

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΑΛΙΕΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

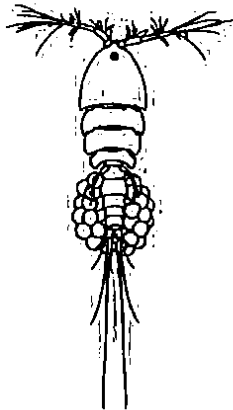
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
« ΒΙΩΣΙΜΗ ΑΛΙΕΙΑ - ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ »

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
της ΕΥΔΟΚΙΑΣ Π. ΚΟΥΡΕΛΕΑ

Βιολόγου

ΘΕΜΑ

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΗ ΑΥΞΗΣΗ ΣΕ  
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΑΡΠΑΚΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΚΩΠΗΠΟΔΩΝ

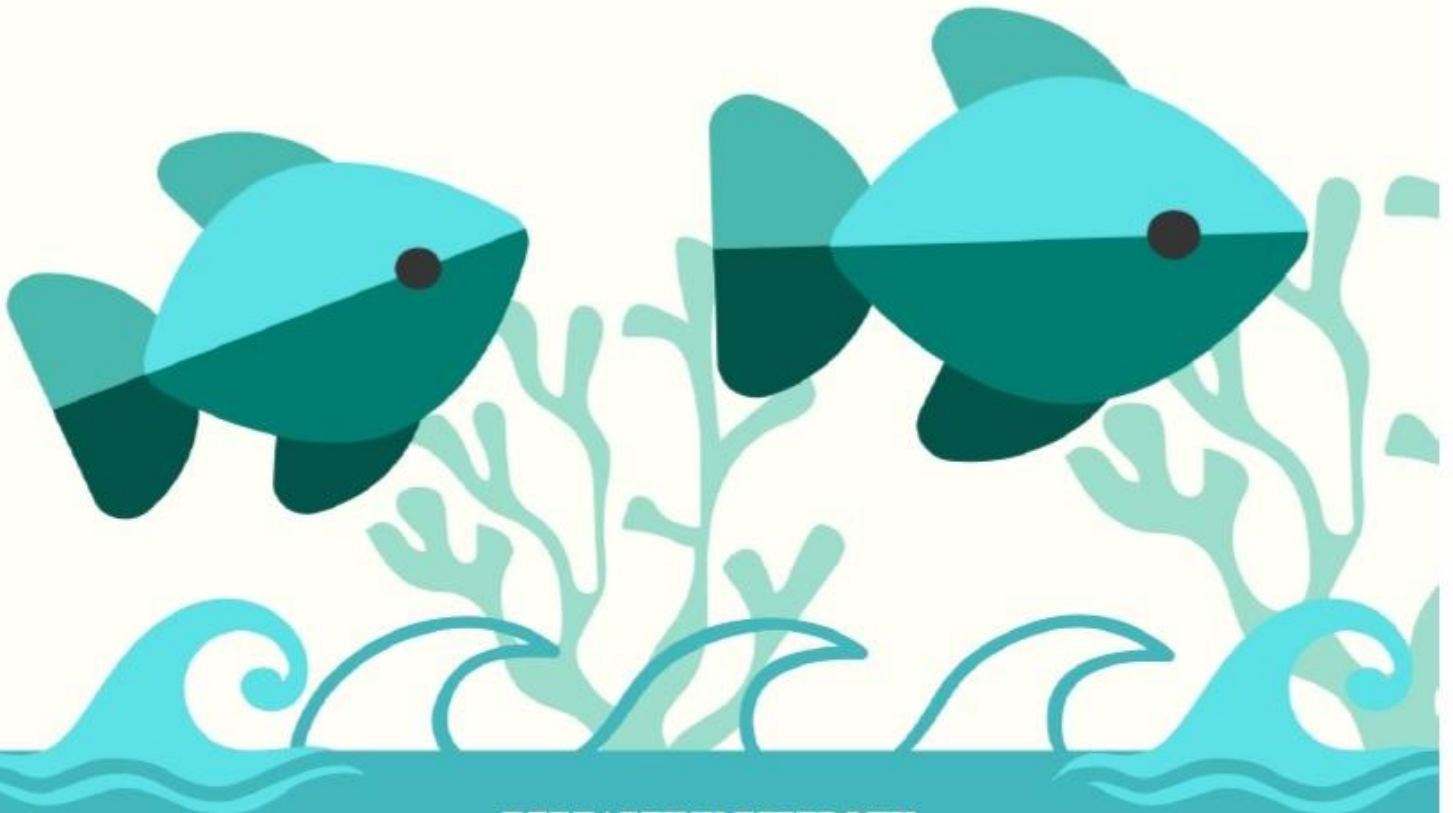
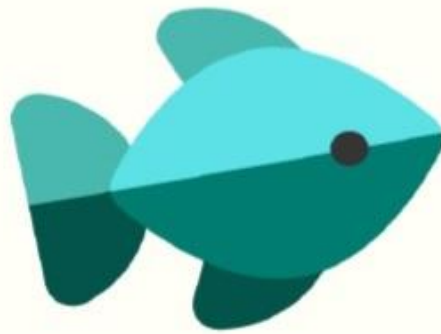


ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΧΩΤΟΣ

Μεσολόγι 2021

Η ΕΠΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΗ ΑΥΞΗΣΗ ΣΕ  
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΑΡΙΑΚΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΚΩΠΗΠΙΔΩΝ

ΕΥΔΟΚΙΑ Π. ΚΟΥΡΕΛΕΑ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ



ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΧΩΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)  
ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΟΥΤΟΠΟΥΛΟΣ (ΜΕΛΟΣ)  
ΑΛΕΞΙΟΣ ΡΑΜΦΟΣ (ΜΕΛΟΣ)

Μεσολόγγι 2021



## **Ευχαριστίες**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Γεώργιο Χώτο για την πολύτιμη καθοδήγηση και την αμέριστη βοήθεια σε όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της συγκεκριμένης εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης θερμά την κα Δέσποινα Αβραμίδου μέλος ΕΤΕΠ του εργαστηρίου Καλλιέργειας Πλαγκτού του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής, Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών του Πανεπιστημίου Πατρών για τη βοήθειά της στην πειραματική διαδικασία της παρούσας εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο εκπαιδευτικό προσωπικό και στους συμφοιτητές μου στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα που έκαναν πιο ενδιαφέρουσα την παραμονή μου τα δύο τελευταία χρόνια στην αιτωλοακαρνανική πρωτεύουσα.

## Περιεχόμενα

	Περίληψη.....	7
	Abstract .....	8
1.1	Κωπήποδα.....	9
1.2	Κωπήποδα και Υδατοκαλλιέργειες.....	12
1.3	Αρπακτικοειδή και Υδατοκαλλιέργειες.....	18
2.	Αλατότητα.....	19
2.1	Μέθοδοι υπολογισμού αλατότητας.....	20
3.	Ωσμωτική ρύθμιση στους υδρόβιους οργανισμούς.....	21
3.1	Ωσμωτική ρύθμιση στα κωπήποδα .....	21
3.2	Επιδράσεις των διακυμάνσεων της αλατότητας στα κωπήποδα.....	22
3.2.1	Αδράνεια.....	22
3.2.2	Οξειδωτική καταπόνηση .....	23
3.2.3	Ενεργειακή καταπόνηση.....	24
3.2.4	Αναβολικές και καταβολικές διεργασίες.....	25
3.2.5	Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat shock proteins).....	26
3.2.6	Κολυμβητική συμπεριφορά.....	27
3.2.7	Δράση ρυπογόνων παραγόντων.....	27
3.2.8	Ανάπτυξη και αναπαραγωγή.....	28
4.	Σκοπός της εργασίας .....	30
5	Υλικά και Μέθοδοι .....	31
5.1	Διαχείριση ζωντανού υλικού.....	31
5.2	Φυσικοχημικές συνθήκες.....	32
5.3	Παράμετροι μελέτης.....	32
5.4	Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	33
5.5	Μελετώμενα κωπήποδα .....	35
5.5.1	Γένος <i>Tigriopus</i> .....	35
5.5.2	Γένος <i>Tisbe</i> .....	37
5.6	Είδη μικροφυκών για τροφή των κωπήπόδων .....	38
5.6.1	<i>Rhodomonas salina</i> .....	39
5.6.2	<i>Dunaliella salina</i> .....	40
6.	Αποτελέσματα.....	42

<b>6.1</b>	<b><i>Tigriopus sp</i></b> .....	<b>42</b>
<b>6.2</b>	<b><i>Tisbe sp</i></b> .....	<b>53</b>
<b>7.</b>	<b>Συζήτηση</b> .....	<b>64</b>
	<b>Βιβλιογραφία</b> .....	<b>74</b>

## Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια έχει εντατικοποιηθεί η προσπάθεια για την εύρεση εναλλακτικών μορφών ζωντανής τροφής για τα προνυμφικά στάδια των ψαριών στις ιχθυοκαλλιεργητικές μονάδες, έναντι της *Artemia* και των Τροχοζώων που χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως. Μια αξιόλογη εναλλακτική πρόταση αποτελούν τα κωπήποδα της Τάξης Harpacticoida (Αρπακτικοειδή), μιας και στα ναυπλιακά τους στάδια μπορούν να στηρίξουν τις τροφικές απαιτήσεις των προνυμφών των ψαριών, ενώ παρουσιάζουν και άλλα πλεονεκτήματα όπως: μικρό μέγεθος, υψηλό αναπαραγωγικό δυναμικό, γρήγορη αύξηση πληθυσμού, διατροφική ευελιξία και ανεκτικότητα σε ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η θερμοκρασία και η αλατότητα.

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε η επίδραση της αλατότητας του θρεπτικού μέσου, στην ανάπτυξη και αναπαραγωγή δύο ειδών κωπήποδων των *Tigriopus sp.* και *Tisbe sp.* με πληθυσμούς προερχόμενους από τη λιμνοθάλασσα του Μεσολογίου, ώστε να γίνει εκτίμηση του κατάλληλου εύρους τιμών αλατότητας για τη μαζική παραγωγή των ειδών αυτών.

Από τα αποτελέσματα, προέκυψε ότι τόσο η ανάπτυξη όσο και η αναπαραγωγή των δύο υπό εξέταση κωπήποδων σε ελεγχόμενο σύστημα μη μαζικής παραγωγής, επηρεάστηκαν από τις διαφορετικές τιμές αλατότητας που χρησιμοποιήθηκαν στο μέσο ανάπτυξης. Η τιμή 32‰, ήταν η ευνοϊκότερη τιμή αλατότητας (από τις τέσσερις που συνολικά μελετήθηκαν) και για τα δύο είδη κωπήποδων. Διαφοροποιήσεις σε σχέση με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητικών εργασιών με κωπήποδα των ίδιων γενών, πιθανών να σχετίζονται τόσο με γενετικούς παράγοντες όσο και με το είδος τροφής που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα.

**Λέξεις κλειδιά:** Αρπακτικοειδή κωπήποδα, *Tisbe sp.*, *Tigriopus sp.*, αλατότητα

## **Abstract**

In recent years, efforts have been intensified to find live feed alternatives for the larval stages of fish in fish farms, instead of Artemia and planktonic Rotifers. Larval stages of Harpacticoida can meet the nutritional requirements of fish larvae, while presenting other advantages such as: small size, high reproductive potential, rapid population growth, nutritional tolerance and tolerance to a wide range of environmental factors.

In the present study the effect of salinity on the growth and reproduction of two species of copepods: *Tigriopus sp.* and *Tisbe sp.* (with populations originating from the lagoon of Messolonghi) was examined, in order to estimate the appropriate range of salinity values for the mass production of these species.

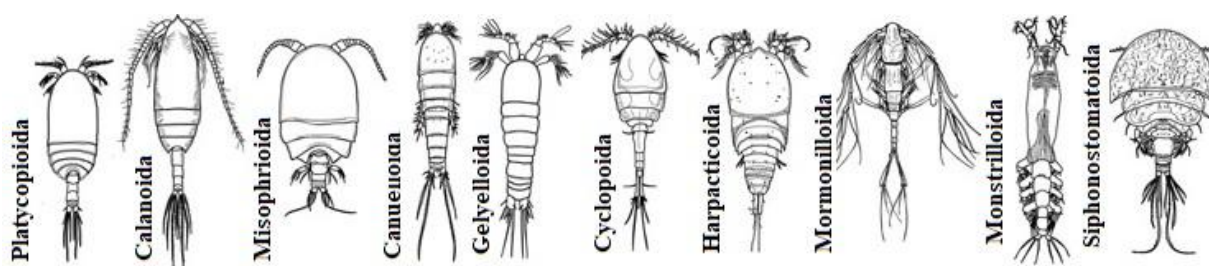
The results showed that both the growth and reproduction of the two species in a controlled non-mass production system were influenced by the different salinity values used in the growth medium. The value of 32 ‰, was the most favorable salinity value (out of the four studied in total) for both species of copepods. Differences in the results of other research work with copepods of the same genus, possibly related to both genetic factors and the type of food used in each experiment.

**Keywords:** Harpacticoida, *Tisbe sp.*, *Tigriopus sp.*, salinity



## 1.1 Κωπήποδα

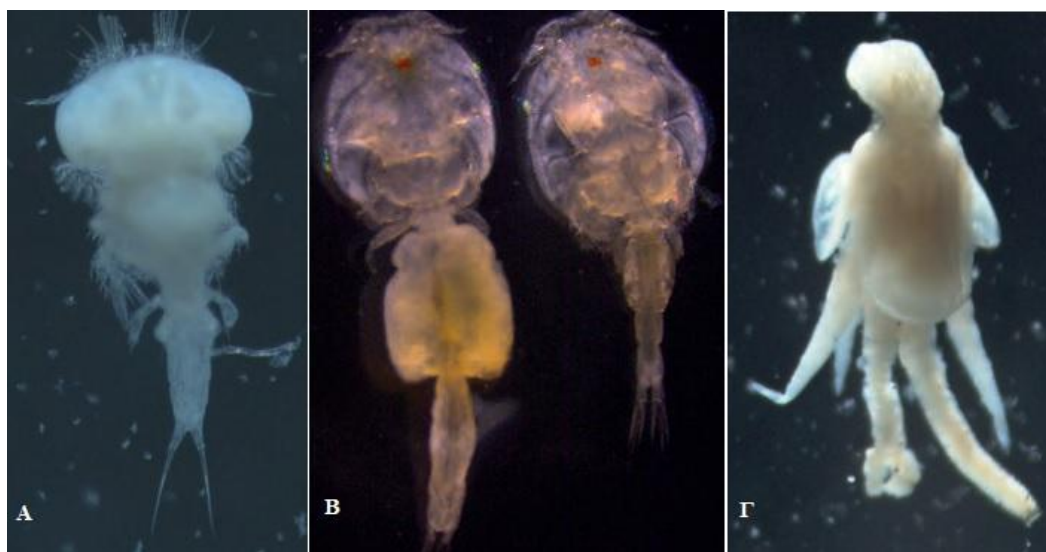
Τα κωπήποδα ανήκουν στο Φύλο (Phylum) (Συνομοταξία) **Arthropoda** (Αρθρόποδα), στο Υπο-Φύλο (Subphylum) (Υποσυνομοταξία) **Crustacea** (Καρκινοειδή), στην Υπερομοταξία (Superclass) **Multicrustacea** (Πολυκαρκινοειδή), στην Ομοταξία (Class) **Hexanauplia** (Εξιναύπλια) και στην Υφομοταξία (Subclass) **Copepoda** (**Κωπήποδα**). Μετά από ένα πλήθος φυλογενετικών αναθεωρήσεων που στηρίχθηκαν τόσο σε μοριακά όσο και σε μορφολογικά δεδομένα, σήμερα τα κωπήποδα κατατάσσονται στις ακόλουθες 10 Τάξεις: Calanoida, Cyclopoida, Harpacticoida, Canuelloida, Gelyelloida, Misophrioida, Monstrilloida, Mormonilloida, Platycorpioida και Siphonostomatoida, με τις τρεις πρώτες Τάξεις να αποτελούν τις πολυπληθέστερες (Khodami et al., 2017, Khodami et al., 2019) (Εικ.1.1).



**Εικόνα 1.1.** Μορφολογικά χαρακτηριστικά των τάξεων των κωπήποδων (Khodami et al., 2017)

Η Υφομοταξία των κωπήποδων, αποτελείται από υδρόβιους, ασπόνδυλους οργανισμούς και είναι μια από τις πιο διαδεδομένες ομάδες μεταζώων στη Γη αποτελώντας μαζί με τους νηματώδεις τους πολυπληθέστερους πολυκύτταρους οργανισμούς του πλανήτη (Humes, 1994). Είναι οι κυρίαρχοι οργανισμοί του μεσοζωοπλαγκτού και αποτελούν συνολικά πάνω από το 80% της βιομάζας του (Verity and Smetacek, 1996). Κατά την εξελικτική διαφοροποίησή τους, τα κωπήποδα κατάφεραν να αποικίσουν σχεδόν σε όλα τα βενθικά και πλαγκτονικά υδρόβια οικοσυστήματα, από τα μεγάλα βάθη των ωκεανών έως τις ρωγμές των παγετώνων των Ιμαλαΐων (Khodami et al., 2017). Εκτιμάται ότι το 75% περίπου των ειδών τους ζει στη θάλασσα και το 25% σε γλυκά νερά (Mauchline, 1998). Ορισμένα είδη είναι κοινά παράσιτα ψαριών και άλλων σπονδυλωτών, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις αποτελούν ενδιάμεσους ξενιστές παρασίτων ψαριών και πτηνών

(Monchenko, 2003) (Εικ.1.2). Υπάρχουν κωπήποδα που παρουσιάζουν ποικίλους βαθμούς συσχέτισης με ασπόνδυλα, όπως σφουγγάρια, εχινόδερμα ή μαλάκια, σε ορισμένα στάδια ή και σε όλο τον κύκλο της ζωής τους (Huys and Boxshall, 1991).



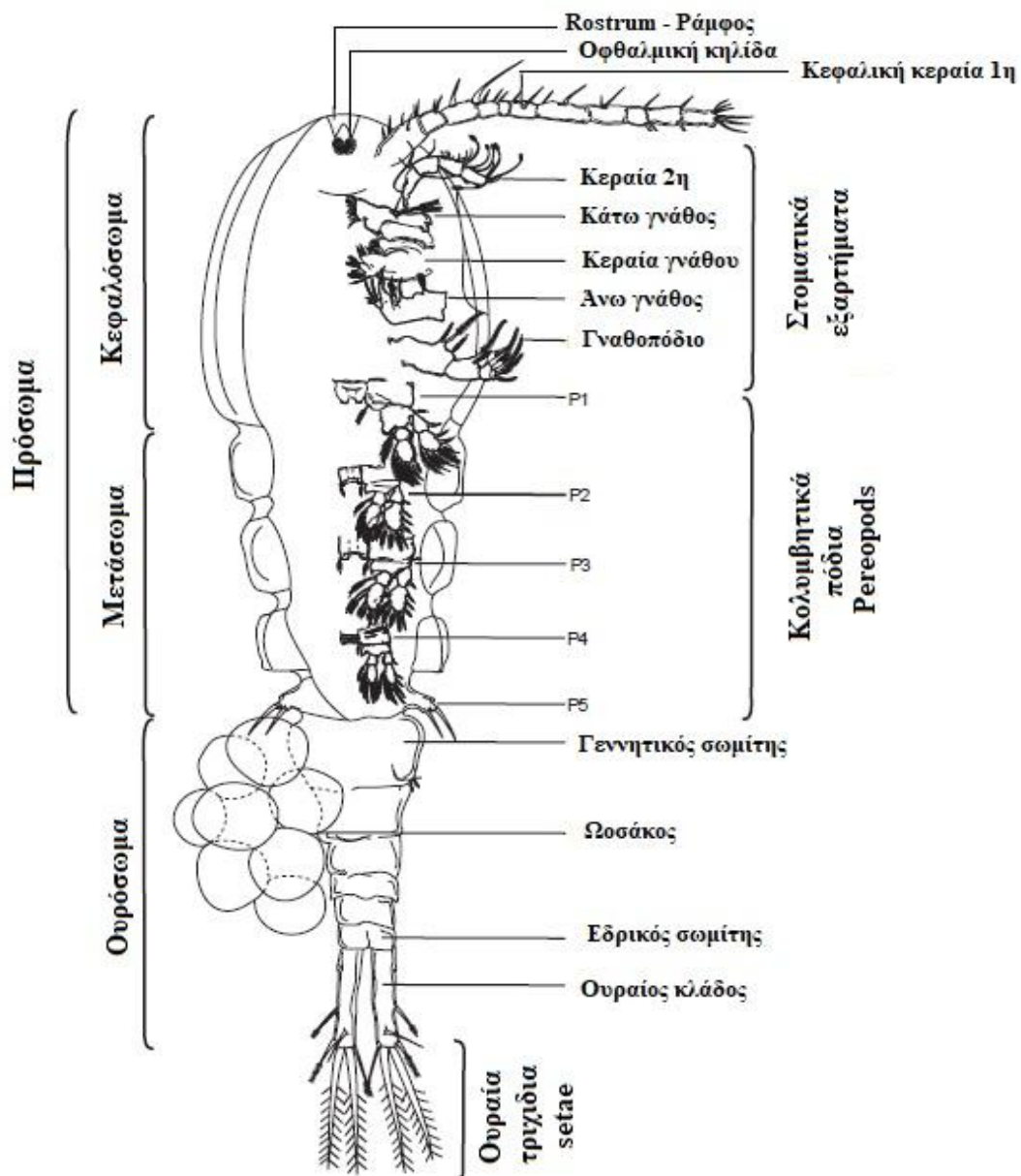
**Εικόνα 1.2** Παρασιτικά είδη κωπήποδων. A: *Nothobomolochus* sp. B: *Caligus* sp. Γ: *Lernanthropus* sp. (Santhosh et al., 2018)

Τα κωπήποδα είναι γονοχωριστικά και αναπαράγονται με αμφιγονικό τρόπο. Όπως σε όλα τα καρκινοειδή έτσι και στα κωπήποδα, από την εκκόλαψη των αβγών τους προκύπτει μια λαρβική (νυμφική) μορφή που ονομάζεται **ναύπλιος** στην οποία διακρίνονται κεφαλή και ουρά, όχι όμως θώρακας και κοιλιά τα οποία χαρακτηρίζουν το ενήλικο στάδιο και τα οποία προκύπτουν καθώς ο ναύπλιος μεγαλώνει κατά στάδια μέσω διαδοχικών εκδύσεων (συνήθως 6 ναυπλιακά στάδια), γίνεται **κωπηποδίτης** και μετά από άλλες 6 εκδύσεις γίνεται ενήλικο άτομο με ποικιλία μορφών ανάλογα με το είδος, αλλά με κοινή τη βασική δομή **κεφαλή-θώρακας-κοιλιά** (Χώτος, 2019) (Εικ. 1.3).

Τα κωπήποδα αποτελούν βασικά στοιχεία των υδρόβιων τροφικών πλεγμάτων μεταφέροντας οργανική ύλη από πρωτογενείς παραγωγούς σε ανώτερους καταναλωτές. Παράλληλα έχουν ρυθμιστικό ρόλο στη στρατολόγηση νέων ψαριών, μιας και τόσο τα αυγά των κωπήποδων όσο και οι ναύπλιοι και οι κωπηποδίτες, αποτελούν θήραμα τόσο για προνυμφικά στάδια ψαριών όσο και για ενήλικα ψάρια (Daly Yahia et al., 2004, Uye, 2011, Neffati et al., 2013).

Αξίζει να σημειωθεί ο σημαντικός ρόλος των κωπήποδων στον κύκλο των στοιχείων και ιδιαίτερα του άνθρακα. Λόγω του μικρού τους μεγέθους και του γρήγορου ρυθμού ανάπτυξης των πληθυσμών τους, τα κωπήποδα συμβάλλουν

σημαντικά στη δευτερογενή παραγωγικότητα καθώς και στην μεταφορά στο βυθό του οργανικού άνθρακα (carbon sink). Τα πλαγκτονικά κωπήποδα που τρέφονται νύχτα στα επιφανειακά νερά και μεταναστεύουν βαθύτερα κατά την ημέρα (στρατηγική αποφυγής θηρευτών που επιτυγχάνεται με τη μετατροπή των σωματικών ελαίων τους σε βαρύτερα λίπη), μέσω των απορριπτόμενων εξωσκελετών τους από τις εκδύσεις, καθώς και των περιττωμάτων τους, δημιουργούν τεράστιες ποσότητες νεκρής οργανικής ύλης, η οποία βυθιζόμενη μεταφέρει και εναποθέτει άνθρακα στα ιζήματα (Χώτος, 2019).



**Εικόνα 1.3.** Διαγραμματική απεικόνιση των σωματικών τμημάτων και εξαρτημάτων ενός θηλυκού κωπήποδου (όχι σε κλίμακα) (προσαρμογή Santhosh et al., 2018)

Η γνώση που έχει προκύψει από τις πολυάριθμες μελέτες σχετικά με τη φυσιολογία και το μεταβολισμό των κωπηπόδων τις τελευταίες δεκαετίες, αξιοποιείται στις ημέρες μας και τα κωπήποδα πλέον χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες για τη μελέτη της υποβάθμισης των οικοσυστημάτων και της ρύπανσης σε παράκτιες ευτροφικές περιοχές (Beaugrand, 2005, N'doua Etilé et al., 2017, Drira et al., 2018), ενώ λόγω της προσαρμοστικότητας που παρουσιάζουν στις μεταβαλλόμενες φυσικοχημικές συνθήκες του περιβάλλοντός τους, αποτελούν χρήσιμους οργανισμούς για δοκιμές τοξικότητας βαρέων μετάλλων και χημικών ρυπαντών (Kadiene et al., 2019) και παράλληλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως σχετικοί δείκτες σε οικοτοξικολογικές μελέτες, καθώς είναι ευαίσθητα σε μια σειρά οργανικών ενώσεων που αποτελούν βασικά συστατικά φυτοφαρμάκων και εντομοκτόνων (Forget et al., 1998). Επιπλέον από το Marten και τους συνεργάτες του (2000), έχει αναφερθεί ο σημαντικός ρόλος των κωπηπόδων στον έλεγχο της εξάπλωσης της ελονοσίας και του δάγκειου πυρετού, μέσω της θήρευσης από τα κωπήποδα των προνυμφών των κουνουπιών που μεταδίδουν τις συγκεκριμένες ασθένειες.

## 1.2 Κωπήποδα και Υδατοκαλλιέργειες

Τα Τροχόζωα (*Brachionus spp.*) και οι προνύμφες του Καρκινοειδούς *Artemia sp.* αποτελούν τις πλέον διαδεδομένες ζωντανές τροφές για μαζική παραγωγή προνυμφών στις ιχθυοκαλλιέργειες. Ωστόσο οι προνύμφες ορισμένων θαλασσινών ειδών ψαριών όπως π.χ των οικογενειών Lutjanidae και Serranidae δεν καλύπτονται διατροφικά από τις τροφές αυτές και απαιτείται χρήση άλλης ζωντανής τροφής που να καλύπτει το σύνολο των μεταβολικών αναγκών τους (Hussain et al., 2020). Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στους ναύπλιους διαφόρων ειδών κωπηπόδων, κυρίως των Τάξεων Calanoidea και Harpacticoida και μολονότι η χρήση τους σε εμπορικές ζωοτροφές για προνύμφες ψαριών είναι επί του παρόντος πολύ περιορισμένη, παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα (τα οποία αναφέρονται παρακάτω), αφήνοντας πολλές προοπτικές για ευρύτερη χρήση τους στο μέλλον (Alajmi and Zeng, 2015). Με τη χρήση των κωπηπόδων ως ζωντανή τροφή, αυξάνονται τα περιθώρια για την εισαγωγή νέων ειδών ψαριών στις ιχθυοκαλλιέργειες που μέχρι τώρα δεν ήταν εφικτό να καλλιεργηθούν, μιας και οι εμπορικά διαθέσιμες τροφές δεν ήταν δυνατό ακόμη και μετά από εμπλουτισμούς, να τα καλύψουν τροφικά (Baensch and Tamaru, 2009). Πολλά είδη κωπηπόδων παρουσιάζουν μεγάλη ανοχή στις διακυμάνσεις της αλατότητας, της θερμοκρασίας

και άλλων φυσικοχημικών περιβαλλοντικών παραγόντων. Ωστόσο, η παραγωγικότητά τους μπορεί να ποικίλλει σημαντικά σε διαφορετικές τιμές των παραγόντων αυτών. Κατά τη μαζική παραγωγή ενός είδους για τη χρήση του ως ζωντανή τροφή στην υδατοκαλλιέργεια, είναι σημαντικό να εξασφαλιστούν οι βέλτιστες συνθήκες ώστε να εξασφαλιστεί ή μέγιστη δυνατή παραγωγικότητα (Støttrup, 2000).

Στη συνέχεια παρουσιάζονται ορισμένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα για τη χρήση των κωπηπόδων ως τροφή στις ιχθυοκαλλιέργειες:

**i) Φυσικό θήραμα:** Οι ναύπλιοι των κωπηπόδων αποτελούν απαραίτητο διατροφικό στοιχείο των προνυμφικών σταδίων των θαλάσσιων ψαριών. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι αποτελούν πάνω από το 50% της σύστασης του στομαχικού περιεχομένου τους, σύμφωνα με ερευνητικές εργασίες που έχουν πραγματοποιηθεί για πληθυσμούς διαφόρων ειδών θαλασσιών ψαριών (Støttrup, 2000).

**ii) Προσέλκυση προνυμφών:** Οι ναύπλιοι των κωπηπόδων είναι ένα ελκυστικό θήραμα για τις προνύμφες των ψαριών, καθώς η ακανόνιστη κολυμβητική τους κίνηση «ζιγκ-ζαγκ», παρέχει ένα οπτικό διεγερτικό στην αναζήτηση τροφής από τις προνύμφες (Barroso et al., 2013).

