

SZENT ISTVÁN EGYETEM
GAZDASÁGI, AGRÁR- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI KAR
TESSEDIK CAMPUS
KÖRNYEZETTUDOMÁNYI INTÉZET

Tudományos Diákköri Dolgozat

**AKVAKULTÚRÁBAN HASZNÁLT ÉLŐTÁPLÁLÉK SZERVEZETEK
DÚSÍTÁSI TECHNOLOGIÁJÁNAK FEJLESZTÉSE**

Készítette:

Karádi Szilvia
IV. évf. BSc hallgató

Konzulens:

Dr. habil. Jakab Gusztáv
egyetemi docens

Külső konzulens:

Jakabné Dr. Sándor Zsuzsanna
tudományos főmunkatárs
Halászati és Öntözési Kutatóintézet

SZARVAS
2013

Utolsó módosítás dátuma: 2013.10.12.

Tartalomjegyzék

Bevezetés és célkitűzés	4
1. Irodalmi áttekintés	7
1.1. A vitaminok	7
1.1.1. A C-vitamin	7
1.1.2. A B ₁ -vitamin	10
1.1.3. A B ₆ -vitamin	11
1.2. A zsírok és zsírsavak	13
2. Anyag és módszer	15
2.1. <i>Artemia salina</i>	15
2.2. A kísérletben szereplő halfajok bemutatása	16
2.3. Kísérleti protokollok	18
2.3.1. Az <i>Artemia salina</i> lárvák táplálása C-vitamin tartalmú készítmények alkalmazásával	18
2.3.2. Az <i>Artemia salina</i> lárvák táplálása C- és B-vitamin tartalmú készítmények alkalmazásával	20
2.3.3. Élő eleség esszenciális zsírsavakkal történő dúsításához alkalmazandó emulzió üzemi szintű előállítása	22
2.4. Halivadékok etetése dúsított <i>Artemia</i> lárvákkal	24
2.4.1. Ponty etetési kísérlet	24
2.4.2. Barramundi etetési kísérlet	25
2.4.3. Vörös árnyékhal etetési kísérlet	26
2.5. Vízoldható vitaminok meghatározása nagy nyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) ..	27
2.6. A zsírsavösszetétel meghatározása gázkromatográfiával	28
3. Eredmények	30
3.1. Dúsítási technológiák fejlesztése	30
3.2. Etetési kísérletek	31
4. Következtetések	37

4.1. Dúsítási technológiák fejlesztése	37
4.2. Etetési kísérletek.....	37
Összefoglalás	39
Irodalomjegyzék	41
Ábrajegyzék	45
Táblázatjegyzék	46
Köszönetnyilvánítás	47
Mellékletek	48

Bevezetés és célkitűzés

Az elmúlt időszakban jelentős mértékben megnövekedett a halászati tevékenység az egész világon. Emiatt a halállományok nagy része veszélybe került. Ezzel párhuzamosan a társadalmi igény láthatóan növekszik a telítetlen zsírsavakban, nyomelemekben, vitaminokban gazdag táplálékok, így a halfélék iránt is, ez legfőképpen a magasabb esszenciális zsírtartalmú halfajokra igaz. A haltermelést meglehetősen befolyásolják az eltérő piaci igények és követelmények, a vásárlói szokások, a földrajzi és gazdasági viszonyok. (BLASKÓ et. al., 2011)

Az európai akvakultúra haltermelésének mintegy 75 százalékát a pisztrángfélék, 12 százalékát a pontyfélék, és 9 százalékát a mediterrán halfajok, mint a tengeri sügér és az aranydurbincs teszi ki. Az elmúlt évtizedekben, az édesvízi tavakban és átfolyóvizes rendszerekben tenyésztett pontyfélék és pisztrángok termelése a kereslet korlátozottsága miatt nem változott. Azonban a ketreces technológia fejlesztésével, a termelési költségek lecsökkentek, így a tengeri ketrecekben nevelt halfajok, mint a lazac, tengeri sügér és aranydurbincs termelése nagymértékben megnövekedett. Habár alacsony termelői árakkal jelentős korlátozó tényezőként szerepelnek az új halfajok értékesítésében, és a szárazföldi haltermelő rendszerek működésében, mégis vannak rá példák, hogy a megfelelő technológiával és marketinggel is sikeresek lehetnek az intenzív édesvízi rendszerek. Ilyenek például a rombuszhal és afrikai harcsa Európában, vagy a barramundi és vörös árnyékhal Ausztráliában és egyre inkább Európában is. (FELEDI et. al., 2011)

Az akvakultúra, a geotermikus energia hasznosításának egyik legfőbb területe. A hazai haltermelés kiugrásának egyik lehetősége az ország speciális adottságaiban rejlik. Izland után Magyarország rendelkezik Európa második legjelentősebb geotermikus vízkészletével, aminek oka egyrészt, hogy a Kárpát-medencében az üledékes kőzetek dominálnak, másrészt a földkéreg hazánkban az átlagosnál vékonyabb. Ez az adottság hazánkban is lehetőséget adhat olyan melegigényes halfajok termelésére, mint a fentebb már említett barramundi és az afrikai harcsa. (FEHÉR et. al., 2012)

A zárt, intenzív és recirkulációs elven működő, energiatakarékos és környezetbarát haltermelési rendszerek egyre nagyobb tért hódítanak meg, termelési volumenük erős növekedési tendenciát mutat. A recirkulációs rendszerek üzemeltetésének legkritikusabb tényezői a vízmozgatás energiatakarékossága, a szűrő-tisztító rendszerek hatékonysága és biztonsága mellett a halfaj és korosztály specifikus, optimális beltartalmú takarmányok, eleségek megléte. (Debreceni Egyetem, 2012)

A takarmány jelentős mértékben képes befolyásolni a hús minőségét és a fogyasztói megítélést. Az elfogyasztott táplálék kihat a zsírtartalomra és az érzékszervi tulajdonságokra. A megfelelően kiválasztott, kialakított takarmányozással jelentősen javíthatjuk a termékminőséget. (HORVÁTH et. al., 2012)

A tengeri, valamint édesvízi akvakultúrában, vagyis a haltenyésztési ágazatban elsődleges cél tehát az egészséges, optimális - korra, méretre egyöntetű- halállomány elérése, melyhez első lépésként a lárvanevelés hatékonyságának növelése szükséges. Ebben legnagyobb szerepe a táplálék megfelelő beltartalmának lehet, mivel a jobb takarmányhasznosítás a növekedési erő még tökéletesebb kiaknázását, katalizálását eredményezheti. Mivel a halaknak, mint ahogyan minden élőlénynek, olyan anyagokra van szükségük, melyekből képesek felépíteni, működtetni saját szervezetüket. Ezen anyagokat táplálék formájában veszik fel környezetükből. Bizonyos vitaminok hiánya vagy elégtelen volta a növekedésben, mortalitásban, deformitásokban jelentkezhetnek.

Az akvakultúrában az egyik legfontosabb kérdés az élő táplálék biztosítása. Az egyes halfajok és korosztályok élőtáplálék-igénye rendkívül eltérő, mind a táplálék minőségében, mind mennyiségében. Szerepe igen nagy az éppen táplálkozni kezdő lárvánál, ill. a szaporításra szánt tenyészállatoknál. Az élőtáplálék-szervezetek tartalmazzák optimális arányban és mennyiségben azokat a legfontosabb tápanyagokat (fehérjék, aminosavak, zsírok, vitaminok, nyomelemek, enzimek stb.), melyek halaink számára nélkülözhetetlenek. Igaz ugyan, hogy ma már sok - és tápértéket tekintve kitűnő - mesterséges táp áll a rendelkezésünkre, azonban még a legjobb sem tudja helyettesíteni azt az élettani hatást, melyet az élő táplálék biztosít. Illetőleg a hallárvák mesterséges tápra szoktatása egyes fajoknál igen nehézkes. (HORVÁTH, 1993)

Az élőtáplálék szervezetek tápanyagtartalma az eltérő élőhelyi sajátosságok miatt széles intervallumban változik, különösen a vízőldékony vitaminok esetében, melyek hiánya a hallárvák életképességét, növekedését, fejlődését nagyban befolyásolja. Mivel az élőtáplálék szervezetek, valamint mikroalgák C-vitamin, illetve zsírsavtartalma tehát igen változó, így a hallárvák folyamatos és optimális mértékű tápanyag szükségletét ezek nem képesek biztosítani.

A hallárvák korai táplálkozásában fontos szerepet töltenek be az *Artemia salina*, illetve a kerekessférgék (*Rotatoria*). Ezen szervezetek alacsony esszenciális zsírsav- és vitamin tartalmának módosításával, megfelelő táplálással alkalmassá tehetők hallárvák indító eleségként történő alkalmazására. (SÁNDOR, 2013)

Az élotáplálék szervezetek ezen hiányosságaira csak a késő 70-es és korai 80-as években figyeltek fel. Ekkortájt ugrott meg több halfaj termelési volumene, ezért a tenyésztőknek további artémia forrásokat kellett felhasználniuk, mely váratlan problémákat eredményezett a termelési hozamokban. Japán, amerikai és európai kutatók tanulmányozták az esetet és hamar rájöttek, hogy tápértékükben eltérnek a különböző földrajzi forrásokból származó élotáplálék szervezetek. A helyzet kritikusabbá vált, mikor szignifikáns különbségeket tapasztaltak az azonos forrásból etetett halcsoportok termelési hozamainál. Néhány tanulmány bebizonyította, hogy az esszenciális zsírsavak (EFA) koncentrációja az artémia naupliusokban a halak tápértéke szempontjából meghatározó. Ezeket a megfigyeléseket követve az artémiák és rotatóriák táplálkozási szempontjai jelentős figyelmet kaptak az akvakultúrában, így a lárvanevelés hatékonyságának elősegítésére az elmúlt évtizedekben számos dúsítási technológiát fejlesztettek ki világszerte az élotáplálék szervezetek tápanyagtartalmának növelésére. Angol, japán, francia és belga kutatók is részt vettek a fejlesztésekben, melyekben algát, élesztőt, emulgált készítményeket, kevert etetést, mikroszemcsés etetést és ön-emulgáló koncentrátumokat használtak. A legmagasabb dúsítási szintet az emulziós eljárásokkal kapták. Ezt a technikát leszámítva a különböző módszerek némileg változnak, tekintettel a keltetési körülményekre, az elődúsítási és dúsítási időszakra, valamint a hőmérsékletre. A számos tanulmány bebizonyította a pozitív hatását a dúsított élotáplálék szervezeteknek a növekedésben és az életben maradásban a különböző akvakultúr fajoknál. (AGH-SORGELOOS, 2005; AKBARY et. al., 2011; COUTTEAU-SORGELOOS, 1997)

Azonos célú eljárásunkban különböző halfajok (ponty, barramundi, illetve vörös árnyékhal) termelhetőségének javítása történik élotáplálék szervezetek (*Artemia salina*) különböző dúsítási technológiák fejlesztésével, mivel főként a barramundi (*Lates calcarifer*) és vörös árnyékhal (*Sciaenops ocellatus L.*) esetében idegenhoni származásuk miatt, hazánkban zárt, intenzív rendszerekben tenyésztik őket. Ezen épített rendszerek hátránya, hogy a természetes vizekben alapvetően meglévő élotáplálék szervezeteket nélkülözik.

Célunk, hogy laboratóriumi körülmények között alkalmazható technológiákat dolgozzunk ki a kísérletben felhasznált vitaminok, illetve esszenciális zsírsavak élőelesebbe juttatására, az *Artemia* bio-enkapszulációs képességének, valamint a vízben a testfelületükre történő adszorpció kihasználásával. Továbbá e technológiák alkalmazása és tesztelése az élotáplálék szervezeteken és különböző halfajokon.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A vitaminok

Az állatok normális fejlődésükhöz, életműködésükhöz igénylik ezen nem táplálék jellegű, természetes szénvegyületeket. Biokatalizátor szerepet töltenek be az anyagcsere szabályozás és az energiatranszformálás terén. Hiányukban betegségek léphetnek fel (hipovitaminozis, avitaminozis), melyek következtében zavarok jelentkeznek a fejlődésben, az ellenállóság és a szexuális funkciók pedig lecsökkennek. Manapság elterjedtek a szintetikus vitaminkészítmények, melyek a táplálékot hatékonyan kiegészítik. (TÓTH, 1999; ÁDÁM - FEHÉR, 1988)

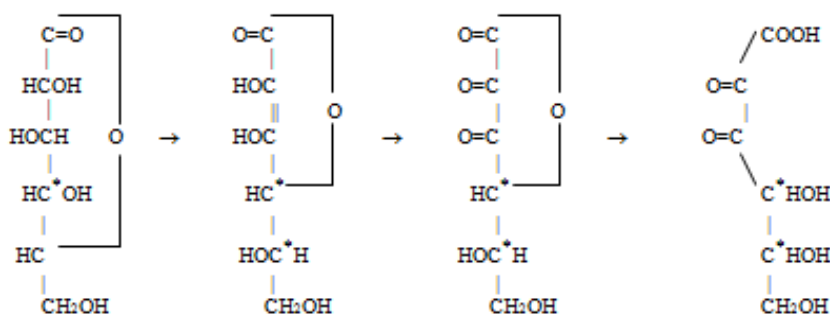
A vitaminokat két csoportba sorolják az oldhatóság alapján: vízben oldódó vitaminok (B, C, P) és zsírban oldódó vitaminok (A, D, E, K). (TASNÁDI, 1983) Jelen kísérletben a vízben oldható vitaminok közül kerültek felhasználásra.

