cl / 16hrs - 1,25 gr Cl / 22hrs	,064
Pair 84	1,25 gr Cl / 16hrs - 1,25 gr Cl / 24hrs	,097
Pair 85	1,25 gr Cl / 18hrs - 1,25 gr Cl / 20hrs	,977
Pair 86	1,25 gr Cl / 18hrs - 1,25 gr Cl / 22hrs	,493
Pair 87	1,25 gr Cl / 18hrs - 1,25 gr Cl / 24hrs	,427
Pair 88	1,25 gr Cl / 20hrs - 1,25 gr Cl / 22hrs	,509
Pair 89	1,25 gr Cl / 20hrs - 1,25 gr Cl / 24hrs	,484
Pair 90	1,25 gr Cl / 22hrs - 1,25 gr Cl / 24hrs	,881

Πίνακας 8. Αποτελέσματα της δοκιμασίας Paired Samples t test ($p < 0,05$) για την εκκολαυσιμότητα σε κύστες που υπέστησαν αποκελύφωση (1,5-1,75 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης).

		Sig. (2-tailed)
Pair 91	1,5 gr Cl / 14hrs - 1,5 gr Cl / 16hrs	,000
Pair 92	1,5 gr Cl / 14hrs - 1,5 gr Cl / 18hrs	,062
Pair 93	1,5 gr Cl / 14hrs - 1,5 gr Cl / 20hrs	,041
Pair 94	1,5 gr Cl / 14hrs - 1,5 gr Cl / 22hrs	,041
Pair 95	1,5 gr Cl / 14hrs - 1,5 gr Cl / 24hrs	,039
Pair 96	1,5 gr Cl / 16hrs - 1,5 gr Cl / 18hrs	,477
Pair 97	1,5 gr Cl / 16hrs - 1,5 gr Cl / 20hrs	,374
Pair 98	1,5 gr Cl / 16hrs - 1,5 gr Cl / 22hrs	,359
Pair 99	1,5 gr Cl / 16hrs - 1,5 gr Cl / 24hrs	,340
Pair 100	1,5 gr Cl / 18hrs - 1,5 gr Cl / 20hrs	,855
Pair 101	1,5 gr Cl / 18hrs - 1,5 gr Cl / 22hrs	,825
Pair 102	1,5 gr Cl / 18hrs - 1,5 gr Cl / 24hrs	,751
Pair 103	1,5 gr Cl / 20hrs - 1,5 gr Cl / 22hrs	,966
Pair 104	1,5 gr Cl / 20hrs - 1,5 gr Cl / 24hrs	,914
Pair 105	1,5 gr Cl / 22hrs - 1,5 gr Cl / 24hrs	,956
Pair 106	1,75 gr Cl / 14hrs - 1,75 gr Cl / 16hrs	,761
Pair 107	1,75 gr Cl / 14hrs - 1,75 gr Cl / 18hrs	,430
Pair 108	1,75 gr Cl / 14hrs - 1,75 gr Cl / 20hrs	,351
Pair 109	1,75 gr Cl / 14hrs - 1,75 gr Cl / 22hrs	,298
Pair 110	1,75 gr Cl / 14hrs - 1,75 gr Cl / 24hrs	,311
Pair 111	1,75 gr Cl / 16hrs - 1,75 gr Cl / 18hrs	,652
Pair 112	1,75 gr Cl / 16hrs - 1,75 gr Cl / 20hrs	,670
Pair 113	1,75 gr Cl / 16hrs - 1,75 gr Cl / 22hrs	,612
Pair 114	1,75 gr Cl / 16hrs - 1,75 gr Cl / 24hrs	,534
Pair 115	1,75 gr Cl / 18hrs - 1,75 gr Cl / 20hrs	,975
Pair 116	1,75 gr Cl / 18hrs - 1,75 gr Cl / 22hrs	,850
Pair 117	1,75 gr Cl / 18hrs - 1,75 gr Cl / 24hrs	,809
Pair 118	1,75 gr Cl / 20hrs - 1,75 gr Cl / 22hrs	,858
Pair 119	1,75 gr Cl / 20hrs - 1,75 gr Cl / 24hrs	,856
Pair 120	1,75 gr Cl / 22hrs - 1,75 gr Cl / 24hrs	,978

