UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE
WYDZIAŁ BIOINŻYNIERII ZWIERZĄT

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr inż. Przemysław Piech

nr albumu: 1472

Biotechnika rozrodu rozpióra (*Ballerus ballerus* L.) oraz wpływ wybranych czynników biotycznych i abiotycznych na wzrost oraz przeżywalność larw w warunkach kontrolowanych

Rozprawa doktorska wykonana
w Katedrze Ichtiologii i Akwakultury
pod kierunkiem
prof. dr hab. inż. Romana Jacka Kujawy

Olsztyn, 2023

UNIVERISTY OF WARMIA AND MAZURY IN OLSZTYN

FACULTY OF ANIMAL BIOENGINEERING

PHD THESIS

MSc Eng. Przemysław Piech

Student no.: 1472

Reproductive biotechnique of the blue bream (*Ballerus ballerus* L.) and the influence of selected biotic and abiotic factors on larval growth and survival under controlled conditions

Dissertation thesis performed in the
Department of Ichthyology and Aquaculture
under the guidance of
prof. Roman Jacek Kujawa

Olsztyn, 2023

SPIS TREŚCI

1. ROZPRAWA DOKTORSKA 4
2. WYKAZ SKRÓTÓW 5
3. WPROWADZENIE 6
3.1. HIPOTEZY BADAWCZE ORAZ CEL PRACY 11
4. MATERIAŁY I METODY 12
4.1. PROCEDURY BADAWCZE 13
4.2. POCHODZENIE I PRZETRZYMYWANIE RYB 13
4.3. MANIPULACJE Z RYBAMI 14
4.4. OPIS EKSPERYMENTÓW 14
4.4.1. Rozród w warunkach kontrolowanych 14
4.4.2. Wpływ temperatury na wzrost i przeżywalność larw 17
4.4.3. Wpływ zagęszczenia obsady na wzrost i przeżywalność larw 18
4.4.4. Wpływ zastępowania pokarmu na wzrost i przeżywalność larw 18
4.4.5. Wpływ zasolenia wody na wzrost i przeżywalność larw 19
4.5. POBIERANIE PRÓB I ANALIZA STATYSTYCZNA 20
5. WYNIKI 23
5.1. ROZRÓD W WARUNKACH KONTROLOWANYCH 23
5.2. WPŁYW TEMPERATURY NA WZROST I PRZEŻYWALNOŚĆ LARW 28
5.3. WPŁYW ZAGĘSZCZENIA NA WZROST I PRZEŻYWALNOŚĆ LARW 28
5.4. WPŁYW ZASTĘPOWANIA POKARMU NA WZROST I PRZEŻYWALNOŚĆ LARW 31
5.5. WPŁYW ZASOLENIA WODY NA WZROST I PRZEŻYWALNOŚĆ LARW 33
6. DYSKUSJA 35
7. WNIOSKI 45
8. LITERATURA 46
STRESZCZENIE 63
SUMMARY 66
SPIS TABEL 69
SPIS RYSUNKÓW I ZDJĘĆ 70
ZAŁĄCZNIKI 71

1. ROZPRAWA DOKTORSKA

Dysertacja wykonana została na podstawie następujących autorskich prac naukowych:

1. **Piech, P.**, Kujawa, R. (2021). **Artificial reproduction of blue bream (*Ballerus ballerus* L.) as a conservative method under controlled conditions**. *Animals*, 11(5), 1326.

   https://doi.org/10.3390/ani11051326 (Impact Factor: 3.231, Punktacja MEiN: 100)

2. **Piech, P.**, Kujawa, R., Nowosad, J., Kucharczyk, D., Targońska, K., Szmyt, M. (2023). **Influence of temperature and stocking density during rearing on larval blue bream, *Ballerus ballerus* (L.).** *Fisheries & Aquatic Life, 31, 31-43.*

   https://doi.org/ 10.2478/aopf-2023-0004 (Impact Factor:-, Punktacja MEiN: 100)

3. **Piech, P.**, Kujawa, R. (2022). **Impact of replacing natural food with commercial feed on the growth and survival of blue bream larvae (*Ballerus ballerus*) under controlled conditions**. *Fisheries & Aquatic Life*, *30*(4), 192-201.
   https://doi.org/10.2478/aopf-2022-0018 (Impact Factor: -, Punktacja MEiN: 100)

4. **Piech, P.**, Kujawa, R. (2023). **Effect of different water salinities on the larvae of the blue bream *Ballerus ballerus* (Linnaeus, 1758) during rearing**. *Animals*, 13(7), 1245.

   https://doi.org/10.3390/ani13071245 (Impact Factor: 3.231, Punktacja MEiN: 100)

Łączna punktacja MEiN powyżej wymienionych artykułów naukowych: **400**.
Całkowity Impact Factor powyżej wymienionych artykułów naukowych: **6.462**.

2. WYKAZ SKRÓTÓW

B. ballerus – *Ballerus ballerus* L. – rozpiór, siniec

CPH - homogenat przysadki karpia

GnRH - analog hormonu uwalniającego gonadotropinę u ssaków

HCG - ludzka gonadotropina kosmówkowa

GSI - współczynnik gonadosomatyczny

DPH – (ang. days post hatching) - dni po wykluciu

ITL/TLI - współczynnik przyrostu długości całkowitej na jednostkę czasu

SGR - względne tempo wzrostu masy ciała

SBR - względne tempo wzrostu biomasy

RGR - relatywne tempo przyrostów masy osobnika

RBR - relatywne tempo przyrostów biomasy

RFL - względny średni wzrost końcowy

RFW - względna średnia masa końcowa

RFB - względna średnia biomasa końcowa

ppt – (ang. parts per thousand) - liczba części na tysiąc, stosowane przy wyrażaniu stężeń

Artemia sp. – solowiec (skorupiak planktonowy)

SD – (ang. standard deviation) - odchylenie standardowe

NaCl - chlorek sodu

$CaCl_2$ - chlorek wapnia

$MgCl_2$ - chlorek magnezu

$CaCO_3$ - węglan wapnia

$MgCO_3$ - węglan magnezu

pH - miara kwasowości lub zasadowości, która wskazuje ilość jonów wodorowych obecnych w roztworze lub substancji

NH_3 – amoniak

3. WPROWADZENIE

Akwakultura jest najszybciej rozwijającą się gałęzią gospodarki ludzkiej na świecie. Główną jej rolą jest hodowla zwierząt wodnych jako źródła wartościowej i zdrowej żywności. Dzięki opracowanym protokołom hodowlanym możliwa stała się produkcja w warunkach kontrolowanych ryb należących do nadgromady bezżuchwowców (Agnatha) oraz do gromad ryb chrzęstnoszkieletowych (Chondrichthyes), mięśniopłetwych (Sarcopterygii) i promieniopłetwych (Actinopterygii), jak również mięczaków wodnych należących do typu Mollusca oraz skorupiaków wodnych z podtypu Crustacea. Ponadto możliwości produkcyjne i zdobyta wiedza wykorzystywane są do ochrony ryb i bezkręgowców - zarówno poszczególnych gatunków jak i konkretnych populacji. W związku z tym opracowywane lub rozwijane są technologie rozrodu oraz podchowu nie tylko gatunków ryb, które są lub potencjalnie mogą stać się cennym surowcem do produkcji żywności, ale również gatunków, których liczebność w wodach otwartych spada lub zmniejszyła się tak, że są zagrożone wyginięciem (Kujawa i in. 2019, Lepić i in. 2020, Kujawa, Piech 2021, Nowosad i in. 2021a, Szmyt i in. 2021). Gatunki ryb, które nie mają znaczenia gospodarczego, stanowią jednak cenny składnik ekosystemów wodnych wpływający na ich bioróżnorodność. Było tak w przypadku kilku gatunków reofilnych ryb karpiowatych, które nie mają znaczenia gospodarczego, lub/ani wysokiego statusu ochronnego np.: bolenia *Leuciscus aspius* (Kujawa i in. 1997; Targońska i in. 2010), jazia *Leuciscus idus* (Cejko i in. 2010; Kupren i in. 2011; Targońska i in. 2011a, 2012; Kucharczyk i in. 2020), jelca *Leuciscus leuciscus* (Cejko i in. 2012; Nowosad i in. 2014; Targońska i in. 2015; Kucharczyk i in. 2019), klenia *Squalius cephalus* (Krejszeff i in. 2008, 2010; Kupren i in. 2011), brzany *Barbus barbus* (Targońska i in. 2011b; Żarski i in. 2011, Nowosad i in. 2016, 2020, 2021b; Prusińska i in. 2020) oraz wzdręgi *Scardinius erythtrophthalmus* (Kucharczyk i in. 1997a).

Stan jakości środowiska, a przede wszystkim wód śródlądowych, z roku na rok ulega degradacji. Zmiany te są na tyle poważne, że zagrażają wielu organizmom (Molenda 2018). Istnieje wiele czynników, które wpływają na taki stan rzeczy. Mogą to być czynniki naturalne lub antropopresja. Zmiany klimatu, które poniekąd są czynnikiem naturalnym, mogą wywoływać susze (niskie stany wód), jak również intensywne opady powodujące katastrofalne wezbrania wody (Pörtner i Peck 2010; Aldous i in. 2011). Poza naturalnymi przyczynami negatywnych procesów zachodzących w środowisku lądowym, jak również

w ekosystemach wodnych, są także i te wywołane irracjonalną oraz nieprzemyślaną działalnością człowieka. Pod ogromną presją znajdują się rzeki ze względu na sztuczne modyfikacje przepływu, dopływ ścieków z gospodarstw domowych i przemysłu oraz zmiany w użytkowaniu gruntów zlewni (np. rolnictwo i górnictwo) (Malmqvist i Rundle 2002; Nel i in. 2007; Vörösmarty i in. 2010). Czynniki te w różny sposób przyczyniają się do zmian fizyko-chemicznych wody, w tym również do jej zasolenia. Najczęściej są to substancje niespotykane w takich ilościach w ciekach, nawet strefy przyujściowej. Ich oddziaływanie na organizmy zamieszkujące dany odcinek cieku jest niejednoznaczne. Nie zawsze od razu widoczne są negatywne skutki inwestycji ingerujących w środowisko. Wszelkie kopalnie, zarówno odkrywkowe jak i te podziemne, zajmujące się wydobyciem różnych surowców, zanieczyszczają środowisko wodami pokopalnianymi (Hübner 2007; Sauer i in. 2016). Wody pokopalniane występują w każdej kopalni, a ich źródłem są warstwy wodonośne. Różnią się one zawartością jonów chlorkowych, siarczanowych jak również związkami metali ciężkich. Wody te, zawierające duże ilości soli oraz metali ciężkich trafiają do rzek, a następnie do mórz. Dopływ wód pokopalnianych do rzek powoduje ich zasolenie, co nie jest bez znaczenia dla organizmów w nich występujących. Warto w tym miejscu zaznaczyć, iż wody zasolone pochodzą nie tylko z kopalni. Okresowym, występującym tylko w okresie zimowym, źródłem wód silnie zasolonych są spływy z dróg (Cañedo-Argüelles i in. 2013). Związane jest to ze stosowaniem soli jako środka zmniejszającego zlodzenie nawierzchni. Najpopularniejszymi środkami przeciwoblodzeniowymi są nieorganiczne sole na bazie chlorków, tj. chlorek sodu (NaCl), chlorek magnezu ($MgCl_2$) i chlorek wapnia ($CaCl_2$). Po zastosowaniu sole drogowe rozpuszczają się i przedostają do ekosystemów słodkowodnych poprzez słony przepływ lądowy generowany przez topniejący śnieg lub deszcz oraz poprzez źródła wód gruntowych (Evans i Frick 2001; Hintz i Relyea 2019). Zasolenie wód śródlądowych wpływa na biocenozę wód śródlądowych, a przede wszystkim na zachowania behawioralne organizmów wodnych, w tym również ryb. Zanieczyszczenia solankowe prowadzą do trwałego oddziaływania chemicznego na wodne biocenozy (Braukmann i Böhme 2011). Dotyczy to zwłaszcza organizmów o małej mobilności oraz wrażliwych na zmiany zasolenia. Szczególnie wrażliwe na zmiany w środowisku wodnym są stadia młodociane ryb, mięczaki, skorupiaki denne i larwy owadów. Spływy do cieków solanki o nieobojętnym dla środowiska składzie może być przyczyną procesu wymierania wrażliwych gatunków ryb i innych organizmów zamieszkujących dany odcinek rzeki (Hinz i Relyea 2017). Permanentne spływy wód zasolonych oraz brak możliwości przemieszczania się

organizmów wodnych w celu uniknięcia negatywnego wpływu wody o znacznym stopniu zasolenia nie tylko prowadzą do wymierania słabszych i mniej odpornych gatunków, lecz również ograniczają rozwój gatunków mniej wrażliwych. Dotyczy to szczególnie wczesnych stadiów rozwojowych stenohalinowych ryb karpiowatych, które są mało odporne na zmiany zasolenia (Swanson 1998). Do ryb, które nie unikają wód słonawych, należą ryby tzw. wód przejściowych. Zamieszkują one ujścia rzek oraz zatoki przymorskie. Wśród gatunków występujących w takich wodach można wymienić sandacze *Sander lucioperca*, okonie *Perca fluviatilis*, sieje *Coregonus lavaretus*, płocie *Rutilus rutilus*, miętusy *Lota lota*, leszcze *Abramis brama*, bolenie, szczupaki *Esox lucius*, cierniki *Gasterosteus aculeatus* oraz łososiowate Salmonidae. Ryby te korzystają z bogatych w pokarm wód morskich, gdzie żerują oraz odpowiednich do rozrodu wód słodkowodnych, gdzie przystępują do rozrodu. Wczesne stadia rozwojowe wymienionych gatunków ryb są znacznie bardziej tolerancyjne na zasolenie niż ryby stenohalinowe. W strefach przyujściowych występują również gatunki, które bardzo rzadko wpływają do wód zasolonych i większość część życia spędzają w wodach słodkich.

Ochrona bioróżnorodności ichtiofauny stała się kluczowym elementem zapewniania pogłowia ryb w wodach śródlądowych, zarówno tych stojących jak i płynących. Zachowanie bioróżnorodności nie jest możliwe bez skutecznej ochrony środowiska. Poprzez ochronę środowiska rozumie się ograniczenie postępującej antropopresji (zanieczyszczanie wód, nadmierna melioracja, wydobycie kruszywa z koryt rzecznych etc.) (Goryczko i Witkowski 2009). Istotnymi elementami ochrony gatunków są również metody *in situ* i *ex situ*. Dotyczy to głównie ryb zagrożonych wyginięciem, ważnych z konsumpcyjnego punktu widzenia lub istotnych dla szeroko pojętej turystyki wędkarskiej (Szmyt i in. 2021). Odpowiedni stan populacji ryb w wodach śródlądowych wspomagany jest poprzez produkcję materiału zarybieniowego pochodzącego z akwakultury (akwakultura zachowawcza) (Śliwiński i in. 2016; Zakęś i in. 2016).

Rozwój akwakultury pozwolił na opracowanie wielu mechanizmów (protokoły rozrodcze, protokoły hodowlane, stada rozrodcze) służących ochronie nie tylko gatunków cennych gospodarczo, jak również tych, które wpływają na bioróżnorodność zbiorników, w tym gatunków wskaźnikowych oraz zagrożonych wyginięciem (Gorzel i Kornijów 2004; Kujawa i Piech 2021). Wysokie koszty produkcji związane między innymi z opłatami za wodę, energię oraz wynagrodzenia pracowników są często przeszkodą do rozpoczęcia hodowli/chowu nowych gatunków. Mimo tego globalna rosnąca świadomość

człowieka i jego troska o ekosystemy stwarza okazję dla hodowców na wprowadzanie nowych gatunków do akwakultury w celu opracowania ich protokołów podchowowych w celach zarybieniowych, wspomagających naturalne populacje. Do takich ryb możemy zaliczyć rozpióra *Ballerus ballerus* (L.), gatunek ryby z rodziny *Cyprinidae*, który jest jedynym z dwóch przedstawicieli rodzaju *Ballerus* występujących w wodach śródlądowych Polski.



Fot. 1. Rozpiór, siniec - *Ballerus ballerus* (Linneusz, 1758) *fot. R. Kujawa*

Gatunek ten zamieszkuje głównie jeziora i dolny bieg większych rzek zlewisk Morza Północnego i Bałtyku (Wezery, Elby, Odry, Wisły, aż do basenu Newy, południowej Szwecji i południowej Finlandii), w dorzeczu Dunaju (od górnej Austrii, jeziora Neusiedler i Platten), w północnych dopływach Morza Czarnego i Morza Azowskiego (Dniestr, Dniepr, Don), aż do Wołgi i Uralu (Hesse i Witkowski 1996, Tadajewska 2000).

Rozpiór kształtem ciała przypomina krąpia *Blicca bjoerkna* oraz sapę *Ballerus sapa*. W odróżnieniu od wymienionych gatunków posiada najwięcej łusek w linii bocznej 62-77 (sapa - 47-52, a krąp 50-58) (Levin i Levina 2014). Żywi się planktonem - wioślarkami i widłonogami oraz bentosem. Ryby te osiągają dojrzałość płciową w wieku 3-5 lat (Chaŝem 1969). Dojrzałe samice mają co najmniej 24,1 cm długości, a dojrzałe samce 20,6 cm

(Karabanowicz i Kompowski 1994). Do rozrodu przystępują wiosną, zwykle od kwietnia do połowy maja, gdy temperatura wody przekroczy 12°C (Kompowski 1992, 1997). Na miejsce tarła wybierają płytkie, silnie zarośnięte roślinnością przybrzeżne odcinki rzeki. Jego ikra przed uwodnieniem ma średnicę 1,5 mm. Po uwodnieniu zwiększa swoją średnicę i staje się kleista. Najczęściej samica składa od 4000 - 25 000 ziaren ikry.

W ostatnim okresie areał występowania tego gatunku, głównie na terenie Europy, uległ drastycznemu zmniejszeniu. Taka sytuacja jest wynikiem szeregu czynników oddziaływujących przez wiele lat na bioróżnorodność ekosystemów wodnych. Wśród nich można wymienić: długotrwałą rabunkową eksploatację rybacką, antropogeniczne zmiany i zanieczyszczenia środowiska wodnego oraz introdukcję nowych gatunków. Obecnie jeszcze dość liczna i stabilna populacja rozpióra występuje wyłącznie w Zalewie Szczecińskim i jeziorze Dąbie, choć jej liczebność ulega znacznym wahaniom. Mimo dość sporej populacji tego gatunku w wymienionych wodach śródlądowych, obserwuje się tendencję spadkową „czystych genetycznie populacji" na skutek krzyżówek międzygatunkowych (Rolik 1967). Najczęściej obserwuje się krzyżówki rozpióra z krąpiem. Do krzyżówek tych najczęściej dochodzi w miejscach, gdzie nakładają się ich terminy i miejsca tarła. W pozostałych przyległych wodach gatunek ten traktowany jest jako osobliwość faunistyczna.

3.1. HIPOTEZY BADAWCZE ORAZ CEL PRACY

Na podstawie analizy problemu badawczego oraz aktualnego stanu wiedzy dotyczącego biotechniki rozrodu rozpióra oraz wpływu różnych czynników na wzrost i przeżywalność larw tego gatunku w warunkach kontrolowanych, postawiono następujące hipotezy badawcze **(H)**:

H1: Efektywność rozrodu rozpióra zależy od stymulacji środkami hormonalnymi.

H2: Wzrost i przeżywalność larw zależna jest od temperatury wody.

H3: Wzrost i przeżywalność larw zależna jest od zagęszczenia obsady.

H4: Wzrost i przeżywalność larw zależna jest od momentu zastąpienia żywego pokarmu paszą komercyjną.

H5: Wzrost i przeżywalność larw zależna jest od zasolenia wody.

Powyższe hipotezy były podstawą do sformułowania głównego celu rozprawy doktorskiej, którym jest opracowanie biotechniki rozrodu rozpióra oraz wpływ wybranych czynników biotycznych i abiotycznych na wzrost oraz przeżywalność larw w warunkach kontrolowanych. Powyższy cel został zrealizowany poprzez realizację celów szczegółowych **(C)**, przedstawionych poniżej:

C1: Opracowanie metody rozrodu rozpióra z uwzględnieniem stymulacji środkami hormonalnymi.

C2: Określenie wpływu temperatury wody na wzrost i przeżywalność larw rozpióra.

C3: Określenie wpływu zagęszczenia obsady na wzrost i przeżywalność larw rozpióra.

C4: Określenie optymalnego momentu zastąpienia żywego pokarmu paszą komercyjną oraz jego wpływu na wzrost i przeżywalność larw rozpióra.

C5: Określenie wpływu zasolenia wody na wzrost i przeżywalność larw rozpióra.

4. MATERIAŁY I METODY

W pracy przedstawiono wyniki badań przeprowadzonych w czasie pięciu etapów badawczych, których rezultaty zostały opublikowane w następujących publikacjach naukowych (rys. 1):

• **Etap I:** rozród rozpióra w warunkach kontrolowanych

Artificial reproduction of blue bream (*Ballerus ballerus* L.) as a conservative method under controlled conditions. *Animals*, 11 (5), 1326.

• **Etap II i III:** wpływ temperatury oraz zagęszczenia obsady na wzrost i przeżywalność larw rozpióra

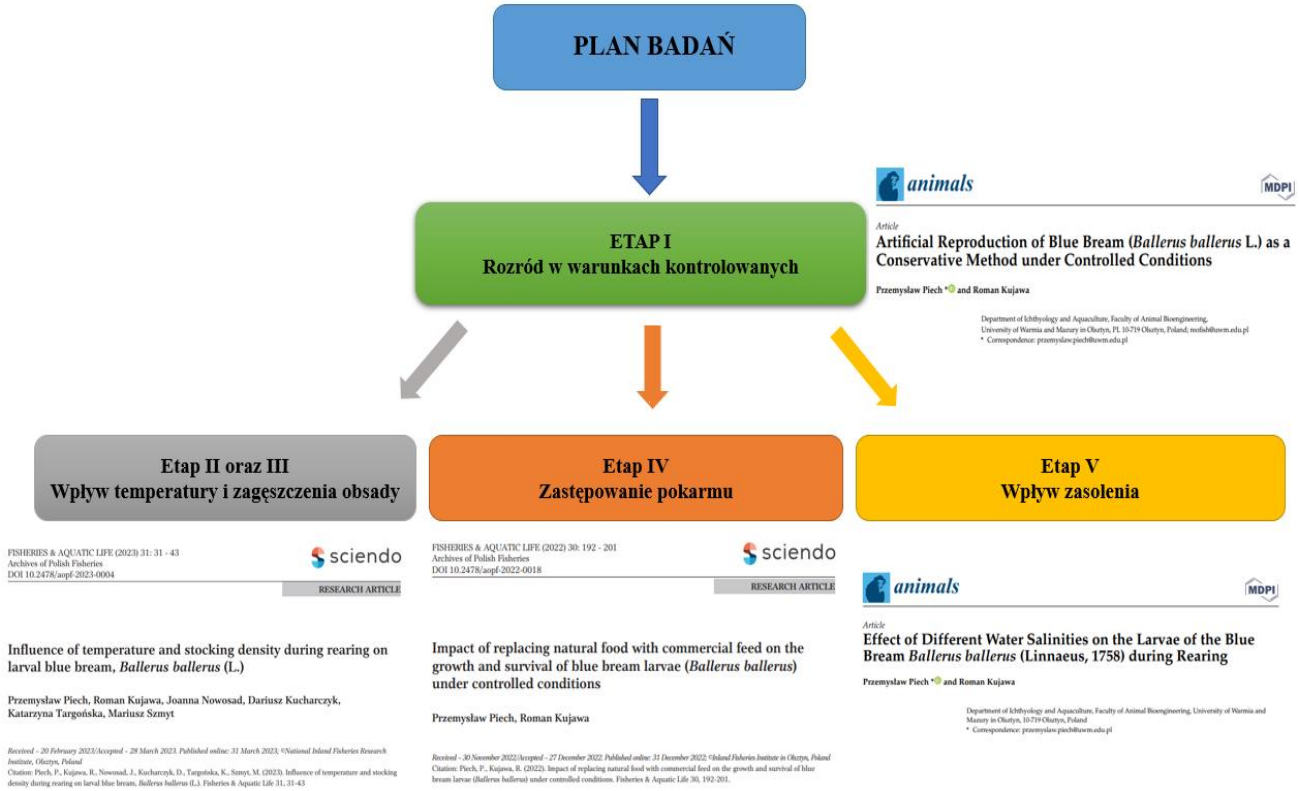
Influence of temperature and stocking density during rearing on larval blue bream, *Ballerus ballerus* (L.). *Fisheries & Aquatic Life*, 31, 31-43.

• **Etap IV:** wpływ zastępowania pokarmu na wzrost i przeżywalność larw rozpióra

Impact of replacing natural food with commercial feed on the growth and survival of blue bream larvae (*Ballerus ballerus*) under controlled conditions. *Fisheries & Aquatic Life, 30,* 192-201.

• **Etap V:** wpływ zasolenia wody na wzrost i przeżywalność larw rozpióra

Effect of different water salinities on the larvae of the blue bream *Ballerus ballerus* (Linnaeus, 1758) during rearing. *Animals*, *13*(7), 1245.



Rysunek 1. Schemat przedstawiający etapy badań wykonanych w ramach rozprawy doktorskiej

4.1. PROCEDURY BADAWCZE

Wszystkie procedury na zwierzętach były przeprowadzone zgodnie z przepisami opisanymi w polskim kodeksie postępowania dotyczącym opieki i wykorzystywania zwierząt do celów naukowych (Dz.U. 2015 poz. 266).

4.2. POCHODZENIE I PRZETRZYMYWANIE RYB

Tarlaki rozpióra podchodziły z jeziora Dąbie (północno-zachodnia Polska). Tarlaki pozyskiwano w okresie ich naturalnego tarła (połowa maja) przy pomocy sprzętu stawnego – żaki oraz wontony. Po ostrożnym uwolnieniu ryb ze sprzętu połowowego, umieszczono je w pojemnikach z intensywnie natlenioną wodą (Kujawa i in. 2011). Następnie przewieziono je do basenów podchowowych znajdujących się w Centrum Akwakultury i Inżynierii Ekologicznej na Wydziale Bioinżynierii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (północno-wschodnia Polska).

4.3. MANIPULACJE Z RYBAMI

Wszystkie manipulacje z rybami przeprowadzano wprowadzając je uprzednio w stan anestezji w roztworze wodnym MS-222 (ARGENT Chemical Laboratories, Inc., Redmond, WA, USA) w dawce:

- 50 mg MS-222 na 1 dm^3 wody - dla larw rozpióra,

- 100 mg MS-222 na 1 dm^3 wody - dla tarlaków rozpióra.

4.4. OPIS EKSPERYMENTÓW

4.4.1. Rozród w warunkach kontrolowanych

Tarlaki rozpióra zostały podzielone według płci i umieszczone w oddzielnych basenach tarlakowych (Kujawa i in. 1999). Baseny o pojemności 1000 dm^3 wykonane były z tworzywa sztucznego. Posiadały one niezależne systemy: natleniania, płynnej regulacji temperatury wody, filtry zewnętrzne EHEIM 2260 ze złożem biologicznym oraz lampy UV. Temperatura wody w basenach wynosiła 14,5°C i nie różniła się od aktualnie panującej w jeziorze Dąbie podczas odłowu ryb.

Rozróżnienie płci tarlaków rozpióra nie było kłopotliwe. Samice w okresie tarła mają śliską lub lekko chropowatą łuskę. Zauważyć można nabrzmiałą brzuszną partię ciała z wyraźnie wystającą brodawką płciową. Samce w tym czasie mają pysk, głowę oraz płetwy piersiowe zabarwione na lekko żółtawy kolor. Spód ciała mają ciemny. Za płetwą odbytową, a przed ogonową mają na ciele powierzchnię szorstkiej łuski (dobrze wyczuwalną pod palcami) o lekko żółtawym kolorze. Poza okresem rozrodczym dymorfizm płciowy jest słabo zaznaczony. Gotowość samic do rozrodu określono na podstawie wyglądu zewnętrznego oraz pobierając przyżyciowo próbki oocytów według metodyki opisanej przez Kujawę i Kucharczyka (1996). Pobrane oocyty były następnie prześwietlane w płynie Serra. Oocyty samic były w 3 stadium rozwojowym (Brzuska i Bieniarz 1977). Jest to optymalne stadium, w którym należy stymulować ryby karpiowate podczas kontrolowanego rozrodu (Kujawa i in., 1998; Brzuska 2000). Do badań wykorzystano 40 samic i 10 samców (tab. 1). Masa ciała ikrzyc rozpióra wykorzystanych do rozrodu zawierała się w przedziale od 404-995 g.

Tabela 1. Charakterystyka tarlaków rozpióra użytych w doświadczeniu.

	Masa (g)	Długość *LT* (cm)	Masa (g)	Długość *LT* (cm)
	Samice (n = 40)		Samce (n = 10)	
min. – max.	404-995	34-48	298-443	33-39
($\bar{x}$)	501,6	37,8	387,8	35,8
(± SD)	138,7	3,0	40,3	1,9

Po 24 godzinach od wpuszczenia tarlaków rozpióra w basenach podwyższono temperaturę wody do 16°C i przystąpiono do stymulacji substancjami hormonalnymi. Zastosowano trzy preparaty:

- Ovopel, zwierający analog ssaczego GnRH (D-Ala^6, Pro^9-Net-mGnRH) oraz metoklopramid jako antagonistę receptorów dopaminowych (Unic-trade, Budapest, Hungary) (Horvath i in. 1997);
- CPH - homogenat przysadki mózgowej karpia (Argent, Redmont, WA, USA);
- Ovaprim, zawierający analog łososiowego GnRH (D-Arg^6, Pro^9-Net-sGnRH) oraz domperidon jako antagonistę receptorów dopaminowych (Syndel, Nanaimo, Canada) (Peter i in. 1993).

Stymulowano tylko samice, gdyż samce oddawały nasienie po lekkim ucisku partii brzusznej w okolicy otworu płciowego. Przed iniekcjami samice były ważone na wadze elektronicznej KERN z dokładnością do 0,1 g. Sproszkowany homogenat przysadki mózgowej karpia CPH oraz Ovopel rozcierano w szklanym homogenizatorze, a następnie rozpuszczono w 0,9% roztworze NaCl. Wszystkie iniekcje hormonalne dokonywano dootrzewnowo, pod nasadę lewej płetwy brzusznej. Wielkość dawek poszczególnych preparatów przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Środki hormonalne i ich dawki użyte w kontrolowanym rozrodzie samic rozpióra

	Środek stymulujący			
	CPH (mg kg^{-1})	Ovopel (granuli kg^{-1})	Ovaprim (ml kg^{-1})	0,9% NaCl (ml kg^{-1})
Grupa	I	II	III	Kontrola
Iniekcje	0,4 po 24 godzinach 3,6	0,2 po 24 godzinach 1,2	0,5	2

Ikrzyce z poszczególnych grup doświadczalnych zostały poznakowane przy użyciu znaczków typu floy-tag (Basavaraju i in. 1998; Rikardsen i in. 2002). Grupę kontrolną stanowiły samice iniekowane tylko płynem fizjologicznym.

Po zaaplikowaniu ikrzycom całkowitej dawki substancji hormonalnej temperaturę wody w basenie podniesiono do 19°C (± 0,5°C). Przegląd ikrzyc rozpoczęto po 12 godzinach od wykonania II iniekcji. Po tym czasie pozostałe samice przeglądano już co godzinę. Wszystkie manipulacje z rybami przeprowadzano po ich anestezji w roztworze MS 222.

Ikrę uzyskaną od samic z poszczególnych grup kolekcjonowano oddzielnie w plastikowych naczyniach, a następnie zapłodniono mleczem od kilku samców. Następnie ikrę pochodzącą od każdej samicy przed umieszczeniem w aparatach inkubacyjnych pozbawiano kleistości. Początkowo płukano ją w roztworze mocznika z solą (40 g mocznika, 30 g NaCl - 10 dm^3 wody), a następnie przez kilka sekund w roztworze taniny (7 g taniny - 10 dm^3 wody). Po pozbawieniu ikry kleistości umieszczono ją w mini aparatach inkubacyjnych Weissa o objętości 1,8 dm^3 pracujących w obiegu zamkniętym (Kujawa i in., 2000). W trakcie trwania inkubacji ikry prowadzono obserwacje rozwoju embrionalnego rozpióra oraz z każdego słoja pobierano losowo próby w celu określenia ilości żywych zarodków w fazie zaoczkowania, w stosunku do całkowitej liczby ziaren ikry użytych do obserwacji [%]. Następnie pobierano również próby aktywnie pływającego wylęgu, aby obliczyć % wylęgu w stosunku do całkowitej liczby ziaren ikry użytych do obserwacji.

W trakcie doświadczenia rejestrowano również następujące parametry:

- masę ikry uzyskanej od każdej z owulujących samic – określano przy użyciu wagi elektronicznej z dokładnością do 0,1g,
- czas latencji – okres pomiędzy zastosowaniem preparatu stymulującego a wystąpieniem owulacji [h],
- liczbę samic owulujących, w stosunku do samic stymulowanych [%],
- śmiertelność ikrzyc z poszczególnych grup doświadczalnych [%],

Następnie wyliczono GSI w następujący sposób:

$$GSI = 100\ W_g \times W_b^{-1}$$

gdzie: W_g - to masa pozyskanej ikry (g), W_b - całkowitą masa ryby (g) przed pozyskaniem ikry.

4.4.2. Wpływ temperatury na wzrost i przeżywalność larw

Larwy rozpióra po napełnieniu drugiej komory pęcherza pławnego i rozpoczęciu aktywnego pływania w poszukiwaniu pokarmu, co miało miejsce w piątej dobie od wyklucia (5 DPH), zostały umieszczone w akwariach podchowowych.



Fot. 2. Larwy rozpióra rozpoczynające żerowanie.

Pojedynczy system doświadczalny, w którym badano wpływ danej temperatury na wzrost i przeżywalność larw składał się z 3 akwariów. Każde akwarium miało objętość roboczą 25 dm^3. Larwy zostały policzone i umieszczane we wszystkich akwariach podchowowych w zagęszczeniu 40 osobn. dm^{-3}. Obsada pojedynczego akwarium wynosiła 1000 larw. Temperatura wody w badanych wariantach wynosiła: 15,0 ± 0,1°C, 20,0 ± 0,1°C, 25,0 ± 0,1°C i 30,0 ± 0,1°C.

Każdy układ doświadczalny użyty do badania wpływu temperatury na wzrost oraz przeżywalność larw zawierał również akwarium „filtracyjne" o pojemności 200 dm^3 ze złożem biologiczne w postaci pływającego medium - bactoballi stosowanych w filtrach denitryfikacyjnych. W celu zapewnienia odpowiednich warunków tlenowych zastosowano dodatkowo dmuchawę membranową RESUN LP 100. Powietrze w akwariach filtracyjnych rozprowadzane było za pomocą dyfuzorów z rurkami silikonowymi. Dodatkowo w każdym

akwarium podchowowym umieszczono kostkę napowietrzającą, przez którą również tłoczono powietrze z dmuchawy. Stałe dostarczanie napowietrzonej i oczyszczonej wody do akwariów odbywało się poprzez system zraszaczy.

Larwy rozpióra karmiono *ad libitum* cztery razy dziennie w odstępach trzygodzinnych (8.00, 11.00, 14.00, 17.00) (Piech i Kujawa 2022). Pokarm składał się z żywych naupliusów solowca *Artemia* sp.

4.4.3. Wpływ zagęszczenia obsady na wzrost i przeżywalność larw

Rozpoczynające żerowanie larwy rozpióra były podchowywane w obiegu hodowlanym RAS, składającym się z 12 akwariów (po 3 akwaria dla każdego wariantu doświadczenia) przepływowych przeznaczonych do podchowu larw. Każde akwarium miało objętość roboczą 25 dm^3. Larwy zostały policzone i umieszczane w akwariach w zagęszczeniu 20, 40, 80 i 120 osobn.·dm^{-3}. Obsada pojedynczego akwarium wynosiła odpowiednio 500, 1000, 2000 i 3000 larw. Temperatura wody podczas podchowu larw wynosiła 25,0 ± 0,1°C. Testowane w niniejszej pracy zagęszczenia obsad zostały ustalone na podstawie wcześniejszych badań dotyczących reofilnych ryb karpiowatych przeprowadzonych przez Kujawę (2004).

4.4.4. Wpływ zastępowania pokarmu na wzrost i przeżywalność larw

Larwy rozpióra w momencie rozpoczęcia aktywnego żerowania, umieszczono w 15 akwariach o pojemności roboczej 25 dm^3 każde (po 3 akwaria dla każdego wariantu doświadczenia). Akwaria umieszczono w systemie z cyrkulowanym obiegiem wody o temperaturze 25°C (±0,2°C). Zestaw akwariów wyposażony był w wydajny system filtracji wody, składający się ze złoża biologicznego i zewnętrznego filtra kanistrowego. Natężenie przepływu wody przez akwaria ustalono na poziomie 0,20 $dm^3 \cdot min^{-1}$. Woda była dostarczana do zbiorników z larwami przez zraszacze. Fotoperiod ustalono na 12 godzin światła dziennego i 12 godzin nocy. W każdym akwarium umieszczono 1000 larw rozpióra. Pierwszym pokarmem podawanym larwom był solowiec (*Artemia* sp.) (A). Po określonym czasie pokarm naturalny zastąpiono paszą Perla Larva Proactive (P). Jest to specjalna komercyjna pasza dla larw ryb o wielkości 0,1 - 0,3 mm, składająca się z mączki rybnej, mączki krewetkowej, oleju rybnego, pszenicy, drożdży, lecytyny, mikroelementów oraz suplementu Protect®. Wyróżnia się bardzo wysoką zawartością białek o najwyższej strawności, nienasyconych kwasów tłuszczowych i fosfolipidów. Perla jest bardzo stabilną paszą wykazującą doskonałe parametry fizyczne. Pokarm, zarówno żywe naupliusy

solowca, jak i pasza Perla Larvae Proactive, podawany był ręcznie, 3 razy dziennie, o godz. 8.00, 12.00 i 16.00. Dawki pokarmowe były dostosowane do biomasy hodowanych ryb i korygowane dzień po każdym pobraniu próbek. Eksperyment trwał 21 dni

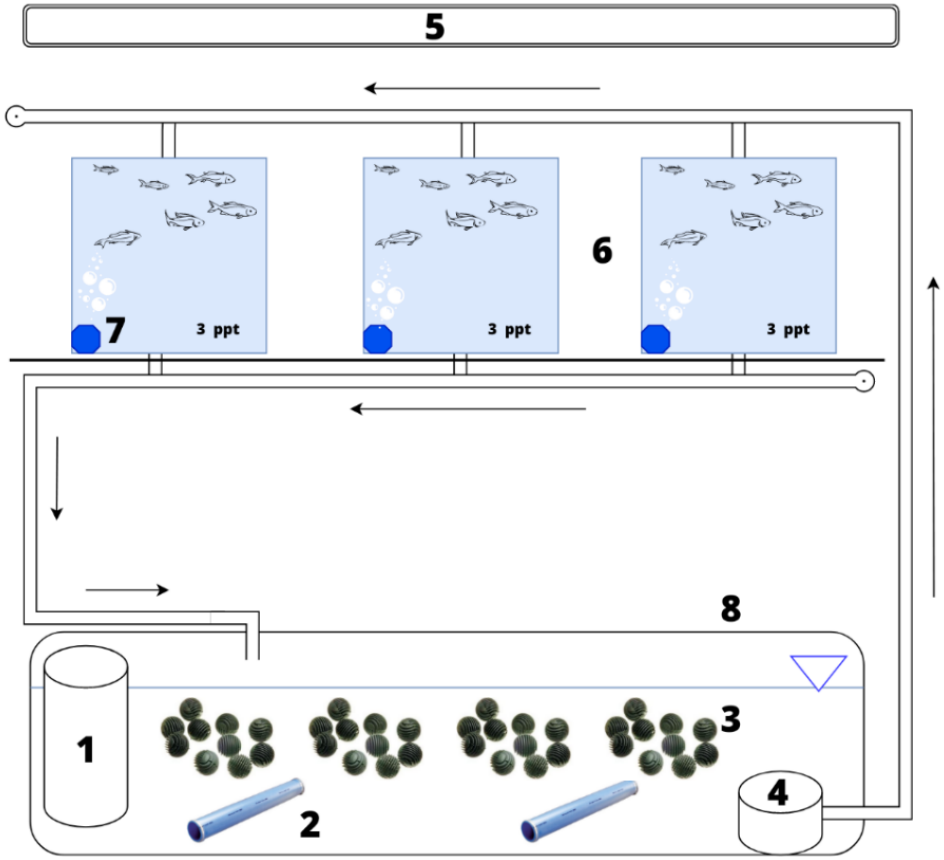
Doświadczenie obejmowało pięć wariantów żywienia: grupa A21 - tylko pokarm naturalny; grupa A4P17 - pokarm naturalny przez 4 dni, a następnie pasza komercyjna przez 17 dni; grupa A8P13 - pokarm naturalny przez 8, a następnie pasza przez 13 dni; grupa A12P9 - pokarm naturalny przez 12 dni, a następnie pasza przez 9 dni oraz grupa P21 - larwy karmione paszą przez cały okres odchowu. Pokarm naturalny przygotowywano według procedury opisanej przez Sorgeloosa (Sorgeloos i in. 1977). Wielkość naupliusów solowca wynosiła 430 mikronów. Codziennie przed pierwszym karmieniem usuwano niezjedzone resztki pokarmu i inne zanieczyszczenia w celu utrzymania odpowiednich warunków sanitarnych. Usuwano również martwe larwy, a następnie liczono je w celu obliczenia wskaźnika śmiertelności.

4.4.5. Wpływ zasolenia wody na wzrost i przeżywalność larw

Podchów rozpoczynających żerowanie larw rozpióra prowadzony był w czterech oddzielnych systemach recyrkulacyjnych (RAS) przystosowanych do podchowu larw w wodzie o różnym stopniu zasolenia (rys. 2). Larwy rozpióra były hodowane w wodzie o zasoleniu 3, 5 lub 7 ppt. Próbę kontrolną stanowiły larwy hodowane w wodzie słodkiej (0 ppt), wolnej od zasolenia. Do uzyskania odpowiedniego zasolenia wody użyto soli morskiej Pro-Reef, która została rozpuszczona w wodzie o temperaturze 20°C. Pojedynczy obwód doświadczalny składał się z 3 akwariów przeznaczonych do podchowu larw w wodzie o danym zasoleniu. Każde akwarium miało objętość roboczą 25 dm^3. Każdy obieg doświadczalny zawierał również akwarium "filtracyjne" o pojemności 200 dm^3 zawierające odpieniacz białek oraz złoże biologiczne w postaci pływającego medium. Medium filtracyjne stanowiły bactoballs stosowane w filtrach denitryfikacyjnych.

Larwy rozpióra o średniej długości ciała 7,5 mm, zostały policzone i umieszczone we wszystkich akwariach podchowowych w zagęszczeniu 40 osobn. dm^{-3}. Obsada pojedynczego akwarium wynosiła 1000 larw. Temperatura wody we wszystkich grupach testowych wynosiła początkowo 20°C i była stopniowo (1°C na godzinę) zwiększana do 25,0 ± 0,2°C, czyli docelowej temperatury podchowu.

Larwy rozpióra były karmione *ad libitum* trzy razy dziennie w odstępach czterogodzinnych (8.00, 12.00, 16.00). Pokarm stanowiły żywe naupliusy solowca *Artemia* sp. przygotowane według ściśle określonej receptury.



Rysunek 2. Schemat poglądowy jednego z czterech układów doświadczalnych wykorzystanych w eksperymencie: 1 - odpieniacz białek, 2 - dyfuzor rurowy, 3 - bactoballs, 4 - pompa, 5 - fluorescencyjne lampy, 6 - akwarium z rybami, 7 - kamień napowietrzający, 8 - akwarium ze złożem filtracyjnym.

4.5. POBIERANIE PRÓB I ANALIZA STATYSTYCZNA

W okresie odchowu larwy rozpióra pochodzące z każdego wariantu podchowowego były sześciokrotnie mierzone i ważone. Pierwszy, tzw. zerowy pomiar miał miejsce bezpośrednio po zarybieniu akwariów w każdym z wariantów podchowowych, a kolejne pomiary przeprowadzono w 5, 9, 13 i 17 dniu oraz w dniu zakończenia eksperymentu, tj. 21 dniu. W tym celu odłowiono rano (przed rozpoczęciem karmienia) po 30 osobników z każdego zbiornika. Przed wykonaniem pomiarów odłowione larwy usypiano w roztworze MS-222 (50 mg l^{-1} wody). Następnie ważono je na wadze analitycznej KERN ALJ 220-5 DNM o dokładności do 0,1 mg. Larwy jeszcze znieczulone umieszczano z pewną ilością

wody na płytkach Petriego i obserwowano pod mikroskopem stereoskopowym LEICA MZ16Z. Dokumentację fotograficzną larw wykonano przy użyciu kamery mikroskopowej DFC 420. Wielkość larw analizowano w oprogramowaniu LAS V 3.1.0. Całkowita długość ciała larwy (*longitudo totalis* - l. t.) była mierzona z dokładnością do 0,1 mm. Po tych zabiegach larwy umieszczano w pojemniku wypełnionym dobrze natlenioną wodą. Po rozpoczęciu aktywnego pływania larwy przenoszono do akwariów, z których zostały pobrane. Na podstawie uzyskanych danych obliczono współczynnik przyrostu długości całkowitej na jednostkę czasu (ITL) według wzoru (Peňáz i in. 1989):

$$\text{ITL} = \frac{TL\ (n_2) - TL\ (n_1)}{\Delta t},$$

gdzie: TL - średnia długość osobnika (*longitudo totalis*), n_1 - początek okresu, n_2 - koniec okresu, Δt - czas trwania podchowu (dni).

