

## PENGARUH VITAMIN B<sub>12</sub> DAN PENGKAYAAN FITOPLANKTON KEPADATAN TINGGI TERHADAP KEPADATAN DAN KUALITAS ROTIFER (*Brachionus rotundiformis*)

Gede S. Sumiarsa<sup>\*)</sup>, Dahlan Makatutu<sup>\*)</sup> dan Ibnu Rusdi<sup>\*)</sup>

### ABSTRAK

Rendahnya kualitas rotifer sering menyebabkan kualitas larva ikan yang diberi pakan rotifer tersebut juga rendah. Oleh sebab itu perlu dilakukan upaya-upaya untuk memperbaiki kualitas rotifer. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui dosis vitamin B<sub>12</sub> dan periode pengkayaan fitoplankton yang terbaik dalam kultur rotifer. Pada penelitian pertama perlakuan yang diterapkan adalah dosis vitamin B<sub>12</sub> 10, 20, 30 pg/ekor selama 48 jam budidaya, sedangkan pada penelitian kedua perlakuan yang diterapkan adalah pengkayaan fitoplankton selama 1, 2, 3 jam. Hasil penelitian pertama menunjukkan bahwa pemberian vitamin B<sub>12</sub> dengan dosis minimal 10 pg/ekor telah dapat meningkatkan kepadatan rotifer secara nyata (P<0,05) pada akhir penelitian dibandingkan dengan kontrol namun tidak meningkatkan kandungan total lemak secara nyata (P>0,05) dibandingkan dengan perlakuan yang lain dan kontrol. Pada penelitian ke dua, pengkayaan dengan fitoplankton kepadatan tinggi meningkatkan kandungan lemak secara nyata (P<0,05) namun tidak meningkatkan bobot secara nyata (P>0,05) dibandingkan dengan kontrol. Disimpulkan bahwa dosis pemberian vitamin B<sub>12</sub> yang terbaik adalah 30 pg/ekor sedangkan waktu pengkayaan fitoplankton terbaik adalah dua jam.

**ABSTRACT:** Effect of Vitamine B<sub>12</sub> and High Density Phytoplankton Enrichment on Density and Quality of Rotifer (*Brachionus rotundiformis*). By: Gede S. Sumiarsa, Dahlan Makatutu and Ibnu Rusdi.

Low quality rotifer often results in low quality of fish larvae to be fed with. It is, therefore, considered important to improve rotifer's quality. The purposes of these experiments were to find out the effect of vitamine B<sub>12</sub> addition and phytoplankton enrichment on the quality of cultured rotifer. Dosage treatments in the first experiment were 10, 20, 30 pg/pcs for 48-hour culture while in the second experiment phytoplankton enrichment periods were 1, 2, 3 hours period. Vitamine B<sub>12</sub> significantly increased rotifer density at the end of the experiment (P<0.05) compared to control but did not significantly (P>0.05) increase rotifer's total fat content. Meanwhile, results in the second experiment showed that high density phytoplankton enrichment increased rotifer's fat content significantly (P<0.05) but it did not increase the average wet weight significantly (P>0.05). It is concluded that the best dosage of vitamine B<sub>12</sub> administered in rotifer culture was 30 pg/pc while the best phytoplankton enrichment period was two hours.

**KEYWORDS:** *Brachionus rotundiformis*; phytoplankton; enrichment; rotifer; vitamine, B<sub>12</sub>

### PENDAHULUAN

Rotifer tipe S (*Brachionus rotundiformis*) hingga saat ini masih merupakan pakan alami utama dalam pembenihan ikan-ikan laut dan belum dapat tergantikan sepenuhnya oleh pakan buatan (Fukusho, 1990; Fulks dan Main, 1990). Rotifer memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan pakan buatan dalam hal ukuran yang

relatif kecil, tetap bertahan di kolom air dan tidak mengendap, bergerak dengan kecepatan yang rendah dan laju perkembangbiakan yang cukup tinggi (Hirata, 1979; Lubzens, 1987). Namun, populasi rotifer dalam bak-bak budidaya sering sulit diprediksi karena mengalami kematian massal secara tiba-tiba yang disebabkan oleh beberapa faktor yang belum diketahui (Wohlschlag *et al.*, 1990). Oleh sebab itu, masih diperlukan

<sup>\*)</sup> Peneliti pada Loka Penelitian Perikanan Pantai Gondol, Bali.

terus upaya-upaya untuk mempertahankan atau bahkan memacu pertumbuhan populasi rotifer dalam lingkungan yang terkontrol untuk menjaga kesinambungan produksi larva. Dapat dipastikan bahwa produksi larva ikan dalam unit pembenihan tidak dapat berlangsung jika budidaya rotifer mengalami kegagalan. Dengan kata lain, keberhasilan produksi rotifer merupakan salah satu persyaratan yang penting dalam pembenihan ikan-ikan laut.