1.1.1. A C-vitamin

Szent-Györgyi Albert volt, aki először izolálta a C-vitamint, mikor 1928-ban ismeretlen anyagot talált a mellékvesében. Miután megállapította annak összetételét ($C_6H_8O_6$), hexorunsavnak nevezte el. Szegeden a paradicsompaprika présnedvéből vonta ki ezt az anyagot a legnagyobb mértékben, majd később kidolgozták a paprikából kiinduló C- vitamin gyártás módszerét is. Ez volt az első vitamin, melyet laboratóriumi körülmények között állítottak elő. 1932-ben Szent- Györgyi Albert és tőle függetlenül J. Tillmans tengeri malacokkal végzett kísérleteikkel igazolták, hogy a C-vitamin és a hexuronsav azonos vegyület. Közös javaslatra L-aszkorbinsavnak nevezték el, a skorbut elleni hatására utalva. 1937-ben Szent-Györgyi megkapta az élettani-orvosi Nobel díjat a C-vitaminnal kapcsolatos felfedezése miatt

A vízben oldódó vitaminok közé tartozik. Élettani és biológiai funkciói sokrétűek, ezért az emberek és az állatok számára nélkülözhetetlen. Néhányan közülük, mint a majmok, a tengerimalacok, az ember, a halak nagy része és egyes madarak csak táplálkozás útján jutnak hozzá, míg más élőlények képesek szintetizálni, mivel elegendő gulonolakton-oxidáz (GLO) enzim aktivitással rendelkeznek. (PAPP, 2003)

L-gulonolakton $\rightarrow$ L-aszkorbinsav $\Leftrightarrow$ dehidro-L-aszkorbinsav $\rightarrow$ 2,3-diketo-gulonsav



1. ábra: A C-vitamin keletkezése és lebomlása a természetben

(Forrás: DABROWSKI et. al. 1994)

Abszorpciója többnyire a belekben történik egy aktív transzport mechanizmuson keresztül. A felvehető mennyiség a nyálka Na^+ koncentrációjától függ. Lebomlása végbemehet két útvonalon is. Az L-aszkorbinsav reverzibilis oxidációja dehidro-L-aszkorbinsavvá minden esetben a folyamat első szakasza, ezután irreverzibilisen diketo-gulonsavvá alakul, aminek biológiai aktivitása már nincs.

Az aszkorbinsav monoszacharid-származéknak tekinthető, mert az L-glükózból levezethető 2-dezoxi-2-keto-L-gulonsav γ -laktonjának dienol alakja. Erős redukálószer, emiatt könnyen oxidálódik.

Az L-aszkorbinsav színtelen, kristályos vegyület. Kémiai és fizikai tulajdonságait az egy savas protont tartalmazó, öt szénatomból álló gyűrű határozza meg. Kémiaiag erősen reaktív csoportjai miatt, a természetes formáknál stabilabb, biológiaiilag aktív formája iparilag is előállítható.

A C-vitamin elektron donor is, ezen alapszanak biokémiai reakciói. A fémionoknak egy vagy két elektront tud átadni.

Immunstimulátor, mely szerepet játszik a fiziológiai állapot javításában, véd a környezeti káros hatásoktól és a fertőzésektől.

Közreműködik a májban végbemenő detoxikációs folyamatokban. Az L-aszkorbinsav csökkenti az egyes fémek mérgező hatását, így például az ólomét, a kadmiumét és a nikkelét. Redukált formába alakítja őket, ezáltal kevésbé abszorbeálóknak és gyorsan távoznak a szervezetből. (PAPP, 2003)

A C-vitamin biztosítja a bélcsatornából történő vas felszívódását a vas redukciója révén és részt vesz az E-vitamin regenerációjában. (ÁDÁM - FEHÉR, 1988)

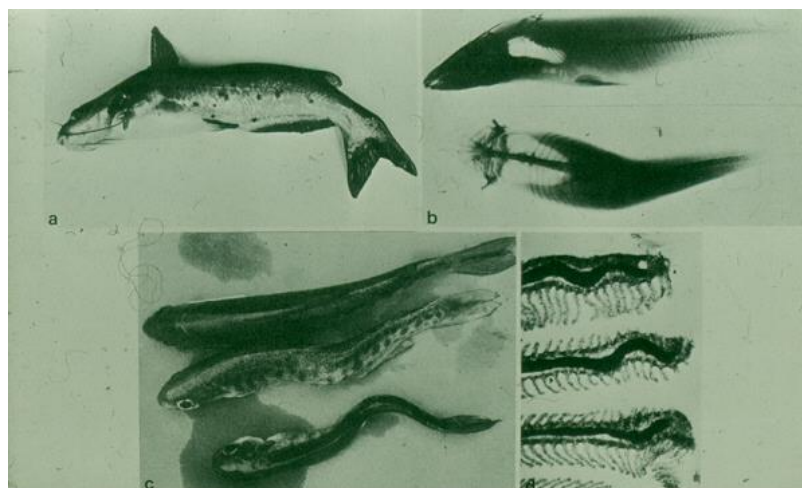
A C-vitamin hiány- és túladagolás tünetei a halaknál

TUCKER és HALVER (1986) szerint lassan, hetek, hónapok alatt alakulnak ki azok a makroszkopikus tünetek, melyeket az L-aszkorbinsav hiánya okoz. (PAPP, 2003) A gyenge növekedést, lelassult mozgást és étvágycsökkenést követi a gerinc torzulása és a kopolyúfedél rövidülése. (TÓTH, 1999)

Gyakori tünet még a bőr elszíneződése, a farokúszó elváltozása és a test különböző részein történő fokozott vérékenység kialakulása. A sebek gyógyulása jelentősen lelassul, a vér hemoglobin tartalma csökken, csak úgy, mint a betegségekkel és stresszel szembeni ellenálló képesség. Mindezen tünetek következménye a jelentős arányú elhullás. (TASNÁDI, 1983)

A C-vitamin hiánybetegsége a skorbut, mely a középkori hajózások korából ismert, és ami a halakra is veszélyes. (ÁDÁM - FEHÉR, 1988)

A pisztráng- és pontyféléken mutatkozó stressz hatásokért is az L-aszkorbinsav hiánya felelős. A különböző kezelésekkel, mint a teleltetéssel, áthelyezéssel járó stressz hatások kiegyensúlyozásában jelentős szerepe van. Ha a C-vitamin-ellátásuk javul, ugrásszerűen megszűnik a stressz hatás is. Az alacsony hőmérsékletnek kitett állatokat a nagy C-vitamin dózis felerősíti. (TASNÁDI, 1983)



2. ábra: A gerinc görbülete a farokúszó előtt
(Forrás: HALVER et.al., 1969; NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.), 1973)

Régen még azt feltételezték, hogy a C-vitamin felesleg a vizelettel távozik, de mára már bebizonyították, hogy a hosszan tartó túlzott adagolása károsodáshoz vezet. Ennek a káros következménynek az L-aszkorbinsav lebomlási termékeként keletkező vesekő a legismertebb formája. (PAPP, 2003)

A halak C-vitamin igénye

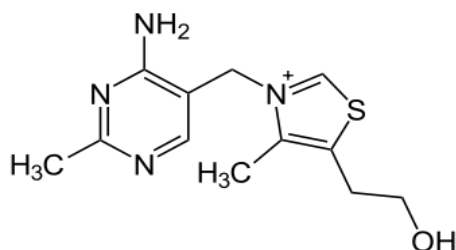
barramundi: 25-30 mg/kg (AMBASANKAR et. al. 2009)

pontyfélék: 50 mg/kg (TUCKER -HALVER, 1986)

pisztráng: 100 mg/kg (TUCKER - HALVER, 1986)

1.1.2. A B₁-vitamin

Más néven tiamin. Az egyik legkorábban felfedezett vitamin. Vízben oldódó vitaminok közé tartozó, hőre érzékeny vegyület. Mivel szinergista hatásúak, a B-vitaminok hatásosabbak, ha együttesen alkalmazzák őket. Nitrogén és kén tartalmú heterociklusos vegyület, amely egy pirimidin és egy tiazol gyűrűből áll. Szintelen, szilárd anyag, mely savas közegben stabil vegyület, semleges vagy lúgos kémhatású oldatban pedig oxidáció révén lebomlik.



3. ábra: Tiamin

(Forrás: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.1098.html>)

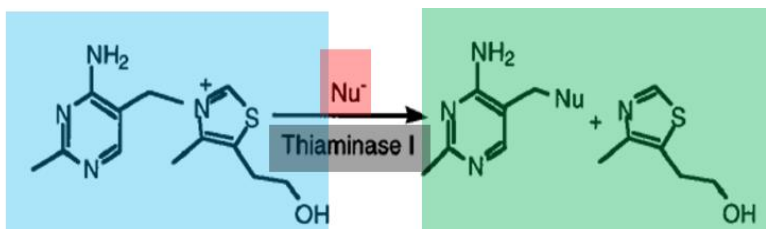
Jelentős szerepe van a szénhidrát anyagcserében, miután a pirosszőlósav dekarboxilezését végző enzim koenzimje energiát fejleszt, segíti a szénhidrátok égetését és létfontosságú szerepe van az izmok és a szív működésében. Az idegrendszerben nélkülözhetetlen mivel részt vesz az acetil-kolin szintézisében, mely az idegsejtek közti ingerület átviteléért felel. (PROKISCH, 2010;)

A B₁-vitamin hiány- és túladagolás tünetei a halaknál

Mivel a szénhidrát-anyagcsere tiamint igényel, a szénhidrátban gazdag táplálkozással növekszik a szervezet vitaminigénye, ezáltal könnyebben alakul ki a hiánybetegség. A hiány tünetei közé tartozik az étvágycsökkenés, letargia, növekedés elmaradása, rossz takarmányhasznosítás, izmok tónuseloszlásának megváltozása, egyensúlyzavar, bőr sötét elszíneződése. További tünet még az összerendezetlen izom- és kopolyúfedő-mozgás, ami

légzési zavarhoz vezet. Gyakori és nagy ivadékkori elhulláshoz vezet a tiamin hiány. (TASNÁDI, 1983; ÁDÁM - FEHÉR, 1988)

Egyes halak tiamináz enzimje már a bélben elbontja a tiamint, ezzel vitaminhiányt okozva. A halfej tiamináz-enzim-tartalma jelentős. A tiamináz a tiamin antivitaminja. (TASNÁDI, 1983)



4. ábra: A tiamin tiamináz általi bontása
(Forrás: CAMPOBASSO et al., 1998.)