Względne tempo wzrostu masy ciała (SGR) i względne tempo wzrostu biomasy (SBR) od początku karmienia do końca doświadczenia wyprowadzono ze wzorów (Brown 1957):

$$\text{SGR} = 100 * \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{\Delta t} \text{ and, SBR} = 100 * \frac{\ln(n_2 * W_2) - \ln(n_1 * W_1)}{\Delta t}.$$

Następnie na ich podstawie wyliczono relatywne tempo przyrostów masy osobnika (RGR) oraz relatywne tempo przyrostów biomasy (RBR) od momentu rozpoczęcia odżywiania do zakończenia eksperymentu według wzoru (Myszkowski 1997):

$$\text{RGR} = 100 * \left(e^{\frac{\text{SGR}}{100}} - 1\right) \text{ and RBR} = 100 * \left(e^{\frac{\text{SBR}}{100}} - 1\right),$$

gdzie: W_1 - średnia masa początkowa osobnika (mg) w okresie odchowu, W_2 - średnia masa końcowa osobnika (mg) w okresie odchowu, n_1 - liczba ryb (osobników) na początku okresu odchowu, n_2 - liczba ryb (osobników) na końcu okresu odchowu, Δt - czas trwania podchowu (dni).

Analogicznie obliczono RGR dla długości ciała. Biomasę ryb w każdym akwarium określono jako iloczyn średniej masy osobnika i liczby żywych osobników. Otrzymaną wartość dzielono przez pojemność akwarium otrzymując w ten sposób biomasę wyrażano w $g \cdot dm^{-3}$.

W trakcie eksperymentu codziennie liczono martwe larwy i obliczano ostateczny wskaźnik przeżywalności w %. Wyrażono go jako stosunek liczby larw na końcu podchowu

do liczby larw na początku doświadczenia. Rejestrowana każdego dnia liczba martwych ryb posłużyła do wykreślenia krzywych skumulowanej śmiertelności dla każdego wariantu podchowu ryb. Średni przyrost masy ciała larw PM (mg) obliczono dla larw z każdej badanej grupy doświadczalnej pod koniec trzytygodniowego okresu odchowu (Imanpoor i in. 2012).

$$PM = mk - mp$$

gdzie: mk - średnia masa końcowa, a mp - średnia masa początkowa larw

W celu porównania wyników obliczono względną średnią końcową długość (RFL), względną średnią końcową masę (RFW) i względną średnią końcową biomasę (RFB) ryb doświadczalnych, przy założeniu, że długość, masa i biomasa ryb z grupy kontrolnej na koniec doświadczenia była równa 100%.

Eksperyment 1: Ocenę normalności rozkładu danych, wyrażoną jako średnia ± SD, przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica w wersji 13.1 (StatSoft Inc. 2016, Tulsa, OK, USA). Dane miały rozkład normalny (test Shapiro-Wilka), a wariancje były jednorodne (test Levena). Różnice między średnimi grup dla każdej zmiennej oceniono za pomocą ANOVA i testów wielokrotnego zakresu Duncana dla porównań grupowych ($p < 0,05$ uznano za znaczące).

Eksperyment 2, 3, 4, 5: W celu określenia, czy różnice w średniej długości i średniej masie ryb w grupach doświadczalnych były istotne, zastosowano test wielokrotnego zakresu Duncana ($P \leq 0,05$) (Duncan 1955). Procenty przeżywalności zostały znormalizowane, a różnice uznano za istotne przy $\alpha = 0,05$ (Sokal, Rohl 1981). Wyniki opracowano statystycznie w programie Excel 16.0 i Statistica 13.0 dla Windows.

5. WYNIKI

5.1. ROZRÓD W WARUNKACH KONTROLOWANYCH

Od ryb z grupy kontrolnej nie pozyskano gamet (Piech i Kujawa 2021). Najmniejszą liczbę owulujących samic (cztery ryby) stwierdzono w grupie III, stymulowanej Ovaprimem. W pozostałych grupach było od 6 do 9 owulujących samic, co stanowiło 60-90% samic w poszczególnych grupach. Czas latencji był najkrótszy u samic otrzymujących iniekcje z Ovopelu (grupa II). Ryby z tej grupy miały owulację 12 h po iniekcji hormonalnej (tab. 3).

Tabela 3. Wpływ różnych środków hormonalnych na owulację samic rozpióra *Ballerus ballerus* (L.) podczas kontrolowanego rozrodu.

	Środek stymulujący			
	CPH	**Ovopel**	**Ovaprim**	
Grupa	**I**	**II**	**III**	**Kontrola**
Liczba samic poddanych iniekcji	10	10	10	10
Masa samic (min-max) (g)	404-964	416-995	475-846	462-836
Przeżywalność samic po iniekcji (%)	70	90	80	90
Liczba owulujących samic (%)	6/60	9/90	4/40	-
Okres latencji (h)	15-18	12	13-20	-

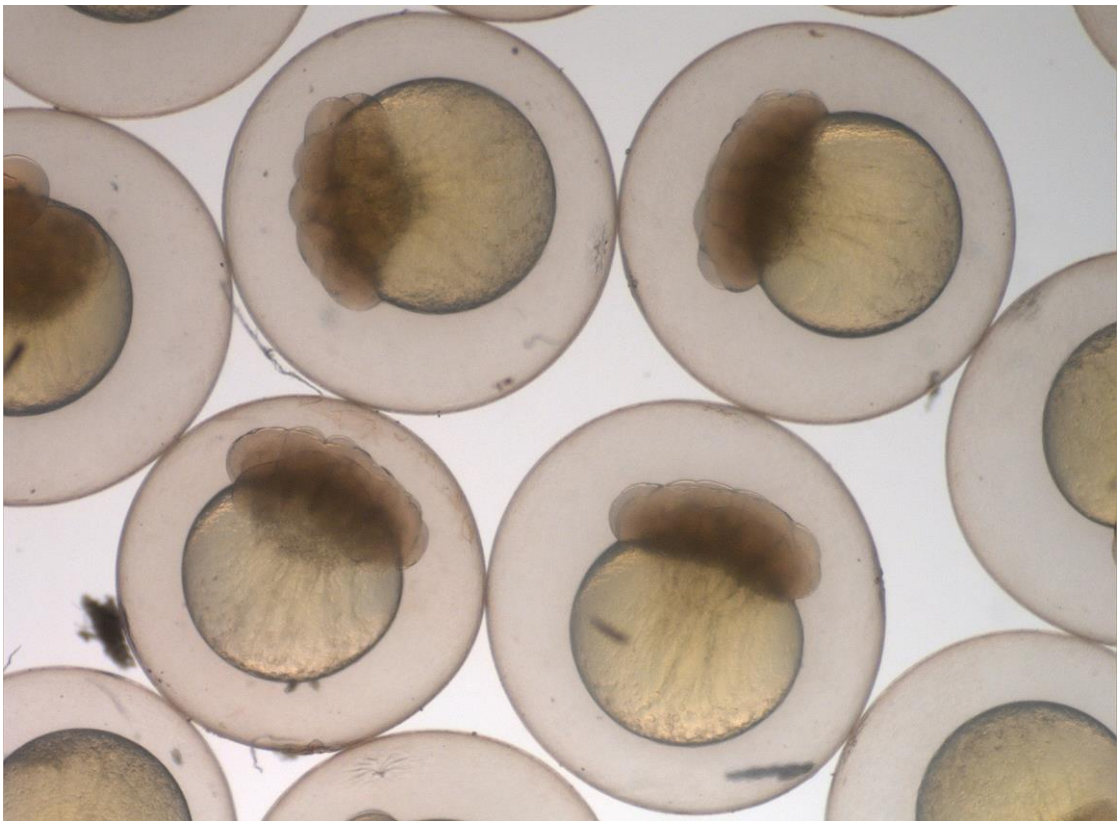
W pozostałych grupach czas pomiędzy podaniem środka hormonalnego a owulacją był dłuższy, średnio o 3-6 h. W grupie III, w której samice stymulowanej były Ovaprimem, owulacja była znacznie wydłużona w czasie. Pomiędzy owulacją pierwszej i ostatniej samicy występował nawet siedmiogodzinny odstęp. Stwierdzono niewielkie różnice w przeżywalności ryb w zależności od zastosowanych hormonalnych stymulatorów rozrodu. Największe straty wśród samic aż 30% samic odnotowano w grupie gdzie był zastopowany CPH. W grupie gdzie samice stymulowano Ovopelem straty wyniosły tylko 10%. Ikrę o najwyższej średniej masie na rybę (75,4 g) uzyskano od samic z grupy II, stymulowanych Ovopelem (tab. 4), natomiast jaja o najniższej średniej masie na rybę (49,5 g) pochodziły od ryb z grupy III. Ogólna skuteczność zapłodnienia wyrażona procentem żywych zarodków była stosunkowo wysoka - od 73,8% w grupie III do 88,8% w grupie II, przy czym różnice

były statystycznie istotne. Wysoki był również procent pływających larw. Był on najwyższy w grupie II (82,5%), a najniższy w grupie III (66,4%). Różnice te były statystycznie istotne.

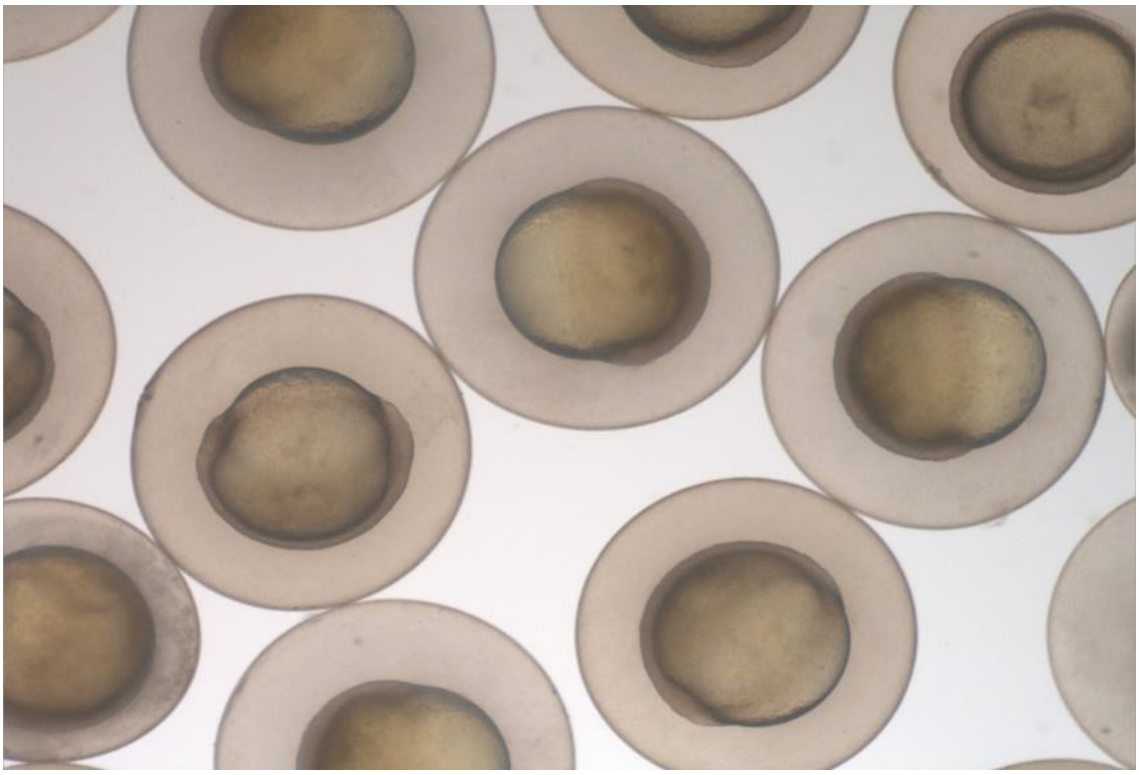
Tabela 4. Wpływ różnych czynników hormonalnych na ilość i jakość ikry podczas sztucznego rozmnażania *Ballerus ballerus* (L.).

Grupa	Środek stymulujący			
	CPH I	Ovopel II	Ovaprim III	Kontrola
	($\bar{x}$) (±SD)			
Masa samic (g osobn.$^{-1}$)	494,5 (±22,4)	489,3 (±21,7)	467,4 (48,0)	479,5 (±26,7)
Masa ikry (g)	60,8 ^{ab} (±10,8)	75,4 ^{a} (±8,6)	49,5 ^{b} (±9,3)	0
GSI (%)	12,3 (±1,7)	15,4 (±2,1)	10,6 (±2,1)	
Przeżywalność do zaoczkowania (%)	81,2 ^{b}(±0,6)	88,8 ^{a}(±0,5)	73,8 ^{c}(±1,2)	0
Pływające larwy (%)	74,3 ^{b}(±0,8)	82,5 ^{a}(±0,4)	66,4 ^{c}(±0,7)	0

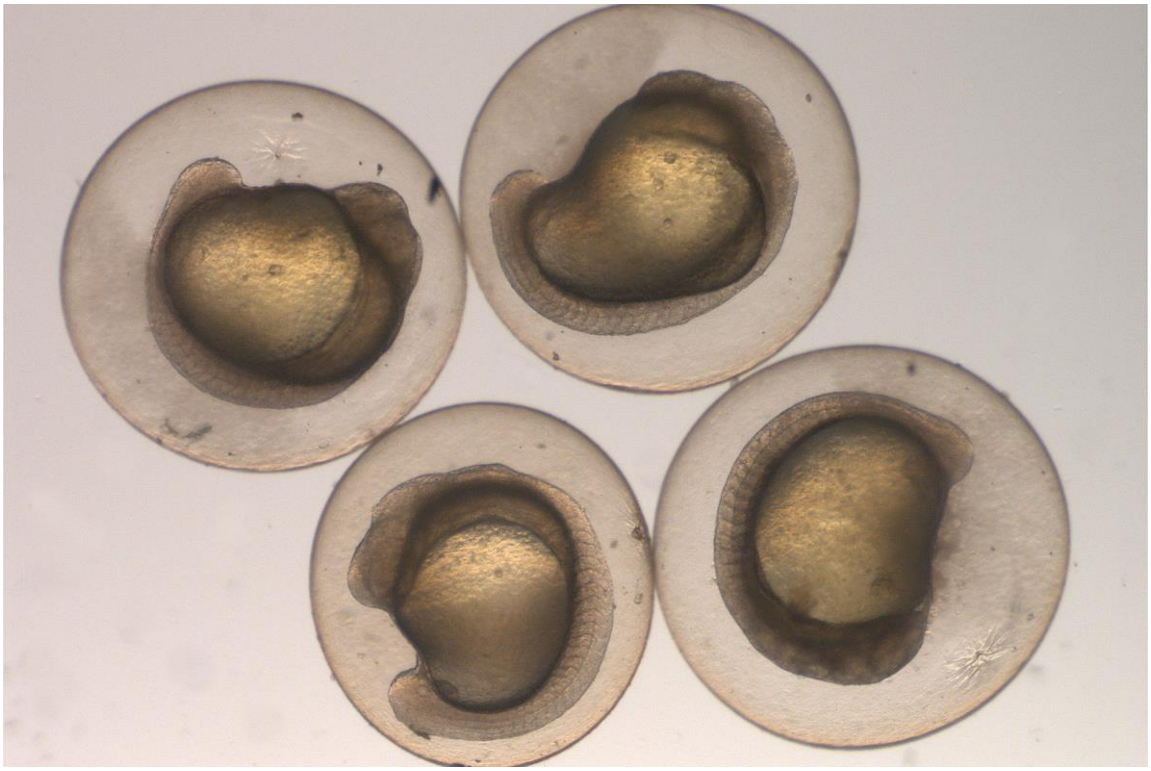
Poniżej przedstawiono zdjęcia kilku etapów rozwoju embrionalnego i larwalnego rozpióra (fot. 3-9).



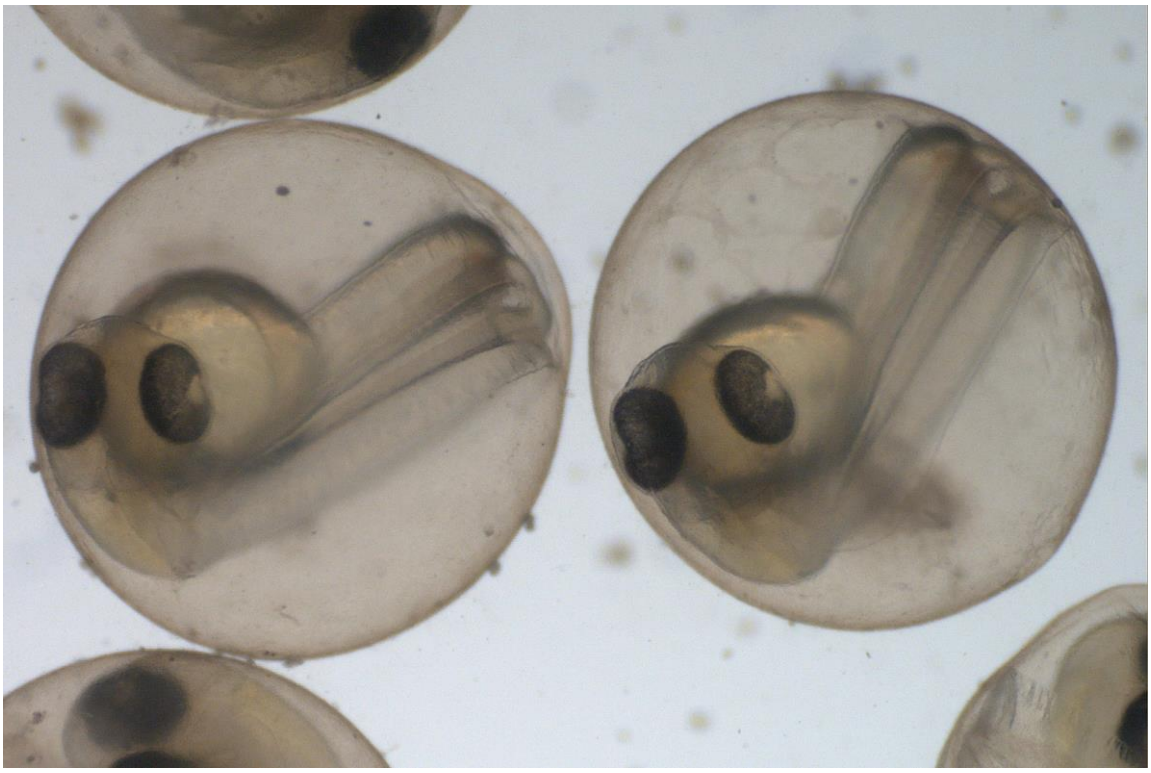
Fot. 3. Zdjęcie ikry ukazujące blastulę wielkokomórkową.



Fot. 4. Zdjęcie ikry ukazujące moment obrastania (2/3 epibolii).



Fot. 5. Zarodki na etapie organogenezy.



Fot. 6. Zarodki z pigmentem w oczach (zaoczkowanie).



Fot. 7. Zarodek w momencie opuszczania osłonki jajowej.



Fot. 8. Larwy w trakcie resorpcji zapasów woreczka żółtkowego.



Fot. 9. Larwy tuż przed napełnieniem pęcherza pławnego powietrzem.

5.2. WPŁYW TEMPERATURY NA WZROST I PRZEŻYWALNOŚĆ LARW

Najmniejsze larwy uzyskano w wodzie o temperaturze 15°C (Piech i in. 2023). W ostatnim dniu podchowu ich średnia masa wynosiła 34,2 (± 3,1 mg), przy średniej długości 16,8 (± 1,14 mm). Larwy rozpióra podchowywane w wodzie o temperaturze 25°C uzyskały średnią masę 65,8 (± 0,1 mg), przy średniej długości 25,3 (± 0,95 mm). Najszybciej rosły larwy rozpióra w wodzie o temperaturze 30°C. Osiągnęły one średnią masę 80,1 (± 0,1 mg) przy średniej długości 28,4 (± 1,4 mm). Najwyższą biomasę larw rozpióra wynoszącą 76,26 (3,05 g·dm^{-3}) uzyskano również w wodzie o temperaturze 30°C. Były to wartości ponad 2x większe niż wyliczone dla larw podchowywanych w wodzie o najniższej temperaturze wody (tab. 5). Najwyższą przeżywalność larw - 97,6%, odnotowano w akwariach z woda o temperaturze 15°C. Nieco niższe, ale nieistotne statystycznie, wskaźniki przeżywalności zaobserwowano w wodzie o temperaturze 25 i 30°C, odpowiednio 95,4% i 95,2%. Najniższy wskaźnik przeżywalności larw zaobserwowano w wodzie o temperaturze 20°C, gdzie 94,9% larw ze stada początkowego przeżyło podchów.

5.3. WPŁYW ZAGĘSZCZENIA NA WZROST I PRZEŻYWALNOŚĆ LARW

Najmniejsze larwy rozpióra uzyskano podchowując je w zagęszczeniu 120 osobn.·dm^{-3} (Piech i in. 2023). W ostatnim dniu podchowu uzyskały one średnią masę 49,5 (± 3,1 mg), przy średniej długości 20,1 (± 1,2 mm) (tab. 6). Przy gęstości obsady 80 osobn.·dm^{-3}, uzyskały średnią masę 56,1 (± 3,2 mg), przy średniej długości 22,4 (± 0,9 mm). Przy zagęszczeniu 40 osobn.·dm^{-3}, larwy osiągnęły masę 64,2 (± 3,5 mg), przy średniej długości 24,6 (± 0,73 mm). Największe larwy osiągnęły masę 69,4 (± 3,2 mg) i średnią długość 26,8 (± 0,9 mm) przy zagęszczeniu 20 osobn.·dm^{-3}. Najwyższą biomasę larw rozpióra wynoszącą 135,78 g (8,5 g·dm^{-3}) uzyskano przy zagęszczeniu 120 osobn.·dm^{-3}. Podczas 21-dniowego okresu podchowu najwyższą przeżywalność larw zaobserwowano przy zagęszczeniu 20 osobn.·dm^{-3}. Prawie 94,6% osobn. ze stada początkowego przeżyło eksperyment. Nieco gorszy, ale nieistotny statystycznie, procent przeżywalności odnotowano przy zagęszczeniu 40 i 80 osobn. - odpowiednio 94,2% i 93,1%. Najniższy wskaźnik przeżywalności larw zaobserwowano przy zagęszczeniu 120 osobn.·dm^{-3}, gdzie 91,4% larw z obsady początkowej przeżyło podchów.

Tabela 5. Wyniki podchowu larw rozpióra *Ballerus ballerus* (L.) w temperaturach wody 15, 20, 25 i 30°C ± 0,2°C. Wartość średnia ± SD. Wyniki w wierszach z tym samym indeksem literowym nie różnią się istotnie statystycznie (α = 0,05).

Parametr	Wariant podchowowy			
	15	20	25	30
Początkowa średnia długość ciała (mm)	7,6±0,1^{a}	7,6±0,1^{a}	7,6±0,1^{a}	7,6±0,1^{a}
Początkowa średnia masa ciała (mg)	2,2±0,1^{a}	2,2±0,1^{a}	2,2±0,1^{a}	2,2±0,1^{a}
Końcowa średnia długość ciała (mm)	16,8±1,14^{d}	21,1±0,73^{c}	25,3±0,95^{b}	28,4±1,4^{a}
Końcowa średnia masa ciała (mg)	34,2±3,1^{d}	51,3±0,1^{c}	65,8±0,1^{b}	80,1±0,1^{a}
Obsada początkowa (osobn.)	1000	1000	1000	1000
Obsada końcowa (osobn.)	976,0±5,6	949,0±7,5	954,0±9,5	952,0±4,6
Przeżywalność (%)	97,6±0,56^{a}	94,9±0,75^{b}	95,4±0,95^{b}	95,2±0,46^{b}
Wzrost całkowitej długości (ITL) (mm·d^{-1})	0,44±0,05^{d}	0,64±0,03^{c}	0,84±0,05^{b}	0,99±0,07^{a}
Relatywny współczynnik wzrostu (RGR) dla masy (%·d^{1})	13,96±0,49^{d}	16,18±0,38^{c}	17,56±0,27^{b}	18,67±0,24^{a}
Relatywny współczynnik wzrostu (RGR) dla długości (%·d^{-1})	3,85±0,34^{d}	4,98±0,17^{c}	5,89±0,19^{b}	6,48±0,25^{a}
Relatywny współczynnik wzrostu (RBR) dla biomasy (%·d^{-1})	13,83±0,49^{d}	15,89±0,38^{c}	17,30±0,27^{b}	18,39±0,24^{a}
Biomasa (g)	33,38±3,03^{d}	48,68±3,32^{c}	62,77±3,05^{b}	76,26±3,24^{a}
Biomasa (g·dm^{-3})	1,34±0,12^{d}	1,95±0,13^{c}	2,51±0,12^{b}	3,05±0,13^{a}

Tabela 6. Wyniki podchowu larw rozpióra *Ballerus ballerus* (L.) przy zagęszczeniu 20, 40, 80 i 120 osobn. dm^{-3}. Wartość średnia ± SD. Wyniki w wierszach z tym samym indeksem literowym nie różnią się statystycznie istotnie ($\alpha = 0,05$).

Parametr	Wariant podchowowy			
	20	**40**	**80**	**120**
Początkowa średnia długość ciała (mm)	7,6±0,1^{a}	7,6±0,1^{a}	7,6±0,1^{a}	7,6±0,1^{a}
Początkowa średnia masa ciała (mg)	2,2±0,1^{a}	2,2±0,1^{a}	2,2±0,1^{a}	2,2±0,1^{a}
Końcowa średnia długość ciała (mm)	26,8±0,9^{a}	24,6±0,7^{a}	22,4±0,9^{b}	20,1±1,2^{b}
Końcowa średnia masa ciała (mg)	69,4±3,2^{a}	64,2±3,5^{a}	56,1±3,2^{b}	49,5±3,1^{c}
Obsada początkowa (osobn.)	500	1000	1500	3000
Obsada końcowa (osobn.)	473,0±10,97	942,0±14,11	1397,0±37,0	2743,0±57,0
Przeżywalność (%)	94,6±1,1^{a}	94,2±1,4^{a}	93,1±3,7^{a}	91,4±5,7^{a}
Wzrost całkowitej długości (ITL) ($mm \cdot d^{-1}$)	0,91±0,04^{a}	0,81±0,03^{a}	0,70±0,04^{b}	0,60±0,06^{c}
Relatywny współczynnik wzrostu (RGR) dla masy ($\% \cdot d^{1}$)	17,86±0,26^{a}	17,43±0,31^{a}	16,68±0,32^{b}	15,98±0,35^{c}
Relatywny współczynnik wzrostu (RGR) dla długości ($\% \cdot d^{-1}$)	6,18±0,18^{a}	5,75±0,15^{a}	5,28±0,20^{b}	4,74±0,30^{b}
Relatywny współczynnik wzrostu (RBR) dla biomasy ($\% \cdot d^{-1}$)	17,55±0,26^{a}	17,09±0,31^{b}	16,28±0,32^{c}	15,49±0,34^{d}
Biomasa (g)	32,83±1,51^{d}	60,48±3,30^{c}	78,37±4,47^{b}	135,78±8,50^{a}
Biomasa ($g \cdot dm^{-3}$)	1,31±0,06^{d}	2,42±0,13^{c}	3,13±0,18^{b}	5,43±0,34^{a}

5.4. WPŁYW ZASTĘPOWANIA POKARMU NA WZROST I PRZEŻYWALNOŚĆ LARW

Statystycznie istotne różnice w średnich masach i długościach larw z poszczególnych wariantów żywienia pojawiły się w 13 dniu okresu podchowu i utrzymywały się do końca doświadczenia (Piech i Kujawa 2022). Średnia masa osobnicza larw rozpióra z wariantu, w którym dostarczano tylko naturalny pokarm (A21), wynosiła 62,1 mg. Wzrost ten był 1,6- i 2-krotnie wyższy niż w dwóch wariantach, które były najgorsze pod tym względem, a mianowicie larwy karmionych naupliusami przez pierwsze cztery dni (A4P17) i tych karmione wyłącznie paszą Perla (P21). W porównaniu z innymi wariantami, wzrost ten był 1,3-krotnie wyższy niż w przypadku larw z wariantu A8P13, które były karmione żywymi naupliusami solowca przez osiem dni, i 1,1-krotnie wyższy niż w przypadku larw z wariantu A12P9, które były karmione naupliusami solowca przez pierwsze 12 dni życia. Najwyższe tempo wzrostu larw rozpióra z badanych wariantów odnotowano w grupie A12P9, gdzie larwy osiągnęły średnią masę ciała 56,1 mg przy średniej długości całkowitej 21,1 mm. Wartości te były tylko nieznacznie gorsze niż te uzyskane w próbie kontrolnej A21. Końcowa przeżywalność larw w każdej grupie żywieniowej wahała się od 67% (A4P17) do 93% (A12P9) (tab.7). Nie odnotowano statystycznie istotnych różnic między osobnikami z tych samych wariantów żywieniowych. Najwyższy wskaźnik przeżywalności larw na poziomie 96%, odnotowano w grupie karmionej wyłącznie żywym pokarmem naturalnym (A21). Dla porównania wskaźniku przeżywalności larw z grupy gdzie podawana była wyłącznie pasza (P21) – wyniósł zaledwie 38%.

Tabela 7. Wyniki podchowu larw rozpióra *Ballerus ballerus* (L.) karmionych naupliusami solowca *Artemia* sp., zastępowanymi po 4, 8 lub 12 dniach paszą komercyjną Perla. Wartość średnia ± SD. Wyniki w wierszach z tym samym indeksem literowym nie różnią się statystycznie istotnie ($\alpha = 0,05$).`

Parametr	Wariant podchowowy				
	A21	**A12P9**	**A8P13**	**A4P17**	**P21**
Początkowa średnia długość ciała (mm)	$7,50\pm0,15^{a}$	$7,50\pm0,15^{a}$	$7,50\pm0,15^{a}$	$7,50\pm0,15^{a}$	$7,50\pm0,15^{a}$
Początkowa średnia masa ciała (mg)	$2,1\pm0,1^{a}$	$2,1\pm0,1^{a}$	$2,1\pm0,1^{a}$	$2,1\pm0,1^{a}$	$2,1\pm0,1^{a}$
Końcowa średnia długość ciała (mm)	$22,60\pm0,9^{a}$	$21,10\pm1,0^{ab}$	$19,80\pm1,1^{b}$	$17,40\pm1,1^{c}$	$15,40\pm1,3^{cd}$
Końcowa średnia masa ciała (mg)	$62,10\pm3,2^{a}$	$56,10\pm3,5^{ab}$	$49,70\pm4,1^{b}$	$37,40\pm5,5^{c}$	$30,50\pm6,1^{cd}$
Obsada początkowa (osobn.)	1000	1000	1000	1000	1000
Obsada końcowa (osobn.)	$960,00\pm17^{a}$	$930,00\pm25^{ab}$	$887,00\pm36^{b}$	$670,00\pm60^{c}$	$380,00\pm74^{d}$
Przeżywalność (%)	$96,00\pm1,7^{a}$	$93,00\pm2,5^{ab}$	$88,70\pm3,6^{b}$	$67,00\pm6,0^{c}$	$38,00\pm7,4^{d}$
Wzrost całkowitej długości (ITL) ($mm\cdot d^{-1}$)	$0,72\pm0,04^{a}$	$0,65\pm0,04^{ab}$	$0,59\pm0,05^{b}$	$0,47\pm0,05^{c}$	$0,38\pm0,06^{cd}$
Relatywny współczynnik wzrostu (RGR) dla masy ($\%\cdot d^{1}$)	$17,50\pm0,29^{a}$	$16,93\pm0,51^{ab}$	$16,26\pm0,49^{b}$	$14,70\pm0,73^{c}$	$13,59\pm1,11^{cd}$
Relatywny współczynnik wzrostu (RGR) dla długości ($\%\cdot d^{-1}$)	$5,39\pm0,19^{a}$	$5,05\pm0,24^{ab}$	$4,73\pm0,28^{b}$	$4,09\pm0,31^{c}$	$3,49\pm0,42^{cd}$
Relatywny współczynnik wzrostu (RBR) dla biomasy ($\%\cdot d^{-1}$)	$17,27\pm0,28^{a}$	$16,53\pm0,48^{ab}$	$15,60\pm0,49^{b}$	$12,53\pm0,71^{c}$	$8,47\pm1,05^{d}$
Biomasa (g)	$59,62\pm3,8^{a}$	$52,17\pm4,2^{ab}$	$44,08\pm3,9^{b}$	$25,06\pm3,32^{c}$	$11,59\pm2,3^{d}$
Biomasa ($g\cdot dm^{-3}$)	$2,38\pm0,08^{a}$	$2,09\pm0,19^{ab}$	$1,76\pm0,16^{b}$	$1,00\pm0,13^{c}$	$0,46\pm0,09^{d}$

5.5. WPŁYW ZASOLENIA WODY NA WZROST I PRZEŻYWALNOŚĆ LARW

Po dostosowaniu zasolenia wody w poszczególnych akwariach do pożądanego poziomu, pierwsze martwe larwy pojawiły się drugiego dnia w wodzie o zasoleniu 7 ppt (Piech i Kujawa 2023). W wodzie o zasoleniu 3, 5 ppt pierwsze martwe larwy obserwowano trzeciego dnia. Podczas 21-dniowego okresu odchowu najniższą śmiertelność obserwowano w wodzie pozbawionej zasolenia (0 ppt). Doświadczenie przeżyło blisko 98,6% osobników z wyjściowej obsady. Bardzo podobną przeżywalność larw uzyskano, gdy hodowano je w wodzie o zasoleniu 3 ppt. W tym wariancie 97% larw przeżyło cały okres podchowu. Najniższą przeżywalność larw zaobserwowano w wodzie o zasoleniu 7 ppt, gdzie 83,2% larw z wyjściowej obsady przeżyło podchów (tab. 8). Podczas wszystkich pomiarów kontrolnych, średnie długości larw hodowanych w wodzie słodkiej i w wodzie o zasoleniu 3 ppt były podobne. W ostatnim dniu podchowu larwy rozpióra hodowane w wodzie o zasoleniu 3 ppt uzyskały średnią masę ciała 64,1 mg (± 4,2 mg) przy średniej długości 22,6 mm (± 0,9 mm). Najmniejsze larwy uzyskano podchowując je w wodzie o zasoleniu 7 ppt. W ostatnim dniu podchowu uzyskały one średnią masę 48,6 mg (± 6,2 mg), przy średniej długości 18,9 mm (± 1,5 mm), natomiast w wodzie o zasoleniu 5 ppt uzyskały średnią masę 52,4 mg (± 4,8 mg), przy średniej długości 19,3 mm (± 1,3 mm). Nie odnotowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy średnią masą osobników hodowanych w wodzie słodkiej i w wodzie o zasoleniu 3 ppt. Podobnie nie odnotowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy średnią masą osobników podchowywanych w wodzie o zasoleniu 5 i 7 ppt. Największą biomasę larw rozpióra wynoszącą 62,2 g (± 4,1 g) uzyskano w wodzie o zasoleniu 3 ppt.

Tabela 8. Wyniki podchowu larw rozpióra *Ballerus ballerus* (L.) w wodzie słodkiej i wodzie o zasoleniu 3, 5, 7 ppt. Wartość średnia ± SD. Wyniki w wierszach z tym samym indeksem literowym nie różnią się statystycznie istotnie (α = 0,05).

Parametr	Wariant podchowowy			
	0	3 ppt	5 ppt	7 ppt
Początkowa średnia długość ciała (mm)	$7,5 \pm 0,1^{a}$	$7,5 \pm 0,1^{a}$	$7,5 \pm 0,1^{a}$	$7,5 \pm 0,1^{a}$
Początkowa średnia masa ciała (mg)	$2,2 \pm 0,1^{a}$	$2,2 \pm 0,1^{a}$	$2,2 \pm 0,1^{a}$	$2,2 \pm 0,1^{a}$
Końcowa średnia długość ciała (mm)	$21,9 \pm 0,9^{a}$	$22,6 \pm 0,9^{a}$	$19,3 \pm 1,3^{b}$	$18,9 \pm 1,5^{b}$
Końcowa średnia masa ciała (mg)	$62,5 \pm 3,4^{a}$	$64,1 \pm 4,2^{a}$	$52,4 \pm 4,8^{b}$	$48,6 \pm 6,2^{b}$
Obsada początkowa (osobn.)	1000	1000	1000	1000
Obsada końcowa (osobn.)	$986 \pm 1,0^{a}$	$970 \pm 2,0^{a}$	$946 \pm 7,2^{b}$	$832 \pm 15,4^{c}$
Przeżywalność (%)	$98,6 \pm 0,1^{a}$	$97 \pm 0,2^{a}$	$94,6 \pm 0,7^{b}$	$83,2 \pm 1,5^{c}$
Wzrost całkowitej długości (ITL) ($mm \cdot d^{-1}$)	$0,7 \pm 0,0^{a}$	$0,6 \pm 0,1^{a}$	$0,6 \pm 0,01^{b}$	$0,5 \pm 0,1^{b}$
Relatywny współczynnik wzrostu (RGR) dla masy ($\%\cdot d^{1}$)	$17,3 \pm 0,3^{a}$	$17,4 \pm 0,4^{a}$	$16,3 \pm 0,5^{b}$	$15,9 \pm 0,7^{b}$
Relatywny współczynnik wzrostu (RGR) dla długości ($\%\cdot d^{-1}$)	$5,4 \pm 0,2^{a}$	$5,4 \pm 0,3^{a}$	$4,6 \pm 0,3^{b}$	$4,5 \pm 0,4^{b}$
Relatywny współczynnik wzrostu (RBR) dla biomasy ($\%\cdot d^{-1}$)	$17,2 \pm 0,3^{a}$	$17,3 \pm 0,4^{a}$	$16,0 \pm 0,5^{b}$	$14,9 \pm 0,7^{b}$
Biomasa (g)	$61,6 \pm 3,4^{a}$	$62,2 \pm 4,1^{a}$	$49,6 \pm 4,5^{b}$	$40,4 \pm 5,2^{b}$
Biomasa ($g \cdot dm^{-3}$)	$2,5 \pm 0,1^{a}$	$2,5 \pm 0,2^{a}$	$2,0 \pm 0,2^{b}$	$1,6 \pm 0,2^{b}$

6. DYSKUSJA

W przypadku większości dziko żyjących gatunków ryb, w celu pozyskania od nich produktów płciowych, należy dokonać stymulacji hormonalnej (Donaldson, 1996). Dotyczy to zwłaszcza reofilnych ryb karpiowatych, których rozród w warunkach kontrolowanych, bez zastosowania iniekcji hormonalnych, często jest niemożliwy. Jedynie odłowienie ryb na tarliskach w trakcie tarła umożliwia pozyskanie od nich produktów płciowych bez stymulacji hormonalnych (Slyn'ko i Slyn'ko 2010). Badania w zakresie kontrolowanego rozrodu rozpióra z wykorzystaniem substancji hormonalnych oparto na badaniach dotyczących rozrodu leszcza *Abramis brama* (Kucharczyk i in. 1997ab) oraz reofilnych ryb karpiowatych (Kucharczyk i in. 1998; Kujawa i in. 1998; Targońska i in. 2010; Kupren i in. 2011; Kucharczyk i in. 2016; Kucharczyk i in. 2019). Ryby te podobnie jak rozpiór przed rozrodem w warunkach kontrolowanych muszą zostać odłowione ze środowiska naturalnego. Wiąże się to z ich dużym stresem i może skutkować zmniejszeniem ich przeżywalności po umieszczeniu w basenach. Wywołanie owulacji u samic i zwiększenie ilości pozyskiwanego nasienia od samców przy pomocy iniekcji zawiesiną zhomogenizowanych przysadek mózgowych CPH jest obecnie częściowo wypierane przez stosowanie innych środków hormonalnych takich jak Ovaprim czy też Ovopel (Horvath i in. 1997; Brzuska i Adamek 1999; Brzuska 2000; Jamróz i in. 2008; Żarski i in. 2009; Cieśla i in. 2014). W celu opracowania biotechniki rozrodu sprawdza się działanie różnych środków hormonalnych stosowanych w różnych dawkach. Ma to szczególne znaczenie dla ryb karpiowatych niejednorodnych pod względem rozrodu. Ryby o jednorazowym tarle w sezonie muszą otrzymać środki hormonalne, nierzadko wraz z antagonistami dopaminy (Horvath i in. 1997; Brzuska i Grzywaczewski 1999; Brzuska 1999, 2000, 2001). Natomiast ryby o tarle porcyjnym powinny otrzymywać inne hormony lub w innych dawkach (Kucharczyk i in. 1996, 1997). Często stosowanym stymulatorem rozrodu ryb jest ludzka gonadotropina kosmówkowa – HCG. Gonadotropina kosmówkowa – HCG jest szczególnie polecana podczas rozrodu ryb okoniowatych (Dabrowski i in. 1994; Kucharczyk i in. 1996). W przypadku reofilnych ryb karpiowatych jej skuteczność jest niewielka, a ponadto procedura stosowania wymaga 2-4 iniekcji, co wpływa stresująco na ryby i może być powodem ich zwiększonej śmiertelności. Nie wskazane jest stosowanie HCG w przypadku ryb dzikich, odłowionych ze środowiska naturalnego - szczególnie wrażliwych na wszelkie manipulacje. Ostatnie badania pokazują jednak, że HCG może być stosowane podczas rozrodu jazia i jelca, jednak czas latencji jest ponad dwukrotnie dłuższy

niż przy innych środkach hormonalnych (Kucharczyk i in. 2019, 2020). Wspomniany już powyżej Ovaprim firmy Syndel według producenta skraca i synchronizuje czas tarła, zmniejsza stres ryb, zwiększa produkcję mlecza i przedłuża jego aktywność oraz podnosi efektywność tarła. W praktyce wygląda to jednak nieco inaczej. W wielu przypadkach, szczególnie u ryb karpiowatych, nie uzyskuje się po zastosowaniu Ovaprimu zadawalających efektów rozrodczych, zwłaszcza jeśli chodzi o procent owulujących samic jak i jakość biologiczną ikry (Ahmad Tajuddin i in. 1986; Thalathiah i in. 1988). Potwierdzają to również wyniki rozrodu rozpióra w warunkach kontrolowanych, kiedy to po zastosowaniu Ovaprimu liczba owulujących samic i masa pozyskanej ikry była najniższa.

W prezentowanych badaniach dotyczących rozrodu rozpióra zastosowano Ovaprim, Ovopel oraz ekstrakt z przysadek mózgowych karpia – CPH. Wymienione środki hormonalne są bardzo często stosowane w kontrolowanym rozrodzie karpia i innych ryb karpiowatych (Drori i in. 1994; Yaron 1995; Kulikovsky i in. 1996; Brzuska 2000). Pomimo podobnych efektów końcowych rozrodu, środki te odmiennie oddziałują na organizm ryby. CPH wpływa bezpośrednio na dojrzewanie gamet, natomiast GnRH pośrednio - oddziałuje na gruczoły dokrewne ryby, które z kolei produkują własne gonadoliberyny doprowadzając do dojrzewania gamet (Yaron 1995; Targońska i in. 2010). Przeprowadzone badania wykazały, że do wywołania owulacji u ikrzyc rozpióra odłowionych ze środowiska naturalnego można stosować zarówno CPH, Ovopel, jak również Ovaprim. Jednak w przypadku tego ostatniego preparatu skuteczność była najniższa. Najbardziej skutecznym preparatem okazał się Ovopel. Jego działanie w postaci liczby owulujących samic, synchronizacji tarła oraz ilości pozyskanej ikry było korzystniejsze niż w przypadku innych stymulatorów rozrodu. Zaobserwowano również wyższą przeżywalność zarodków, w fazie zaoczkowania, pochodzących od ikrzyc rozpióra stymulowanych Ovopelem w stosunku do zarodków pochodzących od samic stymulowanych pozostałymi preparatami. Niezmiernie ważne jest również i to, że samice z tej grupy bardzo dobrze zniosły wszelkie manipulacje związane z rozrodem w warunkach kontrolowanych. Ich przeżywalność do momentu pozyskania produktów płciowych wyniosła 90%. Ponadto Ovopel jest stosunkowo tanim preparatem, a jego przygotowanie jest mało pracochłonne (Horvath i in. 1997).