Peran beberapa vitamin dan mineral khususnya vitamin B<sub>12</sub> dalam kultur rotifer telah dilaporkan dapat memacu laju pertumbuhan dan perkembangbiakan rotifer (Hirayama dan Maruyama, 1991; Yu *et al.*, 1988) walaupun peran fisiologis vitamin tersebut belum dapat sepenuhnya dimengerti dan dijelaskan secara eksplisit. Akan tetapi tidak ada kesamaan kebutuhan dosis yang optimal dalam kultur rotifer dalam beberapa literatur yang ada karena lingkungan dan sistem budidaya yang berbeda nampaknya menyebabkan perbedaan kebutuhan/dosis vitamin B<sub>12</sub> yang berbeda pula.

Kendala lain yang umum dialami dalam pembenihan ikan-ikan laut adalah masih rendahnya kualitas nutrisi rotifer bagi benih ikan sehingga usaha-usaha untuk memperbaiki kualitas rotifer pada saat kultur maupun setelah dipanen merupakan suatu hal yang mutlak dilakukan untuk mendukung usaha produksi larva yang berkesinambungan (Fernandez-Reiriz *et al.*, 1993). Salah satu cara yang umum dilakukan untuk memperbaiki kualitas nutrisi rotifer setelah dipanen adalah dengan cara pengkayaan (*enrichment*) rotifer dengan bahan-bahan yang memiliki kandungan protein dan asam lemak yang tinggi (Snell, 1990) baik dengan bahan buatan maupun fitoplankton. Cara tersebut diterapkan dengan memanfaatkan karakteristik rotifer yang bersifat sebagai "*bio capsule*", yaitu dapat menjadi "pengantar" suatu bahan untuk disampaikan kepada larva ikan yang akan memangsa rotifer tersebut (Fulks dan Main, 1990). Dengan demikian kualitas rotifer tersebut dapat ditingkatkan secara praktis.

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati pengaruh pemberian vitamin B<sub>12</sub> dalam budidaya massal rotifer dan pengaruh periode pengkayaan rotifer dengan fitoplankton *Nannochloropsis oculata* kepadatan tinggi terhadap kualitas rotifer.

## BAHAN DAN METODE

### Percobaan Vitamin B<sub>12</sub>

Pada penelitian pemberian vitamin B<sub>12</sub> cair (produksi Adi Husada, Surabaya), dosis perlakuan adalah:

- A: 0 picogram (pg)/ekor (kontrol)
- B: 10 pg/ekor
- C: 20 pg/ekor
- D: 30 pg/ekor

Keempat perlakuan tersebut diulang tiga kali dan diacak dengan metode bilangan random. Disain penelitian adalah rancangan acak lengkap dan data dianalisis dengan sidik ragam satu arah (Sokal dan Rohlf, 1981).

Rotifer tipe S dalam penelitian ini dibudidayakan dengan metode berkesinambungan (*continuous system*) pada silinder-silinder kaca serat ukuran 1.000 liter. Pada hari pertama semua bak diisi dengan 500 liter fitoplankton *Nannochloropsis oculata* dengan kepadatan 15 x 10<sup>6</sup> sel/ml, diberi aerasi dengan laju 4-5 liter/menit dan diinokulasi dengan 20 juta ekor rotifer. Vitamin B<sub>12</sub> cair dilarutkan ke dalam air budidaya rotifer yang disesuaikan dengan dosisnya. Di hari kedua pada masing-masing unit penelitian ditambahkan lagi dengan 500 liter fitoplankton *N. oculata*. Setelah jumlah rotifer dalam setiap bak diketahui, vitamin B<sub>12</sub> cair ditambahkan lagi ke dalam setiap bak disesuaikan dengan dosis perlakuan. Pada hari ke tiga dilakukan panen di semua unit penelitian.

