

Dynamique de production et qualité nutritive du rotifère d'eau douce *Brachionus calyciflorus*

Aboubacar Awaïss ⁽¹⁾ et Patrick Kestemont ⁽²⁾

⁽¹⁾Département du Génie rural, Eaux et Forêts, Faculté d'Agronomie, BP 10960, Université Abdou Moumouni Dioffo, Niamey, Niger.

⁽²⁾Unité de Recherches en Biologie des Organismes, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, Belgique.
E-mail: Patrick.Kestemont@fundp.ac.be

Reçu le 20 mars 1996 ; accepté le 26 novembre 1996.

Awaïss A., P. Kestemont. *Aquat. Living Resour.*, 1997, 10, 111-120.

Production dynamic and nutritive quality of the freshwater rotifer Brachionus calyciflorus.

Abstract

Production dynamics and nutritional quality of the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* as live food for freshwater fish larvae were assessed after determination of the development rate of this species fed the algae *Dictyosphaerium chlorelloides*. These aspects were investigated by a study of population dynamics (daily rate of production, duration of embryonic development and minimum generation time, fecundity of amictic females) and of the biochemical composition of the cultured organisms. Duration of embryonic development, highly dependent on temperature, ranged from 7 to 13.4 h. Maximum reproduction rate was reached at 25 °C, with 22.1 eggs per female. Female origin (young amictic females or females first-cultivated with *D. chlorelloides*) affects significantly the results of production. At the end of the production cycle, rotifer density reached 245 and 188 ind.ml⁻¹, respectively. Regarding nutritional quality of rotifers, crude protein contents did not vary significantly throughout the production cycle (53.5-54.1 % of dry matter). Among the fatty acids, linoleic acid C18:2 n-6 was the most abundant. This acid represented up to 42 % of the total identified fatty acids at the end of the production cycle with females first-cultivated with *D. chlorelloides*.

Keywords: Rotifer, *Brachionus calyciflorus*, *Dictyosphaerium chlorelloides*, reproduction rate, mass production, nutritional quality.

Résumé

La dynamique de production du rotifère *Brachionus calyciflorus* en conditions contrôlées et sa qualité nutritive en tant que source alimentaire pour les larves de poissons d'eau douce sont évaluées après une détermination du taux de développement de cet organisme sur l'algue *Dictyosphaerium chlorelloides*. Ces aspects sont examinés par le biais d'une série d'études portant sur la dynamique de population (taux de production journalier, durée de développement embryonnaire et temps de génération minimum, fécondité des femelles amictiques) et sur la composition biochimique de ces organismes. La durée de développement embryonnaire, fortement dépendante de la température, varie entre 7 et 13,4 h. Les rotifères atteignent leur meilleur taux de reproduction à 25 °C, soit en moyenne 22,1 œufs par femelle. L'origine des femelles utilisées (jeunes femelles amictiques ou femelles précultivées sur *D. chlorelloides*) influence les résultats de production en masse, avec des densités atteignant, en fin de production, respectivement 245 et 188 rotifères par ml. En ce qui concerne la qualité nutritionnelle des rotifères, la teneur en protéines brutes varie peu au cours du cycle de production (53,5-54,1 % de la matière sèche). Parmi les acides gras, l'acide linoléique C18:2n-6 est le plus abondant dans les rotifères, et représente, en fin de cycle de production, 42 % des acides gras identifiés chez les femelles précultivées sur *D. chlorelloides*.

Mots-clés : Rotifère, *Brachionus calyciflorus*, *Dictyosphaerium chlorelloides*, qualité nutritionnelle, production en masse, taux de reproduction.

INTRODUCTION

Le problème majeur de tout élevage de poissons dont les larves sont de petite taille porte sur la nourriture qui doit être accessible en quantité suffisante pour le jeune alevin. L'efficacité d'une distribution d'aliment inerte comme aliment de démarrage a été testée avec succès chez les larves de carpe par Charlon et Bergot (1984), mais de nombreux problèmes zootechniques subsistent et l'utilisation de nourriture naturelle vivante apparaît souvent nécessaire. Dans bien des cas, il est essentiel de pouvoir produire du zooplancton en conditions standard, ce qui se fait d'ailleurs depuis des années en larviculture marine.

Actuellement, la production d'*Artemia* permet de disposer de proies vivantes de taille adéquate et de bonne qualité nutritionnelle pour l'alimentation des larves, mais l'utilisation d'*Artemia* est limitée car son coût est élevé et l'approvisionnement en œufs de durée difficile. Par ailleurs, la taille des nauplii d'*Artemia* fraîchement éclos varient entre 450 et 500 μm , ce qui est parfois trop élevé pour l'ouverture buccale des jeunes larves (Kestemont et Awaïss, 1989). Des souches d'*Artemia* de petite taille sont actuellement disponibles sur le marché, mais leur taille excède 400 μm . Il est donc intéressant de rechercher d'autres organismes qui pourraient être produits en eaux douces à un coût faible; des élevages de rotifères sont développés expérimentalement à cette fin. Cette question est importante pour diversifier la pisciculture africaine basée essentiellement sur le Tilapia. De plus, la production de poissons africains, tels que les Clariidés, présente des potentialités fantastiques (Hogendoorn, 1980; Legendre, 1992) mais limitée par la survie larvaire, particulièrement en absence de nourritures vivantes appropriées (Adeyemo *et al.*, 1994, Verreth, 1994, Otémé et Gilles, 1995).

Contrairement au rotifère d'eau saumâtre *Brachionus plicatilis*, la culture en masse des espèces d'eau douce n'a pas encore acquis un développement significatif, et encore moins en tant que première nourriture pour les larves de poissons d'eau douce. Cependant chez *B. calyciflorus*, la nutrition et l'influence de facteurs extérieurs tels que la température sur la dynamique de population de cette espèce ont été étudiées (Awaïss *et al.*, 1992a; Awaïss et Kestemont, 1992). Par ailleurs, cet organisme, en tant qu'aliment vivant de démarrage, a été étudiée chez différentes larves de poissons d'eau douce (Awaïss *et al.*, 1992b, 1993).

Cette étude vise à l'optimisation des conditions d'alimentation nécessaires à la production en masse du rotifère d'eau douce *B. calyciflorus*. Deux aspects sont examinés: la dynamique de production avec l'algue

Dictyosphaerium chlorelloides, et la qualité nutritionnelle de ces organismes en culture. La dynamique de production comprend également la détermination d'une température optimale de production nous permettant d'obtenir, avec l'algue considérée, de meilleurs taux de reproduction et de développement des organismes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Production d'algues et de rotifères

Origine et conservation des souches

La souche d'algue utilisée a été identifiée au Jardin Botanique National de Bruxelles, comme étant l'espèce *Dictyosphaerium chlorelloides*. Après une mise en culture préalable, un stock de « tubes souches » a été constitué et a servi de point de départ pour toutes les cultures. Les caractéristiques du milieu de culture utilisé sont indiquées dans le Tableau 1. Ce milieu permet une bonne croissance des algues sans altération de la morphologie des cellules, et comporte la préparation de quatre solutions composées.

