

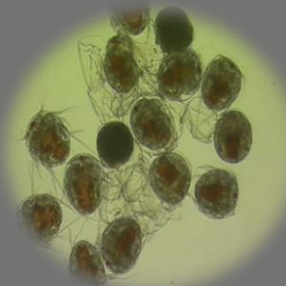
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΑΛΙΕΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Π.Μ.Σ.)
<<ΒΙΩΣΙΜΗ ΑΛΙΕΙΑ-ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ – SUSTAINABLE
FISHERIES-AQUACULTURE>>

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΣΕ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΟ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΤΩΝ ΒΑΣΙΚΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΩΝ
ΑΡΠΑΚΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΚΩΠΗΠΟΔΩΝ ΤΩΝ ΓΕΝΩΝ *TISBE* ΚΑΙ
TIGRIOPUS



ΦΟΙΤΗΤΗΣ: ΙΩΑΝΝΗΣ ΦΩΤΟΔΗΜΑΣ
ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΧΩΤΟΣ, καθηγητής



Στους λατρευτούς μου
γονείς, Παναγιώτη και
Ούρσουλα, ως ελάχιστη
ένδειξη αγάπης.

Στην Κατερίνα.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Γεώργιο Χώτο που δέχτηκε να είναι ο επιβλέπων καθηγητής της Διπλωματικής Εργασίας, η συμβολή του ήταν πολύτιμη καθόλη την διάρκεια της. επειδή με τις διαλέξεις και τα μαθήματα του, "Καλλιέργειες Πλαγκτού", "Εφαρμογές Φυκοκαλλιεργειών" υπήρξε αρωγός στην προσπάθειά μου, να κατανοήσω ότι είναι το επιστημονικό αντικείμενο που με ενδιαφέρει πραγματικά, δίδοντας μου ερεθίσματα για περαιτέρω εξέλιξη.

Από το εργαστηριακό επιστημονικό προσωπικό του εργαστηρίου πλαγκτού, την κυρία Αβραμίδου Δέσποινα, επειδή μέσω εκείνης έμαθα να χρησιμοποιώ όλες τις απαραίτητες τεχνικές και μεθόδους που χρειάστηκαν προκειμένου να επιτύχω τον σκοπό μου, από την πρώτη μέρα της πρακτικής μου στο εργαστήριο έως και σήμερα.

Την κυρία Μπεκιάρη Βλασούλα υπεύθυνη του εργαστηρίου Χημείας η οποία βοήθησε σημαντικά να υλοποιήσω ένα τμήμα της εργασίας μου.

ABSTRACT

This dissertation concerns experimentation on two marine harpacticoid copepod species isolated from coastal lagoonal areas of the Messolonghi lagoon (W. Greece). Based on the relevant literature the first species belongs to Genus *Tisbe* (presumably *Tisbe holothuriae*) and the second to Genus *Tigriopus* (presumably *Tigriopus fulvus*). As we were unable to make exact identification at the species level by using molecular markers and in order to eliminate any uncertainty about their taxonomy we chose to refer to them with only their Genus name *Tisbe* and *Tigriopus*. Overall, from preliminary cultures in the laboratory, both species proved very sturdy and presented ease in handling, with rapid population increase in various vessels accepting all kind of microalgal food. The main purpose of the research was to find their suitability for mass culture in order to be candidates as live food in fish hatcheries. The experimentation included 3 sections. 1st was about fecundity as of the total production of nauplii from each egg-sac bearing female, 2nd the salinity tolerance of the copepods in an extreme range from fresh water till the extreme of 140 ppt, 3rd the influence of 5 cultured microalgae on their population growth. In terms of salinity tolerance as investigated with the probit method it was found that both species presented an impressive survival of 100 % (or almost 100 %) in a wide range of salinity ranging in 20-80 ppt for *Tigriopus* ($LC_{50} (95\% CL) = 132 \pm 5,35$ ppt) and 30-70 ppt for *Tisbe* ($LC_{50} (95\% CL) = 93 \pm 3,23$ ppt). The range probably can be wider if the copepods could had been previously gradually acclimatized in the tested salinities instead of being abruptly introduced in it from the standard salinity of 35 ppt (dictated from the probit method). Thus *Tigriopus* is more halotolerant than *Tisbe* especially in lower salinities (brackish water) with $LC_{50} = 1$ ppt vs $LC_{50} (95\% CL) = 15 \pm 2,41$ ppt respectively. In salinity of 35 ppt where both species seem to perform their biological activities in natural terms, fecundity of each egg bearing females was estimated as hatched nauplii per day till the exhausting of the eggsac. Both species presented a gradual hatching of the eggs for a period extending several days and their productivity was almost the same with mean values $34,6 \pm 1,95$ nauplii per eggsac for *Tisbe* and $34,4 \pm 2,83$ nauplii per eggsac for *Tigriopus*. These values of nauplii production are quite promising in terms of mass culturing as compared with the those in the literature and probably can be further increased with optimization of culture conditions. In the feeding with microalgae experiment using 3 chlorophytes (*Tetraselmis*, *Dunaliella*, *Asteromonas*), 1 haptophyte (*Isochrysis*) and 1 cryptophyte (*Rhodomonas*) the 28 days experimentation using 1 gravid female per 4 ml cell (25 replicates) resulted in population increase with a maximum of 830 individuals for *Tetraselmis* fed *Tigriopus* and a minimum of 137 ind. for *Isochrysis* fed *Tigriopus*. All algae proved effective on the population growth with *Tetraselmis* and *Asteromonas* the most efficient especially for *Tisbe* fed with *Asteromonas* ($SGR-r=0,11$) and *Tigriopus* fed with *Tetraselmis* ($r=0,13$). Thus flagellated microalgae can be effective in copepod raising.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u>Σκοπός της εργασίας</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u>Βασικά βιολογικά χαρακτηριστικά των κωπηπόδων</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> Συστηματική και γενική μορφολογία σώματος</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u>Εξαρτήματα του σώματος των κωπηπόδων</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> Κεφαλικά εξαρτήματα.....</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> Στοματικά εξαρτήματα.....</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> Θωρακικά εξαρτήματα.....</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> Εξαρτήματα ουραίων ζευγαρωτών αποφύσεων</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u>Αναπαραγωγή των κωπηπόδων</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u>Αναπαραγωγική διαδικασία στα αρπακτικοειδή κωπήποδα</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
σελιδοδείκτης.	
<u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> Γενικές πληροφορίες επί των πειραματισμών.....</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> Περι ταυτοποίησης των κωπηπόδων.....</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> Αποθεματικές καλλιέργειες.....</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> Εργαστηριακές συνθήκες και χειρισμοί του ζωντανού υλικού.....</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
σελιδοδείκτης.	
<u> Τεχνική υποδομή και χειρισμοί εκτέλεσης των πειραμάτων</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
σελιδοδείκτης.	
<u> Πείραμα Γονιμότητας.....</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> Πείραμα αντοχής στην αλατότητα</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> Πείραμα επίδρασης της τροφής στην αύξηση.....</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u>Αποτελέσματα.....</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> Πείραμα γονιμότητας.....</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> Πείραμα αντοχής στην αλατότητα</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> Πείραμα διατροφής</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ. ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ.....</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ. ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ.....</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ. ΔΙΑΤΡΟΦΗ.....</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> Βιολογικά χαρακτηριστικά των χρησιμοποιηθέντων φυκών</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
σελιδοδείκτης.	
<u> Isochrysis galbana</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> Rhodomonas salina</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> Tetraselmis suecica</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
<u> Dunaliella salina</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της εργασίας

Η ραγδαία ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών πρωτίστως αλλά και των διακοσμητικών ψαριών δευτερευόντως, έχει προκαλέσει ερευνητικό ενδιαφέρον σε όλους τους ποικίλους τομείς που εμπλέκονται στη διατροφή των ψαριών προκειμένου αυτά να παραχθούν σε μεγάλες ποσότητες σε ελεγχόμενο περιβάλλον. Κάθε απόπειρα να παραχθεί ο τεράστιος αριθμός των λαρβών των ψαριών που απαιτούνται και ιδιαίτερα αυτών που παράγονται στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς των θαλασσινών ειδών, συναρτάται και εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα της κατάλληλης ζωντανής τροφής (live food). Η απαίτηση για ζωντανή τροφή από τις λάρβες των ψαριών είναι μια υποχρεωτική κατάσταση για να αναπτυχθούν, καθώς το πεπτικό τους σύστημα είναι λειτουργικώς ανώριμο για να πέψει αδρανή-τεχνητή τροφή. Πέραν όμως αυτού και η κίνηση της ζωντανής τροφής (κάτι που η αδρανής τροφή στερείται) προκαλεί τη λάρβα να τη συλλάβει. Άλλωστε στο φυσικό περιβάλλον οι λάρβες τρέφονται με ζωοπλαγκτόν και η ζωντανή τροφή που αποτελείται από ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς δεν είναι παρά μια αντιγραφή της φύσης. Σήμερα ως αποκλειστική σχεδόν πρώτη ζωντανή τροφή χρησιμοποιείται το τροχόζωο *Brachionus plicatilis* ακολουθούμενο κατόπιν (όταν οι λάρβες έχουν μεγαλώσει αρκετά) από τους ναυπλίους της αλμυρογαρίδας *Artemia*. Παρομοίως τα ψάρια και τα οστρακόδερμα (γαρίδες, κλπ.) που παράγονται στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς απαιτούν επίσης ζωντανή τροφή. Στη φύση οι λάρβες δεν έχουν το *Brachionus plicatilis* στο διαιτολόγιό τους ούτε και την *Artemia* (είτε για ναυπλίους πρόκειται, είτε για ενήλικες). Το μέγεθος του *Brachionus plicatilis* είναι στο εύρος των 100 - 300 μm και των ναυπλίων της *Artemia* στο εύρος των 422-517 μm. Όσο και αν αυτοί οι δύο οργανισμοί έχουν κυριολεκτικά καταλάβει την αποκλειστικότητα στη χρησιμοποιούμενη ζωντανή τροφή παγκοσμίως, υπάρχουν διάφορα ζητήματα που ανακύπτουν καθώς η γκάμα των καλλιεργούμενων ψαριών συνεχώς εμπλουτίζεται με νέα είδη. Και πράγματι υπάρχουν είδη ψαριών όπως ο γαλαζοπτέρυγος τόνος του οποίου οι λάρβες τρέφονται με πλαγκτονικά κωπήποδα τα οποία δεν αποτελούν την καθιερωμένη ζωντανή τροφή για τα συνήθη ιχθυοεκκολαπτήρια. Επιπλέον, από διάφορα πειράματα βρέθηκε, ότι η χρήση των κωπήποδων μπορεί να ωφελήσει τις λάρβες κάθε είδους ψαριού. Αυτό δεν πρέπει να εκπλήσσει καθώς τα κωπήποδα αποτελούν το σημαντικότερο αν όχι το αποκλειστικό μέρος του ζωοπλαγκτού με το οποίο διατρέφονται οι λάρβες στο φυσικό περιβάλλον.

Τα κωπήποδα είναι τα πλέον σημαντικά και άφθονα μικροασπόνδυλα που συνδέουν τη μεταφορά ενέργειας από τους πρωτογενείς παραγωγούς (φυτοπλαγκτόν) στους ποικίλους καταναλωτές στα τροφικά πλέγματα των

θαλασσινών (και των γλυκών) οικοσυστημάτων. Οι ναύπλιοι των κωπηπόδων δεν υστερούν ούτε σε κίνηση ούτε σε θρεπτική αξία των τροχοζώων. Μάλιστα είναι ανώτεροι ποιοτικώς από την ίδια τους τη φύση (όχι μόνο οι ναύπλιοι αλλά και όλα τα οντογενετικά στάδια των κωπηπόδων) καθώς εμπεριέχουν μεγάλες ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (HUFA) τα οποία προσλαμβάνουν τρεφόμενοι με τους παραγωγούς αυτών των λιπαρών που είναι αποκλειστικώς το φυτοπλαγκτόν. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν βασικό συστατικό της ζωντανής τροφής και χωρίς επαρκή ποσότητά τους οι λάρβες δεν αναπτύσσονται σωστά. Καθώς οι λάρβες δεν μπορούν να τραφούν με φυτοπλαγκτόν η χρήση ζωντανής τροφής που τράφηκε με φυτοπλαγκτόν αποτελεί αναγκαιότητα. Παρόλα αυτά για διάφορους λόγους που άπτονται της φυσιολογίας και της πρακτικότητας στη διαχείρισή τους, ούτε τα τροχόζωα ούτε η *Artemia* μπορούν να επιτύχουν την τέλεια περιεκτικότητα HUFAs στο σώμα τους. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς τα τροχόζωα και οι ναύπλιοι της *Artemia* εμπλουτίζονται πρώτα σε διαλύματα με μεγάλη συγκέντρωση HUFA (DHA & EPA) πριν μοιραστούν για να καταναλωθούν από τις λάρβες. Υπάρχουν όμως ατέλειες στον εμπλουτισμό αυτό καθώς δεν επιτυγχάνεται η τέλεια αναλογία DHA/EPA που χρειάζονται τα διάφορα είδη ψαριών. Τα κωπήποδα δεν έχουν ανάγκη εμπλουτισμού διότι εμπεριέχουν σε μεγάλο βαθμό αυτά τα μακρομόρια. Και εκτός από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα περιέχουν και μεγάλα ποσά από φωσφολιπίδια, βιταμίνη A, C και E, πολικά λίπη, αντιοξειδωτικά, ασταξανθίνη και πεπτικά ένζυμα που βοηθούν το ατελές πεπτικό σύστημα των λαρβών. Όλες οι παραπάνω ενώσεις των κωπηπόδων που οι ατελείς λάρβες έχουν τόσο ανάγκη, τα καθιστούν εξαιρετικής φύσεως ζωντανή τροφή που συμβάλλει στην ανεμπόδιστη παραγωγή υγιών ιχθυδίων.

Επιπροσθέτως των παραπάνω χημικών χαρακτηριστικών τους η χαρακτηριστική τινασσόμενη κίνηση των κωπηπόδων ερεθίζει οπτικώς τις λάρβες για να τα συλλάβουν προσφέροντας έτσι αποτελεσματική θήρευση. Πάντως η καλλιέργεια κωπηπόδων για χρήση στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς ο γαλαζοπτέρυγος τόνος σε συστηματικό βαθμό επειδή η μαζική παραγωγή τους δεν είναι εύκολα επιτεύξιμη στο επιθυμητό επίπεδο μια και όλα τα είδη παρουσιάζουν μακρύτερο χρόνο γενεάς συγκριτικά με τα τροχόζωα. Επιπλέον από τις τρεις μεγάλες ομάδες των κωπηπόδων, καλανοειδή, κυκλωποειδή και αρπακτικοειδή τα πλαγκτονικά καλανοειδή παρουσιάζουν μεγάλη δυσκολία στο να επιβιώσουν σε μεγάλες πυκνότητες ενώ από τις υπόλοιπες δύο τα αρπακτικοειδή που είναι κυρίως βενθικά παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα στο πρακτικό μέρος της καλλιέργειάς τους. Αυτά τα πλεονεκτήματα είναι κυρίως η αντοχή τους στο συνωστισμό, η θρέψη τους τόσο με αιωρούμενη τροφή όσο και η βόσκησή τους στον πυθμένα, η αντοχή τους στη ρύπανση και οι χαμηλές απαιτήσεις τους σε διαλυμένο οξυγόνο. Η αποτελεσματική καλλιέργεια των κωπηπόδων λοιπόν μπορεί να εξελιχθεί εφόσον μελετηθούν τα βασικά βιολογικά τους χαρακτηριστικά με κυριότερο από αυτά τη γονιμότητα η οποία θα καθορίσει και την παραγωγή τους σε ναυπλίους. Σε συνδυασμό με τη γονιμότητα υψίστης σημασίας είναι και η εύρεση της προτιμητέας αλατότητας, του τύπου

της τροφής, του επιπέδου φωτισμού, του τύπου του δοχείου και άλλων δευτερευόντων παραμέτρων.

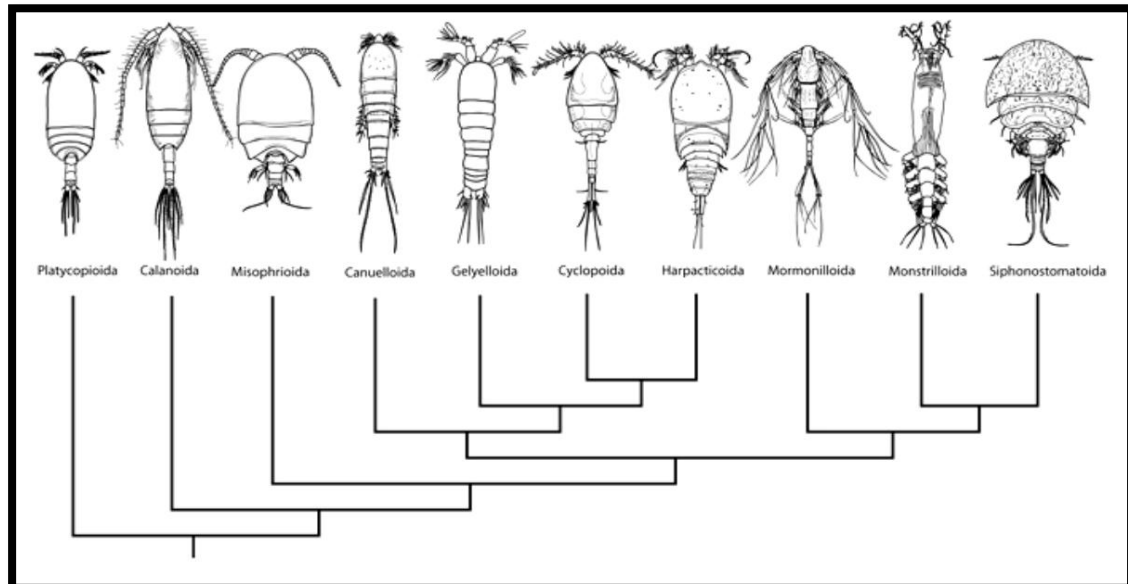
Βασικά βιολογικά χαρακτηριστικά των κωπηπόδων Συστηματική και γενική μορφολογία σώματος

Τα κωπήποδα (copepods) είναι υδρόβια ζώα μικρού μεγέθους και εντάσσονται στην κατηγορία των καρκινοειδών. Έχουν τη δυνατότητα να ζουν σε ύδατα διαφορετικών αλατότητων, δηλαδή σε θαλασσινό και γλυκό νερό. Έχουν καταγραφεί περισσότερα από 13.000 είδη με 2800 από αυτά να ζουν στο γλυκό νερό και 6500 να ζουν παρασιτικά σε άλλα θαλάσσια ζώα, τα υπόλοιπα είδη είναι πλαγκτονικά και ολοκληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο είτε αιωρούμενα στην υδάτινη στήλη, είτε βενθικώς.

Η συστηματική τους κατάταξη είναι:

Φύλο (Phylum) (Συνομοταξία):	Arthropoda (Αρθρόποδα)
Υπο-Φύλο (Subphylum) (Υποσυνομοταξία):	Crustacea (καρκινοειδή)
Υπερομοταξία (Superclass):	Multicrustacea (Πολυκαρκινοειδή)
Ομοταξία (Class):	Hexanauplia (Εξιναύπλια)
Υφομοταξία (Subclass):	Copepoda (Κωπήποδα)

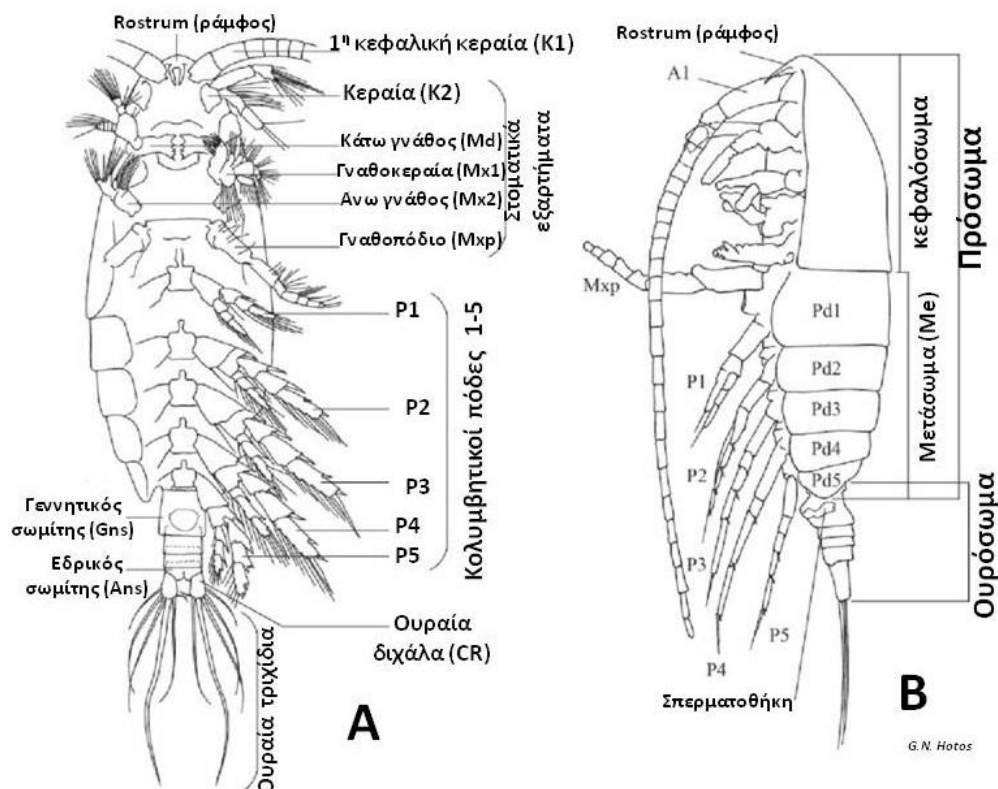
Στην Υφομοταξία κωπήποδα διακρίνονται **10 Τάξεις** οι: Calanoida, Cyclopoida, Harpacticoida, Canuelloida, Gelyelloida, Misophrioida, Monstrilloida, Mormonilloida, Platycopioida και Siphonostomatoida (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά των δέκα τάξεων των κωπηπόδων καθώς επίσης και η φυλογενετική σχέση τους σε δενδρόγραμμα (από Hotos, 2019).

Κατά γενική παραδοχή ο τρόπος διαβίωσης των κωπήποδων διακρίνεται σε πλαγκτονική και βενθική φάση, ωστόσο αυτά κατά τον περισσότερο χρόνο της ζωής τους, παρουσιάζουν διαβίωση όπως των πλαγκτονικών οργανισμών. Με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, όπως και στα

υπόλοιπα καρκινοειδή, η εκκόλαψη των αυγών παράγει νυμφικά πλάσματα γνωστά ως ναύπλιοι. Οι ναύπλιοι διαθέτουν κεφαλή και ουρά, όχι όμως θώρακα και κοιλιά. Ο θώρακας και η ουρά παρατηρούνται εμφανώς στα ενήλικα άτομα. Η ανάπτυξη των ναυπλίων διανύει συνήθως 6 (αναπτυξιακά στάδια) που σε κάθε ένα από αυτά πραγματοποιείται και μια έκδυση. Κατόπιν οι ναύπλιοι μετατρέπονται σε κωπηποδιτες οι οποίοι με τη σειρά τους θα διανύσουν επίσης άλλα 6 αναπτυξιακά στάδια, με αντίστοιχες εκδύσεις ώστε να μετατραπούν σε ενήλικα. Ανάλογα με το είδος παρουσιάζουν ποικιλομορφία ως προς τη βασική τους δομή, δηλαδή (κεφαλή-θώρακας-κοιλιά). Το σώμα των κωπηπόδων (Σχήμα 2), γενικώς έχει μήκος λιγότερο του 1 mm έως το πολύ 2 mm (εξαιρουμένων κάποιων γιγαντιαίων πολικών ειδών που φτάνουν έως και 1 cm). Είναι εμφανώς επιμήκη και χαρακτηρίζονται από ένα μεγάλο ζεύγος κεραιών (ακρότατο) και από ένα δεύτερο κοντότερο πιο πίσω. Η κεφαλή καλύπτεται από ένα είδος θωράκισης γνωστής ως εξωσκελετός, διαθέτοντας μια διάφανη και λεπτή υφή. Η πλειονότητα των κωπηπόδων στο εμπρόσθιο μέρος της κεφαλής διαθέτει έναν χαρακτηριστικό οφθαλμό ερυθρού χρώματος. Ως προς τον χρωματισμό του σώματος, διακρίνονται σε αποχρώσεις του μπλε και του πρασίνου για τα είδη που ζουν σε θερμά νερά και σε ερυθρές αποχρώσεις για αυτά που ζουν σε ψυχρά νερά.



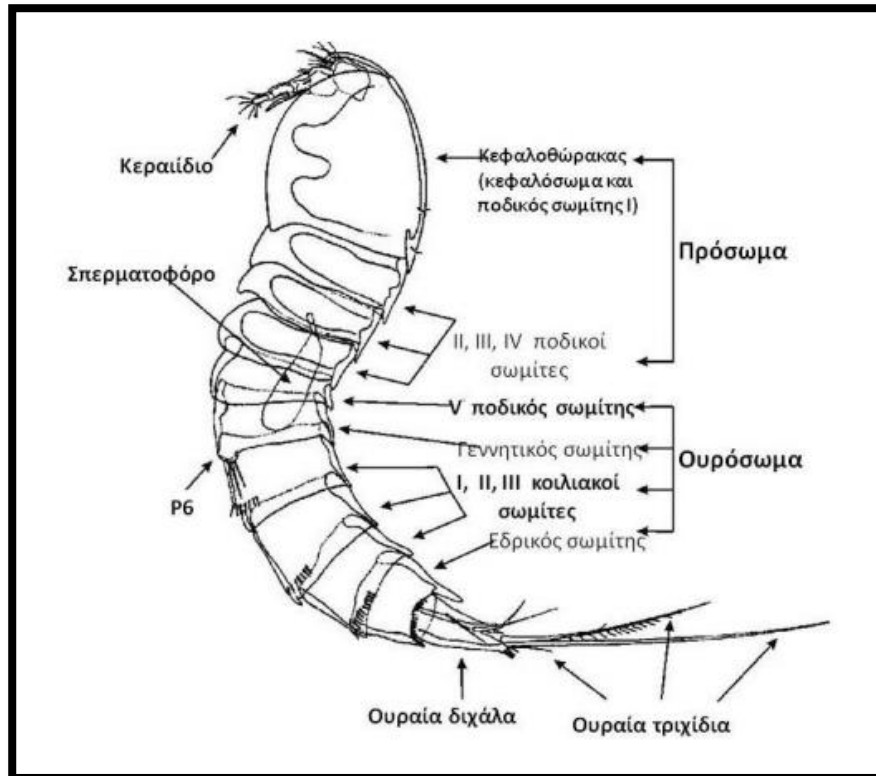
Σχήμα 2. Κοιλιακή όψη (A) και πλάγια όψη (B), ενός καλανοειδούς κωπηπόδου με το σύνολο των σωματικών τμημάτων και εξαρτημάτων που διαθέτουν. Αναλυτικότερα: η στοματική περιοχή περιλαμβάνει και ορίζεται από τα στοματικά εξαρτήματα άνω γνάθος (Mx2) και κάτω γνάθος (Md). Ενδιάμεσα περιλαμβάνονται οι

γναθοκεραίες (Mx1) και τέλος στο κάτω τμήμα της άνω γνάθου στοματικά εξαρτήματα τα λεγόμενα γναθοπόδια (Mxp), (από Hotos, 2019).

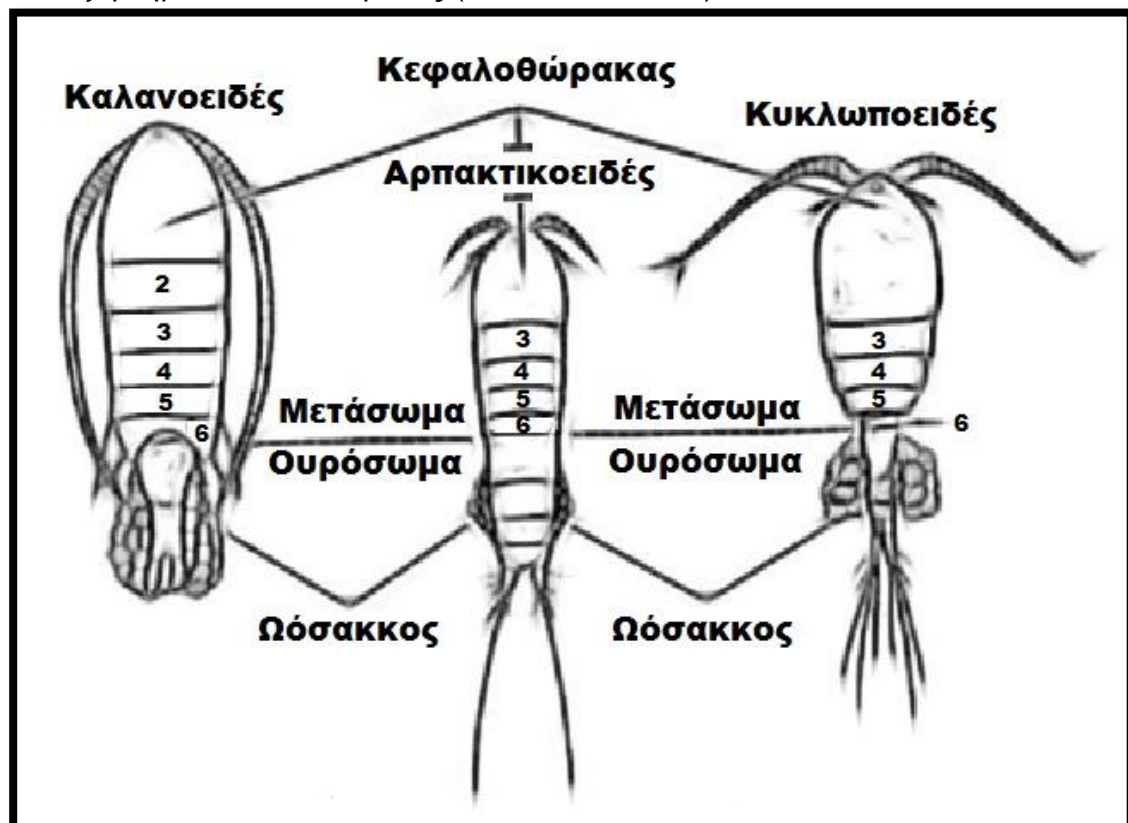
Τα κυριότερα διακριτά χαρακτηριστικά των κωπηπόδων είναι η πρόσθια κυλινδροειδής δομή του σώματος, αποτελούμενη από ένα εξόγκωμα την κεφαλή, και τα 3 με 5 συνήθως τμήματα θώρακος που συνεχίζουν μετά από αυτή, (σχηματίζοντας τον κεφαλοθώρακα). Το πρώτο ζεύγος των θωρακικών εξαρτημάτων ονομάζεται γναθοπόδιο, και συμβάλλει στη διεργασία σίτισης του οργανισμού. Τα επόμενα διακριτά τμήματα των κωπηπόδων είναι στενότερα σε σχέση με τον θώρακα και αποτελούνται από πέντε διαφορετικά τμήματα, σχηματίζοντας το Μετάσωμα με ένα ζεύγος κολυμβητικών ποδιών σε κάθε τμήμα. Ακολουθεί το στενότερο τμηματοποιημένο ουρόσωμα χωρίς κάποιο είδος εξαρτήματος εκτός από αυτό που βρίσκεται στο τέλος (ουραία διχάλα) (Σχήματα 2, 3 & 4). Η ουραία διχάλα δεν είναι όμοια σε μέγεθος σε όλα τα κωπήποδα όμως στα περισσότερα υπάρχει κάποιο είδος αποφύσεων (τριχίδια). Στα αρπακτικοειδή και κυκλωποειδή κωπήποδα το 5^ο θωρακικό τμήμα με το ζεύγος των ποδιών του είναι ενσωματωμένο στο ουρόσωμα. Το 1^ο τμήμα-σωμίτης του ουροσώματος καλείται γεννητικός σωμίτης καθώς εκεί υπάρχει ο γεννητικός πόρος όπου καταλήγουν οι αγωγοί των γεννητικών προϊόντων (ωαγωγός/οί ή σπερματογωγός) και των δύο φύλων. Το τελευταίο τμήμα του ουροσώματος (πριν την ουραία διχάλα) καλείται εδρικό (telson) και φέρει το εδρικό (πρωκτικό) άνοιγμα για την έξοδο των κοπροειδών περιττωμάτων.

Στο κάτω τμήμα του κεφαλοθώρακα υπάρχουν: α) τριχοειδείς αποφύσεις (γνάθοι και γναθοπόδια) και β) το δεύτερο ζεύγος κεραιών της κεφαλής που λειτουργούν για την επίτευξη αργής κολυμβητικής κίνησης. Τα εξαρτήματα των θωρακικών ποδιών επηρεάζουν τη συμπεριφορά του κωπηπόδου εντός της υδάτινης στήλης με ποικίλο τρόπο. Για την περίπτωση των καλανοειδών κωπηπόδων η κίνηση που πραγματοποιούν χαρακτηρίζεται ως απότομη, με τις συνεχείς εκτινάξεις (κίνησης προς μια κατεύθυνση και διαφυγής από αυτή) αντίθετα για την περίπτωση των αρπακτικοειδών η κίνηση τους χαρακτηρίζεται ως λιγότερο απότομη, με συχνά και παρατεταμένα διαστήματα ακινησίας. Τα σωματικά εξαρτήματα προσφέρουν στους εν λόγω οργανισμούς μεγάλη πλευστότητα στο σώμα τους, και μειωμένη ταχύτητα καταβύθισης, καλύτερο προσανατολισμό αλλά και αποφυγή θηρευτών. Ως προς την προσέλκυση των αρσενικών από τα θηλυκά υπάρχουν ενδείξεις ότι κάποια είδη παράγουν φερομόνες. Από την διεθνή βιβλιογραφία προκύπτει μια αντιφατική γνώμη σχετικά με τις την κολυμβητική ικανότητα των κωπηπόδων παραβλέποντας τον τρόπο με τον οποίο κινούνται αυτά κατά περίπτωση. Τα βενθικά κωπήποδα που ζουν στο βυθό ανάμεσα στα μορφώματα του ιζήματος, ή ανάμεσα στις θαλλικές διακλαδώσεις του στύπου των μακροφυκών, συνήθως χρησιμοποιούν τα 4 ζεύγη των ποδιών τους (από τα 5 πλεοπόδια) για κολύμβηση και ερπυσμό ενώ

επίσης το κυλινδρικό τους σώμα τους επιτρέπει να τρυπώνουν στους διαύλους του υποστρώματος.



Σχήμα 3. Πλευρική όψη ενός αρπακτικοειδούς κωπητόδου, με τις ονομασίες των εξαρτημάτων του σώματος (από Hotos, 2019).

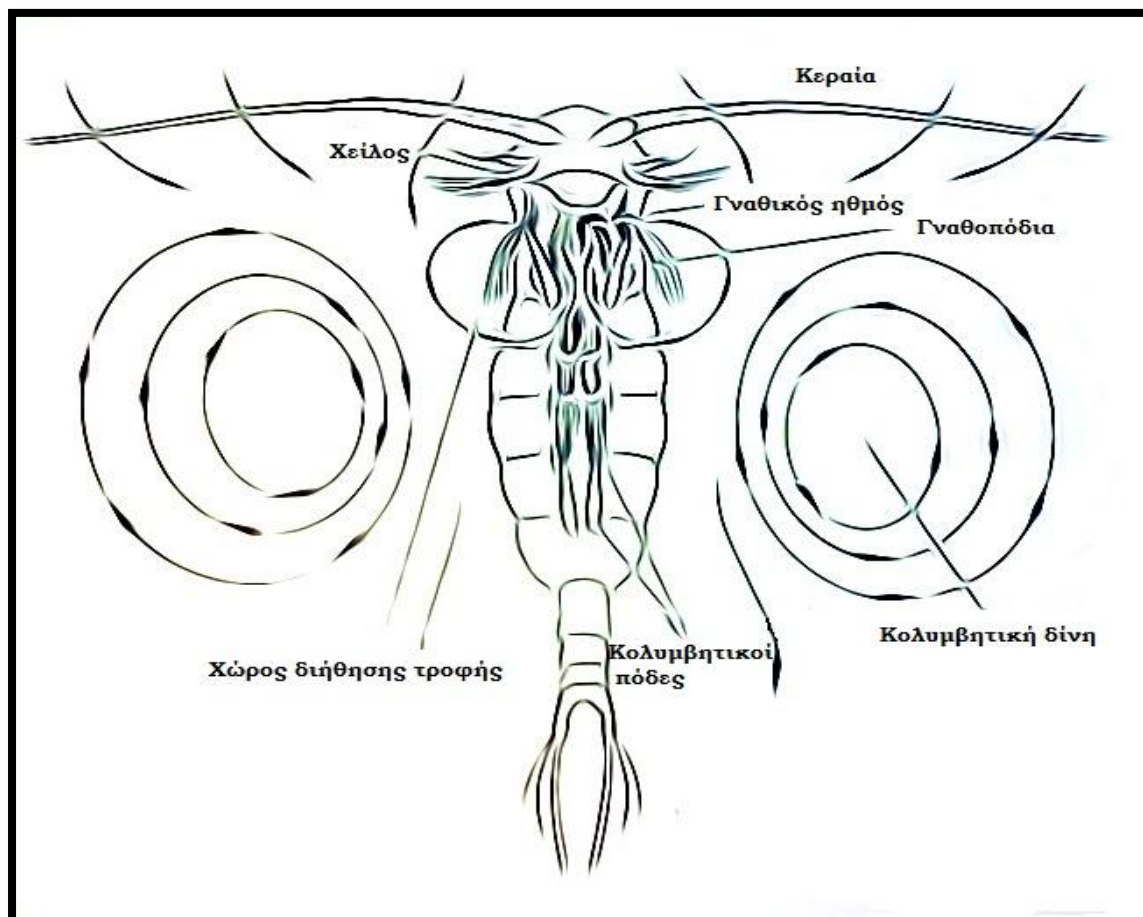


Σχήμα 4. Ραχιαίες όψεις κωπηπόδων (καλανοειδές, αρπακτικοειδές, κυκλωποειδές), με τις σωματοδομές τους (από Hotos, 2019).

Εξαρτήματα του σώματος των κωπηπόδων

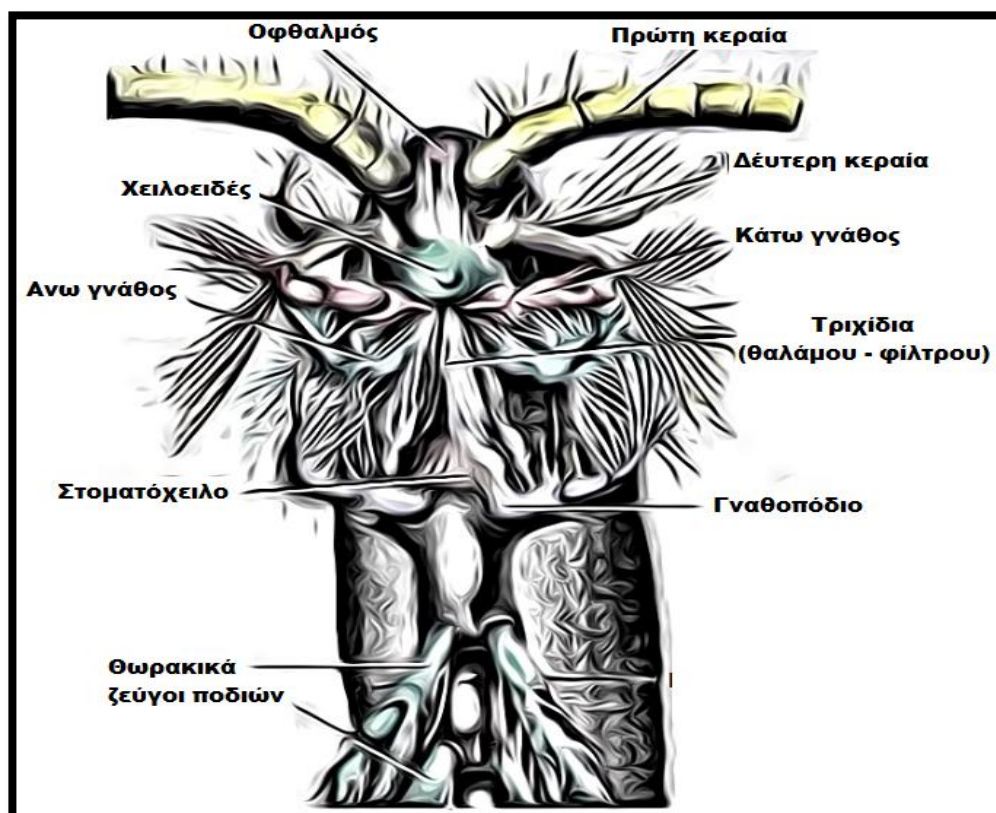
Στα κωπήποδα των κατηγοριών καλανοειδών, κυκλωποειδών, αρπακτικοειδών διακρίνονται τα ακόλουθα σωματικά εξαρτήματα:

Κεφαλικά εξαρτήματα: Τα κωπήποδα διαθέτουν δύο ζευγάρια κεραιών το πρώτο και μακρύτερο βρίσκεται στο μετωπιαίο της κεφαλής και το επόμενο χαρακτηριστικά μικρότερο σε μήκος από κάτω του. Το πρώτο μεγάλο ζεύγος κεραιών δεν διακλαδώνεται αλλά όμως περιέχει κατά μήκος του ένα μεγάλο αριθμό από τριχίδια που ενεργούν ως αισθητήρια όργανα. Επίσης αυτά συμβάλλουν στην ευστάθεια όταν κολυμπά καθώς επίσης είναι και δέκτης μηχανικών και χημικών σημάτων. Στα καλανοειδή στα αρσενικά άτομα η μια κεραία εκ των δύο μεγάλων, έχει κυρτό σχήμα και λειτουργεί ως συλληπτήριο όργανο του θηλυκού ατόμου κατά την αναπαραγωγική δραστηριότητα. Οι κεραιές του δευτέρου ζεύγους κεραιών είναι διχαλωτές και εξηπηρετούν στη μετακίνηση αλλά και τον σχηματισμό στροβίλων (Σχήμα 5) του νερού προκειμένου να δημιουργούνται δίνες ώστε τα αιωρούμενα σωματίδια να προσλαμβάνονται ευκολότερα από τα στοματικά εξαρτήματα.