A túlzott tiamin bevitel mérgezést okozhat. A kelleténél nagyobb mennyiségű B₁-vitamin a többi B-vitamin kiürüléséhez vezet. (VITAMINIMUM)

A halak B₁-vitamin igénye

A takarmány B₁-vitaminnal való kiegészítése, csak iparszerű nevelési körülmények között szükséges, mivel a természetes táplálékszervezetek bőségesen tartalmazzák. (TÓTH, 1999)

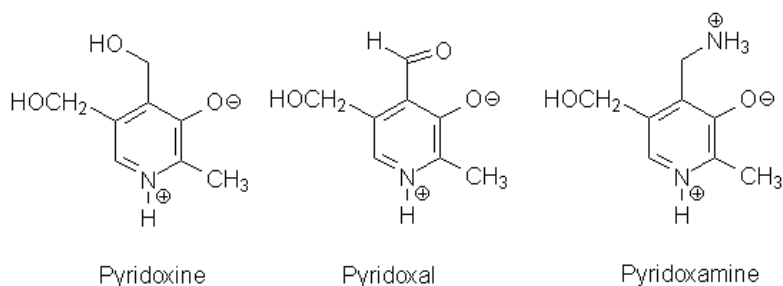
Kívánatos adagja: 0,2 mg/4200 kJ

pontyfélék: 4,5 mg/kg

pisztráng: 0,13-0,2 mg/testtömeg-kg/nap (TASNÁDI, 1983)

1.1.3. A B₆-vitamin

Más elnevezései: piridoxin, adermin, piridoxal, piridoxamin. A B-vitamin komplex többi tagjához hasonlóan vízben oldódó vitamin. (TÓTH, 1999) A B₆-vitamin változataira is utal a többféle elnevezés. Kémiai szerkezetét tekintve a piridin egyik származéka, amelynek a szerkezete majdnem megegyezik funkciós csoportok kivételével. A piridoxin alkoholos hidroxilcsoportot, a piridoxal aldehidcsoportot, a piridoxamin pedig aminocsoportot tartalmaz. (ÁDÁM -FEHÉR, 1988)



5. ábra: A B₆-vitamin

(Forrás: <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Shikimate7.html>)

Aktív formája a piridoxál-foszfát, számos aminosav-anyagcsere reakciójában vesz részt kofaktorként. B₆-vitamin kell ahhoz, hogy a B₁₂-vitamin jól felszívódjon. A piridoxin kristályos, vízben jól, alkoholban nehezen oldódó vegyület, amely nem oxidálódik hőre, semleges és lúgos közegben fény hatására lebomlik. (ERDMAN et. al., 2012) A halak szervezetének nitrogén-anyagcseréjében, több enzim alkotórészeként tölt be szerepet. A szaporítóhalak ikratermelésében mutatkozik meg jelentősége. (TASNÁDI, 1983)

A B₆-vitamin hiány- és túladagolás tünetei a halaknál

Hiánya esetén normális étvágy ellenére is rossz a takarmányértékesítés, gyenge a növekedés, a májon világos foltok jelentkeznek, az ikra rosszul termékenyül, veseelégtelenség alakul ki, a bőrfelületek sérülékennyé válnak és gyengén regenerálódnak, jelentős lesz az elhullási arány. (TASNÁDI, 1983) Továbbá a piridoxin hiány a fehérje-anyagcsere károsodásával jár, mivel a piridoxál-foszfát a fehérje-anyagcserét szabályozó enzimek koenzimje. Halak közül a pisztrángfélék érzékenyek a B₆-vitaminhiányra, mivel ha a vitamin koncentrációja 10 mg/kg tápláléknál kisebb, anémia és mozgási rendellenesség alakulhat ki. (ÁDÁM - FEHÉR, 1988)

A halak B₆-vitamin igénye

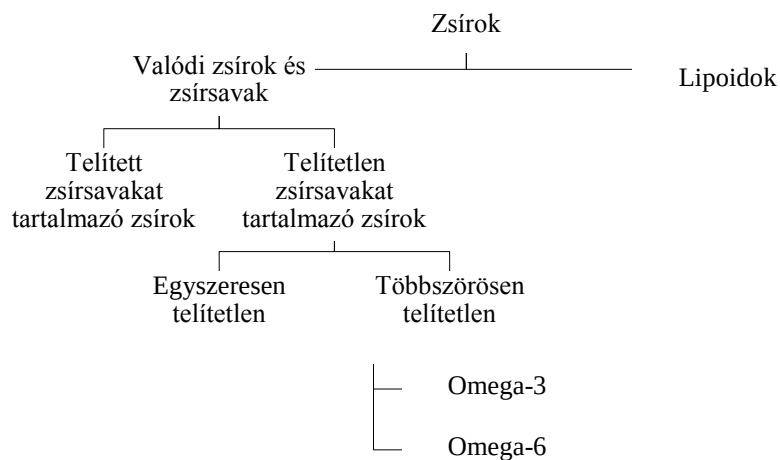
barramundi: 5-10 mg/kg (AMBASANKAR, 2009)

pontyfélék: 8 mg/kg (TASNÁDI, 1983)

Pisztráng: 6 mg/kg (FAO)

1.2. A zsírok és zsírsavak

A zsírok nagy energiatartalmú táplálóanyagok, felosztásukat a 6. ábra mutatja be.



6. ábra: A zsírok csoportosítása
(Forrás: Baintner, 1976 után)

A valódi zsírok a glicerinek zsírsavakkal alkotott észterei. Olvadáspontjuk függ attól, hogy a glicerinekhez telített vagy telítetlen zsírsavak kapcsolódnak. A halak számára a telített zsírok nehezebben emészthetők, mint a telítetlenek, mivel a telített zsírok nehezebben hidrolizálnak.

A halak szervezetében a zsírok két nagy csoportba sorolhatóak:

- ❖ A szervi zsírok a sejtek nélkülözhetetlen zsírkészletei, melyeket nem használnak fel energiaszolgáltatási célra, mert hiányokban élettani károsodás lép fel.
- ❖ A raktározott zsír a halak tartalék energiakészlete, melyet az aktív táplálkozási időszakon kívül hasznosítanak.

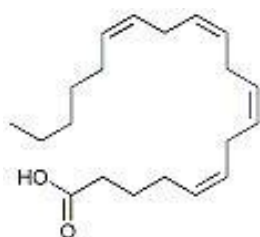
A zsírok összhatásukban befolyásolják a takarmányok értékesülését, hatással vannak a halhús víztartalmára és a halzsír konzisztenciájára.

Az esszenciális zsírsavak vitaminhatást fejtenek ki (F-vitamin). Ezek telítetlen zsírsavak, melyeket a halak nem, vagy csak kis mennyiségben képesek előállítani, így a takarmányok nélkülözhetetlen faktorai. Bőrgyulladás, májelfajulás léphet fel hiányuk esetén és fontos szerepük van az ikra termékenyülő képességében. (TASNÁDI, 1983)

A telítetlen zsírsavak jelölésére egyszerű kódokat használunk, amelyben a szénatomok számát, a kettős kötések számát és a karboxilcsoporttól legtávolabbi kettős kötés távolabbi pillératomjának helyzetét a láncvégi metilcsoporttól számozva tüntetjük fel. (NOVÁK et. al., 2000)

A többszörösen telítetlen zsírsavaknak klinikai szempontból két jelentős típusa létezik.

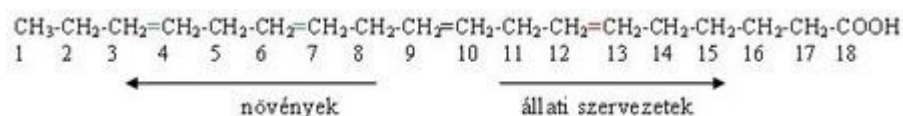
- ❖ Az Omega-3 zsírsavak hosszú szénláncúak, melyek kettőskötései közül az első, a zsírsavmolekula metilcsoportot tartalmazó végétől számított 3. szénatomnál helyezkedik el. Ezen zsírsavak közül az eikozapentaénsav (EPA, 20:5 ω 3) és a dokozahexaénsav (DHA, 22:6 ω 3) leginkább a halakban, halolajokban lelhetők fel.
- ❖ Az Omega-6 zsírsavak inkább növényi olajokban találhatók meg. Ide tartozik az eikozatetraénsav (ARA=arachidonsav, 20:4 ω 6). Enyhén sárgás színű, mozgékony folyadék, olvadáspontját 74-76°C-on éri el. (COVINGTON, 2004; LEAF et. al. 2003)



7. ábra: Arachidonsav

(Forrás: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.392692.html>)

Az esszenciális jelleg abból adódik, hogy pl. a sztearinsav a 9-10. szénatomja között az élő szervezetek mindegyike képes kettőskötés kialakítására, de általában csak a növények képesek kettőskötéseket kialakítani a metil-csoport felé haladva, és az állati szervezetek enzimelei csak a karboxil-csoport és a lánc közepén lévő kettőskötés között képesek deszaturációs folyamatra. (CSENGERI I.)



8. ábra: Kötések kialakítása

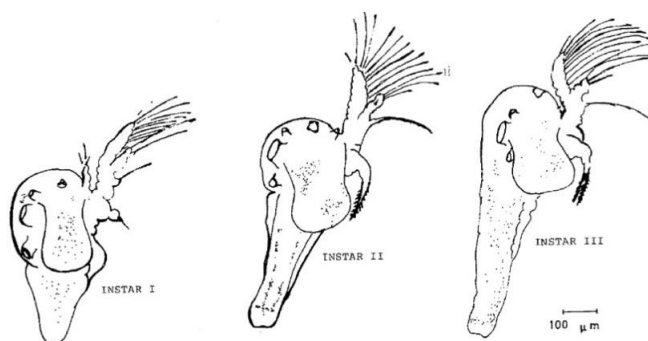
(Forrás: Csengeri I.)

2. Anyag és módszer

2.1. *Artemia salina*

Vízben élő rákfajta, más néven sórák. Az ízeltlábúak törzsébe tartozik. Szinte az egész világon megtalálható a sós vizekben 25%-os sótartalomig. Tengerek vizében nem él, legfőbb előfordulási területe a Nagy- Sóstó (USA).

A kifejlett egyedek 13-16 mm nagyságúak. Testük 19 szegmensből áll. Fejrészüik rövid, szelvényeiken találhatóak a levélláb-párok és a kopolyúk. Bár a halványpiros a domináns, színük igen változatos a sókoncentráció és a víz tápanyagtartalma miatt. A testüket borító rugalmas kitinréteget periodikusan cserélik. Az esetek többségében szűznemzéssel szaporodnak, mivel a hímek ritkán fordulnak elő. A nőstény a petéket nagy számban rakja, ezáltal kedvező körülmények esetén tömegesen fordulnak elő adott élőhelyen. A sóráknak alvó petéi vannak, melyeket cisztáknak neveznek, ezek több évig is aktiválhatók maradnak a vastag burkuknak köszönhetően. (HANS, 1970, TREECE, 2000)



9. ábra: *Artemia salina* L. Instar I, II és III alakja
(Forrás: Hentschel, 1968.)

Az *Artemia salina* alkalmazása az akvakultúrában széles körben elterjedt. A tartós petékből kikelt lárvákat (nauplius) élő eleséggként alkalmazzák. Takarmányozástani szempontból a legnagyobb energiatartalmú táplálék, mivel szikanyagot tartalmaz. Az *Artemia* kémiai összetétele általában 50% fehérje, 20% zsír, 11% szénhidrát. Keltetésük 24-26 óra a víz hőfoktól függően, a keltetéshez szükséges sókoncentráció 15-25 ppt (ng L^{-1}). A keltetés alatt fontos az erőteljes megvilágítás és levegőztetés alkalmazása. A kelés után a nauplius az első vedlésig, kb. 4-6 óráig nem táplálkozik, így a petében tárolt tartalék tápanyagokat felhasználva, tápértéke csökken. Emiatt lényeges, hogy az etetéshez frissen kikelt naupliust (24 órás), a dúsításhoz 28-30 órás Instar II-es vagy későbbi alakok kerüljenek felhasználásra. (TREECE, 2000)

2.2. A kísérletben szereplő halfajok bemutatása

A hazai és európai szinten legnagyobb mennyiségben megtermelt hal a ponty. Ezzel szemben a barramundi és a vörös árnyékhal kereslete csak az elmúlt években nőtt meg jelentősen, pedig igen értékes és exportképes halfajok szálkamentességük és kiváló húsminőségük miatt. Kontrollált termelési rendszerekbe is jól illeszthetőek, növekedési erélyük jó. A hazai termelésben, kutatásban új fajnak számítanak, így a velük folytatott kísérletek számos hasznos eredménnyel zárulhatnak. (FELEDI et. al., 2011). A barramundi és vörös árnyékhal lárvák Izraelből érkeztek a HAKI kísérleti rendszerébe a Jászkiséri Halas Kft. projektvezető közreműködésével.

