



PROCEEDING WORKSHOP INTERNACIONAL PRODUCCIÓN DE LARVAS DE PECES

*Innovación y avances en la nutrición para
contribuir al mejoramiento y escalamiento
de los cultivos*

14 / 15 septiembre 2006

Editores

Patricio Dantagnan Dantagnan
Aliro Bórquez Ramírez
Iván Valdebenito Isler
Adrián Hernández Arias

C^oNA

Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola



GOBIERNO DE CHILE
FONDEF

© Universidad Católica de Temuco
Dirección General de Docencia
Manuel Montt 056, Temuco

ISBN 978-956-7019-34-2
Registro de Propiedad Intelectual
Inscripción N° 165.283

Editorial UC TEMUCO
Manuel Montt 056, Temuco
Fono: 045- 205253
mail: editorial@uctemuco.cl

Edición General
Patricio Dantagnan

Producción General
Andrea Rubilar Urra

Diseño y Diagramación
Hardessen Design

Impresión
Alfabetas Artes Gráficas
Fono: 2-5515657

Primera edición, octubre 2007

IMPRESO EN CHILE / PRINTED IN CHILE

ÍNDICE

- 5 **Presentación**
- 7 **Introducción. Alimentación y nutrición durante el crecimiento larvario en peces. Antecedentes generales a considerar**
Patricio Dantagnan; Juan Pablo Lazo
- 29 **Estado actual del cultivo larvario del Puye *Galaxias maculatus***
Patricio Dantagnan; Iván Valdebenito; Aliro Bórquez; Natalia Quintana; Andrés Rodríguez, Alejandra Ortega
- 43 **Algunos avances en el estudio del cultivo larvario del lenguado chileno *Paralichthys adpersus***
Alfonso Silva; N. Orellana; Piaget; Vega, ; Toledo, Pedro
- 55 **Mercado de smolt de salmones en Chile, hasta el 2010**
Alfonso Mardones
- 69 **Hatchery production of new marine finfish species Critical points of production evolution and nutrition**
Grethe Rosenlund; Nick King
- 79 **Advances in hatchery technology.**
Kolkovsk , S; Curnow, J; Kin, J. L
- 91 **Recirculation systems for the high density rotifer culture on commercial scale**
José Rainuzzo
- 107 **Current state of the use of artemia in fish larvae culture. Perspectives and alternatives**
Italo Salgado
- 119 **Producción natural de alimentos para larvas en sistemas semintensivos en climas fríos: el caso Puye**
Aliro Bórquez; Italo Salgado; Javier Quevedo; Patricio Dantagnan
- 133 **Marine Fish Larvae Diets – Current Status and Future Directions**
Sagiv Kolkovski
- 151 **Feeding marine fish larvae with lipid sources alternative to fish oil**
Marisol Izquierdo; Eyad Atalah; Tibiabin Benítez-Santana; Carmen Hernández; Lidia Robaina
- 161 **Requerimientos de ácidos grasos esenciales en larvas de peces: Efecto de factores ambientales**
Patricio Dantagnan, Marisol Izquierdo

- 173 Nutritional requirements for fish larvae: protein, aminoacids, phospholipids, and vitamins**
Marisol Izquierdo, M.S. and Lidia Robaina
- 183 Fecundidad y calidad de Gametos en peces: Parámetros de evaluación y efectos nutricionales**
Iván Valdebenito I.

PRESENTACIÓN

El sector de la Acuicultura ha sido uno de los más dinámicos en los últimos años, con un gran impacto en la economía nacional, lo que ha permitido posesionar a Chile como un país de gran desarrollo en la Acuicultura, con prestigio a nivel mundial y liderazgo en América Latina. Este dinamismo ha llevado a nuestro país a ubicarse como primer productor mundial de salmones e incentivar en los últimos años el desarrollo el cultivo de nuevas especies, ya sea mediante la introducción de especies exóticas o mediante el cultivo de especies nativas. Este hecho ha llevado, a que actualmente exista un número importante de universidades, instituciones o centros de investigación, que están desarrollando diversos proyectos tendientes al cultivo nuevas especies nativas y exóticas, esto con el único fin de incrementar la oferta de especies que se cultiven, y que puedan convertirse, en el corto plazo, en una verdadera alternativa de diversificación para la Acuicultura en Chile.

A pesar del dinamismo de esta actividad y de las inversiones destinadas, el nivel de la investigación en este campo ha sido limitado y no ha estado a la altura del desarrollo de esta industria, lo que de un modo u otro dificulta el escalamiento hacia niveles más productivos del nuevas especies, y por otra parte dificulta optimizar la primera fase de producción en aquellas especies ya desarrolladas, como las diferentes especies de salmones que actualmente se cultivan en Chile. De todo el ciclo productivo en el cultivo de peces, las mayores dificultades casi siempre ocurren durante la larvicultura (comúnmente llamado alevinaje), es aquí donde la mayoría de las nuevas especies, y las que ya se cultivan comercialmente tienen sus mayores dificultades y donde suelen ocurrir las mayores mortalidades. En este sentido, hay consenso que los estudios nutricionales y fisiológicos en las larvas de peces, puede llegar a contribuir al mejoramiento, tanto de las sobrevivencias, como el crecimiento y las condiciones de las larvas para seguir su desarrollo. Estos aspectos son temas no suficientemente desarrollados ni abordados en Chile, siendo que son aspectos tan relevantes para el éxito del cultivo como para la rentabilidad misma de los proyectos.

En este sentido, entre los temas más importantes que deben abordarse en esta crucial etapa del desarrollo están:

1. Eficiencia en la producción de alimentos vivos: mejoramiento de las condiciones nutricionales
2. Requerimientos nutricionales óptimos para larvas de peces
3. Desarrollo y fabricación de enriquecedores, microdietas y dietas de arranque que cubran los requerimientos de las larvas de peces
4. Calidad embrionaria y larval: efecto de la nutrición de los reproductores
5. Capacidades morfológicas y fisiológicas en larvas para una óptima alimentación
6. Patologías nutricionales en larvas de peces: uso de prebióticos, probióticos e inmunoestimulantes

Este proceeding recoge los manuscritos de las ponencias realizadas por científicos nacionales y extranjero en el Workshop Internacional “Producción de larvas de peces: innovación y avances en nutrición para contribuir al mejoramiento y escalamiento de los cultivos” realizado en la Universidad Católica de Temuco – Chile, los días 14 y 15 de Septiembre del 2006. Este Workshop se enmarcó dentro del proyecto FONDEF AQ04I1006 “Nuevos productos para la industria de la alimentación larvaria de peces: desarrollo de nuevos métodos de producción de alimentos vivos

y producción de enriquecedores artificiales para rotíferos". Estuvo dirigido a empresas productoras de productoras de larvas y alevines de peces, empresas de alimentos para peces, académicos, investigadores, estudiantes de pre y postgrado en acuicultura, biología marina y manejo de recursos naturales acuáticos, interesados en la investigación en nutrición en larvas de peces, así como a encargados de proyectos y técnicos que desarrollan tecnologías de cultivo de nuevas especies, en los cuales está depositado gran parte de la responsabilidad de la investigación en este campo. En este workshop se establecieron los siguientes objetivos:

- Poner en alerta la importancia de las buenas prácticas nutricionales y alimenticias durante el cultivo larvario,
- Acercar a investigadores, estudiantes de postgrado y personas vinculadas a la producción de larvas de peces, a los desafíos y problemas asociados al cultivo larvario tanto de la nuevas especies de peces como de aquellas ya instaladas en los sistemas productivos,
- Instalar en el debate acuícola nacional, la importancia de desarrollar la investigación aplicada en aspectos nutricionales y fisiológicos, asociados al cultivo larvario en peces,
- Dejar planteadas líneas de investigación para objetivos comunes en el trabajo con larvas con las nuevas especies.

Los organizadores de este workshop agradecen a las siguientes empresas por su apoyo y patrocinio, Skreeting, Harting S.A., Acecamp S.A., Aquafarma (Veterquímica), Merck, así como al área de Recursos Marinos de la Fundación Chile y el laboratorio de cultivo de peces del Departamento de Acuicultura de la Universidad Católica del Norte. Los organizadores hacen especial referencia al Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola (CGNA), consorcio de investigación constituido por la Universidad Católica de Temuco, INIA Carillanca y la Universidad de la Frontera por el apoyo y respaldo a este workshop, en el cual sus investigadores tuvieron una activa participación. Así mismo, se agradece a las siguientes instituciones internacionales, Department of Fisheries and Aquaculture of SINTEF of Norway, al Grupo de Investigación en Acuicultura de La Universidad de las Palmas de Gran Canaria de España, y al Department of Fisheries of Government of West Australia, por estar representadas por investigadores ampliamente reconocidos a nivel mundial en su especialidad que expusieron sus investigaciones. Finalmente, se agradece al Gobierno de Chile, a través de CONICYT, quien con su programa FONDEF aportó la mayor parte de los fondos para el exitoso desarrollo de este Workshop.

Dr. Patricio Dantagnan D.

ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN DURANTE EL CRECIMIENTO LARVARIO EN PECES

ANTECEDENTES GENERALES A CONSIDERAR

P. Dantagnan; J. P. Lazo
Escuela de Acuicultura, Universidad Católica de Temuco
Email: dantagna@uctemuco.cl

El éxito de una dieta en la supervivencia y el crecimiento larvario, viene determinado por el balance entre el esfuerzo de captura y el valor energético y nutritivo que adquiere la larva con su ingestión. Los requerimientos bioenergéticos aportados por las dietas, para llevar a cabo el desarrollo, tanto de la fase larvaria como la fase juvenil, e incluso adulta, se consiguen si se tiene un alimento nutricionalmente balanceado y adaptado a las sucesivas transformaciones morfológicas, entre ellas el incremento en talla. De esto se desprende que la alimentación durante el crecimiento larvario debe ser capaz de producir larvas nutricionalmente capacitadas para lograr una alta sobrevivencia y un óptimo crecimiento durante su desarrollo, constituyéndose esto en el mayor problema en todo hatchery productivo y más aún, en aquellos que intentan desarrollar nuevas tecnologías. En este sentido, la consecución de microdietas, vivas o inertes, capaces de cubrir los requerimientos nutricionales y las necesidades morfológicas que van experimentando durante el crecimiento larval en peces, es uno de los desafíos más importantes de la acuicultura intensiva y semiintensiva, y del cual depende en gran medida el éxito de un hatchery. Estos estudios, son difíciles de abordar, puesto que las larvas de peces son organismos tremendamente delicados y sus requerimientos dependen de múltiples factores tales como, la especie en cuestión, edad, presencia y actividad de enzimas digestivas, factores ambientales, relación con otros nutrientes, etc. Desde este punto de vista los estudios en alimentación larvaria deben ser abordados tanto en relación a la especie como en relación a la presa o el alimento (Tabla 1).

La alimentación larvaria de peces se considera desde el momento en que la larvas comienzan con la alimentación exógena, aún cuando estén haciendo uso de sus reservas de vitelo (alimentación endógena), este momento es variable entre las distintas especies y no depende necesariamente del momento de la absorción del saco vitelino, puesto que las larvas de diferentes especies inician su alimentación en distintas etapas de la absorción de este, incluso en algunos casos cuando la larva recién eclosiona y su reserva de vitelo está 100% (Tabla 2). Esta transición desde el alimento vivo al alimento inerte, requiere necesariamente que todas las estructuras y órganos relacionados con la incorporación de alimento, digestión y asimilación en el tiempo adecuado estén en funcionamiento, y que además, el alimento esté disponible adecuadamente (Yúfera y Darias, 2007). La capacidad de la larva de aceptar alimento vivo o inerte en los inicios de la alimentación, desde el punto de vista de la especie depende de aspectos anatómico – fisiológicos, tales como: apertura y funcionalidad de la boca, el desarrollo de los órganos sensoriales (Segner, 1993), el estado morfológico y funcional del intestino (Storch, 1993; Segner et al., 1994), musculatura y capacidad de respiración, etc. En este sentido, larvas que pueden llegar a consumir un determinado alimento y si la funcionalidad digestiva es limitada, serán mal nutridas e incapaces de sobrevivir a estados de mayor desarrollo. De igual modo, factores externos a la larva juegan un rol fundamental en su capacidad de alimentación, y por ende en el éxito de su desarrollo, entre los cuales está la calidad del agua (Reitan et al., 1993; Kurokawa et al., 1995), el tamaño y abundancia de las presas (Prior y Epifanio, 1993; Johnson y Dropkin, 1995), calidad nutritiva de ellas (Watanabe y Kiron 1994; Izquierdo, 1996), calidad de la puesta, (la cual además podría

depender de múltiples factores), densidad larval, etc. (Rojas et al., 1991; Daniels et al., 1996). En resumen, el desconocimiento de la capacidad de la larva para consumir alimento, así como de los factores externos, unido a los requerimientos nutricionales de cada especie, pueden llevar a formular dietas inadecuadas, que aunque cumplan los requisitos de tamaño y digestibilidad pueden provocar altas mortalidades por desbalances nutricionales.

Tabla 1

Consideraciones relevantes, respecto a la especie y la presa durante el crecimiento larvario de peces marinos.

Aspectos propios de la especie	<ul style="list-style-type: none"> · Requerimientos anatómicos y fisiológicos · Comportamientos y eficiencia en la captura del alimento · Requerimientos de biomasa · Requerimientos nutricionales · Respuesta y tolerancia a factores ambientales
Aspectos propios de las presas	<ul style="list-style-type: none"> · Tamaño y forma · Movilidad · Concentración (disponibilidad) · Contenido de nutrientes (facilidad de enriquecimiento)

El desconocimiento del momento adecuado para el inicio de la alimentación exógena, puede llevar a un adelantamiento o un retardo en la entrega de alimento, lo que puede llegar a generar costos innecesarios, principalmente en la producción de alimento vivo. De aquí la importancia de determinar el Punto de No Retorno (PNR), concepto que está asociado a un momento crítico en el que ocurren las mayores mortalidades, aún en presencia de alimento adecuado, donde las larvas son incapaces de recuperarse, y es definido como el momento en que el 50% de las larvas, son incapaces de alimentarse y por lo tanto sobrevivir (Yúfera y Darias, 2007). Este momento

es crítico y es específico para cada especie (Figura 1), y depende de la temperatura del agua y la longitud larval, variando entre 3 días en larvas de aguas templadas y 20 días en aguas frías. Por esta razón, el retraso en el suministro de alimento puede provocar una temprana desnutrición larval, generando deformidades y problemas digestivos, que pueden llegar a afectar la sobrevivencia final más allá del PNR (Yúfera y Darias, 2007).

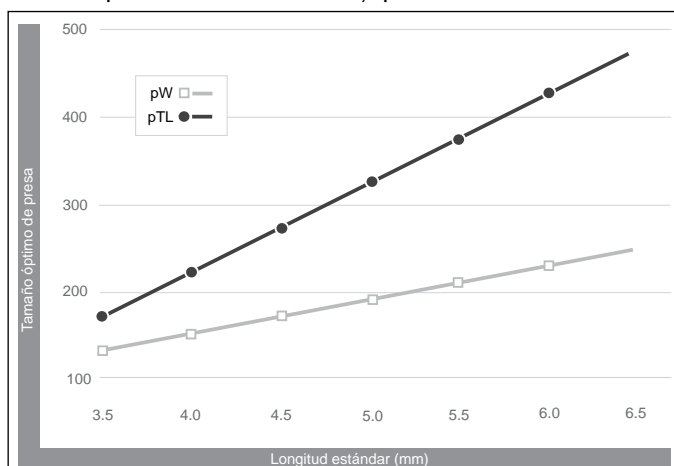


Figure 1. Optimal prey size (width = pW; total length= pTL) for turbot larvae.

Aspectos anatómicos

a) Tamaño larval y apertura de la boca

Tanto el tamaño de la larva, la apertura de la boca y el tiempo de absorción del saco de vitelo, son elementos importantes a considerar en la alimentación larvaria, tanto en lo referido al tamaño y tipo de alimento, como el momento del inicio de la alimentación. No existe una relación evidente entre el tamaño de la larva y el momento de inicio de la alimentación exógena. En muchos casos es posible observar larvas como las de *Dicertrarchus labrax*, cuyo tamaño al eclosionar es de 5,0 – 5,5 mm, donde el inicio de la alimentación comienza a ser evidente recién al tercer día de la eclosión (Carrillo *et al.*, 1995), mientras que la larvas de *Sparus aurata* y *Scophthalmus maximus*, que son de menor tamaño al eclosionar (3,3-4,6 y 3-4mm respectivamente), comienzan con la alimentación exógena a partir del segundo día después de la eclosión (Zohar *et al.*, 1995, Liewes, 1984). Por otra parte, larvas de *Galaxias maculatus*, cuyo tamaño al eclosionar alcanza los 6 mm, el inicio de la alimentación necesariamente debe ser el primer día (Dantagnan, *et al.*, 1995), (Tabla 2). Sin embargo, es claro que el tamaño de la larva y de la boca determina a priori el tipo y tamaño del alimento exógeno que la larva es capaz de consumir, por lo que los cambios en el tamaño de la boca son extremadamente importantes a considerar, puesto que ello afecta la capacidad de la larva de ingerir el alimento. De hecho, al comienzo de la primera alimentación, las larvas seleccionan por tamaño, más que por otros factores (Yúfera y Darías, 2007). Por ejemplo, en especies como la dorada europea (*Sparus aurata*), el trubot (*Scophthalmus maximus*), u otros tipos de lenguados, en las que la larva mide alrededor de 3 mm al comienzo de la alimentación exógena el tamaño típico de partícula que para estos pequeños estados larvales va en un rango de 50 a 150 μm (Ronnestad, 2002). Por lo tanto uno de los aspectos más importantes

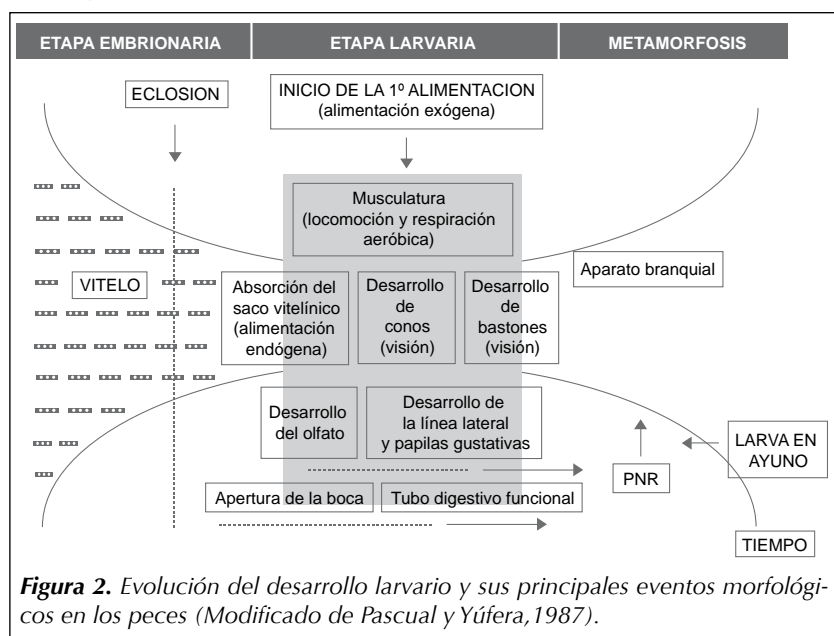


Figura 2. Evolución del desarrollo larvario y sus principales eventos morfológicos en los peces (Modificado de Pascual y Yúfera, 1987).

de la alimentación larval es asegurar que el tamaño de la partícula a proveer esté correlacionado correctamente con el tamaño de la boca (Figura 2).

Tabla 2

Parámetros biométricos y tiempos de algunos eventos asociados a la larvicultura en algunas especies marinas y de agua dulce.

Especie	<i>Dicentrarchus labrax</i>	<i>Sparus aurata</i>	<i>Pagrus major</i>	<i>Mugil cephalus</i>	<i>Scophthalmus máximus</i>	<i>Salmo salar</i>	<i>Galaxias maculatus</i>
Tamaño huevo (mm)	1,0-1,39	0,9-1,3	0,8-1,2	0,9	0,9-1,3	5,0-6,0	0,9-1,1
Tamaño larva a eclosión (mm)	3,0-4,0	2,0-3,1	2,0-3,2	2,6-3,5	3,0-3,2	15,0-25,0	6,0-7,0
Tamaño al inicio de la alimentación exógena (mm)	5,0-5,5	3,3-4,6	3,1-3,2	3,1-3,5	3,0-4,0		6,0-7,0
Tiempo inicio alimentación (días post eclosión)	3-7	2-6	4-5	3-4	2-3	26-28	0-1
Temperatura (°C)	14-18	17-20	18,0	22-24	20	1-7	11-13
Tiempo absorción del saco (días)	7-10	2-6	4-5				5-7
Tiempo destete (días)	>30	30-35	>35	>40	45-60		>30
Referencia	Carrillo <i>et al.</i> , 1995	Zohar <i>et al.</i> , 1995	Kurunuma y Fukusho, 1984		Liewes, 1984	Blaxter, 1969	Dantagnan <i>et al.</i> , 1995

La relación entre el tamaño de la boca de la larva, tipo y tamaño de la presa, es considerada como uno de los factores más decisivos en la capacidad de la larva para su alimentación, y la determinación del tamaño de presa o tamaño de partícula más adecuado de acuerdo al crecimiento de la larva, resulta relevante para su sobrevivencia. En este sentido, se ha visto en larvas de turbot que la relación entre ancho de la presa y ancho de la boca, disminuye desde un 46% el día 1 posteclosión hasta un 37% el día 10 posteclosión, denotando con esto que mientras más pequeña es la larva, puede seleccionar un mayor espectro de tamaño de partícula, mientras que a medida que crece el tamaño de partícula que puede escoger, se restringe (Cunha y Planas, 1999), (Tabla 3). Del mismo modo, el ancho de la boca, incrementa proporcionalmente más que el alto de la boca, lo que confirma lo propuesto por Yasuda (1960), quien sugirió que es el alto de la boca el que juega un rol importante en la captura de la presa, mientras que el ancho de la boca es lo que determina el tamaño de la presa capturada, razón por lo cual es el crecimiento en definitiva se ve directamente afectado, más por el ancho que por la altura de la boca (Shirota, 1970). Así, en peces con boca pequeña el crecimiento es más lento, puesto que deben realizar un mayor esfuerzo para ingerir cantidades pequeñas de presa. Ejemplo de esto es el mostrado por larvas de turbot, en las que se ha visto que poseen un crecimiento más rápido que otras especies,

puesto que poseen una boca más grande, respecto a su longitud total, por lo que están en condiciones de capturar presas más grandes que las de otras especies del mismo tamaño.

Tabla 3

Parámetros biométricos entre longitud total, tamaño de boca y tamaño de presa en larvas de turbot (Cunha y Planas, 1999).

Día	Longitud total (mm)	Ancho boca (μm)	Alto boca (μm)	Relación ancho/alto	Ancho presa (μm)	Alto presa (μm)	Relación ancho presa/ancho boca
2	3,78 ± 0,08	314 ± 25	394 ± 26	0,79	144	209	0,45
4	4,27 ± 0,18	392 ± 35	446 ± 47	0,87	161	243	0,41
6	4,79 ± 0,19	466 ± 61	501 ± 65	0,93	176	275	0,38
8	5,34 ± 0,22	536 ± 74	560 ± 77	0,95	206	364	0,38
10	6,01 ± 0,52	612 ± 84	631 ± 86	0,96	225	423	0,36

En este sentido, Fernández-Díaz y Yúfera (1994), demostraron que la selección del tamaño del alimento esta en función del tamaño larval y más específicamente, del ancho de la boca en larvas de *Sparus aurata* y que éstas tienden a mantener una relación constante entre el diámetro de la partícula ingerida y el ancho de la boca. Sin embargo, se ha demostrado también que muchas larvas de peces también son capaces de aceptar presas mucho más grandes que las adecuadas al tamaño de la boca, principalmente cuando están expuestas a un amplio espectro de presa naturales, los mismos autores demostraron que larvas de *Sparus aurata* son capaces de ingerir sin dificultad partículas con diámetros entre el 60-80% del ancho de la boca, aunque estas representan sólo un pequeño porcentaje del total de partículas consumidas. Aunque en general las larvas de primera alimentación son capaces de ingerir presas con tamaño similar a la abertura de la boca, ellas prefieren presas pequeñas, y en general se sugiere que el tamaño de presa más apropiado, sea de un rango del 25-50% del tamaño de la abertura de la boca (Shirota, 1970, Cunha y Planas, 1999).

Aunque muchas especies eclosionan sin apertura bucal, el rápido desarrollo de ella facilita un rápido cambio desde una alimentación endógena a una exógena. En otros casos se ha observado que durante el inicio de la alimentación, algunas larvas, que son capaces de ingerir alimento inerte desde el mismo momento de la eclosión y que aparentemente el intestino pareciera ser funcional, en la práctica la capacidad de digestión es escasa o nula, alcanzando altos niveles de mortalidad, días después de la absorción del saco (Yúfera *et al.*, 1995), en un estudio que comparó el uso de rotíferos con microencapsulados en larvas de *Sparus aurata*, ambos de similar tamaño, demostró que la larva es capaz de ingerir el alimento inerte desde el inicio de la ali-

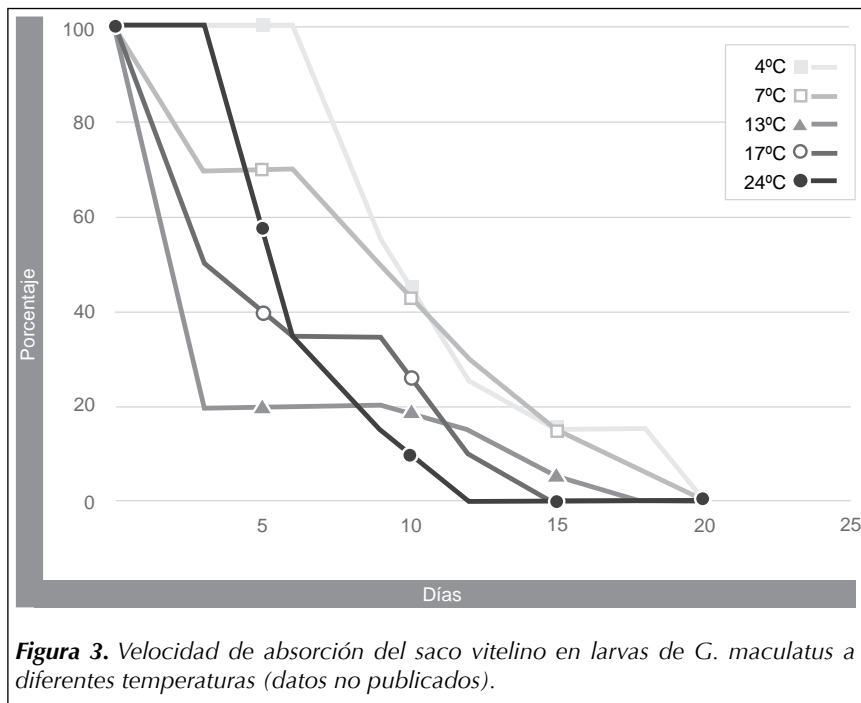
mentación exógena, pero incapaz de digerirlo, provocando una rápida evacuación de este con evidente daño en el epitelio intestinal. En otro estudio realizado en *Galaxias maculatus* (Dantagnan *et al.*, 1995), demostró que la larva es capaz de consumir alimento inerte, incluso desde el primer día después de la eclosión, aunque mortalidades de hasta 100% fueron encontradas a los 10 días después de la absorción del saco, atribuyendo esta mortalidad mas bien a aspectos de desbalances nutricionales y calidad en la fabricación que a la imposibilidad de consumo.

b) Absorción del saco

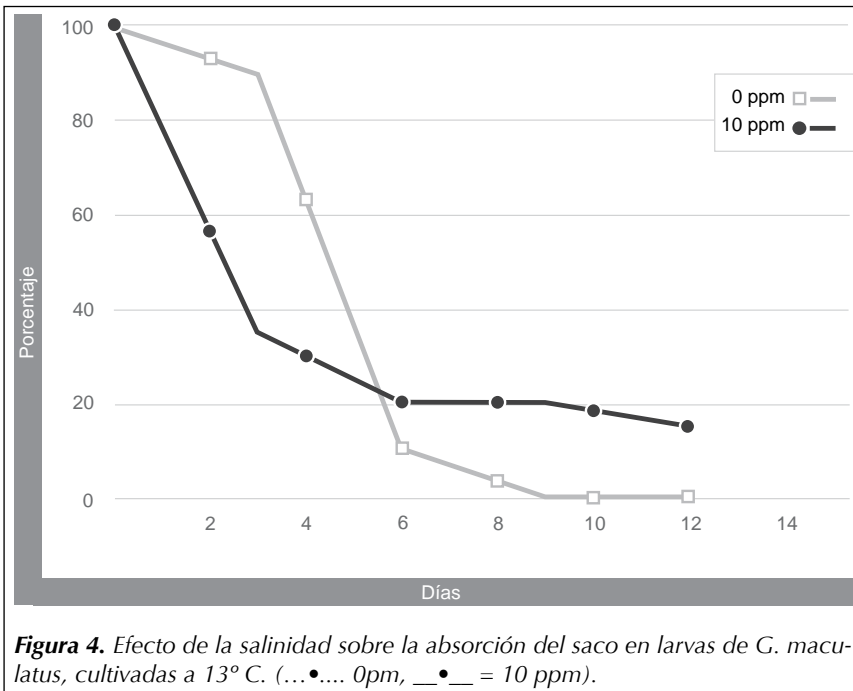
Es evidente que cuando las reservas del saco de vitelo han sido utilizadas completamente, la capacidad de alimentación exógena de las larvas ha sido desarrollada, y por lo tanto la supervivencia comienza a depender enteramente de la disponibilidad, cantidad y calidad del alimento. Es decir, el paso de alimento endógeno a exógeno es considerado de hecho como una de las más sensibles y críticos del desarrollo larvario, debido entre otras cosas, a la sensibilidad de ciertas condiciones ambientales no óptimas que dañan el desarrollo morfológico y que pueden llegar a generar larvas anormales (Bolla y Ottersen, 1998). De hecho, en los cultivos comerciales, esta etapa de transición es a menudo el periodo de más alta mortalidad y muchos autores han señalado que parámetros físicos, como la aireación, flujo, luz, temperatura y salinidad, pueden ser letales o causar serios daños en la etapa de larva de saco. Por esta razón, el aprendizaje es de vital importancia para la larva, por lo que la apertura de la boca debe ocurrir necesariamente antes de la absorción total del saco. En la mayoría de los casos, el comienzo de la alimentación exógena comienza normalmente cuando la boca está abierta, pero antes de la absorción total del saco. En el caso de la trucha, *Oncorhynchus mykiss*, esta posee un saco cuya absorción total le lleva entre 18-20 días, aunque entre los 10 y 15 días posteclosión ya son capaces de aceptar alimento (Miguez, 1980), lo que indica una temprana apertura de la boca, mucho antes de la absorción total del saco. En relación a la duración de las reservas vitelínicas, no existe una relación clara con el inicio de la alimentación, mientras que en larvas de *Sparus aurata* y *Pagrus major* por ejemplo, el inicio de la alimentación puede llegar a coincidir con el término de las reservas vitelínicas. En otras especies como *Galaxias maculatus* o *Dicentrarchus labrax*, claramente el inicio de la alimentación exógena comienza mucho antes del agotamiento total de las reservas del vitelo. Sin embargo, es claro que para el desarrollo de las técnicas de cultivo, es deseable adoptar condiciones ambientales que maximicen la eficiencia de utilización de las reservas energéticas del saco, para una mejor eficiencia de conversión hacia tejidos (Yúfera y Darias, 2007), además se minimicen así, las mortalidades durante el periodo de transición a la alimentación exógena y por lo tanto, que hagan más exitosa la primera alimentación (Petersen *et al.*, 1996).

En salmón del Atlántico (*Salmo salar*) la masa seca embrionaria se triplica durante la absorción del saco, mientras que en otras especies como en el Stripped bass (*Morone saxatilis*) ocurre un incremento en la longitud cercano al 50%, y un incremento de sólo el 14% en la masa seca. Esta diferencia refleja que los salmones producen relativamente pocos huevos con una gran cantidad de vitelo para ser utilizado durante la fase de utilización del vitelo en condiciones ambientales adversas. Bajo estas condiciones, es favorecido el crecimiento somático y la eficiencia de conversión llega al 70 - 80%. En el stripped bass, produce muchos más huevos con relativamente poco vitelo liberados en un ambiente estuarino turbulento y donde la larva nada continuamente durante la fase de reabsorción del saco. Bajo estas condiciones, el crecimiento somático es minimizado y la eficiencia de conversión es de solo el 25%.

Se sabe que la temperatura afecta la velocidad de absorción del saco. En un trabajo no publicados para puye, se observa que existe una relación directamente proporcional entre la temperatura y la absorción del saco (Figura 5), y que mientras más baja es la temperatura, más lenta es la absorción del saco, por el contrario a mayor temperatura el saco se absorbe más rápidamente (Figura 3).



Otro parámetro que suele afectar la velocidad de reabsorción del saco es la salinidad, la que puede tener efectos en la sobrevivencia y en el incremento de larvas deformes (Bolla y Ottersen, 1998; Lein et al., 1997), demostrándose una importante variación en los rangos de tolerancia, el que es dependiente, no sólo de la especie, sino de la edad y el estado de desarrollo de las células del cloro en la epidermis del saco vitelino. Esto es importante para larvas estenohalinas, para las cuales es esencial conocer los límites inferiores y superiores de tolerancia para el buen éxito del cultivo. Por otro lado, es sabido que huevos y larvas de peces marinos son hypoosmóticos al agua de mar, aún cuando los órganos involucrados en la osmoregulación no están desarrollados (Riis-Vestergaard, 1987), lo que hace a las larvas mucho más sensibles a cambios en la salinidad, aunque a medida que se desarrollan, su tolerancia a la salinidad incrementa y se hace máxima, posiblemente cuando el sistema urinario se hace funcional (Lein et al., 1997) y cuando las células del cloro están enteramente funcionales. En *G. maculatus*, se puede apreciar por ejemplo, que cuando las larvas son cultivadas en aguas dulce (0 ‰), las larvas aceleran más rápidamente la absorción del saco que cuando son cultivadas en agua salobre (10‰).



En cualquiera de los casos, el retardo o la aceleración en la absorción del saco de vitelo, puede llegar a alterar el inicio de la alimentación, así como modificar la conducta de alimentación de las larvas y las dosis de alimentación. Este efecto, lleva a concluir que el manejo de ciertas variables ambientales puede llevar a la maximización del uso de las reservas del saco, considerando que a un mayor período de transición entre la alimentación endógena (absorción del saco) y la alimentación exógena se minimizan las mortalidades, por lo que no necesariamente las larvas de mayor tamaño tienen más éxito en el inicio de la alimentación (Peterson, *et al.*, 1996). En otras palabras, optimizar la absorción completa del saco y la capacidad de alimentación exógena, sumada a una alta calidad del alimento puede contribuir a incrementar considerablemente la sobrevivencia (Heming y Buddington, 1988).

c) Desarrollo de los órganos sensoriales

En la naturaleza, la depredación y la inanición son consideradas como los principales agentes de mortalidad larval. Si bien, en cultivos la depredación es casi inexistente, el canibalismo es a menudo frecuente, siendo un agente importante de mortalidad. En todos estos casos, para escapar de la predación o el canibalismo la velocidad de natación y la conducta de caza debe ser efectiva, ambos aspectos relacionados estrechamente con el desarrollo de los órganos sensoriales.

Pareciera ser que la eficiencia de alimentación, durante la primera alimentación en la mayoría de las especies está determinada por algunas características del tipo de alimento, en que el movimiento y otras características de las presas, juegan un rol fundamental. En este sentido, el desarrollo de los órganos sensoriales son determinantes en la ingestión de alimento. Así, se ha discutido que la presencia de órganos sensoriales no están totalmente desarrollados en muchas de las especies durante los primeros días, por lo que se ha supuesto que el primer estímulo de alimentación es el movimiento y tamaño de las presas (Civera-Cerecedo *et al.*, 2004). Para la detección de las presas, los órganos sensoriales incluyen: mecanorreceptores, quimiorreceptores y receptores ópticos. En general, los órganos sensoriales de las larvas de peces teleósteos son

incompletos en el momento de la eclosión y se van completando progresivamente durante el desarrollo (Figura 2).

Mecano receptores: de los mecanoreceptores que los peces utilizan para la detección de la presas, la línea lateral es el órgano más utilizado por los peces adultos. La línea lateral consiste de una fila de células llamadas neuromastos que en la mayoría de los peces van en un canal que se extiende a lo largo del cuerpo, desde la cabeza hasta el inicio de la aleta caudal. En las larvas este órgano no está usualmente presente al eclosionar, desarrollándose posteriormente.

Quimiorreceptores: de los quimiorreceptores, el olfato y las papilas gustativas son los principales. En relación al olfato, la mayoría de los peces lo tienen bastante desarrollado, ya que poseen lóbulos olfatorios muy conspicuos en el cerebro. En larvas de peces, el olfato se desarrolla rápidamente después de la eclosión y es utilizado tanto para la detección del alimento, como para algunas interacciones sociales, a través de feromonas. Por otra parte el gusto y la palatabilidad del alimento, parece influenciar la disposición de la larva un tipo de dieta específica. Así por ejemplo, se ha demostrado histológicamente que en larvas de *Pagrus major* los órganos olfatorios aparecen desde el día 8 post eclosión, mientras que células gustativas aparecen a los 16 días. Evolutivamente, las larvas de peces están adaptadas a presas vivas con cierto gusto y palatabilidad, y por lo tanto, la aceptación de dietas inertes es más difícil. Los receptores gustativos usualmente aparecen de manera temprana en el desarrollo larval, principalmente en la boca y la región faríngeal.

Receptores oculares: la retina de los peces contiene conos y bastones, similar a los mamíferos. Mientras los bastones poseen más pigmentos visuales que los conos, y por lo tanto son mucho más sensitivos, los conos sólo pueden operar a altas intensidades de luz. Para la mayoría de las especies, ha sido demostrado que las larvas tienen puros conos durante la primera alimentación y que los bastones aparecen más tardíamente. Esto explica por qué muchas larvas de peces son alimentadas de día a intensidades de luz relativamente altas, la oscuridad o bajas intensidades de luz reducen la incorporación de alimento sustancialmente. La razón de la presencia de puros conos en la retina de larvas peces, puede ser una explicación relacionada con el tamaño de la retina. El limitado espacio disponible en la retina hace que la actividad fototrópica sea mucho mayor con conos grandes que con conos pequeños. Muchos conos pequeños en vez de unos pocos conos grandes reduce la sensibilidad fototrópica. En este sentido, es considerado que larvas de peces marinos, son principalmente alimentadores visuales al comienzo.

d) Musculatura y capacidad de respiración

Otros aspectos a ser considerados en el comportamiento de la alimentación larval son el desarrollo de la musculatura y la capacidad respiratoria para mantener la capacidad de natación que permita la captura del alimento. En peces adultos la natación continua esta sustentada por fibras rojas, que participan en la respiración aeróbica (donde la fuente de Carbono es el CO_2), mientras que la natación de esfuerzo está sustentada por fibras blancas que participan en la respiración anaeróbica (donde la principal fuente es el glicógeno).

En las larvas las cosas parecen ser distintas, ellas contienen una capa muscular similar a los músculos rojos de los adultos, que cubre casi toda la superficie del cuerpo y que es claramente aeróbica, y que además de cumplir funciones de locomoción, cumple funciones en la respiración. De esta manera estas pueden sustituir a las branquias que en los estados larvarios iniciales son bastantes rudimentarias. Por esta razón, las capas musculares más profundas, que son anaeróbicas en los adultos, obviamente son aeróbicas en las larvas de los peces.

Las branquias de los peces están compuestas por los llamados arcos branquiales con numerosos filamentos branquiales, los que a su vez contienen pequeñas lamelas secundarias, siendo estas últimas el sitio para el intercambio de gases. Las larvas tienen filamentos, pero carecen de lamelas secundarias, por lo tanto las capas musculares superficiales asumen la función respiratoria de las branquias. Con el desarrollo del aparato branquial, las larvas reducen el área superficial de los músculos dedicados a la respiración, transfiriendo cada vez mayormente esta función a las branquias. Por otra parte, paralelo al desarrollo branquial, la musculatura roja y blanca es cada vez es más diferenciada.

Requerimientos nutricionales en larvas de peces

Los requerimientos de ácidos grasos, difieren tanto en tipo como en cantidad entre especies, y más aún entre especies de agua dulce y marinas. Además, suelen ser diferentes entre larvas y juveniles de una misma especie, siendo normalmente el requerimiento de las larvas el doble que el de los juveniles (Izquierdo, 1996a). Todos los estudios al respecto indican que los ácidos grasos esenciales más importantes y requeridos en los peces, para un normal crecimiento y sobrevivencia son los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y dentro de ellos principalmente los de la serie n-3 y n-6 (Izquierdo *et al.*, 1989; Izquierdo *et al.*, 1992; Rodríguez *et al.*, 1993; Mourente *et al.*, 1993; Salhi *et al.*, 1994), reportándose que las mortalidades y ciertos signos de deficiencia en la natación están relacionadas precisamente a bajos niveles de n-3 HUFA (Koven *et al.*, 1992). Los requerimientos de n-3 HUFA en larvas de peces marinos pueden ser variables, tanto entre especies diferentes, como dentro de la misma especie, y los estudios han reportado entre un 0,03% para *Pleuronectes plateassa* (Dickey - Collas y Geffen, 1992) y cerca del 4% en *Seriola quinqueradiata* (Watanabe, 1993), y en la mayoría de los casos pueden ser mantenidos principalmente con ácidos grasos de cadena larga como son el EPA (20:5n-3), el DHA (22:6n-3) y el ácido ARA (20:4n-6). Varios estudios han indicado sin embargo, que es probable que no sólo el contenido total de n-3HUFA, de DHA EPA o ARA, en forma individual sea importante, sino que un adecuado balance de la relación EPA/DHA sea necesario para obtener un óptimo crecimiento (Izquierdo, 1996 a y b, Rodríguez *et al.*, 1998), más aún, recientemente se ha establecido que una relación entre estos tres ácidos grasos debe ser atendida, puesto que es esta relación la que puede determinar ciertos aspectos fisiológicos y morfológicos importante en larvas de rodaballo (Estévez *et al.*, 1999; Sargent *et al.*, 1999b).

En peces de agua dulce, también los ácidos grasos poliinsaturados tienen claros efectos sobre el crecimiento y sobrevivencia, aunque en este caso, tanto los ácidos grasos de la serie n-3 como los de la serie n-6 PUFA pueden tener importancia, donde el 18:3n-3 y el 18:2n-6 suelen satisfacer las necesidades (Sargent *et al.*, 1995). Takeuchi (1997), en una amplia revisión acerca de los requerimientos en peces de agua dulce, indica que los requerimientos de n-3 HUFA, suelen ir acompañados de requerimientos de 18:3n-3 o 18:2n-6. Así la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) requiere un 0,5% de n-3 HUFA, en compañía de un 1% de 18:3n-3, la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) requiere 0,5% de n-3 HUFA y 1% de 18:2n-6 y el catfish (*Ictalurus punctatus*) 1-2% de 18:3n-3 y 0,5-0,75% de n-3 HUFA, principalmente aquellos derivados del ácido linoléico (18:3n-3) y linoleico (18:2n-6) (Satoh *et al.*, 1989). Por otra parte, también se ha demostrado que en la trucha arcoiris no hay diferencias en eficiencia de utilización entre EPA y DHA, aunque el crecimiento se ve aumentado por la combinación de ambos ácidos grasos (Watanabe, 1982). En general, los requerimientos de ácidos grasos insaturados en peces de agua dulce suelen ser más bajos, oscilando entre 1-2% (Sargent *et al.*, 1995) o incluso menos. Experimentos en larvas de carpa (*Cyprinus carpio*) han mostrado, que a diferencia de los peces

marinos, éstas pueden sobrevivir y crecer bien con dietas que poseen niveles de n-3 HUFA, tan bajos como 0,05-0,1% (Guerden *et al.*, 1995). En todo caso, tanto en peces de agua dulce como marinos, un máximo crecimiento sin síntomas de una gran deficiencia, puede ser obtenido sólo con ácidos grasos n-3 HUFA, pero no con n-6 HUFA únicamente. Así, el salmón rey (*Oncorhynchus keta*), mantenido en agua dulce, si bien requiere 0,5% n-3HUFA más la adición de 1% de 18:2n-6 o 18:3n-3 para mejorar el crecimiento, la sobrevivencia se ve claramente reducida sólo con la adición de 0,5% 18:3n-3 (Takeuchi *et al.*, 1979). Según esto, los ácidos grasos de la serie n-6 suelen ser más determinantes en la sobrevivencia y el crecimiento en los peces de agua dulce que en peces marinos, aunque siempre acompañados de los ácidos grasos de la serie n-3, por lo que la relación n-3/n-6 HUFA también suele ser menor (Cowey y Sargent, 1972) y por lo tanto, los ácidos grasos derivados del ácido linoleico (18:2n-6), como es ARA (20:4n-6) también cobran mayor relevancia en los peces de agua dulce que en los peces marinos.

Por otra parte, puesto que los peces marinos son incapaces de sintetizar ácidos grasos de cadena larga altamente insaturados, como los de la serie n-3 y n-6, por ejemplo, convertir el ácido linoléico (18:3n-3) a ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), como es el DHA y EPA, tienen la necesidad de incorporar en la dieta estos últimos para un normal crecimiento y desarrollo (Sargent *et al.*, 1989; Stottrup, 1993). Sin embargo, los peces de agua dulce como la trucha, poseen la habilidad de convertir el ácido linoléico en DHA y EPA y ácido linoleico (18:2n-6) en ARA (20:4n-6). Por ello, la adición directa de EPA y/o DHA en la dieta de peces marinos mejora el crecimiento larval, pero no si se adiciona el precursor (Watanabe, 1982). En los peces de agua dulce sin embargo, la adición de 18:3n-3 y 18:2n-6 sí mejora el crecimiento y disminuye los síntomas patológicos producto de las deficiencias, aunque varias evidencias indican también que la adición de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) como el 20:5n-3 y 22:6n-3, también son efectivos en mejorar el crecimiento. Por otra parte, la razón n-3/n-6 PUFA tiende a ser más baja en peces de agua dulce que en peces marinos. En este sentido, en los peces de agua dulce los requerimientos de ácidos grasos de la serie n-6 PUFA llegan a ser más importantes que los de la serie n-3, aunque se debe enfatizar que usualmente la presencia de n-3 PUFA en las dietas es más determinante que la sola presencia de n-6 PUFA (Cowey y Sargent, 1972; Sargent *et al.*, 1989).

En la actualidad, la forma más común de establecer dietas para primera alimentación que permitan cubrir las necesidades lipídicas de las larvas es obteniendo información mediante el estudio del patrón bioquímico de huevos y larvas recién eclosionadas (Fyhn, 1989; Tandler *et al.*, 1989; Planas *et al.*, 1993; Vázquez *et al.*, 1994). Otra práctica común y ligada a la anterior, es analizar la evolución (conservación y pérdida) de los lípidos y ácidos grasos corporales en larvas desde la eclosión hasta la desaparición del saco vitelínico (Rodríguez, 1994). Ambas prácticas consideran que los huevos de peces contienen todos los nutrientes esenciales para el desarrollo del embrión y el crecimiento de la larva hasta la absorción del saco, por lo que su estudio podría dar luces acerca de los requerimientos nutricionales en las larvas de primera alimentación, suponiendo que el sistema nutricional endógeno podría ser también el mismo para la alimentación exógena (Ostrowski y Divakaran, 1990). Si bien el crecimiento larval durante la etapa de nutrición endógena está influenciado por una serie de parámetros abióticos (Watanabe y Kiron, 1994), algunos autores han sugerido que las reservas nutritivas del saco de vitelo aportan los requerimientos necesarios para pasar esta etapa crítica del desarrollo y que el patrón de nutrientes usado por los embriones y larvas recién eclosionadas pueden indicar las necesidades nutricionales de las larvas durante su primera alimentación (Vázquez *et al.*, 1994). Los principales ácidos grasos en los lípidos de huevos en peces marinos tales como el fletán (*Hippoglossus hippoglossus*) (Falk-Petersen *et al.*, 1989), rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Rainuzzo *et al.*, 1993), dorada japonesa (*Pagrus major*) (Izquierdo *et al.*, 1989a) y dorada (*Sparus aurata*) (Mourente y Odriozola, 1990) son el DHA, el ácido palmítico, EPA y el ácido oléico. Se debe indicar que la importancia

relativa de cada ácido graso puede diferir entre las especies estudiadas y entre diferentes puestas de huevos de la misma especie. Estas diferencias pueden estar relacionadas principalmente con la dieta de los reproductores (Watanabe *et al.*, 1984; Watanabe, 1985, Fernández Palacios *et al.*, 1995). En algunas especies marinas, tales como el fletán, los n-3HUFA son marcadamente catabolizados después de la fecundación y durante el inicio del desarrollo embrionario, constituyendo la mayor fuente energética durante este período (Falk-Petersen *et al.*, 1989). Sin embargo, durante la última etapa de la embriogénesis en muchas otras especies tales como el rodaballo (Planas *et al.*, 1993) y la dorada (Mourete y Odriozola, 1990), estos ácidos grasos son conservados durante el desarrollo larval. Otro método utilizado por algunos autores para obtener información sobre los requerimientos de ácidos grasos en larvas de peces, es analizando los patrones de conservación y pérdida de ácidos grasos. Algunos ácidos grasos poliinsaturados tales como el DHA, el ácido araquidónico y en algunas especies el EPA son conservados a expensas de otros ácidos grasos, durante la inanición en peces como el rodaballo (Rainuzzo *et al.*, 1994), dorada japonesa (Tandler *et al.*, 1989) y la dorada (Koven *et al.*, 1989; Rodríguez, 1994). Esta estrategia bioquímica permite la preservación de componentes esenciales de las membranas biológicas durante los períodos críticos. En todos los casos estudiados el DHA es el ácido graso preferentemente conservado, sugiriendo la importancia de este ácido para las larvas de peces marinos (Izquierdo, 1996).

Morfología y fisiología digestiva de las larvas de peces

a) Generalidades

Una de las líneas de investigación que viene desarrollándose desde hace más de una década en el campo de la larvicultura de peces, tiene relación con aspectos de desarrollo morfológico y enzimático del sistema digestivo durante el desarrollo larval. Esto permite conocer si las larvas tienen un sistema digestivo apropiado para recibir alimento exógeno y que tipo de alimento eventualmente podrían recibir (Segner *et al.* 1994), puesto que no sólo basta saber si las larvas lo consumen o no, si no además, si su sistema digestivo está preparado para una adecuada digestión de los alimentos y una adecuada absorción de los nutrientes. El desconocimiento de esto podría llevar a elaborar dietas nutricionalmente balanceadas, pero inadecuadas desde el punto de vista de la digestión. El conocimiento de los cambios en el desarrollo del tracto digestivo asociado con el proceso de asimilación de nutrientes es esencial para ayudar a identificar los factores limitantes durante el cultivo larval, reduciendo así los “cuellos de botella” durante el destete y sincronizando el estado de desarrollo con las prácticas de alimentación (Hamlin *et al.*, 2000).

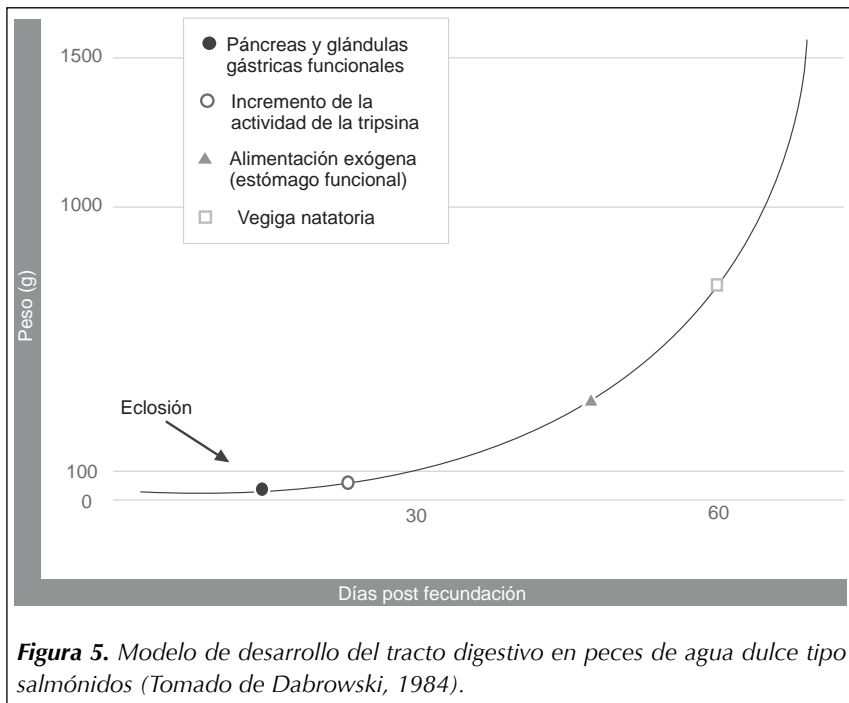
b) Desarrollo del sistema digestivo

En el momento de la eclosión, el sistema digestivo de las larvas es un simple tubo recto y corto sin mayor diferenciación. Durante el desarrollo y maduración del tracto digestivo no se observan grandes cambios morfológicos hasta que se inicia la formación del estómago con sus glándulas gástricas y los ciegos pilóricos. Este desarrollo del estómago indica, desde el punto de vista nutricional, la transformación a la etapa juvenil (Tanaka, 1973; Govoni *et al.*, 1986; Lazo, 1999). Existen diferencias notables entre los procesos digestivos de peces que cuentan con un estómago desarrollado y funcional, como es el caso en juveniles y adultos, y los que carecen de él, como es característico de la etapa larvaria y de aquellos peces denominados agastros. De manera general, el sistema digestivo de las larvas es menos complejo que el de juveniles y adultos desde el punto de vista morfológico, histológico y fisiológico.

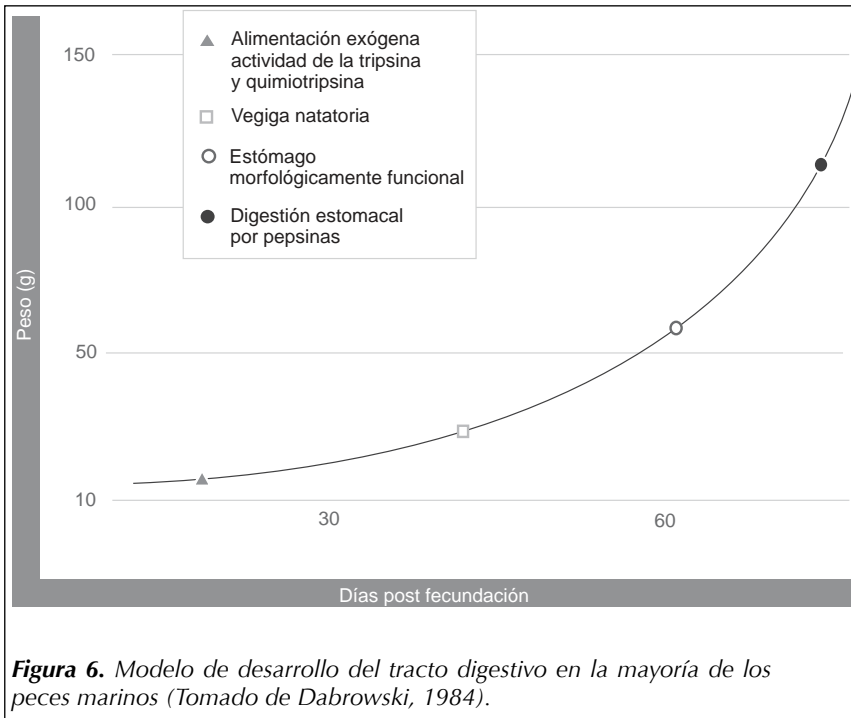
Con el fin de alcanzar un mayor entendimiento sobre la ecología y fisiología de las distintas larvas de peces Dabrowski (1982, 1984), estableció tres categorías de peces en función del desa-

rollo del sistema digestivo basado en el grado de desarrollo del sistema digestivo en el momento en el cual el contenido de el saco vitelino había sido completamente absorbido y se iniciaba la alimentación exógena:

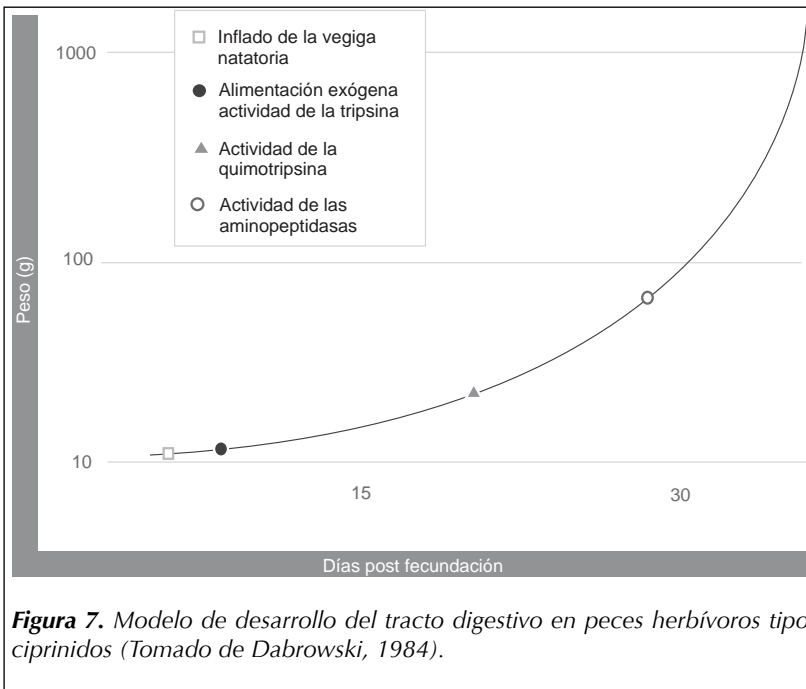
- Aquellos que producen huevos demersales con grandes cantidades de vitelo, y que al comienzo de su alimentación exógena presentan un estómago funcional, por lo que estas especies pueden iniciar la alimentación directamente con alimento inerte. En este caso, el desarrollo embrionario es relativamente largo y al iniciarse la alimentación exógena, las larvas muestran tractos digestivos relativamente completos y funcionales. Esta estrategia es típica de los salmónidos y muchas especies de agua dulce (Figura 5).



- Aquellos que producen huevos pelágicos de pequeño tamaño y que contienen una cantidad limitada de vitelo, y en las que una vez iniciada la alimentación exógena, el estómago aparece más tardíamente, existiendo incluso en algunas especies cierto desfase entre su aparición y funcionalidad. En este caso, el desarrollo embrionario es rápido y la alimentación exógena se inicia, aún cuando hay una capacidad digestiva mínima. La gran mayoría de las larvas de especies de peces marinos se ubican dentro de esta categoría (Figura 6).



- Aquellos que permanecen sin estómago a lo largo de su vida, como los ciprínidos, siendo común durante el desarrollo larvario un incremento de la longitud del intestino (Figura 7).



El hígado es uno de los primeros órganos en desarrollarse ya que está involucrado en la reabsorción del material vitelino. Mientras que el páncreas y la vesícula biliar, relacionados con la digestión de proteínas, lípidos y carbohidratos, se diferencian después, siendo completamente funcionales en el momento que se inicia la alimentación exógena. Las enzimas digestivas son producidas en varios órganos, incluyendo el estómago, páncreas, vesícula biliar y las paredes del intestino. Sin embargo, las enzimas también pueden provenir del alimento vivo o de las bacterias que conforman la flora intestinal.

c) Digestión enzimática

En aquellos peces con un estómago completamente desarrollado y funcional, la digestión de proteínas comienza en un medio ácido (HCl) en el cual la pepsina es la enzima principal. En contraste, las larvas de peces marinos no secretan pepsinógeno para digerir las proteínas, ni ácido clorhídrico para su activación, por lo que la digestión reposa esencialmente sobre las enzimas pancreáticas e intestinales activas en un medio alcalino. En términos nutricionales, las larvas aún no poseen una plena competencia digestiva.

En el intestino, la digestión se lleva a cabo a través de procesos tanto intracelulares como extracelulares (Smith, 1989). Las enzimas que participan en estos procesos pueden estar localizadas en el lumen intestinal (eg., enzimas secretadas por el páncreas como la tripsina y la quimotripsina), las adheridas a la membrana del epitelio intestinal (borde en cepillo) (eg., la aminopeptidasa o la fosfatasa alcalina) o en el interior de las células (eg., catepsinas). La digestión intracelular se realiza principalmente en la región posterior del intestino y fue puesta en evidencia por Watanabe (1984), quien observó la absorción de proteínas (peroxidasa del rábano) por medio de pinocitosis y su posterior digestión intraenterocítica por medio de lisosomas. Este mecanismo de digestión es más importante en larvas que en juveniles o adultos, y se cree que la digestión intracelular compensa la baja digestión extracelular exhibida durante la etapa larvaria (Watanabe, 1984; Cahu y Zambonino Infante, 1995).

En casi todas las especies estudiadas se ha encontrado actividad proteolítica alcalina, atribuida esencialmente a la tripsina y quimotripsina, así como a algunas metaloproteasas (aminopeptidasas y carboxipeptidasas). Las enzimas que degradan los lípidos son principalmente de dos tipos, lipasa neutra no-específicas activada por sales biliares y lipasa pancreática específica activada por co-lipasa y sales biliares (Gjellesvik *et al.*, 1992; Izquierdo *et al.*, 2000). Los lípidos son emulsificados por las sales biliares para facilitar su digestión. Las enzimas actúan sobre sus respectivos sustratos lipídicos liberando ácidos grasos, los que son absorbidos por las células de la pared del intestino anterior y resintetizados intracelularmente antes de su transporte subsiguiente al hígado (Smith, 1989). También, se ha encontrado actividad de tipo amilasa y maltasa en la mayoría de las larvas estudiadas. En general, se considera que al iniciar la alimentación exógena las larvas ya poseen enzimas digestivas. En términos de regionalización intestinal, las proteínas son digeridas y absorbidas en la parte posterior, mientras que la digestión de lípidos ocurre principalmente en la parte anterior (Govoni *et al.*, 1986).

La inhabilidad de las larvas de peces marinos para crecer adecuadamente al ser alimentados con dietas artificiales ha sido generalmente atribuida a una baja actividad enzimática, lo que resulta en una pobre capacidad digestiva. Se ha sugerido que las enzimas exógenas (presentes en el alimento vivo) compensan esta deficiencia digestiva, ya sea digiriendo los nutrientes directamente o activando los zimógenos producidos por las larvas (Dabrowski, 1979; Lauff y Hoffer, 1984). Sin embargo, varios estudios realizados independientemente han llevado a diferentes investigadores a la conclusión de que el aporte de las enzimas exógenas a la actividad enzimática total es relativamente insignificante (0.6% al 10%) (Bagari y Lovell, 1986; Cahu y Zambonino Infante,

1997; Díaz *et al.*, 1997; Kurokawa *et al.*, 1998; Lazo *et al.*, 2000a). Estos autores argumentan que el pobre crecimiento y baja supervivencia exhibida por larvas alimentadas con dietas artificiales no son atribuibles a una deficiencia enzimática, sino más bien al no haber proporcionado a la larva una dieta artificial adecuada que cubra todos los requerimientos nutricionales. Así como al hecho de que la dieta no haya sido ingerida satisfactoriamente y/o que no haya estimulado la secreción de sus propias enzimas digestivas. Por lo tanto, el que el sistema digestivo no este completamente desarrollado durante la etapa larvaria, no implica que no sea funcional. Considerando esta premisa, el reto actual consiste en identificar y caracterizar la estructura química de los nutrientes requeridos, y de proveerlos en las proporciones adecuadas para que el sistema digestivo pueda digerirlos y absorberlos.