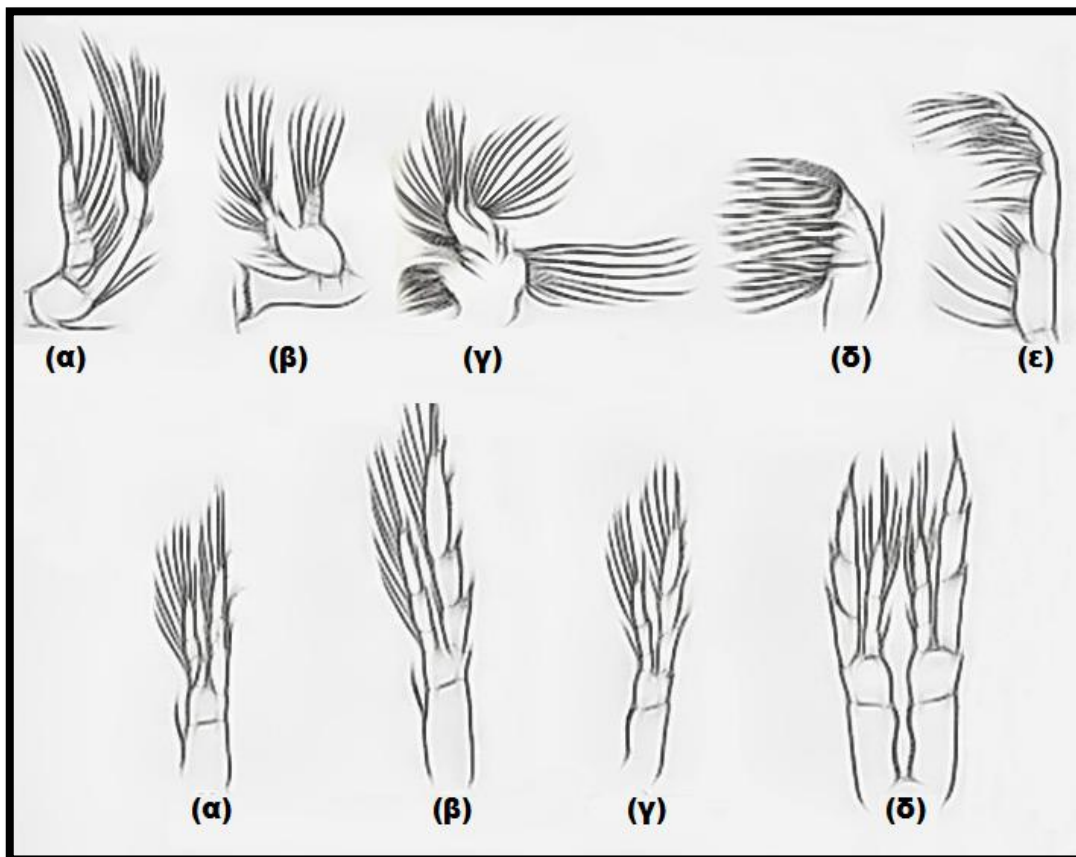
Σχήμα 5. Οι δίνες που προκαλούνται με τις δυναμικές κινήσεις των κεφαλικών εξαρτημάτων ώστε να συγκεντρώνονται τα αιωρούμενα σωματίδια τροφών σε ένα σημείο στην στοματική περιοχή (επεξεργασμένη εικόνα από Hotos, 2019).

Στοματικά εξαρτήματα (Σχήμα 6). Περιέχουν ένα ζεύγος κάτω γνάθου (mandible), δύο ζεύγη άνω γνάθου (maxillae), καθώς επίσης και ένα ζεύγος από γναθοπόδια (maxillipedes), (ξεκινώντας με τη σειρά από το κεφάλι προς την ουρά). Η κάτω γνάθος χρησιμοποιείται για τη διεργασία της μάσησης των τροφών. Στο πίσω μέρος του κεφαλιού, διακρίνεται η πρώτη γνάθος του άνω τμήματος, η οποία είναι διχαλωτή και μη τμηματοποιημένη και διαθέτει αρκετά τριχίδια στις άκρες της. Αντίθετα, η δεύτερη άνω γνάθος δεν διαθέτει διακλαδώσεις αλλά έχει επίσης όπως και η πρώτη, τριχίδια στις άκρες της. Στο κάτω μέρος του κεφαλιού, υπάρχει ζεύγος από τμηματοποιημένα γναθοπόδια χωρίς διακλαδώσεις με αρκετά τριχίδια στο εσωτερικό των τμημάτων του κάθε ξεχωριστού γναθοποδίου. Στα αρσενικά στελέχη, το μέγεθος των τριχιδίων είναι σχετικά μικρό σε σχέση με αυτά που διαθέτουν τα θηλυκά κωπήποδα. Τα προαναφερόμενα τέσσερα ζεύγη εξαρτημάτων, όσον αφορά τα στοματικά χαρακτηριστικά συντελούν στην συγκέντρωση της τροφής σε μια εστία (κολυμβητική δίνη (Σχήμα 5), ώστε τα κωπήποδα να διευκολύνονται κατά την διεργασία της σίτισης, με τη συνεργική δράση του δευτέρου ζεύγους κεραιών επειδή βασικός τρόπος θρέψης τους είναι η διήθηση του φυτοπλαγκτού. Στην κατηγορία των αρπακτικών κωπήποδων (αρπακτικοειδή) τα εξαρτήματα χρησιμοποιούνται ως εργαλεία για το κυνήγι θηραμάτων ή για την επεξεργασία της τροφής από στέρεα υποστρώματα που βρίσκονται στον πυθμένα. Στα κωπήποδα πάντως χρησιμοποιούνται ποικίλοι τρόποι για την λήψη τροφής, ανάλογα με την κατάσταση διαβίωσης, θήρευση ή βόσκηση ή διήθηση του ύδατος.



Σχήμα 6. Κάτοψη της ευρύτερης περιοχής, της στοματικής κοιλότητας ενός καλανοειδούς κωπηπόδου (από Hotos, 2019).

Θωρακικά εξαρτήματα: Περιέχουν τα μέρη του θώρακα (σωμίτες) και στα περισσότερα είδη κωπηπόδων αποτελούνται από πέντε ζεύγη ποδιών σε όλο το μήκος του θώρακα (ένα ζεύγος σε κάθε σωμίτη (Σχήμα 2). Μόνο το 5^ο ζεύγος (τελευταίο προς την ουρά) είναι ποικίλως διαμορφωμένο στα αρσενικά ανά είδος για να εξυπηρετήσει τη μεταφορά του σπερματοφόρου στο θηλυκό. Τα 5 ζεύγη των ποδιών του θώρακα (Σχήμα 7), που είναι γνωστά ως κολυμβητικοί πόδες, παρουσιάζονται ως διχάλωτά και διαμερισματοποιημένα με το μέρος της διχάλας το οποίο είναι προς τα έξω και λέγεται εξωποδίτης και το μέρος προς το εσωτερικό, λέγεται ενδοποδίτης. Τα δύο μέρη της διχάλας εκφύονται από ένα θεμελιώδες τμήμα (βασοποδίτης), που αποτελεί το τμήμα το οποίο εκφύεται από το θώρακα. Όλα τα πόδια στα μέρη των ενδοποδιτών και εξωποδιτών είναι εφοδιασμένα με ακάνθινα παρακλάδια τα οποία έχουν τριχίδια με διαφορετικό μήκος και αριθμό το καθένα, και αυτά καθορίζουν τα χαρακτηριστικά των διαφορετικών ειδών των κωπηπόδων. Σχετικά με τα καλανοειδή και αρπακτικοειδή κωπήποδα, και στο αρσενικό και στο θηλυκό, το πέμπτο ζεύγος των ποδιών παρουσιάζεται πολύ μικρό σε σχέση με τα υπόλοιπα τέσσερα ζεύγη που απομένουν. Τα συγκεκριμένα είδη γονιμοποιούνται με αναπαραγωγική επαφή και ιδιαίτερα στην κατηγορία των κυκλωποειδών, το ένα πόδι του πέμπτου ζεύγους των αρσενικών είναι ενισχυμένο στον εξωποδίτη, για να μεταβιβάσει το σπερματοφόρο στο αναπαραγωγικό όργανο του θηλυκού (Σχήμα 8). Αξιοσημείωτη είναι η παρουσία ακάνθινων αποφύσεων στους πόδες προς την εξωτερική πλευρά και τριχιδίων στην εσωτερική. Στα στοματικά εξαρτήματα και στην κεραία δεν υπάρχουν ακάνθινες αποφύσεις αλλά υπάρχει αφθονία τριχιδίων.

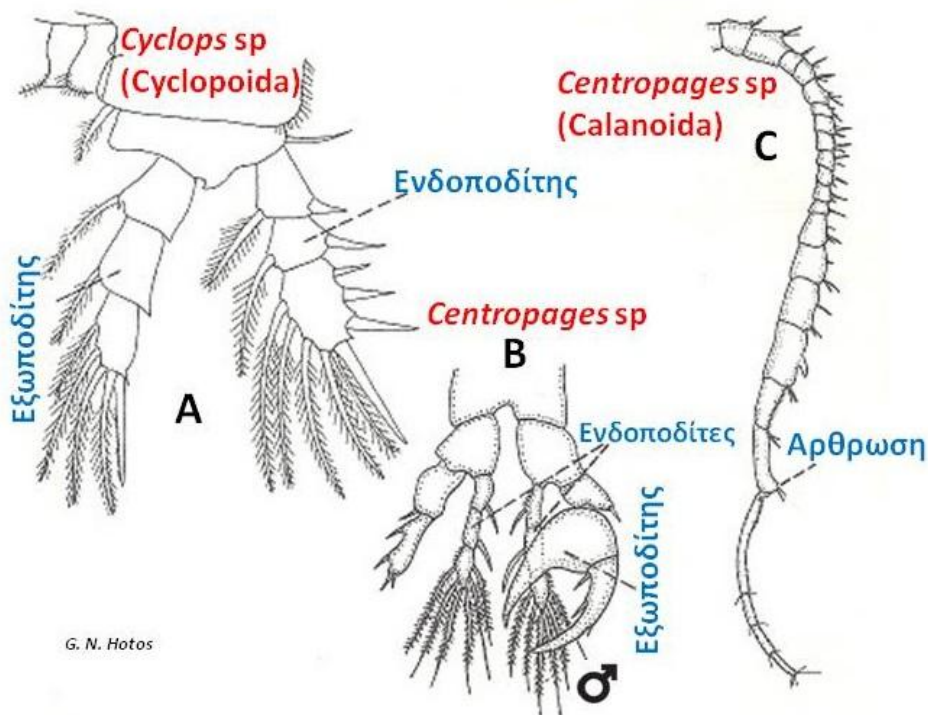


Σχήμα 7. Στην άνω σειρά απεικονίζεται η κατασκευή των στοματικών εξαρτημάτων του καλανοειδούς *Calanus finmarchicus*. (α) Διχαλωτή κεραία του 2ου ζεύγους κεραιών, (β) Κάτω γνάθος, (γ) 1^η άνω γνάθος, (δ) 2^η άνω γνάθος, (ε) Γναθοπόδιο. Στην κάτω σειρά απεικονίζεται η κατασκευή θωρακικών ποδιών του καλανοειδούς *Calanus finmarchicus*. (α) πόδι 1^{ου} ζεύγους. (β) πόδι 4^{ου} ζεύγους. (γ) πόδι 5^{ου} ζεύγους. (δ) 5^ο ζεύγος ποδιών αρσενικού (από Hotos, 2019).

Εξαρτήματα ουραίων ζευγαρωτών αποφύσεων: Στο τελικό τμήμα του σώματος υπάρχουν ποικίλοι σχηματισμοί. Το τελικό τμήμα - σωμίτης του ουροσώματος, ο εδρικός σωμίτης (τέλσον-telson), απολήγει σε ένα διχαλωτό τμήμα δηλαδή την ουραία διχάλα που το κάθε μέρος της καταλήγει σε έξι ακτίνες - τριχίδια τα οποία δημιουργούν θύσανο. Στα καλανοειδή τα τριχίδια των θυσάνων εμφανίζονται κοντά και με ίσο μήκος στα κυκλωποειδή 2 από αυτά είναι μακρύτερα από τα υπόλοιπα, ενώ στα αρπακτικοειδή εμφανίζονται πολύ μακριά τριχίδια με χαρακτηριστικό γνώρισμα αρκετά μεγάλη επέκταση του καντρικού του κάθε θυσάνου. Τα ουραία τριχίδια προσφέρουν επίπλευση και ισορροπία στο κωπήποδο.

Όλα τα προαναφερόμενα εξαρτήματα είναι τμηματοποιημένα (για παράδειγμα για την κάθε κεραία του από το πρώτο ζεύγος πάνω από 23

τμήματα στα καλανοειδή, 17 τμήματα στα κυκλωποειδή, λιγότερα από 10 στα αρπακτικοειδή) και φέρουν μεγάλο αριθμό τριχιδίων στην επιφάνειά τους ("πτέρωμα"). Πιο συγκεκριμένα, το πρώτο μακρύ ζεύγος κεραιών διαθέτει σε όλο το μήκος της κάθε κεραίας απολήξεις νευρώνων στη βάση καθενός από τα δεκάδες τριχίδια, λαμβάνοντας νευρικά μηνύματα από την κίνηση των τριχιδίων που προκαλείται από την κίνηση του νερού. Τα μηνύματα αυτά επεξεργάζονται με γρήγορο ρυθμό στο κεντρικό εγκεφαλικό γάγγλιο και η αντίδραση του κωπητόδου στο συγκεκριμένο ερέθισμα είναι κατάλληλη, δηλαδή είτε με κίνηση διαφυγής από θηρευτές που το προσεγγίζουν, είτε κινούμενο προς πηγή τροφής, είτε προς κάποιο θηλυκό.



Σχήμα 8. Δεξί 2^ο θωρακικό πόδι του κυκλωποειδούς *Cyclops* με χαρακτηριστική διχαλωτή μορφή, τμηματοποίηση ενδοποδίτη και εξωποδίτη που φέρουν άκανθες και τριχίδια. **B.** Χαρακτηριστική μορφή του 5^{ου} ζεύγους θωρακικών ποδιών του αρσενικού του καλανοειδούς *Centropages* όπου ο δεξιός εξωποδίτης είναι διαμορφωμένος σε δαγκάνα για σύλληψη της κοιλιάς του θηλυκού. **C.** Η κατάλληλα διαμορφωμένη προς σύλληψη (του θηλυκού) 1^η κεραία του αρσενικού *Centropages* (από Hotos, 2019).

Υπάρχουν παρεμφερείς νευρικές απολήξεις και σε άλλα εξαρτήματα ή μέρη της σωματικής επιφάνειας αλλά σε τι βαθμό δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένο. Συνεπώς ενάντια σε ορισμένες απόψεις που θεωρούν το 1ο μακρύ ζεύγος των κεραιών ως όργανο κολύμβησης, αυτό δεν είναι ορθό γιατί αυτές οι κεραίες λειτουργούν ως αισθητήριο όργανο και με την ευρεία έκταση προσφέρουν επίσης πλευστότητα και ισορροπία. Αν οι κεραίες χρησίμευαν

στην κολύμβηση τότε τα νευρικά ερεθίσματα από την κίνηση του νερού θα δημιουργούσαν σύγχυση στην αντίληψη του ζώου για την όποια κινούμενη μάζα στον αντιληπτικό χώρο (Hotos, 2019). Από τις υπόλοιπες 3 κατηγορίες εξαρτημάτων (στοματικά, θωρακικοί πόδες, ουραίες αποφύσεις) σχετικά με την ώθηση αποκλείονται οι ουραίες αποφύσεις που παρέχουν απλώς πλευστότητα και μείωση της τυρβώδους ροής κατά την κίνηση (αεροδυναμικότητα). Με βάση νεότερα δεδομένα που έχουν εξαχθεί από μελέτη ευρημάτων από κάμερες μικροσκοπικής καταγραφής, κατανοήθηκε ότι η κίνηση των κωπηπόδων επιτυγχάνεται όσον αφορά τη συνήθη κολύμβηση με τη συνεχή κίνηση του 2ου κοντύτερου ζεύγους κεραιών μαζί με τη βοήθεια των στοματικών εξαρτημάτων. Για τις απότομες κινήσεις-τινάγματα των κωπηπόδων ενεργοποιούνται τα ζεύγη των θωρακικών ποδών με ταχύτατες παλμικές κινήσεις.

Αναπαραγωγή των κωπηπόδων

Τα Κωπήποδα είναι γονοχωριστικά, η ωοθήκη που φέρουν τα θηλυκά είναι σε άλλα είδη μονή, σε άλλα σε ζεύγος. Οι ωαγωγοί απολήγουν στην κοιλιακή επιφάνεια του πρώτου μεταμερούς (δηλαδή σωμίτης), που βρίσκεται στο ουρόσωμα. Το εν λόγω τμήμα περιέχει ένα ζεύγος από σπερματοθήκες. Σε γενικές γραμμές η σπερματοθήκη και ο ωαγωγός διασυνδέονται. Για την περίπτωση των αρσενικών κωπηπόδων (καλανοειδή και αρπακτικοειδή) χρησιμοποιείται ο ένας μοναδικός όρχις που υπάρχει σε μόνο μια μεριά του σώματος. Ο όρχις περιλαμβάνει σπερματοφόρα κύτταρα (δηλαδή μια μάζα από σπέρμα) κατάλληλα διαμορφωμένη. Το σύνολο των σπερματοφόρων κύτταρων προορίζεται για την μεταφορά του στις ωοθήκες του θηλυκού στελέχους κατά τη διαδικασία της συνουσίας. Και στα αρσενικά επίσης ο πόρος του σπερματογωγού βρίσκεται στο πρώτο μεταμερές (σωμίτης) του ουροσώματος

Το αρσενικό αρπάζει το θηλυκό με την βοήθεια των διαμορφωμένων κεραιών του πρώτου ζεύγους (Σχήματα 9 & 10). Γενικώς τα αρσενικά διαθέτουν εξειδικευμένα εξαρτήματα ώστε να επιτευχθεί ο στόχος σύλληψης του θηλυκού και η μεταφορά σπερματοφόρου υλικού σε αυτό. Σε γενικές γραμμές η συνήθης συμπεριφορά των αρσενικών επικεντρώνεται στο κυνήγι του θηλυκού και μετέπειτα στη σύλληψή του. Η συγκεκριμένη πρακτική γίνεται με την χρήση του πρώτου ζεύγους κεραιών, στην συνέχεια το ζεύγος των κωπηπόδων (αναπαραγωγικά συζευγμένα) κολυμπούν για ένα εύλογο χρονικό διάστημα, μέχρι την στιγμή που μετατοπίζονται και έρχονται σε επαφή οι κοιλιακές τους επιφάνειες, και αυτό επιτυγχάνεται με την βοήθεια του πέμπτου ποδιού του αρσενικού κωπηπόδου. Οι κοιλιακές χώρες συνδέονται με το απέναντι πόδι του αγκιστροειδούς από το πέμπτο ζεύγος ποδιών να εξυπηρετεί στην εναπόθεση του σπερματοφόρου υλικού στον πόρο του ωαγωγού όπου εκεί υπάρχει ένας χώρος που χρησιμεύει ως αποθήκη, δηλαδή μια σπερματοθήκη. Με το πέρας της αναπαραγωγικής δραστηριότητας, το ζεύγος κωπηπόδων απαγκιστρώνεται. Και τέλος

ακολουθεί από τα θηλυκά η δυνατότητα γονιμοποίησης των παραγόμενων ωοκυττάρων του με το σπέρμα του αποθηκευμένου περιεχομένου του σπερματοφόρου υλικού.



Σχήμα 9. Ζεύγος κωπηπόδων γένους *Tigriopus* σε αναπαραγωγική δραστηριότητα, με το αρσενικό κωπήποδο να έχει αγκιστρωθεί στο θηλυκό με την βοήθεια του πρώτου ζεύγους κεραιών (φωτογρ. Γ. Χώτος).



Σχημα 10. Ζεύγος κωπηπόδων γένους *Tisbe* σε αναπαραγωγική

δραστηριότητα, με το αρσενικό κωπήποδο να έχει αγκιστρωθεί στο θηλυκό με την βοήθεια του πρώτου ζεύγους κεραιών (φωτογρ. Γ. Χώτος)..

Αναπαραγωγική διαδικασία στα αρπακτικοειδή κωπήποδα

Τα κωπήποδα γονιμοποιούνται αμφιγονικά και η σεξουαλική συμπεριφορά τους παρουσιάζει ορισμένα πρότυπα τα οποία περιγράφουν όσον αφορά τα αρπακτικοειδή κωπήποδα το άρπαγμα του θηλυκού από το αρσενικό και την μετέπειτα γονιμοποίηση των αυγών. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αναπαραγωγή, πρέπει το θηλυκό να δεχτεί τη συνουσία και αυτό προκύπτει από ορμονικά σημάδια που υποδηλώνουν ότι βρίσκονται σε οίστρο και αποδέχονται την αναπαραγωγή. Πιο συγκεκριμένα, σχετικά με τα καρκινοειδή και πιο ειδικά τα κωπήποδα, η συνουσία περιλαμβάνει ένα μακρύ ή βραχύ στάδιο που συνίσταται στο γράπωμα του θηλυκού από το αρσενικό, και την κολύμβηση ανά ζεύγη (Σχήματα 9 & 10), που η διάρκειά της μπορεί να επεκταθεί και μια εβδομάδα μέχρι και περισσότερο χρόνο, και ενδεχομένως χωρίς να παραχθεί ένα ουσιαστικό αποτέλεσμα, δηλαδή η μεταφορά σπέρματος.

Προτού το αρσενικό και θηλυκό στέλεχος γίνουν ζευγάρι, εκτελείται μια περίπλοκη διεργασία πολιορκίας από το αρσενικό στέλεχος με αποδέκτη το θηλυκό που μπορεί να έχει μεγάλη διάρκεια, και εν τούτοις να μην καταλήξει στο ζευγάρωμα. Τα θηλυκά στα οποία το ζευγάρωμα είναι ανεπιτυχές, είναι θηλυκά που είτε δεν είναι ακόμα έτοιμα να δεχτούν τη συνουσία, είτε έχει προηγηθεί η μεταφορά γενετικού υλικού από κάποιο αρσενικό κωπήποδο προς το συγκεκριμένο θηλυκό. Όλη αυτή η διαδικασία, εξαρτάται από κάποιες χημικές ουσίες που εκκρίνονται από το σώμα του θηλυκού στελέχους. Όταν σχηματίσουν ζεύγος για την κολύμβηση, η οποία δεν στηρίζεται σε κάποιο πρότυπο, το αρσενικό μεταφέρει το σπέρμα του (σε μορφή σπερματοφόρου σάκου) στην σπερματοθήκη του θηλυκού και εκεί το εναποθέτει.

Εφόσον το γενετικό υλικό του αρσενικού κωπήποδου βρίσκεται στη διάθεση του θηλυκού, το θηλυκό αποφασίζει αν θα χρησιμοποιήσει ένα μέρος ή όλο το σπέρμα, είτε για να αναπαράγει μια και μοναδική γενιά ωοκυττάρων (αβγά), είτε συνεχείς γενιές αυγών. Αυτό παρατηρήθηκε με τη μελέτη καλλιέργειών που έγιναν στο εργαστήριο καλλιέργειας πλαγκτού και στα δύο είδη, δηλαδή στο γένος *Tisbe* και στο γένος *Tigriopus*, τα θηλυκά φτιάχνουν έναν ωόσακκο (με τα αβγά που έχουν γεννήσει) αρκετές φορές και το περιεχόμενο του κάθε ωόσακκου να απορρίπτεται πρώτα με την εκκόλαψη των ναυπλίων και με το πέρας των ημερών (σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και οι συνθήκες που υφίστανται) να δημιουργείται ένας νέος ωόσακκος.

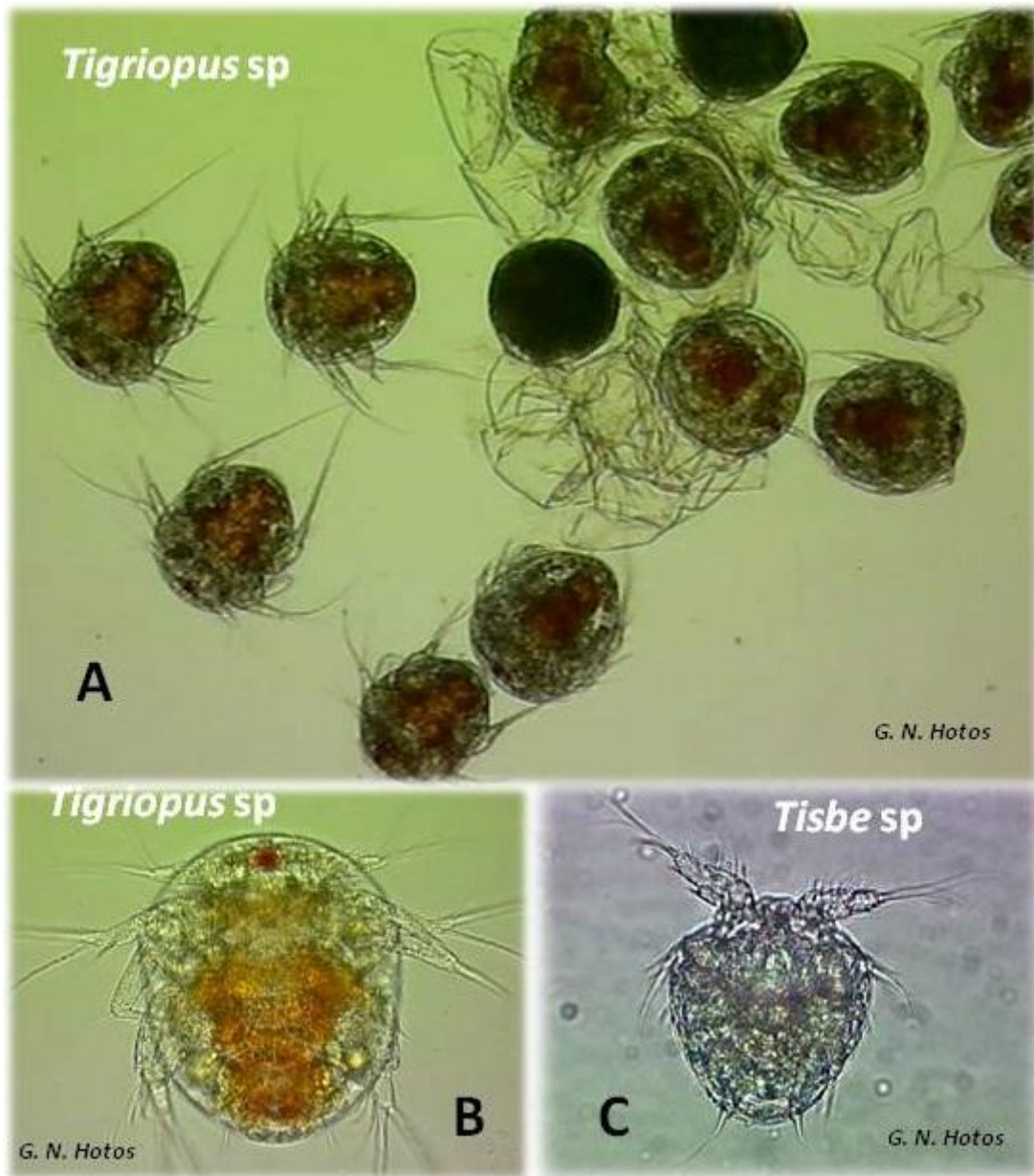
Η μακράς διάρκειας πολιορκία του θηλυκού από το αρσενικό στερεί από το αρσενικό στέλεχος την ευκαιρία να κινηθεί προς άλλα θηλυκά για να τα γονιμοποιήσει, και ειδικότερα αν λάβουμε υπόψιν το σύντομο διάστημα διαβίωσης των κωπήποδων (2-3 μήνες), αυτή η κατάσταση από τη σκοπιά της εξέλιξης είναι περίεργη. Μπορούν να διατυπωθούν διάφοροι είδους υποθέσεις που να δικαιολογούν αυτή την κατάσταση όπως λόγου χάριν ότι τα θηλυκά αναπαράγονται για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και η μακράς

διαρκείας πολιορκία του θηλυκού από το αρσενικό, διασφαλίζει ότι η αναπαραγωγή θα πραγματοποιηθεί στην κατάλληλη ώρα. Αν το θηλυκό, αναπαράγεται μία και μοναδική φορά η μακράς διαρκείας σύλληψη, σημαίνει ότι το αρσενικό κωπήποδο εντόπισε το θηλυκό που επιθυμεί να γονιμοποιήσει αρπάζοντας το κάποια στιγμή για να το γονιμοποιήσει στα σίγουρα και προτιμά να αναλώσει χρόνο στο συγκεκριμένο κωπήποδο, παρά το να ψάχνει άλλα θηλυκά τα οποία έχουν ήδη γονιμοποιηθεί, άρα καθίστανται μη διαθέσιμα. Εκτός από αυτά, ανακύπτουν και άλλα διάφορα ερωτήματα αλλά απαιτούν πολύ χρόνο και πολλά πειράματα για να έχουμε μια ξεκάθαρη συνολική εικόνα. Πιο συγκεκριμένα, ένα αρσενικό που κυνήγησε ένα θηλυκό κολύμπησαν ανά ζεύγος για μεγάλη χρονική περίοδο και ύστερα το γονιμοποίησε, επαναλαμβάνει το ίδιο και με άλλο ή άλλα θηλυκά;. Στα κωπήποδα που καλλιεργούνται στο εργαστήριο, διακρίθηκαν δύο τύποι ζευγαρώματος. Ο πρώτος τύπος καθοριζόταν από ένα αρσενικό να έχει αρπάξει ένα ενήλικο θηλυκό (το οποίο μπορεί να είναι μεγαλύτερου μεγέθους από το αρσενικό), ενώ ο δεύτερος τύπος συνίσταται στο αρσενικό να έχει συλλάβει ένα ανώριμο θηλυκό, που βρίσκεται στο στάδιο του κωπηποδίτη. Το στάδιο του κωπηποδίτη που συνελήφθη από το αρσενικό παρουσιάζει ποικιλομορφία από το νεαρό στάδιο C2 ως και το τελικό στάδιο C5. Τα θηλυκά, κατά τη διαδικασία της σύλληψής τους υφίστανται όλες τις συνεχείς εκδύσεις ώσπου να ολοκληρώσουν την τελική τους έκδυση και να περάσουν στο τελευταίο στάδιο C6 στο οποίο γίνονται ενήλικα πλέον άρα είναι ικανά να δεχτούν γονιμοποίηση. Αυτή η διαδικασία της γονιμοποίησης αποβλέπει στη διασφάλιση της γονιμοποίησης του θηλυκού άρα αξίζει η ενασχόληση του αρσενικού με το θηλυκό. Ο χρόνος που ξοδεύεται για αυτό διαφοροποιείται ανάλογα με τη φάση ανάπτυξης του θηλυκού. Ο χρόνος κυμαίνεται από λίγες ώρες όταν έχουμε ενήλικο θηλυκό ως και περισσότερο από μια εβδομάδα αναφορικά με τον θηλυκό κωπηποδίτη σταδίου C2 ή C3.

Τα ώριμα ωοκύτταρα του θηλυκού γονιμοποιούνται από τη μεταφορά του σπέρματος από το αρσενικό στο θηλυκό όταν διέρχονται και εξέρχονται από το άνοιγμα του ωαγωγού δηλαδή εκεί που βρίσκεται η σπερματοαποθήκη. Το αποτέλεσμα είναι να απελευθερώνονται στο υδρόβιο περιβάλλον ως γονιμοποιημένα αβγά και όταν εκκολάπτονται (Σχήμα 11) απελευθερώνουν πλαγκτονικούς ναυπλίους. Αυτό παρατηρείται σε συγκεκριμένα είδη, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό των κωπηπόδων αποτελείται από είδη στα οποία τα θηλυκά στελέχη μαζεύουν τα γονιμοποιημένα αβγά που εξέρχονται από τον ωαγωγό και τα εναποθέτουν σε έναν υμενώδη σάκκο (δημιουργημένος από εκκρίσεις του ωαγωγού) ο οποίος είναι εξαρτημένος από τη μητέρα (ο ωόσακκος) (Σχήματα 12 & 13). Στο εσωτερικό του ωόσακκου τα αβγά αναπτύσσονται και έπειτα (ύστερα από 12 ώρες ή ημέρες ανάλογα του είδους), υφίστανται ταυτόχρονη ή σταδιακή εκκόλαψη και ο ωόσακκος διαλύεται. Ορισμένα είδη κωπηπόδων όταν δημιουργούν ωόσακκο τον απορρίπτουν μέσα στο νερό. Με το πέρασ των ημερών το συγκεκριμένο θηλυκό είναι δυστόν να δημιουργήσει ξανά ωόσακκο με καινούργια γενιά

αβγών που έχουν γονιμοποιηθεί και αυτή η διαδικασία μπορεί να γίνει ξανά και ξανά πολλές φορές. Κάθε φορά, η νέα γενιά αβγών αναπαράγεται από το σπέρμα που χρησιμοποιείται από τη σπερματοπαθήκη του θηλυκού το οποίο μεταφέρθηκε από το αρσενικό στέλεχος.

Με βάση το είδος του κωπηπόδου που εξετάζουμε, κάθε ένας ωόσακκος περιλαμβάνει μια γενιά αβγών που αποτελείται από 20 με 60 με μεγάλη ποικιλομορφία στα είδη. Τα χαρακτηριστικά του κάθε ωόσακκου απορρέουν από το συγκεκριμένο είδος κωπηπόδων. Το μεγαλύτερο ποσοστό των αρπακτικοειδών εμφανίζουν έναν ωόσακκο, τα κυκλωποειδή 2 ωοσάκκους (με εξαίρεση κάποια που διαθέτουν έναν) και τέλος τα καλανοειδή 1 ή 2 ωοσάκκους λαμβάνοντας υπόψιν τον συνολικό αριθμό των ωαγωγών που διαθέτει το είδος. Στα είδη των καλανοειδών και αρπακτικοειδών κωπηπόδων που ζουν στα γλυκά νερά, όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος δεν είναι ευνοϊκές (για παράδειγμα όταν στερεύει κάποια λίμνη) τα αβγά προστατεύονται από σκληρό χόριο και αποτίπτουν σε λαθροβίωση για μεγάλη χρονική περίοδο ώστε να εκκολαφθούν όταν το κοίλωμα γεμίσει ξανά νερό. Μερικά από τα κωπήποδα που ζουν στα γλυκά νερά ακολουθούν παρεμφερή διαδικασία με την προαναφερόμενη για να είτε τους κωπηποδίτες, είτε τα ενήλικα παράγοντας μια ουσία που καλύπτει το σώμα τους και εγκυστώνονται με ελάχιστη σπατάλη ενέργειας σε φάση αδρανοποίησης. Αυτές οι αδρανοποιημένες μορφές που έχουν παγιδευτεί στη λάσπη της λίμνης που έχει αδειάσει από νερό, είναι δυνατόν να μετοικήσουν σε άλλα οικοσυστήματα μέσω της μεταφοράς τους από τη λάσπη που κολλάει στα πόδια των πτηνών. Όταν βρεθούν στο υδρόβιο περιβάλλον ενυδατώνονται, η κύστη καταστρέφεται και έτσι ο οργανισμός συνεχίζει να διαβιεί στο καινούργιο περιβάλλον.



Σχημα 11. Α. Απελευθερωμένα γονιμοποιημένα αυγά και νεο-εκκολαφθέντες ναύπλιοι του γένους *Tigriopus*. **Β.** Ναύπλιος σταδίου N1 *Tigriopus*. **Γ.** Ναύπλιος σταδίου N1 *Tisbe*. (φωτογρ. Γ. Χώτος).



Σχήμα 12. Απεικόνιση ενός θηλικού κωπηπόδου με αναπτυγμένο ωόσσακο του γένους *Tigriopus* (φωτογρ. Γ. Χώτος).



Σχήμα 13. Απεικόνιση ενός θηλικού κωπηπόδου με αναπτυγμένο ωόσσακο του γένους *Tisbe* (φωτογρ. Γ. Χώτος).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γενικές πληροφορίες επί των πειραματισμών

Η πειραματική διαδικασία της παρούσας διπλωματικής χωρίζεται σε 3 ενότητες. Η πρώτη ενότητα αφορά τη μελέτη της γονιμότητας των 2 ειδών των εξεταζομένων κωπηπόδων σε συνθήκες τυπικού θαλασσινού νερού (35-37 ppt). Η δεύτερη την αντοχή τους στις απότομες αλλαγές της αλατότητας και η τρίτη στην επίδραση των διαφορετικών τύπων τροφής (φυτοπλαγκτόν) στην παραγωγή απογόνων σε ένα ορισμένο διάστημα. Χάριν συντομίας εντεύθεν τα 3 αυτά διαφορετικά πειράματα θα ονομάζονται.

1. Πείραμα γονιμότητας

2. Πείραμα αντοχής στην αλατότητα

3. Πείραμα επίδρασης τύπου τροφής

Ο γενικός σκοπός που διέπει την όλη πειραματική διαδικασία είναι να αποκτηθεί χρήσιμη γνώση για την εκμετάλλευση αυτών των γενών κωπηπόδων σε υδατοκαλλιεργητικές δραστηριότητες που εστιάζονται στη διατροφή των πρώτων σταδίων των εκτρεφόμενων ειδών (ψάρια κυρίως αλλά και γαρίδες) με την κατάλληλη ζωντανή τροφή. Από ποικίλες πηγές της βιβλιογραφίας τόσο της επιστημονικής όσο και της ερασιτεχνικής ή διαφημιστικής-εμπορικής, έχει βρεθεί ότι τα αρπακτικοειδή κωπήποδα και ιδίως αυτά των γενών *Tisbe* και *Tigriopus* προσφέρονται για μαζική καλλιέργεια. Γενικώς τα αρπακτικοειδή κωπήποδα φαίνεται να υπερέχουν ως προς την πρακτικότητα της διαδικασίας της καλλιέργειάς των συγκριτικά με τα καλανοειδή και τα κυκλωποειδή. Αν και δεν υπάρχουν σαφείς μελέτες που να καταδεικνύουν επιστημονικώς κάτι τέτοιο φαίνεται ότι ο τρόπος της ζωής όλων αυτών των κωπηπόδων είναι που κυβερνά την αποδοτικότητα της καλλιέργειάς των. Έτσι ενώ τα καλανοειδή και τα κυκλωποειδή είναι πλαγκτονικά και διασπείρονται στη στήλη του νερού, τα αρπακτικοειδή συγκεντρώνονται κατά βάση στον πυθμένα ενώ συνάμα καταλαμβάνουν και τη στήλη του νερού. Από πρακτική άποψη αυτό σημαίνει ότι τα αρπακτικοειδή επωφελούνται και από την ιζηματοποιημένη οργανική μάζα τροφής και από αυτή που αιωρείται ενώ τα καλανοειδή και κυκλωποειδή μπορούν να καταναλώσουν μόνο αιωρούμενη τροφή. Επιπροσθέτως ακόμα και οργανική ύλη σε αποσύνθεση στον πυθμένα μπορεί να καταναλωθεί από τα αρπακτικοειδή αν και δεν είναι γνωστό σε τι βαθμό και μέχρι ποίου σημείου αποσύνθεσης μπορεί αυτή η οργανική ύλη να πεφθεί. Ένας άλλος παράγοντας που κάνει τα αρπακτικοειδή πιο χρήσιμα για κατανάλωση ως ζωντανή τροφή από τις λάρβες των ψαριών, είναι η πιο ομαλή κινητικότητά τους συγκριτικά με τα καλανοειδή και τα κυκλωποειδή καθ' όλα τα οντογενετικά τους στάδια. Είτε για ναύπλιους πρόκειται, είτε για μεταναύπλιους, είτε για ενήλικα, η όλη κινητικότητα των αρπακτικοειδών είναι κατά πολύ ασθενέστερη των καλανοειδών και κυκλωποειδών. Όλα τα κωπήποδα βέβαια χαρακτηρίζονται από απότομα τινάγματα κατά την κίνησή τους αλλά ενώ τα τινάγματα αυτά είναι πολύ απότομα και δυνατά μετακινώντας το ζώο κατά πολλές φορές το μήκος του σώματός του στα

καλανοειδή και κυκλωποειδή, στα αρπακτικοειδή τα τινάγματα είναι πολύ ηπιότερα, δεν μετακινούν το ζώο σε μεγάλη απόσταση κάθε φορά και επιπλέον η όλη κίνησή τους είναι κατά κάποιο τρόπο συνεχής δίδοντας την εικόνα μάλλον σταθερής κολυμβητικής κατάστασης παρά τινάγματος διαφυγής. Όπως είναι ευνόητο η ηπιότερη κολυμβητική συμπεριφορά των αρπακτικοειδών προσφέρει καλύτερες δυνατότητες σύλληψης των από τους επιθυμητούς θηρευτές των όπως είναι οι ασθενικές και μικρής κινητικότητας λάρβες των ψαριών στα θαλάσσια ιχθυοεκκολαπτήρια. Έχοντας λοιπόν ξεκαθαρίσει το αντικείμενο της ερευνητικής εργασίας ως τα γνωστότερα αρπακτικοειδή κωπήποδα *Tigriopus* και *Tisbe*, το βασικότερο στοιχείο για τη διατήρηση, αύξηση και εκπλήρωση των βιολογικών τους δραστηριοτήτων ήταν η επιλογή του τύπου της τροφής των. Ως διατροφικό υπόστρωμα επιλέχθηκε το φυτοπλαγκτόν μια και μπορεί αφενός να προσληφθεί διηθητικώς από τα κωπήποδα και επιπλέον ιδιαίτερα για τα αρπακτικοειδή μπορεί να προσληφθεί και από το ίζημα (όποια μάζα από αυτό έχει καθιζάνει) λόγω της μοναδικής ικανότητάς των να συλλέγουν (συλλαμβάνουν) και μη αιωρούμενα οργανικά σωματίδια. Επιπλέον το φυτοπλαγκτόν αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της παραγωγικής διαδικασίας στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς των θαλασσινών ψαριών και λόγω του ότι καλλιεργείται συστηματικά στο οικείο εργαστήριο καλλιέργειας πλαγκτού αποτελεί πρόσφορη και συνεχώς διαθέσιμη τροφή για τα κωπήποδα. Δοκιμάστηκαν ποικίλα είδη καλλιεργούμενων μικροφυκών των οποίων η παραγωγή ήταν συνεχής και συνεπώς στην καλύτερη δυνατή κατάσταση σύστασης, συλλεγόμενα κάθε φορά κατά την εκθετική φάση αύξησης βάσει μετρήσεων της πυκνότητας καλλιέργειας όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Η επιλογή του φυτοπλαγκτού ως διατροφικό μέσο των κωπηπόδων έγινε και για λόγους υγιεινότερου περιβάλλοντος μια και ποικίλες άλλες τροφές που απαντώνται στη βιβλιογραφία όπως π.χ. λειοτριβημένα μακροφύκη ή μαγιές τείνουν να υποβαθμίζουν (βρωμίζουν) τάχιστα το περιβάλλον καλλιέργειας κάτι ανεπιθύμητο στις ειδικές συνθήκες μικροπεριβάλλοντος που δημιουργήσαμε για τους πειραματισμούς μας. Ένα άλλο πρόβλημα που θαλήσαμε να ξεπεράσουμε ήταν αυτό του ελέγχου των καλλιέργειών των κωπηπόδων ήτοι του ακριβούς αριθμού των στο εκάστοτε δοχείο τόσο ως προς τον αριθμό των ενήλικων ατόμων όσο και των ναυπλίων. Επιπλέον να καταμετρώνται καθημερινώς τα θηλυκά που φέρουν ωόσακκο, τα υπάρχοντα ζεύγη, τα νεκρά άτομα και οι ωόσακκοι που ενίοτε αποκολλώνται από το σώμα του θηλυκού. Όλες αυτές οι καταγραφές σε καθημερινή βάση απαιτούν πλήρη κατόπτευση του περιβάλλοντος εγκλεισμού και κάτι τέτοιο είναι αδύνατον να γίνει σε δοχεία καλλιέργειας των 20, 50, 100 ml πόσο μάλλον σε μεγαλύτερα των 250, 500 ή 1000 ml. Σε τέτοιους όγκους νερού μόνο αρκετές δειγματοληψίες μπορούν να δώσουν αξιόπιστη εικόνα του τι συμβαίνει στο δοχείο κάτι που κατά τη γνώμη μας στρεσάρει και αναστατώνει τον πληθυσμό. Επιπλέον στην περίπτωση των αρπακτικοειδών κωπηπόδων όπου μεγάλο μέρος του πειραματικού πληθυσμού και ιδιαίτερα οι ναύπλιοι είναι συγκεντρωμένοι στον πυθμένα, η λήψη δείγματος από τη στήλη του νερού δεν θεωρείται αξιόπιστη παρά μόνο μετά από ισχυρή ανάδευση του

δοχείου κάτι που από την προκαταρκτική εμπειρία μας αναστατώνει τον πληθυσμό και καταστρέφει το χρήσιμο οργανικό στρώμα ιζήματος μέσα στο οποίο τα αρπακτικοειδή κωπήποδα βοσκούν και ηρεμούν (χαρακτηριστικό αποκλειστικώς των αρπακτικοειδών). Ετσι επιλέξαμε να διατηρούμε τον υπό πειραματικούς χειρισμούς εκάστοτε πληθυσμό σε μικροδοχεία με όγκο νερού 4 ml που είχαν αποδειχθεί από προκαταρκτικές προσπάθειες απόλυτα επαρκή για την διαβίωση των ζώων. Ετσι το κάθε μικροδιαμέρισμα των 5 ml (με 4 ml νερού) των πολυθάλαμων (25 μικροδιαμερίσματα) πλαστικών πλακών προσέφερε επιπλέον και πολλά αντίγραφα της κάθε πειραματικής συνθήκης κάτι επιθυμητό από στατιστική άποψη.