**iii) Διατροφική ισορροπία:** Τα κωπήποδα είναι τροφή υψηλής θερμιδικής αξίας (Sun and Fleeger, 1995) και ιδιαίτερα οι Τάξεις Calanoida και Harpacticoida θεωρούνται ως το πιο ουσιαστικό φυσικό θήραμα για τις προνύμφες των θαλάσσιων ψαριών, όχι μόνο επειδή περιέχουν θρεπτικά συστατικά που υποστηρίζουν τις διατροφικές απαιτήσεις για την ανάπτυξη των προνυμφών, αλλά και γιατί προμηθεύουν τις προνύμφες με τα απαραίτητα δομικά στοιχεία (κυρίως αμινοξέα) για την βέλτιστη παραγωγή πεπτικών ένζυμων (Olivotto et al., 2011). Επιπλέον η θρεπτική σύνθεση ορισμένων κωπηπόδων, κυρίως η περιεκτικότητά τους σε ελεύθερα αμινοξέα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Highly Unsaturated Fatty Acids: H.U.F.A), είναι κατάλληλη για την ανάπτυξη των προνυμφών των ψαριών και δεν απαιτείται εμπλουτισμός, όπως στις περιπτώσεις που για τροφή χρησιμοποιούνται Τροχόζωα ή *Artemia* (Hill et al., 2020). Η συγκέντρωση των HUFA's στους ιστούς των κωπηπόδων καθορίζεται από τη διατροφή τους. Τα απαραίτητα HUFA's που πρέπει να λαμβάνονται από τις προνύμφες των ψαριών είναι το DHA (εικοσιδυοεξαενοϊκό οξύ), το ERA (εικοσαπενταενοϊκό οξύ) και το ARA (αραχιδονικό οξύ) μιας και από μόνες τους δεν μπορούν να συνθέσουν τις ποσότητες που απαιτούνται για να καλύψουν τις μεταβολικές τους ανάγκες (η ανεπάρκειά τους

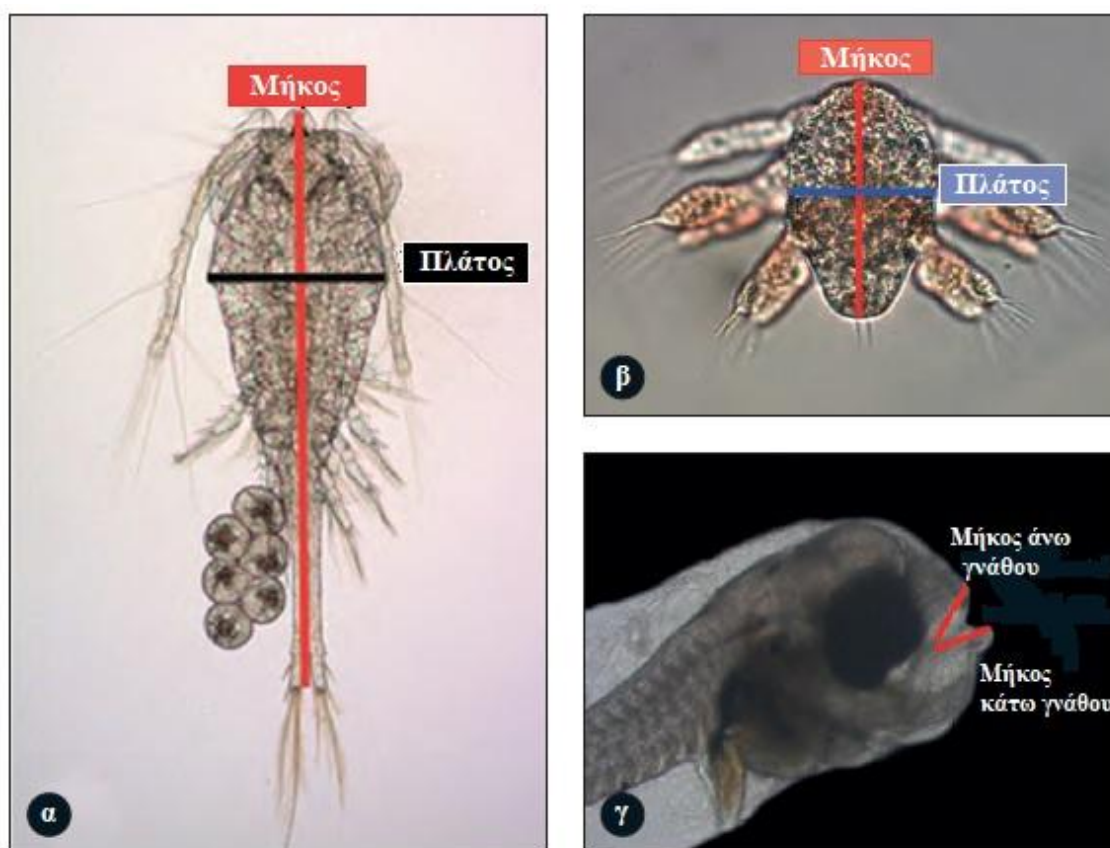
οδηγεί σε καθυστερημένη ανάπτυξη ψαριών, υψηλά ποσοστά θνησιμότητας και μειωμένη ικανότητα αντιμετώπισης του στρες) (Izquierdo, 1996). Σύμφωνα με τον Siqueru και τους συνεργάτες του (2017), σε καλλιέργειες κωπηπόδων του είδους *Pseudodiaptomus hessei*, ακόμη και στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε μόνο ένα είδος φύκου (*Isochrysis galbana*) για τροφή, ο λόγος DHA/EPA ήταν 2/1. Γενικά οι αυξημένες τιμές του λόγου DHA/EPA ευνοούν την επιβίωση και την ανάπτυξη των προνυμφών των θαλάσσιων ψαριών και σύμφωνα με τον Sargent και τους συνεργάτες του (1997) η ιδανική τιμή του λόγου για τις προνύμφες είναι 2/1.

Πέραν όμως των λιπαρών οξέων, στα κωπήποδα απαντώνται στις απαιτούμενες συγκεντρώσεις και άλλα συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξη των προνυμφών των ψαριών. Περιέχουν υδατοδιαλυτές βιταμίνες όπως η C και λιποδιαλυτές όπως η E, ενώ στους ιστούς τους απαντάται και το τερπένιο ασταξανθίνη που αποτελεί φυσικό αντιοξειδωτικό και προστατεύει τα HUFA's από υπεροξειδωση. Σύμφωνα με τους Alajmi και Zeng (2013) στις προνύμφες των κωπηπόδων, η συγκέντρωση του Ιωδίου είναι σε ορισμένες περιπτώσεις είναι μέχρι και 700 φορές υψηλότερη σε σχέση με αυτή στις προνύμφες της *Artemia*. Το Ιώδιο αποτελεί απαραίτητο ιχνοστοιχείο για την παραγωγή θυρεοειδικών ορμονών που σχετίζονται με την ομαλή μεταμόρφωση των ψαριών κατά την ανάπτυξή τους.

Επιπλέον τα κωπήποδα μπορούν να καλύψουν ποιοτικά και ποσοτικά τις απαιτήσεις των προνυμφών των ψαριών σε ελεύθερα αμινοξέα και σε ορισμένες περιπτώσεις σύμφωνα με τους Lindley et al. (2011) σε ναυπλίους κωπηπόδων απαντώνται υπερδιπλάσιες ποσότητες σε σύγκριση με αυτές που απαντώνται σε άτομα *Artemia* των ίδιων αναπτυξιακών σταδίων.

**iv) Μέγεθος:** Οι προνύμφες των ψαριών καταπίνουν ολόκληρα τα θηράματα τους, καθώς τα δόντια εμφανίζονται σε επόμενα αναπτυξιακά στάδια (Rønnestad et al., 2013) και για το λόγο αυτό, τα ζωντανά θηράματα πρέπει να έχουν το κατάλληλο μέγεθος (25-50% του μεγέθους του ανοίγματος του στόματός τους (Εικ.1.4)) (Olivotto et al., 2017a) για να αποφευχθεί η καταπόνηση του αναπτυσσόμενου οισοφάγου τους. Σε αντίθετη περίπτωση εμφανίζονται υψηλά ποσοστά θνησιμότητας στις προνύμφες των ψαριών, αφού δεν μπορούν να καταπιούν το θήραμα τους (Yúfera and Darias, 2007). Το μέγεθος των προνυμφών της *Artemia* τις καθιστά σε ορισμένες περιπτώσεις ακατάλληλες για τροφή των πρώτων προνυμφικών σταδίων θαλάσσιων ψαριών μιας και συχνά είναι αρκετά μεγάλες. Το ίδιο μειονέκτημα αν και λιγότερο συχνά σε σχέση με την *Artemia* εμφανίζουν και άτομα Τροχοζώων όταν

προορίζονται για τροφή σε προνύμφες ορισμένων ειδών πελαγικών ψαριών (Olivotto et al., 2017a). Αντίθετα το ιδιαίτερα μικρό μέγεθος των ναυπλίων ορισμένων ειδών κωπηπόδων με μήκος της τάξεως των 50 μm, αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα για τη χρήση τους ως τροφή σε προνύμφες ακόμη και μικρών πελαγικών ψαριών (Burgess and Callan, 2018).



**Εικόνα 1.4.** α) μήκος και πλάτος ενήλικου κωπηπόδου β) μήκος και πλάτος ναυπλίου γ) διαστάσεις στόματος προνύμφης ψαριού (προσαρμογή Santhosh et al., 2018)

**ν) Αποθήκευση αυγών:** Σύμφωνα με τους Marcus and Murray (2001) η μαζική παραγωγή, αποθήκευση και μεταφορά αυγών κωπηπόδων σε διάπαυση, θα μπορούσε να αποτελέσει μια εναλλακτική μορφή τροφής έναντι της *Artemia* και των Τροχοζώων, για προνύμφες ιχθυοκαλλιεργειών. Ορισμένα είδη κωπηπόδων της Τάξεως Calanoida (*Acartia tonsa*, *Centropages hamatus*, *Labidocera aestiva*) έχουν την ικανότητα να παράγουν αυγά διάπαυσης που μπορούν να αποθηκευτούν (Støttrup, 2006, Ajiboye et al., 2010). Οι ταχέως μεταβαλλόμενες αβιοτικές συνθήκες θέτουν τα αυγά σε κατάσταση ηρεμίας/διάπαυσης, η οποία μπορεί να αντιστραφεί και να ξεκινήσει η εκκόλαψη, όταν ξαναγίνουν ευνοϊκές οι συνθήκες (Jørgensen et al.,

2019). Απαιτούνται όμως επιπλέον έρευνες για να εντοπιστούν τα είδη των κωπηπόδων που μπορούν αφενός να καλύψουν τις διατροφικές ανάγκες των προνυμφών των ψαριών και αφετέρου μπορούν να παράγουν αυγά κατάλληλα προς αποθήκευση.

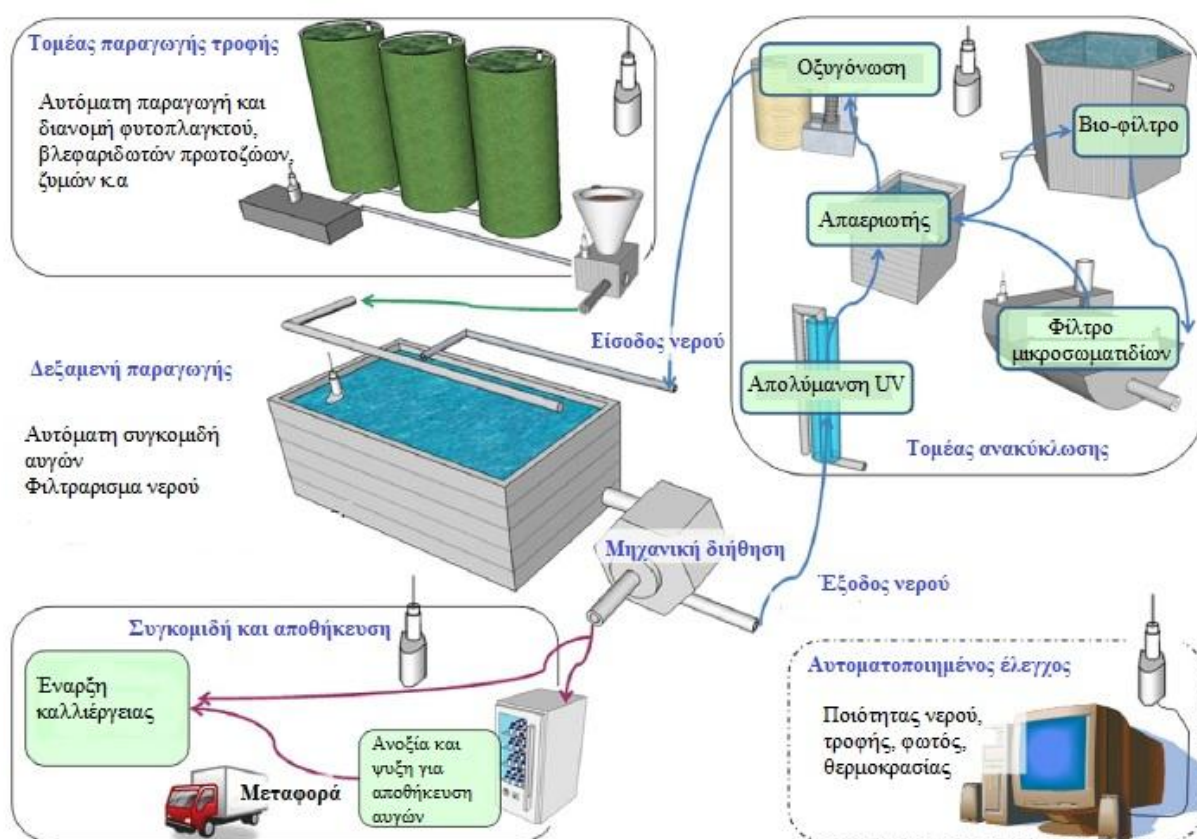


**Εικόνα 1.5.** Μαζική παραγωγή κωπηπόδων σε εργαστηριακές συνθήκες (Santhosh et al., 2018)

Πέραν όμως των χαρακτηριστικών των κωπηπόδων που τα καθιστούν κατάλληλα για χρήση ως ζωντανή τροφή για τις προνύμφες των ιχθυοκαλλιεργειών υπάρχουν και ορισμένα επί του παρόντος **μειονεκτήματα** που πρέπει να αναφερθούν. Επειδή μέχρι σήμερα μόνο για λίγα είδη έχει επιτευχθεί αποθήκευση αυγών, απαιτείται η χρήση ζωντανών ναυπλίων κωπηπόδων με αποτέλεσμα να αυξάνει το κόστος και η δυσκολία μεταφοράς. Επιπλέον σε πολλά είδη κωπηπόδων της Τάξεως Calanoida οι μεγάλες πυκνότητες στις καλλιέργειες τους δημιουργούν προβλήματα βιωσιμότητας και για το λόγο αυτό απαιτείται μεγάλος όγκος νερού (Ajiboye et al., 2010). Για να



αντικαταστήσουν οι παραγωγοί των ιχθυοκαλλιεργειών τις κοινές τροφές (Τροχόζωα και Artemia) που εδώ και δεκαετίες έχουν καθιερωθεί σε παγκόσμιο επίπεδο, θα πρέπει να υπάρξουν ισχυρά κίνητρα μιας και μεταξύ των άλλων θα χρειαστεί να εκσυγχρονιστούν κάποιες από τις δομές των παραγωγικών μονάδων τους και να υπάρξει εκ νέου εκπαίδευση του προσωπικού για την αποτελεσματική χρήση της εναλλακτικής μορφής τροφής. Απαιτούνται λοιπόν μελέτες που θα οδηγήσουν σε μαζική παραγωγή αυγών ή ναυπλίων κωπηπόδων με διατροφική σύνθεση πληρέστερη για τα ψάρια σε σχέση με την Artemia και τα Τροχόζωα και με κόστος παραγωγής και μεταφοράς μικρότερο από το αντίστοιχο των παραπάνω ειδών, ώστε στο άμεσο μέλλον να αυξηθεί σημαντικά η χρήση τους ως τροφή στις προνύμφες των ψαριών των ιχθυοκαλλιεργειών.



**Εικόνα 1.6.** Πρόταση - σχηματική απεικόνιση δομής μεγάλης κλίμακας για μαζική παραγωγή κωπηπόδων. Τα βενθικά είδη παράγονται σε 3D δομές του πυθμένα. Η συγκομιδή ναυπλίων/ αυγών για χρήση ή αποθήκευση μειώνει τον κίνδυνο κανιβαλισμού. Οι διαδικασίες ανακυκλοφορίας παρέχουν νερό υψηλής ποιότητας στο οποίο προστίθεται αυτόματα η τροφοδοσία. Ένα σύστημα παρακολούθησης εξοπλισμένο με πολλούς αισθητήρες παρακολουθεί τις παραλλαγές των ζωτικών παραμέτρων στις καλλιέργειες, μειώνοντας στο ελάχιστο το εργατικό δυναμικό κατά τη διάρκεια της παραγωγής (προσαρμογή από Drillet et al., 2011)

### 1.3 Αρπακτικοειδή και Υδατοκαλλιέργειες

Τα κωπήποδα της Τάξης Harpacticoida (Αρπακτικοειδή), στα ναυπλιακά τους στάδια έχουν μικρό μέγεθος, υψηλό αναπαραγωγικό δυναμικό, γρήγορη αύξηση πληθυσμού και είναι διατροφικά ευέλικτα και ανεκτικά σε ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η θερμοκρασία και η αλατότητα (Sun and Fleeger, 1995, Stottrup and Norsker, 1997), με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται πλεονεκτικά ως τροφή σε προνύμφες ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας. Συγκριτικά με άλλες τάξεις κωπηπόδων όπως τα καλανοειδή, εμφανίζονται πιο πλεονεκτικά για μαζική παραγωγή μιας και μπορούν να επιτευχθούν βιώσιμες καλλιέργειες τους σε μεγάλες πυκνότητες (Camus and Zeng, 2008). Παράλληλα, τα αρπακτικοειδή βοηθούν στη διατήρηση των δεξαμενών εκτροφής των προνυμφών των ψαριών καθαρίζονται τες, καθώς καταναλώνουν τα φύκη και τα τροφικά υπολείμματα που προσκολλώνται στα τοιχώματά τους (Delbare et al., 1996).

Η μετατροπή οργανικών μορίων που προκύπτουν από τον καταβολισμό της τροφής των Αρπακτικοειδών σε απαραίτητα λιπαρά οξέα (EFAs) τα καθιστά πιο πλήρη πηγή θρεπτικών συστατικών για τις προνύμφες των ψαριών σε σχέση με τις κοινές τροφές που χρησιμοποιούνται σήμερα όπως π.χ η *Artemia* ή τα τροχόζωα (Nanton and Castell, 1998). Σύμφωνα με τους Camus και Zeng (2008) η περιεκτικότητα των ιστών τους σε χημικές ενώσεις καθορίζεται κύρια από τα είδη των μικροφυκών που αποτελούν την τροφή τους. Η ικανότητα των αρπακτικοειδών κωπηπόδων για βιοσύνθεση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακριάς ανθρακικής αλυσίδας από κορεσμένα λιπαρά οξέα, τους δίνει την προσαρμοστική ικανότητα να ανταπεξέρχονται σε δυσμενείς καταστάσεις που σχετίζονται είτε με τη μειωμένη διαθεσιμότητα θρεπτικών μορίων στο περιβάλλον τους, είτε με σταδιακές περιβαλλοντικές αλλαγές λόγω κλιματικών μεταβολών (Werbrouck et al., 2017). Τα Αρπακτικοειδή, ζώντας συνήθως ως βενθικοί οργανισμοί σε παράκτια ενδιαιτήματα, τρέφονται κυρίως με φύκη και οργανικά σωματίδια (Punparak et al., 2017). Ανάλογα με το είδος αλλά και τη διαθεσιμότητα της τροφής, τα είδη των αρπακτικοειδών απαντώνται ως επιβενθικοί, ενδοβενθικοί ή μεσοβενθικοί οργανισμοί.

## 2. Αλατότητα

Ο όρος «αλατότητα» του θαλασσινού νερού, θα έπρεπε να καθορίζει την ολική μάζα των διαλυμένων αλάτων ανά χιλιόγραμμο νερού. Η μάζα όμως αυτή είναι δύσκολο να προσδιοριστεί γιατί το ξηρό υπόλοιπο που παίρνουμε με εξάτμιση του νερού, είναι εξαιρετικά υγροσκοπικό και αν θερμανθεί για την απομάκρυνση της συγκρατούμενης υγρασίας, έχουμε παράλληλη διάσπαση των ανθρακικών αλάτων και υπό ορισμένες συνθήκες των αλάτων μαγνησίου. Οι M. Knudsen, S.P.L. Soresen και C. Forch (Knudsen, 1902) πραγματοποίησαν αποξήρανση δείγματος θαλασσινού νερού σε ατμόσφαιρα χλωρίου στους 480°C μέχρι ορισμένου σταθερού βάρους. Κατά την διεργασία αυτή οι οργανικές ουσίες αποσυντίθενται, οι ανθρακικές ουσίες μετατρέπονται σε οξείδια, οι βρωμιούχες και ιωδιούχες σε χλωριούχες. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις οι παραπάνω ερευνητές κατέληξαν στον ακόλουθο αρκετά συμβατικό ορισμό που είναι και σήμερα αποδεκτός:

*«Αλατότητα είναι η μάζα σε γραμμάρια των στερεών ουσιών που περιέχονται σε ένα χιλιόγραμμο θαλασσινού νερού, αφού μετατραπούν οι ανθρακικές ουσίες σε οξείδια, αφού αντικατασταθούν οι βρωμιούχες και ιωδιούχες ουσίες με το ισοδύναμό τους σε χλωριούχες ουσίες και αφού οξειδωθούν οι οργανικές ουσίες».*

Πρακτικά ο πιο αξιόπιστος τρόπος για τον προσδιορισμό της «απόλυτης αλατότητας» του νερού, είναι η πλήρης χημική ανάλυση, διαδικασία όμως ιδιαίτερα χρονοβόρα. Έτσι στην πράξη η αλατότητα προσδιορίζεται με έμμεσες μεθόδους οι οποίες βασίζονται κυρίως στις φυσικές ιδιότητες του νερού, όπως π.χ η αγωγιμότητα, η πυκνότητα κτλ., με αποτέλεσμα η αριθμητική τιμή της να είναι συνήθως μικρότερη από την τιμή των ολικών διαλυμένων στερεών. Η αλατότητα εκφράζεται σε γραμμάρια ανά χιλιόγραμμο (g/kg) ή ως ποσοστό επί τοις χιλίοις. Παράλληλα σε ορισμένες αναφορές χρησιμοποιείται από τους ερευνητές και ο όρος ωσμωτικότητα (εκφράζεται σε mosmol/kg). Η τιμή των 3,4 ‰ είναι ισοδύναμη με 100 mosmol/kg (29,41mosmol/kg ανά 1 ‰).

Συναφής όρος με την αλατότητα που εξαρτάται κυρίως από την περιεκτικότητα του νερού σε χλωριούχα, ιωδιούχα και βρωμιούχα είναι η χλωριότητα που ορίζεται ως η περιεκτικότητα του δείγματος σε χλωριούχα, ιωδιούχα και βρωμιούχα σε γραμμάρια που περιέχεται σε ένα κιλό νερού, αν υποτεθεί ότι βρώμιο και χλώριο έχουν αντικατασταθεί από χλώριο.

## 2.1 Μέθοδοι υπολογισμού αλατότητας

**A) Μέθοδος ηλεκτρικής αγωγιμότητας.** Κατά τη μέθοδο αυτή, μετράται με αγωγιμόμετρο η ηλεκτρική αγωγιμότητα του δείγματος και συσχετίζεται με την αλατότητα. Η μέθοδος δεν χαρακτηρίζεται από μεγάλη ακρίβεια γιατί αντιστοιχεί μόνο στην αλατότητα που προέρχεται από ιονικά διαλύματα.

**B) Υδρομερική μέθοδος.** Η μέθοδος κατά την οποία μετράται η πυκνότητα του νερού με πυκνόμετρο (π.χ διαθλασίμετρο) και στη συνέχεια προσδιορίζεται η αλατότητα με τη βοήθεια πινάκων συσχέτισης των δύο παραμέτρων. Αποτελεί μέθοδο μεγαλύτερης ακρίβειας σε σχέση με τη μέθοδο της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στην οποία οι συσχετισμοί πραγματοποιούνται με βάση την παραδοχή ότι η εκατοστιαία αναλογία των χημικών στοιχείων στο νερό δεν μεταβάλλεται.

**Γ) Μέθοδος νιτρικού αργύρου.** Η μέθοδος κατά την οποία προσδιορίζεται η συγκέντρωση των ιόντων χλωρίου και με τη χρήση πινάκων υπολογίζεται η αλατότητα (Μέθοδος Mohr) (Ζανάκη, 2001).

Ο όρος αλατότητα θα χρησιμοποιηθεί στην παρούσα εργασία στη γενικώς αποδεκτή μορφή του για τη μέση συγκέντρωση αλατιού σε γραμμάρια ανά χιλιόγραμμο νερού (με συμβολισμό: ‰).



**Εικόνα 2.1.** Τύπος φορητού διαθλασίμετρου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ακρίβειας 0,1%.

### **3. Ωσμωτική ρύθμιση στους υδρόβιους οργανισμούς**

Για τη επιβίωση και την ομαλή ανάπτυξη των υδρόβιων οργανισμών, όταν η συγκέντρωση των ιόντων των υδατοδιαλυτών αλάτων μεταξύ του ενδοκυτταρικού και του εξωκυτταρικού τους περιβάλλοντος διαφέρει σημαντικά, πραγματοποιείται ωσμωρύθμιση, είτε παθητικά με μηχανισμούς διάχυσης, είτε ενεργητικά μέσω μηχανισμών που διαφοροποιούνται με βάση το είδος των οργανισμών. Τα είδη των υδρόβιων οργανισμών που δεν διαθέτουν ενεργητικούς μηχανισμούς ωσμωρύθμισης λειτουργούν ως ωσμωσυμμορφωτές (osmotic conformers) και τα σωματικά υγρά τους είναι ισοτονικά με το περιβάλλον τους. Τα είδη των υδρόβιων οργανισμών που διαθέτουν ενεργητικούς μηχανισμούς ωσμωρύθμισης λειτουργούν ως ωσμωρυθμιστές (osmotic regulators), διατηρώντας ωσμωτικές διαβαθμίσεις μεταξύ των σωματικών υγρών τους και του εξωτερικού τους περιβάλλοντος.

#### **3.1 Ωσμωτική ρύθμιση στα κωπήποδα**

Σε πολλά ασπόνδυλα συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων Τάξεων κωπηπόδων, η ωσμωτική ρύθμιση πραγματοποιείται σε επίπεδο κυττάρων. Οι φυσιολογικοί μηχανισμοί για τη ρύθμιση των ενδοκυτταρικών ιοντικών συγκεντρώσεων περιλαμβάνουν τη μεταβολή της συγκέντρωσης ανόργανων και οργανικών οσμωλυτικών ενώσεων, όπως η δεξαμενή των μη απαραίτητων ελεύθερων αμινοξέων (FAA) (Goolish and Burton 1989, Rivera-Ingraham et al., 2016). Η δεξαμενή FAA μπορεί να παρουσιάσει αύξηση συγκέντρωσης μέσω βιοσύνθεσης αμινοξέων (Burton, 1986) ή μείωση συγκέντρωσης, είτε μέσω αύξησης της απέκκρισης των αμινοξέων (Farmer and Reeve, 1978), είτε μέσω οξείδωσης αμινοξέων (Goolish and Burton, 1989), καθώς και μέσω σύνθεσης πρωτεϊνών (Pierce, 1982) συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών του στρες - αλατότητας (Gonzalez and Bradley, 1994). Ο ρόλος των πρωτεϊνών του στρες - αλατότητας είναι η ρύθμιση της ροής άλλων οσμωλυτικών ενώσεων, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις λειτουργούν ως τσαπερόνια (συννοδά πρωτεϊνικά μόρια) προστατεύοντας άλλες πρωτεΐνες από μετουσίωση όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος είναι δυσμενείς (π.χ ακραίες τιμές αλατότητας) (Gonzalez and Bradley, 1994). Η μελέτη της De Biasse και των συνεργατών της (2018) για την επίδραση υπερωσμωτικού στρες σε πληθυσμούς του *Tigriopus californicus*, κατέδειξε ότι πολλοί γενετικοί τόποι συμμετέχουν στη ρύθμιση της ωσμωτικότητας των κωπηπόδων αυτών. Υπό τις συνθήκες του στρες ενεργοποιείται η παραγωγή πρωτεϊνών η/και πεπτιδίων που συμβάλλουν μέσω δομικών και

λειτουργικών μετατροπών στην αύξηση της διαμεμβρανικής μεταφοράς ελεύθερων αμινοξέων.

### **3.2 Επιδράσεις των διακυμάνσεων της αλατότητας στα κωπήποδα**

Έχουν αναφερθεί τουλάχιστο 26 είδη κωπήπόδων που μπορούν να επιβιώσουν σε περιβάλλοντα με αλατότητες πάνω από 100‰ ενώ 12 από αυτά έχουν βρεθεί σε περιβάλλοντα με αλατότητες που ξεπερνούν τα 200‰. Τα είδη *Actodiptomus salinus* και *Cletocamptus retrogressus* είναι τα πλέον αλατοανθεκτικά είδη κωπήπόδων που έχουν καταγραφεί μέχρι σήμερα μιας και έχουν συλλεχθεί από περιβάλλοντα με αλατότητες 300‰ και 360‰ αντίστοιχα (Anufriieva, 2015).

Σύμφωνα με τον Kinne (1971) η αλατότητα του περιβάλλοντος επηρεάζει τα ασπόνδυλα τόσο σε δομικό όσο και σε λειτουργικό επίπεδο, μέσω μεταβολών που πραγματοποιούνται στις σχετικές αναλογίες των ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών διαλυμάτων, στους συντελεστές απορρόφησης και κορεσμού των διαλυμένων αερίων καθώς και στο ιξώδες των σωματικών υγρών. Τα είδη που απαρτίζουν των ζωοπλαγκτόν επηρεάζονται άμεσα από τις ποιοτικές μεταβολές του νερού, κυρίως λόγω του μικρού μεγέθους τους και της μικρής διάρκειας του κύκλου της ζωής τους. Οι μεταβολές της αλατότητας επηρεάζουν τις οικολογικές διεργασίες στα υδάτινα οικοσυστήματα, συμπεριλαμβανομένης της αφθονίας και της ποικιλομορφίας του ζωοπλαγκτού. Μπορούν άμεσα και έμμεσα να επηρεάσουν την αφθονία του ζωοπλαγκτού, οδηγώντας στην εξαφάνιση ορισμένων ειδών και στην εμφάνιση άλλων. Επιπλέον οι διακυμάνσεις της αλατότητας μπορεί έμμεσα να προκαλέσουν ή να συμβάλουν στην έλλειψη τροφής, επηρεάζοντας έτσι την αφθονία του ζωοπλαγκτού. Πολλοί οργανισμοί μεταναστεύουν για να αποφύγουν την υψηλή ή χαμηλή αλατότητα. (Perumal et al., 2009). Για όσους δεν υπάρχει η δυνατότητα αυτή, όπως στα περισσότερα είδη κωπήπόδων, παρατηρούνται επιδράσεις/μεταβολές, ορισμένες εκ των οποίων αναφέρονται στη συνέχεια:

#### **3.2.1 Αδράνεια**

Όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες (αλατότητα, θερμοκρασία, διαθεσιμότητα οξυγόνου και τροφής) γίνουν ιδιαίτερα δυσμενείς, ορισμένες Τάξεις κωπήπόδων επιβιώνουν μέσω μιας μεταβολικά υποβαθμισμένης στρατηγικής, της αδράνειας (dormancy), η οποία διακρίνεται σε διάπαυση (diapause) και κατάσταση ληθάργου (quiescence). Η διάπαυση ελέγχεται από έναν γενετικά καθορισμένο εσωτερικό

μηχανισμό, ενώ ο λήθαργος πυροδοτείται από δυσμενείς συνθήκες πριν προλάβει το κωπήποδο να εγκλιματιστεί και διαρκεί μέχρι οι συνθήκες να ξαναγίνουν ευνοϊκές και μπορεί να επηρεάσει αυγά, ναυπλίους, ελεύθερους ή εγκυστωμένους κωπηποδίτες και ενήλικα άτομα. Χαρακτηριστική είναι η ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν ορισμένα είδη κωπήποδων σε φάση διάπαυσης ακόμη και στα πεπτικά ένζυμα που εκκρίνονται στο στομάχι των μεταναστευτικών πτηνών των οποίων αποτελούν θηράματα. Με τον τρόπο αυτό τα κωπήποδα καταφέρνουν να μεταφερθούν κατά τη μετανάστευση των πτηνών και να αποβληθούν μέσω των περιττωμάτων τους σε οικοσυστήματα με κατάλληλες συνθήκες για την επιβίωση τους (Anufriieva, 2015). Αναφορές για Αρπακτικοειδή κωπήποδα σε αδράνεια υπάρχουν για πληθυσμούς των γενών *Tigriopus*, *Tisbe* και *Tachidius* που αναπτύσσονται σε υφάλμυρα νερά στα οποία πραγματοποιείται αύξηση της αλατότητας με ταυτόχρονη μείωση της θερμοκρασίας (Capezzuto et al., 2019).

