



Instrukcja doradcza

nr 13/RD/2023

**Sortowanie wylęgu sandacza (*Sander
luciperca*) pod kątem wypełnienia
pęcherza pławnego**



Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”; ETAP III; akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20 z dnia 16.01.2020 r.**

Instrukcja doradcza

Sortowanie wylęgu sandacza (*Sander lucioperca*) pod kątem wypełnienia pęcherz pławnego

Autorzy:

Prof. dr hab. inż. Zdzisław Zakęś

Dr inż. Maciej Rożyński

Dr inż. Sławomir Krejszef

Mgr inż. Marek Hopko

Zakład Akwakultury, Instytut Rybnictwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza –
Państwowy Instytut Badawczy



Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”;
ETAP III; akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20 z dnia 16.01.2020 r.**

Spis treści

1. Wstęp	4
2. Odsortowywanie ryb z wypełnionym pęcherzem pławnym	5
3. Przygotowywanie roztworu MS-222	7
4. Literatura	11



1. Wstęp

Ryby okoniowate należą do tzw. gatunków zamkniętopęcherzowych. Oznacza to, że napełnienie pęcherza pławnego jest u nich możliwe jedynie w krótkim okresie ich rozwoju ontogenetycznego (Ostaszewska 2002, Demska-Zakęś i in. 2003, Kowalska i in. 2003, Kowalska i Zakęś 2004, Zakęś 2012, 2017, Zakęś i in. 2015). W czasie rozwoju osobniczego larw sandacza (*Sander lucioperca*) ze zmianami zachodzącymi w przewodzie pokarmowym związany jest zanik drożności (atrofia) przewodu powietrznego (*ductus pneumaticus*) przez który „przetłaczane” jest powietrze atmosferyczne zaczerpnięte sponad powierzchni wody. Należy podkreślić, że zainicjowanie procesu napełniania pęcherza pławnego warunkuje dalszy prawidłowy wzrost i przeżywalność larw. Intensyfikacja podchowu ryb w systemach recyrkulacyjnych (RAS), rozkład nieopbranej paszy i śniętych larw (woreczków żółtkowych i kropli tłuszczu), przyczynia się do tworzenia na powierzchni basenów podchowowych błony, stanowiącej bardzo często barierę dla larw próbujących zaczerpnąć powietrze atmosferyczne. Celem rozwiązania tego problemu, a w rezultacie zwiększenia efektywności podchowu larw, stosuje się różne metody usuwania czy też rozbijania błony powierzchniowej. Wcześniejsze badania wykazały, że w przypadku larw sandacza satysfakcjonujące wyniki daje stosowanie tzw. natrysku (Szkudlarek 2005, Zakęś 2017). U dorady (*Sparus auratus*) stosowano też inne rozwiązania techniczne i metody usuwania błony powierzchniowej (Chatain 1989). Polegały one m.in. na wtłaczaniu błony powierzchniowej za pomocą odpowiednio umocowanej rurki, przez którą przepływał strumień powietrza, do wnętrza ramki-pułapki. Urządzenie to w języku angielskim nosi nazwę „skimmer”, co w bezpośrednim tłumaczeniu na język polski znaczy m.in. „szumówka”. Nazwa ta wprawdzie bardzo trafnie oddaje istotę działania tego urządzenia, ale chyba poprawniejsze będzie używanie bardziej złożonego terminu – np. strumieniowy zgarniacz błony powierzchniowej. Testy przeprowadzone w czasie podchowu larw sandacza nie potwierdziły jednak skuteczności tego rozwiązania (Szkudlarek 2005, Zakęś 2017).

Pomimo stosowania rozwiązań technicznych ułatwiających wypełnienie pęcherza pławnego przez larwy sandacza pewien ich odsetek jednak go nie napełnia. W rezultacie konieczne jest odsortowanie tego rodzaju ryb. Jest to bowiem materiał o istotnie obniżonej wartości hodowlanej, o niższym potencjale wzrostowym, z



deformacjami ciała, a jego obecność w podchowie nasila zjawisko kanibalizmu (Zakęś 2017).