Les jeunes femelles amictiques du rotifère d'eau douce, *Brachionus calyciflorus* Pallas (souche F3, Gamesville, Floride) sont obtenues à partir d'œufs de durée provenant du laboratoire de Recherche

Tableau 1. – Composition du milieu de culture de *Dictyosphaerium chlorelloides*.

Composition of culture medium of Dictyosphaerium chlorelloides.

Solution I (mg. l ⁻¹ d'eau distillée)		
Na NO ₃		5 600
Na Glycérophosphate		800
Vit B12		0,16
Vit B8		0,08
Vit B1		2
Solution II « Traces de métaux » (mg. l ⁻¹)		
ZnCl ₂		40
H ₃ BO ₃		600
CoCl ₂ ·6H ₂ O		15
CuCl ₂ ·2H ₂ O		40
MnCl ₂ ·4H ₂ O		400
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O		370
Solution III « Fer chélaté »		
Addition de 240 mg de FeCl ₃ ·4H ₂ O à une solution contenant 0,05 mole de Na ₂ EDTA pH 7,6 (ou 276 mg de FeCl ₃ ·6H ₂ O).		
Solution IV « Tampon »		
Tris-HCl 1M pH 7,6		

Pour un litre de culture on ajoute : 10 ml de la solution I, 1 ml de la solution II, 1 ml de la solution III et 0,66 ml de la solution IV. Le milieu de culture obtenu est stérilisé par filtration et le pH résultant est de 8,5.

biologique en Pollution aquatique de l'Université d'Etat de Gand (Belgique) et conservés à 4 °C, afin de maintenir leur viabilité et leur pouvoir d'éclosion.

Mise en culture des organismes

Une culture d'algues en chémostat de 10 l est assurée en continu pour servir au démarrage des cultures destinées à la production en masse des rotifères. Pour des volumes de 20 à 60 l, le milieu de culture est stérilisé, à raison de 1 ml d'eau de Javel pour 10 l de culture. Après 15 min d'aération, le milieu est neutralisé par du thiosulfate de sodium (0,1 ml.l⁻¹). Toutefois, il est difficile dans ces conditions de maintenir des cultures pures pendant 4 à 5 jours et une légère contamination est toujours possible, mais elle ne gêne pas le développement des algues. Afin d'obtenir des juvéniles de rotifères, des œufs de durée sont incubés durant 24 h et à 26 ± 1 °C dans 40 ml d'un milieu synthétique EPA de Hoff et Snell (1987). Pour une production en continu des rotifères, les organismes sont introduits dans les cultures dès que la densité algale atteint 10⁷ cell.ml⁻¹. En effet, une accumulation trop importante de cellules mortes pourrait induire le développement de micro-organismes indésirables. Un contrôle journalier des cultures sous loupe binoculaire a permis de vérifier l'état de leur contamination par d'autres organismes tels que les protozoaires ciliés, ou d'autres espèces de rotifères.

Dans le cadre de la production en continu, la culture d'algues et celle des rotifères sont effectuées à une température constante de 25 °C en gaines polyéthylène (2 m de haut; 350 mm de large et de 0,15 mm d'épaisseur), dont la partie inférieure est terminée en cône de façon à utiliser au maximum l'homogénéisation obtenue par aération à l'aide d'une tige de verre.

Temps de génération des rotifères

Les expériences décrites ci-dessous utilisent des rotifères issus des cultures en masse maintenues depuis décembre 1989 en laboratoire.

Détermination des paramètres biologiques

Huit femelles par classe de température ont été isolées chacune dans une cupule (18 × 20 mm) d'une contenance de 3 ml et installée dans un bain thermostaté (± 0,1 °C). Les œufs utilisés pour l'évaluation de développement embryonnaire proviennent de populations acclimatées pendant 48 h aux températures d'expérience. Les durées de développement embryonnaire (De), post-embryonnaire (Dp) et l'intervalle de temps minimum séparant deux générations successives ont fait l'objet d'une étude chez des jeunes femelles amictiques de *B. calyciflorus*. La durée du développement embryonnaire est déterminée à trois températures (20; 25 et 30 °C) par des mesures directes du temps de développement selon

Pourriot et Rougier (1975). Le développement post-embryonnaire dépend de la quantité d'aliment, aussi les jeunes femelles amictiques sont placées, dès leur naissance, en présence d'une suspension d'algues en léger excès.

Fécondité des femelles amictiques

La survie, la fécondité et le taux net de reproduction de ces organismes (Ro) sont évalués par le dénombrement des descendants, effectué toutes les 24 h, sur 12 jeunes femelles amictiques isolées dans des cupules et suivies jusqu'à leur mort. Les jeunes femelles écloses, une fois dénombrées, sont soustraites du milieu à chaque observation. La reproduction étant parthénogénétique, le dénombrement est arrêté dès l'apparition d'un mâle. Le taux net de reproduction correspond au nombre total d'œufs pondus par une femelle durant sa vie.

Production en masse des rotifères

La production en masse de *B. calyciflorus* est effectuée à partir de 2 souches de rotifères (S1 = femelles précultivées, S2 = jeunes femelles amictiques). Au cours des cycles de production (3 cycles par souche), les inoculations de *D. chlorelloides* sont issues des cultures ayant un temps maximum de résidence de 3 jours en chémostat, les cellules étant jeunes et à multiplication plus rapide. Les densités cellulaires des algues dans les gaines sont mesurées au début de chaque cycle de production (soit 10⁷ cell.ml⁻¹), l'inoculant des rotifères est dans tous les cas constitué d'un pool d'organismes destiné à démarrer une production à 2 ind.ml⁻¹. Les femelles S1 sont issues d'un stock de rotifères précultivés depuis 1989 sur *D. chlorelloides* et donc adaptés à cet aliment. Le taux intrinsèque d'accroissement (K_r, 24 h⁻¹) des rotifères, le temps de doublement de la population (t_d, 24 h) et la production journalière (P, ind.ml⁻¹ ou en mg poids frais. l⁻¹) sont déterminés pour un cycle de production de 9 jours selon les équations suivantes :

$$K_r = (\ln N_t - \ln N_0)/t \text{ et } t_d = \ln 2/K_r \text{ James } et \text{ al. (1986).}$$

$$P = (N_t - N_0)/t \text{ ou } = (B_f - B_0)/t$$

avec N₀ et N_t = nombre initial et final de rotifères, par ml de culture ;

B₀ et B_f = biomasse initiale et finale en rotifères par litre de culture.