Πίνακας 9. Αποτελέσματα της δοκιμασίας Paired Samples t test ($p < 0,05$) για την εκκολαπιμότητα μεταξύ του μάρτυρα και των συγκεντρώσεων χλωρίου (0,25 -1,75 g Cl/14 ml διαλύματος αποκελύφωσης) για τους παρακάτω χρόνους εκκόλαψης

		Sig. (2-tailed)
Pair 1	0 gr Cl / 14hrs - 0,25 gr Cl / 14hrs	,003
Pair 2	0 gr Cl / 14hrs - 0,5 gr Cl / 14hrs	,000
Pair 3	0 gr Cl / 14hrs - 0,75 gr Cl / 14hrs	,000
Pair 4	0 gr Cl / 14hrs - 1,0 gr Cl / 14hrs	,000
Pair 5	0 gr Cl / 14hrs - 1,25 gr Cl / 14hrs	,000
Pair 6	0 gr Cl / 14hrs - 1,5 gr Cl / 14hrs	,000
Pair 7	0 gr Cl / 14hrs - 1,75 gr Cl / 14hrs	,000
Pair 8	0 gr Cl / 16hrs - 0,25 gr Cl / 16hrs	,005
Pair 9	0 gr Cl / 16hrs - 0,5 gr Cl / 16hrs	,000
Pair 10	0 gr Cl / 16hrs - 0,75 gr Cl / 16hrs	,000
Pair 11	0 gr Cl / 16hrs - 1,0 gr Cl / 16hrs	,000
Pair 12	0 gr Cl / 16hrs - 1,25 gr Cl / 16hrs	,000
Pair 13	0 gr Cl / 16hrs - 1,5 gr Cl / 16hrs	,000
Pair 14	0 gr Cl / 16hrs - 1,75 gr Cl / 16hrs	,000
Pair 15	0 gr Cl / 18hrs - 0,25 gr Cl / 18hrs	,002
Pair 16	0 gr Cl / 18hrs - 0,5 gr Cl / 18hrs	,001
Pair 17	0 gr Cl / 18hrs - 0,75 gr Cl / 18hrs	,000
Pair 18	0 gr Cl / 18hrs - 1,0 gr Cl / 18hrs	,001
Pair 19	0 gr Cl / 18hrs - 1,25 gr Cl / 18hrs	,000
Pair 20	0 gr Cl / 18hrs - 1,5 gr Cl / 18hrs	,000
Pair 21	0 gr Cl / 18hrs - 1,75 gr Cl / 18hrs	,004
Pair 22	0 gr Cl / 20hrs - 0,25 gr Cl / 20hrs	,162
Pair 23	0 gr Cl / 20hrs - 0,5 gr Cl / 20hrs	,019
Pair 24	0 gr Cl / 20hrs - 0,75 gr Cl / 20hrs	,009
Pair 25	0 gr Cl / 20hrs - 1,0 gr Cl / 20hrs	,072
Pair 26	0 gr Cl / 20hrs - 1,25 gr Cl / 20hrs	,087
Pair 27	0 gr Cl / 20hrs - 1,5 gr Cl / 20hrs	,181
Pair 28	0 gr Cl / 20hrs - 1,75 gr Cl / 20hrs	,447
Pair 29	0 gr Cl / 22hrs - 0,25 gr Cl / 22hrs	,002
Pair 30	0 gr Cl / 22hrs - 0,5 gr Cl / 22hrs	,008
Pair 31	0 gr Cl / 22hrs - 0,75 gr Cl / 22hrs	,012
Pair 32	0 gr Cl / 22hrs - 1,0 gr Cl / 22hrs	,115
Pair 33	0 gr Cl / 22hrs - 1,25 gr Cl / 22hrs	,053
Pair 34	0 gr Cl / 22hrs - 1,5 gr Cl / 22hrs	,422
Pair 35	0 gr Cl / 22hrs - 1,75 gr Cl / 22hrs	,715
Pair 36	0 gr Cl / 24hrs - 0,25 gr Cl / 24hrs	,000
Pair 37	0 gr Cl / 24hrs - 0,5 gr Cl / 24hrs	,002
Pair 38	0 gr Cl / 24hrs - 0,75 gr Cl / 24hrs	,005
Pair 39	0 gr Cl / 24hrs - 1,0 gr Cl / 24hrs	,021
Pair 40	0 gr Cl / 24hrs - 1,25 gr Cl / 24hrs	,093
Pair 41	0 gr Cl / 24hrs - 1,5 gr Cl / 24hrs	,265
Pair 42	0 gr Cl / 24hrs - 1,75 gr Cl / 24hrs	,718