2. Odsortowywanie ryb z wypełnionym pęcherzem pławnym

Czas napełniania pęcherza pławnego u wylęgu sandacza zależy od tempa rozwoju osobniczego, które jest determinowane temperaturą wody. Przykładowo w temperaturze wody 18 i 22°C może on napełniać pęcherz, odpowiednio do 16-17 i 11-12 dnia po wykluciu (dpw). W rekomendowanej do podchovu larw sandacza temperaturze wody (RAS), tj. 20°C proces ten jest możliwy do 10-12 dnia podchovu (wiek 14-16 dpw) (fot. 1). Symptomy rozpoczęcia procesu wypełniania pęcherza pławnego (badania histologiczne) obserwowane są już pierwszego dnia podchovu (wiek wylęgu 4-5 dpw; Kowalska i in. 2003). Przyżyciowo, używając mikroskopu, odsetek wylęgu z napełnionym pęcherzem pławnym można oszacować po 9-10 dniach podchovu (Zakęś 2017).

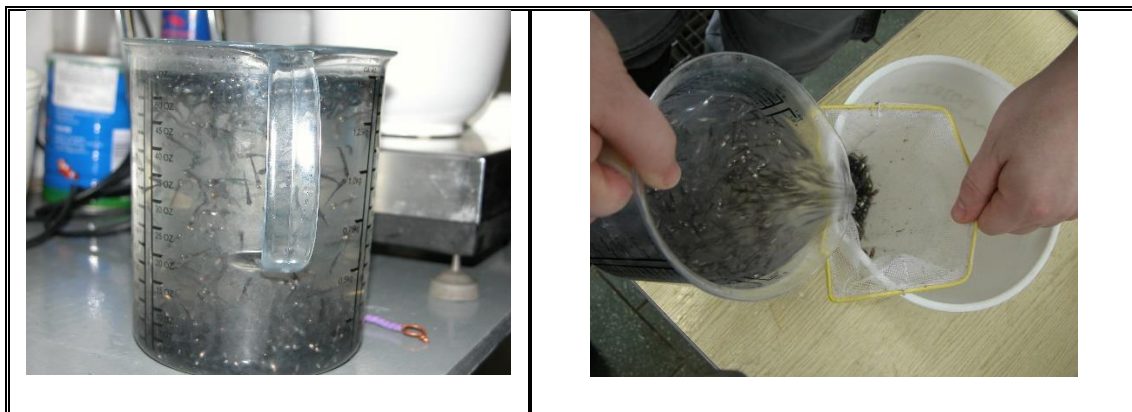


Fot. 1. Wylęg sandacza w początkowej fazie napełniania pęcherza pławnego (wiek 8 dpw, temperatura wody - 20°C; pod mikroskopem pęcherz pławny jest widoczny w postaci srebrzącej się kulki) (fot. Z. Zakęś).

Teoretycznie już po tym czasie można by spróbować oddzielić osobniki z wypełnionym pęcherzem pławnym od larw z niewypełnionym pęcherzem. Jednak obecnie nie ma metod, które byłyby bezpieczne dla larw sandacza i zapewniały ich wysoką przeżywalność. Podchowując wylęg sandacza w temperaturze wody ok. 20°C zabieg oddzielania ryb z wypełnionym pęcherzem pławnym przeprowadzamy pod koniec 3 lub w 4 tygodniu podchovu. Przyjąć należy, że średnia masa ciała wylęgu musi wynosić > 50 mg (Zakęś 2017). Przeprowadzenie masowego sortowania materiału