Περι ταυτοποίησης των κωπήπόδων

Τα κωπήποδα που χρησιμοποιήθηκαν στους πειραματισμούς της παρούσας εργασίας ανήκαν στην τάξη των αρπακτικοειδών διότι παρουσίαζαν όλα τα χαρακτηριστικά της τάξης αυτής που τη διαφοροποιεί από τις άλλες (Fenwick, 2007). Δηλαδή κοντές κεραίες του 1^{ου} ζεύγους το μήκος των οποίων δεν ξεπερνά τον κεφαλοθώρακα, ευρύ ουρόσωμα που ενώνεται με το μετάσωμα ομαλά χωρίς απότομη στένωση και ένα μόνο ωόσακκο (όχι ζεύγος ωόσακκων). Τα χρησιμοποιηθέντα είδη συλλέχθηκαν στις ακτές της λιμνοθάλασσας Μεσολογίου με μεταφορά στο εργαστήριο βυθισμένου στο νερό υλικού ήτοι πέτρες και κομμάτια θαλάσσιων αγγειοσπέρμων (*Zostera*) μαζί με ποσότητα νερού και κατόπιν εξέτασης και διαλογής τους κάτω από στερεοσκόπιο μεταφέρθηκαν με πιπέτα σε δοχεία καλλιέργειας. Εχοντας ως οδηγό ποικίλες κλείδες αναγνώρισης κωπήπόδων (Rose, 1933; Shiel, 1995; Stoch, 2007) καταλήξαμε στο ότι ανήκαν στο γένος *Tisbe* και στο γένος *Tigriopus*. Η μεγαλύτερη δυσκολία ήταν η ταυτοποίηση του είδους καθώς δεν υπάρχουν εύκολες στη χρήση κλείδες. Μόνο η μοριακή ταυτοποίηση με γενετικούς δείκτες θα μπορούσε να δώσει σίγουρη απάντηση όμως τέτοια δυνατότητα δεν υπήρχε. Από την εξέταση της σχετικής βιβλιογραφίας (Humes, 1957; Ranade, 1957; Bozic, 1960; Fava & Volkmann, 1975; Bergmans, 1983; Carli & Grisafi, 1983) πιθανολογούμε ότι πρόκειται για το *Tisbe holothuriae* και το *Tigriopus fulvus*. Για το *Tisbe holothuriae* υπάρχει αρκετή σύγχυση καθώς υπάρχουν αρκετά συμπατρικά είδη (Volkmann-Rocco, 1972b, 1979b) με τα θηλυκά πρακτικά πανομοιότυπα. Μόνο τα αρσενικά μπορούν να αναγνωριστούν σχετικά εύκολα καθώς στο *Tisbe holothuriae* το πρώτο ενδοποδικό τμήμα του πόδα P2 φέρει ένα χαρακτηριστικό τροποποιημένο τριχοειδές το οποίο διακρίναμε στο στερεοσκόπιο αν και με μεγάλη δυσκολία. Καθώς δεν επιθυμούμε να υπεισέλθει και ο παραμικρός λανθασμένος χαρακτηρισμός του είδους, προτιμήσαμε σε όλη την εργασία να αναφερόμαστε στο κάθε είδος μόνο με το όνομα του γένους ήτοι *Tisbe* και *Tigriopus* δεδομένου ότι απ' ότι αναγράφεται στη βιβλιογραφία υπάρχει αρκετή διαφοροποίηση μεταξύ των δύο γενών αφενός και αφετέρου αυτό που πρωτίστως μας ενδιέφερε ήταν να δούμε το πως τα δύο αυτά γένη ανταποκρίνονται στους διάφορους χειρισμούς.

Αποθεματικές καλλιέργειες

Για κάθε πείραμα και για τα δύο είδη κωπηπόδων ο εκάστοτε απαιτούμενος αριθμός ατόμων ή τα φέροντα ωόσακκο θηλυκά ή τα ζεύγη των αναπαραγόμενων κωπηπόδων προέρχονταν από αποθεματικές καλλιέργειες οι οποίες διατηρούνταν στο εργαστήριο σε βέλτιστες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, αρχικά κάθε πληθυσμός κάθε είδους κωπηπόδων διατηρούνταν σε γυάλινα κυλινδρικά δοχεία του 1 L γεμισμένα με 850 ml νερό αλατότητας 37 ppt σε θερμοκρασία και φωτισμό δωματίου (~19 °C και ~500 lux αντίστοιχα) με καθημερινή παροχή μικρής αλλά επαρκούς συγκεντρωμένου από φυγοκέντρωση (πάστα) μίγματος φυτοπλαγκτού (*Tetraselmis*, *Rhodomonas*, *Isochrysis*, *Dunaliella*, *Asteromonas*), από τα είδη δηλαδή που καλλιεργούνταν στο εργαστήριο και τα οποία συλλέγονταν για να δοθούν στα κωπήποδα όταν βρίσκονταν στην εκθετική φάση αύξησης. Προτιμήθηκε να δίδεται μίγμα φυτοπλαγκτού προκειμένου να μειωθεί στον ελάχιστο δυνατό βαθμό η πιθανή διατροφική ανεπάρκεια κάποιου από αυτά αν δίδονταν μόνο αυτό. Από τη διεθνή βιβλιογραφία λείπουν τα κατάλληλα στοιχεία που να προκρίνουν ένα είδος φυτοπλαγκτού ως το καλύτερο για την ανάπτυξη των συγκεκριμένων κωπηπόδων συνεπώς το μίγμα επιλέχθηκε ως η καλύτερη πρακτική θρέψης. Ο έλεγχος της αύξησης των παραπάνω φυτοπλαγκτονικών ειδών δίδεται στο παράρτημα στο τέλος της διατριβής.

Αυτή η πρακτική θρέψης των κωπηπόδων αποδείχτηκε επιτυχής καθώς στο κάθε δοχείο αποθεματικής καλλιέργειας αναπτύχθηκε και σταθεροποιήθηκε ένας πυκνός πληθυσμός κωπηπόδων με έντονη κινητικότητα και αποτελούμενος από κάθε τύπο ατόμων και οντογενετικού σταδίου (ναύπλιοι, μεταναύπλιοι, ενήλικα αρσενικά και θηλυκά, θηλυκά με ωόσακκο, ζεύγη αναπαραγωγής). Η διατήρηση του υγιούς πυκνού πληθυσμού ήταν εύκολη και διατηρήθηκε ακμαίος για 35 ημέρες. Κατόπιν άρχισε να μειώνεται και να μειώνεται η αναλογία των θηλυκών που έφεραν ωόσακκο. Προφανώς η αύξηση του ρυπαντικού φορτίου του νερού υποβάθμιζε σταδιακά την καλλιέργεια. Σε τέτοιες καταστάσεις όλη η μάζα των κωπηπόδων φιλτράρονταν με νάυλον δίχτυ πόρων διαμέτρου 145 μm και τα συλλεγόμενα κωπήποδα τοποθετούνταν σε φρέσκο φιλτραρισμένο νερό. Με το φιλτράρισμα αυτό απομακρύνονταν συνάμα και όσα βλεφαριδωτά πρωτόζωα *Euplotes* είχαν παρεισφύσει και πολλαπλασιαστεί στο δοχείο.

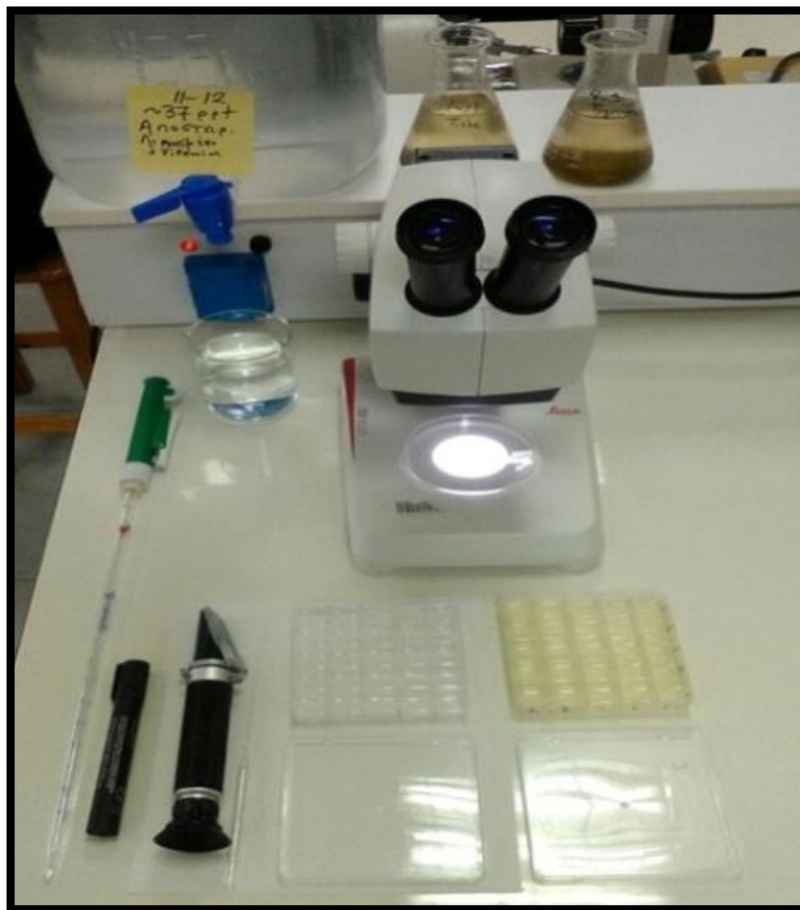
Από το δοχείο της αποθεματικής καλλιέργειας λαμβάνονταν όταν παρίστατο ανάγκη ποσότητες των 10 ml με τη χρήση κατάλληλης γυάλινης πιπέτας από τις οποίες μετά από έλεγχο του περιεχομένου τους στο μικροσκόπιο λαμβάνονταν τα κωπήποδα που απαιτούνταν στα πειράματα. Ειδικότερα λαμβάνονταν με αυτό τον τρόπο τα ενήλικα κωπήποδα (χωρίς ωόσακκο) που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα αντοχής στην αλατότητα και τα αβγομένα θηλυκά που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα επίδρασης του τύπου της τροφής. Για το πείραμα της γονιμότητας ακολουθήθηκε άλλη τακτική που συνίστατο στη λήψη ζευγαριών και την τοποθέτησή τους σε

πολυθάλαμες πλάκες (plates) με ένα ζεύγος σε κάθε κυψελίδα από τις 25 που υπάρχουν στον κάθε θάλαμο (Σχήμα 16). Και στην περίπτωση των θαλάμων προστίθετο μίγμα συμπυκνωμένου φυτοπλαγκτού (0,2 ml κάθε 3 ημέρες). Σε κάθε περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν οι τετράγωνες πλαστικές διαφανείς πολυθάλαμες πλάκες των 25 διαμερισμάτων, αυτές σημάνθηκαν καταλλήλως με μαρκαδόρο στις εξωτερικές τους πλευρές υπό τύπου κανάβου με τα γράμματα A, B, C, D, E ανά διαμέρισμα σε μία πλευρά και με τα νούμερα 1, 2, 3, 4, 5 στη γειτονική πλευρά. Ετσι έγινε κατορθωτό να καταγράφονται αποτελεσματικά τα αποτελέσματα στο κάθε διαμέρισμα το καθένα από τα οποία αποτέλεσε μία επανάληψη της εκάστοτε συνθήκης.

Εργαστηριακές συνθήκες και χειρισμοί του ζωντανού υλικού

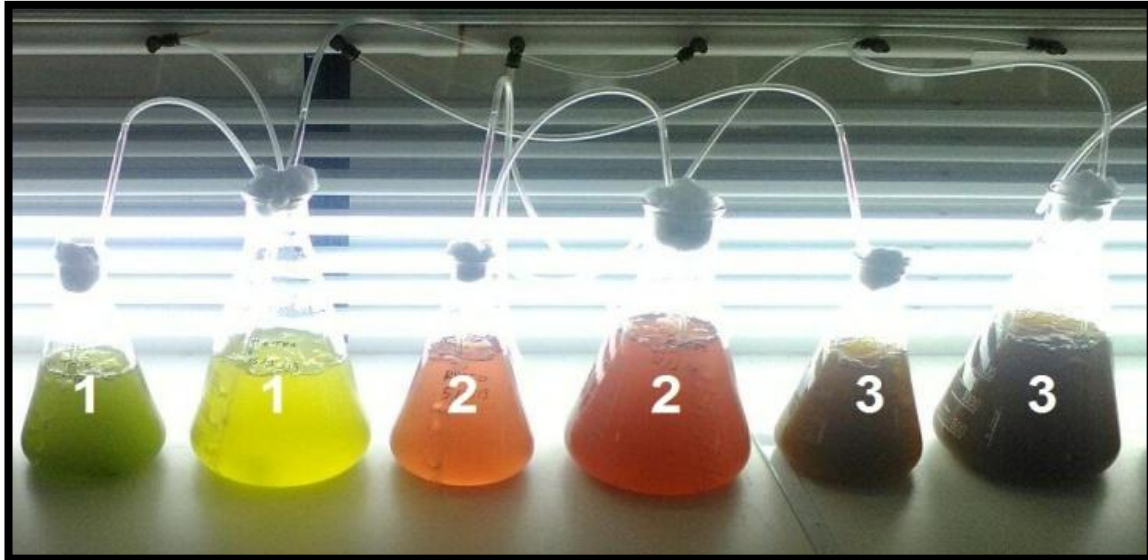
Τα κωπήποδα γενών *Tigriopus* & *Tisbe* συλλέχθηκαν με την βοήθεια πλαγκτονικής απόχης, με άνοιγμα ματιού 90 μm, στην ευρύτερη περιοχή της λιμνοθάλασσας Μεσολογίου, κατά τη χρονική περίοδο του Απριλίου, του 2017. Τα προαναφερόμενα είδη απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς σε επίπεδο γένους. Επακολούθησε ομαλός εγκλιματισμός στις σταθερές συνθήκες του εργαστηρίου, ενώ δεν σημειώθηκαν σημαντικές θερμοκρασιακές διακυμάνσεις, (ήταν δηλαδή σταθερά στους 19° βαθμούς). Το υγρό μέσο διαβίωσης των ζώων, ήταν αποστειρωμένο, υφάλμυρο νερό με αλατότητα που δεν ξεπερνούσε τα 37 ppt (δηλαδή όπως και οι τιμές της αλατότητας της λιμνοθάλασσας Μεσολογίου). Η διατροφή των κωπηπόδων βασίστηκε στους φυτοπλαγκτικούς οργανισμούς *Rhodomonas salina*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*. Οι ποικιλίες *Rhodomonas salina* & *Isochrysis galbana* έχουν χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν σε πειράματα διατροφής από αρκετούς ερευνητές, με αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα στην παραγωγή ναυπλίων όσο και κωπηπόδων (Drillet, 2003) Όσον αφορά τις υπόλοιπες ποικιλίες, *Asteromonas gracilis*, και *Dunaliella salina*, προσαρμόστηκαν σε αλατότητες 75 ppt, ώστε να αποφευχθούν προβλήματα ωσμωρύθμισης και χορηγήθηκαν και αυτές δοκιμαστικά ώστε να διαπιστωθεί η αποδοτικότητα τους τόσο σε παραγωγή ναυπλίων, όσο και για ανάπτυξη των κωπηπόδων. Τα αρπακτικοειδή κωπηπόδα κατα γενική ομολογία καλύπτουν τις ενεργειακές τους ανάγκες με διάφορα είδη τροφής. Δεν είναι λίγοι οι ερευνητές που κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιήσει ποικίλα είδη τροφών για την παραγωγή και ανάπτυξη των κωπηπόδων. Διαπιστώνεται από τον (Person Le Ruyet, 1975), ότι τα μονοκύτταρα φυτοπλαγκτονικά κύτταρα είναι ικανά να σιτίσουν σε ένα ικανοποιητικό βαθμό αρπακτικοειδή κωπήποδα γένους *Tisbe*. Στο διάστημα των 30 ημερών, ήταν εμφανής η αύξηση (επάρκεια ατόμων), των δύο υδροβίων πληθυσμών, με υψηλές συγκεντρώσεις ναυπλίων, κωπηποδιών, και ενήλικων κωπηπόδων. Το γεγονός αυτό υποδήλωνε μια σχετικώς εύρυθμη διαβίωση. Τα πειραματικά δοχεία ήταν τύπου πλακέτες μικρο-διαμερισμάτων (Σχήμα 16). Η διαχείριση των υδροβίων ζώων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συγκεκριμένου

εργαστηριακού υλικού (Σχήμα 14). Με τη χρήση στερεοσκοπίου & πιπέτας paster από τα δύο δοχεία μητρικών αποθεματικών καλλιεργειών των κωπηπόδων *Tigriopus* & *Tisbe*, συλλέχθηκε από ένα τυχαίο πυκνό δείγμα που τοποθετήθηκε σε δυο τρυβλία ξεχωριστά, από εκεί στοχεύονταν και απομονώθηκαν μόνο τα θηλυκά άτομα που έφεραν ωόσακκο. Στην πλακέτα μικρο-διαμερισμάτων, τόσο στα *Tigriopus* όσο και στα *Tisbe* χορηγήθηκε αποστειρωμένο αλατόνερο 35 ppt σε όλες τις κυψέλες. Τα αβγομένα υδρόβια ζώα τοποθετούνταν σε μια αριθμημένη κυψέλη μέχρι να συμπληρωθούν όλες οι θέσεις της πλακέτας. Όταν τα θηλυκά στελέχη εκκόλαψαν τους πρώτους ναυπλίους, τα αβγομένα θηλυκά απομονώνονταν και απομακρύνονταν από το διαμέρισμά τους τοποθετούμενα σε νέο. Αντίθετα οι ναύπλιοι συνέχιζαν ομαλά την διαβίωση εντός των πλακετών, μέχρι τη χρονική φάση της αναπαραγωγικής ωρίμανσης. Από εκείνη τη χρονική στιγμή και έπειτα, πραγματοποιήθηκε ημερήσια καταγραφή των αναπτυξιακών σταδίων, (βλέπε Πίνακες 3 & 4) δηλαδή παρακολούθηση των ναυπλίων πρώτης ημέρας έως την χρονική φάση αναπαραγωγικής τους ωρίμανσης.

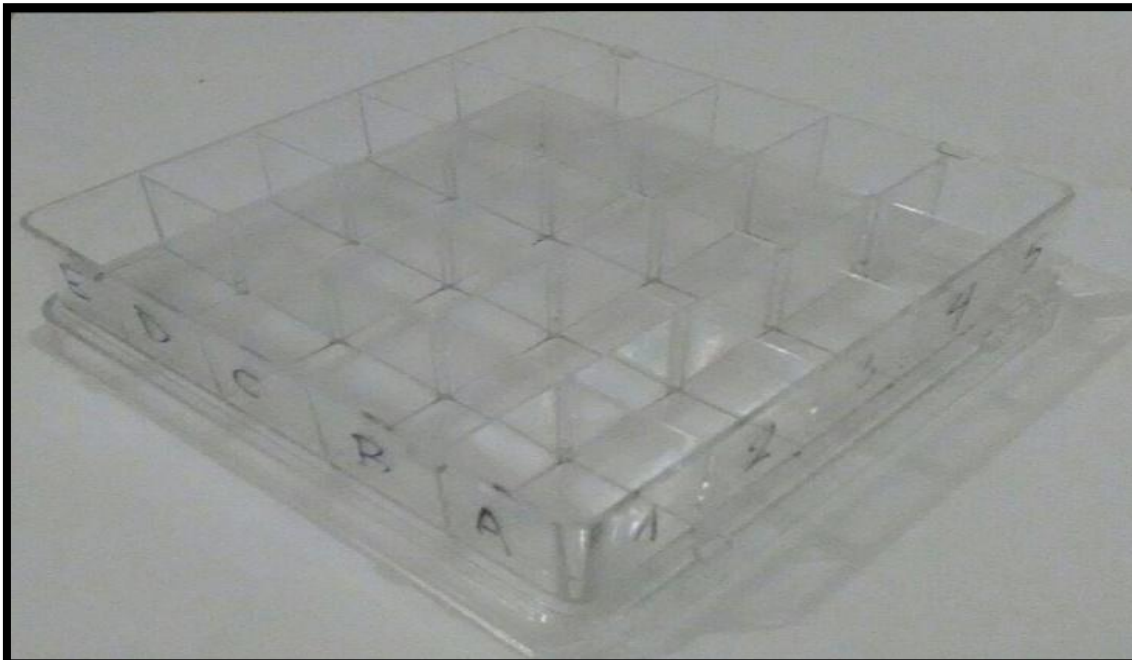


Σχήμα 14. Απεικόνιση του συνολικού εξοπλισμού & υλικού για τις ανάγκες χειρισμού των υδρόβιων ζώων.

Για την ανάπτυξη των μικροφυκών (Σχήμα 15), χρησιμοποιήθηκαν καθαρές καλλιέργειες (Σχήμα 24) που διατηρούνται στο εργαστήριο καλλιέργειας πλαγκτού και θρεπτικά άλατα βασισμένα στο πρωτόκολλο Conway Walne 1966. Ειδικότερα παρασκευάστηκαν: διάλυμα θρεπτικών αλάτων, διάλυμα ιχνοστοιχείων, και διάλυμα βιταμινών (Χώτος, 2016).



Σχήμα 15. Καλλιέργειες μικροφυκών για τις ανάγκες των πειραμάτων, με τα είδη: 1. *Tetraselmis suecica*, 2. *Rhodomonas salina*, 3. *Isochrysis galbana*.



Σχήμα 16. Απεικόνιση πλακέτας (microplate) μικρόδιαμερισμάτων (κυψελίδες) για καλλιέργεια και ανάπτυξη υδροβίων οργανισμών.

Τεχνική υποδομή και χειρισμοί εκτέλεσης των πειραμάτων

Η τεχνική υποδομή που αναλύεται διεξοδικά σε αυτή την ενότητα αφορά τη γενική υποδομή και τους χειρισμούς που απαιτούνται για να εκτελεστούν εύρυθμα τα πειράματα της γονιμότητας, της αντοχής στην αλατότητα, και την επίδραση τύπου τροφής - διατροφή (βλέπε οργανογράμματα στο τέλος της παρούσας ενότητας). Ωστόσο οι χειρισμοί ήταν σχεδόν παρόμοιοι σχετικά με την προετοιμασία των αντιδραστηρίων - υλικών και την εκτέλεση των πειραματικών διεργασιών. Στον εργαστηριακό χώρο υπήρχε επαρκής φωτισμός από λαμπτήρες τύπου Led λευκού φωτός (Σχήμα 17), παρέχοντας διαρκή φωτισμό 400 - 500 lux διάχυτη ένταση στην ευρύτερη περιοχή του εργαστηρίου. Τα θαλασσινά φύκη διατηρούνταν σε γυάλινες κυλινδρικές φιάλες Erlenmeyer 1 L τοποθετημένες κοντά στις συστοιχίες των λαμπτήρων για να δέχονται ένταση τουλάχιστον 5000 lux. Το θαλασσινό νερό που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις ανακαλλιέργειες και τα πειράματα ήταν από την Λιμνοθάλασσα Μεσολογγίου. Το νερό συλλεγόταν από συγκεκριμένο σημείο ώστε να διασφαλίζεται όσο το δυνατόν η ομοιόμορφη ποιότητά του. Η αποθήκευσή του γινόταν σε τύπου Nalgene δοχεία (Σχήμα 18) ολικής χωρητικότητας 12 λίτρων. Τα λιπασμένα αλατόνερα τοποθετούταν σε αυτόκαυστο μηχάνημα με θερμική επεξεργασία 125 βαθμών για περίπου 30 λεπτά και στην συνέχεια η ψύξη του γίνονταν βαθμιαία μέχρι τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ο καθαρισμός των δοχείων γινόταν με την χρήση πλυντηρίου και έπειτα με ξέπλυμα με υπεροξειδίο του υδρογόνου, καθώς και ξέβγαλμα με απιονισμένο νερό. Σε όλους τους χειρισμούς, ακολουθούνταν πιστά οι κανόνες αποστειρωμένου πεδίου. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα τα δοχεία των κωπηπόδων φιλτράρονταν ώστε να απομονωθούν τα νεκρά στελέχη αλλά και να απορριφτούν ανεπιθύμητα ιζήματα με χρήση κοσκινόφιλτρων ποικίλων ανοιγμάτων που ξεκινούσαν από τα 90 μm για τους ναυπλίους έως και τα 145 μm για τα ενήλικα κωπήποδα. Συνεχίζοντας με τις απαιτήσεις των υποδομών για το δεύτερο πείραμα αντοχής στη αλατότητα, η προετοιμασία των διαλυμάτων των διαφορετικών αλατοτήτων επιτεύχθηκε με τη χρήση του ακόλουθου εργαστηριακού υλικού: κωνικές γυάλινες φιάλες τύπου Erlenmeyer 1000 ml, αποσταγμένο νερό, τεχνητό θαλασσινό αλάτι Instant Ocean, μαγνητικός αναδευτήρας θερμαινόμενος, αποστειρωμένη ανοξειδωτή σέσουλα, σελοφαν, ψηφιακός ζυγός ακριβείας 0,001 g. Όλες οι κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer 1000 ml πριν χρησιμοποιηθούν είχαν απολυμανθεί με υπεροξειδίο του υδρογόνου και στη συνέχεια είχαν ξεπλυθεί καλά με αποσταγμένο νερό.



Σχήμα 17. Απεικόνιση λαμπτήρα τύπου Led λευκού φωτός.



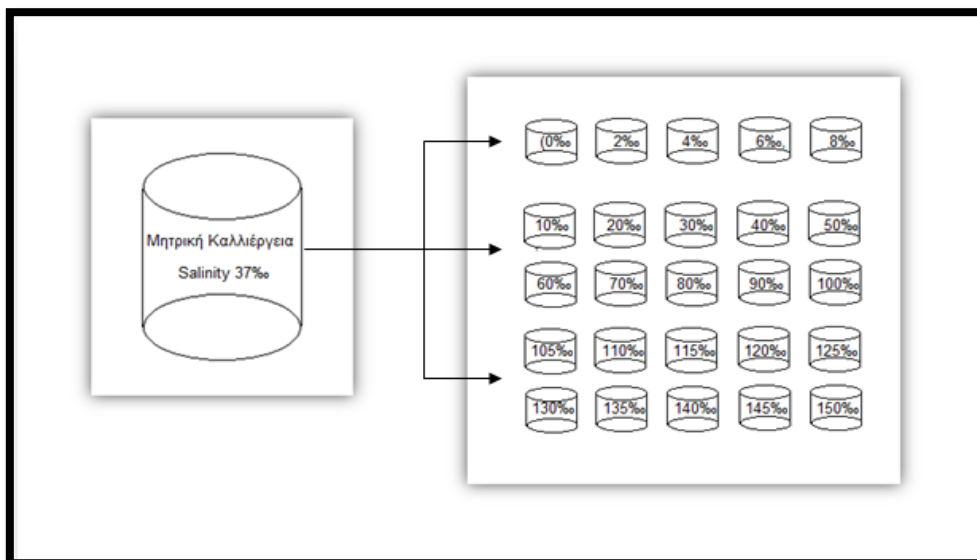
Σχήμα 18. Απεικόνιση, στο αριστερά τμήμα των δοχείων Nalgene 12 λίτρων και στο δεξιό τμήμα το αυτόκαυστο μηχάνημα.



Σχήμα 19. Απεικόνιση στο αριστερό τμήμα της κωνικής φιάλη Erlenmeyer με αλατόνερο με τον μαγνητικός αναδευτήρα, για τις ανάγκες ομογενοποίησης του διαλύματος (αλατόνερο), στο κεντρικό τμήμα ο ζυγός ακριβείας για ανάγκες υπολογισμού ποσότητας άλατος και στο δεξιό τμήμα το πειραματικό δοχείο για τις πειραματικές δοκιμασίες αντοχής στην αλατότητα.

Για τις ανάγκες των πειραμάτων αντοχής στην αλατότητα χρησιμοποιήθηκε ο τύπος αραίωσης διαλυμάτων: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$. Υπολογίστηκε για κάθε κατηγορία αλατόνευρου που χρησιμοποιήθηκε η αντίστοιχη ποσότητα άλατος που χρειάζονταν για να παρασκευαστεί το κάθε διάλυμα. Με τη χρήση του ψηφιακού ζυγού ακρίβειας (Σχήμα 19) υπολογίστηκε η επιθυμητή ποσότητα άλατος που χρειάζονταν σε κάθε φιάλη Erlenmeyer καθώς προσθέτονταν και η ποσότητα των 900 ml αποστειρωμένου νερού. Η κάθε φιάλη τοποθετούνταν στο μαγνητικό αναδευτήρα (Σχήμα 19) μέχρι το διάλυμα να ομογενοποιηθεί, να σφραγιστεί και τέλος να αναγράφει η περιεκτικότητα άλατος του διαλύματος. Η προετοιμασία τόσο των υλικών όσο και των διαλυμάτων βασίστηκε στο παρακάτω οργανόγραμμα (Σχήμα 20).

- ❖ **Δοκιμασία μειωμένης αλατότητας:**
(0‰, 2‰, 4‰, 6‰, 8‰, 10‰).
- ❖ **Δοκιμασία σχετικά φυσιολογικής αλατότητας:**
(20‰, 30‰, 40‰, 50‰, 60‰, 70‰)
- ❖ **Δοκιμασία πολύ υψηλής αλατότητας:** (80‰, 90‰, 100‰, 105‰, 110‰, 115‰, 120‰, 125‰, 130‰, 135‰, 140‰, 145‰, 150‰).



Σχήμα 20. Απεικόνιση του οργανογράμματος διαλυμάτων διαφορετικών αλατοτήτων για τις ανάγκες της πειραματικής δοκιμασίας, αντοχής στην αλατότητα για τα κωπήποδα γένους *Tigriopus* & *Tisbe*.

Τα κωπήποδα τοποθετούνταν 25 τον αριθμό ανά δοχείο άμεσα σε μικρά πλαστικά δοχεία των 20 ml (Σχήμα 21) με την καθορισμένη αλατότητα το καθένα με σκοπό να εφαρμοστεί η μέθοδος Probit (Wardlaw, 1989), δηλαδή να βρεθεί το 50% της θνησιμότητας του πληθυσμού μετά το πρώτο 24ωρο, που ονομάζεται εν συντομία LC_{50} . Με το πέρας του πρώτου 24ωρου σημειωνόταν ο αριθμός των ζωντανών και νεκρών ζώων. Τα υποτιθέμενα νεκρά ζώα για να διαπιστωθεί εάν όντως ήταν νεκρά, συλλέγονταν με μια

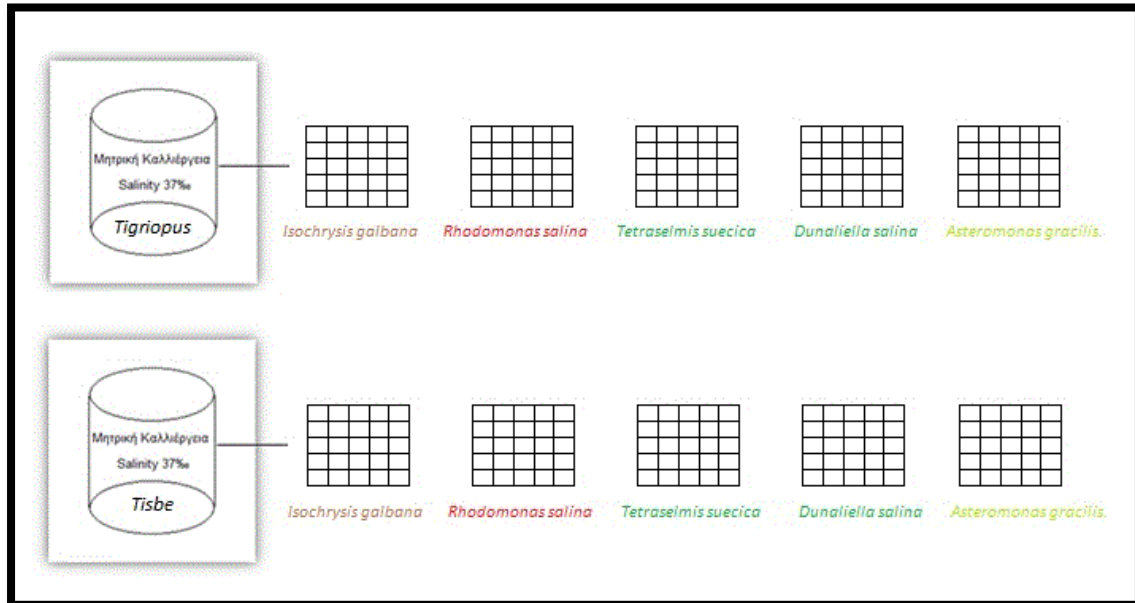
πιπέτα paster σε ένα τρυβλίο που διέθετε αλατόνερο φυσιολογικής αλατοτητας 35-37 ppt και έπειτα από ένα εύλογο διάστημα ελέγχονταν ξανά εάν είναι ζωντανά. Η διαφοροποίηση στο πείραμα επίδρασης της τροφής είχε να κάνει με τα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά των μικροφυκών αλλά και τη μεθοδολογία χορήγησης της τροφής.

Ο έλεγχος της αύξησης των μικροφυκών έγινε με μικροσκοπική καταμέτρηση σε αιμοκυττόμετρο τύπου Fuchs-Rosenthal (Σχήμα 22) των κυττάρων τους από δείγματα των καλλιιεργειών τους που λαμβάνονταν καθημερινώς. Συνάμα μετρούνταν και η οπτική απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο (Σχήμα 23) στα 680 nm. Από τις μετρήσεις αυτές κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αύξησης της καλλιέργειας και τα διαγράμματα-ευθείες παλινδρόμησης-βαθμονόμησης της οπτικής πυκνότητας εκφρασμένης ως απορρόφηση συναρτήσεως του αριθμού των κυττάρων/ml (αναφέρονται στο παράρτημα).

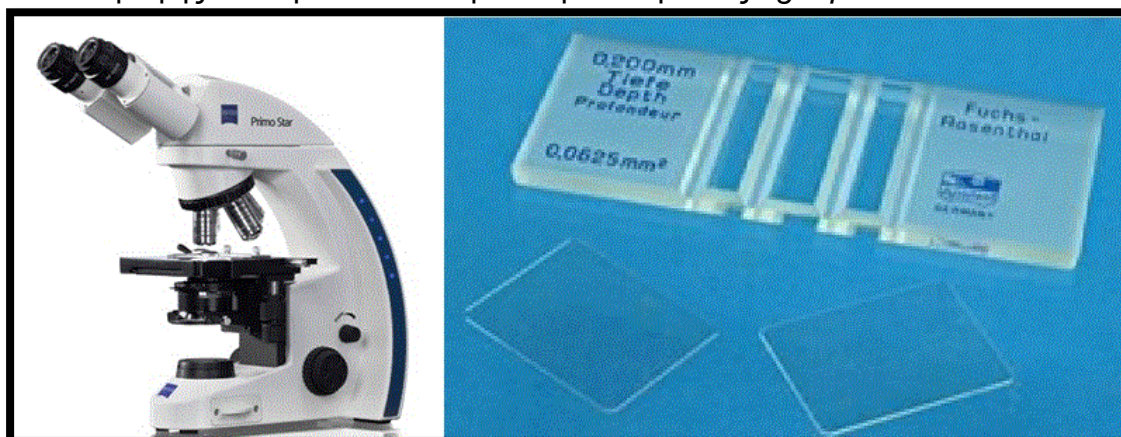
Τα διαγράμματα δομήθηκαν με την χρήση του ακόλουθου εξοπλισμού:

- α) Μικροσκόπιο Zeiss, Σχήμα 22
- β) Φασματοφωτόμετρο Shimadzu, Σχήμα 23
- γ) Κυβέτα Φασματοφωτόμετρου, Σχήμα 23
- δ) Αιμοκυττόμετρο Fuchs - Rosenthal, Σχήμα 22
- ε) Δείγματα των ανα-καλλιιεργειών *Isochrysis galbana*, *Rhodomonas salina*, *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina*, *Asteromonas gracilis*
- στ) Δημιουργίας και χρήσης διαλύματος Lugol για ακινητοποίηση των μικροφυκών.

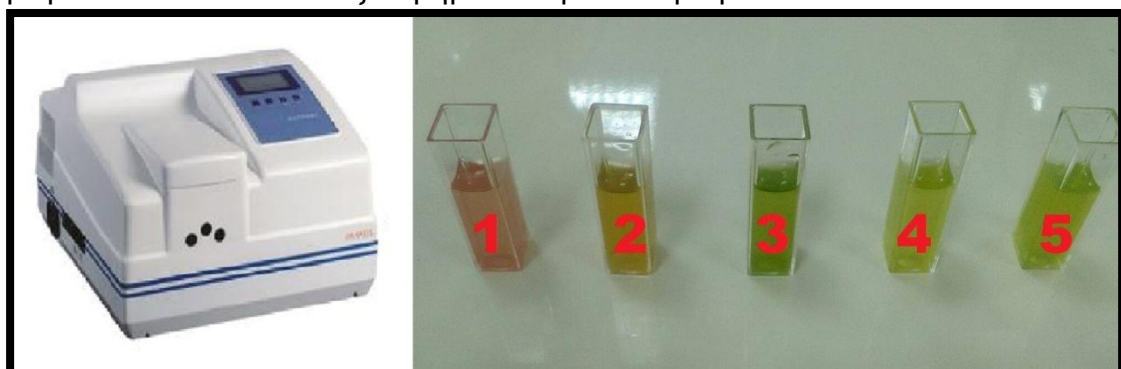
Σχετικά με τα αντιδραστήρια για την παρασκευή διαλύματος Lugol χρησιμοποιήθηκαν: μια πλαστική φιάλη 100 ml, αποσταγμένο νερό 90 ml, 20g KIO_3 , 10g I_2 , 20 ml CH_3COOH . Το αιμοκυττόμετρο Fuchs - Rosenthal χρησιμοποιήθηκε για την καταμέτρηση κυττάρων μεγέθους 2 - 20 μm . Στα δείγματα χορηγήθηκε μια σταγόνα Lugol ώστε να επέλθει μαζικός θάνατος και ακινητοποίηση στο σύνολο των κυττάρων. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους δυο ειδικούς θαλάμους της πλάκας Fuchs - Rosenthal και σκεπάστηκαν από την επικαλυπτήριδα.



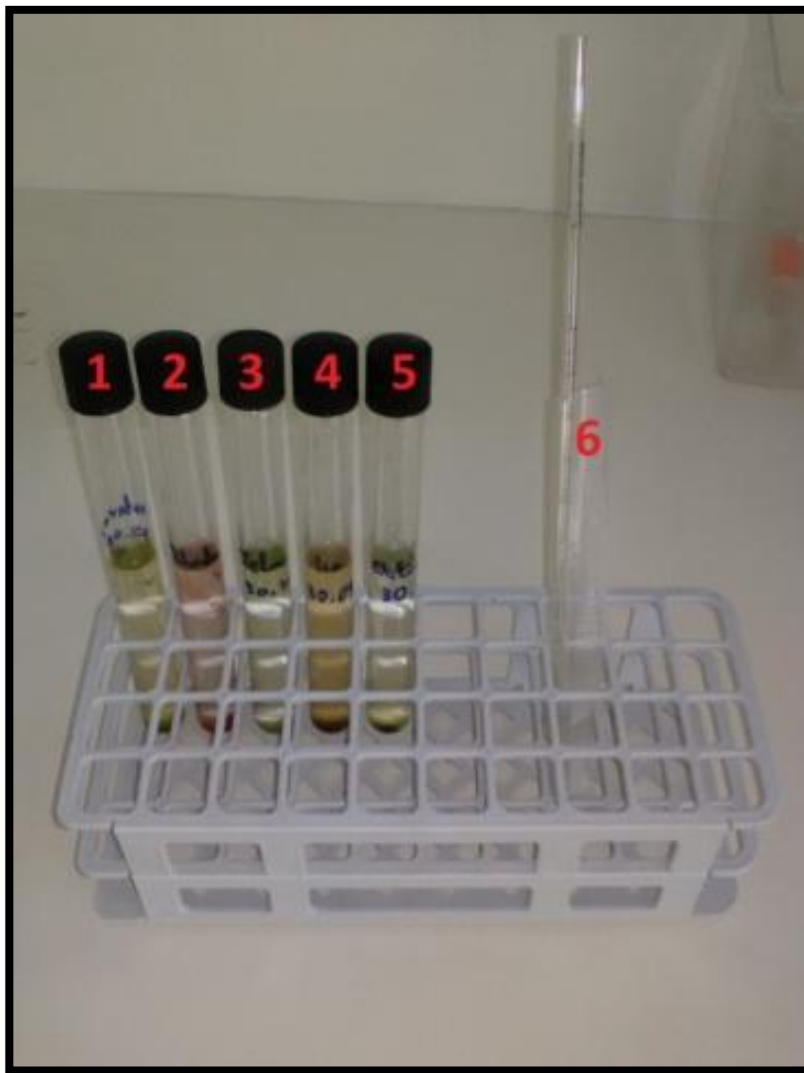
Σχήμα 21. Απεικόνιση του οργανογράμματος πειράματος επίδρασης του τύπου τροφής στα αρτακτικοειδή κωπήποδα γένους *Tigriopus* & *Tisbe*.



Σχήμα 22. Απεικόνιση στο αριστερό τμήμα του χρησιμοποιηθέντος μικροσκοπίου και στο δεξιό τμήμα το αιμοκυττόμετρο Fuchs - Rosenthal..

