



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

"Efecto de la temperatura sobre el desarrollo embrionario y
crecimiento larval del lenguado *Paralichthys woolmani* en el
Ecuador"

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del título de
ACUICULTOR

Presentada por
Mario Fajardo Brito

GUAYAQUIL - ECUADOR
1997

DEDICATORIA



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARIDIMA

A Dios y mi familia, por ser soportes
fundamentales durante todo este año.



AGRADECIMIENTOS

BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

Quisiera agradecer en primer lugar a DIOS todopoderoso por haberme dado el generoso don de la vida. A mis padres, Jorge y Guillermina, por existir... por sus consejos... por su preocupación, cariño y aliento en los momentos más difíciles... sencillamente los amo.

A mis hermanos, Jorge y Manuel, por apoyarme siempre en este duro y largo camino, y por alentarme en las circunstancias más apremiantes.

A Mónica, por ser esa persona especial que supo apoyarme y comprender mis malos ratos.

Al CENAIM, por darme la oportunidad de realizar mi tesis.

A Jorge Calderón V., Ph.D., Director del CENAIM y Supervisor de Tesis, por permitir la realización del presente trabajo y por su ejemplo de perseverancia.

A Raúl Guartatanga I., Ac., Director de tesis, por la oportunidad brindada, por elegirme para realizar el tema y por transmitirme sus conocimientos sobre el mismo.

A Lorena Schwarz G., M.Sc., por tu generosa ayuda y comprensión, por tus acertadas sugerencias... y, sobretodo, por haber creído en mí en circunstancias tan difíciles... gracias por tu invaluable amistad.

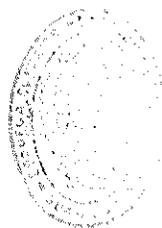
A Masatoshi Futagawa, Ing., por su apoyo en los trabajos investigativos del departamento y por su desinteresada colaboración en la realización de esta tesis.

A Eduardo Cavezas, Blgo., por el abastecimiento de algas pero especialmente por tu gran espíritu de colaboración. A María Helena del Departamento de Análisis Ambiental, por haberme permitido realizar mis análisis. A María, José, Abel y Julio del Departamento de Zooplancton, por el abastecimiento de alimento vivo.

A Isabel Tomalá A., Ac., compañera de tesis y gran amiga. En los momentos críticos se conocen a los amigos y tu los supiste ser... por fin lo hemos logrado.

Finalmente, a mis compañeros tesisistas y amigos, cuyos nombres no incluyo, ya que sería muy egoísta de mi parte... Gracias de todo corazón.

DECLARACION EXPRESA



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

" La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y, el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL".

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).

A handwritten signature in cursive script, reading "Mario Fajardo B.", written over a horizontal line.

Mario Fajardo B. ,



Jerry Landívar, M.Sc.

Presidente del Tribunal



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA



Raúl Guartatanga, Ac.

Director de Tesis

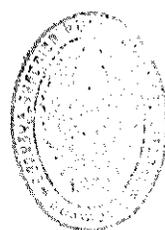


Jorge Calderón, Ph.D.

Miembro Principal

ABREVIATURAS

ANOVA	: análisis de varianza
aprox.	: aproximadamente
Asv	: ancho del saco vitelino
At	: ancho total. Máximo ancho corporal tomando en cuenta aletas dorsales y anales
cel	: célula(s)
cm	: centímetro
D	: días de cultivo
DHA	: ácido docosahexanoico ó 22:6 n-3
EPA	: ácido eicosapentanoico ó 20:5 n-3
g	: gramos
h	: horas
ha	: hectárea(s)
HUFA's	: ácidos grasos altamente insaturados
Kg	: Kilogramo
L	: litro
Lt	: Longitud total. Distancia lineal desde la parte más anterior de la cabeza hasta la punta de la aleta caudal
lux	: unidad de iluminación
m	: metros
mg	: miligramos
min	: minutos
ml	: mililitros
mm	: milímetros
N	: nitrógeno
nm	: nanómetro



BIBLIOTECA
FAC. FIS.
MARITIMA

OD	: oxígeno disuelto
ppm	: partes por millón
P.V.C.	: cloruro de polivinilo
r.e.a.a.d.	: radios elongados anteriores de la aleta dorsal
Sl	: longitud estándar ó longitud corporal. Distancia lineal desde la punta del maxilar superior hasta la punta del notocordio o fin de la hipural
T20	: tratamiento a temperaturas de 20°C
T24	: tratamiento a temperaturas de 24°C
T28	: tratamiento a temperaturas de 28°C
TM	: toneladas métricas
Ton	: toneladas
μ m	: micrómetros
ups	: unidades prácticas de salinidad
U.V.	: ultravioleta (método de esterilización del agua)



BIBLIOTECA
FAC. PISC.
MARÍTIMA

RESUMEN

BIBLIOTECA
FAC. DCS.
MARTINA

En el presente experimento tratamos de establecer el efecto de tres diferentes temperaturas (20°C, 24°C y 28°C) sobre el desarrollo embrionario (fase experimental I) y crecimiento larval (fase experimental II) del lenguado *Paralichthys woolmani*, basado en tiempos de desarrollo, crecimientos y supervivencias. Los huevos viables (flotantes) sembrados a partir de estadios de división celular (16 células) registraron sobre un 70% de eclosión, tiempos de 32.10, 23.40 y 18.30 horas a 20°C, 24°C y 28°C, respectivamente; mientras que en pre-larvas de un día, registraron luego de 35 días de cultivo larvario, estadios larvales variables dentro de un mismo tratamiento, con un 60% en estadio H y 60% en estadio G para 24°C y 28°C, respectivamente. En larvas a 20%, se reportaron mortalidades de 100% al día 30 de cultivo con un 50% de larvas en estadio F.

Las longitudes totales finales de pre-larvas, registradas luego de 40 horas de incubación, fueron 2.39 ± 0.06 mm, 2.49 ± 0.08 mm y 2.23 ± 0.09 mm con supervivencias de 81%, 93% y 34% para 20°C, 24°C y 28°C, respectivamente; siendo 24°C significativamente superior ($p < 0.05$) a 20°C y 28°C. No obstante los índices de supervivencias entre 20°C y 24°C no fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En la segunda fase experimental, las pre-larvas sembradas bajo condiciones adecuadas de alimentación, altas densidades de cultivo (50 larvas/L) y altos porcentajes de recambio (60% a 500%), reportaron una longitud total final de 11.31 ± 1.87 mm y 8.76 ± 0.71 mm, con supervivencias de 8.9% y 0.9% a 24°C y 28°C, respectivamente; siendo 24°C significativamente superior ($p < 0.05$). En lo referente a las larvas sembradas a 20°C reportaron al día 30 de cultivo una longitud total de 7.32 ± 0.87 mm. Por su aceptable crecimiento y supervivencia, rangos próximos a 24°C, son considerados adecuados para un buen crecimiento larval del *Paralichthys woolmani*. Por lo tanto, podríamos deducir que una producción constante tanto de pre-larvas como de alevines podría obtenerse bajo condiciones controladas (laboratorios).