należy poprzedzić testami na próbach o małej liczebności. Przykładowo, z basenu pobieramy ok. 100 larw i sortujemy w roztworze soli oraz anestetyku (*szczegóły poniżej*). Wylęg z wypełnianym pęcherzem przenosimy do naczynia ze świeżą wodą i po kilku minutach określamy odsetek wybudzonych ryb (przeżywalność). Następnie pod mikroskopem analizujemy, czy w tej próbie występują jedynie ryby z wypełnianym pęcherzem pławnym. Natomiast próbę ryb z niewypełnionym pęcherzem badamy pod mikroskopem pod kątem obecności ryb z wypełnionym pęcherzem. Do masowego sortowania wylęgu sandacza można przystąpić, gdy odsetek wybudzonych osobników z wypełnionymi pęcherzami wynosi powyżej 95%, a w próbie ryb z niewypełnionym pęcherzem pławnym liczba tego rodzaju ryb stanowi powyżej 98% (Zakęś 2017).

Obecnie do odsortowywania ryb z wypełnionym pęcherzem pławnym polecać można stosowanie wodnego roztworu soli kuchennej (NaCl) i anestetyku. Rekomendowane stężenie uzyskuje się rozpuszczając w 1 litrze wody 10 g NaCl i anestetyk (MS-222) 20-50 mg/l. Przed sortowaniem konieczne jest krótkotrwałe przegłodzenie wylęgu. Nie podajemy pokarmu przez 3-4 godziny. Do sporządzenia roztworu używamy dobrze natlenionej wody pobranej z dopływów do basenów podchowowych. Do przeprowadzania tego zabiegu najlepiej użyć plastikowych, przezroczystych pojemników miarowych o objętości 1-2 litry (fot. 2). Ryby odławiamy kasarkiem o małym oczku (# 0,2 mm) i przenosimy do naczynia z roztworem soli kuchennej i anestetyku. Delikatnie mieszamy (końcem kasarka). Po kilkunastu/kilkudziesięciu sekundach uśpione ryby z wypełnionym pęcherzem pławnym są wynoszone na powierzchnię wody w naczyniu. Z kolei ryby bezpęcherzowe opadają na dno. Ryby pęcherzowe zlewamy przez kasarek i umieszczamy w sadzyku z dopływem świeżej wody, w którym przebywają do odpicia się (aktywnego, horyzontalnego poruszania się). Z rybami, które opadły na dno naczynia całą procedurę powtarzamy jeszcze dwa razy i odławiamy pozostałe osobniki z wypełnionymi pęcherzami pławnymi (fot. 2).



Fot. 2. Oddzielanie wylęgu sandacza z wypełnionym pęcherzem pławnym w naczyniu z wodnym roztworem soli kuchennej i MS-222. Ryby z wypełnionym pęcherzem są wynoszone ku górze naczynia - początkowa faza procedury (fotografia lewa). Zlewanie wylęgu sandacza z wypełnionym pęcherzem z naczynia z roztworem soli i anestetyku do kasarka (fotografia prawa) (fot. Z. Zakęś)

Ryby bez wypełnionego pęcherza pławnego z punktu widzenia hodowcy są nieprzydatne do dalszego podchowu. Po odsortowaniu należy je uspić stosując przedawkowanie MS-222 (stężenie 200 mg/l) lub poprzez umieszczenie na lodzie, a następnie poddać utylizacji. Osobniki z wypełnionym pęcherzem pławnym, po odpiciu w sadzyku, umieszczamy w basenach podchowowych. Obsadzanie basenów podchowowych i żywienie larw z wypełnionych pęcherzem pławnym przeprowadzamy według procedur opracowanych dla tego gatunku (Zakęś 2017).

3. Przygotowywanie roztworu MS-222

Głównymi zaletami stosowania anestetyków, oprócz wyciszenia reakcji stresowej organizmu, jest istotne skrócenie czasu manipulacji oraz zminimalizowanie ich negatywnych skutków, np. uszkodzeń mechanicznych ciała, jak również śmiertelności pomanipulacyjnej (Park i in. 2008). Pośród środków znieczulających, mniej lub bardziej popularnych w akwakulturze, szczególne miejsce zajmuje metanosulfonian trikainy ($C_9H_{11}O_2N + CH_3SO_3H$) spotykany częściej pod nazwą MS-222. Od momentu jego opracowania i wprowadzenia na rynek w 1967 roku jest on najpopularniejszym oraz najczęściej stosowanym środkiem w celu indukcji znieczulenia ogólnego w akwakulturze (Topic Popovic i in. 2012). Początkowo MS-222 był opracowywany jako miejscowy środek przeciwbólowy w medycynie ludzkiej, jednak szybko odkryto, że ma on również bardzo dobre właściwości znieczulające w przypadku zwierząt wodnych.

Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”; ETAP III; akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20 z dnia 16.01.2020 r.**

W Stanach Zjednoczonych MS-222 został zatwierdzony przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (Food and Drug Administration, FDA) do stosowania jako środek znieczulający w akwakulturze, ale tylko w przypadku niektórych rodzin ryb, a mianowicie: sumikowatych (Ictaluridae), łososiowatych (Salmonidae), szczupakowatych (Esocidae) i okoniowatych (Percidae) (FDA 2022). W Unii Europejskiej (UE) na podstawie decyzji Europejskiej Agencji Leków (EMA) MS-222 został dopuszczony do stosowania w akwakulturze wyłącznie w roztworze wodnym. Pomimo powyższej decyzji, w wielu krajach UE MS-222 nie został uwzględniony/zarejestrowany jako środek do stosowania w akwakulturze, np. w Hiszpanii i Francji. Obecnie MS-222 w kilku krajach jest dostępny na rynku pod różnymi nazwami handlowymi i oferowany przez różne firmy farmaceutyczne, np. Aqua Life TMSTM (Syndel, Canada), FinquelTM (Argent Chemical laboratories, USA), Tricaine-STM (Western Chemical Inc., USA).

Kluczowe znaczenie podczas przygotowywania roztworu znieczulającego na bazie MS-222 ma dobór odpowiedniego stężenia i czasu kąpieli (Rożyński i in. 2018). Czynniki te są przede wszystkim zależne od gatunku, który poddajemy kąpieli, masy ciała/sortymentu oraz temperatury wody. MS-222 bardzo dobrze rozpuszcza się w wodzie tworząc klarowny bezbarwny roztwór. Bardzo wysoka rozpuszczalność sprawia, że nadaje się on do stosowania zarówno w wodzie słodkiej, jak i morskiej (Maricchiolo i Genovese 2011). Roztwór ma odczyn kwaśny, ponieważ MS-222 w kontakcie z wodą tworzy kwas metanosulfonowy (Smith i in. 1999). Dlatego podstawową czynnością podczas przygotowywania kąpieli znieczulającej powinno być zastosowanie odpowiedniej substancji buforującej zbyt niskie pH roztworu. Wykazano bowiem, że roztwór MS-222, w zależności od twardości wody i stężenia anestetyku, może mieć krytycznie niskie pH, bliskie 2,8 (Ohr 1976). To z kolei może w negatywny sposób wpływać na ryby poddawane znieczuleniu ogólnemu. Zbyt niskie pH może bowiem być przyczyną szeregu zaburzeń fizjologicznych u ryb, np.: zmian w gospodarce jonowej i osmotycznej organizmu, zagęszczenia krwi i wzrostu jej ciśnienia, a także zahamowania tempa metabolizmu i wzrostu ryb (Carter i in. 2011). Niebuforowany MS-222 może powodować również uszkodzenia skóry, nabłonka oddechowego i rogówki u ryb (Davis i in. 2008). Dowiedziono również, że zobojętniony MS-222 powoduje szybsze, trwalsze i bardziej harmonijne znieczulenie ze



Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”; ETAP III; akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20 z dnia 16.01.2020 r.**

skróconym czasem powrotu do stanu równowagi. Najpopularniejszą substancją wykorzystywaną do buforowania kwaśnego odczynu MS-222 jest wodorowęglan sodu (NaHCO_3) stosowany w stosunku 1:2 (MS-222 : NaHCO_3) (Kolanczyk i in. 2003, Wagner i in. 2003). MS-222 może być również buforowany przy użyciu innych substancji, np. wodorofosforanu sodu (Na_2HPO_4), wodorotlenku sodu (NaOH) lub imidazolu (Davis i in. 2008).