Por otra parte, se han postulado varias razones por las cuales las dietas artificiales, utilizadas hasta la fecha, pueden haber sido inadecuadas. Entre las que merecen ser destacadas están las siguientes:

1. Han carecido de sustancias, en las cantidades necesarias, que estimulen su ingestión para proveer los nutrientes requeridos durante el desarrollo larvario
2. No han estimulado la secreción de zimógenos hacia el tubo digestivo, o han inhibido ciertas enzimas digestivas ya presentes en el tubo digestivo
3. Han provocado daños estructurales a las paredes intestinales
4. No han proporcionado ciertos nutrientes esenciales, como amino ácidos y ácidos grasos, vitaminas, y/o ciertas sustancias estimuladoras del desarrollo y crecimiento (*eg.*, espermina y hormonas)
5. Aunque presentes en la dieta, la estructura química de los nutrientes esenciales no ha sido la adecuada para su digestión, absorción y eficiente utilización (*eg.*, fosfolípidos en relación a triglicéridos o amino ácidos libres en relación a proteínas)
6. Las proporciones de los nutrientes no han sido las adecuadas

BIBLIOGRAFIA

- Baragi, V., Lovell R. (1986) *Digestive enzyme activities in stripped bass from first feeding through larval development*. Trans. Am. Fish. Soc., 115, 478 – 484.
- Blaxter, J. (1969) *Development: Eggs and larvae*. In: Hoar, W., Randall, D. (Eds.). Fish Physiology, Academic Press, Inc. (London) Ltda. 177 – 252.
- Bolla, S., Ottesen, O.H. (1998) *The influence of salinity on the morphological development of yolk sac larvae of Atlantic halibut, Hippoglossus hippoglossus (L.)*. Aquaculture Research 29, 203 – 209.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L. (1997) *Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding?* Aquacult. Int., 5, 151 – 160.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L. (1995) *Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: Response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases*. Fish Physiol. Biochem., 14, 209 – 214.
- Carrillo, M., Zanuy, S., Parat, F., Cerda, J., Ramos, J., Mananos, E., Bromage, N., (1995) *Sea Bass (Dicentrarchus labrax)*. In: Bromage, N., Roberts, R. (Eds.), Broodstock management and egg & larvae quality. Blackwell Science Ltd. 138 – 168.
- Cowey, C.B., Sargent, J.R. (1972) *Fish nutrition*. In: Russell, F.S., Yonge, M. (Eds.), Advances in marine Biology Academic Press, London. 10, 383 – 492.
- Cunha, I., Planas, M. (1999) *Optimal prey size for early turbot larvae (Scophthalmus maximus L.) based on mouth and ingested prey size*. Aquaculture 175, 103 – 110.
- Dabrowski, K. (1979) *The role of proteolytic enzymes in fish digestion*. In *Cultivation of Fish Fry and its Live Food, Vol. 4*, E. Styczunska-Jurewicsk, T. Jaspers and E. Persoone (Ed.), European Mariculture Society, Belgium, pp. 107 – 126.
- Dabrowski, K. (1984) *The feeding of fish larvae: Present "state of the art" and perspectives*. Reprod. Nutr. Dev., 24, 807 – 833.
- Daniels, H.V., Berlinsky, D.L., Hodson, R.G., Sullivan, C.V. (1996) *Effects of stocking Density, Salinity, and Light Intensity on Growth and survival of Southern Flounder Paralichthys lethostigma Larvae*. J. World Aqua. Soc. 27, 153 – 159.
- Dantagnan, P., Bórquez, A., Bariles, J., Valdebenito, I., Vega, R. (1995) *Effects of different diets on the survival and growth of Puye (Galaxias maculatus)*. In: Lavens, P., Jaspers E., Roelants I. (Eds.), Larvi' 95 Fish & Shellfish Larviculture Symposium. Europ. Aqua. Soc., Special Publ. 24, 435 – 437.
- Díaz, M., Moyano, F.J., García-Carreno, F.L., Alarcón, F.J., Sarasquete, M.C., 1997 *Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream*. Aquacult. Int., 5, 461 – 471.
- Dickey-Collas, M., Geffen, A.J. (1992) *Importance of the fatty acids 20:5n-3 and 22:6n-3 in the diet of plaice (Pleuronectes platessa) larvae*. Mar. Biol. 113, 463 – 468.
- Estévez, A., McEvoy, L.A., Bell, J.G., Sargent, J.R. (1999) *Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (Scophthalmus maximus) larvae fed -prey enriched in arachidonic and eicosapentaenoic acids*. Aquaculture 180, 321 – 343.

- Falk-Petersen, S., Sargent, J.R., Fox, C., Falk-Petersen, I.B., Haug, T., Kjorsvik, E., (1989) *Lipids in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs from planktonic samples in Northern Norway*. Mar. Biol. 101, 553 – 556.
- Fernández-Díaz, C., Yufera, M. (1995) *Capacity of gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae to break down dietary microcapsules*. Aquaculture 134, 269 – 278.
- Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Valencia, A., Salhi, M., Vergara, J. (1995) *Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)*. Aquaculture, 132, 325 – 337.
- Fyhn, H.J. (1989) *First feeding of marine fish larvae: Are a free amino acids the source of energy*. Aquaculture 80, 111 – 120.
- Gjellesvik, D.R., Lombardo, D., Walther B.T. (1992) *Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties*. Biochim. Biosphys. Acta, 1124, 123 – 134.
- Govoni, J.J., Boehlert, G.W., Watanabe Y. (1986) *The physiology of digestion in fish larvae*. Environ. Biol. Fish., 16, 59 – 77.
- Guerden, I., Radünz-Neto, J., Bergot, P. (1995) *Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae*. Aquaculture 131, 303 – 314.
- Hamlin, H.J., Hunt von Herbing, I., Kling L.J. (2000) *Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny*. J. Fish. Biol. 57, 716 – 732.
- Heming, T.A., Buddington, R.K. (1988) *Yolk sac absorption in embryonic and larval fishes*. In Hoar, W.A., Randall, D.J. (Eds.), Fish Physiology, Vol. 11A. Academic Press, London, pp. 407 – 446.
- Izquierdo, M.S., Watanabe, T., Takeuchi, T., Arakawa, T., Kitajima, C. (1989a) *Requirement of larval red seabream *Pagrus major* for essential fatty acids (*Nippon Suisan Gakkaishi*) Bull. Japan. Soc. Scien. Fish 55, 859 – 867*.
- Izquierdo, M.S., Watanabe, T., Takeuchi, T., Arakawa, T., Kitajima, C. (1989b) *Optimal levels in *Artemia* to meet the EFA requirements of red seabream (*Pagrus major*)*. In: Takeda, M., Watanabe, T. (Eds.), The current status of fish nutrition in Aquaculture. Japan Translation Center, Ltd., Tokyo, Japan, 221 – 232.
- Izquierdo, M.S., Arakawa, T., Takeuchi, T. Haroun, R., Watanabe, T. (1992) *Effect of n-3HUFA levels in *Artemia* on growth of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)*. Aquaculture 105, 73 – 82.
- Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L., Hernández-Cruz, C.M. (2000) *Recent advances in lipid nutrition in fish larvae*. Fish Physiol. Biochem, 22, 97 – 107.
- Izquierdo, M.S. (1996) *Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae*. Aquaculture Nutrition 2, 183 – 191.
- Izquierdo, M.S. (1996a) *Essential fatty acid requirement of cultured marine fish larvae*. En Gajardo G., Coutteau, P. (Eds.), Improvement of the comercial production of marine aquaculture species. Proceeding of a Workshop on fish and mollusc larviculture, Santiago Chile, pp. 31 – 44.
- Johnson, J.H., Dropkin, D.S. (1995) *Effects of prey density and short term food deprivation on the growth and survival of American shad larvae*. Journal of Fish Biology 46, 872 – 79.

- Koven, W.M., Kissil, G.W., Tandler, A. (1989) *Lipid and n-3 requirement of Sparus aurata larvae during starvation and feeding*. Aquaculture, 79, 185 – 191.
- Koven, W.M., Tandler, A., Kissil, G.W., Sklan, D. (1992) *The importance of n-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval Sparus aurata and their effect on survival, lipid composition and size distribution*. Aquaculture 104, 91 – 104.
- Kurokawa, T., Shiraishi, M., Suzuki, T. (1998) *Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine (Sardinops melanotictus) larvae*. Aquaculture 161, 491 – 499.
- Kurokawa, T., Kagawa, H., Ohta, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Hirose, K. (1995) *Development of digestive organs and feeding ability in larvae of Japanese eel (Anguilla japonica)*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 52, 1030 – 1036.
- Kuruma, K., Fukusho, K. (1984) *Rearing of Marine Fish Larvae in Japan*. Ottawa, Ontario, IDRC, 109 pp.
- Lauf, M., Hoffer, R. (1984) *Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes*. Aquaculture 37, 335 – 346.
- Lazo, J.P. (1999) *Development of the digestive system in Red Drum (Sciaenops ocellatus) larvae*. Ph.D. Dissertation. The University of Texas at Austin. USA.
- Lazo, J.P., Joan Holt, G., Arnold, C.R. (2000) *Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum (Sciaenops ocellatus)*. Aquaculture Nutrition 6, 183 – 192.
- Lein, I., Tveite, S., Gjerde, B., Holmefjord, I. (1997) *Effects of salinity on yolk sac larvae of Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus L.)*. Aquaculture 156, 291 – 303.
- Liewes E. (1984) *Culture, feeding and diseases of Commercial flatfish species*. A.A. Balkema, Rotterdam, Boston, 104 pp.
- Martínez-Palacios, C.A., Morte, J.C., Tello-Ballinas, J.A., Toledo-Cuevas, M., Ross, L.G. (2004) *The effects of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of Chirostoma estor Jordan 1880 (Pisces: Atherinidae)*. Aquaculture 238, 509 – 522.
- Mourente, G., Rodríguez A., Tocher, D., Sargent, J. (1993) *Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) on lipid and fatty acid compositions and growth in gilthead sea bream (Sparus aurata L.) larvae during first feeding*. Aquaculture 112, 79 – 98.
- Mourente, G., Odriozola, J.M. (1990) *Effect of broodstock diets on total lipids and fatty acids composition of larvae of gilthead sea bream (Sparus aurata) during yolk sac stage*. Fish Physiol. Biochem. 8, 103 – 110.
- Ostrowsky, A.C., Divakaran, S. (1990) *Survival and bioconversion of n-3 fatty acids during early development of dolphin (Coryphaena hippurus) larvae fed oil enriched rotifers*. Aquaculture 89, 273 – 285.
- Pascual, E., Yúfera, M. (1987) *Alimentación en el cultivo larvario de peces marinos*. In Espinoza de los Monteros, J., Labarta, U. (Eds.). Alimentación en Acuicultura Plan de formación de Técnicos superiores en Acuicultura (FEUGA). 251 – 280.
- Peterson, R. H., Martin-Robichaud, D., Berge A. (1996) *Influence of temperatura and salinity on lenght and yola utilization of stripped bass larvae*. Aquaculture Internacional 4, 89 – 103.
- Planas, M., Garrido, J.L., Labarta, U., Ferreiro, M.J., Fernández-Reiriz, M.J., Munilla, R., (1993) *Changes of fatty acid composition during development in turbot (Scophthalmus maximus)*

- eggs and larvae. In: Walther B.T., Fyhn, H.J. (Eds.), *Physiological and Biochemical aspects of fish development*. Univ. of Bergen, Norway, pp. 323 – 329.
- Pryor, V.K., Epifanio, C.E. (1993) *Prey selection by larval weakfish (Cynoscion regalis): the effects of prey size, speed, and abundance*. *Marine Biology* 116, 31 – 37.
- Rainuzzo, J.R., Farestveit, R., Jorgensen, L. (1993) *Fatty acid and aminoacid composition during embryonic and larval development in plaice (Pleuronectes platessa)*. In: Walther B.T., Fyhn, H.J. (Eds.), *Physiological and Biochemical aspects of fish development*. Univ. of Bergen, Norway, pp. 290 – 295.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Jorgense, L., Olsen, Y. (1994) *Lipid composition in turbot larvae fed live feed cultured by emulsions of different lipid classes*. *Comp. Biochem. Physiol.* 107, 699 – 710.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., Oie, G., Olsen, Y. (1993) *Nutritional effects of algal additions in first-feeding of turbot (Scophthalmus maximus L.) larvae*. *Aquaculture* 118, 257 – 275.
- Riis-Vestergaard, J. (1987) *Physiology of teleost embryos related to environmental challenges*. *Sarsia* 72, 351 – 358.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Izquierdo, M.S., Mora, J., Lorenzo, A., Fernández-Palacios, H. (1993) *Essential fatty acid requirement of larval gilthead sea bream, Sparus aurata (L.)*. *Aquac. Fish. Manage.*, 24, 295 – 304.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Badia, P., Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Hernández, A.L. (1998) *The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream (Sparus aurata L.) larvae when using an appropriate DHA/EPA ratio in the diet*. *Aquaculture* 169, 9 – 23.
- Rodríguez, C. (1994) *Estudio de los requerimientos de ácidos grasos esenciales de la dorada europea durante las dos primeras semanas de alimentación*. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna, España 284 pp.
- Rojas, R., Champigneulle, A., Chapuis, G. (1991) *The mass-rearing of coregonus lavarretus L. larvae at high densities and two rearing acles with two dry diets*. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers E., Ollevier F. (Eds.), *Larvi' 91 Fish and crustacean Larviculture Symposium*. Europ. Aqua. Soc. Special Publ. 15, 145 – 147.
- Rønnestad, I (2002) *Control and Efficiency of Digestive Function of Marine Fish Larvae*. In Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición acuícola VI. Memorias del VI Simposium Interacional de Nutrición Acuícola*. 3-6 Septiembre. Cancún, Quintana Roo, México.
- Salhi, M., Izquierdo, M.S., Hernández-Cruz, C.M., González, M., Fernández-Palacios, H. (1994) *Effect of lipid and n-3 HUFA levels in microdiets on growth, survival and fatty acid composition of larval gilthead sea bream (Sparus aurata)*. *Aquaculture* 124, 275 – 282.
- Sargent, J., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J., Tocher, D.R. (1995) *Requirement criteria for essential fatty acids*. *J. Appl. Ichthyol.* 11, 183 – 198.
- Sargent, J., Henderson, R.J., Tocher, D.R. (1989) *The lipids*. In: Halver J.E. (ed.), *Fish Nutrition* Academic press, San Diego, pp. 154 – 219.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D., (1999) *Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions*. *Aquaculture* 179, 217 – 229.

- Satoh, S., Poe, W.R., Wilson R.P. (1989) *Effect of dietary n-3 fatty acids on weight gain and liver polar lipid fatty acid composition of fingerling channel catfish*. J. Nutr. 120, 23 – 28.
- Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W., Hanke, W. (1994) *The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus**. Marine Biology 119, 471 – 486.
- Segner, H. (1993) *Nutritional physiology in fish larvae*. In *Third International course on fish larvae nutrition*, May 3-12. Wageningen, Netherland. 55 – 76 p.
- Shirota, A. (1970) *Studies on the mouth size of fish larvae*. Bull. Japan Soc.Sci. Fish. 36, 353 – 368.
- Smith, L. (1989) *Digestive Functions in Teleost Fishes* In *Fish Nutrition*. J. Halver (Ed.) Academic Press, Inc. London. pp 332 – 422.
- Storch, V. (1993) *Ultrastructure of intestine – an introduction*. In *Third International course on fish larvae nutrition*, May 3-12. Wageningen, Netherland. 13 – 30 p.
- Stottrup, J. (1993) *First feeding in marine fish larvae: Nutritional and environmental aspects*. In *Physiological and biochemical aspects of fish development*. B. Walther., H. Fyhn (Eds.). University of Bergen, Norway. pp 123 – 131.
- Takeuchi, T. (1997) *Essential fatty acid requirement of aquatic animals with emphasis of fish larvae and fingerling*. Reviews in Fisheries Science 5, 1 – 25.
- Takeuchi, T., Watanabe, T., Nose, T. (1979) *Requirement for essential fatty acids of chum salmon (*Onchorhynchus keta*) in freshwater environment*. Nippon Suisan Gakkaishi 45, 1319 – 1323.
- Tanaka, M. (1973) *Studies in the structure and function of the digestive system of teleost larvae*. D. Agric. Thesis, Kyoto University, Japan.
- Tandler, A. Watanabe, T., Satoh, S., Fukusho, K. (1989) *The effect of food deprivation on the fatty acid and lipid profile of red seabream larvae (*Pagrus major*)*. Br. J. Nutr. 62, 349 – 361.
- Vázquez, R., Gonzales, S., Rodriguez, A., Mourente, G. (1994) *Biochemical composition and fatty acid content of fertilized eggs, yolk sac stage larvae and first feeding larvae of the Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup)*. Aquaculture 119, 273 – 286.
- Watanabe, T., Arakawa, I., Kitajima, C., Fujita, S. (1984) *Effect of nutritional quality broodstock diet on reproduction of red sea bream*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 50, 495 – 501.
- Watanabe, T., Kiron, V. (1994) *Prospects in larval fish dietetics*. Aquaculture 124, 223 – 251.
- Watanabe, T. (1982) *Lipid nutrition in fish*. Comp. Biochem. Physiol 73B, 1 – 16.
- Watanabe, T. (1985) *Importance of the study of broodstock nutrition for further development of aquaculture*. In: Cowey, C.B., Mackie A.M., Bell J.C. (Eds.), *Nutrition and feeding in fish*. Academic Press, London, pp. 395 – 414.
- Watanabe, T. (1984) *An structural study of intracellular digestion of horseradish peroxidase by the rectal epithelium cells in larvae of a freshwater cottid fish *Cottus nozawae**. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 50, 409 – 416.
- Watanabe, T. (1993) *Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish*. J. World Aqua. Soc. 24, 152 – 161.

- Yasuda, F. (1960) *The feeding mechanisms in some carnivorous fish*. Rec. Oceanogr. Works Jpn., 5, pp. 153 – 160.
- Yúfera, M., Fernández-Díaz, C., Pascual, E. (1995) *Feeding rates of gilthead seabream (Sparus aurata), larvae on microcapsules*. Aquaculture 134, 257 – 268.
- Yúfera, M., Darias, M.J. (2007) *The onset of exogenous feeding in marine fish larvae*, Aquaculture (in press).
- Zohar, Y., Harel, M., Hassin, S., Tandler, A. (1995) *Gilt-Head Seabream (Sparus aurata)*. In : Bromage, N., Roberts, R. (Eds.), Broodstock management and egg & larvae quality. Blackwell Science Ltd. 94 – 117.

ESTADO ACTUAL DEL CULTIVO LARVARIO DEL PUYE (*GALAXIAS MACULATUS*) EN CHILE

P. Dantagnan; I. Valdebenito; A. Bórquez; Quintana, A; Rodríguez y A. Ortega.
Escuela de Acuicultura, Universidad Católica de Temuco.
Email: dantagna@uctemuco.cl

1.1. Importancia y aspectos biológicos de la especie

Galaxias maculatus (Jenyns, 1842) (Osmeriformes: *Galaxiidae*) conocido en Chile como “puye”, es un pequeño pez que se caracteriza por su carencia de pigmentación durante su estado de larva y postlarva, siendo su cuerpo transparente, anguiliforme y sin escamas (Figura 1). En esta especie, las larvas son robustas y pueden alcanzar un tamaño comercial con 4-6 cm de longitud total, en un periodo de tiempo aproximado de 6 meses, con un peso total cercano a los 0,3 g. Estas características son las que hacen a esta especie particularmente apreciada para su comercialización como símil de la “anguila”, o juvenil de la anguila, principalmente en los mercados de Europa y México. Por su demanda en el mercado internacional, alcanza precios que pueden oscilar entre



Figura 1. Morfología de ejemplares cristalinos de *G. maculatus*.

US\$28 – US\$100 el kilogramo como producto elaborado (Mardones, 2003). Por esto, constituye una especie atractiva para su producción comercial, siendo un candidato potencial para diversificar la acuicultura en Chile.

Esta especie posee distribución circumpolar Antártica, habita en aguas frías del hemisferio sur, encontrándose en Tasmania, Nueva Zelanda, Australia, Islas Malvinas y en la parte sur de Sudamérica (McDowall, 1968). En Chile se encuentra en la zona central desde los 32° Latitud Sur hasta los 53° Latitud Sur (McDowall, 1968; Campos, 1970) (Figura 2).

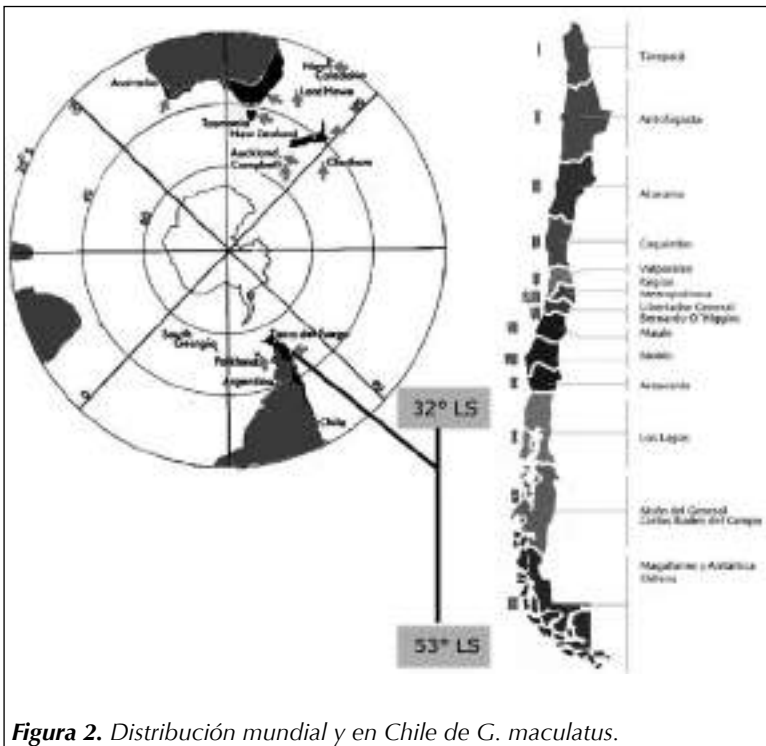


Figura 2. Distribución mundial y en Chile de *G. maculatus*.

Esta especie vive de preferencia en ríos y lagos del sur de Chile y Argentina. Se caracteriza por poseer poblaciones lacustres y diádromicas, las primeras viven en los lagos interiores con o sin conexión con el mar y realizan su reproducción en los mismos lagos, como lo han demostrado Pollard (1971) y Campos (1979). De la población que más conocimiento biológico existe es de las estuarinas, en las que su ciclo de vida es ampliamente conocido (Figura 3), principalmente en Nueva Zelanda y Chile. Según estas investigaciones, los reproductores que habitan aguas límnicas, como ríos y arroyos, migran hacia el estuario, donde desovan y donde la influencia mareal es importante para esta etapa, condición conocida como catádomo marginal según McDowall (1987). De acuerdo a Campos (1970) y Figueroa (1988), las épocas de puesta para las poblaciones dulcea-cuícolas ocurren en primavera – verano sin embargo, para las poblaciones estuarinas, la época de puesta se extiende entre verano y bien entrado el otoño (McDowall, 1968; Ferriz, 1987).

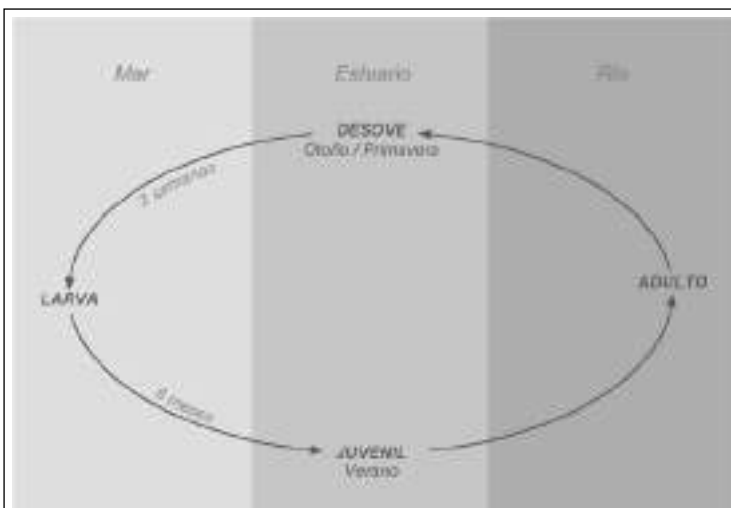


Figura 3. Ciclo de vida de *G. maculatus*, de acuerdo a McDowall (1987).

En el caso de las poblaciones diadrómicas, el desove toma lugar entre la vegetación de la orilla durante las mareas de sicigia, las que al bajar dejan las ovas desarrollándose fuera del agua en un ambiente húmedo extra-acuático y protegidas del sol. Los huevos de puyes estuarinos pueden tolerar un amplio rango de salinidades, variando entre las completamente dulces y las completamente marinas, aunque tanto su desarrollo como su eclosión, ocurre más satisfactoriamente en las salinidades intermedias (McDowall, 1987).

La eclosión de las larvas tiene lugar en el estuario, después de aproximadamente 16 días de desarrollo (Campos, 1970), aunque el período de incubación es claramente dependiente de la temperatura ambiental. Posteriormente migran al mar para retornar como juveniles cristalinos con aproximadamente 50 mm de tamaño, éstos siguen su retorno río arriba donde ocurre la pigmentación y metamorfosis, para volver río abajo, al estuario a desovar y completar su ciclo biológico (McDowall, 1987).

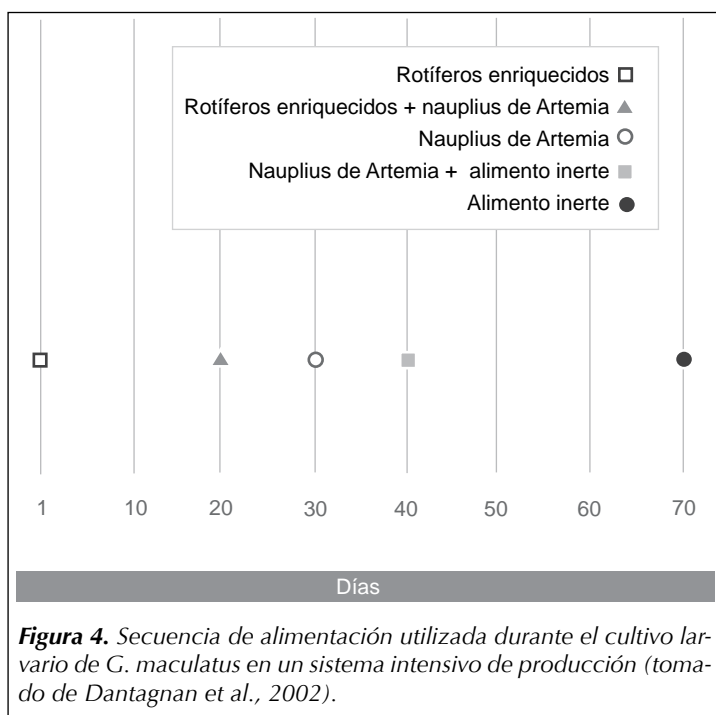
Desde el punto de vista de su conducta, se ha detectado que las larvas de *G. maculatus* posee una conducta de búsqueda de alimento bastante activa desde el momento de su eclosión, en un comportamiento de alimentación típico de peces clupeidos (Hunter, 1972 en Mitchell, 1989). También se desplaza nadando por la superficie del agua y cerca de las paredes del estanque, sus movimientos son armónicos y activos, presenta además fototactismo positivo (Mitchell, 1989).

1.2. Cultivo larvario

A pesar de la importancia comercial de esta especie, no existen antecedentes que den cuenta del cultivo masivo en criaderos. Mitchell (1989) publica las primeras experiencias de cultivo a nivel de laboratorio, señalando, entre otras cosas, que las larvas pueden consumir rotíferos y nauplius de *Artemia* en cautiverio. Además, logró determinar que esta especie tolera temperaturas entre 12 y 18° C y que sus larvas pueden ser cultivadas en un amplio rango de salinidades.

En general la larva de *G. maculatus* posee una longitud total de aproximadamente $6.0 \pm 0,5$ mm (Barile, 2003) y durante los primeros veinte días pueden llegar a duplicar su crecimiento (Dantagnan *et al.*, 2002), considerándose una larva relativamente grande, aunque tamaños de larvas menores a 6 mm también han sido reportadas. Las larvas de puye nacen con la boca abierta y funcional, poseen un vitelo bastante pequeño, que sólo dura entre 5 y 6 días a 13°C, (Mitchell, 1989; Dantagnan *et al.*, 1995). En experimentos de laboratorio con diferentes tipos de dietas, esta especie es capaz de consumir alimento preferentemente vivo y que deben ser suministrados desde el primer día después de su eclosión, puesto que su reserva vitelínica es escasa, y aunque el alimento inerte produce las mayores mortalidades, aparentemente es debido a una restricción de tipo nutricional o de características del alimento, (Op. cit, 1995).

Por otro lado, Dantagnan *et al.*, (2002) ha establecido una secuencia de alimentación larvaria (Figura 4) que ha permitido establecer la viabilidad técnica del cultivo larval en forma masiva y a escala piloto en un sistema intensivo de producción.



Sin embargo, es importante destacar que si bien la factibilidad técnica del cultivo de “puye” es posible, el cultivo bajo las condiciones establecidas por Dantagnan et al., (2002) es absolutamente inviable, considerando que cada individuo cristalino, pesa en promedio solo 0,3 gramos, por lo que la obtención de una unidad mínima de producción de 10 toneladas requeriría de al menos 30 millones de larvas (Barile et al., 2003). Esta condición hace que la demanda de agua y estanques sobrepase cualquier rentabilidad.

El desarrollo del cultivo larvario es quizás la etapa más compleja del cultivo de *G. maculatus*, puesto que es donde, se producen las mayores mortalidades e incertidumbres. Entre los aspectos que incluyen el manejo técnico básico para optimizar el cultivo están: el establecimiento de las secuencias, dosis alimentarias y tiempos de destete adecuadas; tomando en cuenta los cambios en su desarrollo morfológico y fisiológico, requerimientos nutricionales bajo condiciones ambientales específicas, técnicas de masificación mediante el manejo de las densidades, el control del canibalismo y la tolerancia a algunos factores ambientales, como temperatura, luminosidad, salinidad, y calidad del agua. Por último, las condiciones nutricionales y de manejo ambiental para la obtención de un cristalino anguiliforme y transparente como el de origen silvestre son los factores más relevantes.

Factores ambientales: de acuerdo a Mitchell (1989), la temperatura óptima en que esta especie mejor se desarrolla durante el cultivo larvario está entre los 12 y 18° C. Por otra parte, experiencias de cultivo en laboratorio indican que las larvas de puye soportan un rango de temperatura entre los 4 y 24° C (Figura 5), sobrepasando este rango de temperatura la mortandad es de casi un 100 %. Sin embargo, se considera como temperatura óptima mantener las larvas entre 10 y 12°C, a esta temperatura las larvas sobreviven de manera óptima y crecen suficientemente, mientras que a temperaturas muy frías, aunque pueden sobrevivir, no crecen lo suficiente, tardan en reabsorber el saco y reducen el consumo de alimento.

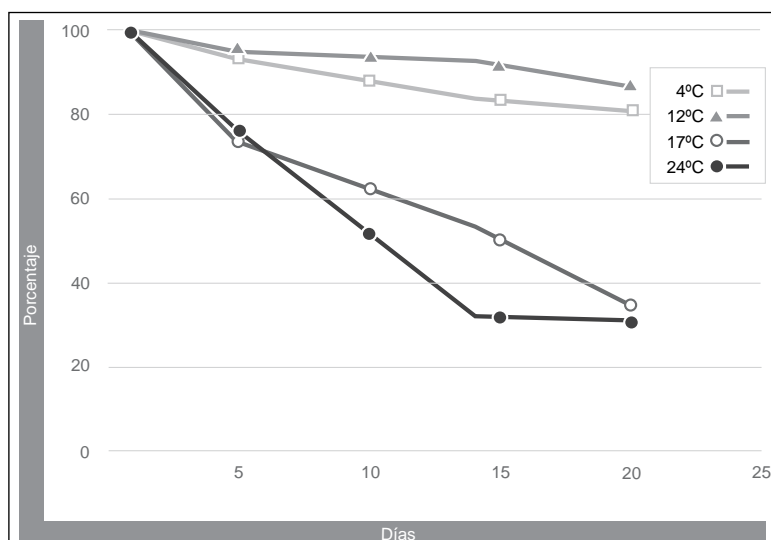


Figura 5. Sobrevivencias promedio de larvas de puye cultivadas a diferentes temperaturas en un período de 20 días.

Aunque la luminosidad óptima varía de una especie a otra, en general, en las distintas especies se utilizan fotoperíodos largos o discontinuos con intensidades luminosas no muy potentes, ya que la intensidad luminosa más conveniente no está suficientemente demostrada en la mayoría de las especies. Su utilidad puede estar asociada a la facilidad para capturar la presa, pero se ha demostrado que la intensidad alta de la luminosidad pueden provocar estrés en las larvas, lo que se traduce en cambios en la conducta, ya que las larvas se localizan en el fondo del estanque como una forma de buscar la oscuridad (Ortega, 1992).

En el caso del puye, si bien es cierto no hay estudios al respecto, la mayoría de los trabajos usan luz continua, puesto que de esta manera se facilita la captura del alimento, promoviendo el crecimiento de las larvas. Además, todo indica que esta larva nace con una capacidad visual que le permite capturar el alimento con mayor facilidad, esto por el gran tamaño de los ojos. Sin embargo, al igual que en la mayoría de los casos se sugiere poner los estanques de cultivo en un ambiente de alta luminosidad y/o claridad ambiental, de manera tal que la captura de las presas se vea favorecida por parte de las larvas.

En cuanto a la salinidad de cultivo, se ha determinado, como la más apropiada para larvas provenientes de reproductores estuarinos, la de 15‰, pudiendo cultivar las larvas hasta en 10‰ con resultados igualmente satisfactorios (Dantagnan, 2002). Finalmente, el pH más adecuado en la mayoría de los cultivos larvarios es el que tiene el agua de mar, que está entre 8,0 – 8,2 (Ortega, 1992), por lo que se estima que para puye debe ser similar, aunque no existen estudios al respecto. En cuanto al oxígeno, es conocido que la mayoría de los cultivos larvales no debe bajar de los 4 – 5 mg/L según la especie, mientras que el amoníaco y los nitritos generalmente no deben exceder de 0,01 mg/L y de 0,1 mg/L respectivamente (Ortega, 1992). Para el cultivo de larvas de peces marinos idealmente se debe utilizar agua filtrada por arena y posteriormente por filtros de cartucho hasta 1 o 5 μ , esto se aplica para el cultivo de rodaballo y dorada, sin embargo no se aplica en el caso de la lubina (Ortega, 1992). Para el caso del puye, Mitchell (1989) sólo señala que agua de mar de buena calidad es muy importante para la sobrevivencia, no existiendo información detallada sobre estos aspectos.

Manejo de las densidades y dosis de alimentación

En la mayoría de los cultivos larvarios que utilizan alimentos vivos, es de vital importancia conocer tanto las dosis de alimentación como las máximas densidades a las que las larvas pueden ser cultivadas. El manejo de ambas variables tienen repercusiones que pueden determinar muchas veces la viabilidad técnica y económica del cultivo (Planas & Cunha, 1999; Sykes *et al.*, 2003). En el caso específico del puye, si esto no se logra, el costo operacional y de infraestructura podría hacer inviable el cultivo bajo un sistema intensivo de producción (Dantagnan *et al.*, 2002). Una de las soluciones para este problema es mantener altas densidades de cultivo, y determinar la cantidad adecuada de alimento en su etapa larvaria, y así facilitar el escalamiento comercial. Sin embargo, en el cultivo de larvas de peces, uno de los mayores problemas que trae el incremento de las densidades e inadecuadas dosis de alimento, es el canibalismo. Hetch & Peinar, (1993) señala que esta conducta puede ser atribuida a factores medio ambientales como la disponibilidad de presa, la composición nutricional y energética del alimento, la densidad poblacional, el tipo de refugio disponible, la claridad del agua, intensidad de luz y frecuencia de alimentación, además de factores de jerarquía que tiene que ver con la dispersión de talla que ocurre dentro del cultivo, la que se acentúa en altas densidades, y por último, a factores genéticos. En *Galaxias maculatus* esta conducta ha sido observada anteriormente por Dantagnan *et al.*, (2002), contribuyendo a incrementar las mortalidades, atribuyendo esta conducta a una dispersión de talla y no por disponibilidad de alimento o densidad larval.

El manejo de la densidad de cultivo en todas las especies, varía según los requerimientos biológicos, ecológicos y económicos de cada especie. Las densidades iniciales en la mayoría de las larvas, van desde las 20 a 300 larvas/L (Ortega, 1992). Diversos trabajos mencionan distintas densidades iniciales de cultivo, por ejemplo 70 larvas/L en *Lota lota* logrando sobrevivencia del $69,20 \pm 8,25$ % alimentadas con una mezcla progresiva de *Brachionus calyciflorus* (10 rotíferos/ml) y nauplius de *Artemia* (4 nauplius/ml) durante 35 días (Harzevili *et al.*, 2002); la densidad inicial de cultivo para *Sparus aurata* varía entre 50 – 100 larvas/L, logrando sobrevivencias que pueden fluctuar entre un 15 – 35 % (Ortega, 1992). Para esta misma especie, Pascual & Arias (1982) encontraron que al cultivar a una densidad de hasta 100 larvas/L se pueden obtener sobrevivencias de 23,8 % al día 30. Se puede mencionar también a *Dicentrarchus labrax*, cuya densidad inicial de cultivo oscila entre 40 – 50 larvas/L con una alta sobrevivencia, elevándose a un 40 – 50 % (Ortega, 1992, Hatzithanasiou *et al.*, 2002). Una excepción la constituye el lenguado, con sobrevivencias que pueden superar el 60 – 70 % con densidades que van entre 10 y 50 larvas/L. La especie que presenta una de las más bajas sobrevivencias es el turbot, que a menudo no alcanza el 15 % (Ortega, 1992), aunque se han logrado sobrevivencias del 40% en cultivos con densidades de 16 larvas/L (Olesen & Minck, 1983). En definitiva los ejemplos son numerosos y variados, así como también sus resultados.

Estudios preliminares realizados por Bórquez *et al.*, (1996) indican que con *G. maculatus* es posible el cultivo con densidades iniciales de hasta 60 larvas por litro, al menos durante los primeros 35 días de cultivo, no encontrando diferencias significativas en crecimiento ni sobrevivencia con las densidades iniciales de 40 y 50 larvas por litro, aunque existe una tendencia a mejorar los índices de crecimiento y sobrevivencia con las densidades menores, desconociendo los resultados a estas densidades después de los 35 días. En estudios recientes, no publicados, se encontró que la sobrevivencia final obtenida en larvas de *Galaxias maculatus* alimentadas con una dosis de 2-5-10 rotíferos/ml y 5-10-15 nauplius de *Artemia*/ml, fue significativamente mayor en comparación a larvas alimentadas con la mitad de la dosis anterior, esto independiente de la densidad larval, lo que sugiere que esta especie requiere altas dosis de alimento, siendo no aconsejable bajar las dosis (Tabla I y II). Sin embargo, en el mismo experimento se encontró

que tanto el crecimiento como la sobrevivencia después que las larvas fueron sometidas a un estímulo de estrés al final del experimento, no fueron afectados por la densidad larval ni por las dosis de alimento (Tabla 1 y 2). Este estudio concluye que es posible cultivar larvas de puye hasta 120 larvas/ litro, siempre y cuando la dosis de alimento sea alta, pues una baja en la disponibilidad de alimento repercute en las sobrevivencias totales, aunque no afecta el crecimiento y tampoco la sobrevivencia al estímulo de estrés. Si bien, no hay diferencias significativas entre las densidades larvales de 80 y 120 larvas/L, este estudio concluye que desde el punto de vista económico, es más aconsejable utilizar una densidad de 80 larvas/L, debido a que la mayor mortalidad observada en la densidad de 120 larvas/L (aunque no significativa respecto a 80 larvas/litro), significa aproximadamente un 35% más en los costos de producción de rotíferos y estanques para reproductores, la razón de esto, se debe a la gran cantidad de larvas que se requieren para alcanzar la unidad mínima de producción. Sin embargo, se sugiere evaluar en un futuro dos posibles opciones: acotar aún más las densidades de cultivo que existen entre 80 y 120 larvas/L, puesto que si se encontrara una densidad intermedia que aumente, o al menos, mantenga la misma sobrevivencia final obtenida con 80 larvas/ L, los indicadores económicos podrían optimarse. La segunda opción es mejora la sobrevivencia final obtenida en la densidad de 120 larvas/L, manejando variables como la cantidad y frecuencia de alimento.

Tabla 1

Parámetros productivos obtenidos en el cultivo larvario de *G. maculatus*, alimentados con una dosis aumentada de rotíferos y nauplius de *Artemia* durante 30 días.

Dosis de alimento	Densidad (larvas/L)	Talla inicial (mm)	Talla final (mm)	Sobrevivencia final (%)	Sobrevivencia estrés (%)	Índice de crecimiento específico I.C.E. (%)
5-10-20 Rotíferos/ml, 5-10-15 nauplius de Artemia/ml	30	6,70 ± 0,5	11,96 ± 1,7	54,44 ± 0,2	50,22 ± 0,20	1,91 ± 0,5
	60	6,68 ± 0,4	11,91 ± 1,4	51,11 ± 0,1	48,00 ± 0,10	1,85 ± 0,4
	80	6,82 ± 0,4	11,33 ± 1,3	51,42 ± 0,02	49,42 ± 0,02	1,6 ± 0,4
	120	6,61 ± 0,5 s	11,24 ± 1,2	47,83 ± 0,09	45,00 ± 0,1	1,75 ± 0,4

Tabla 2

Parámetros productivos obtenidos en el cultivo larvario de *G. maculatus*, alimentados con una dosis reducida de rotíferos y nauplius de *Artemia* durante 30 días.

Dosis de alimento	Densidad (larvas/L)	Talla inicial (mm)	Talla final (mm)	Sobrevivencia final (%)	Sobrevivencia estrés (%)	Índice de crecimiento específico I.C.E. (%)
2-5-10 Rotíferos/ml, 2-5-10 nauplius de Artemia/ml	30	6,71 ±0,4	10,89 ± 1,4	17,11 ± 1,1	13,33 ± 0,10	1,59 ± 0,4
	60	6,73 ±1,1	11,54 ± 1,3	18,00 ± 1,1	16,22 ± 1,15	1,78 ± 0,5
	80	6,71 ±0,4	10,67 ± 1,5	18,42 ± 0,1	15,67 ± 0,199	1,52 ± 0,5
	120	6,73 ±0,5	9,42 ± 1,6	23,00 ± 1,0	18,89 ± 0,589	1,07 ± 0,5

Destete

Los primeros resultados de intentos de producción masiva de larvas de puye, indican que desde el punto de vista técnico es posible un cultivo intensivo, utilizando alimentos vivos como rotíferos y pasando a alimentos inertes gradualmente, sin pasar por nauplius de *Artemia*, esto, considerando al menos un desdoble entre los 20 y 30 días y una separación por tallas a los 60 días. Por otra parte, todo indica que para efectos de una mejor proyección económica de este cultivo, es necesario estudiar con precisión, el momento de transición de alimento vivo a alimento inerte, o incluso la posibilidad de comenzar la primera alimentación directamente con microdietas. Conclusiones preliminares señalan que al parecer el éxito de la larvicultura de *G. maculatus* en un sistema intensivo de cultivo, pasa por un cultivo en altas densidades, un adecuado manejo de las separaciones por tamaño en los momentos precisos y una optimización del momento del destete.

En trabajos de laboratorio, se encontró que al alimentar larvas con una microdieta elaborada en base a los requerimientos de ácidos grasos esenciales (Dantagnan, 2003) desde el primer día después de la eclosión, la sobrevivencia larval alcanzó un 34,8% a los 30 días, mientras que larvas alimentadas con una dieta mixta (50% de dieta inerte y 50% de rotíferos enriquecidos), la sobrevivencia alcanzó un 70,1% (Tabla 3) esto confirma lo señalado por Dantagnan *et al.*, (1995) en el sentido que aparentemente la larva de *G. maculatus* es capaz de consumir alimento inerte. De este estudio se concluye además, que la co-alimentación es tan buena como la alimentación con presas vivas para las larvas de *G. maculatus*, obteniéndose los peores resultados con la utilización de 100% microdieta, como ocurre con la mayoría de las especies en donde se han utilizado microdietas (Kanazawa *et al.*, 1989; Mookerji & Ramakrishna-Rao, 1991; Marte & Duray, 1991; Walford *et al.*, 1991; Koskela & Pirhonen, 1991; Tandler & Kolkovski, 1991; Takeuchi *et al.*, 2003). Sin embargo, en la mayoría de los trabajos, al igual que en este estudio, falta por dilucidar si existe un efecto de las microdietas inertes más allá de la primera alimentación, por lo que es necesario que los experimentos concluyan más tardíamente para llegar a conclusiones más certeras.

Tabla 3

Crecimientos y sobrevivencia final obtenida después de 30 días de cultivo en larvas alimentadas con tres regimenes distintos de alimentación.

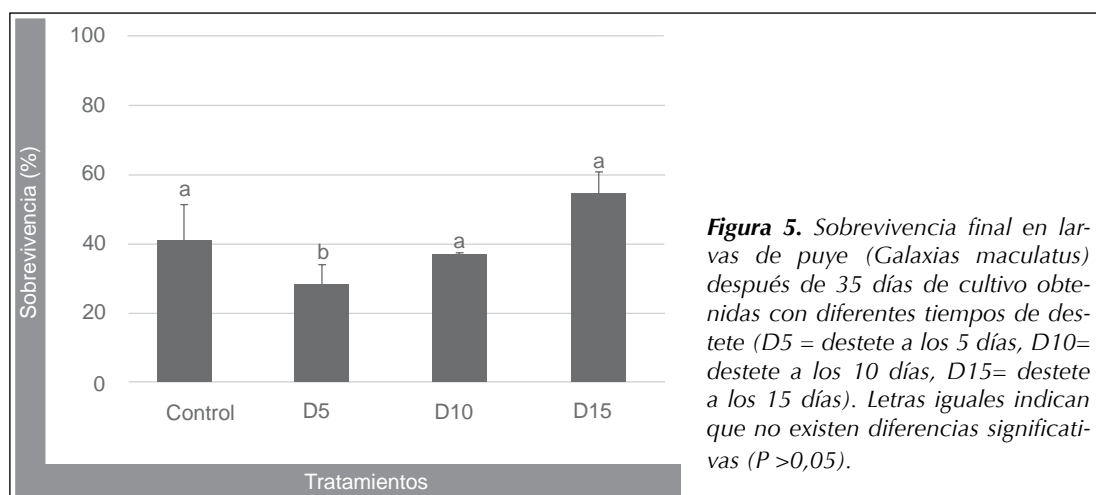
Tratamiento	Talla inicial (mm)	Talla final (mm)	Sobrevivencia (%)
Sólo rotíferos	5,86 ± 0,68	9,87 ± 1,61	50,2 ± 8,6
50% rotíferos/50% dieta inerte	5,86 ± 0,68	11,41 ± 1,37	70,1 ± 4,7
100% dieta inerte	5,86 ± 0,68	10,27 ± 1,24	34,8 ± 17,4

Experimentos que buscan adelantar las fechas de destete, en vez de realizar co alimentación desde el comienzo, indican que antes de los 10 días post eclosión no es posible destetar a larvas de *G. maculatus*, ya que se obtienen baja sobrevivencia y crecimiento, por lo que comenzar a

destetar gradualmente el día 15 post eclosión, se obtienen resultados en sobrevivencia y crecimiento comparables a la dieta control (sólo alimentos vivos hasta el día 30) (Figura 5 y 6). Por lo tanto, es primordial un destete gradual para ayudar a la larva de *Galaxias maculatus* a aceptar fácilmente el alimento inerte.

Es importante señalar que no sólo la calidad de las microdietas condiciona el consumo final por parte de las larvas, sino que es importante realizar una transición gradual del alimento vivo al alimento inerte, cuyo tiempo puede ser variable de acuerdo a la especie. Juario *et al.*, (1991) han reportado que las larvas de sea bass (*Lates calcarifer*) presentan un alto índice de canibalismo producto del no-consumo de alimento inerte al destetar abruptamente, hecho que podría quedar salvaguardado con la co-alimentación, puesto que las larvas pueden llegar a reconocer la microdieta dentro de su entorno y consumirla junto con el alimento sin problemas.

Por otro lado, varios autores señalan como las principales causas de los malos rendimientos reportados por las microdietas a los siguientes aspectos: deficiente calidad nutricional de la microdieta o en desacuerdo con los requerimientos nutricionales de las larvas (Person Le Ruyet, 1991; Koskela & Pirhunen, 1991; Tandler & Kolkovski, 1991; Devresse *et al.*, 1991), a factores propios de las larvas, tales como, la edad y su conducta frente a la microdieta (Weinhart & Rosh, 1991), desarrollo del tracto digestivo, etc. (Devresse *et al.*, 1991), y finalmente al deterioro, que ocasiona en la calidad del agua la microdieta producto de una inadecuada fabricación (Kana-zawa y Teshima, 1988; Bengston *et al.*, 1991).



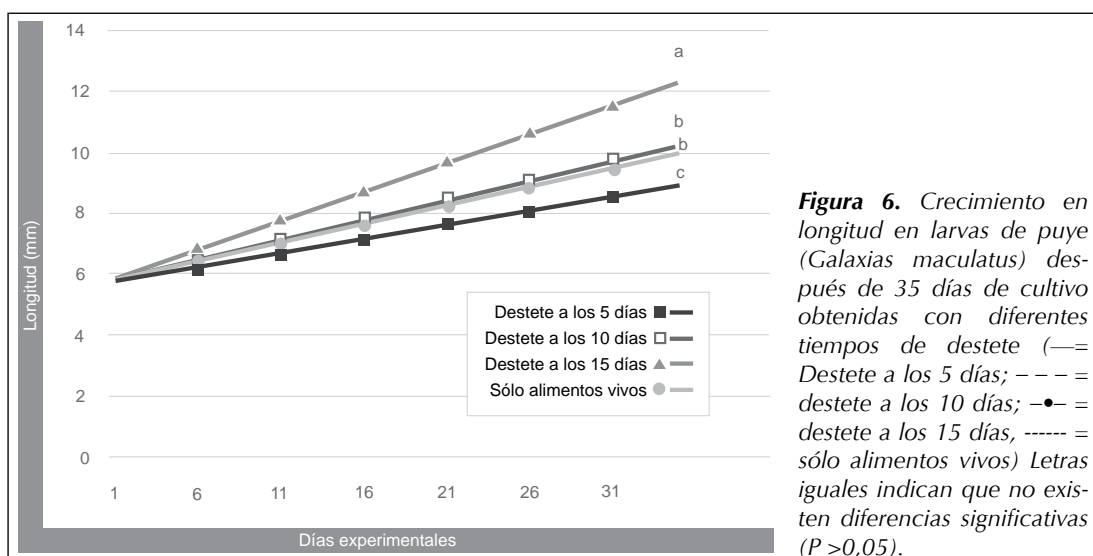


Figura 6. Crecimiento en longitud en larvas de puye (*Galaxias maculatus*) después de 35 días de cultivo obtenidas con diferentes tiempos de destete (— = Destete a los 5 días; - - - = destete a los 10 días; -•- = destete a los 15 días, = sólo alimentos vivos) Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$).

Aunque el tamaño de partícula que la tecnología puede producir es equivalente al tamaño de partícula del alimento vivo que las larvas pueden consumir, queda claro que la utilización adecuada de ambos está condicionado, no sólo por aspectos morfológicos, sino también por la diferenciación de los diferentes órganos, el desarrollo fisiológico, los requerimientos nutricionales de las larvas, el comportamiento de larva y las propiedades físicas inherentes al propio alimento. En este aspecto el uso combinado de alimentos vivos y dietas inertes (co-alimentación), desde el comienzo de la alimentación exógena, ha sido propuesto como una estrategia para aumentar el rendimiento, permitiendo entre otras cosas un temprano destete (Rosenlund *et al.*, 1997).

Requerimientos nutricionales

Uno de los aspectos más importantes en el avance de la larvicultura de peces se relaciona con los requerimientos nutricionales durante las primeras etapas, estos normalmente son enfocados hacia los ácidos grasos esenciales, considerados estos como los principales recursos energéticos y de formación de órganos y tejidos en estas etapas. Experimentos llevados a cabo en larvas *G. maculatus*, indican que los requerimientos de ácidos grasos pueden diferir, según estas sean cultivadas en agua dulce o salobre. Los estudios llevados a cabo por Dantagnan (2003), sugieren que existe un claro efecto de la salinidad en los requerimientos nutricionales de esta especie, donde larvas cultivadas en agua dulce requieren altos niveles de PUFA para alcanzar los mejores crecimientos y sobre vivencias, mientras que larvas cultivadas en aguas más salobres requieren menores niveles de PUFA. Por otro lado, se ha logrado determinar que cuando las larvas son cultivadas en agua dulce, los requerimientos de una relación EPA/DHA son más favorables a EPA que DHA, pero que cuando son cultivadas a 15‰, los requerimientos aparentemente son más favorables a DHA. Evidencias de una mayor importancia del DHA sobre el EPA en ambientes marinos han sido mencionados anteriormente (Hernández-Cruz *et al.*, 1994) concordando con lo encontrado en este trabajo. Sin embargo, evidencias de una mayor importancia del EPA sobre el DHA en agua dulce son escasas.

Problemas y propuestas

La producción masiva de huevos y larvas de puye en Chile, provenientes de poblaciones estuarinas, hasta ahora es técnicamente factible en un sistema intensivo de producción, ya sea a escalas experimentales y pilotos. Sin embargo, una de las principales dificultades para la producción de una unidad económicamente rentable de larvas y postlarvas en cautiverio (de 10 toneladas), utilizando un sistema intensivo de producción, es la cantidad de infraestructura y equipamiento que se necesita, el cual está basado en la producción simultánea de un batch de 136×10^6 larvas, las que si son cultivadas en estanques de 1 m^3 , a una densidad de 80 larvas por litro requerirían 1700 estanques de 1 m^3 cada uno y un manejo de 900 estanque de 1 m^3 para rotíferos (Barile, 2003).

Los principales problemas, que quedan pendientes por resolver antes de llegar a generar una unidad mínima de producción económicamente rentable, son los siguientes:

- El trabajo con poblaciones de agua dulce, desde la larvicultura hasta el manejo de los reproductores. Todo el trabajo hasta ahora ha sido realizado con poblaciones de origen estuarino.
- La producción en cautiverio de una postlarva (juvenil cristalino) de aspecto y características similares al encontrado en la naturaleza.
- Sincronía de los desoves y la producción de larvas.
- Auscultar una combinación de producción de larvas en sistema intensivo, con destetes tempranos o, mediante el uso de microdietas artificiales, y una producción de postlarvas en sistemas semi-intensivo de origen salobre.
- Conocer respuestas de la larvicultura en un sistema salino en tierra mediante un cultivo semi-intensivo.

BIBLIOGRAFIA

- Barile, J., Bórquez, A., Dantagnan, P., Mardones, A., Quevedo, J., Salgado, I., Valdebenito, I., Vega, R. (2003) *Antecedentes para el cultivo del puye Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842) (pises: galaxiidae). Graficasur Ltda. Chile. 144 pp.
- Bengston, B., Legar, P., Zorruelos, P. (1991) *Use of Artemia as a food source for aquaculture*. In: Brown, R., Sorgeloos, P., Trotman, C. (Eds.), *Artemia Biology*, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 255 – 285.
- Bórquez, A., Dantagnan, P., Valdebenito, I., Vega, R. (1996) *Crecimiento y sobre vivencia larval de Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842) con diferentes densidades de cultivo. Segundo Simposio Avances y Perspectivas de la Acuicultura en Chile. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura, pp. 255 – 258.
- Campos, H. (1979) *Avances en el estudio sistemático de la familia Galaxiidae* (Osteichthys: Salmoniformes). Arch. Biol. Med. Exper. 12, 107 – 118.
- Campos, H. (1970) *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842) en Chile, con especial referencia a su reproducción. Boletín del Museo de Historia Natural, Santiago - Chile 1, 5 – 20.
- Dantagnan, P. (2003) *Requerimientos de Ácidos Grasos Esenciales en Larvas de Puye (Galaxias maculatus, Jenyns, 1842): Efecto de la Salinidad*. Doctoral thesis. Las Palmas de Gran Canaria University, Spain, 187 pp.
- Dantagnan, P., Bórquez, A., Quevedo, J., Valdebenito, I. (2002) *Cultivo larvario del Puye (Galaxias maculatus) en un sistema intensivo recirculado*. Información Tecnológica 13, 15 – 21.
- Dantagnan, P., Bórquez, A., Barile, J., Valdebenito, I., Vega, R. (1995) *Effects of different diets on the survival and growth of Puye (Galaxias maculatus)*. In: Lavens, P., Jaspers E., Roelants I. (Eds.), *Larvi'95 Fish & Shellfish Larviculture Symposium*. Europ. Aqua. Soc., Special Publ. 24, 435 – 437.
- Deberse, B., Candreva, P., Léger, P., Zorruelos, P. (1991) A new artificial diet for the early weaning of seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. (Eds.), *Larvi'91 Fish and Crustacean Larviculture Symposium*, 3-7 September 1995, Gent, Belgium. Eur. Aquacult. Soc., Spec. Publ. 15, 178 – 182.
- Ferriz, R.A. (1987) *Biología del Puyen Galaxias maculatus (Jenyns) (Teleostomi, Galaxiidae) en un embalse Norpatagónico*. Ciclo de vida, ciclo gonadal y Fecundidad. Hidrobiología 5, 28 – 38.
- Figuroa, D. (1988) *Antedecentes preliminares en la reproducción de G. maculatus*. Seminario de Investigación. Ciclo básico de Biología. Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Harzevili, A., Charleroy, D., Auwerx, I., Van Slycken, J., Dhert, P., Zorruelos, P. (2002) *Larval rearing of burbot (Lota lota L.) using Brachionus calyciflorus rotifer as starter food*. J. Appl. Ichthyol. 19, 84 – 87.
- Hatziathanasiou, A., Paspatis, M., Houbart, M., Kestemont, P., Stefanakis, S., Kentouri, M., (2002) *Survival, growth and feeding in early life stages of European sea bass (Dicentrarchus labrax) intensively cultured under different stocking densities*. Aquaculture 205, 89 – 102.
- Hernández-Cruz, C., Salhi, M., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M. (1994) *Improvements in the culture of Sparus aurata L. larvae in relation to the use of antibiotics, phytoplankton and system*. Aquaculture 124, 269 – 274.

- Hecht, T., Pienaar, G. (1993) *A review of cannibalism and its Implications in Fish Larviculture*. Journal of the World Aquaculture Society 24, 246 – 261.
- Juário, J.V., Duray, M.N., Fuchs, J. (1991) *Weaning of seabass, *Lates calcarifer* B., larvae to artificial diet*. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. (Eds.), Larvi'91 Fish and Crustacean Larviculture Symposium, 3-7 September 1995, Gent, Belgium. Eur. Aquacult. Soc., Spec. Publ. 15, pp.183.
- Kanazawa, A., Koshio, S., Teshima, S. (1989) *Growth and survival of larval red sea bream *Pagrus major* and Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed microbound diets* J. World Aquacult. Soc. 20, 31 – 37.
- Kanazawa, A., Teshima, S. (1988) *Microencapsulate diet for fish larvae*. NOAA tech rep NMFS 70. Natl. Mar. Fish Serev. Seattle, WA, 57 – 62.
- Koskela, J., Pirhonen, J. (1991) *Growth and survival of first-feeding Arctic char *Salvelinus alpinus* fed a dry diet supplemented whit artemia*. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. (Eds.), Larvi'91 Fish and Crustacean Larviculture Symposium, 3-7 September 1995, Gent, Belgium. Eur. Aquacult. Soc., Spec. Publ. 15, 164 – 166.
- Marte, C.L., Duray, M.N. (1991) *Microbound larval feed as supplement to live food for milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) larvae*. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. (Eds.), Larvi '91 Fish and Crustacean Larviculture Symposium, 3-7 September 1995, Gent, Belgium. Eur. Aquacult. Soc., Spec. Publ. 15, 175 – 177.
- McDowall, R. (1987) *Evolution and importance of diadromy: The occurrence and distribution of diadromy among fishes*. American Fisheries Society Symposium, 1, 1 – 13.
- McDowall, R. (1968) *Galaxias maculatus, the New Zealand whitebait*, New Zealand Ministry of Agriculture and Fisheries. Fisheries Research Bulletin 2, 84 pp.
- Mitchell, C. (1989) *Laboratory culture of Galaxias maculatus and potential applications*. N. Zeal. J. Mar. Freshw. Res. 23, 325 – 336.
- Mookerji, N., Ramakrishna-Rao, T. (1991) *Survival and growth of rohu (*Labeo rohita*) and singhi (*Heteropneustes fossilis*) larvae fed on dry and live foods*. In: Laven, P., Sorgeloos, P., Jaspers E., Ollevier F. (Eds), Larvi'91 - Fish and Crustacean Larviculture Symposium Belgium. European Aquaculture Society Special publication 15, 148 – 150.
- Olesen, J., Minck, F. (1983) *A technical solution to the mass-culturing of larval turbot*. Aquaculture Engineering 2, 1 – 12.
- Ortega, A. (1992) *Desarrollo larvario y destete en peces cultivados*. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura Xunta de Galicia 8, 1 – 32.
- Pascual, E., Arias, A. (1982) *Diseño, construcción y funcionamiento de una planta piloto para la producción de alevines de dorada*. Informe Técnico Instituto Investigaciones Pesqueras. 52 pp.
- Person-Le Ruyet, J. (1991) *Feeding of marine fish larvae: Microdiets or live preys?*. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier F. (Eds.), Larvi'91 - Fish and Crustacean Larviculture Symp., Gent, Belgium. Europ. Aquacult. Soc., Spec. Pub., 15, 168 – 169.
- Planas, M., Cunha, I. (1999) *Larviculture of Marine Fish: Problems and Perspectives*. Aquaculture 177, 171 – 190.
- Pollard, D. (1971) *The Biology of landlocked form of the normally catadromous salmoniform fish *Galaxias maculatus* (Jenyns)*. I. Life cycle and origin. Aust. J. Mar. Freshwat. Res. 22, 91 – 123.

- Rosenlund, G., Stoss, J., Talbot, C. (1997) *Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets*. *Aquaculture* 155, 183 – 191.
- Sykes, A., Domingues, P., Loyd, M., Sommerfield, A., Andrade, J. (2003) *The influence of culture density and enriched environments on the first stage culture of young cuttlefish, Sepia officinalis (Linnaeus, 1758)*. *Aquaculture International* 11, 531 – 544.
- Takeuchi, T., Tatsumi, S., Masuoka, S., Hirose, K., Uzu, H., Jin, J., Fujimoto, C., Ohta, K., Lee, K., Ryoo, J., Choi, S. (2003) *Split flow and bypass flow systems for monolithic capillary columns in liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A* 1021, 55 – 59.
- Tandler, A., Kolkovski, S. (1991) *Rates of ingestion and digestibility as limiting factors in the successful use of microdiets in Sparus aurata larval rearing*. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier F. (Eds.), *Larvi'91 - Fish and Crustacean Larviculture Symp.*, Gent, Belgium. Europ. Aquacult. Soc., Spec. Pub., 15, 169 – 171.
- Walford, J., Lim, T., Lam, T. (1991) *Replacing live food with microencapsulated diets in the rearing of seabass (Lates calcarifer) larvae: Do the larvae ingest and digest protein-membrane microcapsules?* *Aquaculture* 92, 225 – 235.
- Weinhart, G., Rosch, R. (1991) *Food intake of larvae of Coregonus lavaretus L. Do they really ingest less dry diet than Artemia nauplii?* In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier F. (Eds.), *Larvi'91 -Fish and Crustacean Larviculture Symp.*, Gent, Belgium. Europ. Aquacult. Soc., Spec. Pub., 15: (abstract) 144p.

ALGUNOS AVANCES EN EL ESTUDIO DEL CULTIVO LARVARIO DEL LENGUADO CHILENO *PARALICHTHYS ADSPERSUS*

A. Silva, Y. Orellana, N. Piaget, A. Vega, P. Toledo
Departamento de Acuicultura, Casilla 117,
Universidad Católica del Norte Coquimbo, Chile.
Email: asilva@ucn.cl

Introducción

Entre los peces marinos nativos de Chile, el lenguado *Paralichthys adspersus*, es una de las especies que se destaca por sus interesantes perspectivas de cultivo. Sus características, desarrollo y factibilidad de engorde han sido descritas por autores como Zúñiga & Acuña (1992), Silva & Vélez (1998) y Silva *et al.*, (2001). La experiencia de su cultivo larval coincide con estudios realizados en sus congéneres, en relación a que la etapa de mayor mortalidad sigue siendo la primera etapa de desarrollo larval Daniels *et al.*, (1996); Cabrera & Hur (2001). Dicho fenómeno, que ha sido ya señalado anteriormente para otros peces planos de cultivo comercial, como el turbot (*Scophthalmus maximus*) y el halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), ha sido relacionado con diferentes aspectos, entre los que podemos nombrar deficiencias nutricionales de las dietas vivas, alimentación, condiciones microbiológicas y factores físicos del cultivo, entre otros Gatesoupe (1990); Tyler & Ireland (1994); Izquierdo (1996); Rainuzzo *et al.*, (1997); Olsen *et al.*, (1999); Bengtson *et al.*, (2000); Downing & Litvak (2001).

Por lo anteriormente expuesto, los estudios realizados sobre estos y otros parámetros que afecten a la primera etapa del cultivo larval de lenguado son de enorme importancia para optimizar los resultados finales de esta etapa. El presente trabajo entrega antecedentes preliminares sobre dos experiencias realizadas en la etapa de cultivo larval de lenguado *P. adspersus* tendientes a medir el efecto de la temperatura sobre el consumo de alimento y su desarrollo, y el efecto del uso de inmunoestimulantes en la supervivencia larval de la especie.

Efecto de la temperatura en el desarrollo y consumo de alimento

La temperatura ha sido considerada desde siempre como uno de los factores más importantes que afectan el desarrollo y cultivo de las larvas de peces marinos (Brett, 1979). Su influencia en factores como crecimiento, desarrollo larval, supervivencia y consumo de alimento en otras especies ha sido ampliamente estudiada Lawrence (1975); Brett (1979); Johns & Howell (1980); Elliott (1982); Bry *et al.*, (1991); Mihelakakis & Yoshimatsu (1998); Ottesen & Bolla (1998); Tidwell *et al.*, (1999) pudiéndose concluir en general, y a excepción de la supervivencia, que el aumento de la temperatura, hasta un máximo a determinar para cada especie, acelera los diferentes parámetros de desarrollo y el consumo de alimento en las larvas. En Chile no existen reportes que confirmen esto en el lenguado *P. adspersus* así, el conocer los rangos óptimos de temperatura necesarios para mejorar crecimiento y desarrollo en sus primeras etapas, así como conocer su efecto sobre el consumo de alimento es una información relevante para optimizar la técnica y eficiencia de los cultivos.