### 3.2.2 Οξειδωτική καταπόνηση

Στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών οργανισμών, παράγονται (σε ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις) κατά τη διάρκεια της κυτταρικής αναπνοής όταν αυτή πραγματοποιείται υπό μη στρεσογόνες συνθήκες, ενεργές μορφές οξυγόνου: ROS-reactive oxygen species (όπως το υπεροξειδικό ανιόν  $O_2^-$ , η ρίζα υδροξυλίου  $OH^-$  και το υπεροξειδίο του υδρογόνου  $H_2O_2$ ) και ενεργές μορφές αζώτου: RON-reactive nitrogen species (όπως το ανιόν του νιτροξυλίου  $NO^-$ , το κατιόν του νιτροξυλίου  $NO^+$ , το οξείδιο του διαζώτου  $N_2O$ , το υπεροξυνιτρώδες ανιόν  $ONOO^-$  και οι νιτροθεικές ενώσεις RSNO). Ο Rivera-Ingraham και οι συνεργάτες του (2017) αναφέρουν ότι υπό το στρες αυξημένης αλατότητας, τα θαλάσσια ασπόνδυλα αυξάνουν την παραγωγή των ROS και RON σε κύτταρα συγκεκριμένων ιστών τους. Όταν η παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου και αζώτου υπερβεί την ικανότητα των αντιοξειδωτικών συστημάτων των κυττάρων (ενζυμική δράση των: S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης, αναγωγή της γλουταθειόνης, καταλάση, υπεροξειδίο της δισμουτάσης κ.α), οδηγούμαστε σε οξειδωτικό στρες που καταπονεί οξειδωτικά τα κύτταρα και δημιουργεί πληθώρα αρνητικών συνεπειών, όπως διάρρηξη των πλασματικών μεμβρανών και εκροή κυτταροπλασματικού περιεχομένου λόγω οξείδωσης των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης, μεταλλάξεις του γενετικού υλικού, πρόωρη γήρανση και θάνατο των κυττάρων, καθώς και οξείδωση των καρβοξυλικών

και σουλφυδριλικών ομάδων των αμινοξέων στις δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες των κυττάρων (Levine et al., 1990, Beckman and Ames, 1998, Sies, 2018).

Σύμφωνα με τη ερευνητική μελέτη του Martinez και των συνεργατών του (2020) η έκθεση κωπηπόδων του είδους *Acartia tonsa* σε περιοδικά μεταβαλλόμενες τιμές αλατότητας για μεγάλο χρονικό διάστημα, οδήγησε σε ιδιαίτερα αυξημένα ποσοστά οξειδωτικής καταπόνησης, κυρίως τα κύτταρα των θηλυκών ατόμων λόγω της αυξημένης καρβονυλίωσης πρωτεϊνών μεσαίου μοριακού βάρους.

Ο Seo και οι συνεργάτες του (2006a) μελέτησαν τα επίπεδα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης σε επίπεδο mRNA σε κύτταρα κωπηπόδων του είδους *Tigriopus japonicus* που αναπτύχθηκαν σε καλλιέργειες με διαφορετικές τιμές αλατότητας. Η αναγωγή της γλουταθειόνης μετατρέπει ενζυμικά τη δισουλφιδική γλουταθειόνη στο τριπεπτίδιο γλουταθειόνη που παρουσιάζει υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Τα αποτελέσματα της παραπάνω έρευνας, έδειξαν σε χαμηλές τιμές αλατότητας πτώση της συγκέντρωσης των mRNA της αναγωγάσης και αύξηση τους σε υψηλές τιμές αλατότητας, ενώ ο λόγος GSH/GSSG (συνθετάση της γλουταθειόνης / δισουλφιδική γλουταθειόνη) φαίνεται να καθόρισε το επίπεδο της μεταβολής της παραγόμενης αναγωγάσης υπό τις συνθήκες του στρες αλατότητας.

Η κορτικοτροπίνη (CRH) αποτελεί ένα από τα γνωστά νευροπεπτίδια του στρες που επάγουν τη δράση αντιοξειδωτικών μηχανισμών στα κύτταρα των σπονδυλωτών. Η δράση της CRH ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη δέσμευσης της ορμόνης που ενεργοποιεί την έκλυση της CRH. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της πρωτεΐνης αυτής σε κωπήποδα του είδους *Tigriopus japonicus* υπό συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας και αλατότητας, μελετήθηκαν από το Lee και τους συνεργάτες του (2008) και με βάση τα αποτελέσματα της έρευνας τους, διαπιστώθηκε ότι και οι δύο στρεσογόνοι παράγοντες προκαλούν ενεργοποίηση της δράσης του γονιδίου που συνεπάγεται αυξημένη παραγωγή της πρωτεΐνης και επομένως μειωμένη δράση της ορμόνης κορτικοτροπίνης.

### **3.2.3 Ενεργειακή καταπόνηση**

Από ενεργειακής άποψης η ζωή σε περιβάλλοντα υψηλής αλατότητας είναι κοστοβόρα. Σύμφωνα με τους Goolish and Burton (1989) στο είδος *Tigriopus californicus* παρατηρήθηκε ότι το 23% της ενέργειας που παράγονταν από την κυτταρική αναπνοή των ατόμων, καταναλώνονταν για την αύξηση της βιοσύνθεσης



ελευθέρων αμινοξέων προκειμένου να καλυφτούν οι ωσμωτικές απαιτήσεις όταν τα άτομα μεταφέρονταν από περιβάλλον αλατότητας 17‰ σε περιβάλλον με αλατότητα 35‰. Η ενέργεια που απαιτείται αυξάνει με την αύξηση της μεταβολής της αλατότητας, όμως όταν η αλατότητα του περιβάλλοντος αυξηθεί πάνω από 70‰ οι ενεργειακές ανάγκες είναι αδύνατο να καλυφτούν από πολλά είδη κωπηπόδων, με αποτέλεσμα αυτά είτε να πεθαίνουν, είτε να μην είναι σε θέση να πραγματοποιήσουν επιτυχώς βασικές λειτουργίες τους (π.χ αναπαραγωγή). Σε ορισμένες περιπτώσεις οι ενεργειακές απαιτήσεις μειώνονται όταν οι οργανισμοί δεν βιοσυνθέτουν μόνοι τους τις ωσμωτικές ενώσεις που απαιτούνται για τη ρύθμιση της ωσμωτικότητας τους, αλλά τις προμηθεύονται απευθείας από το εξωκυτταρικό τους περιβάλλον (Shadrin and Anufriieva, 2013). Ενεργειακή καταπόνηση όμως, έχουμε και σε περιβάλλοντα χαμηλής αλατότητας. Οι McAllen και Taylor (2001) απέδειξαν ότι ο ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου, επομένως και ο μεταβολικός ρυθμός του *T. brevicornis* αυξήθηκε με τη μείωση της αλατότητας λόγω της ενέργειας που απαιτείται για την κάλυψη των ωσμωρυθμιστικών διαδικασιών.

### 3.2.4 Αναβολικές και καταβολικές διεργασίες

**Αμινοξέα.** Ορισμένες Τάξεις κωπηπόδων συμπεριλαμβανομένων των Αρπακτικοειδών και των Καλανοειδών, κατά των εγκλιματισμό τους σε περιβάλλοντα υψηλής αλατότητας, έχει παρατηρηθεί ότι βιοσυνθέτουν ελεύθερα αμινοξέα όπως αλανίνη, γλυκίνη και προλίνη, αυξάνοντας την ενδοκυτταρική συγκέντρωσή τους (Van Der Meeren et al., 2008, Lindley et al., 2011, Svetlichny et al., 2012). Οι Jeffries και Alzara (1970) διαπίστωσαν συσχέτιση της αύξησης της συγκέντρωσης των αμινοξέων σε κωπήποδα του γένους *Acartia* με την αύξηση της αλατότητας. Οι Burton και Feldman (1982) διαπίστωσαν ότι εντός 3 ωρών μετά την μεταφορά ενήλικων ατόμων του είδους *Tigriopus californicus* από αλατότητα 6 ‰ σε 34 ‰, σημειώθηκαν αυξήσεις στην συγκέντρωση της προλίνης, της αλανίνης και της γλυκίνης στους ιστούς τους. Ομοίως, οι Goolish και Burton (1989) διαπίστωσαν σημαντικές αυξήσεις στην συγκέντρωση της αλανίνης και της προλίνης όταν ενήλικα άτομα του ίδιου είδους μεταφέρθηκαν σε περιβάλλοντα με αύξηση της αλατότητας κατά 50% με το μεγαλύτερο μέρος της αλλαγής να συμβαίνει εντός 3 ωρών.

Οι βιοχημικοί δείκτες, και ιδίως οι δείκτες - RNA (π.χ. συγκέντρωση RNA, λόγος RNA: DNA και λόγος RNA: πρωτεΐνες), είναι χρήσιμοι για τον προσδιορισμό της φυσιολογικής κατάστασης, καθώς και για τον ποσοτικό προσδιορισμό της απόκρισης

στο στρες, συμπεριλαμβανομένου του οσμωτικού στρες στα καρκινοειδή. Επομένως, χρησιμοποιώντας τη συγκέντρωση RNA ως δείκτη μεταβολικής δραστηριότητας, μπορούν να προσδιοριστούν οι επιδράσεις της αλατότητας σε κυτταρικό ή μοριακό επίπεδο (Calliari et al., 2006). Οι Willet και Burton (2002) μελέτησαν υπό συνθήκες αυξημένης αλατότητας τη δράση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα P5CR και P5CS τα οποία είναι υπεύθυνα για την κατάλυση των βασικών βιοχημικών αντιδράσεων της σύνθεσης προλίνης από γλουταμινικό οξύ στα κωπήποδα, για τη ρύθμιση της ωσμωτικότητας τους. Τα αποτελέσματα της μελέτης τους έδειξαν ότι η αύξηση της αλατότητας δεν οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής των mRNA για την παραγωγή των P5CR και P5CS. Επομένως η αύξηση της συγκέντρωσης της προλίνης λόγω αύξησης της αλατότητας σχετίζεται με αλλαγές σε μεταφραστικό είτε σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Είτε δηλαδή οι υπερωσμωτικές συνθήκες του περιβάλλοντος ενεργοποιούν τη μετάφραση των mRNA των P5CR και P5CS που ήδη υπάρχουν στα κύτταρα των κωπηπόδων, είτε τροποποιούν τη δομή των P5CR ή/και P5CS ενεργοποιώντας τη δράση τους.

**Λιπίδια.** Λιπίδια με τη μορφή λιποσταγόνων (Lipid Droplets) συσσωρεύονται σε πολλά κωπήποδα κυρίως για την άμεση εξυπηρέτηση των ενεργειακών τους αναγκών όταν αυτό απαιτείται (Zarubin et al., 2014). Ο Lee και οι συνεργάτες του (2017) διαπίστωσαν ελάττωση της συγκέντρωσης των λιποσταγόνων ακόμη και σε ποσοστό 80% όταν άτομα του είδους *Paracyclops nana* αναπτύχθηκαν σε υπερωσμωτικό περιβάλλον. Οι ερευνητές απέδωσαν την ελάττωση στη μείωση της διαθέσιμης ενέργειας για τον κύκλο του Krebs και τις μεταβολικές αντιδράσεις λιπογένεσης, λόγω των αυξημένων ενεργειακών δαπανών για τη ρύθμιση της ωσμωτικότητας των υπό μελέτη κωπηπόδων.

**3.2.5 Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat shock proteins).** Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών με κύριο ρόλο την προστασία των κυττάρων από περιβαλλοντικά ή παθοφυσιολογικά ερεθίσματα. Ταξινομούνται σε ομάδες σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος. Πρωτεΐνες με μικρό μοριακό βάρος (π.χ hsp10, hsp20) έχουν ως ρόλο την επιδιόρθωση κυτταρικών βλαβών που προκαλούνται από καταπονήσεις, ενώ οι μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεΐνες (π.χ hsp70, hsp90) σχετίζονται με την προστασία των κυττάρων από στρεσογόνους παράγοντες επιδιορθώνοντας μεταξύ των άλλων πρωτεϊνικά μόρια (Ivanina et al., 2008, Kalmar and Greensmith, 2009). Σύμφωνα με το Lee και τους συνεργάτες του (2017) η

ανάπτυξη ατόμων του είδους *Paracyclopsina nana* σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας, οδήγησε σε αύξηση της ενεργότητας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ hsp70, hsp90. Πιθανών, σύμφωνα με τους ερευνητές, σε αυτό να οφείλεται το ότι δεν παρατηρήθηκε αύξηση της θνησιμότητας στα κωπήποδα που μελετήθηκαν λόγω κυτταρικών βλαβών, μολονότι η αύξηση της αλατότητας επηρέασε αρνητικά πολλές μεταβολικές αντιδράσεις των κωπηπόδων

**3.2.6 Κολυμβητική συμπεριφορά.** Οι Michalec et al. (2012) βρήκαν σημαντική επίδραση της μεταβολής της αλατότητας στην κολυμβητική συμπεριφορά ενήλικων θηλυκών και αρσενικών ατόμων του κωπηπόδου *Pseudodiaptomus annandalei*. Η απόκλιση της αλατότητας από τη βέλτιστη για το είδος, οδήγησε στη μείωση της κολυμβητικής δραστηριότητας των κωπηπόδων, με τους ερευνητές να αποδίδουν τη συμπεριφορά αυτή στα μειωμένα ενεργειακά ποσά που ήταν διαθέσιμα για το σκοπό αυτό, λόγω της αύξησης της κατανάλωσης της ενέργειας για την αντιμετώπιση του στρες από την έκθεση σε ακραίες τιμές αλατότητας. Σε ανάλογες παρατηρήσεις κατέληξαν και οι Lance (1964) για θαλάσσια είδη κωπηπόδων και οι Mcallen και Taylor (2001) για το είδος *Tigriopus brevicornis*.

**3.2.7 Ρυπογόνοι παράγοντες.** Σε περιβάλλοντα με υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών ρυπαντών (π.χ εντομοκτόνων), έχει παρατηρηθεί αύξηση της βιοσυσσώρευσης τους στους υδρόβιους οργανισμούς, όταν αυξάνονται οι τιμές της αλατότητας στο περιβάλλον. Πιθανών αυτό να οφείλεται στην συναπορρόφηση των ρυπαντών με την αύξηση της ποσότητας του νερού που απορροφάται από το περιβάλλον για τη ρύθμιση της οσμωτικότητας των οργανισμών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ρυπαντές είναι ιδιαίτερα τοξικοί για τους υδρόβιους οργανισμούς ,δημιουργώντας μεταβολικές δυσλειτουργίες και αύξηση της θνησιμότητάς τους (Hong et al., 2021). Σύμφωνα με το Hong και τους συνεργάτες του (2021), η έκθεση ατόμων του είδους *Tigriopus japonicus* σε περιβάλλον υψηλής αλατότητας παρουσία της ουσίας 4-MBC (δραστική ουσία των αντηλιακών που καταλήγει στα υδάτινα οικοσυστήματα μετά την απόπλυσή της από το δέρμα αποτελώντας ρυπαντή), είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του οξειδωτικού στρες που επάγεται από την 4-MBC, γεγονός που αποδεικνύεται από την αυξημένη έκφραση του γονιδίου δισμουτάση του σουπεροξειδίου *sod* (γονίδιο οξειδωτικής απόκρισης).

Παράλληλα όμως η αλατότητα θεωρείται ένας από τους βασικούς παράγοντες που επηρεάζει τη βιοδιαθεσιμότητα και την τοξικότητα των ελεύθερων μεταλλικών ιόντων, ενώ συχνά εξασθενεί τη συναρμογή μεταξύ των μετάλλων και των βιουποκαταστατών τους (Church et al., 2017, DeForest et al., 2017). Αποτελέσματα ερευνών δείχνουν πώς η αύξηση της αλατότητας σχετίζεται κάτω από ορισμένες συνθήκες με τη μείωση της τοξικότητας των βαρέων μετάλλων, όπως π.χ του Cu στα κωπήποδα. Η τοξικότητα του Cu προκαλείται κυρίως από ελεύθερα ιόντα  $Cu^{+2}$  στο διάλυμα. Η αυξημένη αλατότητα μπορεί να επηρεάσει την πρόσληψη ιόντων  $Cu^{+2}$  λόγω ανταγωνισμού του με άλλα ιόντα για πρωτεΐνες μεταφοράς ή/και ιόντα-διαύλους (Kwok and Leung, 2005). Ένας ακόμη πιθανός μηχανισμός που μπορεί να εξηγήσει τη μείωση της τοξικότητας του Cu με την αύξηση της αλατότητας είναι η συμπλοκοποίηση του Cu με τα ιόντα χλωρίου (Cl) (Rainbow, 1997). Σε γενικές γραμμές, τα σύμπλοκα Cu-Cl αυξάνονται καθώς αυξάνεται η αλατότητα με αποτέλεσμα τη μείωση της βιοσυσώρευσης του Cu στους ιστούς των κωπηπόδων και επομένως την τοξικότητα του (Sadiq, 1992). Έτσι σε υδάτινα περιβάλλοντα ρυπασμένα με βαρέα μέταλλα όπως ο Cu, η αύξηση της αλατότητας μπορεί να ευνοήσει την επιβίωση των κωπηπόδων.

**3.2.8 Ανάπτυξη και αναπαραγωγή.** Υπάρχουν πειραματικές μελέτες που αποδεικνύουν ότι ορισμένα είδη κωπηπόδων μπορούν να ανταπεξέλθουν στην επίδραση του στρες αλατότητας χωρίς να αυξηθεί η θνησιμότητα τους, αλλά να υποστούν αρνητικές συνέπειες στους ρυθμούς ανάπτυξης τους και στο επίπεδο της γονιμότητάς τους. Η καθυστέρηση στην ανάπτυξη και η μειωμένη γονιμότητα, πιθανών να οφείλονται στην αύξηση των ενεργειακών δαπανών για την ωσμωρύθμιση εις βάρος των υπόλοιπων λειτουργικών διεργασιών που πραγματοποιούν τα άτομα υπό μη στρεσογόνες συνθήκες (Lee et al., 2017). Σύμφωνα με το Lee και τους συνεργάτες του (2017), σε κυκλωποειδή κωπήποδα του είδους *Paracyclopsina nana*, αύξηση της αλατότητας κατά 10% οδήγησε σε μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και αύξηση του απαιτούμενου χρόνου για τη μετάβαση από τα αναπτυξιακά στάδια των ναυπλίων σε αυτά των κωπηποδιτών και από τα αναπτυξιακά στάδια των κωπηποδιτών στα ενήλικα άτομα. Παράλληλα παρατηρήθηκε μείωση της γονιμότητας κατά 60% σε σχέση με αυτή που σημειώθηκε στις άριστες συνθήκες ανάπτυξης για το συγκεκριμένο είδος. Αντίστοιχες παρατηρήσεις έχουν γίνει και για τα είδη *Acartia clausi* και *Pseudocalanus newmani*,

στα οποία η αύξηση της αλατότητας με ταυτόχρονη μείωση της θερμοκρασίας, οδήγησαν σε αύξηση του χρόνου για την ολοκλήρωση των αναπτυξιακών σταδίων των ατόμων που μελετήθηκαν (Bretler and Schogt, 1994), ενώ σε άτομα του είδους *Aprocylops royi* η έκθεση σε υπερωσμωτικό περιβάλλον, οδήγησε επίσης σε αύξηση του απαιτούμενου χρόνου για την ολοκλήρωση των αναπτυξιακών σταδίων των ναυπλίων (Pan et al., 2016).

Οι Calliari et al. (2006) μελέτησαν την επίδραση της αλατότητας στην αναπαραγωγή δύο ειδών κωπηπόδων του γένους *Acartia* (*tonsa* και *clausi*). Και στα δύο είδη η επιτυχία εκκόλαψης των αυγών ήταν μικρή στις χαμηλότερες αλατότητες που δοκιμάστηκαν. Επιπλέον το μεταβλητό μέγεθος των αυγών μεταξύ των διαφορετικών τιμών αλατότητας, υποδηλώνει ότι το κέλυφος του αυγού είναι διαπερατό στο νερό και έτσι τα έμβρυα στις διαφορετικές τιμές αλατότητας, αντιμετώπιζαν διαφορετικές οσμωτικές πιέσεις, ενώ η μεγαλύτερη εμβρυϊκή θνησιμότητα σε χαμηλές αλατότητες για το *A. clausi* υποδηλώνει ότι τα έμβρυα είναι πιο ευαίσθητα από τα ενήλικα άτομα στη μείωση της αλατότητας. Το μικρό εύρος ανοχής στις μεταβολές της αλατότητας κατά τα πρώτα ναυπλιακά στάδια είναι ένα κοινό πρότυπο σε αρκετά είδη κωπηπόδων (Chinnery and Williams 2004, Devreker et al. 2004).

Στην μελέτη του Ohs και των συνεργατών του (2010) σχετικά με την επίδραση διαφορετικών τιμών αλατότητας σε κωπήποδα του είδους *Pseudodiaptomus pelagicus*, η γονιμότητα επηρεάστηκε έμμεσα από τη μεταβολή της αλατότητας, μιας και λιγότερα αυγά μετρήθηκαν στους ωοσάκους αυγών των θηλυκών ατόμων που αναπτύχθηκαν σε χαμηλότερες και υψηλότερες αλατότητες σε σχέση με τη βέλτιστη. Σύμφωνα με τις Μήλιου και Μωραΐτου (1991) σε άτομα του κωπηπόδου *Tisbe holothuriae* η απόκλιση από την βέλτιστη τιμή αλατότητας (38 ppt) είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγικότητας (μικρότερος αριθμός ναυπλίων από κάθε σάκο αυγών), καθώς και την αύξηση της θνησιμότητας.

#### 4. Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα ερευνητική εργασία επιδιώκει να συμβάλει περαιτέρω στην απαιτούμενη γνώση για τη χρήση των κωπηπόδων ως τροφή σε προνυμφικά στάδια ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας, έναντι των κοινών ζωντανών τροφών που χρησιμοποιούνται σήμερα. Το ενδιαφέρον για τη μαζική καλλιέργεια κωπηπόδων με σκοπό τη χρήση τους ως τροφή στα προνυμφικά στάδια ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας, αλλά και σε καλλωπιστικά ψάρια ενυδρείων, είναι αυξανόμενο τόσο στη χώρα μας όσο και σε άλλες χώρες τα τελευταία χρόνια. Η μαζική παραγωγή κωπηπόδων υψηλής θρεπτικής αξίας θα μπορούσε να οδηγήσει στη μείωση του κόστους παραγωγής στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας. Επιπλέον η καλλιέργεια συγκεκριμένων ειδών κωπηπόδων ως τροφή θα μπορούσε να συμβάλει στην παραγωγή ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας υψηλότερης θρεπτικής αξίας. Για να επιτευχθεί όμως αυτό απαιτούνται οι βέλτιστες φυσικοχημικές συνθήκες ανάπτυξης που καθορίζονται όχι μόνο από το είδος των κωπηπόδων αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις και από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των πληθυσμών από τους οποίους προέρχονται.

Για το λόγο αυτό, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της δυνατότητας καλλιέργειας δύο γενών κωπηπόδων που απαντώνται ευρέως στην Ελλάδα και γενικότερα στη Μεσόγειο, των *Tisbe* και *Tigriopus* καθώς και η διερεύνηση της επίδρασης τεσσάρων επιπέδων αλατότητας και δύο ειδών μικροφυκών (ως τροφή) στην ανάπτυξη και την παραγωγή τους.

## 5. Υλικά και μέθοδοι

Η πειραματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο **Καλλιέργειας πλαγκτού του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής, Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών του Πανεπιστημίου Πατρών.**

### 5.1 Διαχείριση ζωντανού υλικού

1. Κωπήποδα των γενών *Tisbe* και *Tigriopus* συλλέχθηκαν από τη λιμνοθάλασσα του Μεσολογίου και καλλιεργήθηκαν για πολλές γενεές στο εργαστήριο **Καλλιέργειας πλαγκτού**. Η αλατότητα στο σταθμό δειγματοληψίας κατά τη λήψη των δειγμάτων ήταν 37‰.
2. Από τις καλλιέργειες του Εργαστηρίου, αρχικά από κάθε γένος επιλέχθηκαν τυχαία 30 θηλυκά άτομα που έφεραν αυγά και τοποθετήθηκαν με προσρόφηση μέσω πιπέτας Pasteur σε μεμονωμένα τριβλία των 15 mL που περιείχαν νερό αλατότητας 35‰.
3. Μετά την πλήρη εκκόλαψη του ωοσάκου τους τα θηλυκά άτομα απομακρύνθηκαν με προσρόφηση μέσω πιπέτας Pasteur από τα μεμονωμένα τριβλία όπου παρέμειναν μόνο οι ναύπλιοι των F1 γενεών.
4. Η ανάπτυξη των ναύπλιων (F1 γενιά) που προέκυψαν από την εκκόλαψη των θηλυκών ατόμων παρακολουθούνταν καθημερινά μέσω στερεοσκοπίου.
5. Θηλυκά άτομα της F1 γενιάς που εμφάνισαν τον πρώτο ωοσάκο τους επιλέχθηκαν τυχαία και τοποθετήθηκαν σε μεμονωμένα τριβλία αφού πρώτα τους έγιναν δύο διαδοχικές πλύσεις σε καθαρό νερό αλατότητας 35‰ για να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα ταυτόχρονης μεταφοράς ναυπλίων ή πρωτόζωων.
6. Συνολικά για κάθε αλατότητα και κάθε είδος τροφής επιλέχθηκαν τυχαία και μελετήθηκαν από την F1 γενιά 36 θηλυκά άτομα.
7. Σε κάθε τριβλίο που τοποθετήθηκαν τα θηλυκά άτομα της F1 γενιάς υπήρχαν 8 ml νερού, ενώ δεν υπήρχε κάποιο είδος υποστρώματος.
8. Τα θηλυκά άτομα που απέρριπταν μετά από πλήρη εκκόλαψη τους ωοσάκους τους μεταφέρονταν σε νέο τριβλίο με αποτέλεσμα σε κάθε τριβλίο να υπάρχουν ναύπλιοι και εν συνεχεία ενήλικα άτομα της ίδιας γενιάς.
9. Τέσσερις διαφορετικές **αλατότητες** επιλέχθηκαν για το νερό (μέσο ανάπτυξης) των θηλυκών ατόμων και των ναυπλίων που θα προέκυπταν από την εκκόλαψη των αυγών των ωοσάκων τους: **20%, 32%, 44% και 60%.**

10. Ανά τρεις ημέρες με τη χρήση πιπέτας Pasteur γίνονταν προσθήκη τροφής σε κάθε τριβλίο.
11. Επιλέχθηκαν δύο είδη τροφής: καλλιέργεια μικροφυκών των ειδών *Rhodomonas salina* και *Dunaliella salina*.

## 5.2 Φυσικοχημικές συνθήκες

**Θερμοκρασία:** Η θερμοκρασία του Εργαστηρίου σε όλη τη διάρκεια του πειράματος ήταν σταθερή  $20 \pm 1$  °C.

**Φωτοπερίοδος:** Η φωτοπερίοδος που επιλέχθηκε ήταν 18h φως – 6h σκοτάδι.

**pH:** Κατά την αρχική τοποθέτηση των θηλυκών ατόμων στα τριβλία η τιμή του pH ήταν  $7,9 \pm 1$ . Κατά την εξέλιξη του πειράματος η τιμή του pH παρουσίασε μεταβολές.

**Αλατότητα:** Οι τέσσερις διαφορετικές τιμές αλατότητας επιλέχθηκαν για το νερό (μέσο ανάπτυξης) ήταν 20‰, 32‰, 44‰ και 60‰. Με φορητό διαθλασίμετρο αλατότητας γινόταν καθημερινά μέτρηση της τιμής αλατότητας του μέσου ανάπτυξης και σε όποιο τριβλίο υπήρχε μεταβολή γινόταν διόρθωση με προσθήκη ποσότητας νερού κατάλληλης αλατότητας. Δεν πραγματοποιήθηκε κατά την εξέλιξη του πειράματος εξ ολοκλήρου ανανέωση του νερού των τριβλίων.