Enfin, la qualité de l'eau de culture (pH, N-NH₄, N-NO₂⁻) est suivie toutes les 48 heures, à compter du jour d'inoculation des rotifères.

Analyses biochimiques

Conditionnement des échantillons

Les analyses biochimiques portent sur des échantillons lyophilisés d'algues et de rotifères, et concernent le carbone (C), l'azote (N), les protéines brutes, les acides aminés et les acides

gras. Les prélèvements du matériel frais sont réalisés à des intervalles de temps réguliers, 2 et 5 jours respectivement pour les algues et les rotifères. Les algues proviennent d'une culture monospécifique en chémostat et les rotifères des cultures en gaine. Les rotifères ainsi prélevés sont maintenus à jeun pendant 4 h dans une eau filtrée à l'aide d'un filtre millipore de 0,45 μm , puis rincés abondamment et stockés à -18°C . Chaque dosage est effectué sur trois échantillons d'algues et de rotifères. Une estimation du poids frais des rotifères est réalisée par filtration et centrifugation de 10 l de culture à 120 rotifères. ml^{-1} .

Carbone, azote, protéines brutes et acides aminés

Les concentrations en carbone et azote sont déterminées par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un analyseur C-N (Carlo Erba, NA 1500). La concentration en protéines brutes est déterminée selon le produit $\text{N} \times 6,25$.

Le dosage des acides aminés est réalisé par chromatographie sur HPLC en phase inverse après dérivatisation au phénylthiocyanate (PITC) (Heinrikson et Meredith, 1984). En milieu alcalin, le PITC réagit avec tous les acides aminés primaires et secondaires pour donner des dérivés phénylthiocarbamyls. Ceux-ci peuvent être détectés en UV à 245 nm après séparation sur une colonne de phase inverse. Les chromatographies en HPLC sont réalisées à l'aide d'un Kontron HPLC System 600 connecté à un Kontron Anacomp 220 et la détection en UV par un Uvikon 720 LC.

Acides gras

L'analyse des acides gras est effectuée selon la méthode de Christophe et Mattijs (1966). Les échantillons conditionnés sont injectés dans une colonne WIDERBORE (super 0 \times 20 M) dans un chromatographe HEWLETT-PACKARD 5840A. Un intégrateur couplé avec le chromatographe indique les temps de rétention et calcule les pourcentages relatifs des surfaces des pics des esters méthyliques d'acides gras (EMAG). La nature des acides gras est déterminée en comparant la longueur équivalente de chaîne de leurs esters méthyliques à celle des esters méthyliques d'acides gras connus (AGPI 1 et 2, SERCOLAB - Mechelen, Belgique).

Analyses des données

L'influence de la température sur le taux net de reproduction des femelles, l'effet du type d'inoculants sur les paramètres de croissance (K_r , t_d), ainsi que l'effet de la durée du cycle de production sur les teneurs en C, N et protéines des rotifères, sont mis en évidence par une analyse de la variance à un critère de classification (Dagnelie, 1975). Les comparaisons par paire des moyennes sont effectuées suivant le test PLSD (Protected Least Significant Difference) de Fisher (Feldman *et al.*, 1988).

RÉSULTATS

Conditions expérimentales

Les conditions aseptiques dans lesquelles nous avons effectué les cultures d'algues en chémostat et leur récolte ont permis d'entreprendre en continu une production monospécifique de *D. chlorelloides* exempte de toute contamination. En ce qui concerne les cycles de production entrepris avec *B. calyciflorus*, le suivi de la qualité de l'eau de culture permet de constater une augmentation sensible du pH de 8,5 à 9,0 et de la concentration en N-NH_4 à 1,74 mg.l^{-1} . Aucun développement d'organismes indésirables n'a été observé durant toute la durée du cycle de production.

Taux de développement des rotifères

Les valeurs moyennes des durées de développement embryonnaire et post-embryonnaire obtenues chez *B. calyciflorus* ont été indiquées dans le Tableau 2. La durée de développement de l'embryon est étroitement liée à la température. A 30°C , le développement post-embryonnaire est proportionnellement plus rapide que la durée d'éclosion des œufs. Les variations individuelles au niveau de la durée de développement embryonnaire s'atténuent avec l'augmentation de la température. Quant à l'intervalle de temps minimum entre deux générations, il varie de 38 à 17,9 h entre 20°C et 30°C , soit une réduction de 2 h par $^\circ\text{C}$.

Fécondité des femelles amictiques

A un accroissement de la température correspond une diminution de la durée de vie de la femelle et une augmentation du nombre de descendants produits par jour (Tableau 2). L'augmentation de la température engendre une diminution de l'intervalle entre chaque ponte, avec l'apparition à 25°C et à 30°C d'une classe de 7 à 8 jeunes par 24 h. A 20°C , la fécondité d'une femelle se limite en moyenne à 2 jeunes par 24 h durant presque la moitié de sa vie. Elle s'améliore ensuite très sensiblement jusqu'à la mort. Le nombre de descendants produits par jour et par femelle initiale (= survie \times fécondité) est d'autre part plus grand à 25°C , où la femelle maintient durant au moins 80% de sa durée de vie, une fécondité élevée, supérieure à 2 jeunes par 24 h. La période de sénescence est très courte à 25°C et reste en moyenne inférieure à 24 h, contrairement à celle observée à 20°C . L'action de la température sur le taux net de reproduction des femelles amictiques nourries avec *D. chlorelloides* est significative ($p < 0,001$). Les rotifères atteignent leur meilleur taux de reproduction à 25°C soit en moyenne 22,1 œufs par femelle.

Tableau 2. – Influence de la température sur les durées de développement embryonnaire (De), post-embryonnaire (Dp), le taux net de reproduction (Ro), la survie (s) et la fécondité (f) chez *Brachionus calyciflorus* nourri avec *Dictyosphaerium chlorelloides*.

Influence of temperature on duration of embryonic (De), post-embryonic (Dp) development, net reproduction rate (Ro), survival rate (s) and fecundity (f) of Brachionus calyciflorus fed on Dictyosphaerium chlorelloides.