INDICE GENERAL

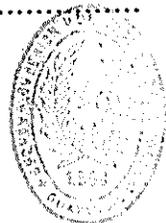


BIBLIOTECA
FAC. ING.
UNAM

ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	iii
INDICE GENERAL.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	vii
INDICE DE TABLAS.....	ix
INTRODUCCION.....	10
1. ANTECEDENTES.....	13
1.1. Taxonomía (Ahlstrom <i>et al.</i> , 1984).....	13
1.2. Biología del lenguado.....	13
1.2.1. Morfología.....	14
1.2.2. Distribución.....	15
1.2.3. Hábitos alimenticios.....	15
1.3. Desarrollo embrionario.....	15
1.3.1. Características de los huevos del género <i>Paralichthys</i>	15
1.3.2. Desarrollo embrionario del lenguado <i>Paralichthys microps</i>	16
1.3.3. Efecto de la temperatura sobre el desarrollo embrionario del lenguado.....	17
1.4. Crecimiento larval.....	20
1.4.1. Características de las larvas del género <i>Paralichthys</i>	20
1.4.2. Crecimiento larval del lenguado <i>Paralichthys adspersus</i>	21
1.4.3. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento larval del lenguado.....	21
1.5. Alimentación.....	26
1.5.1. Microalgas.....	26

1.5.2. Rotíferos.....	28
1.5.3. <i>Artemia</i>	29
1.5.4. Bioenriquecimiento.....	30
1.5.4.1. Enriquecimiento de rotíferos con HUFA's (n-3).....	31
1.5.4.2. Enriquecimiento de <i>Artemias</i> con HUFA's (n-3).....	32
1.6. Parámetros físico-químicos.....	33
1.6.1. Oxígeno disuelto.....	33
1.6.2. pH.....	34
1.6.3. Amoníaco.....	34
2. MATERIALES Y METODOS.....	35
2.1. Obtención de huevos.....	35
2.2. Diseño experimental.....	35
2.3. Sistema de cultivo.....	35
2.3.1. Unidades de enfriamiento y calentamiento.....	36
2.3.2. Suplemento del agua.....	36
2.3.3. Tanques de cultivo.....	37
2.4. Condiciones experimentales.....	38
2.4.1. Fase I: Efecto de la temperatura sobre el desarrollo embrionario.....	39
2.4.1.1. Siembra.....	39
2.4.1.2. Muestreos.....	39
2.4.2. Fase II: Efecto de la temperatura sobre el crecimiento larval.....	40
2.4.2.1. Siembra.....	40
2.4.2.2. Muestreos.....	40
2.4.3. Alimentación.....	41
2.4.3.1. Calidad del alimento (Enriquecimiento).....	41

2.4.3.2. Régimen alimenticio.....	42
2.4.3.3. Método de alimentación.....	42
2.4.4. Condicionantes físico-químicas del medio.....	43
2.5. Metodología estadística.....	44
3. RESULTADOS	45
3.1. Desarrollo embrionario.....	45
3.1.1. Tiempos de desarrollo embrionario.....	45
3.1.2. Supervivencia pre-larval.....	50
3.1.3. Mediciones biométricas en pre-larvas de cultivo.....	50
3.1.4. Temperatura.....	50
3.2. Crecimiento larval.....	51
3.2.1. Tiempo de crecimiento larval.....	52
3.2.2. Supervivencia larval.....	56
3.2.3. Mediciones biométricas en larvas de cultivo.....	56
3.2.4. Parámetros físico-químicos.....	59
3.2.4.1. Temperatura.....	60
3.2.4.2. Oxígeno disuelto.....	60
3.2.4.3. Amoníaco.....	61
DISCUSION.....	63
CONCLUSIONES.....	66
RECOMENDACIONES.....	67
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	68



INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Relación entre el tiempo desde la fertilización hasta la eclosión y la temperatura en dos tipos de rodaballos.....	17
Figura 2.	Efecto de la temperatura sobre la tasa de incremento en longitud total larval del rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>).....	23
Figura 3.	Disposición del sistema de cultivo.....	37
Figura 4.	Tanque de cultivo utilizado durante ambas fases experimentales.....	38
Figura 5.	Régimen alimenticio aplicado durante la segunda fase experimental.....	42
Figura 6.	Desarrollo embrionario del lenguado <i>Paralichthys woolmani</i> bajo 3 diferentes regímenes de temperatura.....	46
Figura 7.	Estadio de 32 células. 27 min luego de la siembra a 16 células.....	46
Figura 8.	Estadio de mórula. 1 h y 37 min luego de la siembra.....	47
Figura 9.	Estadio de blástula. 4 h y 45 min luego de la siembra.....	47
Figura 10.	Estadio de gástrula. 6 h y 40 min luego de la siembra.....	48
Figura 11.	Embrión con la formación del corazón. 15 h luego de la siembra.....	48
Figura 12.	Embrión listo para eclosionar. 20 h y 40 min luego de la siembra.....	49
Figura 13.	Eclosión (70%). 23 h y 40 min luego de la siembra.....	49
Figura 14.	Niveles de temperatura mantenidos durante la primera fase experimental.....	51
Figura 15.	Crecimiento larval del lenguado <i>Paralichthys woolmani</i> bajo 3 diferentes regímenes de temperatura.....	52

Figura 16.	Estadio pre-larval. Día 1 de cultivo (siembra).....	53
Figura 17.	Apertura de la boca. Día 2 de cultivo. Estadio A.....	53
Figura 18.	Formación de 4-5 r.e.a.a.d. Estadio D.....	54
Figura 19.	Formación de 7-9 r.e.a.a.d. Estadio F.....	54
Figura 20.	Ojo derecho observable desde el lado izquierdo. Estadio G.....	55
Figura 21.	Migración completa del ojo (10% de las larvas). Estadio I.....	55
Figura 22.	Supervivencias larvales registradas durante la segunda fase experimental en estadios primarios de metamorfosis.....	56
Figura 23.	Crecimientos en longitud total larval registrados durante la segunda fase experimental.....	57
Figura 24.	Crecimientos en ancho total larval registrados durante la segunda fase experimental.....	58
Figura 25.	Crecimiento relativo de larvas de lenguado <i>Paralichthys woolmani</i> durante la segunda fase experimental.....	58
Figura 26.	Temperaturas diurnas (A) y nocturnas (B) registradas durante la segunda fase experimental.....	60
Figura 27.	Niveles de oxígeno disuelto (ppm) registrados durante la segunda fase experimental.....	61
Figura 28.	Niveles de amoníaco (ppm) registrados durante la segunda fase experimental.....	62



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MAR DEL PLATA

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características principales de huevos del género <i>Paralichthys</i>	16
Tabla 2.	Edad media (horas) observada para cada uno de los 10 estadios de desarrollo de huevos de rodaballo, correspondientes a las diferentes temperaturas experimentales.....	18
Tabla 3.	Características principales de larvas del género <i>Paralichthys</i>	20
Tabla 4.	Recambio de agua en los tanques de cultivo durante la segunda fase experimental.....	44
Tabla 5.	Parámetros finales de la primera fase experimental.....	51
Tabla 6.	Parámetros finales de la segunda fase experimental.....	59
Tabla 7.	Parámetros físico-químicos registrados durante la segunda fase experimental.....	62



BIBLIOTECA
FAC. ING.
QUITO

INTRODUCCION

En menos de una década, Ecuador se ha convertido en uno de los países más exitosos en acuicultura de camarones de la historia. Veinte años atrás las modestas cantidades exportadas correspondían tan sólo a capturas de pesquerías; sin embargo, no fue sino hasta 1977, que la industria camaronera comenzó a desarrollarse convirtiendo al Ecuador, en 1988, en el más grande exportador de camarones en América latina, y el segundo en el mundo con 70,000 TM (más 10,000 TM por capturas de pesquerías) (Aiken, 1990).