Uzyskane w powyższym badaniu wyniki potwierdzają skuteczność stosowania Ovopelu, jako stymulatora rozrodu ryb pozyskanych ze środowiska naturalnego. Podczas rozrodu ryb dzikich w warunkach kontrolowanych szczególnie istotne jest uzyskanie jak największej liczby owulujących samic. Niewytarte samice, jeżeli przeżyją nie nadają się już do dalszej

hodowli. Ponadto generują koszty związane z pozyskaniem ich ze środowiska naturalnego. Biorąc pod uwagę nakład pracy związany z pozyskaniem tarlaków, to straty materialne mogą być wymierne. Obecnie prowadzone są prace mające na celu uzyskanie w warunkach kontrolowanych tarlaków rozpióra. Przypuszcza się, iż ryby częściowo udomowione będą mniej podatne na stres i znacznie lepiej zniosą wszelkie manipulacje związane z rozrodem (Kucharczyk i in. 1999).

Na wzrost i przeżywalność larw ryb podczas podchowu w warunkach kontrolowanych ma wpływ bardzo wiele czynników (Matthias i in. 2018). Jednym z nich jest temperatura wody. Temperatura, w której podchowywane są larwy ryb, powinna zapewnić wysoki wskaźnik przeżywalności oraz równomierny wzrost wszystkich osobników. Badania nad określeniem zakresu optymalnych temperatur dla rozwoju embrionalnego i larwalnego ryb były i nadal są prowadzone. Jest to bowiem jeden z najważniejszych czynników abiotycznych wpływających na tempo wzrostu, rozwój i przeżywalność larw podczas intensywnego chowu w warunkach kontrolowanych. Badania przeprowadzone na larwach ryb karpiowatych, takich jak boleń, ciosa (*Pelecus cultratus*) i leszcz pospolity (*Abramis brama*) wykazały, że w wielu przypadkach optymalny zakres temperatur podczas ich podchowu w warunkach kontrolowanych wynosi od 25°C do nawet 30°C (Kucharczyk i in. 1997a, 1998; Kujawa i in. 1997, 2015). Są to często znacznie wyższe temperatury niż te występujące podczas rozwoju embrionalnego i larwalnego w środowisku naturalnym (Kujawa i in. 1997; Kupren i in. 2011). Poznanie aspektów wpływu temperatury wody na rozwój, przeżywalność czy możliwość wystąpienia deformacji rozwojowych jest niezwykle istotne dla efektywności chowu i jakości materiału zarybieniowego (Kupren i in. 2010, 2011; Łączyńska i in. 2016; Nowosad i in. 2021b).

W niniejszym badaniu, dotyczącym podchowu larw rozpióra, podobnie jak w przypadku większości badanych ryb karpiowatych, temperatury w zakresie 25-30°C można uznać za optymalne. Są to wartości bardzo zbliżone do wyników uzyskanych podczas podchowu larw ciosy (Kujawa i in. 2015) czy leszcza pospolitego (Kucharczyk i in. 1997b, 1998) i minimalnie wyższe jak w przypadku bolenia (Kujawa i in. 1997) czy jazia, jelca i klenia (Kupren i in. 2010, 2011). Podobną zależność można zaobserwować również podczas podchowu larw rozpióra - optymalne temperatury dla larw hodowanych w kontrolowanych warunkach są wyższe niż te występujące w naturze. Wskazuje to, niezależnie od badanego gatunku, na niezwykle wysoką tolerancję larw ryb karpiowatych na warunki termiczne. W obiegach zamkniętych, zarówno dla rozrodu, rozwoju embrionalnego, jak i larwalnego, stosuje się na ogół optymalne warunki termiczne np.: dla jazia i jelca 12-14°C (Targońska i

in. 2011; Cejko i in. 2012; Nowosad i in. 2014; Kucharczyk i in. 2019, 2020). W warunkach naturalnych, zwłaszcza w okresie wiosennym występują znaczne wahania temperatury wody. Występują one zazwyczaj w wodach płynących i płytkich częściach jezior, które są przecież zwykle miejscami rozrodu i wzrostu narybku. Badania prowadzone zarówno w warunkach kontrolowanych, jak i w środowisku naturalnym wykazały, że duże wahania temperatury wody, nawet w zakresie temperatur optymalnych, mogą powodować zaburzenie tarła, obniżenie płodności i jakości gamet, wysoką śmiertelność zarodków i larw oraz występowanie deformacji rozwojowych (Kupren i in. 2010, 2011; Nowosad i in. 2014; Targońska i in. 2014). Dla producentów materiału zarybieniowego daje to jednak bardzo ważną wskazówkę - temperatura odchowu larw nie musi być idealnie (najbardziej optymalnie) trafiona, ale powinna być w miarę stała.

Oprócz określenia optymalnej temperatury wody podczas podchowu larw, ważne jest również odpowiednie ich zagęszczenie. Istotny wpływ na wielkość obsady ma początkowa wielkość larw, ich tempo wzrostu, rodzaj podawanego pokarmu i sposób karmienia, temperatura wody oraz odporność na obniżony poziom tlenu i wzrost związków azotowych. Jest to szczególnie istotne podczas intensywnego podchowu larw w warunkach kontrolowanych (Karakatsouli i in. 2007, 2015).W badaniu przeprowadzonym na larwach rozpióra stwierdzono, że rosły one najszybciej przy najniższym zagęszczeniu (20 osobn.·dm^{-3}). W tej grupie miały one najwyższe statystycznie istotne względne tempo wzrostu (RGR) dla masy i względne tempo wzrostu (RGR) dla długości (%·d^{-1}), a także najwyższą średnią długość i masę na koniec podchowu. Podobne obserwacje odnotowali inni naukowcy w przypadku bolenia, klenia i jazia, których larwy również osiągnęły najwyższą masę i długość całkowitą przy najniższym testowanym zagęszczeniu - 50 osobn.·dm^{-3} (Żarski i in. 2008; Kupren i in. 2011). Przeżywalność larw rozpióra po zakończeniu podchowu we wszystkich wariantach zagęszczenia była wysoka i wynosiła od 91,4% do 94,6%, a pomiędzy badanymi grupami nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie. Podobną przeżywalność larw bolenia, klenia i jazia uzyskano również w badaniach przeprowadzonych przez Kuprena i in. (2011). Nie zaobserwowano w nich istotnego wpływu zagęszczenia larw na ich śmiertelność. Wykazano natomiast, że nawet maksymalne testowane zagęszczenie na poziomie 400 osobn.·dm^{-3} w przypadku larw ogranicza tempo ich wzrostu, lecz nie wpływa negatywnie na ich przeżywalność. Znacznie większe zagęszczenie larw bo aż 1000 osobników·dm^{-3} było z sukcesem zastosowane podczas podchowu larw miętusa (*Lota lota*) (Żarski i in. 2009). W przypadku innych

gatunków ryb zagęszczenie obsad jest znacznie mniejsze. Przykładem mogą być badania wpływu zagęszczenia larw suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*) na ich wzrost i przeżywalność podczas podchowu w RAS (Aste i in. 2009). Podchowywali oni larwy suma afrykańskiego w zagęszczeniu od 1 do 25 osobn.·dm^{-3}. Na koniec badań, stwierdzili, że optymalny poziom zagęszczenia larw wyniósł 15 osobn.·dm^{-3}. Podobne badania, lecz dotyczące larw paku czarnopłetwego (*Colossoma macropomum*), wykazały, że spośród testowanych obsad na poziomie 10, 30 i 50 osobn. dm^{-3} najwyższe parametry podchowu uzyskano w największej obsadzie (Santos i in. 2020). Analizę wpływu gęstości obsady larw sandacza (*Sander lucioperca*) na ich wzrost i przeżywalność przeprowadzili Szkudlarek i Zakęś (2007). Dla larw między 4 a 18 dniem po wylęgu najkorzystniejsze spośród testowanych zagęszczeń (od 25 do 100·osobn.·dm^{-3}) okazało się największe. Miało ono wyraźnie przełożenie na maksymalny wzrost i przeżywalność larw z tego wariantu podchowowego. W przypadku dalszego podchowu larw sandacza w zagęszczeniach od 6 do 15 osobn.·dm^{-3}, najwyższe wskaźniki przeżywalności i wzrostu uzyskano również przy najwyższym zagęszczeniu.

Jednym z najpoważniejszych problemów napotykanych podczas hodowli larw ryb w warunkach kontrolowanych jest zapewnienie im odpowiedniej jakości i ilości pokarmu. Istnieje ogromna różnorodność komercyjnych pasz do hodowli larw ryb odpowiednich dla danego gatunku ryb. Dla większości gatunków ryb hodowanych w celach konsumpcyjnych opracowano już pasze dla każdego etapu rozwoju (Belal 2007; Barbu i in. 2008; Molnar i in. 2009; Şara i in. 2010; Sverinciuc i in. 2017). Odpowiedni skład pasz komercyjnych zapewnia szybki wzrost larw przy jednoczesnym zachowaniu ich wysokiej przeżywalności. Akwakultura wykracza jednak poza hodowlę komercyjnych ryb przeznaczonych do spożycia. Zajmuje się również produkcją materiału zarybieniowego dla ryb zagrożonych wyginięciem (Kujawa i Piech 2022). Są to głównie gatunki dzikie, jeszcze nieudomowione, dla których nie opracowano odpowiednich pasz komercyjnych. Przykładem są reofilne ryby karpiowate, których larwy zaczynają pobierać pokarm na końcowym etapie resorpcji zawartości woreczka żółtkowego po napełnieniu pęcherza pławnego (Kupren i in. 2015; Nowosad i in. 2021). Analiza dostępnej literatury poświęconej temu zagadnieniu (Hofer i Uddin 1985; Wolnicki i Korwin-Kossakowski 1993; Wolnicki 1995abc) oraz przeprowadzony na potrzeby niniejszej pracy eksperyment podchowowy dowiodły, że larwy rozpióra, podobnie jak innych reofilnych ryb karpiowatych, powinny być początkowo karmione pokarmem naturalnym, a dopiero po pewnym czasie są w stanie

efektywnie przyswajać składniki odżywcze zawarte w paszach komercyjnych. Dostępna literatura dostarcza informacji, że pierwszym pokarmem egzogennym mogą być wrotki *Brachionus calyciflorus*, które z powodzeniem były podawane podczas pierwszego etapu podchowu klenia *Leuciscus cephalus* (Shiri Harzevili i in. 2003). Jednak najczęściej stosowanym żywym pokarmem, ze względu na jego wysoką przyswajalność przez większość ryb, jest słodkowodny zooplankton lub naupliusy solowca *Artemia* sp. (Bryant i Matty 1980; Bengtson i in. 2018). Niemniej jednak te dwa rodzaje pokarmu stały się ostatnio mniej dostępne, a w konsekwencji ich cena znacznie wzrosła. Wymagają one również pracochłonnego przygotowania przed podaniem larwom ryb. Alternatywą mogą być pasze komponowane. Przyswajanie przez larwy ryb składników zawartych w paszy komercyjnej może odbywać się tylko przy pomocy egzogennych enzymów zawartych w zooplanktonie, gdyż ich układ pokarmowy jest jeszcze w trakcie rozwoju i brak jest odpowiednich enzymów (Dąbrowski 1984; Wiggins i in. 1986). Niektórzy naukowcy donoszą, że karmienie larw karpiowatych komercyjną paszą jest jednoznacznie związane z ich indywidualną masą ciała. Według Bryanta i Matty'ego (1981) minimalna masa larw umożliwiająca zastąpienie pokarmu naturalnego paszą waha się od 5 do 15 mg, natomiast według Stanny'ego 10-12 mg (1984). Inni autorzy sugerują jednak, że larwy potrzebują żywego pokarmu nawet przez kilkanaście dni. Jeszcze inni twierdzą, że przejście z żywego pokarmu na karmę komercyjną powinno odbywać się stopniowo (Kwiatkowski i in. 2008). Wszyscy jednak wskazują, że żywy pokarm powinien być stosowany w początkowej fazie karmienia. Pozwala to larwom na osiągnięcie szybkiego przyrostu masy ciała i osiągnięcie kolejnych etapów rozwojowych. Może to wyjaśniać, przynajmniej w pewnym stopniu, dlaczego zaobserwowano w początkowym okresie podchowu larw rozpióra z grupy P21 niższe przyrosty masy i długości. Podobne obserwacje poczynili inni badacze, którzy hodowali larwy ryb karpiowatych na paszach starterowych (Wolnicki 1996; Mookerji i Ramakrishan 1999). Potwierdzają to również badania nad hodowlą larw ryb karpiowatych przy użyciu pasz starterowych (Wolnicki i Myszkowski 1999ab). Doniesienia te potwierdzają, że larwy wielu gatunków ryb karpiowatych wymagają kilkudniowego karmienia naturalnym pokarmem na początku okresu podchowu. Jedynie larwy takich reofilnych ryb karpiowatych, jak brzana *Barbus barbus* i świnka *Chondrostoma nasus*, o średniej początkowej masie ciała 10 mg, mogą być od początku karmione komercyjnymi paszami starterowymi (Kujawa i in. 2010). Stosowanie komercyjnych pasz po krótkim czasie podawania larwom naturalnego pokarmu jest powszechnym rozwiązaniem, przynoszącym zadowalające efekty. Warunkiem wstępnym jest wybór paszy komercyjnej odpowiedniej dla danego gatunku ryb. Podchów

larw rozpióra na pokarmie naturalnym zastąpionym po określonym czasie komercyjną paszą Perla, pozwoliło określić, jak długo larwy powinny otrzymywać pokarm naturalny, aby były w stanie przyswoić składniki odżywcze z pasz. Wyniki badań potwierdzają wcześniejsze obserwacje innych badaczy, że w pierwszym etapie życia - trwającym różnie długo w zależności od gatunku ryb karpiowatych - larwy muszą otrzymywać pokarm naturalny (Skrzypczak i in. 1998; Mamcarz i in. 1998; Kujawa 2004). Wykazali oni, że od 5 do 13 dnia podchowu (w zależności od gatunku ryb i testowanej paszy) możliwe jest zastąpienie pokarmu naturalnego paszami, przy jednoczesnym uniknięciu znacznych strat wśród larw. Niemniej jednak, tempo wzrostu larw, które początkowo otrzymywały naupliusy solowca *Artemia* sp., a następnie paszę komercyjną, było niższe niż w przypadku larw ryb otrzymujących wyłącznie pokarm naturalny. Analiza wyników podchowu larw rozpióra ujawnia wyraźną zależność ich wzrostu i przeżywalności od rodzaju pokarmu. Im dłużej larwy były karmione pokarmem naturalnym (*Artemia* sp.), tym lepsze były przyrosty zarówno średniej masy, jak i długości całkowitej. Największe larwy uzyskano w wariantach, w których wspomniany okres był najdłuższy. Larwy z wariantu A21, karmione wyłącznie naupliusami solowca, były ponad dwukrotnie cięższe niż larwy otrzymujące wyłącznie paszę Perla (P21). Wynik ten wyraźnie wskazuje, że czas po jakim można zastąpić pokarm naturalny paszą uzależniony jest od masy ciała podchowywanych larw.

Zasolenie jest jednym z wielu czynników środowiskowych hamujących rozprzestrzenianie się hydrobiontów. Wpływa na przeżywalność, metabolizm i występowanie wielu gatunków ryb, które jako najliczniejsza obecnie grupa kręgowców opanowały zarówno wody o niskiej zawartości jonów - wody słodkie, jak i te o wysokiej zawartości jonów - wody słone. Stanowi czynnik ograniczający dla siedlisk lub obszarów, w których możliwy jest sukces reprodukcji gatunku. Wpływa na wszystkie rodzaje ekosystemów słodkowodnych - jeziora, rzeki, strumienie i tereny podmokłe. (James i in. 2003; Lind i in. 2018). Źródłem zasolenia w ciekach wodnych może być spływ z pól uprawnych, podnoszenie się poziomu mórz, regulacja hydrologii rzek, górnictwo i stosowanie soli do odladzania dróg (Castillo i in. 2018; Herbert i in. 2015). Badania nad wpływem różnego zasolenia na poszczególne etapy życia ryb słodkowodnych prowadzone są od dawna. Większość badań dotyczyła ryb hodowanych w celach konsumpcyjnych, w których określono optymalny poziom zasolenia w celu zwiększenia wydajności chowu w recyrkulacyjnych systemach RAS (Jackson 1981; Wang i in. 1997; Al-Faiz i in. 2009; Kang'ombe i Brown 2010; Jun i in. 2012; Al-Khshali i Al Hilali 2019).

Pilotażowe badania dotyczące wpływu zasolonej wody na larwy ryb słodkowodnych podczas podchowu w celach restytucyjnych przeprowadzone były na ciosie *Pelecus cultratus* (Kujawa i in. 2017) oraz boleniu *Leuciscus aspius* (Kujawa i Piech 2022). Powyższe badania umożliwiły hodowlę większej liczby ryb przy mniejszym nakładzie pracy i energii.

Obecne prowadzone badania w wielu ośrodkach naukowych koncentrują się na określeniu zdolności różnych taksonów do przeżycia w wodzie o różnym stopniu zasolenia, a nie na zwiększeniu efektów podchowu przy użyciu zasolonej wody. Opisany eksperyment na larwach rozpióra doskonale wpisuje się w to zagadnienie, ponieważ rozwijające się zarodki i wczesne stadia larw ryb są szczególnie wrażliwe na zmiany zasolenia wody (James i in. 2003; Fridman i in. 2012; Mardaneh Khatooni i in. 2012; Kültz 2015; Kujawa i Piech 2022; Kujawa i in. 2017; Lawson i Alake 2011). Ryby słodkowodne są narażone na działanie słonej wody nie tylko wtedy, gdy znajdują się w strefie międzypływowej lub podczas migracji z wód słodkich do słonych, ale także w ich naturalnym środowisku. Nie są to jednak miejsca na granicy wód słodkich i słonych, ale odcinki rzek silnie zanieczyszczone solami (Cañedo-Argüelles i in. 2013). Punktowe lub odcinkowe zasolenie wody spowodowane działalnością antropogeniczną, taką jak górnictwo, hutnictwo, przemysł chemiczny nie pozostaje bez wpływu na biocenozy lokalnych zbiorników wodnych, w tym na ichtiofaunę (James i in. 2003; Molenda 2018; Cañedo-Argüelles i in. 2013).

W przeprowadzonym eksperymencie zaobserwowano, że stopniowy wzrost zasolenia nie wpłynął negatywnie na larwy rozpióra. Różnice we wzroście larw rozpióra w wodzie o różnych poziomach zasolenia potwierdzają dane literaturowe, które pokazują, że zmiany zasolenia powodują większe zużycie energii na regulację osmotyczną i jonową, co oznacza, że mniej energii pozostaje na wzrost i rozwój (Brown 1957; Febry i Lutz 1987; Alderdice 1988; Bœuf i Payan 2001). Larwy ryb słodkowodnych umieszczone w słonej wodzie (roztwór hipertoniczny w stosunku do płynów ustrojowych) tracą wodę znajdującą się w tkankach, co powoduje wzrost stężenia soli w organizmie. Równowaga kwasowo-zasadowa krwi zostaje wówczas naruszona. Hemoglobina nie jest w stanie prawidłowo wiązać tlenu znajdującego się we krwi, co może prowadzić do upośledzenia metabolizmu tlenu w organizmie, a ostatecznie do śmierci (Varsamos i in. 2005). Powyższe zmiany dotyczą nie tylko larw, ale także starszych osobników. Pomyślne przeniesienie ryb

słodkowodnych do wody o wysokim zasoleniu wiąże się z tolerancją tkanek na zmiany ich uwodnienia lub zdolnością do regulacji ciśnienia osmotycznego, np. przez nerki i skrzela.

Badania potwierdzają, że larwy rozpióra, podobnie jak larwy bolenia zamieszkujące podobne środowiska, również tolerują wody o zasoleniu 3-7 ppt (Kujawa i Piech 2022). Starsze osobniki reofilnych ryb karpiowatych są w stanie tolerować znacznie wyższe zasolenie wody. Przykładem jest blisko spokrewniony jaź, który toleruje wodę o zasoleniu 15 ppt. Najprawdopodobniej organizmy stenohalinowe, które wykazują zachowania anadromiczne, które zamieszkują głównie rzeki i są często obserwowane w wodach o zasoleniu kilku promili, będą najlepiej przystosowane do tych zmian (Skovrind i in. 2016).

Zbyt wysoki poziom zasolenia zabija gatunki słodkowodne z powodu toksycznych poziomów jonów sodu i chlorków w ich komórkach oraz zmniejszonej zdolności do pobierania niezbędnych jonów i wody. Omawiając wpływ słonej wody na organizmy słodkowodne, warto wspomnieć o pierwiastkach i związkach chemicznych, które mogą potęgować negatywny wpływ chlorków i siarczanów na organizmy. Takimi pierwiastkami są wapń Ca, magnez Mg i potas K. Źródłem Ca i Mg mogą być sole drogowe, takie jak $CaCl_2$ i $MgCl_2$, które są używane nie tylko zimą, ale także latem do wiązania pyłu na drogach żwirowych (Hintz i Relyea 2019). Pierwsze dwa często tworzą związki $CaCO_3$ i $MgCO_3$ odpowiedzialne za twardość wody. Im więcej jest tych związków, tym twardsza jest woda, a wpływ jonów chlorkowych na organizmy jest mniejszy (Elphick i in. 2011). W opisywanym doświadczeniu jako rozcieńczalnik dla soli morskiej została użyta woda wodociągowa (o twardości 24°n). Przypuszczalnie mogło to wpłynąć na tak wysoką przeżywalność larw rozpióra we wszystkich testowanych zasoleniach. Negatywny wpływ chlorków i siarczanów na organizmy słodkowodne potęguje podwyższona obecność potasu (Schulz i Cañedo-Argüelles 2019). W związku z tym wskazane jest aby podczas hodowli larw ryb słodkowodnych w wodzie o różnych poziomach zasolenia, a także podczas przewidywania ekologicznych skutków wprowadzenia solanki do wód śródlądowych uwzględniony został skład chemiczny wody (Moffett i in. 2020).

Według badań Laxa i Petersona (2009) na larwy ryb słodkowodnych negatywnie wpływa długotrwała ekspozycja stężenia chlorków powyżej 25 $mg \cdot dm^{-3}$. Wysoka tolerancja larw rozpióra na wodę o zasoleniu 3 ppt (3000 $mg \cdot dm^{-3}$) wskazuje, że istnieją duże różnice międzygatunkowe nawet wśród ryb stenohalinowych w zakresie wrażliwości na sól (Imanpoor i in 2012). Zdolność adaptacyjna ryb do słonej wody może zależeć od wcześniejszej ekspozycji na ten czynnik. Co więcej, mechanizmy stojące za możliwą

aklimatyzacją lub adaptacją do zasolenia przez organizmy słodkowodne są nadal niezbadane (Coldsnow i in. 2017) i nie wiadomo, dlaczego niektóre osobniki tego samego gatunku lepiej, a inne bardzo słabo tolerują słoną wodę (Van Dam i in. 2017; Scheibener 2017).

7. WNIOSKI

- Zaobserwowano zadawalającą odporność tarlaków rozpióra na manipulacje związane z rozrodem w warunkach kontrolowanych. Najlepszym stymulatorem owulacji rozpióra w warunkach kontrolowanych okazał się Ovopel. Po zastosowaniu Ovopelu również przeżywalność samic do momentu pozyskania produktów płciowych była najwyższa. Najmniejszą przeżywalność samic zaobserwowano po zastosowaniu CPH. Wysoki procent zapłodnienia oraz przeżywalność larw uzyskano od samic stymulowanych Ovopelem lub CPH.
- Przeprowadzone badania potwierdziły wysoką tolerancję larw rozpióra na wysoką temperaturę - optymalną dla reofilnych ryb karpiowatych oraz duże zagęszczenie obsady. Najlepsze wyniki podchowu i najniższą śmiertelność larw rozpióra uzyskano przy najniższym zagęszczeniu obsady wynoszącym 20 osobn.·dm^{-3}. Jeśli chodzi o wpływ temperatury, podchów w najwyższej testowanej temperaturze (30°C) okazał się najlepszą opcją, z najwyższymi wskaźnikami przeżywalności i wzrostu. W przypadku masowej produkcji materiału zarybieniowego rozpióra zaleca się stosowanie temperatury 25°C i zagęszczenia obsady na poziomie 40-80 osobn.·dm^{-3}, w celu uzyskania optymalnych wyników podchowu, zarówno pod względem biologicznym, jak i ze względu na niższe koszty związane z podgrzewaniem wody w obiegach podchowowych.
- Podchów larw rozpióra w warunkach kontrolowanych wymaga zapewnienia im w początkowym okresie podchowu dostępu do żywego pokarmu. Najwyższe tempo wzrostu larw rozpióra z badanych wariantów odnotowano w grupie A12P9. Zbyt wczesne zastąpienie żywego pokarmu paszą komercyjną obniża parametry wzrostu i zwiększa śmiertelność larw. Przyswajanie przez larwy rozpióra składników zawartych w paszy komercyjnej może odbywać się tylko przy pomocy egzogennych enzymów zawartych w zooplanktonie, dlatego konieczne jest zapewnienie im żywego pokarmu w początkowej fazie żerowania.
- W powyższym doświadczeniu najlepsze parametry wzrostu uzyskano podchowując larwy rozpióra w wodzie o zasoleniu 3 ppt. Wyższe poziomy zasolenia były również akceptowane przez larwy, o czym świadczą wyliczone parametry podchowu. Wskaźniki przeżywalności larw rozpióra we wszystkich testowanych poziomach zasolenia były bardzo wysokie i wynosiły od 83,2% do 97,0%. Tolerancja larw rozpióra na wodę o zasoleniu 3-7 ppt sugeruje, że są one w stanie przetrwać i rozwijać się w wodach naturalnych zanieczyszczonych solankami pochodzącymi ze zrzutu wód pokopalnianych.

8. LITERATURA

Ahmad, T.Z., Chuah, H.P., Haron, A. Zahari, A. (1986). Induced breeding techniques for some of the cyprinid foodfishes in Malacca. *Proc. Intl. Conf. Dev. Managt. Trop. Living Aquat. Resour. Serdang Malays.* 2–5 Aug., 1993, 44–51.

Alderdice, D.F. (1988). Osmotic and ionic regulation in teleost eggs and larvae. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology, vol. XIA. Academic Press, New York*, pp. 163–251.

Aldous, A., Fitzsimons, J., Richter, B., Bach, L. (2011). Droughts, floods and freshwater ecosystems: Evaluating climate change impacts and developing adaptation strategies. *Marine and Freshwater Research,* 62, 223–231.

Al-Faiz, A.F., Jabir A., Yesser, A. (2009). Variance salinity concentrations effects on survival, growth and feeding of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Iraqi J. Aquaculture,* 6(2):59–70.

Al-Khshali M. S., Al Hilali H. A. (2019). Influence of transfer to high salinity on chloride cells, oxygen and energy consumption in Common carp *Cyprinus carpio*. *Journal of Animal Science and Products*, 2(1): 1-12.

Atse, B.C., Konan, K.J., Alla, Y.L., Pangini, K. (2009). Effect of rearing density and feeding regimes on growth and survival of African catfish, *Heterobranchus longifilis* (Valenceinnes, 1840) Larvae in a closed recirculating aquaculture system. *Journal of Applied Aquaculture,* 21, 183–195.

Basavaraju, Y., Renuka Devi, B. S., Mukthayakka, G., Purushotham, Reddy, L., Mair, G. C., Roderick, E. E., Penman, D. J. (1998). Evaluation of marking and tagging methods for genetic studies in carp. *Journal of Biosciences*, 23, No.5, 585-593.

Barbu, A., Sara, A., Alina, A., Bentea, M. (2008). The effects of some fodder additives on production performances of different fish species. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 65, 278-282.

Belal, I. E. (2007). Incorporating fodder beet Beta vulgaris cv. Majoral in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) diet. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 22-30.

Bengtson, D. A., Léger, P., Sorgeloos, P. (2018). Use of Artemia as a food source for aquaculture. In *Artemia biology* (pp. 255-286). CRC Press.

Bœuf, G., Payan, P. (2001). How should salinity influence Fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology* Part C. 130: 411-423.

Braukmann, U., Böhme, D. (2011). Salt pollution of the middle and lower sections of the river Werra (Germany) and its impact on benthic macroinvertebrates. *Limnologica,* 41, 113–124.

Bryant, P. L., Matty, A. J. (1980). Optimisation of Artemia feeding rate for carp larvae (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 21(3), 203-212.

Brown, M.E. (1957). Experimental studies on growth. In: The physiology of fishes. (Ed. M.E. Brown). *Academic Press, New York,* 361–400.

Brzuska E., Bieniarz K. (1977). Metoda przyżyciowego określania dojrzałości płciowej samic karpia w związku z iniekcjami homogenatu przysadki mózgowej karpia. *Broszury IRŚ Olsztyn*, 105, 27.

Brzuska, E., Adamek, J. (1999). Artificial spawning of European catfish, *Silurus glanis* L.: stimulation of ovulation using LHRH-a, Ovaprim and carp pituitary extract. *Aquaculture Research*, 30: 59-64.

Brzuska, E. (2000). Artificial spawning of carp *Cyprinus carpio* L.: differences between the effects on reproduction in females of Polish and Hungarian provenance treated with carp pituitary and (D-Ala6) GnRH ProNHEt (Kobarelin). *Aquaculture Research*, 31, 457-465.

Brzuska, E., Grzywaczewski, R., 1999. Artificial spawning of carp *Cyprinus carpio* L.: differences between the effects on reproduction in females of Israeli strain Dor-70 and its cross-breed treated with carp pituitary and Ovopel. *Aquaculture Research*, 30: 559-570.

Brzuska, E., 2001. Artificial spawning of carp (*Cyprinus carpio* L.); the use of Aquaspawn and carp pituitary extract to induce ovulation in females of Lituanian line B. *Aquaculture Research*, 32: 357-364.

Cañedo-Argüelles, M., Kefford, B. J., Piscart, C., Prat, N., Schäfer, R. B., Schulz, C. J. (2013). Salinisation of rivers: an urgent ecological issue. *Environmental pollution*, 173, 157-167.

Castillo, A. M., Sharpe, D. M., Ghalambor, C. K., De León, L. F. (2018). Exploring the effects of salinization on trophic diversity in freshwater ecosystems: a quantitative review. *Hydrobiologia*, 807(1), 1-17.

Chaŝem, M.T. (1969). Polovoje sozrievanie i plodovitost sinca *Abramis ballerus* (L.) Rybinskogo vodochraniliszcza [Sexual maturation and fecundity of blue bream, *Abramis ballerus* (L.) from the Rybinsk reservoir. *Voprosy Ichtiologii*, 9: 489–496. (In Russian).

Cejko, B. I., Kowalski, R. K., Kucharczyk, D., Targońska, K., Krejszeff, S., Żarski, D., Glogowski, J. (2010). Influence of the length of time after hormonal stimulation on selected parameters of milt of ide *Leuciscus idus* L. *Aquaculture Research*, 41, 804-813.

Cejko, B. I., Targońska, K., Kowalski, R. K., Żarski, D., Sarosiek, B., Kucharczyk, D., Glogowski, J. (2020). The effectiveness of hormonal preparations (Ovopel, Ovaprim, LHRH a, hCG and CPE) in stimulating spermiation in dace *Leuciscus leuciscus* (L.). *Journal of Applied Ichthyology*, 28, 873-877.

Cieśla, M., Jończyk, R., Gozdowski, D., Śliwiński, J. (2014). Changes in ide *Leuciscus idus* (L.) females' reproductive parameters after stimulation with carp pituitary homogenate (CPH) and Ovopel: The effect of domestication? *Aquaculture International*, 22(1).

Coldsnow, K. D., Mattes, B. M., Hintz, W. D., Relyea, R. A. (2017). Rapid evolution of tolerance to road salt in zooplankton. *Environmental pollution*, 222, 367-373.

Dabrowski, K. (1984). Influence of initial weight during the change from live to compound feed on the survival and growth of four cyprinids. *Aquaculture*, 40, 27-40.

Donaldson, E. M. (1996). Manipulation of reproduction in farmed fish. *Animal Reproduction Science*, 42(1-4), 381-392.

Drori, S., Ofir, M., Levavi-Sivan, B., Yaron, Z. (1994). Spawning induction in common carp (*Cyprinus carpio*) using pituitary extract or GnRH superactive analogue combined

with metoclopramidae: Analysis of hormone profile, progress of oocyte maturation and dependence on temperature. *Aquaculture*, 119, 393–407.

Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F tests. biometrics, 11(1), 1-42.

Elphick, J. F., K. D. Bergh, and H. C. Bailey. (2011). Chronic toxicity of chloride to freshwater species: Effects of harness and implications for water quality guidelines. *Environ. Toxicol. Chem.*, 30: 239–246.

Evans, M., C. Frick. (2001). The effects of road salts on aquatic ecosystems. Environment Canada. *Water Science and Technology Directorate*, Report no. 02–308.

Febry, R. Lutz, P. (1987). Energy partitioning in fish: the activity related cost of osmoregulation in a euryhaline cichlid. *Journal of Experimental Biology*, 128, 63–85.

Fridman, S., Bron, J., Rana, K. (2012). Influence of salinity on embryogenesis, survival, growth and oxygen consumption in embryos and yolk-sac larvae of the Nile tilapia. *Aquaculture*, 334, 182-190.

Goryczko, K., Witkowski, A. (2009). Gospodarka zarybieniowa a ochrona środowiska. *Chrońmy Przyrodę Ojczystą*, *65*(2), 93-98.

Gorzel, M., Kornijów, R. (2004). Biologiczne metody oceny jakości wód rzecznych. *Kosmos*, 53, 183-191.

Heese, T., Witkowski, A. (1996). Ochrona rzadkich i zagrożonych gatunków ryb w Polsce, stan aktualny i perspektywy. *Zoologica Poloniae*, 41(Supl.), 5-6.

Herbert, E. R., Boon, P., Burgin, A. J., Neubauer, S. C., Franklin, R. B., Ardón, M., Hopfensperger, K.N., Lamers, L.P.M., Gell, P. (2015). A global perspective on wetland salinization: ecological consequences of a growing threat to freshwater wetlands. *Ecosphere*, 6(10), 1-43.

Hofer, R., Uddin, A. N. (1985). Digestive processes during the development of the roach, *Rutilus rutilus* L. *Journal of Fish Biology*, 26(6), 683-689.

Hintz, W. D., Relyea, R. A. (2019). A review of the species, community, and ecosystem impacts of road salt salinisation in fresh waters. *Freshwater biology*, 64(6), 1081-1097.

Hintz, W.D., Relyea, R.A. (2017). Impacts of road deicing salts on the early-life growth and development of a stream salmonid: Salt type matters. *Environmental Pollution*, 223, 409–415.

Horvath, L., Szabo T., Burke J. (1997). Hatchery testing of GnRH analogue containing pellets on ovulation in four cyprinid species. *Polish Archives of Hydrobiology*, 44, 281-292.

Hübner, G. (2007). Ökologisch-faunistische Fließgewässerbewertung am Beispiel der salzbelasteten unteren Werra und ausgewählter Zuflüsse. *Dissertation Universität Kassel*, Fachbereich Architektur, Stadtplanung, Landschaftsplanung, 303 S, Kassel.

Imanpoor, M. R., Najafi, E., Kabir, M. (2012). Effects of different salinity and temperatures on the growth, survival, haematocrit and blood biochemistry of Goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture Research*, 43(3), 332-338.

Jackson, A. G. (1981). Salinity tolerance and osmotic behavior of European carp (*Cyprinus carpio* L.) from the river Murray. *Australia Trans. R. Soc. Aus.,* 103 (7): 185- 189.

James, K. R., Cant, B., Ryan, T. (2003). Responses of freshwater biota to rising salinity levels and implications for saline water management: a review. *Australian Journal of Botany*, 51(6), 703-713.

Jamróz, M., Kucharczyk, D., Hakuć-Błażowska, A., Krejszeff, S., Kujawa, R., Kupren, K., Kwiatkowski, M., Targońska, K., Żarski, D., Cejko, B.I., Glogowski, J. (2008). Comparing the effectiveness of Ovopel, Ovaprim, and LH-RH analogue used in the controlled reproduction of ide, *Leuciscus idus* (L.). *Fisheries & Aquatic Life*, 16(4), 363-370.

Jun Q., Pao X., Haizhen W., Ruiwei L. Hui W. (2012) Combined effect of temperature, salinity and density on the growth and feed utilization of Nile tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, 43, 1344– 1356.

Kang'ombe J., Brown J. A. (2010). Effect of salinity on growth, feed utilization, and survival of Tilapia rendalli under laboratory conditions. *Journal of Applied Aquaculture*, 20:4, 256-271.

Karabanowicz, J., Kompowski, A. On biology of reproduction of blue bream, Abramis ballerus (L., 1758), in the lower part of River Odra, Lake Dąbie and Szczecin Lagoon. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 1994, 2, 77–92.

Karakatsouli, N., Papoutsoglou, S. E., Manolessos, G. (2007). Combined effects of rearing density and tank colour on the growth and welfare of juvenile white sea bream *Diplodus sargus* L. in a recirculating water system. *Aquaculture Research*, 38, 1152-1160.

Karakatsouli, N., Kassianos, N., Papoutsoglou, S.E. (2015). Effects of rearing density and tank colour on juvenile sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) growth performance. *Aquaculture International*, 23:943–953.

Kompowski, A., Błaszczyk, P. (1997). Reproduction and fecundity of blue bream *Abramis ballerus* L., 1758 in Międzyodrze. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 27, 57–77.

Kompowski, A. (1991). Catches and growth rate of *Abramis ballerus* (L., 1758) from Lake Dąbie and the Firth of Szczecin. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 21: 17–28.

Krejszeff, S., Kucharczyk, D., Kupren, K., Targońska, K., Mamcarz, A., Kujawa, R., Kaczkowski, Z., Ratajski, S. (2008). Reproduction of chub, *Leuciscus cephalus* L., under controlled conditions. *Aquaculture Research*, 39, 907-912.

Krejszeff, S., Targońska, K., Żarski, D., Kucharczyk, D. (2010). Artificial reproduction of two different spawn-forms of the chub. *Reproductive Biology*, 10, 67-74.

Kucharczyk, D., Kujawa, R., Mamcarz, A., Wyszomirska, E. (1997a). Induced spawning in rudd (*Scardinius erythtrophthalmus* L.). *Polish Archives of Hydrobiology*, 44, 209-213.

Kucharczyk, D., Nowosad, J., Kucharczyk, D. J., Kupren, K., Targońska, K., Wyszomirska, E., Kujawa, R. (2019). Out-of-season artificial reproduction of common dace (*Leuciscus leuciscus* L.) under controlled conditions. *Animal Reproduction Science*, 2019, 202, 21-25.

Kucharczyk, D., Nowosad, J., Wyszomirska, E., Cejko, B. I., Arciuch-Rutkowska, M., Juchno, D., Boroń, A. (2020). Comparison of artificial spawning effectiveness of hCG, CPH and GnRHa in combination with dopamine inhibitors in a wild strain of ide

Leuciscus idus (L.) in hatchery conditions. *Animal Reproduction Science*, 221, 106543.

Kucharczyk, D., Nowosad, J., Łuczyński, M. J., Targońska, K. (2016). New technique for fertilizing eggs of burbot, asp and ide under hatchery conditions. *Animal Reproduction Science,* 172, 143-147.

Kucharczyk, D., Luczynski, M., Kujawa, R., Czerkies, P. (1997b). Effect of temperature on embryonic and larval development of bream (*Abramis brama* L.). *Aquatic Sciences*, 59, 214-224.

Kucharczyk, D., Luczynski, M., Kujawa, R., Kaminski, R., Ulikowski, D., Brzuzan, P. (1998). Influences of temperature and food on early development of bream (*Abramis brama* L.). *Archiv für Hydrobiologie*, 141, 243-256.

Kucharczyk, D., Kujawa, R., Mamcarz, A., Wyszomirska, E., Ulikowski, D. (1999). Artificial spawning of ide (*Leuciscus idus*) under controlled conditions. *Electron. J. Agric. Univ.*, Fisheries, 2(2).

Kujawa, R., Pol, P., Mamcarz, A., Furgała-Selezniow, G. (2011). Preliminary studies on fishing and transport of the sichel (*Pelecus cultratus* L., 1758) for reproduction under controlled conditions. *Fish management in a water environmental*. M Fish Will, Olsztyn, 201-205.

Kujawa R., Kucharczyk D. (1996). A method of in vivo designating oocytes from cyprinid and percid fish using catheter, *Komunikaty Rybackie*, 4, 20-21.

Kujawa, R., Cejko, B. I., Fopp-Bayat, D., Judycka, S., Glińska-Lewczuk, K., Timofte, C. M., Nowosad, J., Kucharczyk, D. (2019). Reproduction of endangered river lamprey (*Lampetra fluviatilis*) in controlled conditions. *Animal Reproduction Science*, 203, 75-83.

Kujawa, R., Kucharczyk, D., Mamcarz, A. (1999). A model system for keeping spawners of wild and domestic fish before artificial spawning. *Aquacultural Engineering*, 20, 85-89.

Kujawa, R., Kucharczyk, D., Mamcarz, A., Jamróz, M., Kwiatkowski, M., Targońska, K., Żarski, D. (2010). Impact of supplementing natural feed with dry diets on the growth

and survival of larval asp, *Aspius aspius* (L.), and nase, *Chondrostoma nasus* (L.). *Fisheries & Aquatic Life*, 18(1), 13-23.

Kujawa, R., Kucharczyk, D., Mamcarz, A., Żarski, D., Targońska, K. (2011). Artificial spawning of common tench *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758), obtained from wild and domestic stocks. *Aquaculture International*, 19, 513-521.

Kujawa, R., Furgała-Selezniow, G., Mamcarz, A., Lach, M., Kucharczyk, D. (2015). Influence of temperature on the growth and survivability of sichel larvae *Pelecus cultratus* reared under controlled conditions. *Ichthyological Research*, 62, 163-170.

Kujawa, R., Lach, M., Pol, P., Ptaszkowski, M., Mamcarz, A., Nowosad, J., Furgała-Selezniow G., Kucharczyk, D. (2017). Influence of water salinity on the survival of embryos and growth of the sichel larvae *Pelecus cultratus* (L.) under controlled conditions. *Aquaculture Research*, 48(3), 1302-1314.

Kujawa, R., Mamcarz, A., Kucharczyk, D. (1998). Biotechnology of reproduction and breeding of asp (*Aspius aspius* L.). *Czech Journal of Animal Sciences*, 43, 396-396.

Kujawa, R., Mamcarz, A., Kucharczyk, D. (1997). Effect of temperature on embryonic development of asp (*Aspius aspius* L.). *Polish Archives of Hydrobiology*, 44, 139-143.

Kujawa, R., Mamcarz, A., Kucharczyk, D., Skrzypczak, A. (2000). An experimental unit for rearing of larval freshwater fish. Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis, *Piscaria*, 205, 103-108.

Kujawa, R. (2004). Biologiczne podstawy podchowu larw reofilnych ryb karpiowatych w warunkach kontrolowanych. *Rozprawy i Monografie. Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie*, (88), 1-88.

Kujawa, R., Piech, P. (2022). Influence of Water Salinity on the Growth and Survivability of Asp Larvae *Leuciscus aspius* (Linnaeus, 1758) under Controlled Conditions. Animals, 12(17), 2299.

Kujawa, R., Piech, P. (2021). Rearing of Bitterling (*Rhodeus amarus*) Larvae and Fry under Controlled Conditions for the Restitution of Endangered Populations. *Animals*, 11(12), 3534.

Kulikovsky, Z., Marttin, F. J. B., Yaron, Z. (1996). A comparison of two spawning-inducing agents for common carp. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 48(2), 108-111.

Kültz, D. (2015). Physiological mechanisms used by fish to cope with salinity stress. *The Journal of Experimental Biology*, 218(12), 1907-1914.

Kupren, K., Mamcarz, A., Kucharczyk, D. (2010). Effects of temperature on survival, deformations rate and selected parameters of newly hatched larvae of three rheophilic cyprinids (genus *Leuciscus*). *Polish Journal of Natural Sciences*, 25, 299-312.

Kupren, K., Żarski, D., Krejszeff, S., Kucharczyk, D. Targońska, K. (2011). Effect of stocking density on growth, survival and development of asp *Aspius aspius* (L.), ide *Leuciscus idus* (L.) and chub *Leuciscus cephalus* (L.) larvae during initial rearing under laboratory conditions. *Italian Journal of Animal Science*, 10, e34.

Kupren, K., Nowosad, J., Żarski, D., Targońska, K., Hakuć-Błażowska, A., Kucharczyk, D. (2015). Early development and allometric growth in laboratory-reared European chub *Leuciscus cephalus* (Linnaeus, 1758). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15(3), 385-392.

Kültz, D. (2015). Physiological mechanisms used by fish to cope with salinity stress. *The Journal of Experimental Biology*, 218(12), 1907-1914.

Kwiatkowski M., Żarski D., Kucharczyk D., Kupren K., Jamróz M., Targońska K., Krejszeff S., Hakuć-Błażowska A., Kujawa R., Mamcarz A. (2008). Influence of feeding chosen rheophilic cyprinid larvae using natural and compound diet – *Arch. Pol. Fish.* 16, 383-396.