Age (jours)	Températures								
	20 °C			25 °C			30 °C		
	s	f	sxf	s	f	sxf	s	f	sxf
1	1	0,7	0,7	1	1,6	1,6	1	1,6	1,6
2	1	0,9	0,9	1	2,5	2,5	0,8	2,7	2,2
3	1	0,8	0,8	0,9	3,8	3,4	0,8	4,4	3,5
4	1	0,8	0,8	0,9	4,9	4,4	0,7	3,8	2,7
5	1	1,6	1,6	0,9	3,6	3,0	0,3	2,5	0,8
6	0,9	1,6	1,5	0,6	3,6	2,2	0	0	0
7	0,9	2,4	2,1	0,3	3,2	1,0			
8	0,8	1,3	1,0	0,1	2	0,2			
9	0,8	1,1	0,9	0	0	0			
10	0,4	1	0,4						
11	0,2	1	0,2						
12	0,1	0	0						
13	0	0	0						
De (h)	13 ± 2			10 ± 1			7 ± 1		
Dp (h)	25 ± 2			17 ± 1			11 ± 1		
Ro	12,5 ± 3,6 a			22,1 ± 3,5 b			12,5 ± 5,4 a		

Les valeurs moyennes (\pm écart-type) portant la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

Means bearing the same letter do not differ significantly ($p > 0,05$).

Production en masse des rotifères

Au terme de la période de production, les densités de population de *B. calyciflorus* varient, selon le type d'inoculant utilisé, de 188 ± 8 à 245 ± 25 ind.ml⁻¹ (Fig. 1). La production journalière des rotifères est particulièrement importante avec les jeunes femelles amictiques et atteint en moyenne $78,3 \pm 8,1$ mg de poids frais.l⁻¹, avec un taux intrinsèque d'accroissement de la population moyen de 0,53 par 24 h et un K_{max} variant de 1,09 à 1,25 par 24 h. Le temps de doublement de la population est dans les deux cas supérieur à 24 h (Tableau 3). Une analyse de la variance réalisée sur les valeurs de production journalière révèle une différence significative ($p < 0,05$) entre les deux types d'inoculant. Cette différence s'observe également au niveau de leur taux intrinsèque d'accroissement journalier ($p < 0,05$). Durant les 6 premiers jours de production de femelles parthénogénétiques, la population est composée essentiellement de femelles dont les portées varient entre 2 à 3 œufs immédiats.ind⁻¹. Au-delà de cette période de production, le nombre de femelles amictiques est en constante réduction et au terme du cycle, la population en production est constituée essentiellement de femelles sexupares et de mâles dont la durée de vie n'excède pas 48 h, traduisant ainsi l'interruption du cycle amictique.

Tableau 3. – Production journalière (P) des rotifères selon le type d'inoculant utilisé (S1 et S2) (mg poids frais. l⁻¹), moyenne \pm écart-type. K_r : taux intrinsèque d'accroissement; t_d : temps de doublement de la population rotifères.

Daily production (P) of rotifer according to their origine= (mg of wet weight. l⁻¹) mean \pm standard deviation.

Paramètres	Inoculant S1	Inoculant S2
Densité initiale (ind.ml ⁻¹)	2	2
Densité finale (ind.ml ⁻¹)	188 \pm 8	245 \pm 25
P (mg poids frais.l ⁻¹)	59,9 \pm 2,4	78,3 \pm 8,1
K_r (24 h ⁻¹)	0,50 \pm 0,01	0,53 \pm 0,01
t_d (24 h)	1,37 \pm 0,01	1,29 \pm 0,03
Biomasse finale (mg poids frais.l ⁻¹)	545 \pm 22	711 \pm 73

K_r : growth rate ; t_d : doubling time.

Qualité nutritionnelle des algues

Des acides aminés, l'alanine (Ala) est éluee en même temps que le pic de l'histidine (His) et l'acide aspartique (Asp) avec l'acide glutamique (Glu), les valeurs correspondantes sont donc groupées. Ces deux associations représentent respectivement 13,8 et 14,5% du poids des protéines de l'échantillon, soit 27,8 et 29,2 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de poids sec. On note également une proportion faible de tryptophane (Tyr) et de lysine (Lys) dans les algues (2,4 et 3,7% du poids des

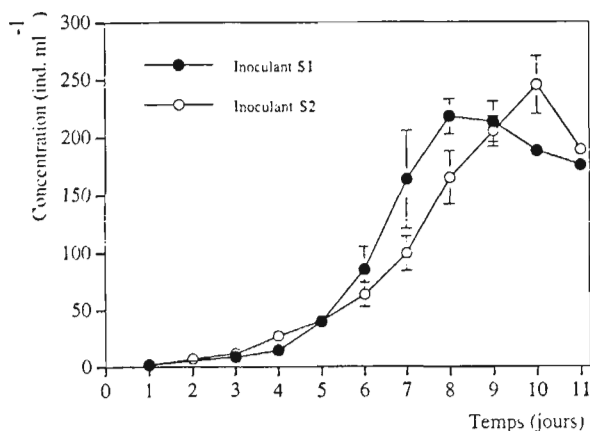


Figure 1. – Variation temporelle de la concentration en rotifères (ind. ml⁻¹) au cours de cycles de production en continu à partir d'inoculants constitués de femelles précultivées (S1) ou de jeunes femelles amictiques (S2). Moyenne et écart-type de 3 cycles.

Temporal variation of the rotifer concentrations (ind. ml⁻¹) during batch production with different female origins (S1: first cultivated females, S2: young amictic females). Mean and standard deviation of 3 cycles.

protéines). Par ailleurs, la concentration en cystine (Cys) est très faible chez *D. chlorelloides*, détectée à l'état de traces. Le rapport AAE/AANE indique une présence plus notable des acides aminés essentiels (AAE) dans les algues, et notamment l'arginine (Arg; 6,9%), la thréonine (Thr; 7,9%), la valine (Val; 8,1%) et la leucine (Leu; 9,9%). Le calcul de ce rapport ne tient pas compte du couple Ala + His.

Parmi les acides gras, ceux de la série des oléiques (notamment C18:1n-9 et C20:1n-9) sont les plus représentés (respectivement 41,6 et 20,2% du total). L'acide palmitique C16:0 est abondant dans le groupe des acides saturés et atteint 19,9% du total, soit 2,4% du poids sec. Parmi les poly-insaturés (AGPI), on retrouve surtout les acides C18:2n-6 et C20:5n-3. Ces acides ne représentent chez *D. chlorelloides* que 13% des acides totaux, soit 1,6% du poids sec, en revanche les acides monoinsaturés représentent 64,4% du total, soit 8% du poids sec de lyophilisat.