Perhitungan laju perkembangbiakan rotifer (kepadatan rotifer, kepadatan betina amiktik rotifer yang mengandung telur dan jumlah telur per mililiter) dilakukan setiap enam jam sesuai dengan metode Fulks dan Main (1990) yang dimulai setelah inokulasi rotifer sampai saat sebelum panen. Data pendukung lain yang diperoleh untuk setiap perlakuan adalah rata-rata ukuran rotifer (panjang dan lebar lorica) dan bobot basah rotifer. Parameter kualitas air pendukung yang diukur selama penelitian adalah suhu, salinitas, oksigen terlarut (DO) dan pH.

### Percobaan Pengkayaan Rotifer

Pada penelitian ke dua, perlakuan lamanya pengkayaan rotifer dengan fitoplankton kepadatan

an tinggi adalah sebagai berikut:

- A: tanpa pengkayaan (kontrol)
- B: pengkayaan dengan perendaman selama satu jam
- C: pengkayaan dengan perendaman selama dua jam
- D: pengkayaan dengan perendaman selama tiga jam

Keempat perlakuan diulang tiga kali dengan penempatan unit penelitian diacak berdasarkan metode bilangan random. Sama seperti pada penelitian sebelumnya, disain penelitian ini adalah rancangan acak lengkap dengan analisis data dan dengan sidik ragam satu arah (Sokal and Rohlf, 1981).

Rotifer tipe S dalam penelitian ini diperoleh dari hasil budidaya massal yang dilakukan secara berkesinambungan pada bak-bak semen persegi empat berukuran 3x3x1 m<sup>3</sup>. Setelah dipanen, masing-masing 30 liter rotifer yang terkonsentrasi dengan kepadatan antara 1.900-2.000 ekor/ml ditempatkan di dalam silinder plastik berkapasitas 60 liter. Kecuali kontrol, pada semua unit percobaan ditambahkan masing-masing 30 liter *N. oculata* berkepadatan tinggi yaitu 80,4 x 10<sup>6</sup> sel/ml dan diberi aerasi dengan laju 7-8 liter/menit. Fitoplankton dengan kepadatan tinggi diperoleh dari pencairan dan pengenceran fitoplankton yang telah dikonsentrasikan dan dibekukan beberapa hari sebelumnya. Panen rotifer pada unit-unit percobaan dilakukan sesuai dengan perlakuannya, yaitu setelah 1, 2 dan 3 jam, dibilas dengan air laut yang bersih dan disimpan dalam *deep-freezer* untuk analisis asam lemak. Perlakuan kontrol sebelumnya langsung disimpan dalam *deep-freezer* setelah dipanen dari kultur di bak-bak semen.

Data yang dicatat dari setiap unit percobaan adalah rata-rata ukuran rotifer (panjang dan lebar lorica), bobot basah rotifer, persentase rotifer yang mengandung telur, jumlah telur (Fulks and Main, 1990) dan kandungan asam lemak. Parameter kualitas air pendukung yang diukur adalah suhu dan salinitas.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan laju pertumbuhan rotifer selama penelitian pemberian dosis vitamin B<sub>12</sub> dapat dilihat pada *Table 1* dan data pendukung

kualitas air penelitian pertama tersebut dicantumkan dalam *Table 2*. Hasil pengamatan penelitian pengkayaan rotifer dengan fitoplankton dicantumkan dalam *Table 3*.

Pada *Table 1* terlihat bahwa kepadatan akhir rotifer betina amiktik yang mengandung telur dan jumlah telur per mililiter tanpa pemberian vitamin B<sub>12</sub> secara nyata lebih rendah (P<0,05) dibandingkan ketiga dosis pemberian vitamin B<sub>12</sub> tetapi tidak dijumpai perbedaan yang nyata (P>0,05) di antara ketiga perlakuan pemberian vitamin. Sedangkan pemberian vitamin B<sub>12</sub> dengan dosis 30 pg/ekor menghasilkan kepadatan rotifer tertinggi (160 ekor/ml) secara nyata dibandingkan kedua perlakuan lain dan kontrol (P<0,05). Dengan demikian nampak bahwa vitamin B<sub>12</sub> berperan untuk memacu laju perkembangan rotifer. Dilaporkan oleh Hirayama dan Maruyama (1991) bahwa vitamin B<sub>12</sub> merupakan salah satu faktor pembatas dalam budidaya rotifer. Beberapa peneliti telah melakukan pemanfaatan vitamin ini mulai dari budidaya fitoplankton yang diperkaya dengan vitamin B<sub>12</sub> (Maruyama *et al.*, 1989; Maruyama dan Hirayama, 1993) dan pemanfaatan bakteri sebagai penghasil vitamin B<sub>12</sub> dalam budidaya rotifer (Yu *et al.*, 1989).