Lawson, E.O., Alake, S.A. (2011). Salinity adaptability and tolerance of hatchery reared comet goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus 1758). *Int. J. Zool. Res.*, 7, 68-76.

Lax, S., Peterson, E. W. (2009). Characterization of chloride transport in the unsaturated zone near salted road. *Environmental Geology*, 58, 1041-1049.

Lepič, P., Blecha, M., Kozák, P. (2020). Intensive winter culture of *Chondrostoma nasus* (Linnaeus, 1758) and *Vimba vimba (*Linnaeus, 1758) for spring restocking. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 20, 97-102.

Levin, B. A., Levina, M. A. (2014). Poly- and oligomerization of scales in the blue bream *Ballerus ballerus* (*Cyprinidae*) as a consequence of thyroid status regulation. *Journal of Applied Ichthyology*, 30, 809-813.

Lind, L., Schuler, M. S., Hintz, W. D., Stoler, A. B., Jones, D. K., Mattes, B. M., Relyea, R. A. (2018). Salty fertile lakes: How salinization and eutrophication alter the structure of freshwater communities. *Ecosphere*, 9(9), e02383.

Łączyńska, B., Palińska-Żarska, K., Nowosad, J., Biłas, M., Krejszeff, S., Müller, T., Kucharczyk, D., Żarski, D. (2016). Effect of age, size and digestive tract development on weaning effectiveness in crucian carp, *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758). *Journal of Applied Ichthyology*, 32, 866-872.

Malmqvist, B., Rundle, S. (2002). Threats to the running water ecosystems of the world. *Environmental Conservation*, 29, 134–153.

Mamcarz, A., Kucharczyk, D., Kujawa, R., Skrzypczak, A., Furgala-Selezniow, G. (1998). Ontogeny of feeding habits in northern pike, *Esox lucius* (Esocidae), larvae reared in illuminated cages. *Italian Journal of Zoology*, 65(S1), 251-253.

Mardaneh Khatooni, M., Mojazi Amiri, B., Mirvaghefi, A., Jafari, V., Hoseinifar, S. H. (2012). The effects of salinity on the fertilization rate and rearing of the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) larvae. *Aquaculture International*, 20(6), 1097-1105.

Matthias, B. G., Ahrens, R. N. M., Allen M. S., Tuten, T., Siders, Z. A., Wilson, K. L. (2018). Understanding the effects of density and environmental variability on the process of fish growth. *Fisheries Research,* 198, 209-219.

Mookerji, N., Ramakrishan Rao, T. (1999). Rates of yolk utilization and effects of delayed initial feeding in the larvae of the freshwater fishes rohu and singhi. *Aquaculture International*, 7(1), 45-56.

Moffett, E. R., Baker, H. K., Bonadonna, C. C., Shurin, J. B., Symons, C. C. (2023). Cascading effects of freshwater salinization on plankton communities in the Sierra Nevada. *Limnology and Oceanography Letters*, *8*(1), 30-37.

Molenda, T. (2018). Impact of a saline mine water discharge on the development of a meromictic pond, the Rontok Wielki Reservoir, Poland. *Mine Water and the Environment*, 37(4), 807-814.

Molnar, F., Şara, A., Ani, A. R. (2009). The Influence of Some Fodder Additives on the Growth Indices and Survival Rate of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) and Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella* L.) Juveniles. *Measurements*, 18, 100.

Myszkowski, L. (1997). Pitfalls of using growth rate coefficients. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, 44(3).

Nel, J.L., Roux, D.J., Maree, G., Kleynhans, C.J., Moolman, J., Reyers, B., Rouget, M., Cowling, R.M. (2007). Rivers in peril inside and outside protected areas: A systematic approach to conservation assessment of river ecosystems. *Diversity and Distributions*, 13, 341–352.

Nowosad, J., Dryl, K., Kupren, K., Kucharczyk, D. (2020). Inhibiting the influence of ovarian fluid on spermatozoa activation and spermatozoa kinetic characteristics in the common barbel *Barbus barbus*. *Theriogenology*, 158, 250-257.

Nowosad, J., Kucharczyk, D., Sikora, M., Kupren, K. (2021b). Optimization of barbel (*Barbus barbus* L.) fertilization and effects of ovarian fluid when there are controlled conditions for gamete activations. *Animal Reproduction Science*, 224, 106652.

Nowosad, J., Kucharczyk, D., Targońska, K., Wyszomirska, E., Chwaluczyk, R., Kupren, K. (2016). The Synergistic Effect of Temperature and Hormonal Stimulation on Spawning Efficiency of Common Barbel, *Barbus barbus* L. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 16, 517-524.

Nowosad, J., Kupren, K., Biegaj, M., Kucharczyk, D. (2021a). Allometric and ontogenetic larval development of common barbel during rearing under optimal conditions. *Animal*, 15, 100107.

Nowosad, J., Targońska, K., Chwaluczyk, R., Kaszubowski, R., Kucharczyk, D. (2014). Effect of temperature on the effectiveness of artificial reproduction of dace [*Cyprinidae* (*Leuciscus leuciscus* (L.))] under laboratory and field conditions. *Journal of Thermal Biology*, 45, 62-68.

Nowosad, J., Żarski, D., Biłas, M., Dryl, K., Krejszeff, S., Kucharczyk, D. (2013). Dynamics of ammonia excretion in juvenile common tench, *Tinca tinca* (L.), during intensive rearing under controlled conditions. *Aquaculture International*, 21, 629–637.

Peter, R.E., Lin, H.R., van der Kraak, G., Little, M. (1993). Releasing hormones, dopamine antagonists and induced spawning. In: Muir, J.P., Roberts, R.J. (Eds.) *Recent Advances in Aquaculture*, vol IV. Institute of Aquaculture, *Blackwell Scientific Publications*, Oxford, 25–30.

Peňáz, M., Prokeš, M., Kouřil, J., Hamáčková, J. (1989). Influence of water temperature on the early development and growth of the tench, *Tinca tinca*. *Folia Zoologica*, 38, 275-287.

Piech, P., Kujawa, R. (2021). Artificial reproduction of blue bream (*Ballerus ballerus* L.) as a conservative method under controlled conditions. *Animals,* 11(5), 1326.

Piech, P., Kujawa, R. (2022). Impact of replacing natural food with commercial feed on the growth and survival of blue bream (*Ballerus ballerus*) larvae under controlled conditions. *Fisheries & Aquatic Life*, 30(4), 192-201.

Piech, P., Kujawa, R. (2023). Effect of different water salinities on the larvae of the blue bream *Ballerus ballerus* (Linnaeus, 1758) during rearing. *Animals*, 13(7), 1245.

Piech, P., Kujawa, R., Nowosad, J., Kucharczyk, D., Targońska, K., Szmyt, M. (2023). Influence of temperature and stocking density during rearing on larval blue bream, *Ballerus ballerus* (L.). *Fisheries & Aquatic Life*, 31(1), 31-43.

Pörtner, H.O., Peck, M.A. (2010). Climate change effects on fishes and fisheries: Towards a cause-and-effect understanding. *Journal of Fish Biology*, 77, 1745–1779.

Prusińska, M., Nowosad, J., Jarmołowicz, S., Mikiewicz, M., Duda, A., Wiszniewski, G., Sikora, M., Biegaj, M., Samselska, A., Arciuch-Rutkowska, M., Targońska, K., Otrocka-Domagała, I., Kucharczyk, D. (2020). Effect of feeding barbel larvae (*Barbus barbus* (L, 1758)) *Artemia* sp. nauplii enriched with PUFAs on their growth and survival rate, blood composition, alimentary tract histological structure and body chemical composition. *Aquaculture Reports*, 18, 100492.

Rolik, H. (1985). *Abramis ballerus* (L.) i *Pelecus cultratus* (L.) (Pisces, Cyprinidae) w Polsce. *Fragmenta Faunistica*, 29(9), 121-135.

Rikardsen, A. H., Woodgate, M., Thompson, D. A. (2002). A comparison of floy and soft vialpha tags on hatchery arctic charr, with emphasis on tag retention, growth and survival. *Environmental Biology of Fishes*, Volume 64, Issue 1-3, 269-273.

Santos, E. L. R., Rezende, F. P., Moron, S. E. (2020). Stress-related physiological and histological responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to transportation in water with tea tree and clove essential oil anesthetics. *Aquaculture*, 523, 735164.

Șara, A., Barbu, A., Molnar, F., Alina, A. (2010). The effects of some fodder additives on the growth and consumption indices of brook trout (*Salvelinus fontinalis* M.). *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologie*s, 67(1/2), 321-325.

Sauer, F.G., Bundschuh, M., Zubrod, J.P., Schäfer, R.B., Thompson, K., Kefford, B.J. (2016). Effects of salinity on leaf breakdown: Dryland salinity versus salinity from a coalmine. *Aquatic Toxicology*, 177, 425–432.

Scheibener, S. A. (2017). Osmoregulatory Physiology in Aquatic Insects: Implications for Major Ion Toxicity in a Saltier World.

Shiri Harzevili, A., De Charleroy, D., Auwerx, J., Vught, I., Van Slycken, J. (2003). Larval rearing of chub, *Leuciscus cephalus* (L.), using decapsulated Artemia as direct food. *Journal of Applied Ichthyology*, 19(2), 123-125.

Schulz, C. J., Cañedo-Argüelles, M. (2019). Lost in translation: the German literature on freshwater salinization. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374(1764), 20180007.

Skovrind M, Olsen M.T., Vieira F.G., Pacheco G., Carl H., Gilbert M.T.P, Møller P.R.R. (2016). Genomic population structure of freshwater-resident and anadromous ide (*Leuciscus idus*) in north-western Europe. *Ecology and Evolution*, 6(4): 1064–1074.

Skrzypczak, A., Mamcarz, A., Kujawa, R., Kucharczyk, D., Furgala-Selezniow, G. (1998). Feeding habits of larval Eurasian perch, *Perca fluviatilis* (Percidae). *Italian Journal of Zoology*, 65(S1), 243-245.

Slyn'ko, E.E., Slyn'ko Yu, V. The viability of the first generation roach (*Rutilus rutilus* L.), bream (*Abramis brama* L.), and blue bream (*Abramis ballerus* L.) hybrids at early stages of development. *Inland Water Biol.* 2010, 3, 155–159.

Śliwiński, J., Ostaszewska, T., Kamaszewska, M. (2016). Akwakultura jako narzędzie poprawy statusu karpiowatych ryb reofilnych w Polsce - stan i perspektywy badań. *Przegląd Naukowy Inżynieria i Kształtowanie Środowiska*, 25, 239-248.

Sokal, R. R., Rohl, F. J. (1981). Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research, ed. 2. San Francisco. W. H. Freeman, 733.

Sorgeloos, P., Bossuyt, E., Lavina, E., Baeza-Mesa, M., Persoone, G. (1977). Decapsulation of Artemia cysts: A simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture. *Aquaculture*, 12, 311–315.

Stanny L.A. (1984). Principles of rearing cyprinid fish under controlled conditions. *Gosp. Ryb.* 3: 3-6 (in Polish).

Sverinciuc, C., Bențea, M. I., Șara, A. (2017). The effects of some fodder additives on growth performance of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Agricultura-Revistă de Știință și Practică Agricolă,* (1/2), 105-109.

Swanson, C. (1998). Interactive effects of salinity on metabolic rate, activity, growth and osmoregulation in the euryhaline milkfish (*Chanos chanos*). *Journal of Experimental Biology*, 201, 3355–3366.

Szkudlarek, M., Zakęś, Z. (2007). Effect of stocking density on survival and growth performance of pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), larvae under controlled conditions. *Aquaculture International*, 15, 67-81.

Szmyt, M., Piech, P., Panasiewicz, G., Niewiadomski, P., Pietrzak-Fiećko, R. (2021). Gonadal steroid fluctuations and reproduction results of European grayling (*Thymallus thymallus* L.) from broodstock farmed in a recirculation aquaculture system. *Animal Reproduction Science*, 224, 106648.

Schulz, C. J., Cañedo-Argüelles, M. (2019). Lost in translation: the German literature on freshwater salinization. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374(1764), 20180007.

Tadajewska M. (2000). Rozpiór *Abramis ballerus*. W: Ryby słodkowodne Polski (Red.) M. Brylińska. *Wydawnictwo Naukowe PWN*, Warszawa, 257-261.

Targońska, K., Kucharczyk, D., Kujawa, R., Mamcarz, A., Żarski, D. (2010). Controlled reproduction of asp, *Aspius aspius* (L.) using luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) analogues with dopamine inhibitors. *Aquaculture*, 306, 407-410.

Targońska, K., Kucharczyk, D., Żarski, D., Cejko, B., Krejszeff, S., Kupren, K., Król, R., Dryl, K., Kowalski, K., Glogowski, J. (2011b). Artificial reproduction of wild and cultured barbel (*Barbus barbus*, *Cyprinidae*) under controlled conditions. *Acta Veterinaria Hungarica*, 59, 363-372.

Targońska, K., Kupren, K., Kujawa, R., Mamcarz, A., Kaczkowski, Z., Glogowski, J., Kowalski, R.K., Żarski, D., Wyszomirska, E., Kucharczyk, D. (2015). Artificial reproduction of different dace, *Leuciscus leuciscus* (L.) populations as a method for biodiversity preservation. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15, 477-485.

Targońska, K., Kupren, K., Żarski, D., Król, R., Kucharczyk, D. (2011a). Influence of thermal conditions on successful ide (*Leuciscus idus* L.) artificial reproduction during spawning season. *Italian Journal of Animal Science*, 10(4), e50.

Targońska, K., Żarski, D., Krejszeff S., Kucharczyk, D. (2012). Influence of age of wild ide *Leuciscus idus* (L.) female on spawning effectiveness under controlled conditions. *Italian Journal of Animal Science*, 11, 342-346.

Thalathiah, S., Fauzi, O.A., Ibrahim, T. (1988). First Successful Attempt to Induce Breed Mystus Nemurus (C & V) at Batu Berendam Melaka. *Malays. Soc. Anim. Prod.*, 11, 53-55.

Van Dam, R. A., Harford, A. J., Lunn, S. A., Gagnon, M. M. (2014). Identifying the cause of toxicity of a saline mine water. *PLoS One,* 9(9), e106857.

Varsamos, S., Nebel, C., Charmantier, G. (2005). Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: A review. Comparative Biochemistry and Physiology. *Part A, Molecular & Integrative Physiology,* 141, 401–429.

Vörösmarty, C.J., McIntyre, P.B., Gessner, M.O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S.E., Sullivan, C.A., Reidy Liermann, C., Davies, P.M. (2010). Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature,* 467, 555–561.

Wang, J. Q., Lui, H., Po, H., Fan, L. (1997). Influence of salinity on food consumption, growth and energy conversion efficiency of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Aquaculture,* 148, 115–124.

Wiggins T.A., Bender Jr T.R., Mudrak V.A., Coll J.A., Whittington J.A. (1986). Effect of initial feeding rates of *Artemia* nauplii and dry diet supplements on the growth and survival of American shad larvae – Progr. *Fish-Cult.* 48, 290-293.

Wolnicki, J. (1996). Intensive rearing of larval and juvenile vimba, *Vimba vimba* [L.], fed natural and formulated diets. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, 43(4).

Wolnicki, J., Górny, W. (1995a). Controlled rearing of ide (*Leuciscus idus* L.) larvae using live food and dry feed. *Aquaculture*, 129(1-4), 255-256.

Wolnicki, J., Górny, W. (1995b). Suitability of two commercial dry diets for intensive rearing of larval tench (*Tinca tinca* L.) under controlled conditions. *Aquaculture*, 129(1-4), 256-258.

Wolnicki, J., Górny, W. (1995c). Survival and growth of larval and juvenile barbel (*Barbus barbus* L.) reared under controlled conditions. *Aquaculture*, 129(1-4), 258-259.

Wolnicki, J., Korwin-Kossakowski, M. (1993). Survival and growth of larval and juvenile tench, Tinca tinca L., fed different diets under controlled conditions. Aquaculture Research, 24(6), 707-713.

Yaron, Z. (1995). Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*, 129, 49–73.

Zakęś, Z., Wunderlich, K., Szczepkowski, M., Szczepkowska, B. (2016). Jakość hodowlana materiału zarybieniowego siei jeziorowej produkowanego w obiektach akwakultury dysponujących technologią systemów recyrkulacyjnych. *Działalność gospodarstw rybackich w 2016 roku – uwarunkowania ekonomiczne, prawne i ekologiczne*, 155.

Żarski, D., Sasinowski, W., Kucharczyk, D., Kwiatkowski, M., Krejszeff, S., Targońska, K. (2009). Mass initial rearing of burbot *Lota lota* (L.) larvae under controlled conditions. *Polish Journal of Natural Sciences*, 24, 76-84.

Żarski, D., Kupren, K., Targońska, K., Krejszeff, S., Furgała-Selezniow, G., Kucharczyk, D. (2011). The effect of initial larval stocking density on growth and survival in common barbel *Barbus barbus* (L.). *Journal of Applied Ichthyology*, 27, 1155-1158.

Ziemann, H. (1973). Untersuchungen über den Einfluß verdünnter Kaliendlaugen auf den Abbau organischer Substanzen im Wasser. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 1(3), 257-265.

Akty prawne

Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 12 listopada 2001 r. w sprawie połowu ryb oraz warunków chowu, hodowli i połowu innych organizmów żyjących w wodzie. Dz. U. 2001 nr 138 poz. 1559.

Ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych. Dz. U. 2015 poz. 266

STRESZCZENIE

Biotechnika rozrodu rozpióra (*Ballerus ballerus* L.) oraz wpływ wybranych czynników biotycznych i abiotycznych na wzrost oraz przeżywalność larw w warunkach kontrolowanych

mgr inż. Przemysław Piech

Akwakultura jest rodzajem działalności gospodarczej, która z roku na rok notuje dynamiczny wzrost produkcji. Jej główną rolą jest produkcja wysokiej jakości żywności. Oprócz tego wspiera ona czynną i bierną ochronę gatunków jak i całych populacji. W związku z powyższym opracowywane, a także rozwijane są technologie produkcji materiału zarybieniowego w celu utrzymania liczebności gatunkowej wód otwartych, która ulega stałemu spadkowi. Gatunki ryb, które mimo iż nie mają znaczenia gospodarczego, stanowią cenny składnik ekosystemów wodnych i wpływają na ich bioróżnorodność. Przykładem mogą być reofilne ryby karpiowate, które nie mają znaczenia gospodarczego, lub/ani wysokiego statusu ochronnego, ale posiadają funkcję regulacyjną w wodach słodkich np. boleń *Leuciscus aspius*. Do innych gatunków występujących już tylko na ograniczonym obszarze można zaliczyć rozpióra *Ballerus ballerus*. Jest on jednym z dwóch (obok sapy *Ballerus sapa*) gatunków ryb z rodzaju *Ballerus* występujących w Polsce. Opracowanie metody rozrodu, a następnie podchowu larw rozpióra w warunkach kontrolowanych stało się głównym celem rozprawy doktorskiej.

Dla osiągnięcia postawionego celu rozprawy doktorskiej podjęto zadania badawcze opublikowane w czterech autorskich artykułach naukowych. W **artykule 1** (Piech i Kujawa 2021) skupiono się na opracowaniu techniki rozrodu rozpióra w warunkach kontrolowanych. W oparciu o przeprowadzone badania opisano wpływ różnych środków hormonalnych i efekty rozrodu w warunkach kontrolowanych. Zaobserwowano zadawalającą odporność tarlaków rozpióra na manipulacje związane z rozrodem w warunkach kontrolowanych. Najlepszym stymulatorem owulacji rozpióra w warunkach kontrolowanych okazał się Ovopel. Po zastosowaniu Ovopelu również przeżywalność samic do momentu pozyskania produktów płciowych była najwyższa. Najmniejszą przeżywalność samic zaobserwowano po zastosowaniu CPH. Wysoki procent zapłodnienia oraz przeżywalność larw uzyskano w grupach samic stymulowanych Ovopelem lub CPH.

Materiał pochodzący z kontrolowanego rozrodu (larwy) posłużył do kolejnych badań i postawienia kolejnych celów szczegółowych.

W **artykule 2** (Piech i in. 2023a) analizowano wpływ temperatury oraz zagęszczenia obsady podczas podchowu na wzrost i przeżywalność larw. W trakcie 21-dniowego podchowu oceniono parametry hodowlane uzyskane podczas różnych wariantów podchowowych. Wytypowane zostały optymalne temperatury i zagęszczenia obsady, które cechowały najwyższe współczynniki wzrostu oraz przeżywalność larw. Przeprowadzone badania potwierdziły wysoką tolerancję larw rozpióra na wysoką temperaturę - optymalną dla ryb reofilnych oraz duże zagęszczenie obsady. Najlepsze wyniki podchowu i najniższą śmiertelność larw rozpióra uzyskano przy najniższym zagęszczeniu obsady wynoszącym 20 osobn.·dm^{-3}. Jeśli chodzi o wpływ temperatury, podchów larw w najwyższej testowanej temperaturze (30°C) jest najlepszą opcją, z najwyższymi wskaźnikami przeżywalności i wzrostu. W przypadku masowej produkcji materiału zarybieniowego rozpióra zaleca się stosowanie temperatury 25°C i zagęszczenia obsad na poziomie 40-80 osobn.·dm^{-3}, w celu uzyskania optymalnych wyników hodowli, zarówno pod względem biologicznym, jak i pod względem stosunkowo niższych kosztów związanych z podgrzewaniem wody w obiegach hodowlanych.

W **artykule 3** (Piech i Kujawa 2022) skupiono się na jednej z ważniejszych kwestii podczas intensywnego podchowu, czyli ustaleniu optymalnego momentu zastąpienia pokarmu żywego, którym był solowiec *Artemia* sp.(A) pokarmem komercyjnym (paszą-P). Wykazano, że podchów larw rozpióra w kontrolowanych warunkach wymaga zapewnienia im dostępu do żywego pokarmu w początkowym okresie podchowu. Najwyższe tempo wzrostu larw rozpióra z badanych wariantów odnotowano w grupie A12P9 (pokarm naturalny przez 12 dni, a następnie pasza przez 9 dni). Zbyt wczesne zastąpienie żywego pokarmu paszą komercyjną obniża parametry wzrostu i zwiększa śmiertelność larw. Przyswajanie przez larwy ryb składników zawartych w paszy komercyjnej może odbywać się tylko przy pomocy egzogennych enzymów zawartych w zooplanktonie, gdyż ich układ pokarmowy jest jeszcze w trakcie rozwoju i brak jest odpowiednich enzymów. Ustalenie minimalnego okresu karmienia pokarmem naturalnym bez większego spadku wskaźników wzrostowych przyczyni się do ograniczenia kosztów podchowu materiału zarybieniowego rozpióra w warunkach kontrolowanych.

W **artykule 4** (Piech i Kujawa 2023b) zbadano jaki wpływ na wzrost i przeżywalność larw rozpióra ma zasolenie wody. Na podstawie danych literatury i wcześniejszych badań wytypowano warianty podchowowe o ściśle określonych poziomach zasolenia wody. W powyższym doświadczeniu najlepsze parametry wzrostu uzyskano podchowując larwy rozpióra w wodzie o zasoleniu 3 ppt. Wyższe poziomy zasolenia były również akceptowane przez larwy, o czym świadczą wyliczone parametry podchowu. Wskaźniki przeżywalności larw rozpióra we wszystkich testowanych poziomach zasolenia były bardzo wysokie i wynosiły od 83,2% do 97,0%. Tolerancja larw rozpióra na wodę o zasoleniu 3-7 ppt sugeruje, że są one w stanie przetrwać i rozwijać się w wodach naturalnych zanieczyszczonych solankami pochodzącymi ze zrzutu wód pokopalnianych.

Powyższe wyniki stanowią uzupełnienie branżowej literatury dotyczącej rozpióra. Mogą mieć wpływ na optymalizację procesu hodowlanego, tym samym obniżenie kosztów podchowu tego gatunku.

Słowa kluczowe: rozpiór, larwy, przeżywalność, współczynnik wzrostu, stymulacja hormonalna, warunki kontrolowane

SUMMARY

Reproductive biotechnique of the blue bream (*Ballerus ballerus* L.) and the influence of selected biotic and abiotic factors on larval growth and survival under controlled conditions

Msc. Eng. Przemysław Piech

Aquaculture is a type of economic activity that has seen rapid growth in production year after year. Its main role is to produce high-quality food. In addition, it supports the active and passive protection of species as well as entire populations. Accordingly, technologies for the production of stocking material are being developed, as well as developed, to maintain the species abundance of open waters, which is in steady decline. Fish species, which, although not economically important, are a valuable component of aquatic ecosystems and affect their biodiversity. Examples include rheophilic cyprinid fish, which do not have economic importance and/or high conservation status, but have a regulatory function in freshwater, such as the asp *Leuciscus aspius*. Other species that are already present only in a limited area include the blue bream *Ballerus ballerus*. It is one of two (along with white-eye bream *Ballerus sapa*) species of fish of the genus *Ballerus* found in Poland. The development of a method of reproduction and subsequent rearing of blue bream larvae under controlled conditions became the main objective of the dissertation.

To achieve the set goal of the dissertation, research tasks published in four original scientific articles were undertaken. **In Article 1** (Piech and Kujawa 2021), the focus was on the development of the breeding technique of the blue bream under controlled conditions. Based on the research conducted, the effect of various hormonal agents and the effects of reproduction under controlled conditions were described. Satisfactory resistance of blue bream spawners to reproductive manipulations under controlled conditions was observed. Ovopel proved to be the best stimulator of blue bream ovulation under controlled conditions. After the application of Ovopel, the survival rate of females to the acquisition of sexual products was also the highest. The lowest survival rate of females was observed after the application of CPH. High fertilization percentages and larval survival rates were obtained in groups of females stimulated with Ovopel or CPH. Material from controlled reproduction (larvae) was used to further study and set further specific goals.

Article 2 (Piech et al. 2023a) analyzed the effects of temperature and stocking density during rearing on larval growth and survival. During 21-day rearing, the breeding parameters obtained during different rearing variants were evaluated. Optimal temperatures and stocking densities were selected, which were characterized by the highest growth rates and larval survival. The study confirmed the high tolerance of blue bream larvae to high temperatures - the optimal temperature for rheophilic fish and high stocking density. The best rearing results and the lowest mortality of blue bream larvae were obtained at the lowest stocking density of 20 indiv.·dm^{-3}. As for the effect of temperature, rearing larvae at the highest temperature tested (30°C) is the best option, with the highest survival rates and growth rates. For mass production of blue bream stocking material, it is recommended to use a temperature of 25°C and a stocking density of 40-80 individuals·dm^{-3}, to obtain optimal rearing results, both biologically and in terms of relatively lower costs associated with heating water in rearing circuits.

Article 3 (Piech and Kujawa 2022) focused on one of the most important issues during intensive rearing, i.e. determining the optimal moment to replace live food, which was the brine shrimp *Artemia* sp.(A), with commercial food (feed-P). It has been shown that rearing blue bream larvae under controlled conditions requires providing them with access to live food during the initial rearing period. The highest growth rate of the blue bream larvae of the tested variants was recorded in the A12P9 group (natural food for 12 days, followed by feed for 9 days). Replacing live food too early with commercial feed decreases growth parameters and increases larval mortality. The assimilation by fish larvae of the ingredients contained in commercial feed can only take place with the help of exogenous enzymes contained in zooplankton since their digestive system is still in the process of development and lacks the appropriate enzymes. Setting a minimum feeding period with natural food without a major decrease in growth rates will help reduce the cost of rearing blue bream stocking material under controlled conditions.

Article 4 (Piech and Kujawa 2023b) investigated how water salinity affects the growth and survival of blue bream larvae. Based on literature data and previous studies, rearing variants with strictly defined water salinity levels were selected. The above experiment obtained the best growth parameters by rearing the blue bream larvae in water with a salinity of 3 ppt. The larvae also accepted higher salinity levels, as evidenced by the calculated rearing parameters. Survival rates of blue bream larvae at all salinity levels tested were very high, ranging from 83.2% to 97.0%. The tolerance of the blue bream larvae to

water with a salinity of 3-7 ppt suggests that they can survive and thrive in natural waters contaminated with brine from post-mining water discharges.

The above results add to the industry literature on blue bream. They may have implications for optimizing the breeding process, thereby reducing the cost of rearing this species.

Keywords: blue bream, larvae, survival rate, growth rate, hormonal stimulation, controlled conditions

SPIS TABEL

Tabela 1. Charakterystyka tarlaków rozpióra użytych w doświadczeniu *Ballerus ballerus* (L.)……15

Tabela 2. Środki hormonalne i ich dawki użyte w kontrolowanym rozrodzie samic rozpióra *Ballerus ballerus* (L.)……15

Tabela 3. Wpływ różnych środków hormonalnych na owulację samicy rozpióra *Ballerus ballerus* (L.) podczas kontrolowanego rozrodu……23

Tabela 4. Wpływ różnych środków hormonalnych na ilość i jakość jaj podczas sztucznego rozrodu rozpióra *Ballerus ballerus* (L.). Dane w wierszu z tą samą literą nadrzędną nie różnią się statystycznie (p>0,05)……..24

Tabela 5. Wyniki podchowu larw rozpióra *Ballerus ballerus* (L.) w temperaturach wody 15, 20, 25 i 30°C ± 0,2°C. Wartość średnia ± SD. Wyniki w wierszach z tym samym indeksem literowym nie różnią się istotnie statystycznie (α = 0,05)……29

Tabela 6. Wyniki podchowu larw rozpióra *Ballerus ballerus* (L.) przy zagęszczeniu 20, 40, 80 i 120 osobn. dm^{-3}. Wartość średnia ± SD. Wyniki w wierszach z tym samym indeksem literowym nie różnią się statystycznie istotnie (α = 0,05)……30

Tabela 7. Wyniki podchowu larw rozpióra *Ballerus ballerus* (L.) karmionych *Artemią* i przeniesionych na komercyjną paszę Perla po 4, 8 lub 12 dniach. Wartość średnia ± SD. Wyniki w wierszach z tym samym indeksem literowym nie różnią się statystycznie istotnie (α = 0,05)……..32

Tabela 8. Wyniki podchowu larw rozpióra *Ballerus ballerus* (L.) w wodzie słodkiej i wodzie o zasoleniu 3, 5, 7 ppt. Wartość średnia ± SD. Wyniki w wierszach z tym samym indeksem literowym nie różnią się statystycznie istotnie (α = 0,05)……34

SPIS RYSUNKÓW I ZDJĘĆ

- **Rysunki**

Rysunek 1. Schemat przedstawiający etapy badań wykonanych w ramach rozprawy doktorskiej……....13

Rysunek 2. Schemat poglądowy jednego z czterech przygotowanych układów doświadczalnych wykorzystanych w eksperymencie: 1 - odpieniacz białek, 2 - dyfuzor rurowy, 3 - bactoballs, 4 - pompa, 5 - fluorescencyjne lampy, 6 - akwarium z rybami, 7 - kamień napowietrzający, 8 - akwarium ze złożem filtracyjnym……20

- **Zdjęcia**

Fot. 1. Rozpiór, siniec - *Ballerus ballerus* (Linneusz, 1758)……...9

Fot. 2. Larwy rozpióra rozpoczynające żerowanie……...17

Fot. 3. Zdjęcie ikry ukazujące blastulę wielkokomórkową……..24

Fot. 4. Zdjęcie ikry ukazujące moment obrastania (2/3 epibolii)…….25

Fot. 5. Zarodki na etapie organogenezy……25

Fot. 6. Zarodki z pigmentem w oczach (zaoczkowanie)……..26

Fot. 7. Zarodek w momencie opuszczania osłonki jajowej……..26

Fot. 8. Larwy w trakcie resorpcji zapasów woreczka żółtkowego……27

Fot. 9. Larwy tuż przed napełnieniem pęcherza pławnego powietrzem……27

ZAŁĄCZNIKI

- ✓ **Praca nr 1:** Piech, P., Kujawa, R. (2021). Artificial reproduction of blue bream (*Ballerus ballerus* L.) as a conservative method under controlled conditions. *Animals*, 11(5), 1326. https://doi.org/10.3390/ani11051326
- ✓ **Praca nr 2:** Piech, P., Kujawa, R., Nowosad, J., Kucharczyk, D., Targońska, K., Szmyt, M. (2023). Influence of temperature and stocking density during rearing on larval blue bream, *Ballerus ballerus* (L.). *Fisheries & Aquatic Life, 31, 31-43.* https://doi.org/ 10.2478/aopf-2023-0004
- ✓ **Praca nr 3:** Piech, P., Kujawa, R. (2022). Impact of replacing natural food with commercial feed on the growth and survival of blue bream larvae (*Ballerus ballerus*) under controlled conditions. *Fisheries & Aquatic Life*, *30*(4), 192-201. https://doi.org/10.2478/aopf-2022-0018
- ✓ **Praca nr 4:** Piech, P., Kujawa, R. (2023). Effect of different water salinities on the larvae of the blue bream *Ballerus ballerus* (Linnaeus, 1758) during rearing. *Animals*, 13(7), 1245. https://doi.org/10.3390/ani13071245
- ✓ **Oświadczenie współautorów**

Oświadczenie współautorów publikacji

Piech, P., Kujawa, R., Nowosad, J., Kucharczyk, D., Targońska, K., Szmyt, M. (2023). Influence of temperature and stocking density during rearing on larval blue bream, *Ballerus ballerus* (L.). *Fisheries & Aquatic Life, 31, 31-43.* https://doi.org/ 10.2478/aopf-2023-0004

Niniejszym oświadczamy, że indywidualny wkład w powstanie ww publikacji jest następujący:

autor	wkład %	opis*	podpis
Przemysław Piech	40 %	ABCDEFG	
Roman Jacek Kujawa	20 %	ABCDEFG	
Joanna Nowosad	10 %	BDE	
Dariusz Kucharczyk	10 %	DE	
Katarzyna Targońska	10 %	DE	
Mariusz Szmyt	10 %	DE	

* **A** – przygotowanie projektu badania, **B** – przeprowadzanie badań, **C** – analiza statystyczna, **D** – interpretacja wyników, **E** – przygotowanie publikacji, **F** – opracowanie piśmiennictwa, **G** – pozyskanie funduszy

animals

MDPI

Article

Artificial Reproduction of Blue Bream (*Ballerus ballerus* L.) as a Conservative Method under Controlled Conditions

Przemysław Piech * and Roman Kujawa

Department of Ichthyology and Aquaculture, Faculty of Animal Bioengineering, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, PL 10-719 Olsztyn, Poland; reofish@uwm.edu.pl
* Correspondence: przemyslaw.piech@uwm.edu.pl

Simple Summary: Quite severe biological imbalances have been caused by the often ill-conceived and destructive actions of humans. The natural environment, with its flora and fauna, has been subjected to a strong, direct or indirect, anthropogenic impact. In consequence, the total population of wild animals has been considerably reduced, despite efforts to compensate for these errors and expand the scope of animal legal protection to include endangered species. Many animal populations on the verge of extinction have been saved. These actions are ongoing and embrace endangered species as well as those which may be threatened with extinction in the near future as a result of climate change. The changes affect economically valuable species and those of low value, whose populations are still relatively strong and stable. Pre-emptive protective actions and developing methods for the reproduction and rearing of rare species may ensure their survival when the ecological balance is upset. The blue bream is one such species which should be protected while there is still time.

Abstract: The blue bream *Ballerus ballerus* (L.) is one of two species of the *Ballerus* genus occurring in Europe. The biotechnology for its reproduction under controlled conditions needs to be developed to conserve its local populations. Therefore, a range of experiments were performed to obtain valuable gametes from blue bream following hormonal stimulation with carp pituitary homogenate (CPH), Ovopel and Ovaprim. CPH and Ovopel were injected twice and Ovaprim—once, under a pectoral fin. The spawners were inspected 12 h after the last injection, and the gametes were collected. Eggs were collected from spawning females and fertilized with sperm from three males. The smallest number of ovulating blue bream (four females) was obtained from individuals stimulated with Ovaprim. There were six to nine ovulating females in the other groups, accounting for 60–90% of the females in the respective groups. The latency period was the shortest in the spawners stimulated with Ovopel. The fish in this group ovulated 14 h after the hormonal injection. Spawning was synchronized and all females spawned simultaneously. The highest average weight of eggs per fish (75.4 g) was obtained from the females stimulated with Ovopel, whereas the individuals stimulated with Ovaprim provided the smallest average amount of eggs (49.5 g). The study showed that blue bream spawners are not very sensitive to reproduction-related handling under controlled conditions.

Keywords: rheophilic fish; controlled conditions; artificial reproduction; hormonal stimulation

check for updates

Citation: Piech, P.; Kujawa, R. Artificial Reproduction of Blue Bream (*Ballerus ballerus* L.) as a Conservative Method under Controlled Conditions. *Animals* **2021**, *11*, 1326. https://doi.org/10.3390/ani11051326

Academic Editor: Guiomar E. Rotllant

Received: 2 April 2021
Accepted: 3 May 2021
Published: 6 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

There are many fish species of high or low economic value inhabiting inland waters in Poland. Fish of both types are often caught together. Although the economic importance of some fish is low, they are an essential component of the ichthyofauna, affecting the aquatic environment biodiversity. One such species is the blue bream *Ballerus ballerus* (L.)—one of two representatives of the genus *Ballerus* occurring in Europe [1]. It is a phytophilous rheophilic cyprinid fish, inhabiting large, slow lowland rivers, flow-through swamps and eutrophic lakes with lush vegetation. The blue bream mainly inhabits the pelagic zone in

lakes and the benthopelagic zone in rivers [2]. It is often found in salty and brackish waters in river estuaries of the North and Baltic Seas, and of the European parts of the Black Sea, the Sea of Azov and the Caspian Sea river basins [3].

The fish reach sexual maturity at the age of 3–5 years [4]. Mature females are at least 24.1 cm long and mature males are 20.6 cm in length [5,6]. This fish produces eggs once a season, usually between early April and early May, in water above 12 °C [6,7]. The spawning period can shift to late May if the water does not become warm enough due to low spring air temperatures [5]. The blue bream's annual reproductive cycle description is based on gonad morphology, GSI fluctuations [5] and the gonad histology in fish of both sexes in the annual development cycle [8,9].

This species' reproduction under controlled conditions has not yet been conducted. The issue is very important given the fact that the procedure would help to maintain or restore its population should such a need arise in the future. Unlike other cyprinids, the blue bream is sensitive to thermal water pollution. The forecast water temperature increase due to climate change could have a considerable impact on the species' range in the wild [10]. The water temperature has a great impact on the seasonal spawning effectiveness and, consequently, on the condition of ichthyofauna in inland waters [11]. Climate change and extreme weather conditions may upset natural fish reproduction [12]. Disruption of natural reproductive functions may, in extreme situations, lead to the total disappearance of individual fish species populations. Developing methods for reproduction under controlled conditions for fish species of low economic value and larvae rearing in recirculation aquaculture systems may considerably boost these species' stocking material production. Production intensification in Recirculating Aquaculture Systems (RAS) provides a great opportunity for the development of conservative aquaculture. The research conducted thus far has facilitated the implementation of the developed technologies in fishing practice. This has increased stocking with such biologically valuable species as the asp *Leuciscus aspius*, the ide *Leuciscus idus*, the common rudd *Scardinius erythrophthalmus*, the dace *Leuciscus leuciscus*, the common bream *Abramis brama* and the burbot *Lota lota* [12–20]. Maintaining the population sizes of low-economic value fish at an appropriate level ensures sufficient feed for such fish as the pike *Esox lucius* and the European catfish *Silurus glanis*. Stocking with fish species of low economic value also increases the biodiversity in water bodies and watercourses.

Fish reproduction under controlled conditions is a common method for supporting fish populations. There are many methods for aiding fish reproduction. Oogenesis and spermatogenesis are induced with chemical preparations. Without hormonal stimulation, it is impossible to obtain mature oocytes from female fish of most cyprinid species under controlled conditions [17,21,22]. Hormonal agent application to male fish increases the amount of sperm obtained from them and improves its quality [23]. Hormonal stimulation combined with a proper thermal regime is the most effective method. Maintaining the appropriate temperature together with hormone application is a guarantee of obtaining valuable gametes [24]. The thermal requirements are adjusted on a species-specific basis. Maintaining the assumed temperature-related regime has a huge impact on the development of maturing oocytes and successful spawning. Even small temperature fluctuations often lead to gonad resorption [11]. The method for fish reproduction under the controlled conditions described above is usually applied together with an appropriate photoperiod [25–29].

The professional literature provides descriptions of many hormonal agents with a beneficial impact on fish reproduction. The effectiveness of these agents varies. The most common agents administered to fish include carp pituitary homogenate (CPH), human chorionic gonadotropin (hCG), Ovopel containing a mammalian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogue and metoclopramide as a dopamine receptor antagonist and Ovaprim containing an analogue of salmon GnRH and domperidone as a dopamine receptor antagonist [12,17,30,31]. Most hormonal agents require proper preparation—they must be dissolved or homogenized in a 0.9% NaCl solution [32–34]. Among the

hormonal agents mentioned above, only Ovaprim is immediately ready for use. The other reproduction stimulators must be homogenized and dissolved in physiological saline. The injections are given intraperitoneally or intramuscularly [27].

In this study, blue bream reproduction under controlled conditions was performed following stimulation with the three preparations most commonly used in cyprinid fish. The study aimed to develop a procedure for blue bream reproduction under controlled conditions.

2. Materials and Methods

The blue bream reproductive study was conducted at the Centre for Aquaculture and Ecological Engineering in the Department of Ichthyology and Aquaculture of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn (Poland). The species' spawners were caught in Lake Dąbie in mid-May, i.e., during the natural spawning period. The fish were caught with fish traps and gillnets. They were carefully removed from the nets and put into containers with intensively aerated water [35].

The fish are very fidgety when being removed from the nets, which makes them susceptible to scale loss. This facilitates bacterial and fungal invasions, which can kill the fish within a short time. Therefore, all the fish handling was performed very gently. On the coast, the fish were put into transport bags with water and supplied with oxygen. The transport between the fish loading and release into the tanks lasted eight hours. Afterwards, the spawners were separated according to sex and put into two separate tanks working in one RAS system [36]. During fish collection in the wild, the water temperature was 14.0–14.5 °C.

It was easy to distinguish between the blue bream spawner sexes. The females' scales during the spawning period are smooth or slightly rough. The abdominal section is swollen with a distinctly protruding papilla. The males' snout, head and pectoral fins are yellowish and the bottom of their body is dark. There is a yellowish area of rough scales (easily felt with fingertips) between the anal fin and the caudal fin. Sexual dimorphism is poorly marked outside the reproductive period. The females' readiness for reproduction was determined based on their appearance and by collecting oocyte samples according to the methodology described by Kujawa and Kucharczyk [37]. The oocytes were subsequently cleared in Serra's liquid. They were in the third stage [17], which is the optimum stage for cyprinid fish stimulation for artificial reproduction [22,38]. Forty females and ten males were used in the experiment (Table 1).

Table 1. Characteristics of the examined blue bream *Ballerus ballerus* (L.).

	Weight (g)	Length (cm)	Weight (g)	Length (cm)
	Females (n = 40)		Males (n = 10)	
min–max	404–995	34–48	298–443	33–39
mean	501.6	37.8	387.8	35.8
(±SD)	138.7	3.0	40.3	1.9

The blue bream spawners' body weight ranged from 404 to 995 g. The differences in the average body weight of females in different groups were relatively small.

The 1000 L tanks were made of plastic. They had independent systems for aeration, stepless regulation of the water temperature, EHEIM CLASSIC 2260 (EHEIM GmbH & Co.KG, Deizisau, Germany) external filters with a biological bed, EHEIM 1262 pumps with a flow of 3400 dm^3/h and EHEIM (EHEIM GmbH & Co.KG, Deizisau, Germany) UV lamps for water treatment. Maintaining the set water temperature was ensured by a chilled water system and 2.5 kW heaters. Continuous water temperature monitoring and control were performed using the OXYGuard Pacific (OxyGuard International A/S, Farum, Denmark). The water temperature in the tanks was 14.5 °C (±0.1 °C) and it was not much different from that in Lake Dąbie at the time of fish catching.

Three preparations were used:

- Ovopel, containing a mammalian GnRH analogue (D-Ala6, Pro9-Net-mGnRH) and metoclopramide as a dopamine receptor antagonist (Unic-trade, Budapest, Hungary) [29].
- CPH—carp pituitary homogenate (Argent, Redmont, WA, USA).
- Ovaprim, containing a salmon GnRH analogue (D-Arg6, Pro9-Net-sGnRH) and domperidone as a dopamine receptor antagonist (Syndel, Nanaimo, Canada) [30].

Only the females were stimulated as the males released sperm when their abdominal area near the sexual orifice was pressed slightly. The females were weighed on a KERN electronic balance with an accuracy of 0.1 g. Powdered carp pituitary homogenate (CPH) and Ovopel were pounded up in a mortar and dissolved in a 0.9% solution of NaCl. All hormonal injections were given intraperitoneally, under the left pelvic fin base. The volumes of the preparation doses are shown in Table 2.

