

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
VÝZKUMNÝ ÚSTAV RYBÁŘSKÝ A HYDROBIOLOGICKÝ
VE VODŇANECH

Postup dekapsulace trvalých vajíček artémie
a jejich použití v akvakultuře

EDICE METODIK



**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUĎĚJOVICÍCH
VÝZKUMNÝ ÚSTAV RYBÁŘSKÝ A HYDROBIOLOGICKÝ
VE VODŇANECH**

I. ADÁMKOVÁ

**POSTUP DEKAPSULACE TRVALÝCH VAJÍČEK ARTÉMIE
A JEJICH POUŽITÍ V AKVAKULTUŘE**

č. 58

Vodňany
1999

ISBN 80 – 85887 – 25 - 8

Obsah

	<i>strana</i>
<i>Úvod</i>	3
<i>Vývoj artémie od trvalého vajíčka do štádia nauplia</i>	3
<i>Dekapsulace</i>	5
<i>Užití dekapulovaných trvalých vajíček</i>	8
<i>Závěr</i>	9
<i>Citovaná literatura</i>	9

Úvod

Nauplia drobného koryše žabronožky solné neboli artémie (*Artemia salina*) jsou široce využívána jako živá potrava pro larvy ryb a koryšů jak v mořských, tak ve sladkovodních akvakulturních systémech.

I když byla artémie vědecky popsána již Linném v roce 1758, její výrazné použití jako vhodné potravy v řízeném chovu larválních organismů začalo až ve 30. letech tohoto století. S rostoucím zájmem a tlakem chovatelů ryb byly vytvořeny podmínky pro průmyslovou těžbu artémie, jejíž první průkopníci realizovali v r. 1951 sběr trvalých vajíček na jezeře Great Salt Lake ve státě Utah v USA.

V současnosti je artémie komerčně získávána na pěti kontinentech, velká část trhu je však stále dotována právě z lokality Great Salt Lake (až 90%), což způsobuje vysokou zranitelnost trhu klimatickými a ekologickými změnami v tomto jezeře. Tato skutečnost může být dokumentována neobvykle nízkou těžbou a snížením kvality trvalých vajíček artémie v posledních letech, což vyvolalo rapidní vzrůst jejich cen na světovém trhu. Vzhledem k tomu je žádoucí v líhňářské a chovatelské praxi začlenit metody zajišťující vyšší efektivnost a optimalizaci využití komerčně dodávaných trvalých vajíček artémie. Takovou metodou může být dekapsulace (Morris a Afzelius, 1967, Sorgeloos a kol. 1977). Na základě námi provedených testů byla zpracována metoda dekapsulace komerčně dodávaných trvalých vajíček artémie za využití českého komerčního chlomanového přípravku SAVO (účinná látka chloman sodný). V této metodice je popsán metodický postup aplikace tohoto přípravku pro účely dekapsulace, přičemž zhodnocení vlivu ošetření přípravkem SAVO na kvalitu líhnutí trvalých vajíček artémie lze nalézt v práci Adámkové (1999) a další práce týkající se této oblasti se připravují. Ještě než bude přistoupeno k samotné metodě, bude stručně podáno několik poznatků k životnímu cyklu artémie od trvalého vajíčka do naupliového stádia.

Vývoj artémie od trvalého vajíčka do stádia nauplia

Životní cyklus artémie začíná líhnutím trvalých vajíček. V nepříznivých podmínkách v přírodním prostředí (vysoká salinita, velké výkyvy obsahu kyslíku v důsledku eutrofizace, nedostatek potravy) vytváří artémie metabolicky neaktivní trvalá vajíčka, která plavou na hladině a jsou vyhazována větrem a vlnami na břeh. Obal takovychto trvalých vajíček sestává ze 3 základních vrstev (Morris a Afzelius, 1967):

- *alveolární vrstva*

pevná lipoproteinová vrstva prostoupená chitinem a hematinem, který způsobuje hnědé zbarvení vajíčka. Chrání embryo vůči mechanickému poškození a UV záření.