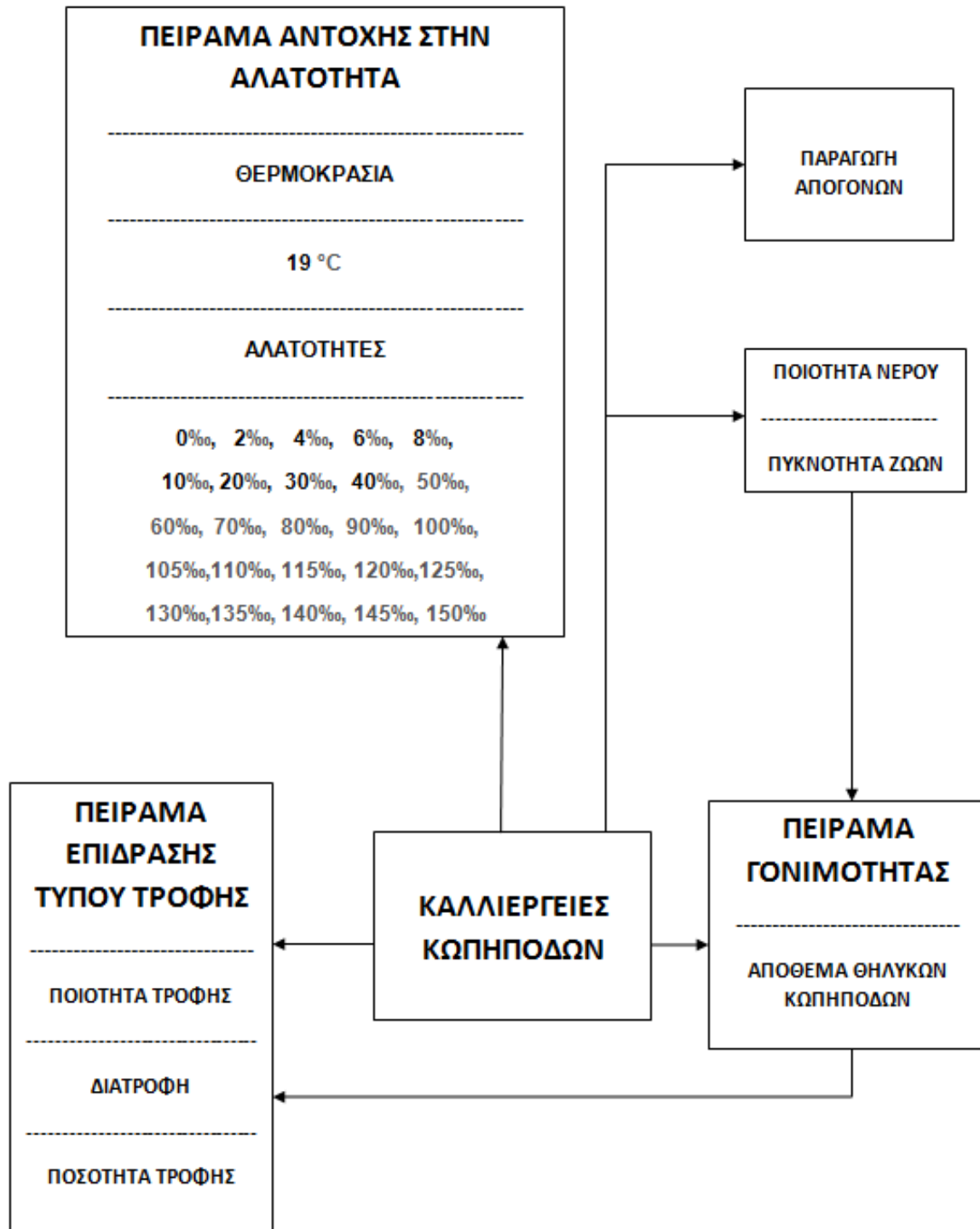


Σχήμα 23. Απεικόνιση, στο αριστερό τμήμα του χρησιμοποιηθέντος φασματοφωτόμετρου Shimadzu στο δεξιότμήμα των δειγμάτων μικροφυκών σε κυβέτα, 1.*Rhodomonas salina*, 2.*Isochrysis galbana*, 3.*Tetraselmis suecica*, 4.*Asteromonas gracilis*, 5.*Dunaliella salina*

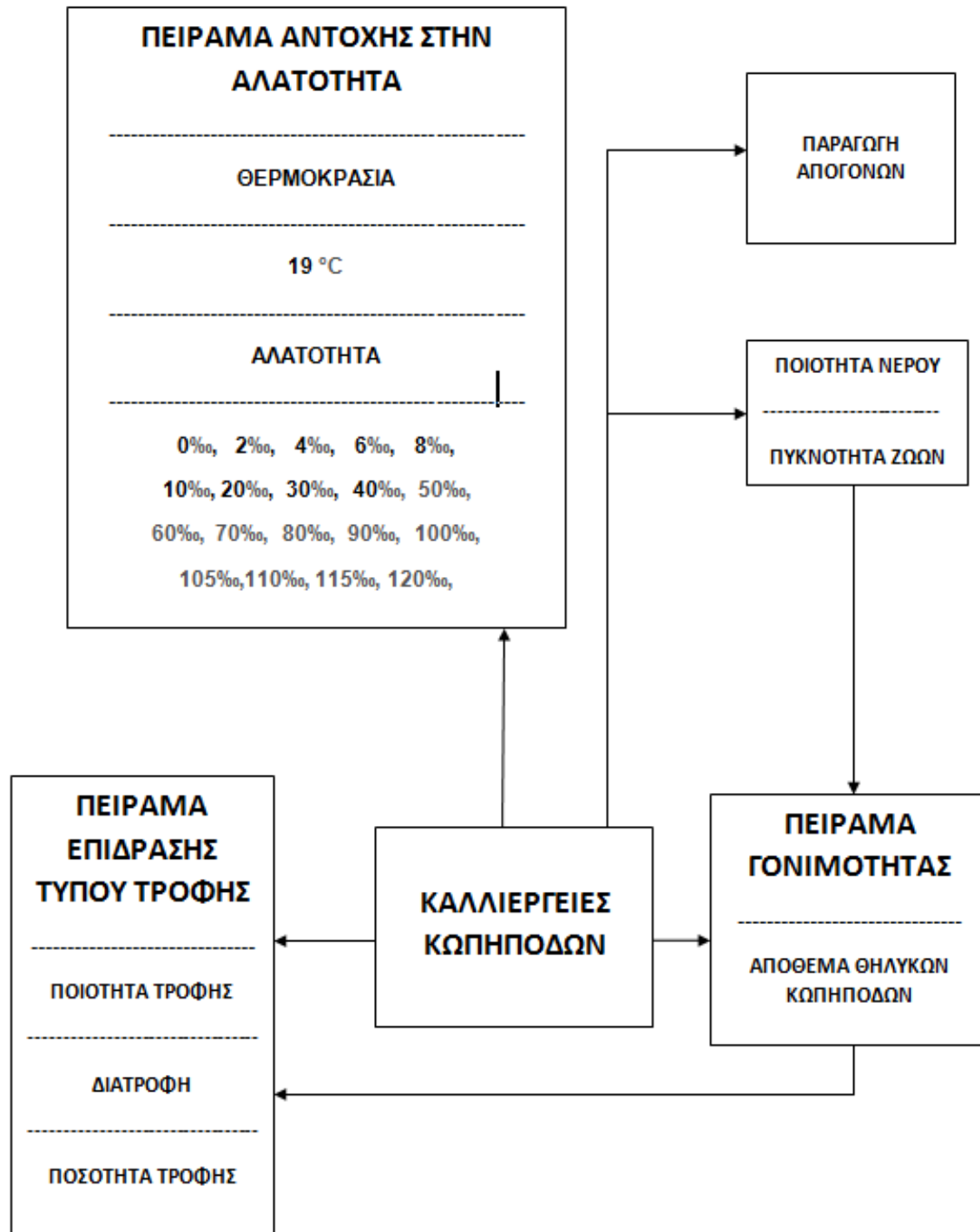


Σχήμα 24. Τα χρησιμοποιηθέντα μικροφύκη σε καθαρή καλλιέργεια Master.
1.*Asteromonas gracilis*, 2.*Rhodomonas salina*, 3.*Tetraselmis suecica*,
4.*Isochrysis galbana*, 5.*Dunaliella salina*, 6.Αναλώσιμη πιπέτα paster.

Οργανόγραμμα μελέτης κωπηπόδου γένους *Tigriopus*



Οργανόγραμμα μελέτης κωπηπόδου γένους *Tisbe*



Πείραμα Γονιμότητας

Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά τα οποία για πρώτη φορά ανέπτυσσαν ωόσακκο. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικώς 25 θηλυκά για το κάθε είδος και τοποθετήθηκαν ανά ένα σε κάθε κυβοειδή θάλαμο (κυψελίδα) των πολυθάλαμων πλακών. Κάθε θάλαμος (εντεύθεν "διαμέρισμα") περιείχε 4 ml φιλτραρισμένου θαλασσινού νερού αλατότητας 35 ppt διατηρώντας στάθμη νερού αρκετά πιο κάτω από το χείλος του διαμερίσματος του οποίου η χωρητικότητα ήταν 5 ml. Οι θάλαμοι διατηρούνταν πάντοτε σκεπασμένοι καθόλη την επιφάνεια της πλάκας με κατάλληλη προσαρμογή διαφανούς μεμβράνης και τοποθέτησης από πάνω του ειδικού πλαστικού καλύμματος. Με τον τρόπο αυτό η εξάτμιση περιορίστηκε στο ελάχιστο και η αλατότητα δεν ανέβηκε καθόλη τη διάρκεια του πειράματος αισθητά. Η μεταβολή της αλατότητας λόγω εξάτμισης στο νερό των διαμερισμάτων δεν ξεπέρασε το +1-2 ppt και θεωρήθηκε ασήμαντη γι' αυτό δεν έγιναν διορθώσεις αυτής με αποσταγμένο νερό. Ούτε η ποσότητα του νερού χρειάστηκε συμπλήρωση επειδή ότι νερό χάνονταν λόγω εξάτμισης αναπληρώνονταν (και με το παραπάνω κατ' ελάχιστον) με την κάθε 5 ημέρες πρόσθεση με μικροπιπέττα 0,2 ml συμπυκνωμένου μίγματος φυτοπλαγκτού αλατότητας 35 ppt. Κατά την έναρξη του πειράματος τοποθετήθηκε σε κάθε διαμέρισμα ένα θηλυκό κωπήποδο που είχε σχηματίσει ωόσακκο για πρώτη φορά στη ζωή του. Αυτή η συνθήκη διασφαλίστηκε από την επιλογή τέτοιων ατόμων που προέκυψαν από προηγούμενως τοποθέτηση πολλών ζευγαριών κωπήπόδων σε άλλους θαλάμους μέχρι να αποκολληθούν τα ζεύγη.

Κατόπιν γίνονταν καθημερινή εξέταση στο μικροσκόπιο για να διαπιστωθούν τα γονιμοποιημένα θηλυκά που σχημάτισαν ωόσακκο. Έχοντας προετοιμάσει έτσι τις κατάλληλες συνθήκες ήταν εύκολο να βρούμε μετά από μερικές ημέρες και μάλιστα ταυτόχρονα πολλά θηλυκά με ωόσακκο για να μεταφερθούν αυτά ανά ένα σε κάθε διαμέρισμα όπου παρακολούθηθηκε η μετέπειτα παραγωγή απογόνων (γονιμότητα). Με καθημερινή παρακολούθηση σε στερεοσκόπιο (Nikon SMZ) της κατάστασης στο κάθε διαμέρισμα καταμετρώντο καθημερινά οι ναύπλιοι που εκκολάπτονταν από κάθε ωόσακκο. Οι παρατηρήσεις και οι καταγραφές σταμάτησαν όταν πλέον ο ωόσακκος απορρίπτονταν (εξαντλημένος ή μη από αυγά) και δεν καταγράφονταν πλέον νέοι ναύπλιοι στο διαμέρισμα.

Θα πρέπει βεβαίως εδώ να επισημανθεί ότι όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία αλλά και παρατηρήθηκε στις δικές μας καλλιέργειες κωπήπόδων, τα θηλυκά μετά την εξάντληση του πρώτου ωόσακκου της ζωής των μπορούν να ξανασηματίσουν καινούργιο από το σπέρμα που είχαν σε περίσσεια αποθηκεύσει σε ειδική σωματική τους κοιλότητα όμως αυτό δεν ακολουθεί κάποιο κανονικό χρονικό πρότυπο και δεν επεκταθήκαμε στους πειραματισμούς. Προτιμήθηκε να διερευνηθεί μόνο η γονιμότητα κατά την πρώτη φορά που σχηματίζουν ωόσακκο ως ένα σταθερό μέτρο της αναπαραγωγικής τους ικανότητας.

Πείραμα αντοχής στην αλατότητα

Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα άτομα τα οποία λήφθηκαν από την αποθεματική καλλιέργεια και εισήχθησαν σε μικροδοχεία που περιείχαν νερό ορισμένης αλατότητας. Το πείραμα συνίστατο στην άμεση εισαγωγή ενήλικων ατόμων κωπηπόδων από την αλατότητα των 35 ppt στην οποία ήταν εγκλιματισμένα (θεωρουμένης ως κανονικής αλατότητας) σε δοχεία με νερό ποικίλων αλατοτήτων εύρους από απόλυτα γλυκό νερό (0 ppt) έως υπεράλμυρο 150 ppt με βήματα διαφορετικών αλατοτήτων της τάξεως των 10 ppt για τις αλατότητες άνω των 35 ppt και της τάξεως των 2 ppt για το εύρος αλατοτήτων 0-10 ppt. Σκοπός του πειράματος ήταν να κατανοηθεί η αντοχή του κάθε είδους των κωπηπόδων σε ακραίες συνθήκες περιβάλλοντος ως προς την αλατότητα κάτι που θα αντανακλά και τη δυνατότητά τους να προσαρμόζονται σε πιθανές ακραίες καταστάσεις.

Ο σχεδιασμός του πειράματος έγινε ως εξής:

1. Ετοιμάστηκαν τα δοχεία με τις επιλεγμένες αλατότητες. Χρησιμοποιήθηκαν μικρά διάφανα πλαστικά κυπελλοειδή δοχεία χωρητικότητας 50 ml στα οποία τοποθετήθηκε το νερό της επιθυμητής αλατότητας που δημιουργήθηκε είτε με ανάμιξη κατάλληλης ποσότητας τεχνητού άλατος (Instant Ocean) στο νερό αναφοράς των 35 ppt είτε με πρόσθεση κατάλληλης ποσότητας αποσταγμένου νερού. Όλες αυτές οι αλατότητες είχαν προπαρασκευαστεί σε δοχεία Erlenmeyer των 250 ml τα οποία πωματίστηκαν για να αποφευχθεί η εξάτμιση και η εξ' αυτής μεταβολή της αλατότητας και τοποθετήθηκαν σε αναμονή για την ταυτόχρονη μεταφορά των νερών τους στα κατάλληλα σημασμένα κυπελλοειδή δοχεία που θα δέχονταν τα κωπήποδα. Η ποσότητα του νερού για το κάθε κύπελλο ορίστηκε στα 25 ml προκειμένου αφενός να είναι επαρκής για τον πειραματισμό και να μην επηρεάζεται από την όποια μικρομεταβολή της αλατότητας λόγω εξάτμισης και αφετέρου το κατάλληλο μικρό μέγεθος των δοχείων να επιτρέπει την άνετη κατόπτευση του περιεχομένου τους στο στερεοσκόπιο για τον έλεγχο της κατάστασης των κωπηπόδων.

2. Τα προς χρησιμοποίηση κωπήποδα που θα τοποθετούνταν στα κύπελλα με τα νερά των αλατοτήτων είχαν πρώτα συγκεντρωθεί σε μικροδοχείακια (vials) σε μία ελάχιστη ποσότητα νερού (~1 ml) συλλεγμένα με ειδική πιπέτα αναρρόφησης από την αποθεματική καλλιέργεια. Επιλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν 25 ενήλικα κωπήποδα σε κάθε μικροδοχείκι και όταν ολοκληρώθηκε η πλήρωση όλων των δοχείων με τον αριθμό αυτό (κάτι που διήρκεσε περί τις 2 ώρες) ήμασταν έτοιμοι να χύσουμε σχεδόν ταυτόχρονα το περιεχόμενό τους ανά ένα σε κάθε κύπελλο με τη δεδομένη αλατότητα. Ο τρόπος αυτός επιλέχτηκε για να υπάρχει ομοιομορφία στο χρόνο έναρξης των πειραματισμών για όλες τις αλατότητες και παρόλο που η πρόσθεση 1 ml νερού αλατότητας 35 ppt (από τα μικροδοχείακια) στην ποσότητα των 25 ml των κύπελλων του πειραματισμού θα άλλαζε έστω και ελαφρά την επιθυμητή δημιουργηθείσα αλατότητα το θεωρήσαμε αναγκαίο κακό και το μετριάσαμε στο ελάχιστο με επιπρόσθετη πρόσθεση 3 ml αποσταγμένου νερού. Αν

ακολουθούσαμε διαφορετική μέθοδο με αναρρόφηση κωπηπόδων από την αποθεματική καλλιέργεια και πρόσθεση των κωπηπόδων σταδιακά στο κάθε κύπελλο τότε η καθυστέρηση και οι ευνότητες ασυνέχειες στην τοποθέτηση θα ακύρωναν τη βασικότερη παράμετρο του πειράματος που ήταν η ταυτόχρονη εισαγωγή του ορισμένου αριθμού κωπηπόδων στα κύπελλα.

3. Με την εισαγωγή των 25 κωπηπόδων στο κάθε κύπελλο κρατήθηκε ο χρόνος έναρξης του πειράματος. Τα κύπελλα καλύφθηκαν με διάφανη μεμβράνη στεγανά για να αποφευχθεί η εξάτμιση και η αλλαγή της αλατότητας.

4. Η επιβίωση των κωπηπόδων στην κάθε αλατότητα ελέγχθηκε μετά από 24 ώρες αν και με ενδιάμεσους ελέγχους στο στερεοσκόπιο ήταν σχεδόν αμέσως μετά την εισαγωγή εμφανής η παρουσία ή απουσία στρες στα άτομα.

5. Μετά από 24 ώρες καταγράφηκε ο αριθμός των νεκρών και ζωντανών κωπηπόδων στην κάθε αλατότητα προκειμένου να υπολογιστούν τα probit και το LC_{50} 24 ωρών για την κάθε αλατότητα σύμφωνα με τη μέθοδο probit (Wardlaw, 1988).

6. Η μέθοδος probit υπολογίζει την 50% θνησιμότητα των πειραματοζώων (στην περίπτωση μας κωπήποδα) σε μια σειρά κλιμακούμενων συγκεντρώσεων κάποιας ουσίας (στην περίπτωση μας αλατότητα). Η 50 % θνησιμότητα υπολογίζεται ως LC_{50} (Lethal Cncentration 50%) +/- 95% όρια εμπιστοσύνης και αντιστοιχεί στη συγκέντρωση εκείνη της εξεταζόμενης ουσίας η οποία επιφέρει το θάνατο στο 50% του αριθμού των πειραματοζώων που εκτέθηκαν σε αυτή μέσα σε ένα ορισμένο χρονικό διάστημα (συνήθως 24 ωρών όπως στη δική μας περίπτωση).

Η ανάλυση probit ως πρώτο βήμα καταγράφει ως ποσοστό τη θνησιμότητα σε κάθε αλατότητα. Κατόπιν οι τιμές των ποσοστών της θνησιμότητας καταγράφονται ως αριθμοί probit βάσει ειδικού πίνακα τιμών (Wardlaw, 1986, Appendix A6 "percentages and probits"). Στη συνέχεια δημιουργείται η ευθεία παλινδρόμησης με τις τιμές των probit στον άξονα Y και τις αλατότητες στον άξονα X. Από τη σχηματιζόμενη ευθεία εύκολα μπορούμε να βρούμε την τιμή της αλατότητας που αντιστοιχεί στην τιμή probit 5 που αντιστοιχεί σε 50% θνησιμότητα και αυτή αποτελεί το LC_{50} .

Τα 95% όρια εμπιστοσύνης του LC_{50} (24-h), (θνησιγόνος αλατότητα για το 50% των ατόμων σε 24 ώρες) δίδονται ως: $LC_{50} \pm 1,96[SE(LC_{50})]$.

Το τυπικό σφάλμα (SE) του LC_{50} , υπολογίσθηκε χρησιμοποιώντας τον τύπο:

$$SE(LC_{50}) = \frac{1}{b\sqrt{pnw}}$$

όπου:

b = η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης της probit-αλατότητα,
 p = ο αριθμός των αλατοτήτων που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε περίπτωση,
 n = ο αριθμός των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε ομάδα
 (αλατότητας) = 25,

\bar{w} = το μέσο «βάρος των παρατηρήσεων σχετιζομένων με τα probit».

Για να υπολογιστεί το \bar{w} καταγράφουμε σε πίνακα τα probit της θνησιμότητας που αντιστοιχούν σε κάθε αλατότητα. Αυτά είναι τα "παρατηρούμενα probit". Σε κάθε "παρατηρούμενο probit" αντιστοιχεί και ένα "αναμενόμενο probit" που είναι η τιμή που προκύπτει από την τιμή probit στον άξονα Y η οποία αντιστοιχεί στο σημείο της ευθείας παλινδρόμησης probit-αλατότητας όπου την κόβει η κάθετος που υψώνεται από την εκάστοτε τιμή αλατότητας του άξονα X . Σε κάθε "αναμενόμενο probit" βάσει ειδικού πίνακα τιμών (Wardlaw, 1989, Appendix A7 "weighing coefficients for expected probits") αντιστοιχεί και μια τιμή "βάρους-weight". Η μέση τιμή όλων των βαρών δίνει το ζητούμενο \bar{w} .

Πείραμα επίδρασης της τροφής στην αύξηση

Με το πείραμα αυτό μελετήθηκε η επίδραση που είχε ο τύπος της τροφής στην αύξηση του πληθυσμού των κωπηπόδων του κάθε είδους. Πραγματοποιήθηκε με εισαγωγή ενός αβγομένου θηλυκού σε κάθε διαμέρισμα των πολυθάλαμων πλακών και παραμονή του εκεί για διάστημα 28 ημερών με σκοπό να παράγει απογόνους ανεξαρτήτως του πόσες φορές θα ξανασηματίσει ωόσακκο ή για το αν οι πρώτοι του απόγονοι σχημάτισαν και αυτοί ωόσακκο. Στο τέλος της περιόδου επώασης (28 ημέρες) καταμετρήθηκαν όλα τα κωπήποδα που βρίσκονταν ζωντανά στο κάθε διαμέρισμα ανεξαρτήτως οντογενετικού σταδίου.

Το νερό (4 ml) στα διαμερίσματα ήταν αλατότητας 35 ppt, η θερμοκρασία 20-21 °C και ο διάχυτος φωτισμός δωματίου ~500 lux. Οι θάλαμοι καλύφθηκαν με διάφανη μεμβράνη για να αποφευχθεί η εξάτμιση και μόνο δύο μικρές οπές στη μεμβράνη διασφάλιζαν την απαραίτητη ανταλλαγή των αερίων για το μεγάλο χρονικό διάστημα που διήρκεσε το πείραμα.

Χρησιμοποιήθηκαν 5 είδη μικροφυκών ως τροφή προερχόμενα από τις διατηρούμενες καλλιέργειες (σε αλατότητα 35 ppt) στο εργαστήριο καλλιέργειας πλαγκτού. *Tetraselmis* sp., *Isochrysis* sp., *Rhodomonas salina*, *Asteromonas gracilis* και *Dunaliella salina*. Για να δοθούν στα κωπήποδα φυγοκεντρώνταν μια ποσότητα καλλιέργειας ορισμένου είδους που βρίσκονταν σε εκθετική φάση αύξησης και το συλλεγόμενο ίζημα της φυκικής μάζας μαζί με 2 ml υπερκείμενου νερού αναδεύονταν για να σχηματιστεί ένα πυκνό αιώρημα. Αυτό γίνονταν και για τα 4 δοχεία (χωρητικότητας 50 ml) το καθένα που περιείχαν φυτοπλαγκτό προς φυγοκέντρωση. Δηλαδή μετά από κάθε φυγοκέντρωση είχε συλλεχθεί συνολικά ποσότητα 8 ml συμπυκνωμένου φυτοπλαγκτού προερχόμενης από 200 ml καλλιέργειας που φυγοκεντρήθηκε.

Από το συμπυκνωμένο διάλυμα φυτοπλαγκτού λήφθηκε ποσότητα 0,3 ml και χύθηκε στα διαμερίσματα με τα κωπήποδα. Η ποσότητα αυτή θεωρήθηκε επαρκής και σε περίσσεια για τις διατροφικές ανάγκες των

κωπηπόδων καθώς το νερό αποκτούσε χρώμα ανάλογο αυτού του εκάστοτε φύκους και από προηγούμενες προκαταρκτικές παρατηρήσεις είχε βρεθεί ότι τέτοιες ποσότητες φυτοπλαγκτού επαρκούν για πολύ καιρό (περί τις 5 ημέρες) για να καλύπτουν τις διατροφικές ανάγκες μικρού αριθμού κωπηπόδων (πόσο μάλλον ενός ατόμου στην αρχή). Κάθε εβδομάδα η πρόσθεση νέου φυτοπλαγκτού παρόμοιας ποσότητας διασφάλιζε την επάρκεια της τροφής. Επιπλέον η μικροποσότητα νερού με φυτοπλαγκτόν που προστίθονταν στα διαμερίσματα αναπλήρωνε και την όποια έστω μικρή ποσότητα χάνονταν λόγω εξάτμισης. Στο τέλος των 28 ημερών μάλιστα παρατηρήθηκε ότι η στάθμη σε κάθε διαμέρισμα είχε ανέβει λίγο (στην αρχή η στάθμη είχε σηματοδοτεί με οριζόντια γραμμή μαρκαδούρου περιφερειακά της τετράγωνης πολυθάλαμης πλάκας) και η αλατότητα είχε αυξηθεί στα 38 ppt κάτι που το θεωρήσαμε ως αναγκαίο κακό αλλά μη αρνητικό για το πείραμα.

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 25 κωπήποδα ανά πολυθάλαμη πλάκα ανά είδος ανά τύπο τροφής, δηλαδή με ένα κωπήποδο ανά διαμέρισμα, 25 κωπήποδα ανά πλάκα. Με άλλα λόγια 25 επαναλήψεις ανά είδος κωπηπόδου και τύπο τροφής. Αναλυτικότερα δημιουργήθηκαν οι παρακάτω συνδυασμοί:

1. Tigriopus - Tetrasemis, 25 κωπήποδα ανά ένα σε κάθε διαμέρισμα από τα 25.
2. Tigriopus - Isochrysis, 25 κωπήποδα ανά ένα σε κάθε διαμέρισμα από τα 25.
3. Tigriopus-Rhodomonas, 25 κωπήποδα ανά ένα σε κάθε διαμέρισμα από τα 25.
4. Tigriopus -Asteromonas, 25 κωπήποδα ανά ένα σε κάθε διαμέρισμα από τα 25.
5. Tigriopus - Dunaliella, 25 κωπήποδα ανά ένα σε κάθε διαμέρισμα από τα 25.
6. Tisbe - Tetrasemis, 25 κωπήποδα ανά ένα σε κάθε διαμέρισμα από τα 25.
7. Tisbe - Isochrysis, 25 κωπήποδα ανά ένα σε κάθε διαμέρισμα από τα 25.
8. Tisbe-Rhodomonas, 25 κωπήποδα ανά ένα σε κάθε διαμέρισμα από τα 25.
9. Tisbe -Asteromonas, 25 κωπήποδα ανά ένα σε κάθε διαμέρισμα από τα 25.
10. Tisbe - Dunaliella, 25 κωπήποδα ανά ένα σε κάθε διαμέρισμα από τα 25.

Στο τέλος των 28 ημερών καταγράφηκε ο αριθμός των υπαρχόντων ζωντανών κωπηπόδων στο κάθε διαμέρισμα για να υποστούν στατιστική επεξεργασία προς εύρεση στατιστικώς σημαντικών διαφορών (ANOVA, Tukey test).

Αποτελέσματα

Πείραμα γονιμότητας

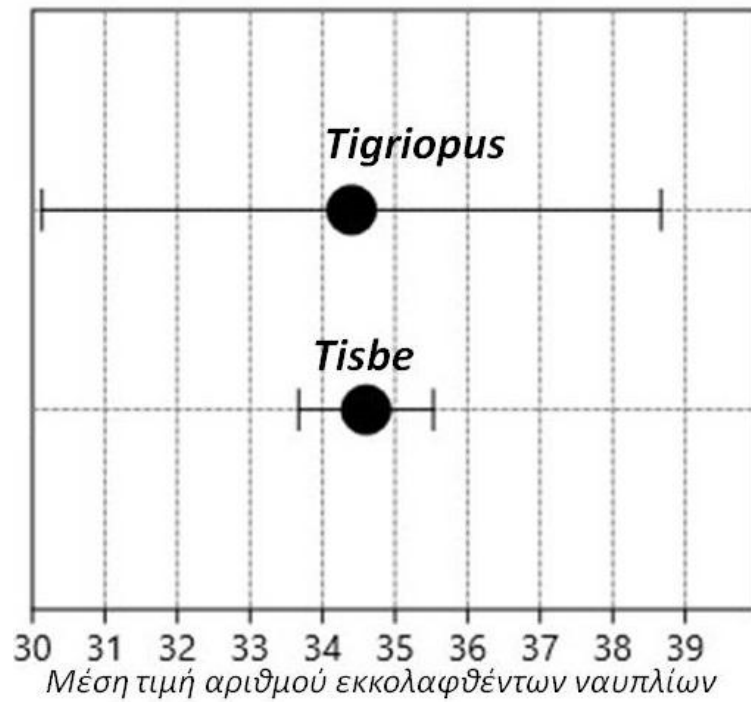
Η διάρκεια των παρατηρήσεων για την εμφάνιση των εκκολαπτομένων ναυπλίων καθημερινώς δεν είχε ως τέλος κάποια προκαθορισμένη ημερομηνία. Έτσι οι καταγραφές ανά είδος κωπηπόδου, ανά διαμέρισμα, ανά ημέρα, όπως καταγράφονται στους Πίνακες 1 και 2 παρουσιάζουν διαφορετική διάρκεια μεταξύ *Tigriopus* και *Tisbe*. Το μεν *Tisbe* σταμάτησε να εμφανίζει νέους ναυπλίους την 5^η ημέρα και το *Tigriopus* την 9^η ημέρα. Δηλαδή το μεν *Tisbe* εξάντλησε τον ωόσακκό του την 4^η ημέρα το δε *Tigriopus* την 8^η ημέρα.

Πίνακας 1. Στατιστικά στοιχεία παραγωγής αριθμού νεοεκκολαφθέντων ναυπλίων ανά ημέρα από κάθε θηλυκό άτομο κωπηπόδου *Tisbe* με πρωτοσχηματισμένο ωόσακκο μέχρι πλήρους εκκόλαψης των αβγών του. Σε κάθε κελί αντιστοιχεί ένα θηλυκό άτομο.

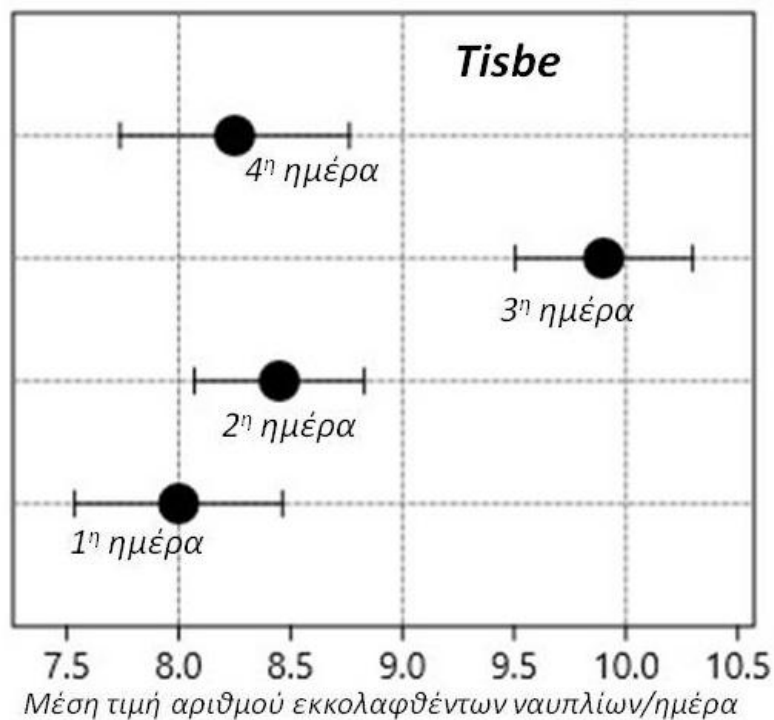
<i>Tisbe</i>					
Κελί	1η ημέρα	2η ημέρα	3η ημέρα	4η ημέρα	Σύνολο ναυπλίων
1	10	8	9	16	43
2	7	6	8	7	28
3	11	7	12	7	37
4	8	6	7	8	29
5	9	10	8	7	34
6	4	8	9	6	27
7	7	8	11	9	35
8	7	9	7	6	29
9	9	7	11	5	32
10	6	12	10	9	37
11	7	8	9	11	35
12	6	7	11	9	33
13	12	9	12	8	41
14	8	9	10	8	35
15	10	12	8	9	39
16	6	8	11	9	34
17	6	8	12	9	35
18	11	8	9	7	35
19	9	8	13	7	37
20	7	11	11	8	37
Σύνολα	160	169	198	165	692
Μέση Τιμή	8	8,45	9,9	8,25	34,6
Τυπ. απόκλιση	2,07	1,7	1,77	2,29	4,15
Τυπ. σφάλμα	0,46	0,38	0,39	0,51	0,93
Συντελ. ποικιλ.	25,9	20,1	17,9	27,7	12
Μέση Τιμή	8	8,45	9,9	8,25	Μέση τιμή ναυπλίων / ημέρα
					8,25 ± 1,95

Πίνακας 2. Στατιστικά στοιχεία παραγωγής αριθμού νεοεκκολαφθέντων ναυπλίων ανά ημέρα από κάθε θηλυκό άτομο κωπηπόδου *Tigriopus* με πρωτο-σχηματισμένο ωόσακκο μέχρι πλήρους εκκόλαψης των αβγών του. Σε κάθε κελί αντιστοιχεί ένα θηλυκό άτομο.

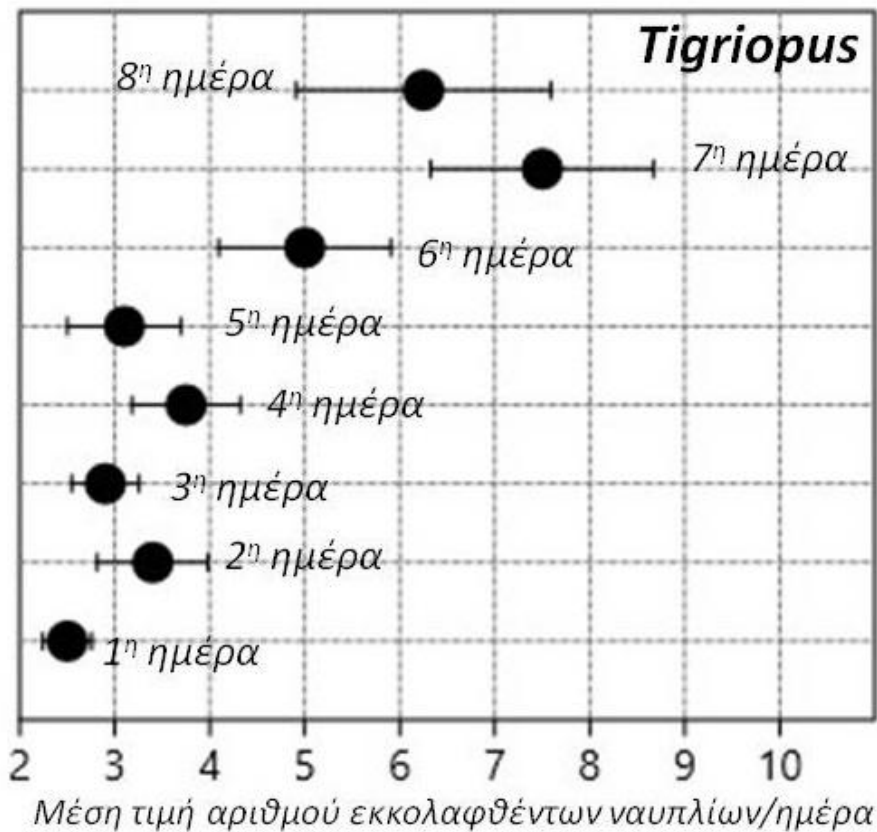
<i>Tigriopus</i>									
Κελί	1η ημ.	2η ημ.	3η ημ.	4η ημ.	5η ημ.	6η ημ.	7η ημ.	8η ημ.	Σύνολο ναυπλίων
1	2	3	3	3	4	13	14	0	42
2	2	3	1	5	0	0	0	0	11
3	5	7	4	2	0	0	0	0	18
4	6	4	3	4	2	7	10	0	36
5	4	5	4	4	3	11	11	9	51
6	3	9	4	2	1	4	11	15	49
7	2	3	4	5	4	4	12	0	34
8	2	5	5	6	5	3	10	13	49
9	2	0	0	0	0	0	0	0	2
10	2	3	4	5	5	8	11	12	50
11	2	0	0	0	0	0	0	0	2
12	2	0	0	0	0	0	0	0	2
13	2	0	3	4	3	8	12	14	46
14	2	2	2	1	9	7	9	10	42
15	2	5	4	5	7	6	10	11	50
16	2	3	3	2	0	0	0	0	10
17	2	4	5	10	5	5	14	12	57
18	2	8	2	5	6	7	9	9	48
19	2	1	3	7	4	8	8	9	42
20	2	3	4	5	4	9	9	11	47
Σύνολα	50	68	58	75	62	100	150	125	688
Μέση Τιμή	2,5	3,4	2,9	3,75	3,1	5	7,5	6,25	34,4
Τυπ. απόκλ.	1,14	2,6	1,58	2,55	2,67	4,05	5,25	5,99	19,07
Τυπ. σφάλμα	0,25	0,58	0,35	0,57	0,59	0,90	1,17	1,33	4,26
Συντ. ποικιλ.	45,8	76,5	54,7	68	86,2	81	70	95,8	55,4
Μέση τιμή	2,5	3,4	2,9	3,75	3,1	5	7,5	6,25	Μέση τιμή ναυπλίων / ημέρα
									3,4 ± 2,83



Σχήμα 25. Μέσες τιμές \pm τυπικό σφάλμα (SE) του συνολικού αριθμού παραχθέντων ναυπλίων από όλα τα θηλυκά (20) *Tisbe* και *Tigriopus* με πρωτοσχηματισμένο ωόσακκο για όλη τη διάρκεια του πειράματος (δηλ. μέχρι εξαντλήσεως του ωόσακκου).



Σχήμα 26. Μέσες τιμές \pm τυπικό σφάλμα (SE) του αριθμού παραχθέντων ναυπλίων ανά ημέρα από όλα τα θηλυκά (20) *Tisbe* με πρωτοσχηματισμένο ωόσακκο για όλη τη διάρκεια του πειράματος (δηλ. μέχρι εξαντλήσεως του ωόσακκου).



Σχήμα 27. Μέσες τιμές \pm τυπικό σφάλμα (SE) του αριθμού παραχθέντων ναυπλίων ανά ημέρα από όλα τα θηλυκά (20) *Tigriopus* με πρωτοσχηματισμένο ωόσακκο για όλη τη διάρκεια του πειράματος (δηλ. μέχρι εξαντλήσεως του ωόσακκου).

Η παραγωγή ναυπλίων και στα δύο είδη κωπηπόδων είναι ασύγχρονου τύπου δηλαδή μέσα στον ίδιο ωόσακκο υπάρχουν έμβρυα τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικό στάδιο οντογεννητικής ανάπτυξης κάθε στιγμή και συνεπώς εκκολάπτονται σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Όμως ανάμεσα στα δύο είδη παρατηρούνται (Πίνακες 1 & 2 - Σχήματα 25, 26 & 27) ουσιαστικές και αξιοσημείωτες διαφορές. Έτσι το *Tisbe* για τη συντομότερη διάρκεια πλήρους εξάντλησης του ωόσακκού του (4 ημέρες) έναντι του *Tigriopus* (8 ημέρες) παρουσιάζει και μία ομοιομορφία στον αριθμό των ναυπλίων που εκκολάπτονται καθημερινώς τόσο μεταξύ των ημερών όσο και μεταξύ των 20 θηλυκών που αποτελούν τις επαναλήψεις του πειράματος. Έτσι από την εξέταση του Πίνακα 1 και του Σχήματος 26 φαίνεται ότι στο *Tisbe* οι μέσες τιμές εμφάνισης ναυπλίων κυμάνθηκαν μεταξύ 8 και 10 ατόμων ανά ημέρα με μικρές τιμές τυπικού σφάλματος και συντελεστή ποικιλότητας (18-28), ενώ στο *Tigriopus* η κατάσταση είναι εντελώς διαφορετική με πολύ μεγάλο εύρος μέσων τιμών (~3-8), μεγαλύτερο τυπικό σφάλμα και πολύ μεγάλους συντελεστές ποικιλότητας (46-96).

Επιπλέον όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 για κάθε άτομο θηλυκού *Tisbe* η παραγωγή ναυπλίων ανά ημέρα ακολούθησε ένα ομαλό πρότυπο με παραγωγή λίγο πολύ παρόμοιου αριθμού ναυπλίων και χωρίς διακοπή ή

αποτυχία για κανένα από τα 20 άτομα. Για το *Tigriopus* η κατάσταση παρουσιάζει εντελώς διαφορετική εικόνα καθώς καταγράφηκαν και άτομα που είτε στην αρχή εκκόλαψαν λίγα αυγά και μετά σταμάτησαν (κελιά νο. 2, 3, 9, 11, 12 του Πίνακα 2) είτε στις πρώτες ημέρες εκκόλαψαν λίγους ναυπλίους και τις επόμενες πολύ περισσότερους (όλα τα υπόλοιπα κελιά του Πίνακα 2 κατά διάφορη ένταση ανά περίπτωση).

Οι παραπάνω ανομοιομορφίες στο ρυθμό παραγωγής ναυπλίων ανάμεσα στα δύο είδη αντανακλώνται και στις μέσες τιμές παραγωγής ναυπλίων ανά άτομο όπου ενώ οι τιμές 34,6 ναύπλιοι για το *Tisbe* και 34,4 ναύπλιοι για το *Tigriopus* (Πίνακες 1 & 2) είναι παρόμοιες και δεν διαφέρουν στατιστικώς (t-test, $p < 0,05$) το τυπικό σφάλμα και ο συντελεστής ποικιλότητας για (4,26 και 55,4 αντίστοιχα) για το *Tigriopus* είναι πολύ μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα για το *Tisbe* (0,93 και 12). Αυτό αποτυπώνεται και στο Σχήμα 25 και γενικώς είναι ενδεικτικό του ότι κατά τον πολλαπλασιασμό του *Tigriopus* παρουσιάζονται άτομα με μεγαλύτερη ποικιλία στο ρυθμό παραγωγής ναυπλίων συγκριτικά με το *Tisbe*.

Τέλος η συνολική παραγωγή ναυπλίων από όλο τον πληθυσμό του *Tisbe* (692 ναύπλιοι) και του *Tigriopus* (688 ναύπλιοι) (Πίνακες 1 & 2) παρουσιάζουν εκπληκτική ισοδυναμία και σε φυσικό πληθυσμιακό επίπεδο πιθανόν να αντανακλούν παρόμοια γονιμότητα.