Barramundi (*Lates calcarifer*)

A sügéralakúak rendjébe tartozó, Csendes-óceáni térség nagytű ragadozó halfaja. A kifejlett példányok eléri a 29–60 centimétert, de másfél méteresre is megnőhetnek. Melegigényes, édes és tengervízben él életszakaszától függően. Katadróm halfaj, így a szaporodáshoz sós vízre van szüksége (30-40 ppt), mivel az ikrák és a lárvák csak így életképesek. A barramundi protandrikus hermafrodita faj, mely tejesként ivarérett, majd ezt követően válik egy részük ikrás egyedé. A lárvák takarmányozásában fontos az élő táplálék, mint az *Artemia*, vagy a *Rotatoria*. Ezen táplálékszervezetek enzimeit jó hatással vannak a halak emésztésére. Élettartama körülbelül 14 év. (FELEDI et. al., 2011; Debreceni Egyetem, 2012)



10. ábra: Barramundi

(Forrás: [www.fishfiles.com.au.photo](http://www.fishfiles.com.au/photo))

Vörös árnyékhal (*Sciaenops ocellatus*)

A vörös árnyékhal széles hőmérséklet és sótűrésű faj, mely szintén a sügéralakúak rendjébe tartozik. Az Atlanti-óceán észak-amerikai partvidéke mentén terjedt el. Az ívás, az ikrák kelése és a lárvák fejlődése ennél a fajnál is sós vízhez kötött. Rákok és halak képezik a legfőbb táplálékát. Maximális élettartama 40 év. Akvakultúrás termelése az 1970-es években kezdődött. (FELEDI et. al., 2011; Debreceni Egyetem, 2012)



11. ábra: Vörös árnyékhal
(Forrás: *W.Savary*)

Ponty (*Cyprinus carpio*)

A ponty a pontyalakúak rendjébe tartozó faj, mely mára szinte az összes földrész édesvizében megtalálható. Alakja a környezeti hatásokra jelentősen változhat, igen jól alkalmazkodik. A nemes pontyok között megkülönböztetünk tükrös, pikkelyes, bőr és oldalsoros változatokat. Az alföldi lassú áramlású és álló vizeket kedveli. Az ívás 18-22°C-os vízben zajlik. A kikelő lárvák első tápláléka a kerekesszék, később kisebb planktonrácokat fogyasztanak. A kifejlett egyedek folyamatos táplálékkereső életmódot folytatnak, mindenevők. (GYÖRE, 1995)



12. ábra: Ponty
(Forrás: *Gallery.nanfa.org*)

2.3. Kísérleti protokollok

2.3.1. Az *Artemia salina* lárvák táplálása C-vitamin tartalmú készítmények alkalmazásával

A) *Artemia salina* lárvák táplálása L-aszkorbinsav oldatban dúsított élettelen algával

Az Instar II vagy III alakú, már táplálkozó *Artemiá*kat etetjük az élettelen alga készítménnyel (instant *Nannochloropsis* sp.), melyet megelőzően 30 percig dúsítottunk L-aszkorbinsav oldatban. Az *Artemia* lárvákat különböző ideig etetjük a dúsított (nem szűrt) algával 1 g/l L-aszkorbinsav koncentrációban és figyeltük a dúsulás mértékét.



13. ábra: Nauplius II lárva
(Forrás: JAKABNÉ SÁNDOR ZS. et al., 2013.)

PROTOKOLL

Az *Artemia* lárvákat előlevegőztetett 2,5%-os vizes oldatban tartjuk. Minden palackban 1l sós vízben kb. 2g kikelt *Artemia* található.

1. 0-kontroll: csak *Artemia*
2. Kezelés: *Artemia* és 1ml hozzáadott fagyasztott, nem dúsított algapaszta
3. C-vitaminos alga kezelés: *Artemia* és 1ml hozzáadott fagyasztott, C-vitaminnal dúsított algapaszta

L-aszkorbinsav oldat készítése (10g/l):

1g L-AA feloldása 100ml 25‰-es sós vízben.

Alga dúsítás:

1ml algát dúsítunk 100 ml, 10g/l L-aszkorbinsav tartalmú vízben levegőztetés nélkül 30 percig.

B) *Artemia* lárvák táplálása 10µg/ml koncentrációjú aszkorbil-palmitát (AP) emulzióval kiegészített élettelen algával

A hallárvák első élő eleségének C-vitaminban történő gazdagítás alapját az képezi, hogy az eljárás során készített, stabilizált, finom emulziót táplálékkul adagoljuk az *Artemia salina* nevű sórák lárváinak. A sórák lárvája bekebelezi és asszimilálja a kémiaiilag stabil és lipofil aszkorbinsav palmitátot (AP), a megfelelő méretben diszpergált olajemulzió cseppcsekék formájában. Ezt követően az *Artemia salina*-val táplálkozó hallárva szervezetébe épül be a C-vitamin.

Az Instar II vagy III *Artemia* lárvákat etetjük aszkorbil-palmitát (AP) zsíroldható C-vitamint tartalmazó készítménnyel. Ehhez az AP emulziót élettelen alga készítménnyel együtt adjuk a már táplálkozó 6 órás Instar nauplius lárváknak és etetjük a kísérlet alatt különböző ideig.

A dúsítási kísérletet állandó levegőztetés mellett végeztük és folyamatosan figyeltük az élő szervezetek életképességét, valamint mértük a rendszerben lévő oldott oxigéntartalmat és hőmérsékletet. C-vitamin analízishez óránként vettünk mintákat, melyeket azonnal fagyasztottunk -75°C-on. A kísérletek végén az *Artemia* minták C-vitamin tartalmát HPLC technikával határoztuk meg.

PROTOKOLL

Az *Artemia* lárvákat előlevegőztetett 2,5%-os sós vizes oldatban tartjuk. Minden palackban 1l sós vízben kb. 2g kikelt *Artemia* található.

1. Ø-kontroll: csak *Artemia*
2. Kezelés: *Artemia* és 1ml hozzáadott fagyasztott, nem dúsított algapaszta
3. Emulziós kezelés: *Artemia* és 1ml hozzáadott fagyasztott, nem dúsított algapaszta és 1ml AP emulzió

Az emulzió előállítása Treece (2000); Teeranachaideekul et. al., (2007; 2008) módszerei alapján kidolgozott eljárás szerint történt.

Emulzió készítés:

Anyagok:

- ❖ 40ml desztillált víz
- ❖ 0,5g zselatin
- ❖ 8ml szójaolaj

- ❖ 0,4g – 1 kapszula szója lecitin
- ❖ 1 kapszula E-vitamin
- ❖ 0,05g beta-karotin
- ❖ 2 kapszula aszkorbil-palmitát (500 mg AP)

Eljárás:

1. Zselatin áztatás 40 ml hideg desztillált vízben, majd oldás 80°C-os vízfürdőn, és visszahűtés 40°C-ra (100 ml lombik)
2. Olaj emulzió: 100 ml pohárban 8 ml olaj keverése 80°C-on 2 kapszula AP-tal 2- percig, majd béta-karotinnal 30 másodpercig, szója lecitin és E-vitamin hozzáadás, keverés további 30-60 másodpercig
3. Az Euro-Turrax bekapcsolt állapotában a zselatin oldat hozzáadás és keverés 2x1 percig.
4. Az emulzió tárolása felhasználásig

2.3.2. Az *Artemia salina* lárvák táplálása C- és B-vitamin tartalmú készítmények alkalmazásával

A naupliusok dúsítása C és B-vitaminokkal - B₁ és B₆ - két féle módon történt.

A) *Artemia* lárvák dúsítása vízben oldható vitaminokkal, fürdetéses etetéssel

Ebben a kísérletben a vitamin anyagok a vitaminszemcsék elfogyasztásával, illetve a felületi adszorpcióval juttathatók be az *Artemia* szervezetébe. Ehhez az élettelen alga készítményt 30 percig dúsítjuk 10g/l, L-aszkorbinsav, tiamin és piridoxin oldatban, majd a 6 órás INSTAR II Nauplius lárvákat 1 órán keresztül etetjük a dúsított algával.

PROTOKOLL

100 ml vitamin oldat készítése (10g/l):

1g L-AA, 1 g tiamint, 1 g piridoxint feloldani 100 ml 25‰-es sós vízben

Alga dúsítás:

- a RotigrowNanno algapasztát hűtve tároljuk a kísérlet végéig, utána le kell fagyasztani a következő felhasználásig.
- Naponta 1 ml algát dúsítunk 100 ml 10 g/L vitamin tartalmú vízben levegőztetés nélkül 30 percig.

B) *Artemia* lárvák táplálása C- és B-vitaminokat tartalmazó emulzió készítménnyel

Ehhez a 10 mg/ml koncentrációjú, aszkorbil-palmitátot, tiamint és piridoxint tartalmazó emulziót az élettelen alga készítménnyel együtt adjuk a már táplálkozó 6 órás INSTAR II Nauplius lárváknak és etetjük őket a 1 órán keresztül (1L *Artemiához* 1 ml emulzió, mely 10 µg/ml C-, B₁- és B₆-vitamin koncentrációt eredményez).

PROTOKOLL

Emulzió elkészítése:

Az emulziót az első nap készítjük el, a napi adagot eppendorf csövekben kiporciózva lefagyasztjuk.

Anyagok:

- ❖ 40 ml desztillált víz
- ❖ 0,5 g zselatin
- ❖ 8 ml Szójaolaj
- ❖ 0,4 g – 1 kapsz szója lecitin
- ❖ 1 kapszula E-vitamin
- ❖ 0,05 g beta-karotin
- ❖ 0,5 g B₁- és B₆-vitamin
- ❖ 2 kapszula aszkorbil-palmitát (500 mg)

Az anyagok gyógyszertárból beszerezhetők.

Eljárás:

1. B₁- és B₆-vitaminok feloldása 40 ml desztillált vízben.
2. Zselatin áztatása fél órát, majd oldás 80°C-os vízfürdőn, és visszahűtés 40°C-ra (100 ml lombik).
3. Olaj emulzió: 100 ml pohárban 8 ml olaj keverése 80°C-on béta-karotinnal 30 másodpercig, szója lecitin és E-vitamin hozzáadás, keverés további 30-60 másodpercig.
4. Az Euro-Turrax bekapcsolt állapotában a zselatin oldat hozzáadása és keverés 1 percig, majd a hőérzékeny aszkorbil-palmitát hozzáadása és keverés még 1 percig.
5. Az emulzió tárolása hűtőben felhasználásig.

Az emulzió összetétele: 10 mg/ml C-vitamin, 10 mg/ml B₁, 10 mg/ml B₆

Kísérleti elrendezés:

10 mg petéből kikelt és leszűrt 6 órás *Artemia* lárvákat 4 részre osztjuk a fenti két kísérlet alapján, amelyből:

1. Ø-kontroll: 250ml
2. Kontroll: 250ml *Artemia* és 1 ml alga
3. Vitaminos fürdetés: 250ml *Artemia* és 100ml B-vitaminnal dúsított alga
4. Emulziós dúsítás: 250ml *Artemia*, 1ml algapaszta (nem dúsított) és 1ml emulzió

A szétosztott mennyiséget 1l térfogatig töltjük 25 % sótartalmú vízzel. Az etetés végén oxigéntartalom és hőmérsékletmérés minden alkalommal.



14. ábra: Oldott oxigéntartalom mérése

A kísérletet 1 óráig folytatjuk, majd az *Artemiákat* összegyűjtjük, a vitaminméréshez a mintákat desztillált vízzel átmoszuk, majd -75°C-on tároljuk.

2.3.3. Élő eleség esszenciális zsírsavakkal történő dúsításához alkalmazandó emulzió üzemi szintű előállítása

A hallárvák élő eleségének EFA-gazdagításának (dúsításának) alapját az képezi, hogy az eljárás során készített, stabilizált, finom emulziót táplálékul adagoljuk az *Artemia salina* nevű sórák táplálkozó lárváinak (INSTAR II-IV nauplius). A sórák lárvái bekebelezik és asszimilálják a megfelelő méretben diszpergált olajemulzió cseppecskékben található zsírsavakat.

Az esszenciális arachidonsavnak az élőeleségbe történő beviteléhez zselatinos emulziót készítettünk (Treece 2000; Teeranachaideekul et al., 2007; 2008). Az emulzió készítéshez gyógyszerkönyvi minőségű alapanyagokat használtunk fel. A dúsítási eljáráshoz ARA (arachidonsav) készítményt szereztünk be a kínai Huatai cégtől (Huatai Biopharm Inc.

Industrial Park, Xiaohan Town, Deyang, Sichuan, 618304 P.R.China) magyarországi kereskedő közreműködésével.

Emulzió készítés:

Anyagok*

- ❖ 800 ml alacsony sótartalmú ivóvíz vagy desztillált víz
- ❖ 15 g zselatin
- ❖ 160 ml ARA olaj (TG, HUATAI)
- ❖ 4 g – 10 kapsz szója lecitin
- ❖ (10 kapszula) E-vitamin
- ❖ 0,5 g beta-karotin

* Az anyagok gyógyszerházból beszerezhetőek.

Eljárás:

1. Zselatin áztatás 800 ml hideg csapvízben (vagy desztillált vízben) 3000 ml nagy főzőpohárban vagy megfelelő konyhai edényben, majd és oldás 80°C-os vízfürdőben; visszahűtés 40°C-ra, ha feloldódott minden anyag.
2. Olaj emulzió: 3000 ml nagy főzőpohárban vagy megfelelő konyhai edényben 160 ml olaj keverése 80°C-on 1 g E-vitamin, 0,5 g béta-karotin hozzáadás után, konyhai botmixerrel vagy nagysebességű konyhai turmix géppel 2x60 másodpercig, szója lecitin hozzáadás és keverés további 2x30-60 másodpercig.
3. Az Ultraturrax bekapcsolt állapotában a zselatin oldat hozzáadás és keverés 2x3 percig
4. Az emulzió porciózása és tárolása felhasználásig hűtőben.
2 gramm száraz *Artemia* petéből származó naupliuszhoz 0,5 ml emulzió kell.
5. Az emulzió visszamelegítése szobahőfokra, felkeverés 10-20 ml vízzel a nevelőben és hozzákeverés az *Artemia* lárvákhoz.