## 5.3 Παράμετροι μελέτης

Μελετήθηκαν οι κάτωθι παράμετροι για κάθε διαφορετική τιμή αλατότητας στο μέσο ανάπτυξης για τα δύο γένη κωπηπόδων και για τα δύο είδη τροφής:

1. **Συνολικός αριθμός ναυπλίων.** Μετρήθηκε ο συνολικός αριθμός ναυπλίων που προέκυψαν από την εκκόλαψη των αυγών του συνόλου των ωοσακών κάθε θηλυκού ατόμου.
2. **Αριθμός ναυπλίων 1<sup>ου</sup> ωοσάκου.** Μετρήθηκε ο αριθμός ναυπλίων που προέκυψαν από την εκκόλαψη των αυγών του 1<sup>ου</sup> ωοσάκου κάθε θηλυκού ατόμου.
3. **Αριθμός ωοσακών.** Μετρήθηκε ο συνολικός αριθμός ωοσακών που παρήγαγε κάθε θηλυκό άτομο ανεξάρτητα εάν προέκυψαν από αυτούς μέσω εκκόλαψης ναύπλιοι (ορισμένοι ωοσάκοι απορρίπτονται από τα θηλυκά άτομα χωρίς να έχει προηγηθεί εκκόλαψη αυγών).
4. **Χρόνος εκκόλαψης 1<sup>ου</sup> ωοσάκου.** Μετρήθηκε ο συνολικός χρόνος σε ημέρες που απαιτήθηκε για την πλήρη εκκόλαψη του 1<sup>ου</sup> ωοσάκου κάθε θηλυκού

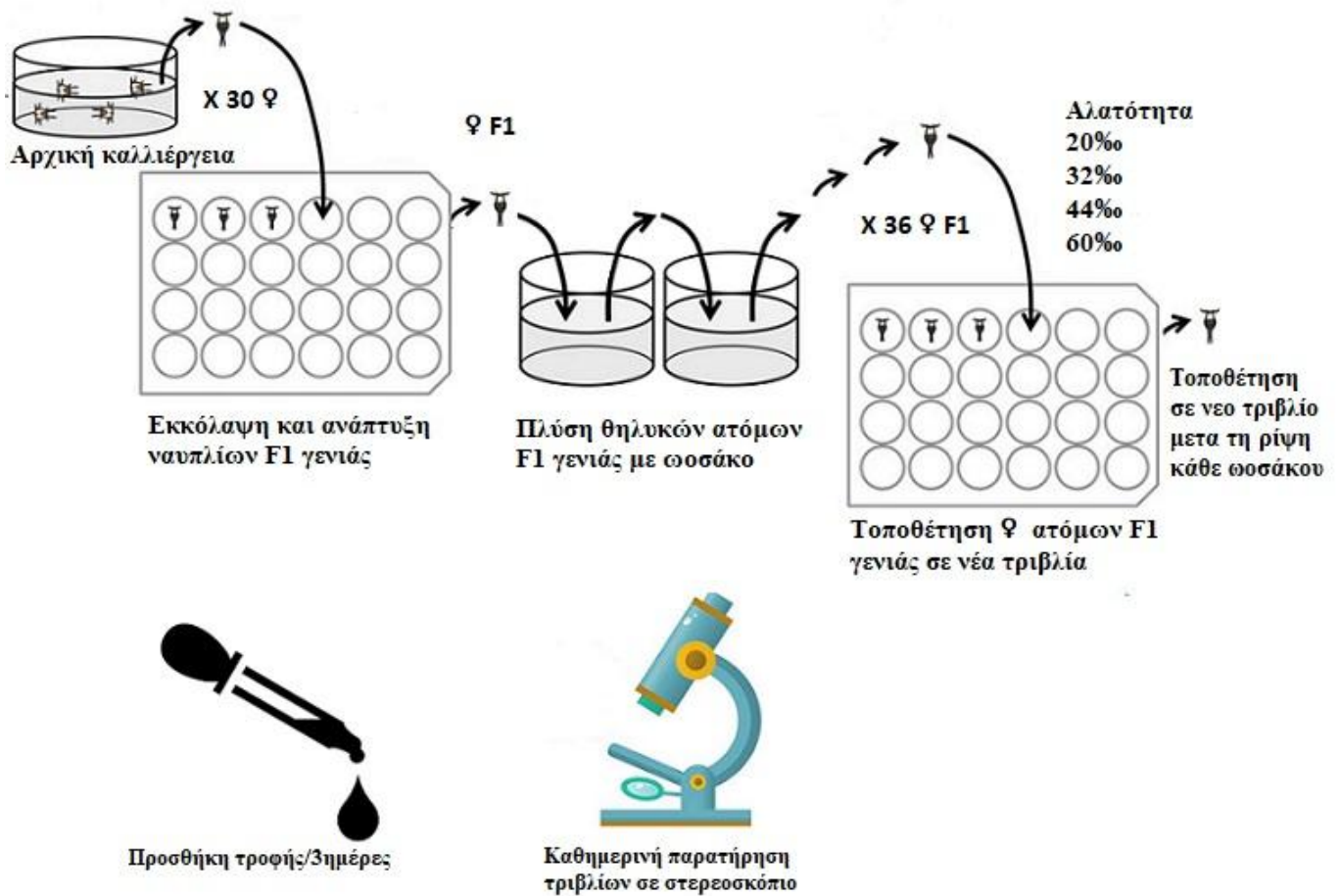


ατόμου. Οι ωοσάκοι που απορρίφθηκαν χωρίς να γίνει εκκόλαψη των αυγών τους δεν συμπεριλήφθηκαν στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

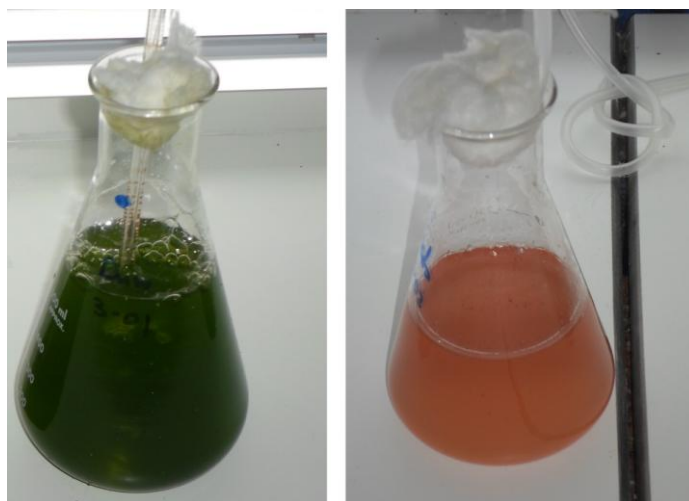
5. **Χρόνος μεταξύ των δύο πρώτων ωοτοκιών.** Μετρήθηκε ο συνολικός χρόνος σε ημέρες από την εμφάνιση του πρώτου ωοσάκου έως την εμφάνιση του δεύτερου ωοσάκου ανά θηλυκό άτομο. Τα θηλυκά άτομα που παρήγαγαν λιγότερους από δύο ωοσάκους δεν συμπεριλήφθηκαν στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.
6. **Εκατοστιαία αναλογία θηλυκών ατόμων.** Υπολογίστηκε η εκατοστιαία αναλογία θηλυκών ατόμων επί του συνόλου των ενήλικων ατόμων που εκκολάφθηκαν από το σύνολο των ωοσακών των 36 θηλυκών ατόμων, σε κάθε αλατότητα. Τα άτομα που πέθαναν σε στάδιο πριν από αυτό των ενήλικων ατόμων (ναύπλιοι – κωπηποδίτες) δεν συμπεριλαμβάνονται για τον υπολογισμό της % αναλογίας θηλυκών ατόμων.

#### **5.4 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.**

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε χρήση του προγράμματος SPSS® (IBM® SPSS® STATISTICS, version 20). Το πείραμα ήταν μονοπαραγοντικό (παράγοντας: αλατότητα διαλύματος/μέσου ανάπτυξης). Ακολουθήθηκε το εντελώς τυχαιοποιημένο σχέδιο και χρησιμοποιήθηκαν 36 θηλυκά άτομα που έφεραν αυγά (επιλέχθηκαν τυχαία με προσρόφηση), ανά είδος, για κάθε τιμή αλατότητας, για τα δύο διαφορετικά είδη τροφής. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση της διασποράς (ANOVA) και όταν το F ήταν στατιστικά σημαντικό, η σημαντικότητα των διαφορών των μέσων των υπό μελέτη παραγόντων εκτιμήθηκε με το Tukey Test σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .



Εικόνα 5.1. Συνοπτική σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας



Εικόνα 5.2. Καλλιέργειες *Dunaliella salina* και *Rhodomonas salina* που χρησιμοποιήθηκαν ως τροφή για τα καλλιεργούμενα κωπήποδα



Εικόνα 5.3. Στερεοσκόπηση και αποθήκευση των δειγμάτων του πειράματος

## 5.5. Μελετώμενα είδη

### 5.5.1. Γένος *Tigriopus*

Συστηματική ταξινόμηση

Υπερβασίλειο: Eucaryota

Βασίλειο: Animalia

Υποβασίλειο: Bilateria

Ανθυποβασίλειο: Protostomia

Υπερσυνομοταξία: Ecdysozoa

Φύλο: Arthropoda

Υποφύλο: Crustacea

Υπερομοταξία: Multicrustacea

Ομοταξία: Hexanauplia

Ανθυφομοταξία: Neocopepoda

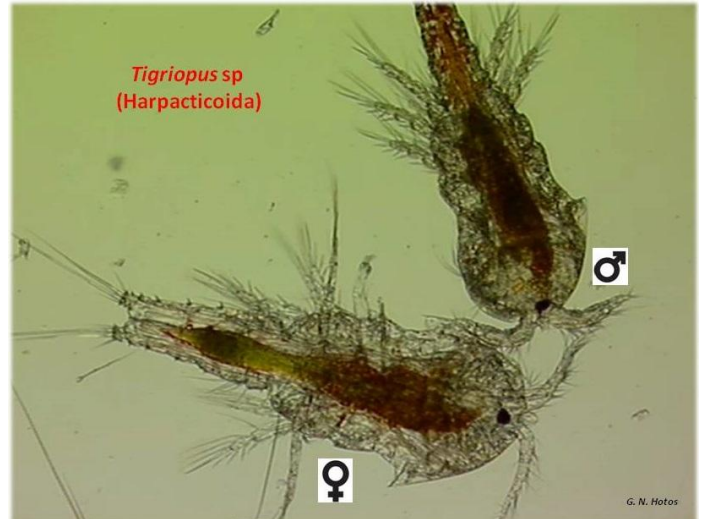
Υφομοταξία: Copepoda

Υπερτάξη: Podoplea

Τάξη: Harpacticoida

Οικογένεια: Harpacticidae

Γένος: *Tigriopus*



Εικόνα 5.4. Ενήλικα άτομα *Tigriopus sp.* (Χώτος, 2021)

Το γένος *Tigriopus* περιγράφηκε από το Norman το 1868 ο οποίος βασίστηκε στα χαρακτηριστικά ενός πληθυσμού του είδους *Tigriopus lilljeborgi* (σήμερα αποδεκτό ως *T. fulvus* (Fischer, 1860)) της περιοχής Shetlan της Σκωτίας. Ανήκει στο φύλο Arthropoda και αποτελεί ένα από τα γένη της οικογένειας Harpacticidae. Είναι γένος με μεγάλη γεωγραφική εξάπλωση και υπάρχουν αναφορές για τα είδη του από τις ακτές της Βόρειας Αμερικής (Kelly et al., 2012) μέχρι και την Ανταρκτική (Park et al., 2014).

Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες αναθεωρήσεις το γένος περιλαμβάνει τα ακόλουθα 15 είδη: *T. angulatus* Lang, 1933, *T. brachydactylus* Candeias, *T. brevicornis* Møller, 1776, *T. californicus* Baker, 1912, *T. crozettensis* Soyer, Thiriot-Quievreux & Colomines, 1987, *T. fulvus* Fischer, 1860, *T. igai* Ito, 1977, *T. japonicus* Mori, 1938, *Tigriopus iranicus* sp. nov (Nazari, 2021). *T. kerguelensis* Soyer, Thiriot-Quievreux & Colomines, 1987, *T. kingsejongensis* Park, S. Lee, Cho, Yoon, Y. Lee & W. Lee, 2014, *T. minutus* Bozic, 1960, *T. raki* Bradford, 1967, *T. sirindhornae* Chullasorn, Dahms & Klangsin, 2013, *T. thailandensis* Chullasorn, Ivanenko, Dahms, Kangtia & Yang, 2012 (Nazari, 2021). Για τα είδη *T. brevicornis*, *T. brachydactylus*, *T. fulvus* και *T. minutes* υπάρχουν αναφορές για την παρουσία τους σε περιοχές της Μεσογείου, ενώ ειδικότερα στην Ελλάδα για το είδος *T. fulvus* (Vecchioni et al., 2019).

Τα είδη του γένους *Tigriopus* είναι κυρίως βενθικά, με μεγάλη ικανότητα προσαρμογής ακόμη και στις ιδιαίτερες συνθήκες των ενδαιτημάτων της υπερπαλιρροϊκής ζώνης. Αρκετά από τα είδη, αποτελούν τα κυρίαρχα σε περιβάλλοντα με μεγάλου εύρους μεταβολές θερμοκρασίας και αλατότητας, όπως π.χ εφήμερες μικρολίμνες σκληρού υποστρώματος της υπερπαλιρροϊκής ζώνης. Τα περισσότερα είδη είναι μικρά σε μέγεθος (μήκος σώματος ενηλίκων περίπου 1mm) και παρουσιάζουν χαρακτηριστικό χρωματισμό. Οι καφέ αποχρώσεις που συχνά εμφανίζουν, οφείλονται στο τερπένιο ασταξανθίνη. Στο φυσικό τους περιβάλλον παρουσιάζουν ευρύ φάσμα τροφικών επιλογών (από διάτομα μέχρι οργανική σωματιδιακή ύλη) (Vecchioni et al., 2019). Για τα ώριμα άτομα ορισμένων ειδών, έχει αναφερθεί ότι προκειμένου να επιβιώσουν υπό δυσμενείς συνθήκες, μεταβαίνουν σταδιακά σε κατάσταση πλήρους ηρεμίας και ξαναγίνονται ενεργά όταν οι συνθήκες το επιτρέψουν (Vittor, 1971, Powlik and Lewis, 1996).

Όλα τα είδη του γένους *Tigriopus* είναι γονοχωριστικά. Πριν τη γονιμοποίηση, γίνεται σύλληψη του θηλυκού ατόμου από το αρσενικό με τη βοήθεια των κεραιών

του 1<sup>ου</sup> ζεύγους του. Μετά από ένα μόνο ζευγάριωμα το θηλυκό παράγει διαδοχικούς ωοσάκους με γονιμοποιημένα αυγά από τα οποία προκύπτουν με εκκόλαψη ναύπλιοι, ενώ ακόμη ο σάκος είναι προσαρτημένος στο σώμα του θηλυκού (Χώτος, 2019, Vecchioni et al., 2019).

Τα είδη του γένους *Tigriopus* έχουν χρησιμοποιηθεί ως κατάλληλοι βιοδείκτες σε μελέτες εκτίμησης οικολογικής ποιότητας, καθώς και σε τοξικολογικές μελέτες μιας και βιοσυσσωρεύουν στους ιστούς τους ρυπαντές ή τοξικές ενώσεις τόσο από το υπόστρωμα, όσο και από τη στήλη του νερού των ενδιαιτημάτων τους (Raisuddin et al., 2007).

### 5.5.2. Γένος *Tisbe*

#### Συστηματική ταξινόμηση

**Υπερβασίλειο:** Eucaryota

**Βασίλειο:** Animalia

**Υποβασίλειο:** Bilateria

**Ανθυποβασίλειο:** Protostomia

**Υπερσυνομοταξία:** Ecdysozoa

**Φύλο:** Arthropoda

**Υποφύλο:** Crustacea

**Υπερομοταξία:** Multicrustacea

**Ομοταξία:** Hexanauplia

**Ανθυφομοταξία:** Neocopepoda

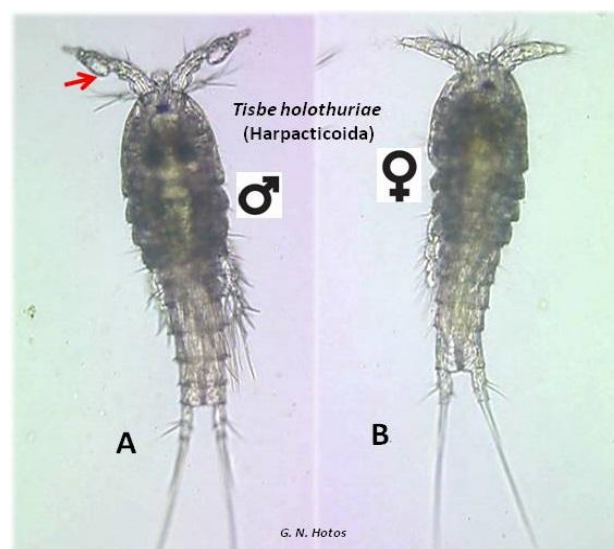
**Υφομοταξία:** Copepoda

**Υπερτάξη:** Podoplea

**Τάξη:** Harpacticoida

**Οικογένεια:** Tisbidae

**Γένος:** *Tisbe*



Εικόνα 5.5. Ενήλικα άτομα *Tisbe sp.* (Χώτος, 2021)

Για το κοσμοπολίτικο γένος *Tisbe* (Lilljeborg, 1853) υπάρχουν αναφορές για τουλάχιστον 54 ταυτοποιημένα είδη. Ωστόσο, αποδεικνύεται πειραματικά ότι ορισμένα από τα είδη του γένους *Tisbe* παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό γενετικής συγγένειας γεγονός που αντανακλάται στο μεγάλο βαθμό φαινοτυπικής ομοιομορφίας

μεταξύ π.χ τον ειδών *T. holothuriae* / *T. battagliai*, *T. bulbisetosa* / *T. inflatiseta* και *T. Gracilis* / *T. cucumariae* (Chullasorn et al., 2011). Στην Ελλάδα υπάρχουν αναφορές για την παρουσία του είδους *Tisbe holothuriae* (Miliou et al., 2000, Miliou and Moraitou –Apostolopoulou, 1991).

Τα περισσότερα είδη του γένους *Tisbe* είναι βενθικά, παρουσιάζουν υψηλές αφθονίες στα φυσικά ενδιαίτητά τους, έχουν σύντομο κύκλο ζωής, ενώ υπάρχουν και αρκετές αναφορές για τη δυνατότητα καλλιέργειας και μελέτης τους υπό εργαστηριακές συνθήκες. Ορισμένα είδη όπως το *Tisbe battagliai* και το *Tisbe biminiensis* χρησιμοποιούνται ως βιολογικοί δείκτες τόσο για την ποιότητα του νερού μέσω της εκτίμησης της τοξικότητας των αποβλήτων στα ναυπλιακά στάδια των κωπηπόδων, όσο και για την εκτίμηση της τοξικότητας των βαρέων μετάλλων που βιοσυσσωρεύονται σε επιβενθικά ενδιαίτηματα (Castro et al., 2009).

Η ανάπτυξη των κωπήποδων του γένους *Tisbe* περιλαμβάνει 6 ναυπλιακά και 6 κωπηποδιτικά στάδια. Το έκτο κωπηποδιτικό στάδιο είναι αυτό των ενήλικων ατόμων. Μεταξύ των δύο φύλων υπάρχει διμορφισμός. Μετά την γονιμοποίηση το θηλυκό δίνει διαδοχικούς ωόσακκους. Ο ωόσακκος "διαλύεται" σταδιακά με την εκκόλαψη των αυγών. Υπό δυσμενείς συνθήκες ο ωόσακκος αποβάλλεται και δίνει λίγους ναύπλιους ή και καθόλου. Ο χρόνος της ναυπλιακής και κωπηποδικής ανάπτυξης, ο χρόνος εμφάνισης του πρώτου ωόσακκου, οι χρόνοι ωοτοκίας και εκκόλαψης, ο αριθμός των ωόσακκων και των αυγών ανά θηλυκό, η μακροβιότητα, η θνησιμότητα και η αναλογία θηλυκών, επηρεάζονται από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Μήλιου, 1990).

**5.6 Είδη μικροφυκών για τροφή των κωπήπόδων.** Στις καλλιέργειες κωπηπόδων ως τροφή συχνά επιλέγονται μικροφύκη κατάλληλα να καλύψουν τις τροφικές απαιτήσεις τους που καθορίζονται από το είδος και το αναπτυξιακό στάδιο των κωπηπόδων. Τα βασικά κριτήρια επιλογής των ειδών του φυτοπλαγκτού για την διατροφή των κωπηπόδων είναι: 1) τα κύτταρα τους να έχουν κατάλληλο μέγεθος, ώστε να είναι δυνατή η σύλληψη και η πέψη τους 2) τα κύτταρα να μην έχουν δύσπεπτα κυτταρικά τοιχώματα καθώς και διάφορους μορφολογικούς σχηματισμούς, που να εμποδίζουν την σύλληψη 3) να μην εκκρίνουν τοξικές ουσίες και 4) να είναι πλούσια σε απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιείται μείγμα δύο ή και περισσότερων ειδών μικροφυκών για την κάλυψη των τροφικών απαιτήσεων των καλλιεργούμενων κωπηπόδων (Corner and Cowey,

1968). Στην παρούσα ερευνητική εργασία ως τροφή για τα υπό μελέτη είδη κωπηπόδων, επιλέχθηκαν καλλιέργειες μικροφυκών των ειδών *Rhodomonas salina* και *Dunaliella salina*.

### 5.6.1. *Rhodomonas salina*

**Συστηματική ταξινόμηση**

**Υπερβασίλειο:** Eucaryota

**Βασίλειο:** Chromista

**Υποβασίλειο:** Hacrobia

**Φύλο:** Cryptophyta

**Κλάση:** Cryptophyceae

**Τάξη:** Pyrenomonadales

**Οικογένεια:** Pyrenomonadaceae

**Γένος:** *Rhodomonas*

**Είδος:** *Rhodomonas salina*



**Εικόνα 5.6.** *Rhodomonas salina* (diark.org)

Το γένος των μονοκύτταρων μικροφυκών *Rhodomonas* ανήκει στο φύλο Cryptophyta και αποτελεί ένα από τα γένη της οικογένειας Pyrenomonadaceae. Ενδιατεί κυρίως, σε θαλάσσια και υφάλμυρα νερά και τα διάφορα είδη του παρουσιάζουν μεγάλη προσαρμοστικότητα στις μεταβολές της αλατότητας του περιβάλλοντός τους (Jepsen et al., 2018). Είναι κοσμοπολίτικο και μολονότι αναφέρονται δυσκολίες στη διατήρηση και την εξέλιξη της μαζικής καλλιέργειάς του (Knuckey et al., 2005), χρησιμοποιείται ευρέως ως τροφή στις καλλιέργειες κωπηπόδων (Berggreen et al., 1988, Støttrup and Jensen, 1990, Jónasdóttir, 1994, Marinho da Costa and Fernández, 2002, Broglio et al., 2003, Zhang et al., 2013, Arndt and Sommer 2014), προνυμφών δίθυρων μαλακίων (Brown et al., 1998, Muller-Feuga et al., 2003, Malzahn and Boersma, 2012), καθώς και προνυμφών γαστερόποδων (Aldana-Aranda and Patino Suarez, 1998). Η αναπαραγωγή του πραγματοποιείται με απλή κυτταρική διαίρεση, ενώ δεν έχει αναφερθεί εγγενής αναπαραγωγή του. Στα ωοειδούς σχήματος κύτταρά του, πέραν των χλωροφυλλών, απαντάται και η κόκκινη φωτοχρωστική φυκοερυθρίνη με κύριο ρόλο τη δέσμευση

φωτεινής ακτινοβολίας που διοχετεύεται στο Φωτοσύστημα II (Allen and Hutcison, 1980, Turpin, 1991). Οι καλλιέργειες σε φάση εκθετικής αύξησης έχουν λαμπερό κόκκινο χρώμα, ενώ η φθίνουσα καλλιέργεια αποκτά σκούρο κοκκινο-καφέ χρωματισμό και κατόπιν πράσινο (Χώτος, 2016). Χαρακτηριστικό γνώρισμα των κυττάρων είναι η ύπαρξη δύο άνισων μαστιγίων.

Η μεγάλη θρεπτική αξία του γένους *Rhodomonas* οφείλεται μεταξύ των άλλων στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που περιέχει σε υψηλές συγκεντρώσεις, όπως π.χ το DHA (δοκοσαεξανοϊκό οξύ) και το EPA (εικοσαεπτανοϊκό οξύ), απαραίτητων για την επιβίωση και την ομαλή ανάπτυξη των ψαριών στα πρώιμα αναπτυξιακά τους στάδια (Peck and Hostle, 2006, Oostlandera et al., 2020). Σε αποτελέσματα μελετών αναφέρεται ότι η χρήση του *Rhodomonas* ως τροφή σε καλλιέργειες κωπηπόδων, συμβάλει στην αύξηση της παραγωγής των αυγών και του ρυθμού της ανάπτυξης τους (J.G. Støttrup, J. Jensen., 1990, Knuckey et al., 2005), ενώ πρόσφατες έρευνες αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα στελεχών του *Rhodomonas*, σε μεθόδους οργανικής απορρύπανσης υδάτων, μέσω μεταβολικών διεργασιών όπως η προσρόφηση, η βιοσυσσώρευση και η βιοαποικοδόμηση (Hao et al., 2020)

### 5.6.2 *Dunaliella salina*.

**Συστηματική ταξινόμηση**

**Υπερβασίλειο:** Eucaryota

**Βασίλειο:** Protista

**Φύλο:** Chlorophyta

**Κλάση:** Chlorophyceae

**Τάξη:** Chlamydomonadales

**Οικογένεια:** Dunaliellaceae

**Γένος:** *Dunaliella*

**Είδος:** *Dunaliella salina*



**Εικόνα 5.7.** *D. salina* (Lv et al., 2016)

Ως ξεχωριστό γένος το *Dunaliella* αναγνωρίστηκε και περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Teodoresco το 1905. Όλα τα είδη του γένους είναι μονοκύτταρα, χωρίς κυτταρικό τοίχωμα και διαθέτουν 2 ισομεγέθη μαστίγια. Ο μοναδικός χλωροπλάστης τους, είναι κυπελλοειδούς σχήματος και συχνά περιέχει ένα κεντρικό πυρηνοειδές.



Στον χλωροπλάστη ορισμένων ειδών συχνά απαντώνται μεγάλες ποσότητες β-καροτένιου, γεγονός που σχετίζεται με τον παροδικό πορτοκαλί (κόκκινο) χρωματισμό των κυτταρών του μικροφύκους κάτω από ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Το β-καροτένιο φαίνεται να προστατεύει τα κύτταρα από τις βλαπτικές συνέπειες της υπερϊόδους ακτινοβολίας στην οποία τα είδη του γένους εκτίθενται συχνά, στα περιβάλλοντά που αναπτύσσονται. Εκτός από το λιποδιαλυτό β-καροτένιο που αποτελεί πρόδρομη ένωση της βιταμίνης Α, τα κύτταρα της *D. salina* αποτελούν πηγή και της υδατοδιαλυτής βιταμίνης Β12 (Kumudha and Sarada, 2016). Λόγω απουσίας κυτταρικού τοιχώματος, τα κύτταρα των ειδών του γένους *Dunaliella*, εμφανίζουν μεταβλητότητα στο σχήμα τους το οποίο καθορίζεται από την ωσμωτικότητα του περιβάλλοντός τους (Oren, 2005).

Το κύτταρο του είδους *D. salina* είναι αρκετά μικρότερο συγκριτικά με άλλα είδη μαστιγοφόρων χλωροφυκών που απαντώνται σε συνθήκες υπεραλατότητας ή κανονικής αλατότητας όπως π.χ το *Rhodomonas salina* (Χώτος, 2019).

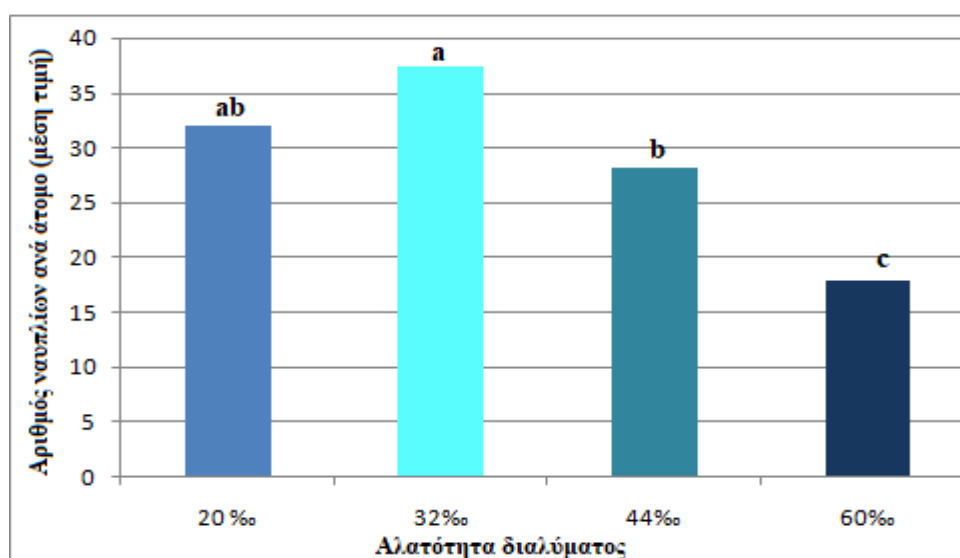
Ο αγενής πολλαπλασιασμός της *D. salina* γίνεται με κυτταρική διαίρεση κατά μήκος του κυττάρου, ενώ πραγματοποιείται και πολλαπλασιασμός μέσω σύντηξης γαμετών και δημιουργία ζυγωτού. Σύμφωνα με τους Martinez et al. (1995) σε αυξημένες τιμές αλατότητας παρατηρείται αγενής πολλαπλασιασμός, ενώ η μείωση της αλατότητας προάγει τον πολλαπλασιασμό μέσω δημιουργίας ζυγωτού.

## 6. Αποτελέσματα

### 6.1 *Tigriopus sp.*

#### 6.1.1 Συνολικός αριθμός ναυπλίων

Στα θηλυκά άτομα *Tigriopus sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Rhodomonas salina*, ο αριθμός των ναυπλίων που εκκολάφτηκαν συνολικά ανά θηλυκό άτομο είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 32‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 44‰ και 60‰. Η μέση τιμή των ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά θηλυκό άτομο σε αλατότητα 32‰ είναι μεγαλύτερη από αυτή της αλατότητας 20‰, ωστόσο η διαφορά τους δεν είναι στατιστικά σημαντική. Στην αλατότητα 60‰ η μέση τιμή των ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά θηλυκό άτομο είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αυτή που παρατηρείται στις υπόλοιπες αλατότητες (Εικ. 6.1).

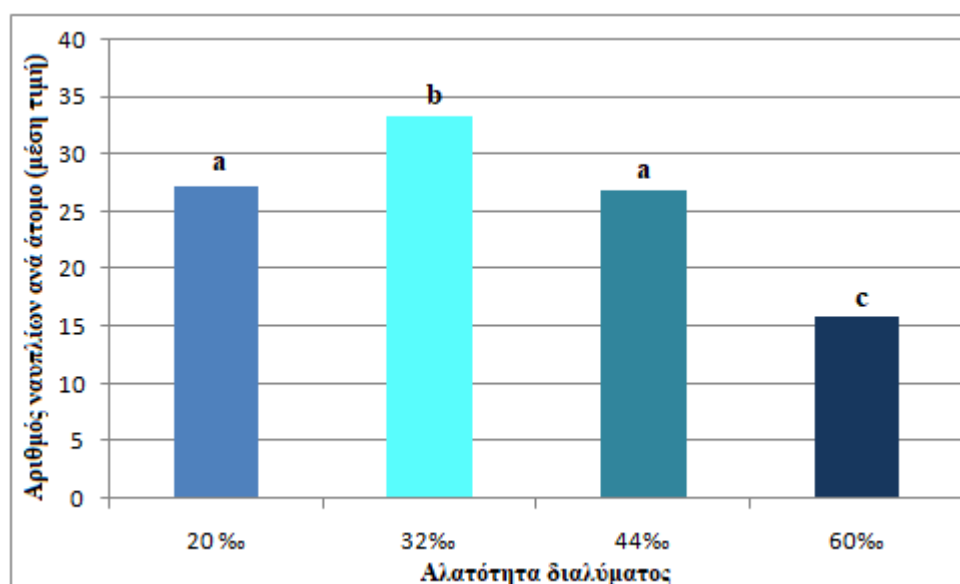


**Εικόνα 6.1.** Μέσος αριθμός ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina*. Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .

**Πίνακας 6.1.** Στατιστικές παράμετροι αριθμού ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ναυπλίων	Ελάχιστος αρ. ναυπλίων
20‰	31,944	7,9027	1,31	46	17
32‰	37,33	10,754	1,7924	54	21
44‰	28,222	9,50	1,584	46	0
60‰	17,944	7,742	1,290	28	0

Στα θηλυκά άτομα *Tigriopus sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Dunaliella salina*, η μέση τιμή του αριθμού των ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά θηλυκό άτομο είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 32‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 20‰, 44‰ και 60‰. Στην αλατότητα 60‰ η μέση τιμή των ναύπλιων που εκκολαφτήκαν ανά θηλυκό άτομο είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αυτή που παρατηρείται τις υπόλοιπες αλατότητες (Εικ. 6.2). Ο μέγιστος αριθμός ναυπλίων από ένα θηλυκό άτομο εκκολάφτηκε στην αλατότητα 32‰ (57 ναύπλιοι), ενώ στις αλατότητες 44‰ και 60‰ υπήρξαν θηλυκά άτομα που από τα αυγά των ωοσάκων τους δεν εκκολάφτηκε κανένας ναύπλιος (Πίν. 6.2).



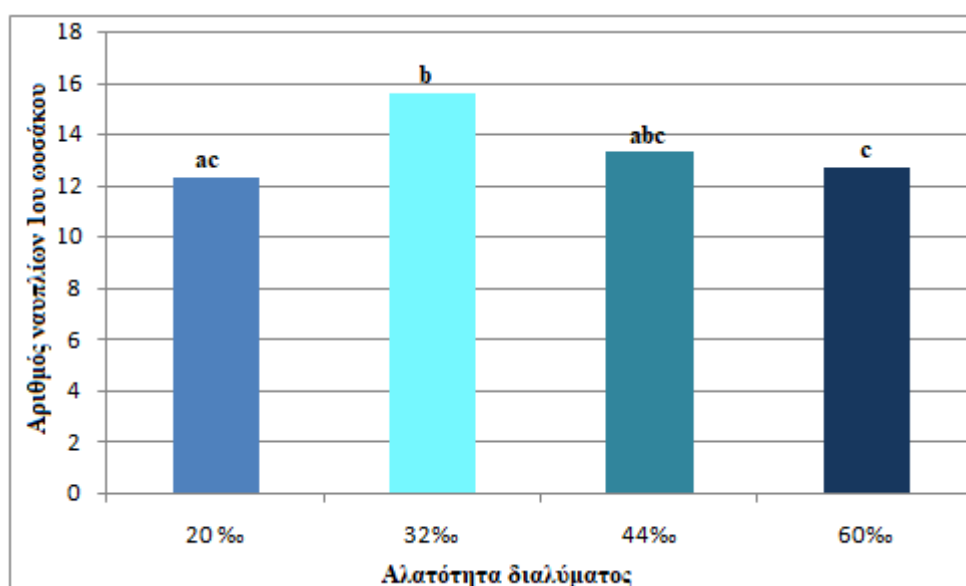
**Εικόνα 6.2.** Μέσος αριθμός ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina*. Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .

**Πίνακας 6.2.** Στατιστικές παράμετροι αριθμού ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ναυπλίων	Ελάχιστος αρ. ναυπλίων
20‰	27,25	8,226	1,37	47	12
32‰	33,194	11,119	1,853	57	19
44‰	26,833	14,952	2,492	52	0
60‰	15,833	6,1295	1,021	23	0

### 6.1.2 Αριθμός ναυπλίων 1<sup>ου</sup> ωοσάκου

Στα θηλυκά άτομα *Tigriopus sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Rhodomonas salina*, η μέση τιμή του αριθμού των ναυπλίων που εκκολάφθηκαν ανά θηλυκό άτομο από τον πρώτο ωοσάκο, είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στα θηλυκά κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 32‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 20‰ και 60‰. Η μέση τιμή των ναυπλίων στην αλατότητα 32‰ είναι μεγαλύτερη από αυτή της αλατότητας 44‰ ωστόσο η διαφορά τους δεν είναι στατιστικά σημαντική. Στην αλατότητα 20‰ η μέση τιμή των ναυπλίων είναι μικρότερη σε σχέση με τη μέση τιμή αυτών που εκκολαφτήκαν στις υπόλοιπες αλατότητες, χωρίς όμως η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική παρά μόνο με το διάλυμα αλατότητας 32‰ (Εικ. 6.3).

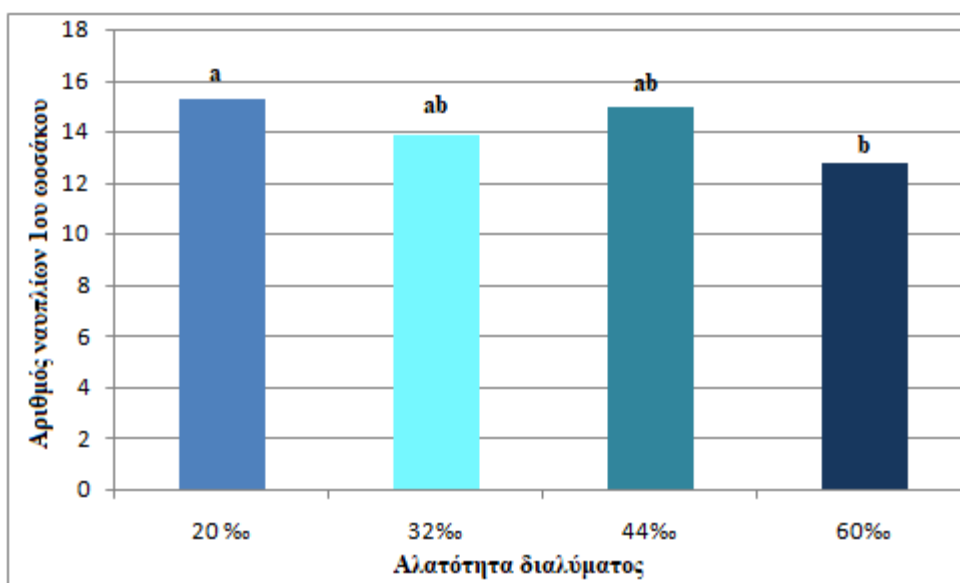


**Εικόνα 6.3.** Μέσος αριθμός ναυπλίων που εκκολάφθηκαν από τον 1<sup>ο</sup> ωοσάκο ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina*. Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .

**Πίνακας 6.3.** Στατιστικές παράμετροι αριθμού ναυπλίων που εκκολάφθηκαν από τον 1<sup>ο</sup> ωοσάκο ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ναυπλίων	Ελάχιστος αρ. ναυπλίων
20‰	12,277	3,881	0,646	17	0
32‰	15,55	4,538	0,756	24	9
44‰	13,277	4,778	0,796	22	0
60‰	12,722	6,801	1,133	21	0

Στα θηλυκά άτομα *Tigriopus sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Dunaliella salina*, η μέση τιμή του αριθμού των ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά άτομο από τον πρώτο ωοσάκο είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 20‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 60‰. Η μέση τιμή των ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά άτομο από τον πρώτο ωοσάκο σε αλατότητα 20‰ είναι μεγαλύτερη από αυτή των υπόλοιπων αλατοτήτων χωρίς όμως η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική παρά μόνο με το διάλυμα αλατότητας 60‰ (Εικ. 6.4).



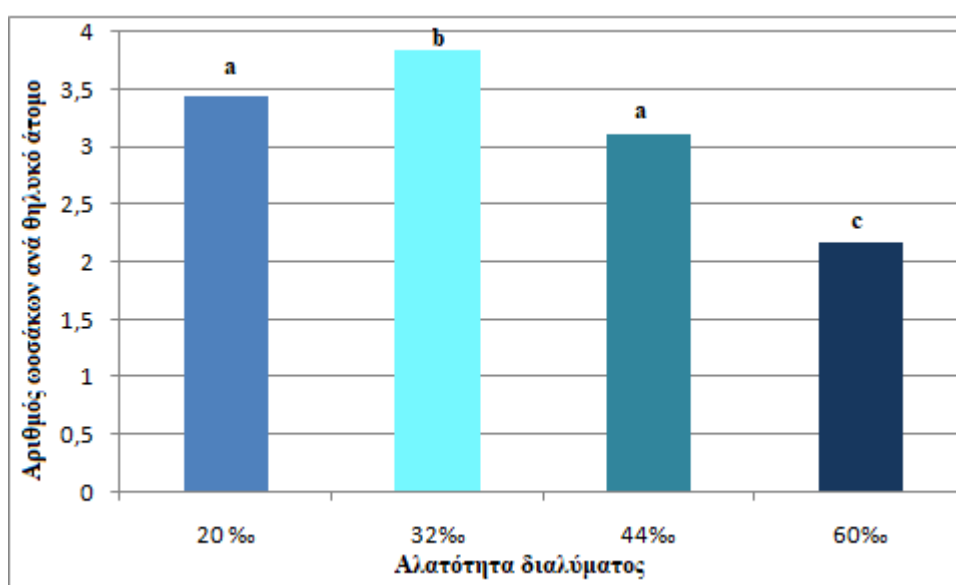
**Εικόνα 6.4.** Μέσος αριθμός ναυπλίων που εκκολάφτηκαν από τον 1<sup>ο</sup> ωοσάκο ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina*. Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .

**Πίνακας 6.4.** Στατιστικές παράμετροι αριθμού ναυπλίων που εκκολάφτηκαν από τον 1<sup>ο</sup> ωοσάκο ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ναυπλίων	Ελάχιστος αρ. ναυπλίων
20‰	15,277	3,746	0,624	22	10
32‰	13,88	3,350	0,558	22	8
44‰	14,944	6,832	1,138	28	0
60‰	12,75	5,206	0,867	20	0

### 6.1.3. Αριθμός ωοσάκων

Στα θηλυκά άτομα *Tigriopus sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Rhodomonas salina*, η μέση τιμή των συνολικών ωοσάκων που παρήγαγε το κάθε θηλυκό είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 32‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν στις υπόλοιπες αλατότητες. Στην αλατότητα 60‰ η μέση τιμή των συνολικών ωοσάκων ανά θηλυκό άτομο ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αυτή στις υπόλοιπες αλατότητες (Εικ. 6.5). Η μέση τιμή των συνολικών ωοσάκων ανά θηλυκό άτομο μεταξύ των τιμών αλατότητας 20‰ και 44‰ δεν είναι στατιστικά σημαντική.

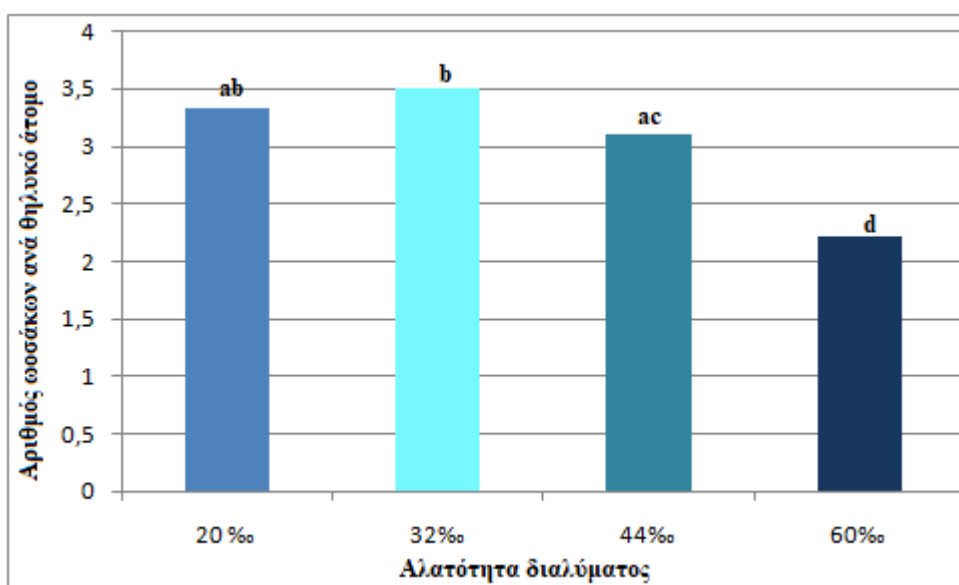


**Εικόνα 6.5.** Μέση τιμή συνολικού αριθμού ωοσάκων ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina*. Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .

**Πίνακας 6.5.** Στατιστικές παράμετροι αριθμού ωοσάκων ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ωοσάκων	Ελάχιστος αρ. ωοσάκων
20‰	3,444	0,5039	0,083	4	2
32‰	3,83	0,696	0,116	5	2
44‰	3,11	0,667	0,111	4	2
60‰	2,166	0,696	0,116	3	1

Στα θηλυκά άτομα *Tigriopus sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Dunaliella salina*, η μέση τιμή των συνολικών ωοσάκων που παρήγαγε το κάθε θηλυκό είναι μεγαλύτερη στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 32‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν στις υπόλοιπες αλατότητες δεν παρουσιάζει όμως στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την αλατότητα 20‰. Στην αλατότητα 60‰ η μέση τιμή των συνολικών ωοσάκων ανά θηλυκό άτομο είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αυτή στις υπόλοιπες αλατότητες Η μέση τιμή των συνολικών ωοσάκων ανά θηλυκό άτομο μεταξύ των τιμών αλατότητας 20‰ και 44‰ δεν είναι στατιστικά σημαντική (Εικ. 6.6).



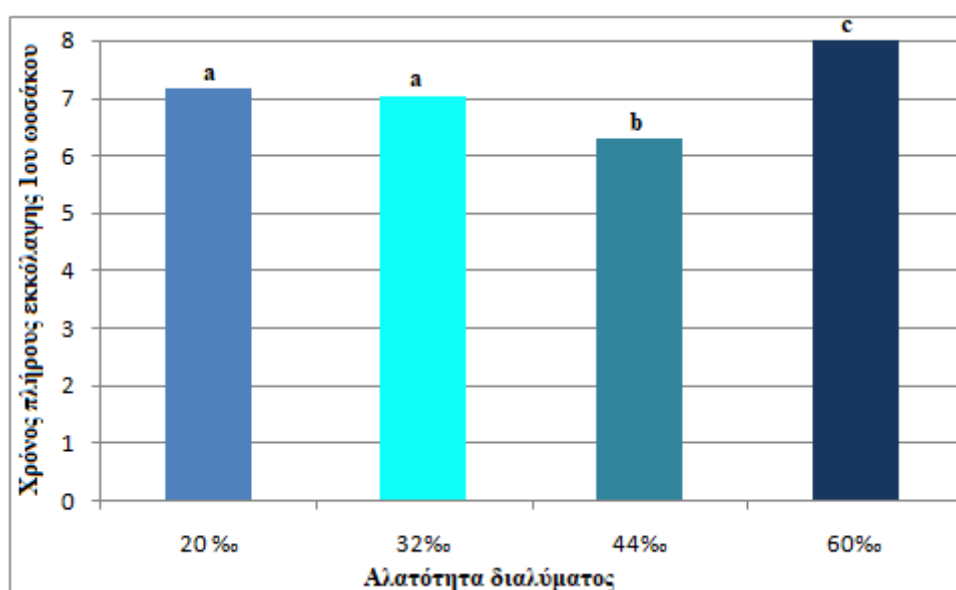
**Εικόνα 6.6.** Μέση τιμή συνολικού αριθμού ωοσάκων ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina*. Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .

**Πίνακας 6.6.** Στατιστικές παράμετροι αριθμού ωοσάκων ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ωοσάκων	Ελάχιστος αρ. ωοσάκων
20‰	3,33	0,756	0,126	5	2
32‰	3,5	0,774	0,129	5	2
44‰	3,111	0,574	0,095	4	2
60‰	2,222	0,865	0,144	4	1

#### 6.1.4. Χρόνος εκκόλαψης 1<sup>ου</sup> ωοσάκου

Στα θηλυκά άτομα *Tigriopus sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Rhodomonas salina*, η μέση τιμή του χρόνου που απαιτήθηκε για την εκκόλαψη των ναυπλίων του 1<sup>ου</sup> ωοσάκου μέχρι την απόρριψη του από τα θηλυκά άτομα είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 60‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν στις υπόλοιπες αλατότητες. Στην αλατότητα 44‰ η μέση τιμή του χρόνου είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αυτή στις υπόλοιπες αλατότητες. Η διαφορά της μέσης τιμής του χρόνου μεταξύ των τιμών αλατότητας 20‰ και 44‰ δεν στατιστικά σημαντική (Εικ. 6.7).



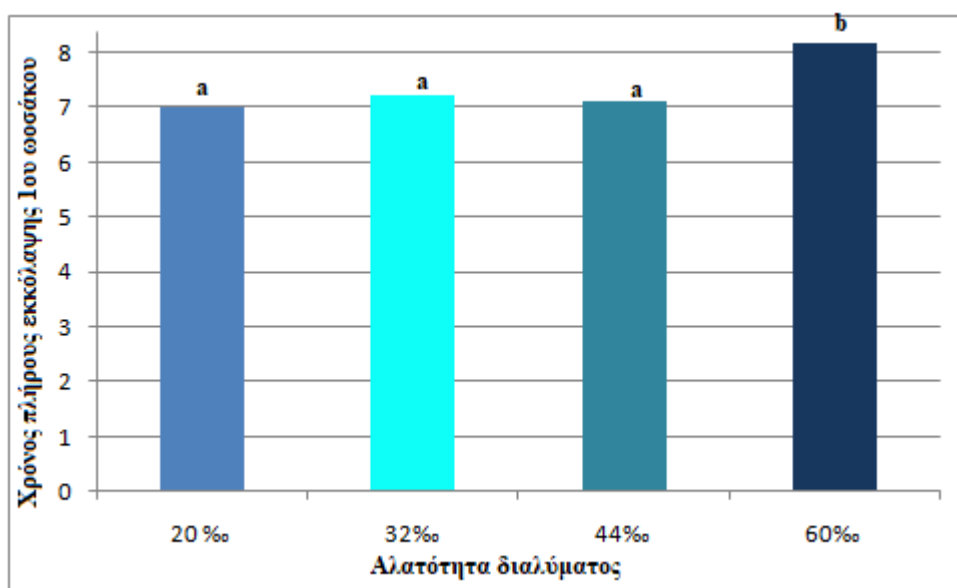
**Εικόνα 6.7.** Μέση τιμή χρόνου πλήρους εκκόλαψης 1<sup>ου</sup> ωοσάκου ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina* (σε ημέρες). Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .

**Πίνακας 6.7.** Στατιστικές παράμετροι χρόνου πλήρους εκκόλαψης 1<sup>ου</sup> ωοσάκου ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ημερών	Ελάχιστος αρ. ημερών
20‰	7,166	1,424	0,237	10	4
32‰	7,027	1,341	0,223	9	4
44‰	6,277	1,161	0,193	8	4
60‰	8,19	1,190	0,198	11	6



Στα θηλυκά άτομα *Tigriopus sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Dunaliella salina*, η μέση τιμή του χρόνου που απαιτήθηκε για την εκκόλαψη των ναυπλίων του 1<sup>ου</sup> ωσάκου μέχρι την απόρριψη του από τα θηλυκά άτομα είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 60‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν στις υπόλοιπες αλατότητες. Η διαφορά της μέσης τιμής του χρόνου μεταξύ των τιμών αλατότητας 20‰, 32‰ και 44‰ δεν στατιστικά σημαντική (Εικ. 6.8).



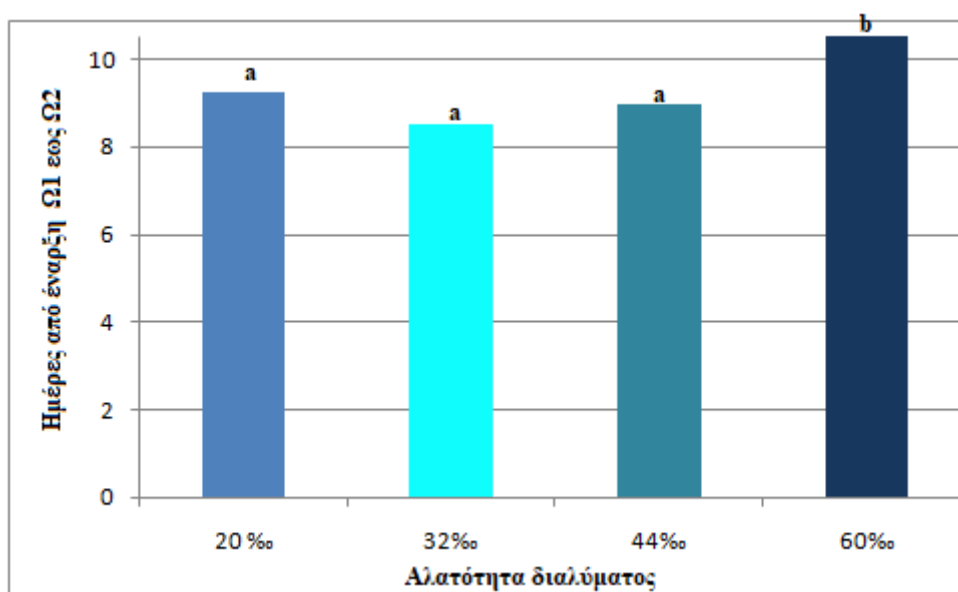
**Εικόνα 6.8.** Μέση τιμή χρόνου πλήρους εκκόλαψης 1<sup>ου</sup> ωσάκου ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina* (σε ημέρες). Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .

**Πίνακας 6.8.** Στατιστικές παράμετροι χρόνου πλήρους εκκόλαψης 1<sup>ου</sup> ωσάκου ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ημερών	Ελάχιστος αρ. ημερών
20‰	7,027	1,335	0,189	9	4
32‰	7,222	1,737	0,195	9	4
44‰	7,055	0,826	0,137	9	5
60‰	8,166	1,158	0,193	11	5

### 6.1.5 Χρόνος μεταξύ των δύο πρώτων ωοτοκιών

Στα θηλυκά άτομα *Tigriopus sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Rhodomonas salina*, η μέση τιμή του χρόνου σε ημέρες από την εμφάνιση του πρώτου ωοσάκου έως την εμφάνιση του δεύτερου ωοσάκου ανά θηλυκό άτομο, είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 60‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν στις υπόλοιπες αλατότητες. Στην αλατότητα 32‰ η μέση τιμή του χρόνου είναι μικρότερη σε σχέση με αυτή στις αλατότητες 20‰ και 44‰, η μεταξύ τους διαφορά όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική (Εικ. 6.9).

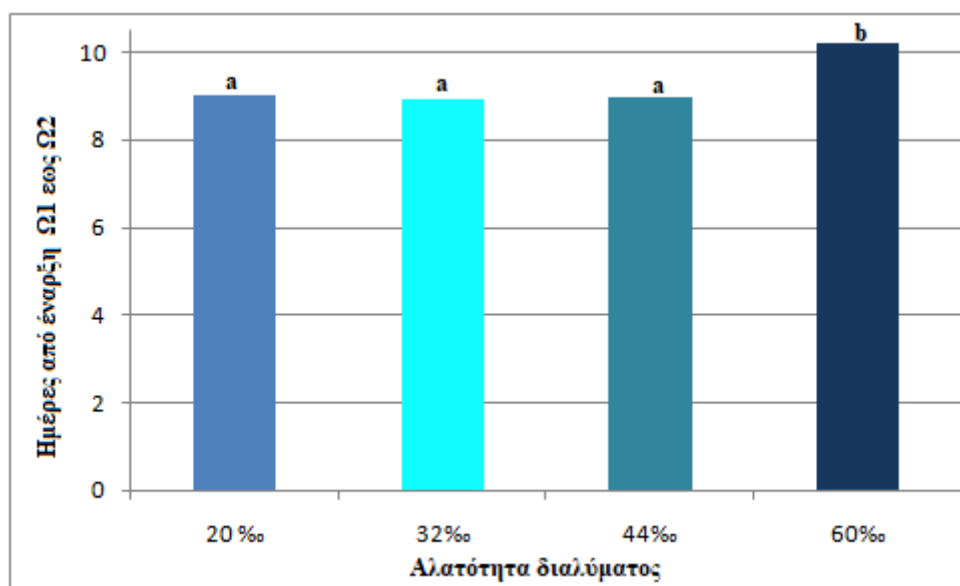


**Εικόνα 6.9.** Μέση τιμή χρόνου σε ημέρες από την εμφάνιση του πρώτου ωοσάκου έως την εμφάνιση του δεύτερου ωοσάκου ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina* (σε ημέρες). Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .

**Πίνακας 6.9.** Στατιστικές παράμετροι χρόνου από την εμφάνιση του πρώτου ωοσάκου έως την εμφάνιση του δεύτερου ωοσάκου ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ημερών	Ελάχιστος αρ. ημερών
20‰	9,25	1,537	0,256	12	6
32‰	8,527	1,32	0,219	11	6
44‰	8,944	1,12	0,186	11	7
60‰	10,694	1,064	0,177	13	9

Στα θηλυκά άτομα *Tigriopus sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Dunaliella salina*, η μέση τιμή του χρόνου σε ημέρες από την εμφάνιση του πρώτου ωοσάκου έως την εμφάνιση του δεύτερου ωοσάκου ανά θηλυκό άτομο, είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 60‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν στις υπόλοιπες αλατότητες. Στην αλατότητα 32‰ η μέση τιμή του χρόνου είναι μικρότερη σε σχέση με αυτή στις αλατότητες 20‰ και 44‰, η μεταξύ τους διαφορά όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική (Εικ. 6.10).



**Εικόνα 6.10.** Μέση τιμή χρόνου σε ημέρες από την εμφάνιση του πρώτου ωοσάκου έως την εμφάνιση του δεύτερου ωοσάκου ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina* (σε ημέρες). Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .

**Πίνακας 6.10.** Στατιστικές παράμετροι χρόνου από την εμφάνιση του πρώτου ωοσάκου έως την εμφάνιση του δεύτερου ωοσάκου ανά θηλυκό άτομο *Tigriopus sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ημερών	Ελάχιστος αρ. ημερών
20‰	9	0,958	0,154	10	6
32‰	8,916	1,130	0,1884	11	6
44‰	8,972	0,940	0,56	11	7
60‰	10,194	1,116	0,186	13	8

### 6.1.6 Εκατοστιαία αναλογία θηλυκών ατόμων

Στον Πίνακα 6.11 αναφέρεται η % αναλογία θηλυκών ατόμων επί του συνόλου των ενήλικων ατόμων που προέκυψαν από το σύνολο των θηλυκών ατόμων (36) σε κάθε αλατότητα. Τα άτομα που πέθαναν σε στάδιο πριν από αυτό των ενήλικων ατόμων (ναύπλιοι – κωπηποδίτες) δεν συμπεριλαμβάνονται για τον υπολογισμό της % αναλογίας θηλυκών ατόμων.

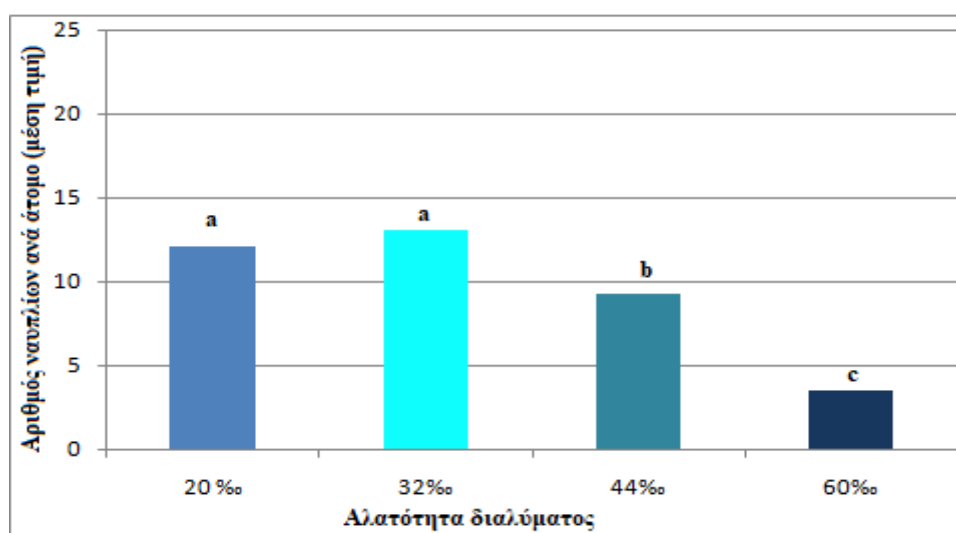
**Πίνακας 6.11.** Εκατοστιαία αναλογία θηλυκών ατόμων *Tigriopus sp.* επί του συνόλου των ενήλικων ατόμων σε κάθε τιμή αλατότητας.

		% Αναλογία θηλυκών	
Τροφή		<i>Rhodomonas salina</i>	<i>Dunaliella salina</i>
Αλατότητα			
22‰		59,12	61,23
32‰		56,8	54,1
44‰		62,3	55,4
60‰		48,7	47,34

## 6.2 *Tisbe sp.*

### 6.2.1 Συνολικός αριθμός ναυπλίων

Στα θηλυκά άτομα *Tisbe sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Rhodomonas salina*, ο αριθμός των ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά θηλυκό άτομο είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 32‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 44‰ και 60‰. Η μέση τιμή των ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά θηλυκό άτομο σε αλατότητα 32‰ είναι μεγαλύτερη από αυτή της αλατότητας 20‰ ωστόσο η διαφορά τους δεν είναι στατιστικά σημαντική. Στην αλατότητα 60‰ η μέση τιμή των ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά θηλυκό άτομο είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αυτή που παρατηρείται στις υπόλοιπες αλατότητες (Εικ 6.11).

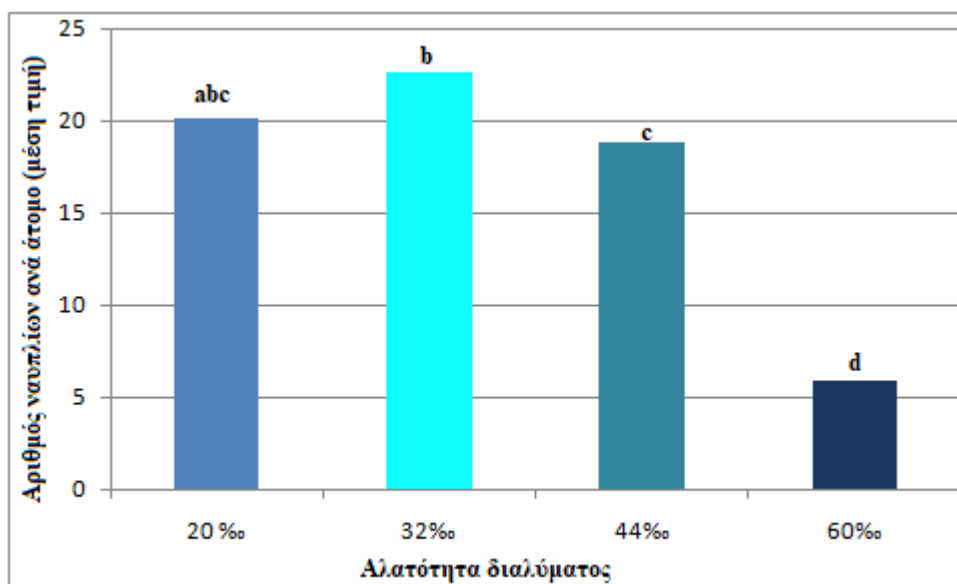


**Εικόνα 6.11.** Μέσος αριθμός ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina*. Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .

**Πίνακας 6.11.** Στατιστικές παράμετροι αριθμού ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ναυπλίων	Ελάχιστος αρ. ναυπλίων
20‰	12,111	4,314	0,719	18	0
32‰	13,055	3,632	0,605	19	8
44‰	9,2222	3,015	0,5025	14	0
60‰	3,5	2,99	0,498	8	0

Στα θηλυκά άτομα *Tisbe sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Dunaliella salina*, η μέση τιμή του αριθμού των ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά θηλυκό άτομο είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 32‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 44‰ και 60‰. Στην αλατότητα 60‰ η μέση τιμή των ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά θηλυκό άτομο είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αυτή που παρατηρείται τις υπόλοιπες αλατότητες (Εικόνα 6.12). Ο μέγιστος αριθμός ναυπλίων από ένα θηλυκό άτομο εκκολάφτηκε στην αλατότητα 32‰ (34 ναύπλιοι), ενώ σε όλες τις αλατότητες υπήρξαν θηλυκά άτομα που από τα αυγά των ωοσάκων τους δεν εκκολάφτηκε κανένας ναύπλιος (Πίνακας 6.12).



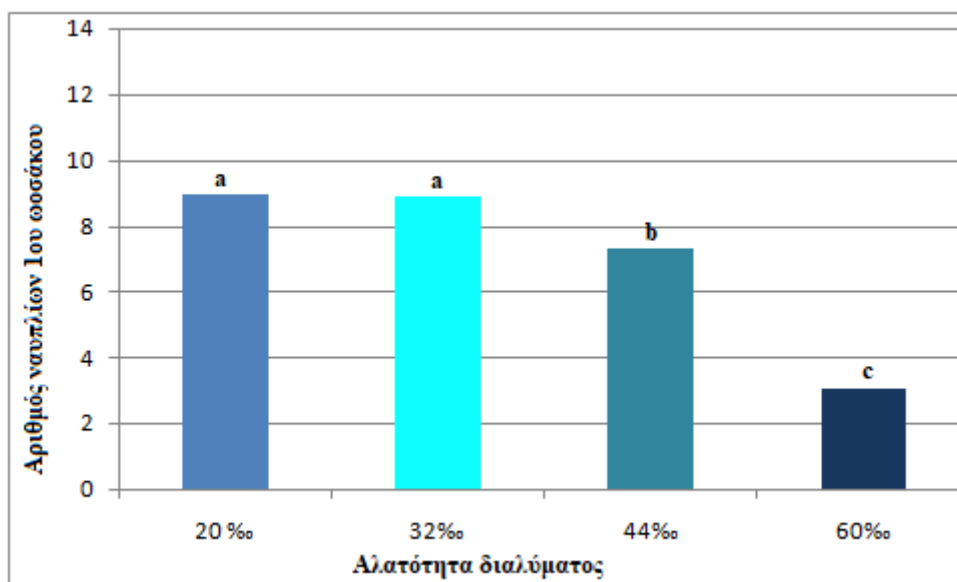
**Εικόνα 6.12.** Μέσος αριθμός ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina*. Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .

**Πίνακας 6.12.** Στατιστικές παράμετροι αριθμού ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ναυπλίων	Ελάχιστος αρ. ναυπλίων
20‰	20,138	6,000	1,000	26	0
32‰	22,667	7,90	1,31	34	0
44‰	18,83	7,125	1,187	32	0
60‰	5,833	4,43	0,798	11	0

## 6.2.2 Αριθμός ναυπλίων 1<sup>ο</sup> ωοσάκου

Στα θηλυκά άτομα *Tisbe sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Rhodomonas salina*, η μέση τιμή του αριθμού των ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά θηλυκό άτομο από τον πρώτο ωοσάκο, είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στα θηλυκά κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 32‰ και 20‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 44‰ και 60‰. Η μέση τιμή των ναυπλίων στην αλατότητα 20‰ είναι μεγαλύτερη από αυτή της αλατότητας 32‰ ωστόσο η διαφορά τους δεν είναι στατιστικά σημαντική. Στην αλατότητα 60‰ η μέση τιμή των ναυπλίων είναι μικρότερη σε σχέση με τη μέση τιμή αυτών που εκκολαφτήκαν στις υπόλοιπες αλατότητες (Εικ. 6.13).

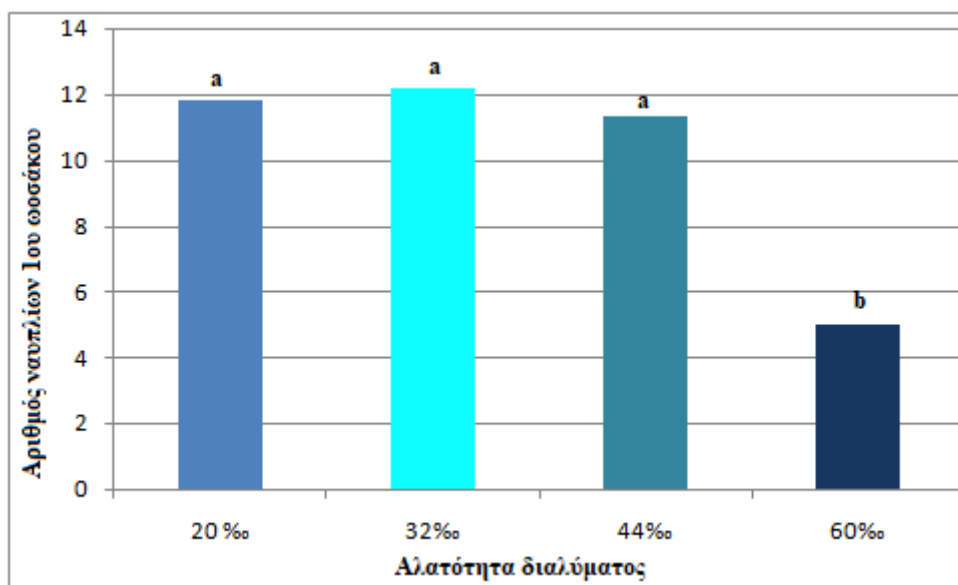


**Εικόνα 6.13.** Μέσος αριθμός ναυπλίων που εκκολάφτηκαν από τον 1<sup>ο</sup> ωοσάκο ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina*. Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .

**Πίνακας 6.13.** Στατιστικές παράμετροι αριθμού ναυπλίων που εκκολάφτηκαν από τον 1<sup>ο</sup> ωοσάκο ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ναυπλίων	Ελάχιστος αρ. ναυπλίων
20‰	8,944	2,672	0,445	14	0
32‰	8,88	1,326	0,221	11	6
44‰	7,305	2,376	0,396	12	0
60‰	3,055	2,485	0,413	7	0

Στα θηλυκά άτομα *Tisbe sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Dunaliella salina*, η μέση τιμή του αριθμού των ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά άτομο από τον πρώτο ωοσάκο είναι μεγαλύτερη στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 32‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν στις υπόλοιπες αλατότητες χωρίς όμως να παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις αλατότητες 20‰ και 44‰. Η μέση τιμή των ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά άτομο από τον πρώτο ωοσάκο σε αλατότητα 60‰ είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη από αυτή των υπόλοιπων αλατοτήτων (Εικ. 6.14).



**Εικόνα 6.14.** Μέσος αριθμός ναυπλίων που εκκολάφτηκαν από τον 1<sup>ο</sup> ωοσάκο ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina*. Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .

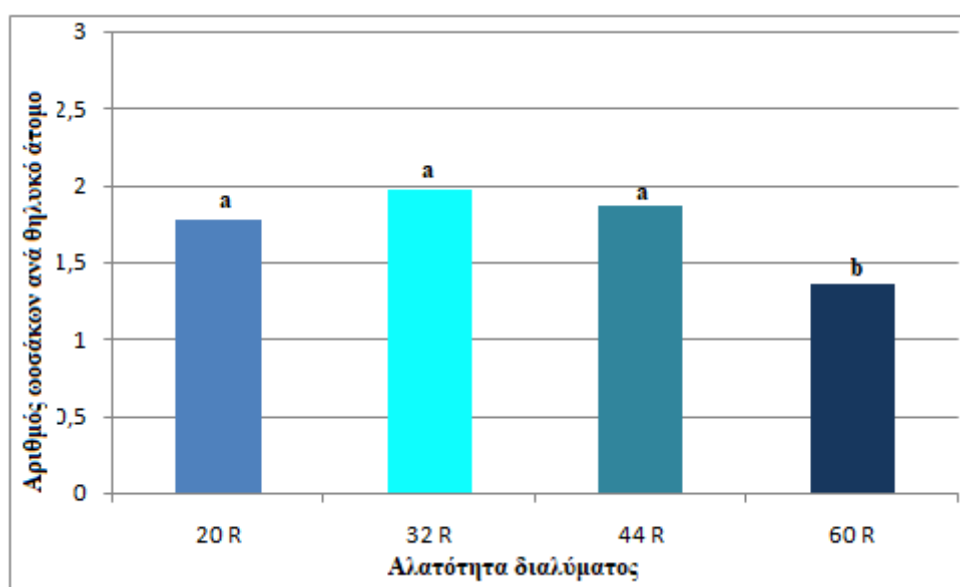
**Πίνακας 6.14.** Στατιστικές παράμετροι αριθμού ναυπλίων που εκκολάφτηκαν από τον 1<sup>ο</sup> ωοσάκο ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ναυπλίων	Ελάχιστος αρ. ναυπλίων
20‰	11,80	3,99	0,667	19	0
32‰	12,167	4,150	0,691	18	0
44‰	11,305	3,755	0,625	18	0
60‰	5	3,971	0,661	11	0



### 6.2.3 Αριθμός ωοσάκων

Στα θηλυκά άτομα *Tisbe sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Rhodomonas salina*, η μέση τιμή των συνολικών ωοσάκων που παρήγαγε το κάθε θηλυκό άτομο είναι μεγαλύτερη στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 32‰ σε σύγκριση με τις τιμές αυτών που αναπτύχθηκαν στις υπόλοιπες αλατότητες, δεν παρουσιάζει όμως στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τη μέση τιμή στις αλατότητες 20‰ και 44‰. Στην αλατότητα 60‰ η μέση τιμή των συνολικών ωοσάκων ανά θηλυκό άτομο είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αυτή στις υπόλοιπες αλατότητες (Εικ. 6.15).

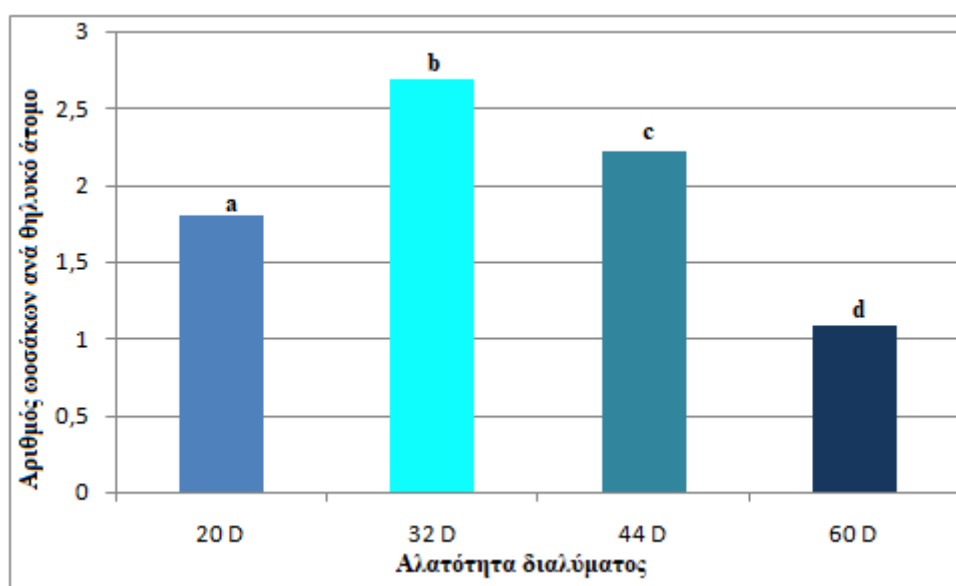


**Εικόνα 6.15.** Μέση τιμή συνολικού αριθμού ωοσάκων ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina*. Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .

**Πίνακας 6.15.** Στατιστικές παράμετροι αριθμού ωοσάκων ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ωοσάκων	Ελάχιστος αρ. ωοσάκων
20‰	1,777	0,637	0,1062	3	1
32‰	1,972	0,693	0,116	3	1
44‰	1,8611	0,6392	0,1065	3	1
60‰	1,3611	0,487	0,081	2	1

Στα θηλυκά άτομα *Tisbe sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Dunaliella salina*, η μέση τιμή των συνολικών ωοσάκων που παρήγαγε το κάθε θηλυκό είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 32‰ σε σύγκριση με την τιμή αυτών που αναπτύχθηκαν στις υπόλοιπες αλατότητες. Στην αλατότητα 60‰ η μέση τιμή των συνολικών ωοσάκων ανά θηλυκό άτομο είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αυτή στις υπόλοιπες αλατότητες (Εικ. 6.16).



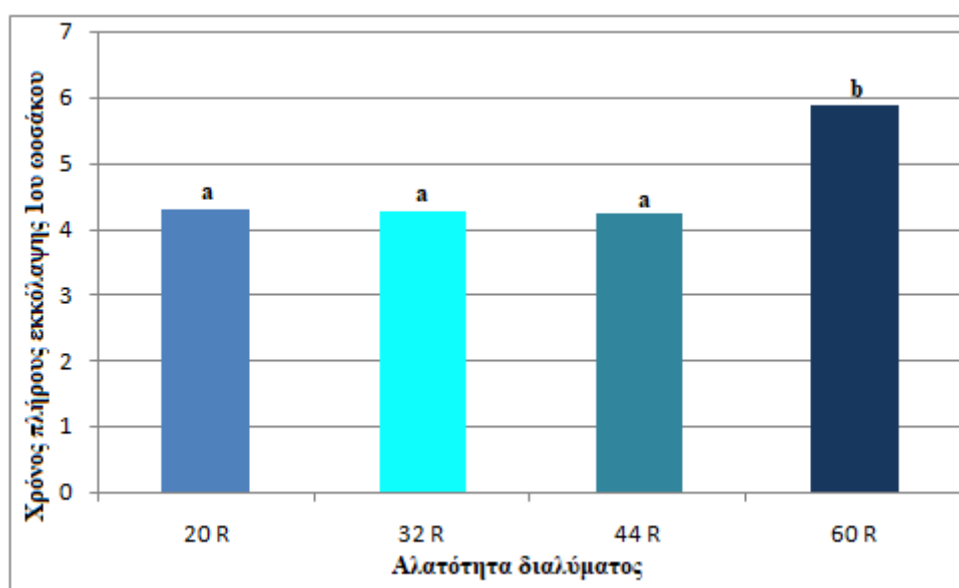
**Εικόνα 6.16.** Μέση τιμή συνολικού αριθμού ωοσάκων ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina*. Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .

**Πίνακας 6.16.** Στατιστικές παράμετροι αριθμού ωοσάκων ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ωοσάκων	Ελάχιστος αρ. ωοσάκων
20‰	1,805	0,668	0,111	3	1
32‰	2,694	0,786	0,131	5	2
44‰	2,222	0,680	0,113	4	1
60‰	1,083	0,439	0,07	2	0

#### 6.2.4 Χρόνος εκκόλαψης 1<sup>ου</sup> ωοσάκου

Στα θηλυκά άτομα *Tisbe sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Rhodomonas salina*, η μέση τιμή του χρόνου που απαιτήθηκε για την εκκόλαψη των ναυπλίων του 1<sup>ου</sup> ωοσάκου μέχρι την απόρριψη του από τα θηλυκά άτομα είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 60‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν στις υπόλοιπες αλατότητες. Η διαφορά της μέσης τιμής του χρόνου μεταξύ των τιμών αλατότητας 20‰, 32‰ και 44‰ δεν στατιστικά σημαντική (Εικ. 6.17).

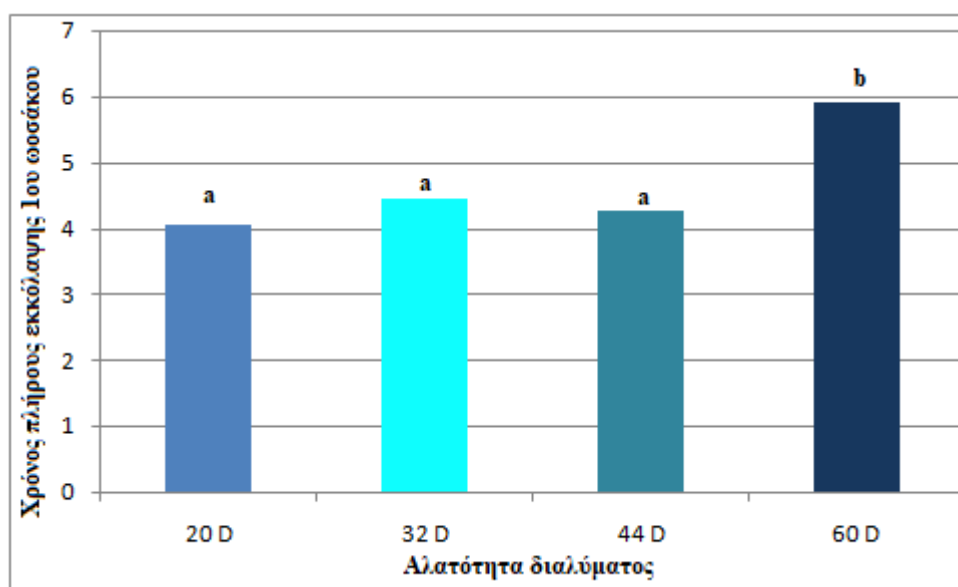


**Εικόνα 6.17.** Μέση τιμή χρόνου πλήρους εκκόλαψης 1<sup>ου</sup> ωοσάκου ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina* (σε ημέρες). Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$

**Πίνακας 6.17.** Στατιστικές παράμετροι χρόνου πλήρους εκκόλαψης 1<sup>ου</sup> ωοσάκου ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ημερών	Ελάχιστος αρ. ημερών
20‰	4,305	0,709	0,118	6	3
32‰	4,25	0,603	0,100	5	3
44‰	4,222	0,760	0,126	6	3
60‰	5,88	1,304	0,217	8	4

Στα θηλυκά άτομα *Tisbe sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Dunaliella salina*, η μέση τιμή του χρόνου που απαιτήθηκε για την εκκόλαψη των ναυπλίων του 1<sup>ου</sup> ωσάκου μέχρι την απόρριψη του από τα θηλυκά άτομα είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 60‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν στις υπόλοιπες αλατότητες. Η διαφορά της μέσης τιμής του χρόνου μεταξύ των τιμών αλατότητας 20‰, 32‰ και 44‰ δεν στατιστικά σημαντική (Εικ. 6.18).



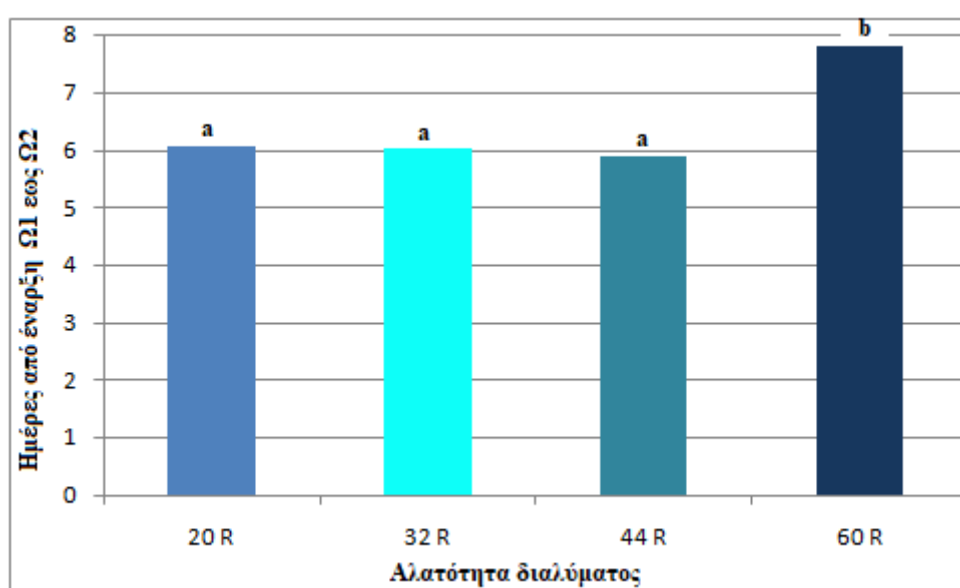
**Εικόνα 6.18.** Μέση τιμή χρόνου πλήρους εκκόλαψης 1<sup>ου</sup> ωσάκου ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina* (σε ημέρες). Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .

**Πίνακας 6.18.** Στατιστικές παράμετροι χρόνου πλήρους εκκόλαψης 1<sup>ου</sup> ωσάκου ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ημερών	Ελάχιστος αρ. ημερών
20‰	4,055	0,714	0,119	5	3
32‰	4,444	0,843	0,140	6	3
44‰	4,25	0,840	0,140	6	3
60‰	5,91	1,317	0,219	9	4

### 6.2.5 Χρόνος μεταξύ των δύο πρώτων ωοτοκιών

Στα θηλυκά άτομα *Tisbe sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Rhodomonas salina*, η μέση τιμή του χρόνου σε ημέρες από την εμφάνιση του πρώτου ωοσάκου έως την εμφάνιση του δεύτερου ωοσάκου ανά θηλυκό άτομο, είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 60‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν στις υπόλοιπες αλατότητες. Στην αλατότητα 44‰ η μέση τιμή του χρόνου είναι μικρότερη σε σχέση με αυτή στις αλατότητες 20‰ και 32‰, η μεταξύ τους διαφορά όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική (Εικ. 6.19).

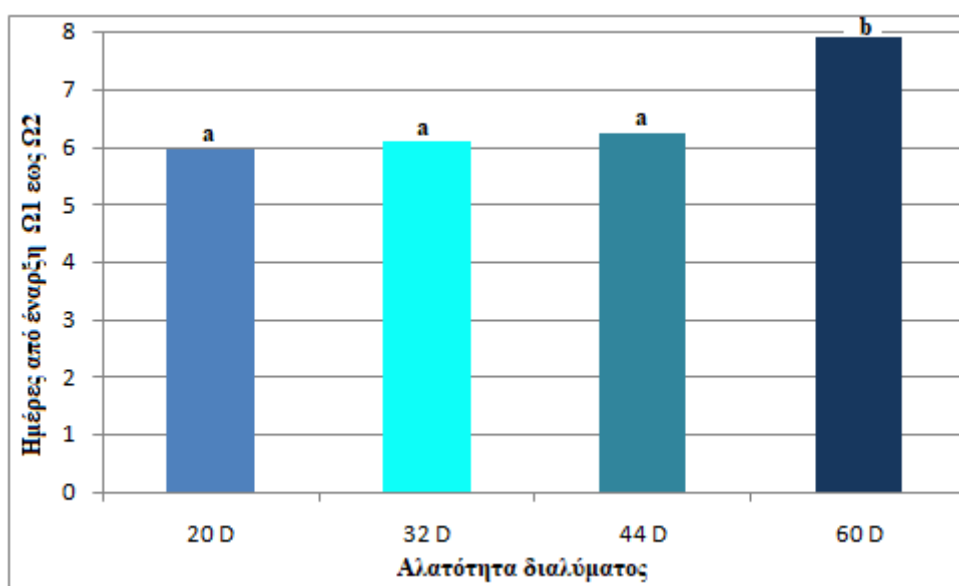


**Εικόνα 6.19.** Μέση τιμή χρόνου σε ημέρες από την εμφάνιση του πρώτου ωοσάκου έως την εμφάνιση του δεύτερου ωοσάκου ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina* (σε ημέρες). Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .

**Πίνακας 6.19.** Στατιστικές παράμετροι χρόνου από την εμφάνιση του πρώτου ωοσάκου έως την εμφάνιση του δεύτερου ωοσάκου ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Rhodomonas salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ημερών	Ελάχιστος αρ. ημερών
20‰	6,055	0,92	0,154	8	4
32‰	6,027	0,736	0,122	8	4
44‰	5,888	0,627	0,1111	7	5
60‰	7,805	1,214	0,202	10	6

Στα θηλυκά άτομα *Tisbe sp.* που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Dunaliella salina*, η μέση τιμή του χρόνου σε ημέρες από την εμφάνιση του πρώτου ωοσάκου έως την εμφάνιση του δεύτερου ωοσάκου ανά θηλυκό άτομο, είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 60‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν στις υπόλοιπες αλατότητες. Στην αλατότητα 20‰ η μέση τιμή του χρόνου είναι μικρότερη σε σχέση με αυτή στις αλατότητες 32‰ και 44‰, η μεταξύ τους διαφορά όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική (Εικ. 6.20).



**Εικόνα 6.20.** Μέση τιμή χρόνου σε ημέρες από την εμφάνιση του πρώτου ωοσάκου έως την εμφάνιση του δεύτερου ωοσάκου ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina* (σε ημέρες). Τιμές-στήλες που φέρουν το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ .

**Πίνακας 6.20.** Στατιστικές παράμετροι χρόνου από την εμφάνιση του πρώτου ωοσάκου έως την εμφάνιση του δεύτερου ωοσάκου ανά θηλυκό άτομο *Tisbe sp.* που τράφηκε με *Dunaliella salina*.

Αλατότητα	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα	Μέγιστος αρ. ημερών	Ελάχιστος αρ. ημερών
20‰	5,944	0,826	0,137	8	4
32‰	6,083	0,90	0,151	8	4
44‰	6,222	0,929	0,154	8	4
60‰	7,916	1,317	0,219	11	5

### 6.2.6 Εκατοστιαία αναλογία θηλυκών ατόμων

Στον Πίνακα 6.21 αναφέρεται η % αναλογία θηλυκών ατόμων επί του συνόλου των ενήλικων ατόμων που προέκυψαν από το σύνολο των θηλυκών ατόμων (36) σε κάθε αλατότητα. Τα άτομα που πέθαναν σε στάδιο πριν από αυτό των ενήλικων ατόμων (ναύπλιοι – κωπηποδίτες) δεν συμπεριλαμβάνονται για τον υπολογισμό της % αναλογίας θηλυκών ατόμων.

**Πίνακας 6.21.** Εκατοστιαία αναλογία θηλυκών ατόμων *Tisbe sp.* επί του συνόλου των ενήλικων ατόμων σε κάθε τιμή αλατότητας.

		% Αναλογία θηλυκών	
		<i>Rhodomonas salina</i>	<i>Dunaliella salina</i>
Αλατότητα	Τροφή		
22‰		54,2	52,4
32‰		49,4	59,8
44‰		45,4	51,6
60‰		42,6	61,4

## 7. Συζήτηση

### 7.1 *Tigriopus sp.*

Στα θηλυκά άτομα *Tigriopus sp.* ο αριθμός των ναυπλίων που εκκολάφτηκαν συνολικά ανά θηλυκό άτομο είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 32‰ και για τα δύο είδη τροφής που χρησιμοποιήθηκαν. Στα άτομα που τράφηκαν με *Rhodomonas salina* η μέση τιμή του συνολικού αριθμού ναυπλίων ανά θηλυκό άτομο στην ευνοϊκότερη τιμή αλατότητας (32‰) είναι 37,3 ενώ στα άτομα που τράφηκαν με *Dunaliella salina* στην ίδια τιμή αλατότητας η μέση τιμή είναι 33,94 ναύπλιοι. Σε αντίστοιχη μελέτη των Biandolino et al. (2018) σε άτομα του είδους *Tigriopus fulvus* που τράφηκαν με μείγμα *Tetraselmis suecica* και *Isochrysis galbana* η αλατότητα επηρέασε σημαντικά την αναπαραγωγική διαδικασία. Στην τιμή αλατότητας 38‰ που υπήρξε η ευνοϊκότερη στη συγκεκριμένη μελέτη, η μέση τιμή του συνολικού αριθμού ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά θηλυκό άτομο ήταν 67, σημαντικά υψηλότερη από αυτές που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Η διαφορά πιθανών να σχετίζεται τόσο με γενετικούς παράγοντες όσο και με το είδος της τροφής που χρησιμοποιήθηκε. Πολλοί ερευνητές έχουν πραγματοποιήσει μελέτες για το συσχετισμό της αναπαραγωγής διαφόρων ειδών κωπηπόδων με τα είδη του φυτοπλαγκτού που χρησιμοποιείται για τη διατροφή τους τόσο στο φυσικό περιβάλλον όσο και σε συνθήκες εργαστηρίου. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των αναπαραγωγικών χαρακτηριστικών των κωπηπόδων (γονιμότητα, επιτυχία επώασης, επιβίωση ναυπλίων) και την ποσότητα, αλλά και τα χαρακτηριστικά φυκών όπως το μέγεθος, η μορφολογία, η τοξικότητα και η βιοχημική τους σύνθεση (Hussain et al., 2020).

Ο μέγιστος αριθμός ναυπλίων που εκκολάφτηκε στην παρούσα μελέτη από τον 1<sup>ο</sup> ωοσάκο θηλυκού ατόμου που τράφηκε με *Rhodomonas salina* είναι 24 ναύπλιοι στην τιμή αλατότητας 32‰, ενώ αντίστοιχα ο μέγιστος αριθμός για τα θηλυκά που τράφηκαν με *Dunaliella salina* είναι 28 ναύπλιοι στην τιμή αλατότητας 44‰. Οι μέσες τιμές είναι σημαντικά χαμηλότερες γιατί επηρεάζονται από το γεγονός ότι ορισμένα θηλυκά άτομα στα πλαίσια της προσαρμογής τους στις νέες τιμές αλατότητας που τοποθετήθηκαν, απέρριψαν τον 1<sup>ο</sup> ωοσάκο τους χωρίς να γίνει εκκόλαψη των αυγών τους. Σε αντίστοιχη μελέτη των Lee και Hu (1980) με άτομα του είδους *Tigriopus japonicum* σε τιμή αλατότητας 30,7 ‰ παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη μέση τιμή ναυπλίων ανά ωοσάκο (36 ναύπλιοι), ενώ για άτομα του ίδιου είδους οι Hagiwara et al. (1995) παρατήρησαν σε τιμή αλατότητας 32‰ τη



μεγαλύτερη μέση τιμή ναυπλίων ανά ωσάκο, η οποία ήταν 52 ναύπλιοι. Το είδος της τροφής που χρησιμοποιήθηκε στις δύο περιπτώσεις ήταν *Chlorella sp.* και *Tetraselmis tetrathele* αντίστοιχα και σύμφωνα με τους ερευνητές ήταν αυτό που οδήγησε στις διαφοροποιήσεις των αποτελεσμάτων στις δύο μελέτες.

Στην παρούσα εργασία ο μέσος αριθμός ωσακών ανα θηλυκό άτομο επηρεάστηκε από την τιμή της αλατότητας. Στα άτομα που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Rhodomonas salina* η μεγαλύτερη μέση τιμή είναι 3,83 ωσακοί και παρατηρείται στην αλατότητα 32 ‰, ενώ στα άτομα που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Dunaliella salina* η μεγαλύτερη μέση τιμή είναι 3,5 ωσακοί και παρατηρείται πάλι στην αλατότητα 32 ‰. Σε αντίστοιχη έρευνα των Biandolino et al. (2018) σε άτομα του είδους *Tigriopus fulvus* που τράφηκαν με μείγμα *Tetraselmis suecica* και *Isochrysis galbana* δεν υπήρχε μεγάλη διαφοροποίηση αφού στην αλατότητα 38 ‰ ο αριθμός των ωσακών ανά θηλυκό άτομο ήταν  $4.67 \pm 0.84$ .