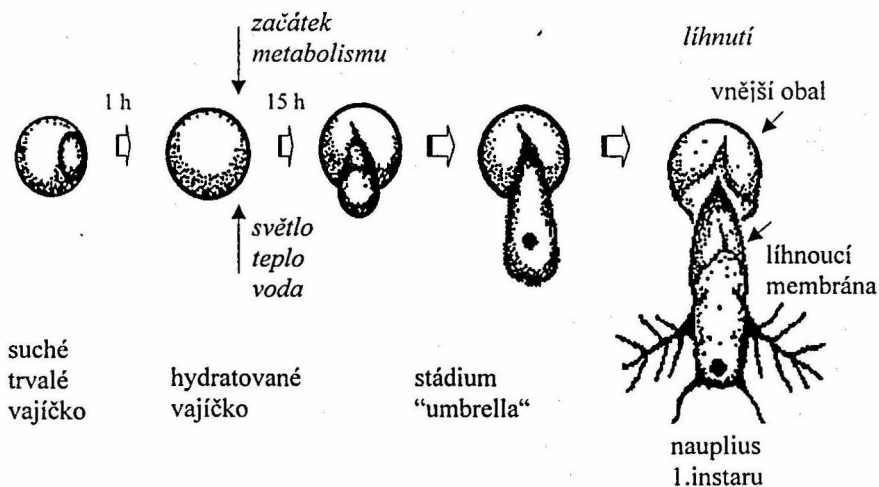
- *vnější kutikulární membrána*

permeabilní membrána chránící embryo před pronikáním molekul větších než molekula CO_2

- *embryonální kutikula*

průhledná a vysoce elastická vrstva, během inkubace se vyvíjí v líhnoucí membránu

Trvalá vajíčka přetrvávají v suchém stavu až do opětovné hydratace ve vodě, kdy dochází k nastartování jejich metabolismu (obr. 1). Zhruba za 15-20 h vnější obal (včetně vnější kutikulární membrány) trvalého vajíčka praská a objevuje se embryo obklopené průhlednou membránou. Zatímco embryo visí připojené k vnějšímu obalu, dokončuje se jeho vývoj (embryonální stádium „umbrella“) a po protřetí membrány dochází k vylíhnutí naupliové larvy (nauplius 1. instaru). Čerstvě vylíhlá nauplia nepřijímají potravu a spotřebovávají pouze žloutkové rezervy, protože jejich trávicí soustava není ještě plně vyvinuta. Zhruba za 8 - 12 h vývoje přecházejí nauplia do 2. larvální fáze (stádium 2. instaru), kdy mají plně funkční trávicí trakt a přijímají potravu (mikroskopické řasy, bakterie, detrit). Nauplia rostou a vyvíjejí se v několika dalších vývojových stádiích, přičemž zhruba za 8 dní mohou dosáhnout dospělosti. Samci jsou menší než samice, ale rekvysitují se ve všech populacích. Rozmnožování artémie je převážně jednopohlavní (partenogenetické).



Obr. 1: Vývojové změny artémie ze stádia trvalého vajíčka do naupliového stádia 1. instaru (upraveno z Hoffa a Snella, 1987)

Dekapsulace

Metoda je založena na úplném odstranění vnějšího tvrdého lipoproteinového obalu trvalých vajíček artémie pomocí krátkodobé expozice vajíček v chlomanovém roztoku.

Opodstatněnost využití dekapulace vajíček v akvakultuře je dána následujícími výhodami:

- *Eliminace separace*

Vnější tvrdá lipoproteinová vrstva je oxidací chlomanovým roztokem úplně odstraněna, tudíž je separace nauplií od nevylihých trvalých vajíček a prázdných obalů zbytečná. Jediným zbytkem po líhnutí dekapulovaných vajíček jsou tenké a průhledné membrány, kterými je obklopeno embryo.