Πίνακας 10. Αποτελέσματα της δοκιμασίας Paired Samples t test ($p < 0,05$) για την εκκολαπιμότητα μεταξύ της μέγιστης τιμής και των τιμών των υπόλοιπων συγκεντρώσεων χλωρίου για κάθε χρόνο εκκόλαπισης

		Sig. (2-tailed)
Pair 1	0,25 gr Cl / 14hrs - 1,75 gr Cl / 14hrs	,000
Pair 2	0,5 gr Cl / 14hrs - 1,75 gr Cl / 14hrs	,001
Pair 3	0,75 gr Cl / 14hrs - 1,75 gr Cl / 14hrs	,020
Pair 4	1,0 gr Cl / 14hrs - 1,75 gr Cl / 14hrs	,103
Pair 5	1,25 gr Cl / 14hrs - 1,75 gr Cl / 14hrs	,267
Pair 6	1,5 gr Cl / 14hrs - 1,75 gr Cl / 14hrs	,551
Pair 7	0,25 gr Cl / 16hrs - 1,25 gr Cl / 16hrs	,000
Pair 8	0,5 gr Cl / 16hrs - 1,25 gr Cl / 16hrs	,068
Pair 9	0,75 gr Cl / 16hrs - 1,25 gr Cl / 16hrs	,183
Pair 10	1,0 gr Cl / 16hrs - 1,25 gr Cl / 16hrs	,459
Pair 11	1,5 gr Cl / 16hrs - 1,25 gr Cl / 16hrs	,861
Pair 12	1,75 gr Cl / 16hrs - 1,25 gr Cl / 16hrs -	,645
Pair 13	0,25 gr Cl / 18hrs - 1,25 gr Cl / 18hrs	,082
Pair 14	0,5 gr Cl / 18hrs - 1,25 gr Cl / 18hrs	,277
Pair 15	0,75 gr Cl / 18hrs - 1,25 gr Cl / 18hrs	,718
Pair 16	1,0 gr Cl / 18hrs - 1,25 gr Cl / 18hrs	,323
Pair 17	1,5 gr Cl / 18hrs - 1,25 gr Cl / 18hrs	,592
Pair 18	1,75 gr Cl / 18hrs - 1,25 gr Cl / 18hrs	,299
Pair 19	0,25 gr Cl / 20hrs - 0,75 gr Cl / 20hrs	,365
Pair 20	0,5 gr Cl / 20hrs - 0,75 gr Cl / 20hrs	,895
Pair 21	1,0 gr Cl / 20hrs - 0,75 gr Cl / 20hrs	,443
Pair 22	1,25 gr Cl / 20hrs - 0,75 gr Cl / 20hrs	,371
Pair 23	1,5 gr Cl / 20hrs - 0,75 gr Cl / 20hrs	,128
Pair 24	1,75 gr Cl / 20hrs - 0,75 gr Cl / 20hrs	,040
Pair 25	0,25 gr Cl / 22hrs - 0,5 gr Cl / 22hrs	,851
Pair 26	0,75 gr Cl / 22hrs - 0,5 gr Cl / 22hrs	,776
Pair 27	1,0 gr Cl / 22hrs - 0,5 gr Cl / 22hrs	,229
Pair 28	1,25 gr Cl / 22hrs - 0,5 gr Cl / 22hrs	,088
Pair 29	1,5 gr Cl / 22hrs - 0,5 gr Cl / 22hrs	,018
Pair 30	1,75 gr Cl / 22hrs - 0,5 gr Cl / 22hrs	,009
Pair 31	0,25 gr Cl / 24hrs - 0,5 gr Cl / 24hrs	,863
Pair 32	0,75 gr Cl / 24hrs - 0,5 gr Cl / 24hrs	,654
Pair 33	1,0 gr Cl / 24hrs - 0,5 gr Cl / 24hrs	,094
Pair 34	1,25 gr Cl / 24hrs - 0,5 gr Cl / 24hrs	,075
Pair 35	1,5 gr Cl / 24hrs - 0,5 gr Cl / 24hrs	,004
Pair 36	1,75 gr Cl / 24hrs - 0,5 gr Cl / 24hrs	,002