De acuerdo a estadísticas oficiales existen 121,369 ha de cultivos de camarón autorizados en Ecuador, pero solamente 100,000 ha están actualmente en producción (1990). Sin embargo las granjas camaroneras se encuentran en las 4 provincias ubicadas al frente del Océano Pacífico, la mayoría en el Golfo de Guayaquil (71% en la provincia del Guayas, 18% en El Oro, 8% en Manabí, y 3% en Esmeraldas) (Aiken, 1990).

No obstante, desde hace algunos años atrás, el sector camaronero ha venido atravesando por una crisis profunda agravada principalmente por la fluctuación de los precios en mercados internacionales (debido a la creciente oferta del producto), escasez de larva de buena calidad (larva salvaje), mal manejo técnico del recurso, y enfermedades tales como parásitos, protozoarios, patógenos virales o bacterianos, Síndrome de Taura, etc. Es por eso que en los actuales momentos, se podría pensar seriamente en acceder hacia otras alternativas de cultivo tales como la de peces marinos, tratando de aprovechar al máximo parte de la infraestructura ya existente de camaroneras y laboratorios.

Dentro de toda la extensa gama de peces marinos con los que cuenta nuestro país se destacan claramente las especies de peces planos y muy particularmente la especie nativa conocida como lenguado *Paralichthys woolmani* perteneciente al género *Paralichthys*. Las especies de este género son consideradas como especies finas que alcanzan buenos precios en el mercado internacional presentándose como las especies que, después de los

salmónidos, muestran las mejores perspectivas de desarrollo, dado que por su excelente calidad, alto precio y demanda en mercados tan importantes y estables como los de EE.UU., Europa y Japón se comercian a precios del orden de US\$15-18 y hasta US\$30/kg (Silva, 1991).

Sin embargo, uno de los grandes problemas que afecta el cultivo de peces marinos en general, es la producción a gran escala de alevines de calidad. Japón, en la década de los ochenta, fue el pionero con el cultivo del pargo (*Pagrus major*) desarrollándose posteriormente en Europa, métodos de cría larvaria más competitivos para la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y la dorada (*Sparus aurata*). Adelantos en los conocimientos sobre los requerimientos dietéticos de las larvas relacionados a los ácidos grasos (n-3) altamente insaturados (HUFA's), permitieron una exitosa transición de una larvicultura piloto a una de escala comercial (Sorgeloos *et al.*, 1995).

Actualmente, Japón es aún el más grande productor de larvas de peces marinos con alrededor de 200 millones de larvas producidas por año, de las cuales el pargo (*Pagrus major*) y el lenguado *Paralichthys olivaceus* constituyen el 70% de su producción total (Sorgeloos *et al.*, 1994).

Por otro lado se ha demostrado que uno de los factores ambientales más influyentes sobre procesos anatómicos, fisiológicos y metabólicos de los peces, es la temperatura (Blaxter, 1969; Kamler, 1992). Justamente en trabajos realizados por Silva (1994) sobre efectos de la temperatura sobre huevos de lenguado *Paralichthys microps*, la calidad y fertilidad de los huevos se ven notablemente disminuidos a temperaturas por sobre los 15°C. Mientras que en larvas, los efectos de temperatura (Seikai *et al.*, 1986) sobre el lenguado *Paralichthys olivaceus* se determinó en la marcada influencia que tiene este parámetro ambiental en lo que se refiere a tamaños metamórficos y duración de períodos larvales.

Más aún, y considerando la ubicación geográfica de nuestro país, se hace imperioso establecer rangos óptimos de cultivo a fin de determinar si la larvicultura del lenguado *Paralichthys woolmani* tiene alguna limitante en este aspecto; ya que en nuestro medio, las amplias fluctuaciones de temperatura podrían afectar al cultivo de esta especie de aguas frías.

Dentro del presente trabajo se destacan los siguientes objetivos: (1) Evaluar si la temperatura puede ser un factor limitante para una producción constante de alevines durante todo el año, (2) determinar la influencia de tres temperaturas de prueba (20°C, 24°C y 28°C) sobre el desarrollo embrionario y crecimiento larval del lenguado, (3) determinar rangos de temperatura óptimos de cultivo basado en crecimientos, supervivencias y duración de estadios tanto en desarrollo embrionario como en crecimiento larval.

1. ANTECEDENTES

Recientemente, el cultivo de peces planos ha mostrado un rápido crecimiento como resultado de mejoras en las técnicas para la obtención de alevines (Shepherd & Bromage, 1988), así como en los notables avances realizados en el cultivo larvario y alimentación de alevines de lenguado, rodaballo y solla; pudiéndose convertir en un futuro muy cercano, en uno de los principales recursos de la acuicultura (Liewes, 1984).



1.1. TAXONOMIA (Ahlstrom *et al.*, 1984)

Superclase: Pisces

Clase: Teleostomi

Superorden: Acanthopterygii

Orden: Pleuronectiformes

Suborden: Pleuronectoidei

Familia: Paralichthyidae

Género: *Paralichthys*

especie: *woolmani*

Nombre científico: *Paralichthys woolmani*

Nombre común: Lenguado

BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

1.2. BIOLOGIA DEL LENGUADO

Los lenguados son teleósteos marinos carnívoros, pertenecientes al orden Pleuronectiformes que incluye a los peces planos que se encuentran en las costas frías de todo el mundo (Silva, 1991). El lenguado *Paralichthys adspersus* tiene hábitos gregarios y sedentarios, y se ubica en el fondo de estanques u otro cuerpo de agua, en zonas más bien protegidas y oscuras. Estos peces silvestres son más inquietos y nerviosos, si se les

compara con el rodaballo (*Scophthalmus maximus*). Una característica de estos peces es que pueden soportar condiciones de bajos flujos de agua y oxígeno. Aunque se les puede manejar sin anestésico, se debe de tomar precauciones en manejos fuertes, para evitar la pérdida de escamas e infecciones consiguientes. Por otra parte, ante condiciones de estrés, los lenguados cambian el color en su epidermis y aumentan la frecuencia de sus movimientos operculares, para permitir el mayor ingreso de agua y oxígeno (Silva *et al.*, 1994). En general, viven en el fondo oceánico de 30 a 100 m de profundidad, donde las temperaturas son siempre más frías (14°C a 20°C); no obstante se estima que el rango de temperatura ideal para el crecimiento de la especie nativa del Ecuador, *Paralichthys woolmani*, es de 20°C a 25°C (Benetti *et al.*, 1995).