- *Vyšší energetický obsah naupliových larev*

Nauplia, která se vylihnu z dekapulovaných vajíček, mají o 30-55% vyšší obsah energie než je tomu u standardně vylihých nauplií, protože nespotřebují energii na protřzení vnějšího obalu. Pokud mají trvalá vajíčka nízký obsah energie, může tak být výrazně zlepšena jejich líhivost.

- *Dezinfekce*

Trvalá vajíčka artémie mohou být kontaminována baktériemi, a to zejména baktériemi *Vibrio sp.*, které jsou potenciálními patogeny ryb. Ošetřením chlomanovým roztokem je provedena dezinfekce trvalých vajíček, a tím je redukováno riziko zavlečení patogenních organismů přilnutých na vnější vrstvě trvalých vajíček.

- *Přímé využití vajíček*

Dekapsulovaná vajíčka mohou být použita i bez inkubace pro přímé krmení larev ryb.

Procedura dekapulace může být rozdělena do tří, příp. čtyř posloupných kroků. Těmito kroky jsou hydratace, dekapulace, propláchnutí a příp. deaktivace. Posledně jmenovaný úkon - deaktivace slouží pro odstranění všech stop chlóru, které mohou zůstat i přes intenzivní propláchnutí na dekapulovaných vajíčkách, namočením v kyselém roztoku. S ohledem na vlastní výsledky i zahraniční zkušenosti jsme toho názoru, že tento krok je opodstatněně zařadit jen pro skutečně precizní provedení celé procedury. Důležité může být zejména při zkrmování takto ošetřených vajíček larvám ryb v malých akváriích, kde v malém objemu vody může být chlór, který eventuálně

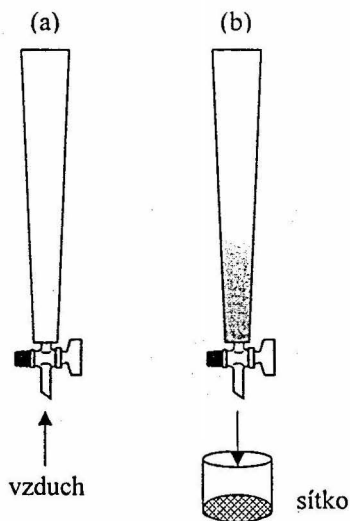
zůstane na vajíčkách, škodlivý pro zvláště citlivé ryby. Při důkladném propláchnutí dekapsulovaných vajíček se nezdá, že je kyselá koupel nutná. Dekapsulovaná vajíčka bez dezaktivace v kyselém roztoku lze použít jak pro přímé krmení larev ryb, tak pro krmení po následné inkubaci dekapsulovaných vajíček v solném roztoku aniž by bylo pozorováno poškození takto odkrmovaných larev ryb.

Následující postup je specifikován pro založení kultury z 3-5 g vajíček. Pro jiná množství trvalých vajíček je nutné níže uvedené objemové údaje přepočítat. Hustota a celkové množství vajíček, které může být dekapsulováno v daném množství roztoku, jsou totiž limitovány zvýšením teploty média, ke kterému dochází v průběhu dekapsulačního (oxidačního) procesu (= *exotermická reakce*). V případě dekapsulace vajíček ve vyšších hustotách by muselo být zajištěno dodatečné chlazení suspenze (led aj.) tak, aby teplota během dekapsulace v žádném případě nepřesáhla 40 °C, jinak může dojít k negativnímu ovlivnění životaschopnosti embryí.

Pomůcky

1. Inkubační lahev

Pro tyto účely se velice dobře osvědčil skleněný sedimentační válec dle Imhoffa s kohoutem (viz obr. 2). Je v něm možné dobře sledovat vlastní průběh dekapsulace, umožňuje přívod vzduchu odspodu lahve, a tím je zajištěno dokonalé udržení (mísení) vajíček artémie v suspenzi. Kohoutem může být regulováno množství přiváděného vzduchu a po zastavení a odstranění přívodu vzduchu mohou být stejnou cestou odpuštěna vajíčka (pro propláchnutí po dekapsulaci, další inkubaci, či zkrmení).