Πίνακας 11. Αποτελέσματα της δοκιμασίας Paired Samples t test ($p < 0,05$) για την εκκολαπιμότητα μεταξύ της μέγιστης τιμής σε ολικό επίπεδο και των συγκεντρώσεων χλωρίου που αντιστοιχούν στις μέγιστες τιμές για κάθε χρόνο εκκόλαπισης

		Sig. (2-tailed)
Pair 1	0,5 gr Cl / 24hrs - 1,75 gr Cl / 14hrs	,000
Pair 2	0,5 gr Cl / 24hrs - 1,25 gr Cl / 16hrs	,000
Pair 3	0,5 gr Cl / 24hrs - 1,25 gr Cl / 18hrs	,014
Pair 4	0,5 gr Cl / 24hrs - 0,75 gr Cl / 20hrs	,078
Pair 5	0,5 gr Cl / 24hrs - 0,5 gr Cl / 22hrs	,812

Πίνακας 12. Στατιστικά στοιχεία της εκκολαψιμότητας κύστεων *Artemia franciscana* (GSL) για τις παρακάτω φυσικοχημικές παραμέτρους επώασης: θερμοκρασίας, αλατότητας και φωτισμού την 24^η ώρα από την έναρξη της ενυδάτωσης.

	N	Mean	Std. Error Mean	Std. Deviation
16,5 ± 1 °C	48	117786	1877	13004
21,5 ± 1 °C	48	206198	2696	18676
26,5 ± 1 °C	48	226085	2217	15363
31,5 ± 1 °C	48	210432	2327	16119
36,5 ± 1 °C	48	45729	1260	8728
40 psu	48	228594	2300	15934
30 psu	48	224417	5931	41091
20 psu	48	237719	2349	16275
5 psu	48	253365	1857	12864
0 psu	48	5677	825	5713
ΦΩΤΙΣΜΟΣ (1000 LUX)	48	224417	5931	41091
ΣΚΟΤΑΔΙ	48	214271	4676	32396

Πίνακας 13. Αποτελέσματα της δοκιμασίας Paired Samples t test ($p < 0,05$) για την εκκολαψιμότητα μεταξύ διαφορετικών τιμών θερμοκρασίας, αλατότητας και φωτισμού.

		Sig. (2-tailed)
Pair 1	16,5 ± 1 °C - 21,5 ± 1 °C	,000
Pair 2	16,5 ± 1 °C - 26,5 ± 1 °C	,000
Pair 3	16,5 ± 1 °C - 31,5 ± 1 °C	,000
Pair 4	16,5 ± 1 °C - 36,5 ± 1 °C	,000
Pair 5	21,5 ± 1 °C - 26,5 ± 1 °C	,000
Pair 6	21,5 ± 1 °C - 31,5 ± 1 °C	,216
Pair 7	21,5 ± 1 °C - 36,5 ± 1 °C	,000
Pair 8	26,5 ± 1 °C - 31,5 ± 1 °C	,000
Pair 9	26,5 ± 1 °C - 36,5 ± 1 °C	,000
Pair 10	31,5 ± 1 °C - 36,5 ± 1 °C	,000
Pair 11	40 psu - 30 psu	,518
Pair 13	40 psu - 5 psu	,000
Pair 14	40 psu - 0 psu	,000
Pair 15	30 psu - 20 psu	,042
Pair 16	30 psu - 5 psu	,000
Pair 17	30 psu - 0 psu	,000
Pair 18	20 psu - 5 psu	,000
Pair 19	20 psu - 0 psu	,000
Pair 20	5 psu - 0 psu	,000
Pair 21	ΦΩΤΙΣΜΟΣ - ΣΚΟΤΑΔΙ	,177