MS-222 występuje pod postacią proszku, który przed sporządzeniem roztworu musi zostać odważony w odpowiedniej ilości. Dodatkowym utrudnieniem podczas indukcji znieczulenia ogólnego za pomocą tego anestetyku jest konieczność buforowania jego kwaśnego odczynu. Z tego powodu dużym ułatwieniem mogłoby być wcześniejsze przygotowanie roztworu i jego przechowywanie do czasu użycia (tab. 1).



Projekt pt.: Program Doradztwa Rybackiego „Rozradzanie, wylęgarnictwo, podchów ryb i zarybianie”; ETAP III; akronim „DORADZTWO”; Nr Umowy: **00002-6521.2-OR1400003/18/20 z dnia 16.01.2020 r.**

Tabela 1. Procedura przygotowania wodnego roztworu MS-222 do znieczulania ogólnego ryb o przykładowej objętości 5 l

Potrzebne materiały:

1. MS-222;
2. Wodorowęglan sodu (bufor);
3. Woda destylowana;
4. Waga o dokładności $\pm 0,001$ g;
5. Naczynie o pojemności 1 l;
6. Pojemnik, w którym usypiane będą ryby;
7. Woda z podchowalni;
8. Naczynie miarowe z podziałką o dokładności ± 50 ml.

Kolejne kroki w procedurze:

1. Po wytarowaniu naczynia na wadze, odważamy w nim 1000 mg MS-222;
2. Następnie bez tarowania, w celu zbuforowania kwaśnego odczynu MS-222 dodajemy do naczynia 2000 mg wodorowęglanu sodu;
3. Bez tarowania dolewamy do naczynia wodę destylowaną do momentu uzyskania roztworu o masie 1000 g;
4. Kolejnym krokiem jest dokładne rozmieszanie roztworu;
5. Tym sposobem otrzymaliśmy roztwór wyjściowy o stężeniu MS-222 1000 mg/l;
6. Następnie w celu otrzymaniażądanego stężenia roztworu docelowego (**tabela, kolumna 3**) odmierzamy odpowiednią objętość roztworu wyjściowego (**tabela, kolumna 1**) i wlewamy ją do pojemnika, w którym ryby będą usypiane;
7. Ostatnim krokiem w procedurze jest dodanie do pojemnika wody podchowowej o odpowiedniej objętości (**tabela, kolumna 2**).

Przykładowe proporcje składników pozwalające otrzymać roztwór MS-222 o objętości 5 l

1	2	3
Objętość roztworu wyjściowego	Objętość wody podchowowej	Stężenie MS-222 w roztworze docelowym
250 ml	4,75 l	50 mg/l
500 ml	4,50 l	100 mg/l
750 ml	4,25 l	150 mg/l