Table 2. Treatments and their doses used for blue bream *Ballerus ballerus* (L.) female artificial reproduction.

Parameter	CPH (mg kg^{-1})	Ovopel (Pellets kg^{-1})	Ovaprim (mL kg^{-1})	0.9% NaCl (mL kg^{-1})
Group	I	II	III	Control
Injection	0.4 after 24 h 3.6	0.2 after 24 h 1.2	0.5	2

The spawners in each experimental group were labeled with Floy Tags [39,40]. Females from all groups were kept together to minimize the impact of abiotic conditions on the final maturation process of females [11,13,15,20]. The control group included female fish receiving only physiological saline. The statistical analysis did not show any significant differences between females in the groups. After one day of acclimation, the water temperature in the tanks was increased to 16 °C (±0.1 °C) and the hormonal stimulation was started 24 h after the spawners were released to the tanks.

Later, the water temperature in the tank was increased to 19 °C (±0.1 °C) after the spawners were given the final (resolving) dose of the hormonal treatment. The spawner inspection was started 12 h after the final injection. After that time, the females were inspected every hour. All the fish handling was performed after they were anesthetized in an MS 222 solution (100 mg L^{-3} of water).

The eggs obtained from females were collected by gentle pressure on the abdominal wall from the head towards the tail and then placed separately into plastic vessels. Then, they were fertilized with semen from several males [34,41]. The same weight portions of eggs (10 g of eggs) from each female were fertilized with 100 µL of semen. The gametes were activated with water and then removed in the stickiness procedure before putting them into incubators. First, they were washed in a solution of urea with salt (40 of urea, 30 g of NaCl—10 L of water) and then for a few seconds in a tannin solution (7 g of tannin—10 L of water). Non-sticky eggs were placed in Weiss closed-circuit mini incubators (jar) with a capacity of 1.8 L [42]. For each of the females, such egg samples were produced in triplicate.

During the egg incubation, samples were taken randomly from each jar to determine the number of live eyed-egg embryos/total number of egg grains used for the observation ratio (%) and the number of swimming larvae/total number of egg grains used for the observation ratio (%).

The following parameters were also recorded during the experiment:

- The weight of eggs obtained from each ovulating female—determined with an electronic balance with an accuracy of 0.1 g;
- The latency time—the time between the application of a stimulating agent and ovulation (h);
- The number of ovulating/stimulated females ratio (%);
- Spawner mortality rate in each experimental group (%).

The GSI was calculated in the following manner:

$$GSI = 100\ Wg \times Wb^{-1}$$

where: Wg—weight of the obtained eggs (g), Wb—total weight of the fish (g) before the eggs were collected.

The assessment of the normality of the data distribution, expressed as mean ±SD, was ascertained using Statistica software version 13.1 (StatSoft Inc. 2016, Tulsa, OK, USA). Data were normally distributed (Shapiro–Wilk test) and the variances were homogenous (Leven's test). Differences between the means of the groups for each variable were evaluated using ANOVA and Duncan's multiple range tests for group comparisons ($p < 0.05$ was considered to be significant).

3. Results

Gametes were not acquired from the fish in the control group. The lowest number of ovulating blue bream females (four fish) was found in group III, stimulated with Ovaprim (Table 3). There were six to nine ovulating females in the other groups, accounting for 60–90% of the females in the respective groups.

Table 3. Effects of different hormonal agents on blue bream *Ballerus ballerus* (L.) female ovulation during controlled reproduction.

Group	I	II	III	Control
Number of stimulated females	10	10	10	10
Female body (min–max) (g)	404–964	416–995	475–846	462–836
Female survival after injection (%)	70	90	80	90
No. of ovulated females/(%)	6/60	9/90	4/40	-
Latency time (h)	15–18	12	13–20	-

The latency time was the shortest in the spawners receiving Ovopel injections (group II). The fish in this group ovulated 12 h after the hormonal injection. Spawning was synchronized and all females spawned simultaneously (Table 3). The time between administration of the hormonal agent and ovulation was longer in the other groups, by 3–6 h, on average. The ovulation was considerably extended in time in group III, stimulated with Ovaprim. There was up to a seven-hour span between the ovulation of the first and the last female.

The fish survival rate was found to differ slightly depending on the hormonal preparations used to induce ovulation. The loss of females was the highest (30%—Table 3) among those stimulated with CPH. The survival rate was 90% in the group of spawners stimulated with Ovopel and 80% in the group in which Ovaprim was used.

Eggs with the highest average weight per fish (75.4 g) were obtained from the females in group II, stimulated with Ovopel (Table 4), while eggs with the lowest average weight per fish (49.5 g) originated from fish in group III. However, the differences were not statistically significant.

Table 4. Influence of different hormonal agents on egg quantity and quality during *Ballerus ballerus* (L.) artificial reproduction. The data in row with the same letter superscript are not differ statistically ($p > 0.05$).

Group	I	II	III	Control
	Mean (±SD)			
Female body (g ind^{-1})	494.5 (±22.4)	489.3 (±21.7)	467.4 (±48.0)	479.5 (±26.7)
Mass of eggs (g)	60.8 ^{ab} (±10.8)	75.4 ^{a} (±8.6)	49.5 ^{b} (±9.3)	0
GSI (%)	12.3 (±1.7)	15.4 (±2.1)	10.6 (±2.1)	
Survival to eyed-egg stage (%)	81.2 ^{b} (±0.6)	88.8 ^{a} (±0.5)	73.8 ^{c} (±1.2)	0
Swimming larvae (%)	74.3 ^{b} (±0.8)	82.5 ^{a} (±0.4)	66.4 ^{c} (±0.7)	0

There was also no significant variation in the individual experimental groups in terms of the survival of the embryos to the eyed-egg stage (Table 4). The overall fertilization effectiveness expressed as the percent of live eyed-egg embryos was relatively high—from 73.8% in group III to 88.8% in group II, with the differences being statistically significant. The percent of swimming larvae was also high. It was the highest in group II (82.5%) and the lowest in group III (66.4%). The differences were statistically significant (Table 4).

4. Discussion

Hormonal stimulation is necessary to obtain gametes from most fish species living in the wild [43]. This especially applies to rheophilic cyprinids, whose reproduction under controlled conditions is often impossible without hormonal injections. Gametes can be obtained from them without such stimulation only when they are caught at a spawning site during the spawning [44]. Research into blue bream reproduction under controlled conditions following hormonal stimulation was based on studies of the bream *Abramis brama* [13,14] and rheophilic cyprinids [12,16–20]. Similarly to blue bream, these fish must be caught in the wild before their reproduction under controlled conditions. This results in high stress for the fish, with a possible decreased survival rate when they are put into tanks. Inducing ovulation in females and increasing the sperm amount by injection of CPH suspension has now been partly replaced with the use of other hormonal agents, e.g., Ovaprim or Ovopel [45–50]. Hormones are increasingly often combined with CPH injections. Developing a reproduction biotechnique involves testing various hormonal agents at different doses. It is of particular importance in cyprinids with diverse reproduction procedures. Fish producing eggs once per season must receive hormonal agents, often in combination with dopamine antagonists [45,46,50,51]. However, multiple-spawners should receive different hormones in different doses [13,52] than single-spawners [13–15]. Such stimulating agents include human chorionic gonadotropin (HCG), which is used as a supporting hormone in conventional methods of controlled reproduction. It is particularly recommended for use in percid reproduction [52,53]. This agent's effectiveness in out-of-season reproduction of rheophilic cyprinids is very low. Moreover, the application procedure requires two to four injections, which is stressful for the fish and may result in their increased mortality [54,55]. According to Syndel, the Ovaprim manufacturer, the product shortens and synchronizes spawning, reduces fish stress, increases egg production, extends its activity and improves spawning effectiveness. However, the results are different in practice. Ovaprim use does not often give satisfactory results in reproduction, especially for cyprinid fish, particularly with respect to the percent of ovulating females and the biological quality of the eggs [56,57]. This was confirmed by the outcome of blue bream reproduction under controlled conditions in which both the number of ovulating fish and the egg weight were the lowest following the application of Ovaprim.

The hormonal agents used in this study included Ovaprim, Ovopel and carp pituitary homogenate (CPH). These agents are very often used in controlled reproduction of the carp and other cyprinids [22,25,58,59]. The ultimate effects of their use are similar, but their impact on the fish organism varies. CPH affects gamete maturation directly, whereas GnRH affects it indirectly—it influences the fish endocrine glands, which produce their own gonadotropin-releasing hormones and induce gamete maturation [17,25].

According to the study findings, ovulation in blue bream females caught in the wild can be stimulated with CPH, Ovopel or Ovaprim. Ovopel proved to be the most effective and Ovaprim the least. The use of Ovopel produced better results (number of ovulating females, spawning synchronization and the amount of eggs obtained) than the other reproduction stimulators. The survival rate for embryos in the eyed-egg stage for the blue bream females stimulated with Ovopel was higher than females receiving the other preparations. Importantly, the females in this group very well tolerated all reproduction-related handling under controlled conditions. Their survival rate until releasing the gametes was 90% (Table 3). Moreover, Ovopel is relatively cheap and easy to prepare [45].

CPH and Ovaprim were less effective than Ovopel. The female survival rate following stimulation with Ovopel was surprisingly high given the fact that they were acquired in the fishing process. CPH injection resulted in ovulation in 60% of the spawners (Table 2). The embryo survival rate in this group was only slightly lower than the rate for embryos hatched from the eggs from Ovopel-injected females. A similar observation was made for common dace *L. leuciscus* [11,20], asp *L. aspius* [12], ruffe *Gymnocephalus cernua* [31], common barbel *Barbus barbus* [32], river lamprey *Lampetra fluviatilis* [34], European catfish *S. glanis* [46], ide *L. idus* [48,54] and burbot *L. lota* [55]. The present study clearly shows that Ovopel is the best reproduction stimulator for blue bream caught in the wild. It proved to be highly effective and safe for the stimulated females. Their survival rate following Ovopel application was the same as in the control group. The Ovaprim effectiveness was low.

In many fish species, it has been found that the influence of abiotic factors such as dissolved oxygen (DO), pH, ammonium levels and temperature are important for the maturation of gonads and gametes. For example, even minimal temperature fluctuations in the range of optimal temperatures can have a very negative impact on the effectiveness of artificial reproduction [11]. For this reason, in our study, females from all groups were kept together to minimize the impact of factors other than the administered hormonal agents on reproductive efficiency [60]. Of course, when planning your research, it is important to take into account the issue of steroid hormones and the possibility of their excretion into the water by females. The most important is DHP (17,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one). However, for example, studies by Acharjee et al. on Asian stinging catfish (*Heteropneustes fossilis*) showed that the accumulation of DPH in the blood does not appear until many hours after ovulation [61]. Thus, the possibility of its excretion by some females and the impact on other breeders in our experiment was imperceptible, as evidenced by the results from the control group (ovulation—0%). Determination of the optimal stimulation conditions, including simultaneous environmental conditions and hormonal agents, is necessary for the effective artificial reproduction of cyprinids [32]. The studies conducted thus far on cyprinids have shown that off-season breeding, although more difficult to carry out, requires the use of thermal conditions that are the same as those used in the season [11,13,14,32]. The results of the reproduction of fish of the genus Abramis, which are related to the genus Ballerus, reported thus far have shown that the reproduction of fish in the season and in the off-season is very similar in terms of the reproductive protocol [62–67]. The research published by Kucharczyk et al. [13–15,65] showed that during off-season reproduction, the thermal conditions are identical to those during spawning in the breeding season, and only sometimes is the hormonal stimulation slightly different: slightly higher doses of hormonal agents or more injections are used. On this basis, it should be concluded that the given conditions of blue bream stimulation in the breeding season and outside the breeding season should be very similar.

The findings of this study confirm the effectiveness of Ovopel as a reproduction stimulator for fish caught in the natural environment. It is essential to have as many ovulating females as possible in the reproduction of wild fish under controlled conditions. Surviving females that fail to produce eggs are useless for further breeding. They also generate costs for their acquisition in the wild. Given the amount of work necessary to catch the spawners, the financial loss can be considerable. Currently, work is underway aimed at rearing blue bream spawners under controlled conditions. It is believed that partly domesticated fish will be less susceptible to stress and will better tolerate all reproduction-related handling [68].

5. Conclusions

Blue bream spawners were found to tolerate reproduction-related handling well under controlled conditions. Ovopel proved to be the best blue bream ovulation stimulator under such conditions. The rate of female survival until releasing the gametes following the use of Ovopel was the highest. The lowest female survival rate was observed following the use

of CPH. High fertilization and larvae survival rates were observed in the groups of females stimulated with Ovopel or CPH.

Author Contributions: Investigation, P.P.; R.K; data curation, P.P.; formal analysis, P.P.; writing—review and editing, P.P.; conceptualization, R.K.; funding acquisition, R.K.; resources, supervision, writing—original draft, R.K. Both the authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland, project No. 18.610.005-110 and financially supported by the Minister of Science and Higher Education in the range of the program entitled "Regional Initiative of Excellence" for the years 2019–2022, Project No. 010/RID/2018/19, amount of funding PLN 12.000.000.

Institutional Review Board Statement: This research was conducted with the permission of the Local Ethical Committee in Olsztyn, No 27/2010, from 27 January 2010 for the years 2011–2015.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. *Ballerus ballerus* (Linnaeus 1758). Available online: https://www.fishbase.de/summary/Ballerus-ballerus.html (accessed on 25 March 2021).
2. Šanda, R.; Slavík, O. New record of the Blue bream (*Abramis ballerus*) in the Elbe River in the Czech Republic. *Acta Soc. Zool. Bohem.* **2007**, *71*, 25–26.
3. Tadajewska, M. Zope *Abramis ballerus* (L.). In *Freshwater Fish of Poland*; Brylińska, M., Ed.; Państwowe Wydawnictwo Naukowe: Warszawa, Poland, 2000; pp. 273–276. (In Polish)
4. Chaŝem, M.T. Polovoje sozrievanie i plodovitost sinca *Abramis ballerus* (L.) Rybinskogo vodochraniliszcza [Sexual maturation and fecundity of blue bream, *Abramis ballerus* (L.) from the Rybinsk reservoir. *Vopr. Ichtiologii* **1969**, *9*, 489–496. (In Russian)
5. Karabanowicz, J.; Kompowski, A. On biology of reproduction of blue bream, *Abramis ballerus* (L., 1758), in the lower part of river Odra, Lake Dąbie and Szczecin Lagoon. *Acta Ichthyol. Piscat.* **1994**, *24*, 77–92. [CrossRef]
6. Kompowski, A.; Błaszczyk, P. Reproduction and fecundity of blue bream *Abramis ballerus* L., 1758 in Międzyodrze. *Acta Ichthyol. Piscat.* **1997**, *27*, 57–77. [CrossRef]
7. Kompowski, A. Catches and growth rate of *Abramis ballerus* (L., 1758) from Lake Dąbie and the Firth of Szczecin. *Acta Ichthyol. Piscat.* **1991**, *21*, 17–28. [CrossRef]
8. Domagała, J.; Dziewulska, K.; Kirczuk, L.; Pilecka-Rapacz, M. Sexual cycle of white bream, *Blicca bjoerkna* (Actinopterygii, Cypriniformes, Cyprinidae), from three sites of the lower Oder River (NW Poland) differing in temperature regimes. *Acta Ichthyol. Piscat.* **2015**, *45*, 285–298. [CrossRef]
9. Domagała, J.; Dziewulska, K.; Kirczuk, L.; Pilecka-Rapacz, M. Sexual Cycle of the Blue Bream (*Ballerus ballerus*) from the Lower Oder River and Dąbie Lake (NW Poland). *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* **2016**, *16*, 819–829. [CrossRef]
10. Souchon, Y.; Tissot, L. Synthesis of thermal tolerances of the common freshwater fish species in large Western Europe rivers. *Knowledge* **2012**, *405*, 3. [CrossRef]
11. Nowosad, J.; Targońska, K.; Chwaluczyk, R.; Kaszubowski, R.; Kucharczyk, D. Effect of temperature on the effectiveness of artificial reproduction of dace [Cyprinidae (*Leuciscus leuciscus* (L.))] under laboratory and field conditions. *J. Therm. Biol.* **2014**, *45*, 62–68. [CrossRef]
12. Targońska, K.; Kucharczyk, D.; Kujawa, R.; Mamcarz, A.; Żarski, D. Controlled reproduction of asp, *Aspius aspius* (L.) using luteinizinghormone releasing hormone (LHRH) analogues with dopamine inhibitors. *Aquaculture* **2010**, *306*, 407–410. [CrossRef]
13. Kucharczyk, D.; Kujawa, R.; Luczynski, M.; Glogowski, J.; Babiak, I.; Wyszomirska, E. Induced spawning in bream, *Abramis brama* (L.), using carp pituitary exstract and hCG. *Aquac. Res.* **1997**, *28*, 139–144. [CrossRef]
14. Kucharczyk, D.; Kujawa, R.; Mamcarz, A.; Wyszomirska, E. Artificial spawning in bream (*Abramis brama* L.). *Pol. Arch. Hydrobiol.* **1997**, *44*, 201–205.
15. Kucharczyk, D.; Kujawa, R.; Mamcarz, A.; Wyszomirska, E. Induced spawning in rudd (*Scardinius erythrophthalmus* L.). *Pol. Arch. Hydrobiol.* **1997**, *44*, 207–211.
16. Kucharczyk, D.; Kujawa, R.; Mamcarz, A.; Skrzypczak, A.; Wyszomirska, E. Out of season spawning of asp *Aspius aspius*, ide and chub under artificial conditions. In *Karpiowate Ryby Reofilne*; PZW: Warszawa, Poland, 1998; pp. 57–64. (In Polish)
17. Kujawa, R.; Mamcarz, A.; Kucharczyk, D. Biotechnology of reproduction and breeding of asp (*Aspius aspius* L.). *Czech J. Anim. Sci.* **1998**, *43*, 396.
18. Kupren, K.; Żarski, D.; Krejszeff, S.; Kucharczyk, D.; Targońska, K. Effect of stocking density on growth, survival and development of asp *Aspius aspius* (L.), ide *Leuciscus idus* (L.) and chub *Leuciscus cephalus* (L.) larvae during initial rearing under laboratory conditions. *Ital. J. Anim. Sci.* **2011**, *10*, e34. [CrossRef]

19. Kucharczyk, D.; Nowosad, J.; Łuczyński, M.J.; Targońska, K. New technique for fertilizing eggs of burbot, asp and ide under hatchery conditions. *Anim. Reprod. Sci.* **2016**, *172*, 143–147. [CrossRef] [PubMed]
20. Kucharczyk, D.; Nowosad, J.; Kucharczyk, D.J.; Kupren, K.; Targońska, K.; Wyszomirska, E.; Kujawa, R. Out-of-season artificial reproduction of common dace (*Leuciscus leuciscus* L.) under controlled conditions. *Anim. Reprod. Sci.* **2019**, *202*, 21–25. [CrossRef] [PubMed]
21. Kozlowski, B. Practise of hormonal stimulation of artificial spawning in cyprinid fishes. *Broszura Inst. Rybactwa Śródlądowego Olszt.* **1994**, *162*, 41. (In Polish)
22. Brzuska, E. Artificial spawning of carp *Cyprinus carpio* L.: Differences between the effects on reproduction in females of Polish and Hungarian provenance treated with carp pituitary and (D-Ala6) GnRH ProNHEt (Kobarelin). *Aquac. Res.* **2000**, *31*, 457–465. [CrossRef]
23. Cejko, B.I.; Targońska, K.; Kowalski, R.K.; Żarski, D.; Sarosiek, B.; Kucharczyk, D.; Glogowski, J. The effectiveness of hormonal preparations (Ovopel, Ovaprim, LHRHa, hCG and CPE) in stimulating spermiation in dace *Leuciscus leuciscus* (L.). *J. Appl. Ichthyol.* **2012**, *28*, 873–877. [CrossRef]
24. Cejko, B.I.; Kucharczyk, D.; Targońska, K.; Żarski, D.; Sarosiek, B.; Kowalski, R.K.; Glogowski, J. Influence of temperature on the effectiveness of the hormonal stimulation of male ide, *Leuciscus idus* (L.). *Fish. Aquat. Life* **2010**, *18*, 205–211. [CrossRef]
25. Yaron, Z. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture* **1995**, *129*, 49–73. [CrossRef]
26. Szabó, T.; Medgyasszay, C.; Horváth, L. Ovulation induction in nase (Chondrostoma nasus, Cyprinidae) using pituitary extract or GnRH analogue combined with domperidone. *Aquaculture* **2002**, *203*, 389–395. [CrossRef]
27. Mylonas, C.C.; Fostier, A.; Zanuy, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2010**, *165*, 516–534. [CrossRef] [PubMed]
28. Duncan, N.; Estévez, A.; Porta, J.; Carazo, I.; Norambuena, F.; Aguilera, C.; Mylonas, C.C. Reproductive development, GnRHa-induced spawning and egg quality of wild meagre (*Argyrosomus regius*) acclimatised to captivity. *Fish Physiol. Biochem.* **2012**, *38*, 1273–1286. [CrossRef]
29. Alavi, S.M.H.; Hatef, A.; Mylonas, C.C.; Gela, D.; Papadaki, M.; Rodina, M.; Kašpar, V.; Pšenička, M.; Podhorec, P.; Linhart, O. Sperm characteristics and androgens in *Acipenser ruthenus* after induction of spermiation by carp pituitary extract or GnRHa implants. *Fish Physiol. Biochem.* **2012**, *38*, 1655–1666. [CrossRef]
30. Peter, R.E.; Lin, H.R.; van der Kraak, G.; Little, M. Releasing Hormones, Dopamine Antagonists and Induced Spawning. In *Recent Advances in Aquaculture*; Muir, J.P., Roberts, R.J., Eds.; Institute of Aquaculture, Blackwell Scientific Publications: Oxford, UK, 1993; Volume IV, pp. 25–30.
31. Kucharczyk, D.; Malinovskyi, O.; Nowosad, J.; Kowalska, A.; Cejko, B.I. Comparison of responses to artificial spawning of ruffe (*Gymnocephalus cernua*) specimens captured from their natural habitat to those produced in cultured conditions. *Anim. Reprod. Sci.* **2021**, *225*, 106684. [CrossRef]
32. Nowosad, J.; Kucharczyk, D.; Targońska, K.; Wyszomirska, E.; Chwaluczyk, R.; Kupren, K. The synergistic effect of temperature and hormonal stimulation on spawning efficiency of common barbel, *Barbus barbus*, L. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* **2016**, *16*, 517–524. [CrossRef]
33. Szabó, T.; Urbányi, B.; Müller, T.; Szabó, R.; Horváth, L. Assessment of induced breeding of major Chinese carps at a large-scale hatchery in Hungary. *Aquac. Rep.* **2019**, *14*, 100193. [CrossRef]
34. Kujawa, R.; Cejko, B.I.; Fopp-Bayat, D.; Judycka, S.; Glińska-Lewczuk, K.; Timofte, C.M.; Nowosad, J.; Kucharczyk, D. Reproduction of endangered river lamprey (*Lampetra fluviatilis*) in controlled conditions. *Anim. Reprod. Sci.* **2019**, *203*, 75–83. [CrossRef]
35. Kujawa, R.; Kucharczyk, D.; Mamcarz, A.; Żarski, D.; Targońska, K. Artificial spawning of common tench *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758), obtained from wild and domestic stocks. *Aquac. Int.* **2011**, *19*, 513–521. [CrossRef]
36. Kujawa, R.; Kucharczyk, D.; Mamcarz, A. A model system for keeping spawners of wild and domestic fish before artificial spawning. *Aquac. Eng.* **1999**, *20*, 85–89. [CrossRef]
37. Kujawa, R.; Kucharczyk, D. A method of in vivo designating oocytes from cyprinid and percid fish using catheter. *Komun. Ryb. Olszt.* **1996**, *4*, 20–21. (In Polish)
38. Brzuska, E.; Bieniarz, K. Metoda przyżyciowego określania dojrzałości płciowej samic karpia w związku z iniekcjami homogenatu przysadki mózgowej karpia. *Broszury IRŚ Olszt.* **1977**, *105*, 27.
39. Basavaraju, Y.; Renuka, D.B.S.; Mukthayakka, G.; Purushotham, R.L.; Mair, G.C.; Roderick, E.E.; Penman, D.J. Evaluation of marking and tagging methods for genetic studies in carp. *J. Biosci.* **1998**, *23*, 585–593. [CrossRef]
40. Rikardsen, A.H.; Woodgate, M.; Thompson, D.A. A comparison of floy and soft vialpha tags on hatchery arctic charr, with emphasis on tag retention, growth and survival. *Environ. Biol. Fishes* **2002**, *64*, 269–273. [CrossRef]
41. Kucharczyk, D.; Kucharczyk, D.J.; Nowosad, J.; Omirzhanova, N. Optimization of artificial insemination outcomes of African catfish (*Clarias gariepinus*) with differing hatchery conditions. *Anim. Reprod. Sci.* **2019**, *211*, 106222. [CrossRef] [PubMed]
42. Kujawa, R.; Mamcarz, A.; Kucharczyk, D.; Skrzypczak, A. An experimental unit for rearing of larval freshwater fish. *Folia Univ. Agric. Stetin. Piscaria* **2000**, *205*, 103–108.
43. Donaldson, E.M. Manipulation of reproduction in farmed fish. *Anim. Reprod. Sci.* **1996**, *42*, 381–392. [CrossRef]
44. Slyn'ko, E.E.; Slyn'ko Yu, V. The viability of the first generation roach (*Rutilus rutilus* L.), bream (*Abramis brama* L.), and blue bream (*Abramis ballerus* L.) hybrids at early stages of development. *Inland Water Biol.* **2010**, *3*, 155–159. [CrossRef]

45. Horvath, L.; Szabo, T.; Burke, J. Hatchery testing of GnRH analogue containing pellets on ovulation in four cyprinid species. *Pol. Arch. Hydrobiol.* **1997**, *44*, 281–292.
46. Brzuska, E.; Adamek, J. Artificial spawning of European catfish, *Silurus glanis* L.: Stimulation of ovulation using LHRH-a, Ovaprim and carp pituitary extract. *Aquac. Res.* **1999**, *30*, 59–64. [CrossRef]
47. Ciesla, M.; Jonczyk, R.; Gozdowski, D.; Sliwinski, J. Changes in ide *Leuciscus idus* (L.) females' reproductive parameters after stimulation with carp pituitary homogenate (CPH) and Ovopel: The effect of domestication? *Aquac. Int.* **2014**, *22*, 77–88. [CrossRef]
48. Jamroz, M.; Kucharczyk, D.; Hakuc-Błażowska, A.; Krejszeff, S.; Kujawa, R.; Kuprem, K.; Kwiatkowski, M.; Targońska, K.; Żarski, D.; Cejko, B.I.; et al. Comparing the effectiveness of Ovopel, Ovaprim and LH-RH analogue used in the controlled reproduction of Ide, *Leucicus idus* (L.). *Arch. Pol. Fish.* **2008**, *16*, 363–370. [CrossRef]
49. Żarski, D.; Kucharczyk, D.; Targońska, K.; Jamróz, M.; Krejszeff, S.; Mamcarz, A. Application of Ovopel and Ovaprim and their Combinations in Controlled Reproduction of Two Reophilic Cyprinid Fish Species. *Pol. J. Nat. Sci.* **2009**, *24*, 235–244. [CrossRef]
50. Brzuska, E.; Grzywaczewski, R. Artificial spawning of carp *Cyprinus carpio* L.: Differences between the effects on reproduction in females of Israeli strain Dor-70 and its cross-breed treated with carp pituitary and Ovopel. *Aquac. Res.* **1999**, *30*, 559–570. [CrossRef]
51. Brzuska, E. Artificial spawning of carp (*Cyprinus carpio* L.); the use of Aquaspawn and carp pituitary extract to induce ovulation in females of Lituanian line B. *Aquac. Res.* **2001**, *32*, 357–364. [CrossRef]
52. Kucharczyk, D.; Kujawa, R.; Mamcarz, A.; Skrzypczak, A.; Wyszomirska, E. Induced spawning in perch (*Perca fluviatilis* L.) using carp pituitary extract and HCG. *Aquac. Res.* **1996**, *27*, 847–852. [CrossRef]
53. Dabrowski, K.; Ciereszko, A.; Ramseyer, L.; Culver, D.; Kestemont, P. Effects of hormonal treatment on induced spermiation and ovulation in the yellow perch (*Perca flavercens*). *Aquaculture* **1994**, *12*, 171–180. [CrossRef]
54. Kucharczyk, D.; Nowosad, J.; Wyszomirska, E.; Cejko, B.I.; Arciuch-Rutkowska, M.; Juchno, D.; Boroń, A. Comparison of artificial spawning effectiveness of hCG, CPH and GnRHa in combination with dopamine inhibitors in a wild strain of ide *Leuciscus idus* (L.) in hatchery conditions. *Anim. Reprod. Sci.* **2020**, *221*, 106543. [CrossRef]
55. Kucharczyk, D.; Nowosad, J.; Kujawa, R.; Dietrich, G.; Biegaj, M.; Sikora, M.; Luczynski, M.J. Comparison of spontaneous and hormone-induced reproduction of burbot (*Lota lota* L.) under hatchery conditions. *Aquaculture* **2018**, *485*, 25–29. [CrossRef]
56. Ahmad, T.Z.; Chuah, H.P.; Haron, A.; Zahari, A. Induced breeding techniques for some of the cyprinid foodfishes in Malacca. *Proc. Intl. Conf. Dev. Managt. Trop. Living Aquat. Resour. Serdang Malays.* **1986**, *1993*, 44–51.
57. Thalathiah, S.; Fauzi, O.A.; Ibrahim, T. First Successful Attempt to Induce Breed Mystus Nemurus (C & V) at Batu Berendam Melaka. *Malays. Soc. Anim. Prod.* **1988**, *11*, 53–55.
58. Drori, S.; Ofir, M.; Levavi-Sivan, B.; Yaron, Z. Spawning induction in common carp (*Cyprinus carpio*) using pituitary extract or GnRH superactive analogue combined with metoclopramidae: Analysis of hormone profile, progress of oocyte maturation and dependence on temperature. *Aquaculture* **1994**, *119*, 393–407. [CrossRef]
59. Kulikovsky, Z.; Marttin, F.J.B.; Yaron, Z. A comparison of two spawning-inducing agents for common carp. *Isr. J. Aquac.-Bamidgeh* **1996**, *48*, 108–111.
60. Szczerbowski, A.; Kucharczyk, D.; Mamcarz, A.; Łuczyński, M.J.; Targońska, K.; Kujawa, R. Artificial off-season spawning of Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. *Fish. Aquat. Life* **2009**, *17*, 95–98. [CrossRef]
61. Acharjee, A.; Chaube, R.; Joy, K. Ovaprim, a commercial spawning inducer, stimulates gonadotropin subunit gene transcriptional activity: A study correlated with plasma steroid profile, ovulation and fertilization in the catfish *Heteropneustes fossilis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2017**, *251*, 66–73. [CrossRef] [PubMed]
62. Nowosad, J.; Kucharczyk, D.; Liszewski, T.; Targońska, K.; Kujawa, R. Comparison of temperature shock timing to induced artificial mitotic gynogenesis and androgenesis in common tench. *Aquac. Int.* **2015**, *23*, 45–53. [CrossRef]
63. Targońska, K.; Żarski, D.; Kupren, K.; Palińska-żarska, K.; Mamcarz, A.; Kujawa, R.; Skrzypczak, A.; Furgała-Selezniow, G.; Czarkowski, T.K.; Hakuć-Błażowska, A.; et al. Influence of temperature during four following spawning seasons on the spawning effectiveness of common bream, *Abramis brama* (L.) under natural and controlled conditions. *J. Therm. Biol.* **2014**, *39*, 17–23. [CrossRef]
64. Mamcarz, A.; Kucharczyk, D.; Kujawa, R. Reciprocal hybrids of tench *Tinca tinca* (L.) × bream *Abramis brama* (L.), and tench × carp *Cyprinus carpio* L., and some characteristics of their early development. *Aquac. Int.* **2006**, *14*, 27–33. [CrossRef]
65. Kucharczyk, D.; Kujawa, R.; Mamcarz, A.; Targońska-Dietrich, K.; Wyszomirska, E.; Glogowski, J.; Babiak, I.; Szabó, T. Induced spawning in bream (*Abramis brama* L.) using pellets containing GnRH. *Czech J. Anim. Sci.* **2005**, *50*, 89–95. [CrossRef]
66. Glogowski, J.; Babiak, I.; Kucharczyk, D.; Luczynski, M.; Piros, B. Some properties of bream *Abramis brama* L. sperm and its cryopreservation. *Aquac. Res.* **1999**, *30*, 765–772. [CrossRef]
67. Kucharczyk, D.; Żarski, D.; Targońska, K.; Łuczyński, M.J.; Szczerbowski, A.; Nowosad, J.; Kujawa, R.; Mamcarz, A. Induced Artificial Androgenesis in Common Tench, *Tinca tinca* (L.), Using Common Carp and Common Bream Eggs. *Ital. J. Anim. Sci.* **2014**, *13*, 2890. [CrossRef]
68. Kucharczyk, D.; Kujawa, R.; Mamcarz, A.; Wyszomirska, E.; Ulikowski, D. Artificial spawning of ide (*Leuciscus idus*) under controlled conditions. *EJPAU* **1999**, *2*, 5.

FISHERIES & AQUATIC LIFE (2023) 31: 31 - 43
Archives of Polish Fisheries
DOI 10.2478/aopf-2023-0004

sciendo

RESEARCH ARTICLE

Influence of temperature and stocking density during rearing on larval blue bream, *Ballerus ballerus* (L.)

Przemysław Piech, Roman Kujawa, Joanna Nowosad, Dariusz Kucharczyk, Katarzyna Targońska, Mariusz Szmyt

Received – 20 February 2023/Accepted – 28 March 2023. Published online: 31 March 2023; *©National Inland Fisheries Research Institute, Olsztyn, Poland*
Citation: Piech, P., Kujawa, R., Nowosad, J., Kucharczyk, D., Targońska, K., Szmyt, M. (2023). Influence of temperature and stocking density during rearing on larval blue bream, *Ballerus ballerus* (L.). Fisheries & Aquatic Life 31, 31-43

Abstract. This study determined the effects of stocking density and water temperature on the rearing parameters and survival of larval blue bream under controlled conditions. Two experimental larval blue bream rearing variants were conducted. In the first experiment, larval blue bream were reared at different stocking densities of 20, 40, 80, and 120 indiv. dm^{-3} at 25°C. In the second experiment, larvae were reared in water at 15, 20, 25, and 30°C at a stocking density of 40 individuals per dm^3. The larval blue bream achieved the highest growth rate at the lowest density tested (20 indiv. dm^{-3}; 69.4 mg at an average length of 26.8 mm) and at the highest temperature tested (30°C; 80.1 mg at an average length of 28.4 mm). The final larval survival rate during rearing at different temperatures ranged from 95.2 to 97.6%, while the final larval survival rate at different stocking densities ranged from 91.4 to 94.6%. The lowest growth and survival rates were recorded for larvae reared in water at 15°C and at a density of 120 indiv. dm^{-3}.

Keywords: blue bream, growth rate, survival rate, controlled conditions, stocking material, cyprinid fish

P. Piech [✉], R. Kujawa, K. Targońska, M. Szmyt
Department of Ichthyology and Aquaculture, Faculty of Animal Bioengineering, University of Warmia and Mazury, 10-719 Olsztyn, Poland
E-mail: przemyslaw.piech@uwm.edu.pl

J. Nowosad
Department of Ichthyology, Hydrobiology and Aquatic Ecology, National Inland Fisheries Research Institute
10-719 Olsztyn, Poland

J. Nowosad, D. Kucharczyk
Department of Research and Development, Chemprof, Gutkowo, 11-041 Olsztyn, Poland

Introduction

Protecting the biodiversity of fish fauna has become a key element in preserving fish stocks in lentic and lotic inland waters. Biodiversity conservation is not possible without effective environmental protection, which refers to reducing progressive anthropogenic pressure such as water pollution, excessive land reclamation, riverbed aggregate extraction, etc. (Goryczko and Witkowski 2009). In situ and ex situ methods, from designating conservation sizes to establishing broodstocks, are also important elements of species conservation. This applies mainly to fishes that are threatened with extinction, commercially important for human consumption, or important to recreational fisheries (Szmyt et al. 2021). Maintaining fish populations at adequate levels in inland waters is supported by the production of stocking material in aquaculture (conservation aquaculture; Śliwiński et

© Copyright by National Inland Fisheries Research Institute, Poland.
© 2023 Author(s). This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/).

al. 2016, Zakęś et al. 2016). As a rapidly growing industry, aquaculture has become an essential tool in combatting the deteriorating state of the environment. As a result of the development of aquaculture, many mechanisms, including artificial spawning protocols, breeding protocols, and indoor cultured stock, have been developed to protect not only economically valuable species, but also species important for the biodiversity of reservoirs, including indicator species and endangered species (Radwan et al. 2002, Gorzel and Kornijów 2004, Kujawa et al., 2019, Kucharczyk et al. 2021, Kujawa and Piech, 2021). High costs of water, production, and staff salaries are often barriers to starting to farm/rear new species (Hakuć-Błażowska et al. 2010). Despite this, growing global awareness and concern for ecosystems provides an opportunity for farmers to introduce new species into aquaculture and to develop their rearing protocols for stocking purposes and supporting natural populations.

One such species is blue bream, *Ballerus ballerus* (L.), a rheophilous cyprinid that inhabits the lakes and lower reaches of the larger rivers of the North Sea and Baltic Sea catchments (Weser, Elbe, Oder, Vistula, up to the Neva Basin, southern Sweden and southern Finland), the Danube basin (from upper Austria, Lake Neusiedler and Platten), the northern tributaries of the Black Sea and the Sea of Azov (Dniester, Dnieper, Don), up to the Volga and the Urals (Hesse and Witkowski 1996, Tadajewska 2000). The body shape of blue bream resembles those of white bream, *Blicca bjoerkna* (L.), and white-eye bream, *Ballerus sapa* (Pallas), but unlike these species, it has a relatively high number of scales on the lateral line 62–77 (white bream 50–58; white-eye bream 47–52; Levin and Levina 2014). It feeds on cladocera and copepod zooplankton and benthos. Despite its negligible economic value, it is an important species in the food pyramid of aquatic habitat reservoirs, especially in the Oder River catchment.

Developing efficient protocols for the production of stocking material under controlled conditions requires intensive, wide-ranging research on important aspects of breeding. Good examples are recent studies on the effects of temperature, stocking density, and feeding regime on larval maraena whitefish (*Coregonus maraena* (Bloch) (Sebesta et al. 2018, Stejskal et al. 2021a, 2021b), which facilitated developing a complete protocol for producing stocking material of this species. A suitable reproduction method under controlled conditions using hormonal agents has already been successfully developed for blue bream, *Ballerus ballerus* (L.) (Piech and Kujawa 2021). A feeding model for this species has also been developed (Piech and Kujawa 2022), and the effects of different levels of water salinity on the breeding parameters of the larvae of this species have been investigated (Piech and Kujawa 2023).

The aim of this study was to investigate the effects of stocking density and water temperature on the growth and survival of larval blue bream, *B. ballerus*, under controlled conditions.

Materials and Methods

The blue bream spawners were caught with gill-nets in mid-May during their natural spawning period in Lake Dąbie (northwest Poland). The larval blue bream originated from reproduction carried out under controlled conditions (Piech and Kujawa 2021).

Stocking density

Larval blue bream were reared in a RAS comprising 12 flow-through tanks designed for rearing larvae. Each tank had a working volume of 25 dm^3. The larval blue bream (5 days post hatch (DPH); 7.6 mm average body length) were counted and placed in the tanks at densities of 20, 40, 80, and 120 indiv. dm^{-3}. The stocking densities of single tanks were 500, 1,000, 2,000, and 3,000 larvae. The water temperature during rearing was 25.0 ± 0.2°C. The stocking densities tested in this study were chosen based on Kujawa (2004).

Temperature

Each experimental system consisted of three rearing tanks, each of which had a working volume of 25

dm^3. Larval blue bream, 5 DPH with an average body length of 7.6 mm, were counted and placed in each of the rearing tanks at a density of 40 indiv. dm^{-3}. The stocking density of a single tank was 1,000 larvae. The water temperatures in the variants were 15.0, 20.0, 25.0, and 30.0 ± 0.2°C. The temperatures tested in this study were chosen based on Kujawa et al. (2015).

Each of the experimental systems used to test the effects of temperature on the growth and survival of larval blue bream included a 200 dm^3 filter tank with a floating medium biological bed. The filter medium was bactoballs used in denitrification filters (AB Aqua Medic GmbH, Bissendorf, Germany). In the mini circuit, in which the effects of stocking density on larval blue bream growth and survival were tested, the filter tank had a capacity of 800 dm^3. To ensure adequate oxygen conditions, a RESUN LP 100 membrane blower (Shenzhen XingRisheng Industrial Co. Ltd., Shenzhen, China) was also used. Air was distributed in the filter tanks using silicon tube diffusers (Akwatech Systemy Sp. K., Poznań, Poland). Aeration cubes were installed in each of the rearing tanks through which air from the blower was also pumped. A sprinkler system provided a continuous supply of oxygenated, purified water to the tanks.

The water oxygen content was measured with a YSI multiparameter meter (YSI Incorporated Brannum Lane Yellow Springs, Ohio, USA) and was within 6.5–7.8 mg O_2 dm^{-3}, the water pH range was 7.1–7.3. The ammonia and nitrite contents were measured in the morning with a HANNA INS HI 83200 with reagents (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA), and neither was detected in the water during the experiment (Nowosad et al. 2013).

Sample collection

Monitoring measurements of larval weight and total length were done every 4 d (on days 1, 5, 9, 13, 17, and 21 of rearing). Each sample comprised thirty individuals (n=30) caught randomly from each tank. These were collected in the morning before feeding. The fish were weighed to the nearest 0.1 mg and measured to the nearest 0.1 mm.

During the experiment, the number of dead larvae was counted daily and the final survival rate percentage was calculated. This was expressed as the ratio of the number of larvae at the end of rearing to the number of larvae at the start of the experiment. Cumulative mortality curves were plotted for each rearing variant based on daily counts of dead larvae. Average larval weight gain (mg) was calculated for larvae from each experimental group at the end of the three-week rearing period (Imanpoor et al. 2012). Measurements were used to calculate survival, the index of total length gain per unit time (ITL), specific growth rate (SGR), survival, and larval biomass (SBR) (Brown 1957, Peňáz et al. 1989). These values were used to calculate the relative growth rate (RGR) and the relative biomass growth rate (RBR) from the beginning of feeding to the end of the experiment (Myszkowski 1997). Growth rates (SGR and RGR) for body length were calculated in the same way.

Fish feeding

The larval blue bream were fed manually *ad libitum* four times daily at three-hour intervals (08:00, 11:00, 14:00, 17:00; Piech and Kujawa 2022). The food was live brine shrimp, *Artemia* sp., nauplii (Ocean Nutrition Europe, Essen, Belgium) (Sorgeloos et al. 1977).

Data Analysis

The number of dead fish recorded daily were used to plot cumulative mortality curves for each fish rearing variant. To compare results, the relative final mean length (RFL), the relative final mean weight (RFW), and the relative final mean biomass (RFB) of the experimental fish were calculated, assuming that the length, weight, and biomass of the control fish (21 d feeding regime with live brine shrimp nauplii) at the end of the experiment was 100%. Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$; Duncan 1955) was used to determine the significance of differences in mean

Table 1
Results of rearing larval blue bream (*B. ballerus*) at stocking densities of 20,40, 80, and 120 indiv. dm^{-3}. Mean value ± SD. Results in rows with the same letter index are not statistically significantly different (α = 0.05)

	Experimental groups			
Parameter	20	40	80	120
Initial mean body length (mm)	7.6 ± 0.1^a	7.6 ± 0.1^a	7.6 ± 0.1^a	7.6 ± 0.1^a
Initial mean body weight (mg)	2.2 ± 0.1^a	2.2 ± 0.1^a	2.2 ± 0.1^a	2.2 ± 0.1^a
Final mean body length (mm)	26.8 ± 0.9^a	24.6 ± 0.7^a	22.4 ± 0.9^b	20.1 ± 1.2^b
Final mean body weight (mg)	69.4 ± 3.2^a	64.2 ± 3.5^a	56.1 ± 3.2^b	49.5 ± 3.1^c
Initial stock (indiv.)	500	1000	1500	3000
Final stock (indiv.)	473.0±10.97	942.0±14.11	1397.0±37.0	2743.0±57.0
Survival (%)	94.6 ± 1.1^a	94.2 ± 1.4^a	93.1 ± 3.7^a	91.4 ± 5.7^a
Increase in total length (ITL) (mm d^{-1})	0.91 ± 0.04^a	0.81 ± 0.03^a	0.70 ± 0.04^b	0.60 ± 0.06^c
Relative growth rate (RGR) for weight (% d^{-1})	17.86 ± 0.26^a	17.43 ± 0.31^a	16.68 ± 0.32^b	15.98 ± 0.35^c
Relative growth rate (RGR) for length (% d^{-1})	6.18 ± 0.18^a	5.75 ± 0.15^a	5.28 ± 0.20^b	4.74 ± 0.30^b
Relative growth rate (RBR) for biomass (% d^{-1})	17.55 ± 0.26^a	17.09 ± 0.31^b	16.28 ± 0.32^c	15.49 ± 0.34^d
Biomass (g)	1.31 ± 0.06^d	2.42 ± 0.13^c	3.13 ± 0.18^b	5.43 ± 0.34^a
Biomass (g dm^{-3})	32.83 ± 1.51^d	60.48 ± 3.30^c	78.37 ± 4.47^b	135.78 ± 8.50^a

lengths and weights among the fish from different experimental groups. Survival percentages were normalized (angular transformation), and differences were significant at α = 0.05 (Sokal and Rohl 1981). The results were processed statistically in Excel 16.0 (Microsoft, Redmond, WA, USA) and Statistica 13.0 for Windows (StatSoft, Inc., Tulsa, OH, USA).