Kísérleti elrendezés:

Az *Artemia* naupliuszokat a kelés után 4-6 órával (INSTAR II-III alakok) kezdtük etetni dúsított esszenciális zsírsav készítményekkel készített emulzióval. A kontroll *Artemia* csoportok algasűrítmenyt kaptak. Az összehasonlításokhoz kontrollnak tekintettük az etetés kezdetén vett mintákat is.

A dúsítás végén a dúsított *Artemia* naupliuszokat planktonhálón óvatosan leszűrtük és átmostuk sós vízzel egy másik pohárba. Az így gazdagított és elválasztott élőeleseég megfelelően osztott mennyiségeivel etethetők a hallárvák.

2.4. Halivadékok etetése dúsított *Artemia* lárvákkal

2.4.1. Ponty etetési kísérlet

A barramundi lárvá élıőeleség etetési kísérletet ponty lárvákkal modelleztük. Élıőeleségként az *Artemia salina* sórákot alkalmaztuk, melyet a kidolgozott dúsítási technológia segítségével C- és B-vitaminnal egészítettünk ki.

Kísérletünk során a három napos, 4-5 mg átlagsúlyú és 7-8 mm hosszúságú már táplálkozó pontylárvákat élıtáplálékkal etetjük, majd 2 hét után átszoktatjuk száraz tápra. A kísérletben két kontroll csoportot és két különböző eljárással dúsított vitaminos csoportot alakítottunk ki. A kezeléseket az 1. táblázat foglalja össze. Kísérletünket zárt rendszerben, kereskedelmi forgalomban megvásárolható *Artemia* naupliusokkal végeztük.

1. táblázat: *Artemia* kezelések

Elnevezések	Kezelések
Ø-kontroll	dúsítás nélküli <i>Artemia</i>
Kontroll	1 ml algával dúsított <i>Artemia</i>
Szuszpenziós	1g LA aszkorbinsav+ 1 g B ₁ +B ₆ + 1 ml algával dúsított <i>Artemia</i>
Emulziós	2 kapszula aszkorbil-palmitátot tartalmazó emulzió 1 g B ₁ +B ₆ + 1 ml algával dúsított <i>Artemia</i>

Kísérletek ideje és időtartama: 12 napon keresztül zárt rendszerben

A lárvák mennyisége: 400 db/ kezelésenként és ismétlésenként.

Népesítés: 30 db lárv/l, illetve 400 db lárv/vödör

A kísérlet 3-3 párhuzamban történik.

Takarmányozás gyakorisága: Napi két alkalommal, vitaminnal dúsított naupliust juttatunk a pontylárváknak rögtön a dúsítás végén. Az *Artemia* dúsítást 1 órán keresztül végeztük, melynek végén a tisztavizes átmosás után dúsított naupliusokat a hallárváknak adtuk. Napi három alkalommal szintén 30 órás naupliusszal etettük.

Mintavételek: Induláskor és a kísérlet zárásakor, a 12. napon, vettünk lárvá mintákat és *Artemia* mintákat vitamin mérésekre és szárazanyag mérésre.

Vizsgálatok:

-Testtömegre, testhosszra, valamint a haltest beltartalmára vonatkozóan mintáztuk a halakat. A mintákat a további kémiai-analitikai feldolgozáshoz mélyfagyasztva (-80°C-on) tároltuk.

-C- és B-vitamin tartalom mérése HPLC módszerrel

2.4.2. Barramundi etetési kísérlet

A barramundi lárva életének legkorábbi szakaszában főként kerekessérgekkel táplálkozik, majd néhány nap elteltével már áttér a kisebb alsóbbrendű rákok fogyasztására, melyek közül elsősorban az egyszerűen és gyorsan keltethető *Artemia salina* naupliusz etetése terjedt el a gyakorlatban. A tápra szoktatás ausztráliai gyakorlatában alkalmazott tápok Európában nem elérhetők, ezért szükséges a Magyarországon elérhető „weaning” tápok mellett egyes tápanyagokban gazdagított *Artemia* etetése is a tápra szoktatás idején.

A kísérleteket 10 mg kezdő átlagtömegű és 9,1 mm átlagos teljes testhosszúságú barramundi lárvákkal végeztük, melyek már *Artemiával* táplálhatóak.

A kezeléseket az 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat: *Artemia* kezelések

Kezelések	<i>Artemia</i> -naupliuszok (6-10 órás post-hatch életkor között)
Ø-kontroll	Alga-készítmény nélküli tartás
Kontroll	Táplálás élettelen alga-készítménnyel (<i>Nannochloropsis</i> sp.)
C-vitamin (L-AA)	Táplálás élettelen, de C-vitaminnal dúsított alga-készítménnyel
Arachidonsav	Táplálás arachidonsav készítmény emulzióval

Kísérletek ideje és időtartama: 8 napon keresztül

A lárvák mennyisége, népesítés: 100 db/ kezelésenként és ismétlésenként/vödör.

A kísérlet 3-3 párhuzamban történt.

Takarmányozás gyakorisága: Napi egyszer C-vitaminnal és arachidonsavval dúsított *Artemia* naupliusz Instar II/III rögtön a dúsítási folyamat (3 óráig) után, melynek végén a tisztavizes átmosás után dúsított naupliuszokat a hallárváknak adtuk. Napi három alkalommal szintén 30 órás naupliuszokkal etettünk.

Mintavételek: Induláskor és a kísérlet zárásakor, a 8. napon, vettünk lárva és naupliusz mintákat vitamin-, zsírsav mérésre és szárazanyag meghatározásra.

Vizsgálatok:

- Termelési mutatók (növekedési ráta, megmaradás) meghatározása a testtömeg, testhossz mérésével
- C-vitamin tartalom mérése HPLC módszerrel, zsírsav összetétel mérés gázkromatográfiásan.

2.4.3. Vörös árnyékhal etetési kísérlet

Élőeleségként *Artemia salina* sórakot alkalmaztunk, melyet a kidolgozott dúsítási technológia segítségével, C-vitaminnal egészítettünk ki.

Kísérletünket a 30 mg átlagsúlyú vörös árnyékhal ivadékokkal végeztük. A kísérletben két kontroll csoportot, két vitaminos csoportot alakítottunk ki, melyek élőtakarmányt fogyasztottak, valamint két már száraz táppal táplálkozó csoportot. A kezeléseket a 3. táblázat foglalja össze. Élőtápláléknak úgyszintén *Artemia* naupliust alkalmaztunk, majd 10 nap etetés után kísérletünket továbbfolytattuk mindegyik csoportnál C-vitaminnal dúsított száraztáppal. A víz eltérő kémhatása miatt külön vizsgáltuk a pH befolyását a dúsulás mértékére.

3. táblázat: Az *Artemia* naupliusok kezelése a vörös árnyékhal ivadékok takarmányozására történő felhasználás előtt, valamint a száraz takarmányok

Elnevezések	Kezelések
Ø-kontroll	dúsítás nélküli <i>Artemia</i>
Kontroll	1 ml algával dúsított <i>Artemia</i>
Recirkvizes	1g LA aszkorbinsav + 1 ml algával, recirkvízben (pH=8,56) dúsított <i>Artemia</i>
Csapvizes	1g LA aszkorbinsav + 1 ml algával, csapvízben (pH=10,12) dúsított <i>Artemia</i>
C-vitaminos tápos	1000 mg kg ⁻¹ C-vitamin foszfát+ Coppens táp
Kontroll tápos	Coppens táp

Kísérletek ideje és időtartama: 10 napon keresztül élőtakarmány (1. kísérlet szerint), majd 20 napig száraz dúsított takarmány

Népesítés: 20 db/ kezelésenként és ismétlésenként.

A kísérlet 3-3 párhuzamban történik.

Takarmányozás gyakorisága: Napi két alkalommal dúsított naupliust juttatunk a lárváknak rögtön a dúsítás végén. Az *Artemia* dúsítást 1 órán keresztül végeztük, melynek végén a tisztavizes átmosás után dúsított naupliusokat a hallárváknak adtuk. Napi három alkalommal szintén 30 órás naupliusszal etettük. A tápos csoportok etetése ad libitum történt.

Mintavételek: Induláskor és a kísérlet zárásakor, a 10. napon, vettünk halmintákat és *Artemia* mintákat vitamin mérésekre és szárazanyag mérésre. Folytatásban szintén a teljes kísérlet végén.

Vizsgálatok:

- Testtömegre, valamint a haltest beltartalmára vonatkozóan mintáztuk a halállomány 30 %-át (kezelésenként és ismétlésenként). A mintákat a további kémiai-analitikai feldolgozáshoz mélyfagyasztva (-80°C-on) tároltuk.
- C-vitamin tartalom mérése HPLC módszerrel

2.5. Vízoldható vitaminok meghatározása nagy nyomású folyadékkromatográfiával (HPLC)

A méréseket GY. PAPP et. al., 1998, módszere alapján végeztük a Halászati és Öntözési Kutatóintézet kromatográfiás laboratóriumában a következő módon:

A mérés azon alapszik, hogy aszkorbát oxidáz enzimmal a C-vitamin, azaz az L-aszkorbinsav dehidroaszkorbinsavvá oxidálható, amely az alkalmazott kromatográfiás körülmények között nem detektálható. Az egyébként bomlékony L-aszkorbinsav erősen savas (pl. perklórsavas) közegben legalább 24 óráig stabil. Ionpár reagenssel UV detektorral 254 nm-en mérhető. A C-vitamin formák mellett jól mérhetőek a B₁-(tiamin) és B₆-(piridoxin) vitaminok is.

A méréshez szükséges reagenszek:

- *Sigma Chemical Co. (St. Luis, Missouri, USA)*: L-aszkorbinsav, tiamin, piridoxin, aszkorbát-oxidáz enzim, HPLC minőségű metanol
- *Aldrich-Chemie GmbH (Steinheim, Germany)*: tetrabutylammonium-dihidrogénfoszfát, EDTA, nátriumacetát, 1,4-ditioeritritol (DTE)

A minták előkészítése az analízishez:

A minta homogenizátumából bemértünk 1-1 g-ot. Az első azonnali perklórsavas kezelés után az L-aszkorbinsav közvetlen meghatározására használtuk, míg a második teljes aszkorbinsav_tartalmát lebontottuk aszkorbát oxidáz enzimmal az alapvonal meghatározása céljából.



15. ábra: HPLC-UV-DAD rendszer

HPLC kondíciók:

A mobil fázis $0,04 \text{ mol l}^{-1}$ nátrium-acetát volt, amely $0,05 \text{ mmol l}^{-1}$ EDTA-t és $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ tetra-butilammónium-dihidrogén-foszfátot tartalmazott, pH-ját 85 %-os H_3PO_4 -el 3,76-ra állítottuk, végül 1.000 ml-t 24 ml metanollal kevertünk és $0,45 \mu\text{m}$ -es membránszűrőn szűrtük (Whatman vagy Millipore).

A mérésekhez Waters 2695 HPLC rendszert használtunk, Waters 2996 diódasoros detektorral. A mobil fázis áramlási sebessége $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ volt, 23°C -on. A C-vitamint 250 nm-en mértük. Az elválasztást Nova-Pak C_{18} ($5 \mu\text{m}$, $3,9 \text{ mm} \times 3,0 \text{ cm}$) oszloppal végeztük. A kromatogramokat a Waters Empower szoftverjének segítségével értékeltük.

A mérések előtt standard sort futtatunk, $5 \mu\text{g/g}$ és $100 \mu\text{g/g}$ koncentrációnak megfelelő tartományban. A standard sor egyes vitaminoknak a koncentrációja és az egyes csúcs alatti területei ebben a koncentráció tartományban lineáris összefüggést mutatattak ($r^2=0.998$), a kimutathatósági határ $0,5 \mu\text{g/g}$ volt.

2.6. A zsírsavösszetétel meghatározása gázkromatográfiával

A lipidek extrakcióját Folch és munkatársai módszere szerint (Folch et al., 1957) végeztük Halászati és Öntözési Kutatóintézet kromatográfiás laboratóriumában. A mintaelőkészítésnél kloroform-metanol 2:1 arányú eleggyel a bemért mintákat homogenizáltuk, majd az elegyhez belső standardot (ISTD) adtunk (lignocerinsav-metilészter, 24:0 FAME). Az elválasztáshoz a lipidek zsírsavait metilészterekké alakítottuk át. Az átészterezéshez sósavas metanolt (5% cc. HCl abszolút metanolban) használtunk (Stoffel et al., 1959) 80°C -on 2-8 órán keresztül nitrogénnel öblített légterű, lezárt ampullákban.