1.2.1. Morfología

Para peces planos, en general, se describen las siguientes características: las aletas dorsal y anal son muy largas, bordeando el cuerpo y típicamente son de radios blandos. Las aletas pélvicas son pequeñas, y están situadas justo antes de la anal y en frente de las pectorales. La aleta caudal está bien desarrollada y en forma de abanico. Las mandíbulas son asimétricas y muy bien desarrolladas, el cuerpo es aplanado lateralmente, no simétricamente bilateral en el adulto. Los ojos se encuentran en la parte superior cuando el pez descansa en el suelo (Webb *et al.*, 1981).

Según la morfología descrita por Allen & Robertson (1994) el lenguado *Paralichthys woolmani* presenta las siguientes características: radios dorsales: 70-80; radios anales: 52-64; radios pectorales: 11-12; línea lateral fuertemente arqueada sobre la aleta pectoral; aletas pectorales en posición lateral pero no situadas sobre la media de la región abdominal; origen de la aleta dorsal en dirección del ojo superior, boca grande, mandíbulas con una fila simple de dientes; color del cuerpo: café-oscuro con manchas blanquecinas y manchas redondas azules o blanquecinas pálidas; usualmente con 3 grandes manchas blanquecinas sobre la mitad del cuerpo a lo largo de la línea lateral.

Según Allen & Robertson (1994) alcanza hasta 35 cm de longitud; pero se han encontrado especímenes de hasta 80 cm (Burgess & Axelrod, 1984).

1.2.2. Distribución

El género *Paralichthys* es uno de los más importantes tanto en las costas de Norte y Sudamérica (Gingsburg, 1952 *vide* Zúñiga & Acuña, 1992). El *Paralichthys woolmani* se encuentra desde las costas de Baja California hasta Perú (Allen & Robertson, 1994). Originalmente fue descubierta en las Islas Galápagos por la expedición Albatros (Burgess & Axelrod, 1984).

1.2.3. Hábitos alimenticios

Son inmatos cazadores pues observan rápida y certeramente el alimento antes de cazarlo (Silva *et al.*, 1994). En trabajos realizados sobre hábitos alimenticios en el lenguado *Paralichthys olivaceus*, Nashida & Tominaga (1987) demostraron que los mayores componentes del contenido estomacal de esta especie fueron grupos de peces tales como sardinas (*Sardinops melanosticta*), anchoveta (*Engraulis japonica*) y gobios (*Chaeturichthys sciistius*), presentándose además en cierto porcentaje camarones (*Metapenaeopsisdalei*) y crangon (*Crangon affinis*).

1.3. DESARROLLO EMBRIONARIO

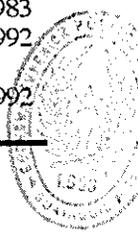
1.3.1. Características de los huevos del género *Paralichthys*

En lo que se refiere al género *Paralichthys* (Tabla 1), los huevos recién fertilizados tienen un diámetro promedio de 0.80 mm, son transparentes, pelágicos, esféricos y lisos; presentando además, una sola gota oleosa que se ubica en la periferia de la masa de vitelo en los últimos estadios de huevos y cercano a la eclosión (Ahlstrom *et al.*, 1984).

Tabla 1. Características de los huevos del género *Paralichthys*

Especies	Tamaño del huevo (mm)	Tamaño de la gota oleosa (mm)	Corión	Tamaño de desove (mm)	Referencias
<i>Paralichthys californicus</i>	0.74-0.82	0.10-0.19	Suave	ca. 2.0	Ahlstrom <i>et al.</i> , 1983
<i>Paralichthys dentatus</i>	0.90-1.10	0.18-0.31	—	2.4-2.8	Smith y Fahay, 1970 <i>fide</i> Ahlstrom <i>et al.</i> , 1983
<i>Paralichthys olivaceus</i>	0.83-1.03	0.13-0.21	Suave	2.6-2.8	Mito, 1963 <i>fide</i> Ahlstrom <i>et al.</i> , 1983
<i>Paralichthys adpersus</i>	—	ca. 0.13	—	ca. 1.7	Zúñiga y Acuña, 1992
<i>Paralichthys microps</i>	ca. 0.80	—	—	ca. 1.5	Zúñiga y Acuña, 1992

*ca.= aproximadamente



1.3.2. Desarrollo embrionario del lenguado *Paralichthys microps*

BIBLIOTECA
FAC. AG.
MANTENA

Los desarrollos embrionarios para huevos de lenguado chileno (*Paralichthys microps*) obtenidos por Silva (1988) registraron un tiempo de eclosión de 68 h con un 100% de eclosión y temperaturas de 15°C.

Los primeros estadios se desarrollan en un tiempo de 3 h y 45 min, caracterizándose por sucesivas divisiones celulares a partir de 2 células hasta alcanzar un número tan extenso de células que se hace difícil contarlas (Mórula). Posteriormente, a 7 h y 10 min luego de la fertilización, el blastodisco (agrupación celular) adquiere un mayor grosor dirigiéndose al polo animal y separándose de la zona externa del huevo por apenas un estrecho espacio perivitelino (Blástula). El siguiente estadio (Gástrula) tiene una duración entre 12 h y 30 min y 25 h, se caracteriza por la formación del anillo germinativo y por la invasión completa del blastodisco al vitelo.

Los siguientes estadios son inherentes al desarrollo del embrión ocurren desde las 25 h hasta las 57 h y 68 h, e incluyen esbozo embrionario, formación de cápsulas ópticas, formación de los miómeros, formación del corazón (pulsaciones), pigmentaciones del saco vitelino así como movimientos espasmódicos del embrión previo eclosión y finalmente, ruptura del corión (eclosión).

1.3.3. Efecto de la temperatura sobre el desarrollo embrionario del lenguado

La influencia de la temperatura sobre el desarrollo puede ser expresada por cambios en el tiempo desde el momento de la fertilización sobre la masa aparente de cualquier estadio de desarrollo. Este parámetro está estrechamente relacionado a la tasa de desarrollo embrionario (Fig. 1 y Tabla 2) así como a las tasas de absorción del vitelo, supervivencias y tamaños de eclosión (Kamler, 1992).

Debido a que la temperatura controla el nivel de actividades metabólicas y que el proceso de transferencia del vitelo es una función fisiológica dependiente de la temperatura, Quantz (1985 *fide* Person-Le Ruyet 1989) concluyó que la tasa de absorción del saco vitelino es directamente proporcional a la temperatura (Fig. 1), mientras que la eficiencia en transferencia de material vitelino es inversamente proporcional a la misma observada en larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus*).