Results

The smallest larvae obtained were reared at a stocking density of 120 indiv. dm^{-3}. On the last day of rearing, their average weight was 49.5 ± 3.1 mg at an average length of 20.1 ± 1.2 mm. At a stocking density of 80 indiv. dm^{-3}, the average weight was 56.1 ± 3.2 mg at an average length of 22.4 ± 0.9 mm. At a stocking density of 40 indiv. dm^{-3}, the average weight of the larvae was 64.2 ± 3.5 mg at an average length of 24.6 ± 0.73 mm. The average weight of the largest larvae was 69.4 ± 3.2 mg at an average length of 26.8 ± 0.94 mm at a stocking density of 20 indiv. dm^{-3} (Figs. 1-2).

The highest larval blue bream biomass of 135.78g (8.5 g dm^{-3}) was obtained at the stocking density of 120 indiv. dm^{-3}. The lowest larval biomass was obtained at the stocking density of 20 indiv. dm^{-3} at just 32.83 g (1.51 g dm^{-3}). Table 1 presents the results of other breeding indicators studied such as RGR and ITL (Table 1).

During the 21-day rearing period, the lowest mortality was observed at the stocking density of 20 indiv. dm^{-3} (Fig. 3). Nearly 94.6% of the individuals from the initial stock survived the experiment. The survival percentages at the stocking densities of 40 and 80 indiv. dm^{-3} were slightly worse, but statistically insignificant, at 94.2 and 93.1%, respectively. The lowest larval survival rate was observed at the stocking density of 120 indiv. dm^{-3} with 91.4% of larvae from the initial stock surviving (Figure 3). The larvae reared at a water temperature of 15°C were the smallest (Figs. 4-5).

On the last day of rearing, the average weight of larvae from the water temperature of 15°C was 34.2 ± 3.1 mg at an average length of 16.8 ± 1.14 mm. At a water of temperature 20°C, the average weight was 51.3 ± 0.1 mg at an average length of 21.1 ± 0.73 mm. At the water temperature of 25°C, the average larval weight was 65.8 ± 0.1 mg at an average length of 25.3 ± 0.95 mm. The highest average larval weight was 80.1 ± 0.1 mg at an average length of 28.4 ± 1.4

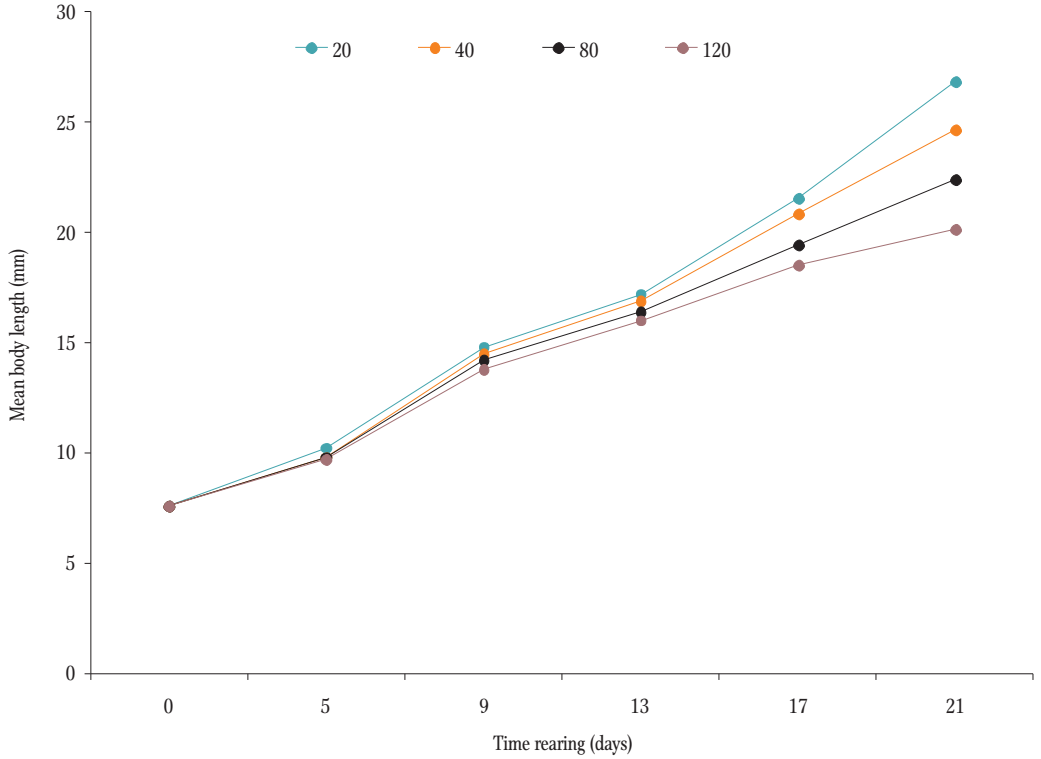


Figure 1. Increases in total lengths of larval blue bream (*B. ballerus*) reared at stocking densities of 20, 40, 80, and 120 indiv. dm^{-3}.

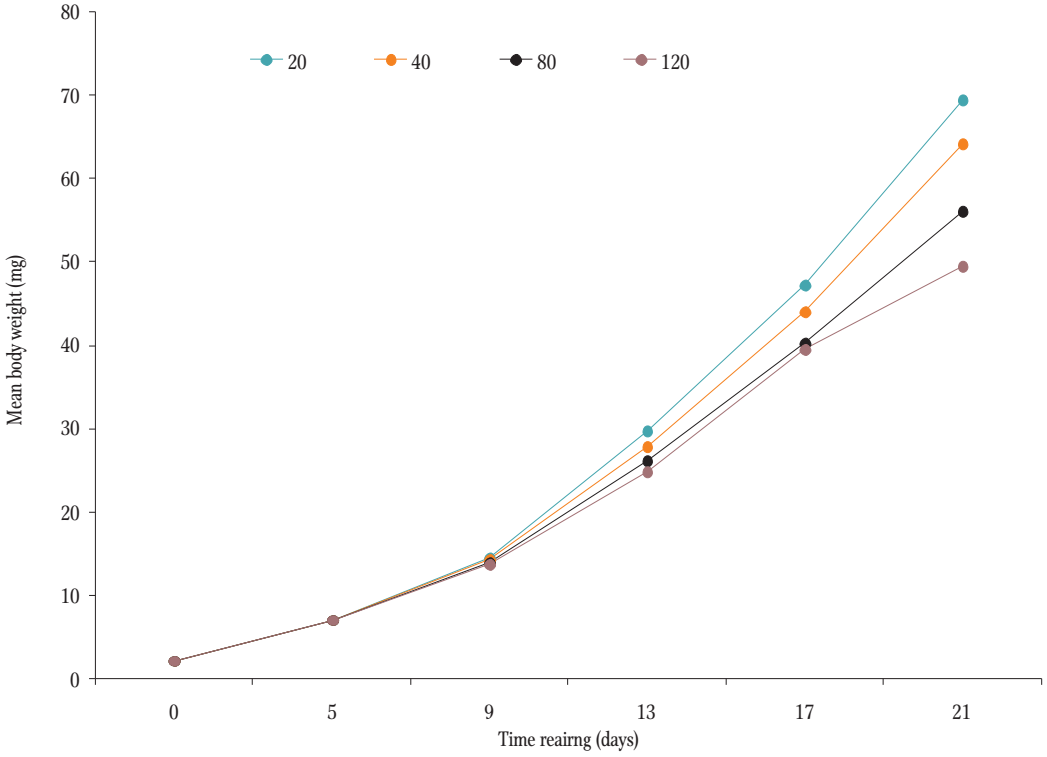


Figure 2. Increases in the body weights of larval blue bream (*B. ballerus*) reared at stocking densities of 20, 40, 80, and 120 indiv. dm^{-3}.

Table 2
Results of rearing larval blue bream (*B. ballerus*) at water temperatures of 15, 20, 25, and 30°C ± 0.2°C. Mean value ± SD. Results in rows with the same letter index are not statistically significantly different (α = 0.05)

	Experimental groups			
Parameter	15	20	25	30
Initial mean body length (mm)	7.6 ± 0.1^{a}	7.6 ± 0.1^{a}	7.6 ± 0.1^{a}	7.6 ± 0.1^{a}
Initial mean body weight (mg)	2.2 ± 0.1^{a}	2.2 ± 0.1^{a}	2.2 ± 0.1^{a}	2.2 ± 0.1^{a}
Final mean body length (mm)	16.8 ± 1.14^{d}	21.1 ± 0.73^{c}	25.3 ± 0.95^{b}	28.4 ± 1.4^{a}
Final mean body weight (mg)	34.2 ± 3.1^{d}	51.3 ± 0.1^{c}	65.8 ± 0.1^{b}	80.1 ± 0.1^{a}
Initial stock (indiv.)	1000	1000	1000	1000
Final stock (indiv.)	976.0±5.6	949.0±7.5	954.0±9.5	952.0±4.6
Survival (%)	97.6 ± 0.56^{a}	94.9 ± 0.75^{b}	95.4 ± 0.95^{b}	95.2 ± 0.46^{b}
Increase in total length (ITL) (mm d^{-1})	0.44 ± 0.05^{d}	0.64 ± 0.03^{c}	0.84 ± 0.05^{b}	0.99 ± 0.07^{a}
Relative growth rate (RGR) for weight (% d^{-1})	13.96 ± 0.49^{d}	16.18 ± 0.38^{c}	17.56 ± 0.27^{b}	18.67 ± 0.24^{a}
Relative growth rate (RGR) for length (% d^{-1})	3.85 ± 0.34^{d}	4.98 ± 0.17^{c}	5.89 ± 0.19^{b}	6.48 ± 0.25^{a}
Relative growth rate (RBR) for biomass (% d^{-1})	13.83 ± 0.49^{d}	15.89 ± 0.38^{c}	17.30 ± 0.27^{b}	18.39 ± 0.24^{a}
Biomass (g)	1.34 ± 0.12^{d}	1.95 ± 0.13^{c}	2.51 ± 0.12^{b}	3.05 ± 0.13^{a}
Biomass (g dm^{-3})	33.38 ± 3.03^{d}	48.68 ± 3.32^{c}	62.77 ± 3.05^{b}	76.26 ± 3.24^{a}

mm at a water temperature of 30°C. The highest larval blue bream biomass of 76.26 (3.24 g dm^{-3}) was obtained at a water temperature of 30°C, while the lowest of just 33.38 g (3.03 g dm^{-3}) was obtained at a water temperature of 15°C (Table 2).

The lowest mortality observed was at a water temperature of 15°C during the 21-day rearing period (Figure 6), and almost 97.6% of the individuals from the initial stock survived. Slightly lower, but statistically insignificant, survival rates were observed at

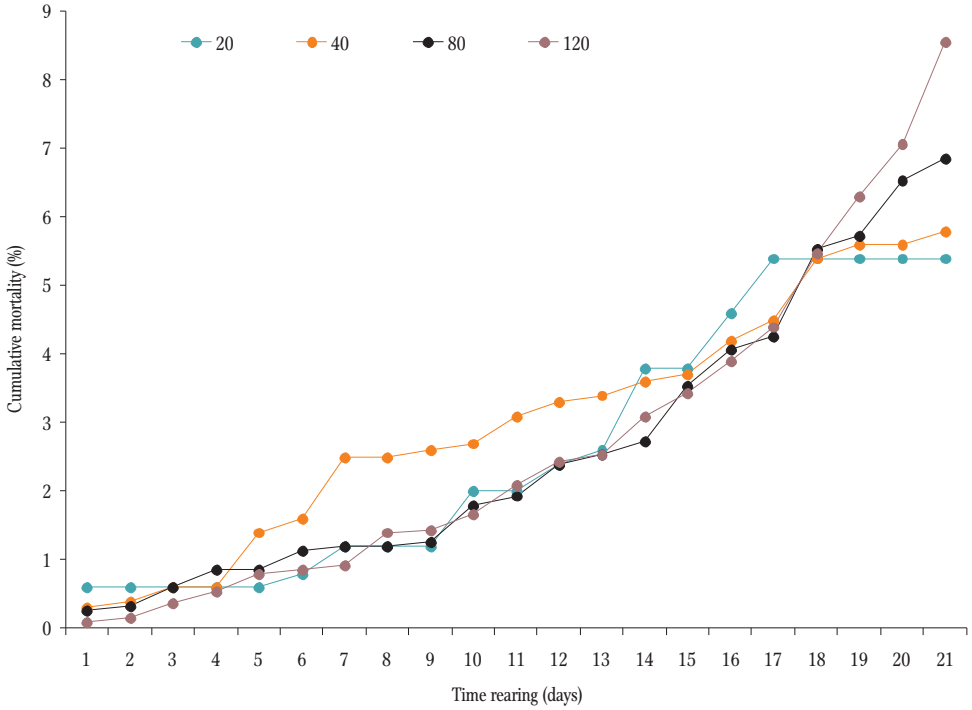


Figure 3. Cumulative mortality of larval blue bream (*B. ballerus*) reared at stocking densities of 20, 40, 80, and 120 indiv. dm^{-3}.

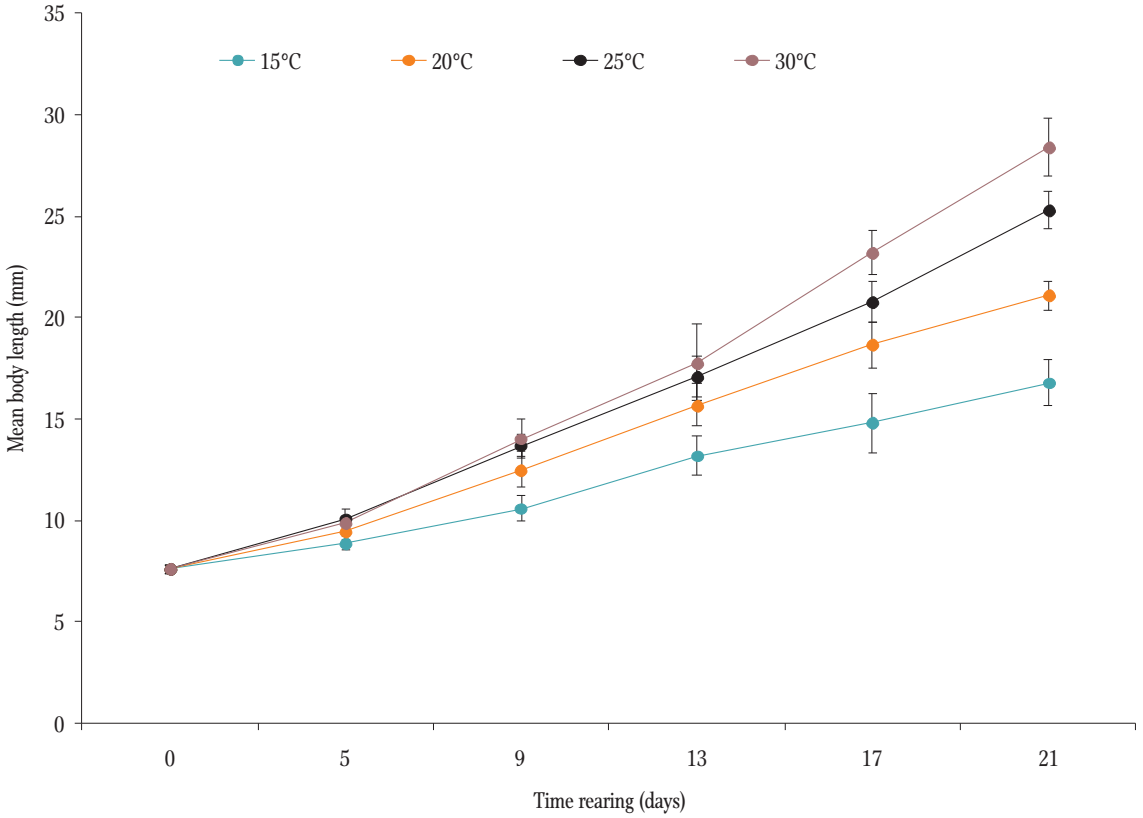


Figure 4. Increases in total lengths of larval blue bream (*B. ballerus*) reared in water temperatures of 15, 20, 25, and 30 ± 0.2°C.

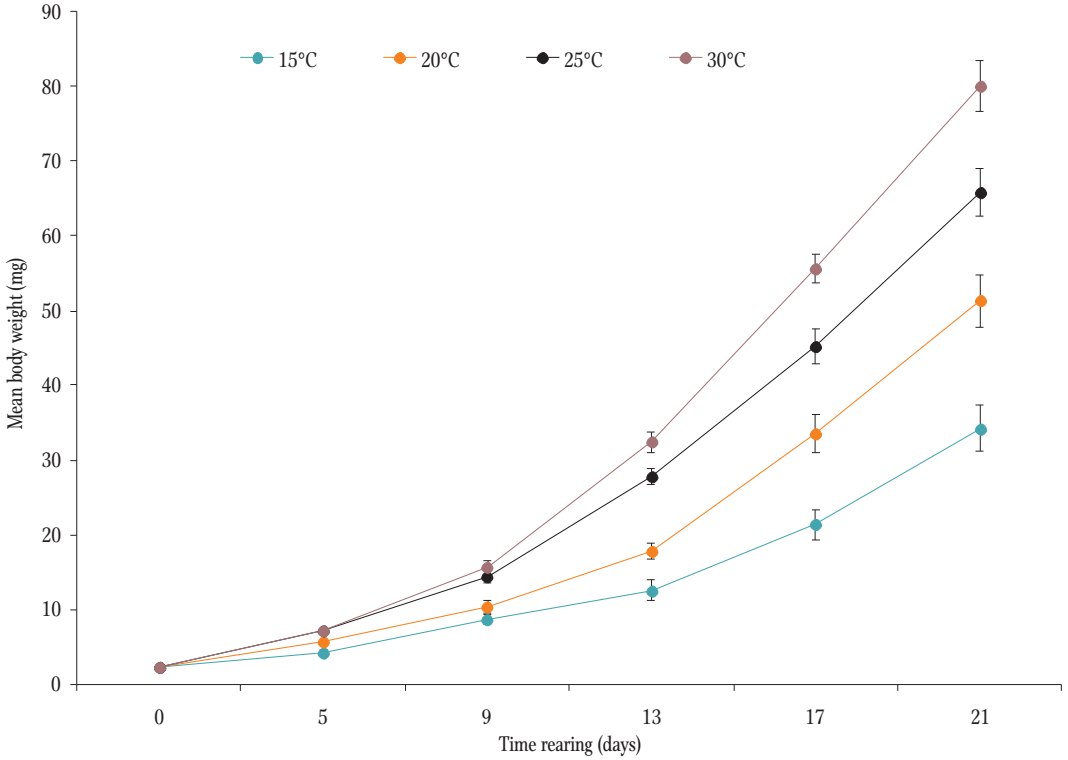


Figure 5. Increase in total weight of larval blue bream (*B. ballerus*) reared in water temperatures of 15, 20, 25, and 30 ± 0.2°C.

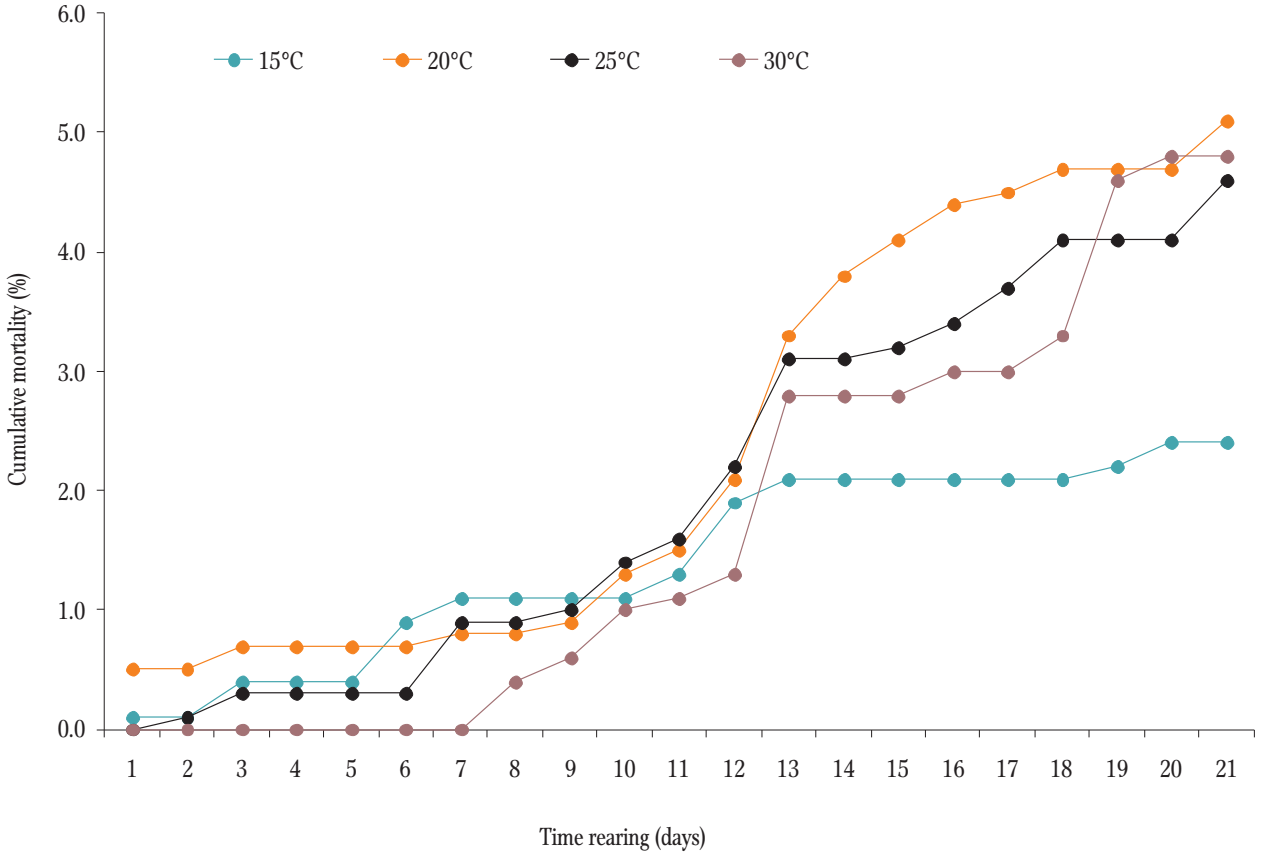


Figure 6. Cumulative mortality of larval blue bream (*B. ballerus*) reared in water temperatures of 15, 20, 25, and 30 ± 0.2°C.

water temperatures of 25 and 30°C at 95.4 and 95.2%, respectively. The lowest larval survival rate was observed at a water temperature of 20°C, in which 94.9% of the larvae from the initial stock survived (Table 2).

Discussion

The main role of aquaculture is to produce fish and aquatic invertebrates as sources of valuable, healthy food. Additionally, it is a conservation tool for species and specific populations. Consequently, breeding and rearing technologies have been or are being developed not only for fish species that are, or potentially could become, valuable raw materials for food production, but also for species the abundance of which in open waters is declining to the extent that they are threatened with extinction (Kujawa et al. 2019, Lepić et al. 2020, Kujawa and Piech 2021, Nowosad et al. 2021b, Szmyt et al. 2021). Researchers in this field are also interested in fish species that are of no economic importance, but are valuable components of aquatic ecosystems and their biodiversity. This was the case for several species of rheophilous cyprinid fishes that are of no economic importance and/or do not have a high conservation status, including: ide, *Leuciscus idus* (L.) (Cejko et al. 2010, Kupren et al. 2011, Targońska et al. 2011a, 2012, Kucharczyk et al. 2020); chub, *Squalius cephalus* (L.) (Krejszeff et al. 2008, Krejszeff et al. 2010, Kupren et al. 2011); common dace, *Leuciscus leuciscus* (L.) (Cejko et al, 2012, Nowosad et al. 2014, Targońska et al. 2015, Kucharczyk et al. 2019); barbel, *Barbus barbus* (L.) (Targońska et al. 2011b, Żarski et al. 2011, Nowosad et al. 2016, 2020, 2021, Prusińska et al. 2020); rudd, *Scardinius erythrophthalmus* (L.) (Kucharczyk et al. 1997a);

and asp, *Leuciscus aspius* (L.) (Kujawa et al. 1997, Targońska et al. 2010).

For many fish species, variation in individual growth can lead to changes in population productivity since size affects survival, fecundity, and reproduction. Variation in growth results from a number of aspects that are dependent and independent of stocking density (Matthias et al. 2018). This is important for intensive rearing under controlled conditions (Karakatsouli et al. 2007, 2015), and particularly so for larvae. Aste et al. (2009) investigated the effects on larval African catfish (*Clarias gariepinus* (Burchell)) stocking density in RAS on rearing parameters ranging from 1 to 25 individuals per l, and they report that the optimum density level was 15 larvae per l. Santos et al. (2020) reared larval cachama (*Colossoma macropomum* (Cuvier)) in a RAS and analyzed the effect of initial stocking densities of 10, 30, and 50 indiv. dm^{-3} on rearing parameters. They found it was possible to rear this species successfully at the highest stocking density. Szkudlarek and Zakęś (2007) analyzed the effects of stocking density on larval pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), growth and survival and found that increasing maximum larval density (100 indiv. dm^{-3}, range 25–100) between 4 and 18 DPH had a favorable effect on survival. In further larval pikeperch rearing at densities of 6 to 15 indiv. dm^{-3}, the highest survival and growth rates were obtained at the highest density. However, the proper density depends on the species, initial larval size, feeding regime, food type, and water temperature. One example is the mass rearing of larval burbot (*Lota lota* (L.)) at a density of 1,000 indiv. dm^{-3} (Żarski et al. 2009).

In the present study on larval blue bream, the larvae grew fastest at the lowest density (20 indiv. dm^{-3}). In this group, they had the highest, statistically significant RGR values for weight and length (%-d^{-1}) and the highest mean length and weight at the end of rearing. Similar observations were recorded for asp, chub, and ide, which also had the highest weights and total lengths at the lowest stocking densities tested (Żarski et al. 2008, Kupren et al. 2011). Statistically significant differences in the mean weights of larvae from different test groups appeared on 17 d of rearing, while differences in length were noted slightly earlier on 13 d of rearing. However, Kupren et al. (2011) reported differences in larval lengths in the first (asp) or third (ide, chub) weeks of rearing. The survival rate of larval blue bream after the end of rearing in all density variants was high and ranged from 91.4 to 94.6%, and no statistical differences were found among the experimental groups. Kupren et al. (2011) reported similar results and found that stocking density had no significant effect on larval asp, chub, or ide mortality, and they demonstrated that the larvae of all three species could be reared at densities of up to 400 indiv. dm^{-3} with a slight reduction in growth rates and no negative effects on survival or development.

In addition to determining the correct stocking density and food for larval fish, determining optimum rearing temperature is important. This temperature should be one at which the larvae have a high survival rate while they simultaneously grow to similar individual sizes. Research continues to be conducted on determining the ranges of optimum temperatures for embryonic and larval development in fishes. This is because it is one of the most important abiotic factors influencing larval growth rates, growth, and survival during intensive rearing under controlled conditions. Studies conducted on cyprinid fish such as asp, sichel (*Pelecus cultratus* (L.)), and common bream (*Abramis brama* (L.) have shown that, in many cases, the optimal temperature range for their rearing under controlled conditions is between 25°C and sometimes even 30°C (Kucharczyk et al. 1997a, 1998, Kujawa et al. 1997, 2015). These temperatures are often significantly higher than those occurring during embryonic and larval development in the wild (Kujawa et al. 1997, Kupren et al. 2011). Learning about the aspects of temperature effects on development, survival, and the possibility of developmental deformities is extremely important for rearing efficiency and the quality of stocking material (e.g., Kupren et al. 2010, 2011, Łączyńska et al. 2016, Nowosad et al. 2021b).

In the present study, as for most of cyprinid fishes studied, temperatures in the range of 25–30 °C can be considered optimal. These are very similar to

the results obtained during the rearing of larval sichel (Kujawa et al. 2015) and common bream (Kucharczyk et al. 1997b, 1998) and marginally higher, although they overlap, with those for asp (Kujawa et al. 1997), ide, dace, and chub (Kupren et al. 2010, 2011). For other freshwater fish species that often live in the same area as blue bream, such as European whitefish, the optimum temperatures for larval development are much lower in the 15–19°C range (Sebesta et al. 2018). However, a similar pattern is also observed here in that the optimum temperatures for larvae reared under controlled conditions are higher than those found in the wild. Regardless of the species studied, this indicates that larvae exhibit extremely high plasticity with regard to thermal conditions. It is clear, however, that these conditions cannot be compared indiscriminately. Optimal thermal conditions are generally applied in RAS during fish reproduction and embryonic and larval development (e.g., for ide and dace 12–14°C - Targońska et al. 2011, Cejko et al. 2012, Nowosad et al. 2014, Kucharczyk et al. 2019, 2020). However, temperature fluctuations do occur in the wild, especially in lotic waters and in lake shallows, which are, after all, the usual spawning grounds of these fishes and the rearing sites of their juveniles. Studies conducted under controlled conditions and in the natural environment indicate that large temperature fluctuations, even within the range of optimum temperatures, can disrupt spawning, reduce fecundity and gamete quality, cause high embryo and larval mortality, and the occurrence of developmental deformities (Kupren et al. 2010, 2011, Nowosad et al. 2014, Targońska et al. 2014). However, this provides very important information for producers of stocking material; namely, that while larval rearing temperatures do not have to hit the optimal point precisely, they should be fairly constant.

The present study confirmed that larval blue bream are highly tolerant of high stocking densities and high temperatures that are optimal for rheophilic fish. The best larval blue bream rearing results and the lowest mortality rates were obtained when this species was reared at the lowest stocking density of 20 indiv. dm^{-3}. The highest temperature tested (30°C) was optimal and produced the highest larval blue bream survival and growth rates. For large-scale blue bream stocking material production, it is recommended to apply lower densities and a temperature of 25° to obtain optimal rearing results both biologically and to lower costs of heating water in the RAS.

Author contributions. P.P. and R.K. designed the study. P.P. conducted the field investigations and provided environmental data. R.K. managed the database and did some of the analyses. R.K. conducted the statistical analyses. P.P, R.K., J.N, D.K., K.T., and M.T. did some of the data analyses and drafted the manuscript. All authors contributed to writing the manuscript and approved the final version that was submitted.

ORCID iD

Przemysław Piech https://orcid.org/0000-0003-0538-5758
Roman Kujawa https://orcid.org/0000-0003-0925-1204
Joanna Nowosad https://orcid.org/0000-0001-9491-0141
Dariusz Kucharczyk https://orcid.org/0000-0002-0889-0656
Katarzyna Targońska https://orcid.org/0000-0002-6273-2587
Mariusz Szmyt https://orcid.org/0000-0001-8799-9088

References

Atse, B.C., Konan, K.J., Alla, Y.L., Pangini, K. (2009). Effect of rearing density and feeding regimes on growth and survival of African catfish, *Heterobranchus longifilis* (Valenceinnes, 1840) Larvae in a closed recirculating aquaculture system. Journal of Applied Aquaculture, 21, 183–195.

Brown, M. E. (1957). Experimental studies on growth. In: The physiology of fishes. (Ed.) M.E. Brown, Academic Press, New York, 361–400.

Cejko, B. I., Kowalski, R. K., Kucharczyk, D., Targońska, K., Krejszeff, S., Żarski, D., Glogowski, J. (2010). Influence of the length of time after hormonal stimulation on selected parameters of milt of ide *Leuciscus idus* L. Aquaculture Research, 41, 804–813.

Cejko, B. I., Targońska, K., Kowalski, R. K., Żarski, D., Sarosiek, B., Kucharczyk, D., Glogowski, J. (2012). The effectiveness of hormonal preparations (Ovopel, Ovaprim, LHRH a, hCG and CPE) in stimulating spermiation in dace *Leuciscus leuciscus* (L.). Journal of Applied Ichthyology, 28, 873–877.

Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F-test. Biometrics, 11, 1–42.

Goryczko, K., Witkowski, A. (2009). Stocking management and environmental protection. Chrońmy Przyrodę Ojczystą, 65, 93–98 (in Polish).

Gorzel, M., Kornijów, R. (2004). Biological methods for assessing river water quality. Kosmos, 53, 183–191 (in Polish).

Hakuć-Błażowska, A., Kupren, K., Turkowski, K., Targońska, K., Żarski, D., Kucharczyk, D. (2010). A comparison of the economic effectiveness of various spawning agents for stimulating the reproduction of the cultured and wild forms of the common barbel *Barbus barbus* (L.). Polish Journal of Natural Sciences, 25, 272–286.

Heese, T., Witkowski, A. (1996). Conservation of rare and threatened fish species in Poland: Current state and perspectives. Zoologica Poloniae, 41(Supl.), 5–6 (in Polish).

Imanpoor, M. R., Najafi, E., Kabir, M. (2012). Effects of different salinity and temperatures on the growth, survival, haematocrit and blood biochemistry of Goldfish (*Carassius auratus*). Aquaculture Research, 43, 332–338.

Karakatsouli, N., Papoutsoglou, S. E., Manolessos, G. (2007). Combined effects of rearing density and tank colour on the growth and welfare of juvenile white sea bream *Diplodus sargus* L. in a recirculating water system. Aquaculture Research, 38, 1152–1160.

Karakatsouli, N., Kassianos, N., Papoutsoglou, S.E. (2015). Effects of rearing density and tank colour on juvenile sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) growth performance. Aquaculture International, 23, 943–953.

Krejszeff, S., Kucharczyk, D., Kupren, K., Targońska, K., Mamcarz, A., Kujawa, R., Kaczkowski, Z., Ratajski, S. (2008). Reproduction of chub, *Leuciscus cephalus* L., under controlled conditions. Aquaculture Research, 39, 907–912.

Krejszeff, S., Targońska, K., Żarski, D., Kucharczyk, D. (2010). Artificial reproduction of two different spawn-forms of the chub. Reproductive Biology, 10, 67–74.

Kucharczyk, D., Nowosad, J., Kucharczyk, D. J., Kupren, K., Targońska, K., Wyszomirska, E., Kujawa, R. (2019). Out-of-season artificial reproduction of common dace (*Leuciscus leuciscus* L.) under controlled conditions. Animal Reproduction Science, 202, 21–25.

Kucharczyk, D., Nowosad, J., Wyszomirska, E., Cejko, B. I., Arciuch-Rutkowska, M., Juchno, D., Boroń, A. (2020). Comparison of artificial spawning effectiveness of hCG, CPH and GnRHa in combination with dopamine inhibitors in a wild strain of ide *Leuciscus idus* (L.) in hatchery conditions. Animal Reproduction Science, 221, 106543.

Kucharczyk, D., Kujawa, R., Mamcarz, A., Wyszomirska, E. (1997a). Induced spawning in rudd (*Scardinius erythtrophthalmus* L.). Polish Archives of Hydrobiology, 44, 209–213.

Kucharczyk, D., Luczynski, M., Kujawa, R., Czerkies, P. (1997b). Effect of temperature on embryonic and larval development of bream (*Abramis brama* L.). Aquatic Sciences, 59, 214–224.

Kucharczyk, D., Luczynski, M., Kujawa, R., Kaminski, R., Ulikowski, D., Brzuzan, P. (1998). Influences of temperature and food on early development of bream (*Abramis brama* L.). Archiv für Hydrobiologie, 141, 243–256.

Kucharczyk, D., Malinovskyi, O., Nowosad, J., Kowalska, A., Cejko, B. I. (2021). Comparison of responses to artificial spawning of ruffe (*Gymnocephalus cernua*) specimens captured from their natural habitat to those produced in cultured conditions. Animal Reproduction Science, 225, 106684.

Kujawa, R., Mamcarz, A., Kucharczyk, D. (1997). Effect of temperature on embryonic development of asp (*Aspius aspius* L.). Polish Archives of Hydrobiology, 44, 139–143.

Kujawa, R. (2004). Biological foundations for rearing rheophilic cyprinid species under controlled conditions – Rozprawy i monografie 88, Wyd. UWM, Olsztyn, 88 p. (in Polish).

Kujawa, R., Furgała-Selezniow, G., Mamcarz, A., Lach, M., Kucharczyk, D. (2015). Influence of temperature on the growth and survivability of sichel larvae *Pelecus cultratus* reared under controlled conditions. Ichthyological Research, 62, 163–170.

Kujawa, R., Cejko, B. I., Fopp-Bayat, D., Judycka, S., Glińska-Lewczuk, K., Timofte, C. M., Nowosad, J., Kucharczyk, D. (2019). Reproduction of endangered river lamprey (*Lampetra fluviatilis*) in controlled conditions. Animal reproduction science, 203, 75–83.

Kujawa, R., Piech, P. (2021). Rearing of Bitterling (*Rhodeus amarus*) Larvae and Fry under Controlled Conditions for the Restitution of Endangered Populations. Animals, 11, 3534.

Kupren, K., Mamcarz, A., Kucharczyk, D. (2010). Effects of temperature on survival, deformations rate and selected parameters of newly hatched larvae of three rheophilic cyprinids (genus *Leuciscus*). Polish Journal of Natural Sciences, 25, 299–312.

Kupren, K., Żarski, D., Krejszeff, S., Kucharczyk, D. Targońska, K. (2011). Effect of stocking density on growth, survival and development of asp *Aspius aspius* (L.), ide *Leuciscus idus* (L.) and chub *Leuciscus cephalus* (L.) larvae during initial rearing under laboratory conditions. Italian Journal of Animal Science, 10, e34.

Lepič, P., Blecha, M., Kozák, P. (2020). Intensive winter culture of *Chondrostoma nasus* (Linnaeus, 1758) and *Vimba vimba (*Linnaeus, 1758) for spring restocking. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 20, 97–102.

Levin, B. A., Levina, M. A. (2014). Poly- and oligomerization of scales in the blue bream *Ballerus ballerus* (*Cyprinidae*) as a consequence of thyroid status regulation. Journal of Applied Ichthyology, 30, 809–813.

Łączyńska, B., Palińska-Żarska, K., Nowosad, J., Biłas, M., Krejszeff, S., Müller, T., Kucharczyk, D., Żarski, D. (2016). Effect of age, size and digestive tract development on weaning effectiveness in crucian carp, *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758). Journal of Applied Ichthyology, 32, 866–872.

Matthias, B. G., Ahrens, R. N. M., Allen M. S., Tuten, T., Siders, Z. A., Wilson, K. L. (2018). Understanding the effects of density and environmental variability on the process of fish growth. Fisheries Research, 198, 209–219.

Myszkowski, L. (1997). Pitfalls of using growth rate coefficients. Polskie Archiwum Hydrobiologii, 44, 389–396,

Nowosad, J., Żarski, D., Biłas, M., Dryl, K., Krejszeff, S., Kucharczyk, D. (2013). Dynamics of ammonia excretion in juvenile common tench, *Tinca tinca* (L.), during intensive rearing under controlled conditions. Aquaculture International, 21, 629–637.

Nowosad, J., Targońska, K., Chwaluczyk, R., Kaszubowski, R., Kucharczyk, D. (2014). Effect of temperature on the effectiveness of artificial reproduction of dace [*Cyprinidae* (*Leuciscus leuciscus* (L.))] under laboratory and field conditions. Journal of Thermal Biology, 45, 62–68.

Nowosad, J., Kucharczyk, D., Targońska, K., Wyszomirska, E., Chwaluczyk, R., Kupren, K. (2016). The Synergistic Effect of Temperature and Hormonal Stimulation on Spawning Efficiency of Common Barbel, *Barbus barbus* L. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 16, 517–524.

Nowosad, J., Dryl, K., Kupren, K., Kucharczyk, D. (2020). Inhibiting the influence of ovarian fluid on spermatozoa activation and spermatozoa kinetic characteristics in the common barbel *Barbus barbus*. Theriogenology, 158, 250–257.

Nowosad, J., Kupren, K., Biegaj, M., Kucharczyk, D. (2021a). Allometric and ontogenetic larval development of common barbel during rearing under optimal conditions. Animal, 15, 100107.

Nowosad, J., Kucharczyk, D., Sikora, M., Kupren, K. (2021b). Optimization of barbel (*Barbus barbus* L.) fertilization and effects of ovarian fluid when there are controlled conditions for gamete activations. Animal Reproduction Science, 224, 106652.

Peňáz, M., Prokeš, M., Kouřil, J., Hamáčková, J. (1989). Influence of water temperature on the early development and growth of the tench, *Tinca tinca*. Folia Zoologica, 38, 275–287.

Piech, P., Kujawa, R. (2021). Artificial reproduction of blue bream (*Ballerus ballerus* L.) as a conservative method under controlled conditions. Animals, 11, 1326.

Piech, P., Kujawa, R. (2022). Impact of replacing natural food with commercial feed on the growth and survival of blue bream larvae (*Ballerus ballerus*) under controlled conditions. Fisheries & Aquatic Life 30, 192–201.

Piech, P., Kujawa, R. (2023). Effect of different water salinities on the larvae of the blue bream *Ballerus ballerus* (Linnaeus, 1758) during rearing. Animals, 13(7), 1245.

Prusińska, M., Nowosad, J., Jarmołowicz, S., Mikiewicz, M., Duda, A., Wiszniewski, G., Sikora, M., Biegaj, M., Samselska, A., Arciuch-Rutkowska, M., Targońska, K., Otrocka-Domagała, I., Kucharczyk, D. (2020). Effect of feeding barbel larvae (*Barbus barbus* (L, 1758)) *Artemia* sp. nauplii enriched with PUFAs on their growth and survival rate, blood composition, alimentary tract histological structure and body chemical composition. Aquaculture Reports, 18, 100492.

Radwan, S., Mieczan, T., Plaska, W., Wojciechowska, W., Sender, J., Jaszczenko, P. (2002). The aquatic ecosystems of the Polesia region: Current state and directions of changes.. Acta Agrophysica, 66, 89–120 (in Polish).

Santos, E. L. R., Rezende, F. P., Moron, S. E. (2020). Stress-related physiological and histological responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to transportation in water with tea tree and clove essential oil anesthetics. Aquaculture, 523, 735164.

Sebesta, R., Kucharczyk, D., Nowosad, J., Sikora, M., Stejskal, V. (2018). Effect of temperature on growth and survival of maraena whitefish *Coregonus maraena* (Bloch 1779) larvae in controlled conditions. Aquaculture Research, 49, 3151–3157.

Sokal, R. R., Rohl, F. J. (1981). Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research, ed. 2. San Francisco. W. H. Freeman, 733.

Sorgeloos, P., Bossuyt, E., Lavińa, E., Baeza-Mesa, M., Persoone, G. (1977). Decapsulation of Artemia cysts: a simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture. Aquaculture, 12, 311–315.

Stejskal, V., Matousek, J., Sebesta, R., Nowosad, J., Sikora, M., Kucharczyk, D. (2021a). Stocking density effect on survival and growth of early life stages of maraena whitefish, *Coregonus maraena* (Actinopterygii: Salmoniformes: *Salmonidae*). Acta Ichthyologica et Piscatoria, 51, 139–144.

Stejskal, V., Gebauer, T., Sebesta, R., Nowosad, J., Sikora, M., Biegaj, M., Kucharczyk, D. (2021b). Effect of feeding strategy on survival, growth, intestine development, and liver status of maraena whitefish *Coregonus maraena* larvae. Journal of the World Aquaculture Society, 52, 829–842.

Szkudlarek, M., Zakęś, Z. (2007). Effect of stocking density on survival and growth performance of pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), larvae under controlled conditions. Aquaculture International, 15, 67–81.

Szmyt, M., Piech, P., Panasiewicz, G., Niewiadomski, P., Pietrzak-Fiećko, R. (2021). Gonadal steroid fluctuations and reproduction results of European grayling

(*Thymallus thymallus* L.) from broodstock farmed in a recirculation aquaculture system. Animal Reproduction Science, 224, 106648.

Śliwiński, J., Ostaszewska, T., Kamaszewska, M. (2016). Aquaculture as a tool for improving the status of rheophilous cyprinids in Poland: State of and perspectives for research.. Przegląd Naukowy Inżynieria i Kształtowanie Środowiska, 25, 239–248 (in Polish).

Tadajewska M. (2000). Blue bream, *Abramis ballerus*. In: The Freshwater Fishes of Poland (Ed.) M. Brylińska. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa: 257–261 (in Polish).