16. ábra: GC-MS rendszer

A zsírsavösszetétel meghatározását DB225 típusú, 30 méteres, 0,25 mm belső átmérőjű, 0,25 μ m vastagságú kapilláris oszlopon végeztük AGILENT “5973N” típusú, lángionizációs (FID) és tömegspektrometriás (MSD) detektorral felszerelt gázkromatográfiás rendszerben. A kiértékelést AGILENT “CHEMSTATION” software segítségével végeztük. Vivőgázként nagytisztaságú (T 6.0) héliumot alkalmaztunk. Az elválasztás hőmérséklete 200°C volt. Az alkalmazott hőmérsékleten az egyes telített és telítetlen zsírsavak általában a kívánalmaknak megfelelően különültek el.

A zsírsav-metilészter csúcsok azonosításához elsődleges, illetve másodlagos standardokat (lenolaj, csukamájolaj, mélytengeri halolaj, ligetszépe olaj stb.), valamint a relatív elúciós hőmérsékletek logaritmusa és a szénatomszám közötti összefüggést alkalmaztuk. Egyes zsírsavak azonosításához tömegspektrometriás módszert is alkalmaztunk. A zsírsav összetétel mennyiségi értékelése a csúcs alatti területek meghatározásával és specifikus reszponz faktor (SRF) alkalmazásával történt. A zsírsavtartalom meghatározásához lignocerin-sav-metilészter belső standardot alkalmaztunk.

3. Eredmények

3.1. Dúsítási technológiák fejlesztése

Az *Artemia* lárvák szervezetében egy óra dúsítás után már duplájára nőtt akár a kezeletlen, akár az algás csoporthoz képest (21 mg/kg-ról 42 mg/kg-ra élő tömegre számítva), és három óra múlva már háromszoros növekedést határoztunk meg a kontrollokhoz képest (4. táblázat).

Az *Artémia* naupliuszoknál az arachidonsav készítmény alkalmazása a szervezetek zsírsav szintjét az idő függvényében egyre jobban növelte a kontroll csoporthoz viszonyítva, 22 óra után akár 80%-al is (5. táblázat). A könnyebb kivitelezhetőség miatt a halnevelési kísérleteinket csak 1 óra időtartamig végeztük.

4. táblázat: *Artemia* naupliusz lárvák C-vitamin dúsítási kísérletének adatai

Minta	C-vitamin tartalom (µg/g) eredeti anyagra	C-vitamin tartalom (µg/g) száranyagra
Induló	25,33	181,6
Kontroll 1 órás	21,03	186,1
Kontroll 2 órás	13,83	122,4
Kontroll 3 órás	15,56	137,8
Algás 1 órás	25,42	224,0
Algás 2 órás	22,58	199,0
Algás 3 órás	18,82	165,8
Emulziós 1 órás	42,91	354,7
Emulziós 2 órás	39,21	324,2
Emulziós 3 órás	50,54	417,9

5. táblázat: *Artemia* táplálékszervezet zsírsavösszetétele az esszenciális zsírsav készítményeket tartalmazó emulzióval történő etetésnél

Készítmény/ Összetétel m/m %	ARA (TG, HUATAI,)	Start	Algás kontroll	ARA 3óra	ARA 22 óra
16:0	9,3	9,8	9,9	9,8	19,4
18:0	6,3	4,0	6,1	4,2	4,0
18:1 ω 9	4,5	14,7	14,0	14,3	5,6
18:2 ω 6	3,5	3,7	3,6	3,6	6,4
18:3 ω 3	0,0	10,4	9,1	10,3	0,4
20:4 ω 6	49,8	2,4	7,3	3,5	10,5
20:5 ω 3	0,0	14,0	11,4	13,9	11,6
22:6 ω 3	0,0	0,2	0,1	0,2	0,1
Total ω -6	61,1	6,6	11,9	7,5	20,3
Total ω -3	0,5	29,5	23,8	29,2	15,9
ω -3/ ω -6	0,01	4,49	2,01	3,89	0,78

3.2. Etetési kísérletek

Ponty

A vitaminokkal dúsított élotáplálékot fogyasztó pontylárvák testösszetételében a 10 napos kezelés hatására különbség nem látható a C-vitamin és a B₁-vitamin esetében az egyes csoportok között, de még az induló halminták mennyiségéhez képest sem mutatható ki számottevő különbség. Az *Artemia* dúsítás a B-vitaminok esetében jelentős a két kezelt csoport esetében (7. táblázat), viszont a hallárvák testösszetételében ennek dúsulása csak a B₆ esetében mutatkozik meg. A C-vitamin dúsulás az *Artemia* kezelések során nem jelentkezik egyik csoport esetében sem, ahogy a korábbi kísérleti eredményeinknek megfelelően várható lett volna (6. táblázat).

A 10 napos etetési kísérlet során elért termelési adatok nem mutatnak szignifikáns különbséget az egyes pontylárva csoportok között (8. táblázat).

6. táblázat: Pontylárvák vitamin tartalma az etetési kísérlet során

HALMINTÁK	B ₁		B ₆		L-aszkorbinsav	
	átlag (µg/g)	szórás	átlag (µg/g)	szórás	átlag (µg/g)	szórás
Induló	3,09	0,60	53,23	9,00	1,41	0,28
Ø-kontroll	3,89	1,16	21,78	0,32	0,97	0,47
Kontroll	3,67	0,10	20,51	1,97	1,48	0,71
Emulziós	3,34	0,33	30,46	1,96	0,93	0,08
Szuszenziós	4,18	0,47	31,05	10,10	1,43	0,43

7. táblázat: A vitaminokkal dúsított *Artemia* naupliusok összetétele

	B ₁ (µg/g)		B ₆ (µg/g)		L-aszkorbinsav (µg/g)	
	átlag	szórás	átlag	szórás	átlag	szórás
Ø-kontroll	8,52	3,61	7,71	7,23	5,54	4,42
Kontroll	8,80	1,63	13,70	11,10	6,69	19,63
Emulziós	10,72	2,28	14,78	14,29	7,02	14,09
Szuszenziós	62,09	0,38	56,28	17,92	5,31	2,54

8. táblázat: A pontyok termelési mutatói az élőeléség etetési kísérlet végén

kezelések	megmaradás %		hossz mm	súly mg	kondíciós faktor
Ø-kontroll	99,25	±1,2	1,56 ± 0,02	35,00 ± 5,03	0,92 ± 0,15
Kontroll	98,75	±0,3	1,56 ± 0,02	36,20 ± 1,95	0,95 ± 0,08
Emulziós	98,50	±0,8	1,54 ± 0,05	37,30 ± 2,90	1,01 ± 0,05
Szuszenziós	96,25	±0,4	1,59 ± 0,01	36,00 ± 4,70	0,89 ± 0,12

Barramundi

Az előleleség etetési kísérlet végén a halak vizsgált mutatóiban (10. táblázat) nem volt szignifikáns különbség. Az egyes kezelések között a magas szórások (szétnövés) miatt, azonban az „éhezett” *Artemiával* etetett csoport megmaradási és kondíciós faktor értékei némileg elmaradtak a „táplált” naupliuszokkal „takarmányozottakétól”. Az algával és a dúsított készítményekkel „táplált” naupliuszokkal „takarmányozott” halak zsírsav tartalmának, illetve C-vitamin tartalmának különbségei (9. táblázat, 17. ábra) is azt igazolják, hogy a tápanyag-dúsítások hatással voltak a halak megmaradására és kondíciós faktorára.

9. táblázat: Barramundi lárvák zsírsav összetétele az etetési kísérlet után

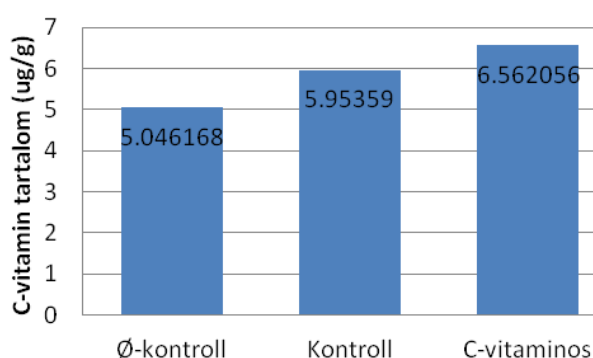
Haltáplálék kezelése	Ø-kontroll		Algás kontroll		C-vitaminos L-AA		ARA-emulzió	
	m/m %	mg/g	m/m %	mg/g	m/m %	mg/g	m/m %	mg/g
Zsírsav / Összetétel halban								
16:0	14,49	2,41	13,11	2,82	14,04	2,44	13,18	2,47
18:0	7,38	1,23	6,15	1,32	7,22	1,23	7,14	1,33
18:1ω9	12,66	2,10	13,80	2,98	11,51	2,07	12,61	2,43
18:2ω6	3,18	0,53	3,24	0,70	3,05	0,54	3,08	0,59
18:3ω3	6,64	1,10	7,63	1,64	6,49	1,16	6,80	1,32
20:4ω6	4,39	0,72	3,76*	0,80	4,36	0,75	5,25*	0,97
20:5ω3	10,69	1,77	10,86	2,32	11,16	1,94	10,47	1,97
22:6ω3	1,94	0,32	1,29	0,28	2,38	0,45	2,17	0,36
Total FA (mg/g)		16,54		21,53		17,68		18,82
Total ω-6	8,25	1,36	7,74	1,66	8,27	1,44	9,40	1,76
Total ω-3	26,19	4,33	26,84	5,76	26,74	4,75	26,32	4,95
ω-3/ω-6	3,18		3,47[♦]		3,27		2,80[♦]	

* a különbség $p=0,026$ szinten szignifikáns az algás és az arachidonsavas (ARA) csoportok között

♦ a különbség $p<0,001$ szinten szignifikáns az algás és az arachidonsavas (ARA) csoportok között

10. táblázat: A barramundi ivadékok termelési mutatói az élőeléség dúsítás után

Kezelések	Megmaradás (%)	Testhossz (mm)	Testtömeg (mg)	Kondíció-faktor (%)
Ø-kontroll	96,59 ± 1,14	12,05 ± 0,38	29,31 ± 4,72	1,67 ± 0,31
K-kontroll	98,11 ± 0,66	11,51 ± 0,45	29,91 ± 4,03	1,94 ± 0,26
C-vitamin	98,48 ± 0,66	11,30 ± 0,42	28,96 ± 5,03	2,00 ± 0,23
Arachidonsav	98,11 ± 0,66	11,22 ± 0,05	29,25 ± 3,83	2,02 ± 0,26



17. ábra: A barramundi ivadékok C-vitamin koncentráció értékei az etetési kísérlet után

Az előzőleg különbözőképpen dúsított *Artemia*-naupliusszal táplált barramundi ivadékok egy hetes időszak után minden nehézség/elhullás nélkül átszoktathatóak voltak a tápfogyasztásra.

Vörös árnyékhal

Az élőtáplálékot fogyasztó vörös árnyékhalak C-vitamin tartalma a 10 napos kezelés hatására duplájára emelkedett a kontroll csoportokhoz képest, de az induló halminták mennyiségéhez képest is szignifikáns különbség látható. A C-vitaminos kiegészítésű táppal etetett csoportok C-vitamin szintje lemarad az *Artemia* naupliust fogyasztó mindegyik csoporthoz képest.

Ez alátámasztja azt az elfogadott, gyakorlatban is bebizonyosodott tényt, hogy az élőtáplálék szervezetek fontos szerepet töltenek be a halak korai takarmányozásában. A mesterséges takarmányban nem találhatóak meg azok az enzimek, melyek szükségesek a hal még fejletlen emésztőrendszerének jó működéséhez.