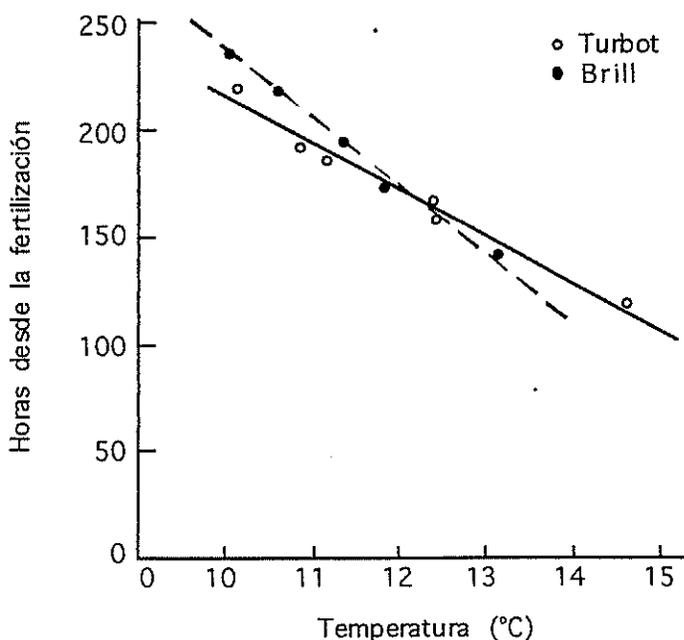


Fig. 1. Relación entre tiempo desde la fertilización hasta la eclosión y la temperatura en dos tipos de rodaballo (tomado de Jones, 1972)

Tabla 2. Edad media (horas) observada para cada uno de los 10 estadios de desarrollo de huevos de rodaballo, correspondientes a las diferentes temperaturas experimentales (tomado de Iglesias *et al.*, 1993).

Estadio	Temperatura °C				
	10	13	15	18	20
1	5.00	4.38	3.00	3.00	3.00
2	25.67	14.73	13.17	9.00	9.00
3	51.58	25.59	25.80	17.00	16.38
4	—	38.76	36.53	25.00	21.00
5	—	53.33	46.38	33.00	27.00
6	—	73.67	56.00	41.31	36.90
7	—	100.92	74.37	51.27	47.10
8	—	124.80	92.45	70.38	63.00
9	—	155.64	111.00	84.81	75.00
10	—	175.24	131.00	97.91	83.00

Estadio 1 (huevos de dos a dieciséis divisiones celulares), Estadio 2 (Mórula), Estadio 3 (Blástula), Estadio 4 (Gástrula), Estadio 5 (Vestigio del primer embrión), Estadio 6 (Estadio E de embrión), Estadio 7 (Estadio F de embrión), Estadio 8 (Estadio G de larva), Estadio 9 (Estadio H de larva bien formada), Estadio 10 (Estadio de eclosión) (Según Jones, 1972).

En estudios realizados con el lenguado *Paralichthys microps* se observó que una proporción substancial de los huevos obtenidos (51% a 66%) fueron de pobre calidad, opacos, ovoidales, con diámetro irregular y distribución anormal del material vitelino especialmente a temperaturas por sobre 15°C (Silva, 1994).

El efecto de la temperatura del agua sobre el desarrollo y supervivencia de huevos y larvas de solea fue estudiado por Flutcher (1970 *fide* Liewes, 1984) y Fonds (1979 *fide* Liewes, 1984). Este último encontró que la temperatura óptima de incubación para huevos de solea es de 10°C a 16°C. A 19°C sólo el 10% de los huevos eclosionan y a 22°C no hay larvas viables.

Sin embargo en especies como el halibut del Pacífico (*Hippoglossus stenolepis*), el rango de temperatura adecuada para la eclosión fue de 6.5°C a 9°C mientras que con temperaturas de 3°C, 10°C y 11°C no ocurre eclosión alguna, lo cual nos indica que para ciertas especies, el límite máximo y mínimo de temperatura para la eclosión es mucho más restringido que para otras (Liu *et al.*, 1994).

En Australia, se han realizado estudios sobre efectos de la temperatura en huevos del "greenback flounder" (*Rhombosolea tapirina*) determinándose, que la tasa de desarrollo de los huevos se incrementa rápidamente con la temperatura en una tendencia no-lineal, a través del rango comprendido entre 9°C a 18°C. En cuanto a las tasas de eclosión, los huevos eclosionados a 15°C fueron significativamente inferiores ($p < 0.05$) a los que fueron incubados ya sea a 9°C ó 12°C siendo la tasa más alta de eclosión a 12°C y 35 ups de salinidad (Hart & Purser, 1995).

Cabe anotar además que el desarrollo larval de las especies del género *Paralichthys* presenta un patrón característico. Kuronuma & Fukusho (1984 *vide* Silva & Flores, 1989); reportaron la eclosión de huevos del lenguado *Paralichthys olivaceus* 49 h después de la fertilización, a temperaturas entre 16°C a 20°C. lo que coincide con Silva & Flores (1989) quienes obtuvieron eclosión de los embriones del lenguado *Paralichthys adspersus* a temperaturas de 16°C a 18°C entre las 54 h y 62 h. Sin embargo, el tamaño de la larva al nacer (2.4 a 2.6 mm) que obtuvieron Kuronuma & Fukusho (1984 *vide* Silva & Flores, 1989) fue superior al tamaño obtenido (1.9 mm) por Silva & Flores (1989).

Adicionalmente, efectos de choques térmicos de corta duración sobre 29 estadios de huevos de lenguado *Paralichthys olivaceus* fueron realizados, exponiéndolos a 9 diferentes temperaturas (24°C a 40°C) por 15 min, retornándolos inmediatamente a la temperatura de incubación (14°C \pm 0.3°C). De los resultados obtenidos se desprende que la tasa de eclosión es inferior en las primeras divisiones y estadios de cierre de blastoporo que en cualquier otro estadio, por lo tanto la tasa de eclosión depende del estadio de desarrollo al tiempo del choque térmico (Kashiwagi *et al.*, 1992).

En resumen, se ha demostrado que tanto en especies del género *Paralichthys* como en otras especies de peces planos, la temperatura de incubación va a determinar características morfológicas y fisiológicas de los huevos que posteriormente inciden en la



BIBLIOTECA
FACULTAD DE CIENCIAS
SANTIAGO, CHILE

supervivencia y crecimiento larval; y que según Blaxter (1969), la temperatura óptima de incubación puede ser determinada en base al éxito de la eclosión, variando además el rango de tolerancia de una especie de acuerdo con su estadio de desarrollo embrionario.