Obr. 2: Sedimentační válec dle Imhoffa s kohoutem (a) během hydratace, dekapsulace a inkubace trvalých vajíček artémie, (b) během odpuštění vajíček

2. Pro vzdušňovací zařízení
3. Odměrné nádoby
4. Sítko

Činidla

dekapsulace

1. SAVO (výrobce Bochemie Bohumín, koncentrace chlornanu sodného 4,72 % při plnění)
2. Hydroxid sodný NaOH, 1 N roztok. Roztok se připraví tak, že 40 g NaOH se rozpustí v destilované vodě a doplní na objem 1 l.

dezaktivace

3. Kyselina chlorovodíková HCl, 0,1 N roztok. Roztok se připraví tak, že 8,9 ml koncentrované HCl (35%) se za míchání přidává k 991,1 ml destilované vody.

nebo

Thiosíran sodný $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,1 % roztok. Roztok se připraví rozpuštěním 1 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ v destilované vodě a doplněním na objem 1 l.

Postup

• *Hydratace*

Suchá trvalá vajíčka artémie o hmotnosti 3-5 g se hydratují ve 150 ml vodovodní vody (bez přídavku soli) v inkubační lahvi po dobu 1 h. Vajíčka jsou udržována v suspenzi pomocí provzdušňování. Zpočátku je žádoucí seškrabovat vajíčka ulpělá na stěnách nádoby zpět do vodního roztoku gumovou stěrkou.

• *Dekapsulace*

Po hydrataci jsou k suspenzi v inkubační nádobě přidány 3 ml NaOH (*přídavek NaOH zvyšuje pH roztoku na reakční optimum pro dekapsulaci, $\text{pH} \geq 10$*) a dále 180 ml chlornanového přípravku SAVO. Ve chvíli, kdy je přidán chlornanový roztok, je v případě nutnosti přívod vzduchu upraven tak, aby bylo zabráněno pění. Dekapsulační (oxidační) proces startuje okamžitě a jak se vnější obal rozpouští, je pozorována změna barvy vajíček z tmavě hnědé, přes šedou na oranžovou a vajíčka ztrácejí schopnost vznášení. Proces trvá několik minut v závislosti na zdroji trvalých vajíček (obvykle 3-5 min) a je ukončen, když jsou vajíčka úplně oranžová.

Pozn. Dekapsulaci je nutno ukončit okamžitě po dosažení oranžové barvy trvalých vajíček. Při delším setrvání vajíček v chlornanovém roztoku může dojít k poškození vajíček a ovlivnění životaschopnosti embryí, což se projeví negativním výsledkem v případě další inkubace dekapsulovaných vajíček.

- *Propláchnutí*

Dekapsulovaná vajíčka jsou ihned spláchnuta na sítko a důkladně propláchnuta proudem vodovodní vody, dokud je cítit pach chlóru (obvykle 1-2 min).

- *Dezaktivace*

Rezidua chlóru, která mohou zůstat adsorbována na dekapsulovaných vajíčkách, lze dezaktivovat namočením (<1 min) dekapsulovaných vajíček do roztoku 0,1 N HCl, nebo 0,1 % Na₂S₂O₃. Poté se vajíčka znovu propláchnou vodou.

Užití dekapsulovaných trvalých vajíček

Dekapsulovaná vajíčka lze použít pro přímé krmení larev ryb a koryšů. Lze je rovněž inkubovat standardním postupem nebo krátkodobě uchovat po dobu několika dní v chladničce při 0-4°C.