Las larvas utilizadas en esta experiencia fueron obtenidas de un desove espontáneo de reproductores de *Paralichthys adspersus* del Laboratorio de Cultivo de Peces de la Universidad Católica del Norte, cuyos huevos fueron incubados a temperatura ambiente ($15 \pm 2^\circ\text{C}$) en tanques cónicos de 500 lt con agua de mar filtrada ($1\mu\text{m}$), esterilizada por UV y con un recambio del 25% del agua diariamente.

La experiencia se inicia con 700 larvas de 10 días de edad, $5,5 \pm 0,18$ mm de longitud total y en estado de preflexión temprana, las que fueron divididas en 3 tratamientos de temperatura de 20°C , 18°C y 16°C , y puestas en 9 recipientes negros de forma piramidal con capacidad de 5 lt cada uno a una densidad de 15 larvas/l. Los recipientes fueron mantenidos con aireación suave, luz indirecta y un flujo constante (90 ml/min) de agua de mar (34‰) filtrada ($1\mu\text{m}$) y esterilizada por UV, proveniente de tres estanques de almacenamiento de 250 lt cubiertos e implementados con calefactores previamente graduados para mantener la temperatura constante del agua en los niveles requeridos para cada tratamiento.

Durante la experiencia las larvas fueron alimentadas dos veces al día (9:00 y 18:00 hrs.) con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) cultivados con una mezcla de microalga (*Isochrysis galbana*) y levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y enriquecidos según protocolo comercial con DHA SELCO (INVE Aquaculture Belgium), tratando de mantener una concentración constante mínima de 10 rot/ml por recipiente. Diariamente se procedió a monitorear temperatura (9:00; 13:00 y 18:00 hrs.), cantidad de rotíferos presentes y eliminar las larvas muertas para mantener limpio el sistema.

Al final de la experiencia, cuya duración fue de 15 días, se determinó el tamaño final ($\pm 0,01$ mm) y estado de desarrollo larval utilizando la clasificación propuesta por Zúñiga & Acuña (1992) para la especie, y una lupa estereoscópica Nikon SMZ -10 provista de un ocular micrométrico.

La determinación del consumo relativo de rotíferos/larva se realizó previamente en forma indirecta, con larvas de 15 días de edad (6,5 mm Lt), utilizando la misma conformación de los tratamientos descritos, mediante el control del cambio en la densidad de rotíferos en cada uno de los recipientes a intervalos de 2,5 hrs. y durante 15 hrs. de observación continua (Okauchi *et al.*, 1980). Para la toma de muestras se diseñó una placa guía de muestreo con el objeto de tomar siempre las muestras en los mismos lugares de cada recipiente. El recuento de los rotíferos se hizo tomando para cada recipiente 9 muestras de 1 ml con una pipeta de 1 ml, cada una de las cuales fue puesta en una placa petri cuadrada a la que se le agregó una gota de Lugol para inmovilizar los rotíferos y facilitar su conteo bajo la lupa.

Adicionalmente se agregó y controló de igual manera y en forma paralela, un set de recipientes en duplicado mantenidos en las mismas condiciones de temperaturas y densidad de rotíferos descritas anteriormente, pero sin larvas, con el objeto de descartar posibles fluctuaciones naturales significativas producidas en la densidad de los rotíferos al interior de los recipientes durante las 15 horas de control.

El número relativo de rotíferos consumido por larva/día fue determinado utilizando la siguiente relación:

$$\text{Consumo relativo} = \frac{\text{N}^\circ \text{ rotif. inicial} - \text{N}^\circ \text{ rotif. final (rotíferos/larva/día)}}{\text{N}^\circ \text{ larvas}}$$

Además se estima la tasa relativa de alimentación/larva/día como [consumo x peso rotífero / peso larva] x 100 (Kitajima & Hayashida, 1984). El peso promedio del rotífero se estimó en $3.0 \pm 0.15 \mu\text{g}$ y el de la larva en $3,0 \pm 0,8 \text{ mg}$ (peso húmedo).

Los datos de longitud total al final de la experiencia para cada tratamiento fueron expresados como promedio \pm SD, previo test de normalidad y fueron comparados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un nivel de confianza de 95%. En caso de significancia entre tratamientos se aplicó una prueba de comparación múltiple de Tukey's ($P < 0.05$). Transformaciones de logaritmo natural (datos de longitud) fueron realizadas antes del análisis cuando las varianzas no fueron homogéneas.

Al observar los datos obtenidos, es posible concluir que la tasa de crecimiento de lenguado, se incrementa proporcional y significativamente ($P < 0,05$) con el aumento de la temperatura, desde 0,9 %/día (6,3 mm) a 16°C, hasta 3,1 %/día (8,7 mm) a los 20°C dentro de los 15 días de cultivo larval (Figura 1).

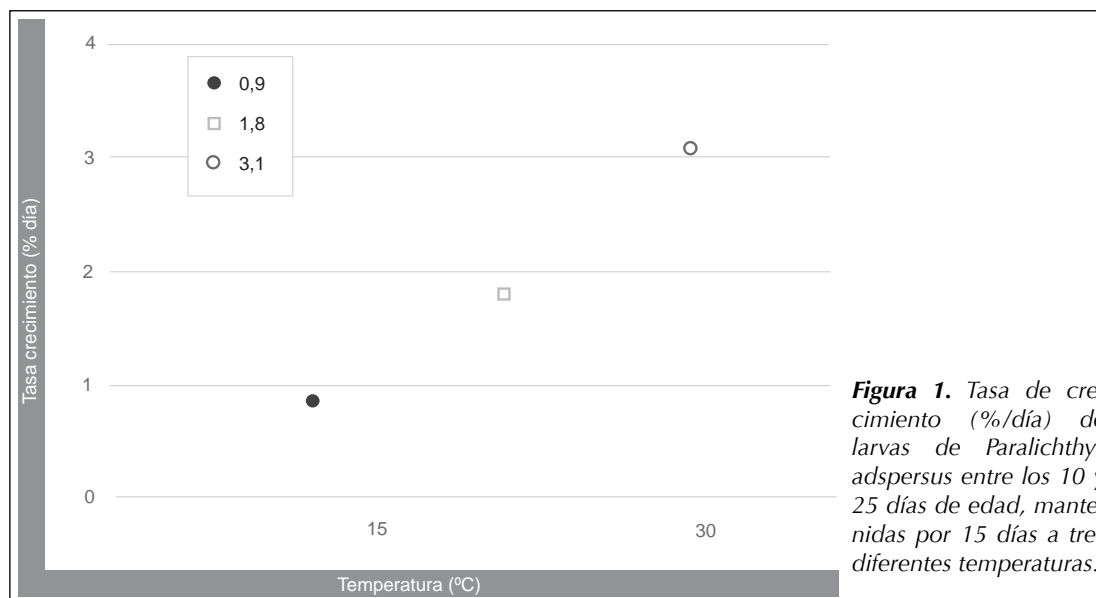


Figura 1. Tasa de crecimiento (%/día) de larvas de *Paralichthys adspersus* entre los 10 y 25 días de edad, mantenidas por 15 días a tres diferentes temperaturas.

Igualmente en la Figura 2 se observa una mayor velocidad de desarrollo de las larvas en el tiempo con el incremento de la temperatura, lo que demuestra la sensibilidad de la especie a los cambios de temperatura. Así a 16°C, el 72% de las larvas está en estado de pre-flexión tardía y sólo un 28% ha avanzado al estado de flexión. A 18°C se nota un evidente avance en el estado de desarrollo de las larvas, el que se refleja en la desaparición del estado de pre-flexión tardía, el aumento al 89,5% de las larvas en flexión y la aparición de un 10,5% de las larvas en el estado de post-flexión temprana. A 20°C y siguiendo la misma tendencia, se pudo observar que el 33,7% de las larvas se encontraba en metamorfosis temprana y el 66,3% se encuentra en estado de post-flexión temprana.

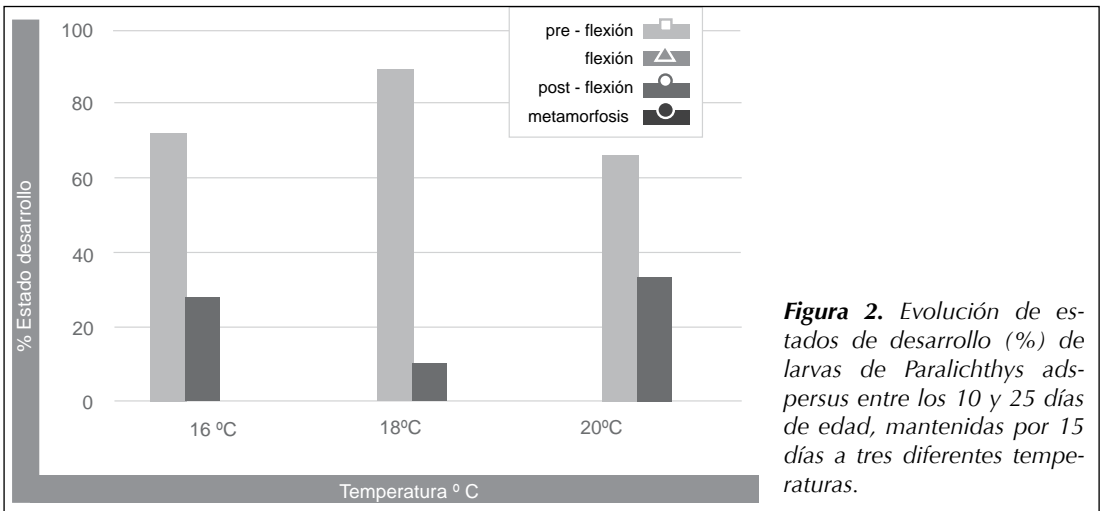


Figura 2. Evolución de estados de desarrollo (%) de larvas de *Paralichthys adspersus* entre los 10 y 25 días de edad, mantenidas por 15 días a tres diferentes temperaturas.

Lo anterior coincide con lo reportado también para otros peces planos como *Pseudopleuronectes americanus* (Laurence, 1975), *Paralichthys dentatus* (Johns et al., 1981), *Paralichthys californicus* (Gadomski et al., 1990) y *Scophthalmus maximus* (Person-Le Ruyet, 1989), concluyéndose que ello sería consecuencia en parte de un mayor consumo de alimento por aumento del metabolismo basal de las larvas a mayores temperaturas, lo que resultaría en mayores crecimientos y desarrollo de las mismas. El hecho que en la presente experiencia las larvas de lenguado mantenidas en 20°C muestren un mayor consumo de alimento que las mantenidas a 18°C y 16°C, hace pensar que efectivamente esta sería una de las razones de provocar dichas diferencias entre los tratamientos.

En efecto, en la Figura 3 se muestra la fluctuación natural y por predación de rotíferos (rotíferos/ml) calculado para cada tratamiento durante las 15 hrs. de control. La fluctuación natural de rotíferos en el tanque sin larvas no fue significativa variando entre 9,7 y 10,3 rotíferos/ml. En cambio, los tanques con larvas muestran una mayor disminución de rotíferos a 20°C (11 a 1 rotífero/ml) que a 16°C (10 a 3 rotíferos/ml). Todos los tratamientos necesitaron aproximadamente 10 hrs. para que el 50% de los rotíferos fueran consumidos.

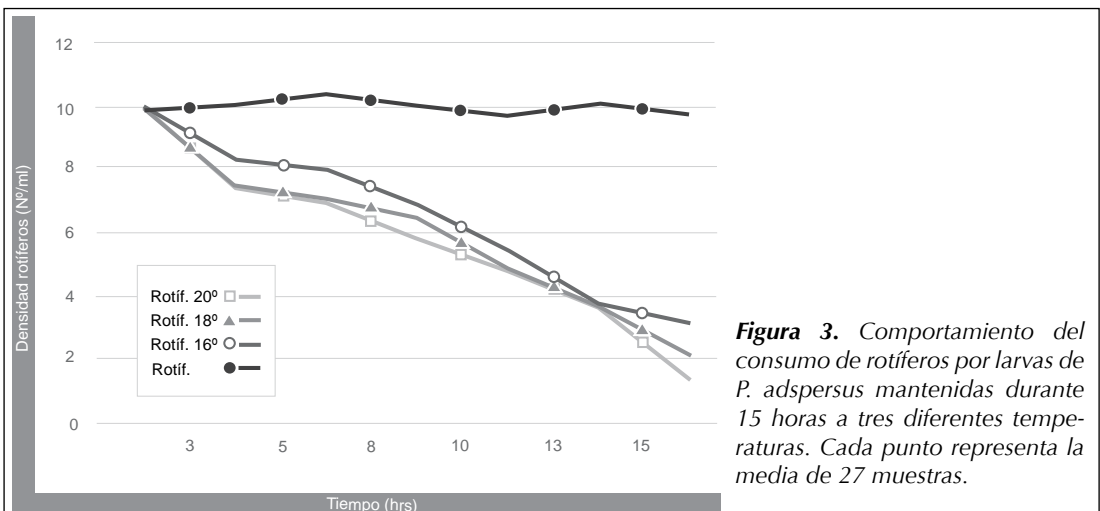


Figura 3. Comportamiento del consumo de rotíferos por larvas de *P. adspersus* mantenidas durante 15 horas a tres diferentes temperaturas. Cada punto representa la media de 27 muestras.

Igualmente el consumo relativo de rotíferos por larva/día incrementa significativamente con la temperatura desde 460 rotíferos/larva/día a 16°C hasta 620 rotíferos/larva/día a 20°C, lo que equivale a su vez a tasas de alimentación del 46% y 62% de su biomasa/día. No se presentaron diferencias significativas de consumo ni tasas de alimentación entre las larvas mantenidas a 16°C y 18°C.

Al observar el comportamiento del consumo de rotíferos por larva/hora durante las primeras 15 hrs., es posible notar que este no es parejo para ninguna de las temperaturas testeadas, existiendo un consumo creciente durante las primeras 2,5 hrs. de iniciada la alimentación el que luego decrece, para tender a recuperarse a partir de las 5 hrs. siguientes y hasta las 10–12 hrs. en que el 50% de los rotíferos existentes han sido consumidos en las tres temperaturas (Figura 4).

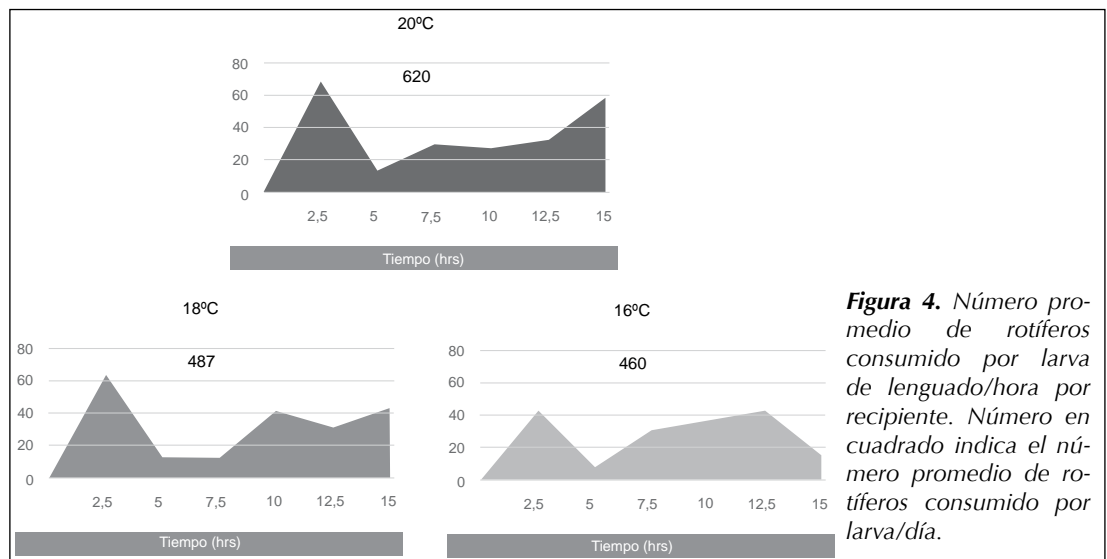


Figura 4. Número promedio de rotíferos consumido por larva de lenguado/hora por recipiente. Número en cuadrado indica el número promedio de rotíferos consumido por larva/día.

El consumo y la tasa de alimentación de rotíferos y artemias ha sido estudiada para varias especies Yasunaga (1971); Kitajima *et al.*, (1976); Kitajima & Hayashida (1984); Corcobado Oñate *et al.*, (1991); Reitan *et al.*, (1994); Yoshimatsu & Kitajima (1996) determinándose que el consumo se encuentra entre 130 y 780 rotíferos larva día y la tasa de alimentación entre 40% a 73% de la biomasa húmeda día de acuerdo a la edad, alimento utilizado y especie. En nuestra experiencia el consumo depende de la temperatura, estimándose un consumo relativo promedio entre 460 y 620 rotíferos/día para larvas de *P. adspersus* de 15 días de edad mantenidas a 16°C y 20°C respectivamente, rango mayor que el reportado por Yasunaga (1971) para *Paralichthys olivaceus* (100-300 rotíferos/larva/día) y similar al reportado por Kitajima *et al.*, (1976) para larvas de red sea bream (*Pagrus major*) de la misma edad (580-780 rotíferos/larva /día).

Los resultados obtenidos confirman la aceleración del crecimiento y de la metamorfosis de la larva de lenguado *P. adspersus* mantenida a 20°C, respecto a temperaturas de 16° y 18°C, lo que permitiría acortar aproximadamente en 20 días la fase larval y aumentar así el rendimiento del cultivo. El comportamiento del consumo/día observado en larvas de *P. adspersus* de 15 días de edad, nos indica que bajo las condiciones de la experiencia, el consumo no es constante sino variable, lo que estaría relacionado más con el tiempo que las larvas demoran en digerir las mismas que con la densidad de presas existentes. En este sentido se reafirma la necesidad de repartir la cantidad de alimento calculada para el día en varias raciones separadas aproximadamente tres a cuatro horas cada una.

Efecto de β -Glucanos y Manano-oligosacáridos en el cultivo larval

La mortalidad en estados tempranos de desarrollo de peces esta recurrentemente asociada a enfermedades producidas por infecciones de bacterias oportunistas y al estrés causado por la manipulación propia de las actividades en un cultivo (Skajermo & Vadstein, 1999; Ellis, 2001). Así por ejemplo, en el cultivo de *Paralichthys adspersus*, la vibriosis se manifiesta cuando los peces presentan una inmunodepresión producida por estrés (Miranda & Rojas, 1996). Otros autores como Sakai (1999) y Raa (2000) indican que la aplicación de compuestos profilácticos como los β -glucanos y manano-oligosacáridos (β G MOS) durante las etapas tempranas de desarrollo larval mejoran la salud de los peces, estimulando principalmente al sistema inmune no-específico para crear una defensa contra ataques virales, bacteriales y fúngicos.

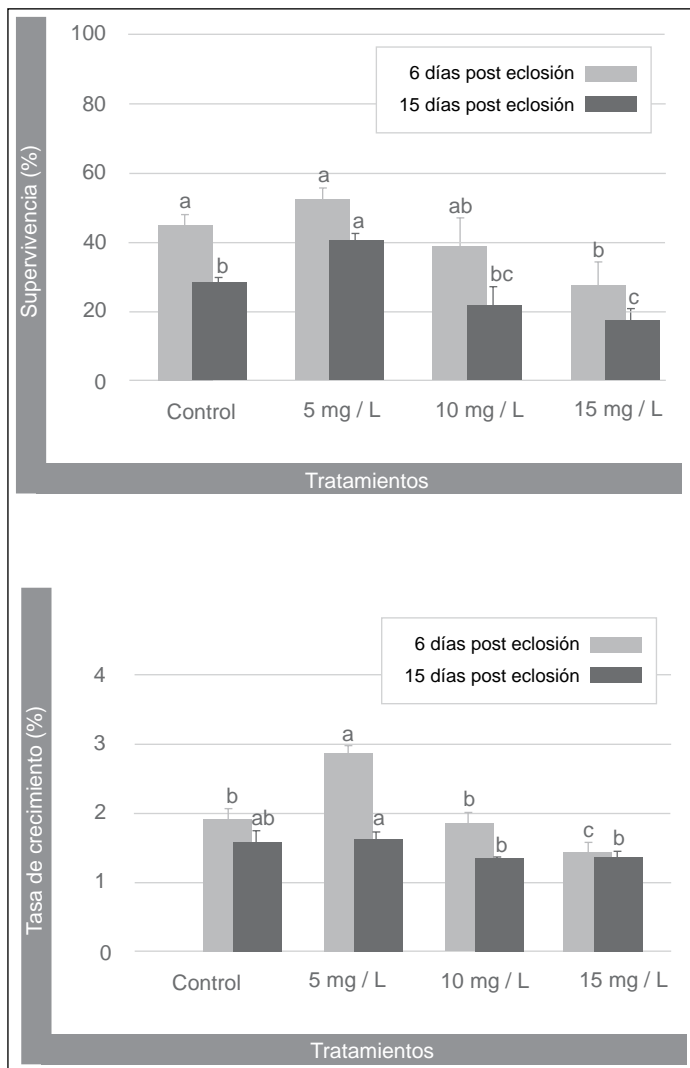
En este contexto es posible hipotetizar que la adición de β G MOS a los cultivos larvales de lenguado chileno (*Paralichthys adspersus*) podría también disminuir la mortalidad de individuos durante la primera alimentación con presas vivas. Por esta razón, en el presente trabajo se planteó como objetivo el evaluar el efecto de distintas concentraciones de β G MOS en la supervivencia y crecimiento larval de *P. adspersus*, así como la activación del sistema inmune no-específico en el intestino mediante la manifestación de monocitos o células precursoras de macrófagos en el intestino de las larvas.

Para probar esta hipótesis, se realizaron dos experiencias que abarcaron los primeros 25 días de cultivo larval de la especie: en la experiencia 1, se utilizaron larvas de 5 días de edad ($4,0 \pm 0,3$ mm de longitud estándar) y en la experiencia 2 larvas de 15 días de edad ($5,4 \pm 0,2$ mm de longitud estándar). Las larvas fueron alimentadas durante toda la experiencia solamente con rotíferos *Brachionus plicatilis* (5-10 rotíferos/ml) cultivados con microalga (*Isochrysis sp.*) y levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), enriquecidos con una mezcla de microalgas. Cada experiencia duró 10 días. En ambos casos, las larvas fueron expuestas durante los 5 primeros días de cada experiencia a tratamientos con concentraciones de 5 mg/L, 10 mg/L y 15 mg/L de β G MOS, a través del método de inmersión (Tytler & Blaxter, 1988), manteniendo un tratamiento control sin aplicación del compuesto. El compuesto β -glucano y manano-oligosacárido utilizado y denominado DP MOS β G fue provisto por la empresa DESPRO S.A. (Desarrollo de Proteínas de Chile S.A.) y es utilizado como complemento alimenticio en dietas de peces. Este compuesto es una asociación de β -Glucanos (46%), Manano-oligosacáridos (53%) y contenido citoplasmático (1%).

Los tratamientos se distribuyeron de manera aleatoria en 12 tanques cilíndricos negros con capacidad de 30 L a una densidad de 30 larvas/L. Para determinar el efecto de los β G MOS en las larvas, se determinaron el porcentaje de supervivencia, la tasa de crecimiento y la manifestación de monocitos o células precursoras de macrófagos en el intestino de las larvas. Durante el día 2, 4, 6, 8 y 10 de experimentación, 30 larvas fueron extraídas de los tanques experimentales con un sifón para su medición. Se determinó la longitud estándar (Lst) medida desde el punto anterior extremo de la mandíbula superior, hasta el punto posterior extremo de la notocorda utilizando un proyector de perfiles (Nikkon V12). Para cada replica de cada tratamiento, se calculó la tasa de crecimiento específica (SGR), usando la ecuación $SGR = \frac{(\ln Lst_2 - \ln Lst_1)}{(T_2 - T_1)} * 100$, donde Lst_1 es la longitud estándar (mm) a un tiempo T_1 (Downing & Litvak, 1999). El porcentaje de supervivencia (S%) fue calculada para cada tratamiento usando la ecuación $S = (N_f/N_i) * 100$, donde N_i y N_f es el número inicial y final de larvas, respectivamente (Downing & Litvak, 1999). Las larvas de cada muestreo fueron excluidas de los análisis de supervivencia. Después de cada toma de las muestras se disminuyó proporcionalmente el volumen de agua de cada tanque para mantener la densidad constante (30 larvas/litro).

Todas las larvas muestreadas fueron preservadas en formalina diluida en agua de mar al 10% en frascos de plástico negro rotulados, para realizar posteriormente el análisis histológico de acuerdo a lo descrito por Muñeton-Gómez *et al.*, (2000). Todos los cortes realizados fueron revisados bajo microscopio de luz con un aumento máximo de 100X, usando aceite de inmersión, para evaluar la presencia de células que caracterizan el sistema inmune no específico en el intestino de las larvas.

Para el tratamiento estadístico, tanto los datos de supervivencia (S%) como los de crecimiento (SGR) fueron evaluados usando Análisis de Varianza (ANDEVA). Los datos porcentuales fueron previamente transformados al arcoseno de la raíz cuadrada (Sokal & Rohlf, 1981). Cuando el ANDEVA mostró diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó la prueba a *posteriori* de Tukey para detectar diferencias entre pares de grupos. El efecto de la aplicación de β G MOS en el incremento temporal de la longitud estándar fue evaluado con un Análisis de Covarianza (ANCOVA). Antes de realizar ANDEVA y ANCOVA se comprobó la normalidad de los datos, los datos fuera de rango y la homocedasticidad de las varianzas a través de la prueba de Barlett, la prueba de Lilliefort y comprobación visual (Sokal & Rohlf, 1981) usando el software computacional SYSTAT 8.0®.



Los resultados indican que la aplicación de 5 mg/L de β G MOS aumenta significativamente el crecimiento en larvas de *P. adspersus* de 5 y 15 días de cultivo larval, y la supervivencia sólo en larvas de 15 días de cultivo, mientras que concentraciones de 15 mg/L de β G MOS tuvieron un efecto supresor de estos parámetros poblacionales en ambas etapas (Figura 5). Esto último es coincidente con lo reportado por Mulero *et al.*, (1998) para *Sparus aurata*, el que indica que un exceso de compuestos profilácticos aplicados a la especie, suprimió la respuesta inmune no específica con consecuencias negativas para la supervivencia y el desarrollo de los individuos. Así proporciones por sobre los 10 mg/lit de β G MOS podrían también estar interfiriendo en el desarrollo óptimo o posterior del sistema inmune de las larvas de lenguado chileno.

Figura 5. Supervivencia y tasa de crecimiento de larvas de *P. adspersus* de 5 y 15 días de edad tratadas con diferentes concentraciones de β -glucanos y manano-oligosacáridos.

En los análisis de los tejidos del epitelio intestinal se detectaron células monocíticas claramente diferenciadas, caracterizadas por núcleos circulares y de mediano tamaño (Esteban *et al.*, 1994). Estas se presentan con una mayor frecuencia relativa en los grupos tratados con β G MOS al día 10 de experimentación, en comparación con el grupo control. La presencia de monocitos en los tejidos intestinales, junto con mayores crecimientos y supervivencias de los individuos tratados con β G MOS sugieren un efecto positivo del inmunoestimulante en la salud de las larvas de *P. adspersus*.

Esta experiencia es la primera en detectar que la aplicación de β glucano y manano-oligosacáridos diluido en el agua de cultivo por 5 días aumenta significativamente el porcentaje de supervivencia en contraste con una situación control, o en comparación con otros estudios previamente realizados en larvas de *P. adspersus* (Silva & Flores, 1988; Silva, 2000, 2001). El grado de protección obtenido por la administración de este compuesto está probablemente relacionado con la estimulación de componentes no específicos del sistema inmune que tienen actividad antibacteriana, como lo evidencia la presencia de células precursoras de macrófagos. Otros estudios realizados en peces planos, han sugerido que la administración de compuestos conteniendo β glucanos mejora la resistencia contra bacterias oportunistas (Strand & Dalmo, 1997; Sakai, 1999; Dalmo *et al.*, 2000; Bergh *et al.*, 2001; Bricknell & Dalmo, 2005).

En resumen y considerando los resultados preliminares de ambas experiencias, se considera que tanto el aumento de la temperatura de cultivo como el aporte de β G MOS, deberían ser considerados como nuevas herramientas para la disminución del período larval y aumento de la supervivencia en la planificación y desarrollo de un esquema de manejo para la producción intensiva de juveniles de *P. adspersus*, particularmente durante la primera alimentación de las larvas con presas vivas.

BIBLIOGRAFIA

- Bengtson, D., Simlick, T., Binette, E., Lovett, R., Alves, D., Schreiber A., Specker, J., (2000) Survival of larval summer flounder *Paralichthys dentatus* on formulated diets and failure of thyroid hormone treatment to improve performance. *Aquacult. Nutr.* 6, 193 – 198.
- Bergh, Ø., Nilsen, F., Samuelsen, O. (2001) Diseases, prophylaxis and treatment of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: a review. *Diseases of Aquatic Organisms* 48, 57 – 74.
- Brett, J. R. (1979) Environmental factors and growth. In: Hoar, W.S., Randall, D. J., Brett J.R. (Eds.), *Fish Physiology Vol. VIII Bioenergetics and Growth*. Academic Press, New York, pp. 599 – 675.
- Bricknell I., Dalmo R. (2005) The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology* 19, 457 – 472.
- Bry, C., Hollebecq, M., Ginot, V., Israel, G., Manelphe, J. (1991) Growth patterns of pike (*Esox lucius* L.) larvae and juveniles in small ponds under various natural temperature regimes. *Aquaculture* 97, 155 – 168.
- Cabrera, T., Hur, S. (2001) The nutritional value of live foods on the larval growth and survival of japanese flounder, *Paralichthys olivaceos*. *Journal of Applied Aquaculture* 11, 35 – 53.
- Corcobado, F., Coo, A., Arnaiz, R., Amoedo F., Rua, N. (1991) Daily ration of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, in intensive culture. In: Lavens P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier F. (Eds.), *Larvi'91 – Fish and Crustacean Larviculture Symposium*. Special Publication 15. European Aquaculture Society, pp. 119 – 121.
- Daniels, H., Berlinsky, D., Hodson, R., Sullivan C. (1996) Effects of stocking density, salinity, and light intensity on growth and survival of southern flounder *Paralichthys lethostigma* larvae. *Journal of the World aquaculture society* 27, 153 – 159 pp.
- Dalmo, R., Kjerstad, A., Arnesen, S., Tobias, P., Bogwald, J. (2000) Bath exposure of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) yolk sac larvae to bacterial lipopolysaccharide (LPS): Absorption and distribution of the LPS and effect on fish survival. *Fish and Shellfish Immunology* 10, 107 – 128.
- Downing, G. and M.K. Litvak. (1999) The effect of photoperiod, tank colour and light intensity on growth of larval haddock. *Aquaculture International* 7: 369–382.
- Downing, G., Litvak, M. (2001) The effect of light intensity and spectrum on the incidence of first feeding by larval haddock. *J. Fish Biol.* 59, 1566 – 1578.
- Elliott, J.M. (1982) The effects of temperature and ration size on the growth and energetics of salmonid fish in captivity. *Comparative Biochemistry and Physiology* 73, 81 – 92.
- Ellis E. (2001) Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 25, 827 – 839.
- Esteban, M., Muñóz, J., López-Ruiz, A., Mulero, V., Meseguer, J. (1994) Respuesta inespecífica en peces frente a las infecciones bacterianas. Inflamación, Fagocitosis. En: Zamora S., Aguilheiro, B., García Hernández, M. (Eds.), *Aulas del Mar*, Universidad de Murcia.
- Gadomski, D., Caddell, S., Abbott, L., Caro, T. (1990) Growth and development of larval and juvenile california halibut *Paralichthys californicus*, reared in the laboratory. *Fish Bulletin* 174, 85 – 97.

- Gatesoupe, F. (1990) The continuous feeding of turbot larvae and control of the bacterial environment of rotifers. *Aquaculture* 89, 139 – 148.
- Izquierdo, M.I. (1996) Essential fatty acid requirements of culture marine fish larvae. In: Gajardo, G., Coutteau, P. (Eds.), *Improvement of the commercial production of marine aquaculture species. Proceeding of a workshop on fish and mollusc*. Impresora Creces, Santiago, Chile, pp. 31 – 44.
- Johns, D., Howell, W. (1980) Yolk utilization in summer flounder (*Paralichthys dentatus*) embryos and larvae reared at two temperatures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2, 1 – 8.
- Johns, D., Howell, W., Klein-Macphee, G. (1981) Yolk utilization and growth to yolk sac absorption in summer flounder (*Paralichthys dentatus*) larvae at constant and cyclic temperatures. *Mar. Biol.* 63, 301 – 308.
- Kitajima, C., Fukusho, K., Iwamoto, H., Yamamoto, H. (1976) Amount of rotifer, *Brachionus plicatilis*, consumed by red sea bream larvae, *Pagrus major*. *Bull. Nagasaki Pref. Inst. Fish* 2, 105 – 112.
- Kitajima, C., Hayashida, G. (1984) Number of rotifer, *Brachionus plicatilis*, and *Artemia salina* nauplius consumed daily by a larva and juvenile of puffer, *Takifugu rubripes*. *Bulletin of Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries* 10, 41 – 48.
- Laurence, G. (1975) Laboratory growth and metabolism of the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* from hatching through metamorphosis at three temperatures. *Mar. Biol.* 32, 223 – 229.
- Mihelakakis, A., Yoshimatsu, T. (1998) Effects of salinity and temperature on incubation period, hatching rate and morphogenesis of the red sea bream. *Aquaculture International* 6, 171 – 177.
- Miranda, C., Rojas, R. (1996) Vibriosis en el lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindachner 1867) en cautiverio. *Revista de Biología Marina. Valp.* 31, 1 – 9.
- Muñetón, M., Villarejo, S., García G. (2000) *Manual de técnicas histológicas aplicadas a organismos marinos*. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. CICIMAR: 81 pp.
- Mulero, V., Esteban, M., Muñoz, J., Meseguer, J. (1998) Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 8, 49 – 62.
- Okauchi, M., Oshiro, T., Kitamura, S., Tsujigado, A., Fukusho, K. (1980) Number of rotifer, *Brachionus plicatilis*, consumed daily by a larva and juvenile of porgy *Acanthopagrus schlegeli*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture* 1, 39 – 45.
- Olsen, A., Attramadal, Y., Reitan, K., Olsen, Y. (1999) Food selection and digestion characteristics of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae fed cultivated prey organisms. *Aquaculture* 181, 293 – 310.
- Ottesen, O., Bolla, S. (1998) Combined effects of temperature and salinity on development and survival of Atlantic halibut larvae. *Aquaculture International* 6, 103 – 120.
- Person-Le J. (1989) The hatchery rearing of turbot larvae (*Scophthalmus maximus*). In: Aguirre P., Cortés, F., Fuentes, J., Gurriarán, E., Labarta, U., Mora, J., Camacho, A., Pazó X., País X. (Eds.), *Seminario sobre Tecnología do Cultivo do Rodaballo. Cuadernos da Área de Ciencias Mariñas* 3. Seminario de Estudos Galegos. A Coruña, España, pp. 57 – 87.

- Raa, J. (2000) The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.
- Rainuzzo, J., Reitan, K., Olsen, Y. (1997) The significance of lipids at early stages of marine fish. A review. *Aquaculture* 155, 103 – 115.
- Reitan, K., Rainuzzo, J., Olsen, Y. (1994) Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. *Aquaculture International* 2, 33 – 48.
- Sakai, M. (1999) Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172, 63 – 92.
- Strand, H., Dalmo, R. (1997) Absorption of immunomodulating ($\beta(1, 3)$ -D-glucan) in yolk sac larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *J. of Fish Diseases* 20, 41 – 49.
- Silva, A., Flores, H. (1989) Consideraciones sobre el desarrollo y crecimiento larval del lenguado (*Paralichthys adspersus*, Steinadcher, 1987) cultivado en laboratorio. *CPSS Rev. Pacífico Sur* 629 – 634.
- Silva A., Velez, A. (1998) Development and challenges of the turbot and flounder aquaculture in Chile. *World Aquaculture* 29, 48 – 51.
- Silva, A. (2000) Bases biológico-técnicas para el desarrollo del cultivo artificial del lenguado chileno (género *Paralichthys*). Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de Barcelona. Barcelona.
- Silva, A., Oliva, M., Castelló, F. (2001) Evaluación del crecimiento de juveniles de lenguado chileno (*Paralichthys adspersus* Steindachner, 1867) cultivado en estanques. *Biología Pesquera* 29, 21 – 30.
- Silva, A. (2001) Advance in the culture research on small-eye flounder *Paralichthys microps* and chilean flounder *Paralichthys adspersus* in Chile. *Journal of Applied Aquaculture*. 11, 147 – 164.
- Skjeremo, J., Vadstein, O. (1999) Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 177, 333 – 343.
- Sokal, R., Rohlf, F. (1981) *Biometry: Principles and practice of statistical in biological research*. W.H. Freeman and Company. San Francisco 776 pp.
- Tidwell, J., Coyle, S., Evans, J., Weibel, C., Mckinney, J., Dodson, K., Jones. H. (1999) Effect of culture temperature on growth, survival, and biochemical composition of yellow perch *Perca flavescens*. *Journal of the World Aquaculture Society* 30, 324 – 330.
- Tytler, P., Blaxter, J. (1988) The Effects of External Salinity on the Drinking Rates of the Larvae of Herring, Plaice and Cod. *J. Exp. Biol.* 138, 1 – 15.
- Tyler, P., Ireland, J. (1994) Drinking and water-absorption by the larvae of herring (*Clupea harengus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. fish Biol*, 44, 103 – 116.
- Yasunaga, Y. (1971) Studies on the feeding habit and growth of the plaice *Paralichthys olivaceos*, in the larval stage. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.* 68, 31 – 44.
- Yoshimatsu, T., Kitajima, C. (1996) Effects of daily ration and feeding frequency of *Artemia* on the growth of mullet larvae. *Aquaculture International* 4, 85 – 88.
- Zúñiga, H., Acuña, E. (1992) Larval development of two sympatric flounder, *Paralichthys adspersus* and *Paralichthys microps* from the bay of Coquimbo, Chile. *Fish Bull.* 90, 607 – 620.

MERCADO DE SMOLT DE SALMONES EN CHILE, HASTA EL 2010

Alfonso Mardones Lazcano,
Escuela de Acuicultura Universidad Católica de Temuco
Email: mardolaz@uctemuco.cl

Resumen

Desde los inicios de la industria salmoniculora en la década de los ochenta, Chile ha mostrado un crecimiento sostenido en la exportación de salmónidos de cultivo. Las exportaciones han crecido de 3.971 toneladas en 1988 a 383.700 toneladas netas de salmón y trucha en 2005 con ingresos en este último año de US\$ 1.721,2 millones, estimándose que el año 2010 las exportaciones serán alrededor de las 565.000 toneladas, valoradas en unos US\$ 3.000 millones.

El siguiente estudio considera los requerimientos de smolt de las 28 empresas más importantes del mercado salmonero de Chile entre el 2006 y el 2010, y considera las tres especies de mayor importancia comercial: Salmón plateado o Coho (*Onchorynchus kisutch*), Trucha (*Onchorynchus mykiss*) y Salmón del atlántico o Salar (*Salmo salar*).

Estos resultados nos permiten estimar las necesidades de nuevas pisciculturas, que se requerirán para cubrir las demandas de la industria, en relación a las tasas de crecimiento de la misma.

Introducción

Las exportaciones de salmónes en el año 2005 fueron del orden de los US\$ 1.721 millones, incrementándose en 20% respecto del año anterior. El incremento de los valores exportados, en relación a 2004, tiene un efecto combinado de un incremento en los precios para las tres principales variedades exportadas especialmente para la trucha y el salmón del Pacífico, y de un mayor volumen embarcado de salmón atlántico. De esta manera la participación de los embarques de salmón y trucha representa en promedio de los últimos cinco años, el 53% de las exportaciones del Sector de Pesca y Acuicultura (FitchRatings, 2006).

En 2005 las totalidad de las especies exportadas presentaron un incremento respecto al año anterior, efecto de los mayores precios alcanzados, fruto de la incorporación de un mayor grado de valor agregado a los productos. Los embarques de salmón atlántico se incrementaron en 23%, el salmón Coho en un 22%, mientras que los envíos de trucha en un 7%. Las exportaciones de salmón atlántico tiene la mayor participación, que las otras especies (Tabla 1).

Tabla 1

Exportaciones de Salmón y Trucha

Exportaciones Salmón y Trucha	2000	2001	2002	2003	2004	2005	Variación 05/04
Exportaciones Salmón y Trucha (Mton)	206	300	331	286	355	384	8,2%
MM US \$ FOB	973	964	973	1.147	1.439	1.721	19,6%
Precio Promedio (US \$/ kilo)	4,7	3,2	2,9	4,0	4,1	4,5	9,8%

Fuente: SalmónChile, 2006.

Se estima que para 2006, el sector salmonicultor exportará cerca de US\$2.000 millones, equivalente a un incremento de 16%, el cual se fundamenta en la mayor demanda mundial y en la capacidad de la industria de agregar mayor valor a sus productos, lo que debiera mantener buenos precios en los mercados internacionales. (FitchRatings, 2006)

Para los siguientes años, se estima que se incrementará la demanda mundial por el producto en torno a un 10% anual, considerando que el consumo de salmón es aún bajo a nivel mundial en relación a otras carnes proteicas y debido especialmente al relativamente bajo consumo per cápita de Estados Unidos, actualmente el segundo mercado destino de las exportaciones de salmón chileno.

Se esperan llegar a exportar sobre US\$ 3.000 millones en 2010, basándose en el potencial crecimiento de los envíos a Estados Unidos, además del incremento esperado en las exportaciones hacia Europa y Asia. En el mercado asiático, destaca el atractivo de China e India, tanto por el tamaño de su población como por su alto consumo de productos del mar, considerando que aún el salmón no alcanza una presencia relevante; además, la cercanía y el tamaño del mercado latinoamericano generan un importante potencial. (FitchRatings, 2006)

Los anteriores índices de crecimiento de la demanda, combinados con las existencias de peces en cultivo, permiten proyectar la eventual demanda que existirá de smolt y juveniles de las 3 principales especies que se cultivan en Chile, entre los años 2006 y 2010.

Materiales y métodos

La metodología empleada en este estudio, es para investigaciones de tipo exploratorio y descriptivo (Hernández, 1998). El estudio descriptivo permite analizar independientemente las variables a investigar, de esta forma se realizaron las proyecciones de requerimientos de smolt.

El diseño de investigación fue de tipo no experimental, donde no existe manipulación deliberada de variables (Hernández, 1998). Lo que se hace es evaluar el problema desde el contexto natural y actual en que se desarrolla, y se centra en analizar cuál es el estado de una o varias variables en el momento de estudio, o de estudiar como evoluciona o cambia una o más variables del sector piscicultor.

Se consideraron tres fuentes de información, las generales, primarias y secundarias (Salkind, 1999), permitiendo realizar un análisis de los datos más integro y cercano a la realidad del sector.

El estudio exploratorio para la proyección de la producción de smolt, se consideró a las 28 empresas más importantes del mercado salmonero de Chile, que en conjunto representan más de un 95% de la producción total de salmones exportados en Chile.

Resultados

De acuerdo a la proyección de cosecha de peces para la temporada 2006, el 68% de las empresas requieren smolt de Salmón Coho, el 82% de Trucha e igual porcentaje de Salmón Salar, considerando que los pesos de cosecha son de 3, 3 y 4kg respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2

Números de empresas y % de abastecimiento para las tres principales especies salmónidos.

	Coho	Trucha	Salar
Peso Cosecha (kg)	3	3	4
Número de Empresas	19	23	23
Porcentaje	68%	82%	82%

La capacidad de abastecimiento por parte de las empresas es diversa, existiendo algunas que se abastecen en un 100% con producción propia, otras en un determinado porcentaje y una menor cantidad de ellas no tienen producción de ovas, alevines o smolt propias, como se muestra en la siguiente tabla 3.

Tabla 3

Capacidad de abastecimiento con producción propia.

	Coho	Trucha	Salar
0%	5%	9%	0%
25%	5%	9%	4%
40%	5%	4%	4%
50%	0%	4%	4%
60%	5%	4%	4%
70%	5%	4%	20%
75%	11%	4%	12%
80%	5%	9%	40%
90%	0%	0%	4%
100%	58%	52%	8%
Total Empresas	19	23	25

De las empresas que requieren alevines y smolt de Salmón Coho, se destaca que un 5% de ellas no tienen producción propia, por lo que son abastecidos a través de otras empresas, un 11% se abastecen en un 75% y un porcentaje importante se autoabastecen.

Las empresas que producen Trucha, se destaca que un 9% no tienen producción propia, el 52% se abastecen en un 100% y las restantes tienen producciones entre un 25% a 80%.

De las empresas productoras de Salmón Salar se destaca que todas ellas producen en algún porcentaje smolt de esta especie, considerando que 72% de ellas satisfacen sus necesidades de smolt entre un 70% a un 80%. A diferencia de las empresas productoras de las dos especies anteriores, existe un menor porcentaje de empresas que se abastezcan en un 100% con producción propia de smolt o alevines de salar, sólo un 8%.

Necesidades de siembra de smolt para la cosecha del año 2006

Las empresas estimaron que los requerimientos totales de smolt para la cosecha del año 2006 corresponden a **233.014.5000** individuos, distribuidos de mayor a menor requerimiento, en 132.961.098 individuos de Salmón Salar, 59.569.778 de Trucha y 40.483.624 de Salmón Coho (Gráfico 1).

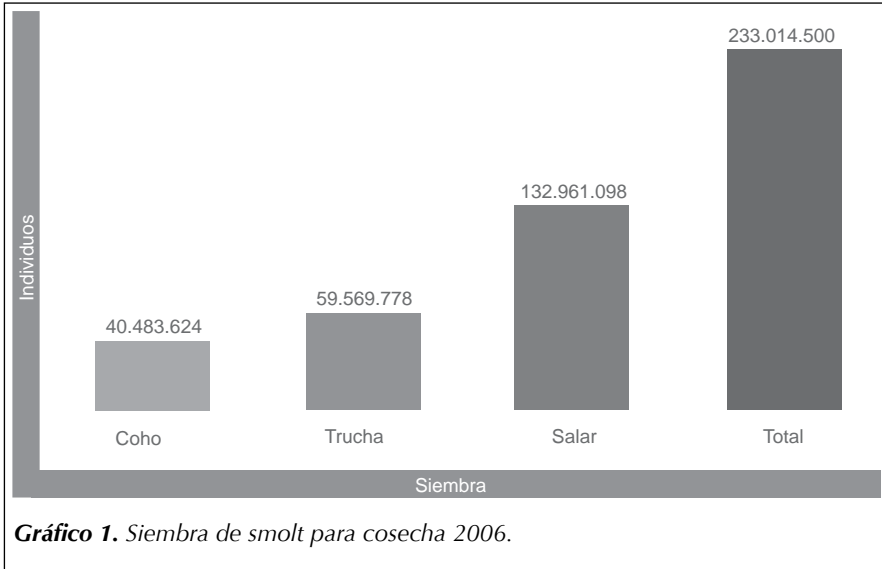


Gráfico 1. Siembra de smolt para cosecha 2006.

Necesidades de smolt por especie

De acuerdo a las necesidades de smolt, la mayor demanda para el 2006 es de Salmón Salar, correspondiendo a un 57% del total del mercado, seguido en una menor proporción por Trucha, 26% y la menor proporción corresponde a Salmón Coho, en un 17% (Gráfico 2).

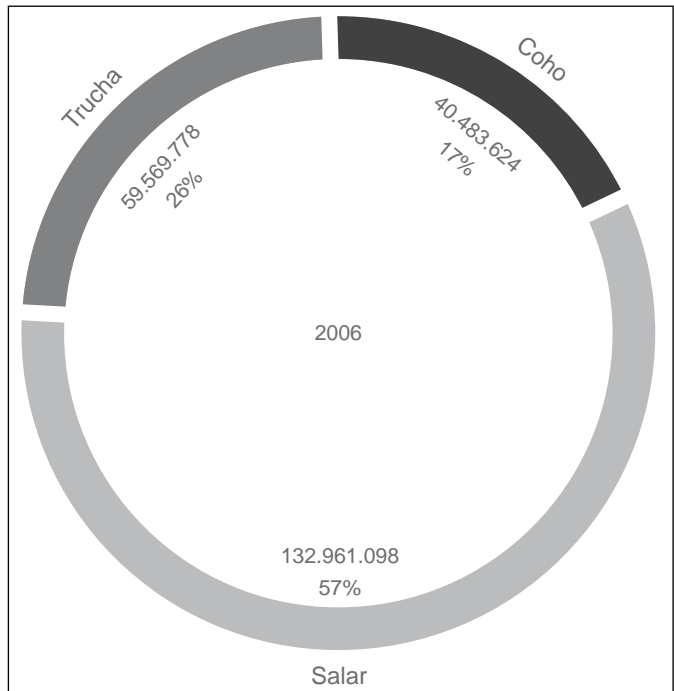
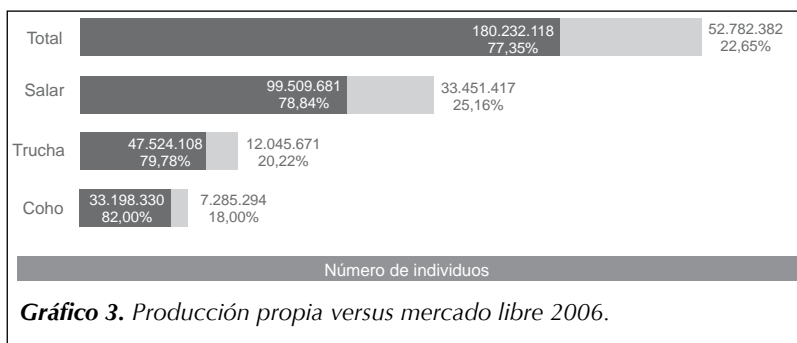


Gráfico 2. Necesidades de smolt en el mercado.

Actualmente las empresas satisfacen las necesidades de smolt con producción propia y otro porcentaje son obtenidas del mercado libre, llámese así a las empresas no integradas hacia delante, excedentes de empresas y pisciculturas independientes. En general las empresas son capaces de abastecerse con producción propia en un 77,35%, equivalentes a 180.332.118 individuos.

En relación a la producción propia de smolt por especies, la producción propia satisface el **74,84%** de los requerimientos de Salmón Salar, **79,78%** de Trucha y **82%** de Salmón Coho (Gráfico 3).



Análisis de la demanda de smolt por especie

Se realiza un análisis más específico por especie, para ello se consideraron algunos datos estadísticos como el promedio requerido por empresa, mínimo y máximo, y los requerimientos del 25% de las empresas de menor producción y el 25% de las empresas de mayor producción.

Demanda de smolt de salmón coho

Esta especie es producida por una menor cantidad de empresas (19) y tiene un menor requerimiento de smolt, estimando una necesidad total del mercado en **40.483.624** individuos.

Promedio	Mínimo	Máximo	25% inferior	25% superior
2.097.098	306.041	4.698.750	1.217.708	2.736.515

- En promedio las empresas tienen necesidades de 2.097.098 individuos.
- El mínimo de smolt requeridos por una empresa es de 306.041 y el máximo es de 4.698.750 individuos. Estas cifras permiten visualizar la diversidad en los requerimientos y tamaños de las empresas.
- El 25% de las empresas necesitan una cantidad inferior a 1.217.708 individuos, en tanto que el 25% de las empresas de mayores producciones, tienen necesidades superiores a 2.736.515 individuos. (Ver gráfico 4).

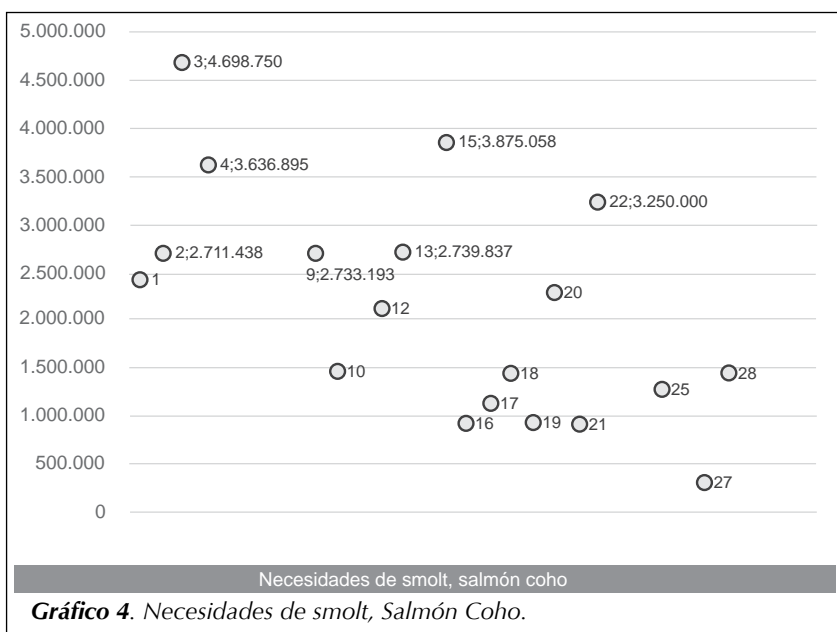


Gráfico 4. Necesidades de smolt, Salmón Coho.

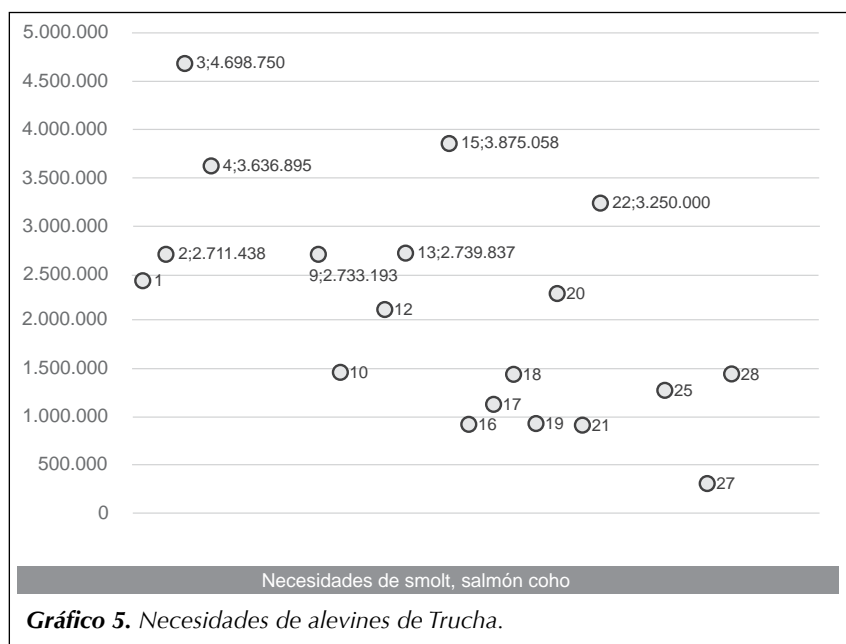
De las 19 empresas productoras de Coho, las 4 más importantes en el mercado de esta especie, ordenados sus requerimientos en forma descendente son: 4.698.750, 3.875.058, 3.636.895 y 3.250.000. Las restantes empresas tienen requerimientos inferiores a 3.000.000 individuos.

Demanda de juveniles de trucha

Esta especie es producida por 23 empresas y los requerimientos de alevines para ingreso al mar se estiman en **59.569.778** individuos.

Promedio	Mínimo	Máximo	25% inferior	25% superior
2.589.990	306.201	9.839.495	952.094	3.600.690

- En promedio las empresas tienen necesidades de 2.589.990 individuos.
- El mínimo de juveniles requeridos por una empresa es de 306.201 y el máximo es de 9.839.495 individuos. Estas cifras permiten visualizar la diversidad en los requerimientos y tamaños de las empresas.
- El 25% de las empresas necesitan una cantidad inferior a 952.094 individuos, en tanto que el 25% de las empresas de mayores producciones, tienen necesidades superiores a 3.600.690 individuos. (Ver Gráfico 5).



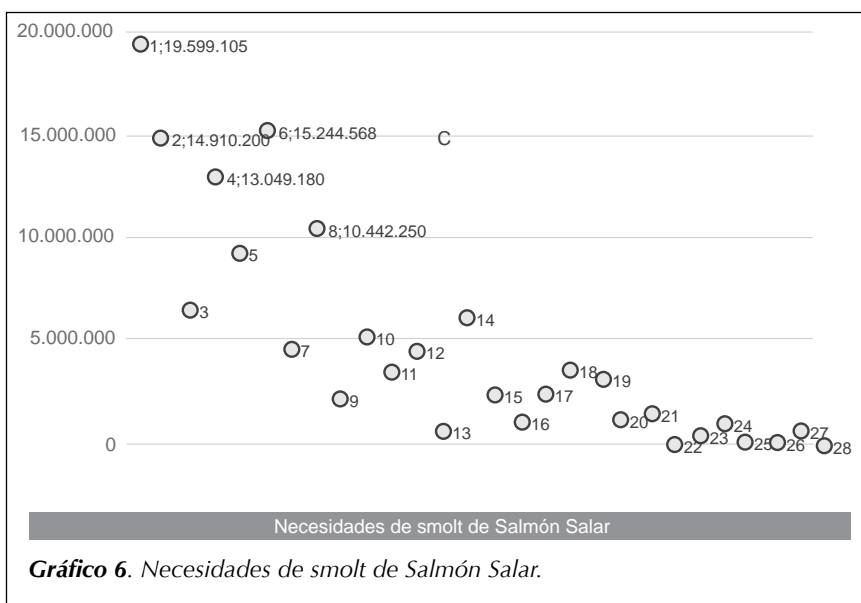
De las 23 empresas productoras de Trucha, la más importante en el mercado de esta especie requiere 9.839.495, superando ostensiblemente a otras empresas que le siguen en cantidades de: 6.613.895, 4.510.800, 4.368.000 y 4.110.677. Las restantes empresas tienen requerimientos inferiores a 4.000.000 individuos.

Demanda de smolt de salmón salar

Esta especie es producida por una mayor cantidad de empresas (25) y los requerimiento de smolt son significativamente mayores a la de las especies anteriores, estimándose los requerimientos en **132.961.098** individuos.

Promedio	Mínimo	Máximo	25% inferior	25% superior
5.780.917	161.615	19.599.105	1.850.466	7.961.363

- En promedio las empresas tienen necesidades de 5.780.917 individuos.
- El mínimo de smolt requeridos por una empresa es de 161.615 y el máximo es de 19.599.105 individuos, considerablemente mayor a las dos especies anteriores. Estas cifras permiten visualizar la diversidad en los requerimientos y tamaños de las empresas.
- El 25% de las empresas necesitan una cantidad inferior a 1.850.466 individuos, en tanto que el 25% de las empresas de mayores producciones, tienen necesidades superiores a 7.961.363 individuos, lo que indica la importancia de esta especie en el mercado. (Ver Gráfico 6).

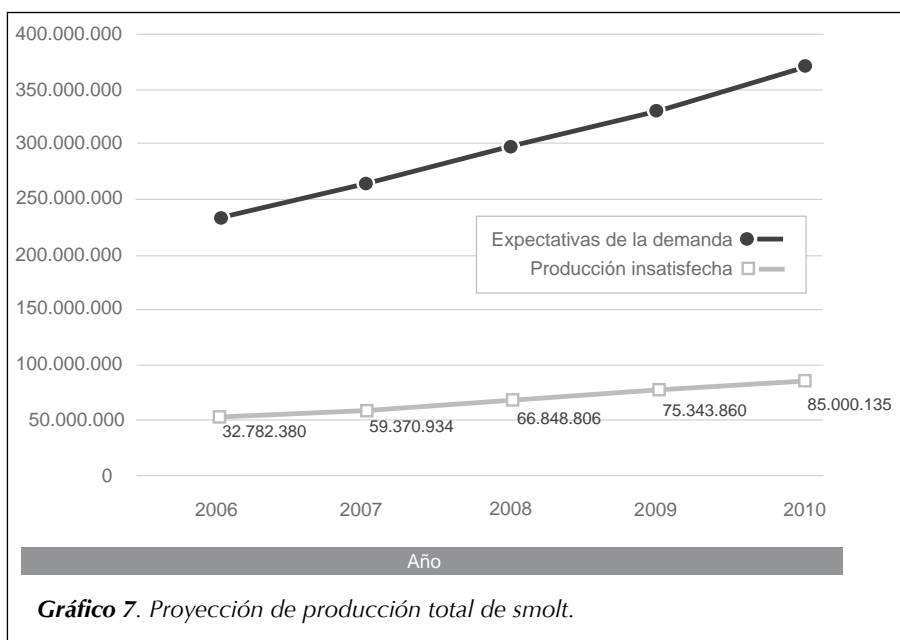


De las 25 empresas productoras de salar, la más importante en el mercado de esta especie, requiere 19.599.105, superando a otras empresas que le siguen, en las siguientes cantidades demandadas: 15.244.568, 14.910.200, 13.049.180 y 10.442.250. Las restantes empresas tienen requerimientos inferiores a 10.000.000 individuos.

Proyección de producción de smolt al año 2010

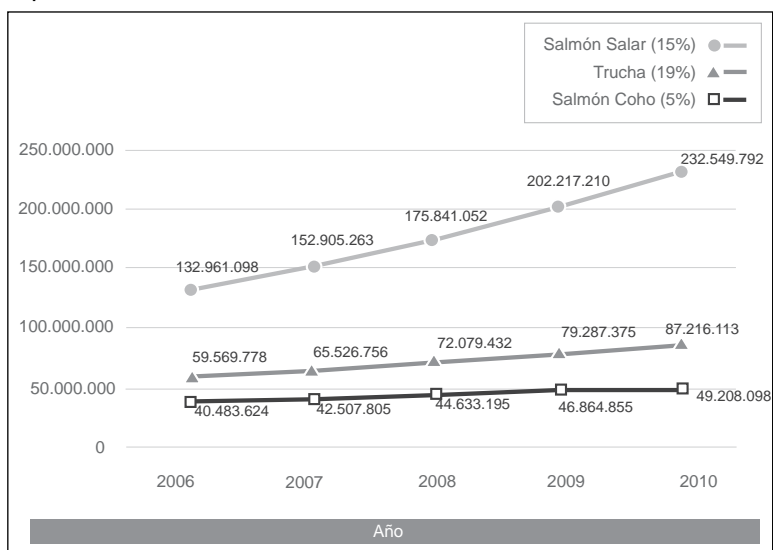
La proyección realizada para el 2010 considera las expectativas de demanda por año y la demanda insatisfecha que debería ser abastecida por el mercado libre, es decir otras empresas productoras de smolt y alevines.

Actualmente el mercado requiere de 233.014.500 smolt y alevines, para el abastecimiento de la cosecha del año 2006, requiriendo del mercado libre el 22,65% de smolt (52.782.380), estimándose que para el año 2010 la demanda será de 368.976.012 individuos, equivalente a un aumento de 37%. (Ver Gráfico 7), las que deberán necesariamente ser abastecidas por nuevas pisciculturas.



Las proyecciones realizadas por especies, de acuerdo a las estimaciones mundiales de demanda, consideran un crecimiento distinto en los requerimientos de smolt, considerando aumentos anuales en las ventas de peces cosechados en un 5% para el Salmón Coho, un 10% para Trucha y 15% para el Salmón Salar.

- Las necesidades de Salmón Coho para el año 2006, es de 40.483.624 individuos, proyectando un aumento para el año 2010 en un 18% (49.208.098) más que la actual.
- Los requerimiento de Trucha para el año 2006, son de 59.569.778 individuos y para el año 2010, la producción aumentaría en un 32% (87.216.113).
- El Salmón Salar tiene una estimación de mayor crecimiento, 15%; requiriéndose para el año 2006, 132.961.098 individuos y para el año se proyecta un aumento en un 43%, equivalentes a 232.549.792 individuos. (Ver Gráfico 8).



Conclusiones: proyección de smolt y alevines por especie en relación al mercado libre

La industria presenta un aumento de empresas que integran en su modelo de producción todas las etapas del cultivo, es decir, desde la producción de ovas hasta la producción de carne, alcanzando al 87,5% de las empresas, bastante mayor al observado por Mardones, Vega y Zamorano en 1994, año en que las empresas que estaban totalmente integradas representaban un 50%.

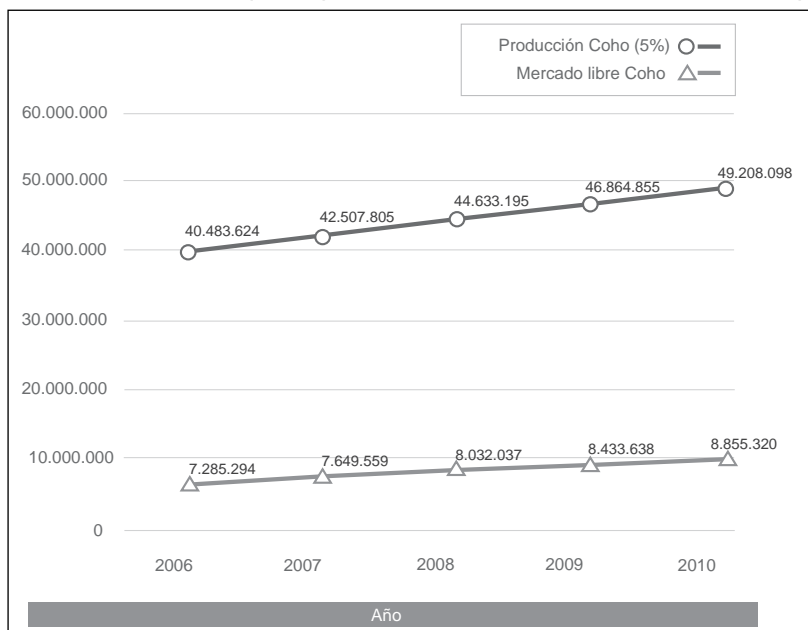
El desafío de la industria salmonicultora es sostener el crecimiento futuro, para lo que las empresas deben planificar sus aumentos productivos considerando el crecimiento de la demanda. Sin embargo, los principales factores que limitan la capacidad de abastecer dicha demanda son restricciones geográficas, a través de la obtención de permisos acuícolas; restricciones de mercado, evitar producir más de lo que se demanda y restricciones de disponibilidad de insumos a nivel mundial, principalmente de harina y aceite de pescado.