Qualité nutritionnelle des rotifères

Chez les rotifères, la teneur en carbone est influencée par la durée du cycle de production (Fobs = 49,8; $p < 0,01$). Quant aux teneurs en azote et en protéines, elles varient peu et sont indépendantes de la durée du cycle ($p > 0,05$). Parmi les acides aminés non essentiels (AANE), seuls la glycine (Gly) et les acides glutamique et aspartique (Glu + Asp) sont largement représentés, atteignant respectivement 25,1 et 8,6% du poids des protéines. La composition en acides aminés essentiels des rotifères produits après 240 h de culture, et selon le type d'inoculant utilisé est indiquée à la Figure 2. Les teneurs individuelles en carbone et azote des rotifères sont reportées dans le Tableau 4.

Tableau 4. – Composition biochimique du rotifère *Brachionus calyciflorus* nourri avec l'algue *Dictyosphaerium chlorelloides* durant le cycle de production.

*Biochemical composition of the rotifer *Brachionus calyciflorus* fed on *Dictyosphaerium chlorelloides* during the batch production.*

	Durée de production		
	24 h	120 h	240 h
Carbone (%)	41,5 ± 0,2 a	39,7 ± 0,3 b	39,2 ± 0,2 b
(ng. ind ⁻¹)	118,6	113,7	112,2
Azote total (%)	9,6 ± 0,1 a	9,1 ± 0,3 a	9,0 ± 0,3 a
(ng. ind ⁻¹)	27,4	26,1	25,8

Les valeurs moyennes portant la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

Means bearing the same letter do not differ significantly ($p > 0.05$).

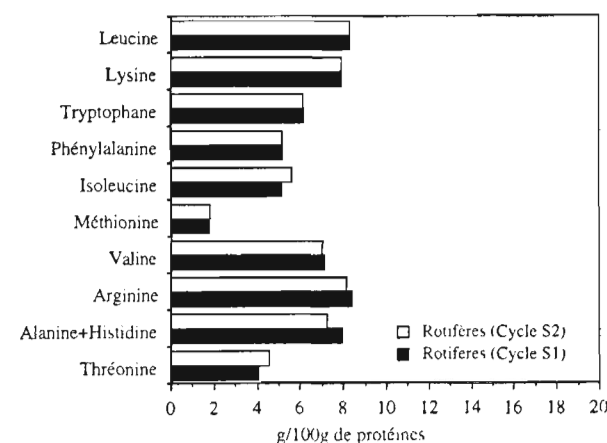


Figure 2. – Composition en acides aminés essentiels (AAE) des rotifères en fin de cycle de production avec *D. chlorelloides* (cycles de production S1 et S2).

*Essentials amino acid (EAA) composition of rotifers at the end of the batch production with *D. chlorelloides* (production cycles S1 and S2).*

Au niveau des acides gras, seuls ceux du groupe des saturés et ceux appartenant à la série des linoléiques montrent une augmentation en liaison avec le temps de résidence des organismes dans le milieu de culture. Ils atteignent respectivement 3,5 et 6,8% du poids sec à la fin du cycle de production avec les femelles précultivées; 3,8 et 6,7% du poids sec du lyophilisat avec l'inoculant S2. Quant aux acides des séries linoléique, oléique et palmitoléique, ils sont faiblement représentés et chaque groupe ne totalise pas 1% du poids sec des rotifères (Fig. 3, 4). Indépendamment de la période d'échantillonnage et du type d'inoculant utilisé, le C18:2n-6 est l'acide gras le plus abondant dans les rotifères (> 5% du poids sec). A la fin des différents cycles, cet acide représente 41,8 à 42,2% des acides gras identifiés, tandis que les AGPI de la série des linoléiques atteignent environ 1% du poids sec, soit 8% des acides gras totaux. Au niveau du groupe des acides saturés, des monoinsaturés et des polyinsaturés, seuls les seconds connaissent durant le

cycle de production une réduction significative dans le temps (de 19,6 à 13,9% avec S1 et 12,9% du total avec S2), cette réduction s'est faite surtout au profit du groupe des polyinsaturés.

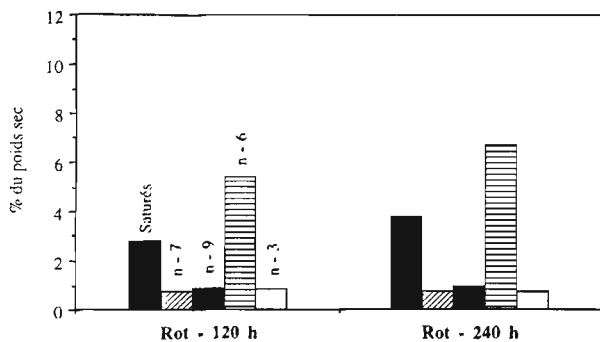


Figure 3. — Pourcentage (par rapport au poids sec) des familles d'acides gras chez les rotifères pré-cultivés sur *D. chlorelloides* (cycle de production S1): Rot-24 h: au début de l'expérience; Rot-120 h: rotifères après 120 h de culture; Rot-240 h: rotifères à la fin de l'expérience.

Percentages (expressed as % of dry weight) of fatty acid families in rotifers first-cultivated with *D. chlorelloides* (production cycle S1): Rot-24 h, at the beginning of the experiment; Rot-120 h, rotifers after 120 h culture; Rot-240 h, rotifers at the end of the experiment.

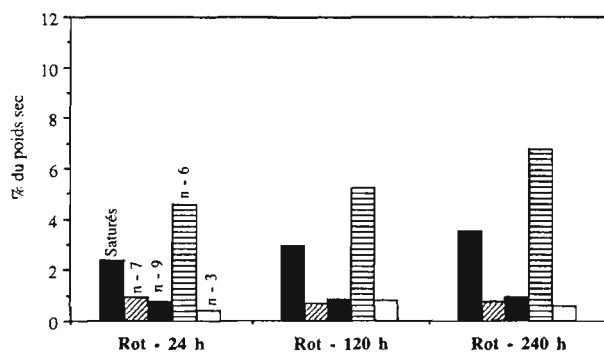


Figure 4. — Pourcentage (par rapport au poids sec) des familles d'acides gras chez les rotifères cultivés sur *D. chlorelloides* (cycle de production S2): Rot-120 h: rotifères après 120 h de culture; Rot-240 h: rotifères à la fin de l'expérience.

Percentages (expressed as % of dry weight) of saturated and unsaturated fatty acid families in rotifers fed with *D. chlorelloides* (production cycle S2): Rot-120 h, rotifers after 120 h culture; Rot-240 h, rotifers at the end of the experiment.