Přímé užití

Dekapsulovaná vajíčka artémie mohou být použita bez inkubace pro přímé krmení larvám ryb a koryšů. Přímé použití vajíček ošetřených dekapulací pro tyto účely je však omezené, neboť dekapsulovaná vajíčka ztratila schopnost vznášení, sedimentují na dně odchovných nádrží a stávají se tak pro larvy ryb schopné přijímat potravu pouze z vodního sloupce nedostupná. Pro tyto druhy ryb lze podpořit udržení částic v suspenzi pomocí krátkodobé zvýšené aerace v odchovné nádrži, či sušením dekapsulovaných vajíček. Dekapsulovaná vajíčka jsou výhodnou potravou pro raná stádia přijímající potravu ze dna. Díky zhruba poloviční velikosti vajíček artémie (200-250 μm) ve srovnání s jejichmi naupliovými larvami (400-550 μm) lze vajíčka využít pro odkrm malých raných stádií ryb akceptujících nepohyblivou potravu, pro něž jsou počátku nauplia jako potravu příliš velká.

Inkubace

Po dekapulaci a důkladném propláchnutí dekapsulovaných vajíček lze provést jejich inkubaci standardním postupem. Vajíčka jsou spláchnuta ze sítko do inkubační lahve, která je naplněna vodou s přídavkem kuchyňské soli v koncentraci 25 g na 1 l vody. Dekapsulovaná vajíčka jsou inkubována cca při 25°C při aeraci zajištěné od spodu inkubační lahve. Vylíhlá nauplia i

nevylihla (ale dekapsulovaná) vajíčka (embrya) mohou být poté bez jakékoli separace zkrmována larvám ryb. Jsou tak využita všechna trvalá vajíčka nasazená k inkubaci.

Závěr

Dekapsulace umožňuje efektivnější využití trvalých vajíček artémie pro účely odkrmu raných stádií ryb a koryšů na líhních, odchovných ryb i v akvaristice. Ošetření pomocí chlornanového roztoku SAVO má vliv na zvýšení vstupní ceny tohoto druhu potravy pro larvální stádia ryb a koryšů. Pokud však zvážíme, že pro zkrmování mohou být využita všechna trvalá vajíčka, efektivita této procedury se ziskově projeví především u vajíček o nižší kvalitě, u nichž zůstává velká část trvalých vajíček nevylihnutá a pro larvy tak nestrávitelná a nevyužitelná. Ovšem i v případě ošetření kvalitních trvalých vajíček artémie lze využít výhody dezinfekce, přímého použití, vyššího energetického obsahu nauplií, či odstranění nutnosti separace nauplií od nevylihnutých vajíček a prázdných obalů. Vedle toho bylo v našich testech pozorováno, že vajíčka ošetřená dekapsulací se mohou líhnout za kratší inkubační dobu (díky nižší energetické potřebě embryí na protržení membrány) doprovázenou zkrácenou synchronií líhnutí (tj. časový interval, během kterého se vylihne většina nauplií).

Citovaná literatura

- Adámková, I., 1999. Lihnivost trvalých vajíček artémie (*Artemia salina*) ošetřených komerčním chlornanovým výrobkem SAVO. Bull. VÚRH Vodňany, 35 (3): v tisku.
- Hoff, F. H., Snell, T. W., 1987. Plankton Culture Manual. Florida Aqua Farms, 141 pp.
- Morris, J.E., Afzelius, B.A., 1967. The structure of the shell and outer membranes in encysted *Artemia salina* embryos during cryptobiosis and development. J. Ultrastruct. Res., 20: 244-259.
- Sorgeloos, P., Bossuyt, E., Lavina, E., Baeza-Mesa, M., 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.

Metodika byla vytvořena na podkladě řešení projektu EP 7306 NAZV MZe ČR.

Adresa autora:

Ing. Ivana Adámková, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, 389 25 Vodňany

Lektoroval:

RNDr. Josef Matěna, CSc., Hydrobiologický ústav Akademie věd České republiky, Na sádkách 7, 370 05 České Budějovice

V edici Metodik vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech – Náklad: 200 výtisků – Tisk: Tiskárna Public – M. Kreuz, 389 01 Vodňany