1.4. CRECIMIENTOLARVAL

1.4.1. Características de las larvas del género *Paralichthys*

En larvas del género *Paralichthys* tanto el desove, flexión del notocordio y metamorfosis ocurren a tamaños pequeños (Tabla 3). Las larvas de este género son moderadas en su profundidad corporal, con una cabeza profunda y mandíbulas de tamaño moderado. El cuerpo es lateralmente más comprimido que en otros géneros, la masa intestinal es larga, y se nota además claramente, una cresta dorsal que consiste de radios elongados formados tempranamente, comenzando con el segundo radio dorsal (Smith y Fahay, 1970 *vide* Ahlstrom, 1984).

Tabla 3. Características larvales principales de algunas especies del género *Paralichthys*

Especies	Radios dorsales elongados	Tamaño de eclosión (mm)	Flexión del notocordio (mm)	Tamaño de metamorfosis (mm)	Referencias
<i>Paralichthys californicus</i>	5	2.0	6.0-7.3	7.5-9.4	(Ahlstrom y Moser 1975 <i>vide</i> Ahlstrom <i>et al.</i> , 1984)
<i>Paralichthys dentatus</i>	4-8	2.4-2.8	7-9.5	9.5	(Smith y Fahay 1970 <i>vide</i> Ahlstrom <i>et al.</i> , 1984)
<i>Paralichthys olivaceus</i>	5-6	2.6-2.8	7.1-8.7	10.2-14.2	(Okiyama, 1967 <i>vide</i> Ahlstrom <i>et al.</i> , 1984)
<i>Paralichthys adspersus</i>	3	1.7	7.2	13.0	(Zúñiga y Acuña, 1992)
<i>Paralichthys microps</i>	6	1.5	8.6	11.0	(Zúñiga y Acuña, 1992)

1.4.2. Crecimiento larval del lenguado *Paralichthys adspersus*

A temperaturas entre 16°C a 18°C, la eclosión de los embriones del lenguado *Paralichthys adspersus* ocurre entre las 54 h y 62 h, con una longitud total promedio de 1.9 mm.

Los embriones al eclosionar rodean al saco vitelino formando una línea curva alrededor de éste. No poseen boca funcional y el aparato digestivo no está bien diferenciado; sin embargo, las cápsulas ópticas, corazón y cerebro son fácilmente identificables. En esta etapa las larvas poseen movimientos espasmódicos y permanecen flotando en la superficie del agua.

Al producirse la apertura de la boca, al cuarto día de cultivo, la larva que ha alcanzado 3.8 mm de longitud, presenta una alimentación activa en toda la columna de agua. Al día 18 (6.7 mm), se produce la elongación de tres de los radios dorsales. Posteriormente entre los 30 y 40 días (10.5 mm), se inicia la aparición de los primeros radios de la aleta caudal presentando un cuerpo más grueso y corto, así como la migración del ojo derecho en dirección anterodorsal.

Finalmente, a los 60 días (13.0 y 18.5 mm), ambos ojos se encuentran en el mismo lado y la larva se ubica en el fondo del tanque (etapa bentónica) reduciéndose su actividad natatoria y adquiriendo todas las características de un adulto (Silva & Flores, 1989).

1.4.3. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento larval del lenguado

Los peces, en general, son animales poiquilotermos o de sangre fría, su temperatura corporal varía pasivamente de acuerdo con la temperatura del agua circundante; pero generalmente, son tolerantes a amplios rangos de temperaturas (desde 0°C hasta 45°C). Sin embargo especies específicas, tienen un rango más restringido de temperatura y un cambio de estos rangos influyen significativamente las tasas de reacciones químicas y

procesos dentro del pez, mostrando un 50% de incremento con cada 5°C más de temperatura (Shepherd & Bromage, 1988).

En lo referente a larvas de peces, la temperatura del agua es uno de los parámetros más importantes que influyen su crecimiento y desarrollo tanto en laboratorios (Kramer & Zweifel, 1970 *vide* Seikai *et al.*, 1986) como en ambientes naturales (Methot & Kramer, 1979 *vide* Seikai *et al.*, 1986). A pesar de que numerosos trabajos han considerado efectos térmicos sobre el desarrollo embrionario, pocos estudios han sido enfocados hacia el crecimiento y desarrollo desde la eclosión hasta la metamorfosis del lenguado (*Paralichthys* sp.) (Seikai *et al.*, 1986).

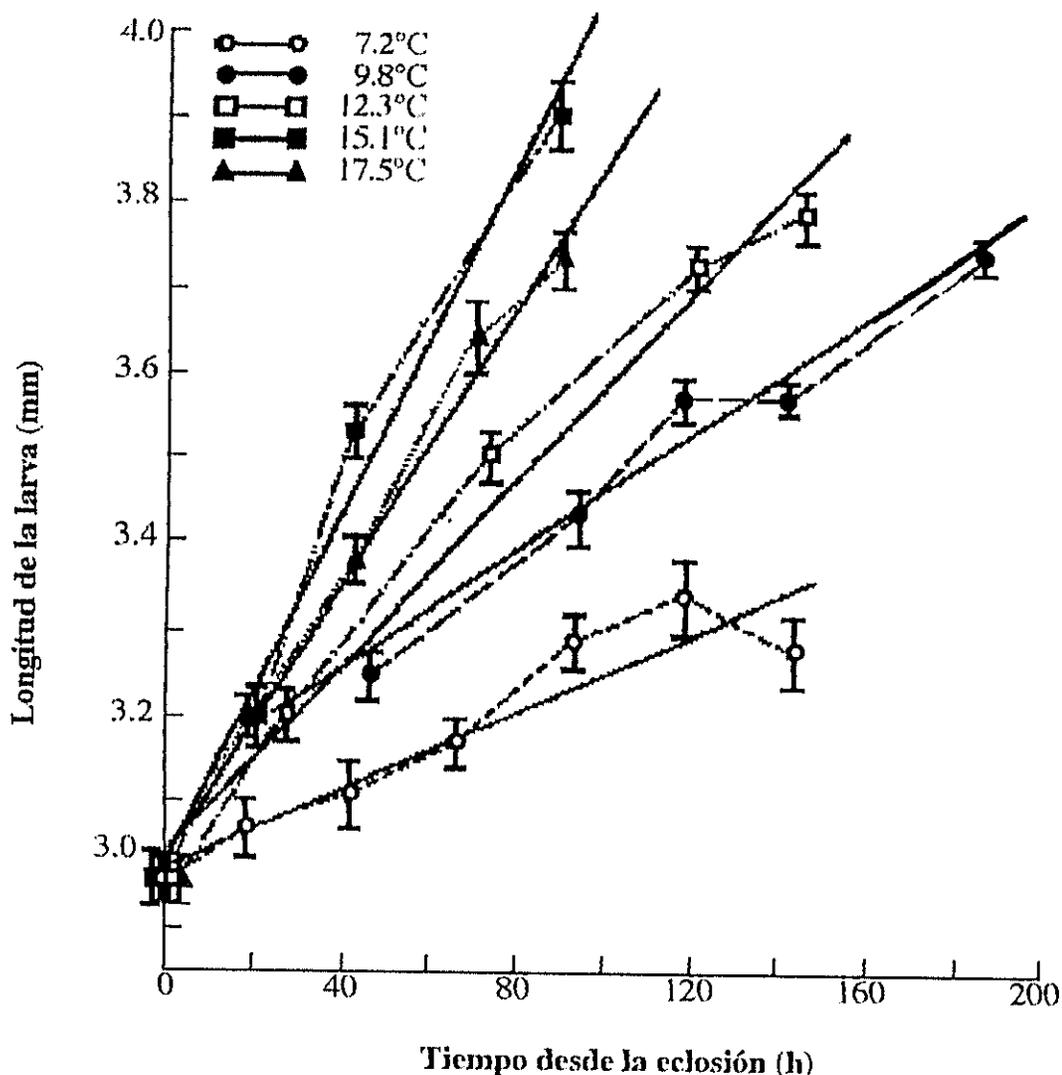
En cuanto al desarrollo y metamorfosis, las larvas de lenguado *Paralichthys olivaceus* eclosionan con la mayoría de sus órganos en estado altricial. Los mayores cambios morfológicos y ecológicos tales como apertura de la boca, pigmentación del ojo, primera alimentación y absorción del saco vitelino ocurren durante el período pre-larval y son enormemente afectados por la temperatura de incubación (Seikai *et al.*, 1986).