Tidak dijumpai perbedaan yang nyata pada ukuran baik panjang maupun lebar lorica dan berat basah rotifer serta kandungan lemak total. Tampaknya perlakuan tersebut tidak berperan dalam proses penggemukan atau peningkatan kualitas nutrisi rotifer bagi larva ikan. Hal yang tampak nyata dalam aspek kualitas air adalah menurunnya kualitas air selama penelitian. Oksigen terlarut pada awal penelitian pertama adalah 6,8 mg/l dan pada akhir penelitian turun menjadi hampir setengahnya. Total amonia pada awal penelitian masih cukup rendah (0,031 mg/l) namun pada akhir penelitian menjadi sepuluh kali lipat dari konsentrasi awal. Demikian pula dengan derajat keasaman (pH) air medium menurun dari 9,4 menjadi 7,5. Kecenderungan ini disebabkan oleh akumulasi sisa-sisa metabolit dan proses dekomposisi fitoplankton dan rotifer yang mati dan juga disebabkan oleh penurunan kepadatan fitoplankton karena pemangsa oleh rotifer (Fulks dan Main, 1990). Seperti diketahui bahwa pH dapat dijadikan salah satu indikator dalam penentuan kondisi kultur fitoplankton (James dan Abu-Rezeq, 1989).

Table 1. Rotifer (R), amictic female rotifer with egg (RE) and egg densities (E) per milliliter of rotifer culture at every six-hour observation, rotifer size ( $10^{-3}$  mm), wet weight ( $10^{-3}$  mg) and total lipid content (%) among vitamin B<sub>12</sub> treatments (Values are expressed in mean  $\pm$  standard error).

Observation time (h)	Treatment											
	A			B			C			D		
	R	RE	E	R	RE	E	R	RE	E	R	RE	E
0	42	7	26	44	7	18	39	9	32	36	7	23
6	60	8	32	73	12	29	66	12	36	67	16	29
12	84	12	46	81	16	49	73	14	42	69	15	35
18	101	19	60	92	19	70	91	21	44	89	18	53
24	60	11	32	76	8	35	61	13	42	54	11	51
30	61	14	46	94	16	51	66	15	47	67	14	61
36	69	16	49	99	23	60	71	18	59	82	17	63
42	77	20	57	121	29	66	110	25	64	124	36	82
48	87 <sup>a</sup>	22 <sup>a</sup>	39 <sup>a</sup>	137 <sup>b</sup>	40 <sup>b</sup>	83 <sup>b</sup>	151 <sup>bc</sup>	25 <sup>c</sup>	74 <sup>d</sup>	160 <sup>d</sup>	43 <sup>d</sup>	80 <sup>d</sup>
Size: - Length	162.0 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>			161.1 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>			156.2 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>			158.1 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>		
- Width	138.1 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>			126.2 $\pm$ 2.1 <sup>ab</sup>			122.7 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>			128.5 $\pm$ 0.9 <sup>ab</sup>		
Wet weight	0.36 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>			0.31 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>			0.34 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>			0.26 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>		
Lipid content	5.6 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>			5.9 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>			5.2 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>			5.6 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>		

A = control    B = Vit. B<sub>12</sub> 10 pg/pc    C = Vit. B<sub>12</sub> 20 pg/pc    D = Vit. B<sub>12</sub> 30 pg/pc

Notes: Values in rows followed by same letters are not significantly different (P>0.05)

Table 2. Range of some water quality parameters recorded during the experiment in all treatments of the first experiment.

Observation time (h)	Temperature (°C)	Salinity (ppt)	DO (mg/l)	Total ammonia (mg/l)	pH
0	26.2 - 29.4	28 - 31	4.3 - 6.8	0.031 - 0.045	8.2 - 9.4
24	27.0 - 28.4	28 - 31	3.7 - 6.8	0.158 - 0.187	7.5 - 8.2
48	27.0 - 27.6	28 - 31	3.7 - 4.8	0.256 - 0.345	7.5 - 7.8

Table 3. Rotifer size (length and width in  $10^3$  mm), wet weight ( $10^3$  mg), percentages of rotifer with egg (RE), number of egg/ml, lipid content (%) and some water quality parameters recorded in the phytoplankton enrichment (values are expressed in mean  $\pm$  standard error).