DISCUSSION

Avec l'intensification de la larviculture, d'importants travaux de recherche ont été entrepris afin d'établir une technologie de production en masse des rotifères en conditions contrôlées (Watanabe *et al.*, 1983; Schlüter *et al.*, 1987; Awaïss, 1992). Dans la réalisation d'une production en masse des rotifères, il convient surtout d'étudier les facteurs influençant le taux

de production de ces organismes, tels que le taux net de reproduction, la fécondité et la durée de développement embryonnaire. Lubzens (1987) signale, en effet, que le choix d'une souche de rotifères à taux de reproduction élevé sous les conditions d'élevage fixées est un élément essentiel pour toute production en masse.

Facteurs de développement des rotifères

Nous nous sommes limités à la détermination d'une température optimale permettant d'obtenir de meilleurs taux de reproduction des organismes. L'étude de certains paramètres de croissance ou biologiques en relation avec la température nous a permis de constater que la dynamique de population observée à 25°C semble plus appropriée pour une production en masse de *B. calyciflorus* avec *D. chlorelloides*. Pour cet optimum thermique, le meilleur intervalle de temps minimum séparant deux générations successives chez ce rotifère est de 28 h sous nos conditions expérimentales, ce qui peut être mis en relation avec les résultats éco-physiologiques obtenus au niveau du mode de nutrition de *B. calyciflorus*, qui indiquent d'excellents taux de filtration et d'ingestion du rotifère à cette même température (Awaïss, 1992).

Production en masse des rotifères

L'adoption d'une méthode de production en continu permet de disposer en un temps réduit de densités de population satisfaisantes. Cette méthode permettrait la production de proies pour les besoins aquacoles. Ces proies dépendent des inoculants de rotifères et de l'aliment dont la qualité et la quantité constituent deux éléments majeurs à considérer dans ce type de production. D'autres facteurs inhérents à la culture tels que la qualité du milieu et la présence d'organismes indésirables ont été pris en compte au cours de chaque cycle de production et il s'avère, d'après nos résultats, que les faibles teneurs en $\text{NH}_4\text{-N}$ dans les milieux ne perturbent pas le développement des rotifères.

Au niveau de la dynamique de production de *B. calyciflorus*, les taux de production et de croissance enregistrés indiquent que cette espèce peut être cultivée sur l'algue *D. chlorelloides*. Les valeurs de K_{max} obtenues au cours de ces cycles sont relativement identiques à celles observées par Galkovskaja (1987) à 25°C avec un autre clone de *B. calyciflorus* nourri à partir d'une densité initiale de *Chlorella* sp. 24 fois plus importante que la nôtre. En dehors des particularités physiologiques du clone, on peut toutefois souligner que *D. chlorelloides* est une source adéquate d'alimentation pour les rotifères d'eau douce du genre *Brachionus*. Le K_{max} atteint avec ce régime est de 1,25 par 24 h, soit un temps de doublement de la population des *Brachionus* de 13,3 h. Les meilleurs résultats de croissance chez cette espèce ($K_{\text{max}} = 1,92$ par 24 h et $t_d = 8,7$ h à 25°C) ont été obtenus par Bennet et Boraas (1988, 1989) avec un clone isolé dans

le Milwaukee Harbor (Wisconsin, U.S.A.); à noter que ce K_{max} a été effectué sur 550 générations (c'est-à-dire sur 8 mois d'adaptation du rotifère en chémostat avec *Chlorella pyrenoidosa*). Pourriot (1986) signale que deux procédés de production des rotifères pourraient théoriquement être mis en œuvre: l'un fondé sur la croissance de la population parthénogénétique, l'autre sur des œufs de durée avec la possibilité de les faire éclore à la demande, par analogie avec les artémies. Compte tenu de la proportion importante de femelles sexupares et de mâles dans les cultures à partir du 6^e jour, et de la qualité du milieu de culture, il semble opportun, dans un objectif de production en masse pour la larviculture, de récolter les rotifères après 120 h de culture avec *D. chlorelloides*, et cela quel que soit le type d'inoculant utilisé.

Qualité nutritionnelle des algues

Les teneurs en protéines de l'algue *D. chlorelloides* varient de 20 à 38% du poids sec. Selon Aujero et Tech (1985), la composition du milieu de culture peut affecter la croissance et la composition en nutriments des algues. Handa (1969) signale que cette composition varie également selon leur stade de développement. Au niveau des acides aminés, le rapport entre acides aminés essentiels et non essentiels (AAE/AANE) indique une présence substantielle des acides aminés essentiels chez *D. chlorelloides* et notamment de la leucine, de la valine, de la thréonine et de l'arginine. La cystine est l'acide aminé le moins représenté dans les algues. Son importance dans l'alimentation des rotifères d'eau douce est encore à démontrer, contrairement aux espèces des eaux saumâtres. Hirayama et Funamoto (1983) ont démontré chez *B. plicatilis* la nécessité d'un apport en cystine s'il est cultivé sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ils indiquent, en effet, que des 9 acides aminés testés (glycine, alanine, sérine, cystine, méthionine, lysine, acide aspartique, acide glutamique et glutathione), seule la cystine contribue à une amélioration substantielle de son taux intrinsèque d'accroissement. Cet apport peut varier de 5 à 10 $\mu\text{g Cys.ml}^{-1}$ d'aliment en suspension.

Quant aux acides gras, leur présence ainsi que leur degré d'insaturation chez les algues dépendent beaucoup des conditions de culture (Fedorov et Karayush, 1974; De Pauw *et al.*, 1984). Selon Shifrin et Chisholm (1980), l'intensité lumineuse est l'un des facteurs qui affectent le plus le degré d'insaturation des acides gras chez les algues. Pour Tsuzuki *et al.* (1990), une réduction dans la désaturation des acides gras chez les algues vertes peut être partiellement interprétée comme le résultat d'une forte concentration de CO_2 dans les cellules. Selon ces auteurs, la composition en acides gras des algues comme *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Dunaliella tertiolecta* varie très sensiblement avec le pourcentage de CO_2 débité dans les cultures pendant la croissance. Cet aspect n'a pas été pris en compte dans le cadre de

nos productions; toutefois les teneurs en acides gras obtenues sont satisfaisantes et proches de celles des chlorelles d'eau douce.