A lo anterior se debe agregar, que uno de los temas de mayor importancia que enfrenta la industria salmonicultora chilena es el contar con un adecuado abastecimiento de ovas, alevines y smolt, ya sea de origen nacional o importado, que ayude a tener seguridad de abastecimiento de smolt para cumplir con las proyecciones de los mercados, pero por otro lado, está la preocupación de evitar o eliminar el riesgo del ingreso de nuevas enfermedades a Chile, a través de la importación de ovas (Contreras, 2001).

Proyecciones para el salmón plateado o coho

La demanda de smolt de Salmón Coho para el año 2006 es de 40.483.624 individuos, estimándose que la demanda a cubrir por terceros es de un 18%, equivalente a 7.285.294 individuos.

Considerando un crecimiento anual de 5%, siendo esta la especie de menor demanda en el mercado, se estima que la producción total aumentaría en un 18% para el año 2010, es decir



49.208.098 individuos, existiendo **8.724.474** peces que deberán producirse en nuevas pisciculturas (Gráfico 9).

Gráfico 9. Proyección de producción de smolt, Salmón Coho.

Proyecciones para las truchas

La demanda de alevines de Trucha para el año 2006 es de 59.569.778 individuos, estimándose que la demanda a ser abastecida por nuevos emprendimientos es de un 20,22%, equivalente a 12.045.671 individuos.

Considerando un crecimiento anual de 10% en las exportaciones, se estima que la producción total aumentaría en un 32% para el año 2010, es decir, 87.216.113 individuos producidos, de ellos **27.646.334** de juveniles, requieren ser producidos en nuevos emprendimientos piscícolas (Gráfico 10).

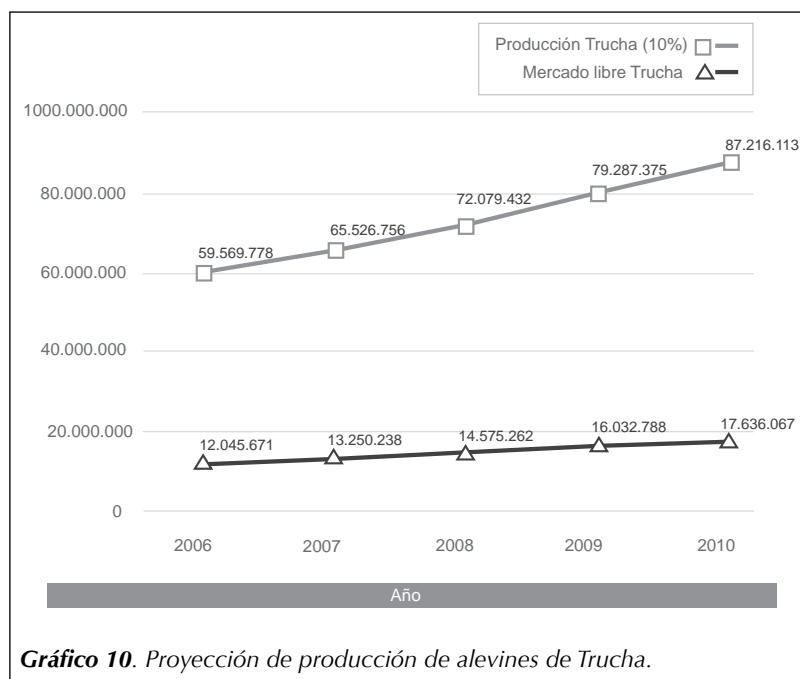
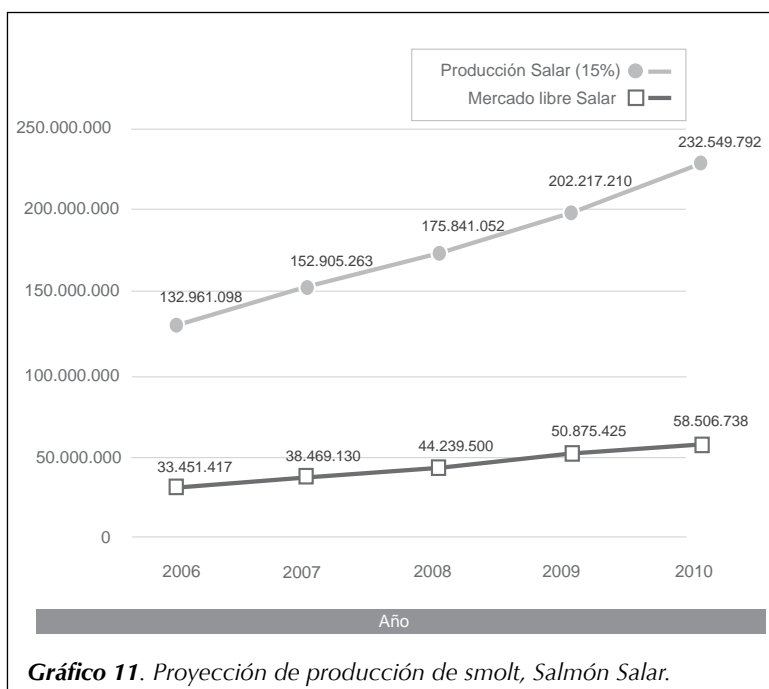


Gráfico 10. Proyección de producción de alevines de Trucha.

Proyecciones para el salmón del atlántico

La demanda de Salmón Salar es la más alta del mercado, estimando para el año 2006 requerimientos de 132.961.098 individuos, estimándose que la demanda a ser cubierta por el mercado libre es de un 25,16%, equivalente a 33.451.417 individuos.

Considerando un crecimiento anual de 15% de las exportaciones, el más alto del mercado, se estima que la producción total aumentaría en un 43% para el año 2010, es decir, 232.549.792 smolt producirán las empresas integradas y no integradas de mantenerse la estructura actual de producción; de esta cantidad **99.588.693** de smolt de salar, necesitan producirse en nuevas pisciculturas, que deberán construir las empresas integradas o por nuevos inversionistas (Gráfico 11).



Si consideramos que en la actualidad todas las pisciculturas se encuentran en estado de régimen operacional, las necesidades al 2010 demandarán necesariamente la construcción y operación de nuevas pisciculturas.

Tomando como supuestos que la mayoría de las pisciculturas opera con caudales entre 1000 a 1500 lt/sg; teniendo tasas de cambio de 1,3; trabajan a densidades de seguridad 20 kg/m³ y que se requieren 1,7 alevines para producir un smolt de salar y 1,72 alevines para producir un smolt de Coho o un juvenil de Trucha, se necesitaran **59 nuevas pisciculturas** operando el año 2009.

Por otro lado, el actual escenario que enfrenta la industria salmonicultora chilena en cuanto al riesgo económico, por no disponer, en calidad y cantidad, del material genético adecuado para cubrir el crecimiento de la demanda, y el riesgo sanitario que significa la entrada de enfermedades a través de la importación de ovas, hace indispensable el reemplazo de estas ovas en el corto y mediano plazo, siendo necesario certificar la calidad exportadora de ovas de otros países, evaluar la capacidad de producción nacional y establecer un programa genético nacional.

Así también, hace falta investigar entre muchos otros múltiples aspectos, la determinación de las variables fisiológicas que el salmón considera en su ciclo de vida, tales como la nutrición especie-específica para la producción de alevines capacitados y fortalecidos para su adaptación a las siguientes etapas de desarrollo productivo, con el objeto de disminuir las mortalidades en los primeros estadios y evitar a posteriori tratamientos curativos o profilácticos posteriores.

Una industria como la salmonicultura, que depende en su totalidad de sus exportaciones, obedece necesariamente de la ciencia y tecnología, que debe producirse en Chile.

BIBLIOGRAFÍA

- Contreras, G. (2001) *Una revisión general del mercado de las ovas y smolt en la industria salmonicultora chilena, con énfasis en la producción e importación de ovas*. Tesis de grado. Universidad Católica de Temuco.
- FitchRatings, (2006) *Sector Pesca y Salmonicultura, informe sectorial marzo 2006*. Agencia clasificadora de riesgos FitchRatings (www.fitchratings.cl)
- Hernández, R. (1998.) *Metodología de la Investigación*. Ed. Mc Graw Hill, México.
- Mardones A., Vega R. & J. Zamorano. (1999) *Survey on Salmon Eggs, Fries and smolt market in Chile*. Eastfish.
- Mardones, A. & Contreras G. (2002) *Significancia de las ovas nacionales e importadas en la industria Salmonicultora Chilena*. X Congreso Latinoamericano de Acuicultura. A. Silva (Ed). Universidad Católica del Norte - Asociación Latinoamericana de Acuicultura.
- Salkind, N. J. (1999) *Métodos de Investigación*. Ed. Prentice-Hall, México.
- Salmonchile. (2006) *Contribución de la salmonicultura a la economía chilena*. Temas del Salmón. Año1, N°2, julio de 2006 (www.salmonchile.cl).

HATCHERY PRODUCTION OF NEW MARINE FINFISH SPECIES

CRITICAL POINTS OF PRODUCTION EVOLUTION AND NUTRITION

Grethe Rosenlund¹ and Nick King²

1. Skretting Aquaculture Research Centre, Stavanger, Norway

2. Skretting Marine Hatchery Feeds, St. Andrews, Canada

The evolution

Developing hatchery production of new species of marine finfish for aquaculture can be seen as a cycle of events. The evolution starts with selection of the species. Normally this builds from knowledge about the species, and the potential market(s) it will occupy. After selecting the species, the first step toward hatchery production is to collect broodstock and establish a secure supply of good quality eggs. This entails developing a program for optimal nutrition and the control of spawning. Next comes the development of larval rearing (LR) – perhaps the core step in the hatchery production. Since many of the basic processes (live feed production, algae production, infrastructure to support LR) will be quite similar for most marine species, a good starting point for this step is to survey existing industries and transfer pertinent technology. However, adaptation to species specific requirements are needed with respect to:

- nutritional and environmental requirements
- physical requirements; such as tank size/shape (or pond), tank hydrodynamics,
- species-specific production strategy including feeding regime, use of live feeds/dry feed, production schedule.

Industrialisation is the last step to establish hatchery production of a new marine species. This is a multi-step function as well that involves (1) the scaling-up of all processes based on specific criteria learned about the species, (2) the establishment of consistent production output and quality, and finally (3) standardisation of production processes.

This communication will look at some critical points related to each of these steps and focus on the importance of nutrition.

Species selection

There are more than 22 000 species of fish described in the world. How to pick the right one for culture in your area? There are many examples existing around the world that are currently at various levels of commercial production.

- Seabass and seabream occurring in Mediterranean.
- Grouper and barramundi occurring in Southeast Asia and Australia.
- High value flatfishes like halibut, flounder or turbot that are being produced in all climates around the world.
- Tropical species like Yellowtail, snapper, pompano, puffer or blue fin tuna?
- Or perhaps cod or cobia - the species that will be used as examples in this paper



Atlantic cod (Gadus morhua).



Cobia (Rachycentron canadum).

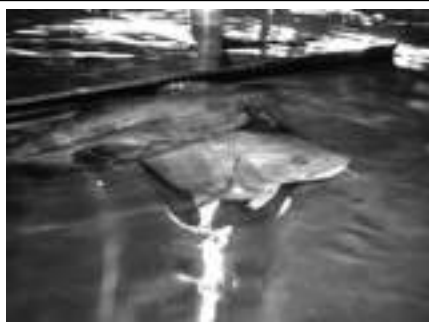
It is common to select high value species where demand is exceeding supply. Such species can potentially create positive margins, and if the natural stocks are in a current state of decline, then future market is secured as well. At an early point, it is good to have an idea about potential market segments that can occur at varying levels of production supply. These market segments will initially occur as niches, and in most cases of aquaculture, new species will need to enter these markets first before eventually developing into a global product. Additionally, these markets may be able to operate on a “seasonal” supply, however, it should be the goal of the production to operate year round for continuous supply. This latter point implies that it is possible to establish a hatchery production providing predictable, year round supply of juveniles.

Before selecting a new species for aquaculture it is very important to have some knowledge about the biology of the species. For instance, if you have knowledge of species-specific requirements that relate to environmental conditions and the critical nutrition through different life stages, then this will make it easier to apply knowledge and experience about hatchery/ongrowing of other species as a starting point for developing cultivation technologies for the new species. For most marine species hatchery production is the initial bottleneck to commercial production, and greatest gains initially can come from such thought process.

Finally, it is good to have a rough idea about expected production time and cost for the candidate species. That is to understand the “break-even” point relative to production volume and production cost. Also, cost of fry must be reasonable relative to fish price. The best approach to address this issue is to develop a business plan of the candidate species using various growth models. For instance selecting a species like cobia that reaches harvest size of 6 kg within 12 months would start to generate income before a species like cod that take 24 months to reach harvest weight of 3 kg.

Development of reproduction

Domestication of new species normally involves collection of mature fish from the wild. It is important to keep these broodstock in quarantine to avoid transfer of possible diseases. But as the species production is established, fish are collected from the farmed stock to build up new broodstock. This practice provides the opportunity for selective breeding of specific production characteristics such as growth. For example, in 1975 it took 2.5 years to grow salmon to 3.5kg in seawater. In 2000, this was reduced to 1 year. A significant proportion of this reduction can be ascribed to the breeding programme. It is also possible to selectively breed for disease resistance, and this along with an established health-monitoring programme, will reduce risk of vertical transmission of pathogen while also opening the possibility to gain “pathogen free” certification.



Cod spawning behaviour.

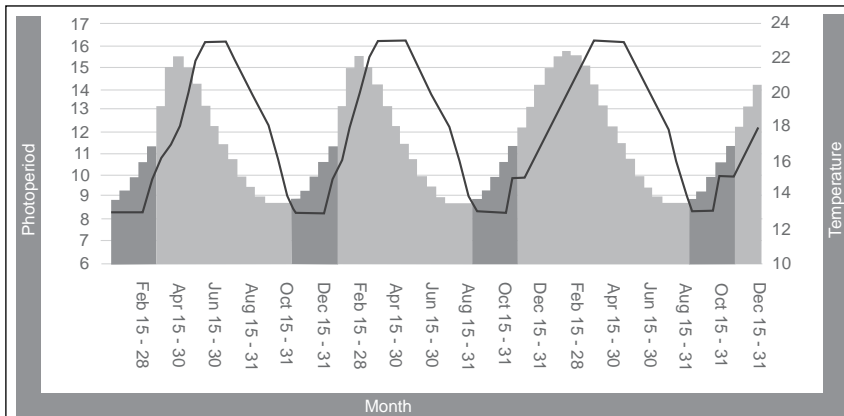


Stripping eggs from puffer fish.

Marine fish can have very different spawning patterns. Critical for hatchery production are (1) the number of annual batches spawned, (2) the size of the batch, and, (3) the time between batches. Furthermore, some species will readily spawn naturally in captivity, like for instance cod and cobia, whereas other species like various flatfishes and puffer fish (as shown below), must be stripped and fertilised *in vitro*.

In general, fish are dependent on some environmental cue to bring it into spawning conditions. The dominant external cue will vary depending on the natural habitat that the species have been adapted to. For example in Atlantic cod that are naturally exposed to distinct seasonal variation, increasing day length is the dominant factor determining spawning. However, we have also learned that in order to have a good spawning result with cod, the temperature must also be controlled. In more tropical fish that naturally are not exposed to changes in light conditions over the year, other factors like temperature, salinity, lunar cycle, and currents are the determining cues for spawning. In Cobia and Pacific threadfin, for instance, spawning activity is more in response to lunar cycle.

Maturation control and egg supply.



This figure shows how day length and temperature are regulated to control maturation and supply of gametes, and how the time of spawning can be changed thus opening the possibility to establish off season spawning populations.

Broodstock can also be brought into spawning condition by using hormone therapy. Such spawning hormones include HCG, LhRH, GnRH, or CPE. Use of hormones becomes increasingly important with species that have low fecundity and require synchronization of spawns in order to obtain enough fertilized eggs to carry a hatchery through a production cycle.

Different strategies are followed for feeding of broodstock. It is often difficult to get broodstock that have recently been collected from the wild to eat dry feed pellets. Instead, these fish are fed either trash fish or a homemade moist feed where fresh or frozen fish is included. It is also thought that aspects other than nutritional composition, is incorporated to fresh fish such as natural steroids or hormones, that may chemically trigger spawning cues for broodfish. Although this approach is positive from a feed intake point of view, it represents several critical risk factors:

- Nutritional composition can vary by season. Quality will vary with distance from the point source.
- Fresh fish can transfer diseases as no heat treatment is made to the raw material
- Enzymes that can break down essential nutrients, i.e. thiaminases
- Nutritionally incomplete with respect to protein and micronutrients. This can partly be compensated in moist feed where the fresh fish is mixed with a meal mix containing vitamins for instance. However, making such feed is labour-intensive, and is quite demanding from a hygienic point of view.

Specialised broodstock pellets represent the safest alternative with respect to hygienic conditions, and also offer opportunity to adjust the nutritional composition according to specific requirements. As already mentioned, it may be a problem to get wild fish to accept dry pellets, but with modern technology it is now possible to produce dry pellets that can be "rewetted" to add moisture while remaining highly stable with complete nutritional package.

Since presentations to follow will go into specific details related to the components of broodstock nutrition, we will not discuss this further. Instead we would like to provide examples that illustrate the importance of broodstock nutrition. We know that broodstock nutrition affects reproductive physiology and in turn its ability to spawn and produce good quality gametes, i.e.:

- Quality of eggs and sperm
- Quality of yolk-sac fry and larvae
- Initial performance of the first feeding larvae or fry before they come established on feed

As we previously stated, fish have different spawning patterns. Some fish like Pacific salmon, spawn once and die, whereas other salmonids spawn annual single-batch of eggs over several years. Most marine fish in aquaculture also spawns annually, but in multiple batches. There are huge variations between species in the number of egg batches produced. For example, European seabass spawn 4-6 batches while Gilthead seabream spawns more than 100 batches of eggs.

Fish that spawn very many batches reach gonado somatic indices higher than 100 (seabream as high as 200). This means that the weight of eggs spawned is higher than the body weight of the fish. This also implies that the fish are highly dependent on diet, both amount and nutritional composition, for successful spawning. Furthermore, in such species dietary effects can be seen within short time. For instance, effects of broodstock lipid composition have been documented in seabream after 15 days of feeding.

There may also be a risk among fish that are kept in captivity and spawn over several years that they may get depleted in some essential nutrient over time. Thus both feed composition and feeding time are important factors determining spawning results.

The effect of feeding special broodstock diets will to some extent depend on species. During the pre-vitellogenic phase the amount of feed given, or the ration, is important determining the

fecundity (# of eggs per female) and the number of fish that will spawn. However, during this phase diet composition also has an effect on body stores composition, providing nutrients to be built into the egg during vitellogenesis -especially in fish that go off feed before vitellogenesis is completed. Also, in fish that are used for several years, this is the period where the fish will recover from the previous spawning.

Several studies have shown that diet composition during vitellogenesis has the biggest impact on egg and off-spring quality. Thus at least during this period a special diet is required. Diet composition can also have a modulating effect on final maturation.

Larval rearing

Juvenile production of marine fish is a rather complex process where eggs or larvae and food represent the input to the process and juveniles the output. The process also involves environmental and physical factors. The success of this process can be measured as **survival, growth and quality of the juveniles**.

A number of environmental factors like water quality, temperature and light are known to affect larvae during this stage, and are therefore necessary to optimise in order to improve the outcome of this process.

Temperature is one of the most important environmental factors modulating growth in fish. Different species have adapted to the temperature range found in their natural habitats. When introducing a new species in aquaculture it is vital to have knowledge about the relationship between growth and temperature during different life stages in order to establish good hatchery protocols.

Using cod as an example, these graphs show the growth curves of Norwegian coastal cod fed natural zooplankton in excess at different temperatures. Growth is both temperature and size dependent, reaching a maximum around 10mm larval length, varying from around 8%/day at 8°C to around 25%/day at 14°C.

The result of this temperature difference is for example a 7.5 fold bigger fish after 56 days at 14°C; 150 mm dry weight compared to 20 mg at 8°C.

Similar studies have not been performed for cobia. Cobia is a warm water species, and typically reared at 28°C. It reaches 1.8g wet weight corresponding to around 300mg dry weight in 35 days after hatch. These huge differences in growth potential at different temperatures and between the two species, have a big impact on food requirements (both in quantity and composition). It is critically important that this is properly reflected in the feeding regimes applied. This data also suggests that it is important to have proper temperature control in order to feed correctly.

Light in terms of both intensity and period is another metabolic modulator shown to affect larval growth and survival. Again, species-specific differences can exist.

Testing light intensities from 300 to 2400 lux and 3 different light regimes for first feeding cod, Puvanendran and Brown (1999), found that the effect of light intensity on growth was biggest during the first weeks of feeding, and they also found a positive effect on growth of longer day length. The same patterns were also seen in survival. So for this species it was recommended to use at least 1200 lux and continuous light.

In cobia similar studies have not yet been done. Cobia juveniles are produced under a variety of conditions worldwide from pond rearing to intensive recirculation. Not all conditions are completely studied or optimised at this point. What we can say is that cobia are visual feeders, and light intensities of 300-2000 lux being reported during larval rearing of this species. With respect to light regime for cobia, similar results are obtained with both 24L and a 14/10 regime, provided that feeding regime is adjusted to light regime.

We should note that light intensities mentioned here are measured at the surface, but the light conditions in a rearing unit will vary depending on depth and water quality.

Although the light intensity threshold for feeding in cod is only 0.4 lux, Fiksen and co-workers (1998) found that the visual range of cod larvae decreased rapidly as the light intensity drops below 600 lux, suggesting that light conditions throughout the larval tank should be carefully controlled.

Water quality is perhaps the most dynamic aspect of the larval rearing process. It requires high level of control and the degree to which it is maintained will have a direct bearing on survival and quality of the juveniles. Typical measurable parameters of water quality are temperature, salinity, saturation of gases, pH, alkalinity, and ammonia.

There are different physical or chemical ways of improving and stabilising water quality. For instance mechanical filtration, UV and ozone treatment will all help to reduce the particulate and microbial load in the supply water to the tank. Additionally, sub-optimal pH can be corrected by buffering. Degassing is normally required in order to avoid gas supersaturation, which can occur by a number of scenarios including air leakage at the pump, differential between temperature between air and water, and seasonal influences occurring at the point source. Cod is very sensitive to gas supersaturation and for some years this was a major cause to malformations in Norwegian hatcheries.

We are finding that recirculation systems are gaining increased interest in marine hatcheries as a tool to stabilise water quality, especially the microflora. Compared to a flow through system, recirculation gives less possibility for opportunistic pathogens to invade the tank.

While it is completely feasible to control and stabilise the source of water entering the larval tank, there are many factors occurring within the tank that can adversely affect water quality.

They include;

- density of fish,
- feed quality,
- feed volume,
- feed frequency
- tank set-up

It is possible to improve water quality within the tank by

- local degassing and adjustment of oxygen flow
- tank cleaning frequency/use of automatic cleaning arm
- surface film cleaners
- water exchange rate and speed
- hydrodynamics

Importance of food

Fish larvae have an incredible growth potential during early life stages, and their main mission is to get through these vulnerable stages as fast as possible. At a given temperature profile, Finn and co-workers (2002) found that cod larvae increased their body weight in the same scale as a mouse to a horse (about 2000 times) within the first 50 days of life. In cobia it takes less than half the time. Thus, it is not surprising that starvation at any point during the larval phase has a very negative effect on growth and survival as reported for cod by Jordaan *et al.*, (2003).

Probably many attempts to produce marine fish juveniles have actually failed due to underfeeding during and after weaning. In most cases, this scenario has been a reaction to reduced water quality occurring within the rearing tank. With respect to this, it is important for larval performance to have a good quality diet in terms of stability and nutrition. Weaning diets for marine fish species are the most complicated feeds to produce. They represent the greatest degree of formulation expertise, diversity of raw materials, and greatest level of practical testing. All this for what represents the smallest market for fish feed suppliers. At Skretting, we have spent a great deal of time and resources to develop a specific weaning diet for marine fish based on cold extrusion technology.



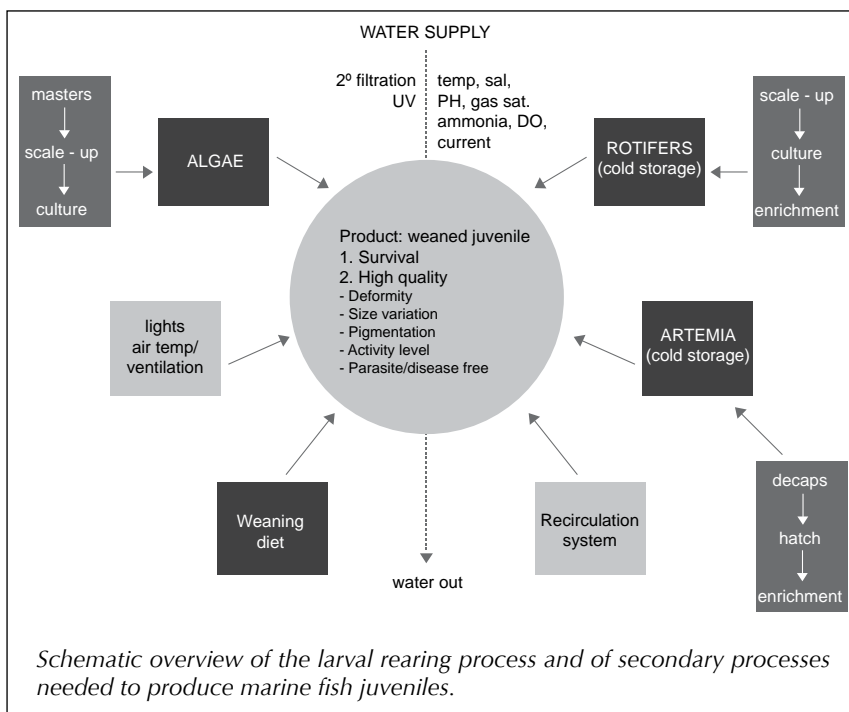
Sequence of feeds commonly used in marine fish hatcheries starting with rotifers (left), followed by Artemia (middle) before fish can utilise dry feed (right).

The trend in marine hatcheries is to reduce the dependency on live feeds, especially on Artemia through earlier introduction of dry feed. However, as it has been documented that fish larvae before metamorphosis have quite different nutritional requirements compared with post-larval fish, a successful early weaning will also depend on development of special larval diets. When using formulated feed from an early stage, feed particle distribution and nutrient leakage are issues of concern. A careful balance is needed to fulfil larval requirements to particle density and quality without compromising water quality. Different devices can be used to ensure a good distribution of feed particles in the water body.

Several studies have investigated the relationship between prey size and prey concentration and larval performance in cod. Puvendran and Brown (1999) offered large rotifers in concentrations from 250 to 16000 per litre and found that at least 4 prey/ml were required to support good growth and survival in first feeding cod. In a follow-up study the same group registered a higher initial feed intake at 4 rotifers/ml as compared to 1,5/ml (Puvendran *et al.*, 2004). Furthermore, they found that cod selected for small rotifers up to day 12 after hatch. In comparison, Øie and co-workers (2004) found best growth and survival in cod larvae fed large rotifers at 5/ml compared with groups fed small rotifers at either 5 or 12 prey/L all the way from first feeding.

In cobia, size of first prey was studied by Holt and Faulk (2005) using rotifer and Artemia. Their results suggest that Artemia is too big to be used from onset of feeding and that 4-6 days of rotifer feeding is required. Also, the fast growth in cobia requires that feed size is often increased to support growth.

To summarize and illustrate the complexity of the larval rearing process, you may consider the **product** of the larval rearing process as a weaned juvenile fish. Then the **success** of the larval rearing process can be measured in terms of survival and quality (for example, deformities, size variation, pigmentation, activity level, health status).



We see that there are many inputs to the process:

- The flow and quality of the water through the tank
- Environmental conditions like temperature, lights, ventilation
- Food; where both quality and availability must be ensured

The process is further complicated by the fact that food is supplied in a sequence of different live feeds followed by dry feed. Each of the live feed inputs has in themselves subsequent processes that can be dynamic in nature and difficult to control. The ultimate goal is to have all these processes optimised and resulting in consistent output of the measurable success traits.

Industrialisation

Industrialisation implies scale-up and coordination of all production steps. It also implies that a level of consistency in survival and quality has been achieved for the product. In this case, the product is a juvenile fish that is ready for transfer to pre-growing or on-growing. Once this consis-

tency in production output is achieved, the final step toward industrialisation within the hatchery is to standardize protocols through a system of management and process control. For example, this can be in the form of a HAACP manual. At this point the hatchery is operating under optimal efficiency in its current state, creating a better position to evaluate ways to reduce production costs without compromising product output and quality.

Industrialisation of an aquaculture company normally involves vertical integration of hatchery, ongrowing and processing. Such integration, along with the use of standardized manuals like HAACP, allows for full traceability and creates the opportunity for unique marketing advantages such as quality labelling or branding.

As an example of industrialization of a region, we need to only look at the Mediterranean aquaculture experience where a rapid growth in fry production to 800million in 2005 occurred from close to nothing in 1985. It should be noted that during this 20-year period the complete focus for developing the industry was put on Bass and Bream, which are still today the main production species. However, more recently we have seen increased quality come from a shift toward bream production as this species is more specialized and lifts the overall standard of the hatchery. Furthermore, we are seeing that hatcheries are now working only with one species and being integrated with other hatcheries for production of the other. Under this scenario, individual hatcheries are more focused on improving the quality of just one species.

To summarize the Mediterranean experience, we can highlight the key factors that have led to more sustainable and greater quality product. These are:

- Professionalism
- Experience gained from the species and the systems
- Technology – has been improved
- Nutrition/biology – more knowledge gained regarding species specific biological requirements as well as nutritional.
- Tools – have been developed for better monitoring and control of the hatchery process

In other words, the process can now be standardised, which is something that simply could not have been done during the early years of production development.

A second example of how an individual hatchery may undergo the industrialization cycle can be seen at GreatBay Aquaculture in the USA. Some typically steps in the industrialisation process can be illustrated by their experience in developing hatchery production of cod where they have seen survival increase from a very low level to 40% in 6 years.

Early on, the following impediments to production were identified:

1. Feeding regime and schedule
2. Special environmental requirements
3. Swim bladder complications

As a result, focus was put on the following points in an effort to overcome these early obstacles:

1. Improved live feed production & enrichment
2. Installation of Industrial recirculation system
3. More optimised feed regime and weaning programme
4. Implementation of passive grading system
5. Improved light management

After some years of steady improvements the hatchery has reached a level of reproducible survival of around 35-40%. This allows standardisation of protocols leading to predictable levels of survival.

Conclusions

- The hatchery is an artificial system that needs to be optimised and controlled to maximise biological potential of the species
- There is much practical experience about hatchery processes that can be learned from other species being produced around the world
 - Species-specific requirements can then be further developed locally
- There is always an underlying importance of nutrition at all stages of production
 - This includes feed composition, feed intensity vs water quality
- Focus on industrialisation
 - Scale-up
 - Consistency
 - Standardisation

ADVANCES IN HATCHERY TECHNOLOGY

*S. Kolkovski, J. Curnow and J. L. King
Research Division, Department of Fisheries, Western Australia,
P. O. Box 20, North Beach, WA 6920, Australia.*

Introduction

Larvae culture in general and specifically larvae nutrition are considered to be the 'bottle-necks' for marine finfish culture. Fish larvae rearing experiments are carried out in various systems, from small beakers to very large commercial tanks, making it difficult to compare data across systems. A need for a standardized, easily replicatable system is evident.

A continuous supply of live or dry feeds and a controlled environment i.e. temperature, filtration, photoperiod, oxygen and pH, are essential for any experimental or commercial system. These environmental factors are best controlled automatically in order to minimize variation between tanks and between experiments. However, only a few automatic systems have been developed for marine finfish hatcheries.

In commercial intensive hatcheries around the world fish larvae are reared in tanks varied in shape, volume and construction materials. These differences can contribute to higher or lower survival and growth of larvae.

Tank shape, aeration and water supply dictate the hydrodynamics of the tank. These in turn affect the accumulation and suspension of organic matter in the water, distribution of food (live and dry), larvae swimming and aggregation, dissolved oxygen and other environmental parameters. These factors strongly affect the survival and growth of larvae, as well as cannibalism and social behaviour. Although important, very little is published on the physical factors affecting fish larvae and in fact, on larvae rearing systems in general.

In recent years, the authors have developed several systems that have taken these factors into account and integrated them into rearing systems for marine fish larvae. Included in the design are the necessary components for larvae culture i.e. larvae tanks, live food delivery, microdiet (MD) feeders and adjunct live food enrichment system. All systems are automatic or semi-automatic and have the flexibility of multi-rearing protocols i.e. individual feeding regimes for groups of replicated tanks.

Recently, a commercial system was developed looking at reducing larvae stress upon transfer from hatching tanks to the rearing tanks. An aeration system was incorporated into the rearing tank reducing larvae stress and increasing the food distribution in the tank.

The paper will describe these systems as well as other essential components in marine fish hatcheries becoming a standard in recent years.

Water treatment

Probably the most essential aspect in hatchery design is providing exceptional water quality. There are two main types of treatment, physical removal of particulates and chemical polishing. There are many systems and methods to remove particles from water. Over the years, different mechanisms have been developed in an attempt to filter any sized particles from the water. Many systems that are available today are virtually 'maintenance free' (Table 1). Huguenin and Colt (2002) describe the different filter systems suitable for various sized particles and flow rates. In particular disk filters are an innovative, very effective and space efficient filtration method.

Table 1

Maximum filtration	Flow rate			
	<1 gpm (<0.24 m ³ /hr)	1-10 gpm (2.4 m ³ /hr)	10-100 gpm (24 m ³ /hr)	100 – 1000 gpm (240 m ³ /hr)
< 1 µm	Cartridge filter, diatomaceous earth	Cartridge filter, diatomaceous earth	Diatomaceous earth	Diatomaceous earth
1-10 µm	Cartridge filter, cyclones	Cartridge filter, cyclones	Cyclones, sand filters	Filter bags, sand filters
10-75 µm	Filter bags, cyclones	Filter bags, cyclones, sand filters	Filter bags, cyclones, sand filters	filter bags, cyclones (modular), sand filters
75-150 µm	Filter bags, microscreens	Filter bags, microscreens, sand filters	Filter bags, microscreens, sand filters	microscreens
150-1000 µm	Filter bags, microscreens	Filter bags, microscreens, sedimentation	Filter bags, microcreens, sedimentation	microscreens

Disk filters

Standard screen filters have only one layer of filtration, limiting the amount of filtration. However, multiple layers of filtration will have a higher probability of capturing any given particles.

Disk filters such as 'spin clean®' (Arkal Filtration Systems) are built to take advantage of this principle. The filters are based on a number of stacked filter disks (Figure 1) that water is passed between. Each disk has 18-32 stopping points created by the crisscross of the grooves on the surface of the disks. This is the equivalent to 18-32 screens in series. Filter disks are also very efficient in utilizing space due to their compact size.

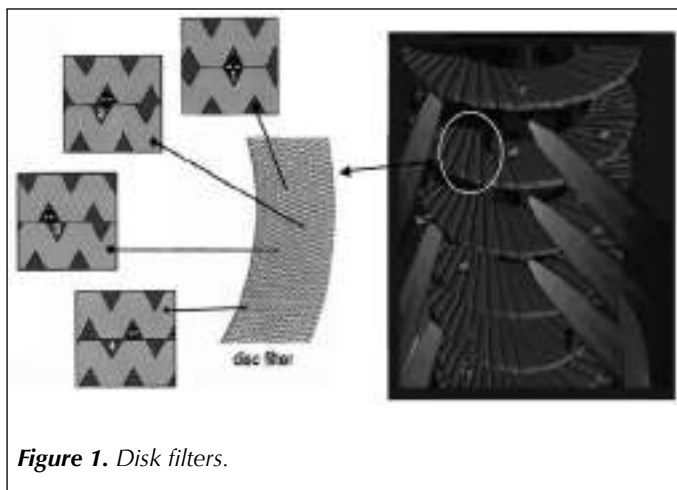


Figure 1. Disk filters.

Automatic backwashing based on a pressure differential across the filter and/or time makes them maintenance free. These filters are gaining popularity in many marine and fresh water aquaculture facilities (Figure 2). However, the filters need high-pressure when backwashed, which dictates the need for a large pump. This is due to the fact that the disks are tightened by a spring and the water pressure needs to press the spring up to release tension on the disk so the backwash can rinse them effectively.

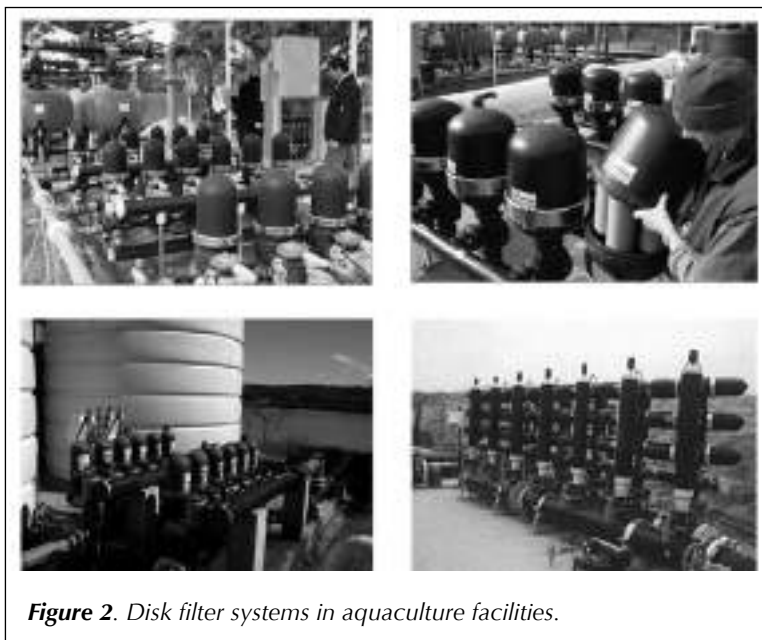


Figure 2. Disk filter systems in aquaculture facilities.

De-gassing column

Generally, when water is sourced from the ocean the only pre-treatment needed is to remove particulates. However, due to unpredictable environmental conditions and fluctuating sediment loads on filtration systems, marine hatcheries (in Australia) are increasingly drawing water into their facilities through marine water bores. This water is often relatively particle and bacteria clean because it is sourced from porous rock and coarse sand sediments that act as the filtrate,



Figure 3. De-gassing column.

however these substrates can adversely alter the chemistry of the water. Bores often provide water low in dissolved oxygen and pH and high in nitrogen and carbon dioxide gases that cause difficulties often resulting in mortality in marine fish brood-stock and larvae. However, a simple method of passing the water through a gas exchanger has been developed in order to restore these chemical properties to a state of equilibrium that is found in natural systems (Figure 3).

A gas exchange column is a vertically orientated cylinder with internal layers that uses gravity to split water into fine droplets through a series of cascades and obstacles, and further allows an opposing air current to contact these droplets. Air is passed upwards at a rate of 20 times the flow of the falling water. By creating smaller water droplets in an opposing current reactor the gas exchange surface area increases exponentially, and is significantly more effective than passing air through a body of water by diffusion, such as aeration in a tank. This process generally requires a retention time of around ten minutes to reach a state of equilibrium, however, by using multiple columns to cover the hatchery water demands this method of water conditioning is both space and cost effective method.

Larvae rearing system (R&D)

The system includes twenty-four 270 l conical tanks with up welling or bottom draining flow through water dynamics (Kolkovski *et al.*, 2004a, Figure 4). The inlet water passes through a gas exchange column (Figure 5) that saturates the water with dissolved oxygen (DO) and stabilizes the pH. The gas exchange column is extremely efficient in saturating the inlet water with DO (from $43\% \pm 2\%$ to $103\% \pm 2\%$ at 20°C). It also removes other gases such as carbon dioxide, which increases the water pH (pH 7.6 to 7.95) and nitrogen, to prevent super saturation and gas bubble disease prior to the water reaching the tank. This eliminates the need for vigorous aeration inside the tank, which may stress fragile fish larvae.



Figure 4. R&D larvae rearing system.



Figure 5. De-saturation column.

The system was originally designed for nutritional experiments using formulated feeds and the use of an up-welling water inlet method extends the suspension time of inert particles in the water column. The system enables the operator to change the water flow direction from up welling to bottom draining as the larvae grow and metamorphose into juvenile. A unique outlet filter (Figure 6) was developed that eases the daily routine of replacing screens when enriched live food is used (Kolkovski *et al.*, 2004a). The filter is made from PVC foam and is square shaped. The sides of the box are open in order to allow the screens to slide into place using grooves cut into the inside of the box. There are several mesh size screens ranging from $49\mu\text{m}$ to $500\mu\text{m}$ for 'day' and 'night' use as well as for different larval stages. At the bottom of each side of the filter



Figure 6. R&D larvae rearing system.

box there is a porous tube, which provides an 'air curtain', in order to prevent the screens from becoming blocked. This filtration design not only acts as a filter, preventing larvae and live and/or dry food to be flushed from the tank, it also acts as a surface skimmer, preventing an oil film on the water surface. A clean water surface facilitates swim bladder inflation, promotes better growth and survival, and reduces deformities.

The larvae rearing system is built as a flow-through green-water system, meaning that a constant supply of algae is needed (Moretti *et al.*, 1999). Coupled with the need for a constant supply of live feeds (rotifers and *Artemia*), which is time consuming. Therefore an automatic distribution system was developed. Four separate identical feeding systems were installed; each is comprised of a 1000 l conical FRP tank. A submersible pump in each tank is connected to one distribution line (20 mm PVC pipe).

The distribution line is built as a ring surrounding the larvae rearing tanks and via a 'step-up' overflow; the line ends above the feeding system tanks for the return of algae and live food. To compensate for the pressure gradient generated by the pump and backpressure within the manifold, a 'relative outlet height gradient' strategy was adopted. That is, vertical 20 mm pipes are connected to the main line above individual tanks, each have a 4 mm outlet at specific heights above the pump tank, relative to the head pressure generated by the pump at that location. The outlets are constructed from a 4 mm elbow fitted to the vertical pipe at the required level. Clear tubing directs the algae / live food from the elbow outlet to the water surface in order to prevent splashing.

During the process of filling the distribution line, pump pressure is not enough to raise the algae in the vertical columns to overflow levels, until the algae in the pipe reaches the main return 'step-up' overflow, which creates additional back pressure in the line. This gives an equal increase in pressure across all the outlets, simultaneously raising the algae in each vertical pipe to their respective delivery level. A constant and even flow throughout the system is generated, resulting in less than 5% variation (between the tanks) of algae and live food delivered to the tank.

Since the system is not pressurized, live food is not damaged passing through the open impeller pump and the distribution lines. At the end of the feeding interval, all the algae and live food is drained from the feeding line to the tanks and back to the live feed tanks, through the pump.

The entire larvae system is controlled by a single programmable logic controller (PLC). Light intensity, photoperiod, dimming time, live food and algae pumping intervals are all automated, substantially reducing labour requirements.

Artemia hatching and enrichment system

Live food such as *Artemia* is considered to be an essential part of any marine finfish hatchery. Standard methods have been developed for hatching cysts and enhancing the nutritional value of the *Artemia* nauplii by using different enrichment products. Although there are a variety of commercially available products in the market, further research on more specific enrichments to meet specific nutritional requirements in finfish larvae is still required. A simple, compact experimental system was developed in order to provide a reliable platform for nutritional experiments for a variety of live food organisms (Kolkovski *et al.*, 2004b, Figure 7). The system was built as a compact, all-in-one unit consisting of eight 50 l conical tanks situated within a temperature controlled water bath. This arrangement reduces variation between the replicates (tanks) resulting from individual heaters and aeration. It reduces the manpower needs via simple procedures for harvesting, washing and refilling all of the tanks synchronously and allows automated addition of enrichments.

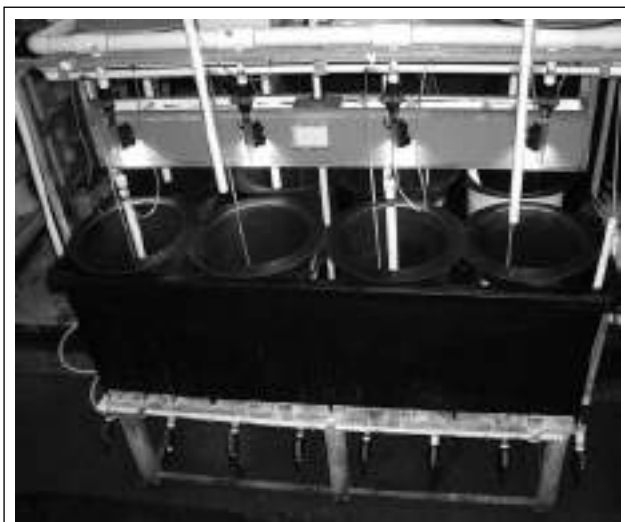


Figure 7. *Artemia* hatching and enriching system.

It also includes switchable bottom (submerged in the water bath) or upper lighting to help concentrate the *Artemia* nauplii during harvest. The system has been used for a variety of experiments, comparing commercial and experimental enrichments, bacterial monitoring and evaluation of different *Artemia* procedures.

Automatic microdiet feeding system

Currently there are very few, if any, commercially available feeders that are able to continuously dispense small amounts of MD. The ones that are available are designed mainly for the ornamental market rather commercial fish hatcheries, or they are too large and suitable only for relatively large amounts of large diet particles. The automatic MD dispenser (AMD™, Figure 8) is designed to periodically administer a small amount of MD (20 – 80mg) to larvae rearing tanks, in order to spread the allocation of the required daily amount of feed evenly across the whole day. This prevents the need to manually feed the larvae, and provides a more constant availability of feed across the whole photoperiod, and outside of working hours. This should also reduce opportunities for bacterial proliferation on unconsumed feed particles. The feeder can cope with a diet particle size range between 70µm and up to 1.5mm. Each feeding event, the same amount of MD (\pm 1%) is released without the need to weigh the diet each time. The AMD's are PLC controlled and can be programmed to any feeding interval schedule needed. The AMD mechanism is based

on two stainless steel slotted plates. One is static and the other slides above it via solenoid control. In a normal position the slots in both plates are covered preventing the MD from spilling into the tank. When the solenoid is activated, the top plate slides and aligns the slots as it passes. At that time the MD particles drop into the tank.

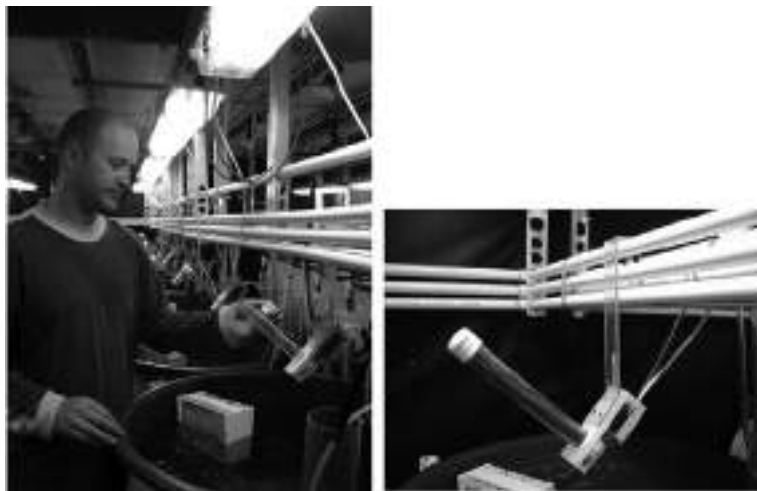


Figure 8. Automatic microdiet feeding system.

When the solenoid is activated, the top plate slides and aligns the slots as it passes. At that time the MD particles drop into the tank. A manifold jets constant airflow beneath the plates in order to scatter the MD particles across the water surface. The AMD system is suitable for research and/or a commercial hatchery, giving flexibility for different feeds and feeding protocols.

Commercial rearing system

Hatching tank

The hatching tank is a tall conical bottomed tank where neutrally buoyant pelagic marine fish eggs are held until they hatch. Ideally the eggs are held within the water column and are prevented from touching the sides and bottom, which can cause abrasion and bacterial infections, leading to death. A new design that has changed the water dynamics of typically used hatching tanks has been described. A 1 tonne up welling conical tank 1100 mm in diameter and standing 1700 mm tall has been used as an example, although the tank itself is not unique, the flow through characteristics are.

The inlet water passes down in opposition to vigorous fine aeration through a gas exchange column, with an air diffuser at the bottom and filled with bio media in order to prolong contact time. The column is 2 m tall, 100 mm diameter and positioned so that half the length is above the tank water level, which helps to generate pressure at the inlet to the hatching tank. This design efficiently saturates the water with dissolved oxygen (DO) and stabilizes the pH, similar to those reported by Kolkovski *et al.* (2004a), however scaled up in size.

After passing through the gas exchange column the inlet water enters the tank through the centre bottom apex of the cone. It immediately passes through a horizontal diffuser that jets the water outwards along the bottom surface towards the tank walls. At the cone/wall interface porous tubing diffuses gentle aeration adjacent to the walls around the entire internal circumference of the tank. This system establishes a circular current up welling at the circumference and drawing down in the middle of the tank and then outwards at the bottom. The tank is taller than it is wide, which provides more efficient current generation using aeration with a longer up welling distance and permits relatively gentler aeration, effectively mixing the water column and keeping the eggs in suspension. The water then passes out of the tank through an air-cleaned 250 μm mesh size outlet screen immediately below the surface.

This system is especially suited to yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) eggs that become negatively buoyant just prior to hatching. At this critical stage of development in previous hatching tank configurations, where a single air diffuser was situated at the centre apex of the bottom cone, the water dynamics were not sufficient to keep the eggs in suspension. The eggs tended to settle to the bottom, die and become a source for bacterial proliferation. The up welling design described allows a much greater flow rate through the tank, which improves both water quality and water dynamics, when compared to static or top filling tanks.

Comparisons of hatching efficiency were conducted using yellowtail kingfish eggs, and the current design attained 88-95% of viable eggs being hatched and surviving to 5 dph, whereas the previous configuration achieved <10% hatch efficiency.

Larvae transfer

After 1.5 days posts hatching the larvae are ready to transfer to the larvae rearing system. Traditionally, harvesting larvae is done by bottom draining into buckets or through collection screens in order to concentrate the larvae, and then manually moving them. The current hatching tank design, allows the larvae to be passively transferred over a 3 to 4 hour period directly into the larvae-rearing tank, with no handling and minimal stress on the larvae.

Method

After the tank is allowed to stand without aeration for 15 min, the unhatched eggs and the debris from hatched eggs separates out of the water column. Some settles down but most floats to the top. The outlet screen is replaced by a down turned elbow and an open pipe extending to the centre of the water column. This channels water and larvae without transferring additional debris.

A large diameter (≥ 40 mm) flexible tube is extended from the larvae rearing tank (with the end held beneath the water surface), filled with water by siphon, and then attached to the hatching tank outlet. The hatching tank inlet water is then simply turned on to allow a passive transfer of larvae across to the larvae-rearing tank. The larvae are retained in the rearing tank, as the transfer water flows through the outlet of the rearing tank, via a 250 μm air-cleaned outlet screen.

In order for the method to work, the open end of the down turned pipe in the hatching tank must be lower than the water level in the rearing tank, and the water level in the rearing tank must not be above the height of the hatching tank. The water level in the rearing tank can be adjusted by using a siphon outlet tube from within a screen in the rearing tank to a bucket next to the rearing tank, with its' surface level maintained at the desired height.

This method of transfer is extremely gentle on the larvae and continues to operate with little effort, as long as the integrity of the siphon continues. For the complete transfer of larvae (> 95%) to the rearing tank approximate of 10 times the hatching tank volume needs to be passed through the system.

Larvae rearing tank

A larvae-rearing system designed for culturing pelagic marine species that are sensitive to poor water quality and bio fouling, is described (Figure 9). The system is a self cleaning up-welling larvae rearing tank operated as a flow through multi-faceted system, including inlet water treatment, automated algae and rotifer dosing and rotifer recovery adjunct systems. Basic automatic lighting and temperature controls are also used, but are not unique to this system.

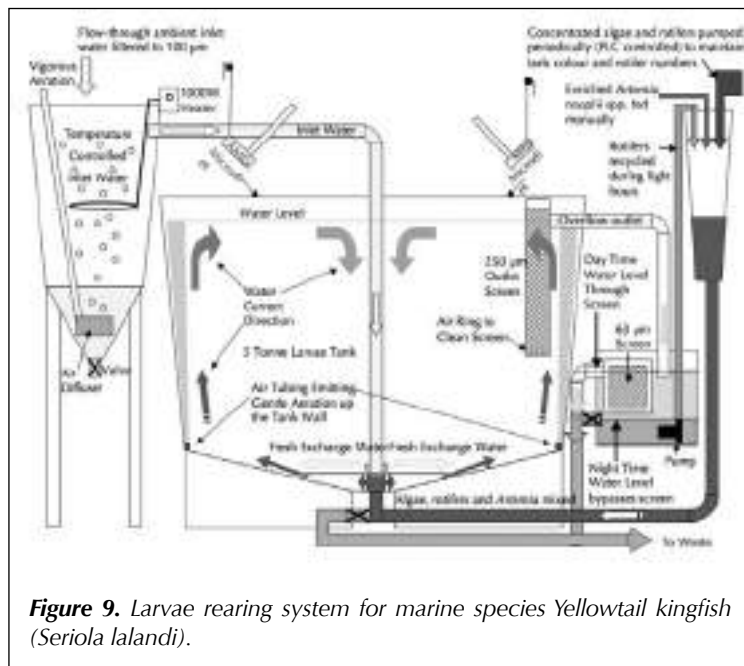


Figure 9. Larvae rearing system for marine species Yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*).

The hydrodynamics are similar to those in the hatching tank, whereby the inlet water passes into the tank at the apex of the conical bottom and is jetted outwards towards the tank wall. At the cone/wall interface a continuous porous-tube ring is situated around the circumference of the tank that delivers gentle up-welling aeration adjacent to the wall. The water current moves towards the centre of the tank at the surface and then draws down towards the bottom, where it is again propelled outwards. The inlet water jets are directed adjacent to the bottom, which helps to prevent the settlement of organic wastes and promotes self-cleaning characteristics.

Inlet

Clean seawater is introduced to the tank via an external vigorously aerated and temperature controlled holding tank. This tank is situated above the level of the larvae-rearing tank, and an overflow is taken from it, across and down to the centre bottom of the larvae tank, where it is jetted outwards into the water column. This preconditions the seawater so that it is well oxygenated and pH stable.

A flat disc made from poly vinyl chloride (PVC) plastic is situated below the inlet, which extends one quarter the radius of the tank bottom. This disc is kept clean from debris by the current generated by the clean seawater inlet. The disc is positioned there to direct recirculating 'rotifer return and algae' water being introduced to the larvae-rearing tank from below.

Rotifer return system

An adjunct screen system that is designed to return rotifers to the larvae-rearing tank is situated in line after the larvae-tank outlet screen. The outlet screen is 250µm mesh size so that the larvae remain in the tank, but rotifers and waste are removed. Outlet water is captured in the adjunct tank, which has a bigger and more vigorously aerated 61µm mesh size screen that retains the rotifers and is less likely to block. The amount of aeration needed to keep this screen clean would damage sensitive marine fish larvae and therefore it is more appropriate in an external tank. Mo-

reover, if the rotifer screen does block it will only overflow the rotifer return tank and no larvae will be lost.

The water from this tank is pumped, using a 2500 l h⁻¹ open impellor pump, back into the larvae rearing tank via an upturned open-ended pipe connected to the bottom centre of the larvae tank. This return water is introduced to the rearing tank below the central PVC disc, which directs the water outwards towards the tank wall through a 3 mm gap between it and the tank bottom. The current generated by this water flow helps to keep the remaining tank bottom clean.

During daylight hours this system returns water/rotifers from behind the screen, however at night a bypass valve is opened and rotifers are flushed to waste. This keeps the larvae in contact with freshly enriched rotifers during the day and removes uneaten rotifers, depleted in nutrients, during the night. The pump operates continuously to maintain the self-cleaning water dynamics of the rearing tank.

Algae and enriched rotifer dosing system

A second adjunct system is used to periodically pump concentrated algae and enriched rotifers into the larvae-rearing tank in order to maintain algae density and rotifer numbers. Algae otherwise flushes through the flow through larvae-rearing tank with the introduction of clean seawater and a constant supply of rotifers are needed to keep up with larval demands.

The system is comprised of two 1 tonne tanks. The tanks work in alternate days. Each day one tank is used to pump algae and rotifers, while the other is static over night containing concentrated live algae, HUFA enriched algal paste and rotifers, being held for the next day ration. A single PLC is used to control the open impellor pumps and AMD's that are situated over the larvae-rearing tank for microdiet feeding.

The algae/rotifer mix is pumped into the larvae-rearing tank via the rotifer return pipe, connected to the middle bottom of the tank below the distribution disc. *Artemia* nauplii can also be fed to the larvae via this tank inlet, which distributes them more evenly into the up-welling currents, where the larvae generally linger.

Before the lights are automatically ramped up half of the days algae and rotifers are pumped into the larvae tank. This colours the water green and introduces enriched rotifers for the larvae to start feeding as soon as it is light. Following the initial pumping period the algae and rotifers are pumped periodically (eg. 7 min in each 30 min period) for the rest of the daylight hours.

Grading system

Cannibalism is a common phenomenon affecting survival and growth in several marine fish larvae, both tropical and temperate. It is a common behaviour for yellowtail kingfish larvae, *S. quinquerediata* (Mizuta, 1981, Sakakura and Tsukamoto, 1996), *S. dumerili* (Shiozawa *et al.*, 2003) and *S. lalandi* (Ebisu and Tachihara, 1993), although, *S. quinquerediata* and *S. dumerili* are considered to be more aggressive than *S. lalandi*. Cannibalism is observed even at low densities, in well-fed conditions, and among individuals of the same size (Sakakura and Tsukamoto, 1996, 1997b, 1998). It is considered that the aggressive behaviour of this species may not be an abnormal behaviour under extraordinary environmental conditions but a normal behaviour of healthy seedlings (Sakakura and Tsukamoto 1998). However, size grading can be effective in reducing cannibalistic behaviour in *Seriola* sp. At night time, juvenile *Seriola* sp. cease swimming and drift at the surface in the rearing tanks to form dense patches that are easily manipulated (Sakakura and Tsukamoto 1997b). A grading system was developed for *S. dumerili*, which takes

advantage of this phenomenon (Shiozawa *et al.*, 2003), and utilizes the same basic idea as the larvae transfer technique (Figure 10). Specifically, a siphon tube connects two tanks, with the end in the second tank placed underwater inside a floating cage, into which the larvae are transferred. The cage mesh size enables the smaller larvae to escape into the tank, while it retains the bigger ones. As the larvae grow the mesh size is increased accordingly. Shiozawa *et al.*, (2003) reported that size grading at night improved total production of juvenile *S. dumerili* by 150-300%. This size-grading method is also effective in *S. quinquerediata* (Yamazaki *et al.*, 2002) however; it is less effective with *S. lalandi* that have a different behaviour and do not tend to float at night (Kolkovski, Curnow and King, pers. Comm.).

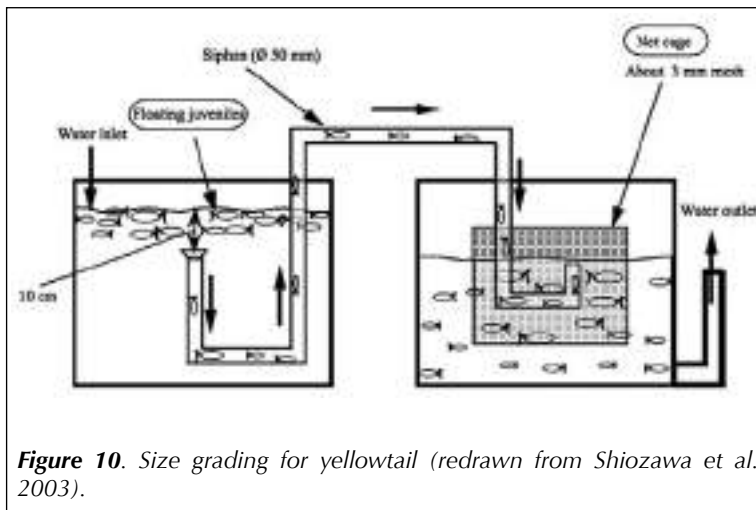


Figure 10. Size grading for yellowtail (redrawn from Shiozawa *et al.*, 2003).

BIBLIOGRAPHY

- Curnow J., King J., Partridge G., Bosmans J., Karlsrud T., Kolkovski S. (2004) *The effect of various co-feeding and weaning regimes on growth and survival in barramundi lates calcarifer larvae*. Australasian Aquaculture Symposium, Sydney, Australia, 110 pp.
- Ebisu, R., Tachihara, K. (1993) *Mortality caused by cannibalism in seed production of gold striped amberjack *Seriola lalandi**. Bulletin Nagasaki Prefecture Institute Fisheries 19,
- Salhi, M., Hernández-Cruz, C.M., Bessonart, M., Izquierdo, M.S. Fernández-Palacios, H. (1999) *Effect of different dietary polar lipid levels and different n-3 HUFA content in lipid on gut and liver histological structure of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae*. Aquaculture 179, 253 – 263. (in Japanese).
- Huguenin, J.E., Colt, J., (2002) *Design and Operating Guide for Aquaculture Seawater, second edition*. Elsevier 328 pp.
- Kolkovski S., Curnow J., King J., (2004a) *Intensive rearing system for fish larvae research – I. marine fish larvae rearing system*. Aquaculture Engineering 31, 295 – 308.
- Kolkovski S., Curnow J., King J. (2004b) *Intensive rearing system for fish larvae research – II. Artemia hatching and enriching system*. Aquaculture Engineering 31, 309 – 317.
- Kolkovski S., Curnow J., King J., Partridge G., Southgate P. (2004c) *Fish larvae diets, replacing imported Artemia – FRDC research project*. Australasian Aquaculture Symposium, Sydney, Australia, 181 pp.
- Mizuta, Y. (1981) *On the seedling production of Buri, *Seriola quinqueradiata**. Saibai Gyogyo Gijyutsu Kaihatsu Kenkyu (Technical Reports of Japanese Sea Ranching Programs) 10, 85 – 97. (in Japanese).
- Moretti, A., Fernandez-Criado, M.P., Cittolin, G., Guidastri, R. (1999) *Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream, volume 1*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, Rome. 76-79.
- Sakakura, Y., Tsukamoto, K. (1996) *Onset and development of cannibalistic behaviour in early life stages of yellowtail*. J. Fish Biology 48, 16 – 29.
- Sakakura, Y., Tsukamoto, K. (1997a) *Age composition in the schools of juvenile yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, associated with drifting seaweeds in the East China Sea*. Fisheries Science 63, 37 – 41.
- Sakakura, Y., Tsukamoto, K. (1997b) *Effects of water temperature and light intensity on aggressive behaviour in the juvenile yellowtails*. Fisheries Science 63, 42 – 45.
- Shiozawa, S., Takeuchi, H., Hirokawa, J. (2003) *Improved seed production techniques for the amberjack, *Seriola dumerili**. Saibai Giken 31, 11 – 18. (in Japanese).
- Yamazaki, H., Shiozawa, S., Fujimoto, H. (2002) *Present status of seedling production of yellowtail at the Japan Sea Farming Association*. Suisanzoshoku 50, 503 – 506. (in Japanese).

RECIRCULATION SYSTEMS FOR THE HIGH DENSITY ROTIFER CULTURE ON COMMERCIAL SCALE

Introduction

Aquaculture is a growing industry worldwide. Salmon and trout are the main species for fish aquaculture in Norway, but both governmental and industry interests have put focus on Atlantic cod in order to be a future commercial aquaculture species. An industrial aquaculture production of cod needs a stable year-round production of cod fry of high quality. The general feeding regime of Atlantic Cod as described in Olsen (2004) still the use of rotifers in the earliest phase is vital for the first feeding success. The cod hatcheries are dependent of predictable production of high amount of high quality rotifers over a period of 20-40 days before the cod larvae can be fed other feeds (*Artemia* or formulated diets). Predictable production of sufficient amount of rotifers is a bottleneck for many commercial hatcheries, and the hatcheries often struggle with sudden crash of the rotifer cultures and high production cost due to labour intensive production methods.

Rotifers, as used in intensive fish feeding protocols, are not the natural feed for cold water fish larvae as Atlantic Cod, and the nutritional quality need to be adjusted to fit to the requirements of cod larvae. Since the rotifer *Brachionus plicatilis* was started to be used as feed organisms in Japan for more than 40 years ago, considerable work has been done to develop production and enrichment methods in order to secure the nutritional quality of the rotifers (Lubzens *et al.*, 1989, Olsen 2004). Different feeds and emulsified enrichment products are developed for used in production and enrichment protocols of rotifers. Today, the important challenge is to develop cost effective production technologies for rotifers that minimize the labor and secure predictable production of high quality rotifers.