Πίνακας 3. Συνοψη συνθηκών και παρατηρήσεων σε ελεγχόμενο περιβάλλον των σταδίων ανάπτυξης θηλυκών κωπηπόδων του γένους *Tigriopus*.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΙΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΟΚΗΜΑΣΙΑΣ	ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ : Θερμοκρασία : 20°C Αλατότητα : 35‰ -37‰ Φωτισμός : 500 lux
	----- ΤΡΟΦΗ : <i>Isochrysis galbana,</i> <i>Rhodomonas salina,</i> <i>Tetraselmis suecica,</i> <i>Dunaliella salina,</i> <i>Asteromonas gracilis</i> -----
	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΥΛΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ : ❖ Plate Μικροδιαμερισμάτων ❖ Πιππέτα αναρρόφησης paster ❖ Στερεοσκόπιο ❖ Τρυβλίο petri 50ml
	5/10/2018 Συλλογή 25 ώριμων θηλυκών ατόμων με αναπτυγμένο ωόσακκο και τοποθέτηση των σε Plate μικρο-διαμερισμάτων.
	6/10/2018 Παρατηρήθηκε εκκόλαψη των ωοσάκκων, και απελευθέρωση βενθικών ναυπλίων (N1) σταδίου επακολούθησε απομάκρυνση όλων των θηλυκών με ωόσακκο.
	14/10/2018 Μετατροπή των ναυπλίων σε κωπηποδίτες με ελεύθερη κολυμβητική κίνηση στην υδάτινη μάζα.
	22/10/2018 Έναρξη αναπαραγωγικής δραστηριότητας θηλυκών & αρσενικών κωπηπόδων σε αναπαραγωγική σύζευξη .
	25/10/2018 Παύση αναπαραγωγικής δραστηριότητας, απομάκρυνση των αρσενικών ατόμων και εμφάνιση μελανού-πράσινου χρωματισμού στην επιφάνεια του ωοσάκκου των θηλυκών.
	26/10/2018 Αλλαγή χρωματισμού του ωοσάκκου από μελανο-πράσινο σε διαυγές καφέ.
27/10/2018 Έναρξη εκκόλαψης ωοσάκκων	
18/11/2018 Πλήρης εκκόλαψη του ωοσάκκου	

Πίνακας 4. Συνοψη συνθηκών και παρατηρήσεων σε ελεγχόμενο περιβάλλον των σταδίων ανάπτυξης θηλυκών κωπηπόδων του γένους *Tisbe*.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΙΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΟΚΗΜΑΣΙΑΣ	<p>ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ : Θερμοκρασία : 20°C Αλατότητα : 35‰ - 37‰ Φωτισμός : 500 lux</p> <hr/> <p>ΤΡΟΦΗ : <i>Isochrysis galbana</i>, <i>Rhodomonas salina</i>, <i>Tetraselmis suecica</i>, <i>Dunaliella salina</i>, <i>Asteromonas gracilis</i></p> <hr/> <p>ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΥΛΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΟΚΗΜΑΣΙΑΣ : ❖ Plate Μικροδιαμερισμάτων ❖ Πιππέτα αναρρόφησης paster ❖ Στερεοσκόπιο ❖ Τρυβλίο petri 50 ml</p>
20/11/2018	Συλλογή 25 ώριμων θηλυκών ατόμων με αναπτυγμένο ωσάκκο και τοποθέτηση των σε Plate μικρο-διαμερισμάτων..
21/11/2018	Παρατηρήθηκε εκκόλαψη των ωσάκκων, και απελευθέρωση βενθικών ναυπλίων (N1) σταδίου επακολούθησε απομάκρυνση όλων των θηλυκών με ωσάκκο.
29/11/2018	Μετατροπή των ναυπλίων σε κωπηποδίτες με ελεύθερη κολυμβητική κίνηση στην υδάτινη μάζα.
7/12/2018	Έναρξη αναπαραγωγικής δραστηριότητας θηλυκών & αρσενικών κωπηπόδων σε αναπαραγωγική σύζευξη .
11/12/2018	Παύση αναπαραγωγικής δραστηριότητας απομάκρυνση των αρσενικών ατόμων, και εμφάνιση μελανού-πράσινου χρωματισμού στην επιφάνεια του ωσάκκου των θηλυκών.
12/12/2018	Αλλαγή χρωματισμού του ωσάκκου από μελανο-πράσινο σε διαυγές καφέ.
13/12/2018	Έναρξη εκκόλαψης ωσάκκων
07/01/2019	Πλήρης εκκόλαψη του ωσάκκου

Πείραμα αντοχής στην αλατότητα

Στους Πίνακες 5 & 6 καταγράφονται οι τιμές της ανάλυσης probit για τα κωπήποδα *Tigriopus* και *Tisbe* αντίστοιχα που έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Wardlaw (1989). Από την πρώτη εξέταση των πινάκων διαπιστώνεται μια εγγενής αδυναμία να γίνει πλήρης εκμετάλλευση του εύρους των χαμηλών αλατοτήτων για το *Tigriopus* επειδή μεταξύ του απόλυτα γλυκού νερού (0 ppt) και της αμέσως επόμενης στην κλίμακα αλατότητας των 2 ppt υπάρχει μεγάλη και απότομη αλλαγή της θνησιμότητας από 100 % στο απόλυτα γλυκό νερό σε μόλις 15 % στο νερό των 2 ppt. Αυτό αποτυπώνεται στο Σχήμα 28 όπου η καμπύλη της θνησιμότητας παρουσιάζει απότομη μεταβολή (πτώση). Κατά συνέπεια στη γραφική αποτύπωση της ευθείας παλινδρόμησης των probits-αλατότητας (Σχήμα 32) λείπει η τιμή 5 στον άξονα των Y και ως εξ' αυτού δεν μπορούν να αποτυπωθούν πλήρως τα αναμενόμενα (expected) probits. Ομως παρ' όλο αυτό το μειονέκτημα ακριβούς υπολογισμού της αλατότητας που επιφέρει 50% θνησιμότητα σε αυτό το είδος κωπηπόδου σε αυτό το εύρος δοκιμασθέντων αλατοτήτων (0-20 ppt), μπορούμε να προσεγγίσουμε την αληθή κατάσταση ισχυριζόμενοι βάσει των αποτελεσμάτων (Πίνακας 5, Σχήμα 28) ότι το 50% της θνησιμότητας επέρχεται μεταξύ 0 και 2 ppt και ιδιαίτερα κάπου σε τιμή πλησιέστερα στο 0 παρά στο 2 ppt. Χάριν λοιπόν υπολογισμού του $LC_{50} \pm SE$ για το *Tigriopus* στο εύρος αλατοτήτων 0-20 ppt θεωρούμε την τιμή 1 ppt ότι επιφέρει 50% θνησιμότητα.

Συνεπώς για το *Tigriopus* $LC_{50} = 1$ ppt και τα όρια εμπιστοσύνης αυτού τίθενται υπολογίζοντας πρώτα το τυπικό σφάλμα (SE) από τον τύπο:

$$SE(LC_{50}) = \frac{1}{b\sqrt{pnw}}$$

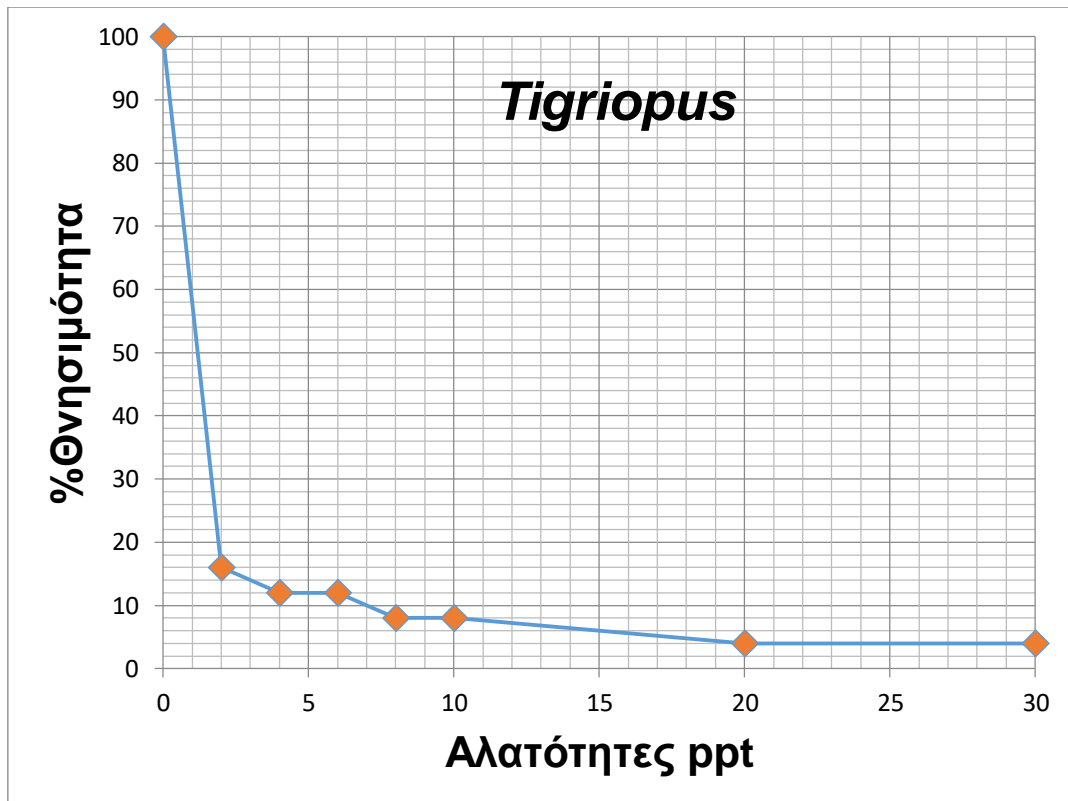
θέτοντας $b = 0,026$ κλίση της ευθείας του Σχήματος 32, $p = 7$ (αριθμός αλατοτήτων), $n = 25$ κωπήποδα σε κάθε αλατότητα, $w = 0.4298$ (η μέση τιμή των weights από τον Πίνακα 5). Μετά τις πράξεις έχουμε $SE(LC_{50}) = 4,4348$ Συνεπώς τα 95% όρια εμπιστοσύνης αυτού είναι $\pm 1,96 \times 4,43 = \pm 8,69$ τιμή όμως πολύ μεγαλύτερη από το $LC_{50} = 1$ ppt και πρακτικώς χωρίς νόημα, έτσι καταγράφουμε το LC_{50} χωρίς όρια εμπιστοσύνης δηλαδή $LC_{50} = 1$ ppt. Γενικώς αυτό που καταγράφηκε στις χαμηλές αλατότητες στο *Tigriopus* ήταν πολύ χαμηλές θνησιμότητες στο εύρος αλατοτήτων 2-30 ppt (από 16-8 %) και στο εύρος αλατοτήτων 40-60 ppt μηδενική θνησιμότητα (0 %).

Πίνακας 5. Αποτελέσματα πειράματος αντοχής στην αλατότητα των ενήλικων κωπηπόδων *Tigriopus*, και οι αντιστοιχούσες τιμές για την ανάλυση probit για τον υπολογισμό του LC₅₀ από τη στιγμή τοποθέτησης των ζώων έως το πέρας του πρώτου 24ωρου διενέργειας του πειράματος..

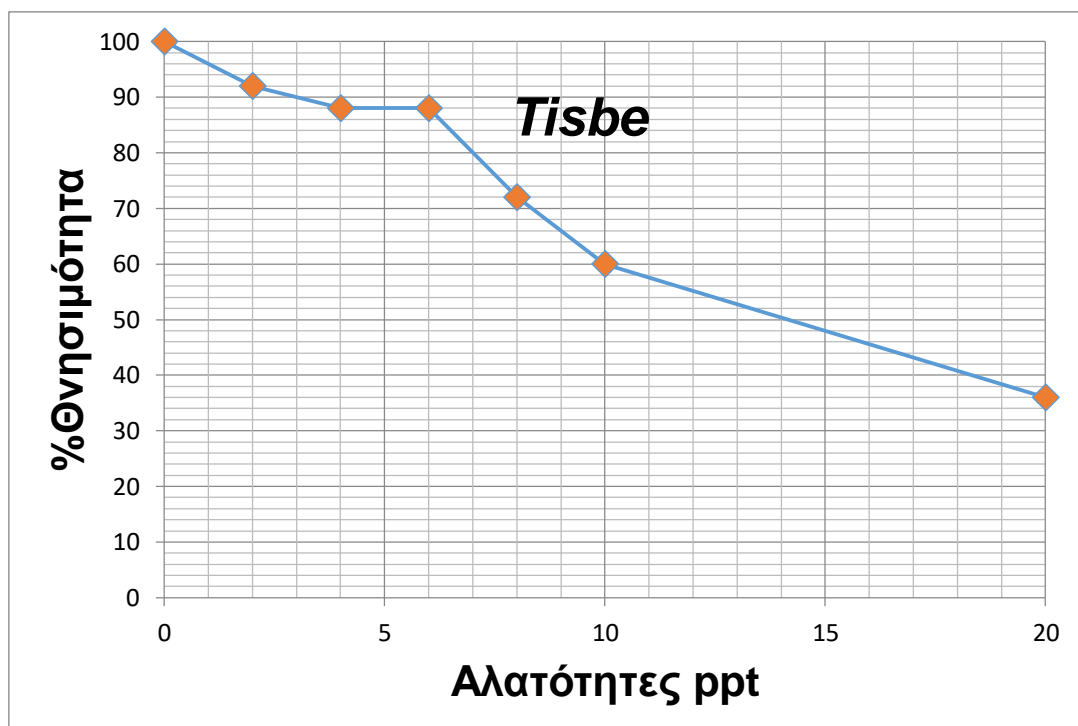
ΑΛΑΤΟΤΗΤΕΣ (ppt)	ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ <i>Tigriopus</i>	% ΘΝΗΣΙΝΟΤΗΤΑ	ΠΑΡΑΤΗΡΟΥΜΕΝΑ PROBIT	ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ PROBIT	WEIGHT
0	(25/25)	100	0	0	0
2	(4/25)	16	4	3,88	0,405
4	(3/25)	12	3,82	3,82	0,37
6	(3/25)	12	3,82	3,77	0,37
8	(2/25)	8	3,59	3,7	0,336
10	(2/25)	8	3,59	3,65	0,336
20	(1/25)	4	3,24	3,38	0,237
30	(1/25)	4	3,24	3,12	0,154
40	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0
70	(1/25)	4	3,24	3,1	0,154
80	(2/25)	8	3,59	3,33	0,208
90	(3/25)	12	3,82	3,64	0,302
100	(3/25)	12	3,82	3,95	0,439
105	(4/25)	16	4	4,12	0,471
110	(4/25)	16	4	4,28	0,532
115	(5/25)	20	4,15	4,43	0,558
120	(5/25)	20	4,15	4,59	0,601
125	(10/25)	40	4,74	4,75	0,627
130	(10/25)	40	4,74	4,9	0,634
135	(13/25)	52	5,05	5,06	0,634
140	(15/25)	60	5,25	5,22	0,627
145	(22/25)	88	6,17	5,38	0,601
150	(25/25)	100	0	0	0
				Αθροισμα Weight	8,596
				Μέση τιμή Weight	0,4298

Πίνακας 6. Αποτελέσματα πειράματος αντοχής στην αλατότητα των ενήλικων κωπηπόδων *Tisbe*, και οι αντιστοιχούσες τιμές για την ανάλυση probit για τον υπολογισμό του LC₅₀ από τη στιγμή τοποθέτησης των ζώων έως το πέρας του πρώτου 24ωρου διενέργειας του πειράματος.

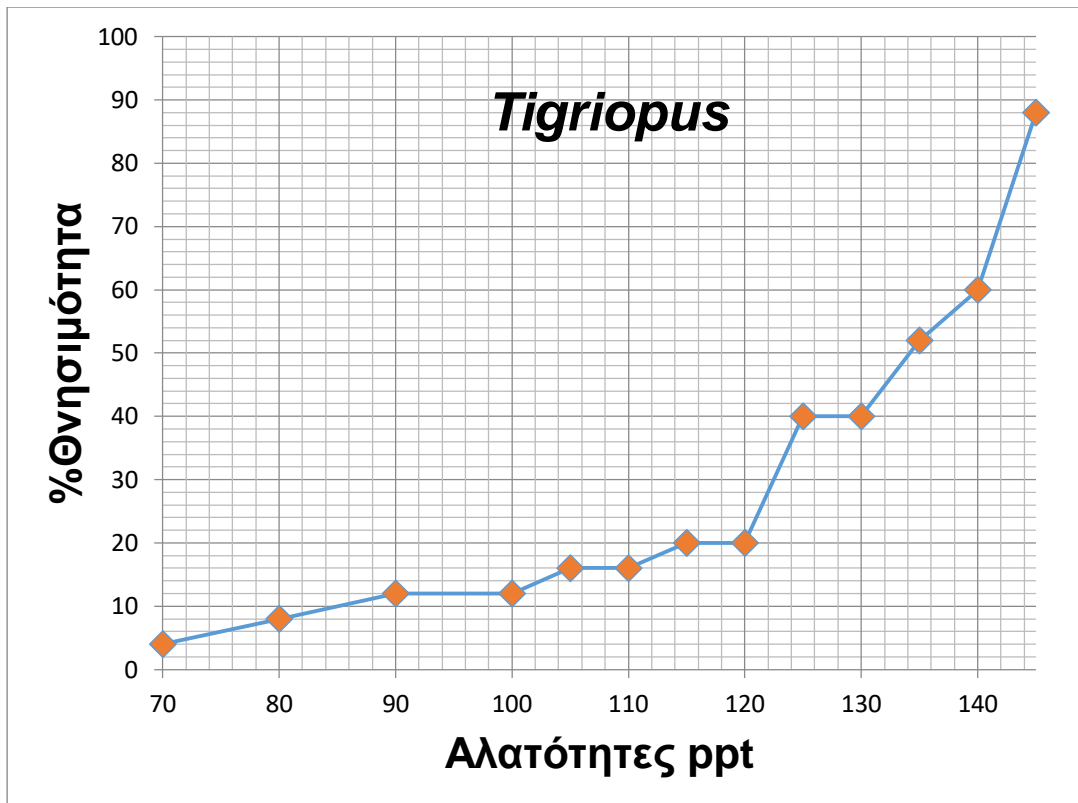
ΑΛΑΤΟΤΗΤΕΣ	ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ <i>Tisbe</i>	% ΘΝΗΣΙΝΟΤΗΤΑ	ΠΑΡΑΤΗΡΟΥΜΕΝΑ PROBIT	ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ PROBIT	WEIGHT
0	(25/25)	100	0	0	0
2	(23/25)	92	6,4	6,34	0,336
4	(22/25)	88	6,17	6,15	0,37
6	(22/25)	88	6,17	5,95	0,439
8	(18/25)	72	5,58	5,73	0,532
10	(15/25)	60	5,25	5,53	0,581
20	(9/25)	36	4,64	4,52	0,581
30	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0
60	(1/25)	4	3,24	2,83	0,092
70	(2/25)	8	3,59	3,48	0,269
80	(4/25)	16	4	4,13	0,471
90	(5/25)	20	4,15	4,78	0,627
100	(9/25)	36	4,64	5,43	0,601
105	(22/25)	88	6,17	5,76	0,503
110	(23/25)	92	6,4	6,08	0,401
115	(24/25)	96	6,75	6,41	0,302
120	(25/25)	100	0	0	0
Αθροισμα Weight					6,105
Μεση τιμη Weight					0,4360



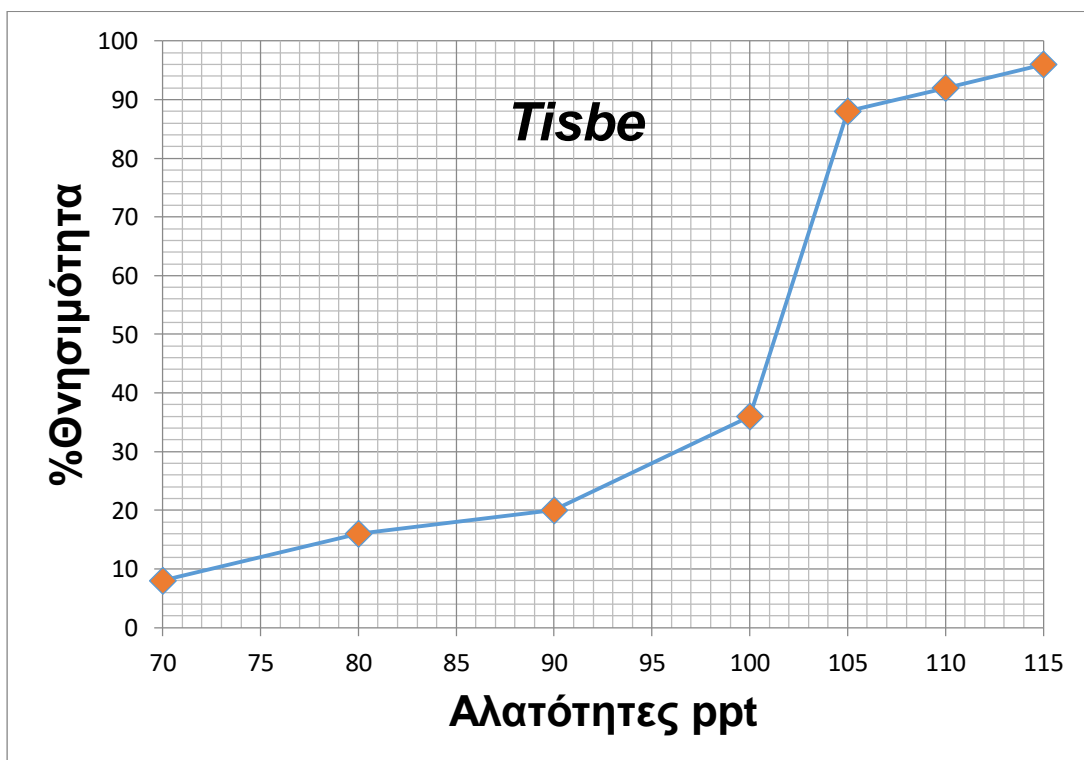
Σχήμα 28. Διάγραμμα μεταβολής του ποσοστού της θνησιμότητας των κωπηπόδων *Tigriopus* στο πείραμα αντοχής στην αλατότητα εύρους 0-30 ppt.



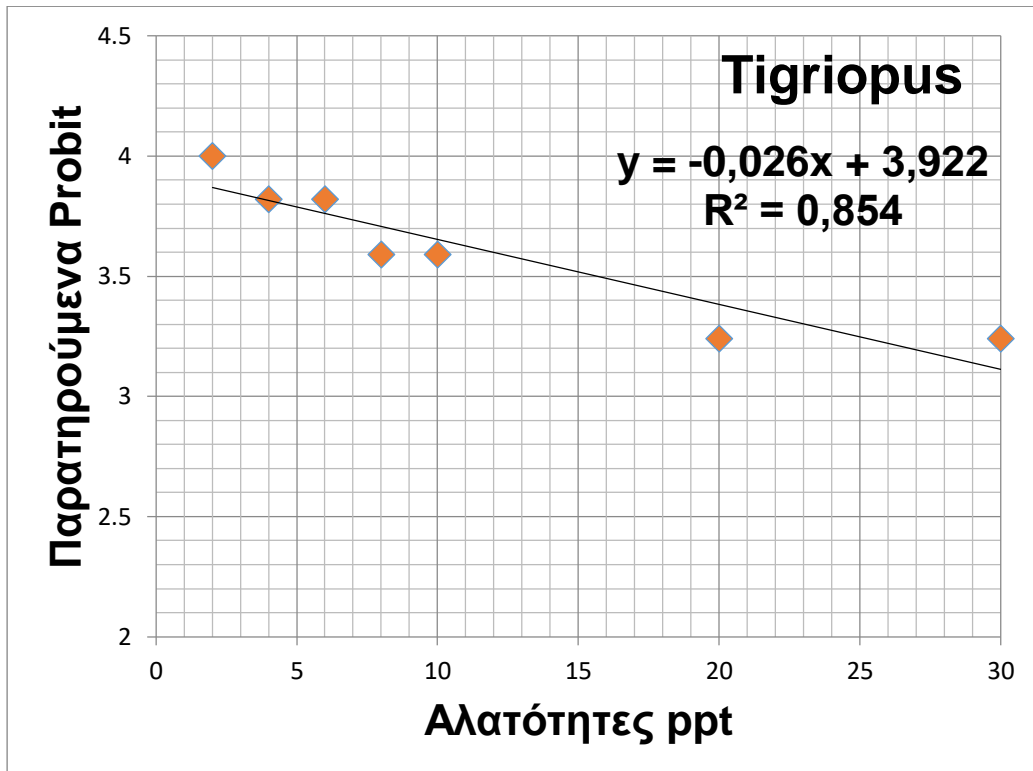
Σχήμα 29. Διάγραμμα μεταβολής του ποσοστού της θνησιμότητας των κωπηπόδων *Tisbe* στο πείραμα αντοχής στην αλατότητα εύρους 0-20 ppt.



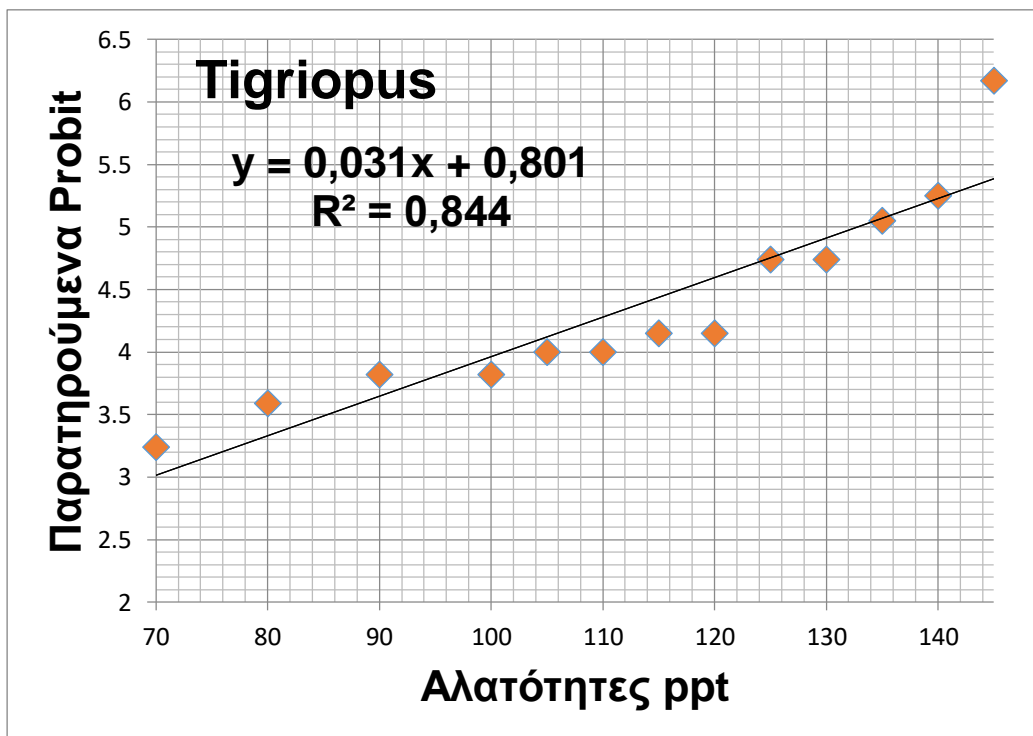
Σχήμα 30. Διάγραμμα μεταβολής του ποσοστού της θνησιμότητας των κωπηπόδων *Tigriopus* στο πείραμα αντοχής στην υψηλή αλατότητα εύρους 70-145 ppt.



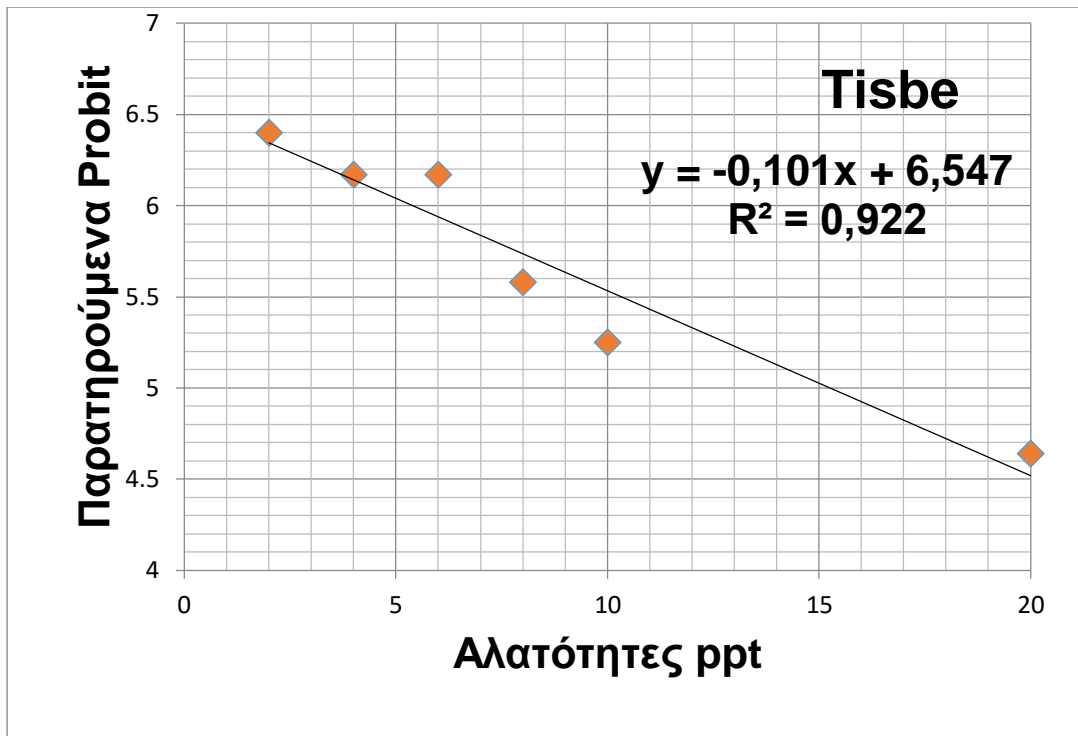
Σχήμα 31. Διάγραμμα μεταβολής του ποσοστού της θνησιμότητας των κωπηπόδων *Tisbe* στο πείραμα αντοχής στην υψηλή αλατότητα εύρους 70-115 ppt.



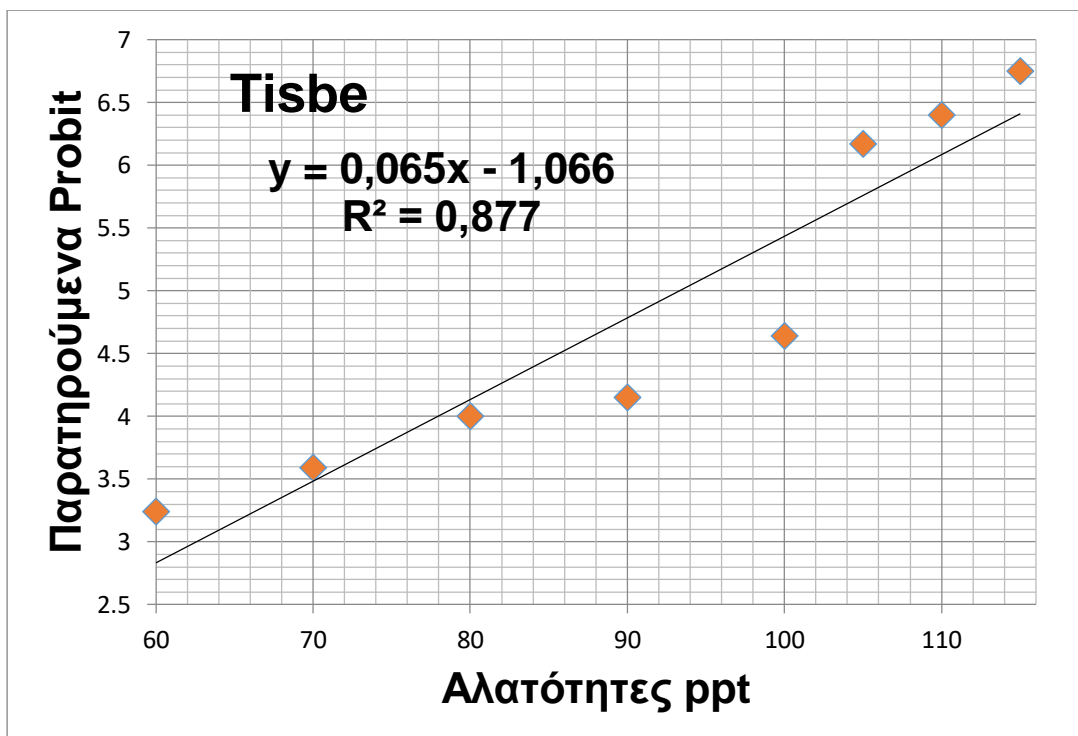
Σχήμα 32. Ευθεία παλινδρόμησης των παρατηρούμενων τιμών probit της θνησιμότητας των κωπηπόδων *Tigriopus* με τις χαμηλές αλατότητες εύρους 0-30 ppt.



Σχήμα 33. Ευθεία παλινδρόμησης των παρατηρούμενων τιμών probit της θνησιμότητας των κωπηπόδων *Tigriopus* με τις υψηλές αλατότητες εύρους 70-145 ppt.



Σχήμα 34. Ευθεία παλινδρόμησης των παρατηρούμενων τιμών probit της θνησιμότητας των κωπηπόδων *Tisbe* με τις χαμηλές αλατότητες εύρους 0-20 ppt.



Σχήμα 35. Ευθεία παλινδρόμησης των παρατηρούμενων τιμών probit της θνησιμότητας των κωπηπόδων *Tisbe* με τις υψηλές αλατότητες εύρους 60-115 ppt.

Για το *Tisbe* στις αντίστοιχες χαμηλές αλατότητες (0-20 ppt) τα αποτελέσματα (Πίνακας 6, Σχήματα 29 & 34) παρουσιάζουν διαφορετική εικόνα από την αντίστοιχη για το *Tigriopus*. Πιο συγκεκριμένα στην αλατότητα των 0 ppt και αυτό το είδος παρουσιάζει 100 % θνησιμότητα. Όμως σε αντίθεση με το *Tigriopus* στις αλατότητες από 2 έως 10 ppt η θνησιμότητα του *Tisbe* παραμένει πολύ υψηλή (άνω του 50%) και μόνο στα 20 ppt μειώνεται (33%) για να μηδενιστεί στο εύρος αλατοτήτων 30-50 ppt.

Για το *Tisbe* στο πείραμα της χαμηλής αλατότητας ο υπολογισμός του LC_{50} έγινε υπολογίζοντας από το Σχήμα 34 την τιμή του σε 15 ppt. Ο υπολογισμός του τυπικού σφάλματος $SE(LC_{50}) = 1,22$ έγινε βάσει των τιμών $b = 0,101$ κλίση της ευθείας του Σχήματος 34, $p = 7$ (αριθμός αλατοτήτων), $n = 25$ κωπήποδα σε κάθε αλατότητα, $w = 0,4360$ η μέση τιμή των weights από τον Πίνακα 6. Μετά από αυτά προκύπτει $LC_{50} (95\% CL) = 15 \pm 2,41$ ppt.

Στις υψηλότερες των 50 ppt αλατότητες η αύξηση της θνησιμότητας στο *Tisbe* παραμένει χαμηλή (2-36 %) και μόνο από τα 100 ppt και πάνω σταδιακά κορυφώνεται μέχρι την απόλυτη τιμή της (100% πρακτικά από τα 115 ppt) (Πίνακας 6, Σχήμα 31). Αντιθέτως για το *Tigriopus* στις υψηλές αλατότητες (>60 ppt) η θνησιμότητα παραμένει πολύ χαμηλή (χαμηλότερη από τις αντίστοιχες του *Tisbe*) και ξεπερνά την τιμή του 50% μόνο σε μεγαλύτερες των 130 ppt αλατότητες. Απόλυτη θνησιμότητα 100 % παρουσιάζεται από τα 150 ppt.

Για το πείραμα των υψηλών αλατοτήτων στο *Tigriopus* ο υπολογισμός του LC_{50} έγινε υπολογίζοντας από το Σχήμα 33 την τιμή του σε 132 ppt. Ο υπολογισμός του τυπικού σφάλματος $SE(LC_{50}) = 2,7293$ έγινε βάσει των τιμών $b = 0,031$ κλίση της ευθείας του Σχήματος 33, $p = 7$ (αριθμός αλατοτήτων), $n = 25$ κωπήποδα σε κάθε αλατότητα, $w = 0,4298$ η μέση τιμή των weights από τον Πίνακα 5. Μετά από αυτά προκύπτει $LC_{50} (95\% CL) = 132 \pm 5,35$ ppt.

Για το πείραμα των υψηλών αλατοτήτων στο *Tisbe* ο υπολογισμός του LC_{50} έγινε υπολογίζοντας από το Σχήμα 35 την τιμή του σε 93 ppt. Ο υπολογισμός του τυπικού σφάλματος $SE(LC_{50}) = 1,6475$ έγινε βάσει των τιμών $b = 0,065$ κλίση της ευθείας του Σχήματος 35, $p = 7$ (αριθμός αλατοτήτων), $n = 25$ κωπήποδα σε κάθε αλατότητα, $w = 0,4360$ η μέση τιμή των weights από τον Πίνακα 6. Μετά από αυτά προκύπτει $LC_{50} (95\% CL) = 93 \pm 3,23$ ppt.

Εκτός από το πλαίσιο του πειράματος του υπολογισμού της θνησιμότητας των δύο ειδών κωπηπόδων μετά από απότομη μεταφορά σε ποικίλες θνησιμότητες, έγιναν και προκαταρκτικά πειράματα σταδιακού εγκλιματισμού των σε διάφορες ακραίες αλατότητες για να διαπιστωθεί αν σε αυτές μπορούν να επιτελέσουν τις συνήθεις βιολογικές τους διεργασίες. Ετσι από τις αποθεματικές καλλιέργειες και των δύο ειδών κωπηπόδων που διατηρούνταν σε αλατότητα 35-37 ppt λήφθηκαν από 2 αβγωμένα άτομα και τοποθετήθηκαν σε μικρά δοχεία των 30 ml. Στα δοχεία αυτά γίνονταν κατά περίπτωση σταδιακή ημερήσια αύξηση ή μείωση της αλατότητας σε βήματα ~ 2 ppt μέχρι να φθάσουν την επιθυμητή αλατότητα. Δημιουργήθηκαν έτσι αλατότητες 50, 60, 70, 80 και 90 ppt ως προς το υψηλότερο μέρος και 25, 20,

15 και 10 ppt ως προς το χαμηλότερο με 2 επαναλήψεις (αντίγραφα) για την κάθε αλατότητα. Οι παρατηρήσεις για την αντίδραση των κωπηπόδων σε αυτές τις αλατότητες έδειξαν ότι και τα δύο είδη παρουσιάζουν φυσιολογική συμπεριφορά με αύξηση του πληθυσμού και ανάπτυξη των ναυπλίων στις αλατότητες 50, 60 και 70 ppt στις υψηλότερες και στις 25, 20, 15 και 10 ppt για το *Tigriopus* και 25 και 20 ppt για το *Tisbe*. Ως κριτήριο προσαρμογής και απρόσκλητης επιτέλεσης των φυσιολογικών τους δραστηριοτήτων χρησιμοποιήθηκε η παρατήρηση για το εάν σε διάρκεια 25 ημερών παρουσιάστηκε εκκόλαψη των αυγών, ανάπτυξη ναυπλίων και δημιουργία νέων ενήλικων τουλάχιστον 10 ατόμων. Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματισμών αυτών προστίθονταν στα δοχεία μικροποσότητες συμπυκνωμένου μίγματος μικροφυκών κάθε 5 ημέρες. Ο έλεγχος της αλατότητας ήταν καθημερινός και κάθε αλλαγή λόγω εξάτμισης της αλατότητας που ξεπερνούσε τα 2 ppt διορθώνονταν με πρόσθεση μικροποσότητας αποσταγμένου νερού.

Πείραμα διατροφής

Μετά το πέρας των 28 ημερών και την καταμέτρηση των υπαρχόντων ζωντανών ατόμων σε κάθε διαμέρισμα των πλακών που χρησιμοποιήθηκαν έγιναν οι σχετικές στατιστικές αναλύσεις. Όπως προκύπτει από την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για τη σύγκριση των μέσων τιμών για τις τιμές από τα 25 διαμερίσματα (επαναλήψεις) για κάθε τύπο τροφής ανά είδος κωπηπόδου υπήρχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο επίπεδο σημαντικότητας 0,05 (Πίνακες 7 και 8).

Πίνακας 7. Αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) των μέσων τιμών του αριθμού των κωπηπόδων του γένους *Tigriopus* από τα 25 μεταξύ όλων των τύπων της τροφής (5 διαφορετικά είδη φυτοπλαγκτού).

ANOVA Test for equal means for all foods in <i>Tigriopus</i>					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	11187,6	4	2796,91	103,8	5,268E-38
Within groups:	3234,16	120		26,9513	
Permutation p (n=99999)					
Total:	14421,8	124			1E-05
Levene's test for homogeneity of variance, from means				p (same)	6,277E-13
Levene's test, from medians				p (same):	2,05E-12
Welch F test in the case of unequal variances:				F=75,29, df=58,04,	p=2,696E-22

Πίνακας 8. Αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) των μέσων τιμών του αριθμού των κωπηπόδων του γένους *Tisbe* από τα 25 μεταξύ όλων των τύπων της τροφής (5 διαφορετικά είδη φυτοπλαγκτού).

ANOVA Test for equal means for all foods in <i>Tisbe</i>					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	3060,83	4	765,208	52,73	1,45E-25
Within groups:	1741,44	120	14,512		
Permutation p (n=99999)					
Total:	4802,27	124			1E-05
Levene's test for homogeneity of variance, from means				p (same):	4,464E-06
Levene's test, from medians				p (same):	9,791E-06
Welch F test in the case of unequal variances:				F=43,66, df=58,76,	p=5,795E-17

Για τις συγκρίσεις της απόδοσης σε άτομα μεταξύ των δύο ειδών κωπηπόδων με τον ίδιο τύπο τροφής πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μέσων τιμών των ατόμων ανά διαμέρισμα χρησιμοποιώντας t-test. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 9 υπήρχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) σε όλα τα συγκρινόμενα ζεύγη. Την καλύτερη απόδοση του *Tisbe* συγκριτικά με το *Tigriopus* την παρατηρήσαμε με το φύκος *Asteromonas gracilis* (19,16 άτομα/διαμ. έναντι 14,8) και στην περίπτωση του φύκου *Isochrysis* (10,32 έναντι 5,48).

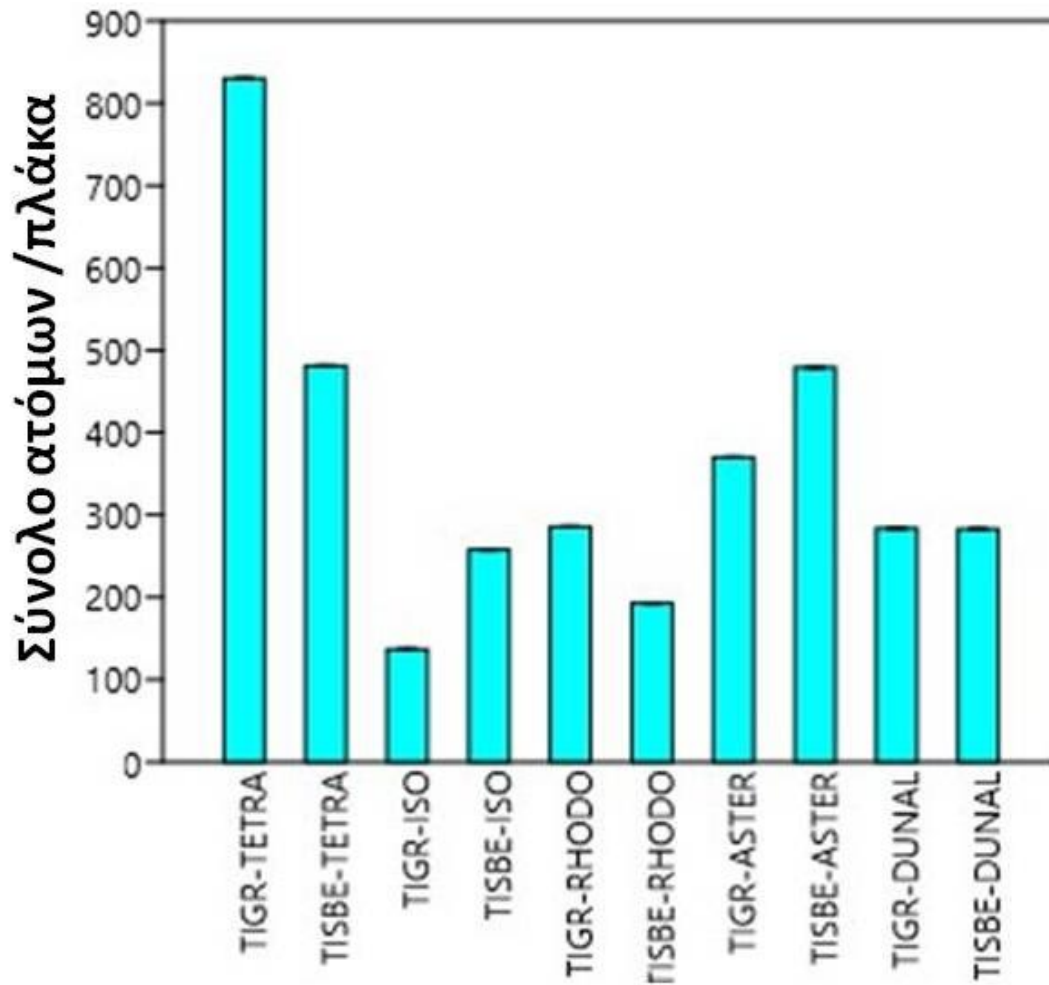
Για όλα τα άλλα φύκη (*Tetraselmis suecica*, *Rhodomonas salina* και *Dunaliella salina*) το *Tigriopus* παρουσίασε μεγαλύτερες τιμές από τις αντίστοιχες του *Tisbe* (33,2, 11,44 και 11,36 έναντι 19,24, 7,72 και 9,72 αντίστοιχα). Το φύκος *Tetraselmis* παρουσίασε γενικώς την καλύτερη απόδοση από όλα τα άλλα και στα δύο είδη κωπηπόδων (ιδιαίτερα στο *Tigriopus*, 33,2) ακολουθούμενο κατόπιν από το *Asteromonas gracilis* το οποίο όμως παρουσίασε υψηλότερη τιμή (19,16) από την αντίστοιχη του *Tigriopus* (14,8). Αυτό διαπιστώνεται ξεκάθαρα από την εξέταση των Σχημάτων 36 και 37 τόσο στο επίπεδο της συνολικής απόδοσης σε άτομα και στα 25 διαμερίσματα της κάθε πλάκας όσο και στις μέσες τιμές από το εκάστοτε σύνολο των 25 διαμερισμάτων.