Qualité nutritionnelle des rotifères

Selon Pourriot et Leborgne (1970), la connaissance de la composition biochimique des espèces est essentielle à la compréhension du métabolisme du zooplancton. Cette connaissance est à la base des succès enregistrés avec certains groupes zooplanctoniques en larviculture marine (Gatesoupe et Luquet, 1981; Watanabe *et al.*, 1983). A l'opposé des Cladocères et de *Daphnia magna* en particulier, peu d'informations sont aujourd'hui disponibles sur cette composition chez les rotifères d'eau douce. Les teneurs en protéines calculées chez *B. calyciflorus* sont supérieures à celles déterminées par la méthode colorimétrique de Biuret par Pourriot et Leborgne (1970) sur un clone isolé d'un étang de type polytrope (soit 23,2% du poids sec de lyophilisat). Les valeurs reportées chez *B. plicatilis* sont variables à ce sujet et évoluent de 28 à 51% selon Ben-Amotz *et al.* (1987). Des teneurs de 63-67% ont déjà été avancées par Watanabe *et al.* (1983) chez *B. plicatilis* nourri avec un régime mixte (algue + levure). Sous nos conditions de production, les teneurs en protéines varient peu durant un cycle de production avec *D. chlorelloides* (53,5 à 54,1%). Selon Guisande et Serrano (1989), le taux de protéines chez les rotifères augmente proportionnellement avec leur niveau d'alimentation. Selon ces auteurs, chez *B. calyciflorus*, le taux de protéines optimal peut être atteint même avec des concentrations alimentaires faibles, on note également une stabilisation de ce taux aux concentrations alimentaires élevées.

En ce qui concerne les acides aminés, aucune déficience nutritionnelle majeure n'a été observée chez *B. calyciflorus*, et les teneurs obtenues sont comparables à celles observées chez les autres groupes zooplanctoniques, en l'occurrence les crustacés. Le dosage du carbone a permis de constater une similarité entre nos résultats chez *B. calyciflorus* (112 à 119 ng.ind^{-1}) et ceux obtenus par Schlüssler et Anger (1982) chez *B. plicatilis* nourri avec *Dunaliella* sp. (soit 116 ng.ind^{-1}).

La présence des acides gras polyinsaturés AGPI n-6 (C18:2n-6 en particulier), essentiels dans la nutrition larvaire des poissons d'eau douce (Watanabe, 1979), témoigne de l'utilité de *B. calyciflorus* comme excellente source d'alimentation en larviculture. En revanche, les acides gras monoinsaturés sont faiblement représentés, par rapport à leur concentration chez *B. plicatilis* (Scott et Baynes, 1978; Watanabe *et al.*, 1983; James et Abu-Rezeq, 1988), et ce malgré une forte présence d'acides monoinsaturés dans l'algue utilisée. L'acide linoléique représente 1,36% du poids sec chez *D. chlorelloides*, soit 11% du total et cette concentration affecte directement celle des rotifères en culture. Ceci est en accord avec les observations de Watanabe *et al.* (1983) chez *B. plicatilis* nourri avec

Chlorella d'eau douce. Celle-ci contient des teneurs élevées en acides linoléique (C18:2n-6 = 9,7%) et linoléique (C18:3n-3 = 13,5% du total), mais est pauvre en acides gras longs poly-insaturés de la série n-3. Ils indiquent qu'une production assurée sur cet aliment permet de récolter des rotifères riches en ces deux acides essentiels. Lubzens *et al.* (1985) soulignent d'autre part que les rotifères sont capables de synthétiser des AGPI n-3, mais cette production est relativement faible au niveau tissulaire, et est loin de satisfaire les besoins normaux de croissance des larves de poissons marins. En accord avec Watanabe *et al.* (1983), une amélioration des acides de la série des linoléiques et linoléiques est indispensable, et d'une part possible avec un accroissement du temps de résidence des rotifères dans les milieux de culture. L'utilisation des milieux d'enrichissement ponctuel en AGPI n-3 permettant de compléter la valeur nutritive des rotifères et leurs besoins alimentaires propres est d'autre part possible.

En conclusion, l'influence de la température sur le niveau de développement des rotifères permet de constater que ce facteur physique doit être largement

pris en compte dans la détermination des conditions optimales d'élevage de ces organismes. Les valeurs des paramètres biologiques obtenues et comparées à celles des autres clones font apparaître chez *B. calyciflorus* qu'à température identique les durées de développement sont variables. L'accroissement de la température engendre, d'une part, une augmentation significative du nombre de jeunes produits par femelle et par jour et, d'autre part, une diminution sensible de la durée de vie moyenne des femelles amictiques. Comparativement aux femelles précultivées, il est plus judicieux, dans le cadre d'une production en continu sur *D. chlorelloides*, de démarrer les cycles de production avec des inoculants composés exclusivement de jeunes femelles amictiques. Celles-ci permettent d'atteindre au terme de 240 h de culture, une biomasse de rotifères de plus de 700 mg de poids frais. l⁻¹. Aucune déficience nutritionnelle n'a été observée chez les rotifères produits, en particulier chez les acides aminés dont les teneurs sont comparables à celles obtenues chez les Entomostracés couramment utilisés en larviculture d'eau douce.

RÉFÉRENCES

- Adeyemo A. A., G. A. Oladesu, A. O. Ayinka 1994. Growth and survival of fry of African catfish species *Clarias gariepinus*, *Heterobranchus bidorsalis* and *Heteroclaris* reared on *Moina dubia* in comparison with other first feed sources. *Aquaculture* **119**, 41-45.
- Aujero E. J., E. Tech 1985. Growth and macronutrient composition of algal foods grown in various inorganic media. SEAFDEC Aquac. Dep, Tigbauan, Iloilo, Philippines, 24 p.
- Awaïss A. 1992. Eco-physiologie, production en masse et potentialités en pisciculture (larviculture) du rotifère d'eau douce (*Brachionus calyciflorus*) (Pallas). Thèse Dr. Sciences, FUNDP, Namur, Belgique, 231 p.
- Awaïss A., P. Kestemont 1992. An investigation into the mass production of the freshwater rotifer (*Brachionus calyciflorus*) Pallas. 2. Influence of temperature on the population dynamics. *Aquaculture* **105**, 337-344.
- Awaïss A., P. Kestemont, J. C. Micha 1992a. An investigation into the mass production of the freshwater rotifer (*Brachionus calyciflorus*) Pallas. 1. An eco-physiological approach to nutrition. *Aquaculture* **105**, 325-336.
- Awaïss A., P. Kestemont, J. C. Micha 1992b. Nutritional suitability of the rotifer (*Brachionus calyciflorus*) Pallas for rearing freshwater fish larvae. *J. Appl. Ichthyol.* **8**, 263-270.
- Awaïss A., P. Kestemont, J. C. Micha 1993. Étude du premier alevinage du poisson-chat africain (*Clarias gariepinus*) (Burchell, 1822) avec le rotifère d'eau douce (*Brachionus calyciflorus*). In: Production, environment and quality. G. Barnabé, P. Kestemont eds. EAS Spec. Publ. 18, Ghent, Belgium, 443-453.
- Ben-Amotz A., R. Fishler, A. Schneller 1987. Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. *Mar. Biol.* **95**, 31-36.
- Bennett W. N., M. E. Boraas 1988. Isolation of a fast-growing strains of the rotifer (*Brachionus calyciflorus*) Pallas using turbidostat culture. *Aquaculture* **73**, 27-36.
- Bennett W. N., M. E. Boraas 1989. A demographic profile of the fastest growing metazoan: a strain of (*Brachionus calyciflorus*) (Rotifera). *Oikos* **55**, 365-369.
- Charlon N., P. Bergot 1984. Rearing system for feeding fish larvae on dry diets. Trial with carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture* **41**, 1-9.
- Christophe A., T. Mattijs 1966. New methods for the determination of the fatty pattern of serum lipid classes. *Clin. Chim. Acta* **16**, 39-43.
- Dagnelie R. 1975. Théorie et méthodes statistiques. Presse Agronomiques de Gembloux, 2, 463 p.
- De Pauw N., J. Morales, G. Persoone 1984. Mass culture of microalgae in aquaculture systems: progress and constraints. *Hydrobiologia* **116**, 121-134.
- Federov H., G. A. Karayush 1974. An investigation of the physiological activity of mono-cultures and mixed cultures of various blue-green-algae. In: Aktual'nyye Problemy Biologii Sinezekebykh Vodorosley (Tropical problems in the biology of blue-green Algae). Nauka Dumka Press, Kiev, 32-40.
- Feldman D., J. Gagnon, R. Hofmann, R. Simpson 1988. Statview TMSE, the solution for data analysis and presentation graphics. From Abacus Concepts, Inc. Berkeley, CA (415)94704, 540-1949.
- Galkovskaja G. A. 1987. Planktonic rotifers and temperature. *Hydrobiologia* **147**, 307-317.
- Gatesoupe F. J., P. Luquet 1981. Practical diet for mass culture of the rotifer (*Brachionus plicatilis*): application to larval rearing of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* **22**, 149-163.