Dhert (2001) has reported that very few modification or improvements on the culture techniques of rotifer have been proposed on a commercial scale (Abu Rezaq *et al.*, 1997, Yoshimura *et al.*, 1997) and in general, European hatcheries still rear rotifer in batch system with little attention for water quality. Under these batch culture conditions rotifers are seldom exceeding 600 individuals/ml and subjected to repeated water renewals to maintain an acceptable water quality. Among the most frequently reported problems are: unpredictability to manage and harvest large rotifer populations, difficulty to manage and harvest large rotifer populations and difficulty to producing a clean rotifer. The background for this new project is to find method for stable and predictable rotifer production, where monitoring and automation processes give cost effective production of high quality rotifers.

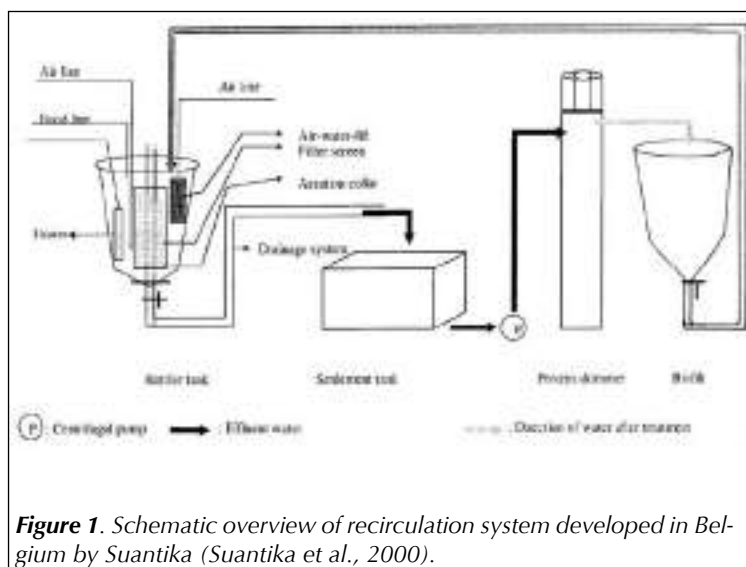
SINTEF Fisheries and Aquaculture have the last 5 years built up three different recirculation systems for production of rotifers. The first one consisted of 4 vessels of 250 L each with a filter system inside each of the tanks. This system was able to produce about 0.8 billions rotifers during 21 days. The second system consisted in a 3000 L culture suited with an external tambour filter with two discs which was able to produce 1.35 billions rotifers per day but the system was somewhat unstable after day 16. A more stable culture for longer period of time if necessary in order to assure that enough supplied of rotifers for a cod fish farm.

Production of live feed organisms as rotifers in cultures induce growth of bacteria. The intensive cultivation technology including high temperatures and supply of feed/organic material creates conditions that favour dominance of opportunistic bacteria (Skjermo and Vadstein, 1993). These bacteria cause infections of larvae, followed by poor growth and high mortality, which is one of the most serious problems in hatcheries for many marine species in aquaculture. Good hygiene and correct feed is important in the production of high quality rotifers, but fish farmers are normally not able to monitor the microbial communities of live feed, water and larvae, and must rely on production technology recommended by equipment vendors and feed producers. When rotifers are produced in a recirculation system there are risks for accumulation of nutrients and increased growth of opportunistic microorganisms, if the system not is well managed. On the other hand, Suantika *et al.*, (2003) showed that the total bacterial numbers as well as the number of *Vibrio* decreased during the production of rotifers in a recirculation system. One result from using recirculation systems for production of rotifers are therefore cleaner rotifers to be fed to the larvae, if the system is optimised and run according to its capacity.

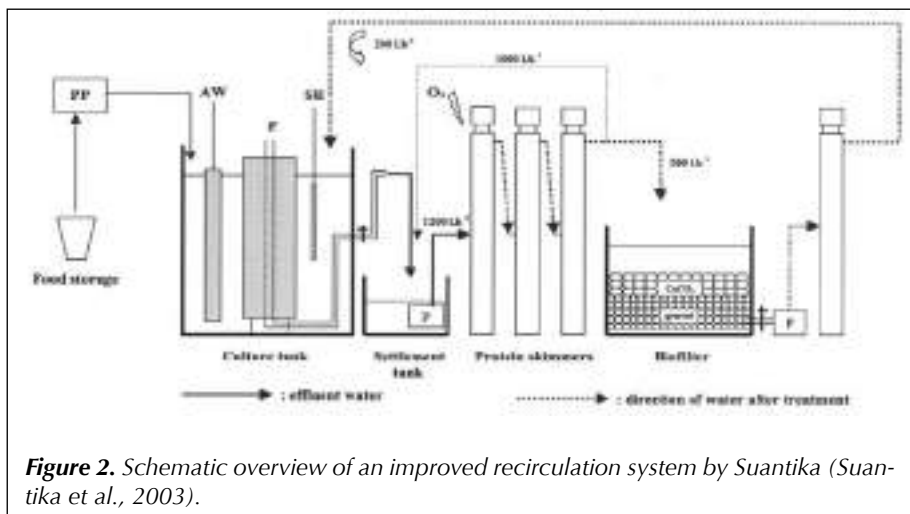
A new recirculation system for rotifers should be automated to simplify operational factors in a cod hatchery and at the same time the system should assure rotifers of high quality which could cover the nutritional requirements of cod larvae.

The Belgian System

The Belgian system was the pioneer system in this kind of rotifers production. It was developed in Gent (Belgium) by G. Suantika (Suantika *et al.*, 2000). A schematic view of this system can be seen in Figure 1. The rotifer size was $150 \pm 15 \mu\text{m}$ the culture reached densities of 7000-22000 rotifers/ml. One of the weak points of these systems was the cleaning filter system which was placed inside of the tanks of the rotifers. For more information of this system see Suantika *et al* 2000 and CRAFT project 2003.



The system was improved in 2002-2003 (Figure 2) and in this system three proteins was used and cultures tanks were bigger than in the former system.



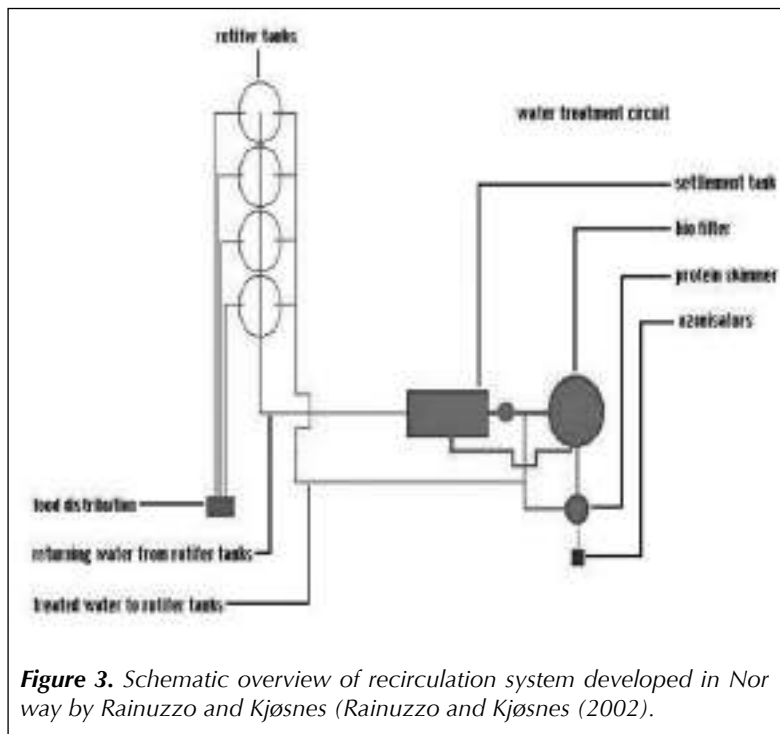
The Norwegian systems Model 2001-2003

Description of the system

The first system developed by SINTEF Fisheries and Aquaculture differed from the first Belgian system in that way that after the settlement tank, the water stream was divided in three directions. One tube was leading to the biofilter, another one to the protein skimmer and a third one to the rotifer tanks. After the biofilter and the protein skimmer water was also returning to the settlement tank or to the rotifer tanks. This allowed a high percentage of treated water in the settlement tank while in the Belgian system the settlement tank contained 100% untreated water. Ozone was applied to water in the protein skimmer. The water current is 0.17 – 1.0 litre /min. in each of the rotifers tanks so the whole water volume in these tanks are treated 6 times a day. In the water circuit the water is circulating at 100 litre/min from the settlement tank through the protein skimmer and biofilter before is coming back to the settlement tank.

The recirculation system consist in the following components: (figure 3)

- a. Four 250 L rotifers tanks
- b. Settlement tank
- c. Protein Skimmer
- d. Biofilter
- e. Feeding system



Rotifers and settlement tanks

The production is taking place in 4 rotifers tanks each of 250 litre (Figure 4). In the rotifers tanks is placed a filter consisting in nylon net mounted in frame of polyethylene (Figure 5). From the rotifers tanks the water circulate across this net, through a tube level which allow having a constant level of water in these tanks. The net hinder at the rotifers go out with the water from the tanks. It is important to create water current along the side of this filter box to hinder that the mesh of the net is blocked up. This is done by placing a diffusion hose at the borders of the filter box in such a way that the air will make air bubbles creating a water current going up along the net.



Figure 4. the tanks are circular with conical bottom. The upper diameter is about 70 cm, height 100 cm, and volume 250 L.

A particles removal was also placed in each of the rotifer tank (Figure 6). The idea was to remove big feed particles from the rotifers tank.



Figure 5. The net of nylon, with mesh of 64 μm , with area of about ca 0.15 m^2 .

Figure 6. Particle removal works after the "air lift" principle.

Protein skimmer and ozone addition



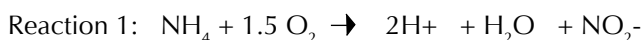
Figure 7. Ozone is added through a venturi pump on the protein skimmer. Protein skimmer has a capacity up to 50 litre/min and have two venturi pumps which deliver 100 mg O_3 /hour from the two pumps (Sander Ozonisorator 100).

From the settlement tank is pumped up water at 50 litre/min through the protein skimmer. This is done in order to remove proteins and particles from the water before are reaching the biofilter. With the help of a venturi pump is added a mixture of air and ozone which result in micro bubbles along the water column of the protein skimmer. The micro bubbles are fixed to the particles in the water and are moved up to the top of the protein skimmer. Here all the contaminated particles are accumulated as foam which is removed as is needed (Figure 7). The addition of ozone kills microorganisms and at the same time increases the micro bubbles capacity to remove particles.

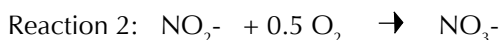
Biofilter

The objective of the biofilter is to remove ammonium and nitrite from the water through a nitrification process. This process happens on the chemical reactions with the help of two types of bacteria: *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. Ammonium is oxidized in the biofilter to the relative less toxic nitrate.

Nitrosomonas



Nitrobacter



Temperature, pH and oxygen are important parameters which must be controlled and regulated in order to have a good result with the biofilter. The nitrification rate increases with increasing water temperature and with increasing concentration of total ammonium (TAN) until a certain level. The oxygen is used in a nitrification process (see equations) thus it is very important that the biofilter has a good supply of air.

The biofilter consists in a tank of the form of a cylinder of about 700 litres, 80 cm of diameter and height of about 140 cm (Figure 8). The filter substrate is polyurethane balls of 2–3 mm of diameter. The volume of substrate is about 250 litres, which results in an area of about 200 m². The interior level tube allows that 60 cm of water is always in the tank. On the surface the substrate is allowed to move freely where a 50 cm layer is formed and where the bacterial activity occurs. On the bottom of the tank three air diffusers were placed. Through these diffusers 1 m³ air is supplied to the biofilter. This air will produce a powerful movement of the water mass and consequently the filter substrate, assuring that enough air reaches the bacteria. Water from the settlement tank (50 litres/min) is supplied to the biofilter with the help of a rotator arm working over the substrate, giving in this way a good water distribution in the biofilter. From the protein skimmer the water (50 litres per minute) comes into the biofilter under the substrate. In this zone there is a strong air bubbling allowing then to remove the rest of ozone from the water.

Feeding system

In order to reach high densities in the culture we need to assure enough feed for the rotifers. Thus, it is necessary to automate the feeding in a way that small portions are being added in short intervals. Such a system was built up in SINTEF Fisheries and aquaculture by placing the food in a suitable bowl placed in a refrigerator (Figure 9). The feeding is in constant movement due to a special constructed tube made on the top of the refrigerator. From the bowl containing the feed is connected a pump which will dose each of the rotifers tanks.

Production potential

This system produce about 0.5-0.7 billions rotifers (L-type) per day dependent on the feed quality and feeding regime.



Figure 8. Biofilter with rotator arm.

Figure 9. Feeding system.

Enriching results

The results of an average enrichment experiments show that with a recirculation system DHA, EPA and thus n-3 HUFA contents are higher than when the enrichment was carried out with a semi continuous flow through system.

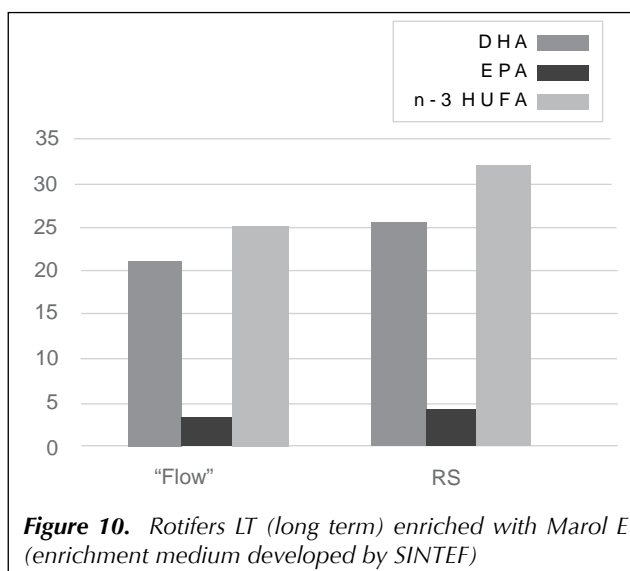
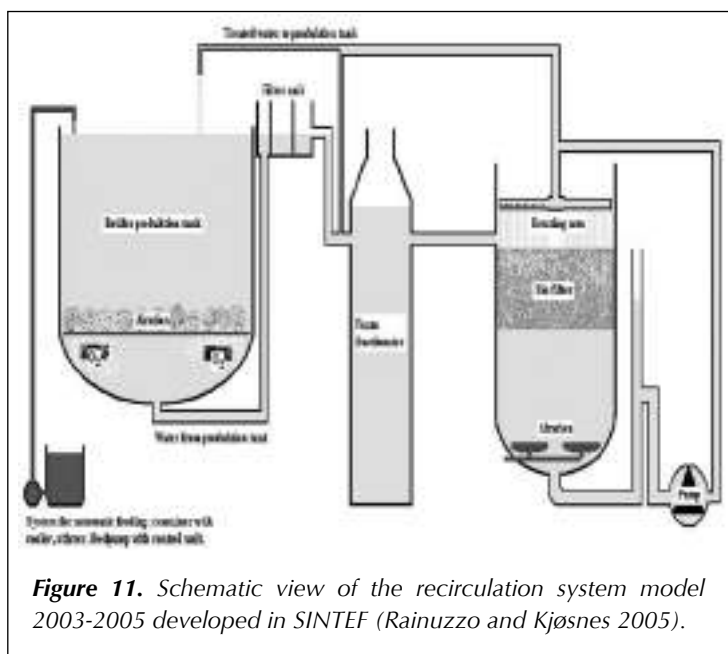


Figure 10. Rotifers LT (long term) enriched with Marol E (enrichment medium developed by SINTEF)

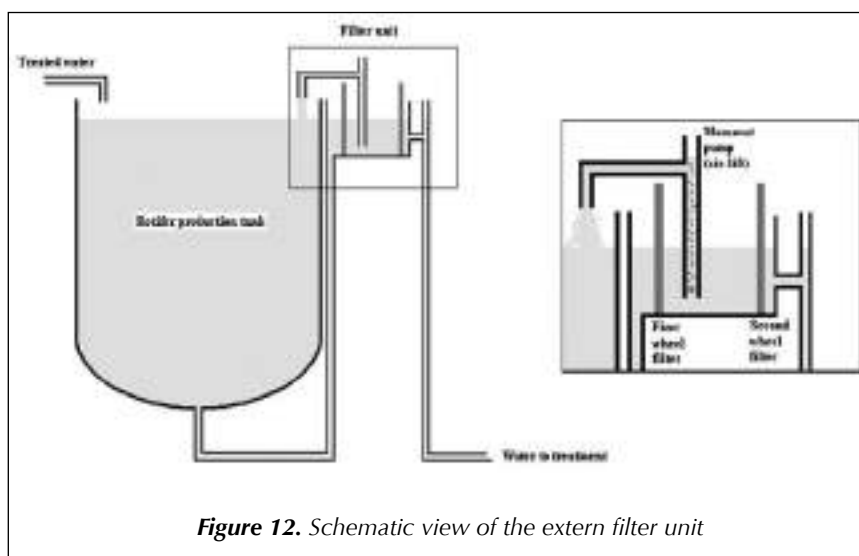
Model 2003-2005

The system consists basically of a production tank (3000 L), a feeding system for rotifers, an extern filter for rotifers, a foam fractionator (protein skimmer, model Helgoland 500, Sander, Germany) of 410 L and a bio-filter of 2000 L with polyurethane balls 2 – 3 mm in diameter as filter substrate (Figure 11). Ozone was produced by an ozoniser (model A2000 Sander, Germany) connected on the suction line of the venture of the protein skimmer.



The water (with rotifer culture) is brought from the bottom of the production tank by gravity to the filter unit (Figure 12). This filter contains two rotating filter wheels; the first one, with a mesh of 250 μm allowing the rotifers pass through, while the bigger particles are removed from the water by the continuous back washing. The second wheel filter with a mesh of 60 μm hinders that rotifers follows the water out of the system. From the chamber between the two filters wheels, concentrated and rinsed culture is brought back to the production tank by an air-lift.

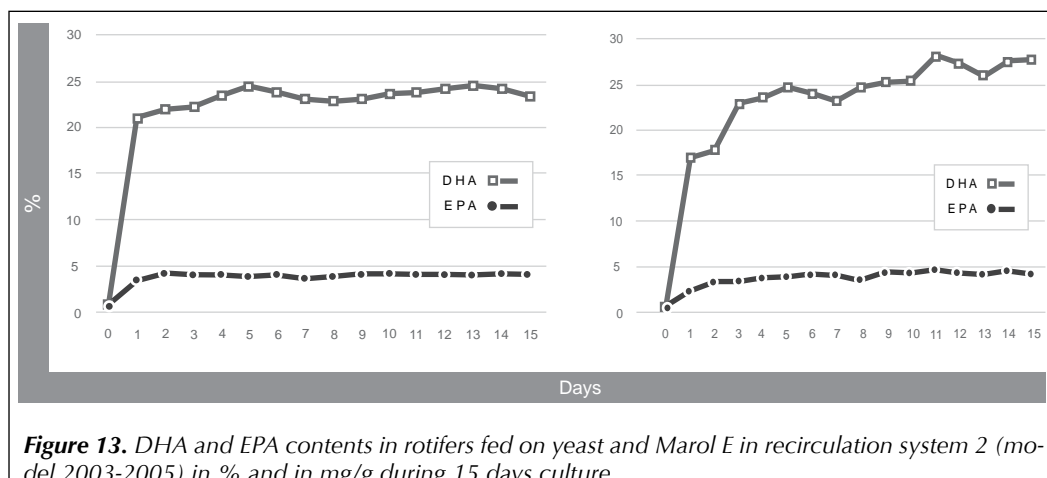
The recirculation flow rate of the system was of 300%. This means that the whole volume of water (3000L) was recirculated 3 times in 24 h.



The system has been tested using a rotifer culture of *Brachionus plicatilis* in a feeding experiment with bakers' yeast and Marol E (lipid emulsion, SINTEF, Norway) in a ratio of 20:1 respectively, during 15 days in a semi continuous production system at 25 °C and with a daily harvesting of 500 litres rotifers culture. Total ammonium (TAN), nitrites and nitrates (not shown in the table) was measured in the water running out from the outlet of the bio-filter by the use of a Hack DR 890 colorimeter instrument and was always quite under the toxic levels.

Some enrichment results

The content of DHA and EPA seems to be quite constant in % after day 4 of cultivation (Figure 13). In mg/g the content of DHA is more unstable during the cultivation period reaching levels between 24- 28 mg/g after day 4. The enrichment experiment was performed during 15 days and the enrichment medium was yeast and Marol E. The ratio of is about 6 since day 5 (Figure 14) while total lipids varied form 15.2 to 17.5 % (Figure 15).



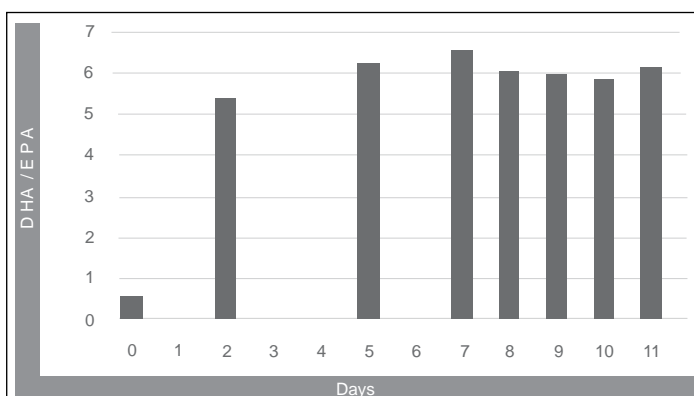


Figure 14. DHA/EPA ratio in rotifers fed on yeast and Marol E in recirculation system 2 (model 2003-2005) during 11 days culture.

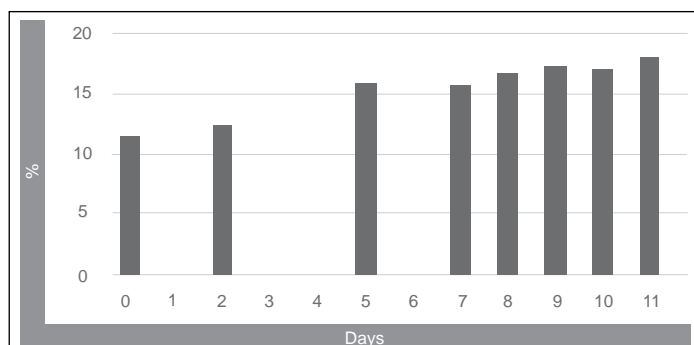


Figure 15. Total lipids in rotifers fed on yeast and Marol E in recirculation system 2 (model 2003-2005) during 11 days culture.

The affectivity of the new system was compared with the former system (model 2001-2003) by comparing the content of DHA and EPA (Figure 16) and DHA/EPA ratio (Figure 17) when rotifers were fed on Baker's yeast and Marol E (SINTEF Emulsion).

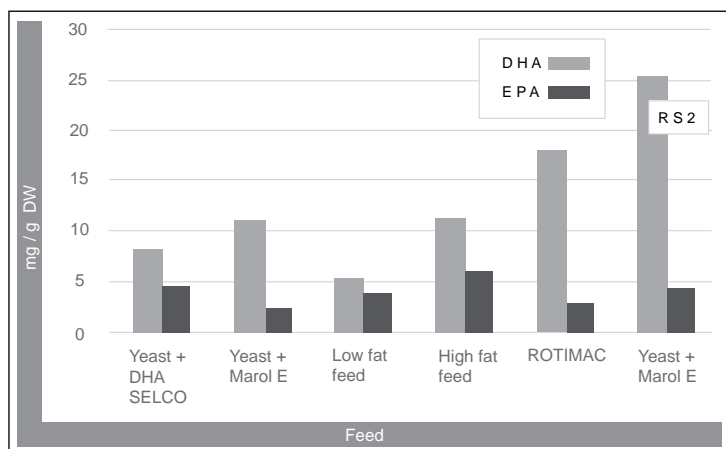


Figure 16. DHA and EPA (in mg/g) in high density cultivated rotifers fed on different feed in recirculation system. The first feed in the figures correspond to experiment using RS1 while the last feed on the right when RS2 was used.

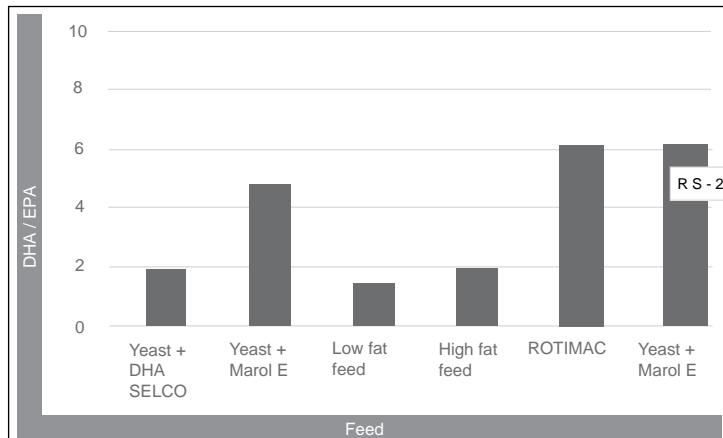


Figure 17. DHA/EPA ratio in high density cultivated rotifers fed on different feed in recirculation system. The first feed in the figures correspond to experiment using RS1 while the last feed on the right when RS2 was used.



Figure 18. Anaerobic breaking down of organic material.

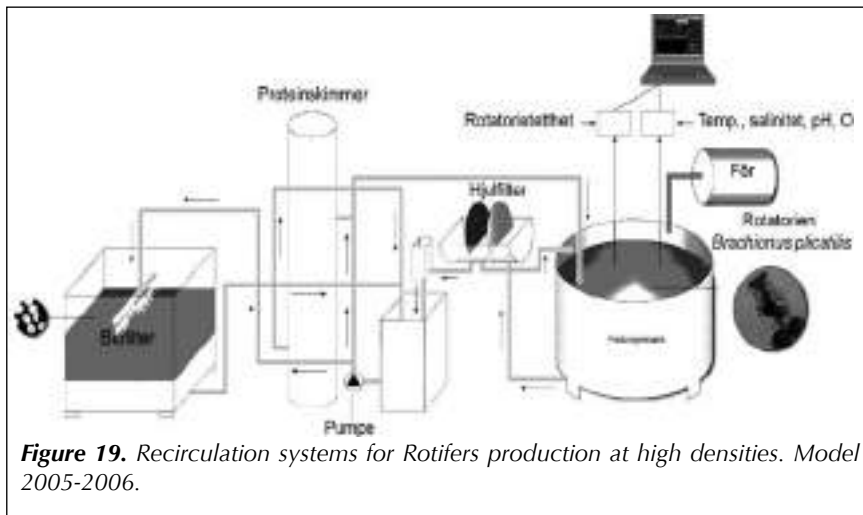
Problems experimented in the culture

One of the main problems causes for culture crash in this kind of system is the anaerobe breaking down of organic material in the cultures tanks. After 15 days culture the water quality had poor quality and observation of the condition of the bottom of the tanks indicated a problem of accumulation of organic material (Figure 18).

Model 2005-2006

This system was more automated than the former one and still is under development (Figure 19). The innovations were the introduction of an automatic rotifers counting system connected to a computer which also was connected to equipment measuring temperature salinity,

pH and Oxygen. Also a hydraulic rotator arm was introduced to clean the walls and bottom of the rotifers tank which was different in design than the former models system.



The first modification done to this model was to reduce culture volume from 3000 litre to 1800 litre and was suited with a rotary arm at the bottom of the tank which its shape was different from the former model in order to introduce the cleaning arm.

The first modification done to this model was to reduce culture volume from 3000 litre to 1800 litre (Figure 20) and was suited with a rotary arm at the bottom of the tank which its shape was different from the former model in order to introduce the cleaning arm.



The first experiment with this conditions was used the rotifer *B. ibericus (austria)* with a 20-30% harvesting per day and feeding the culture with Yeast, Chlorella, vitamins and emulsion. The daily production was 2.5 billions per tank during 20 days (see Figure 21). At day 20 the experiment was stopped due to the poor quality of the water resulting from a dirty tank (see Figure 22). The bottom of the tank was still clean but the walls were in poor hygienic conditions. Thus a cleaning wall arm was also suited to the tank.

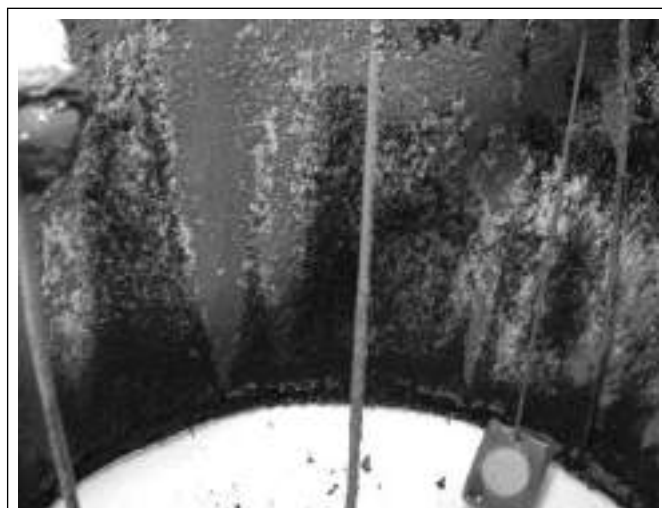
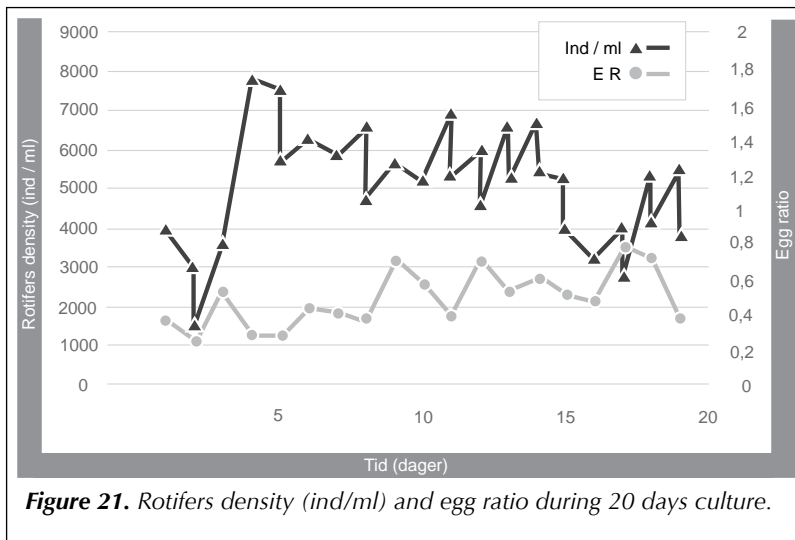


Figure 22. Condition of the rotifer tank after 20 days culture.

After the tank was equipped with a cleaning arm for the walls and for the bottom a new experiment was started with the following conditions:

- Fed on yeast and algae paste
- 1-2 water exchange volume in the production tanks per day.
- New water into the system 300 litre per day
- Stop in oxygen supply at day 11
- Low feed dose from day 20-30
- Increasing feed dose after day 30
- 20% dilution from day 34 until the end of the period

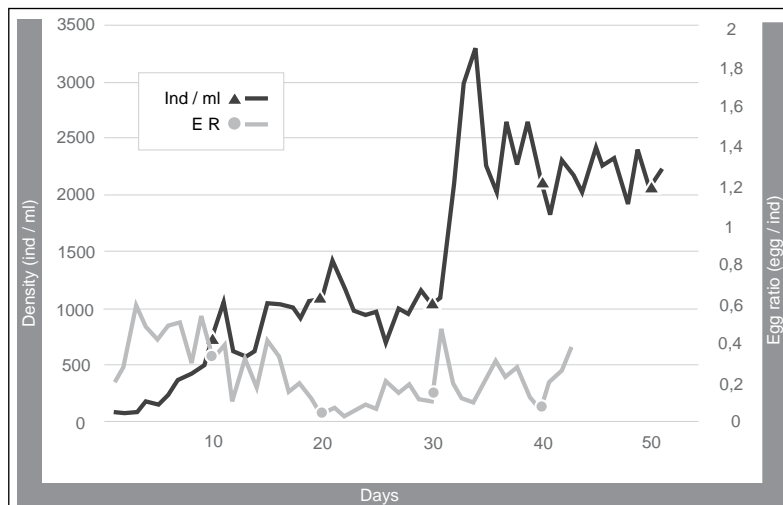


Figure 23. Rotifers culture during 65 days in recirculation system at high density.

Condition of the rotifer tank after 65 days culture

The walls of the tank after 65 days culture were relative clean due to the affectivity of the cleaning arm (Figure 24). The bottom was clean (Figure 25) however, the arm was losing some covering material. A better material for this arm should be tried.



Figure 24. Walls and cleaning arm after 65 days rotifers culture.

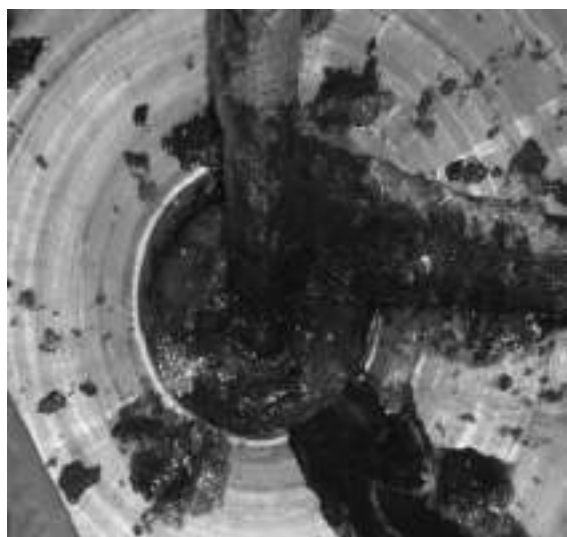


Figure 25. Bottom and cleaning arm of tank after 65 days culture.

Important factors for reach a high density and stable production in recirculation system:

The following factors are important to be taken in to account to obtain a stable production at high rotifers density and by a recirculation system:

Control and regulation of:

- Oxygen
- PH
- NH₃
- Salinity and temperature

Automatic control of:

- Rotifers density
- Egg ratio
- Swimming activity

A rotifer tanks with cleaning arms (for walls and bottom).

Maintenance of a good water quality and microbial control.

BIBLIOGRAPHY

- Abu-Rezq, T., Al.Shimmari, J., Dias, P. (1997) Live food production using batch culture and chemostat system in Kuwait. *Hydrobiologia* 358, 173 – 178.
- CRAFT project (2003) "Development of a recirculation system for the high density rotifer culture on commercial scale". Final report; project funded by the European Community under the 'Quality of Live and Management of Living Resources' Programme (1998-2002). Promotion of innovation and encouragement of SME participation: CRAFT Contract: Q5CR-2000-70186.
- Dhert P., Rombaut, G., Suantika, G., Sorgeloos, P. (2001) Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture* 200, 129 – 146.
- Lubzens, E., Tandler, A., Minkov, G. (1989) Rotifers as food in aquaculture.
- Olsen, Y. (2004) In *Culture of Cold- Water Marine Fish*, Edited by Moksness, Kjørsvik and Olsen, Blackwell Publishing.
- Rainuzzo, J., Kjøsnes, A. (2002) Produksjon av rotatorier. *Norsk Fiskeoppdrett* September, 2002.
- Rainuzzo, J., Kjøsnes A. (2005) Industrial scale recirculation system for high density culture of rotifers (L-strain). Larvi 95 Poster and Abstracts Ghent Belgium.
- Skjermo, J., Vadstein, O. (1993) Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 255/256, 185 – 191.
- Suantika, G., Dhert P., Sweetman E., O'Brien, E., Sorgeloos, P. (2003) Technical and economical of a rotifer recirculation system. *Aquaculture* 227, 173 – 189.
- Yoshimura, K., Usuki, K., Yoshimatsu, T., Kitajima, C., Hagiwara, A. (1997) Recent development of a high density mass culture system for the rotifer *Brachionus rotundiformis* tschuguooff. *Hydrobiologia* 358, 139 – 144.

CURRENT STATE OF THE USE OF ARTEMIA IN FISH LARVAE CULTURE. PERSPECTIVES AND ALTERNATIVES

*Italo Salgado Leu M. Sc., School of Aquaculture
Universidad Católica de Temuco*

Introduction

The use of *Artemia* in aquaculture has been defined mainly by the use of its cysts since Seale in 1933 and Rollefson in 1939 reported the use of newly hatched nauplii as live feed for fish larvae (Sorgeloos *et al.*, 1986). This product was used in sustainable fashion for fish feeding in aquariums. The commercially supplying places were San Francisco Bay (SFB) and the Great **Salt Lake**, UT, both in the USA. The price of cysts was around 10 US dollars. Since that time, the use of the cysts was increased considerably due to the beginning of production of larvae and juveniles, reaching levels of 800 metric tons annually, representing 40% of the total demand for early stages feeds. (Sorgeloos *et al.*, 2001). In 1976, in face of a descent in the collection in Great Salt Lake and a probable low supply, simulated by the existent companies, in 1976 Ghent University, through Patrick Sorgeloos, presented to the Aquaculture Conference, organized by FAO, a proposal which stated that the low supply would be temporary, since there were unexplored areas that could cover this deficiency. In present time, the demand for **Artemia** cysts reaches around 2000 tons of yearly consumption and its use in larvae culture comes conditioned by parameters related to the hatching characteristics of the cysts, the size of the nauplii, their nutritional content, the effects of decapsulation processes, the effectiveness of the separation of newly hatched nauplii from the cysts, the nauplii pigmentation, the nutritional enrichment that nauplii are able to experience, the microbiological load, among other things. (Leger *et al.*, 1987).

Artemia is geographically distributed in more than 600 places, right across the five continents, with only some of them standing out as productive centers at commercial level. Between 80 to 90% of the cysts produced are originated in Great Salt Lake, Utah in the USA. The rest of production comes from diverse places like San Francisco Bay (California, USA) followed by places where it has been introduced as Macau (Brazil), Mekong river delta (Vietnam), Mindoro (Philippine), and Shark Bay (Australia). More recently, a significant production in Central Asia, the South of Siberia, the North and Center of China is reported. (Van Stappen, 2004).

1. Production

1. 2. Main producer: Great Salt Lake, Utah

Regarding the production of Great Salt Lake, Utah (surface: 4,300 km²), it behaves in a cyclical manner, with its maximum values (2002) located around 11,500 tons of cysts (wet weigh), and around 1,000 tons (1986, 1999 and 2004) in its minimum values in the last 20 years. These drops, without a doubt, have created big inconveniences to the users (**larvicultors**), being pointed out that a critical situation due to a low harvests has a dramatic impact in the supply and price of cysts for the larviculture industry (Bengston *et al.*, 1991). This activity began in the decade of the 50s, collecting the adult *Artemia* to be used as fish feed in aquariums in the USA. In the de-

cade of the 70s, the market pressed with the use of the cyst in aquaculture, in the larviculture of crustaceans and fish. From that moment on, the larval stage of aquaculture has been depending on the variations of production of the Great Lake.

Chart 1

Production of cysts in Great Salt Lake, UT, USA, 1986-2004.

Year	Pounds	Tons
1986	2,000,000	907
1987	7,050,000	3,198
1988	6,900,000	3,130
1989	10,250,000	4,649
1990	9,000,000	4,082
1991	13,600,000	6,169
1992	10,100,000	4,581
1993	9,000,000	4,082
1994	6,500,000	2,948
1995	14,900,000	6,759
1996	14,800,000	6,713
1997	6,100,000	2,767
1998	4,700,000	2,132
1999	2,800,000	1,270
2000	20,000,000	9,072
2001	18,250,000	8,278
2002	25,750,000	11,680
2003	5,000,000	2,268
2004	2,700,000	1,225

Elaboration: Salgado, I. - Source: Salgado, 2003; INVE, 2005

The production statistics reflect situations of behavior of the lake that are studied and recorded (Chart 1). The quantity and quality of cysts depend on many factors, fundamentally the salinity of water in the lake. In this habitat, a bigger production of cysts has been proven at salinities above 10%. As salinity drops to 5 or 6%, cysts lose floatability, they are below the surface of water, and are harder to harvest. During the floods of 1983-87, when a record freshwater inflow was registered in the lake, the salinity of the southern region of the lake (called Gilbert Bay) dropped to nearly 5.5% and the activity of cysts collection had to move to the northern part of the railway (called Gunnison Bay) (Figure 1) where most of the *Artemia* population was concentrated. In 1989, the salinity of the southern region was near 10%, and then the industry returned to the southern region. Cysts collection increased to a maximum of 6,169 tons in 1991, moment when it began to descend to 2,948 in 1994. The harvest of cysts increased again in 1995-96 and 1996-97, reaching nearly 6,800 tons of gross weight (nearly half of it becomes final product). In 1997, the descent of salinity to 11% resulted in a change of the algal community to big diatoms, which are not a good source of feed for *Artemia*. In 1997-98, the harvest had to be interrupted after the 3 weeks of labor and only reached 2,767 tons of harvested cysts. This situation was

accompanied with a decrease in the quality of cysts hatchings. The volumes continued dropping until the period 1999-2000, when the lower level of 1,300 tons was reached, followed by a great jump in the next period 2000-01, reaching 9,000 tons. Since that time it has been stable; in the following period they had 8,000 tons and in the last one (2002-03) the record of 11,700 tons of gross weight has been reached. These situations described have their explanations and limitations. A spokesperson for the Utah Artemia Association has said that this huge gross figure contains a great amount of algae and other accompanying material, in more proportion that in previous



Figure 1. *Satellite picture of the Great Salt Lake of Utah, USA.*

periods, pointing out that it is not pure cyst. In consequence, bigger expenses in cleaning and purification are demanded. Due to the higher volume, the prices also get lower. This increase in the production is due to the decrease of the freshwater inflow to the lake (drought), what contributes to the proliferation of Artemia population. If the last three years of high production are analyzed, they are correlated with dry years and with more above normal temperatures. This has originated that the level of the lake diminished in 1.2 meters and the salinity of the southern region rose to 14%, while in the northern side it is 26%. These warm temperatures extend until well into the autumn, giving the Artemia conditions for its increase in population.

The period of cysts harvest comprises the months October through January. There are around 30 companies that compete hard for the collection of this product, with more than 300 boats, specially adapted for this work. This competition, without a doubt, is further promoted by the increment in the demand of cysts for aquaculture.

The configuration of the Great Salt Lake determines a unique and complex ecology. In this biophysical context, Artemia eggs float in the surface of water and depending on the magnitude of the laying, they tend to come together forming huge stains (Figure 2). These stains are not only conformed of cysts, but also of algae, mature Artemia, among other things. The formation, location and displacement of the stain, will depend on weather conditions of the moment. Once the harvest season is open, the companies start monitoring the formation of stains by means of airplanes. Once detected, they communicate it to their boats which go there at the maximum possible speed, establishing a true competition, since the first one to arrive there is the one who takes possession of the stain. Between two boats and using equipment similar to that used to contain oil spills, they proceed to contain the stain trying to capture the highest possible amount. Boats have a registration certificate that authorizes them to carry out the operation and to claim on the captured stain. Once the stain is captured, they communicate it to the harvester boat that will take charge of pumping onboard the contained cysts. Then the product of the harvest is taken to ground facilities to continue with the process of cleaning and commercialization.



Figure 2. Harvest sequence in Great Salt Lake, Utah, USA.

1.2. Other production locations:

Macau, Rio grande do norte, Brazil

Another phenomenon that was news in certain moment is located in the Brazilian northeast, specifically in the town of Macau, Rio Grande do Norte state. This place is a saltern area where presence of *Artemia* didn't exist. It was introduced by men in 1977, beginning production immediately the following year. In that time, the inoculation of nauplii of Franciscan *Artemia* (San Francisco Bay brand) was made in an artisanal salina. The *Artemia* was distributed through all the evaporation ponds, yielding an annual average of 20 tons of cysts (dry weigh). However, after five years, the production began to decline to levels between 1.5 to 5 annual tons during the decade of the '80s. Since 1992, the production of cysts has been stabilized around one annual ton (Chart 2).

Chart 2

Production of cysts in the Brazilian northeast.

YEAR	Harvest of cysts (kg of dry cysts)	YEAR	Harvest of cysts (kg of dry cysts)
1978	24600	1986	2000
1979	30800	1987	5000
1980	18050	1988	5000
1981	10730	1989	5000
1982	5400	1990	4000
1983	1567	1991	2000
1984	1240	1992	1000
1985	3130	1993	1000

http://www.ctu.edu.vn/colleges/aquaculture/cuban_training/vdq/macau.htm

This drastic decline is attributed to the adaptation of the inoculated species to a mostly ovoviparous reproduction. Starting from the '90s, the production comes from the artisanal saline community of Grossos and of two big mechanized salines in Areia Branca, both in Rio Grande do Norte state. This situation is different from what happened before that year, since that production came from very large salines of Macau and its surroundings.

By the middle of 1997, a project was started that incorporated the production of *Artemia* to the artisanal production of salt in the region of Grossos. The fundamental objective has been to open possibilities to improve revenues to the salt makers. The production activities are carried out by 12 families in a surface that goes from 0.5 to 3 hectares. They obtain between 200 and 600 tons of salt in 6 months of work, among which cysts and biomass of *Artemia* are also collected. Reportedly, the biomass has been exported to Panama, Venezuela and USA. Camara, 2003, informs an annual production for Brazil, of 150 tons of biomass and 10 tons of cysts.

Asia

The *Artemia* as a resource exists in introduced form as well as naturally in this continent. The countries that have been working in its commercial production are Vietnam and Thailand. In the experimental level there are Philippine and Indonesia. This production becomes indispensable in this region due to:

- There is not natural presence
- The demand of *Artemia* for the shrimp farm industry is big, especially in Thailand that has become the first producer.
- The inconsistency in the offer of the Great Salt Lake in Utah, makes the price of the cyst go up high.

The activity around *Artemia* began after the success in the inoculation in the northeast of Brazil. The experiments began in Philippine and Thailand, later on in Vietnam. The cultivation has evolved in these three countries in a different way. It was already mentioned that it remains in experimental or pilot scale in Philippine. In Thailand, production has been centralized in the biomass as the main product, while the cysts are considered as a secondary or marginal product. The activity is associated with shrimp culture, fish culture and salt production in some cases, and only with salt production in other cases.

The cultivation of *Artemia* in Vietnam established in 1982 by means of inoculation of *Artemia* Franciscana. The activity is associated with salt production in the coastal area of Vinh Chau–Bac Lieu, with an area of around 500 hectares. The cultivation is directed mainly to production of cysts, while the biomass takes a secondary order. The annual production reaches 10 tons of dry cysts and is directed to local consumption in hatcheries and for export. The exports go to Europe, Japan, South Korea and others.

China

In China there are four defined stumps with characteristics of their own, that add up to a combined production of not less than 300 annual tons. The biggest productive area is Bohai bay with 200 tons, and its surroundings where many salines are implanted.

The biomass is produced in extensive form in countries as China (Bohai), exported to Ecuador, USA, Canada, Japan, Korea, Indonesia, Germany, France, and Spain.

Russia and former Soviet Republics

The cysts are natives, mostly, of Kulundinskoe Lake. The trading companies offer up to 100 tons of this origin. From the lakes of Siberia, productions up to of 1200 tons are reported (Bolshhoye Lake, Altai area). There are also reports of production from Aral Sea, Uzbekistan, Pamir (Tajikistan), Kara-Bogaz-Gol (Turkmenistan), and Kazakhstan. (Marden, 2005).

In chart 3, commercial cysts production from several countries is summarized.

Chart 3

Volumes of Artemia cysts production by countries

Countries	Cysts production (ton)
GSL USA	11700 gross (maximum value) uncertain
San Francisco USA	
Brazil	10 (Camara, 2003)
China	300
Vietnam	10
Russia	3000

2. The consumption of Artemia cysts in fish larviculture

At the end of the decade of the '70s, and due to the development of the cultivation of fish and marine shrimps, the demand for Artemia cysts begins. At present time, it is estimated that around 2,000 tons of cysts are consumed by larvae and juveniles. Of these, between 80 and 85% is demanded by shrimp larviculture, while the remaining between 15 and 20 % is consumed by fish aquaculture (Lavens and Sorgeloos, 2000; Leger, 2004).

According to FAO, 2006 (Figure 3), in the production of fish cultivated in 2004, coastal fish are highlighted with more participation, with 878 thousand tons, then comes the pelagic (189 thousand tons), flatfish (109 thousand tons) and demersal (4 thousand tons), reaching a total of 1,447 thousand tons. In the analysis of the behavior for the last 5 years, it is observed that as a whole they present a yearly average growth rate of 11%.

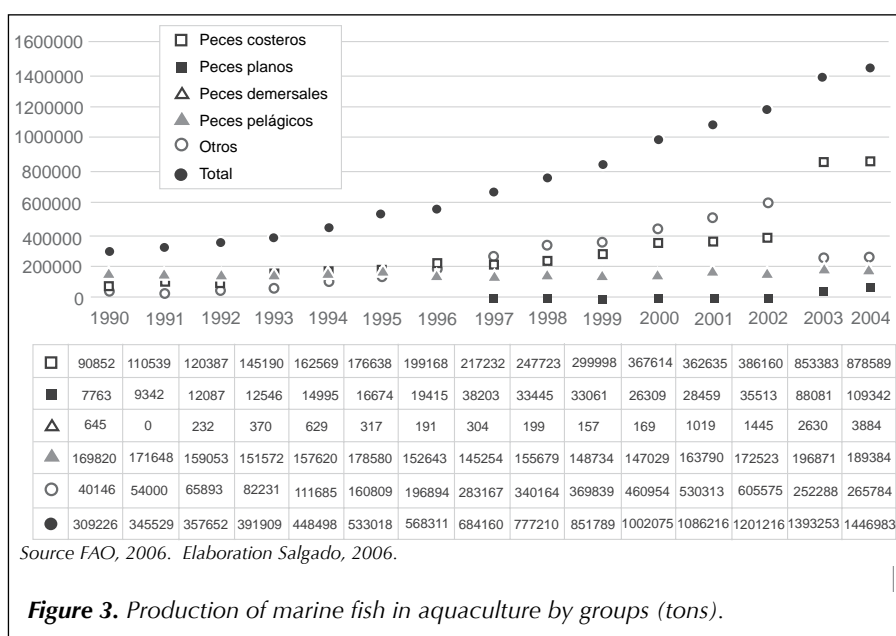


Chart 4

Production of fish cultivated in Europe (tons).

Group	2000	2001	2002	2003	2004
Marine fish	110 430	117 189	110 152	131 972	126 062

Source: FAO, 2006.

For the case of Chart 4 where the production in Europe is presented, we have a production of marine fish coming from cultivation that reached 126,062 tons for the year 2004. The use of cysts for the production of fish larvae in Europe has gone down from 800 kg to 200 kg by million of produced larvae (Chart 5). Even if the use would decrease more (to 50 millions), this reduction should be covered with inert food, with a result that doesn't demonstrate an effective net gain. Below this figure adverse effects are observed in the quality of the larva and it's not profitable at industrial scale. With Artemia representing from 3% (O'Brien, 2003) to 17% (Leger, 2005) of the production cost, a bigger reduction doesn't result a valuable thing, since it would bear an increase in the associate costs for loss or uncertainty of the production. (O'Brien, 2003).

Chart 5

Artemia Consumption Indexes in the production of fish larvae.

Year	Consumption (kg/million)	Days until the end of weaning	Production (millions of individuals)
'80	800 - 500	100 - 80	0 - 30
'90	500 - 200	80 - 50	30 - 40
'00	200 - 50	50 - 30	400 - 700

Source: O'Brien, 2003.

For the levels of larvae production in this continent, they would be using 35 tons of cysts, taking the lowest levels in use (50 kg/million) for a production of 700 million fish larvae.

Keeping in mind that Europe represents 9% of the production of marine fish, obviating the species type, one could assume that for the 1,446 thousand of total tons, 402 tons of cysts would be needed.

3. Strategies of uses

Larval nutrition turns out to be a key question for the success of fish culture and the use of live feed, as rotifera and Artemia, in many strategies it is considered mandatory (Sorgeloos *et al.*, 2001), due to the stimulation that they exercise on fish larvae due to their constant movement and attractive content (free amino acids).

According to the species feeding protocols exist for fish larvae which, depending basically on the size of the larva at the moment of its first feed, can begin even with microalgae, continuing with rotifera, then with Artemia nauplii, the later two frequently enriched nutritionally, to start the weaning later on with inert food (Takeuchi, 2001).

Chart 6

Indicators of live feed use in fish larvae

Species	Level	Rotifera	Artemia	
			Nauplii	Enriched Metanauplii
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Super intensive	They don't use	Day 8-10: 5/mL	Day 15-20: >5/mL
	Intensive	Day 1: 7 /mL		1-2/mL
	Semi-intensive	Media Productivity		5/mL
<i>Sparus aurata</i>	Intensive	Day 4-22: 5-10/mL	Day 18: 5/mL	Day 26: 5/mL
<i>Scophthalmus maximus</i>	Intensive	Day 1-4: 3-5/mL	2-5/mL	2-5/mL
	Semi-intensive	Copepoda		
	Extensive	5/mL	Day 15: 5/mL	Day 30: 5/mL
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>		They don't use	From Day 1, total consumption: 2000/larva	

Source: Shields, 2001. Elaboration: Salgado, I.

Referring only to the use of Artemia, there are many strategies proposed by authors for the different species worked on (Chart 6) that use indicators like individuals per mL or individuals per larva, where consideration is taken also of the time of beginning and duration of supply in number of days of feeding. In all of them, the hatching characteristics of the cysts (efficiency, synchronicity), size of nauplii and its energy content, its nutritional quality (enrichment) and microbial load, among other things, are implicit. The size of the fish larva is also taken into account for the beginning of the feeding type.

For the enrichment techniques they have been experienced with microalgae, products microencapsulated, yeast, emulsions, concentrates and microparticled. Those that have offered better results are the concentrates, in which dilution to a ratio of 0.3 g/L -- what is verified every 12 hours -- the newly hatched nauplii are placed (100 to 300 individuals/mL), for periods of 24 hours. The highly unsaturated fatty acids treated are: EPA (eicosapentaenoic) (larval survival), DHA (docosahexaenoic) (growth, neurological structures: brain, vision, notochord, gregarious behavior) and ARA (arachidonic) (growth and pigmentation), and their DHA/EPA and DHA/ARA relationships (Watanabe *et al.*, 1983, Leger *et al.*, 1987; Sargent *et al.*, 1993; Takeuchi, 2001). The high DHA catabolism of *Artemia* should be taken into account, because DHA enrichment can be vain with certain stumps. *Artemia* uses the DHA as energy source; converts it to EPA (Takeuchi, 2001). As alternative to this, one can go toward copepoda that are rich in DHA, or experiment with early weaning in combination with a continuation in the use of rotifera.

Special mention deserves the comparison of taurine content that has a relationship with the growth and normal behavior of *P. olivaceus* soles. The content of this essential element has been compared in mysids (29.0 mg/g), followed by *Artemia* (6.9 mg/g), commercial diet (3.8 mg/g) and rotifera (0.8–1.8 mg/g) (Takeuchi, 2001).

It was already mentioned that the participation of the cost of *Artemia* inside the production cost varies according to authors (use strategy) from 3 to 17%. Studies have been published of how the decrease in the use of nauplii of *Artemia* has behaved in connection with the presence of opercle deformations and lordosis. In figure 4 it is observed that with amounts of 150 kg of cysts per million of larvae, the presence of deformed opercles reaches a 6% of occurrence, while the presence of lordosis stays at very low levels. When it has been possible to reduce the use of cysts at levels between 50 and 60 kg per million of larvae, the presence index for both deformations stays the same. However, when they have been worked with bigger reductions that reach below to 40 and 30 kg per million, the opercular deformation is increased notably until levels above the 30 and 35% correspondingly, while lordosis becomes more evident.

Callan *et al.*, 2003 points out that a reduction of *Artemia* until 25% of use doesn't have significant effects in cod (*Gadus morhua*), regarding longitude, dry weight, specific growth rate and survival; over those limits significant effects exist in these parameters. Curnow *et al.*, 2006 have found co-feeding strategies for *Lates calcarifer*, diminishing the use of *Artemia*, maintaining the presence of it as the best proven alternative.

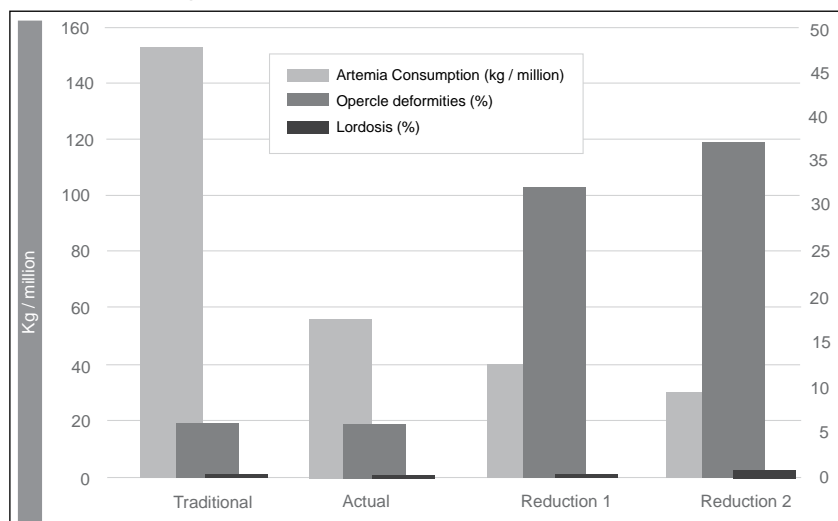
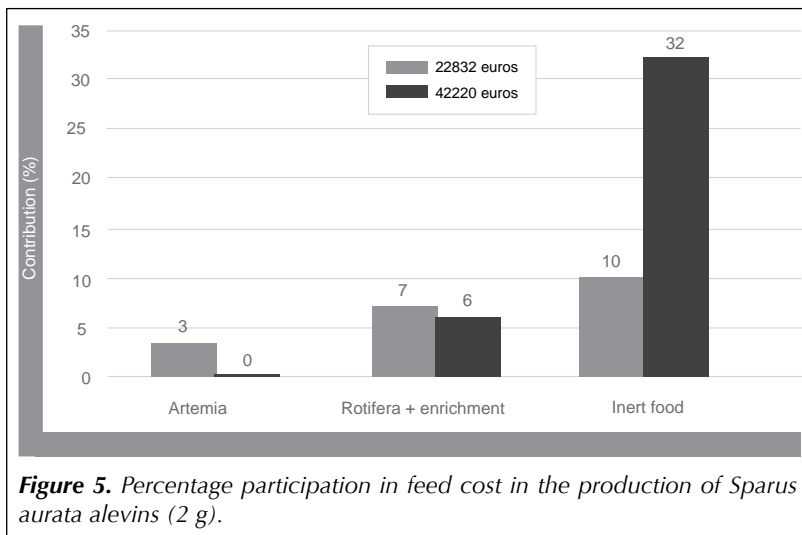


Figure 4. Reduction of *Artemia* and deformities in *D.*

The use of feeds in general and of *Artemia nauplii* in particular, is reflected in the economic field. In Figure 5 the behavior of the cost in relation to the use or substitution of *Artemia nauplii* as feeding strategy, can be appreciated. It is observed that such cost is doubled when *Artemia* is substituted, lengthening the use of rotifera and beginning early the supply of microdiets (O'Brien, 2003).



4. Suggested actions

Keeping in mind the information existent until now, the following actions are suggested:

- Regarding the *Artemia* resource:
 - Increase the information about cysts production locations
 - Exact knowledge about characteristics of the stumps used
 - Use the resource properly disinfected and enriched
- Regarding fish:
 - Improve survival: 5 to 50% (10% average). To identify the factors that originate early mortalities.
 - Continue with nutritional studies in larval stages.
 - Knowledge of the condition of reproducers: eggs and larvae quality.
 - Identify factors of deformities to reduce them.
 - Standardize the production and use easier production methods.
 - Use multiple strategies of co-feeding combinations.

BIBLIOGRAPHY

- Bengston, D.A., Leger, P., Sorgeloos, P. (1991) Use of Artemia as a source for aquaculture. In: Brown, R.A., Sorgeloos, P., Trotman, C.N.A. (Eds.), *Biology*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 255 – 285.
- Callan, C., Jordan, A., Kling, L. (2003) Reducing Artemia use in the culture of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 219, 585 – 595.
- Curnow, J., King, J., Bosmans, J., Kolkovski, S. (2006) The effect of reduced Artemia and rotifer use facilitated by a new microdiet in the rearing of barramundi *Lates calcarifer* (BLOCH) larvae. *Aquaculture* 257, 204 – 213.
- Kolkovski, S. (2001) Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200, 181 – 201.
- Koven, W., Barr, Y., Lutzky, S., Ben Atia, I., Weiss, R., Harel, M., Behrens, P., Tandler, A. (2001) The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in the larvae of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 193, 107 – 122.
- Lavens, P., Sorgeloos, P. (2000) The history, present status and prospects of the availability of Artemia cysts for aquaculture. *Aquaculture* 181, 397 – 403.
- Leger, P. (2005) Producing Artemia for a growing aquaculture industry. The market & needs. Production INVE's experience. Presentation at Larvi 2005. Ghent University, Belgium. Sept. 5 – 8, 2005.
- Leger, P., Bengston, D., Sorgeloos, P., Simpson, K., Beck, A. (1987) The nutritional value of Artemia: a review. In: Sorgeloos, P., Bengston, D., Decler, W., Jaspers, E. (Eds.), *Artemia research and its application. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture*, vol 3. Universa Press, Wetteren, pp. 357 – 372.
- Marden, B. (2005) Great Salt Lake Artemia resource. Population dynamics, management and economics. Utah division of Wildlife resources technical advisory group: INVE technologies and Utah strategic alliance, Mountain Green, Utah, USA.
- O'Brien, E. (2003) Larval production. Artemia resources, substitute feeds? And effects on production. Presentation on Workshop on Hatchery Technologies, Bordeaux, 16-17th January, 2003.
- Shields, R. (2001) Larviculture of marine finfish in Europe. *Aquaculture*, 55 – 88.
- Salgado, I. (2003) Propuesta de producción de Artemia integrada con la camaronicultura y la producción de sal. Ministerio de Desarrollo Agropecuario. República de Panamá. Dirección Nacional de Acuicultura. Programa de Modernización de los Servicios Agropecuarios. 221 pp.
- Sorgeloos, P., Dhert, P., Candreva, P. (2001) Use of the brine shrimp, Artemia spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200, 147 – 159.
- Takeuchi, T. (2001) A review of feed development for early life stages of marine finfish in Japan. *Aquaculture* 200, 203 – 222.
- Watanabe, T., Kitayama, C., Fujita, S. (1983) Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture* 34, 115 – 143.

PRODUCCIÓN DE LARVAS EN SISTEMAS SEMINITENSIVOS EN CLIMAS FRÍOS: EL CASO PUYE

*Aliro Bórquez ; Italo Salgado; Javier Quevedo; Patricio Dantagnan
Escuela de Acuicultura, Universidad Católica de Temuco.
Email: aborquez@uctemuco.cl*

Introducción

El puye, *Galaxias maculatus*, salmoniforme de la familia Galaxiidae, presenta distribución circumpolar en latitudes mayores de 30° LS, encontrándose en Chile, Argentina, Islas Malvinas, Australia, Nueva Zelanda y Tasmania (Mc Dowall, 1968). En Chile se distribuye desde los 32° a los 53° de LS (Campos, 1970). El tamaño del pez es pequeño, la longitud promedio de un adulto es de 7-8cm, carece de escamas y habita aguas límnicas y estuarinas. Las poblaciones lacustres sin conexión con el mar completan su ciclo de vida en el propio lago (Pollard, 1971). Las poblaciones estuarinas, cuyo ciclo de vida es ampliamente conocido en Chile y Nueva Zelanda, los reproductores que habitan aguas limnéticas como ríos y arroyos, migran hacia el estuario donde desovan luego, la larva va al mar y regresa al río como post-larva cristalina. De acuerdo a Mc Dowall (1968), la influencia mareal es importante para esta etapa, razón por la cual el puye es considerado un catádramo marginal.

Las post-larvas de puye (5-6 cm de longitud y 0.35g de peso promedio), presentan morfología anguiliforme y transparente, por eso son llamados cristalinos. Estas características hacen que sea considerada un símil de la angula europea y un producto altamente apreciado para el consumo humano en el mercado europeo y mexicano (Dantagnan *et al.*, 2002). El cristalino puede alcanzar hasta US\$100 el kg como producto elaborado (Bórquez *et al.*, 1996). Aunque no existen cifras oficiales, la pesquería de la especie en Chile se centra en la IX y X región, concentrándose en las zonas de Chiloé y Aysén. Las altas presión extractivas sobre los cristalinos han reducido las poblaciones naturales de esta especie en las aguas de nuestro país (Bariles *et al.*, 2003).

Desde hace más de una década, la Escuela de Acuicultura de la Universidad Católica de Temuco, ha desarrollado numerosos proyectos de investigación tendientes a desarrollar las bases tecnológicas para el cultivo comercial de la fase cristalina de este recurso. (Dantagnan *et al.*, 2002) establecieron una secuencia de alimentación larvaria, que ha permitido establecer la viabilidad técnica del cultivo larval, un sistema intensivo de producción a escala piloto. Sin embargo, la factibilidad comercial del cultivo del puye bajo estas condiciones no es rentable, por que no se pueden sobrepasar densidades de 38 larvas/litros y la demanda de espacio, estanques y agua es muy alta. La evaluación económica para unidad mínima de 10 toneladas de cristalinos bajo un sistema de producción intensiva muestra rentabilidad negativa (Barile *et al.*, 2003).