En el caso del "greenback flounder" (*Rhombosolea tapirina*), la absorción del saco vitelino parece ser más eficiente a 15°C dando como resultado, larvas más grandes y tasas de crecimiento más rápidas con respecto a otras temperaturas de prueba (Hart & Purser, 1995).

Kuronuma & Fukusho (1984 *vide* Silva & Flores, 1989) señalan que para el lenguado *Paralichthys olivaceus*, la tasa de crecimiento está relacionada tanto con el suplemento de *Artemia* como con la temperatura, de tal modo que el manejo de ambos factores pueden acelerar o retardar el crecimiento y la metamorfosis de la especie; mientras que bajo condiciones de suficiente alimentación y densidades razonables de stock, la temperatura ejerce una gran influencia sobre la eclosión, crecimiento larval, desarrollo y metamorfosis de esta misma especie (Seikai *et al.*, 1986). Así también en larvas de rodaballo (Fig. 2) las relaciones entre temperatura y longitud son similares.



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA



Tiempo desde la eclosión (h)

Fig. 2. Efecto de la temperatura sobre la tasa de incremento en longitud total larval del rodaballo (*Scophthalmus maximus*). Longitudes medias son graficadas \pm desviación estándar. Las líneas han sido llenadas por regresión (tomado de Jones, 1972).

Por otro lado se conoce que la supervivencia larval es uno de los mayores problemas que limita el cultivo de peces marinos por cuanto presentan una alta mortalidad durante los primeros 20 días de cría (Silva & Flores, 1989). Según Kuronuma & Fukusho (1984 *vide* Silva & Flores, 1989) existen dos o tres períodos críticos:

- 1.- Período de absorción del saco vitelino
- 2.- Inicio de la alimentación
- 3.- Período de cambio de alimentación natural a artificial (destete o "weaning")

Otros autores como Dabroski (1984 *fide* Silva & Flores, 1989) y Hartman (1983 *fide* Silva & Flores, 1989) señalan que las bajas supervivencias se deben a:

- 1.- Carencia nutricional de los reproductores que debilita la larva
- 2.- Tamaño de la boca
- 3.- Inadecuada e insuficiente alimentación
- 4.- Factores ambientales severos y enfermedades

En *Paralichthys adspersus*, Silva & Flores (1989) obtuvieron una supervivencia al término de la absorción del saco vitelino de 90,7% y 98,8%; lo cual demostró, que éste no es un período crítico. Sin embargo, obtuvieron entre 14 y 20 días, una brusca mortalidad relacionada con una posible deficiencia nutricional. Yasunaga (1971 *fide* Silva & Flores, 1989) obtuvo los mismos resultados para *Paralichthys olivaceus* con un 75% de mortalidad entre los 8 y 16 días de cultivo, terminando al día 60 con una supervivencia del 3,7%.

Por otro lado Kuronuma & Fukusho (1984 *fide* Silva & Flores, 1989) registran para la misma especie, *Paralichthys olivaceus*, supervivencias entre 24,3% y 50% durante los primeros días de cultivo larval, período durante el cual podría alcanzarse la metamorfosis. Sin embargo, en *Paralichthys adspersus*, se obtuvo resultados con rangos menos amplios (11.2% y 13.1%); pudiéndose evidenciar que, en todo caso, el crecimiento larval del *Paralichthys adspersus* es mayor a temperaturas de 16,7°C y 18,9°C que a 15,1°C y 6,2°C (Silva & Flores, 1989).

Tandler *et al.* (1989) concluyeron además que en larvas de "gilthead seabream" (*Sparus aurata*), hay una relación inversa entre grados-días y supervivencia, y una relación directa entre grados-días con tasa de crecimiento, tasa de alimentación y abundancia de larvas más grandes y agresivas a los 32 días de cultivo.

En *Paralichthys olivaceus* el crecimiento larval fue suprimido a 13°C, evidenciado por el extenso valor de la temperatura integrada relativa (suma de las temperaturas medidas diariamente a las 09h:00) (Seikai *et al.*, 1986). Aunque no se confirmó la temperatura mínima a la cual la larva puede crecer, se consideró que 13°C podría ser tomado como el cero biológico para las larvas de lenguado, especulando además que a temperaturas superiores a 19°C, el desarrollo y metamorfosis de las larvas de lenguado sería estimulado en vez del crecimiento. Por otra parte, los rangos obtenidos en este experimento fueron altos comparados con los llevados a cabo en condiciones termales equivalentes (Hiramoto *et al.*, 1980 *fide* Seikai *et al.*, 1986) pudiendo ser considerado 19°C, como la temperatura o valor máximo en condiciones de laboratorio para *Paralichthys olivaceus*.

A pesar de que las fluctuaciones de temperaturas son más moderadas en el mar y pueden ser insignificantes en aguas profundas, en los trópicos las fluctuaciones estacionales son muy ligeras; pudiendo esto provocar un rango de tolerancia más restringido (Blaxter, 1969). Por ejemplo en estudios realizados en 10 especies de larvas de peces, Kuthalningam (1959 *fide* Blaxter, 1969) encontró que la diferencia entre temperatura letal superior e inferior es de tan sólo 3 a 4°C.

En el caso de las larvas de solea (*Solea solea*) el crecimiento varía también con la temperatura. A 22°C, el desarrollo larval hasta metamorfosis es completado en aproximadamente un tercio del tiempo necesario para este proceso, en larvas mantenidas a 10°C. Adicionalmente, la metamorfosis se completa luego de aproximadamente 2 semanas después de la primera alimentación a 22°C, con tamaño larval de 9 mm. En contraste, a 13°C la metamorfosis en esta misma especie se completó luego de 4 semanas con tamaño larval de 10 mm (Fonds, 1979a *fide* Liewes, 1984).