Targońska, K., Kucharczyk, D., Kujawa, R., Mamcarz, A., Żarski, D. (2010). Controlled reproduction of asp, *Aspius aspius* (L.) using luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) analogues with dopamine inhibitors. Aquaculture, 306, 407–410.

Targońska, K., Kucharczyk, D., Żarski, D., Cejko, B., Krejszeff, S., Kupren, K., Król, R., Dryl, K., Kowalski, K., Glogowski, J. (2011b). Artificial reproduction of wild and cultured barbel (*Barbus barbus*, *Cyprinidae*) under controlled conditions. Acta Veterinaria Hungarica, 59, 363–372.

Targońska, K., Kupren, K., Żarski, D., Król, R., Kucharczyk, D. (2011a). Influence of thermal conditions on successful ide (*Leuciscus idus* L.) artificial reproduction during spawning season. Italian Journal of Animal Science, 10(4), e50.

Targońska, K., Żarski, D., Krejszeff S., Kucharczyk, D. (2012). Influence of age of wild ide *Leuciscus idus* (L.) female on spawning effectiveness under controlled conditions. Italian Journal of Animal Science, 11, 342–346.

Targońska, K., Kupren, K., Palińska-Żarska, K., Mamcarz, A., Kujawa, R., Skrzypczak, A., Furgała-Selezniow, G., Czarkowski, T.K., Hakuć-Błażowska, A., Kucharczyk, D. (2014). Influence of temperature during four following spawning seasons on the spawning effectiveness of common bream, *Abramis brama* (L.) under natural and controlled conditions. Journal of Thermal Biology, 39, 17–23.

Targońska, K., Kupren, K., Kujawa, R., Mamcarz, A., Kaczkowski, Z., Glogowski, J., Kowalski, R.K., Żarski, D., Wyszomirska, E., Kucharczyk, D. (2015). Artificial reproduction of different dace, *Leuciscus leuciscus* (L.) populations as a method for biodiversity preservation. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 15, 477–485.

Zakęś, Z., Wunderlich, K., Szczepkowski, M., Szczepkowska, B. (2016). Rearing quality of of lake whitefish stocking material produced in aquaculture facilities with recirculating aquaculture system technology. Management of fish farms in 2016: Economic, legal, and ecological conditions, 155 (in Polish).

Żarski, D., Kucharczyk, D., Kwiatkowski, M., Targońska, K., Kupren, K., Krejszeff, S., Jamróz, M., Hakuć-Błażowska, A., Kujawa, R., Mamcarz, A. (2008). The effect of stocking density on the growth and survival of larval asp, *Aspius aspius* (L.), and European chub, *Leuciscus cephalus* (L.), during rearing under controlled conditions. Fisheries & Aquatic Life, 16, 371–381.

Żarski, D., Sasinowski, W., Kucharczyk, D., Kwiatkowski, M., Krejszeff, S., Targońska, K. (2009). Mass initial rearing of burbot *Lota lota* (L.) larvae under controlled conditions. Polish Journal of Natural Sciences 24, 76–84.

Żarski, D., Kupren, K., Targońska, K., Krejszeff, S., Furgała-Selezniow, G., Kucharczyk, D. (2011). The effect of initial larval stocking density on growth and survival in common barbel *Barbus barbus* (L.). Journal of Applied Ichthyology, 27, 1155–1158.

FISHERIES & AQUATIC LIFE (2022) 30: 192 - 201
Archives of Polish Fisheries
DOI 10.2478/aopf-2022-0018

RESEARCH ARTICLE

Impact of replacing natural food with commercial feed on the growth and survival of blue bream larvae (*Ballerus ballerus*) under controlled conditions

Przemysław Piech, Roman Kujawa

Received – 30 November 2022/Accepted – 27 December 2022. Published online: 31 December 2022; *©Inland Fisheries Institute in Olsztyn, Poland*
Citation: Piech, P., Kujawa, R. (2022). Impact of replacing natural food with commercial feed on the growth and survival of blue bream larvae (*Ballerus ballerus*) under controlled conditions. Fisheries & Aquatic Life 30, 192-201.

Abstract. The effect of replacing natural food with commercial feed on the growth and survival of blue bream, *Ballerus ballerus* (L.), larvae reared under controlled conditions was investigated. Live food, brine shrimp, *Artemia* sp. (A), nauplii, was replaced after four (A4P17), eight (A8P13), and 12 (A12P9) days with commercial feed (P). The control groups were larvae fed nauplii (A21) or feed (P21) exclusively for throughout the experiment. The density of larvae was 40 ind. dm^{-3}, and the rearing temperature was 25 ± 0.5°C. The highest blue bream larval growth rate in the groups fed the commercial feed tested was in group A12P9, in which larvae reached an average body weight of 56.1 mg with an average total length of 21.1 mm. These values were only slightly lower than those obtained in the A21 control sample. Final larval survival in each of the feeding groups ranged from 67% (A4P17) to 93% (A12P9). The larval lowest survival and growth parameters were recorded in control group P21, in which larvae received only commercial feed; this indicated the necessity of using natural food when rearing blue bream larvae.

Keywords. artemia, food replacement, blue bream, survival rate, growth rate, controlled conditions

P. Piech, [✉], R. Kujawa
Department of Ichthyology and Aquaculture, Faculty of Animal Bioengineering
University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland
E-mail: przemyslaw.piech@uwm.edu.pl

Introduction

Blue bream, *Ballerus ballerus* (L.), is one of the two representatives of the genus *Ballerus* inhabiting European inland waters and coastal lagoons. Its silhouette resembles that of bream, *Abramis brama* (L.), although the blue bream body is more elongated with a less steep dorsal profile. Its anal fin is much longer than that of bream (Szlachciak 2005). Blue bream is most often confused with white-eye bream, *Ballerus sapa* (Pall.), but unlike this species, blue bream has an upturned mouth and not an inferior one. Its distribution range is quite vast expanding over the systems of large rivers in the basin of the Caspian Sea (Ural and Volga rivers), the Baltic Sea (from the Oder to the Neva rivers), and the Black Sea (from the Kuban to the Danube rivers) (Tadajewska 2000). Recently, this range of occurrence has been shrinking dramatically, especially in Europe. This stems from a series of factors that have been affecting the biodiversity of aquatic ecosystems for many years. These include the persistently exploiting fish resources, anthropogenic transformations, polluting of aquatic environments, and introducing new species. Currently, relatively large, stable blue bream populations in Poland occur exclusively in the Szczecin Lagoon

© Copyright by Stanisław Sakowicz Inland Fisheries Institute in Olsztyn.
© 2022 Author(s). This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/).

and Lake Dąbie, although the number of specimens fluctuates considerably (Szlachciak 2005, Tadajewska 2000). In other waters, this species is seen as a faunistic peculiarity. Implementation of passive protection (size and protective periods) or simple active protection measures (protection of natural spawning areas, construction of artificial spawning sites) is successful only in slightly modified, slightly polluted water bodies.

A chance to prevent the blue bream from vanishing from Polish waters lies in aquaculture, which no longer functions as just a source of commercial fish for consumption, but which is playing an increasingly important role in saving endangered species (Kujawa and Piech 2021) and even those threatened with extinction (Kujawa et al. 2022). Stocking material obtained under controlled conditions is a form of the active protection of fishes (Zakęś and Demska-Zakęś 2011, Kujawa et al. 2019). Before launching efforts to culture blue bream stocking material, a method for its reproduction under controlled conditions was developed (Kujawa and Piech 2021). Afterward, the focus shifted to rearing blue bream larvae under controlled conditions. The rationale for this research was the lack of any data in the literature pertaining to the culture of blue bream larvae in artificial conditions. The development and then optimization of these stages of fish rearing can provide a safeguard in the event blue bream natural populations collapse and must be restored to sustain the biological diversity of waters. The aim of the current study was to determine how natural feed substituted with commercial diets affected the growth rates and survival of larval blue bream (*Ballerus ballerus*) under controlled conditions.

Materials and Methods

The blue bream larvae used in the present study were obtained from eggs incubated in Weiss jars at the hatchery of the Centre of Aquaculture and Ecological Engineering, at the University of Warmia and Mazury in Olsztyn. The blue bream spawners originated from Lake Dąbie (Poland). Sex products were obtained under controlled conditions following hormonal stimulation (Piech and Kujawa 2021). The water temperature during egg incubation was 19°C ± 0.5. During the experiment, after the yolk sacs were resorbed and the posterior chambers of swim bladders were filled, which occurred in water at a temperature of 20°C, blue bream larvae started swimming actively in search of food. When blue bream larvae started foraging actively, which occurred at five days post hatching (5 DPH), they were placed in 15 tanks with working capacities of 25 dm^3 each (three tanks for each experimental variant). The tanks were part of a recirculating aquaculture system (RAS) with a water temperature of 25°C (± 0.5). Each of the tanks was stocked with 1,000 blue bream larvae. The RAS was fitted with an efficient water filtration system composed of a biological bed and an external EHEIM Classic 1500 XL canister filter coupled with an EHEIM Universal 1262 pump with a maximum capacity of 3400 l h^{-1} (EHEIM GmbH & Co.KG, Deizisau, Germany). The water flow rate through the tanks was 0.20 dm^3 min^{-1}. Water was supplied to the tanks by sprinklers. The photoperiod was 12 h daylight and 12 h darkness. The first food fed to the larvae was live brine shrimp nauplii (*Artemia* sp.) (A) (Ocean Nutrition Europe, Essen, Belgium). This natural food was replaced after a set time with Perla Larva Proactive feed (P) (Skretting AI & Central Operations, Stavanger, Norway). This commercial feed is specifically formulated for fish larvae and has a particle size of 0.1–0.3 mm. Its ingredients include fish meal, shrimp meal, fish oil, wheat, yeast, lecithin, micronutrients, and the Protect® supplement. It has a very high protein content of the highest digestibility, unsaturated fatty acids, and phospholipids. Perla is a very stable feed that has excellent physical parameters. The food, both live brine shrimp nauplii and Perla Larvae Proactive feed, were supplied manually three times daily at 08:00, 12:00, and 16:00. Feed rations were adjusted to fish biomass the day after each sampling (days 6, 10, 14, 18). Fish in the different feeding variants were fed ad libitum.

The experiment comprised five feed variants: group A21 – only natural food; group A4P17 – natural food for four days followed by commercial feed for 17 days; group A8P13 – natural food for eight days followed by commercial feed for 13 days; group A12P9 – natural food for 12 days followed by commercial feed for nine days; group P21 – only commercial feed throughout the rearing period. The natural food was prepared according to the procedure described by Sorgeloos (Sorgeloos et al. 1977). The size of brine shrimp nauplii (instar I) was 430 microns. Every day, prior to the first feeding, unconsumed food and other debris were removed to maintain appropriate sanitary conditions. Dead larvae were also removed and counted to calculate mortality rates. The experiment ran for 21 days. The dissolved oxygen and the content of nitrogen compounds in the water were measured daily throughout the rearing period. The water oxygen content was measured with a YSI multiparameter meter (YSI Incorporated Brannum Lane Yellow Springs, Ohio, USA) and was within 7.1–7.4 mg O_2 dm^{-3}, the water pH ranged was 7.1–7.3. The ammonia and nitrite contents were measured in the morning (Nowosad et al. 2013) with a HANNA INS HI 83200 with reagents (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA), and neither was detected in the water during the experiment.

During the rearing period, the blue bream larvae were measured and weighed six times. The first, the zero measurement, was immediately after the tanks were stocked for every feeding variant, and subsequent measurements were performed on days 5, 9, 13, and 17 and at the end of the experiment on day 21. Thirty individuals from each tank were caught in the morning (before feeding). Before the measurements the larvae were sedated in a solution of MS-222 (tricaine methanesulphonate) (50 mg l^{-1} of water) and then weighed on an KERN ALJ 220-5 DNM analytical balance to the nearest 0.1 mg (KERN & Sohn GmbH, Ballingen, Germany). The larvae, which were still anaesthetised, were then placed on Petri plates with some water and observed under a LEICA MZ16Z stereoscopic microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Photographic documentation of larvae was taken with a DFC 420 microscope camera (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Larval size was analyzed with LAS V 3.1.0 software (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Total length was measured to the nearest 0.1 mm. Following manipulations, the larvae were placed in a container with well-oxygenated water for recovery. After they had recovered from the anaesthesia and had started to swim actively, the larvae were returned to the tanks from which they had been taken. Using the data obtained, the coefficient of total length increase per time unit (TLI) was computed with the following formula (Peňáz et al. 1989):

$$TLI = \frac{TL(n_2) - TL(n_1)}{\Delta t}$$

where: TL – mean length of an individual (*longitudo totalis*), n_1 – start of the period, n_2 – end of the period, Δt – duration of rearing (in days).

The specific growth rate (SGR) for body weight and relative biomass growth rate (SBR) from the beginning of feeding until the end of the experiment were determined with the following formulas (Brown 1957):

$$SGR = 100 \times \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{\Delta t} \textit{ and, } SBR = 100$$

Relative growth rate for body weight (RGR) and relative growth rate for biomass (RBR) from the beginning of feeding until the end of the experiment were determined with the following formulas (Myszkowski 1997):

$$RGR = 100 \times \left(e^{\frac{SGR}{100}} - 1 \right), and\ RBR = 100 \times \left(e^{\frac{SBR}{100}} - 1 \right)$$

where: W_1 – mean initial weight of an individual (mg) during the rearing period, W_2 – mean final weight of an individual (mg) during the rearing period, n_1 – number of stocked fish (individuals) at the beginning of the rearing period, n_2 – number of stocked fish (individuals) at the end of the rearing period, Δt – duration of rearing (days).

The RGR for body length was calculated analogously. The biomass of the fish in each tank was determined as the product of the average individual

weight and the number of live individuals. The resulting value was divided by the capacity of the tank. The biomass calculated was expressed in g dm^{-3}.

Data analysis

The number of dead fish recorded every day served to plot cumulative mortality curves for each fish feeding variant. To compare the results, the relative final mean length (RFL), the relative final mean weight (RFW), and the relative final mean biomass (RFB) of the experimental fish were calculated, assuming that the length, weight, and biomass of the control fish A21 (21 day feeding regime with live brine shrimp nauplii) at the end of the experiment was 100%. To determine whether the differences in the mean fish length and the mean fish weight in the experimental groups were significant, Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$) was used (Duncan 1955). Survival percentages were normalized (angular transformation) and differences were considered significant at $P \leq 0.05$ (Sokal and Rohl 1981). The results were processed statistically in Excel 16.0 and Statistica 13.0 for Windows.

Results

The first statistically significant differences in average larval weights and lengths from the different feeding variants emerged on day 13 of the rearing period and persisted until the end of the experiment (Figs. 1 and 2). The mean individual weights of blue bream larvae from the variant in which only natural food was supplied (A21) was 62.1 mg. This increase was 1.6 and two-fold higher than that in the two variants that were the worst in this respect, namely larvae fed nauplii for the first four days (A4P17) and those fed only Perla feed (P21). In comparison with the other variants, this increase was 1.3-fold higher than that of larvae from variant A8P13, which were fed live brine shrimp nauplii for eight days, and 1.1-fold higher than that noted for larvae from variant A12P9, which were fed nauplii for the first 12 days of life. The highest growth rate of blue bream larvae from the food substitute variants tested was recorded in the A12P9 group, where larvae reached an average body weight of 56.1 mg with an average total length of 21.1 mm. These values were only slightly worse than those obtained in the A21 control sample. Final survival of larvae in each feeding group ranged from 67% (A4P17) to 93% (A12P9). Likewise, the RGR for

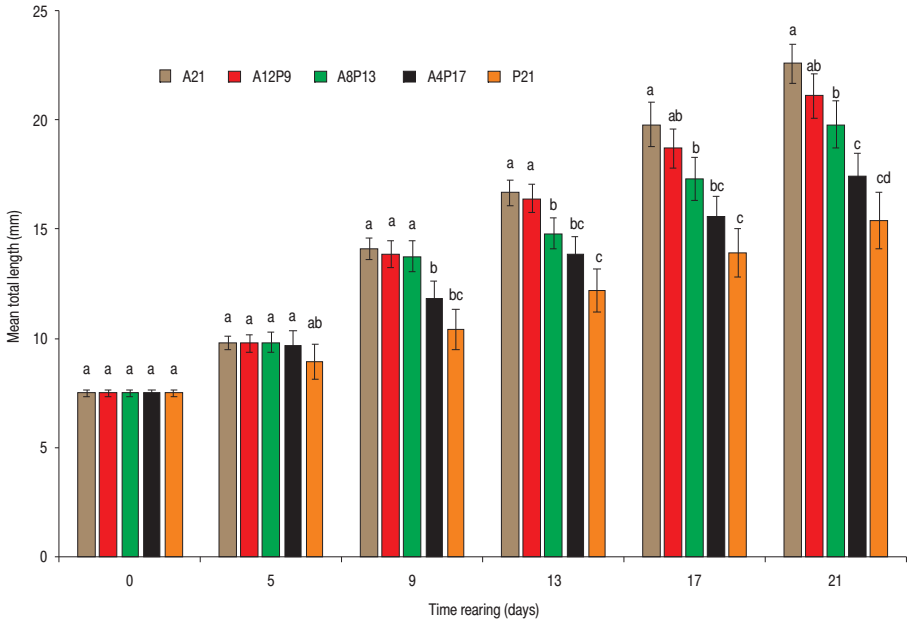


Figure 1. Increase in the total length of blue bream (*B. ballerus*) larvae reared on natural (A) and commercial food (P). The change to commercial food was after four, eight, or 12 days.

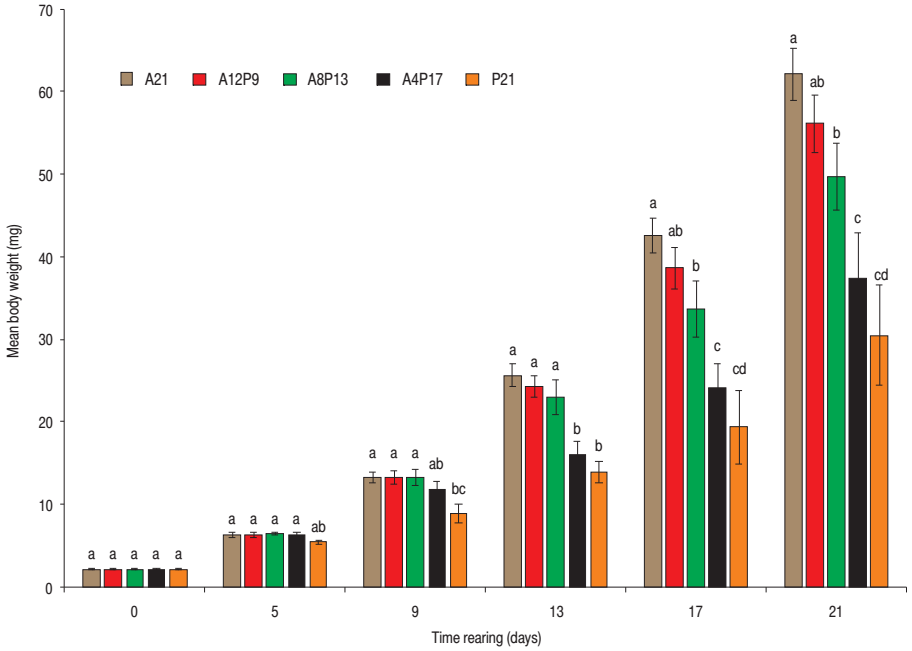


Figure 2. Increase in body weights of blue bream (*B. ballerus*) larvae reared on natural (A) and commercial food (P). The change to commercial food was after four, eight, or 12 days.

the weight of individual larvae was the highest in variant A21 (17.5% d^{-1}) (Table 1). Larvae from variant P21 had a daily relative growth of individual weight of 13.6% d^{-1}. The analysis of the growth in the length of larvae proved that the longest larvae (22.6 mm) were from the variant where the diet was composed of only live brine shrimp nauplii (A21). For comparison, larvae from group P21 had an average body length of 15.4 mm. The TLI for larvae from variant A21 was 0.72 mm d^{-1}. The lowest TLI was noted

Table 1
Results of rearing blue bream (*B. ballerus*) larvae fed with natural food (A) that was changed to Perla commercial feed after four (A4P17), eight (A8P13), or 12 days (A12P9). Mean value ± SD. Results in rows with the same letter index are not statistically significantly different (α = 0.05)

	Experimental groups				
Parameter	A21	A12P9	A8P13	A4P17	P21
Initial mean body length (mm)	7.50 ± 0.15^{a}	7.50 ± 0.15^{a}	7.50 ± 0.15^{a}	7.50 ± 0.15^{a}	7.50 ± 0.15^{a}
Initial mean body weight (mg)	2.1 ± 0.1^{a}	2.1 ± 0.1^{a}	2.1 ± 0.1^{a}	2.1 ± 0.1^{a}	2.1 ± 0.1^{a}
Final mean body length (mm)	22.60 ± 0.9^{a}	21.10 ± 1.0^{ab}	19.80 ± 1.1^{b}	17.40 ± 1.1^{c}	15.40 ± 1.3^{cd}
Final mean body weight (mg)	62.10 ± 3.2^{a}	56.10 ± 3.5^{ab}	49.70 ± 4.1^{b}	37.40 ± 5.5^{c}	30.50 ± 6.1^{cd}
Initial stock (ind.)	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00
Final stock (ind.)	960.00 ± 17^{a}	930.00 ± 25^{ab}	887.00 ± 36^{b}	670.00 ± 60^{c}	380.00 ± 74^{d}
Survival (%)	96.00 ± 1.7^{a}	93.00 ± 2.5^{ab}	88.70 ± 3.6^{b}	67.00 ± 6.0^{c}	38.00 ± 7.4^{d}
Total length increase (TLI) (mm d^{-1})	0.72 ± 0.04^{a}	0.65 ± 0.04^{ab}	0.59 ± 0.05^{b}	0.47 ± 0.05^{c}	0.38 ± 0.06^{cd}
Relative growth rate (RGR) for weight (% d^{-1})	17.50 ± 0.29^{a}	16.93 ± 0.51^{ab}	16.26 ± 0.49^{b}	14.70 ± 0.73^{c}	13.59 ± 1.11^{cd}
Relative growth rate (RGR) for length (% d^{-1})	5.39 ± 0.19^{a}	5.05 ± 0.24^{ab}	4.73 ± 0.28^{b}	4.09 ± 0.31^{c}	3.49 ± 0.42^{cd}
Relative growth rate (RGR) for biomass (% d^{-1})	17.27 ± 0.28^{a}	16.53 ± 0.48^{ab}	15.60 ± 0.49^{b}	12.53 ± 0.71^{c}	8.47 ± 1.05^{d}
Biomass (g)	59.62 ± 3.8^{a}	52.17 ± 4.2^{ab}	44.08 ± 3.9^{b}	25.06 ± 3.32^{c}	11.59 ± 2.3^{d}
Biomass (g dm^{-3})	2.38 ± 0.08^{a}	2.09 ± 0.19^{ab}	1.76 ± 0.16^{b}	1.00 ± 0.13^{c}	0.46 ± 0.09^{d}

Table 2
Final relative mean lengths, weights, and biomasses of blue bream (*B. ballerus*) larvae reared on natural food (A) and commercial feed (P) (water temperature 25.0 ± 0.5°C (± SD), 21 day rearing period). The relative mean final weights (RFW), relative mean final lengths (RFL), and relative mean final biomasses (RFB) of the experimental fish were calculated assuming that the final lengths, weights, and biomasses of the control fish (fed *Artemia* nauplii for 21 days – A21) were 100%

Feeding period with commercial feed (days)	RFW (%)	RFL (%)	RFB (%)
0–21 (P21)	77.66	64.75	49.04
5–21 (A4P17)	84.00	75.88	72.55
9–21 (A8P13)	92.91	87.76	90.33
13–21 (A12P9)	96.74	93.69	95.72

in larvae from variant P21 at 0.38 mm d^{-1}. No statistically significant differences were noted among individuals from the same feeding variants.

The biomass of the blue bream larvae reared on natural food (A21) was 2.38 g dm^{-3} and was nearly 2.4-fold higher than that of the group of larvae fed brine shrimp nauplii for only four days (A4P17) and over five-fold higher than that of the group of larvae fed only Perla feed (P21). The highest larval survival rate was in the group fed only live natural food (A21) at 96%, which was much higher than in the other groups. The group with the lowest survival rate (38%) at the end of the rearing period was in group P21 that was fed only Perla commercial feed. The average cumulative mortality of bream larvae from each feeding variant during rearing is presented in Fig. 3. No statistically significant differences were observed in larval mortality within any of the feeding variants tested.

Similar results were also obtained when natural food was replaced on day 13 with Perla feed (A12P9), which was confirmed by the mean relative final lengths, weights, and biomasses (Table 2). Considering the mean relative final weight (RFW), this index for the larvae fed with Perla feed from day 13 was 96.74% relative to the weight of larvae from the control group (A21). The mean relative final length (RFL) calculated for larvae receiving Perla feed from

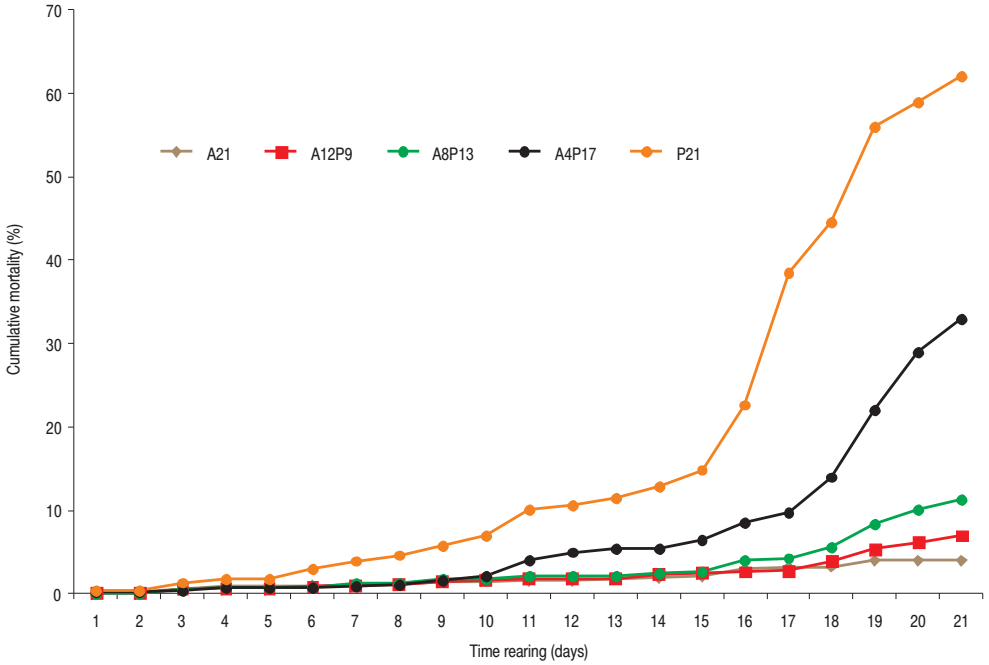


Figure 3. Cumulative mortality of blue bream (*B. ballerus*) larvae fed with natural food (A) that was changed to Perla commercial food after four, eight, or 12 days.

day 13 was 93.69% relative to the length of larvae from the control group. The final values of the relative average biomass (RFB) were analogous to the values given above.

Discussion

One of the greatest challenges of rearing fish larvae under controlled conditions is providing them with the right quality and quantity of food. There is a huge variety of commercial fish larvae rearing feeds suitable for the fish species in question. For most fish species reared for consumption, feeds have already been developed for specific stages of development (Belal 2007, Barbu et al. 2008, Molnar et al. 2010, Şara et al. 2010, Sverinciuc et al. 2017). Appropriate commercial feed compositions ensure rapid growth of larvae and fingerlings while maintaining high survival rates. Aquaculture, however, goes beyond raising commercial fish for consumption; it also produces stocking material of endangered fish species (Kujawa and Piech 2022). These are mostly wild species, not yet domesticated, for which no suitable commercial feeds have been developed. One example is rheophilic cyprinid fishes, the larvae of which begin to take exogenous food at the final stage of yolk sac resorption after the swim bladder has filled (Kupren et al. 2015, Nowosad et al. 2021). The literature available provides information that the first exogenous food can be rotifers, *Brachionus calyciflorus*, which were successfully administered in the first stage of rearing chub, *Squalius cephalus* (L.) (Shiri Harzevili et al. 2003). However, the most frequently used live food, thanks to its ready availability and assimilation by most fishes, is the freshwater zooplankton, or nauplii, of brine shrimp, *Artemia* sp. (Bryant and Matty 1980, Bengtson et al. 2018). Nevertheless, these two types of food have recently become less widely available, and consequently their prices have increased significantly. They also require labor-intensive preparation before being fed to fish larvae.

Compound feeds have become an alternative, but their use requires knowledge of the structure and functioning of the fish larva digestive tract. According to the classification by Dabrowski (1984), larval cyprinid fish belong to the third group of species that is characterized by a short, weakly developed digestive tract with a poor enzyme composition. The contact time between food and digestive enzymes in such young fish is very short (Kaushik 1986, Szlamińska 1987, Wolnicki 2005). Fish larvae compensate for digestive enzyme deficiency during digestive tract development by consuming live food, from which larvae digest and assimilate the nutrients necessary for proper growth and body function (Dabrowski 1984, Wiggins et al. 1986). Determining the right time to replace natural food with feed is a key issue when rearing larvae under controlled conditions.

Scientists investigating this issue suggest that larvae need live food for up to 12 days. Reviewing the literature available on this issue (Hofer and Uddin 1985, Wolnicki and Korwin-Kossakowski 1993, Wolnicki and Górny 1995a, 1995b, 1995c) and the rearing experiment discussed in this paper proved that blue bream larvae, like those of other rheophilous cyprinid fishes, should be fed natural food initially, and only after some time are they able to assimilate effectively the nutrients contained in commercial foods. Some scientists report that feeding cyprinidae larvae commercial feed is clearly related to their individual body weight (Bryant and Matty 1981, Stanny 1984). According to Bryant and Matty (1981), the body weight of an individual fish ranges from 5–15 mg, while according to Stanny (1984) it is 10–12 mg. However, both suggest that live food should be used in the initial feeding stage. This allows the larvae to achieve rapid weight gain and reach subsequent developmental stages. This might explain, at least to some extent, why lower weight and length gains were observed during the initial rearing period of the much lighter blue bream larvae. Similar observations have been made by other researchers who have reared cyprinid fish larvae on starter feeds (Wolnicki 1996, Mookerji and Ramakrishan 1999). This is also confirmed by studies on rearing cyprinid fish larvae using starter feeds (Wolnicki and Myszkowski 1999). These reports confirm that the larvae of many species of cyprinid fishes require several days of feeding with natural

food at the beginning of the rearing period. Only the larvae of rheophilic cyprinid fishes such as barbel, *Barbus barbus* (L.), and common nase, *Chondrostoma nasus* (L.), with average initial body weights of 10 mg, can be fed commercial starter feeds from the beginning of life (Kujawa et al. 2010).

Using commercial feeds after a short time of feeding larvae with natural food is a common solution that leads to satisfactory outcomes. The prerequisite is to select a commercial feed that is suitable for a given fish species. In our experiment rearing blue bream larvae, brine shrimp nauplii was changed to Perla commercial feed, and this enabled us to determine how long the larvae should receive natural food so that they are able to absorb the nutrients from commercial feed. The research results confirmed the observations of other authors that in the first stage of life, which lasts for different lengths of time depending on the cyprinid species, larvae must receive natural food (Skrzypczak et al. 1998, Mamcarz et al. 1998). These authors demonstrated that from days five to 13 of rearing (depending on the fish species and feeds tested), it was possible to replace natural food with feeds while avoiding any considerable losses of larvae. Nonetheless, the growth rates of larvae that received brine shrimp nauplii initially followed by commercial feed tended to be lower than those of fish larvae that received only natural food.

The analysis of the results of rearing blue bream larvae in our experiment revealed that their growth and survival clearly depended on feeding them natural food. The longer the larvae were fed brine shrimp nauplii (*Artemia* sp.), the better the growth gains were in both average weight and total length. The largest larvae were obtained in the variants in which the natural food period was the longest. Larvae from variant A21 fed only brine shrimp nauplii were more than twice as heavy as the larvae fed only Perla feed (P21). This result clearly indicated that there was a relationship between larva mass and food type. The indices of RGR for length, weight, and biomass calculated for the larvae from these variants were also significantly higher than the others. The largest larvae (after control group A21) were in group A12P9, in which natural food was fed for the longest and feed for the shortest period of time. Larvae in group A12P9 were more than 1.5 times heavier than larvae fed natural food for only four days (A4P17). This result clearly suggests that there is a relationship between the body weight of larvae and the period for which they were fed brine shrimp nauplii. This is also clearly confirmed by the final larval biomass from group A12P9 of 2.09, which was more than two times higher than that of the larvae from group A4P17.

The results of rearing blue bream larvae presented in this paper confirm observations of other species of rheophilic cyprinid fished reported by other authors who have studied replacing natural food with commercial feed (Wolnicki and Górny 1995c, Kujawa et al. 1998). Rearing blue bream larvae under controlled conditions requires providing them with access to live food during the initial nursery period. Blue bream larvae, like other rheophilic cyprinid fishes, can be fed commercial feed only after an initial period of feeding them natural food. Replacing live food with commercial feed too early decreases growth parameters and increases larval mortality. The current study showed that replacing natural food with commercial feed after 12 days (A12P9) resulted in high blue bream larva survival rates and satisfactory weight and length gains. It might be possible to shorten this period if a domesticated population of blue bream larvae was maintained. Similar associations were observed when raising domesticated populations in fish of the genus *Leuciscus* (Kwiatkowski et. al. 2008). Increasing the efficiency of rearing blue bream, *Ballerus ballerus*, larvae, as well as that of other rheophilic fishes of the cyprinid family, will be possible after developing commercial feeds with suitable compositions that are enriched with the appropriate exogenous enzymes.

Author contributions. P.P., R.K. designed the study. P.P. conducted the field investigations and provided environmental data. R.K. managed the database and did some of the analyses. R.K. conducted the statistical analyses. P.P did some of the data analyses and drafted the manuscript. All authors contributed to writing the manuscript and approved the submitted final version of it.

ORCID iD

Przemysław Piech https://orcid.org/0000-0003-0538-5758

Roman Kujawa https://orcid.org/0000-0003-0925-1204

References

Barbu, A., Sara, A., Alina, A., Bentea, M. (2008). The effects of some fodder additives on production performances of different fish species. Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies, 65, 278-282.

Belal, I. E. (2007). Incorporating fodder beet *Beta vulgaris* cv. Majoral in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) diet. Emirates Journal of Food and Agriculture, 19, 22-30.

Bengtson, D. A., Léger, P., Sorgeloos, P. (2018). Use of Artemia as a food source for aquaculture. In: Artemia Biology (Ed.) R.A. Browne, P. Sorgeloos, C.N.A. Trotman, CRC Press, Boca Raton: 255-285.

Brown, M. E. (1957). Experimental studies on growth. In: The physiology of fishes. (Ed.) M.E. Brown, Academic Press, New York: 361-400.

Bryant, P. L., Matty, A. J. (1980). Optimisation of Artemia feeding rate for carp larvae (*Cyprinus carpio* L.). Aquaculture, 21(3), 203-212.

Bryant, P. L., Matty, A. J. (1981). Adaptation of carp (*Cyprinus carpio*) larvae to artificial diets: 1. Optimum feeding rate and adaptation age for a commercial diet. Aquaculture, 23(1-4), 275-286.

Dabrowski, K. (1984). Influence of initial weight during the change from live to compound feed on the survival and growth of four cyprinids. Aquaculture, 40, 27-40.

Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F-test. Biometrics, 11, 1-42.

Hofer, R., Uddin, A. N. (1985). Digestive processes during the development of the roach, *Rutilus rutilus* L. Journal of Fish Biology, 26(6), 683-689.

Kaushik, S. J. (1986). Some aspects of larval nutritional physiology in carp In: Aquaculture of Cyprinids (Ed.) R. Billard, J. Marcel, INRA, Paris, France: 215-225.

Kujawa, R., Piech, P. (2021). Rearing of bitterling (*Rhodeus amarus*) larvae and fry under controlled conditions for the restitution of endangered populations. Animals, 11(12), 3534.

Kujawa, R., Piech, P. (2022). Influence of water salinity on the growth and survivability of asp larvae *Leuciscus aspius* (Linnaeus, 1758) under controlled conditions. Animals, 12(17), 2299.

Kujawa, R., Mamcarz, A., Kucharczyk, D. (1998). Biotechnology of reproduction and breeding of asp (*Aspius aspius* L.). Czech J. Anim. Sci, 43, 396.

Kujawa, R., Kucharczyk, D., Mamcarz, A., Jamróz, M., Kwiatkowski, M., Targońska, K., Żarski, D. (2010). Impact of supplementing natural feed with dry diets on the growth and survival of larval asp, *Aspius aspius* (L.), and nase, *Chondrostoma nasus* (L.). Archives of Polish Fisheries, 18(1), 13-23.

Kujawa, R., Cejko, B. I., Fopp-Bayat, D., Judycka, S., Glińska-Lewczuk, K., Timofte, C. M., Nowosad, J., Kucharczyk, D. (2019). Reproduction of endangered river lamprey (*Lampetra fluviatilis*) in controlled conditions. Animal Reproduction Science, 203, 75-83.

Kujawa, R., Piech, P., Nowosad, J., Kucharczyk, D. (2022). Comparison of different methods of wild vimba bream *Vimba vimba* (L.) spawning under controlled conditions. Animal Reproduction Science, 244, 107036.

Kupren, K., Żarski, D., Kucharczyk, D. (2015). Early development and allometric growth patterns in ide *Leuciscus idus* (Linnaeus 1758). Journal of Applied Ichthyology, 31(3), 509-517.

Kwiatkowski M., Żarski D., Kucharczyk D., Kupren K., Jamróz M., Targońska K., Krejszeff S., Hakuć-Błażowska A., Kujawa R., Mamcarz A. (2008). Influence of feeding chosen rheophilic cyprinid larvae using natural and compound diet. Archives of Polish Fisheries, 16, 383-396.

Mamcarz, A., Kucharczyk, D., Kujawa, R., Skrzypczak, A., Furgała-Selezniow, G. (1998). Ontogeny of feeding habits in northern pike, *Esox lucius* (Esocidae), larvae reared in illuminated cages. Italian Journal of Zoology, 65(S1), 251-253.

Molnar, F., Şara, A., Ani, A. R. (2010). The influence of some fodder additives on the growth indices and survival rate of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella* L.) juveniles. Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, 43(1), 84-87.

Mookerji, N., Ramakrishan Rao, T. (1999). Rates of yolk utilization and effects of delayed initial feeding in the larvae of the freshwater fishes rohu and singhi. Aquaculture International, 7(1), 45-56.

Myszkowski, L. (1997). Pitfalls of using growth rate coefficients. Polskie Archiwum Hydrobiologii, 44(3), 389-396.

Nowosad, J., Żarski, D., Biłas, M., Dryl, K., Krejszeff, S., Kucharczyk, D. (2013). Dynamics of ammonia excretion in juvenile common tench, *Tinca tinca* (L.), during intensive rearing under controlled conditions. Aquaculture International, 21(3), 629-637.

Nowosad, J., Kupren, K., Biegaj, M., Kucharczyk, D. (2021). Allometric and ontogenetic larval development of common barbel during rearing under optimal conditions. Animal, 15(2), 100107.

Peňáz, M., Prokeš, M., Kouřil, J., Hamáčková, J. (1989). Influence of water temperature on the early development and growth of the tench, *Tinca tinca*. Folia Zoologica, 38(3), 275-287.

Piech, P., Kujawa, R. (2021). Artificial reproduction of blue bream (*Ballerus ballerus* L.) as a conservative method under controlled conditions. Animals, 11(5), 1326.

Şara, A., Barbu, A., Molnar, F., Alina, A. (2010). The effects of some fodder additives on the growth and consumption indices of brook trout (*Salvelinus fontinalis* M.). Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies, 67(1/2), 321-325.

Shiri Harzevili, A., De Charleroy, D., Auwerx, J., Vught, I., Van Slycken, J. (2003). Larval rearing of chub, *Leuciscus cephalus* (L.), using decapsulated Artemia as direct food. Journal of Applied Ichthyology, 19(2), 123-125.

Skrzypczak, A., Mamcarz, A., Kujawa, R., Kucharczyk, D., Furgala-Selezniow, G. (1998). Feeding habits of larval Eurasian perch, *Perca fluviatilis* (Percidae). Italian Journal of Zoology, 65(S1), 243-245.

Sokal, R. R., Rohl, F. J. (1981). Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research, ed. 2. San Francisco. W. H. Freeman.

Sorgeloos, P., Bossuyt, E., Laviña, E., Baeza-Mesa, M., Persoone, G. (1977). Decapsulation of Artemia cysts: a simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture. Aquaculture, 12(4), 311-315.

Stanny, L. A. (1984). Principles of rearing cyprinid fish under controlled conditions. Gospodarka Rybna, 3, 3-6 (in Polish).

Sverinciuc, C., Bentţea, M. I., Şara, A. (2017). The effects of some fodder additives on growth performance of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). Agricultura, 101-102 (1-2), 105-109.

Szlachciak, J. (2005). Morphological features of zope, *Abramis ballerus*, from the middle stretch of the Odra River, Poland. Acta Ichthyologica et Piscatoria, 35, 93-101.

Szlamińska, M. (1987). Intestine evacuation rate in cyprinid larvae fed on two kinds of dry feeds at 24°C. Acta Ichthyologica et Piscatoria, 17, 35-41.

Tadajewska, M. (2000). Blue bram *Abramis ballerus*. In: Freshwater fish of Poland (Ed.) M. Brylińska, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa: 257-261 (in Polish).

Wiggins, T. A., Bender, Jr T. R., Mudrak, V. A., Coll, J. A., Whittington, J. A. (1986). Effect of initial feeding rates of Artemia nauplii and dry diet supplements on the growth and survival of American shad larvae. The Progressive Fish-Culturist, 48, 290-293.

Wolnicki, J. (1996). Intensive rearing of larval and juvenile vimba, *Vimba vimba* [L.], fed natural and formulated diets. Polskie Archiwum Hydrobiologii, 43(4), 447-454.

Wolnicki, J. (2005). Intensive rearing of early stages of cyprinid fish under controlled conditions. Archives of Polish Fisheries (Poland).

Wolnicki, J., Górny, W. (1995a). Controlled rearing of ide (*Leuciscus idus* L.) larvae using live food and dry feed. Aquaculture, 129(1-4), 255-256.

Wolnicki, J., Górny, W. (1995b). Suitability of two commercial dry diets for intensive rearing of larval tench (*Tinca tinca* L.) under controlled conditions. Aquaculture, 129(1-4), 256-258.

Wolnicki, J., Górny, W. (1995c). Survival and growth of larval and juvenile barbel (*Barbus barbus L.*) reared under controlled conditions. Aquaculture, 129(1-4), 258-259.

Wolnicki, J., Myszkowski, L. (1999). Comparison of survival, growth and stress resistance in juvenile nase *Chondrostoma nasus* (L.) fed commercial starters. European Aquaculture Society Special Publication 27, 256-257.

Wolnicki, J., Korwin-Kossakowski, M. (1993). Survival and growth of larval and juvenile tench, *Tinca tinca* L., fed different diets under controlled conditions. Aquaculture Research, 24(6), 707-713.

Zakęś, Z., Demska-Zakęś, K. (2011). Hatchery practice in the context of biodiversity of aquatic ecosystems. In: Fish management in a variable water environment (Ed.) M. Jankun, G. Furgała-Selezniow, M. Woźniak, A. M. Wiśniewska, Agencja Wydawnicza Agri: 45-52.

animals

MDPI

Article

Effect of Different Water Salinities on the Larvae of the Blue Bream *Ballerus ballerus* (Linnaeus, 1758) during Rearing

Przemysław Piech * and Roman Kujawa

Department of Ichthyology and Aquaculture, Faculty of Animal Bioengineering, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-719 Olsztyn, Poland
* Correspondence: przemyslaw.piech@uwm.edu.pl

Simple Summary: Climate change and negative anthropogenic pressures are becoming huge challenges for quite a number of populations of both terrestrial and aquatic animals. To a significant degree, fish—the most numerous representatives of vertebrates in the world—are exposed to changing temperature conditions but also to the physical and chemical conditions of inland waters. Any biotic or abiotic factor, to a greater or lesser extent, affects the adaptability of individual fish species to the prevailing conditions in the waters in a given area.

Abstract: The influence of water salinities of 3, 5, and 7 ppt on the growth and survival of *Ballerus ballerus* (L.) larvae was studied. The control group was fish reared in freshwater (0 ppt). The larvae showed high tolerance to water salinities of 5–7 ppt. The mean final weight of the larvae ranged from 48.6 to 64.1 mg, with corresponding mean total lengths from 18.9 to 22.6 mm, depending on the water salinity level. The best larval length increments were recorded in water with salinity of 3 ppt. They were only slightly lower in 0 ppt water, and there were no statistically significant differences between the breeding rates calculated for larvae reared in 3 ppt water. Depending on the salinity level of the water, the final survival rate of the blue bream larvae ranged from 83.5 to 98.6%. The blue bream larvae reared in water with salinity levels of 5 and 7 ppt were statistically smaller than the others, but the results obtained were equally satisfactory.