Como el puye sigue teniendo un alto interés comercial, es que surgió necesidad de evaluar el cultivo larval en un sistema de producción semi-intensivo, donde la estrategia de nutrición y alimentación de la especie se basa en la producción natural de alimento la cual es subsidiada por el aporte de fertilizantes orgánicos e inorgánicos exógenos y alimentación suplementaria. Los sistemas de producción semi-intensivos pueden trabajar con densidades intermedias y alcanzar producciones que pueden variar entre 1500 a 5000 Kg/ha/año (Csavas, 1990). Además, con un adecuado manejo, estos sistemas de producción presentan mínimos los riesgos alteraciones ambientales.

El presente trabajo muestra el método desarrollado para la producción de cristalinos de bajo una estrategia de producción semi-intensiva en estanques de tierra, subsidiado con fertilización orgánica e inorgánica y uso de alimentación suplementaria.

Producción de cristalinos de puye

La Figura 1 muestra el esquema general de producción de cristalino propuesto en una estrategia semi-intensiva. La producción se desarrolla en tres grandes etapas, siembra, pre-cría y engorda, las cuales están asociadas con una estrategia de producción de alimento vivos (etapas iniciales) y uso de alimento artificial (etapa final).

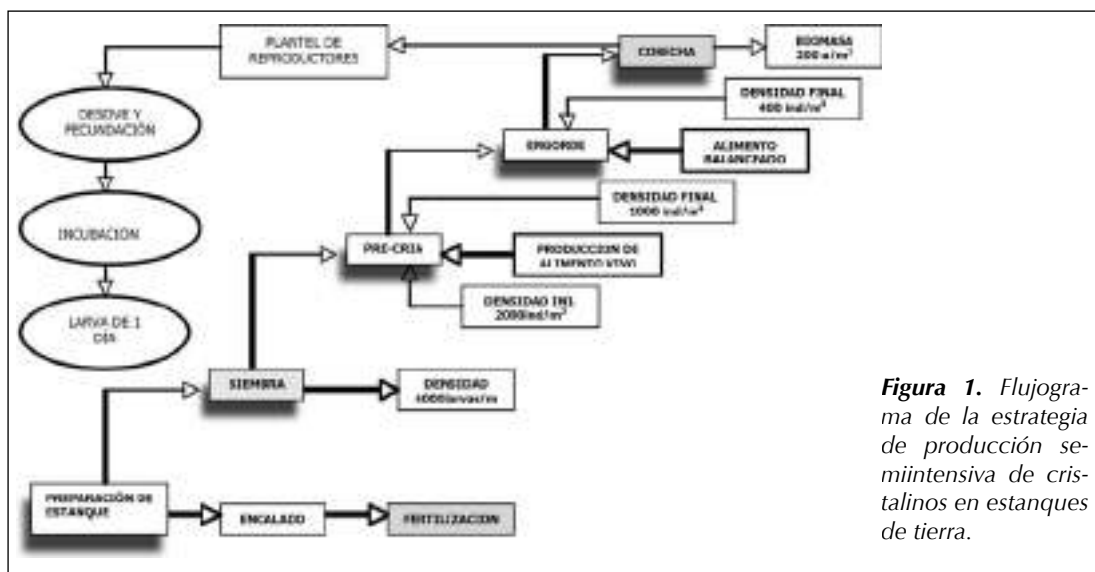


Figura 1. Flujograma de la estrategia de producción semi-intensiva de cristalinos en estanques de tierra.

Preparación y manejo de estanques: Para iniciar un ciclo de producción de puyes bajo un régimen de cultivo semi-intensivo, se debe comenzar con la preparación del estanque (Figura 2). El puye es un pez de aguas frías, lo que en cierta medida dificulta la producción de alimento vivos en estanque de tierra, debido que el régimen térmico en que vive este pez no ofrece las mejores condiciones para mantener una alta productividad natural de alimento como lo que se puede obtener en aguas tropicales. Por otra parte, para obtener una buena sobrevivencia larval, se debe iniciar la preparación del estanque conociendo previamente la fecha probable de eclosión de los huevos de puye.

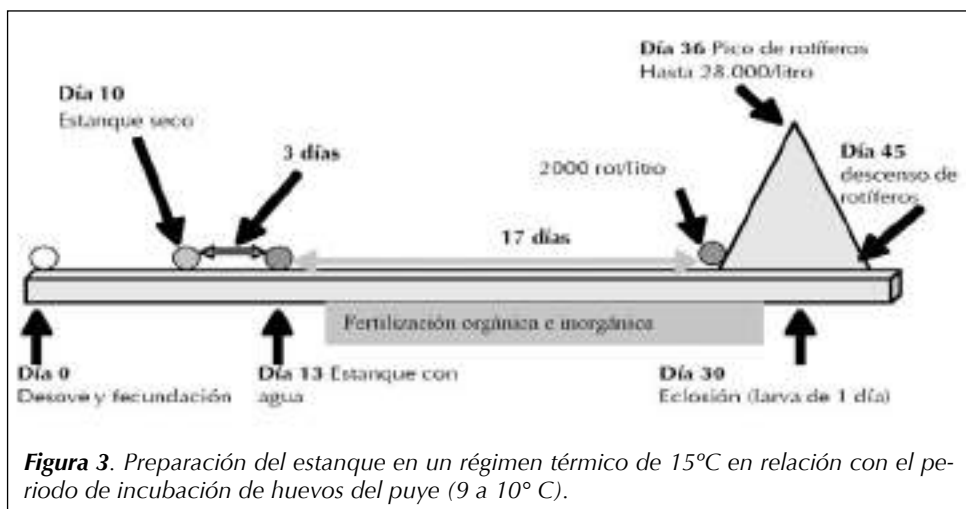


Figura 2. Estanques de 200m² utilizados para la producción de cristalinos, Piscicultura de Faja Maisan.

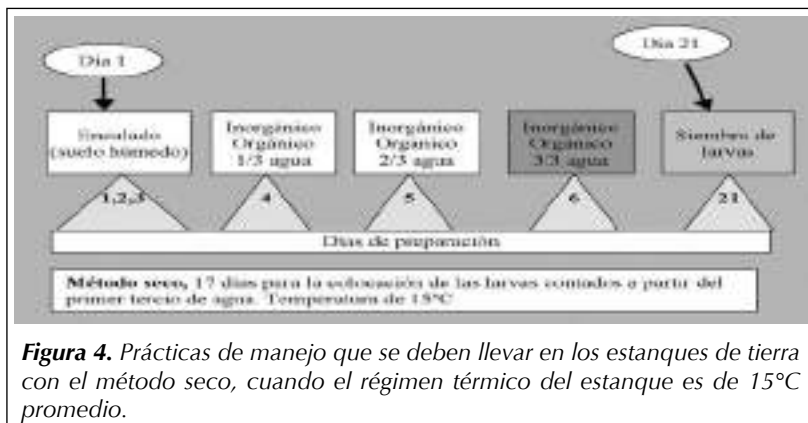
El primer alimento natural que debe recibir la larva cuando es sembrada en los estanques, son rotíferos. La producción de rotíferos responde a un ciclo temporal que depende de la temperatura, disponibilidad de nutrientes y materia orgánica en el estanque.

Si definimos como día 0 el inicio del ciclo de producción de cristalinos en la fecundación, la eclosión de las larvas ocurrirá en 30 días con 9 a 10 °C.

Un estanque de tierra fertilizado con un régimen térmico promedio de 15 °C inicia su pico producción de rotíferos en 20 a 25 días después. En la Figura 3 se esquematiza la preparación de estanques tomando como referencia el tiempo transcurrido desde la fecundación hasta la eclosión, momento en el cual debiera comenzar el pico de rotífero, esto supone que 10 días después del desove se debe comenzar con la preparación del estanque, para que 20 días después comience la producción de rotíferos coincidente con la eclosión y siembra de larvas de un día en los estanques.



Para la preparación de estanques se pueden seguir dos métodos, el método seco, inicia el ciclo con el secado y encalado del estanque y el método húmedo parte el ciclo con el estanque con 1/3 de agua (Figura 4 y 5). Como se sabe el pico de producción de rotíferos esta en estrecha relación con la temperatura, en estas figuras se ha esquematizado el proceso en un régimen térmico del estanque de 15°C.



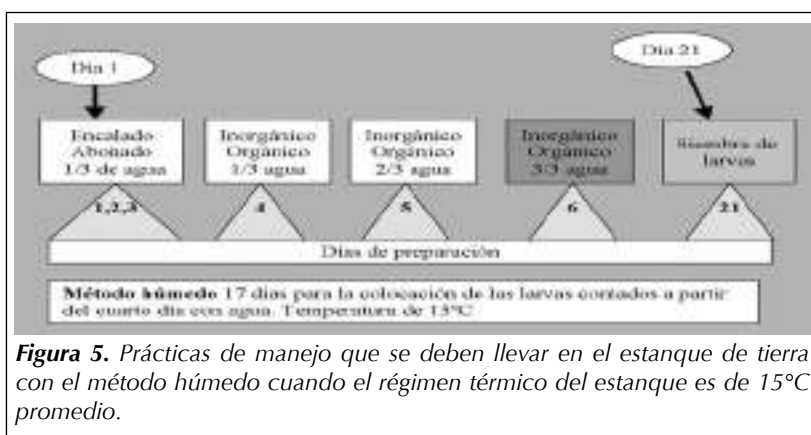


Figura 5. Prácticas de manejo que se deben llevar en el estanque de tierra con el método húmedo cuando el régimen térmico del estanque es de 15°C promedio.

La Tabla 1 muestra en detalle el manejo realizado en la Piscicultura de Faja Maisan, para la producción de alimento natural, en estanques de tierra mediante el método húmedo en un régimen térmico de 15°C. Estas prácticas están referidas principalmente a los tiempos de llenado y abonado de los estanques.

Tabla 1

Programa de fertilización de estanques de tierra para la producción de alimento vivo para larvas de Puye en régimen térmico de 15° C. (Método húmedo).

Día	Actividad
1	Llenar a un tercio. Aplicar fertilizante inorgánico Urea y fosfato a razón de 4 y 1,5 kilos por hectárea cada dos días. Colocar abono orgánico de origen animal a razón de 2900-4000Kg/há/mes dividido en aplicaciones de 725kg/há/semana.
2	Mantener 1/3. Aplicar calcáreo.
3	Mantener 1/3.
4	Llevar a 2/3 el nivel de agua del estanque.
5	Mantener a 2/3.
6	Llenado completo. Aplicar fertilizante inorgánico Urea y fosfato a razón de 4 y 1,5 kilos por hectárea. Colocar Abono orgánico de origen animal a razón de 2900-4000Kg/há/mes dividido en aplicaciones de 725kg/ha/semana.
8-16	Aplicar fertilizante inorgánico, urea y fosfato a razón de 4 y 1,5 kilos por hectárea. Colocar abono orgánico de origen animal a razón de 2900-4000Kg/ha/mes dividido en aplicaciones de 193Kg/ha/cada dos días.
18-20	Aplicar fertilizante inorgánico Urea y fosfato a razón de 4 y 1,5 kilos por hectárea cada dos días.

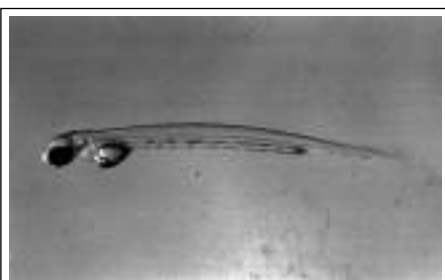


Figura 6. Larva de un día de puye *Galaxias maculatus*.

La planificación de producción de alimento vivo debe estar en estrecha relación con el periodo de desove e incubación de los huevos de puyes, esto es fundamental en el éxito y sobrevivencia de las larvas cuando son sembradas en el estanque, es muy importante que el momento de la eclosión de la larva de un día (Figura 6) coincida con el ascenso de la curva de rotíferos. Se debe garantizar al menos una densidad de 5-8 rot/ml. Cuando se trata de estanques nuevos, se recomienda trabajarlos con agua y régimen de fertilización por espacio de 1,5 a 2 meses antes de efectuar la siembra de larvas, con tasas de fertilización sostenidas de 2000 Kg/há/mes de abono orgánico repartido en dosis interdiarias.

Manejo del agua: Una vez generada una productividad rica en fito y zooplancton producto de la fertilización. La tasa de recambio durante los primeros 45 días, es únicamente para reemplazar el nivel perdido por evaporación e infiltración. A partir de los 60 días se evalúa la necesidad de establecer un flujo mínimo. Uno de los indicadores a considerar será la transparencia (Figura 7). Niveles de transparencia menores de 0,20 m, indican la necesidad de hacer una renovación de agua para tratar de mantener niveles entre 0,25 y 0,30 m. A medida que se avanza con el cultivo, se puede aumentar el recambio.



Figura 7. Estanque fertilizado y en aumento progresivo de la productividad (a). Estanque de larvicultura sin fertilizantes y con baja productividad (b). Nótese transparencia del agua.

No obstante lo mencionado, la elevación de la temperatura del estanque por encima de los 20°C obliga a efectuar recambio de agua dejando de lado las productividades presentes. Generalmente, esta situación se presenta durante los meses de verano. Cuando esto ocurre se aplica una estrategia que consiste en hacer este recambio durante las horas de la tarde (entre las 14 y 16 horas), que es cuando se presenta las temperaturas más altas del día. Otra de las formas de disminuir esta situación es proporcionando sombra a la mitad del estanque.

Siembra de larvas: La siembra de larvas de un día se hace durante el ascenso de la curva de rotíferos, en un régimen térmico de 15°C. Cuando el régimen térmico promedio del estanque aumenta sobre los 15 °C, los procesos biológicos se aceleran y el periodo entre el pico de rotíferos y la siembra se acorta. Aún cuando es posible tener muy buenas producciones de alimentos vivos sobre los 20°C, la sobrevivencia de larvas de puyes de un día (recién eclosionadas) no es buena. En los ensayos realizados con larvas de puye (Piscicultura Faja Maisan), se han utilizado densidades de siembra que variaron entre 3500 y 4000 larvas/m², lo que equivale a 3,5 y 4,0 larvas por litro. La densidad larval de siembra está en estrecha relación con la productividad natural del estanque y en especial con la cantidad de rotíferos. Para obtener una buena sobrevi-

vencia (40 a 50%) se debe tener en consideración que la densidad de rotíferos en el momento de la siembra debe estar en ascenso, sobre los 5000 rotíferos por litro de manera de asegurar una buena disponibilidad de alimento para las larvas recién sembradas. Si la densidad de alimento es baja, también se debe bajar la densidad larval para mantener la sobrevivencia.

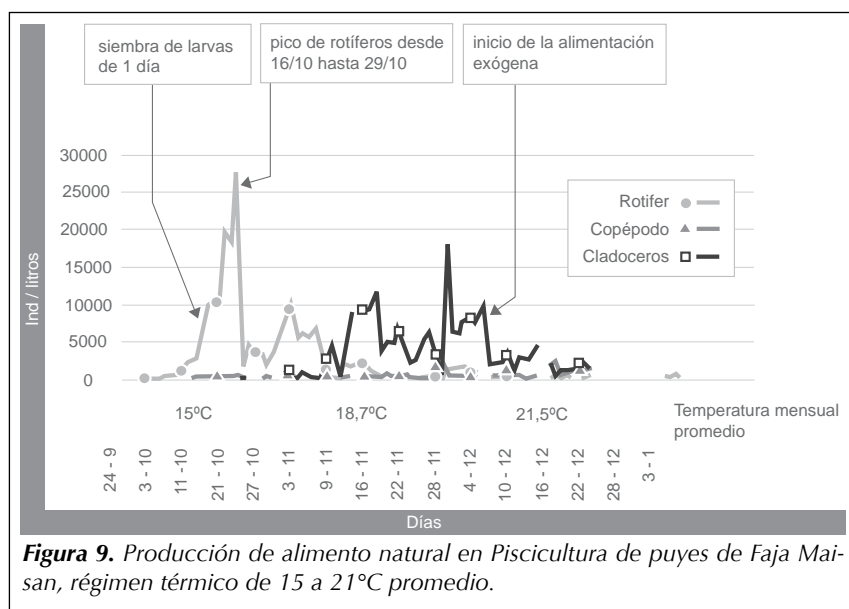
El proceso de siembra se puede hacer directamente en el estanque, cuidando que la temperatura del agua de las larvas a sembrar sea igual a la temperatura del agua del estanque. La Figura 8, muestra el acondicionamiento de larvas contenidas en bolsas antes de ser sembradas en el estanque, las mismas que deben permanecer dentro del estanque al menos una hora, con la finalidad de permitirle equilibrar su temperatura con la del estanque. Para una mejor sobrevivencia larval y control de predadores, se pueden utilizar jaulas "nursery" durante los primeros 10 días, hasta la completa absorción del saco vitelino. Este proceso requiere concentrar plancton del estanque de producción de alimento vivo para suministrar a las larvas, 3 veces al día, dentro de la jaula "nursery". Las jaulas son construidas con una estructura de sostén en PVC de media pulgada y cubierta con una tela de 500 μ de malla, aproximadamente.



Figura 8. Acondicionamiento de larvas a la temperatura del agua del estanque antes de la siembra. Detalle de la jaula "nursery" utilizada en los primeros 20 días de cultivo.

Alimento y alimentación de larvas: el primer alimento que reciben las larvas de puyes son rotíferos y/o nauplios de copépodos. Los 10 primeros días se debe mantener una adecuada concentración de este microzooplancton. El crecimiento de la población de plancton esta relacionada con las condiciones ambientales, por ejemplo tarda aproximadamente, 12-14 días a 17-22°C y 20 días 13-16°C. La densidad de zooplancton debe verificarse cada día. Después que la larva ha aprendido a cazar se puede mantener una densidad de organismos a la mitad, en caso de disminución de la concentración de rotíferos en los 10 primeros días, se debe fortalecer la fertilización orgánica a fin de mantener 3 a 4 rotíferos/ml.

El manejo de los tanques supone control de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, pH, transparencia, nutrientes así como concentración y secuencia del plancton. En la Figura 9, se muestra la sucesión del plancton en estanques de tierra en la Piscicultura del Puye de Faja Maisan, en este estanque en particular se logró prolongar la producción de rotíferos por más de 10 días reforzando la fertilización orgánica. Si bien los rotíferos se mantienen en el estanque, por la sucesión natural del estanque, comienzan aparecer otros organismos del plancton, que servirán de alimento a la larva. En la medida que ésta crece va requiriendo alimento de mayor tamaño, de ahí que es importante la provisión de cladóceros y copépodos que sucederán a los rotíferos en el estanque. Es importante tomar muestras diariamente el estanque a fin de constatar la concentración de este tipo de zooplancton, el que se prolongará en buenas concentraciones (2-3 cladóceros o copépodos por ml) unos 20 a 25 días, si se mantiene una buena estrategia de fertilización. A partir de la tercera semana después de la siembra, la larva es capaz de ingerir cladóceros.



Una vez que comienzan a caer los picos de cladóceros y copépodos se deberá comenzar con el periodo de destete, es decir comenzar a introducir alimento artificial. Con el propósito de asegurar una buena provisión de alimento natural, es recomendable que algunos de los estanques pueden ser sembrados con larvas y otros dejados para la producción de plancton, cuando la concentración de plancton en los estanques con larvas son bajas, se bombea o se filtra plancton del estanque de producción de alimento. En la Tabla 2, se muestran algunas características de los principales grupos de zooplancton encontrados en estanques de tierra fertilizados en la Piscicultura Faja Maisan.

Tabla 2

Principales características biológicas de tres grupos del zooplancton que sirve de alimento natural a la larva de puyes en estanques de tierra.

Nombre	Reproducción primaria	Longitud del cuerpo (mm)	Ciclo de vida (días)	Tamaño de alimento (mm)
Rotíferos	Asexual	0,04-2,5	4,0-42	0,001-0,02
Cladóceros	Asexual	0,2-3,2	25-100+	0,001-0,05
Copépodos	Sexual	0,3-3,2	10-900+	0,2-20

Durante el cultivo se muestrean las larvas, para constatar si están consumiendo el alimento vivo, para lo que se cuenta y se clasifica el tipo del plancton del tracto digestivo. A medida que las larvas crecen el alimento natural no es suficiente para mantener el crecimiento de las larvas, entonces se subsidia el sistema con alimentos exógenos ricos en energía y proteínas. Pasado 25 a 30 días de sembradas las larvas se debe comenzar la alimentación con alimento concentrado. Para

la producción de cristalinos el “starter” de salmón es un alimento adecuado, en los ensayos de la Piscicultura del puye de Faja Maisan, se han usado alimentos con las siguiente composición proximal (Nutra St 1,0-Trouw): Grasa bruta 22%, Proteína bruta 52%, Ceniza bruta 10%, Fibra bruta 0,6%, Fósforo total 1,3%, Premix minerales 1,0%, Premix vitaminas 1,0%, Agua 8-10%, Refuerzo vitaminas (Vitamina A 20.000ui/Kg, Vitamina D3 3000ui/Kg y Vitamina E 300ui/kg).

La primera alimentación con dieta artificial es pequeña, sólo 1-2 g/m²/día. Esta debe comenzar a aproximadamente a los 25 días después de sembrada la larva, en este momento las larvas aún consumen cladóceros y copépodos por lo tanto, el alimento debe tener una granulometría similar a estos alimentos, es importante continuar con los muestreos de larvas a fin de constatar el consumo de alimento artificial. A partir del día 30 la alimentación debe ser ad-libitum, 4 a 5 veces al día, procurando repartir el alimento sobre toda la superficie del estanque. Al final del periodo de producción del cristalino se debe estar entregando 4 a 5 g/m²/día. En la Tabla 3, se muestra el protocolo de alimentación utilizado en los ensayos de alimentación realizados en la piscicultura del puye en Faja Maisan.

Tabla 3

Protocolo de alimento y alimentación utilizado en la Piscicultura del puye en Faja Maisan.

Tipo de alimento	Días				
	0-10	10-25	25-30	25-60	60-120
Rotíferos	5-8 rot/ml	1-2 rot/ml	-	-	-
Cladóceros	-	2-3 cla/ml	2-3 cla/ml	1-2 cla/ml	0,5-1 cla/ml
Copépodos	-	2-3 cop/ml	2-3 cop/ml	1-2 cop/ml	0,5-1 cop/ml
Alimento artificial	-	-	1-2 g/m ² /día	3-4 g/m ² /día	4 -5 g/m ² /día

Aún cuando se haya iniciado el proceso de alimentación artificial, la fertilización de los estanques con larvas debe continuar. Pues esta y la productividad que genera ayuda a mantener la estabilidad del sistema. En este sentido la tasa de fertilización orgánica puede disminuirse hasta 1000Kg/há/mes, considerándose mantener la transparencia del agua no menos de 0,40m.

Crecimiento y mortalidad larval: El crecimiento de larvas de puyes en sistemas semi-intensivos depende fundamentalmente de la temperatura, del manejo y producción de alimento natural en el estanque, y del adecuado manejo de una estrategia de alimentación exógena. La sobrevivencia larval en sistemas de esta naturaleza suele ser bastante alta los primeros 30 días de cultivo larval. Sobre el 50% del cultivo larvario puede perderse durante esta fase. Las principales causas de mortalidad larvaria, están asociadas al canibalismo, deformaciones larvarias y a los problemas relacionados con la inflación de la vejiga natatoria. La alta concentración de oxígeno en el día puede causar mortalidad debido a sobre inflación de la vejiga natatoria, así también la formación de una capa lipídica en la superficie debido a exceso de fitoplancton, impide a las larvas la inflación de la vejiga natatoria. En el caso particular de los ensayos realizados en la Piscicultura del puye de Faja Maisan, no fue posible discriminar la causa de mortalidades, aún cuando puede ser atribuida a la calidad de la larva de un día, para lo que se tienen definido parámetros que garanticen dicha calidad. Por esta razón, los cultivos larvarios en semi-intensivos se basan en una estrategia de selección natural, y el éxito del cultivo está dado por la producción y siembra






de grandes cantidades de larvas de un día en el inicio del cultivo. Para el caso particular del puye, si la siembra inicial de larvas de 1 día es de 4000 a 5000 larvas/m², con una mortalidad estimada de un 50% durante el ciclo de producción (120 días periodo invierno-primavera) se podrá alcanzar una densidad de cristalinos 200 a 250 ind/m².

Figura 10. Muestreo de larvas con una red cónica y red de arrastre en la Piscicultura de Faja Maisan. En las fotos inferiores, recipiente con larvas de puye y mediciones con un pie de metro digital.

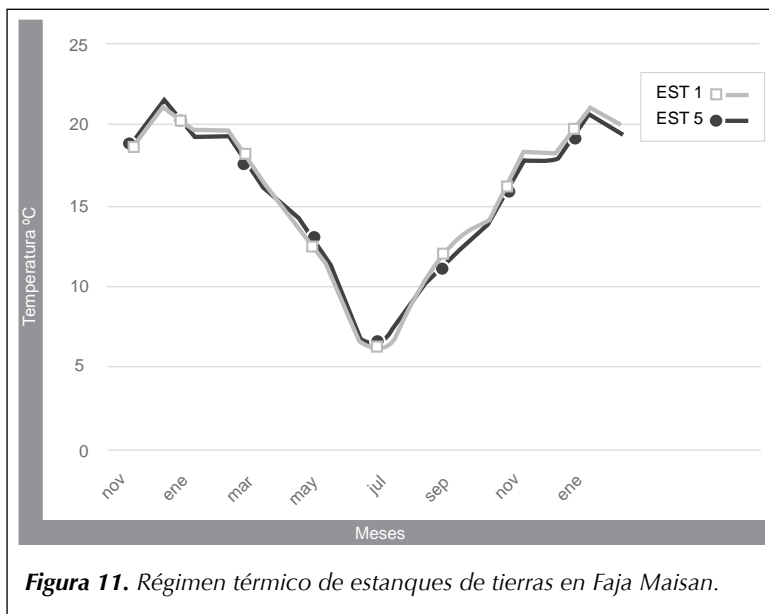
La evaluación del crecimiento larval se efectúa mediante toma de muestras de larvas (Figura 10). De acuerdo a los resultados obtenidos en el Proyecto Fondef D9611071, se conoce el desarrollo larval hasta cristalinos, el mismo que sirvió para estructurar una escala que permite hacer el seguimiento del crecimiento. En la Tabla 4 se puede observar esta con distintos indicadores que permiten identificar el estado en que se encuentra la larva.

Tabla 4

Escala de estados de desarrollo desde larva de un día hasta el estado de cristalino en cultivo semi-intensivo en estanque de tierra.

ESTADO	DESCRIPCIÓN	EDAD	REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA
Estado 1	Tamaño: 5 a 6 mm. Muy finos, presentan saco vitelino. Tubo digestivo con ano cerrado. Sin Pigmentación.	1 – 9 días	
Estado 2	Tamaño: 7 a 15 mm. Sin saco vitelino. Aleta dorsal y ventral del pedúnculo se continúan con aleta caudal. Tubo digestivo funcional. Sin Pigmentación.	10 - 45 días	
Estado 3	Tamaño: 20 a 50 mm. Aleta dorsal y ventral del pedúnculo se encuentran a la misma altura. Sin Pigmentación.	50 –110 días	

Para estos efectos es necesario tomar muestras en el momento de la siembra y luego cada semana hasta un periodo de 45 días. Seguido a esto se deberá distanciar la toma de muestras cada quince días hasta el final del cultivo. A partir de las muestras tomadas después del día 100, particular atención se debe dar a la observación de zonas o estructuras pigmentadas, las que aparecen como puntos estrellados (melanocitos). Esto es indicativo del fin del estado de cristalino e hito importante que define el momento de la cosecha.



El crecimiento de larvas de puyes en un sistema de cultivo semi-intensivo, desde la siembra de larvas de un día hasta la producción del cristalino, espécimen comercial, puede tener distintas velocidades de crecimiento dependiendo de la temperatura del agua, cuando el régimen alimentario es constante. La Figura 11 muestra el régimen térmico de los estanques de larvicultura de la Piscicultura de puyes de Faja Maisan, las temperaturas más bajas se registran en los meses de junio y julio (6,9 y 7,3°C, promedio mensual) y las más altas en diciembre enero (21,5 y 19,3°C, promedio mensual). Durante el periodo de invierno-primavera, el crecimiento en peso y longitud de las larvas responde a los siguientes modelos de crecimiento:

$$\text{Peso} = 9,49\text{E-}05 \text{ (3,0252 t)}$$

$$\text{Talla} = 4,00737 \text{ (1,36137 t)}$$

Donde Pt representa al peso en gramos en determinado momento, y Lt, la longitud en milímetros en un tiempo determinado (t) en días. Mientras que durante el periodo de primavera-verano los modelos para el crecimiento en peso y longitud son los siguientes:

$$\text{Peso} = 5.33\text{E-}03 \text{ (1.70876 t)}$$

$$\text{Talla} = 13,6299 \text{ (1,14977 t)}$$

En el periodo de invierno-primavera el estado de cristalino se alcanza a los 120 días con una longitud de 46 mm y 0,79 g (Figuras 12 y 13). Mientras que en el periodo primavera-verano el estado de larva cristalina comercial se alcanza a los 75 días con una longitud de 42 mm y 0,80g (Figuras 14 y 15).

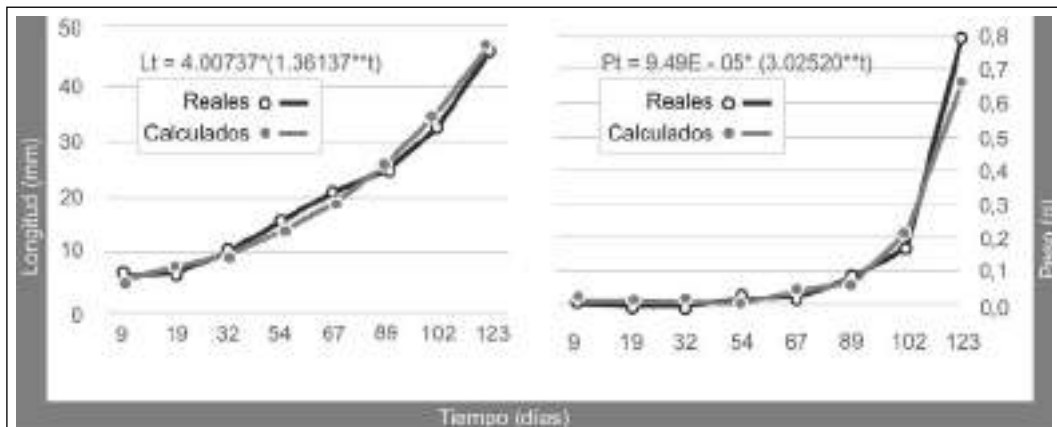


Figura 12. Curva de crecimiento en longitud de cristalinos de *G. Maculatus* “puye”, en cultivo semi-intensivo en estanque de tierra, Faja Maisan. Periodo Invierno-Primavera.

Figura 13. Curva de crecimiento en peso de cristalinos de *G. Maculatus* “puye”, en cultivo semi-intensivo en estanque de tierra, Faja Maisan. Periodo Invierno-Primavera.

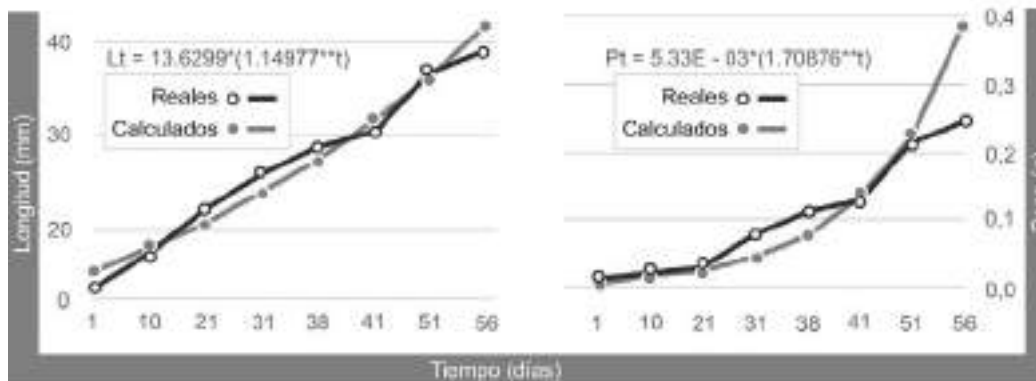


Figura 14. Curva de crecimiento en longitud de cristalinos de *G. maculatus* “puye”, en cultivo semi-intensivo en estanque de tierra, Faja Maisan. Periodo Primavera-Verano.

Figura 15. Curva de crecimiento en peso de cristalinos de *G. maculatus* “puye”, en cultivo semi-intensivo en estanque de tierra, Faja Maisan. Periodo Primavera-Verano.

Conclusiones

1. El puye es un pez de aguas frías que vive en un regimen térmico que no ofrece las mejores condiciones para mantener una alta productividad de alimento natural (vivo).
2. La producción de alimento vivo debe estar en estrecha relación con el periodo de incubación, esto es fundamental en el éxito y sobrevivencia de las larvas, la eclosión de la larva de un día debe coincidir con el ascenso de la curva de rotíferos, se debe garantizar al menos una densidad de 5-8 rot/ml.
3. El crecimiento de la población de plancton esta relacionada con las condiciones ambientales, por ejemplo, tarda aproximadamente de 12 a 14 días entre 17 y 22°C, y 20 días entre los 13 y 16°C. Estos valores son coincidentes mostrados por Li y Qin (1996) para regiones cálidas.
4. Aún cuando es posible tener muy buenas producciones de alimentos vivos sobre los 20°C, la sobrevivencia de larvas de puyes de un día (recién eclosionadas) no es buena.
5. La primera alimentación artificial debe comenzar a aproximadamente a los 25 días después de sembrada la larva. La ración debe ser pequeña, sólo 1-2 g/m²/día., esta coincide con el decaimiento de cladóceros y copépodos en el estanque.
6. A partir del día 30, la alimentación debe ser ad-libitum, 4 a 5 veces al día, procurando repartir el alimento sobre toda la superficie del estanque. Al final del periodo de producción se debe estar entregando 4 a 5 g/m²/día. Es recomendable mantener la fertilización a razón de 1000Kg/há/mes y la transparencia del agua no menos de 0,40m.
7. La sobrevivencia larval en sistemas de esta naturaleza suele ser bastante alta los primeros 30 días (sobre el 50%). Las principales causas de mortalidad larvaria, están asociadas al canibalismo, deformaciones larvarias y a los problemas relacionados con la inflación de la vejiga natatoria.
8. Los cultivos larvarios en semi-intensivos se basan en una estrategia de selección natural, y el éxito del cultivo está dado por la producción y siembra de grandes cantidades de larvas de un día en el inicio del cultivo.
9. En el periodo de invierno-primavera el estado de cristalino se alcanza a los 120 días con una longitud de 46 mm y 0,79 g. Mientras que en el periodo primavera-verano el estado de larva cristalina comercial se alcanza a los 75 días con una longitud de 42 mm y 0,80 g.
10. Para el caso particular del puye, si la siembra inicial de larvas de 1 día es de 4000 a 5000 larvas/m², con una mortalidad estimada de un 50% durante el ciclo de producción (120 días periodo invierno-primavera) se podrá alcanzar una densidad de cristalinos 200 a 250 ind/m².

BIBLIOGRAFÍA

- Bariles, J.; Bórquez, A.; Dantagnan, P.; Mardones, A.; Quevedo, J.; Salgado I.; Valdebenito N.; y Vega, R. (2003) Antecedentes para el cultivo del puye, *Galaxias maculatus* (Pises: Galaxiidae). Ed. Juan Barile Sanhueza. Universidad Católica de Temuco. 144 pp.
- Bórquez, A.; Dantagnan, P.; Valdebenito, N.; Bariles, J. y Vega, R. (1996) Crecimiento y sobrevivencia larval de *Galaxias maculatus* con diferentes densidades de cultivo. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura y 2° Simposio Avances y Perspectivas de Acuicultura en Chile. A. Silva & G. Merino (Eds). Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile. pp. 255 – 258.
- Campos, H. (1970) *Galaxias maculatus* (Jenyns) en Chile, con especial referencia a su reproducción. Boletín del Museo Nacional de Historia Natural, Santiago-Chile 31: 5-20.
- Csavas, I. (1990) Aquaculture development and environmental issues in the developing countries of Asia. Paper presented at the Conference on Environmental Issues in Third World Aquaculture Development, September 1990, Bellagio, Italy.
- Dantagnan, P.; Bórquez, A.; Quevedo, J y Valdebenito, I. (2002) Cultivo larvario del puye (*Galaxias maculatus*), en un sistema cerrado de recirculación. Información Tecnológica, 13(2): 15-21.
- Proyecto Fondef D9611071. (2000) Investigación y desarrollo de la tecnología para el cultivo comercial del puye *Galaxias maculatus* (Informe Final).
- Li y Qin (1996)
- McDowall, R. (1968) *Galaxias maculatus*, the New Zealand whitebait, New Zealand Ministry of Agricultura and Fisheries Research Bulletin 2: 84 pp.
- Pollard, D. A. (1971) The biology of landlocked form of the normally catadromous salmoniform fish *Galaxias maculatus* (Jenyns). I. Life cycle and origin. Australian Journal Marine and Freshwater Research, 22: 91-123.

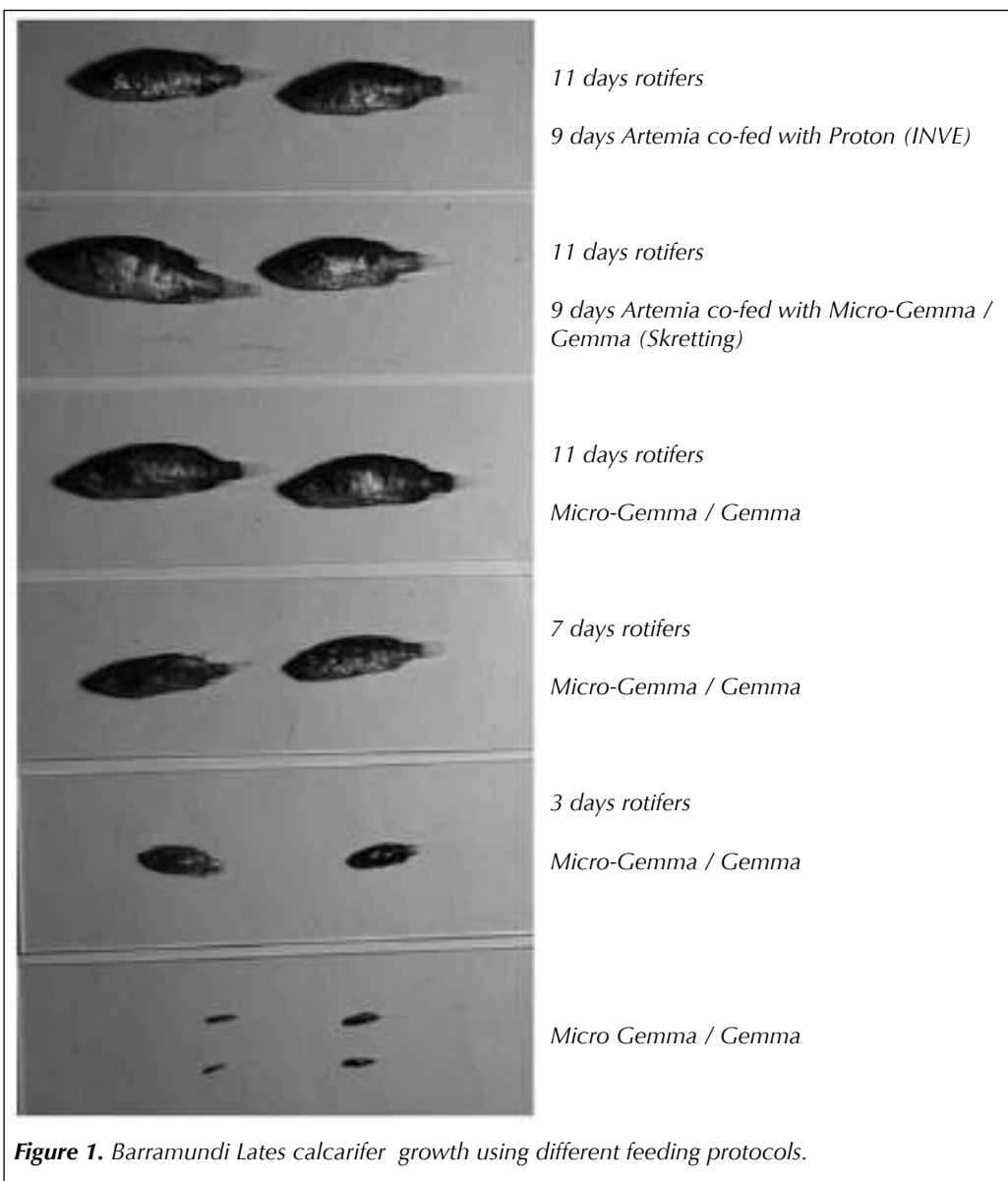
MARINE FISH LARVAE DIETS – CURRENT STATUS AND FUTURE DIRECTIONS

Sagiv Kolkovski

*Research Division, Department of Fisheries, Western Australia, P.O. Box 20,
North Beach, WA 6920, Australia.*

Introduction

During the past decade, efforts have been made to develop formulated diets to replace or, at least, reduce the use of live foods for marine fish larvae (Kolkovski, 2004; Koven *et al.*, 2001). Currently, none of the commercially available microdiets (MDs) match the performance of live food organisms. Although weaning the larvae from *Artemia* onto a MD can be achieved at metamorphosis in many species (Dabrowski, 1984; Foscarini, 1988; Hardy, 1989), the early introduction of prepared diets as the sole replacement for live food has met with limited success (Adron *et al.*, 1974; Barnabe, 1976; Kanazawa *et al.*, 1989; Appelbaum and Van Damme, 1988; Walford *et al.*, 1991). A clear example of the superiority of live food over commercial microdiets was demonstrated by Curnow *et al.*, (2006 a,b, Figure 1). Barramundi larvae development was affected by rearing protocols, with co-feeding rotifers and Gemma Micro (Skretting) allowing complete replacement of *Artemia*. However, by including *Artemia* in the protocol with Gemma Micro survival was significantly improved. Furthermore, feeding protocols with earlier weaning from rotifers resulted in significantly reduced growth and survival.



The efficacy of utilisation of feed particles (either live or inert) by marine larvae is affected by many external and internal factors (Figure 2). Primarily the searching, identification and ingestion process is influenced by physical stimuli including colour, shape, size and movement and olfactory stimuli at a molecular level.

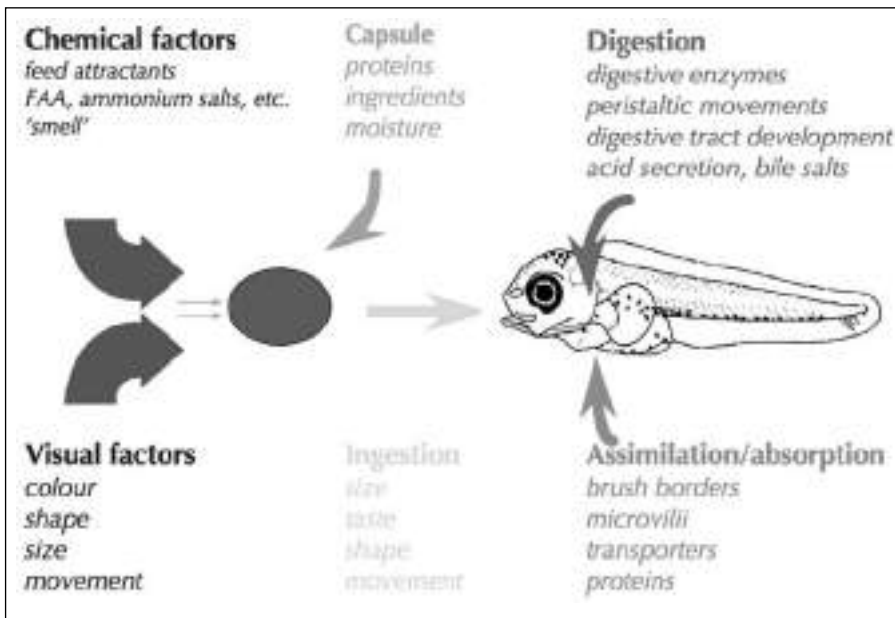


Figure 2. Factors affecting food particle utilisation.

Substances secreted by live food organisms that act to stimulate a feeding response in larvae belong to a group of chemicals known as 'feed attractants' and some have been identified (Kolkovski *et al.*, 1997). Moreover these chemical and physical factors affect the soft palette and influence the ingestion process, which is the precursor to the digestion process. Digestion involves secretion of enzymes, peristaltic movements and later on (after metamorphosis) acid and bile salt secretions. The assimilation and absorption process begins after the food particle is digested and broken down into more simple molecules that can pass across the gut lining. This is further facilitated by the development of brush border and microvilli as well as protein transporters and other transport mechanisms.

The feeding process

(Figure 3, Mackie and Mitchell, 1985):

There are several steps in the process of finding and ingesting food particles:

1. General and not specific reaction, initiation of search movements involves chemical and electrical stimuli.
2. Identification of the food particle location involves chemical stimuli.
3. Close identification of the food particle involves chemical and visual stimuli.
4. Tasting and/or actual feeding requires chemical stimuli (taste buds).

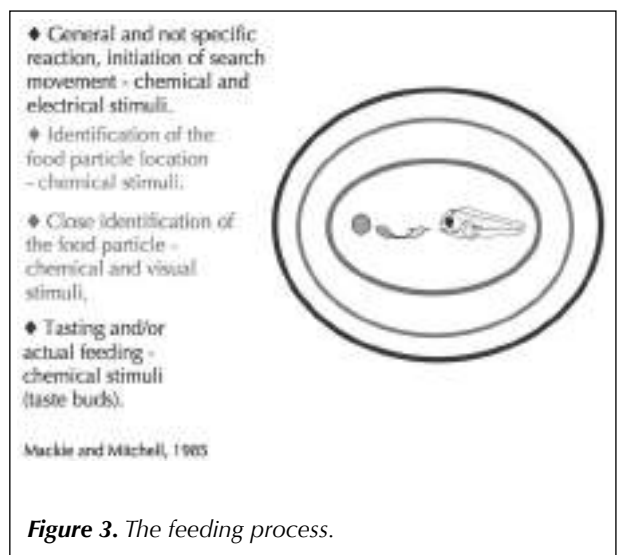


Figure 3. The feeding process.

Feed Identification and Ingestion

Various substances, such as free amino acids, nucleotides, nucleosides and ammonium bases, are released from organisms that are prey for fish larvae and are potent inducers of feeding behavior in marine (Knutsen, 1992; Doving and Knutsen, 1993) and freshwater fish larvae. Generally planktonic organisms concentrate in 'patches' that attract the fish larvae (Table 1).

Table 1

Planktonic organisms and their predators.

Predator	Food organism	Reference
Anchobi <i>Engraulis mordax</i>	Dinoflagellate <i>Gymnodinium</i>	Hunter and Thomas, 1974
Tintinnids <i>Favella sp.</i>	Dinoflagellate <i>Gymnodinium</i>	Buskey and Stoecker, 1989
Pleuronectes platessa	Artemia	Wyatt, 1972
Herring <i>Clupea harengus</i>	<i>Balanus nauplii</i>	Dempsey, 1978

Kolkovski *et al.*, (1997) identified some of the active substances in Artemia rearing water and added these substances to the larvae-rearing tank (at a concentration found in water containing 9 Artemia nauplii /ml). The authors then analysed the effect that individual substances have on ingestion rates by eliminating one substance at a time and observing the differences in feeding activity. When microdiet ingestion rates dropped, the missing substance was regarded as being an active feed attractant. The authors found four amino acids to induce increased feeding activity; glycine, alanine, arginine and ammonium salt – betaine. Furthermore a synergistic relationship was reported between the amino acids and betaine, which when combined produced a stronger effect than the sum of the individuals.

Similar amino acids as well as several other amino acids and other substances were also found to be active with other marine species (Table 2).

Table 2

Amino Acids and other metabolites used as feed attractants in marine organisms.

Rainbow trout <i>Salmo gairdineri</i>	Mixture of L-amino acids	Adron and Mackie, 1978
Atlantic salmon <i>Salmo salar</i>	Glycine	Hughes, 1990
Sea bass <i>Dicentrarchus labrax</i>	Mixture of L-amino acids	Mackie and Mitchell, 1982
Pig fish <i>Orthopristis chrysopterus</i>	Glycine, Betaine	Carr <i>et al.</i> , 1977, 1978
Red sea bream <i>Chrysophrys major</i>	Glycine, Betaine Glycine, Alanine, Lysine Valine, Glutamic acid and Arginine	Goh and Tamura, 1980 Fuke <i>et al.</i> , 1981 Ina and Matsui, 1980
Gilthead sea bream <i>Sparus aurata</i>	Glycine, Betaine, Alanine, Arginine	Kolkovski <i>et al.</i> , 1997

Turbot <i>Scophthalmus maximus</i>	Inosine and IMP	Mackie and Adron, 1978
Dover sole <i>Solea solea</i>	Glycine, Betaine Glycine, Inosine, Betaine	Mackie <i>et al.</i> , 1980 Metaillet <i>et al.</i> , 1983
Puffer Fugu <i>pardalis</i>	Glycine, Betaine	Ohsugi <i>et al.</i> , 1978
Japanese eel <i>Anguilla japonica</i>	Glycine, Arginine, Alanine, Proline	Yoshii <i>et al.</i> , 1979
Cod <i>Gadus morhua</i>	Arginine	Doving <i>et al.</i> , 1994
Herring <i>Clupea herangus</i>	Glycine, Proline	Damsey, 1984
Glass eel <i>Anguilla anguilla</i>	Glycine, Arginine, Alanine, Proline Alanine, Glycine, Histidine, Proline	Mackie and Mitchell, 1983 Kamstra and Heinsbroek, 1991
Lobster <i>Homarus Americanus</i>	Glutamate, Betaine, Taurine, Ammonium chloride	Corotto <i>et al.</i> , 1992
Western Atlantic ghost crab <i>Ocypode quadrata</i>	Butanoic acid, Carboxylic acid, Trehalose, carbohydrates, Homarine, Asparagine	Trott and Robertson, 1984
Freshwater prawn <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Taurine, Glycine, Trimethylamine, Betaine	Harpaz <i>et al.</i> , 1987
Abalone <i>Haliotis discus</i>	Mixture of L-amino acid and lecithin	Harada <i>et al.</i> , 1987
Gibel carp <i>Carassius auratus gibelio</i>	Glycine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Betaine	Xue and Cui, 2001

Amino acids

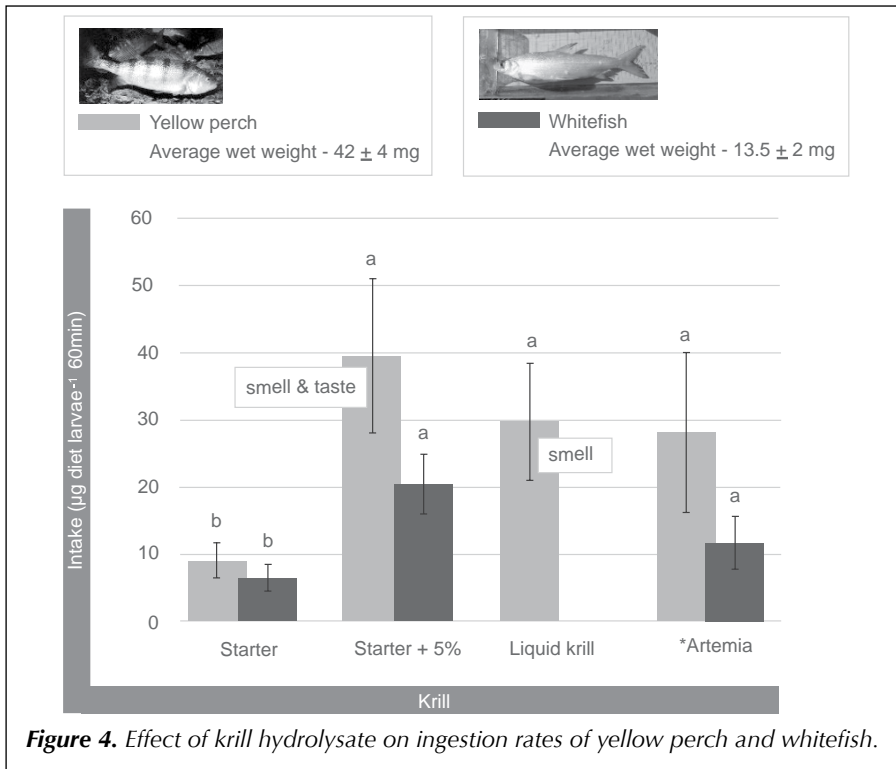
- Only the L-isomers have been found to be active as feed attractants
- Various combinations of amino acids have been found to have a positive effect on various fish species
- Synergistic effects were associated with many combinations of amino acids and other substances such as ammonium salts
- Increasing the concentration of amino acids (when added to the water) was found to have positive effects on feeding, range from 10⁻⁸ M to 10⁻² M.

Hydrolysates

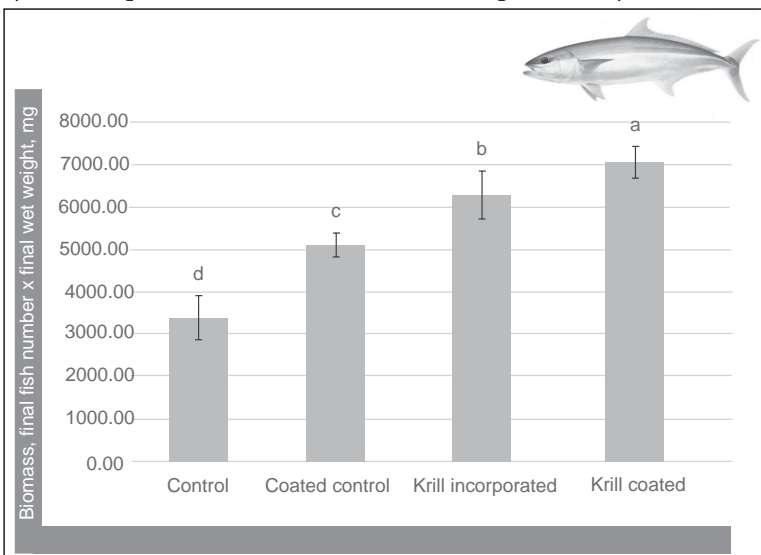
- Hydrolysates act as feed attractants as they contain digested protein components such as free amino acids and peptides.
- Concentrations of extracts and/or hydrolysates made from aquatic animals are harder to quantify than amino acids. However, concentrations that are found to have a positive effect on feeding range from 10⁻² to 10⁻¹⁰ g/l (when added to the water).
- In most cases, when incorporated into the diet, the concentration of hydrolysates and extracts released into the water was not determined.
- As a 'rule of thumb', protein fraction weight between 1000 and 10,000 Dalton was found to have a positive effect on feeding.

A practical way to increase the ingestion rates of microdiets would be to incorporate these substances as extracts or hydrolysates into the diet. Kolkovski *et al.* (2000) tested the effect of krill

hydrolysate as a feed attractant on yellow perch *Perca flavescens* and lake whitefish *Coregonus clupeaformis*, by coating commercial starter diet with 5% krill hydrolysate. Fish fed the coated diet experienced similar growth to fish fed live *Artemia* and significantly higher (31%) growth than fish fed the control diet (Figure 4).



Furthermore, a recent experiment was conducted to determine whether the method of hydrolysate integration into microdiets affected growth of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) larvae.



Krill hydrolysate was either used to coat the diet or it was incorporated into the diet (Kolkovski *et al.*, 2006). Growth rates of larvae fed coated-diet were significantly higher than larvae fed diet containing the hydrolysate, and both diets performed significantly better than the control diet (Figure 5).

Figure 5. Effect of krill hydrolysate coated or incorporated on Yellowtail kingfish larvae growth and survival.

Presentation of feed attractants to fish larvae

- The addition of attractants directly into the water uses large amount of these substances, but maintains a constant concentration.
- Coating the diet particle results in unknown leaching rates, but can contribute to higher palatability and more specifically identifies particles as food.
- Incorporation into the diet, as part of the protein source also results in an unknown leaching rate (depending on the microdiet type), however only a low amount of attractants are needed, part of the protein source in the diet is replaced, and digestion and assimilation is improved.

Table 3

Aquatic organisms (hydrolysate or extract) used as feed attractants.

Organism	Tested on	Reference
Balanus nauplii	Herring Clupea harengus	Dempsey, 1978
Tubifex blood worm	Tilapia	Iwai, 1980
Short necked clam Tapes japonica	Japanees eel Anguilla japonica	Hashimoto <i>et al.</i> , 1968
Cod Gadus morhua	Hermit crab Petrochirus diogenes	Hazlett, 1971
Cod Gadus morhua	Glass ell Anguilla anguilla	Kamstra and Heinsbroek, 1991
Abalone	Spiny lobster Panulirus interruptus	Zimmer-Faust <i>et al.</i> , 1984
Dungeness crab Cancer magister	Little neck clam Protethace staminea	Pearson <i>et al.</i> , 1979
Pink shrimp Penaeus duorarum	Spiny lobster Panulirus argus	Reeder and Ache, 1980
Marine polychaete Perinereis brevicirrus	Red sea Bream Chrysophrys major	Fuke <i>et al.</i> , 1981
Shrimps	Rainbow trout Oncorhynchus mykiss and Atlantic salmon Salmo salar	Mearns <i>et al.</i> , 1987
Krill Euphausia pacifica	Yellow perch Perca flavescens, Walleye Stizostedion vitreum, Lake whitfish Coregonus clupeaformis,	Kolkovski <i>et al.</i> , 2000, Kolkovski, 2001
Krill Euphausia pacifica	Barramndi, Lates calcarifer	Curnow <i>et al.</i> , 2006
Krill Euphausia pacifica	American lobster Homarus americanus	Floreto <i>et al.</i> , 2001
Krill Euphausia pacifica	Black tiger shrimp P. Monodon	Smith <i>et al.</i> , 2005
Mussel Mytilus edulis	Gilthead sea beam Sparus aurata	Tandler <i>et al.</i> , 1982
Fish (non specific)	Black tiger shrimp P. Monodon Largemouth bass Micropterus salmoides	Smith <i>et al.</i> , 2005 De Oliveira and Cyrino, 2004

Table 3. Summary of the variety of extracts and hydrolysates tested as feed attractants on different marine organisms.

Digestion

The basic capacity and rates of hydrolysis and transport of specific nutrients within the fish larvae intestine is qualitatively and quantitatively set in genetic 'memory' to correspond to a natural diet. At first feeding, the digestive tract in most fish species contains the enzymes related to digestion, absorption and assimilation of molecules such as proteins, lipids and glycogen (Kolkovski, 2001). However, larval enzyme activity has been found to be relatively low when compared to adult fish (Cousin *et al.*, 1987). Each enzyme develops independently during ontogenesis, with variation related to fish species and temperature (Figure 6) and the suitability of food type (Cahu and Zambonino Infante, 2001).

Figure 6. Comparison of developmental stages in the digestive tract of several marine fish species (from Moyano *et al.*, 1996).

It has been suggested that the live food consumed by the larvae assist the digestion process by 'donating' their digestive enzymes, either by autolysis or as zymogens that activate the production of larval endogenous digestive enzymes. Live food organisms also contain gut neuro-peptides and nutritional 'growth' factors that enhance digestion. These substances are frequently omitted in formulated diets. However, the level of contribution of live food organisms to the digestion process is debatable (Table 4).

Table 4

Digestive enzyme contribution by live food organisms.

Species	Live food organism	Findings	Authors
Carp <i>Cyprinus carpio</i> , Grass carp <i>Ctenophayngodon idella</i> , Salmon <i>Salmo gairdneri</i> , whitefish <i>Coregonus lavaretus</i>	Copepods, Cladocera, rotifer, Artemia	10%-98% of proteolytic activity is due to the food organisms	Dabrowski and Glogowski (1977a)

Whitefish <i>Coregonus</i> sp.	<i>Monia</i> sp.	70% of the trypsin activity in intestine derived from the live food	Lauff and Hoffer (1984)
Turbot <i>Scophthalmus maximus</i>	<i>Artemia</i> , rotifers, copepods	Exogenous digestive enzymes contribution: proteases 43-60% esterase 89-94% exonuclease 79-88% amylase 15-27%	Munila-Moran <i>et al.</i> , (1990)
Herring <i>Clupea herrengus</i>	copepods	0.5% of total trypsin content in intestine is derived from the live food	Pedersen <i>et al.</i> , (1987), Pedersen and Hjelmeland (1988)
Japanese sardine <i>Sardinops melanotictus</i>	Rotifer protease	0.6% of total protease activity in larvae	Kurokawa <i>et al.</i> , (1998)

Moreover, particulate diets contain proteins and other ingredients that are relatively difficult for larvae to digest. Based on the hypothesis that larvae are lacking the digestive capacity to breakdown dry particles and complex proteins (Figure 7), the inclusion of different digestive enzymes, especially proteases, in the microdiets resulted in significantly improved nutrient utilization and performance of the larvae; however, these were still not at the level of live-food fed larvae (Table 5, Figure 8, Kolkovski *et al.*, 1993).

Figure 7.

Table 5

Figure 8.

The next step, instead of adding digestive enzymes to the diet was to include pre-hydrolyzed proteins (hydrolysates) in the diets, which gave mixed results depending on the percentage of inclusion and larval age (Table 6). Possible explanations for these results were suggested:

Table 6

- Fast flow of short peptides and FAA through the gut, a flow that the larvae cannot handle in terms of FAA absorption (Kolkovski and Tandler, 1999).
- Amino acid absorption rates and specific nutrient receptors progressively change as they pass through the gastrointestinal tract of the fish. Therefore, premature absorption of certain essential amino acids presented in the free form can obstruct the absorption of other essential amino acids, polypeptides or intact proteins (Hardy, 1991).

From these results it can be concluded that free amino acids and hydrolysates can only partially replace the intact proteins in microdiets designed for fish larvae. As a general recommendation, the level of the hydrolysate should not exceed 30% of the total protein levels.

Diet Types

Three types of microdiet particles are currently being used (*Figure 9*):

1. microbound diets (MBD),
2. micro-coated diets (MC) and
3. micro-encapsulated diets (MED).

All have been used extensively in nutritional studies with finfish larvae. MBD's are manufactured using the simplest method, where all the ingredients are mixed with a binder (activated by temperature or chemically) and then dried, ground and sieved to the required size. MC particles are actually MBD particles coated with oils or other binders to reduce leaching. MED particles are taken one step further and have a membrane or capsule wall, which separates dietary materials from the surrounding medium. The capsule wall helps maintain the integrity of the food particle until it is consumed and helps maintain water quality. However, this attribute may restrict leaching of water-soluble dietary components and therefore reduce the larvae's attraction to the food particles. The capsule wall is also thought to impair digestion of the food particle (Yufera *et al.*, 1998).

Figure 9.

Currently, the manufacture process for MBD's is the most commonly used method of preparation. It consists of dietary components held within a gelled matrix or binder (Lopez-Alvarado *et al.*, 1994). They do not have a capsule and it is suggested that this facilitates greater digestibility and increased attraction through greater nutrient leaching (Partridge and Southgate, 1999). Many different binders have been used in MBD's including polysaccharides from seaweed such as agar, carrageenan and alginate and proteins such as zein and gelatine (Meyers *et al.*, 1972; Adron *et al.*, 1974; Hashim and Mat Saat, 1992). Binders vary considerably in their nutritional value and binding characteristics and the choice of binder can significantly influence the MBD's stability in water, rate of ingestion and nutrient assimilation (Partridge and Southgate, 1999). Heinen (1981) assessed water stability of formulated diets made from 11 different binders; MBD made from agar and alginate were amongst the most stable in terms of integrity, while carrageenan was amongst the poorest.

Both MED and MBD are generally dried prior to use and this may hinder their digestion. Relatively new methods of preparing microdiets, initially used in the pharmaceutical industry, are cold extrusion or marumerization (MEM) and particle assisted rotational agglomeration (PARA) (Barrows and Lellis, 2006). The first method (MEM) is effective in producing particles >500µm. The ingredients are pre-mixed and then extruded through a 500µm screen then fractured, shaped and densified in a marumerizer (spinning disk). The PARA method produces <500µm particles, which are created by rotating a wet mash in the marumerizer with inert beads. (Figure 10)

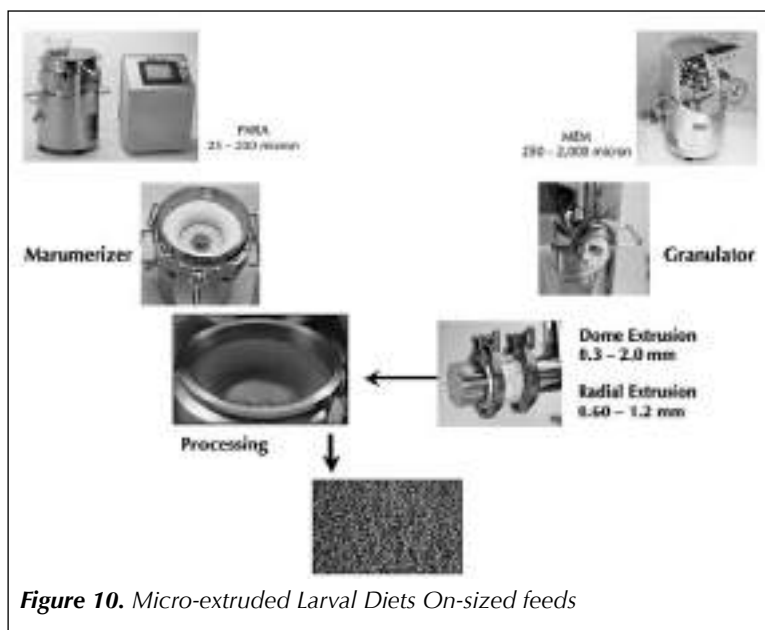


Figure 10. Micro-extruded Larval Diets On-sized feeds

Microdiet characteristics

Leaching

As mention above, one of the problems of MBD particles is the high leaching rate of amino acids. Yufera *et al.*, (2003) determined the rate of different amino acids leaching from both MBD and MED. The authors found contrary patterns between the two diet types. While hydrophilic amino acids leached the most from MBD, hydrophobic amino acids were found to leach from MED

particles at a higher rate (*Figure 11*). The leaching rates of the two diets were also significantly different. For instance, 70% of free lysine leached from MBD particles after less than 5 minutes, while less than 7% leached from MED particles after 60 minutes (*Figure 12*).