Parameter	Treatment			
	A	B	C	D
Size:				
- Length	152.2 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	155.6 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	158.1 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	161.9 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
- Width	120.1 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	122.2 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	122.8 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	122.9 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
Wet weight	0.26 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.40 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.44 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
RE	0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	5 $\pm$ 0.0 <sup>ab</sup>	18 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
Egg	80 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	220 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	900 $\pm$ 1.7 <sup>c</sup>	1.200 $\pm$ 2.2 <sup>c</sup>
Lipid content	4.8 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	6.1 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	6.7 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	7.7 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
Temperature (°C)	27.6	27.5 - 28.4	27.5 - 28.8	27.5 - 29.0
Salinity (ppt)	29	29	29	29

A = control

B = 1-hour enrichment period

C = 2-hour enrichment period

D = 3-hour enrichment period

Notes: Values in rows followed by same letters are not significantly different ( $P > 0.05$ )

Pada Tabel 3 di atas terlihat bahwa baik ukuran (panjang dan lebar lorica) dan bobot rotifer tidak lebih tinggi secara nyata dibandingkan dengan kontrol ( $P > 0,05$ ), tetapi persentase rotifer yang mengandung telur lebih tinggi secara nyata pada perendaman selama tiga jam ( $P < 0,05$ ) dan jumlah telur rotifer per mililiter dan kandungan lemak total pada ketiga perlakuan lebih tinggi secara nyata dibandingkan kontrol. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa pengkayaan rotifer dengan fitoplankton kepadatan tinggi selama lebih dari satu jam dapat memperbaiki kualitas rotifer.

Dilaporkan bahwa pengkayaan rotifer merupakan salah satu usaha untuk meningkatkan kualitas rotifer baik dengan fitoplankton (Hirayama *et al.*, 1989) maupun bahan-bahan lain seperti *baker's yeast* (Hirayama dan Satuito, 1990), kombinasi fitoplankton dan *baker's yeast* (Tamaru *et al.*, 1990) dan pakan komersial (Fernandez-Reiriz *et al.*, 1993). Beberapa penelitian sebelumnya melaporkan berbagai metode dan bahan yang dipergunakan dalam pengkayaan rotifer dan semua mendapatkan hasil yang lebih baik secara nyata dibandingkan dengan kontrol. Hirayama dan Maruyama (1991) melaporkan

bahwa vitamin B<sub>12</sub> merupakan salah satu faktor pembatas dalam kultur rotifer sehingga kekurangan vitamin B<sub>12</sub> akan secara nyata menghambat perkembangbiakan rotifer. Vitamin B<sub>12</sub> diserap oleh rotifer baik secara langsung dari medium maupun secara tidak langsung melalui fitoplankton (Maruyama *et al.*, 1989; Maruyama dan Hirayama, 1993). Selain dengan menambahkan secara langsung ke dalam medium pemeliharaan, vitamin B<sub>12</sub> dapat diproduksi oleh bakteri tertentu dalam medium kultur rotifer dan metode ini merupakan metode yang umum dipergunakan dalam kultur rotifer secara massal karena murah dan efektif (Yu *et al.*, 1988; 1989). Demikian pula dari beberapa literatur dijelaskan bahwa pengkayaan rotifer merupakan salah satu alternatif yang paling praktis dilakukan dalam unit-unit perbenihan. Namun demikian, masih diperlukan metode-metode yang lebih praktis, murah dan baku.

## KESIMPULAN

Vitamin B<sub>12</sub> berperan nyata dalam pemacu perkembangan rotifer secara massal dalam bak-bak budidaya. Dilihat dari kepadatan rotifer, jumlah rotifer betina amiktik yang bertelur dan lebar lorica, maka penambahan vitamin B<sub>12</sub> 10 pg/ekor/hari sudah cukup baik, namun untuk mendapatkan kepadatan telur yang maksimal, dosis yang terbaik adalah 30 pg/ekor/hari. Periode kultur rotifer dengan sistem berkesinambungan perlu diperpanjang agar pengaruh pemberian vitamin B<sub>12</sub> tampak lebih nyata dan efisien. Diduga bahwa masih terdapat residu vitamin B<sub>12</sub> dalam medium yang belum dapat dimanfaatkan oleh rotifer jika kultur rotifer dilakukan secara berkesinambungan atau lama kultur rotifer diperpanjang.