Keywords: blue bream; rheophilic fish; salinity; larvae; survivability; growth rate

Citation: Piech, P.; Kujawa, R. Effect of Different Water Salinities on the Larvae of the Blue Bream *Ballerus ballerus* (Linnaeus, 1758) during Rearing. *Animals* **2023**, *13*, 1245. https://doi.org/10.3390/ani13071245

Academic Editor: Øivind Bergh

Received: 17 February 2023
Revised: 17 March 2023
Accepted: 2 April 2023
Published: 3 April 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The quality of the environment, and especially of inland waters, is deteriorating continuously. These changes are so severe that they threaten many organisms [1]. There are many natural and anthropogenic factors that contribute to this state of affairs. Climate change, which in a way is a natural factor, can cause droughts (low water levels), as well as intense rainfall, resulting in catastrophic water surges [2,3]. In addition to the natural causes of negative processes in the terrestrial environment and in aquatic ecosystems, there are also those caused by irrational and ill-considered human activity. Rivers are under tremendous pressure due to artificial modifications of their flow, the discharge of domestic and industrial wastewater, and changes in catchment land use (such as agriculture and mining) [4–6]. These factors contribute in various ways to physical and chemical changes in water, including its salinity. Most often, chemical changes are due to the presence of substances that are not normally found in such quantities in watercourses, even in estuarine zones. Their impact on the organisms inhabiting a particular section of the watercourse is ambiguous. The negative effects of human-made developments interfering with the environment are not always immediately apparent. All mines, both open-pit and underground ones, developed for the extraction of various raw materials, pollute the environment with post-mining waters [7,8]. Post-mining waters originating from aquifers occur in every mine. They vary in their content of chloride and sulphide ions as well as

heavy metal compounds. These waters, which contain large amounts of salts and heavy metals, end up in rivers and then in the seas. The inflow of post-mining waters into rivers causes their salinization, which is not without significance for river-dwelling organisms. It is worth noting at this point that saline waters originate from other sources as well. A periodic source of highly saline waters, occurring only in winter, is runoffs from roads [9]. This is associated with the use of salt as a means of reducing ice on roads. The most common anti-icing agents are inorganic-chloride-based salts, i.e., sodium chloride (NaCl), magnesium chloride ($MgCl_2$), and calcium chloride ($CaCl_2$). Once applied, road salts dissolve and enter freshwater ecosystems through saline overland flow generated by melting snow or rain and through groundwater sources [10,11].

The salinity of inland waters affects the biocenosis of inland waters, and especially the behaviour of aquatic organisms, including fish. Saline pollution creates a permanent chemical impact on aquatic biocenosis [12]. This is especially true for organisms with low mobility and those that are sensitive to changes in water salinity, such as juvenile stages of fish, molluscs, benthic crustaceans, and insect larvae [13–16]. The runoff of saline water with an inert composition into watercourses can lead to the extinction of sensitive populations of fish and other organisms living in a particular section of a river [17]. The permanent runoff of saline water and the inability of aquatic organisms to move to avoid the negative impact of water with a significant degree of salinity not only annihilates weaker and less resistant species, but also limits the development of less sensitive species. This is especially true for the early developmental stages of stenohaline cyprinid fish, which are hardly resistant to salinity changes [18].

Among the fish that do not avoid brackish waters are those in the so-called transitional waters. These fish benefit from food-rich marine waters, where they feed, and reproductively suitable freshwater, where they breed [19–22]. The early life stages of the listed fish species are much more tolerant to salinity than stenohaline fish. In estuarine zones, there are also species that very rarely enter saline waters and spend most of their lives in freshwater. An example is the blue bream *Ballerus ballerus* [23]. The blue bream is a rheophilic, social species of fish from the *Cyprinidae* family, occurring naturally in the Szczecin Lagoon, as well as Dąbie Lake, a delta lake in the Lower Odra River Valley. Despite the rather sizable population of this species in the aforementioned inland waters, there is a declining trend of "genetically pure populations" due to interspecies crossings. The most frequently observed are crossbreedings of the spud with the bream. These crossings most often occur in places where their spawning dates overlap [24]. Despite the fact that the blue bream is of minor economic importance, it is a component of the ichthyofauna that defines the biodiversity of rivers and lakes. In order to preserve biodiversity in inland waters, active and passive protection is extended to fish species of minor economic importance. A serious contribution to the active protection of species is provided by aquaculture. It is becoming commonplace to develop mechanisms to naturally support many economically valuable species. They range from species acclimation and reproductive biotechnology to the development of rearing protocols and rearing itself.

In the case of the blue bream, an effective method for its reproduction and optimal feeding during rearing under controlled conditions has already been developed [25,26]. Research on the effects of various factors on the growth and survival of blue bream larvae has been launched due to the lack of relevant data in the literature. A study was begun by determining the effect of salinity on the growth and survival of larvae. This is an issue of great interest in the context of the increasingly reported elevated salt levels in watercourses where this fish species still occurs [27].

In this study, a study of the effect of different degrees of water salinity was conducted. The study aimed to determine the appropriate level of water salinity at which fish achieve satisfactory growth rates and larval survival.

2. Materials and Methods

Blue bream spawners were caught in mid-May during their natural reproduction period from Lake Dąbie. The fish were caught using pond equipment—fyke nets and wontons. The blue bream larvae were from reproduction carried out under controlled conditions [25].

Larval rearing was carried out in four separate recirculating aquaculture systems (RASs) adapted to rearing larvae in water with different salinities. Blue bream larvae were reared in water with a salinity of 3, 5, or 7 ppt. The control sample consisted of larvae reared in freshwater (0 ppt), free of salinity. Pro-Reef sea salt (TROPIC MARIN, Wartenberg, Germany), which was dissolved in water at 20 °C, was used to achieve adequate water salinity. A single experimental circuit consisted of 3 aquaria designed for rearing larvae in water of a given salinity. Each aquarium had a working volume of 25 dm^3. Each experimental circuit also included a 200 dm^3 'filter' aquarium containing a protein skimmer (EHEIM GmbH & Co.KG, Deizisau, Germany) and a biological bed in the form of a floating medium. The filter medium consisted of bactoballs used in denitrification filters (AB Aqua Medic GmbH, Bissendorf, Germany). The water circulation in each circuit and the water supply to the individual aquaria were identical to the methodology described by Kujawa and Piech when studying the effects of salinity on asp larvae (Figure 1) [28].

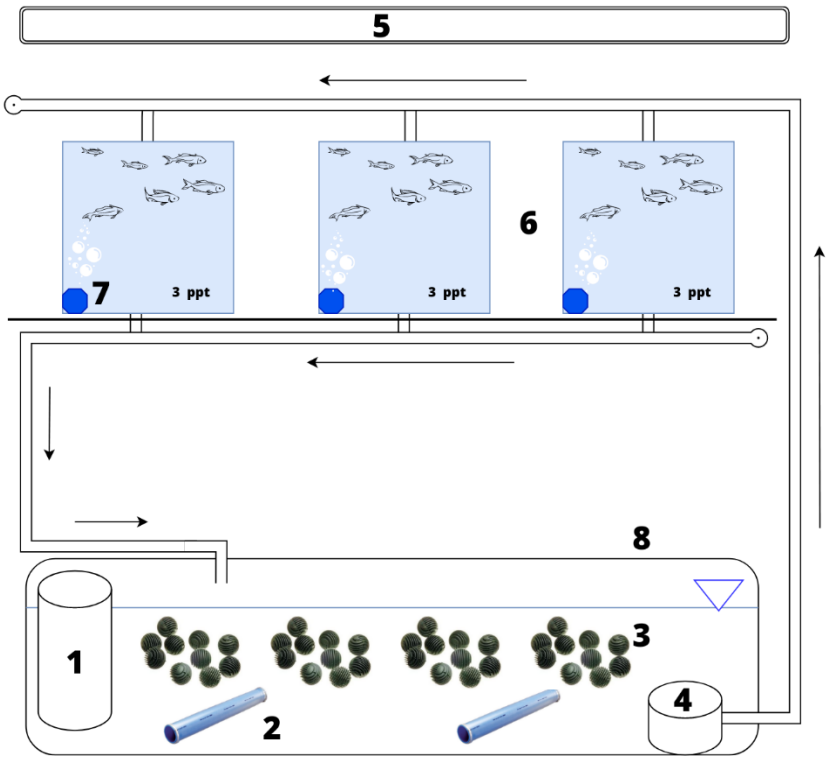


Figure 1. An overview diagram of one of the four prepared experimental systems used in the experiment: 1—protein skimmer, 2—tubular diffuser, 3—bactoballs, 4—pump, 5—fluorescent lamps, 6—aquariums with fishes, 7—aeration stone, 8—aquarium with filter bed.

The blue bream larvae at the age of 5 DPH (days post hatching), with an average body length of 7.5 mm, were counted and placed in all rearing aquaria at a density of 40 indiv.·dm^{-3}. The stocking density of a single aquarium was 1000 larvae. The water temperature in all the test groups was initially 20 °C and was gradually (1 °C per hour) increased to 25.0 ± 0.5 °C, which was the target rearing temperature. Measurements in each experimental group (salinity) were carried out in triplicate.

Control measurements of the weight and total length of the larvae were carried out every four days (day 1, 5, 9, 13, 17, and 21 of rearing). Each time, the samples consisted of thirty individuals (n = 30) randomly caught from each aquarium. They were caught in the morning (before feeding began). Fish were weighed to the nearest 0.1 milligram and measured to the nearest 0.1 mm [28].

The blue bream larvae were fed ad libitum three times a day at four-hour intervals (8 a.m., 12 p.m., and 4 p.m.). The food consisted of live nauplius of the brine shrimp *Artemia* sp. (Ocean Nutrition Europe, Essen, Belgium) [29].

The water oxygen content was measured with a YSI multiparameter meter (YSI Incorporated Brannum Lane Yellow Springs, OH, USA) and was within 7.1–7.4 mg O_2 dm^{-3}, and the water pH range was 7.1–7.3. The ammonia and nitrite contents were measured in the morning with a HANNA INS HI 83200 with reagents (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA), and neither were detected in the water during the experiment [30].

During the experiment, the number of dead larvae was counted daily, and the final survival rate was calculated in %. This was expressed as the ratio of the number of fish at the end of rearing to the number of larvae at the start of the experiment. Cumulative mortality curves were plotted for each rearing mode based on daily counts of dead larvae. The average PM larval weight gain (mg) was calculated for larvae from each experimental group studied at the end of the three-week rearing period [31]. Measurements were used to calculate the survival, the index of total length gain per unit time (ITL), the relative body growth rate (SGR), and the survival and larval biomass (SBR) [32,33]. Based on the above, the relative growth rate (RGR) and relative biomass growth rate (RBR) from the beginning of feeding to the end of the experiment were calculated [34]. Growth rates (SGR and RGR) for body length were calculated in the same way.

The biomass of fish in the tanks was determined as the product of the average weight of individuals and the number of live individuals. The obtained value was divided by the working volume of the tanks, obtaining the biomass of larvae expressed in $g \cdot dm^{-3}$. In order to compare the results obtained, the relative final average length, weight, and biomass of the experimental fish were calculated assuming that the length, weight, and biomass of fish from the control sample (from 0 ppt water) at the end of the experiment were equal to 100%. The assessment of the normality of the data distribution and the statistical processing of the results were carried out using the Excel 2016 and Statistica 13.0 for Windows (StatSoft, Inc., USA) computer programs. Statistical differences between the experimental groups were determined using Duncan's test at a significance level of $\alpha = 0.05$ [35].

3. Results

After adjusting the salinity of the water in the individual aquaria to the desired level, the first dead larvae were observed on the second day in water with a salinity of 7 ppt. In water with a salinity of 3 and 5 ppt, the first dead larvae were observed on the third day. During the 21-day rearing period, the lowest mortality was observed in the control water (0 ppt) (Figure 2).

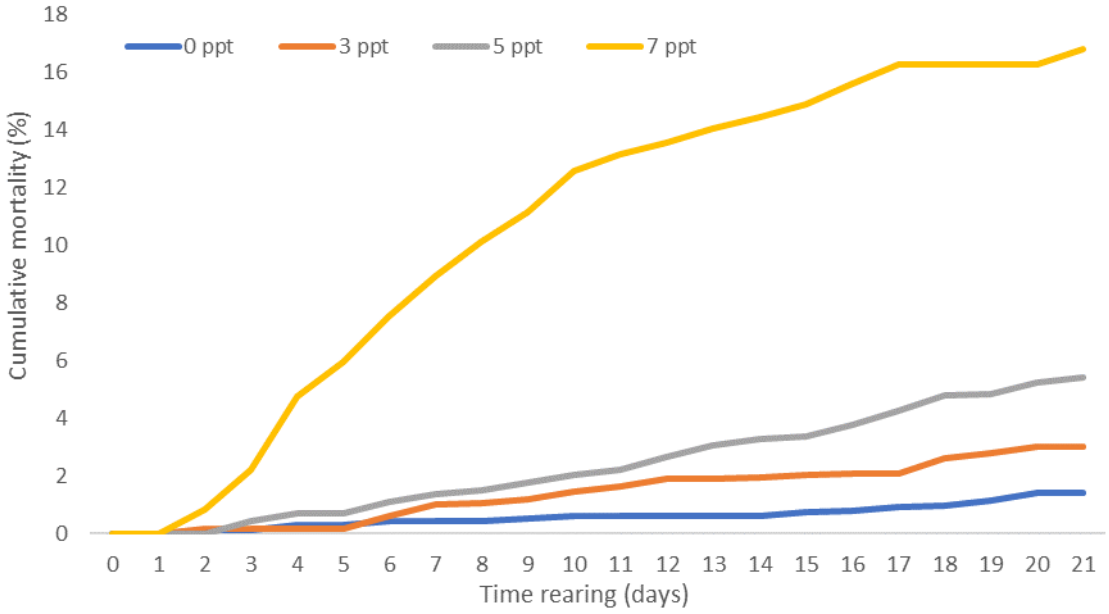


Figure 2. Cumulative mortality of blue bream *Ballerus ballerus* (L.) larvae reared in freshwater and water with salinity of 3, 5, and 7 ppt.

Nearly 98.6% of individuals from the initial stock survived the experiment. A very similar survival rate of larvae was obtained when they were reared in water with salinity of 3 ppt. In this variant, 97% of the larvae survived the entire rearing period. The lowest survival rate of larvae was observed in water with salinity of 7 ppt, where 83.2% of larvae from the initial stock survived rearing (Table 1).

Table 1. Results of rearing the blue bream *Ballerus ballerus* (L.) larvae in freshwater and in water with salinity of 3, 5, and 7 ppt. Mean value ± SD. Results in rows with the same letter index are not statistically significantly different ($\alpha = 0.05$).

	0	**3**	**5**	**7**
Initial mean body length (mm)	7.5 ± 0.1 ^{a}	7.5 ± 0.1 ^{a}	7.5 ± 0.1 ^{a}	7.5 ± 0.1 ^{a}
Initial mean body weight (mg)	2.2 ± 0.1 ^{a}	2.2 ± 0.1 ^{a}	2.2 ± 0.1 ^{a}	2.2 ± 0.1 ^{a}
Final mean body length (mm)	21.9 ± 0.9 ^{a}	22.6 ± 0,9 ^{a}	19.3 ± 1.3 ^{b}	18.9 ± 1.5 ^{b}
Final mean body weight (mg)	62.5 ± 3.4 ^{a}	64.1 ± 4.2 ^{a}	52.4 ± 4.8 ^{b}	48.6 ± 6.2 ^{b}
Initial stock (indiv.)	1000	1000	1000	1000
Final stock (indiv.)	986 ± 1.0 ^{a}	970 ± 2,0 ^{a}	946 ± 7.2 ^{b}	832 ± 15.4 ^{c}
Survival (%)	98.6 ± 0.1 ^{a}	97 ± 0.2 ^{a}	94.6 ± 0.7 ^{b}	83.2 ± 1.5 ^{c}
Average weight gain of larvae (PM) (mg)	60.3 ± 3.4 ^{a}	61.9 ± 4.2 ^{a}	50.2 ± 4.8 ^{b}	46.4 ± 6.2 ^{b}
Increase in total length (ITL) (mm·d^{-1})	0.7 ± 0.0 ^{a}	0.6 ± 0.1 ^{a}	0.6 ± 0.1 ^{b}	0.5 ± 0.1 ^{b}
Relative growth rate (RGR) for weight (%·d^{-1})	17.3 ± 0.3 ^{a}	17.4 ± 0.4 ^{a}	16.3 ± 0.5 ^{b}	15.9 ± 0.7 ^{b}
Relative growth rate (RGR) for length (%·d^{-1})	5.4 ± 0.2 ^{a}	5.4 ± 0.3 ^{a}	4.6 ± 0.3 ^{b}	4.5 ± 0.4 ^{b}
Relative growth rate (RBR) for biomass (RBR) (%·d^{-1})	17.2 ± 0.3 ^{a}	17.3 ± 0.4 ^{a}	16.0 ± 0.5 ^{b}	14.9 ± 0.7 ^{b}
Biomass (g·dm^{-3})	2.5 ± 0.1 ^{a}	2.5 ± 0.2 ^{a}	2.0 ± 0.2 ^{b}	1.6 ± 0.2 ^{b}
Biomass (g)	61.6 ± 3.4 ^{a}	62.2 ± 4.1 ^{a}	49.6 ± 4.5 ^{b}	40.4 ± 5.2 ^{b}

During all the control measurements, the average lengths of larvae reared in freshwater and in water with salinity of 3 ppt were similar (Figure 3).

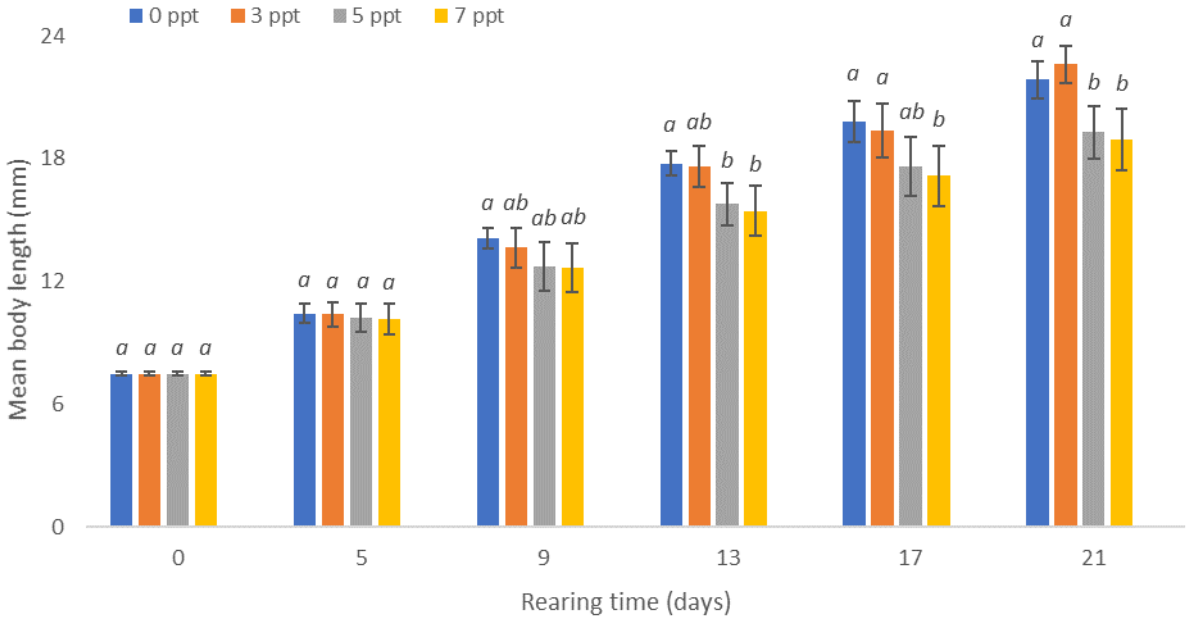


Figure 3. Increase in the body length of the blue bream *Ballerus ballerus* (L.) larvae reared in freshwater and in water with salinity of 3, 5, and 7 ppt. The same letter indexes above the columns in a given sample mean that the values are not statistically significantly different ($\alpha = 0.05$).

On the last day of rearing, the blue bream larvae reared in 3 ppt water gained an average body weight of 64.1 mg with an average length of 22.6 mm (Figures 3 and 4).

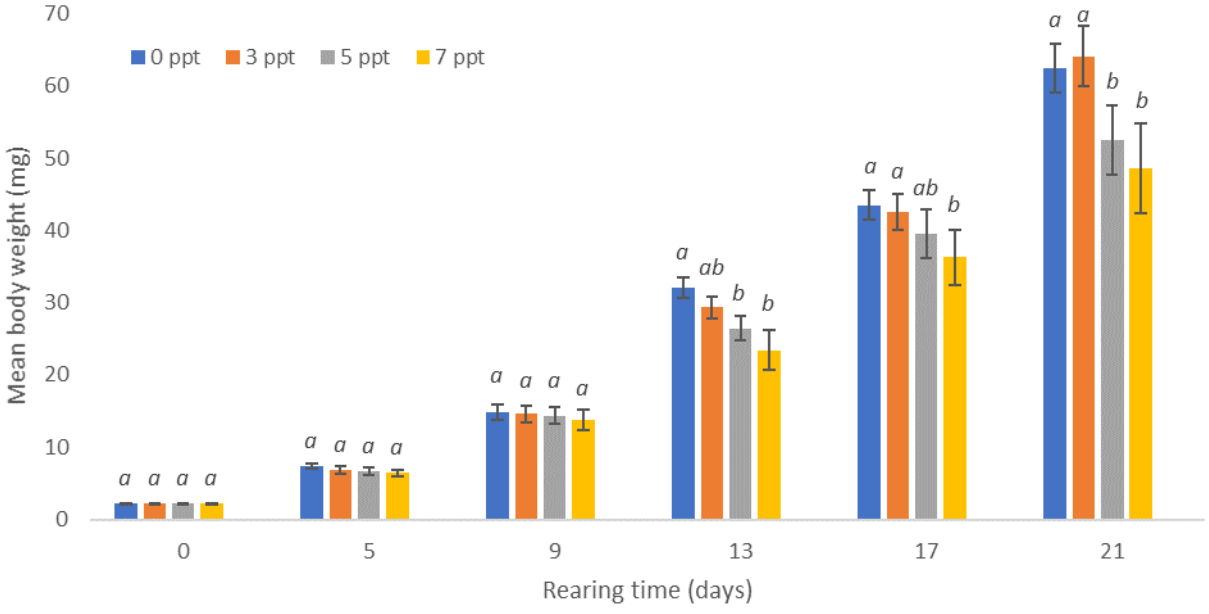


Figure 4. Increase in the body weight of blue bream *Ballerus ballerus* (L.) larvae reared in freshwater and in water with salinity of 3, 5, and 7 ppt. The same letter indexes above the columns in a given sample mean that the values are not statistically significantly different ($\alpha = 0.05$).

The smallest larvae were obtained by rearing them in water with salinity of 7 ppt. On the last day of rearing, they obtained an average weight of 48.6 mg, with an average length of 19.0 mm, while in water with salinity of 5 ppt, they obtained an average weight of 52.4 mg, with an average length of 19.2 mm. No statistically significant differences were noted between the average weight of individuals raised in salinity-free water and in water with

salinity of 3 ppt. Similarly, no statistically significant differences were noted between the average weight of individuals reared in water with salinity of 5 and 7 ppt. The highest biomass of the blue bream larvae of 62.2 g (2.5 g·dm^{-3}) was obtained in water with salinity of 3 ppt. The biomass of the blue bream larvae calculated for larvae from freshwater was only slightly lower, at 61.6 g (2.5 g·dm^{-3}). These differences were not statistically significant. The lowest biomass of larvae was obtained in water with salinity of 7 ppt, in which it was only 40.4 g (1.6 g·dm^{-3}). Table 1 also shows the results of the other studied breeding indicators such RGR and ITL.

The calculations in Table 2 also confirm that the best rearing conditions for blue bream larvae were recorded in water with salinity of 3 ppt.

Table 2. Relative mean final length (RFL), weight (RFW), and biomass (RFB) of experimental fish were calculated assuming that final length, weight, and biomass of the control 0 ppt were 100%.

Salinity (ppt)	RFL (%)	RFW (%)	RFB (%)
0	100.00	100.00	100.00
3	103.4	102.6	101.0
5	88.2	83.9	80.5
7	86.7	77.7	65.6

4. Discussion

Salinity is the total amount of dissolved mineral salts in water. It is determined by the absolute sum of salt concentrations in mg·dm^{-3} or in per mille. It can range from 2 to 390 mg·dm^{-3}. Sources of salinity in watercourses can be runoff from agricultural fields, rising sea levels, the regulation of river hydrology, mining, and the use of salt to de-ice roads [36,37]. It affects all types of freshwater ecosystems—lakes, rivers, streams, and wetlands. It is one of many environmental factors inhibiting the establishment and spread of hydrobionts. It is a limiting factor for habitats or areas in which the success of a species' reproduction is possible [13,38]. It affects the survival, metabolism, and occurrence of many fish species, which, as the most abundant group of hydrobionts vertebrates today, have mastered both low-ion-content waters—freshwaters—as well as those with high ion content—saline waters.

Research on the effects of different salinities on different life stages of freshwater fish has been conducted for a long time. Most of the studies have been on fish reared for consumption, in which the optimum salinity level to increase rearing efficiency in recirculating RAS systems has been determined [39–44]. Examples include studies on the rearing of larvae of sichel *Pelecus cultratus* [45] and asp *Leuciscus aspius* [28]. The above studies made it possible to raise more fish with less labour and energy.

Current investigations in many research centres focus on determining the ability of various taxa to survive in water where salinity has occurred rather than on increasing the effects of rearing using saline water. The described experiment on blue bream larvae fits perfectly into this issue, as developing embryos and early-stage fish larvae, in addition to fish gametes, are particularly sensitive to changes in water salinity [13–16,28,45,46]. Freshwater fish are exposed to saline water not only when they are in the intertidal zone or when migrating from fresh to saline waters, but also while in their natural habitat. These are not, however, places on the borderline between fresh and saline waters, but sections of rivers heavily polluted with salts [10]. In fact, for several decades, there has been an increasing level of salinity in large sections of inland waters created by anthropogenic activities, such as mining, metallurgy, and chemical industries, and as a result of the runoff of highly saline water from stormwater networks during the winter [1,47,48]. Point or sectional salinity is not without influence on the biocoenoses of local water bodies, including the resident ichthyofauna [1,10,13]. This study confirms that blue bream larvae, like asp larvae inhabiting similar environments, also tolerate waters with salinity levels of 3–7 ppt [28]. Older individuals of rheophilic cyprinid fish are able to tolerate much higher

water salinities. An example is the closely related asp *Leuciscus idus*, which tolerates water even with salinity of 15 ppt. Most likely, stenohaline organisms, which exhibit anadromous behaviour, inhabit mainly rivers and are often observed in waters with salinities of several per mille, will be the best adapted to these changes [49].

Differences in the growth of blue bream larvae in water with different salinity levels are confirmed by literature data, which show that changes in salinity result in greater energy consumption for osmotic and ionic regulation, meaning that less energy remains for growth and development [33,50–52]. Freshwater fish larvae placed in salt water (a hypertonic solution relative to body fluids) lose the water found in the tissues, resulting in an increase in salt concentration in the body. The acid–base balance of the blood is then violated. Haemoglobin is unable to properly bind oxygen found in the blood, which can lead to impaired oxygen metabolism in the body, and ultimately, death [53]. The above changes apply not only to larvae, but also to later life stages. The successful transfer of freshwater fish to high-salinity water involves the tolerance of tissues to changes in their hydration or the ability to regulate osmotic pressure, such as through the kidneys and gills. In the experiment conducted, it was observed that a gradual increase in salinity did not adversely affect the larvae of the blue bream. Small losses of larvae in the first days of the experiment were recorded in all aquaria with both salted and salt-free water.

The blue bream larvae had high survival and growth rates in water with salinity of 3 ppt, or 3 $g \cdot dm^{-3}$. According to a study by Lax and Peterson, sustained exposure to chloride concentrations above 25 $mg \cdot dm^{-3}$ can negatively affect freshwater fish [54]. The high tolerance of blue bream larvae to water with a salinity of 3 ppt indicates that there are large interspecies differences even among stenohaline carp in salt sensitivity [31]. The adaptability of fish to saline water may depend on previous salt exposure. Moreover, the mechanisms behind the possible acclimation or adaptation to salinity by freshwater organisms are still unexplored [55], and it is not known why some individuals of the same species better tolerate and others very poorly tolerate saline water [56,57].

The biological effects of salinity include the continued replacement of salt-intolerant organisms with those that can withstand elevated salt concentrations [58]. Increased salinity kills freshwater species due to toxic levels of sodium and chloride ions in their cells and the reduced ability to take up essential ions and water. These effects can reduce species diversity and significantly alter trophic systems by reducing food sources for consumers [59].

When discussing the effects of saline water on freshwater organisms, worth mentioning are the elements and chemical compounds that can potentiate the negative effects of chlorides and sulphides on organisms. Such elements are calcium, Ca, magnesium, Mg, and potassium, K. Sources of Ca and Mg can be road salts, such as $CaCl_2$ and $MgCl_2$, which are not only used in winter, but also in summer to bind dust on gravel roads [12]. The first two often form $CaCO_3$ and $MgCO_3$ compounds responsible for water hardness. The more of these compounds there are, the harder the water is, and the impact of chloride ions on organisms is lower [60]. In the described experiment, tap water (with a hardness of 24°n) was used as a diluent for sea salt. Presumably, this could have influenced such a high survival rate of blue bream larvae in all the salinities tested. The negative effects of chlorides and sulphides on freshwater organisms are compounded by the elevated presence of K [48]. Therefore, when rearing freshwater fish larvae in water of different salinity levels, as well as when predicting the ecological effects of introducing brine into inland waters, it is very important to consider the local water chemistry and the characteristics of the local species assemblage [61].

5. Conclusions

In the above experiment, the best growth parameters were obtained by rearing blue bream larvae in water with a salinity of 3 ppt. The higher salinity levels tested were also accepted by the blue bream larvae, as evidenced by the calculated rearing parameters. The survival rates of blue bream larvae in all salinities tested were very high, ranging from

83.2% to 97.0%. The tolerance of blue bream larvae to water with salinities of 3–7 ppt suggests that they are able to survive and thrive in natural waters with negligible salinities (up to 7 ppt).

Author Contributions: Investigation, P.P.; data curation, P.P.; formal analysis, P.P.; writing—review and editing, P.P.; conceptualization, R.K.; funding acquisition, R.K.; investigation, R.K.; resources supervision, writing—original draft, R.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland, project No. 18.610.005-110 and financially supported by the Minister of Education and Science under the program titled "Regional Initiative of Excellence" for the years 2019-2023, Project No. 010/RID/2018/19, amount of funding 12.000.000 PLN.

Institutional Review Board Statement: The research was carried out with the permission of the Local Ethical Committee in Olsztyn, No 27/2010 from 27 January 2010 for the years 2011–2015.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Molenda, T. Impact of a saline mine water discharge on the development of a meromictic pond, the Rontok Wielki Reservoir, Poland. *Mine Water Environ.* **2018**, *37*, 807–814.
2. Pörtner, H.O.; Peck, M.A. Climate change effects on fishes and fisheries: Towards a cause-and-effect understanding. *J. Fish Biol.* **2010**, *77*, 1745–1779.
3. Aldous, A.; Fitzsimons, J.; Richter, B.; Bach, L. Droughts, floods and freshwater ecosystems: Evaluating climate change impacts and developing adaptation strategies. *Mar. Freshw. Res.* **2011**, *62*, 223–231.
4. Malmqvist, B.; Rundle, S. Threats to the running water ecosystems of the world. *Environ. Conserv.* **2002**, *29*, 134–153.
5. Nel, J.L.; Roux, D.J.; Maree, G.; Kleynhans, C.J.; Moolman, J.; Reyers, B.; Rouget, M.; Cowling, R.M. Rivers in peril inside and outside protected areas: A systematic approach to conservation assessment of river ecosystems. *Divers. Distrib.* **2007**, *13*, 341–352.
6. Vörösmarty, C.J.; McIntyre, P.B.; Gessner, M.O.; Dudgeon, D.; Prusevich, A.; Green, P.; Glidden, S.; Bunn, S.E.; Sullivan, C.A.; Reidy Liermann, C.; et al. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* **2010**, *467*, 555–561.
7. Braukmann, U.; Böhme, D. Salt pollution of the middle and lower sections of the river Werra (Germany) and its impact on benthic macroinvertebrates. *Limnologica* **2011**, *41*, 113–124.
8. Hübner, G. Ökologisch-faunistische Fließgewässerbewertung am Beispiel der salzbelasteten unteren Werra und ausgewählter Zuflüsse. Dissertation Universität Kassel. **2007,** Fachbereich Architektur, Stadtplanung, Landschaftsplanung, 303 S, Kassel.
9. Sauer, F.G.; Bundschuh, M.; Zubrod, J.P.; Schäfer, R.B.; Thompson, K.; Kefford, B.J. Effects of salinity on leaf breakdown: Dryland salinity versus salinity from a coalmine. *Aquat. Toxicol.* **2016**, *177*, 425–432.
10. Cañedo-Argüelles, M.; Kefford, B.J.; Piscart, C.; Prat, N.; Schäfer, R.B.; Schulz, C.J. Salinisation of rivers: An urgent ecological issue. *Environ. Pollut.* **2013**, *173*, 157–167.
11. Evans, M., C. Frick. The effects of road salts on aquatic ecosystems. Environment Canada." Water Science and Technology Directorate. **2001**, Report no. 02–308.
12. Hintz, W.D.; Relyea, R.A. A review of the species, community, and ecosystem impacts of road salt salinisation in fresh waters. *Freshw. Biol.* **2019**, *64*, 1081–1097.
13. James, K.R.; Cant, B.; Ryan, T. Responses of freshwater biota to rising salinity levels and implications for saline water management: A review. *Aust. J. Bot.* **2003**, *51*, 703–713.
14. Fridman, S.; Bron, J.; Rana, K. Influence of salinity on embryogenesis, survival, growth and oxygen consumption in embryos and yolk-sac larvae of the Nile tilapia. *Aquaculture* **2012**, *334*, 182–190.
15. Mardaneh Khatooni, M.; Mojazi Amiri, B.; Mirvaghefi, A.; Jafari, V.; Hoseinifar, S.H. The effects of salinity on the fertilization rate and rearing of the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) larvae. *Aquac. Int.* **2012**, *20*, 1097–1105.
16. Kültz, D. Physiological mechanisms used by fish to cope with salinity stress. *J. Exp. Biol.* **2015**, *218*, 1907–1914.
17. Hintz, W.D.; Relyea, R.A. Impacts of road deicing salts on the early-life growth and development of a stream salmonid: Salt type matters. *Environ. Pollut.* **2017**, *223*, 409–415.
18. Swanson, C. Interactive effects of salinity on metabolic rate, activity, growth and osmoregulation in the euryhaline milkfish (*Chanos chanos*). *J. Exp. Biol.* **1998**, *201*, 3355–3366.

19. Bein, R.; Ribi, G. Effects of larval density and salinity on the development of perch larvae (*Perca fluviatilis* L.). *Aquat. Sci.* **1994**, *56*, 97–105.
20. Jäger, T.; Nellen, W.; Schöfer, W.; Shodjai, F. Influence of salinity and temperature on early life stages of *Coregonus albula*, *C. lavaretus*, *R. rutilus* and *L. lota*. *Rapports er Proces-verbaux des Réunions Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer* **1981**, *178*, 345–348.
21. Klinkhardt, M.B.; Winkler, H.M. Einfluß der Salinität auf die Befruchtungs-und Entwicklungsfähigkeit der Eier von vier Süßwasserfischarten Plötz (*Rutilus rutilus*), Barsch (*Perca fluviatilis*), Kaulbarsch (*Gymnocephalus cernua*) und Zander (*Stizostedion lucioperca*). *Wiss. Z. Univ. Rostock* **1989**, *38*, 23–30.
22. Grøtan, K.; Østbye, K.; Taugbøl, A.; Vøllestad, L.A. No short-term effect of salinity on oxygen consumption in threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) from fresh, brackish, and salt water. *Can. J. Zool.* **2012**, *90*, 1386–1393.
23. *Ballerus ballerus* (Linnaeus, 1758). Available online: https://www.fishbase.se/summary/Ballerus-ballerus.html (accessed on 13 February 2023).
24. Tadajewska, M. Blue bram Abramis ballerus. Freshwater fish of Poland (Ed.) M. Brylińska, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa. **2000**, 257-261.
25. Piech, P.; Kujawa, R. Artificial reproduction of blue bream (*Ballerus ballerus* L.) as a conservative method under controlled conditions. *Animals* **2021**, *11*, 1326.
26. Piech, P.; Kujawa, R. Impact of replacing natural food with commercial feed on the growth and survival of blue bream larvae (*Ballerus ballerus*) under controlled conditions. *Fish. Aquat. Life* **2022**, *30*, 192–201.
27. Kolada, A. *Wstępny Raport Zespołu ds. Sytuacji na Rzece Odrze*; Instytut Ochrony Środowiska-Państwowy Instytut Badawczy: 2022, Warszawa, Polska.
28. Kujawa, R.; Piech, P. Influence of Water Salinity on the Growth and Survivability of Asp Larvae *Leuciscus aspius* (Linnaeus, 1758) under Controlled Conditions. *Animals* **2022**, *12*, 2299.
29. Sorgeloos, P.; Bossuyt, E.; Lavina, E.; Baeza-Mesa, M.; Persoone, G. Decapsulation of Artemia cysts: A simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture. *Aquaculture* **1977**, *12*, 311–315.
30. Nowosad, J.; Żarski, D.; Biłas, M.; Dryl, K.; Krejszeff, S.; Kucharczyk, D. Dynamics of ammonia excretion in juvenile common tench, *Tinca tinca* (L.), during intensive rearing under controlled conditions. *Aquac. Int.* **2013**, *21*, 629–637.
31. Imanpoor, M.R.; Najafi, E.; Kabir, M. Effects of different salinity and temperatures on the growth, survival, haematocrit and blood biochemistry of Goldfish (*Carassius auratus*). *Aquac. Res.* **2012**, *43*, 332–338.
32. Peňáz, M.; Prokeš, M.; Kouřil, J.; Hamáčková, J. Influence of water temperature on the early development and growth of the tench, *Tinca tinca*. *Folia Zool.* **1989**, *38*, 275–287.
33. Brown, M.E. (Ed.) Experimental studies on growth. In *The Physiology of Fishes*; Academic Press: New York, NY, USA, 1957; pp. 361–400.
34. Myszkowski, L. Pitfalls of using growth rate coefficients. *Pol. Arch. Hydrobiol.* **1997**, *44*, 389–396.
35. Duncan, D.B. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* **1955**, *11*, 1–42.
36. Castillo, A.M.; Sharpe, D.M.; Ghalambor, C.K.; De León, L.F. Exploring the effects of salinization on trophic diversity in freshwater ecosystems: A quantitative review. *Hydrobiologia* **2018**, *807*, 1–17.
37. Herbert, E.R.; Boon, P.; Burgin, A.J.; Neubauer, S.C.; Franklin, R.B.; Ardón, M.; Hopfensperger, K.N.; Lamers, L.P.M.; Gell, P. A global perspective on wetland salinization: Ecological consequences of a growing threat to freshwater wetlands. *Ecosphere* **2015**, *6*, 1–43.
38. Lind, L.; Schuler, M.S.; Hintz, W.D.; Stoler, A.B.; Jones, D.K.; Mattes, B.M.; Relyea, R.A. Salty fertile lakes: How salinization and eutrophication alter the structure of freshwater communities. *Ecosphere* **2018**, *9*, e02383.
39. Jackson, A.G. Salinity tolerance and osmotic behavior of European carp (*Cyprinus carpio* L.) from the river Murray, Australia. *Trans. R. Soc. Aust.* **1981**, *103*, 185–189.
40. Wang, J.Q.; Lui, H.; Po, H.; Fan, L. Influence of salinity on food consumption, growth and energy conversion efficiency of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Aquaculture* **1997**, *148*, 115–124.
41. Al-Faiz, A.F.; Jabir, A.; Yesser, A. Variance salinity concentrations effects on survival, growth and feeding of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Iraqi J. Aquac.* **2009**, *6*, 59–70.
42. Kang'ombe, J.; Brown, J.A. Effect of salinity on growth, feed utilization, and survival of *Tilapia rendalli* under laboratory conditions. *J. Appl. Aquac.* **2010**, *20*, 256–271.
43. Qiang, J.; Xu, P.; Wang, H.; Li, R.; Wang, H. Combined effect of temperature, salinity and density on the growth and feed utilization of Nile tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Res.* **2012**, *43*, 1344–1356.
44. Al-Khshali, M.S.; Al Hilali, H.A. Influence of transfer to high salinity on chloride cells, oxygen and energy consumption in Common carp *Cyprinus carpio*. *J. Anim. Sci. Prod.* **2019**, *2*, 1–12.
45. Kujawa, R.; Lach, M.; Pol, P.; Ptaszkowski, M.; Mamcarz, A.; Nowosad, J.; Furgała-Selezniow, G.; Kucharczyk, D. Influence of water salinity on the survival of embryos and growth of the sichel larvae *Pelecus cultratus* (L.) under controlled conditions. *Aquac. Res.* **2017**, *48*, 1302–1314.

46. Lawson, E.O.; Alake, S.A. Salinity adaptability and tolerance of hatchery reared comet goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus 1758). *Int. J. Zool. Res.* **2011**, *7*, 68–76.
47. Ziemann, H. Untersuchungen über den Einfluß verdünnter Kaliendlaugen auf den Abbau organischer Substanzen im Wasser. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **1973**, *1*, 257–265.
48. Schulz, C.J.; Cañedo-Argüelles, M. Lost in translation: The German literature on freshwater salinization. *Philos. Trans. R. Soc. B* **2019**, *374*, 20180007.
49. Skovrind, M.; Olsen, M.T.; Vieira, F.G.; Pacheco, G.; Carl, H.; Gilbert, M.T.P.; Møller, P.R.R. Genomic population structure of freshwater-resident and anadromous ide (*Leuciscus idus*) in north-western Europe. *Ecol. Evol.* **2016**, *6*, 1064–1074.
50. Febry, R.; Lutz, P. Energy partitioning in fish: The activity related cost of osmoregulation in a euryhaline cichlid. *J. Exp. Biol.* **1987**, *128*, 63–85.
51. Alderdice, D.F. Osmotic and ionic regulation in teleost eggs and larvae. In *Fish Physiology*; Hoar, W.S., Randall, D.J., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, 1988; Volume XIA, pp. 163–251.
52. Bœuf, G.; Payan, P. How should salinity influence Fish growth? *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **2001**, *130*, 411–423.
53. Varsamos, S.; Nebel, C.; Charmantier, G. Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: A review. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **2005**, *141*, 401–429.
54. Lax, S.; Peterson, E.W. Characterization of chloride transport in the unsaturated zone near salted road. *Environ. Geol.* **2009**, *58*, 1041–1049.
55. Coldsnow, K.D.; Mattes, B.M.; Hintz, W.D.; Relyea, R.A. Rapid evolution of tolerance to road salt in zooplankton. *Environ. Pollut.* **2017**, *222*, 367–373.
56. Van Dam, R.A.; Harford, A.J.; Lunn, S.A.; Gagnon, M.M. Identifying the cause of toxicity of a saline mine water. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e106857.
57. Scheibener, S.A. In The Osmoregulatory Physiology in Aquatic Insects: Implications for Major Ion Toxicity in a Saltier World. Available online: https://repository.lib.ncsu.edu/bitstream/handle/1840.20/34347/etd.pdf?sequence=1 (accessed on 3 April 2023).
58. Radke, L.C.; Juggins, S.; Halse, S.A.; De Deckker, P.; Finston, T. Chemical diversity in south-eastern Australian saline lakes II: Biotic implications. *Mar. Freshw. Res.* **2003**, *54*, 895–912.
59. Finlayson, C.M.; Davis, J.A.; Gell, P.A.; Kingsford, R.T.; Parton, K.A. The status of wetlands and the predicted effects of global climate change: The situation in Australia. *Aquat. Sci.* **2013**, *75*, 73–93.
60. Elphick, J.F.; Bergh, K.D.; Bailey, H.C. Chronic toxicity of chloride to freshwater species: Effects of harness and implications for water quality guidelines. *Environ. Toxicol. Chem.* **2011**, *30*, 239–246.
61. Moffett, E.R.; Baker, H.K.; Bonadonna, C.C.; Shurin, J.B.; Symons, C.C. Cascading effects of freshwater salinization on plankton communities in the Sierra Nevada. *Limnol. Oceanogr. Lett.* **2023**, *8*, 30–37.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.