Figure 11.

Figure 12.

Buoyancy

One of the most significant problems concerned with microdiet particles is their negatively buoyant inert state. MBD particles don't move like living zooplankton, which is a visual stimulus for increased feeding activity. Furthermore they sink to the bottom where they are no longer available to the larvae and accumulate there, leading to bacterial proliferation. This further necessitates the need to effectively wean the larvae onto the MBD, in order to both modify their digestive

capacity and their feeding behaviour. A change in behaviour is illustrated by the larvae's ability to recognize the inert particles as food and to more actively hunt for them during a relatively smaller window of opportunity, as they pass down through the water column. Figure 13 illustrates the sinking rates of several commercial microdiets. Different attempts have been made to increase the time the microdiet particle spends in the water column including buoyancy (air in the particle), oil levels, manufacturing methods and different rearing systems using up welling currents.

Figure 13.

Weaning methods

An important factor influencing the larvae's acceptance of a microdiet, which affects both their growth and survival, is the weaning process. Generally, weaning is done gradually using co-feeding techniques that reduce the amount of live food while gradually increasing the microdiet component. Curnow et al. (2006 b) demonstrated the effect of different weaning and co-feeding treatments on growth and survival of barramundi larvae (*Figure 14*). The authors found that early weaning before the larvae had adequately developed, as well as diet type and quality not only influenced growth and survival, but also the occurrence of cannibalism.

Figure 14.

Nutrition

Although, many studies have been and are still being directed towards the nutritional requirements of marine fish larvae, we have only begun to 'scratch the surface'. In the past decade or two, the majority of studies were focused on lipid requirements. Recently, more and more studies are published on the protein and amino acid requirements of marine fish larvae. Even more recently, more in-depth studies have been conducted that address protein – energy ratios in fish larvae.

Conclusion

Finally, an integrative approach needs to be taken in the development of microdiets for fish larvae taking into account the physiology of the larval digestive system and nutritional requirements (lipids, proteins, vitamins and trace elements) as well as technology (leaching, sinking, binders, feeding and rearing systems). Microdiet manufacturers need to focus on better ingestion, digestion and assimilation of a balanced nutrient profile that is provided using an all-encompassing approach.

Acknowledgments

The author thanks to Mr J. Curnow for his useful comments and contribution to this review paper.

BIBLIOGRAPHY

- Adron, J.W., Blair, A., Cowey, C.B., 1974. Rearing of plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae to metamorphosis using an artificial diet. *Fishery Bulletin* 72, 353 – 357.
- Adron, J.W., Blair, A., Cowey, C.B., 1974. Rearing of plaice *Pleuronectes platessa* larvae to metamorphosis using an artificial diet. *Fish. Bull.* 72, 353 – 357.
- Appelbaum, S., Van Damme, P., 1988. The feasibility of using exclusively dry diet for rearing of *Clarias gariepinus* Burchell larvae and fry. *J. Appl. Ichthyol.* 4, 105 – 110.
- Barnabe, G., 1976. Elevage larvaire du loup *Dicentrarchus labrax* L.; Pisces Serranidae l'aide d'aliment seccompose. *Aquaculture* 9, 237 – 252.
- Barrows, F.T., Lellis, W.A., 2006. Effect of diet processing method and ingredient substitution on feed characteristics and survival of larval Walleye Sander vitreus. *L. of The World Aquacult.* 37, 154 – 160.
- Cahu, C., Zambonino, J., 2001. Substitution of live food by formulated in marine fish larvae. *Aquaculture* 200, 161 – 180.
- Cousin, J., Baudin-Laurencin, F., Gabaudan, J., 1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L. *J. Fish Biol.* 30, 15 – 33 .
- Curnow, J., King, J., Bosmans, J., Kolkovski, S., 2006a. The effect of various co-feeding and weaning regimes on growth and survival in barramundi (*Lates calcarifer*) larvae. *Aquaculture* 257, 204 – 213.
- Curnow, J., King, J., Partridge, G., Kolkovski, S., 2006b. The effect of *Artemia* and rotifer exclusion during weaning on growth and survival of barramundi (*Lates calcarifer*) larvae. *Fish Nutrition*, in press.
- Dabrowski, K., 1984. The feeding of fish larvae: present "state of the art" and perspectives. *Reprod. Nutr. Develop.* 24, 807 – 833.
- Doving, K.B., Knutsen, J.A., 1993. Feeding responses and chemotaxis in marine fish larvae. In: Kaushik S.J., Luquet P. (Eds.), *IV International Symposium on Fish Nutrition and Feeding INRA*, Paris, pp. 579 – 589.
- Foscarini, R., 1988. A review: intensive farming for red sea bream *Pagrus major* in Japan. *Aquaculture* 72, 191 – 246.
- Hardy, R.W., 1989. Diet preparation. In: Halver, J.E. (Ed.), *Fish Nutrition*. 2nd edn. Academic Press, San Diego, California, USA, 476–544 pp.
- Hashim, R., Mat Sat, N., 1992. The utilisation of seaweed meals as binding agents in pelleted feeds for snakehead (*Channa striatus*) fry and their effects on growth. *Aquaculture* 108, 299 – 308.
- Heinen, J., 1981. Evaluation of some binding agents for crustacean diets. *Progressive Fish Culturist* 43, 142 – 145.
- Kanazawa, A., Koshio, S., Teshima, S., 1989. Growth and survival of larval red sea bream *Pagrus major* and Japanese flounder *Paralichthys oliŌaceus* fed microbound diets. *J. World Aquacult. Soc.* 20, 31 – 37.
- Knutsen, J.A., 1992. Feeding behavior of North Sea turbot (*Scophthalmus maximus*) and Dover

- sole (*Solea solea*) larvae elicited by chemical stimuli. *Marine Biology* 113, 543 – 548.
- Kolkovski, S., 2001. Digestive enzymes in fish larvae - Application and implication - a review. *Aquaculture* 200, 181 – 201.
- Kolkovski, S., 2004. Marine Fish Larvae Diets – Current Status and Future Directions. 11th International Symposium on Nutrition and Feeding in Fish, Phuket, Thailand. 112 pp.
- Kolkovski, S., 2006. Amino acids as feed attractants for marine fish larvae. *World Aquaculture Symposium 2006*, Florence, Italy.
- Kolkovski, S., Czesny, S., Dabrowski, K., 2000. The use of krill hydrolysate as feed attractant in fish diets. *J. World Aqua. Soc.* 31, 81 – 88.
- Kolkovski, S., Koven, W.M., Tandler, A., 1997. The mode of action of *Artemia* in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture* 155, 193 – 205.
- Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G.W., Gertler A., 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Fish Physiol. and Biochem.* 12, 203 – 209.
- Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, E., Gamsiz, K., Tandler, A., 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: A review. *Aquaculture* 194, 107 – 121.
- López-Alvarado, J., Langdon, C. J., Teshima, S., Kanazawa, A., 1994. Effects of coating and encapsulation of crystalline amino acids on leaching in larval feeds. *Aquaculture* 122, 335 – 346.
- Mackie, A.M., Mitchell, A.I., 1985. Identification of gustatory feeding stimulants for fish applications in aquaculture. In: Cowey, C.B., Mackie, A., Bell, J.G.(Eds.), *Nutrition and Feeding in Fish*. Academic Press: London, pp. 177–191.
- Meyers, S.P., Butlers, D.P., Hastings, W.H., 1972. Alginates as binders for crustacean rations. *Progressive Fish Culturist* 34, 9 – 12.
- Partridge, G.J., Southgate, P.C., 1999. The effect of binder composition on ingestion and assimilation of microbound diets (MBD) by barramundi *Lates calcarifer* Bloch larvae. *Aquaculture Research* 30, 879 – 886.
- Walford, J., Lim, T.M., Lam, T.J., 1991. Replacing live foods with microencapsulated diets in the rearing of seabass *Lates calcarifer* larvae: do the larvae ingest and digest protein-membrane microcapsules?. *Aquaculture* 92, 225 – 235.
- Yufera, M., Kolkovski, S., Fernandez-Diaz, C., Dabrowski, K., 2003. Free amino acid leaching from protein-walled microencapsulated diet for fish larvae. *Aquaculture* 214, 273 – 287.
- Yufera, M., Kolkovski, S., Fernandez-Diaz, C., Thies, C., 1998. Microencapsulated diets for fish larvae - current 'state of art'. VII Bioencapsulation symposium - Easton, MD.

FEEDING MARINE FISH LARVAE WITH LIPID SOURCES ALTERNATIVE TO FISH OIL

Izquierdo, M.S., Atalah E., Benítez-Santana, T., Hernández, C.M. and Robaina, L.
Grupo de Investigación en Acuicultura. IUSA & ICCM.
P.O. Box 56, 35200, Telde, Las Palmas, Canary Islands, Spain

Abstract

Despite global production of fish oil has been stagnant for the last decade, its demand as a source of n-3 PUFAs for aquafeeds has been continuously increasing. In marine fish larvae, fish oil replacement levels by vegetable oils will depend on the use of live preys or microdiets. The high content of lipids in enrichments for live preys may allow a high percentage of fish oil substitution, depending on the requirements of each species but also on the utilization of enrichment lipids by rotifers or *Artemia*. In microdiets, despite larvae have high EFA requirements, the high protein at this stage of development impose high dietary protein contents which in turn provide additional sources of EFA. Complete substitution of fish oil by vegetable oils in enrichments for seabream larvae reduces growth and affects larval normal behaviour. But fish oil replacement by vegetable oils in microdiets for seabream, did not affected growth and survival. Moreover, feeding larvae with vegetable oils increased up to 6 times the relative expression of delta 6 desaturase like gene in larvae fed rapeseed and soybean oils. Since the lack of essential fatty acids for marine fish constrains the use of vegetable oils in larval feeds, alternative EFA sources are being developed, such as marine micro algae which constitute a well recognized "single cell oil source" high in PUFA. Substitution of either fish oil or booster oils in microdiets for seabream by homogenized *C. cohnii* promotes good growth and survival, particularly in very young larvae, whereas substitution by *Phaeodactylum tricornutum* at this larval stage damages intestine epithelia and reduces survival. Finally, substitution by *Schyzotrichium sp.* slightly reduces larval seabream growth.

Importance of fish oil as the main lipid source in aquafeeds and larval nutrition

Due to its high digestibility and elevated content on essential fatty acids, fish oil has been traditionally used as a main lipid source in fish diets. But fish oil production is dependant on fisheries which constitute a declining natural resource seriously endangered and its continue exploitation is linked to detrimental environmental consequences (Tonon *et al.*, 2002). Hence, global production of fish oil has been stagnant around 1.2 millions tons/year for the last decade. Besides, the demand for fish oil as a source of n-3 PUFAs is increasing together with the fast development of aquaculture and its use in food and pharmacy. At present more than 70% of the fish oil production is consumed by aquafeeds (Tuominen and Esmark, 2003) and it is expected world fish oil supply will not be enough to cover completely the lipid sources demand for aquaculture within the next ten years. Thus, further development of aquaculture seems to be dependant on the availability of other lipid sources alternative to fish oil (Bell *et al.*, 2003). Moreover, competition for fish oil for its inclusion in human nutritional supplements and agricultural feeds other than for aquaculture will soon make fish oil a highly prized commodity (Harel *et al.*, 2002). In addition,

fish oil use has also other types of problems such as a poor oxidative stability (Swaaf *et al.*, 1999), pollutants accumulation (Tonon *et al.*, 2002), contamination with heavy metals and seasonal and species variation in of a very complex fatty acid profile (up to 50 different fatty acids may be present) (Medina *et al.*, 1998). For all these reasons, there is a high interest in searching for other lipid sources which are able to substitute fish oil in diets for aquaculture.

As the main source of essential fatty acids, together with fish meal, minimum fish oil inclusion in fish diets will depend on quantitative requirements. The reported essential fatty acid requirements may vary between species (NRC, 1993) and are higher in larval stages (1-4% of feed dry matter; Izquierdo, 1996) than in adult fish (0.5-2.0% of feed; NRC 1993). Hence, whereas a fish juvenile is able to survive for months on a diet almost completely deprived from EFA (Izquierdo, 2005), a larvae would die in 10-15 days (Izquierdo *et al.*, 1988). Moreover, DHA is known to have a higher efficiency as an essential fatty acid than EPA (Watanabe *et al.*, 1989; Watanabe 1993), the former being particularly accumulated in the olfactory nerve, retina and central nervous system (Sargent *et al.*, 1993). The content of DHA in fish meal and fish oil is will vary dependent on species and season, but the average content in fish meal is 1.7% (Nutreco ARC, unpublished) and in fish oil 5% (NRC, 1993). Taking into account that fish feed contain about 1.5-2.5% DHA, the market demand for year 2010 would be close to 400.000 metric tons, whereas world production of fish meal and oil only renders less than 200 000 tons of DHA (Rosenlund, unpublished). Despite larval diets for marine fish will require higher concentrations of DHA, the global amount of this fatty acid required for this type of diets will be very small compared with the total feed production.

Plant oils as alternative lipid sources

Some vegetable oils such as soybean and linseed oils are considered as good alternative lipid sources in diets for juvenile salmonids and freshwater fish (Bell *et al.*, 2001; Rosenlund *et al.*, 2001; Caballero *et al.*, 2002). However, in marine fish the use of vegetable oils as a sole lipid source is limited by the low ability of these species to convert linoleic and linolenic acids, abundant in many vegetable oils, into arachidonic (ARA), eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acids (DHA) which are essential for marine fish and high in fish oil. For that reason, partial replacement of fish oil by vegetable oils would be only possible when these essential fatty acids are present in the diets in sufficient quantities to meet the essential fatty acid requirements.

In juveniles of marine fish, recommended fish oil replacement levels found in literature will vary according to the species EFA requirements, the amount of fish meal included as it constitutes a complementary source of EFA, the type of fish oil used the total dietary lipid content and the feeding period (Izquierdo *et al.*, 2005). For instance, up to 60% fish oil may be replaced by palm oil in diets for yellowtail without altering fish growth (Watanabe, 2002), as well as in seabream or sea bass if high lipid content diets are used (Izquierdo *et al.*, 2003), since both fish meal and the portion of fish oil included is able to meet the essential fatty acid (EFA) requirements of these species. Nevertheless, after three months of feeding high lipid diets with a 60% fish oil replacement by certain vegetable oils, particularly soybean oil, liver lipid content and lipid deposition in the hepatocytes markedly increased (Caballero, 2002) and some immune parameters were affected (Montero *et al.*, 2003) suggesting undesirable effects on fish health when longer feeding periods are tested. Besides, increase of substitution levels up to 80 %, significantly reduced growth and conversion indexes (Izquierdo *et al.*, 2006). Regarding the fish oil type, it is advantageous to use fish oils very rich in n-3 HUFA such as Peruvian anchovy oil (Rosenlund *et al.*, 2001), which would allow a higher replacement by vegetable oils, producing fish fillets with a similar n-3 HUFA content than fish fed 100% menhaden fish oil.

In marine fish larvae, fish oil replacement levels will depend firstly on the type of feed used, basically live preys or microdiets. The high content of lipids in enrichments for live preys may allow a high percentage of fish oil substitution, depending on the requirements of each species but also on the utilization of enrichment lipids by rotifers or *Artemia*. In microdiets, despite larvae have high EFA requirements, the high protein at this stage of development impose high dietary protein contents which in turn provide additional sources of EFA. Moreover, the high energy requirements also impose high dietary lipid levels which allow a higher percentage of replacement by vegetable oils, which indeed are very digestible and constitute a good energy source.

Inclusion of vegetable oils in rotifers enrichment

In order to study the effect of fish oil substitution by different vegetable oils in enrichment emulsions for rotifers an experiment was conducted with seabream larvae (Benítez-Santana *et al.*, in press). From day 4th after hatching, larvae were fed with rotifers (*Brachionus plicatilis*) twice a day (at 9h00 and 15h00) for the following 20 days with four types of rotifers: "FO rotifers" enriched with fish oil, "SO rotifers" enriched with soybean oil, "LO rotifers" enriched with linseed oil and "RO rotifers" enriched with rapeseed oil. Each type of rotifers was tested in triplicate larval rearing tanks.

Complete fish oil replacement in rotifers enrichment by any of the vegetable oils assayed markedly reduced seabream larval growth, in relation with the lower n-3 HUFA and DHA levels found in these rotifers in comparison with fish oil enriched ones (Benítez-Santana *et al.*, in press). Essential fatty acid requirements in gilthead seabream along larval development are around 1.5% n-3 HUFA in dry matter, regardless the use of different prey types (Rodríguez *et al.*, 1998) or microdiets (Salhi *et al.*, 1999). The n-3 HUFA contents in rotifers enriched with vegetable oils were lower than 0.19 being well below the minimum level necessary to cover the fatty acid requirements of this species (Benítez-Santana *et al.*, in press).

Whole body composition of the larvae was similar in larvae fed fish oil enriched rotifers with respect to the initial larvae, being higher in n-3 HUFA and DHA than larvae fed vegetable oils enriched rotifers (Benítez-Santana *et al.*, in press). Besides, fatty acids composition in both central nervous system and eyes, revealed a retention of n-3 HUFA, particularly DHA, even in larvae fed rotifers enriched with vegetable oils, confirming their importance for the development of such tissues. Nevertheless, EFA contents in larvae fed rotifers enriched with vegetable oils was lower, in agreement with the different behaviour found in this larvae. For instance, a reduction in burst swimming speed after a visual stimulus was obtained in larvae fed vegetable oils enriched rotifers in comparison with fish oil, in agreement with the visual incapacity found in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) fed DHA-deficient diets (Masuda *et al.*, 1999).

Swimming activity before stimulus was also reduced by feeding rotifers enriched with vegetable oils (Benítez-Santana *et al.*, in press). Despite reaction against sonorous stimulus was not affected by feeding vegetable oils, appearance of reaction after visual stimulus was delayed to day 19th in larvae fed LO rotifers and it was also delayed and reduced by feeding the other vegetable oils. Higher burst swimming speed in larvae fed LO is in agreement with the higher response to acute stress found in juveniles of the same species fed with linseed oil (Montero *et al.*, 2003). Higher burst and cruise swimming speed in the larvae fed rotifers enriched with fish oil, would be related to the higher levels of DHA in larval eyes and brain, since this fatty acid is involve in several neural tissue related functions such as neurocytes myelination and synapse construction, both functions being sensitive to nutritional deficiencies (Krigman and Hoga, 1976).

In summary, complete substitution of fish oil by vegetable oils in enrichments for seabream larvae reduces growth and affects larval normal behaviour, reducing cruise speed, and particularly delaying the appearance of the visual stimulus, suggesting a delay in the functional development of brain and vision, in agreement with the minor EFA and DHA found in eyes and brains of these larvae.

Substitution of fish oil by vegetable oils in microdiets for seabream

Starting diets for marine fish larvae contain high levels of proteins from fish, squid, krill or other meals which generally contain a good amount of essential fatty acids in the polar lipid fraction, suggesting that it is possible to obtain a higher replacement than in live prey enrichments. In order to determine the ability of larval gilthead seabream to utilize different vegetable oils as alternative lipid sources to replace fish oil, seventeen day old gilthead seabream larvae were fed during 17 days four different microdiets formulated with either sardine fish oil (FO), soybean (SO), rapeseed (RO) or linseed (LO) oils and a fifth diet containing defatted squid meal and linseed oil (ELO) (Izquierdo *et al.*, in press).

Good growth, both in terms of total length and body weight, and survival of gilthead seabream larvae fed either FO or RO, SO and LO suggested the good utilization of these vegetable oils when dietary n-3 HUFA levels are high enough to cover the larval requirements for essential fatty acids. Thus, n-3 HUFA levels in the microdiets containing FO, RO, SO or LO were higher than 3% dry weight diet are able to fulfill the essential fatty acid requirements of this species (Izquierdo, 2005). Thus, complete substitution of fish oil by either rapeseed, soybean or linseed oils in microdiets for gilthead seabream seems to be possible when the EPA and DHA requirements are covered by the dietary contents of fish or squid meal. In juveniles of the same species, it is possible to reduce a 60% of the fish oil in diets without compromising growth survival, fillet organoleptic properties or fish feed utilisation, when fish are fed either for a medium (3 months, Izquierdo *et al.*, 2000; Izquierdo *et al.*, 2003) or for a long feeding period (Menoyo *et al.*, 2004; Izquierdo *et al.*, 2005). On the contrary, increase fish oil substitution levels up to 80% significantly reduced growth and conversion indexes (Izquierdo *et al.*, 2006). Thus, higher substitution levels are obtained in larval diets than in juvenile ones. Despite essential fatty acid requirements are higher for larvae (3%) than for juveniles (0.8%) of gilthead seabream (Izquierdo, 2005), the lower protein requirements of the later markedly reduces the inclusion of protein sources such as fish or squid meals which in turn constitute a considerable source of essential fatty acids. Hence, complete substitution of fish oil by vegetable oils in diets for larvae rendered about 3.5% n-3 HUFA, whereas it only rendered 0.3% in diets for juveniles. However, reduction of n-3 HUFA obtained by defatting of squid meal and complete replacement of dietary lipids by linseed oil, did not cover the essential fatty acid requirements of gilthead seabream larvae and significantly reduced larval growth and survival.

Feeding larvae with vegetable oils, increased up to 6 times the relative expression of delta 6 desaturase like gene in larvae fed rapeseed and soybean oils (Izquierdo *et al.*, submitted) in comparison with those fed fish oil and denotes the nutritional regulation of desaturase activity through its gene expression in this fish species. However, feeding LO did not increase to such a high extent the expression of delta 6 desaturase gene, perhaps due to the fact that this oil contains LA but also high level of LNA which is competitor in desaturation and elongation of C₁₈ PUFA. Moreover, very high contents of linseed oil in diet ELO completely inhibited desaturase gene expression, denoting that regulation of desaturase gene expression depends on the type of dietary vegetable oil fed.

The results of this study showed for the first time a significant effect of dietary lipids on the regulation of delta 6 desaturase expression. Feeding gilthead seabream larvae with too high linseed oil contents significantly reduced the expression of desaturase gene, whereas feeding soybean and rapeseed oils increased such expression up to 4 times.

Use of single cell oils in larval feeds

Since the lack of essential fatty acids for marine fish constrains the use of vegetable oils in larval feeds, alternative EFA sources have been the objective of study along the last years. Marine microalgae constitute a well recognized “single cell oil source” high in PUFA, but its production in commercial hatcheries is very limited. Microalgae species can provide numerous high-value products (Pulz *et al.*, 2001), and vary significantly in their nutritional value (Enright *et al.*, 1986; Brown *et al.*, 1997). PUFAs are widespread in the marine food chain and the primary producers are marine algae (Swaaf *et al.*, 2003b). The PUFA content of microalgae depend not only on the species, but also on factors related to culture condition including composition of the medium, pH, aeration, light intensity, temperature, age of culture (Tonon *et al.*, 2002) and duration of the photoperiod (Medina *et al.*, 1998).

The marine dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* constitutes an excellent heterotrophic producer of DHA. *Cryptothecodinium cohnii* is a chloroplastless heterotrophic marine microalgae, which shows two different phases: swarming flagellated cells and cysts. Utilizing several carbon sources *C. cohnii* accumulates lipid over 40% of its biomass dry weight, with up to 30 of total lipid being DHA (Swaaf *et al.*, 2003a and b).

Another interesting single cell source of lipids is the diatom *Phaeodactylum tricornutum* which utilizes lipids as main storage products (Reis *et al.*, 1996, Mirón *et al.*, 2002), producing large quantities of polyunsaturated fatty acids, including considerable amounts of EPA (Arao *et al.*, 1987; Dunstan *et al.*, 1994). In *P. tricornutum* the fatty acids constitute between 8 and 10% of the algal cell biomass, where EPA constitute between 27 and 30% of the total fatty acids present, or 2.6–3.1% of the dry biomass.

As part of the EU-funded project PUFA-feed, a series of studies were conducted in our laboratory in order to determine the effect of inclusion of several types of single cell oils on starter diets for seabream. For instance, inclusion of non-homogenised *C. cohnii* in starter diets for seabream reduced growth in terms of total length and body weight, but it did not affected survival, suggesting an inefficient utilization of dietary nutrients. In a similar way non-homogenized *Schyzotrichium sp.* included in microdiets for seabream produced significantly smaller larvae than a control diet containing sardine oil.

Diet acceptance was determined calculating the percentage of gut occupation by the microdiet by image analysis in pictures of 30 larvae/tank. 37 day-old-larvae (20 larvae per tank) were taken for image study. Larval abdominal cavity was observed in a stereoscope (Leica Wild M3Z®) and the area of the gut occupied by digested matter was measured on the optic micrographs taken at a magnification of 25X, using Image Pro Plus® (Media Cybernetics inc., Silver Springs, MD, USA) semiautomatic image analysis system. There were no significant differences in the area of gut occupied by digested matter among the experimental diets. There was a good acceptability of the microdiet containing non-homogenized *C. cohnii* and no difference was found between microdiet ingestion.

However, when *C. cohnii* was homogenized and included in substitution of a commercial booster rich in EFA, growth and survival was not affected and both parameters were enhanced in comparison with a diet containing fish oil (capelin oil) as a single lipid source. Incorporation of DHA and other fatty acids was proportional to their contents in diet, regardless the inclusion of *C. cohnii* suggesting the good utilization of homogenized *C. cohnii*, in comparison with the non-homogenized ones. Moreover, a higher resistance to epitheliocystis incidence was found in larvae fed with *C. cohnii*.

Homogenized *Schyzotrichium sp.* was also better utilized by gilthead seabream than the non homogenized *Schyzotrichium sp.*, confirming as well as it happened with *C. cohnii* that homogenization, hence partitioning of the cell wall improves the nutritional value of both microorganisms. However, growth expressed in body weight tend to be lower when *Schyzotrichium sp.* was included in seabream microdiets and 22:5n-6 accumulated in larvae.

Feed intake by the seabream of the studied ages was not affected by the dietary inclusion 2 and 4% of homogenized *C. cohnii* and 5% of *Phaeodactylum tricornutum* (Atalah *et al.*, in prep.). Besides, partial substitution of fish oil by the homogenized *C. cohnii* along a long period of time improved growth and survival in gilthead seabream, particularly during their early life stages.

However, feeding with *Phaeodactylum tricornutum* reduced seabream survival in very young larvae causing degeneration of the anterior intestine epithelial (Atalah *et al.*, in prep). A further experiment was conducted to determine the effect of these microorganisms in larval health. For that purpose, seabream postlarvae fed for one month with either homogenized *C. cohnii* or *P. tricornutum* were exposed to *Photobacterium damsela subsp. piscicida*. Mortality was found only at day 21 after inoculation and only in the group fed 4% *C. cohnii*, which reached up to 18% of the population. However no *Photobacterium damsela subsp. piscicida* was found in any of the spleen, kidney or liver of fish fed *P. tricornutum*.

In summary, substitution of either fish oil or booster oils in microdiets for seabream by homogenized *C. cohnii* promotes good growth and survival, particularly in very young larvae, whereas substitution by *Phaeodactylum tricornutum* at this larval stage damages intestine epithelia and reduces survival. Finally, substitution by *Schyzotrichium sp.* slightly reduces larval seabream growth. These studies showed that it is possible to substitute fish oil by homogenized microorganisms, however their production costs are still very high and they should be reduced in order to be economically feasible.

Acknowledgements

The present study is the memoriam of Antonio Valencia for his invaluable technical support and friendship. Some of the results presented in this study were supported by the EU granted project PUFAfeed.

BIBLIOGRAPHY

- Arao, T., Kawaguchi, A., Yamada, M. (1987) Positional distribution of fatty acids in lipids of the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Phyto-chemistry* 26, 2573 – 2576.
- Bell, J.G., McEvoy, J., Tocher, D.R., McGhee, F., Campbell P.J, Sargent, R.J. (2001) Replacement of Fish Oil with Rapeseed Oil in Diets of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Affects Tissue Lipid Compositions and Hepatocyte Fatty Acid Metabolism. *Journal of Nutrition* 131, 1535 – 1543.
- Bell, J.G., Sargent, J.R. (2003) Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* 218, 491 – 499.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.A. (1997) Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151, 315 – 331.
- Caballero, M., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., Gisvold, M., Izquierdo, M.S. (2002) Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 214, 253 – 271.
- Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Barrett, S.M., Leroi, J., Jeffrey, S.W. (1994) Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom. *Phytochemistry* 35, 155 – 161 .
- Enright, C.T., Newkirk, G.F., Craigie, J.S., Castell, J.D.(1986) Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros gracilis* Schütt of varied chemical composition. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 96, 15 – 26.
- Harel, M., Koven, W., Lein, I., Bar, Y., Behrens, P., Stubblefield, J., Zoha, Y., Place A.R. (2002) Advanced DHA, EPA and ARA enrichment materials for marine aquaculture using single cell heterotrophs. *Aquaculture* 213, 347 – 362.
- Izquierdo, M.S. (1988) Estudio de los requerimientos de ácidos grasos esenciales en larvas de peces marinos. Modificación de la composición lipídica de las presas. PhD Thesis. Universidad de La Laguna. Spain.
- Izquierdo, M.S. (1996) Essential fatty acids requirements of cultured marine fish larvae. *Aquac. Nutr.* 2, 183 – 191.
- Izquierdo, M.S. (2005) Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species. *Cah. Options Mediterr.* 63, 91 – 102.
- Izquierdo, M.S., Arantzamendi, L., Montero, D., Robaina, L., Rosenlund, G. (2003) Dietary lipids sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquaculture Nutrition* 9, 397 – 407.
- Izquierdo, M.S., Forster, I., Divakaran, S., Conquest, L., Decamp, O., Tacon, A. (2006) Effect of green and clear water and lipid source on survival, growth and biochemical composition of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutr.* 12, 192 – 202.
- Izquierdo, M.S., Juárez-Carrillo, E., Oliva, V. , Robaina, L., Hernández-Cruz, C.M. Afonso, J.M Regulation of $\Delta 6$ desaturase expression by dietary lipids in gilthead seabream larvae (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* In press.
- Izquierdo, M.S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J., Rosenlund, G. Gines, R., (2005) Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding.

Aquaculture 250, 1 – 2.

- Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L., Hernández-Cruz, C.M. (2000) Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 22, 97 – 107.
- Krigman, M.R., Hogan, E.L. (1976) Undernutrition in the developing rat: effect upon myelination. *Brain Res.* 107, 239 – 255.
- Masuda, R., Takeuchi, T., Tsukamoto, K., Sato, H., Shimizu, K., Imaizumi, K. (1999) Incorporation of dietary docosahexaenoic acid into the central nervous system of the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Brain Behav. Evol.* 53, 173 – 179.
- Medina, A.R., Grima, M.E., Jiménez, G.A., González, M.J. (1998) Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acid. *Biotechnology Advances* 16, 517 – 580.
- Menoyo, D., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Gines, R., Lopez-Bote, C.J., Bautista, C.J., (2004) Adaptation of lipid metabolism, tissue composition and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to the fish oil replacement by linseed and soybean oils. *Br. J. Nutr.* 92, 41 – 52.
- Mirón, A., Cerón, M.C., García, C., Molina, G., Chisti, Y. (2002) Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 1015 – 1023.
- Montero, D., Kalinowski, T., Obach, Robaina, L., Tort, L., Caballero, M.J., Izquierdo, M.S. (2003) Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture* 225, 353 – 370.
- NRC. (1993) *Nutritional Requirements of Fish*. National Academic Press, Washington, DC, USA, 114 pp.
- Pulz, O., Gross, W. (2001) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 635 – 648.
- Reis, L., Gouveia, V., Veloso, H.L., Fernandes, J.A., Empis, J.M., Novais. (1996) Eicosapentaenoic Acid-rich Biomass Production by the Microalga *Phaeodactylum tricorutum* in a Continuous-flow Reactor. *Bioresource Technology* 55, 83 – 88.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Badia, P., Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Hernández, A.L. (1998) The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae when using an appropriate DHA/EPA ratio in the diet. *Aquaculture* 169, 9 – 23.
- Rosenlund, G., Obach, A., Sandberg, M.G., Standal, H., Tveit, K. (2001) Effect of alternative lipid sources on long-term growth performance and quality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research* 32, 323 – 328.
- Salhi, M., Hernández-Cruz, C.M., Bessonart, M., Izquierdo, M.S. Fernández-Palacios, H. (1999) Effect of different dietary polar lipid levels and different n-3 HUFA content in lipid on gut and liver histological structure of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 179, 253 – 263.
- Sargent, J.R., Bell, M.V., Tocher, D.R. (1993) Docosahexaenoic acid and the development of brain and retina in marine fish. In: Drevon, C.A., Baksaas, I., Krokan, H.E. (eds.), *Omega-3 Fatty acids: Metabolism and Biological Effects*, Birkhauser-Verlag, Basel, Switzerland, pp. 139 – 149.
- Swaaf, M.E., Rijk, T.C., Eggink, G., Sijtsma, L. (1999) Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. *J Biotechnol* 70, 185 – 192.

- Swaaf, M., Pronk, J.T., Sijtsma, L. (2003a) Fed-batch cultivation of docosahexaenoic-acid-producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 61, 40 – 43.
- Swaaf, M., Rijk, T.C., Meer, P., Eggink, G., Sijtsma, L. (2003b) Analysis of docosahexaenoic acid biosynthesis in *Cryptocodinium cohnii* by ¹³C labelling and desaturase inhibitor experiments. *J Biotechnol* 103, 21 – 29.
- Tonon, T., Harvey, D., Larson, T.R., Graham, I.A. (2002) Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry* 61, 15 – 24.
- Tuominen, T., Esmark, M. (2003) Food for thought: the use of marine resources in fish feed. WWF-Norway, Report No. 02/03, 53 pp.
- Watanabe, T. (1993) Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *J. World Aquacult. Soc.* 24, 152 – 161.
- Watanabe, T. (2002) Strategies for further development of aquatic feeds. *Fisheries Science* 68, 242 – 252.
- Watanabe, T., Izquierdo, M.S., Takeuchi, T., Satoh, S., Kitajima, C. (1989) Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficacy in larval red seabream. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55, 1635 – 1640.

Table 1

Averages of $\Delta 6$ desaturase-like gene expression per diet in sea bream larvae.

Diet	Average	Std. error
ExtraLinseed Oil	0.401	2.278
Fish oil	1.171	2.278
Linseed oil	2.849	2.278
Soybean oil	7.013	2.278
Rapeseed oil	7.941	2.278

Figure 2. Abdominal cavity and gut from larvae fed a *C. cohnii* containing diet.

Figure 3. Abdominal cavity and gut from larvae fed a diet without *C. cohnii*.

Figure 4. Area of the gut larvae occupied by digesta.

Figure 5. Effect of dietary substitution of booster or fish oil by *C. cohnii* in growth of larval seabream.

REQUERIMIENTOS DE ACIDOS GRASOS EN LARVAS DE PECES: EFECTO DE FACTORES AMBIENTALES

P. Dantagnan, y M. Izquierdo

1. Importancia de los lípidos y ácidos grasos en el cultivo larvario de peces

El estudio de las demandas nutricionales en los primeros estadios de las larvas de peces, es difícil de abordar, puesto que son organismos tremendamente delicados y sus requerimientos dependen de múltiples factores tales como edad, presencia y actividad de enzimas digestivas, factores ambientales, especie en cuestión, interacción con otros nutrientes, entre otros (Watanabe, 1982; Izquierdo, 1996a, Izquierdo *et al.*, 2000). Los requerimientos nutricionales han sido enfocados hasta ahora, de acuerdo a los aportes energéticos de proteínas, carbohidratos, lípidos y recientemente de vitaminas y minerales. Sin embargo, en el momento de determinar los requerimientos nutricionales, los lípidos han sido los componentes más ampliamente estudiados en los organismos acuáticos, puesto que ellos representan la principal fuente de energía para las larvas recién eclosionadas (Watanabe y Kiron, 1994). Se conoce además, que los lípidos, fuera de cumplir importantes funciones energéticas, son componentes estructurales de las membranas celulares, principalmente en las fracciones polares (fosfolípidos), además de ser transportadores de ciertos nutrientes, como las vitaminas liposolubles A, E, D y K (Bell *et al.*, 1986; Watanabe y Kiron, 1994). También se reconoce que los ácidos grasos, cumplen un papel fundamental para el desarrollo y crecimiento de las larvas. Así, numerosos autores indican que los ácidos grasos saturados y monoinsaturados en general, estarían cumpliendo funciones energéticas, (Vázquez *et al.*, 1994), mientras que los poliinsaturados estarían cumpliendo, principalmente roles estructurales en las membranas biológicas y como precursores de eicosanoides u otros componentes biológicamente activos, involucrados entre otras cosas, en la sensibilidad a ciertos estímulos de estrés en los organismos (Bell *et al.*, 1992; Sargent *et al.*, 1995). Dentro de los ácidos grasos se ha logrado establecer que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de la serie n-3 y n-6 (ácidos grasos altamente insaturados, HUFA) son cruciales en larvas de primera alimentación, pues se sabe que tanto la sobrevivencia como el crecimiento mejora notablemente cuando las dietas contienen estos ácidos grasos altamente insaturados (Sargent *et al.*, 1989; Izquierdo *et al.*, 1989a; Koven *et al.*, 1989; Dhert *et al.*, 1991; Rodríguez *et al.*, 1993; Curé *et al.*, 1995). Su deficiencia puede producir algunas alteraciones, no sólo en el crecimiento y la sobrevivencia, sino también en el comportamiento, la anatomía de la larva o ciertas alteraciones en los órganos internos (Koven *et al.*, 1990; Bisbal y Bengston, 1991; Arnaiz *et al.*, 1993). Si bien se sabe que el EPA y el DHA, son los ácidos grasos más abundantes en la mayoría de los huevos y larvas de peces, en general se reconoce que estos ácidos grasos tienen roles fisiológicos distintos, pero complementarios, el primero como importante constituyente de la membrana celular de varios órganos en desarrollo (Kanazawa *et al.*, 1982) así como precursor de prostaglandinas (Bell *et al.*, 1986; Sargent *et al.*, 1995), mientras que el segundo es preponderante en la vitalidad, el crecimiento y sobrevivencia larval (Watanabe y Kiron, 1994). En este mismo sentido, se sabe que el DHA está asociado a la constitución de tejidos neurales, como los que conforman el cerebro, y por lo tanto tiene un rol preponderante en el desarrollo de la visión (Mourente y Tocher, 1992; Navarro y Sargent, 1992) y los tejidos olfatorios (Bell *et al.*, 1986; Sargent *et al.*, 1993), lo que puede llegar a ser muy importante durante la localización y captura de la presas (Rodríguez *et al.*, 1998), así

como en los procesos de metamorfosis y desarrollo de la pigmentación (Kanazawa, 1993; Estévez *et al.*, 1999). (Tocher y Sargent, 1984) señalan además la importancia que tiene el DHA en la fluidez de las membranas branquiales como componente de algunas formas lipídicas como los glicerofosfolípidos, por lo que su importancia en los procesos osmorregulatorios puede llegar a ser vital, sobretodo, en peces anádromos o catádromos (Sampekalo *et al.*, 1992), así como en los procesos de adaptación a diferentes temperaturas ambientales (Bell *et al.*, 1996).

Recientemente se ha ido descubriendo que los ácidos grasos esenciales además de cumplir roles individuales, interactúan entre sí, siendo la efectividad de su función dependiente de la relación establecida entre ellos. Así, por ejemplo, uno de los primeros índices en ser estudiados fue el DHA/EPA o EPA/DHA, considerándose a esta relación crítica para la viabilidad larval y el éxito de la pigmentación en larvas de rodaballo (Reitan *et al.*, 1994), dorada (Rodríguez *et al.*, 1998), aunque posteriormente, Estevez *et al.*, (1999) propusieron que esta relación por sí sola no era suficiente para explicar las anomalías en la pigmentación de el Rodaballo (*Scophthalmus maximus*) si no se considera al ARA en una relación EPA/DHA/ARA. Otro ejemplo es citado por Sargent *et al.*, (1999a) quienes indican que si bien el ARA es el principal precursor de eicosanoides en los peces, el EPA puede ser capaz de inhibir la formación de eicosanoides desde el ARA, por lo tanto la formación de estos productos y la acción de ellos en el organismos está determinado por la relación ARA/EPA. En este sentido, Sargent *et al.*, (1999b), en una revisión amplia acerca de la nutrición de ácidos grasos han propuesto que el estudio de los requerimientos dietarios óptimos de ácidos grasos, poliinsaturados, más que determinar cantidades relativas en forma individual, deben considerar una proporción equilibrada de los tres principales ácidos grasos de cadena larga más importantes, DHA/EPA/ARA, siendo esta relación la que realmente juega un rol en el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de las membranas celulares de los diferentes tejidos en formación. En la práctica esto es difícil de abordar, por el hecho que muchos peces de agua dulce son capaces de producir DHA y EPA desde el ácido linolénico (18:3n-3) y ARA desde el ácido linoleico (18:2n-6), por lo que habría que establecer una nueva correlación, entre la razón 18:3n-3/18:2n-6 y la razón DHA/EPA/ARA, lo que es aún más complejo.

2. Requerimientos nutricionales en larvas de peces

Los requerimientos de ácidos grasos, difieren tanto en tipo como en cantidad entre especies, y más aún entre especies de agua dulce y marinas. Además, suelen ser diferentes entre larvas y juveniles de una misma especie, siendo normalmente el requerimiento de las larvas el doble que el de los juveniles (Izquierdo, 1996a). Todos los estudios al respecto indican que los ácidos grasos esenciales más importantes y requeridos en los peces, para un normal crecimiento y sobrevivencia son los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y dentro de ellos principalmente los de la serie n-3 y n-6 (Izquierdo *et al.*, 1989; Izquierdo *et al.*, 1992; Rodríguez *et al.*, 1993; Mourente *et al.*, 1993; Salhi *et al.*, 1994), reportándose que las mortalidades y ciertos signos de deficiencia en la natación están relacionadas precisamente a bajos niveles de n-3 HUFA (Koven *et al.*, 1992). Los requerimientos de n-3 HUFA en larvas de peces marinos pueden ser variables, tanto entre especies diferentes, como dentro de la misma especie, y los estudios han reportado entre un 0,03% para *Pleuronectes plateassa* (Dickey - Collas y Geffen, 1992) y cerca del 4% en *Seriola quinqueradiata* (Watanabe, 1993), y en la mayoría de los casos pueden ser mantenidos principalmente con ácidos grasos de cadena larga como son el EPA (20:5n-3), el DHA (22:6n-3) y el ácido ARA (20:4n-6). Varios estudios han indicado sin embargo, que es probable que no sólo el contenido total de n-3HUFA o de DHA o EPA o ARA, en forma individual sea importante, sino que un adecuado balance de la relación EPA/DHA sea necesario para obtener un óptimo creci-

miento (Izquierdo, 1996 a y b, Rodríguez *et al.*, 1998), mas aún, recientemente se ha establecido que una relación entre estos tres ácidos grasos debe ser atendida, puesto que es esta relación la que puede determinar ciertos aspectos fisiológicos y morfológicos importante en larvas de (Estévez *et al.*, 1999; Sargent *et al.*, 1999b).

En peces de agua dulce, también los ácidos grasos poliinsaturados tienen claros efectos sobre el crecimiento y sobrevivencia, aunque en este caso, tanto los ácidos grasos de la serie n-3 como los de la serie n-6 PUFA pueden tener importancia, donde el 18:3n-3 y el 18:2n-6 suelen satisfacer las necesidades (Sargent *et al.*, 1995). Takeuchi (1997), en una amplia revisión acerca de los requerimientos en peces de agua dulce, indica que los requerimientos de n-3 HUFA, suelen ir acompañados de requerimientos de 18:3n-3 o 18:2n-6. Así, la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) requiere un 0,5% de n-3 HUFA, en compañía de un 1% de 18:3n-3, la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) requiere 0,5% de n-3 HUFA y 1% de 18:2n-6 y el catfish (*Ictalurus punctatus*) 1-2% de 18:3n-3 y 0,5-0,75% de n-3 HUFA, principalmente aquellos derivados del ácido linolénico (18:3n-3) y linoleico (18:2n-6) (Satoh *et al.*, 1989). Por otra parte, también se ha demostrado que en la trucha arcoiris no hay diferencias en eficiencia de utilización entre EPA y DHA, aunque el crecimiento se ve aumentado por la combinación de ambos ácidos grasos (Watanabe, 1982). En general, los requerimientos de ácidos grasos insaturados en peces de agua dulce suelen ser más bajos, oscilando entre 1-2% (Sargent *et al.*, 1995) o incluso menos. Experimentos en larvas de carpa (*Cyprinus carpio*), han mostrado, que a diferencia de los peces marinos, éstas pueden sobrevivir y crecer bien con dietas que poseen niveles de n-3 HUFA, tan bajos como 0,05-0,1% (Guerden *et al.*, 1995). En todo caso, tanto en peces de agua dulce como marinos, un máximo crecimiento sin síntomas de una gran deficiencia, puede ser obtenido sólo con ácidos grasos n-3 HUFA, pero no únicamente con n-6 HUFA. Así, el salmón rey (*Oncorhynchus keta*), mantenido en agua dulce, si bien requiere 0,5% n-3HUFA más la adición de 1% de 18:2n-6 o 18:3n-3 para mejorar el crecimiento, la sobrevivencia se ve claramente reducida sólo con la adición de 0,5% 18:3n-3 (Takeuchi *et al.*, 1979). Según esto, los ácidos grasos de la serie n-6 suelen ser más determinantes en la sobrevivencia y el crecimiento en los peces de agua dulce que en peces marinos, aunque siempre acompañados de los ácidos grasos de la serie n-3, por lo que la relación n-3/n-6 HUFA también suele ser menor (Cowey y Sargent, 1972) y por lo cual, los ácidos grasos derivados del ácido linoleico (18:2n-6), como es ARA (20:4n-6), también cobran mayor relevancia en los peces de agua dulce que en los peces marinos.

Por otra parte, puesto que los peces marinos son incapaces de sintetizar ácidos grasos de cadena larga altamente insaturados, como los de la serie n-3 y n-6 por ejemplo, convertir el ácido linolénico (18:3n-3) a ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), como es el DHA y EPA, tienen la necesidad de incorporar en las dietas estos últimos para un normal crecimiento y desarrollo (Sargent *et al.*, 1989; Stottrup, 1993). Sin embargo, los peces de agua dulce como la trucha, sí poseen la habilidad de convertir el ácido linolénico en DHA y EPA y ácido linoleico (18:2n-6) en ARA (20:4n-6). Por ello, la adición directa de EPA y/o DHA en la dieta de peces marinos mejora el crecimiento larval, pero no si se le adiciona el precursor (Watanabe, 1982). En los peces de agua dulce sin embargo, la adición de 18:3n-3 y 18:2n-6 sí mejora el crecimiento y disminuye los síntomas patológicos producto de las deficiencias, aunque varias evidencias indican también que la adición de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) como el 20:5n-3 y 22:6n-3, también son efectivos en mejorar el crecimiento. Por otra parte, la razón n-3/n-6 PUFA tiende a ser más baja en peces de agua dulce que en peces marinos. En este sentido, en los peces de agua dulce los requerimientos de ácidos grasos de la serie n-6 PUFA llegan a ser más importantes que los de la serie n-3, aunque se debe enfatizar que usualmente la presencia de n-3 PUFA en las dietas es más determinante que la sola presencia de n-6 PUFA (Cowey y Sargent, 1972; Sargent *et al.*, 1989).

En la actualidad, la forma más común de establecer dietas para primera alimentación que permitan cubrir las necesidades lipídicas de las larvas es obteniendo información mediante el estudio del patrón bioquímico de huevos y larvas recién eclosionadas (Fyhn, 1989; Tandler *et al.*, 1989; Planas *et al.*, 1993; Vázquez *et al.*, 1994). Otra práctica común y ligada a la anterior, es analizar la evolución (conservación y pérdida) de los lípidos y ácidos grasos corporales en larvas desde la eclosión hasta la desaparición del saco vitelínico (Rodríguez, 1994). Ambas prácticas consideran que los huevos de peces contienen todos los nutrientes esenciales para el desarrollo del embrión y el crecimiento de la larva hasta la absorción del saco, por lo que su estudio podría dar luces acerca de los requerimientos nutricionales en las larvas de primera alimentación, suponiendo que el sistema nutricional endógeno podría ser también el mismo para la alimentación exógena (Ostrowski y Divakaran, 1990). Si bien el crecimiento larval durante la etapa de nutrición endógena está influenciado por una serie de parámetros abióticos (Watanabe y Kiron, 1994), algunos autores han sugerido que las reservas nutritivas del saco vitelínico aportan los requerimientos necesarios para pasar esta etapa crítica del desarrollo y que el patrón de nutrientes usado por los embriones y larvas recién eclosionadas pueden indicar las necesidades nutricionales de las larvas durante su primera alimentación (Vázquez *et al.*, 1994). Los principales ácidos grasos en los lípidos de huevos en peces marinos tales como el fletán (*Hippoglossus hippoglossus*) (Falk-Petersen *et al.*, 1989), (*Scophthalmus maximus*) (Rainuzzo *et al.*, 1993), dorada japonesa (*Pagrus major*) (Izquierdo *et al.*, 1989a) y dorada (*Sparus aurata*) (Mourente y Odriozola, 1990) son el DHA, el ácido palmítico, EPA y el ácido oléico. Se debe indicar que la importancia relativa de cada ácido graso puede diferir entre las especies estudiadas y entre diferentes puestas de huevos de la misma especie. Estas diferencias pueden estar relacionadas principalmente con la dieta de los reproductores (Watanabe *et al.*, 1984; Watanabe, 1985, Fernández Palacios *et al.*, 1995). En algunas especies marinas, tales como el fletán, los n-3HUFA son marcadamente catabolizados después de la fertilización y durante el inicio del desarrollo embrionario, constituyendo la mayor fuente energética durante este período (Falk-Petersen *et al.*, 1989). Sin embargo, durante la última etapa de la embriogénesis en muchas otras especies tales como el rodaballo (Planas *et al.*, 1993) y la dorada (Mourente y Odriozola, 1990), estos ácidos grasos son conservados durante el desarrollo larval. Otro método utilizado por algunos autores para obtener información sobre los requerimientos de ácidos grasos en larvas de peces, es analizando los patrones de conservación y pérdida de ácidos grasos. Algunos ácidos grasos poliinsaturados tales como el DHA, el ácido araquidónico y en algunas especies el EPA son conservados a expensas de otros ácidos grasos, durante la inanición en peces como el rodaballo (Rainuzzo *et al.*, 1994), dorada japonesa (Tandler *et al.*, 1989) y la dorada (Koven *et al.*, 1989; Rodríguez, 1994). Esta estrategia bioquímica permite la preservación de componentes esenciales de las membranas biológicas durante los períodos críticos. En todos los casos estudiados el DHA es el ácido graso preferentemente conservado, sugiriendo la importancia de este ácido para las larvas de peces marinos (Izquierdo, 1996).

3. Efecto de factores ambientales en la composición de lípidos y ácidos grasos

En general, se reconoce que además de las condiciones alimenticias, los factores ambientales, tales como temperatura (Farkas *et al.*, 1980; Henderson, 1996, Olsen *et al.*, 1999), salinidad (Borlongan y Benitez, 1992; Tocher *et al.*, 1994), tipo de alimento disponible y la luz (Ota y Yamada, 1971), ejercen un efecto sobre la composición de los lípidos y ácidos grasos en los organismos acuáticos, más aún, cambios estacionales o geográficos pueden llegar a ejercer un efecto significativo (Olsen y Skjervold, 1995; Jobling *et al.*, 1998; Zenebe *et al.*, 1998), de forma que la composición bioquímica puede variar incluso de un año a otro dentro de una misma especie.

Estos cambios afectan principalmente los procesos metabólicos (Sheridan, 1989), los que repercuten en acumulaciones que pueden ser diferentes en los distintos órganos de los organismos acuáticos (Farkas *et al.*, 1980; Sheridan, 1989; Borlongan y Benítez, 1992).

En los peces, así como en otros organismos poiquilotermos, el grado de insaturación de los ácidos grasos es muy importante en los procesos de adaptación a las diferentes temperaturas ambientales. Así, es conocido que mientras más insaturado es un ácido graso, el punto de fusión también es más bajo, por lo cual la presencia de PUFA en las membranas de los organismos acuáticos, en ambientes de bajas temperaturas cobra mayor relevancia (Bell *et al.*, 1986). En este sentido, varios estudios han demostrado que las disminuciones de temperatura producen un marcado incremento en la insaturación de los ácidos grasos, principalmente en las fracciones neutras o polares de los lípidos (Kayama *et al.*, 1986; Greene y Selivonchick, 1987). Varios trabajos, han establecido que uno de los principales cambios a nivel de composición de ácidos grasos es un incremento en el DHA a bajas temperaturas (Thomson *et al.*, 1977; Farkas, 1984, Kayama *et al.*, 1986), principalmente en la fracción de fosfolípidos. Olsen y Skjervold (1995), encontraron que disminuciones en la temperatura del agua de mar, aparentemente explicaron el incremento significativo en DHA en salmones cultivados con la misma dieta, pero en distintas latitudes. Esto se explica por el hecho de que el DHA, es un constituyente esencial de las membranas biológicas, que cumple un rol fundamental en la fluidez de éstas (Bell *et al.*, 1986), y que cualquier cambio externo de temperatura, provocará cambios en las conductas metabólicas, principalmente un incremento de la actividad de las enzimas desaturasas a bajas temperaturas (Kayama *et al.*, 1986; Greene y Selivonchick, 1987), lo que de una u otra forma repercutirá en cambios de las estructuras bioquímicas de las células, esto puede entonces considerarse como una adaptación de la fluidez de las membranas de acuerdo a la temperatura, lo que puede significar en los peces un factor decisivo de sobrevivencia (Farkas *et al.*, 1980). Hall *et al.*, (2002) han establecido por su parte una estrecha relación entre el EPA y la fluidez de las membranas en el molusco bivalvo *Placopecten magellanicus* como respuesta a las bajas temperaturas.

Otro factor mencionado en la literatura, que ejerce claros efectos en la composición de lípidos y ácidos grasos en los organismos acuáticos, es la salinidad, la cual es particularmente importante en los peces migratorios, puesto que sucesivos cambios en la salinidad durante su movimiento entre el agua dulce y el agua salada, provocan cambios significativos en el metabolismo, lo que evidentemente, repercute en su composición bioquímica (Sheridan, 1989), esto como respuestas al proceso de osmorregulación que significa el cambio de ambiente. En todo caso, hay algunas evidencias que indican que estos cambios pueden incluso ocurrir antes que los peces cambien de ambiente, como una respuesta "preadaptativa", aunque los aspectos fisiológicos y los mecanismos bioquímicos que esto involucra son complejos y poco claros (Tocher *et al.*, 1994). Se sabe sin embargo, que la salinidad afecta principalmente los niveles de PUFA en los peces, encontrándose que la relación n-3/n-6 PUFA es distinta entre peces de agua dulce y peces marinos, más aún, existen claras diferencias, no sólo en la composición, sino también en el metabolismo, como ha sido señalado anteriormente (Ver sección requerimientos de ácidos grasos en peces). Incrementos en los PUFA, especialmente en los n-3 PUFA, en respuesta a incrementos en la salinidad, han sido señalados en experimentos de adaptación al agua de mar en algunos peces, principalmente DHA, aunque también de ARA (Daikoku *et al.*, 1982; Borlongan y Benítez, 1992). Estos resultados sugieren que el incremento de estos ácidos grasos, los n-3 PUFA y principalmente el DHA, juegan un rol preponderante en la osmorregulación (Sampekalo *et al.*, 1992; Tocher *et al.*, 1995).

4. Efecto de parámetros ambientales en los requerimientos de ácidos grasos

Aunque existen muchos factores ambientales que pueden incidir, tanto en la acumulación como en el metabolismo de los lípidos y ácidos grasos, sin embargo, existen pocas evidencias concretas que lo demuestren. En este sentido, es esperable que el efecto en los cambios ambientales provoquen también cambios en los requerimientos nutricionales específicos, especialmente de lípidos y ácidos grasos, que permitan a los peces adaptarse fisiológicamente a las diferentes condiciones ambientales.

Aunque son ampliamente conocidas las diferencias que existen en requerimientos nutricionales entre peces de agua dulce y peces marinos, no existen antecedentes de cómo, dentro de una misma especie, factores como la temperatura y la salinidad pueden afectar los requerimientos, lo que podría llegar a ser un elemento clave en las decisiones futuras, tanto para la elaboración de dietas como para la elección del cuerpo de agua donde podrían ser cultivadas las larvas de peces. Esta línea de investigación está poco desarrollada en la actualidad, debido a la innumerable variable involucrada y la complejidad en abordarlas.

BIBLIOGRAFÍA

- Arnaiz, R., Coa, A., Linares, F., Corcobado-oñate, F., Rua, N. y Amoedo, F. (1993) Una hipótesis nutricional de la mortalidad asociada al período crítico. Órganos y desarrollo larvario del rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y la dorada (*Sparus aurata*). Necesidades de DHA. Actas IV Congreso Nacional de Acuicultura 73-78 pp.
- Bell, M.V., Henderson, R.J., Sargent, J. (1986) The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83, 711 – 719.
- Bell, J.G., Sargent, J., Raynard, R.S. (1992) Effects of increasing dietary linoleic acid on phospholipid and eicosanoid production in leucocytes and gill cells of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Prost. Leuk. Essent. Fatty acids* 45, 197 – 206.
- Bell, M., McEvoy, L.A., Navarro, J.C. (1996) Deficit of didocosahexaenoyl phospholipid in eyes of larval sea bass fed an essential fatty acid deficient diet. *J. Fish Biol.* 49, 941 – 952.
- Bisbal, G.A., Bengston, D.A. (1991) Effect of dietary (n-3) HUFA enrichment on survival and growth of summer flounder *Paralichthys dentatus*, larvae. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers E., Ollevier F. (Eds.), *Larvi" 91Fish and crustacean Larviculture Symposium*. Europ. Aqua. Soc. Special Publ., 15, 56 – 57.
- Borlongan, I.G., Benitez, L.V. (1992) Lipid and fatty acid composition of milkfish (*Chanos chanos* Forksskal) grown in freshwater and seawater. *Aquaculture*, 104, 79 – 89.
- Cowey, C.B., Sargent, J.R. (1972) Fish nutrition. In : Russell, F.S., Yonge, M. (Eds.), *Advances in marine Biology* Academic Press, London.10, 383 – 492.
- Cure, K., Gajardo, G., Coutteau, P., Sorgeloos, P. (1995) Manipulation of DHA/EPA ratio in live feed: preliminary results on the effects on survival, growth, pigmentation and fatty acid composition of turbot larvae *Scophthalmus maximus*. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers E., Ollevier F. (Eds.), *Larvi" 95 Fish and Shellfish Larviculture Symposium* Europ. Aqua Soc., Special Publ. 24, 171 – 174.
- Daikoku, T., Yano, I., Masui, M. (1982) Lipid and fatty acid composition and their changes in the different organs and tissue of guppy, *Poecilia reticulata* on sea water adaption. *Comp. Biochem. Physiol.* 73, 167 – 174.
- Dhert, P., Lim, L.C., Lavens, P., Chao, T.M., Chou, R., Sorgeloos, P. (1991) Effects of dietary EFAs on egg quality and larviculture succes of the greasy grouper *Epinephelus tauvina* F. Preliminary results. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers E., Ollevier F. (Eds.), *Larvi" 91Fish & crustacean Larviculture Symposium*. Europ. Aqua. Soc. Special Publ. 15, 58 – 62.
- Dickey-Collas, M., Geffen, A.J. (1992) Importance of the fatty acids 20:5n-3 and 22:6n-3 in the diet of plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae. *Mar. Biol.* 113, 463 – 468.
- Estévez, A., McEvoy, L.A., Bell, J.G., Sargent, J.R. (1999) Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed –prey enriched in arachidonic and eicosapentaenoic acids. *Aquaculture* 180, 321 – 343.
- Falk-Petersen, S., Sargent, J.R., Fox, C., Falk-Petersen, I.B., Haug, T., Kjorsvik, E. (1989) Lipids in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs from planktonic samples in Northern Norway. *Mar. Biol.* 101, 553 – 556.

- Farkas, T., Csegeri, I., Majoros, F., Olah, J. (1980) Metabolism of fatty acids in fish III. Combined effect of environmental temperature and diet on formation and deposition of fatty acids in the carp, *Cyprinus carpio* Linnaeus 1758. *Aquaculture* 20, 29 – 40.
- Farkas, T. (1984) Adaptation of fatty acid composition to temperature – a study on carp (*Cyprinus carpio* L.) liver slices. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79, 531 – 535.
- Fernandez-Palacios, H., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Valencia, A., Salhi, M., Vergara, J. (1995) Effect of n-3HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 132, 325 – 337.
- Fyhn, H.J. (1989) First feeding of marine fish larvae: Are a free amino acids the source of energy. *Aquaculture* 80, 111 – 120.
- Greene, D., Selivonchick, D. (1987) Lipid metabolism in fish. *Prog. Lipid Res.* 26, 53 – 85.
- Guerden, I., Radünz-Neto, J., Bergot, P. (1995) Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* 131, 303 – 314.
- Hall, J.M., Parrish, C., Thompson, R. (2002) Eicosapentaenoic acid regulates scallop (*Placopecten magallanicus*) membrane fluidity in response to cold. *Biol. Bull.* 3, 201 – 203.
- Henderson, R.J. (1996) Fatty acid Metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. *Arch. Anim. Nutr.* 49, 5 – 22.
- Izquierdo, M.S., Watanabe, T., Takeuchi, T., Arakawa, T., Kitajima, C. (1989b) Optimal levels in *Artemia* to meet the EFA requirements of red seabream (*Pagrus major*). In: Takeda, M., Watanabe, T. (Eds.), *The current status of fish nutrition in Aquaculture*. Japan Translation Center, Ltd., Tokyo, Japan, 221 – 232.
- Izquierdo, M.S., Watanabe, T., Takeuchi, T., Arakawa, T., Kitajima, C. (1989a) Requirement of larval red seabream *Pagrus major* for essential fatty acids. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55, 859 – 867.
- Izquierdo, M.S., Arakawa, T., Takeuchi, T., Haroun, R., Watanabe, T. (1992) Effect of n-3HUFA levels in *Artemia* on growth of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 105, 73 – 82.
- Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L., Hernandez-Cruz, C. (2000) Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 22, 97 – 107.
- Izquierdo, M.S. (1996) Fatty acid requirement of cultured marine fish larvae. *Aquaculture nutrition* 2, 183 – 191.
- Izquierdo, M.S. (1996a) Essential fatty acid requirement of cultured marine fish larvae. En Gajardo G., Coutteau, P. (Eds.), *Improvement of the commercial production of marine aquaculture species. Proceeding of a Workshop on fish and mollusc larviculture, Santiago Chile*, pp. 31 – 44.
- Izquierdo, M.S. (1996b) Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquacult. Nutr.* 2, 183 – 191.
- Jobling M., Johansen, S.J., Foshaug, H., Burkow, I.C, Jorgensen, E.H. (1998) Lipid dynamics in anadromous Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.): seasonal variations in lipid storage depots and lipid class composition. *Fish Physiol. Biochem.* 18, 225 – 239.
- Kanazawa, A., Teshima, S., Inamori, S., Sumida, E., Iwashita, T. (1982) Rearing of larval red seabream an ayu with artificial diets. *Mem.Fac.Fish. Kagoshima Univ.* 32, 109 – 114.