Συγκρίνοντας τις μέσες τιμές των διαφόρων τύπων τροφής για κάθε είδος κωπηπόδου ξεχωριστά διαπιστώνεται ότι για το *Tigriopus* μόνο μεταξύ της *Rhodomonas* και της *Dunaliella* υπήρχε ομοιότητα (μη σημαντική διαφορά στο επίπεδο 0,05) βάσει Tukey's test (11,44 και 11,36). Σε όλα τα άλλα φύκη οι μέσες τιμές διέφεραν σημαντικά. Από την αντίστοιχη ανάλυση για το *Tisbe* μεταξύ της *Isochrysis*, *Rhodomonas* και της *Dunaliella* υπήρχε ομοιότητα (μη σημαντική διαφορά στο επίπεδο 0,05) βάσει Tukey's test (10,32, 7,72 και 9,72). Δηλαδή μεταξύ των φυκών που παρουσίασαν τις μικρότερες αποδόσεις για το κωπήποδο αυτό συγκρινόμενες με τις μεγαλύτερες που παρουσιάστηκαν χρησιμοποιώντας *Tetraselmis* και *Asteromonas* (19,24 και 19,16 αντίστοιχα, στατιστικώς όμοιες).

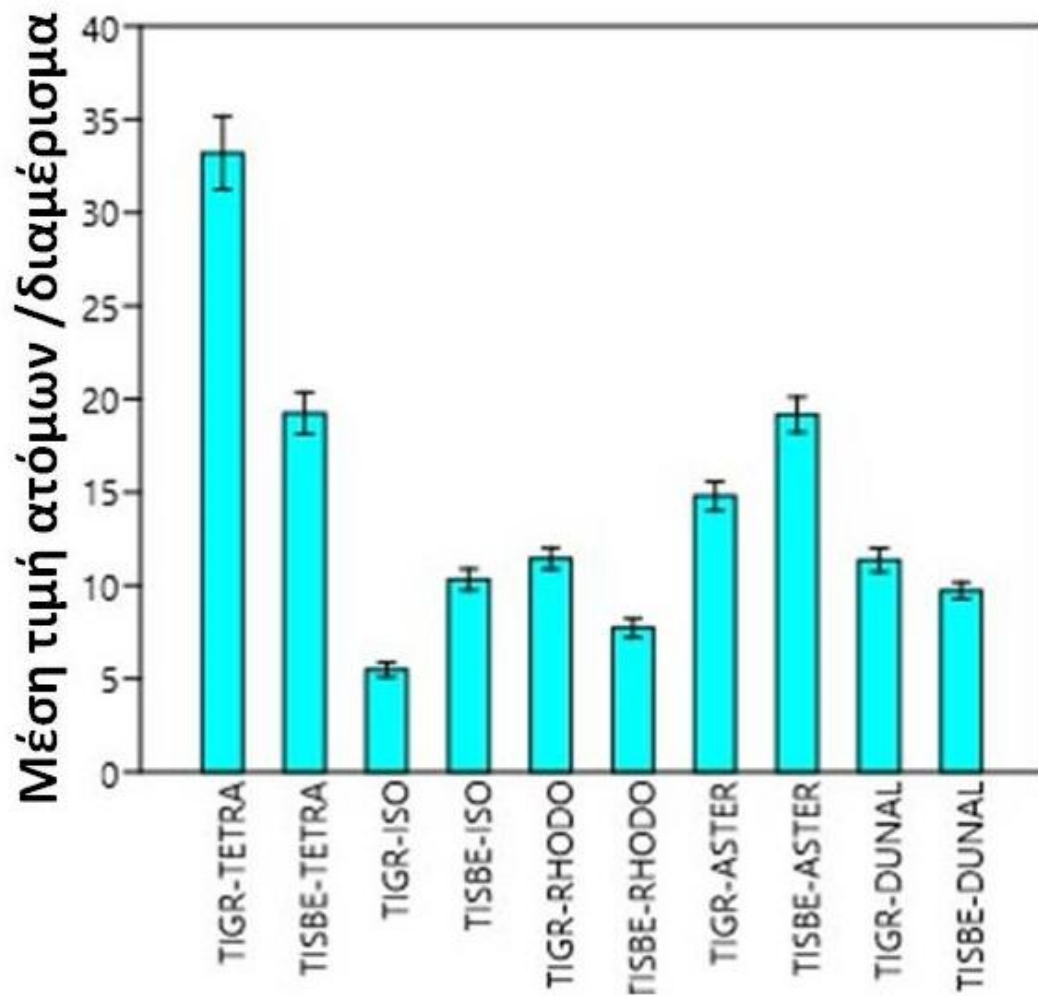
Πίνακας 9. Συγκεντρωτικά στατιστικά στοιχεία για το πείραμα διατροφής των κωπηπόδων *Tigriopus* και *Tisbe* χρησιμοποιώντας 5 διαφορετικά είδη φυτοπλαγκτού ως τροφή. Οι διαφορετικοί δείκτες (A) και (B) δηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά στο επίπεδο 0,05 βάσει t-test για τα εκάστοτε συγκρινόμενα ζεύγη τιμών των δύο ειδών κωπηπόδων για τον ίδιο τύπο τροφής.

Ο δείκτης (1) δηλώνει μη στατιστικώς σημαντική διαφορά στο επίπεδο 0,05 (δηλαδή ομοιότητα) βάσει Tukey's test μεταξύ όλων των τροφών για το *Tigriopus*. Ο δείκτης (2) δηλώνει μη στατιστικώς σημαντική διαφορά στο επίπεδο 0,05 (δηλαδή ομοιότητα) βάσει Tukey's test μεταξύ όλων των τροφών για το *Tisbe*. Στις τιμές που δεν υπάρχουν δείκτες υφίσταται στατιστικώς σημαντική διαφορά στο επίπεδο 0,05 (δηλαδή ομοιότητα) βάσει Tukey's test.

	TIGR-TETRA	TISBE-TETRA	TIGR-ISO	TISBE-ISO	TIGR-RHODO	TISBE-RHODO	TIGR-ASTER	TISBE-ASTER	TIGR-DUNAL	TISBE-DUNAL
Αριθμός κωπηπόδων N (αρχή)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Σύνολο κωπηπόδων N (μετά 28 ημέρες)	830	481	137	258	286	193	370	479	284	243
Μέση τιμή (άτομα/διαμ.)	33,2 ^A	19,24 ^B	5,48 ^A	10,32 ^{B (2)}	11,44 ^{A (1)}	7,72 ^{B (2)}	14,8 ^A	19,16 ^B	11,36 ^{A (1)}	9,72 ^{B (2)}
Ελάχιστο N	18	10	3	4	7	3	10	10	6	5
Μέγιστο N	54	29	10	17	17	13	22	26	18	13
Τυπική απόκλιση	9,836	5,577	2,002	2,868	2,887	2,491	3,905	4,696	3,225	2,227
Τυπικό σφάλμα	1,96	1,115	0,40	0,57	0,577	0,498	0,78	0,939	0,645	0,445
Συντελεστής ποικιλότητας	29,62	28,98	36,54	27,79	25,24	32,27	26,38	24,51	28,39	22,91
Διακύμανση	96,75	31,10	4,01	8,22	8,34	6,21	15,25	22,05	10,40	4,96
Τάχος αύξησης r	0,13	0,11	0,06	0,08	0,09	0,07	0,10	0,11	0,09	0,08
Χρόνος γενεάς tg	5,33	6,30	11,55	8,66	7,70	9,90	6,93	6,30	7,70	8,66



Σχήμα 36. Το σύνολο των καταμετρηθέντων ατόμων στο τέλος της περιόδου των 28 ημερών και στα 25 διαμερίσματα της κάθε πλάκας που χρησιμοποιήθηκε για κάθε τύπο τροφής για το κάθε είδος κωπηπόδου.



Σχήμα 37. Μέσες τιμές και εύρος του τυπικού σφάλματος των καταμετρηθέντων ατόμων στο τέλος της περιόδου των 28 ημερών από τα 25 διαμερίσματα της κάθε πλάκας που χρησιμοποιήθηκε για κάθε τύπο τροφής για το κάθε είδος κωπηπόδου.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ. ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Καθώς η επιστημονική κοινότητα έχει επικεντρώσει το ενδιαφέρον της στην μελέτη των υδάτινων οικοσυστημάτων αυτό περιλαμβάνει και τα τροφικά πλέγματα όπου βασικότατο ρόλο διαδραματίζει το ζωοπλαγκτόν, μέρος του οποίου αποτελούν και τα αρπακτικοειδή κωπήποδα *Tigriopous & Tisbe* της παρούσας εργασίας. Η προσέγγιση του εκάστοτε ειδικότερου θέματος εξαρτάται κυρίως από την επιστημονική σκοπιά που το εξετάζουν οι ερευνητές, αυτό ουσιαστικά είναι και το μεγαλύτερο πρόβλημα που προκύπτει, επειδή υπάρχει μεγάλο πλήθος δημοσιευμένων ερευνών, που ενώ ασχολούνται με το ίδιο αντικείμενο έρευνας, δεν υπάρχουν τα ανάλογα κριτήρια σύγκρισης. Στην καλύτερη περίπτωση οι εμπλεκόμενοι με την έρευνα, μπορούν να "αλιεύσουν" γενικά δεδομένα και να τα προσαρμόσουν στην ειδικότερη εργασία τους όπως έγινε και στην παρούσα έρευνα, ώστε να υπάρχουν κοινά σημεία αναφοράς. Για την περίπτωση των κωπηπόδων υπάρχει ένα μεγάλο πλήθος δημοσιευμένων ερευνών με τίτλο "Γονιμότητα", αποτελώντας έτσι ένα ερευνητικό αντικείμενο αρκετά ογκώδες, ποικίλο και πολύπλοκο, αποτελέσματα του οποίου είναι ο κάθε εμπλεκόμενος να καλείται να αποκωδικοποιήσει αυτή τη "θάλασσα". Στην παρούσα έρευνα το θέμα της γονιμότητας ασχολήθηκε με την ανάπτυξη και παραγωγή των κωπηπόδων των γενών *Tigriopous & Tisbe* ως προς: α) Μέση τιμή παραγωγής ναυπλίων / ημέρα υπό ελεγχόμενες συνθήκες και β) Συνολική παραγωγή ναυπλίων από 25 θηλυκά στελέχη κωπηπόδων που διέθεταν ωόσακκο έως τη χρονική εξάντληση του. Αυτό που προσπάθησε να αναδείξει η παρούσα εργασία και τελικά κατάφερε ήταν η ημερήσια παραγωγή ναυπλίων ατομικώς από κάθε ωόσακοφόρο θηλυκό. Κάτι τέτοιο δεν μπορεί να εκτιμηθεί με ακρίβεια όταν τα πειράματα σχεδιαστούν να γίνουν με πολλά θηλυκά σε ένα δοχείο όσο μικρό και αν είναι το δοχείο όσο μικρός και αν είναι ο αριθμός των εισαχθέντων κωπηπόδων. Σε τέτοιους πειραματισμούς μόνο μια κατά προσέγγιση τιμή παραγωγής ναυπλίων μπορεί να υπολογιστεί. Η κατάσταση στα κωπήποδα γίνεται πιο περίπλοκη κατά τον υπολογισμό της γονιμότητας για δύο κυρίως λόγους. Πρώτον παράγουν πολλές φουρνιές (batches ή broods) αβγών κατά τη διάρκεια της ζωής των, συγκροτημένους ως μάζα αβγών σε υμενώδη σάκο (ωόσακκος) και δεύτερον ο αριθμός των σχηματιζόμενων ωόσακκων δεν είναι σταθερός ούτε είναι σταθερός ο αριθμός των αβγών που περιέχει ο καθένας τους. Αν μάλιστα συνυπολογιστεί και το ότι οι ναύπλιοι που απελευθερώνονται από την εκκόλαψη των αβγών δεν εκκολάπτονται ταυτόχρονα αλλά σταδιακά, τότε το να ορίσεις τι σημαίνει γονιμότητα στα κωπήποδα δεν είναι μια απλή υπόθεση. Έτσι σε διάφορες εργασίες που αναφέρονται στα κωπήποδα ως προς τη γονιμότητά τους παρουσιάζεται μεγάλη ποικιλία στα νούμερα που αναφέρουν. Άλλοι ερευνητές ορίζουν ως γονιμότητα τη συνολική παραγωγή αβγών καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του κωπηπόδου, άλλοι το συνολικό παραγόμενο αριθμό ναυπλίων επίσης καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του. Όμως και στις δύο αυτές περιπτώσεις είναι

απαραίτητο να παρακολουθείται ατομικώς το κάθε εξεταζόμενο θηλυκό για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα από τη στιγμή που εμφανίζει τον πρώτο ωόσακο μέχρι εξάντλησής του και κατόπιν κατά τη διάρκεια εμφάνισης και εξάντλησης και των υπόλοιπων ωόσακων όσοι και αν είναι αυτοί μέχρι το τέλος της ζωής του. Κάτι τέτοιο όμως δεν είναι εύκολο και στις περισσότερες μελέτες σε κάθε δοχείο πειραματισμού τοποθετούνται αρκετά θηλυκά οπότε η παρακολούθηση της εμφάνισης των ναυπλίων οδηγεί μόνο σε συμπεράσματα μέσης τιμής παραγωγής ναυπλίων ανά θηλυκό, τα οποία είναι μεν σημαντικά αλλά δεν μπορούν να αποτυπώσουν με ακρίβεια τη δυναμική παραγωγής ναυπλίων από το κάθε εξεταζόμενο θηλυκό. Στην παρούσα μελέτη η οποία πρέπει να θεωρηθεί ως αρχική σειράς πειραμάτων που θα ακολουθήσουν στο μέλλον έχοντας την παρούσα ως βάση, επιχειρήθηκε ακριβώς η διασάφηση αυτής της κατάστασης με τοποθέτηση ενός μόνο θηλυκού κωπηπόδου από το κάθε είδος σε ατομικό θάλαμο προκειμένου να καταγράφονται οι παραγόμενοι απόγονοι (ναύπλιοι) καθημερινώς. Αυτό που παρατηρήθηκε και για τα δύο είδη κωπηπόδων (*Tisbe* & *Tigriopus*) και το οποίο δεν αναφέρεται στις άλλες δημοσιευμένες εργασίες είναι η σταδιακή παραγωγή ναυπλίων από ένα ωόσακο, δηλαδή δεν εκκολάπτονται όλα τα αβγά του ταυτόχρονα αλλά σταδιακώς μέσα σε διάστημα ορισμένων ημερών, 4 για το *Tsbe*, 8 για το *Tigriopus*. Επιπλέον όπως φαίνεται από τις τιμές των Πινάκων 1 και 2 η παραγωγή ναυπλίων ανά ημέρα δεν είναι σταθερή ούτε ακολουθεί κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο. Συγκρίνοντας τις τιμές παραγωγής ναυπλίων που προκύπτουν από ωοσακοφόρα θηλυκά των γενών *Tisbe* & *Tigriopus* είναι πολύ δύσκολο έως αδύνατον να καταλήξουμε σε κάποιο πρότυπο. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ως προς τη θερμοκρασία και την αλατότητα σε συνδυασμό με τις χρησιμοποιηθείσες πυκνότητες των ατόμων ανά ml ή L, οι ποικίλες χωρητικότητες των δοχείων, οι διαφορετικές χρησιμοποιηθείσες τροφές αλλά και η φωτοπεριοδικότητα, όλα αυτά καθιστούν δύσκολη την αποκωδικοποίηση της γονιμότητας και δεν μπορούν παρά μόνο αόριστα και θολά να σκιαγραφήσουν τη δημογραφική κατάσταση αυτών των ζώων σε ελεγχόμενες συνθήκες. Οι ελεγχόμενες συνθήκες μας ενδιαφέρουν επειδή οι πειραματισμοί που έχουν γίνει, λιγότερο ή περισσότερο αποσκοπούν στο να διερευνηθεί η δυνατότητα να παράγουν αυτά τα ζώα τους περισσότερους δυνατών απογόνους, στον μικρότερο δυνατό χρόνο, υπό συνθήκες συνωστισμού για να δοθούν οι προκύπτοντες ναύπλιοι ή οι κατόπιν αναπτυσσόμενοι κωπηποδίτες ως εξαιρετικής σύνθεσης ζωντανές τροφές στις λάρβες των παραγόμενων στα ιχθυοεκκολαπτήρια θαλασσινών ψαριών. Στην παρούσα μελέτη ως βάση σύγκρισης με άλλες μελέτες χρησιμοποιούμε τις μέσες τιμές παραγωγής ναυπλίων από κάθε ωοσακοφόρο θηλυκό *Tisbe* και *Tigriopus* (20 επαναλήψεις για το κάθε είδος) μέχρι εξάντλησης του ωόσακού τους (πρώτος ωόσακος). Έτσι σε αλατότητα 35 ppt και θερμοκρασία κάτω των 20 °C (15-19 °C) το μεν *Tisbe* έδωσε 34,6 ναυπλίους/ωόσακο (πρακτικώς 35 ναυπ./ωόσ.) το δε *Tigriopus* 34,4 ναυπλίους/ωόσακο (πρακτικώς 34 ναύπ./ωόσ.). Ως προς τη θερμοκρασία η οποία είναι παρόμοια με αυτή (19 °C) που χρησιμοποίησαν για τα πειράματά τους με το *Tisbe holothuriae* οι Miliou & Moraitou-Apostolopoulou (1991 a & b) κατά τις οποίες η απόδοση σε

παραγόμενους ναυπλίους ανά ωόσακκο αυξάνει σε χαμηλότερες των 19 °C θερμοκρασίες ενώ συγχρόνως επιφέρεται μακρύτερος χρόνος ωρίμανσης δηλαδή παραγωγής διαδοχικών ωόσακκων. Σύμφωνα με τις παραπάνω ερευνητήριες η παραγωγή σε ναυπλίους μειώνεται σε κάθε διαδοχικό ωόσακκο με περίπου 30-35 ναυπλίους για τον πρώτο ωόσακκο και πολύ μικρότερο αριθμό για τους επόμενους και τελικώς συνολική παραγωγή ναυπλίων ανά θηλυκό περί τους 76 απογόνους. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας ως προς την παραγωγή ναυπλίων από τον πρώτο ωόσακκο στο *Tisbe* είναι σχεδόν παρόμοια (~35 ναύπλιοι/ωόσακκο) με τα ευρεθέντα από τις παραπάνω ερευνητήριες συνεπώς μπορούμε με σχετική σιγουριά να υπολογίζουμε σε μελλοντικές εκτροφές ότι αυτό το νούμερο αντιπροσωπεύει όντως τη γονιμότητα του είδους αυτού. Όμως υπάρχουν ορισμένα θέματα που πρέπει να διευκρινιστούν με μελλοντική μελέτη και αυτά αφορούν τόσο τη συνολική παραγωγή ναυπλίων από ένα θηλυκό από όλους τους ωόσακκους που θα σχηματίσει. Σε αυτό το θέμα οι παραπάνω ερευνητήριες δίδουν ως μέγιστο αριθμό ναυπλίων τους 76 και το νούμερο αυτό συνδυαζόμενο με τις επιπλέον πληροφορίες που δίδουν ήτοι 6,14 ημέρες για τη ναυπλιακή ολοκλήρωση, 1,46 ημέρες για ωρίμανση του ωόσακκου και 14,67 ημέρες για διάρκεια ζωής δημιουργεί ορισμένα ερωτηματικά που χρειάζονται κατά τη γνώμη μας περαιτέρω διερεύνηση. Σε αυτό καταλήγουμε επειδή χωρίς να έχουμε διεξάγει ειδικό πείραμα επ' αυτού αλλά μάλλον από γενικές παρατηρήσεις της καλλιέργειας κωπηπόδων *Tisbe* στο εργαστήριο καλλιέργειας πλαγκτού (Χώτος, προσωπική επικοινωνία), έχει διαπιστωθεί πολύ μακρύτερη διάρκεια ζωής των κωπηπόδων (~2 μήνες), περισσότεροι από 4 ωόσακκους να σχηματίζονται από ένα θηλυκό και γενικώς αρκετά περισσότεροι από 76 ναυπλίους να προκύπτουν από ένα θηλυκό καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του. Επίσης στην ίδια σειρά παρατηρήσεων ανήκει και η βάσιμη υπόθεση (μένει να διαπιστωθεί πειραματικώς) ότι η γονιμοποίηση ενός θηλυκού *Tisbe* συμβαίνει άπαξ και όλοι οι ωόσακκοι που σχηματίζει σε όλη τη ζωή του περιέχουν φουρνιές αβγών γονιμοποιημένων από την ίδια ποσότητα σπέρματος που φέρει το θηλυκό από την πρώτη και μοναδική συνουσία που είχε με ένα αρσενικό. Αν για τα κωπήποδα του γένους *Tisbe* οι πληροφορίες από τη βιβλιογραφία σχετικά με τη γονιμότητα έτσι όπως την ορίσαμε είναι σχεδόν ελάχιστες, για τα κωπήποδα του γένους *Tigriopus* είναι και περισσότερες και πιο ξεκάθαρες ως προς την παραγωγή ναυπλίων ανά ωόσακκο έστω και αν οι περισσότερες αναφέρονται στο είδος *Tigriopus japonicus*. Έτσι οι Hagiwara et al (1995) πειραματιζόμενοι με το *Tigriopus japonicus* σε θερμοκρασία 25 °C σε 4 διαφορετικές αλατότητες 4, 8, 16 και 32 ppt βρήκαν αριθμό παραγόμενων ναυπλίων για τον πρώτο ωόσακκο 23, 32, 39 και 52 και συνολικό αριθμό ναυπλίων από όλους τους ωόσακκους 270, 449, 635 και 831 αντίστοιχα. Ο αντίστοιχος αριθμός της παρούσας εργασίας (~ 34 ναύπλιοι/ωόσακκο) για μια παρόμοια αλατότητα (35 ppt) με αυτή των παραπάνω ερευνητών (32 ppt - 52 ναύπλιοι/ωόσακκο) κρίνεται ως αντιπροσωπευτικός της δυναμικότητας του είδους και η μικρότερη τιμή του μπορεί να αποδοθεί στις χαμηλότερες θερμοκρασίες του παρόντος πειράματος (~17 °C vs 25 °C). Οι ίδιοι ερευνητές ανέφεραν παραγωγή 11-15

διαδοχικών ωόσακων από κάθε γονιμοποιημένο θηλυκό με διάρκεια ζωής 56-101 ημέρες. Οι Lee & Hu (1981) βρήκαν για το ίδιο είδος συνολική παραγωγή ναυπλίων ανά θηλυκό μέχρι 204 άτομα ενώ ο Harris (1973) πειραματιζόμενος με το *Tigriopus brevicornis* βρήκε 301 ναυπλίους ανά θηλυκό. Όλα τα παραπάνω ευρήματα αφενός ισχυροποιούν και εμμέσως επαληθεύουν την αξιοπιστία των δικών μας ευρημάτων για το μη προσδιορισμένο είδος *Tigriopus* (ενδέχεται να είναι *T. fulvus* ή *T. brevicornis*) με το οποίο πειραματιστήκαμε και αφετέρου υποδεικνύουν προς τη μεγαλύτερη συνολική γονιμότητα του *Tigriopus* έναντι του *Tisbe*. Αυτό το χαρακτηριστικό όμως αντισταθμίζεται κατά κάποιο τρόπο (υπό όρους μαζικής παραγωγής) καθώς ο χρόνος γενεάς είναι μακρύτερος για το *Tigriopus* συγκριτικά με το *Tisbe* κάτι που παρατηρήσαμε αλλά και αναφέρεται και από άλλους ερευνητές (Takano, 1971; Carli et al, 1995). Όμως αυτό δεν σημαίνει ότι οι διαφορές είναι μεγάλες βασισμένες μόνο στα δεδομένα της υπάρχουσας βιβλιογραφίας καθώς όπως προαναφέρθηκε τα δεδομένα για το *Tisbe* απαιτούν περαιτέρω έρευνα σχετικά με το πόσους ωόσακους και με ποια απόδοση σε ναυπλίους παρουσιάζει στη διάρκεια της ζωής του. Από τους πειραματισμούς της παρούσας εργασίας η παραγωγή σε ναυπλίους από τον πρώτο ωόσακο και για τα δύο είδη είναι παρόμοια (34-35 ναύπλιοι) συνεπώς μπορούμε βάσιμα να υποθέσουμε ότι αυτό θα συμβαίνει και για τους επόμενους ωόσακους έτσι που και για το *Tisbe* η συνολική παραγωγή ναυπλίων ανά θηλυκό να είναι πολύ μεγαλύτερη από τους 76 που αναφέρουν οι Miliou & Moraitou-Apostolopoulou (1991 a & b).

Συνοψίζοντας τα πειραματικά ευρήματά μας σε συνδυασμό με τις εν γένει παρατηρήσεις μας σε πλήθος δοχείων όπου διατηρούνταν και αυξάνονταν πληθυσμοί των κωπηπόδων *Tisbe* και *Tigriopus* μπορούμε να πούμε:

1. Τα κωπήποδα του γένους *Tisbe* και του γένους *Tigriopus* ενδημούν στα παράκτια νερά και σε αυτά της λιμνοθάλασσας συλλεγόμενα εύκολα από δείγματα βένθους και αποκομμένα στελέχη φυκών και περιφύτου.
2. Μπορούν να καλλιεργηθούν εύκολα στο εργαστήριο και να αναπτύσσουν πλήρως όλα τα οντογενετικά τους στάδια. Ως τροφή δέχονται όλα τα είδη φυτοπλαγκτού και δεν ενοχλούνται (μάλιστα το προτιμούν) από μάζα ιζήματος νεκρής οργανικής ύλης που βαθμιαία αναπτύσσεται στα δοχεία καλλιέργειας.
3. Δεν υπάρχουν ενδείξεις περί παρθενογένεσης. Τα αβγά πάντοτε γονιμοποιούνται από σπέρμα μέσω συνουσίας. Η επωαστική περίοδος των αβγών από τη στιγμή που θα σχηματιστεί ο ωόσακος ποικίλλει μεταξύ 2 και 4 ημερών.
4. Μετά τη σταδιακή εκκόλαψη των αβγών και μετά από διαδοχικές εκδύσεις διακρίνονται 6 ναυπλιακά στάδια και 6 κωπηποδικά στάδια το τελευταίο των οποίων χαρακτηρίζει την έναρξη της ενήλικης φάσης. Η διάρκεια του ναυπλιακού σταδίου κυμαίνεται σε 6-8 ημέρες και του κωπηποδικού σε 6-9 ημέρες.

5. Η πρώτη ένδειξη σεξουαλικής ωρίμανσης είναι εμφανής πρώτα στα αρσενικά άτομα τα οποία συλλαμβάνουν ένα θηλυκό είτε ενήλικο είτε κωπηποδίτη κατά την 14-20^η ημέρα της ζωής των (από την εμφάνισή τους ως νεοεκκολαφθέντες ναύπλιοι).
6. Ο χρόνος γενεάς (δηλαδή το χρονικό διάστημα από αβγό μέχρι το σχηματισμό ωόσακου) ποικίλλει μεταξύ 14 και 25 ημερών με μέση τιμή τις 17 ημέρες.
7. Η διάρκεια ζωής κάθε κωπηπόδου ποικίλλει πάρα πολύ όμως μπορούμε με ασφάλεια (ιδιαίτερα για τα θηλυκά) να ισχυριστούμε ότι είναι της τάξεως των 2 μηνών με πολύ μειωμένα όμως την παραγωγή αβγών μετά την 40-45^η ημέρα.
8. Ο αριθμός των παραγομένων ωόσακων στη διάρκεια ζωής των θηλυκών κυμαίνεται σε 5-10 με διάστημα εμφάνισης καθενός από αυτούς μετά την εξάντληση του προηγούμενου της τάξεως των 5 περίπου ημερών.
9. Ο αριθμός των αβγών του κάθε ωόσακου είναι περί τα 35.
10. Φαίνεται ότι κάθε θηλυκό γονιμοποιείται άπαξ και η ποσότητα του σπέρματος που αρχικώς αποθηκεύει επαρκεί για τη γονιμοποίηση όλων των αβγών για τους μελλοντικούς ωόσακους που θα δημιουργήσει. Επίσης φαίνεται ότι τα αρσενικά μπορούν να γονιμοποιήσουν διαδοχικά περισσότερα του ενός θηλυκά.
11. Η συνουσία μέσω της σύλληψης ενός θηλυκού από ένα αρσενικό απαιτεί οπωσδήποτε ένα ώριμο αρσενικό (με πλήρως αναπτυγμένους όρχεις) αλλά όχι απαραίτητα και ένα πλήρως αναπτυγμένο θηλυκό (με ώριμα ωοκύτταρα). Πολύ συχνά ένα αρσενικό συλλαμβάνει ένα πολύ μικρότερό του θηλυκό στο τελευταίο κωπηποδιτικό στάδιο και του εναποθέτει τονσπερματοφόρο σάκο για να τον χρησιμοποιήσει αργότερα όταν θα είναι έτοιμο να παράγει ώριμα ωοκύτταρα.
11. Η επιβίωση των εκκολαφθέντων ναυπλίων και των δύο ειδών μέχρι την ενηλικίωση είναι πολύ υψηλή της τάξεως των 75-83 %.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ. ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ.

Οι περισσότερες αναφορές σχετικά με τη χρησιμότητα των κωπηπόδων στη βιβλιογραφία σχετίζονται με τη μαζική παραγωγή τους για να χρησιμοποιηθούν ως ζωντανή τροφή στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς. Από τις υπάρχουσες τάξεις των κωπηπόδων η προσοχή των ερευνητών εστιάζεται στα καλανοειδή και αρπακτικοειδή (Gaudy and Guerin, 1982; Ogle et al., 2005; Payne and Rippingale, 2001; Phelps et al., 2005; Schipp et al., 1999; Støttrup and Norsker, 1997; Sun and Fleeger, 1995). Με βάση αυτό δικαιολογείται και η σκοπιμότητα της παρούσας εργασίας δεδομένου του γεγονότος ότι στην Ελλάδα λειτουργούν πολλοί ιχθυογεννητικοί σταθμοί ευρύαλων ψαριών και η γνώση επί των κωπηπόδων είναι καλοδεχούμενη. Όμως για τα συγκεκριμένα κωπήποδα τα οποία αποτέλεσαν το αντικείμενο της παρούσας εργασίας δηλαδή τα αρπακτικοειδή *Tigriopus* sp. και *Tisbe holothuriae* δεν υπάρχουν πλήρη στοιχεία στη βιβλιογραφία για τα βασικά βιολογικά τους στοιχεία σχετικά με την αναπαραγωγική τους δυναμική, την αντοχή τους στην αλατότητα και τις αποδόσεις του πληθυσμού τους όταν τρέφονται με διάφορα είδη φυτοπλαγκτού τα οποία χρησιμοποιούνται στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς. Θεωρώντας την αλατότητα ως τον πλέον κρίσιμο παράγοντα για την επιβίωση των κωπηπόδων η παρούσα εργασία προσπάθησε να διερευνήσει την αντοχή των συγκεκριμένων κωπηπόδων στη μέγιστη δυνατή γκάμα αλατοτήτων από απόλυτα γλυκό νερό (0 ppt) έως υπεράλμυρο (>130 ppt). Είναι μιν αδιαμφισβήτητο ότι τα κωπήποδα εν γένει αλλά ιδιαίτερα τα αρπακτικοειδή είναι ευρύαλα αλλά σε τι βαθμό δεν είναι ξεκάθαρα γνωστό. Οι υπάρχουσες μελέτες μπορεί μιν να δίδουν μια βέλτιστη αλατότητα στην οποία τα κωπήποδα αποδίδουν τα μέγιστα πληθυσμιακώς και επιπροσθέτως να δίδουν και ένα εύρος αλατότητας στο οποίο ο πληθυσμός τους διατηρεί ικανοποιητική δυναμική, όμως δεν απαντούν ξεκάθαρα για το ανώτατο και κατώτατο όριο αλατότητας στο οποίο μπορούν να επιβιώσουν. Με βάση τα διαθέσιμα στοιχεία για το *Tisbe holothuriae* οι Heath & Moore (1997) δίδουν εύρος αλατότητας 25-30 ppt για καλύτερη αύξηση ενώ τα 38 ppt δίδονται ως η βέλτιστη αλατότητα από τους Miliou & Moraitou-Apostolopoulou (1991a) και Miliou (1996). Για άλλα είδη *Tisbe* όπως το *Tisbe biminiensis* τα όρια αναφέρονται ως πολύ στενά δηλαδή 27-34 ppt και μάλιστα ως απαγορευτική αλατότητα αυτή των 20 ppt (Souza-Santos et al., 2006). Για διάφορα είδη του *Tigriopus* οι τιμές εύρους ικανοποιητικής επιβίωσης είναι 20-40 ppt και βέλτιστο τα 30 ppt (Punnarak et al., 2017) και ιδιαίτερα για το *Tigriopus californicus* ο Herbert (1976) αναφέρει 100% επιβίωση στο εύρος αλατοτήτων 30-70 ppt. Οι τιμές αυτές καταρχάς θεωρούνται σύμφωνες με την τιμή των 35 ppt στην οποία ζούσαν τα κωπήποδα κατά τους πειραματισμούς της παρούσας εργασίας, πλην όμως δεν μπορούμε να ισχυριστούμε ότι εξαντλήσαμε το θέμα για τη βέλτιστη ανάπτυξη καλλιεργούμενων πληθυσμών των συγκεκριμένων ειδών κωπηπόδων. Από παράλληλες παρατηρήσεις σε δοχεία με ποικιλία αλατοτήτων που υπήρχαν στο εργαστήριο και στα οποία αφήνονταν να αναπτυχθούν πληθυσμοί *Tisbe* και *Tigriopus* σε ποικίλες αλατότητες που ξεπερνούσαν τα 35 ppt, παρατηρήθηκε φυσιολογική συμπεριφορά των ατόμων και αδιάλειπτη αναπαραγωγική δραστηριότητα. Το

θέμα αυτό προσφέρεται για μελλοντική έρευνα ιδιαίτερα μάλιστα όταν κωπήποδα του γένους *Tisbe* παρουσιάζονται συχνά σε δείγματα νερού που λαμβάνονται από τις υπεράλμυρες λεκάνες των αλυκών του Μεσολογίου αλατοτήτων 50-75 ppt (Χώτος, αδημοσίευτα στοιχεία, προσωπική επικοινωνία). Το θέμα της παρουσίας των κωπηπόδων σε υπεράλμυρα νερά είναι σημαντικό από οικολογική άποψη καθώς αφενός μεν τα υπεράλμυρα συστήματα είναι από τα πιο ακραία περιβάλλοντα στη Γη (Grant, 2004) υφιστάμενα εποχιακώς δραματικές αλλαγές στην αλατότητα (Belmonte et al., 2012), αφετέρου δε τα κωπήποδα διαδραματίζουν σπουδαίο οικολογικό ρόλο συμμετέχοντας κατά μεγάλο μέρος στο τροφικό πλέγμα και εμμέσως στη βιολογική ανακύκλωση των στοιχείων (Frangoulis et al., 2004). Από τα πλέον των 13.000 ειδών κωπηπόδων πολύ λίγα έχουν καταγραφεί να ενδημούν στα υπεράλμυρα νερά και δεν είναι σαφές αν τα προτιμούν περιστασιακώς επειδή τους προσφέρουν κάποια πλεονεκτήματα ή αναγκαστικώς λόγω εγκλωβισμού τους (για διάφορους λόγους) σε τέτοια περιβάλλοντα. Οποια και αν είναι η αιτία όμως γεγονός αδιαμφισβήτητο είναι ότι τα συγκεκριμένα είδη παρουσιάζουν μεγάλη ικανότητα ωσμωρύθμισης.

Το ότι πολλά κωπήποδα παρουσιάζουν ωσμωρυθμιστικότητα είναι τεκμηριωμένο (Bayly & Boxshall, 2009; Svetlichny et al., 2012) και αυτό σημαίνει ότι αυτά τα είδη μπορούν να συνθέτουν και συσσωρεύουν ωσμωλυτικές ουσίες υπό μορφή ελεύθερων αμινοξέων (αλανίνη, προλίνη, γλυκίνη). Κάτι τέτοιο βέβαια επιφέρει μεταβολικό κόστος για το κωπήποδο αφαιρώντας του ενεργειακό απόθεμα το οποίο σε κανονική αλατότητα θα διοχετεύονταν σε αύξηση. Τέτοια σύνθεση και συσσώρευση αμινοξέων έχει καταγραφεί σε αρπακτικοειδή και καλανοειδή κωπήποδα (Burton, 1991; Lindley et al., 2011) ενώ οι Goolish & Burton (1989) βρήκαν ότι παράγονται και άλλες ωσμωλυτικές ουσίες εκτός από τα αμινοξέα. Ομως ανεξαρτήτως του τύπου των ουσιών που τα κύτταρα των κωπηπόδων παράγουν για να αντιμετωπίσουν τη μεγάλη αλατότητα, είναι μάλλον αδύνατο να μπορέσουν να αντεπεξέλθουν σε μια τέτοια εργοβόρα διαδικασία αν δεν επιστρατεύσουν πιο συμφέρουσες ενεργειακώς τακτικές. Χαρακτηριστικώς αναφέρεται ότι το αρπακτικοειδές κωπήποδο *Tigriopus californicus* εγκλιματισμένο σε αλατότητα 17 ppt όταν μεταφέρονταν σε αλατότητα 35 ppt ξόδευε μέχρι και 23 % από την ενέργειά του για να παράγει τα παραπάνω αμινοξέα (Goolish & Burton, 1989) πόσο μάλλον σε πολύ μεγαλύτερες αλατότητες. Από τα 26 είδη κωπηπόδων που ανά τον κόσμο υπάρχουν σε περιβάλλοντα με αλατότητες άνω των 100 ppt και 12 ειδών σε αλατότητες άνω των 200 ppt (Anufrieva, 2015) με "πρωταθλητές" τα είδη *Cletocamptus retrogressus* σε 360 ppt και *Arctodiaptomus salinus* σε 300 ppt ενδέχεται να υπάρχει και άλλο μεγάλο πλήθος ειδών που ανέχεται (αν δεν προτιμά) μικρότερες υπεραλατότητες από τις παραπάνω (συγκριτικώς πάντα με την κατά σύμβαση κανονική αλατότητα του θαλασσινού νερού των 35-40 ppt). Στον κατάλογο των κωπηπόδων που έχουν καταγραφεί ανά τον κόσμο σε περιβάλλοντα υπεραλατότητας στη σύνοψη της Anufrieva (2015), απουσιάζουν τα γένη *Tisbe* και *Tigriopus*. Αυτό ήταν και κίνητρο για να εξεταστεί η αντοχή των συγκεκριμένων γενών στην αλατότητα στην παρούσα εργασία όταν μάλιστα το ένα από τα δύο γένη (είδος

Tisbe holothuriae) βρέθηκε συχνά σε δείγματα υπεράλμυρου νερού των αλυκών Μεσολογίου (Χώτος, 2016). Το γεγονός λοιπόν της παρουσίας των κωπηπόδων σε υπεράλμυρα περιβάλλοντα είναι επαρκώς διαπιστωμένο και ειδικότερα για τα αρπακτικοειδή που αποτελούν το αντικείμενο της παρούσας μελέτης πειραματικώς ελεγμένο. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μάλιστα αποτελούν ιδιαίτερα έντονο έλεγχο της δυνατότητας βίαιης προσαρμογής των κωπηπόδων σε διάφορες αλατότητες από αυτές στις οποίες είχαν εγκλιματισθεί τα ζώα των πειραματισμών. Τα αποτελέσματα πρέπει να ιδωθούν ως συντηρητικές τιμές διότι η επιβίωση που παρατηρήθηκε στις χρησιμοποιηθείσες αλατότητες μπορεί στην πραγματικότητα να είναι πολύ μεγαλύτερη αν προηγείται σταδιακή άνοδος της αλατότητας με παράλληλο σταδιακό εγκλιματισμό των κωπηπόδων όπως είναι άλλωστε η συνήθης κατάσταση στη φύση.