Στην παρούσα εργασία ο χρόνος πλήρους εκκόλαψης του 1<sup>ου</sup> ωσακού επηρεάστηκε από την τιμή της αλατότητας και η μέση τιμή του είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερη στην αλατότητα 60 ‰ σε σχέση με τις υπόλοιπες αλατότητες και για τα δύο είδη τροφής που χρησιμοποιήθηκαν. Στην έρευνα των Biandolino et al. (2018) σε άτομα του είδους *Tigriopus fulvus* που τράφηκαν με μείγμα *Tetraselmis suecica* και *Isochrysis galbana* η μέση τιμή του χρόνου πλήρους εκκόλαψης των ωσακών των θηλυκών ατόμων ήταν  $2.49 \pm 0.77$  ημέρες χρόνος σημαντικά μικρότερος σε σχέση με τις μέσες τιμές αυτών που καταγράφηκαν στην παρούσα εργασία (6,2 έως 8,9 για την τροφή *R. salina* και 7 έως 8,16 για την τροφή *D. salina*).

Στην παρούσα εργασία στα θηλυκά άτομα *Tigriopus sp.* και για τα δύο είδη τροφής που χρησιμοποιήθηκαν, η μέση τιμή του χρόνου σε ημέρες από την εμφάνιση του πρώτου ωσακού έως την εμφάνιση του δεύτερου ωσακού ανά θηλυκό άτομο, είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 60‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν στις υπόλοιπες αλατότητες. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην αλατότητα 60‰ υπήρξαν άτομα που σχημάτισαν έναν μόνο ωσάκο, καθώς και άτομα που μετά την εκκόλαψη του πρώτου ωσακού τους απέρριψαν τους υπόλοιπους που σχημάτισαν χωρίς να γίνει εκκόλαψη των αυγών τους. Ο σύντομος χρόνος εκκόλαψης των ωσακών σε συνδυασμό με το σύντομο χρόνο που μεσολαβεί μεταξύ δυο ωστοκίων (με προϋπόθεση τη μεγάλη παραγωγή εύρωστων ναυπλίων από κάθε ωσάκο) αποτελούν πλεονεκτικές συνθήκες για τα

συστήματα καλλιέργειας κωπηπόδων μιας και οδηγούν στην αύξηση της παραγωγής και τη μείωση του απαιτούμενου χρόνου για την ολοκλήρωση των αναπαραγωγικών κύκλων των θηλυκών κωπηπόδων.

## 7.2 *Tisbe* sp.

Στα θηλυκά άτομα *Tisbe* sp. ο αριθμός των ναυπλίων που εκκολάφτηκαν συνολικά ανά θηλυκό άτομο είναι μεγαλύτερος στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 32‰ και για τα δύο είδη τροφής που χρησιμοποιήθηκαν. Στα άτομα που τράφηκαν με *Rhodomonas salina* η μέση τιμή του συνολικού αριθμού ναυπλίων ανά θηλυκό άτομο στην ευνοϊκότερη τιμή αλατότητας (32‰) είναι 13,055 ενώ στα άτομα που τράφηκαν με *Dunaliella salina* στην ίδια τιμή αλατότητας η μέση τιμή είναι σημαντικά υψηλότερη (33,94 ναύπλιοι). Και οι δύο όμως τιμές είναι κατά πολύ μικρότερες σε σχέση με αυτές που αναφέρονται από άλλους ερευνητές για άτομα του ίδιου γένους. Σύμφωνα με τους Pinto et al. (2001), σε άτομα του είδους *Tisbe biminiensis* που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 34‰ και τράφηκαν με το διάτομο *Nitzschia closterium* η μέση τιμή των ναυπλίων που εκκολάφτηκαν ανά ωσάκκο ήταν 66,8 ενώ η μέση τιμή ωσάκων για κάθε θηλυκό άτομο ήταν 6,8.

Ο μέγιστος αριθμός ναυπλίων που εκκολάφτηκε στην παρούσα εργασία από τον 1<sup>ο</sup> ωσάκκο θηλυκού ατόμου που τράφηκε με *Rhodomonas salina* είναι 14 ναύπλιοι στην τιμή αλατότητας 20‰, ενώ αντίστοιχα ο μέγιστος αριθμός για τα θηλυκά που τράφηκαν με *Dunaliella salina* είναι 19 ναύπλιοι στην τιμή αλατότητας 20‰. Οι μέσες τιμές είναι σημαντικά χαμηλότερες γιατί επηρεάζονται από το γεγονός ότι ορισμένα θηλυκά άτομα στα πλαίσια της προσαρμογής τους στις νέες τιμές αλατότητας που τοποθετήθηκαν, απέρριψαν τον 1<sup>ο</sup> ωσάκκο τους χωρίς να γίνει εκκόλαψη των αυγών τους. Σε αντίστοιχη εργασία των Norsker και Stottrup (1994) με άτομα του είδους *Tisbe holothuriae* οι μέσες τιμές των ναυπλίων που εκκολάφτηκαν από τον πρώτο ωσάκκο σε θηλυκά άτομα που ως τροφή χρησιμοποιήθηκαν τα μικροφύκη *Rhodomonas salina* και *Dunaliella salina* ήταν 60,7 και 50,7 αντίστοιχα, σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με τις μέσες τιμές της παρούσας εργασίας. Σε άτομα του ίδιου είδους που μελετήθηκαν από τους Gaudy et al. (1982) στις βέλτιστες εργαστηριακές συνθήκες (αλατότητα 38 ‰ και θερμοκρασία 24°C) το είδος της τροφής διαφοροποίησε τη μέση τιμή του συνολικού αριθμού ναυπλίων ανά θηλυκό άτομο. Οι μέσες τιμές για τα δύο είδη τροφής που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 288 και 107 άτομα αντίστοιχα (το πρώτο είδος τροφής είχε

μεγαλύτερη αναλογία υδατανθράκων σε σχέση με το δεύτερο και ήταν εμπλουτισμένο με βιταμίνη Α η οποία απουσίαζε από το δεύτερο είδος τροφής).

Στην παρούσα εργασία ο μέσος αριθμός ωοσακών ανά θηλυκό άτομο επηρεάστηκε από την τιμή της αλατότητας μόνο στα άτομα που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Dunaliella salina*. Στα άτομα που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Rhodomonas salina* η μεγαλύτερη μέση τιμή είναι 1,972 ωοσακοί και παρατηρείται στην αλατότητα 32 ‰ χωρίς όμως να παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές με τις μέσες τιμές που καταγράφηκαν στις υπόλοιπες τιμές αλατότητας, ενώ στα άτομα που ως τροφή χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Dunaliella salina* η μεγαλύτερη μέση τιμή είναι 2,694 ωοσακοί και παρατηρείται πάλι στην αλατότητα 32 ‰. Σύμφωνα με τη Μήλιου (1990), σε άτομα του είδους *Tisbe holothuriae* που αναπτύχθηκαν υπό εργαστηριακές συνθήκες σε θερμοκρασία 19 °C και αλατότητα 32 ‰, η μέση τιμή των ωοσακών ανά θηλυκό άτομο ήταν 2,5 και δεν διαφοροποιείται ιδιαίτερα από την τιμή που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία στα άτομα που τράφηκαν με *Dunaliella salina*. Σε άτομα του ίδιου είδους που μελετήθηκαν από τους Gaudy et al. (1982) στις βέλτιστες εργαστηριακές συνθήκες (αλατότητα 38 ‰ και θερμοκρασία 24°C), το είδος της τροφής διαφοροποίησε τον αριθμό των ωοσακών ανά θηλυκό άτομο που ήταν σημαντικά υψηλότερες από τις μέσες τιμές που καταγράφηκαν στην παρούσα εργασία. Οι μέσες τιμές των ωοσακών για τα δύο είδη τροφής που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 7,2 και 4,67 αντίστοιχα (το πρώτο είδος τροφής είχε μεγαλύτερη αναλογία υδατανθράκων σε σχέση με το δεύτερο και ήταν εμπλουτισμένο με βιταμίνη Α η οποία απουσίαζε από το δεύτερο είδος τροφής).

Στην παρούσα εργασία ο χρόνος πλήρους εκκόλαψης του 1<sup>ου</sup> ωοσάκου επηρεάστηκε από την τιμή της αλατότητας και η μέση τιμή του είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερη στην αλατότητα 60 ‰ σε σχέση με τις υπόλοιπες αλατότητες και για τα δύο είδη τροφής που χρησιμοποιήθηκαν. Σύμφωνα με τη Μήλιου (1990) σε άτομα του ίδιου είδους που αναπτύχθηκαν υπό εργαστηριακές συνθήκες σε θερμοκρασία 19 °C και αλατότητα 32 ‰ ο μέσος χρόνος εκκόλαψης του 1<sup>ου</sup> ωοσάκου ήταν 2,31 ημέρες, τιμή σημαντικά μικρότερη σε σχέση με τις μέσες τιμές που καταγράφηκαν στην παρούσα εργασία και για τα δύο είδη τροφής (4,25 για το *Rhodomonas salina* και 4,44 για το *Dunaliella salina*).

Στην παρούσα εργασία στα θηλυκά άτομα *Tisbe sp.* και για τα δύο είδη τροφής που χρησιμοποιήθηκαν, η μέση τιμή του χρόνου σε ημέρες από την εμφάνιση του πρώτου ωοσάκου έως την εμφάνιση του δεύτερου ωοσάκου ανά θηλυκό άτομο, είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στα κωπήποδα που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 60‰ σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν στις υπόλοιπες αλατότητες. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην αλατότητα 60‰ υπήρξαν άτομα που σχημάτισαν έναν μόνο ωόσακο, καθώς και άτομα που μετά την εκκόλαψη του πρώτου ωοσάκου τους απέρριψαν τους υπόλοιπους που σχημάτισαν χωρίς να γίνει εκκόλαψη των αυγών τους.

### 7.3 Γενικές παρατηρήσεις

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες, χωρίς να πραγματοποιηθεί μαζική καλλιέργεια κωπηπόδων, αλλά αναπαραγωγή μεμονωμένων θηλυκών ατόμων και εν συνεχεία μελέτη της ανάπτυξης των ναυπλίων τους. Παράλληλα μελετήθηκε και η επίδραση των δύο διαφορετικών ειδών μικροφυκών που χρησιμοποιήθηκαν ως τροφή για τα κωπήποδα, του *Rhodomonas salina* και του *Dunaliella salina*. Τα κύτταρα των μικροφυκών από τα οποία πρόεκυψαν οι καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν ως τροφή στην παρούσα εργασία, προήλθαν από το ίδιο φυσικό περιβάλλον από το οποίο προήλθαν και τα κωπήποδα, τη λιμνοθάλασσα του Μεσολογίου. Έτσι, δίνεται η δυνατότητα να εξαχθούν συμπεράσματα για την καταλληλότητα ή μη των ειδών αυτών να εισαχθούν σε εντατικά συστήματα καλλιέργειας κωπηπόδων.

Στην παρούσα εργασία η θνησιμότητα των θηλυκών ατόμων της F1 γενιάς μετά την τοποθέτησή τους στα μεμονωμένα τριβλία, για τη μελέτη της αναπαραγωγικής δραστηριότητας τους στις διαφορετικές τιμές αλατότητας, ήταν μηδενική. Στην ακραία όμως τιμή αλατότητας (60‰) και για τα δύο είδη που μελετήθηκαν ο χρόνος για τη μετάβαση από τα ναυπλικά στάδια στο στάδιο των ενηλίκων ατόμων ήταν πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν που παρατηρήθηκε στις υπόλοιπες αλατότητες. Σύμφωνα με τους Hong et al. (2021) οι ωσμωρυθμιστικοί μηχανισμοί ορισμένων θαλάσσιων οργανισμών κατά τη διάρκεια του κύκλου της ζωής τους, διαφοροποιούνται. Μελέτες που σχετίζονται με την επίδραση της αλατότητας σε άτομα του είδους *Tigriopus japonicus* αναφέρουν ότι μολονότι τα ενήλικα άτομα διαθέτουν μεγάλη ικανότητα προσαρμογής σε μεταβαλλόμενες τιμές αλατότητας, το αναπτυξιακό στάδιο μεταξύ ναυπλίων και κωπηποδιτών εμφανίζεται ως το πιο ευαίσθητο παρουσιάζοντας τη μεγαλύτερη θνησιμότητα (Raisuddin et al., 2007,

Kowk and Leung, 2005), ενώ σύμφωνα με τους Paiva et al. (2020), τα ενήλικα άτομα καρκινοειδών παρουσιάζονται περισσότερο ανεκτικά στο στρες αλατότητας σε σχέση με τα άτομα των υπόλοιπων αναπτυξιακών σταδίων.

Στην παρούσα εργασία η μέση τιμή του συνολικού αριθμού απογόνων που προέκυψαν στις βέλτιστες τιμές αλατότητας και για τα δύο είδη (*Tigriopus sp.* και *Tisbe sp.*) ήταν σημαντικά μικρότερη σε σχέση με τις τιμές που αναφέρουν άλλοι ερευνητές για θηλυκά άτομα των ειδών των ίδιων γενών που αναπτύχθηκαν υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες. Οι λόγοι για τους οποίους παρατηρήθηκε μειωμένη παραγωγή ναυπλίων πιθανών να είναι:

- **Μεγάλη πυκνότητα πληθυσμού.** Στην παρούσα εργασία για την αναπαραγωγή και ανάπτυξη των κωπηπόδων χρησιμοποιήθηκαν τριβλία χωρητικότητας 15 mL με αποτέλεσμα να επιτευχθούν μεγαλύτερες πυκνότητες πληθυσμού σε σχέση με αυτές που αναφέρουν άλλοι ερευνητές που χρησιμοποίησαν σκεύη μεγαλύτερης χωρητικότητας. Μάλιστα λόγω του βενθικού χαρακτήρα των *Tisbe* και *Tigriopus* σχεδόν το σύνολο των ναυπλίων κυρίως των πρώτων ναυπλιακών σταδίων, συγκεντρώνονταν στον πυθμένα των τριβλίων (διάμετρος τριβλίων 4cm) με αποτέλεσμα να αυξάνεται ακόμη περισσότερο η πυκνότητα τους. (Σύμφωνα με τον Mauchline (1998) τα σώματα της πλειονότητας των κωπηπόδων είναι πυκνότερα από το θαλασσινό νερό στο οποίο ζουν, ανεξάρτητα από την αλατότητά του. Για το λόγο αυτό η παραμονή τους στο βένθος απαιτεί λιγότερη κατανάλωση ενέργειας σε σχέση με την παραμονή τους στη στήλη του νερού). Το φαινόμενο έγινε ακόμη πιο έντονο, καθώς με την εξέλιξη του πειράματος δημιουργήθηκε στους πυθμένες των τριβλίων υποτυπώδες υπόστρωμα που προσέλκυε τα κωπήποδα. Έχει αναφερθεί ότι η πυκνότητα μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη, την επιβίωση και τη γονιμότητα των αρπακτικοειδών κωπηπόδων (Cutts, 2001). Στη μελέτη των Punnarak et al. (2017) σε καλλιέργειες με μικρότερη πυκνότητα, παρατηρήθηκαν υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης για κωπήποδα που είχαν συλλεχθεί από φυσικά περιβάλλοντα, ενώ σύμφωνα με τους Fava and Crotti (1979) οι καλλιέργειες κωπηπόδων σε υψηλές πυκνότητες έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση των απεκκρίσεων λόγω του στρες των ζώων, με αποτέλεσμα να μην ευνοείται η επιβίωση, η ανάπτυξη καθώς και η αναπαραγωγή τους.

- **Κανιβαλισμός.** Ο κανιβαλισμός νεαρών ατόμων είναι μια στρατηγική ιδιαίτερα διαδεδομένη για πολλά είδη ζωικών οργανισμών στη φύση (Polis, 1981). Σε πολλά είδη καρκινοειδών που ενδιααιτούν τόσο σε θαλάσσια όσο και σε εκβολικά συστήματα, η ενδοειδική θήρευση ατόμων προνυμφικών σταδίων αποτελεί συχνά έναν από τους κυριότερους λόγους για τη θνησιμότητα τους, συμβάλλοντας στη διατήρηση του σταθερού μεγέθους των πληθυσμών τους (Luppi et al., 2001, Moksnes, 2002). Κανιβαλισμός έχει αναφερθεί για καλανοειδή κωπήποδα (Landry, 1981, Conley and Turner, 1985, Daan et al., 1988), καθώς και για αρπακτικοειδή κωπήποδα των ειδών *Tigriopus fulvus* (Lazzareto and Salvato, 1992, Gallucci and Ólafsson, 2007), *Tigriopus californicus* (Lewis et al., 1998) και *Tigriopus brevicornis* (Gallucci and Ólafsson, 2007). Σύμφωνα με τους Gallucci and Ólafsson (2007) το φαινόμενο του κανιβαλισμού παρατηρείται όταν έχουμε μεγάλες πυκνότητες πληθυσμών ακόμη και όταν στο περιβάλλον υπάρχει επάρκεια άλλων ειδών τροφής. Στην παρούσα εργασία είναι πιθανό να παρουσιάστηκαν συμπεριφορές κανιβαλισμού από τα ενήλικα άτομα στους νεαρούς ναυπλίους, λόγω της μεγάλης πυκνότητας των πληθυσμών στον πυθμένα των τριβλίων, με αποτέλεσμα η μέτρηση του αριθμού των ναυπλίων που γίνονταν καθημερινά να έδινε μικρότερο αριθμό ναυπλίων από αυτούς που εκκολάπτονταν από τα αυγά των ωοσάκων.
- **Μη ανανέωση του μέσου ανάπτυξης.** Η αναπαραγωγή των κωπηπόδων επηρεάζεται άμεσα από αβιοτικούς παράγοντες του περιβάλλοντός τους, όπως η θερμοκρασία, η θολότητα και το pH του νερού (Turner, 2004, Ianora et al., 2007). Στην παρούσα εργασία δεν πραγματοποιήθηκαν ανανεώσεις του μέσου καλλιέργειας (νερού) μιας και κάτι τέτοιο δεν ήταν εφικτό λόγω της μεγάλης πυκνότητας των κωπηπόδων. Κατά την εξέλιξη της παρούσας εργασίας η θερμοκρασία ήταν ελεγχόμενη, όμως η θολότητα και το pH μεταβλήθηκαν, κυρίως στις τιμές αλατότητας που δεν ήταν ευνοϊκές για την ανάπτυξη των κωπηπόδων. Παράλληλα κατά την εξέλιξη του πειράματος δημιουργήθηκε στον πυθμένα των τριβλίων ένα υποτυπώδες υπόστρωμα, από τα υπολείμματα της περίσσιας της τροφής, από τους εξωσκελετούς που προέκυψαν από τις εκδύσεις των κωπηπόδων, καθώς και από τις απεκκρίσεις των κωπηπόδων. Η περίσσια τροφής που παραμένει σε μικρού όγκου καλλιέργειες κωπηπόδων μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα όπως: συσσώρευση νεκρών κυττάρων

φυκών στο νερό και στα τοιχώματα του δοχείου (με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης μικροοργανισμών), προσκόλληση μάζας νεκρών μικροφυκών στα κολυμβητικά εξαρτήματα των κωπηπόδων με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ελεύθερη μετακίνησή τους (Puello-Cruz et al., 2009), επιλεκτική τροφοληψία από τα κωπήποδα (αποφυγή κατανάλωσης νεκρών κυττάρων μικροφυκών) (Alajmi and Zeng, 2015) αύξηση θολότητας του νερού κ.α

- **Γενετικοί παράγοντες.** Στα αρπακτικοειδή κωπήποδα ακόμη και μεταξύ πληθυσμών του ίδιου είδους που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές, έχουν αναφερθεί σημαντικές αποκλίσεις όσον αφορά τις βέλτιστες συνθήκες αλατότητας και γενικότερα των αβιοτικών παραγόντων. Για πληθυσμούς του είδους *Tisbe holothuriae* με φυσικό περιβάλλον τον κόλπο της Μασσαλίας υπήρχε αναπαραγωγική δραστηριότητα σε τιμές αλατότητας από 20‰ έως 48‰, ενώ για πληθυσμούς του ίδιου είδους που προέρχονταν από το Σαρωνικό κόλπο στις αλατότητες 20‰ και 48‰ όχι μόνο δεν παρατηρήθηκε αναπαραγωγική δραστηριότητα αλλά αντίθετα τα άτομα παρουσίασαν μεγάλη θνησιμότητα. Βάση των ερευνητών που μελέτησαν τις παραπάνω συμπεριφορές, η ανθεκτικότητα στην αλατότητα των διαφορετικών πληθυσμών καθορίστηκε από την αλατότητα του περιβάλλοντος από το οποίο προήλθαν (Gaudy et al., 1982). Σύμφωνα με τον Edmands (2001) και στο γένος *Tigriopus* έχει βρεθεί ένα ευρύ φάσμα γενετικών αποκλίσεων στους πληθυσμούς των ειδών του. Τα άτομα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία προήλθαν από τη λιμνοθάλασσα του Μεσολογγίου. Μολονότι υπήρξε εγκλιματισμός στις εργαστηριακές συνθήκες για πολλές γενεές, ο γονότυπος των άγριων πληθυσμών καθόρισε την αναπαραγωγική συμπεριφορά των θηλυκών ατόμων και το σύνολο των ναυπλίων που εκκολάφτηκαν από κάθε ωοσάκο στις διαφορετικές τιμές αλατότητας, διαφοροποιώντας τον από αυτόν που έχει αναφερθεί σε μελέτες με αντίστοιχες τιμές αλατότητας για πληθυσμούς του ίδιου γένους προερχόμενους από διαφορετικές περιοχές.

Και για τα δύο είδη κωπηπόδων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, η μέση τιμή του χρόνου εκκόλαψης του 1<sup>ου</sup> ωοσάκου τους και η μέση τιμή του χρόνου που μεσολαβεί από την εμφάνιση του 1<sup>ου</sup> ωοσάκου μέχρι την εμφάνιση του δεύτερου ωοσάκου, είναι σημαντικά μεγαλύτερες στην ακραία τιμή της αλατότητας (60‰) σε σχέση με τις τιμές στις υπόλοιπες αλατότητες. Ο χρόνος ανάπτυξης είναι ένα σημαντικό γνώρισμα της φυσικής κατάστασης του ζωοπλαγκτού και συνδέεται στενά

με τον χρόνο έναρξης της παραγωγής νέων ατόμων και τον ρυθμό αύξησης του πληθυσμού, με την ταχύτερη ανάπτυξη να οδηγεί σε υψηλότερες αφθονίες σε μικρότερο χρόνο (Allan 1976). Έτσι, οι ταχέως αναπτυσσόμενοι πληθυσμοί στα φυσικά περιβάλλοντα έχουν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι αυτών που αναπτύσσονται πιο αργά, ενώ υπό ελεγχόμενες συνθήκες παραγωγής, η γρήγορη ανάπτυξη σχετίζεται αφενός με τη μείωση του κόστους και την αύξηση της παραγωγής και αφετέρου με την παραγωγή πιο εύρωστων ατόμων λόγω της επίτευξης των ιδανικών συνθηκών ανάπτυξης.

Η αναπαραγωγή των κωπηπόδων επηρεάζεται άμεσα από την ποσότητα και την ποιότητα της προσλαμβανόμενης τροφής (Turner, 2004, Ianora et al., 2007), ενώ παρουσιάζουν μεγάλη προσαρμοστικότητα στα διαθέσιμα είδη τροφής που υπάρχουν στο περιβάλλον τους, μεταβάλλοντας τις φυσιολογικές τους διεργασίες σύμφωνα με το ποσό της ενέργειας που μπορούν να εξασφαλίσουν μέσω της τροφής τους. Μάλιστα σύμφωνα με τους Hasset and Landry (1990) η έλλειψη τροφής από το περιβάλλον των κωπηπόδων (φυσικό ή εργαστηριακό) μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στην τροφοληπτική συμπεριφορά τους και στη δράση των πεπτικών ενζύμων τους, αυξάνοντας χρονικά την επιβίωση τους (ακόμη και για διάστημα 3 εβδομάδων σε συνθήκες ασιτίας (Tsuda, 1994). Στην παρούσα εργασία στα άτομα του γένους *Tigriopus* για το σύνολο των παραμέτρων που μελετήθηκαν δεν παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές για τα δύο διαφορετικά είδη τροφής που χρησιμοποιήθηκαν. Αντίθετα για τα άτομα του γένους *Tisbe* για όλες τις παραμέτρους στην ευνοϊκότερη τιμή αλατότητας (32‰) το μικροφύκος *Dunaliella salina* παρουσιάστηκε ευνοϊκότερο ως τροφή σε σχέση με το *Rhodomonas salina*. Σε αντίστοιχη μελέτη των Norsker και Stottrup (1994) σε κωπήποδα του είδους *Tisbe holothuriae* που αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 28-33‰, η διατροφή τους με μικροφύκη των γενών *Dunaliella* και *Rhodomonas* διαφοροποίησε τη σύσταση των ιστών τους σε HUFAs μακριάς αλυσίδας. Τα κωπήποδα που τράφηκαν με *Rhodomonas* παρουσίασαν μικρότερη συγκέντρωση σε HUFAs σε σχέση με αυτά που τράφηκαν με *Dunaliella*. Οι Miles et al. (2001) προτείνουν ένα μείγμα μικροφυκών για την βέλτιστη ανάπτυξη κωπηπόδων του γένους *Tisbe* και για την παραγωγή μεγάλου αριθμού απογόνων, ενώ σύμφωνα με τον Cutts (2001) και τους De Troch et al. (2006) η τροφή πρέπει να αλλάζει μεταξύ των διάφορων αναπτυξιακών σταδίων των κωπηπόδων μιας και αλλάζει και το μέγεθος των στοματικών τους εξαρτημάτων καθώς και οι ανάγκες τους για θρεπτικά στοιχεία.



Από τα πρώτα στοιχεία των αποτελεσμάτων αυτής της εργασίας φαίνεται ότι τόσο η ανάπτυξη όσο και η αναπαραγωγή των κωπηπόδων επηρεάζονται αρνητικά από τιμές αλατότητας που αποκλίνουν από αυτή που απαντάται στο φυσικό περιβάλλον των πληθυσμών των ειδών που μελετήθηκαν. Η συνολική παραγωγή ναυπλίων κυμάνθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα, σε σχέση με αυτά που αναφέρονται σε αντίστοιχες έρευνες με άτομα διαφόρων ειδών του ίδιου γένους. Οι διαφορές στην ικανότητα προσαρμογής των κωπηπόδων σε τιμές αλατότητας διαφορετικές από αυτές που απαντώνται στο φυσικό τους περιβάλλον, σχετίζονται με γενετικούς παράγοντες οι οποίοι πρέπει να διερευνώνται ώστε να εφαρμόζονται στις περιπτώσεις των συστημάτων μαζικής παραγωγής κωπηπόδων, οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης και αναπαραγωγής.

Η γνώση που προκύπτει από τη μελέτη της επίδρασης διαφορετικών τιμών αλατότητας στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή συγκεκριμένων ειδών κωπηπόδων, εκτός από την αξιοποίηση της στην παραγωγική διαδικασία μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας, θα μπορούσε να αξιοποιηθεί και για οικολογικές πρακτικές μέσω δημιουργίας μοντέλων πρόβλεψης των επιπτώσεων των μεταβαλλόμενων περιβαλλοντικών συνθηκών, όχι μόνο σε επίπεδο είδους αλλά και σε επίπεδο πληθυσμού. Η τοπική προσαρμογή των πληθυσμών είναι η εξέλιξη των χαρακτηριστικών τους, τα οποία έχουν βελτιστοποιηθεί για συγκεκριμένους βιότοπους, έτσι ώστε οι γονότυποι των πληθυσμών αυτών να τους προσδίδουν καλύτερη φυσική κατάσταση σε σχέση με τους γονότυπους του ίδιου είδους από άλλους βιότοπους (Kawecki και Ebert 2004). Τις τελευταίες δεκαετίες γενετικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι οι θαλάσσιοι πληθυσμοί παράκτιων βιότοπων είναι λιγότερο ομοιογενείς από ό, τι πιστεύαμε στο παρελθόν, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι τοπικές επιλεκτικές δυνάμεις μπορεί να είναι αρκετά ισχυρές για να αντισταθμίσουν τη συνεχιζόμενη ροή γονιδίων. Οι πληροφορίες σχετικά με την προσαρμοστική απόκλιση είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την πρόβλεψη των επιπτώσεων της κλιματικής αλλαγής και τη βελτίωση των μοντέλων πρόβλεψης, τα οποία συχνά υποθέτουν ότι όλοι οι πληθυσμοί ενός είδους έχουν το ίδιο εύρος ανοχής στις περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ αλατότητα, θερμοκρασία νερού). Μια τέτοια υπόθεση όμως, μπορεί να υποτιμήσει τον κίνδυνο εξαφάνισης ειδών από έναν βιότοπο, εάν οι μεμονωμένοι πληθυσμοί έχουν μικρότερο εύρος ανοχής από το είδος ως σύνολο (Sanford and Kelly 2011).

## Βιβλιογραφία

- Ajiboye, O.O., Yakubu, A.F., Adams, T.E., Olaji, E.D., Nwogu, N.A. 2010.** A review of the use of copepods in marine fish larviculture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 21, 225–246.
- Anufrieva, E. 2015.** Do copepods inhabit hypersaline waters worldwide? A short review and discussion. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 33(6), 1354-1361.
- Alajmi, F., Zeng, C. 2015.** Evaluation of microalgal diets for the intensive cultivation of the tropical calanoid copepod, *Parvocalanus crassirostris*. *Aquaculture Research* 46, 1025–1038.
- Aldana-Aranda, D., Patiño Suárez, V. 1998.** Overview of diets used in larviculture of three Caribbean conchs: queen conch *Strombus gigas*, milk conch *Strombus costatus* and fighting conch *Strombus pugilis*. *Aquaculture* 167, 163–178.
- Allan, J.D. 1976.** Life history patterns in zooplankton. *The American Naturalist* 110, 165-180.
- Allen, M.M., Hutchison, F. 1980.** Nitrogen limitation and recovery in the cyanobacterium *Aphanocapsa*. *Archives of Microbiology* 128 (1), 1–7.
- Arndt, C., Sommer, U. 2014.** Effect of algal species and concentration on development and fatty acid composition of two harpacticoid copepods, *Tisbe* sp. and *Tachidius discipes*, and a discussion about their suitability for marine fish larvae. *Journal of Aquaculture Nutrition* 20, 44– 59.
- Barroso, M.V., Carvalho, C.V.A., Antoniassi, R., Cerqueira, V.R. 2013.** Use of the copepod *Acartia tonsa* as the first live food for larvae of the fat snook *Centropomus parallelus*. *Aquaculture* 388–391, 153–158.
- Baensch, F., Tamaru, C. 2009.** Spawning and development of larvae and juveniles of the rare blue Mauritius angelfish, *Centropyge debelius* (1988), in the hatchery. *Journal of the World Aquaculture Society* 40 (4), 425-439.
- Beaugrand, G., 2005.** Monitoring pelagic ecosystems using plankton indicators. *Journal of Marine Science*, 62 (3), 333–338.
- Beckman, K., Ames, B.N. 1998.** The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews* 78, 547-581.