- Kanazawa, A. (1993) Importance of dietary docosahexaenoic acid on growth and survival of fish larvae. Finfish hatchery in Asia. Proceedings of Finfish hatchery in Asia '91., Tungking Marine Laboratory, Tfri, Keelung (Taiwan). Tml conference proceedings. Tungking (TML CONF. PROC.) 3, 87 – 95.
- Kayama, M., Hirata, M., Hisai, T. (1986) Effect of water temperature on the desaturation of fatty acids in carp. Bull. Jap. Soc. Fish. 52, 853 – 857.
- Koven, W.M., Kissil, G.W., Tandler, A. (1989) Lipid and n-3 requirement of *Sparus aurata* larvae during starvation and feeding. Aquaculture, 79, 185 – 191.
- Koven, W.M., Tandler, A., Kissil, G.W., Sklan, D., Friezlander, O., Harel, M. (1990) The effect of dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids on growth, survival and swim bladder development in *Sparus aurata* larvae. Aquaculture 91, 131 – 141.
- Koven, W.M., Tandler, A., Kissil, G.W., Sklan, D. (1992) The importance of n-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. Aquaculture 104, 91 – 104.
- Mourente, G., Rodriguez A., Tocher, D., Sargent, J. (1993) Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) on lipid and fatty acid compositions and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae during first feeding. Aquaculture 112, 79 – 98.
- Mourente, G., Odriozola, J.M. (1990) Effect of broodstock diets on total lipids and fatty acids composition of larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during yolk sac stage. Fish Physiol. Biochem. 8, 103 – 110.
- Mourente, G., Tocher, D.R. (1992) Effects of weaning onto a pelleted diet on docosahexaenoic acid (22:6n-3) levels in brain of developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture 105, 363 – 377.
- Navarro, J.C., Sargent, J. (1992) Behavioural differences in starving herring *Clupea harengus* L. larvae correlated with body levels of essential fatty acids. J. Fish Biol. 41, 509 – 513.
- Olsen, R.E., Lovaas, E., Lie, O. (1999) The influence of temperature, dietary polyunsaturated fatty acids, α -tocopherol and spermine on fatty acid composition and indices of oxidative stress in juvenile Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.). Fish Physiol. Biochem. 20, 13 – 29.
- Olsen, Y., Skjervold, H. (1995) Variation in content of ω 3 fatty acids in farmed Atlantic salmon, with special emphasis on effects of non dietary factors. Aquaculture International 3, 22 – 35.
- Ostrowsky, A.C., Divakaran, S. (1990) Survival and bioconversion of n-3 fatty acids during early development of dolphin (*Coryphaena hippurus*) larvae fed oil enriched rotifers. Aquaculture 89, 273 – 285.
- Ota, T., Yamada, M. (1971) Lipids of masu salmon *Oncorhynchus masou*. I. Variations of the lipid content and fatty acid composition of juvenile masu salmon during the period of smolt-transformation, and the influence of light upon those variations. Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ. 22, 151 – 158.
- Planas, M., Garrido, J.L., Labarta, U., Ferreiro, M.J., Fernandez-Reiriz, M.J., Munilla, R. (1993) Changes of fatty acid composition during development in turbot (*Scophthalmus maximus*) eggs and larvae. In: Walther B.T., Fyhn, H.J. (Eds.), Physiological and Biochemical aspects of fish development. Univ. of Bergen, Norway, pp. 323 – 329.
- Rainuzzo, J.R., Farestveit, R., Jorgensen, L. (1993) Fatty acid and aminoacid composition during

- embryonic and larval development in plaice (*Pleuronectes platessa*). In: Walther B.T., Fyhn, H.J. (Eds.), *Physiological and Biochemical aspects of fish development*. Univ. of Bergen, Norway, pp. 290 – 295.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Jorgense, L., Olsen, Y. (1994) Lipid composition in turbot larvae fed live feed cultured by emulsions of different lipid classes. *Comp. Biochem. Physiol.* 107, 699 – 710.
- Reitan, K.T., Rainuzzo, J.R., Olsen, Y. (1994) Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of Turbot larvae. *Aquaculture Internacional* 2, 33 – 48.
- Rodríguez, C., Perez, J.A., Izquierdo, M.S., Mora, J., Lorenzo, A., Fernandez-Palacios, H. (1993). Essential fatty acid requirement of larval gilthead sea bream, *Sparus aurata* (L.). *Aquac. Fish. Manage.*, 24, 295 – 304.
- Rodríguez, C., Perez, J., Badía, P., Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Hernandez, L., (1998) The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae when using an appropriate DHA/EPA ratio in the diet. *Aquaculture* 169, 9 – 23.
- Rodriguez, C. (1994) Estudio de los requerimientos de ácidos grasos esenciales de la dorada europea durante las dos primeras semanas de alimentación. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna, España 284 pp.
- Salhi, M., Izquierdo, M.S., Hernandez-Cruz, C.M., Gonzalez, M., Fernandez-Palacios, H. (1994) Effect of lipid and n-3HUFA levels in microdiets on growth, survival and fatty acid composition of larval gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 124, 275 – 282.
- Sampekalo, J., Takeuchi, T., Watanabe, T. (1992) Comparison of gill lipids between freshwater fish. *J. Tokyo Univ. Fish.* 79, 71 – 76.
- Sargent, J., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J., Tocher, D.R. (1995) Requirement criteria for essential fatty acids. *J. Appl. Ichthyol.* 11, 183 – 198.
- Sargent, J.R., Bell, M.V., Tocher, D.R. (1993) Docosaehaenoic acid and the development of brain and retina in marine fish. In: Devron, C.A., Baksaas, I., Krokan, H.E. (Eds.), *Omega-3 fatty acids: Metabolism and biological Effects*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 139 – 149.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., Estevez, A. (1999a) Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177, 191 – 199.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D. (1999b) Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179, 217 – 229.
- Sargent, J., Henderson, R.J., Tocher, D.R. (1989) The lipids. In: Halver J.E. (ed.), *Fish Nutrition* Academic press, San Diego, pp. 154 – 219.
- Satoh, S., Poe, W.R., Wilson R.P. (1989) Effect of dietary n-3 fatty acids on weight gain and liver polar lipid fatty acid composition of fingerling channel catfish. *J. Nutr.* 120, 23 – 28.
- Sheridan, M. (1989) Alterations in lipid metabolism accompanying smoltification and seawater adpation of salmonid fish. *Aquaculture* 82, 191 – 203.
- Stottrup, J.G. (1993) First feeding in Marine fish larvae: Nutritional and environmental aspects. In: Walther, B.T., Fyhn, H.J. (Eds.), *Physiological and Biochemical aspects of fish development*. Univ. of Bergen, Norway, pp. 123 – 131.

- Takeuchi, T. (1997) Essential fatty acid requirement of aquatic animals with emphasis of fish larvae and fingerling. *Reviews in Fisheries Science* 5, 1 – 25.
- Takeuchi, T., Watanabe, T., Nose, T. (1979) Requirement for essential fatty acids of chum salmon (*Onchorhynchus keta*) in freshwater environment. *Nippon Suisan Gakkaishi* 45, 1319 – 1323.
- Tandler, A. Watanabe, T., Satoh, S., Fukusho, K. (1989) The effect of food deprivation on the fatty acid and lipid profile of red seabream larvae (*Pagrus major*). *Br. J. Nutr.* 62, 349 – 361.
- Thomson, A., Sargent, J., Owen, J. (1977) Influence of acclimatization temperature and salinity on (Na⁺ + K⁺) dependent adenosine triphosphatase and fatty acid composition in the gills of the eel (*Anguilla anguilla*). *Comp. Biochem. Physiol.* 56B, 223 – 228.
- Tocher, D. R., Castell, J.D., Dick, J. R., Sargent, J. (1994) Effects of salinity on the growth and lipid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) cells in culture. *Fish Physiol. Biochem.* 13, 451 – 461.
- Tocher, D.R., Castell, J.D., Dick, J.R., Sargent, J. (1995) Effects of salinity on the fatty acid composition of total lipid and individual glycerophospholipid classes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) cells in culture. *Fish Physiol. Biochem.* 14, 125 – 137.
- Tocher, D.R., Sargent, J. R. (1984) Analysis of lipid and fatty acids in ripe roes of some Northwest European marine fish. *Lipids* 19, 492 – 499.
- Vázquez, R., Gonzales, S., Rodriguez, A., Mourente, G. (1994) Biochemical composition and fatty acid content of fertilized eggs, yolk sac stage larvae and first feeding larvae of the Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Aquaculture* 119, 273 – 286.
- Watanabe, T., Arakawa, I., Kitajima, C., Fujita, S. (1984) Effect of nutritional quality broodstock diet on reproduction of red sea bream. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 50, 495 – 501.
- Watanabe, T., Kiron, V. (1994) Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture* 124, 223 – 251.
- Watanabe, T. (1982) Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol* 73B, 1 – 16.
- Watanabe, T. (1985) Importance of the study of broodstock nutrition for further development of aquaculture. In: Cowey, C.B., Mackie A.M., Bell J.G. (Eds.), *Nutrition and feeding in fish..* Academic Press, London, pp. 395 – 414.
- Watanabe, T. (1993) Importance of dosahexanoic acid in marine larval fish. *J. World Aquacult. Soc.* 24, 152 – 161.
- Zenebe, T., Ahlgrent, G., Bomberg, M. (1998) Fatty acid content of some freshwater fish of commercial importance from tropical lakes in the Ethiopian Rift Valley. *J. Fish Biol.* 53 987 – 1005.

NUTRITIONAL REQUIREMENTS FOR FISH LARVAE: PROTEIN, AMINOACIDS, PHOSPHOLIPIDS, AND VITAMINS

*Izquierdo, M.S. and Robaina, L.
Grupo de Investigación en Acuicultura, IUSA and ICCM. P.O. Box 56, 35200,
Telde, Las Palmas, Canary Islands, Spain*

Abstract

The requirement for a particular nutrient could be defined both from a physiological or a practical point of view. The determination of requirements for different nutrients should consider some general recommendations: Optimal culture conditions as close to commercial scale as possible should be used, testing a hypothesis with 5 to 6 different levels for a given nutrient by triplicates and considering several factors related to the species, the environment, type of culture, feeding strategy and feed. A standard diet should be used as a control and complete feed ingredient descriptions should be provided. In larval nutrition, fish should be fed different levels of the nutrient to be tested through enriched life prey, whose nutrient composition is difficult to control, or microdiets, which still present stability and acceptance problems. Study of the biochemical composition of the eggs, the evolution of a nutrient along the embryo development and the conservation or loss of a nutrient along larval development and during starvation and feeding of the fish can also provide very interesting information about the larvae requirements. As for other types of nutrients, protein requirements in fish larvae are higher than for juveniles or adults. Besides the 10 essential amino acids, Tyr, Cys and taurine must be frequently be included in larval diets. Phospholipids are required for growth and utilization of other dietary lipids such as essential fatty acids and fat-soluble vitamins, their inclusion in microdiets markedly improving lipoprotein synthesis and lipid transport. Most described water-soluble vitamin requirements are much higher for larvae than for juveniles of the same species, not only due to the higher metabolic demand in the former, but also for the high ratio surface/volume in larval diets making the diets more prone to oxidation and leaching. Certain fat-soluble vitamins such as Vit E, markedly improved survival, but their elevation in absence of other anti-oxidants or in inadequate molecular forms as it happens with Vit A, not only negatively affect larval growth and survival but also induces alterations in pigmentation and skeleton deformities in fish larvae.

Determination of nutritional requirements for larvae

The requirement for a particular nutrient could be defined both from a physiological or a practical point of view. Under the later we can consider the requirement for body maintenance as the minimum rate of nutrient expenditure needed to keep the animal alive. For instance, we can consider the energy for maintenance as the energy needed to maintain the basal metabolism, plus the energy used for thermoregulation, plus the energy for involuntary activity such as body movement and muscular activity. But we can also define the requirement for maximal growth, where the relation fish-diet-feeding has an important effect in the determination of the quantitative needs. Besides, we can also talk about requirement for least cost production. Different studies show that the requirements for maximal growth are always higher than the requirements

for least cost production. Thus, de Silva et al. (1989) applying a second order polynomial relation to growth data compiled from different works on Tilapia, observed that the most economical dietary protein content was 28%, considerably less than the 34% protein level which supported maximum growth. Finally, it could be defined the requirement for fish health. The nutrient requirements determined for certain nutrients under optimal culture conditions increase when fish are exposed to unfavorable environmental conditions (poor water quality, stress, pathogens ...). Thus for example, the definition of the requirement for vitamin C to improve immunological defenses is related to the production conditions applied.

Defining the methodology applied to the determination of requirements for different nutrient should consider some general recommendations:

- a. A practical point of view to establish nutritional requirements is preferred.
- b. If optimal culture conditions for the tested species have been established, the requirements should be assayed in such conditions. If not, it should be reviewed what it is known from this species in its natural conditions.
- c. As far as possible, experimental conditions similar to those used at commercial scale should be used (feed preparation technique, water quality, photoperiod or fish stocking density, among others).
- d. Only one hypothesis tested per experiment is preferred.
- e. At least triplicate tanks of fish should be used per dietary treatment, as one tank of fish represents a single block observation.
- f. To determine quantitative requirements it is important to considerer different factors related to the species (such as age and size), related to the medium (such as temperature, salinity, culture density, to the type of culture: extensive/intensive), related to the feeding strategy and feeding regime and related to the feed (dietary energy content, nutrient availability in the ingredient source and interactions with other dietary nutrients or ingredients).
- g. Complete feed ingredient descriptions should be provided, including International Feed Number (IFN), chemical composition and particle size, when reporting dietary formulations and the results of nutritional feeding trials. If a commercially prepared diet is used, the trade name and manufacturer should be indicated.
- h. A standard diet should be used as a control in addition to any local diet also designed as a control. In most cases the use of different control diets makes among different authors complicates comparison of results among them.
- i. A minimum of six dietary nutrient levels or treatments is recommended for nutrient requirement studies.
- j. Carcass analysis should be carried out at the beginning and at the end of the experiment.
- k. An appropriate statistic analysis is always necessary.
- l. Fish should be fed until "apparent satiation" instead of restricted feeding rates.

Besides these general considerations, other ones specifically related with the larval production must be taken into account. The most direct method to evaluate the several nutrients requirements in fish larvae is to feed the larvae with different levels of these nutrients. Although these may seem simple, in fact it is quite complicated. For this purpose we must feed the larvae with enriched life prey or directly on microdiets containing different levels of the nutrient to be tested. Although it is possible to control the live preys content on some nutrients such as fatty acids, the precise amount of certain nutrients such as proteins, amino acids, vitamins and minerals is difficult to manipulate in live preys, whose own metabolism modifies the nutrients provided through the enrichments. In this sense, microdiets are a preferred method to determine the larval requirements, but stability and acceptance are yet problems to be solve before using them in

mass production of fish larvae. Once several levels of the nutrient are provided through the diet, their effects in several parameters are studied: a) Growth rate (much affected by some nutrients but not by others) b) survival rate and resistance to stress (again some species are very sensible but no others and molecular markers of stress would be needed to precise the effects of certain nutrients), c) biochemical composition of the fish larvae.

Other additional methods which can provide interesting information about the requirements are:

- Study of the biochemical composition of the eggs. Marine fish eggs should contain all the nutrients which are essential for the embryo and the larvae development up to the stage of yolk-sac absorption. So their biochemical composition should give us some information about which nutrients are essential for this development.
- Study of the evolution of a nutrient along the embryo development. The evolution in the changes in the free amino acid composition during the embryo development should say us which of these fatty acids are preferentially incorporated into proteins and which ones are used as a source of energy.
- Study of the conservation or loss of a nutrient along larval development and during starvation and the feeding of the fish.

But when comparing the determined quantitative nutrient requirements for a given species, results sometimes differ among the different studies (Izquierdo, 1996). These differences are particularly found during larval stages and can be related not only to differences in the culture conditions (i.e. the presence or not of different types of microalgae in different concentrations in the rearing tank) or larval nutrient original levels (coming from either broodstock feeding or previous larval feeding) but also to the several dietary aspects which have been discussed above.

Protein and amino acid requirements

Fast growing fish larvae have a high demand for protein and require more elevated dietary contents than juveniles and adults, microdiets designed for larval rearing containing between 50 and 70% protein. From the 20 most common aminoacids 10 have been found to be essential or indispensable for all studied fish and are required for optimum growth despite fish are not able to synthesize them: Leu, Ile, Val, Thr, Phe, Met, Trp, Arg, His, and Lys. Another two amino acids, Tyr and Cys are only non essential if Phe and Met are present in the diet. At least all those aminoacids should be also required by fish larvae. Moreover, the importance of other minor amino acids such as taurine, recently pointed out as essential for best growth and survival of several species of sparids should not be neglected.

Methods to determine quantitative requirements of each of those aa in fish larvae include feeding microdiets with graded levels of one amino acid at a time in a test diet containing either all crystalline amino acids, a mixture of casein, gelatin and crystalline amino acids, or a semipurified diet using an imbalanced protein (zein, corn gluten) formulated so that the amino acid profile is identical to the test protein except for the amino acid being tested. As studied by Kanazawa and co-workers for fish larvae of several species, diets are designed to contain protein levels at or slightly below the optimum protein requirement for that species to assure a maximum utilization of the limiting amino acid. Hence, quantitative requirements of several aa have been determined for red sea bream and Japanese flounder larvae (López-Alvarado, 1995). Relations among aa, such as competition or common synthesis pathways, need also be considered. Moreover, aa leaching in the relatively long water staying microdiets, cause difficulties to accurately de-

termine physiological requirements. Hence other methods previously utilized in juveniles have been applied to fish larvae. For instance, from the early 80's it has been shown that there is not difference between the relative proportions of individual essential aa required in diet and the relative proportions of the same 10 aa present in fish carcass. Since the essential aa profile of fish muscle protein does not differ greatly between individual fish species the pattern of requirement for individual species will also be similar. Thus, analysis of the larval aa composition have been frequently used to predict its essential aa requirements (Watanabe and Kiron, 1994).

Comparison of live prey and fish larvae aa profile would also allow us to predict if such feed would cover the larval aa requirements. For instance, when turbot larvae and live food eaa profiles are compared, the profile of the latter seems to be deficient in some eaa such as leucine, arginine, threonine or methionine (Conceição *et al.*, 1997), depending on the larval age and type of prey, whereas rotifers seem to be deficient in threonine and leucine for larval seabream.

Other methods utilized in juveniles consider that when an essential amino acid is deficient in a diet the major proportion will be used for protein synthesis and only a little fraction will be oxidized to carbon dioxide to obtain energy, whereas if that amino acid is supplied in the diet in excess plasma levels will increase and it will be more available for oxidation. A force feeding method including labelled eaa has been recently developed for fish larvae (Conceição *et al.*, 2003), denoting a high retention of labelled doses of eaa in the body (>60%), and low catabolism as measured by liberated $^{14}\text{CO}_2$ (< 25%). In contrast, non essential aa were faster catabolized (>40%).

Phospholipids

Feeding larvae low dietary contents of PL reduces growth and lipid transport from larval enterocytes to hepatocytes (Kanazawa 1993; Izquierdo *et al.*, 2000). For instance, feeding larval gilthead seabream diets without lecithin supplementation produces accumulation of lipidic vacuoles in the basal zone of the enterocyte and esteatosis in the hepatic tissue, both of them being markedly reduced by a 2% addition of soybean lecithin (Figure 1), denoting an enhancement in the lipid transport activity in gut and liver (Izquierdo *et al.*, 2000). This reduction in lipid transport could be related with a limited capacity for "de novo" synthesis of phospholipids in the larvae. Reacilation of phospholipids in the enterocyte is known to occur through the glycerol-3-phos-

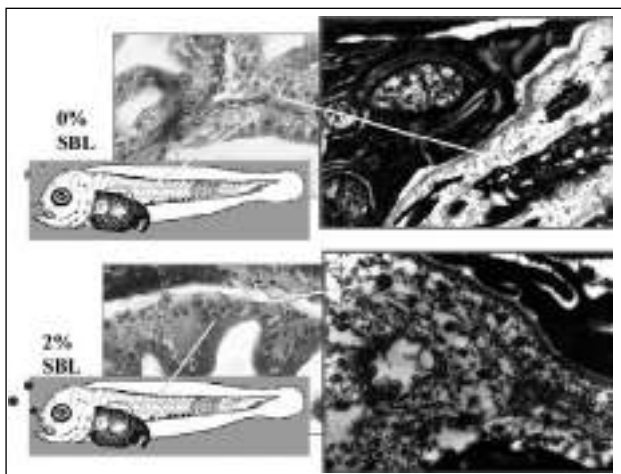


Figure 1. Enhancement of lipoprotein production by inclusion of 2% soybean lecithin in microdiets for marine fish larvae.

phate pathway in both the rough and the smooth endoplasmic reticulum (Izquierdo *et al.*, 2000). But since marine fish larvae fed microdiets show enterocytes with a poor development of endoplasmic reticulum and Golgi system, reacilation capacity may be limited in these larvae. Moreover, inappropriate dietary lipids have been found to markedly affect re-esterification pathways in seabream gut (Caballero *et al.*, 2005), modifying the type of lipoprotein formed. For instance, addition of soybean oil promotes PC synthesis by both glycerol-3-phosphate acyltransferase and monoacylglycerol pathways, thus providing material for VLDL formation, whereas addition of rapeseed oil inhibits lipid re-esterification, particularly into TG (Caballero *et al.*, 2005).

On the contrary, when gilthead seabream larvae are fed TG of marine origin, rich in n-3 HUFA it was observed an accumulation of lipid vacuoles in the basal zone of the enterocyte and hepatic steatosis, denoting the good absorption of dietary TG but also a reduced lipid transport to peripheral tissues, whereas feeding with marine PL markedly reduced lipid accumulation in both type of tissues. A higher lipid content due to accumulation of TG and cholesterol esters was found in larvae fed marine TG, whereas in larvae fed marine PL relative proportions of PC and phosphatidyl-ethanolamine (PE) were higher and richer in n-3 HUFA (Salhi *et al.*, 1999). These results agree well with the higher incorporation into larval polar lipids of fatty acids from dietary polar lipids than from dietary triglycerides. In studies with labelled fatty acids dietary n-3 HUFA PL, significantly improved the incorporation of free eicosapentaenoic acid, but not of free oleic acid, into larval polar lipids in comparison to n-3 HUFA rich TG. This specific incorporation of eicosapentaenoic acid when dietary polar lipids are rich in n-3 HUFA could be related to the enhancement of lipid transport, mobilization and deposition in the peripheral tissues by n-3 HUFA rich dietary phospholipids. As a consequence, growth of larval gilthead seabream was improved when they were fed microdiets containing marine PL instead of marine TG despite the slightly lower dietary n-3 HUFA levels of the former (1.5% versus 1.8%, respectively) (Salhi *et al.*, 1999).

But incorporation of dietary free fatty acids seems to be even lower than that of triglycerides. Thus, labelled oleic acid was better incorporated into both polar or neutral lipids of seabream larvae when it was provided in the diet esterified in a triglyceride than as a free fatty acid, suggesting again a limited capacity of reacilation or transport for dietary long chain free fatty acids or its preferential utilization as energy source in the enterocyte.

Enzymatic, histological and biochemical evidences suggest that marine fish larvae are able to digest and absorb n-3 HUFA rich TG more efficiently than free fatty acids, but feeding with PL, particularly if they are rich in n-3 HUFA, will enhance PL digestion and specially lipid transport allowing a better n-3 HUFA incorporation into larval membrane lipids and promoting fish growth. This confirms former studies which suggest that in addition to the dietary level of essential fatty acids, the molecular form in which they are present in the diet is also important for good growth and survival of marine fish larvae (Izquierdo, 1988; 1996; Izquierdo *et al.*, 1989).

Accumulation of lipidic vacuoles in the basal zone of the enterocyte caused by feeding diets without lecithin supplementation in gilthead seabream disappeared when 0.1% PC was added regardless of its (squid or soybean) origin (Izquierdo *et al.*, 2000). However, squid PC was more efficient in reducing hepatic steatosis than soybean PC, suggesting a combined effect of dietary PC and n-3 HUFA to further enhance hepatic lipid utilization. Indeed both types of molecules have been found to promote lipoprotein synthesis.

Vitamins

The improvement in production of microdiets for larval feeding has greatly facilitated the determination of the vitamin requirements in fish larvae, allowing to experimentally isolating vitamin deficiencies and describing several types of abnormalities. Most described water-soluble vitamin requirements are much higher for larvae than for juveniles of the same species, not only due to the higher metabolic demand in the former, but also for the high ratio surface/volume in larval diets making the diets more prone to oxidation and leaching. Thus, whereas in juveniles vitamin premix accounts for about 2-3% of the diet, in larval microdiets they may reach up to 6-8% of the diet.

Most water soluble vitamin contents of hatchery microalgae and live prey seem to be able to match the requirements of fish larvae, except for the low levels of pyridoxine described in certain studies (González, 1997). However, fat soluble vitamin contents of microalgae and live prey greatly varied among sample batches and with culture conditions, frequently originating hypo and hypervitaminosis.

Vitamin E and vitamin A decreased in seabream from fertilization to the onset of exogenous feeding and a continuous uptake of both nutrients from live preys is observed from day 10th after hatching (Figure 2). However a decrease in the larvae vitamin A content is found when rotifers are substituted by *Artemia* nauplii. Enrichment of *Artemia* nauplii with fat-soluble vitamins improves amber-jack growth (*Seriola dumerilii*) and seabream microdiet supplementation with 1756 IU of a retinol and beta-carotene mixture significantly improves larval growth. However, bioavailability of beta-carotene seems to be very poor in gilthead seabream in comparison with retinol and astaxanthin which seems to have a provitamin A function in larvae of this species. Regarding vitamin E requirements, progressive elevation of dietary alpha-tocopherol acetate levels from up to 1500 mg/kg in larval seabream diets containing free ascorbic acid significantly reduced larval survival, whereas the same increase in alpha-tocopherol when vitamin C was supplemented as ascorbic acid polyphosphate caused a significant improvement in larval growth without affecting survival, suggesting a pro-oxidative effect of alpha-tocopherol over vitamin C in the former (Figure 3).

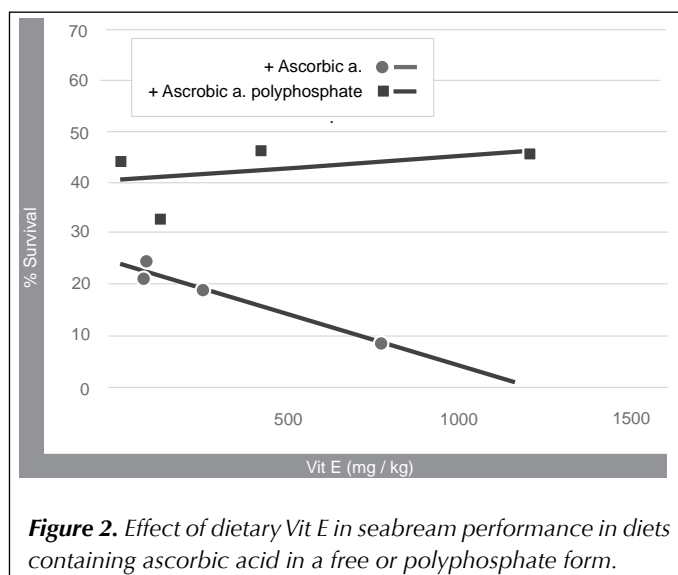
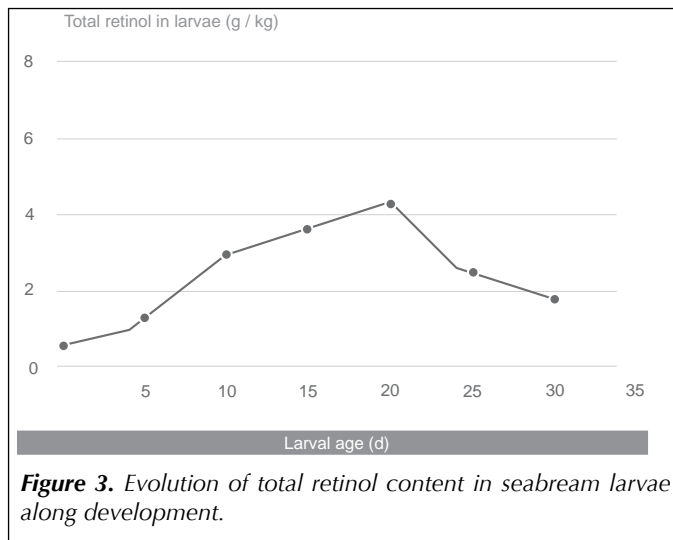


Figure 2. Effect of dietary Vit E in seabream performance in diets containing ascorbic acid in a free or polyphosphate form.



BIBLIOGRAPHY

- Bell, M.V., Dick, J.R., 1993. The appearance of rods in the eyes of herring and increased di-docosahexaenoyl molecular species of phospholipids. *J. Mar.Biol.Ass.U.K.* 73, 679 – 688.
- Benítez, T., Izquierdo, M., Masuda, R., Hernández-Cruz, C., Valencia, A. and Fernández-Palacios, H. Modification of larval gilthead seabream swimming behaviour by dietary essential fatty acids. *J. Fish Biol.*, submitted.
- Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernandez-Cruz, C.M., Gonzalez, M.M. Fernandez-Palacios, H., 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture*, 179, 265 – 275.
- Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., Gallardo, G., Montero, D., Robaina, L., Fernández, A. Is the intestinal biosynthesis of triacylglycerols and phospholipids affected by the inclusion of vegetable oils in diets for sea bream (*Sparus aurata*)? *J.Fish Dis.*, submitted.
- Castell, J.D., Bell, J.G., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1994. Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) *Aquaculture* 155, 149 – 164.
- Conceição, L.E.C., Grasdalen, H., Rønnestad, I., 2003. Amino acid requirements of fish larvae and post-larvae: new tools and recent findings. *Aquaculture* 227, 221 – 232.
- Dantagnan, P., Izquierdo, M., Bórquez, A., Valdebenito, I. Lipid and fatty acid composition along embryo and larval development of puye (*Galaxias maculatus* Jenyns, 1842), obtained from estuarine, fresh water and cultured populations. *Journal of fish Biology* (accepted).
- Estévez, A., Izhikawa, M., Kanazawa, A., 1997. Effects of arachidonic acid on pigmentation and fatty acid composition of japanese flounder, *Paralychthys olivaceous* (Temminck and Schlegel). *Aquaculture Research* 28, 279 – 289.

- González, M. Dietary vitamin E, vitamin A and carotenoids for gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. European Ph.D. Dissertation, Las Palmas Univ. 234 pp.
- Hagve, T.A., Woldseth, B., Brox, J., Narce, M., Poisson, J.P., 1998. Membrane fluidity and fatty acid metabolism in kidney cells from rats fed purified eicosapentaenoic acid or purified docosahexaenoic acid. *Scandinavian J. Clin.Lab. Inves.* 58, 187 – 194.
- Hashimoto, M., Hossain, M.S., Yamasaki, H., Yazawa, K., Masumura, S., 1999. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on plasma membrane fluidity of aortic endothelial cells. *Lipids* 34, 1297 – 1304.
- Hernandez-Cruz, C.M., Salhi, M., Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Gonzalez, M.M., Fernandez-Palacios, H., 1999. Rearing techniques for red porgy (*Pagrus pagrus*) during larval development. *Aquaculture* 179, 489 – 497.
- Izquierdo, M.S. 1996., Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 2, 183 – 191.
- Izquierdo, M.S., 2004. Essential fatty acid requirements of Mediterranean fish. *Cah. Opt. Med.* 67, 34 – 52.
- Izquierdo, M.S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J. Rosenlund, G., Ginés, R. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture*. Submitted.
- Izquierdo, M.S., Tandler, A., Salhi, M., Kolkovski, S., 2001. Influence of dietary polar lipids' quantity and quality on ingestion and assimilation of labelled fatty acids by larval gilthead seabream. *Aquaculture Nutrition* 6, 153 – 160.
- Izquierdo, M.S., Watanabe, T., Takeuchi, T., Arakawa, T., Kitajima, C., 1989 Requirement of larval red seabream *Pagrus major* for essential fatty acids (Nippon Suisan Gakkaishi) *Bull. Japan. Soc. Scien. Fish* 55, 859 – 867.
- Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L., Hernandez-Cruz, C.M., 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiol. Biochem*, 22, 97 – 107.
- Koven, W., Barr, Y., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Weiss, R., Harel, M., Behrens, P., Tandler, A., 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 193, 107 – 122.
- Liu, J., Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., El-Sayed Ali, T., Hernández-Cruz, C.M., Valencia, A., Fernández-Palacios, H., 2002. Necessity of dietary lecithin and eicosapentaenoic acid for growth, survival, stress resistance and lipoprotein formation in gilthead seabream *Sparus aurata*. *Fisheries Science* 68, 1165 – 1172.
- López, J., 1995. Amino acid nutrition of two marine fish larvae: the red seabream (*Pagrus major*) and the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceous*). Ph.D. Dissertation, Kagoshima Univ. 158 pp.
- Madsen, L. Rustan-Arild, C., Vaagenes, H., Berge, K., Dyroy, E., Berge, R., 1999. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid affect mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in relation to substrate preference. *Lipids* 34, 951 – 963.
- Mourente, G., Tocher, D.R., Diaz-Salvago, E., Grau, A., Pastor, E. 1999. Study of the high n-3 highly unsaturated fatty acids requirement and antioxidant status of *Dentex dentex* larvae at the *Artemia* feeding state. *Aquaculture* 179, 291-307.

- Radunz-Neto, J., Corraze, G., Charlon, N., Bergot, P. 1993. Essential N-3 fatty acid requirements of carp (*Cyprinus carpio*) larvae. FROM-DISCOVERY-TO-COMMERCIALIZATION. Carrillo, M., Dahle, L., Morales, J., Sorgeloos, P., Svennevig, N., Wyban, J. European-Aquaculture-Soc 19.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Diaz, M., Izquierdo, M.S., Fernandez-Palacios, H., Lorenzo, A., 1997. Influence of the EPA/DHA ratio in rotifers on gilthead seabream (*Sparus aurata*) larval development. Aquaculture 150, 77 – 89.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Izquierdo, M.S., Lorenzo, A., Fernández Palacios, H., 1994 “The effect of n-3 HUFA proportions in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larval culture.” Aquaculture 124, 284 p.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Badia, P., Izquierdo, M.S., Fernandez-Palacios, H., Hernandez, A.L., 1998. The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae when using an appropriate DHA/EPA ratio in the diet. Aquaculture 169, 9 – 23.
- Roo, F., Socorro, J., Izquierdo, M.S., Caballero, M.J., Hernandez-Cruz, C.M., Fernandez, A., Fernandez-Palacios, H., 1999. Development of red porgy *Pagrus pagrus* visual system in relation with changes in the digestive tract and larval feeding habits. Aquaculture 179, 499 – 512.
- Roo, F.J., Izquierdo, M. S., Socorro, J., Hernández-Cruz, C.M., Valencia, A. Rearing gilthead sea bream *Sparus aurata* larvae under different lighting regimes and dietary n-3 HUFA levels. Importance of dietary n-3 HUFA for eye development and cone formation along gilthead seabream *Sparus aurata* larval development. Aquaculture. Submitted.
- Salhi, M., Hernandez-Cruz, C.M., Bessonart, M., Izquierdo, M. S., Fernandez-Palacios, H., 1999. “Effect of different dietary polar lipid levels and different n-3 HUFA content in polar lipids on gut and liver histological structure of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae”. Aquaculture 179, 253 – 263.
- Salhi, M., Izquierdo, M.S., Hernández-Cruz, C.M., González, M., Fernández-Palacios, H., 1994. Effect of lipid and n-3 HUFA levels in microdiets on growth, survival and fatty acid composition of larval gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture 124, 275 – 282.
- Seiliez, I., Panserat, S., Corraze, G., Kaushik, S., Bergot, P., 2003. Cloning and nutritional regulation of a D6-desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). Comp. Biochem. Physiol. 135, 449 – 460.
- Watanabe, T., 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. J. World Aqua. Soc. 24, 152 – 161.
- Watanabe, T., Kiron, V., 1994. Prospects in larval fish dietetics. Aquaculture 124, 223 – 251.
- Watanabe, T., Izquierdo, M.S., Takeuchi, T., Satoh, S., Kitajima, C., 1989. Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficacy in larval Red Seabream (*Nippon Suisan Gakkaishi*) Bull. Japan. Soc. Scien. Fish. 55, 1635 – 1640.

FECUNDIDAD Y CALIDAD DE GAMETOS EN PECES: PARÁMETROS DE EVALUACIÓN Y EFECTOS NUTRICIONALES

*Iván Valdebenito I.; Patricio Dantagnan D. & Patricia Gallegos C.
Escuela de Acuicultura. Universidad Católica de Temuco – Chile
Email: ivisler@uctemuco.cl*

1. Introducción

Se entiende por gametos de calidad, aquellos que presentan una excelente tasa de sobrevivencia durante la incubación, alevinaje y primera alimentación, es decir, que tengan la capacidad de generar una descendencia viable, que le permita llegar al estado adulto en las mejores condiciones para su comercialización (Kjorsvik *et al.*, 1990).

Muir (1988); Kjorsvik *et al.*, (1990) y Bromage (1995) señalan que el manejo y la selección de los reproductores es clave para obtener gametos viables o de buena calidad, ya que la capacidad de fecundar varía a nivel individual y en función de varios factores relacionados con los reproductores como la nutrición, alimentación, parámetros físico-químicos, genética, edad del reproductor y características propias de los gametos, sobre todo las relacionadas con el envejecimiento asociado al tiempo de permanencia en el tracto reproductivo o el tiempo transcurrido entre el desove y la fecundación, así como las condiciones del medio ambiente donde el huevo es fertilizado y posteriormente incubado. Otros factores que pueden estar implicados en la determinación de la calidad del huevo son aquellos relacionados con la composición química y las dimensiones físicas del huevo, además de la calidad del semen (Kjorsvik *et al.*, 1990).

Kjorsvik *et al.* (1990) y Brooks *et al.*, (1997) señalan que el crecimiento gonadal, la fecundidad y la viabilidad del huevo son muy susceptibles a las condiciones del medio ambiente, siendo afectados por factores tales como temperatura, estrés y principalmente por la nutrición de los peces. Respecto a lo último, indican que las restricciones alimenticias generalmente reducen la fecundidad total y pueden demorar la maduración y disminuir la proporción de peces maduros. Estos autores señalan que cambios en la composición, peso y tamaño del huevo, parecen ser afectados fuertemente por los diferentes niveles alimenticios y que el efecto de la alimentación en la composición del saco vitelino es de particular importancia para la calidad de las larvas.

En cuanto a los óvulos, la polarización del vitelo, su distribución heterogénea en el folículo y la permeabilidad de la membrana, son caracteres negativos para la calidad del huevo (Piper *et al.* 1982).

Para determinar la calidad del huevo en los peces, muchos investigadores utilizan como criterio el tamaño, forma, transparencia, aspecto del corion, simetría celular, distribución de las gotas de lípidos, tasa de flotabilidad, porcentaje de fertilización y eclosión, sobrevivencia larval al tiempo de reabsorción del vitelo y la composición bioquímica de huevos y larvas (Kjorsvik *et al.*, 1990; Bromage *et al.*, 1994; Kjorsvik, 1994). A continuación se realiza una revisión de algunos de los principales factores que afectan la calidad de los gametos en peces y que se encuentran más asociados al manejo que el cultivador puede realizar con ellos, así como también, de algunos de los indicadores más utilizados en la determinación de su calidad.

I. Hembras

a. Sobremaduración

Como la sobremaduración de las ovas ocurre en el interior de los reproductores, es de gran importancia el tiempo que debe transcurrir entre la ovulación y el momento de extraer y fertilizar los huevos. Bajo condiciones de cultivo artificial los huevos de los salmónidos son ovulados, pero no llegan a ser liberados al exterior, esto se convierte en un problema, debiendo ser los peces desovados y los huevos fecundados artificialmente. Durante la sobremaduración, los huevos sufren una serie de cambios en su morfología y composición bioquímica, traduciéndose en una progresiva pérdida en la calidad o viabilidad (Springate *et al.*, 1984).

La tasa de sobremaduración es dependiente de la temperatura (Gillet, 1991). El periodo óptimo para el desove varía para las diferentes especies de peces por ejemplo, para la trucha arcoiris es de 4-10 días después de la ovulación a 10°C (Springate *et al.*, 1984 en Bromage *et al.*, 1994). Este autor, determinó que huevos fertilizados inmediatamente después de la ovulación y 3 días después, muestran que la sobrevivencia es menor que la de huevos fertilizados 4-6 días después de la ovulación. Además señala que huevos de trucha arcoiris retenidos en el cuerpo por más de 12 días pueden ser fertilizados, pero su sobrevivencia embrionaria es baja. De forma similar, Barnes *et al.*, (2000b) determinó en salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) que huevos de hembras con notable sobremaduración poseen 30% de sobrevivencia a estado de "ova ojo", en cambio, en huevos de hembras no sobremaduras este porcentaje corresponde a 50,6%.

Por otro lado, Devauchelle *et al.*, (1988, en Kjorsvik *et al.*, 1990) encontró que huevos sobremaduros de turbot (*Scophthalmus maximus*) contenían más lípidos que los huevos viables y que éstos a su vez, contienen menor cantidad de todos los grupos de lípidos, especialmente de fosfolípidos.

Por lo tanto, es de suma importancia que se realicen suficientes chequeos de madurez a los reproductores, para detectar lo más temprano posible la ovulación, ya que la sobremaduración puede ser una causa significativa de pérdida de viabilidad de los huevos, particularmente para salmónidos (Bromage & Cumarantunga, 1988).

b. Nutrición y alimentación

Tamaño de la ración: Muir (1988); Kjorsvik *et al.*, (1990) y Bromage (1995) señalan que la nutrición puede afectar el tamaño y peso y la composición del huevo. Kjorsvik *et al.*, (1990), señalan que las restricciones alimenticias generalmente reducen la fecundidad total y pueden inhibir la maduración gonadal y disminuir la proporción de peces maduros en especies tales como la trucha café (*Salmo trutta*), trucha arcoiris (*O. mykiss*) y bacalao (*Gadus morhua*). En cambio, la excesiva alimentación incrementa el número total de huevos, pero no incrementa su tamaño, por estas razones se cree que la calidad y cantidad del alimento son factores importantes en la viabilidad del huevo. Al respecto, Springate *et al.*, (1990) y Cerdá *et al.*, (1990a, en Carrillo *et al.*, 1995) determinaron en reproductores de trucha arcoiris (*O. mykiss*) y lubina (*Dicentrarchus labrax*) respectivamente, que grupos alimentados con una ración completa en comparación con hembras alimentadas con la mitad de la ración, exhiben cambios en la fecundidad, pero los efectos más significativos de la alimentación con una baja ración fue una disminución en el tamaño del huevo y un incremento en la fecundidad relativa. Otro importante efecto de la variación en el tamaño y constituyentes de la ración fue un incremento en los niveles de atresia folicular en peces pre-desovados, lo que podría explicar en parte, las alteraciones en la fecundidad y tamaño del huevo. Por otra parte, Kjesbu (1988, en Kjorsvik *et al.*, 1990), concluye que la fecundidad y el

factor de condición de peces en cautiverio fueron 2,5 y 1,5 veces, los de “bacalaos” (*G. morhua*) silvestres del mismo tamaño, respectivamente.

Requerimientos de ácidos grasos: Carrillo y Zanuy (1995) y Brooks *et al.*, (1997) señalan que la calidad del huevo y la sobrevivencia embrionaria en los peces teleósteos es afectada por el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), particularmente n-3 incluyendo docosahexaenoico (DHA) y eicosapentanoico (EPA), las vitaminas, sobre todo la C y la E, los carotenoides (astaxantina) y los elementos trazas.

Respecto a los ácidos grasos, se ha encontrado que con un incremento en los niveles de n-3 PUFA (particularmente DHA) en la dieta de reproductores de *S. aurata* se incrementa el porcentaje de huevos morfológicamente normales, la incorporación de ácidos grasos en los huevos y se mejora significativamente el porcentaje de sobrevivencia larval después de la reabsorción del vitelo (Fernández – Palacios *et al.*, 1995; Tandler *et al.*, 1995 en Izquierdo *et al.*, 2001), pero excesivos niveles de n-3 HUFA producen hipertrofia del saco vitelino en la larva y una disminución en la sobrevivencia larval (Fernández – Palacios *et al.*, 1995) también se ha determinado que con una dieta deficiente en ácidos grasos esenciales (AGEs) se incrementa el número de gotas lipídicas en huevos de dorada (Fernández – Palacios *et al.*, 1997) como también en dorada del Japón (Watanabe *et al.*, 1984a) indicando así, la importancia de los AGEs para el desarrollo normal de huevos y embriones de estas especies.

Por otra parte, huevos de dorada considerados de mejor calidad, tienen un contenido más alto de ácidos grasos totales n-3, donde se incluyen DHA y EPA (Izquierdo *et al.*, 2001). Similarmente, Watanabe *et al.*, (1985b, en Kjorsvik *et al.*, 1990) evaluó dos dietas en reproductores de dorada del Japón donde una contenía alta cantidad de aceite de maíz (EPA deficiente) y encontró que el porcentaje de huevos flotantes, la tasa de incubación y producción final de huevos fueron significativamente reducidos en comparación con la dieta control. Por otra parte, Cerdá *et al.*, (1995) en lubina (*D. labrax*) observaron una clara relación entre la composición de lípidos en la dieta y los resultados de los desoves, encontrando que si los reproductores ingerían niveles bajos de PUFA de la serie n-3 se producía una marcada reducción de la fecundidad y de la viabilidad de los huevos con respecto a especímenes con dietas más equilibradas. En algunas especies marinas como el turbot, platija o lubina, una baja calidad de huevos se correlaciona con un alto contenido de lípidos totales (Devauchelle *et al.*, 1982), al igual que la especie de agua dulce *Coregonus albula* (Kjorsvik *et al.*, 1990).

Vitaminas: el ácido ascórbico ha mostrado jugar un rol importante en la reproducción de salmónidos (Eskelinen, 1989) particularmente en la vitelogénesis (Sandnes, 1991). Al respecto, Sandnes *et al.*, (1984); Dabrowski y Blom (1994) e Izquierdo *et al.*, (2001) demostraron que la vitamina C es un nutriente esencial, y que una deficiencia de esta vitamina en la dieta resulta en huevos que muestran mortalidades considerablemente más altas que huevos de hembras alimentadas con dietas enriquecidas con vitamina C y reduce la concentración de espermatozoides y la motilidad durante y después del período de desove (Sandnes, 1991).

Al respecto estos autores, demostraron que reproductores de trucha arcoiris alimentados con una dieta que contenía un suplemento en el nivel de ácido ascórbico provoca un aumento en el porcentaje de sobrevivencia en incubación comparado con truchas alimentadas sin suplemento de vitamina C. También, se ha demostrado en los trabajos de Sandnes *et al.*, (1984) y Eskelinen (1989) el efecto positivo del ácido ascórbico sobre la eclosión de los huevos. Otro nutriente que juega un rol importante en la reproducción de los peces es la vitamina E, tanto así, que por ejemplo los requerimientos de vitamina E en reproductores de trucha arcoiris son sobre 8 veces más

que los juveniles (Blom & Dabrowski, 1995). Watanabe *et al.*, (1991a) estudió el efecto de un incremento de vitamina E en la dieta (sobre 200mg/Kg) en *P. major* y encontró que esto mejora el porcentaje de huevos flotantes, la tasa de incubación y el porcentaje de larvas normales.

Deficiencias de vitamina E en la dieta de “ayu” (*Plecoglossus altivelis*) (Takeuchi, *et al.*, 1981a), carpa (Watanabe & Takashima, 1977) y en pargo japonés (Watanabe *et al.*, 1985) produce una disminución en la tasa de huevos viables y de la eclosión.

Otras vitaminas como la A y D, también son prontamente incorporadas por el pez al huevo, pero el rol que cumplen en los procesos reproductivos son aún poco claros.

Requerimientos de proteínas: en cuanto al nivel de proteína en la dieta, Al-Hafedh *et al.*, (1999) realizaron un experimento, donde compararon peces de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados con distintos porcentajes de proteína en la dieta (25, 35, 40 y 45%), para visualizar si las influencias sobre la maduración son significativas. Al respecto estos autores, encontraron que cuando son alimentados con 45% de proteína en la dieta los machos maduran a las 14 semanas, en cambio con 25 a 40% los machos maduran a las 16 semanas. También encontró que el número de huevos aumenta con el incremento de proteína en la dieta. La fecundidad relativa fue significativamente mayor para peces alimentados con 25 a 35% de proteína en la dieta que para peces alimentados con 40-45% de proteína.

En trucha arcoiris Watanabe (1984) demostró que dietas con 10% de lípidos y niveles bajos en proteínas (30%) producían gametos de mejor calidad que aquellas alimentadas con altos niveles de proteínas (57%). Washburn *et al.*, (1990) determinaron en la misma especie que al bajar los niveles de proteína de 57 a 30% se mejora significativamente su calidad.

El origen de las proteínas es un factor determinante en la calidad de los gametos. Para trucha arcoiris, las proteínas de origen vegetal (soja y maíz) reducen la fecundidad (Pereira *et al.*, 1992) y grupos de pargo japonés alimentados con pellet a base de harina de sepia, producen gametos con mayor viabilidad y porcentaje de eclosión que aquellos alimentados con alimentos que contenían harina de pescado (Watanabe *et al.*, 1984b y c).

Requerimientos de carbohidratos: Washburn *et al.* (1990, en Brooks *et al.*, 1997) determinaron que reproductores de trucha arcoiris alimentados con una dieta baja en carbohidratos tienen una reducción en la fecundidad relativa y los huevos tienen menor sobrevivencia a estado de ova con ojo y durante la incubación.

Naturaleza de la dieta: Harel *et al.* (1994, en Brooks *et al.*, 1997) respecto a la naturaleza de las dietas, encontraron que reproductores alimentados con dietas naturales producen huevos de mejor calidad que los alimentados con dietas formuladas comercialmente. Por ejemplo, en la dorada, peces alimentados con calamares frescos producen huevos tres veces más viables que peces alimentados con dietas comerciales basadas en gluten de trigo.

La lubina alimentada con dietas artificiales con altos niveles de proteínas produjo siempre gametos de baja viabilidad y tasa de eclosión en comparación a reproductores alimentados con una dieta natural a base de pescado (Cerdá *et al.*, 1994, 1995).

Pigmentos: la movilización de carotenoides y su transporte desde el músculo a la piel y gónadas durante la maduración gonadal (Storebakken & No, 1992), sustenta la hipótesis de que estos pigmentos tienen una función reproductiva importante como en otros animales (Torrissen *et al.*,

1989; Choubert, 1992). Meyer (1993) plantea que las altas concentraciones de astaxantina en huevos de salmón atlántico y otros salmónidos, sugiere un rol como pro-vitamina A y una protección de la piel durante el inicio de la primera alimentación. Aunque los productores regularmente exigen ovas de salmónidos bien pigmentadas, los estudios que relacionan altos contenidos de pigmentos carotenoides con la viabilidad de los gametos son escasos. Torrison (1989) no encontró relación directa entre el contenido de carotenoides y fertilidad, a pesar del importante rol biológico que tienen estos pigmentos como precursores de vitamina A y el rol de fotoprotección. Señalando otras posibles funciones como hormona de fertilización, fuente de pigmentos para cromatóforos, en la respiración, resistencia a altas temperaturas y amonio, lo que coincide con lo informado por Ravinder *et al.*, (1994). Craik (1985) determinó que superada una concentración crítica de pigmentos en los huevos, no existe una correlación lineal entre este valor y la calidad de los gametos. Sin embargo, en pargo japonés los carotenoides producen un efecto positivo en la fertilidad de los huevos y una disminución de las malformaciones observadas en embriones y larvas (Watanabe *et al.*, 1984; Watanabe & Miki, 1991 y 1993). Toledo (1994) en trabajos realizados con trucha arcoiris, demostró que con un nivel de pigmentos mínimo en las ovas de 10mg/Kg se obtiene una buena sobrevivencia en condiciones normales de cultivo. Tampoco encontró diferencias significativas en la calidad de los gametos obtenidos de reproductores alimentados con dietas que contenían pigmentos naturales o artificiales.

c. Manejo de reproductores

Puesto que el principal responsable de la variación en la calidad de los gametos es el piscicultor, para conseguir gametos de alta viabilidad es fundamental el buen manejo y la selección de los reproductores. Entre los factores medio ambientales que son determinantes en la viabilidad del huevo y de la larva se encuentran la temperatura, salinidad y el fotoperiodo. Respecto a la temperatura, Buckley *et al.*, (2000) determinaron que en el transcurso del periodo de desove de bacalao atlántico (*G. morhua*) y eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*) el diámetro del huevo es mayor durante la mitad de la estación de desove, debido a una disminución en la temperatura del agua, lo que señala que existe una relación inversa entre el diámetro del huevo y la temperatura en ambas especies.

Estrés: según Bromage *et al.*, (1992) y Brooks *et al.*, (1997), un factor clave de manejo que comúnmente pueden tener efectos negativos sobre el proceso reproductivo y cuya última consecuencia, generalmente, es producir una progenie poco viable es la prolongada exposición de los reproductores al estrés (como el confinamiento y las altas densidades utilizadas en cautiverio). Al respecto, Schreck *et al.*, (2001) encontró que peces medianamente estresados durante todo el periodo vitelogénico no afectan el tamaño promedio del huevo aunque, este es más heterogéneo. Por otra parte, Campbell *et al.*, (1994) demostraron que en trucha arcoiris el estrés crónico del confinamiento afectó en primer lugar la secreción hormonal, elevando los niveles de cortisol y bajando los de algunos esteroides sexuales. Una problemática similar es reportada por Carragher *et al.*, (1989) para *S. trutta* y *gairdneri*, la que genera un retardo en el desarrollo gonadal de machos y hembras (Sumpter *et al.*, 1987 y Carragher & Sumpter 1990). Además la vitelogenina, compuesto esencial en el crecimiento de los ovocitos, también presenta valores muy bajos en especímenes sometidos a estrés mecánico. En segundo lugar, esta manipulación tuvo como consecuencia la obtención de huevos de pequeño tamaño y de tasas de sobrevivencia de la progenie más bajas que en los controles (Campbell *et al.*, 1994). De acuerdo con estos autores, el estrés medioambiental y particularmente nutricional puede afectar la fecundidad y la calidad del gameto, ya que los huevos en distintos estados de desarrollo tienen límites diferentes de tolerancia a factores de estrés (Westernhagen, 1988 en Kjorsvik, 1995).

Según Billard (1988) otros manejos que en cautiverio también influyen en la viabilidad de los huevos son las prácticas adoptadas para el proceso de fertilización, la sobremaduración de los huevos y la colonización bacteriana.

Edad del pez: en peces de cultivo, la edad a la que se reproducirá un pez, es una decisión que tomará el piscicultor, razón por la cual, se ha incluido dentro de las problemáticas de manejo. Como en muchos vertebrados, la calidad de los gametos producidos por un animal se reduce con la edad. Por ejemplo, la calidad de los gametos del segundo desove es mejor que los del primer desove en trucha arcoiris (Bromage & Cumaranatunga, 1988), puye (observación personal) y lubina (Navas *et al.*, 1995).

Indicadores de la calidad de huevos en peces

a. Morfología

En peces, el ovocito maduro (telolecítico) recién desovado está constituido por una gran masa de vitelo que ocupa el mayor volumen del huevo y por una delgada capa periférica denominada lámina cortical, en la que se encuentran el núcleo y otros organelos celulares. La membrana plasmática está protegida externamente por el corion. Antes de la activación, el corion es de consistencia flácida y está colapsado sobre la membrana del ovocito. El corion presenta uno o varios orificios (micrópilos), con aspecto de cráter, por donde penetra el espermatozoide durante la fecundación. Tras la fecundación los alvéolos corticales se rompen y descargan su contenido formando el llamado espacio perivitelino y a su vez el corion, sufre una serie de cambios estructurales, se endurece protegiendo al embrión de posibles daños o agresiones que pueda sufrir durante la incubación, al mismo tiempo, el diámetro del huevo varía ligeramente. Se observan también una o varias gotas lipídicas, que se encargan de mantener la flotabilidad del huevo (peces marinos) durante la incubación y servir de último alimento a la larva, una vez que el vitelo se ha consumido (Estévez, 1992; Estay, 1994).

Durante la fertilización y activación del huevo, la reacción cortical toma lugar en todos los huevos de los teleosteos que hayan sido o no fertilizados (Kjorsvik *et al.*, 1990). El proceso de fertilización es seguido por el clivaje, una serie de rápidas divisiones mitóticas de las células, donde el citoplasma se divide en numerosas células llamadas blastómeros. Estos disminuyen en tamaño con cada sucesiva división. En peces el gran volumen de vitelo restringe el clivaje a una pequeña área del citoplasma en el polo animal. En huevos no pigmentados como los de puye (*G. maculatus*) son fácilmente visibles los primeros blastómeros de gran tamaño (Benzie, 1968). Para muchas especies un blastómero temprano "normal" es de tamaño y forma regular, no así para "wolffish" (*Anarhichas lupus* L.) (Pavlov *et al.*, 1992) que tiene blastómeros desiguales durante las primeras divisiones. Al respecto, Kjorsvik *et al.*, (1990) y Estévez (1992) describen que huevos de buena calidad, en especies como bacalao (*G. morhua*), lubina (*D. labrax*) y rodaballo (*S. maximus*) la reacción cortical es completa, el espacio perivitelino es más desarrollado y después del clivaje éstos son transparentes, perfectamente esféricos con blastómeros simétricos. En cambio, en huevos de pobre calidad el espacio perivitelino está poco desarrollado y el clivaje es incompleto, lo que puede ocasionar un bajo incremento en el diámetro del huevo después de la fertilización.

Varios autores (Kjorsvik *et al.*, 1990; Bromage *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 1997), señalan que otros buenos indicadores morfológicos de la calidad del huevo durante los primeros estados de desarrollo son la simetría de los blastómeros iniciales, la transparencia y distribución de las gotas lipídicas, tamaño del espacio perivitelino y cambios en el diámetro del huevo después de

la fertilización. Dentro de la morfología se utiliza también el porcentaje de embriones y larvas deformes, aunque esta característica puede estar más relacionada con estudios de polución que de calidad de huevos. Las posibles alteraciones morfológicas de las primeras células indiferenciadas en el embrión, invariablemente afectarán la posterior viabilidad y desarrollo de este. El tipo de morfología de estas células ha sido bastante utilizada en estudios de contaminación y ha resultado ser un parámetro más sensible que la evaluación de la sobrevivencia (Kjorsvik *et al.*, 1990). Se ha demostrado en varios estudios toxicológicos (Kjorsvik, 1990), que muchos huevos anormales, no completan la embriogénesis, lo que sugiere que estos blastómeros anormales pueden generalmente responder a huevos de baja viabilidad, y por lo tanto, este parámetro serviría para evaluar la viabilidad o calidad de los huevos (Kjorsvik *et al.*, 1990; Shields, 1997). De modo similar, Vallin & Nissling (1998) incubaron huevos de bacalao de aspecto regular e irregulares, y en promedio, la tasa de incubación que obtuvo fue menor para huevos irregulares (35%) que regulares (80%), sugiriendo que la morfología ovocitaria puede ser un indicador directo de la viabilidad de los huevos.

b. Tamaño del huevo

Aunque es conocido que huevos grandes producen también larvas más grandes, el tamaño del huevo ha sido un criterio de gran controversia para evaluar la calidad del huevo. Al respecto, Bromage *et al.*, (1992) indican que en trucha arcoiris el tamaño del huevo no parece tener importancia sobre la calidad del huevo, no obstante, Kamler *et al.*, (1982, en Kjorsvik *et al.*, 1990) señalan que la variación en el diámetro del huevo parece ser uno de los criterio más importante en la determinación de la calidad del huevo para peces.

La variabilidad intra específica en el tamaño del huevo está asociada con la edad, el tamaño, las condiciones fisiológicas de la hembra, con el tiempo de desove y la variación en las condiciones medioambientales en que se encuentra el pez (Baynes & Howell, 1996). Uno de los factores que influye tanto en la fecundidad como en el tamaño de los huevos es la dieta (Bromage, 1995). Al respecto, Springate *et al.*, (1985) encontró que reproductores de trucha arcoiris alimentados con la mitad de la ración (0,35% peso corporal por día) reducen el número y el tamaño de los huevos producidos en comparación con peces alimentados con el 0,7 % de su peso corporal por día. Otro de los factores importantes que influyen en el número y tamaño del huevo es el tamaño de la hembra, generalmente así como incrementa el tamaño del pez, también aumenta la fecundidad total y el diámetro de los huevos producidos, particularmente en salmónidos y como consecuencia, las hembras muestran una fecundidad relativa reducida (Bromage & Camaranatunga, 1988). Tal aseveración ha sido demostrada en los trabajos de Coates (1988) en el catfish africano (*Clarias gariepinus*) y los de Pavlov y Moksness (1994) en "wolffish" y Schreck *et al.* (2001) en trucha arcoiris (*O. mykiss*), quienes señalan además que estos resultados también podrían estar asociados con la edad del pez, aunque en algunas especies el efecto de la edad sobre la fecundidad puede ser muy pequeño o inexistente, mientras que en otras parece ser altamente significativo. Por tanto, el efecto de la edad del pez sobre el número de huevos producidos se considera que no es consistente entre todas las especies estudiadas (Wootton, 1979 en Cerdá, 1993)

Gall (1974) y Brooks *et al.*, (1997) indican que en trucha arcoiris la hembra produce mayor cantidad de huevos y de mejor calidad en la segunda estación de desove que en la primera. Similarmente, Bromage & Camaranatunga (1988) señalan que la sobrevivencia a "ova con ojo" de huevos ovulados en la segunda estación fue significativamente más alta comparada con huevos de hembras de primer desove (75% versus 58%, respectivamente).

Por otra parte, los efectos del tamaño del huevo en la sobrevivencia durante el periodo de incubación son controversiales. Algunos autores (Richter *et al.*, 1995; Barnes *et al.*, 2000a), sugieren

que huevos pequeños tienen pobre sobrevivencia mientras que otros (Cerdá *et al.*, 1990a; Estay *et al.*, 1994; Kjorsvik *et al.*, 1998), argumentan que este tamaño no tiene efecto en la calidad del huevo ya que huevos pequeños poseen similares tasas de fertilización que huevos más grandes. Estos últimos, producen alevines de trucha arcoiris más grandes a primera alimentación, pero si los alevines se encuentran bajo condiciones de pobre calidad de agua, estresados o con alimentación inapropiada, pueden sufrir mortalidades más altas que alevines pequeños. A su vez, el alevín de saco nacido de huevos grandes en periodo de inanición, tiene mejor sobrevivencia, aunque si en el "hatchery" se proveen las mismas condiciones de manejo, tanto los huevos pequeños como los grandes tendrán igual oportunidad de sobrevivencia (Blaxter & Hempel, 1963 en Muir 1988 y Gisbert *et al.*, 2000). Springate & Bromage, (1985a) concluyen que pequeños huevos no son básicamente de menor calidad que huevos grandes, ya que estos autores habrían descubierto, que la sobrevivencia de los huevos no es afectada por el tamaño del huevo, sino más bien por una diferencia en el estado de madurez de los huevos, es decir, un efecto más bien de sobremaduración que del tamaño del huevo.

Es conocido que el tamaño del huevo y de la larva están correlacionados (Baynes & Howell, 1996; Gisbert *et al.*, 2000). Al respecto, Beacham *et al.*, (1985) y Baynes & Howell (1996) determinaron en salmón chum (*O. keta*), salmón coho (*O. kisutch*) y en "sole" (*Solea solea*) que las larvas con mayor volumen de vitelo provienen de huevos más grandes y alcanzan mayor talla que las larvas provenientes de huevos pequeños, pero esta ventaja de tamaño es generalmente más corta después de la primera alimentación (Springate y Bromage 1985a) tal como ocurre en esturión siberiano (*Acipenser baeri*) (Gisbert *et al.*, 2000) y en salmón atlántico (*Salmo salar*) (Poxton, 1991) donde se observó una habilidad de los especímenes pequeños para crecer a la misma tasa que un alevín inicialmente más grande.

c. Número de gotas lipídicas

La información disponible respecto a las gotas lipídicas que contienen los huevos es limitada sin embargo, para evaluar la calidad de huevos en peces, especialmente marinos, también se puede utilizar el número y distribución de las gotas de lípidos. Por ejemplo, en dorada del Japón (*P. major*), huevos normales de cultivo tienen diámetros de 0,66 a 1,03mm y contienen una gota de aceite de 0,25mm (Fukuhara, 1985) y en huevos que poseen más de una gota su posterior desarrollo es anormal (Watanabe & Kiron, 1995). En puye (*G. maculatus*) no se encontró relación entre el número de gotas lipídicas visibles en las ovas y su fertilidad.

d. Flotabilidad

En especies con huevos pelágicos, la calidad de gametos está asociada a la flotabilidad (McEvoy, 1984). Se ha usado en pargo japonés (Watanabe *et al.*, 1984a, b), en lubina (Carrillo *et al.*, 1989), la dorada (Fernández Palacios *et al.*, 1995) y turbot.

II. Machos

La calidad del semen de salmónidos también puede afectar la viabilidad del embrión, ya que este puede influir directamente en la fertilidad de las ovas (Estay *et al.*, 1994). Este autor, menciona algunas características macroscópicas del semen que pueden ser indicadores de su calidad, por ejemplo, en trucha arcoiris un buen semen es de color blanco o levemente rosado y de consistencia lechosa o cremosa. Si la consistencia es acuosa o grumosa, recomienda evitar su utilización. Billard (1988); Aas *et al.*, (1991) y Estay *et al.*, (1994) de forma similar señalan características microscópicas, también utilizadas para evaluar la calidad del semen, como la densidad

espermática, motilidad y composición del plasma seminal. Al igual que en machos estresados el espermatozoides es menor que en especímenes no estresados (Campbell *et al.*, 1994)

Sandnes *et al.*, (1984); Dabrowski & Blom (1994) e Izquierdo *et al.*, (2001) demostraron que la vitamina C es un nutriente esencial, y que una deficiencia de esta vitamina en la dieta reduce la concentración de espermatozoides y la motilidad durante y después del período de desove (Sandnes, 1991).

La vitamina E junto con la vitamina C proporcionan un papel protector importante para los espermatozoides durante la espermatogénesis hasta la fertilización, reduciendo el riesgo de peroxidación de los lípidos, lo que es perjudicial para la motilidad del espermatozoide (Ciereszco & Dabrowski, 1995).



GOBIERNO REGIONAL DE LA ARAUCANIA

Programa Bicentenario de Ciencia y Tecnología



GOBIERNO DE CHILE INIA CARRILANCA



GOBIERNO REGIONAL DE LA ARAUCANIA



GOBIERNO DE CHILE CONICYT