11. táblázat: A C-vitaminnal dúsított *Artemia* naupliusok összetétele

Artémia	C-vitamin (ug/g)	
	area	átlag
Induló	1367	0,08
Ø-kontroll	17143	1,05
Kontroll	4454	0,27
Csapvizes	25468	1,56
Recirkvizes	26500	1,62

12. táblázat: Vörös árnyékhal szervezetében kimutatott C-vitamin mennyiségek a dúsított *Artemiával* történt táplálás után

Vörös árnyékhal		C-vitamin (ug/g)		
		area	átlag	szórás
I	Induló	140756	8,63	
ØK1	Ø-kontroll	103504	6,57	0,21
ØK2		107880		
ØK3		110093		
K1	Kontroll	108293	6,32	1,32
K2		79377		
K3		121547		
R1	Recirkvizes	222282	13,29	1,48
R2		237637		
R3		190187		
Cs1	Csapvizes	192322	12,3	0,52
Cs2		199948		
Cs3		209362		
KT1	Kontroll tápos	65195	4,09	0,57
KT2		76735		
KT3		58381		
T1	Tápos	65083	4,03	0,86
T2		80011		
T3		52007		

13. táblázat: A vörös árnyékhal ivadékok testtömegei az élőeleség dúsítás után

Kezelések	Átlagtömeg (g) n=20
Ø-kontroll	0,600
Kontroll	0,605
Recirkvizes	0,630
Csapvizes	0,627
C-vitaminos tápos	0,534
Kontroll tápos	0,560

Az élőeleséggel történő etetést követően az ivadékokat két nap alatt fokozatosan, a napi takarmányadagban a naupliuszok részarányának 0 %-ra való csökkentésével, ill. a tápnak 100 %-ra történő növelésével átszoktattuk a száraz tápra (Coppens táp).

Az élőeleség etetési kísérlet végén a halak vizsgált mutatóiban (13. táblázat), a testtömeg kismértékű eltérése mutatható ki az egyes kezelések között. Ennek többnyire a rövid ideig folytatott etetési kísérlet lehet az oka. A dúsított *Artemiaval* etetett csoportok növekedése számottevőbb, mint a száraztáppal etetett csoportoké, hasonlóan a C-vitamin dúsulás mértékéhez. Az algával és a dúsított készítményekkel „táplált” naupliuszokkal (11. táblázat) „takarmányozott” halak C-vitamin tartalmának különbségei (12. táblázat) is azt igazolják, hogy a tápanyag-dúsítások hatással voltak a halak növekedésére.

4. Következtetések

4.1. Dúsítási technológiák fejlesztése

Artemia naupliuszok C-vitamin tartalmának kiegészítésére kidolgozott két különböző dúsítási technológia eredményesen használható, már egy óra dúsítás is 2-3 szoros C-vitamin növekedést eredményezett. C- és B-vitaminok szimultán kiegészítésének hatása az *Artemia* sórák esetében csak a B- vitaminok mennyiségében jelentkezett, feltételezzük, hogy ennek oka a két vitamin felvétele közötti negatív szinergikus hatás lehet.

A zsírsavak kiegészítésére kidolgozott emulziókészítési eljárással lehetőség van az INSTAR II vagy III táplálkozó *Artemia* lárvák esszenciális zsírsavtartalmának növelésére. Az eredmények (9. táblázat) egyértelműen mutatják az alkalmazott gazdagítási eljárás hatásosságát.

4.2. Etetési kísérletek

Ponty

A kísérleti adataink alapján elmondható, hogy a C- és B-vitaminok szimultán kiegészítésének hatása az *Artemia* sórák esetében nem mutatkozik meg a C-vitamin tartalomban, csak B-vitaminok esetében. Ennek következtében az ilyen módon nevelt pontyok C-vitamin szintje is várhatóan alacsonyabb lesz a fejlődés korai szakaszában szükséges tápanyagigénynél. A B₆-vitamin dúsulása viszont úgy az élőeleség esetében, mint a hallárvák esetében kedvező.

Barramundi

Eredményeink alapján, a megmaradásokat is figyelembe véve levonható az a következtetés, hogy a dúsított élőeleségnek már napi egyszeri alkalmazása is pozitívan hat a termelési mutatókra. Feltételezhető, hogy az éltáplálék szervezeteket naponta több alkalommal etetve, a halak vizsgált mutatóiban mért tendenciaszerű javulások szignifikánsan jelentkeznek. Ugyanakkor elmondható, hogy a dúsítási technológia jól alkalmazható üzemi körülmények között is.

További feladatainknak tekintjük az ivadékok ellenálló képességének vizsgálatait és újabb dúsítási technológia kifejlesztését és alkalmazását vitaminok (E-, D- és K-vitamin) és ásványi anyagok esetében.

Vörös árnyékhal

A kísérleti eredmények alapján megállapítottuk, hogy a víz kémhatása nem befolyásolja szignifikánsan a C-vitamin tartalmát sem a naupliusokban, sem a vörös árnyékhal lárvákban. A dúsított *Artemiával* etetett csoportok növekedése számottevőbb, mint a száraztáppal etetett csoportoké, hasonlóan a C-vitamin dúsulás mértékéhez. Az algával és a dúsított készítményekkel „táplált” naupliusokkal „takarmányozott” halak C-vitamin tartalmának különbségei is azt igazolják, hogy a tápanyag-dúsítások hatással voltak a halak növekedésére.

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a hatás kimutatásához hosszabb ideig, naponta több alkalommal szükséges dúsított élőtáplálék szervezeteket a halaknak juttatni.

Míndemellert a továbbiakban szükséges a C-vitamin halak ellenálló képességére kifejtett hatásának vizsgálata is.

Összefoglalás

A hallárvák kezdeti táplálkozásában fontos szerepet töltenek be a sórakok (*Artemia salina*). Ezen táplálékszervezetek enzimeit jó hatással vannak a halak emésztésére. Az éltáplálék szervezetek tápanyagtartalma széles intervallumban változik az eltérő élőhelyi sajátosságok miatt, legfőképpen a vízőldékony vitaminok esetében, melyeknek hiánya a hallárvák növekedését, életképességét jelentősen befolyásolja. Az *Artemiák* esszenciális zsírsav- és vitamintartalmának módosításával alkalmassá tehetők a hallárvák első élőelesegeként történő alkalmazására.

Célunk az volt, hogy laboratóriumi körülmények között alkalmazható dúsítási technológiát dolgozzunk ki az élő szervezetek bio-enkapszulációs képességének, valamint a vízben a szervezetek testfelületére történő adszorpció kihasználásával és ezen technológiák alkalmazása, illetve tesztelése éltáplálék szervezeteken és különböző halfajokon. A B- és C-vitamin élőelesegbe, jelen esetben az *Artemiák*ba való bevitelére különböző eljárásokat dolgoztunk ki.

Az aszkorbil-palmitát zsírban oldódó C-vitamin készítménynek, a B₁-, B₆-vitaminnak és az esszenciális zsírsavnak (pl. arachidonsav) az élőelesegbe történő beviteléhez zselatinos emulziót készítettünk. Az emulzió előállítása Treece (2000); Teeranachaideekul et. al., (2007;2008) módszerei alapján kidolgozott eljárás átdolgozásával történt. *Artemia* INSTAR II vagy ennél idősebb naupliusok a bio-enkapszuláció során bekebelezik és részben metabolizálják a megfelelő méretben diszpergált aszkorbil-palmitátot vagy arachidonsavat tartalmazó olajemulzió cseppecskéit.

A másik dúsítási technológia során L-aszkorbinsavban, B₁- és B₆-vitaminban történő fürdetéses etetést alkalmaztunk, melynek során az algapaszta felületére adszorbeálódott vitamin elfogyasztásával érték el az éltáplálék szervezetek vízben oldott vitaminokban való dúsulását.

1.) A dúsított táplálékszervezetek tápanyagtartalmának változását kromatográfiás mérésekkel ellenőriztük. A C-vitamin, mint az esszenciális zsírsavak mennyisége néhány óra dúsítási folyamat után többszörösére növekedett. A B- és C-vitaminok szimultán kiegészítésének hatása csak a B-vitaminok mennyiségében jelentkezett. Feltételezéseink szerint a két vitamin felvétele közötti negatív szinergikus hatás lehet ennek az oka.

A kísérlet további részében vizsgáltuk a vitaminokkal, valamint az arachidonsavval dúsított *Artemia* naupliusokkal történő takarmányozás hatásait a lárvák növekedésére, túlélési arányára és mesterséges tápra történő szoktatásának sikerességére.

2.) A pontylárvák esetében a vitaminokkal dúsított élőtáplálékot fogyasztó csoportok testösszetételében a kísérlet végén számottevő különbség nem mutatkozik a vitamintartalomban, kivétel a B₆ vitaminos csoport, ahol a dúsulás jól mérhető.

3.) A barramundinál a dúsított élőeleség napi egyszeri alkalmazása a vizsgált termelési mutatókra nem volt szignifikáns hatással, bár a „dúsítatlan” *Artemiával* etetett csoport megmaradási és kondíciós értékei némileg elmaradtak a „dúsított” naupliuszokkal takarmányozottakétól. A megmaradásokat is figyelembe véve levonható az a következtetés, hogy a dúsított élőeleségnek már napi egyszeri alkalmazása is pozitívan hat a termelési mutatókra.

Az előzőleg különbözőképpen dúsított *Artemia* naupliusszal táplált barramundi ivadékok egy hetes időszak után minden nehézség nélkül átszoktathatóak voltak a tápfogyasztásra.

4.) A vörös árnyékhal esetében vizsgáltuk az élőtáplálék és a mesterséges takarmányozás közti különbségeket, és megállapítottuk, hogy a C-vitaminos kiegészítésű táppal etetett csoportok vitaminszintje jelentősen elmaradt az *Artemia* naupliust fogyasztó hallárvákhoz képest. Bár a halak növekedésére is pozitívan hatott, az etetési kísérlet végén a halak testtömegében, testhosszában és kondíciójában nem volt szignifikáns különbség. Az algával és a dúsított készítményekkel „táplált” naupliuszokkal „takarmányozott” halak tápanyag tartalmának összehasonlítása azt igazolja, hogy a tápanyag-dúsítás hatékony volt és az élőtáplálék fontos szerepet játszik a korai haltakarmányozásban.

5.) A kísérletek lefolytatásával megállapítottuk, hogy a vitaminokkal és zsírsavakkal dúsított táplálék-szervezetek hosszabb időtartamú, és/vagy gyakoribb alkalmazása a halak termelési mutatóira is pozitív hatással lehet, valamint, hogy a víz kémhatása nem befolyásolja szignifikánsan a vitamin- és zsírsavtartalmat sem a naupliuszokban, sem a halivadékokban. Végezetül elmondható, hogy a dúsítási technológia jól alkalmazható üzemi körülmények között is.

További feladatainknak tekintjük az ivadékok ellenálló képességének vizsgálatait és újabb dúsítási technológia kifejlesztését és alkalmazását vitaminok (E-, D- és K-vitamin) és ásványi anyagok esetében.

Irodalomjegyzék

- ÁDÁM GY., FEHÉR O. (1988): Élettan biológusoknak I. Tankönyvkiadó, Budapest, 409-414.p.
- AGH, N., SERGELOOS, P., (2005): Handbook of protocols and guidelines for culture and enrichment of live food for use in larviculture. *Artemia & Aquatic Animals Research Center*, Urmia-Iran.
- AKBARY, P., HOSSEINI, S. A., IMANPOOR, M. R. (2011): Enrichment of *Artemia* nauplii with essential fatty acids and vitamin C: effect on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae performance. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 10 (4): 557-569.p.
- AMBASANKAR, K., AHAMED ALI, S., SYAMADAYAL, J (2009): Nutritional requirements of Asian seabass, *Lates calcarifer*. National Training on 'Cage Culture of Seabass' held at CMFRI, Kochi. 60-65.p.
- BAINTNER K., HORN A., KERTÉSZ F., BÖGRE J. (1976): Állattenyésztés 3. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
- CAMPOBASSO, N., COSTELLO, C. A., KINSLAND, C., BEGLEY, T. P., EALICK, S. E. (1998): Crystal Structure of Thiaminase I- from *Bacillus thiaminolyticus* at 2.0 Å Resolution. *Biochemistry*. 37(45):15981-15989.p.
- COUTTEAU, P., SORGELOOS, P. (1997): Manipulation of dietary lipids, fatty acids and vitamins in zooplankton cultures. *Freshwater Biology*. 38: 501-512.p.
- COVINGTON, M. B. (2004): Omega-3 Fatty Acids. *Am Fam Physician*. 70:133-140.p.
- DABROWSKI, K., MATUSIEWICZ, M. and BLOM, J. H. (1994): Hydrolysis, absorption and bioavailability of ascorbic acid esters in fish. *Aquaculture*. 124.
- ERDMAN, J. W., JR., MACDONALD, I. A., ZEISEL: S. H. (2012): Present Knowledge in Nutrition, 10th edition. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- FEHÉR M., JUHÁSZ P., STÜNDL L., CSORVÁSI É., BÁRSONY P., SZŰCS I. (2012): Két melegigényes halfaj (afrikai harcsa, *Clarias gariepinus* és barramundi, *Lates calcalifer*) termelési paramétereinek vizsgálata különböző termálvizekben, Halászati Tudományos Tanácskozás: Szarvas, 2012.
- FELEDI T., GYALOG G., KUCSKA B., FEHÉR M., BORBÉLY GY., JANCsó M., STÜNDL L., RÓNYAI A. (2011): Újabb ígéretes fajok az európai akvakultúrában: a barramundi (*Lates calcarifer* Bloch, 1790) és a vörös árnyékhal (*Sciaenops ocellatus* L., 1766). *Halászat*. 3-4: 75-80.p.