- Berggreen, U., Hansen, B., Kiørboe, T. 1988.** Food size spectra, ingestion and growth of the copepod *Acartia tonsa* during development: implications for determination of copepod production. *Marine Biology* 99 (3), 341– 352.
- Breteler, W.C., Schogt, N., 1994.** Development of *Acartia clausi* (Copepoda, Calanoida) cultured at different conditions of temperature and food. In: Ferrari, F.D., Bradley, B.P. (Eds.), *Ecology and Morphology of Copepods* 297/298. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 469–479.
- Broglia, E., Jónasdóttir, S.H., Calbet, A., Jakobsen, H.H., Saiz, E. 2003.** Effect of heterotrophic versus autotrophic food on feeding and reproduction of the calanoid copepod *Acartia tonsa*: relationship with prey fatty acid composition. *Aquatic Microbial Ecology* 31, 267–278.
- Brown, M.R., McCausland, M.A., Kowalski, K. 1998.** The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture* 165, 281–293.
- Burgess, A.I., Callan, C.K. 2018.** Effects of supplemental wild zooplankton on prey preference, mouth gape, osteological development and survival in first feeding cultured larval yellow tang (*Zebrasoma flavescens*). *Aquaculture* 495, 738-748.
- Burton, R.S. 1986.** Incorporation of <sup>14</sup>C-bicarbonate into the free amino acid pool during hyperosmotic stress in an intertidal copepod *Journal of Experimental Zoology* 238, 55-61.
- Burton, R.S., Feldman, M.W., 1982.** Changes in free amino acid concentrations during osmotic response in the intertidal copepod *Tigriopus californicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 73a, 441–445
- Calliari, D., Andersen, C.M., Thor, P., Gorokhova, E., Tiselius, P. 2006.** Salinity modulates the energy balance and reproductive success of co occurring copepods *Acartia tonsa* and *Acartia clausi* in different ways. *Marine Ecology Progress Series* 312, 177-188.
- Camus, T., Zeng, C. 2008.** Reproductive performance, survival and development of nauplii and copepodites, sex ratio and adult life expectancy of the harpacticoid copepod, *Euterpina acutifrons*, fed different microalgal diets. *Aquaculture Research* 43, 1159-1169.

- Capezzuto, F., Galassi, D., Ancona, F., Maiorano, P. 2019.** How far may life venture? Observations on the harpacticoid copepod *Phyllognathopus viguieri* under extreme stress conditions. *Aquatic Ecology* 13, 212-224.
- Castro, C., Souza-Santos, L., Gabrielle, A., Garcia, T. 2009.** Sensitivity of the marine benthic copepod *Tisbe biminiensis* to potassium dichromate and sediment particle size. *Brazilian Journal of Oceanography* 57(1), 33-41.
- Chinnery, F.E., Williams, J.A. 2004.** The influence of temperature and salinity on *Acartia* (Copepoda: Calanoida) nauplii survival. *Marine Biology* 145, 733–738.
- Chullasorn, S., Dahms, H., Lee, K., Ki, J., Schizas, N., Kangtia, P., Park, H., Lee, J. 2011.** Description of *Tisbe alaskensis* sp. nov. (Crustacea: Copepoda) Combining Structural and Molecular Traits. *Zoological Studies* 50(1), 103-117.
- Church, B.G., Van Sprang, P.A., Chowdhury, M.J., DeForest, D.K., 2017.** Updated species sensitivity distribution evaluations for acute and chronic lead toxicity to saltwater aquatic life. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36, 2974–2980.
- Cutts, C.J., 2001.** Culture of harpacticoid copepods: potential as live feed for rearing marine fish. *Advances in Marine Biology* 44, 295-316.
- Conley, W.J., Turner, J.T. 1985.** Omnivory by the coastal marine copepods *Centropages hamatus* and *Labidocera aestiva*. *Marine Ecology Progress Series* 21, 113–120.
- Corner, E. D., Cowey, C. 1968.** Biochemical studies on the production of marine zooplankton. *Biological Reviews* 43, 393-426.
- Daly Yahia, M.N., Souissi, S., Kefi-Daly Yahia, O. 2004.** Spatial and temporal structure of planktonic copepods in the Bay of Tunis (southwestern Mediterranean Sea). *International Journal of Zoology Studies* 43, 366–375.
- DeBiase, M., Kawji, Y., Kelly, M. 2018.** Phenotypic and transcriptomic responses to salinity stress across genetically and geographically divergent *Tigriopus californicus* populations. *Molecular Ecology* 1, 1-12.
- DeForest, D.K., Santore, R.C., Ryan, A.C., Church, B.G., Chowdhury, M.J., Brix, K.V. 2017.** Development of biotic ligand model-based freshwater aquatic life criteria for lead following US environmental protection agency guidelines. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36, 2965–2973.

- Delbare, D., Dhert, P., Lavens, P. 1996.** Zooplankton In: Lavens, P. and Sorgeloos, P. (Eds.), *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper, 361, Rome, Italy, 252-282.
- De Troch, M., Chepurnov, V., Gheerardyn, H., Vanreusel, A., Olafsson, E., 2006a.** Is diatom size selection by harpacticoid copepods related to grazer body size? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 332, 1-11.
- Devreker, D., Souissi, S., Seuront, L. 2004.** Development and mortality of the first naupliar stages of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) under different conditions of salinity and temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 303, 31– 46.
- Drillet, G., Frouël, S., Sichlau, M., Jepsen, P., Højgaard, J., Joarder, A., Hansen, B. 2011.** Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed. *Aquaculture* 315, 155–166.
- Drira, Z., Kmiha-Megdiche, S., Sahnoun, H., Tedetti, M., Pagano, M., Ayadi, H., 2018.** Copepod assemblages as a bioindicator of environmental quality in three coastal areas under contrasted anthropogenic inputs (Gulf of Gabes, Tunisia). *Journal of Marine Biology Association* 98 (8), 1889–1905.
- Edmands, S. 2001.** Phylogeography of the intertidal copepod *Tigriopus californicus* reveals substantially reduced population differentiation at northern latitudes. *Molecular Ecology* 10, 1743–1750.
- Evjemo, J.O., Tokle, N., Vadstein, O., Olsen, Y. 2008.** Effect of essential dietary fatty acids on egg production and hatching success of the marine copepod *Temora longicornis*. *Journal of Marine Biology and Ecology* 365, 31-37.
- Farmer, F., Reeve, M.R. 1978.** Role of the free amino acid pool of the copepod *Acartia tonsa* in adjustment to salinity change. *Marine Biology* 48, 311-316.
- Fava, G., Crotti, E., 1979.** Effect of crowding on nauplii production during mating time in *Tisbe clodiensis* and *Tisbe holothuriae* (Copepoda, Harpacticoida). *Helgololand Wiss Meer* 32, 466-475.
- Forget, J., Pavillon, F., Menasria, R., Bocquené, G. 1998.** Mortality and LC50 values for several stages of the marine copepod *Tigriopus brevicornis* (Müller) exposed to the metals Arsenic and Cadmium and the pesticides Atrazine, Carbofuran, Dichlorvos, and Malathion. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40 (3), 239-244.

- Gallucci, F., Ólafsson, E. 2007.** Cannibalistic behaviour of rock-pool copepods: An experimental approach for space, food and kinship. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 342, 325–331.
- Gaudy R., Guerin J.P. & Moraitou-Apostolopoulou M. 1982.** Effect of temperature and salinity on the population dynamics of *Tisbe holothuriae* Humes (Copepoda: Harpacticoida) fed on two different diets. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 57, 257-271.
- Gonzalez, C.R., Bradley, B.P. 1994.** Salinity stress proteins in *Eurytemora affinis* *Hydrobiologia* 292, 461-468.
- Goolish, E.M., Burton, R.S. 1989.** Energetics of osmoregulation in an intertidal copepod: effects of anoxia and lipid reserves on the pattern of free amino accumulation. *Functional Ecology* 3, 81-89.
- Grant, W. D. 2004.** Life at low water activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society - Biological Sciences* 359, 1249-1267.
- Hagiwara, A., Lee, C., Shiraishi, D. 1995.** Some reproductive characteristics of the broods of the Harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* cultured in different salinities. *Fisheries Science* 61(4), 618-622.
- Hao, L., Haiping L., Fanping, M., Bo, Z., Yufei, L., Jiangyue, W., Guoshan, W., Yang, Z. 2020.** The biodegradation of Para-xylene in seawater by a newly isolated oceanic microalga *Rhodomonas* sp. JZB-2. *Journal of Water Process Engineering* 36, 101311 (online no).
- Hassett, R.P., Landry, M.R. 1990.** Effects of diet and starvation on digestive enzyme activity and feeding behavior of the marine copepod *Calanus pacificus*. *Journal of Plankton Research* 12, 991-1010.
- Hill, M., Pernetta, A., Crooks, N. 2020.** Size Matters: A review of live feeds used in the culture of marine ornamental fish. *Journal of the Asian Fisheries Society* 33, 161-174
- Hong, H., Wang, J., Shi, D. 2021.** Effects of salinity on the chronic toxicity of 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC) in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquatic Toxicology* 232, 107742.
- Humes, A.G., 1994.** How many copepods? *Hydrobiologia* 1–7, 292–293.
- Hussain, M., Laabir, M., Yahia, M. 2020.** A novel index based on planktonic copepod reproductive traits as a tool for marine ecotoxicology studies. *Science of the Total Environment* 727, 12-24.

- Huys, R., Boxshall, G. A. 1991.** Copepod evolution. Ray Society London.
- Ianora, A., Miralto, A., Halsband-Lenk, C. 2007.** Reproduction, hatching success, and early naupliar survival in *Centropages typicus*. Progress in Oceanography 72 (2-3), 195-213.
- Ivanina, A.V., Cherkasov, A.S., Sokolova, I.M., 2008.** Effects of cadmium on cellular protein and glutathione synthesis and expression of stress proteins in eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Journal of Experimental Biology 211, 577–586.
- Izquierdo, M.S. 1996.** Essential fatty acid requirements of culture of marine fish larvae. Aquaculture Nutrition 2, 183-191.
- Jeffries, H.P., Alzara, L., 1970.** Dominance-diversity relationships of the free amino acids in coastal plankton. Comparative Biochemistry and Physiology 37, 215–223
- Jepsen, M., Thoisen, C., Caron-Cabaret, T., Pinyol-Galleml, A., Nielsen, S., Hansen, B. 2019.** Effects of Salinity, Commercial Salts, and Water Type on Cultivation of the Cryptophyte Microalgae *Rhodomonas salina* and the Calanoid Copepod *Acartia tonsa*. Journal of the World Aquaculture Society 50 (1), 104-118.
- Jónasdóttir, S.H. 1994.** Effects of food quality on the reproductive success of *Acartia tonsa* and *Acartia hudsonica*: laboratory observations. Marine Biology 121 (1), 67–81.
- Jørgensen, T.S., Jepsen, P.M., Peterson, H.C.B., Friis, D.S., Hansen, B.W. 2019.** Eggs of the copepod *Acartia tonsa* Dana require hypoxic conditions to tolerate prolonged embryonic development arrest. BMC Ecology 19 (1), 187-194.
- Jung, S.O., Lee, Y.M., Park, T.J., Park, H.G., Hagiwara, A., Leung, K.M.Y., Dahms, H.U., Lee, W., Lee, J.S. 2006.** The complete mitochondrial genome of the intertidal copepod *Tigriopus* sp. (Copepoda, Harpacticidae) from Korea and phylogenetic considerations. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 333, 251–262.
- Kadiene, E.U., Meng, P.-J., Hwang, J.-S., Souissi, S. 2019.** Acute and chronic toxicity of cadmium on the copepod *Pseudodiaptomus annandalei*: a life history traits approach. Chemosphere 233, 396–404.
- Kalmar, B., Greensmith, L., 2009.** Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. Advanced Drug Delivery Review 61, 310–318.

- Kawecki, T.J., Ebert, D. 2004.** Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* 7, 1225-1241.
- Kelly, M.W., Sanford, E, Grosberg, R.K. 2012.** Limited potential for adaptation to climate change in a broadly distributed marine crustacean. *Proceedings of the Royal Society* 279, 349-356.
- Khlebovich, V. V., Aladin, N. V. 2010.** The salinity factor in animal life. *Herald of the Russian Academy of Science* 80 (3), 299-304.
- Khodami, S., McArthur, V., Blanco-Bercial, L., Arbizu, P.M. 2017.** Molecular Phylogeny and Revision of Copepod Orders (Crustacea: Copepoda). *Nature: Scientific Reports* 7 (1), 1-11.
- Khodami, S., Mercado-Salas, N., Tang, D., Arbizu, P.M. 2019.** Molecular evidence for the retention of the Thaumatopsyllidae in the order Cyclopoida (Copepoda) and establishment of four suborders and two families within the Cyclopoida. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 138, 43-52.
- Kinne, O. 1971.** Salinity - invertebrates. *Marine Ecology* 1, 821- 995.
- Knuckey, R.M., Semmens, G.L., Mayer, R.J., Rimmer, M.A. 2005.** Development of an optimal microalgal diet for the culture of the calanoid copepod *Acartia sinjiensis*: effect of algal species and feed concentration on copepod development. *Aquaculture* 249, 339–351.
- Knudsen, M. 1901.** Hydrographical Tables. G. E. C. Gad. Copenhagen, 63 pp.
- Kumudha A, Sarada R. 2016.** Characterization of vitamin B12 in *Dunaliella salina*. *Journal of Food Science and Technology* 53, 888-894.
- Kwok, K.W., Leung, K.M. 2005.** Toxicity of antifouling biocides to the intertidal harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* (Crustacea, Copepoda): effects of temperature and salinity. *Marine Pollutin Bulletin* 51, 830–837.
- Lance, J. 1962.** Effects of water of reduced salinity on the vertical migration of zooplankton. *Journal of Marine Biology Association U.K* 42, 131-154
- Landry, M.R. 1981.** Switching between herbivory and carnivory by the planktonic marine copepod *Calanus pacificus*. *Marine Biology* 65, 77–82.
- Lazzaretto, I., Salvato, B. 1992.** Cannibalistic behaviour in the harpacticoid copepod *Tigriopus fulvus*. *Marine Biology* 113, 579–582.
- Lee, C.S., Hu, F. 1980.** Salinity tolerance and salinity effect on brood size of *Tigriopus japonicus* Mori. *Aquaculture* 22, 377-381.



- Lee, K.W., Rhee, J.S., Raisuddin, S., Park, H.G., Lee, J.S. 2008.** A corticotropin-releasing hormone binding protein (CRH-BP) gene from the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *General and Comparative Endocrinology* 158, 54-60.
- Lee, S.H., Lee, M.S., Puthumana, J., Shing, K.H., Park, H.G., Souissi, S., Om, A.S., Lee, J.S., Han, J. 2017.** Effects of salinity on growth, fatty acid synthesis, and expression of stress response genes in the cyclopoid copepod *Paracyclopina nana*. *Aquaculture* 470, 182-189.
- Levine, R.L., Garland, L., Oliver, C.N., Amici, A., Lenz, A. Stadtman, E.R. 1990.** Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186, 464-478.
- Lewis, A.G., Chatters, L., Raudsepp, M. 1998.** Feeding structures and their functions in adult and preadult *Tigriopus californicus* (Copepoda: Harpacticoida). *Journal of Marine Biology Association U.K.* 78, 451–466.
- 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.
- Luppi, T.A., Spivak, E.D., Anger, K. 2001.** Experimental studies on predation and cannibalism of the settlers of *Chasmagnathus granulata* and *Cyrtograpsus angulatus* (Brachyura: Grapsidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 265, 29–48.
- Lv, H., Cui, X., Wahid, F., Xia, F., Zhong, C., Jia, S. 2016.** Analysis of the physiological and molecular responses of *Dunaliella salina* to macronutrient deprivation. *PLOS ONE*.
- MacAllen, R., Taylor, A. 2001.** The effect of salinity change on the oxygen consumption and swimming activity of the high-shore rockpool copepod *Tigriopus brevicornis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 263, 227-240.
- Malzahn, A.M., Boersma, M. 2012.** Effects of poor food quality on copepod growth are dose dependent and non-reversible. *Oikos* 121, 1408–1416.
- Marcus, N.H., Murray, M. 2001.** Copepod diapause eggs: a potential source of nauplii for aquaculture. *Aquaculture* 201, 107–115.
- Marinho da Costa, R.R., Fernández, F. 2002.** Feeding and survival rates of the copepods *Euterpina acutifrons* Dana and *Acartia grani* Sars on the

- dinoflagellates *Alexandrium minutum* Balech and *Gyrodinium corsicum* Paulmier and the Chrytophyta *Rhodomonas baltica* Karsten. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 273, 131–142.
- Marten, G. G., Nguyen, M., Ngo, G. 2000.** Copepod predation on *Anopheles quadrimaculatus* larvae in rice fields. *Journal of Vector Ecology* 25 (1), 1-6.
- Martinez, M., Rodriguez-Grana, L., Santos, L., Denicola, A., Calliari, D. 2020.** Long-term exposure to salinity variations induces protein carbonylation in the copepod *Acartia tonsa*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 526, 347-359.
- Martinez, G., Cifuentes, A., Gonzalez, M., Parra, O. 1995.** Effect of salinity on sexual activity of *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco, strain CONC-006. *Revista Chilena de Historia Natural* 681, 131-138.
- Mauchline, J., 1998.** The biology of calanoid copepods. *Advances in Marine Biology* 33, 71-81.
- Michalec, F., Holzner, M., Hwang, J., Souissi, S. 2012.** Three dimensional observation of salinity- induced changes in the swimming behavior of the estuarine calanoid copepod *Pseudodiaptomus annandalei*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 438, 24-31.
- Miles, D., Auchterlonie, N., Cutts, C., de Quero, C.M. 2001.** Rearing of the Harpacticoid Copepod *Tisbe Holothuriae* and its Application for the Hatchery Production of Atlantic Halibut *Hippoglossus hippoglossus*. SEAFISH Development Aquaculture. Link Project FIN 23.
- Μήλιου, Ε. 1990.** Επίδραση βιοτικών κα αβιοτικών παραγόντων στη δυναμική πληθυσμών καλλιεργούμενων κωπηπόδων. Διδακτορική διατριβή. ΕΚΠΙΑ.
- Miliou, H., Moraitou-Apostolopoulou, M. 1991.** Compined effects of temperature and salinity on the population dynamics of *Tisbe holothuriae*. *Arciv für Hydrobiologie* 121, 431-488.
- Miliou, H., Verriopoulos, G., Maroulis, D., Bouloukos, D., Moraitou-Apostolopoulou, M. 2000.** Influence of Life-History Adaptations on the Fidelity of Laboratory Bioassays for the Impact of Heavy Metals ( $Co^{2+}$  and  $Cr^{6+}$ ) on Tolerance and Population Dynamics of *Tisbe holothuriae*. *Marine Pollution Bulletin* 40(4), 352-359.
- Moksnes, P.O. 2002.** The relative importance of habitat specific settlement, predation and juvenile dispersal for distribution and abundance of young juvenile shore

- crabs *Carcinus maenas*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 271, 41–73.
- Monchenko, V. I. 2003.** Free-Living Cyclopoid Copepods of Ponto-Caspian Basin. Naukova Dumka, Kyiv, 350p. (in Russian)
- Muller-Feuga, A., Moal, J., Kaas, R. 2003.** The microalgae of aquaculture. In: Støttrup, J.G., McEvoy, L.A. (eds.): *Live feeds in marine aquaculture*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 206–299.
- Nanton, D.A., Castell, J.D., 1998.** The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, *Tisbe* sp., for use as a live food for marine fish larvae. *Aquaculture* 163, 251-261.
- Nazari, F., Mirshamsi, O., Arbizu, P.M., 2021.** *Tigriopus iranicus* sp. nov., a new species of Harpacticidae (Copepoda, Crustacea) from Iran, with a redescription of *T. raki* Bradford, 1967. *ZooKeys* 1035, 115–144.
- N'doua Etilé, R., Kassi Blahoua, G., Aké Bédia, T., Essetchi Kouamelan, P., N'Douba, V., 2017.** Spatio-temporal variability of *Acartia clausi* (Copepoda, Calanoida) population structure, abundance, body length, and biomass in a tropical coastal lagoon (Grand-Lahou, Côte d'Ivoire). *International Journal of Sciences* 3 (06), 16–28.
- Neffati, N., Daly Yahia-Kefi, O., Bonnet, D., Carlotti, F., Daly Yahia, M.N., 2013.** Reproductive traits of two calanoid copepods: *Centropages ponticus* and *Temora stylifera*, in autumn in Bizerte Channel. *Journal of Plankton Research* 35 (1), 80–96.
- Norsker, N. H., Støttrup, J. G. 1994.** The importance of dietary HUFAs for fecundity and HUFA content in the harpacticoid *Tisbe holothuriae*, Humes. *Aquaculture* 125, 155-166.
- Ohs, C., Rhyne, A., DiMaggio, M., Stenn E. 2010.** Effects of salinity on reproduction and survival of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus pelagicus*. *Aquaculture* 307, 219-224.
- Olivotto, I., Planas, M., Simões, N., Holt, G.J., Avella, M.A., Calado, R., 2011.** Advances in breeding and rearing marine ornamentals. *Journal of World Aquaculture Society* 42 (2), 135–166.
- Olivotto, I., Chemello, G., Vargas, A., Randazzo, B., Piccinetti, C.C. Carnevali, O. 2017a.** Marine ornamental species culture: From the past to “Finding Dory”. *General and Comparative Endocrinology* 245, 116–121.

- Oostlander, P.C., Van Houcke, J., Wijffels, R.H., Barbosa, M.J. 2020.** Optimization of *Rhodomonas* sp. under continuous cultivation for industrial applications in aquaculture. *Algal Research* 47. (101889 online no).
- Oren, A. 2005.** A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Systems* 1(2), 1-14.
- Pan, Y.-J., Souissi, A., Souissi, S., Hwang, J.-S., 2016.** Effects of salinity on the reproductive performance of *Apocyclops royi* (Copepoda, Cyclopoida). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 475, 108–113.
- Peck, M., Holste, L. 2006.** Effects of salinity, photoperiod and adult stocking density on egg production and egg hatching success in *Acartia tonsa* (Calanoida: Copepoda): Optimizing intensive cultures. *Aquaculture* 255, 341–350.
- Paiva, F., Pauli, N.C., Briski, E., 2020.** Are juveniles as tolerant to salinity stress as adults? A case study of Northern European, Ponto-Caspian and North American species. *Diversity and Distributions* 26, 1627–1641.
- Park, E.O., Lee, S., Cho, M. 2014.** A new species of the genus *Tigriopus* (Copepoda: Harpacticoida: Harpacticidae) from Antarctica. *Proceedings of the Royal Society of Washington* 127, 138-154.
- Péqueux, A. 1995.** Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* 15, 1-60.
- Perumal, N. V., Rajkumar, M., Perumal, P., Rajasekar, T. 2009.** Seasonal variations of plankton diversity in the Kaduviyar estuary, Nagapattinam, southeast coast of India. *Journal of Environmental Biology* 30, 1035-1046.
- Pierce, S.K. 1982.** Invertebrate cell volume control mechanisms: a coordinated use of intracellular amino acids and inorganic ions as osmotic solute. *Biological Bulletin* 163, 405-419.
- Pinto, C.S., Souza-Santos, L., Santos, P. 2001.** Development and population dynamics of *Tisbe biminiensis* reared on different diets. *Aquaculture* 198, 253-267.
- Polis, G.A., 1981.** The evolution and dynamics of intraspecific predation. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 12, 225–251.
- Powlik, J. J., Lewis, A. G. 1996.** Desiccation Resistance in *Tigriopus californicus* (Copepoda, Harpacticoida). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 43(4), 521–532.

- Puello-Cruz, A.C., Mezo-Villalobos, S., Voltolina, D. 2009.** Culture of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus euryhalinus* with different microalgal diets. *Aquaculture* 290, 317-319.
- Punnarak, P., Jarayabhand, P., Piumsomboon, A. 2017.** Cultivation of harpacticoid copepods (families harpacticidae and laophontidae) under selected environmental conditions. *Agriculture and Natural Resources* 51, 278 – 285.
- Rainbow, P. 1997.** Trace metal accumulation in marine invertebrates: marine biology or marine chemistry? *Journal of the Marine Biological Association of the U.K* 77, 195-210.
- Raisuddin, S., Kwok, K.W., Leung, K.M., Schlenk, D., Lee, J.S. 2007.** The copepod *Tigriopus*: a promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquatic Toxicology* 83, 161–173.
- Rivera-Ingraham, G.A., Nommick, A., Blondeau Bidet, A., Ladurner, P., Lignot, J.H. 2016.** Salinity stress from the perspective of the energy-redox axis: lessons from a marine intertidal flatworm. *Redox Biology*, 10, 53-64.
- Rivera-Ingraham, G.A., Lignot, J.H. 2017.** Osmoregulation, bioenergetics and oxidative stress in coastal marine invertebrates: raising the questions for future research. *Journal of Experimental Biology* 220, 1749-1760.
- Rønnestad, I., Yúfera, M., Ueberschär, B., Ribeiro, L., Sæle, Ø., Boglione, C. 2013.** Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Reviews in Aquaculture* 5, 59–98.
- Sadiq, M. 1992.** Toxic metal chemistry in marine environments. Marcel Dekker, New York, p 390.
- Sanford, E., Kelly, M.W. 2011.** Local adaptation in marine invertebrates. *Annual Review of Marine Science* 3, 509-535.
- Santhosh, B., Anil, M., Anzeer, F., Gopakumar, G., Gopalakrishnan, A., Unnikrishnan, C. 2018.** Culture Techniques of Marine Copepods. Indian Council of Agricultural Research.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Bell, J.G. 1997.** Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155, 117-127.

- Seo, J.S., Lee, K.W., Rhee, J.S., Hwang, D.S., Lee, Y.M., Park, H.G., Ahn, I.Y., Lee, J.S. 2006a.** Environmental stressors (salinity, heavy metals, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) modulate expression of glutathione reductase (GR) gene from the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquatic Toxicology* 80, 281-289.
- Shadrin, N. V., Anufriieva, E. V. 2013.** Dependence of *Arctodiaptomus salinus* (Calanoida, Copepoda) halotolerance on exoosmolytes: new data and a hypothesis. *Journal of Mediterranean Ecology* 12, 21-26.
- Sies, H. 2018.** On the history of oxidative stress: concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology* 7, 122-126.
- Siqwepu, O., Richoux, N.B., Vine, N.G. 2017.** The effect of different dietary microalgae on the fatty acid profile, fecundity and population development of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus hessei* (Copepoda: Calanoida). *Aquaculture* 468, 162–168.
- Stottrup, J.G., 2000.** The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. *Aquaculture Research* 31 (8–9), 703–711.
- Støttrup, J.G. 2006.** A review on the status and progress in rearing copepods for marine larviculture. Advantages and disadvantages among calanoid, harpacticoid and cyclopoid copepods. *Avances en Nutrición Acuícola VIII. Memorias del Octavo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, Mazatlán, Sinaloa, México, 62–83.
- Stottrup, J.G., Jensen, J. 1990.** Influence of algal diet on feeding and egg-production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 141, 87–105.
- Stottrup, J. G., Norsker, N. H. 1997.** Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture* 155, 231-247.
- Sun, B. and Fleeger, J. W. 1995.** Sustained mass culture of *Amphiasacoides 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. *Marine Ecology Progress Series* 470, 15-29.

- Tsuda, A., 1994.** Starvation tolerance of a planktonic marine copepod *Pseudodiaptomus newmani*. *Frost. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 181, 81-89.
- Turner, J. T. 2004.** The importance of small planktonic copepods and their roles in pelagic marine food webs. *Zoological Studies* 42 (2), 255-266.
- Turpin, D.H. 1991.** Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *Journal of Phycology* 27 (1), 14–20.
- Uye, S., 2011.** Human forcing of the copepod-fish-jellyfish triangular trophic relationship. *Hydrobiologia* 656, 71–83.
- Van Der Meeren, T., Olsen, R. E., Hamre, K., Fyhn, H. J. 2008.** Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. *Aquaculture* 274 (2-4), 375-397.
- Vecchioni, L., Marrone, F., Rodilla, M., Belda, E., Arculeo, M. 2019.** An account on the taxonomy and molecular diversity of a marine rock pool dweller, *Tigriopus fulvus* (Copepoda, Harpacticoida). *Ciencias Marinas* 45(2), 59-75.
- Verity, P., Smetacek, V. 1996.** Organism life cycles, predation, and the structure of marine pelagic ecosystems. *Marine Ecology Progress Series* 130, 71-83.
- Vittor, B. A. 1971.** Effects of the environment on fitness related life history characters in *Tigriopus californicus* (Doctoral dissertation, Thesis (Ph.D.) - Oregon, Dept. of Biology).
- Werbrouck E, Bodé S, Van Gansbeke D, Vanreusel A, De Troch M. 2017.** Fatty acid recovery after starvation: insights into the fatty acid conversion capabilities of a benthic copepod (Copepoda, Harpacticoida). *Marine Biology* 164:151, 217-226.
- Willet, C., Burton, R. 2002.** Proline biosynthesis genes and their regulation under salinity stress in the euryhaline copepod *Tigriopus californicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 132, 739-750.
- Χώτος, Γ. 2016.** Καλλιέργειες Πλαγκτού. Βιολογικά στοιχεία και τεχνικές. Τ.Ε.Ι Δυτικής Ελλάδας. Research Gate DOI: 10.13140/RG.2.2.29979.28965
- Χώτος, Γ. 2019.** Κωπήποδα. Βασικά Βιολογικά στοιχεία. Πανεπιστήμιο Πελοποννήσου. Research Gate. DOI: 10.13140/RG.2.2.25424.46081
- Yancey, P. H. 2001.** Water stress, osmolytes and proteins. *American Zoologist* 41 (4), 699-709.

- Yúfera, M., Darias, M.J. 2007.** The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture* 268, 53–63.
- Ζανάκη, Κ. 2001.** Έλεγχος ποιότητας νερού. Αθήνα: Ίων Εκδόσεις
- Zarubin, M., Farstey, V., Wold, A., Falk-Petersen, S., Genin, A. 2014.** Intraspecific differences in lipid content of calanoid copepods across fine-scale depth ranges within the photic layer. *PLoS One* 9, e92935.
- Zhang, J., Wu, C., Pellegrini, D., Romano, G., Esposito, F., Ianora, A., Buttino, I. 2013.** Effects of different monoalgal diets on egg production, hatching success and apoptosis induction in a Mediterranean population of the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Aquaculture* 400–401, 65–72.

### **Πηγές από το διαδύκτιο**

<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=106289> (λήψη 1/2021)

<https://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=6826> (λήψη 1/2021)

<https://www.diark.org/diark> (λήψη 3/2021)