4. Literatura

- Carter K.M., Woodley C.M., Brown R.S. 2011 – A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish – Rev. Fish Biol. Fish. 21: 51-59.
- Chatain P. 1989 – Problems related to the lack of functional swimbladder in intensive rearing of *Dicentrarchus labrax* and *Sparus auratus* – W: Advances in tropical aquaculture. AQUACOP IFREMER. Actes de Colloque 9: 699-709.
- Davis M.W., Stephenson J., Noga E.J. 2008 – The effect of tricaine on use of the fluorescein test for detecting skin and corneal ulcers in fish – J. Aquat. Anim. Health 20: 86-95.
- Demska-Zakęś K., Kowalska A., Zakęś Z. 2003 – The development of the swim bladder of pikeperch *Sander lucioperca* (L.) reared in intensive culture – Arch. Pol. Fish. 11: 45-55.
- FDA 2022 – Approved Animal Drug Products (Green Book) – <https://animaldrugsatfda.fda.gov/adafda/views/#/search>
- Kolanczyk R.C., Fitzsimmons P.N., McKim J.M., Erickson R.J., Schmieder P.K. 2003 – Effects of anaesthesia (tricaine methanesulfonate, MS222) on liver biotransformation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) – Aquat. Toxicol. 64: 177-184.
- Kowalska A., Demska-Zakęś K., Zakęś Z. 2003 – Krytyczne okresy w intensywnym podchowcie sandacza – W: Ryby drapieżne. Rozród, podchów, profilaktyka (Red.) Z. Zakęś, K. Demska-Zakęś, T. Krzywosz, J. Wolnicki. Wyd. IRS, Olsztyn: 43-50.
- Kowalska A., Zakęś Z. 2004 – Etiologiczne aspekty deformacji ciała ryb – W: Rozród, podchów, profilaktyka ryb jesiutowatych i innych gatunków (Red.) Z. Zakęś, R. Kolman, K. Demska-Zakęś, T. Krzywosz. Wyd. IRS, Olsztyn: 183-194.
- Maricchiolo G., Genovese L. 2011 – Some contributions to knowledge of stress response in innovative species with particular focus on the use of the anaesthetics – Open Mar. Biol. J. 5: 24-33.
- Ohr E.A. 1976 – Tricaine methanesulfonate. I. pH and its effect on aesthetic potency – Comp. Biochem. Physiol. C. 54: 13-17.
- Ostaszewska T. 2002 – Zmiany morfologiczne i histopatologiczne układu pokarmowego i pęcherza pławnego w okresie wczesnej organogenezy larw

- sandacza (*Stizostedion lucioperca* L.) w różnych warunkach odchowu – Wyd. SGGW, Rozprawy Naukowe i Monografie, 96 s.
- Park M.O., Hur W.J., Im S.Y., Seol D.W., Lee J., Park I.S. 2008 – Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil-anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus* – Aquac. Res. 39: 877-884.
- Rożyński M., Hopko M., Stawecki K., Zakęś Z. 2018 – Impact of fish size, water temperature, and MS-222 concentration on inducing general anesthesia in pikeperch (*Sander lucioperca*) – Aquac. Res. 49: 2774-2781.
- Smith D.A., Smith S.A., Holladay S.D. 1999 – Effect of previous exposure to tricaine methanesulfonate on time to anaesthesia in hybrid tilapias – J. Aquat. Anim. Health 11: 183-186.
- Szkuclarek 2005 – Zraszanie powierzchni wody w basenach podchowowych jako metoda przeciwdziałania syndromowi braku napełnienia pęcherza pławnego u larw sandacza (*Sander lucioperca*) – W: Rozród, podchów, profilaktyka ryb sumokształtnych i innych gatunków (Red.) Z. Zakęś. Wyd. IRS, Olsztyn: 145-151.
- Topic Popovic N., Strunjak-Perovic I., Coz-Rakovac R., Barisic J., Jadan M., Persin Berakovic A., Sauerborn Klobucar R. 2012 – Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia – J. Appl. Ichthyol. 28: 553-564.
- Wagner G.N., Singer T.D., McKinley R.S. 2003 – The ability of clove oil and MS-222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) – Aquac. Res. 34: 1139-1146.
- Zakęś Z. 2012 – Cultured Aquatic Species Information Programme. *Sander lucioperca*. Cultured Aquatic Species Information Programme – W: *FAO Fisheries and Aquaculture Department*.
http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sander_lucioperca/eonline, Rzym, Włochy.
- Zakęś Z. 2017 – Chów i hodowla sandacza – Wyd. IRS, Olsztyn, 212 s.
- Zakęś Z., Szczepkowski M., Kapusta A., Rożyński M., Stawecki K., Pyka J., Szczepkowska B., Wunderlich K., Kozłowski M., Kowalska A., Hopko M. 2015 – Z akwakultury do natury. Opracowanie alternatywnych metod zarządzania rybołówstwem drapieżnych ryb jeziorowych – Wyd. IRS, Olsztyn, 224 s.