- FOLCH, J, LEE, M. AND SLOANE STANLY, G. H., (1957): A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol. Chem., 226: 497-509.p.
- GAPASIN, R.S.J., BOMBEO, R., LAVENS, P., SORGELOOS, P., NEILS, H. (1998): Enrichment of live food with essential fatty acids and vitamin C: effects on milkfish (*Chanos chanos*) larval performance. Aquacultura. 162: 269-286.p.
- GY. PAPP, ZS. , SAROGLIA, M., TEROVA, G., (1998): An improved method for assay of vitamin C in fish feed and tissues. Chromatographia. 48: 43-47.p.
- GY. PAPP ZS. (2003): A C-vitamin és formáinak hatása az európai harcsára (*Silurus glanis* L.) és egy tokhibridre (*Acipenser ruthenus* L. x *Acipenser baeri* Brandt), PhD értekezés, Debrecen
- GYÖRE, K. (1995): Magyarország Természetesvízi halai. Vízi természet- és Környezetvédelem 1., Környezetgazdálkodási Intézet, Budapest, p. 1-340.
- HALVER, J. E., ASHLEY, L. M. and SMITH, R. R. (1969): Ascorbic acid requirements of coho salmon and rainbow trout. Trans. Am. Fish. Soc. 98.
- HANS, F. (1970): Az akvarista kislexikona. Gondolat Könyvkiadó, Budapest
- HENTSCHEL, E. (1968): Die postembryonalen Entwicklungsstadien von *Artemia salina* Leach bei verschiedenen Temperaturen (Anostraca, Crustacea). Zool. Anz. 180.
- HORVÁTH L. (1993): Élő táplálék az akvarisztikában. Galapagos Akvárium Magazin, magánkiadás, Budapest. 93/1.
- HORVÁTH L. (2000): Halbiológia és haltenyésztés. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
- IFJ. HORVÁTH Z., VARGA D., HORVÁTH Z., ANDRÁSSYNÉ BAKA G., SZABÓ A. (2012): Diótakarmány hatása a ponty húsminőségére és fogyasztói megítélésére, Halászati Tudományos Tanácskozás: Szarvas, 2012.
- JAKABNÉ SÁNDOR ZS., CSENGERI I., GYÖNGYÖSINÉ PAPP ZS., BIRÓ J., FELEDI T., RÓNYAI A. (2013): Élőtáplálék szervezetek dúsítási technológiájának fejlesztése. Kutatási Jelentés, Halászati és Öntözési Kutatóintézet, Szarvas.
- LEAF, A., JING X. KANG, YONG-FU XIAO, BILLMAN, G. E. (2003): Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils. Circulation. 107: 2646-2652. p.
- MERCHIE, G., LAVENS, P., VERRETH, J., OLLEVIER, F., NEILS, H., DE LEENHEER, A., STORCH, V., SORGELOOS, P. (1997): The effect of supplemental ascorbic acid in enriched live food for *Clarias gariepinus* larvae at startfeeding. Aquaculture. 151:245-258.p.

- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.). SUBCOMMITTEE ON FISH (1973): Nutrient requirements of domestic animals. Number 11. National Academy of Sciences. Washington D.C. 18.p.
- NOVÁK L., NYITRAI J., HAZAI L. (2000): Biomolekulák kémiája. Magyar Kémikusok Egyesülete, Budapest. 9-16.p.
- O. TÓTH E. (1999): A halak táplálkozásbiológiája és takarmányozása. Debreceni Agrártudományi Egyetem Mezőgazdasági Víz- és Környezetgazdálkodási Főiskolai Kar, Szarvas.
- PROKISCH J. (2010): Funkcionális élelmiszerek hatóanyagai 1. Debreceni Egyetem, Bio- és Környezetenergetikai Tanszék, Debrecen.
- STOEFFEL, W., CHU, F., AHRENS, E.H.,JR., (1959): Analysis of long-chain fatty acids by gas-liquid chromatography - Micromethod for preparation of methylesters. Anal. Chem. 31: 307-308.p.
- TASNÁDI R. (1983): Haltakarmányozás. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
- TEERANACHAIDEEKUL, V., JUNYAPRASERT, V.B., SOUTO, E.B., MÜLLER, R.H. (2008): Development of ascorbyl palmitate nanocrystals applying the nanosuspension technology. Int. J. Pharmaceutics. 354:227-234.p.
- TEERANACHAIDEEKUL, V., MÜLLER, R.H., JUNYAPRASERT, V.B., (2007): Encapsulation of ascorbyl palmitate in nanostructured lipid carriers (NLC) – Effects of formulation parameters on physicochemical stability. Int. J. Pharmaceutics. 340:198-206.p.
- TREECE, G.D. (2000): *Artemia* production for marine larval fish culture. SARC (Southern Regional Aquaculture Center) Publication No. 702, Stoneville, Mississippi 38776, USA. 7.p.
- TUCKER, B. W. and HALVER, J. E. (1986): Vitamin C metabolism in rainbow trout. Comparative Pathology Bull. 18.4: 1-6. p.

Internetes hivatkozások:

- BLASKÓ B., CEHLA B., KISS I., KOVÁCS K., LAPIS M., MADAI H., NAGY A.SZ., NÁBRÁDI A., PUPOS T., SZŐLLŐSI L., SZŰCS I. (2011): Állattenyésztési ágazatok ökonómiája. www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0010_1A_Book_19_Allattenyesztesi_agazati_okonomia/ch14.html, 2013.08.16.
- CSENGERI I., Esszenciális zsírsavak halakban. www.haki.hu/index.cgi?rx=&nyelv=hu&item=&searchwords2=&menuparam4=37&menuparam_4=105&type_=4
- Debreceni Egyetem, Új halfajok a hazai akvakultúrában: www.kutatokejszakaja.hu/2012/esemenynaptar/esemeny.php?id=178&menu_id=4, 2013.07.30.
- Department of Chemistry, University of Maine, Orono. B₆-vitamin: <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Shikimate7.html>, 2013.08.09.
- Pisztráng: <http://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/rainbow-trout/nutritional-requirements/en/>, 2013.08.16.
- Tiamin: <http://chemspider.com/Chemical-Structure.1098.html>, 2013.08.07.
- Vitaminimum: <http://vitaminok.gyogynovenyinfo.com/b1-vitamin.html>, 2013.08.16.

Ábrajegyzék

1. ábra: A C-vitamin keletkezése és lebomlása a természetben	8
2. ábra: A gerinc görbülete a farokúszó előtt	9
3. ábra: Tiamin	10
4. ábra: A tiamin tiamináz általi bontása.....	11
5. ábra: A B ₆ -vitamin	12
6. ábra: A zsírok csoportosítása.....	13
7. ábra: Arachidonsav	14
8. ábra: Kötések kialakítása.....	14
9. ábra: <i>Artemia salina</i> L. Instar I, II és III alakja	15
10. ábra: Barramundi.....	16
11. ábra: Vörös árnyékhal	17
12. ábra: Ponty.....	17
13. ábra: Nauplius II lárva	18
14. ábra: Oldott oxigéntartalom mérése	22
15. ábra: HPLC-UV-DAD rendszer	28
16. ábra: GC-MS rendszer.....	29
17. ábra: A barramundi ivadékok C-vitamin koncentráció értékei az etetési kísérlet után.....	34

Táblázatjegyzék

1. táblázat: <i>Artemia</i> kezelések	24
2. táblázat: <i>Artemia</i> kezelések	25
3. táblázat: Az <i>Artemia</i> naupliuszok kezelése a vörös árnyékhal ivadékok takarmányozására történő felhasználás előtt, valamint a száraz takarmányok	26
4. táblázat: <i>Artemia</i> naupliusz lárvák C-vitamin dúsítási kísérletének adatai	30
5. táblázat: <i>Artemia</i> táplálékszervezet zsírsavösszetétele az esszenciális zsírsav készítményeket tartalmazó emulzióval történő etetésnél	31
6. táblázat: Pontylárvák vitamin tartalma az etetési kísérlet során.....	32
7. táblázat: A vitaminokkal dúsított <i>Artemia</i> naupliuszok összetétele	32
8. táblázat: A pontyok termelési mutatói az élőleség etetési kísérlet végén.....	32
9. táblázat: Barramundi lárvák zsírsav összetétele az etetési kísérlet után	33
10. táblázat: A barramundi ivadékok termelési mutatói az élőleség dúsítás után	34
11. táblázat: A C-vitaminnal dúsított <i>Artemia</i> naupliuszok összetétele	35
12. táblázat: Vörös árnyékhal szervezetében kimutatott C-vitamin mennyiségek a dúsított <i>Artemiával</i> történt táplálás után.....	35
13. táblázat: A vörös árnyékhal ivadékok testtömegei az élőleség dúsítás után	36

Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet és tiszteletemet kifejezni mindazoknak, akik dolgozatom elkészítéséhez hozzájárultak:

Nagyon köszönöm Dr. habil. Jakab Gusztáv témavezetőmnek e tanulmány létrejötte során adott – kiválóan hasznosítható - ötleteit, tanácsait.

Külön szeretném köszönetemet kinyilvánítani külső konzulensemnek, Jakabné Dr. Sándor Zsuzsannának, kinek odaadó munkássága, segítőkészsége és megértő kedvessége nélkül aligha születhetett volna meg ezen íromány, illetve a Halászati és Öntözési Kutatóintézetnek, dolgozóinak, hogy lehetőséget adtak, az ott folyó kísérletekben való részvételre. A kísérleti feltételek biztosításához a Nemzeti Technológia Program TECH_09-A3-2009-0235 számú projektje (BARRA_09) járult hozzá.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném hálámat kifejezni családtagjaimnak, kik tanulmányaim során türelmet és megértést nyújtva segítettek gondjaim megoldásában.

NYILATKOZAT

Nyilatkozom és aláírással igazolom, hogy a TDK dolgozat saját munkám eredménye. A felhasznált irodalmat korrekt módon kezeltem, a TDK dolgozatra vonatkozó jogszabályokat betartottam.

Szarvas, 2013. október 31.

..........

Karádi Szilvia



SZENT ISTVÁN
EGYETEM



GAZDASÁGI, AGRÁR- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI KAR, BÉKÉSCSABA - SZARVAS - GYULA

Központ: 5600 Békéscsaba, Bajza u. 33. Telephely:

Tessedik Campus, 5540 Szarvas, Szabadság u. 1-3.

Tel.: +36-66-524-700 Fax: +36-66-447-220

Tel.: +36-66-313-311 Fax: +36-66-216-858

e-mail: dekan@gk.szie.hu

e-mail: to_szarvas@gk.szie.hu

KONZULTÁCIÓS LAP

Hallgató neve: KARADI SZILVIA

Szak, szakirány: KÖRMEZETGAZDÁLKODÁSI AGRÁRMÉRNÖK, TELEPÜLÉSÜZEMELTETŐ SZ. I. VIZGAZDALKODÁS SZAK. I.

Szaktervezési cím: AKVAKULTÚRÁBAN HASZNÁLT ELŐTÁPLÁLEK SZERVEZETEK
DÜSÍTÉSI TECHNOLOGIÁJÁNAK FEJLESZTÉSE

Konzulens neve: DR. JAKAB GUSZTÁV

Konzulens beosztása: EGYETEMI DOCENS

A szaktervezést gondozó intézet: KÖRMEZETTUDOMÁNYI

Konzulens és a hallgató megegyezése a konzultációk minimális számáról:

Sorszám	A konzultáció témája	Dátum	Konzulens aláírása
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			
9.			
10.			

A hallgatónak a konzultációval kapcsolatos jellemzése (együttműködési készség, felkészülten jelent meg stb.):

A TDK-t követően nyújtott konzultációt nem tartottan működésbe!

A szaktervezéssel kapcsolatos vélemény:

A szaktervezés bírálatra

bocsátható

nem bocsátható

Szarvas,

konzulens aláírása

Hallgatói nyilatkozat

Nyilatkozom, hogy a szakdolgozat saját munkám, a felhasznált irodalmat az „Útmutató a szakdolgozatok készítéséhez és beadásához” című kiadványban előírt módon kezeltem.

Szarvas, 2013. 11. 27.

.....
aláírás

.....IV.....évf.nappali..... tagozatKereskedelmi és közlekedési alrendszer-
menedzser.....szak

Konzulensi nyilatkozat

A szakdolgozat készítőjének konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem és azt bírálatra kiküldeni javaslom.

Szarvas, 2013. 11. 27.

.....
konzulens