Στην παρούσα εργασία η αντοχή των κωπηπόδων *Tisbe* και *Tigriopus* στην υπεραλατότητα όπως υπολογίστηκε με τη μέθοδο probit έδωσε πολύ υψηλές τιμές LC50 (~132 ppt για το *Tigriopus*, 93 ppt για το *Tisbe*). Τέτοιες τιμές σημαίνουν ότι και τα δύο είδη μπορούν να προσαρμοστούν σε πολύ υψηλές αλατότητες και συνεπώς παρουσιάζουν μεγάλη ωσμωρυθμιστική ικανότητα. Από τη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αντίστοιχες τιμές για τα είδη αυτά και συνεπώς μπορούν να θεωρηθούν ως τα πρώτα στοιχεία που παρουσιάζονται. Με βάση τα ευρήματα αυτά μπορούμε να υποθέσουμε ότι τα συγκεκριμένα κωπήποδα δεν θα παρουσιάσουν καμία δυσκολία προσαρμογής σε αλατότητες που ξεπερνούν την αλατότητα του θαλασσινού νερού και βάσει των Σχημάτων 30 και 31 μπορούμε να θεωρήσουμε ότι θα παρουσιάζουν μηδαμινή θνησιμότητα λόγω ωσμωρυθμιστικού στρες σε αλατότητες μέχρι περίπου τα 70 ppt ιδιαίτερα μάλιστα αν ο εγκλιματισμός τους είναι σταδιακός. Η σημασία της αντοχής των κωπηπόδων σε υπεράλμυρα περιβάλλοντα όπως αυτό των αλυκών Μεσολογίου δεν έχει διερευνηθεί αλλά μπορεί να είναι σημαντική επειδή ενδέχεται να συμβάλλουν στην καλή παραγωγή αλατιού. Στα υπεράλμυρα νερά των αλυκών όπου το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Dunaliella salina* αναπτύσσεται μόνο αυτό σε υψηλές πυκνότητες και δημιουργεί πυκνούς πληθυσμούς, επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα της παραγωγής αλατιού επειδή στο νερό συσσωρεύονται βλεννώδεις ουσίες που το φύκος αυτό εκκρίνει για να αντισταθμίσει το ωσμωρυθμιστικό στρες που επιφέρει η υψηλή αλατότητα. Το φύκος αυτό όσο αυξάνεται η αλατότητα παράγει ενδοκυτταρικώς ως ωσμωλύτη γλυκερίνη η περίσσεια της οποίας εκκρίνεται στο νερό και επηρεάζει κατόπιν αρνητικά την κρυστάλλωση του αλατιού. Παρόλο που η *Dunaliella* καλλιεργείται διεθνώς για την παραγωγή της αντιοξειδωτικής χρωστικής β-καρωτίνιο την οποία επίσης συσσωρεύει όσο αυξάνεται η αλατότητα, για την παραγωγή αλατιού θεωρείται "μάστιγα". Οι όποιοι ετερότροφοι οργανισμοί καταναλώνουν την *Dunaliella* στις λεκάνες των αλυκών και κρατούν τον πληθυσμό της σε ασφαλή επίπεδα είναι καλοδεχούμενοι στους παραγωγείς του άλατος. Τέτοιοι οργανισμοί είναι η αλμυρογαρίδα *Artemia* και το βλεφαριδοφόρο πρωτόζωο *Fabrea salina* (Hotos, 2018; Koronesis et al., 2018). Πέραν αυτών ενδεχομένως και τα κωπήποδα να διαδραματίζουν παρόμοιο ρόλο καταναλώνοντας τη *Dunaliella*

κάτι που πρέπει να αποτελέσει αντικείμενο έρευνας. Μάλιστα έχει διατυπωθεί από ερευνητές (Shadrin & Anufrieva, 2013; Senicheva, 2005; Anufrieva & Shadrin, 2012; Anufrieva, 2014) και φαίνεται λογικό, ότι ένας από τους μηχανισμούς που επιτρέπουν στα κωπήποδα να ζουν σε υπεράλμυρα περιβάλλοντα χωρίς να καταναλώνουν υπερβολική ενέργεια για να παράγουν ωσμωλύτες (βλ. αμινοξέα παραπάνω), είναι η ικανότητά τους να τους προσλαμβάνουν έτοιμους (δηλαδή εμμέσως) με την τροφή τους. Τέτοια τροφή μπορεί να είναι η *Dunaliella* τουλάχιστον για τα συγκεκριμένα κωπήποδα (*Tisbe* και *Tigriopus*) η οποία εκτός από θρεπτική (όπως φαίνεται και στο πείραμα διατροφής) είναι και προμηθευτής της ωσμωλυτικής γλυκερόλης. Επίσης ενδέχεται να προσλαμβάνουν εξωγενείς ωσμωλύτες καταναλώνοντας και κυανοβακτήρια των υπεράλμυρων νερών κατά ανάλογο τρόπο με αυτόν που καταγράφηκε για το κωπήποδο *Arcycyclops dengizicus* που η εμφάνισή του συμπίπτει με άνθιση κυανοβακτηρίων σε πολύ υψηλές αλατότητες (Carrasco & Perissinotto, 2012). Είναι γνωστό άλλωστε ότι τα κυανοβακτήρια παράγουν ποικίλους ωσμωλύτες σε συνθήκες υψηλής αλατότητας (Imhoff, 1986; Oren, 2011), και τα κυανοβακτήρια λόγω της έκκρισης από τα κύτταρά τους της περίσσειας τέτοιων ουσιών δημιουργούν πρόβλημα στην παραγωγή αλατιού. Συνεπώς και εδώ ενδέχεται τα κωπήποδα δια της κατανάλωσης και των κυανοβακτηρίων να αποτελούν θετικό παράγοντα στην αλατοπαραγωγή. Και ως προς τις χαμηλές τιμές της αλατότητας τα συγκεκριμένα κωπήποδα παρουσίασαν μεγάλη αντοχή ακόμα και σε ελάχιστα αλατισμένο νερό. Είναι ξεκάθαρο τόσο από τον πειραματισμό της παρούσας εργασίας όσο και από ανάλογες εργασίες (μόνο όμως για το *Tigriopus*, Hawkins, 1962; Herbert, 1976) ότι το απόλυτα γλυκό νερό επιφέρει σχεδόν άμεσα 100% θνησιμότητα και στα δύο είδη. Όμως για το υφάλμυρο νερό η κατάσταση διαφέρει ριζικώς μεταξύ *Tigriopus* και *Tisbe*. Το μεν *Tigriopus* παρουσιάζει μεγάλη προσαρμογή σε αλατότητες από 4 ppt έως και 10 ppt με σχεδόν αμελητέες θνησιμότητες και πρακτικώς απόλυτη επιβίωση σε άνω των 10 ppt αλατότητα, ενώ το *Tisbe* μόνο μετά τα 20 ppt παρουσιάζει 0% θνησιμότητα. Τα νούμερα αυτά ειδικά για το *Tigriopus* βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά του Hawkins (1962). Μπορούμε λοιπόν με βάση τα παραπάνω να θεωρήσουμε ότι παρόλο που το *Tigriopus* παρουσιάζεται να αντέχει σε ένα εκπληκτικό εύρος αλατότητας (~4-120 ppt) έναντι του *Tisbe* (~20-90 ppt) και τα δύο αυτά αρπακτικοειδή είδη μπορούν να αποικίσουν ποικίλα ευμετάβλητα ή και ακραία υδάτινα συστήματα (π.χ. εκβολές ποταμών, λιμνοθάλασσες, υπεράλμυρες λεκάνες, κ.ά.) και από άποψη καλλιέργειάς των να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε πηγή προμήθειας αλμυρού νερού είναι διαθέσιμη. Μάλιστα ιδιαίτερα για το *Tigriopus* που αποτελεί και εμπορικώς δημοφιλές σκεύασμα τροφής για χομπίστες, η καλλιέργειά του μπορεί να γίνει και με οικιακό νερό αρκεί να διαλυθεί σε αυτό μια μικρή σχετικά ποσότητα κοινού αλατιού. Το ίδιο βεβαίως ισχύει και για το *Tisbe* αλλά με μεγαλύτερη αλατότητα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ. ΔΙΑΤΡΟΦΗ.

Όπως σε όλους τους ζωικούς οργανισμούς έτσι και στα κωπήποδα ο τύπος της τροφής και η πυκνότητά της διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο για την αύξησή τους. Είναι ευνόητο ότι για μια αποδεκτή και επαρκή τροφή, η αύξηση του πληθυσμού προκύπτει από μια καλή αναπαραγωγική δραστηριότητα. Ο τύπος της τροφής, το μέγεθός της και η συγκέντρωσή της είτε ξεχωριστά η κάθε παράμετρος, είτε συνδυαστικά αναμένεται να επηρεάσουν την αναπαραγωγή, την εκκόλαψη, το ρυθμό αύξησης, την ανάπτυξη και τελικά την επιβίωση των νέων ατόμων μέχρι την ωριμότητά τους. Όλα αυτά απαιτούν μελετημένους σχεδιασμούς πειραματισμών για τα διάφορα είδη των κωπηπόδων προκειμένου να καταλήξουμε σε ιδανικές τροφές τους οι οποίες όμως εκτός από καλές για αυτά πρέπει να είναι και πρακτικές ως προς την μαζική παραγωγή τους και απρόσκλητα διαθέσιμες συνεχώς. Τέτοιες τροφές είναι οι φυτοπλαγκτονικές οι οποίες καλλιεργούνται ευρέως ιδιαίτερα στις εγκαταστάσεις των ιχθυογεννητικών σταθμών των ευρύαλων ψαριών. Ακριβώς λοιπόν στο πλαίσιο της παραγωγής της λεγόμενης ζωντανής τροφής ολοένα και περισσότερο έχει μπει στο στόχαστρο της επιστημονικής κοινότητας η ανάγκη για διερεύνηση, νέων συμβατικών εναλλακτικών διατροφικών προφίλ που προορίζονται για εκτροφή νεο-εκκολαπτόμενων λαρβών, που παράγει η "βαριά" βιομηχανία του κλάδου της υδατοκαλλιέργειας. Μία από τις πολλά υποσχόμενες ζωντανές τροφές είναι και τα κωπήποδα. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τόσο οι συνθήκες διαβίωσης, όσο και ο τύπος τροφής καθώς και ο συνδυασμός τροφών ώστε να επιτευχθεί μια ορθή βιώσιμη πρακτική. Η θερμοκρασία είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν το μεταβολισμό των εκτρεφόμενων υδρόβιων ζώων, και μάλιστα δεν είναι λίγοι οι επιστήμονες που έχουν διεξάγει πολλαπλά πειράματα, ώστε να πετύχουν τις βέλτιστες θερμοκρασίες. Σύμφωνα με τον Punnaparak (2015) μετά από τις πρώτες 7 ημέρες εκτροφής αρπακτικοειδών κωπηπόδων, η ομάδα των κωπηπόδων που είχε την υψηλότερη απόδοση ήταν αυτή που διαβίωνε στους 30°C, σε σχέση με τις υπόλοιπες θερμοκρασίες που χρησιμοποίησε 25°C και 35°C. Για την παρούσα έρευνα, η θερμοκρασία ρυθμίστηκε σταθερά στους 20°C για τα δύο είδη κωπηπόδων *Tigriopus* & *Tisbe* στο διάστημα των 28 ημερών που ταΐστηκαν με μικροφύκη των ειδών *Isochrysis galbana*, *Rhodomonas salina*, *Tetraselmis suecica*, *Asteromonas gracilis* και *Dunaliella salina*. Η θερμοκρασία, αν και χαμηλότερη αρκετά σε σχέση με τις πειραματικές δοκιμασίες του Punnaparak είχε σχετικά θετικά αποτελέσματα και στους πέντε τύπους τροφών που χρησιμοποιήθηκαν και στα δυο είδη κωπηπόδων, με τιμές τάχους ανάπτυξης (r) σχετικώς όμοιες Αξιοσημείωτο είναι πως οι τροφές είχαν παρόμοια αποτελέσματα ως προς την παραγωγή των κωπηπόδων στο διάστημα των 28 ημερών, με σχετικά μικρή θνησιμότητα που αποδεικνυόταν από την απουσία εμφάνισης πτωμάτων στο πυθμένα των πειραματικών μικροδιαμερισμάτων, (τουλάχιστον για το διάστημα των τελευταίων ημερών), επειδή για τις πρώτες ημέρες δεν ήταν δυνατόν να διαπιστωθεί η θνησιμότητα των κωπηπόδων, επειδή οι ναύπλιοι με τόσο μικρό όγκο που διέθεταν, βιοαποικοδομούσαν ταχύτατα, χωρίς να υπάρχουν εμφανή υπολείμματά τους

μετά το πρώτο 24ωρο παρατήρησης. Η προσπάθεια εκτροφής των κωπηπόδων είτε με κάποιο συγκεκριμένο τύπο φύκους, είτε με μείγμα ειδών μικροφυκών έχει επιφέρει θετικά αποτελέσματα στην παραγωγή ναυπλίων, για την ομαλή ανάπτυξη του κύκλου ζωής των υδρόβιων ζώων. Υψίστης σημασίας αποτελεί το γεγονός ότι τα κωπήποδα είναι αποδοτικότερα για την ανάπτυξη των εκτρεφόμενων λάρβων, σε σχέση με τα εμπλουτισμένα τροχόζωα *Brachionus plicatilis* και την αλμυρογαρίδα *Artemia* (Kuhlman (1981). Ειδικότερα έχει αναφερθεί ότι το εκτρεφόμενο είδος *Hippoglossus hippoglossus* παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα ως προς την ανάπτυξη και ευρωστία του, όταν τρέφεται με κωπήποδα, εν αντιθέσει με την εμπλουτισμένη *Artemia* (McEvoy, 1998). Πιθανόν αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι τα κωπήποδα δημιουργούν ποσοτικώς και ποιοτικώς εξαιρετικής φύσεως λιπίδια, δηλαδή ω-3 και ω-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και ιδιαίτερα ντοκοεικοσαενοϊκό (DHA) και εικοσιπενταενοϊκό (EPA) οξύ. Παρόλα αυτά τα κωπήποδα δεν προτιμούνται ως ζωντανή τροφή στα εκκολαπτήρια λαρβών μέχρι και σήμερα για λόγους άλλους πέραν της αδιαμφισβήτητα εξαιρετικής τους σύνθεσης. Και οι λόγοι αυτοί είναι πρακτικοί-διαχειριστικοί. Τα κωπήποδα παρουσιάζουν μεν γρήγορη αύξηση πληθυσμού σε καλές συνθήκες όμως όχι τόσο γρήγορη όση τα τροχόζωα. Επιπροσθέτως μόνο οι ναύπλιοι των κωπηπόδων μπορούν να δοθούν ως ζωντανή τροφή στις λάρβες και αυτό είναι ένα σοβαρό μειονέκτημα όταν συγκρίνονται με το τροχόζωο *Brachionus plicatilis* του οποίου οι απόγονοι είναι πανομοιότυποι σε μέγεθος και μορφολογία με το μητρικό άτομο. Ετι περαιτέρω οι ναύπλιοι των κωπηπόδων δεν είναι αμιγώς πλαγκτονικοί (απαραίτητη προϋπόθεση για να συλληφθούν από τις λάρβες) αλλά μάλλον (ιδιαίτερα αυτοί των αρπακτικοειδών κωπηπόδων) βενθικοί κατά το μεγαλύτερο διάστημα της ζωής των. Και μπορεί μεν οι ναύπλιοι των αρπακτικοειδών να είναι αργοί στην κίνηση όσο πρέπει για να μπορούν να συλληφθούν από τις λάρβες (συγκριτικά με τους πλαγκτονικούς ναύπλιους των καλανοειδών και κυκλωποειδών που κυριολεκτικά τινάσσονται στο νερό άρα ακατάλληλοι για τις λάρβες), όμως η βενθική κυρίως διαβίωσή τους δημιουργεί πρακτικά προβλήματα. Παρόλα αυτά εάν υπάρχουν πάρα πολλοί ναύπλιοι αρπακτικοειδών θα υπάρξει πάντοτε και ένα ικανό ποσοστό αυτών στη στήλη του νερού για να συλληφθούν από τις λάρβες. Στην παρούσα εργασία, οι τροφές που επιλέχθηκαν για εκτροφή των κωπηπόδων *Tigriopus* & *Tisbe*, ήταν οι 3 γνωστές τροφές που χρησιμοποιούν οι περισσότεροι ιχθυογεννητικοί σταθμοί δηλαδή τα μικροφύκη *Isochrysis galbana*, *Rhodomonas salina* και *Tetraselmis suecica* καθώς επίσης και δύο αλοανθεκτικά είδη που ευδοκίμουν στις αλυκές Μεσολογγίου τα *Asteromonas gracilis* και *Dunaliella salina*. Για τις πρώτες τρεις δεν έγινε κάποια τροποποίηση στην αλατότητα καλλιέργειάς τους (35 ppt) και χορηγήθηκαν στα κωπήποδα σε υψηλές πυκνότητες (*Isochrysis galbana* 1050×10^3 κύτταρα ανά ml, *Rhodomonas salina* 794×10^3 κύτταρα ανά ml, *Tetraselmis suecica* 1925×10^3 κύτταρα ανά ml. Για την περίπτωση των ειδών *Asteromonas gracilis* και *Dunaliella salina* λόγω της υψηλής αλατότητας καλλιέργειάς των έπρεπε πριν δοθούν στα κωπήποδα (αλατότητα 35 ppt) να προσαρμοστούν

από αλατότητα 110 ppt (όπου αυξάνονταν βέλτιστα) σε 75 ppt τουλάχιστον ώστε να μειωθεί αρκετά το όποιο ωσμωρυθμιστικό σοκ. Στη συνέχεια χορηγήθηκαν σε υψηλές πυκνότητες σχετικά με τις αναλογίες (*Asteromonas gracilis* 1625×10^3 κύτταρα ανά ml, *Dunaliella salina* 3200×10^3 κύτταρα ανά ml). Δυστυχώς δεν υπάρχει για τα *Tigriopus* & *Tisbe* εκτενής βιβλιογραφία για την επίδραση παρόμοιων τροφών στην αύξηση του πληθυσμού των. Οι περισσότερες εργασίες για αυτά τα είδη ρίχνουν φως στα δημογραφικά στοιχεία των πληθυσμών τους είτε στη φύση είτε στο εργαστήριο με βασικό σχεδιασμό την επίδραση στη γονιμότητα, στην εκκόλαψη των αυγών και την επιβίωση των ναυπλίων, στα μεγέθη του σώματος κ.ά. ανάλογα με την επίδραση της θερμοκρασίας, της αλατότητας, του υποστρώματος και ενίοτε του είδους της τροφής η οποία συνήθως αποτελείται από κομμάτια μακροφυκών, μαγιά ή φύκη. Όμως όσο πολύτιμες και αν είναι αυτές οι εργασίες (και αδιαμφισβήτητα είναι) δεν παύουν να χάνουν το γενικό και καίριο ζήτημα του να απαντήσουν αν μπορούμε με φυτοπλαγκτόν από ποικίλα είδη μικροφυκών να έχουμε ικανοποιητική παραγωγή κωπηπόδων. Αυτό ζητά διακαώς η παραγωγή και σε αυτό το βασικό επίπεδο έρευνας εστίασε η παρούσα εργασία για τα πλέον εύκολα να συλλεχθούν αρπακτικοειδή κωπήποδα της λιμνοθάλασσας του Μεσολογίου. Έχοντας λοιπόν διασφαλίσει την άνετη συλλογή αρπακτικοειδών κωπηπόδων τα οποία όχι μόνο στη λιμνοθάλασσα του Μεσολογίου αλλά και γενικώς σε όλα τα παράκτια νερά αφθονούν στα διάφορα υποστρώματα του πυθμένα (Hicks, 1980), πειραματιστήκαμε με είδη φυτοπλαγκτού επίσης των αλμυρών νερών. Βέβαια στη φυσική τους διαβίωση τα αρπακτικοειδή κωπήποδα τρέφονται κυρίως με βενθικά είδη μικροφυκών (π.χ. διάτομα) και νεκρή πάγια οργανική ύλη (Couli & Wells, 1983) αλλά έχει πλέον αποδειχθεί ότι μπορούν σε συνθήκες αιχμαλωσίας να τραφούν με φυτοπλαγκτόν και μάλιστα ο συνδυασμός περισσότερων του ενός ειδών μικροφυκών (δηλαδή μείγμα) είναι καλύτερος για την ανάπτυξή τους συγκριτικά με μια μονοειδική διαίτα (Lee et al., 1985). Προφανώς λόγω διασφάλισης της ύπαρξης (ή τουλάχιστον της μη έλλειψης) βιταμινών, ιχνοστοιχείων και άλλων ουσιών απαραίτητων για τη γονιμότητα και την επιβίωσή τους. Στην παρούσα εργασία μας τα αποτελέσματα της διατροφής με είδη φυτοπλαγκτού τα οποία είναι μαστιγοφόρα και κατά συνέπεια κατανέμονται στη στήλη του νερού απέδωσαν όλα καλώς και για τα δύο είδη κωπηπόδων (Πίνακας) απόδειξη ότι τα έντονα κινητικά μικροφύκη δεν αποτελούν πρόβλημα για τα αρπακτικοειδή κωπήποδα. Οι όποιες διαφορές μπορεί να σημαίνουν κάποια προτίμηση για κάποιο είδος όμως μπορεί να είναι και συμπτωματικές αποτέλεσμα του σχεδιασμού του συγκεκριμένου πειράματος. Αυτό που με σιγουριά μπορεί να αποκλειστεί είναι το ότι κανένα από τα δοκιμασθέντα φύκη που ανήκαν μάλιστα σε διάφορες ομοταξίες Χλωρόφυτα (*Dunaliella*, *Tetraselmis*, *Asteromonas*), Κρυπτόφυτα (*Rhodomonas*) και Απτόφυτα (*Isochrysis*) δεν απορρίπτεται από τη διατροφική προτίμηση των συγκεκριμένων κωπηπόδων. Η ευρυφαγία των αρπακτικοειδών κωπηπόδων υποστηρίζεται και από ποικίλα ευρήματα. Οι Carli et al. (1995) έθρεψαν το *Tigriopus fulvus* με ένα μικροφύκος (*Monochrysis lutheri*) και τον κοινό μύκητα της μαγιάς

(*Saccharomyces cerevisiae*) και βρήκαν ότι η κάθε τροφή είχε διαφορετική ευεργετική επίδραση στα κωπήποδα. Έτσι τα κωπήποδα που τράφηκαν με το φύκος παρήγαγαν μεν καθημερινώς περισσότερους ναυπλίους αλλά συνάμα μικρότερη επιβίωση και μεγαλύτερο ποσοστό άγονων θηλυκών. Με άλλα λόγια σε βάθος χρόνου η μαγιά ως τροφή απέδιδε περισσότερα άτομα. Βέβαια από την άποψη της ζωντανής τροφής αυτό δεν είναι κατ' ανάγκην πλεονέκτημα επειδή τον ιχθυολόγο τον ενδιαφέρει η συνεχής παραγωγή ναυπλίων μια και αυτοί θα δοθούν άμεσα ως τροφή στις λάρβες και όχι τα αναπτυσσόμενα άτομα του κωπηποδικού πληθυσμού. Στη λογική λοιπόν της αύξησης του πληθυσμού των αρπακτικοειδών κωπηπόδων εντάσσεται και το κατάλληλο υπόστρωμα στον πυθμένα του όποιου δοχείου αυτά καλλιεργούνται. Και το υπόστρωμα σχετίζεται άμεσα με την αύξηση του πληθυσμού των βενθικής διαβίωσης αρπακτικοειδών κωπηπόδων. Μία σημαντική παρατήρηση που έγινε τόσο στις αποθεματικές καλλιέργειες του εργαστηρίου όσο και στους μικροθαλάμους των πειραματισμών ήταν και το ότι ο πληθυσμός των κωπηπόδων αρχίζει να αυξάνεται με ταχύ ρυθμό μόνο όταν στον πυθμένα του δοχείου έχει συσσωρευθεί αρκετό ίζημα που στην περίπτωση μας αποτελείτο από χαλαρά συνδεδεμένα βαμβακοειδούς υφής οργανικά συσσωματώματα. Τα συσσωματώματα αυτά τα αποτελούν οργανικά τρίμματα, περιπτώματα, μάζες μικροφυκών σε αποσύνθεση, κυανοβακτηριακά νημάτια και γενικά οτιδήποτε μπορεί να παγιδευτεί στο χαλαρό αυτό πλέγμα. Τα κωπήποδα (ναύπλιοι, κωπηποδίτες και ενήλικα) έρπουν μέσα σε αυτή τη μάζα, κομμάτια της οποίας μεταφέρουν ενίοτε στο σώμα τους. Είναι βάσιμο να υποθέσουμε ότι στο ίζημα αυτό αναπτύσσεται πληθυσμός βακτηριδίων ο οποίος μπορεί να συμμετέχει στο διατροφικό πλέγμα των κωπηπόδων. Αντιθέτως στις τροφικές προτιμήσεις των δεν φαίνεται να συμμετέχουν τα πρωτόζωα ιδιαίτερα τα βλεφαριδωτά του γένους *Euplotes* τα οποία ενίοτε και αυτά αναπτύσσονται σε μεγάλους πληθυσμούς στο ίζημα. Παρόλο που τα πρωτόζωα αυτά θα μπορούσαν να αποτελέσουν τροφή για τα κωπήποδα στις καλλιέργειές μας δεν παρατηρήθηκε ποτέ κάτι τέτοιο και η σχέση κωπηπόδων - βλεφαριδωτών μένει να διασαφηνιστεί με ειδικά προς τούτο πειράματα στο μέλλον. Στο πλαίσιο ακριβώς της λογικής του να προμηθεύσουμε στα κωπήποδα την κατάλληλη τροφή που θα δημιουργήσει το παραπάνω αναφερόμενο επωφελές για την αύξησή τους οργανικό ίζημα εντάσσεται και η παροχή στα δοχεία καλλιέργειας του αρπακτικοειδούς *Tisbe holothuriae* του χλωροφύκου-μακροφύκου *Ulva* ώστε οι αποσυντιθέμενοι θαλλοί του να καταναλώνονται αφενός από τα κωπήποδα και αφετέρου να δημιουργούν ίζημα (Miliou & Moraitou-Apostolopoulou (1991b)). Στην περίπτωση μας όλα τα χρησιμοποιηθέντα μικροφύκη δημιούργησαν μετά από 5 περίπου ημέρες ικανοποιητική ποσότητα ιζήματος και μπορούμε βάσιμα να ισχυριστούμε ότι δεν απαιτείται να τοποθετούμε μακροφύκη για να επιτύχουμε κάτι τέτοιο. Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας δεν μπορούμε να εξάγουμε συγκρίσιμες χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την αύξηση του πληθυσμού μόνο των αρπακτικοειδών κωπηπόδων *Tisbe* & *Tigriopus* τρεφόμενων με τα μικροφύκη που χρησιμοποιήσαμε. Οι υπάρχουσες πληροφορίες αφορούν και άλλα αρπακτικοειδή καλλιεργούμενα σε ποικίλα δοχεία, συνθήκες και είδη τροφής

σε εγχειρήματα μαζικής καλλιέργειάς των με βέλτιστη επιτυγχανόμενη πυκνότητα τα 412 κωπ./ml (Kahan, 1981). Παρόλο που μια τέτοια μεγάλη πυκνότητα κωπηπόδων είναι κατά την εμπειρία μας πολύ δύσκολο να επιτευχθεί, πολύ δε περισσότερο να διατηρηθεί, ως θεωρήσουμε αυτό το νούμερο ως ενδεικτικό της δυνατότητας να παράγουμε πυκνούς πληθυσμούς αρπακτικοειδών. Πιο κοντά στην πραγματικότητα είναι η ούτως ή άλλως εξαιρετική πυκνότητα των 205 κωπ./ml που πέτυχαν οι Souza-Santos et al. (2006) με το *Tisbe biminiensis* τρέφοντάς το με διάτομα σε δοχεία των 500 ml και με τάχος αύξησης $r=0,33$. Το ίδιο είδος καλλιεργούμενο σε δοχεία των 20L και τρεφόμενο με τα διάτομα *Phaeodactylon tricornutum* και *Thalassiosira fluviatilis* (Ribeiro & Souza-Santos, 2011) έδωσε τάχος αύξησης (r) 0,08 - 0,11 τιμές παρόμοιες με τις δικές μας (0,06 - 0,13) έτσι όπως αποτυπώθηκαν γενικώς στα αποτελέσματά μας μεταξύ των 5 χρησιμοποιηθέντων μικροφυκών και για τα 2 είδη κωπηπόδων (*Tisbe* & *Tigriopus*). Η καλλιέργεια που επιχειρήσαμε στην παρούσα εργασία με τους περιορισμούς που θέσαμε δηλαδή ένα μόνο αβγωμένο θηλυκό σε κάθε μικροδιαμέρισμα των 4 ml, η μη αλλαγή του νερού και η αραιή τροφοδοσία με το εκάστοτε φύκος πολύ απέχει βέβαια από μια προσπάθεια μαζικής καλλιέργειας, όμως ο στόχος ήταν μόνο να διερευνηθεί αν όντως υπάρχει δυνατότητα χρήσεως του κάθε μικροφύκου ως τροφή των συγκεκριμένων κωπηπόδων. Τα 3 από τα 5 είδη μικροφυκών που χρησιμοποιήσαμε (*Isochrysis* sp., *Rhodomonas* sp. και *Tetraselmis* sp.) έχουν δοκιμαστεί για την καλλιέργεια καλανοειδών κωπηπόδων του γένους *Acartia* (Schipp et al., 1999) και του κυκλωποειδούς *Aprocyclops panamensis* (PHELPS et al., 2005) με επιτυχία και έπρεπε να δοκιμαστούν και στα αρπακτικοειδή κωπήποδα κάτι που αποτέλεσε το θέμα της παρούσας εργασίας. Ιδιαίτερη σημασία έχει επίσης και η χρησιμοποίηση στο πείραμά μας ως τροφή των κωπηπόδων και των άλλων 2 ειδών μικροφυκών δηλαδή των *Asteromonas gracilis* και *Dunaliella salina* απομονωμένων από τις αλυκές Μεσολογγίου και καλλιεργούμενων επί πολλά χρόνια στο εργαστήριο καλλιέργειας πλαγκτού του Τ.Ε.Ι. Δυτικής Ελλάδας. Πρόκειται για εξαιρετικής διατροφικής αξίας μικροφύκη τα οποία έχουν αποδειχθεί εξαιρετική τροφή για πρωτόζωα (*Fabrea salina*) (HOTOS, 2019) και το τροχόζωο *Brachionus plicatilis* (HOTOS, 2002, 2003). Ιδιαίτερα μάλιστα το *Asteromonas gracilis* με το οποίο ελάχιστοι ερευνητές έχουν ασχοληθεί ως υπόστρωμα θρέψης για ασπόνδυλους οργανισμούς (HOTOS, 2019), πρέπει να επισημανθεί η αποτελεσματικότητά του που παρατηρήσαμε στην αύξηση του πληθυσμού των *Tisbe* ($r=0,10$) και *Tigriopus* ($r=0,11$). Στο πλαίσιο αυτό τα συμπεράσματά μας οδηγούν στην κατεύθυνση του να θεωρήσουμε όλα τα μαστιγοφόρα μικροφύκη που χρησιμοποιήσαμε ως ικανοποιητική τροφή για τα κωπήποδα αυτά. Και μπορεί μεν τα τάχη αύξησης που πετύχαμε 0,06-0,13 να είναι χαμηλότερα από των Pinto et al. (2001) ($r=0,49$) οι οποίοι έθρεψαν το *Tisbe biminiensis* με το διάτομο *Nitzschia closterium* ή των Souza-Santos et al. (2006) για το ίδιο είδος με $r=0,33$, όμως έχουμε βάσιμους λόγους να πιστεύουμε ότι με διαφορετικό πειραματισμό επιλέγοντας μεγαλύτερα δοχεία, συστηματική και συχνή παροχή φρέσκου φυτοπλαγκτού, επαρκή αερισμό και

μερική αλλαγή του νερού καθώς και συχνή αφαίρεση φουρνιών ναυπλίων ο πληθυσμός των κωπηπόδων θα δώσει πολύ μεγαλύτερα τάχη αύξησης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Βιολογικά χαρακτηριστικά των χρησιμοποιηθέντων φυκών

Τα φυκή είναι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που δεν διαθέτουν βλαστούς, φύλλα και ρίζες και δεν σχηματίζουν άνθη και καρπούς, όπως και τα ανωτέρα φυτά. Τα φυκή διαφέρουν σημαντικά από τα σπερματοφύτα, τόσο από τα χερσαία όσο και από τα θαλάσσια. Αναπαράγονται με απλή κυτταρική διαίρεση και πιο πολύπλοκα είτε αγενώς, δηλαδή με ζωοσπόρια που προκύπτουν από μίτωση του απλοειδούς μητρικού κυττάρου, είτε εγγενώς, δηλαδή με παραγωγή γαμετών. Οι γαμέτες με σύζευξη θα δώσουν διπλοειδή ζυγώτη (2n), ο οποίος μετά την διαδικασία της μείωσης θα παράγει απλοειδή ζωοσπόρια.

Παρακάτω ακολουθούν στοιχεία βιολογίας των χρησιμοποιηθέντων μικροφυκών ληφθέντα κατόπιν αδείας από Γ. Χώτο, "Καλλιέργειες Πλαγκτού" (2016). Τα διαγράμματα δημιουργήθηκαν από Ι. Φωτοδήμα.

Isochrysis galbana

Φύλο: Prymnesiophyta

Κλάση: Haptophyceae

Τάξη: Isochrysidales

Οικογένεια: Isochrysidaceae

Γένος: *Isochrysis*

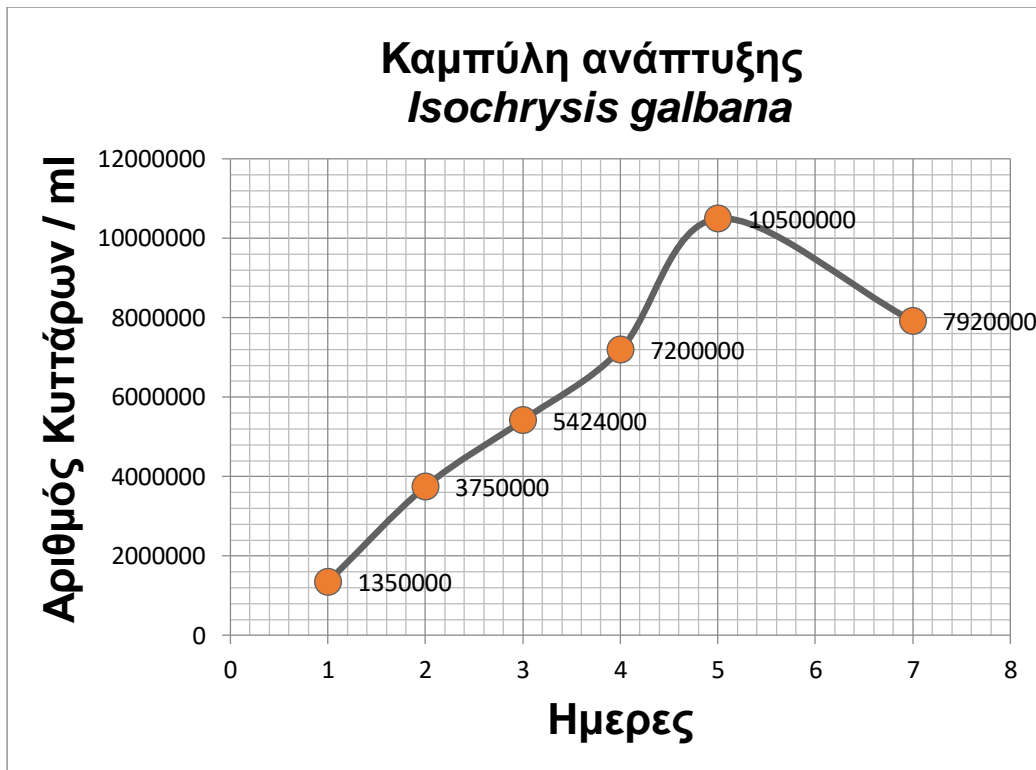
Είδος: *Isochrysis galbana*

Μέγεθος:
κυττάρου, 5-7 μm.
Ελεύθερα κύτταρα (δεν σχηματίζουν αποικίες), με δύο ισομεγέθη μαστίγια. Πολύ συχνά και ιδιαίτερα όταν τα θρεπτικά στοιχεία στο νερό εξαντλούνται, τα κύτταρα παρουσιάζονται σφαιρικά.

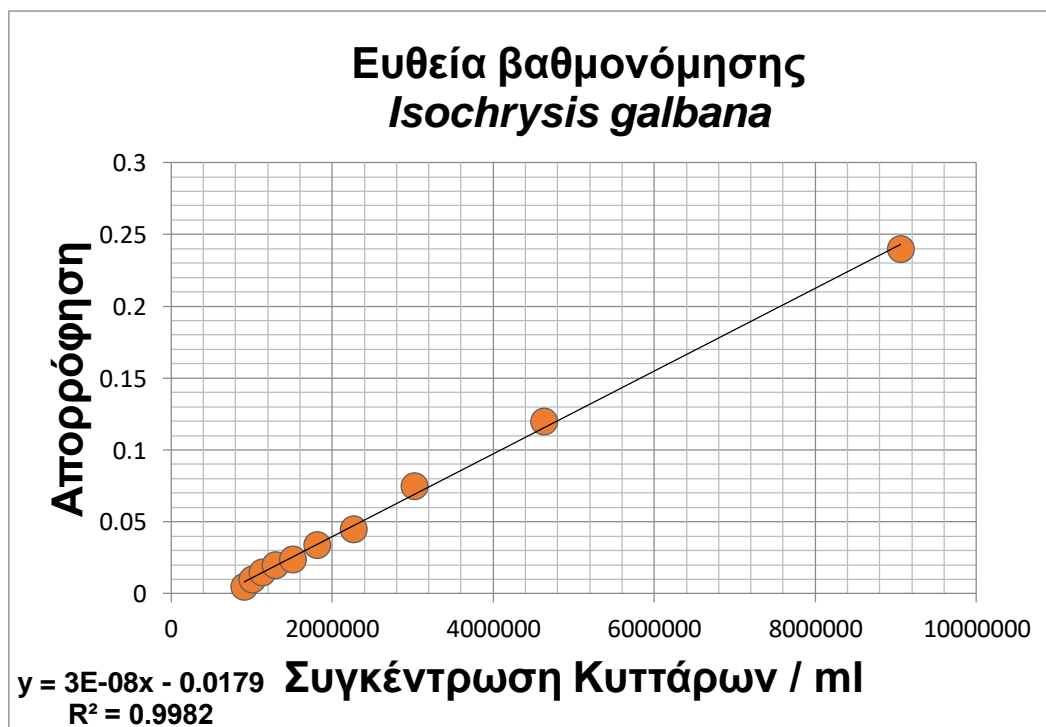
Αυτό το χρυσο-καφετί

φύκος χρησιμοποιείται ευρέως στις υδατοκαλλιέργειες λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα – PUFA και ιδιαίτερα σε εικοσιδυοεξαενοϊκό οξύ 22:6ω-3 (DHA). Τα πολυακόρεστα και ιδιαίτερα το DHA είναι απαραίτητα για την επιβίωση, την αντοχή στο στρες και την καλή ανάπτυξη του εγκεφάλου και των ματιών των εκτρεφόμενων νυμφών των ψαριών στα ιχθυοεκκολαπτήρια. Οι νύμφες τρέφονται με τροχόζωα και τα τροχόζωα τρεφόμενα με *Isochrysis* εμπλουτίζονται με DHA.





Σχήμα 38. Καμπύλη αύξησης του *Isochrysis galbana* σε κύτ./ml στη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειάς του.



Σχήμα 39. Καμπύλη βαθμονόμησης της συγκέντρωσης των κυττάρων /ml του μικροφύκου *Isochrysis galbana* με τη μετρούμενη απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο.

Rhodomonas salina

Φύλο: Cryptophyta

Ομοταξία: Cryptophyceae

Τάξη: Pyrenomonadales

Οικογένεια: Pyrenomonadaceae

Γένος: *Rhodomonas*

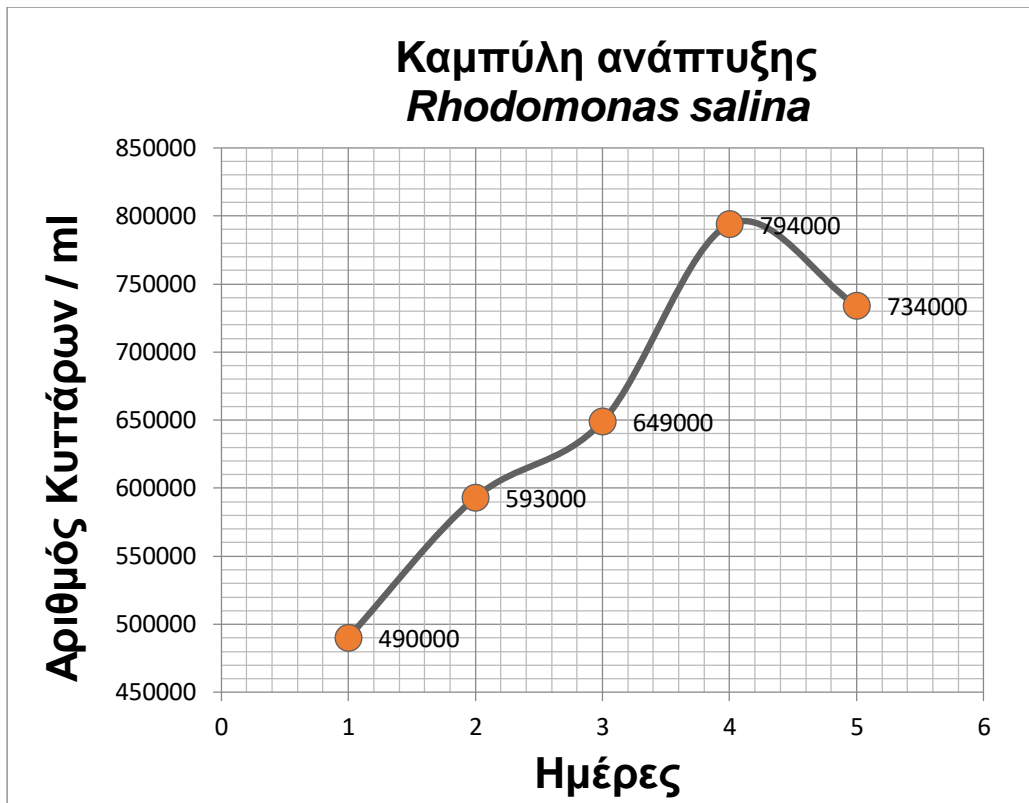
Είδος: *Rhodomonas salina*

Ελεύθερα ωοειδή κύτταρα μεγέθους 5 – 13 μm και πάχους 6 – 8 μm, πεπλατυσμένα με μία πρόσθια αύλακα με δύο ελαφρώς άνισα μαστίγια. Τα μαστίγια του προσφέρουν κινητική ικανότητα. Το χρώμα τους ποικίλλει από σκούρο κόκκινο έως κοκκινο-καφέ.

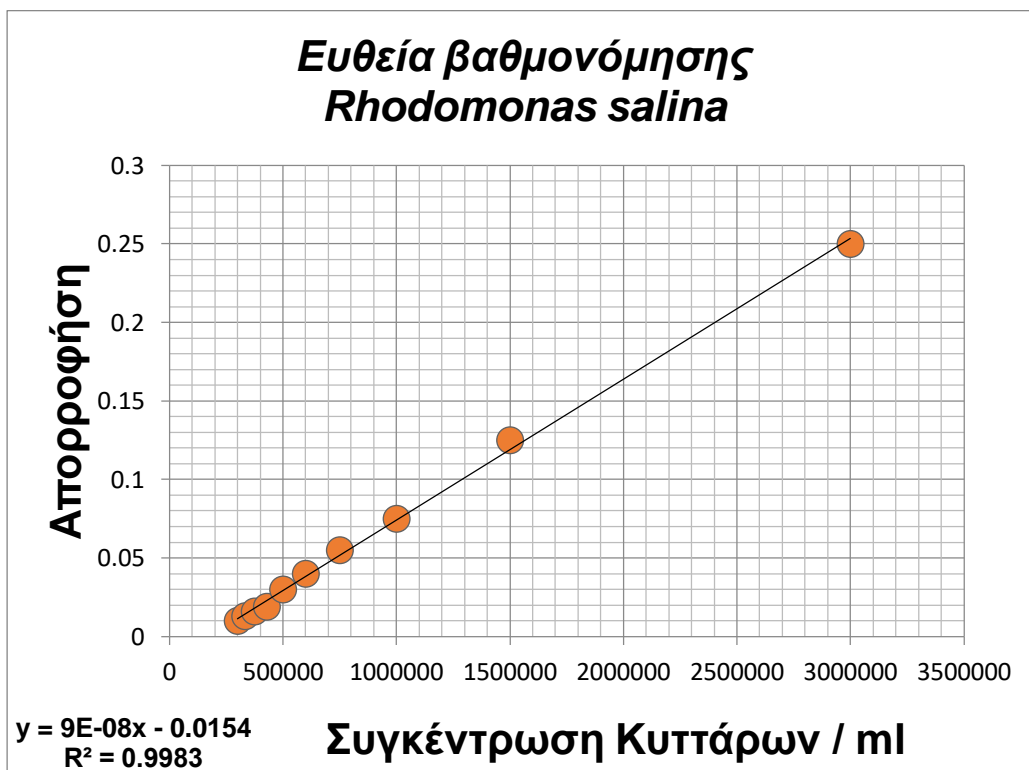
Υπάρχουν εξειδικευμένα κενोटόπια τα οποία

αδειάζοντας απότομα το περιεχόμενό τους, αν το κύτταρο διαταραχθεί από μηχανικό ή χημικό στρες, προωθούν το κύτταρο μακριά από τη διαταραχή. Αλλα είδη του γένους *Rhodomonas* απαντώνται και σε γλυκά νερά. Το *Rhodomonas salina* επιβιώνει σε υφάλμυρα και αλμυρά νερά με βέλτιστο αλατότητας περί τα 20 ppt, θερμοκρασίας 20 °C, pH 8 – 8,2 και φωτισμό συνεχή, εντάσεως 1000-7500 lux. Για την επιτυχή του μαζική καλλιέργεια η οποία μπορεί να φτάσει και τα 1.500.000 κύτ./ml σε 4 ημέρες (ξεκινώντας με 50.000 κύτ./ml), πιο κρίσιμοι παράγοντες είναι η θερμοκρασία και η αλατότητα οι οποίοι πρέπει να είναι βέλτιστοι (20 °C, 20 ppt) ενώ το φως μπορεί να κυμαίνεται σε μεγάλο εύρος έντασης. Εξυπακούεται ότι θα υπάρχει επάρκεια θρεπτικών. Οι καλλιέργειες σε φάση εκθετικής αύξησης έχουν λαμπερό κόκκινο χρώμα ενώ η φθίνουσα καλλιέργεια αποκτά σκούρο κοκκινο-καφέ χρωματισμό και κατόπιν πράσινο.