- Guisande C., L. Serrano 1989. Analysis of protein, carbohydrate and lipid in rotifers. *Hydrobiologia* **186**, 339-346.
- Handa N. 1969. Carbohydrate metabolism in the marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonella conferrancea* (Cleve). *Can. J. Microbiol.* **8**, 229-239.
- Henrikson R. L., S. C. Meredith 1984. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analyt. Biochem.* **136**, 65-74.
- Hirayama K., H. Fumamoto 1983. Supplementary effect of several nutrients on nutritive deficiency of Baker's yeast for population growth of the rotifer (*B. plicatilis*) fed recycled algal diets. *Hydrobiologia* **104**, 71-75.
- Hoff F. H., T. W. Snell 1987. Plankton culture manual. Published by Florida Aqua Farms, Inc. 2nd Ed., 126 p.
- Hogendoorn H. 1980. Controlled propagation of the African catfish *Clarias lazera* (C. and V.). III. Feeding and growth of fry. *Aquaculture* **21**, 233-241.
- James C. M., T. Abu-Rezeq, P. A. Dias, A. E. Salman 1986. Production dynamics and nutritional quality of the rotifer (*Brachionus plicatilis*) under different feed regimes. *Kuwait Inst. Sci. Res. Rep.* KISR 2183, 30 p.
- James C. M., T. S. Abu-Rezeq 1988. Effect of different cell densities of (*Chlorella capsulata*) and a marine (*Chlorella* sp.) for feeding the rotifer (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture* **69**, 43-56.
- Kestemont P., A. Awaïss 1989. Larval rearing of the gudgeon (*Gobio gobio*) under optimal conditions of feeding with the rotifer (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture* **83**, 305-318.
- Legendre M. 1992. Bilan des premiers essais d'élevage d'un silure africain, *Heterobranchus longifilis* (Clariidae), en milieu lagunaire (Lagune Ebrié, Côte-d'Ivoire). In: Recherches sur les systèmes aquacoles en Afrique. G. M. Bernacsek, H. Powles eds., 14-17 nov. 1988, Bouaké, Côte-d'Ivoire. Int. Development research Center, Ottawa, Ont., IDRC-MR308e, f, 211-232.
- Lubzens E., G. Minkoff, S. Marom 1985. Salinity dependence of sexual and asexual reproduction in the rotifer (*B. plicatilis*). *Mar. Biol.* **85**, 123-126.
- Lubzens E. 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia* **147**, 245-255.
- Otémé Z. J., S. Gilles 1995. Élevage larvaire du silure africain *Heterobranchus longifilis*: évaluation quantitative des besoins en proies vivantes des larves. *Aquat. Living Resour.* **8**, 351-354.
- Pourriot R. 1986. Les Rotifères - Biologie. *Aquaculture* **5**, 201-221.
- Pourriot R., L. Leborgne 1970. Teneurs en protéines, lipides et glucides de zooplancton d'eau douce. *Ann. Hydrobiol.* **1**, 171-178.
- Pourriot R., C. Rougier 1975. Dynamique d'une population expérimentale du rotifère (*Brachionus dimidiatus*) en fonction de la nourriture et de la température. *Ann. Limnol.* **11**, 125-143.
- Schlösser H. J., K. Anger 1982. The significance of some methodological effects on filtration and ingestion rates of the rotifer (*Brachionus plicatilis*). *Helgol. Meeresunt.* **35**, 215-225.
- Schlüter M., J. Grocneweg, C. J. Soeder 1987. Growth and food conversion of (*Brachionus rubens*) in continuous culture. IRL Press Ltd, Oxford, 761-783.
- Scott A. P., S. M. Baynes 1978. Effect of alga diet and temperature on the biochemical composition of the rotifer (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture* **14**, 247-260.
- Shifrin N. S., S. W. Chisholm 1980. Phytoplankton lipids: Environmental influences on production and possible commercial applications. In: Algae biomass. G. Shelef, C. J. Soeder eds., Elsevier, 627-645.
- Tsuzuki M., E. Ohnuma, N. Sato, T. Takaku, A. Kawaguchi 1990. Effects of CO₂ concentration during growth on fatty acid composition in microalgae. *Plant Physiol.* **93**, 851-856.
- Verreth J. 1994. Nutrition and related ontogenetic aspects in larvae of the African catfish, *Clarias gariepinus*. PhD Thesis, Wageningen, The Netherlands, 205 p.
- Watanabe T. 1979. Nutritional quality of living feeds used in seed production of fish. In: Proc. 7th Japan-Soviet Symp. Aquaculture, Tokai University, Tokyo, 49-60.
- Watanabe T., T. C. Kitajima, S. Fujita 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish. A review. *Aquaculture* **34**, 115-143.