Berdasarkan jumlah telur yang dihasilkan, periode pengkayaan selama dua jam telah cukup, tetapi untuk meningkatkan kepadatan rotifer yang bertelur, diperlukan waktu tiga jam untuk mendapatkan hasil yang terbaik. Untuk membandingkan lebih rinci antar perlakuan yang memberikan hasil yang terbaik secara ekonomis, diperlukan analisis ekonomi produksi larva.

## DAFTAR PUSTAKA

- Fernandez - Reiriz, M., Labarta, U., and Ferreiro, M.J. 1993. Effects of commercial enrichment diets on the nutritional value of the rotifer (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture* 112: 195-206.
- Fukusho, K. 1990. Review of the research status of zooplankton production in Japan. In: Fulks, W., and Main, K.L., (Eds.). Rotifer and microalgae culture systems. Proceedings of US-Asia Workshop. The Oceanic Institute Hawaii, U.S.A. p. 56-60.
- Fulks, W., and Main, K.L. 1990. Rotifer and microalgae culture systems. Proceedings of US-Asia Workshop. The Oceanic Institute Hawaii, U.S.A. 364 pp.
- Hirata, H. 1979. Rotifer culture in Japan. *Spec. Publ. Eur. Maricult. Soc.* 4: 361-375.
- Hirayama, K., Maruyama, I., and Maeda, T. 1989. Nutritional effect of freshwater *Chlorella* on growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. In: Ricci, C., Snell, T.W., King, C.E (Eds.). Rotifer Symposium V, 186-187: 39-42.
- Hirayama, K., and Satuito, C.G. 1990. The nutritional improvement of baker's yeast for the growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. In: Fulks, W., and Main, K.L., (Eds.). Rotifer and microalgae culture systems. Proceedings of US-Asia Workshop. The Oceanic Institute Hawaii, U.S.A. p. 151-162.
- Hirayama, K., and Maruyama, I. 1991. Vitamin B<sub>12</sub> content as limiting factor for mass culture production of the rotifer *Brachionus plicatilis*. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. (Eds.). *Larvi '91.*, 15: 101-103.
- James, C. M., and Abu Rezeq, T.S. 1989. An intensive chemostat culture system for the production of rotifer for aquaculture. *Aquaculture* 81: 291-301.
- Lubzens, E. 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia*, 147: 245-255.
- Maruyama, I., Ando, Y., and Maeda, T. 1989. Uptake of vitamin B<sub>12</sub> by various strains of unicellular algae *Chlorella*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 1785-1790.
- Maruyama, I., and Hirayama, K. 1993. The culture of rotifer *Brachionus plicatilis* with *Chlorella* containing vitamin B<sub>12</sub> in its cells. *Journal of World Aquaculture Society*, 24: 194-198.
- Snell, T. 1990. Improving the design of mass culture systems for the rotifer, *Brachionus plicatilis*. In: Fulks, W., and Main, K.L.,(Eds.). Rotifer and microalgae culture systems. Proceedings of US-Asia Workshop. The Oceanic Institute Hawaii, U.S.A. p. 61-72.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. 1981. *Biometry*. W.H. Freeman and Co. San Fransisco, California, U.S.A., 884 pp.
- Tamaru, C.S., Lee, C.S., and Ako, H. 1990. Improving the larval of striped mullet (*Mugil cephalus*) by manipulating quantity and quality of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. In: Fulks, W., and Main,

- K.L.,(Eds.). Rotifer and microalgae culture systems. Proceedings of US-Asia Workshop. The Oceanic Institute Hawaii, U.S.A. p. 89-104.
- Wohlschlag, N.S., Li, M., and Arnold, C.R. 1990. Raising food organisms for intensive larval culture: 2. Rotifer. In: Chamberlain, G.W., Miget, R.J. Haby, M.G (Eds.). Red drum aqua-culture. Corpus Christi, Texas, U.S.A. pp. 66-70.
- Yu, J.P., Hino, A., Ushiro, M., and Maeda, M., 1988. Function of bacteria as vitamin B<sub>12</sub> producers during mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakaishi, 54: 1873-1880.
- Yu, J.P., Hino, A., Hirano, R., and Hirayama, K. 1989. Vitamin B<sub>12</sub>-producing bacteria as a nutritive complement for a culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakaishi, 55: 1799-1806.