Σχήμα 40. Καμπύλη αύξησης του *Rhodomonas salina* σε κýt./ml στη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειάς του.



Σχήμα 41. Καμπύλη βαθμονόμησης της συγκέντρωσης των κυττάρων /ml του μικροφύκου *Rhodomonas salina* με τη μετρούμενη απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο.

Tetraselmis suecica

Φύλο: Chlorophyta

Ομοταξία: Chlorophyceae

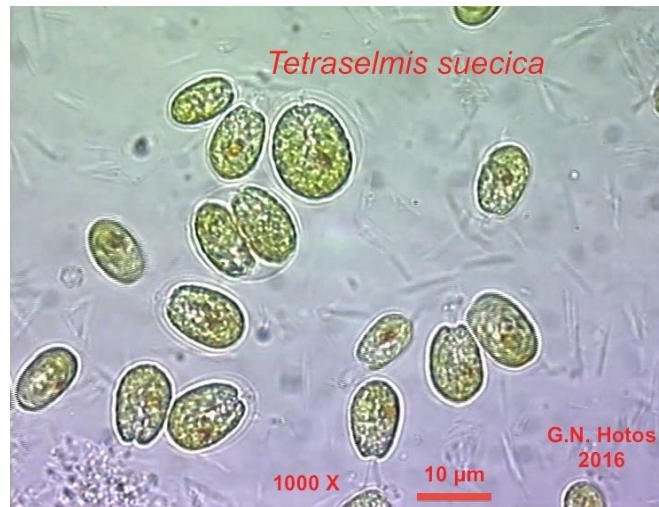
Τάξη: Volvocales

Οικογένεια:

Chlamydomonadaceae

Γένος: *Tetraselmis*

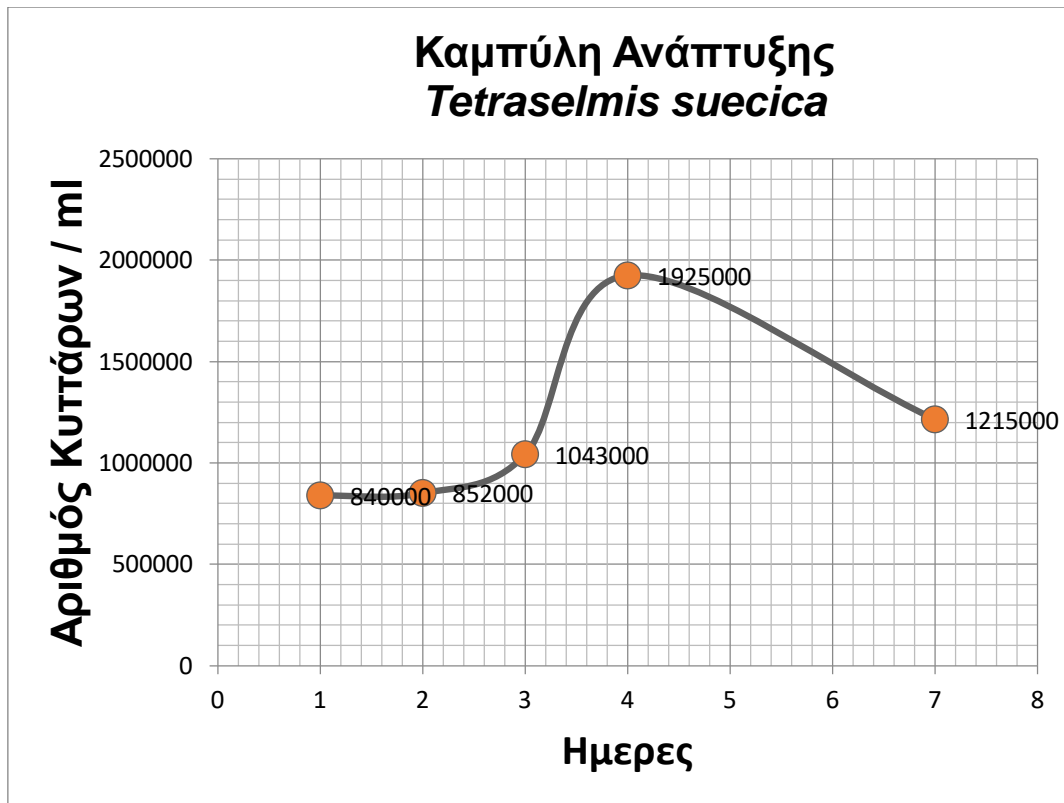
Είδος: *Tetraselmis suecica*



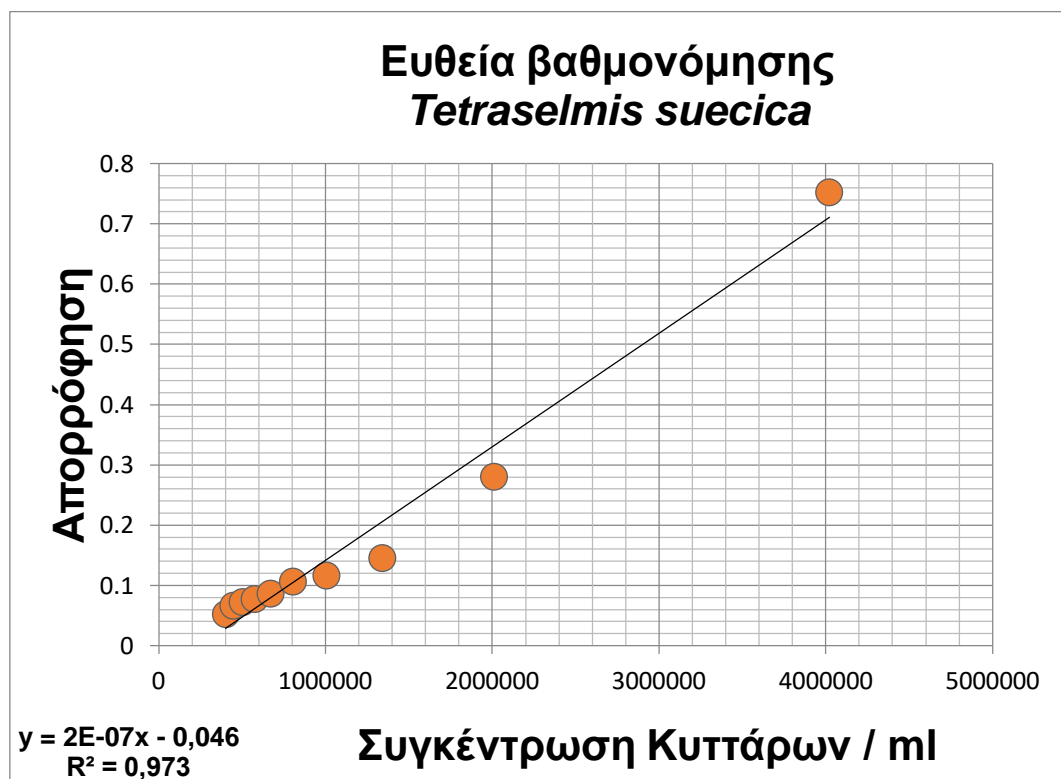
Μονοκύτταρο πράσινο θαλάσσιο είδος φύκους, χωρίς κυτταρικό τοίχωμα, με 4 ισομεγέθη μαστίγια τα οποία του προσδίδουν γρήγορη κίνηση. Μέγεθος 7 – 10 μm με κύτταρα ωσειδο-κυλινδρικά με χαρακτηριστικό βαθούλωμα στο εμπρόσθιο μέρος όπου εκφύονται τα μαστίγια. Η καλλιέργειά του είναι εύκολη και μπορεί να φτάσει σε πυκνότητες 1.500.000 κύτ./ml ή και μεγαλύτερες μέσα σε 4 ημέρες σε βέλτιστη αλατότητα 25 ppt, pH 7 - 8, θερμοκρασία 18 – 22 °C και φωτισμό 5000 – 10.000 lux.

Είναι εξαιρετική τροφή για τα τροχόζωα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια και βιταμίνη C. Επίσης αποτελεί εξαιρετική τροφή για τις προνύμφες και τα ενήλικα άτομα των μαλακίων καθώς και για τα καρκινοειδή (*Artemia*, κωπήποδα, γαρίδες) και τα κοράλλια.

Σε κακές συνθήκες καλλιέργειας (έλλειψη θρεπτικών, υπερβολική αλατότητα κ.ά.) τα κύτταρά του χάνοντας τα μαστίγια περιβάλλονται από μια διάφανη κύστη και παραμένουν σε διάπαυση για πολύ καιρό μέχρι οι συνθήκες να καλυτερέψουν. Το στάδιο αυτό λέγεται παλμελλοειδές (palmella stage) και ενίοτε μέσα στην κύστη αυτή παρατηρούνται κυτταρικές διαιρέσεις. Το συγγενές του είδος *Tetraselmis marina* είναι πολύ μεγαλύτερου μεγέθους (~23 μm), απαντάται σε πολύ αλμυρά νερά (80 – 150 ppt) και παρουσιάζει έντονη παλμελλοποίηση.



Σχήμα 42. Καμπύλη αύξησης του *Tetraselmis suecica* σε κύτ./ml στη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειάς του.



Σχήμα 43. Καμπύλη βαθμονόμησης της συγκέντρωσης των κυττάρων /ml του μικροφύκου *Tetraselmis suecica* με τη μετρούμενη απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο.

Dunaliella salina

Φύλο: Chlorophyta

Ομοταξία: Chlorophyceae

Τάξη: Chlamydomonadales

Οικογένεια: Dunaliellaceae

Γένος: *Dunaliella*

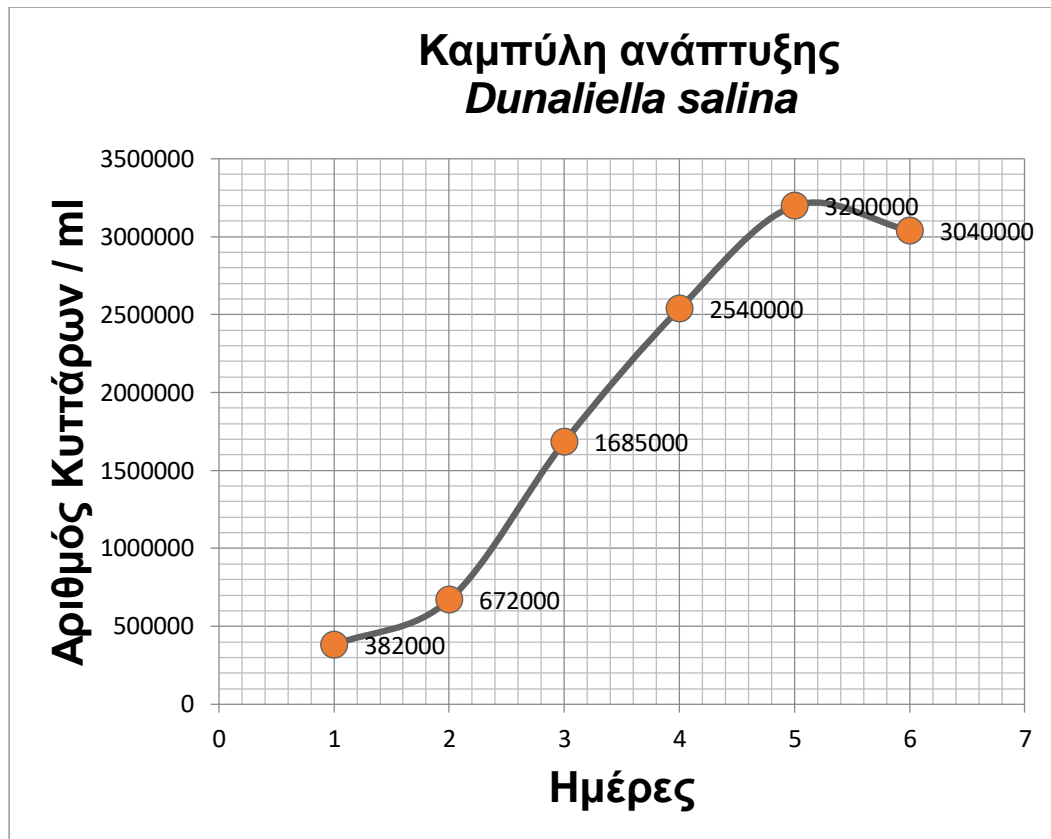
Είδος: *Dunaliella salina*



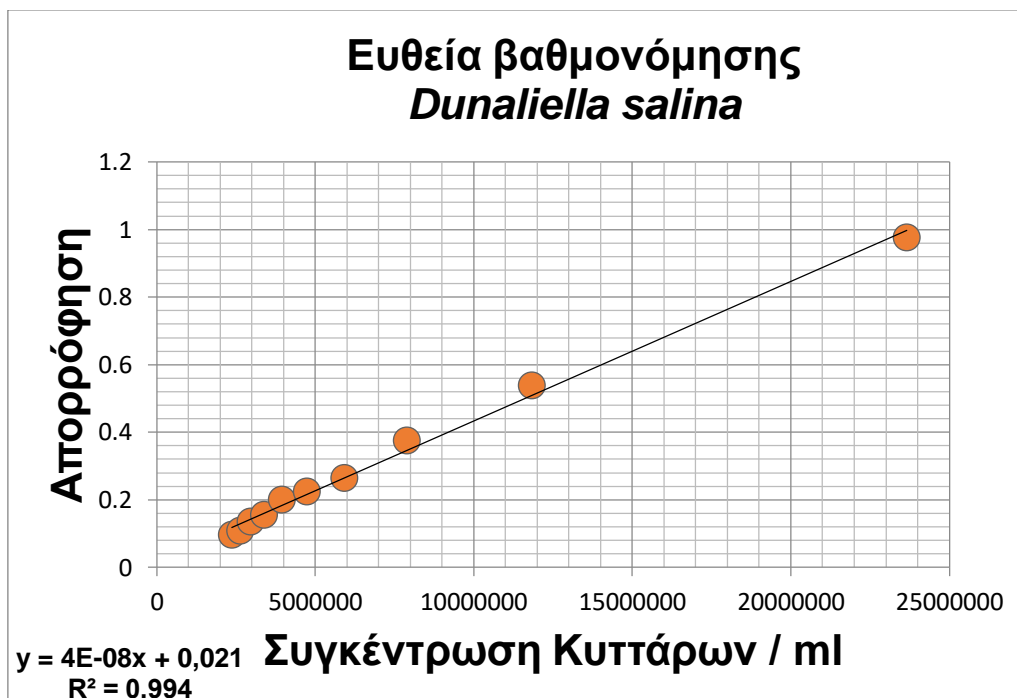
Είναι μονοκύτταρο είδος με δύο ισομεγέθη μεγάλα μαστίγια. Δεν διαθέτει κυτταρικό τοίχωμα. Το γένος *Dunaliella* περιλαμβάνει 29 είδη και επιπροσθέτως πολλές ποικιλίες (τοπικές ή μη, υπό διερεύνηση) και πολλές μορφές κυττάρων (υπό διφορούμενο πολλές φορές καθεστώς ταυτοποίησης). Το είδος *Dunaliella salina* όπως και πολλά από τα συγγενικά του, είναι θαλάσσιο και ειδικά αυτό αντέχει σε εξαιρετικά μεγάλες αλατότητες μέχρι επιπέδου άλμης ~ 310 ppt, διαθέτοντας μια θαυμαστή ωσμωρυθμιστική ικανότητα από τις ικανότερες μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών. Παρουσιάζει αντοχή και στο pH ανεχόμενο ακόμα και τιμή 11. Το ίδιο και για τη θερμοκρασία όπου μπορεί να επιβιώσει σε εύρος $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως $38\text{ }^{\circ}\text{C}$. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων του ενδημεί σε όλες τις αλμυρές λίμνες του κόσμου καθώς και στις λεκάνες των αλυκών όπου κατά τα τελικά στάδια της συμπύκνωσης του νερού στα κρυσταλλοπήγια, χρωματίζει το νερό πορτοκαλοκόκκινο μια και μόνο αυτή κατακλύζει τις δεξαμενές με τα κύτταρά της να έχουν συσσωρεύσει μεγάλες ποσότητες της χρωστικής β-καροτίνη. Η β-καροτίνη είναι πολύτιμο προϊόν για τον άνθρωπο και ως εκ τούτου η *D. salina* καλλιεργείται εντατικά σε πολλά μέρη του κόσμου σε υπεράλμυρες λεκάνες για την παραγωγή αυτής της φυσικής χρωστικής.

Αν και το γενικό υπό την «κλασική» έννοια περιγραφής σχήμα του κυττάρου της είναι αχλαδοειδές, υπάρχει μεγάλη ποικιλία ως προς το μέγεθος (8 – 22 μm), ως προς το σχήμα (ενίοτε οβάλ, ή σφαιρικό) και το χρώμα (πράσινο, πορτοκαλοπράσινο, πορτοκαλί, κόκκινο) ανάμεσα στα είδη ή και ανάμεσα στο ίδιο είδος. Είναι εξαιρετική τροφή για τα τροχόζωα στις υδατοκαλλιέργειες καθώς έχει ικανοποιητική περιεκτικότητα και σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

Αναπαράγεται κυρίως αγενώς με απλή κυτταρική διαίρεση αλλά και εγγενώς με ένωση δύο κυττάρων συμπεριφερόμενων ως γαμέτες. Το προϊόν της ένωσής των είναι ένας ευμεγέθης διπλοειδής ζυγώτης, πολύ ανθεκτικός ακόμα και στο γλυκό νερό ή και στην ξηρότητα. Όταν οι συνθήκες ξαναγίνουν καλές ο ζυγώτης που έχει υποστεί μείωση και κατόπιν διαδοχικές μιτώσεις απελευθερώνει μέχρι και 32 απλοειδή θυγατρικά κύτταρα.



Σχήμα 44. Καμπύλη αύξησης του *Dunaliella salina* σε κύτ./ml στη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειάς του.



Σχήμα 45. Καμπύλη βαθμονόμησης της συγκέντρωσης των κυττάρων /ml του μικροφύκου *Dunaliella salina* με τη μετρούμενη απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο.

Asteromonas gracilis

Φύλο: Chlorophyta
Ομοταξία: Chlorophyceae
Τάξη: Chlamydomonadales
Οικογένεια:
Asteromonadaceae
Γένος: *Asteromonas*
Είδος: *Asteromonas gracilis*

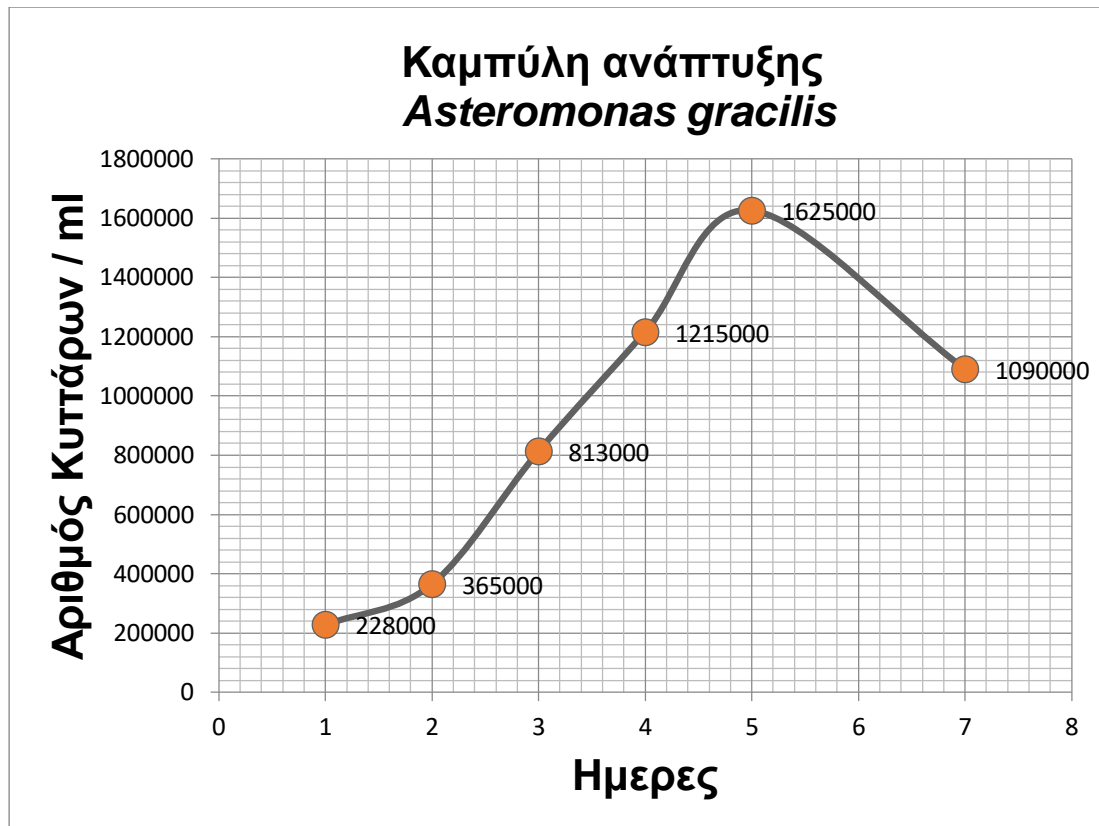


Πράσινο χλωροφύκος με ελεύθερα κύτταρα χωρίς κυτταρικό τοίχωμα, μεγάλου μεγέθους (18 – 25 μm), με δύο μεγάλα μαστίγια που του προσδίδουν έντονη κινητικότητα η οποία χαρακτηρίζεται από αργή στροβιλοτρεμώδη κίνηση με εύκολα παρακολουθήσιμη στο μικροσκόπιο πορεία προς τα εμπρός ή με στρίψιμο προς άλλη κατεύθυνση. Η εμφάνισή του είναι επιμήκους σχήματος με 6 κατασκευές εν είδη «καρίνας» να διατρέχουν κατά τον επιμήκη άξονα το κύτταρο. Αυτή του η κατασκευή και κατά τις διάφορες θέσεις που παίρνει το κύτταρο κατά τον στροβιλισμό, του προσδίδουν ενίοτε και αστεροειδή μορφή. Επίσης παρουσιάζει και άλλες μορφές ανάλογα με την αλατότητα (σφαιρική, πεπλατυσμένη, καρφοειδή κ.λπ.). Το χρώμα του κυττάρου είναι έντονα πράσινο και διακρίνονται εύκολα ο μεγάλος χλωροπλάστης, ο πυρήνας και η πορτοκαλόχροη φωτοευαίσθητη κηλίδα (στίγμα).

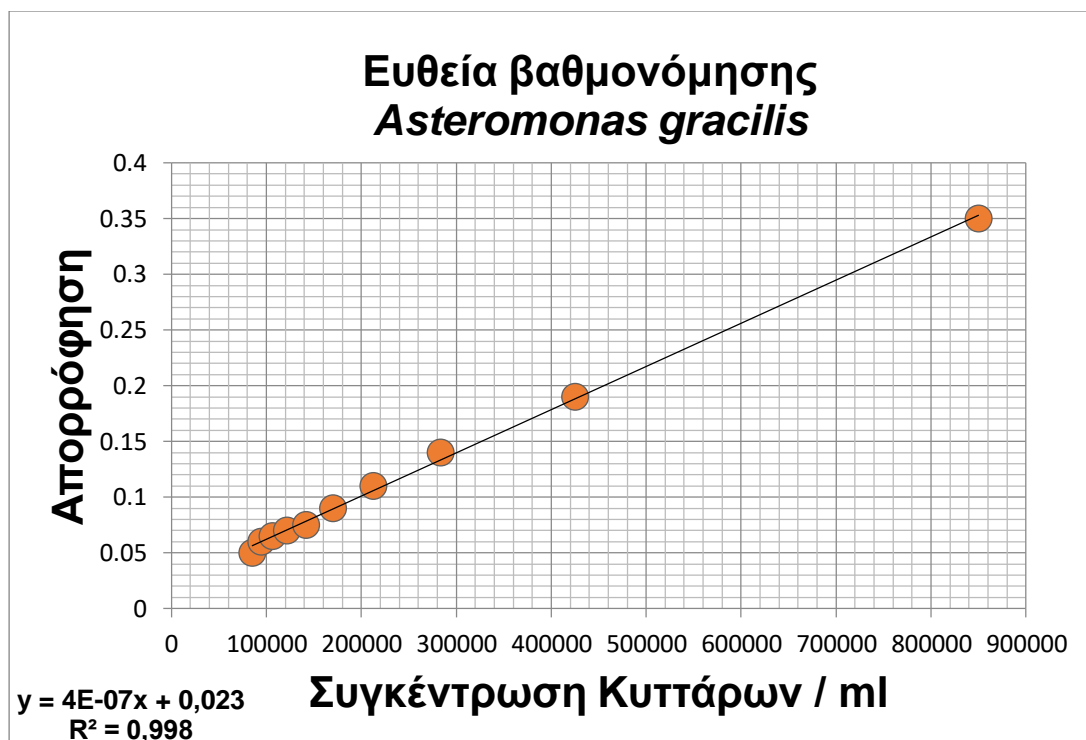
Η *Asteromonas* όπως και η *D. salina* παρουσιάζει θαυμαστή ωσμωρυθμιστική ικανότητα (και τα δύο είδη για να αντέξουν την ωσμωτική διαφορά στην υψηλή αλατότητα παράγουν ενδοκυτταρικός γλυκερίνη), αντέχοντας ένα μεγάλο εύρος αλατότητας από θαλασσινό (35 ppt) έως υπεράλμυρο νερό επιπέδου άλμης (> 300 ppt). Όταν οι συνθήκες χειροτερεύουν (έλλειψη θρεπτικών, κ.ά.) τα κύτταρα μεταμορφώνονται σε κύστες με παχύ μεμβρανικό τοίχωμα και μπορούν να παραμείνουν σε διάπαυση για μήνες ή και χρόνια ακόμα και σε αλάτι και να ξαναμεταμορφωθούν σε κινητικά κύτταρα όταν οι συνθήκες ξαναγίνουν ευνοϊκές. Αυτή της η ιδιότητα σε συνδυασμό με την εύκολη προσαρμογή της σε μεγάλο εύρος αλατότητας, θερμοκρασίας, έντασης φωτός, pH και την μη ανάγκη της για βιταμίνες στο θρεπτικό μέσο, την κάνουν πολύ πρακτικό είδος για καλλιέργεια η οποία μάλιστα δεν καταρρέει εύκολα και αν αυτό γίνει μετά από πολύ καιρό, οι δημιουργηθείσες εν τω μεταξύ κύστες της μπορούν να ξαναδώσουν νέα βιώσιμη καλλιέργεια.

Είναι ιδανική τροφή για τροχόζωα, πρωτόζωα, κωπήποδα και την *Artemia*. Αναπαράγεται με απλή κυτταρική διαίρεση.

Αποτελεί στόχο έρευνας τελευταίως για μαζική καλλιέργεια σε υψηλή αλατότητα με σκοπό την παραγωγή χρήσιμων προϊόντων όπως β-καροτένιο και βιοκαύσιμα.



Σχήμα 46. Καμπύλη αύξησης του μικροφύκου *Asteromonas gracilis* σε κτύ./ml στη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειάς του.



Σχήμα 47. Καμπύλη βαθμονόμησης της συγκέντρωσης των κυττάρων /ml του μικροφύκου *Asteromonas gracilis* με τη μετρούμενη απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Anufriieva, E. V., 2014. Free-living Cyclopidae (Copepoda, Cyclopoida) in saline and hypersaline water bodies of the Crimea: new findings. *Morskoi Ecologicheskii Zhurnal*, 13 (2): 24-30. (in Russian).

Anufriieva, E. V. & Shadrin, N. V., 2012. Crustacean diversity in hypersaline Chersonessus Lake (Crimea). *Opt. Protect. Ecosyst.*, 7 : 55-61. (in Russian).

Anufrieva, V. E., 2015. Do copepods inhabit hypersaline waters worldwide? A short review and discussion. *Chinese Journal of Oceanography and Limnology*. 33(6): 1354-1361.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00343-014-4385-7>

Atsushi Hagiwara, Cheng-Sheng Lee, and Debra J. Shiraishi. (1995). Some Reproductive Characteristics of the Broods of the Harpacticoid Copepod *Tigriopus japonicus* Cultured in Different Salinities. *Fisheries Science* 61(4), 618-622.

Bayly, I. A. E. & Boxshall, G. A., 2009. An all-conquering ecological journey: from the sea, calanoid copepods mastered brackish, fresh, and athalassic saline waters. *Hydrobiologia*, 630 (1): 39-47, <http://dx.doi.org/10.007/s10750-009-9797-6>.

Belmonte, G., Moscatello, S., Batogova, E. A., Pavlovskaya, T., Shadrin, N. V. & Litvinchuk, L. F., 2012. Fauna of hypersaline lakes of the Crimea (Ukraine). *Thalassia Salentina*, 34: 11-24, <http://dx.doi.org/10.1285/i15910725v34p11>.

Bergmans, M., 1983. Population Biology of the Harpacticoid Copepod *Tisbe furcata* (Baird, 1837), Thesis. Vrije Universiteit Brussel, Faculteit Wetenschappen, Laboratorium voor Ecologie en Systematiek.

Bozic, B., 1960. Le Genre *Tigriopus* Norman (Copépodes Harpacticoides) et ses formes Européennes: recherches morphologiques et expérimentales. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, 93: 169-269.

Burton, R. S., 1991. Regulation of proline synthesis during osmotic stress in the copepod *Tigriopus californicus* *J. Exp. Zool.*, 259 (2): 166-173, <http://dx.doi.org/10.1002/jez.1402590204>.

Carli, A. & P. Grisafi, 1983. Copepodi Lagunari. Consiglio Nazionale delle Ricerche. Genova, 124 p

Carli, A., Mariottini, G.L. & Pane, L., 1995. Influence of nutrition on fecundity and survival in *Tigriopus fulvus* Fischer (Copepoda: Harpacticoida). *Aquaculture* 134: 113-119.

Carrasco, N. K. & Perissinotto, R., 2012. Development of a halotolerant community in the St. Lucia Estuary (South Africa) during a hypersaline phase. *PLoS One*, 7 (1): e29927, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029927>.

Coull, B.C. & Wells, J. B. J., 1983. Refuges from fish predation: experiments with phytalmeiofauna from the New Zealand rocky intertidal. *Ecology* 64: 1599-1609.

Drillet G., 2003. Temperature and cold storage effects upon hatching success of subitaneous eggs from the calanoid copepod *Acartia tonsa*. Rapport de fin d'études. DESS "Exploitation des ressources vivants cotiers, 2002-2003.

- Fava, G. & B. Volkmann, 1975. *Tisbe* (Copepoda, Harpacticoida) species from the Lagoon of Venice. I. Seasonal fluctuations and ecology. *Marine Biology* 30: 151–165
- Fenwick, G., 2007. Quick guide to free-living orders of New Zealand freshwater copepoda. Niwa Taihoro Nukurangi.
- Frangoulis, C., Christou, E. D. & Hecq, J. H., 2004. Comparison of marine copepod outfluxes: nature, rate, fate and role in the carbon and nitrogen cycles. *Adv. Mar. Biol.*, 47 : 253-309, [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2881\(04\)47004-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2881(04)47004-7).
- Gaudy, R. & Guerin, J.P., 1982. Population dynamics of *Tisbe* holothuriae (Copepoda: Harpacticoida) in exploited mass culture. *Neth. J. Sea Res.* 16, 208–216.
- Grant, W. D., 2004. Life at low water activity. *Phil. Trans. R. Soc. London B: Biol. Sci.*, 359 (1448): 1 249-1 267, <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2004.1502>.
- Harris, R. P., 1973. Feeding, growth, reproduction and nitrogen utilization by the harpacticoid copepod, *Tigriopus brevicornis*. *Journal of the Marine Biological Association U.K.* 53: 785-800.
- Hawkins, B., 1962. The biology of the marine copepod *Tigriopus californicus* (Baker). Master thesis Humboldt state college, USA.
- Heath, P. L. & Moore, C. G., 1997. Rearing Dover sole larvae on *Tisbe* and *Artemia* diets. *Aquaculture International* 5: 29-39.
- Herbert, J., 1976. Salinity and upper temperature tolerances of a rockpool copepod, *Tigriopus californicus* (Baker, 1912). Master thesis University of Oregon, USA.
- Hicks, G. R. F., 1980. Structure of phytal harpacticoid copepod assemblages and the influence of habitat complexity and turbidity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 44: 157-192.
- Hotos, N. G., 2002. Selectivity of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed mixtures of algal species with various cell volumes and cell densities. *Aquaculture Research*, 33 (12), 949-95.
- Hotos, N. G., 2003. Growth, filtration and ingestion rate of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed with large (*Asteromonas gracilis*) and small (*Chlorella* sp.) celled algal species. *Aquaculture Research*, 34 (10), 793-802.
- Hotos, G., 2018. Protists, Cyanobacteria, Rotifers and Crustacea from the hypersaline lakes of Messolonghi saltworks (W. Greece). *10th World Salt Symposium, 2018, Park city, Utah, U.S.A.*
- Hotos, G., 2019. A short review on the halotolerant green microalga *Asteromonas gracilis* Artari with emphasis on its uses. *Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research*, 4(3): 1-8. DOI: 10.9734/AJFAR/2019/v4i330054
- Hotos, G., 2019. Feeding with various microalgae the salt “loving” ciliate *Fabrea salina* in normal salinity 35 ppt. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 3(3):150-152. DOI: 10.26855/ijfsa.2019.07.00.

- Hotos, G. (Γ. Χώτος), 2019. Κωπήποδα (βασικά βιολογικά στοιχεία). Research Gate, DOI: 10.13140/RG.2.2.25424.46081. Available from: https://www.researchgate.net/publication/336315323_Kopepoda_basika_biologika_stoicheia
- Humes, A. G., 1957. Deux Copepodes Harpacticoides nouveaux du genre *Tisbe*, parasites des Holothuries de la Mediterranee. *Vie et Milieu* 8: 9–22.
- Imhoff, J. F., 1986. Survival strategies of microorganisms in extreme saline environments. *Adv. Space Res.*, 6 (12): 299- 306, [http://dx.doi.org/10.1016/0273-1177\(86\)90098-0](http://dx.doi.org/10.1016/0273-1177(86)90098-0).
- Kahan, D., 1981. Effect of some ecological factors on the growth of the copepod *Schizopera elantensis* a potential food organism for hatcheries. *Kiel. Meerersforsch Sonderh* 5, 544–553.
- Korovessis, A. K., Hotos, G. & G. Zalidis, 2018. The role of the ciliate protozoan *Fabrea salina* in solar salt production. 10th World Salt Symposium, 2018, Park city, Utah, U.S.A.
- Kuhlmann, D., 1981. Rearing of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) on cultured food organisms and postmetamorphosis growth on natural and artificial food. *Aquaculture*, Pages 183-196.
- Lee, C. & Hu, F., 1981. Salinity tolerance and salinity affects on brood size of *Tigriopus japonicus* Mori. *Aquaculture* 22: 377-381
- Lee, W.H., Zhang, X. K., Van Baalen, C. & Arnold, C.R., 1985. Feeding and reproductive performance of the harpacticoid *Tisbe carolinensis* (Copepoda, Crustacea) in four algal cultures. *Marine Ecology Progress Series* 24: 273-279.
- Lindley, L. C., Phelps, R. P., Davis, D. A. & Cummins, K. A., 2011. Salinity acclimation and free amino acid enrichment of copepod nauplii for first-feeding of larval marine fish. *Aquaculture*, 318 (3-4): 402-406, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.050>.
- McEvoy, (1998). Monitoring Working Memory Load during Computer-Based Tasks with EEG Pattern Recognition Methods.
- Miliou, H. & Moraitou-Apostolopoulou, M., 1991a. Combined effects of temperature and salinity on the population dynamics of *Tisbe holothuriae* Humes (Copepoda: Harpacticoida). *Arch. Hydrobiol.* 121: 431-448.
- Miliou, H. & Moraitou-Apostolopoulou, M., 1991b. Effects of seven diets on the population dynamics of laboratory cultured *Tisbe holothuriae* Humes (Copepoda, Harpacticoida). *HelgoländerMeeresunters* 45: 345-356.
- Miliou, H., 1996. The effect of temperature, salinity and diet on final size of female *Tisbe holothuriae* (Copepoda, Harpacticoida). *Crustaceana* 69:742-754
- Ogle, J.T., Lemus, J.T., Nicholson, L.C., Barnes, D.N. & Lotz, J.M., 2005. Characterization of an extensive zooplankton culture system coupled with intensive larval rearing of Red Snapper *Lutjanus campechanus*. In: Lee, C.S., Bryen, P.J.O., Marcus, N.H. (Eds.), *Copepods in aquaculture*. Blackwell, UK, pp. 225–244.
- Oren, A., 2011. Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environ. Microbiol.*, 13 (8): 1 908- 1 923, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02365.x>.

- Payne, M.F. & Rippingale, R.J., 2001. Intensive cultivation of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture* 201 (3–4), 329–342.
- Person Le Rulet.J., 1975 Elevage de copepodes calanoeidew. Biologie et dynamique des populations, premiers resultats Annls. Inst. Oceanogr Monaco 51, 203-221.
- Phelps, R.P., Sumiarsa, G.S., Lipman, E. E., Lan, H., Moss, K.K. & Davis, A.D., 2005. Intensive and extensive production techniques to provide copepod nauplii for feeding larval red snapper *Lutjanus campechanus*. In: Lee, C.S., Bryen, P.J.O., Marcus, N.H. (Eds.), *Copepods in aquaculture*. Blackwell, UK, pp. 151–168
- Pinto, C.S.C., Souza-Santos, L.P. & Santos, P.J.P., 2001. Development and population dynamics of *Tisbe biminiensis* (COPEPODA–HARPACTICOIDA) reared on different diets. *Aquaculture* 198, 253–267.
- Punnarak, P., 2015. Cultivation of harpacticoid copepods (families Harpacticidae and Laophontidae) under selected environmental conditions. *Agriculture and Natural Resources*
- Punnarak, P., Jarayabhand, P. & A. Piumsomboon., 2017. Cultivation of harpacticoid copepods (families Harpacticidae and Laophontidae) under selected environmental conditions. *Agriculture and Natural Resources*, 51: 278-285.
<https://doi.org/10.1016/j.anres.2017.05.002>
- Ranade, M. R., 1957. Observations on the Resistance of *Tigriopus fulvus* to Changes in Temperature and Salinity. *Journal Mar. Biol. Assoc.* pp. 115-119.
- Ribeiro, C. B. A. & Souza-Santos, P. L., 2011. Mass culture and offspring production of marine harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis*. *Aquaculture* 321: 280-288.
- Rose, M. (1933). *Faune De France: Copépodes Pélagiques*. Fédération Française des Sociétés de Sciences Naturelles. Office Central De Faunitique.
- Schipp, G.R., Bosmans, J.M.P. & Marshall, A.J., 1999. A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture* 174, 81–88.
- Senicheva, M. I., 2005. Green alga *Dunaliella salina* in the natural conditions. *Ecologiya Morya* , 67 : 61-63. (in Russian).
- Shadrin, N. V. & Anufriieva, E. V., 2013. Dependence of *Arctodiaptomus salinus* (Calanoida, Copepoda) halotolerance on exoosmolytes: new data and a hypothesis. *J .Medit .Ecol .*, 12 : 21-26.
- Shiel, J. R., 1995. Guide to identification of rotifers, cladocerans and copepods from Australian inland waters. Co-operative research centre for freshwater ecology, identification guide No. 3. Taxonomy workshop, Murray-Darling freshwater research centre, Albury, 8-10 Feb. 1995.
- Souza-Santos, Lilia, P., Julia M. O. Pastor, Natasha G. Ferreira, Weruska M. Costa, Christiane M. V., Araujo-Castro and Paulo J.P. Santos, 2006. Developing the Harpacticoid Copepod *Tisbe biminiensis* Culture: Testing for Salinity Tolerance, Ration Levels, Presence of Sediment and Density Dependent Analyses. *Aquaculture Research* vol. 37, issue 15, Nov. 2006.

- Souza-Santos, L. P., Pastor, J.M.O., Ferreira, N.G., Costa, W.M., Araújo-Castro, C.M.V. & Santos, P. J. P., 2006. Developing the harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis* culture: testing for salinity tolerance, ration levels, presence of sediment and density dependent analyses. *Aquac. Res.* 37, 1516–1523
- Stoch, F., 2007. Copepods colonising Italian springs. In: Cantonati M., Bertuzzi E. & Spitale D., *The spring habitat: biota and sampling methods*. Museo Tridentino di Scienze Naturali, Trento: 217-235.
- Støttrup, J. G. & Norsker, N. H., 1997. Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture* 155, 231–247.
- Sun, B. & Fleeger, J.W., 1995. Sustained mass culture of *Amphiascoides atopus* a marine harpacticoid copepod in a recirculating system. *Aquaculture* 136, 313–321.
- Svetlichny, L., Hubareva, E. & Khanaychenko, A., 2012. *Calanipeda aquaedulcis* and *Arctodiaptomus salinus* are exceptionally euryhaline osmoconformers: evidence from mortality, oxygen consumption, and mass density patterns. *Mar .Ecol .Progr .Ser .*, 470 : 15-29, <http://dx.doi.org/10.3354/meps09907>.
- Takano, H., 1971. Breeding experiments of a marine littoral copepod *Tigriopus japonicus* Mori. *Bull. Tokai reg. Fish. Res. Lab.* 64: 71-80.
- Volkman-Rocco, B., 1972b. Species of *Tisbe* (Copepoda, Harpacticoida) from Beaufort, North Carolina. *Archivodi Oceanografia e Limnologia* 17: 223–258.
- Volkman, B., 1979b. A revision of the genus *Tisbe* (Copepoda, Harpacticoida). Part I. *Archivio di Oceanografia e Limnologia* 19: 121–284.
- Wardlaw, C. A., 1989. *Practical Statistics for Experimental Biologists*. JohnWiley&Sons. ISBN 0 417 90738 3, 290p.
- Χώτος, Γ., 2016. «Καλλιέργειες Πλαγκτού». Τ.Ε.Ι. Δυτικής Ελλάδας. DOI: 10.13140/RG.2.2.24664.03849
- Χώτος, Γ., 2016. Η μικροσκοπική υδρόβια ζωή στις υπεράλμυρες λεκάνες των αλυκών του Μεσολογίου. Έκδοση του Φορέα Διαχείρισης της Λιμνοθάλασσας Μεσολογίου.