La alimentación exógena de la larva comienza al final de la absorción del saco vitelino. Durante la metamorfosis de la platija (*Pleuronectes platessa*), la cual comienza alrededor



BIBLIOTECA
IAC. ING.
MANTILLA

de los 40 a 60 días después del desove, dependiendo de la temperatura del agua, la larva reduce su ingestión de alimento. Lo mismo es observado en las larvas de solea (*Solea solea*) la cual alcanza mucho antes la metamorfosis, mientras que las larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) lo hace dentro de un mes a temperaturas de 12°C a 22°C (Fonds, 1979a *vide* Liewes, 1984).

En resumen, podemos decir que la mayoría de eventos, crecimiento larval y supervivencia son ampliamente dependientes de la temperatura de cultivo tanto en las especies del género *Paralichthys* como en otras especies de peces planos.

1.5. ALIMENTACION

1.5.1. Microalgas

Las microalgas forman el primer eslabón en la cadena alimenticia y son utilizadas ya sea directamente como alimento para animales de cultivo (moluscos, primeros estadios larvales de crustáceos) o para alimentar animales que son presas de peces de cultivo y crustáceos (Barnabé, 1990).

Al hablar de microalgas en larvicultura de peces marinos, se manifiesta el enorme beneficio que éstas producen en el tanque de cultivo durante el período de alimentación con rotíferos (técnica del agua verde o "greenwater technique"), debido a que mantienen la fase reproductora y por ende el valor nutricional de los mismos (Howell, 1979); además, el crecimiento de las larvas que reciben algas durante su alimentación con rotíferos crecen mejor que las cultivadas sin la presencia de algas para el caso de larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus*).

Lavens *et al.*, (1995) señala que la técnica del agua verde es muy usada en Europa en laboratorios de cultivo de perca de mar y besugo así como en la mayoría de laboratorios de producción de larvas de rodaballo, señalando que se ha observado un efecto sinérgico

entre iluminación y algas ("light shading effect") sobre la supervivencia de las larvas al comprobar que, con el uso de lámparas de halógeno (450 a 750 nm) en lugar de tubos fluorescentes (450 a 630 nm), se obtienen porcentajes de supervivencias más bajos ($28\% \pm 5\%$ contra $41\% \pm 8\%$ al día 22). El estrés excesivo de las luces fluorescentes notado en larvas de rodaballo (larvas negruzcas con sensibilidad más alta para estrés de salinidad) puede ser correlacionado con regímenes de alimentación no óptimos.

Por otro lado, desde hace muchas décadas se ha venido demostrando las propiedades antibacteriales de las microalgas (Pratt, 1942 *fide* Stottrup *et al.*, 1993), encontrándose en estos estudios, sustancias antibacteriales extraídas a partir de *Chlorella* que mostraron inhibir el crecimiento de bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas.

Sin embargo, no todas las algas son adecuadas para un cultivo larval. Según experiencias en laboratorios, las microalgas de los géneros *Nannochloropsis* e *Isochrysis* son las más usadas por sus altos contenidos de ácidos grasos esenciales tales como el ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5 n-3) y el ácido docosahexanoico (DHA, 20:6 n-3) (Quantz, 1989).

En estudios realizados entre cepas de *Chlorella* y *Nannochloropsis* sometidas a regímenes de temperaturas de 15°C a 35°C, se determinó que la cepa de *Nannochloropsis* tiene como uno de sus mayores constituyentes, a lo largo de las temperaturas de prueba, al 20:5 n-3 mientras que en la cepa de *Chlorella*, este mismo ácido fue detectado en cantidades muy escasas a 25°C (James, 1989).

Diferentes tipos de algas mostraron gran variabilidad con respecto al crecimiento y supervivencia en larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus*); sin embargo, Stottrup *et al.* (1993) enfatizaron que el efecto antibacterial producido por las microalgas es mucho más importante que el efecto nutricional de las mismas.

1.5.2. Rotíferos

Los rotíferos (*Brachionus plicatilis*) son por su tamaño (150 a 200 μm de longitud) presas deseables para larvas de peces que recién han reabsorbido su saco vitelino pero que aún no pueden ingerir *Artemia*. También pueden ser utilizados para transportar sustancias, tales como: vitaminas, antibióticos o ácidos grasos hacia las larvas de peces. (Sorgeloos, 1995).



BIBLIOTECA
INIMAR
MARITIMA

Además, los rotíferos ofrecen la ventaja de ser fáciles de cultivar y de estar disponibles en grandes cantidades (Jones, 1972). En estudios realizados por este mismo autor se estableció exitosamente la primera alimentación a base de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) a una longitud de 3.6 a 3.8 mm en larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus*), puntualizando además que el tiempo al cual la primera alimentación es ofrecida influye en las tasas subsecuentes de supervivencia.

Por otro lado Howell (1979) señala que la tasa de crecimiento de los últimos estadios larvales del rodaballo parecen ser influenciados por la calidad del alimento ofrecido en los primeros estadios.

Así también los rotíferos han sido utilizados con éxito en reemplazo de ciliados, dinoflagelados y otros organismos zooplanctónicos naturales en el cultivo masivo del pargo (*Pagrus major*) en Japón (Fujita 1973, 1979 *vide* Sorgeloos, 1995).

A pesar del inmenso progreso en la selección y producción de cepas de rotíferos pequeños, algunos peces con tamaños de boca muy pequeños (ej.: especies de cabrillas) no pueden ser cultivados exitosamente con dietas a base de rotíferos. El tamaño del rotífero no solamente debe ser el problema, quizás las tasas de conversión, ingestión y digestión de rotíferos no son las óptimas y podrían ser mejoradas por simples operaciones zootécnicas (Sorgeloos, 1995).

El comportamiento de las larvas de peces planos ("flatfish") al momento de la primera alimentación es característico, ya que flexiona su cuerpo en forma de S, encogiéndose e impulsándose vigorosa y rápidamente en el tanque de cultivo (Jones, 1972).

1.5.3. *Artemia*

A lo largo de todas las dietas vivas usadas en larvicultura de peces, el nauplio de "brine shrimp" o *Artemia* constituye el más ampliamente utilizado. Por esta razón, se han realizado considerables progresos en caracterizar y mejorar su valor nutricional; los más recientes envuelven el enriquecimiento con componentes esenciales (DHA, fosfolípidos y vitamina C) a fin de satisfacer los requerimientos nutricionales del predador (Lavens *et al.*, 1995).

Para larvas de peces, la habilidad para ingerir presas de un sólo mordisco es crítica. Las larvas de peces alimentadas con *Artemia* sobredimensionada no comerán ante la imposibilidad de ingerir la presa. Por lo menos para algunas especies, una correlación bastante alta existe entre la longitud naupliar de la *Artemia* y la mortalidad de las larvas de peces durante los cinco primeros días luego del desove. Sin embargo, si el tamaño de la presa no interfiere con el mecanismo de ingestión del predador, el uso de nauplios más grandes (con contenidos energéticos más altos) será beneficioso ya que el predador gastará menos energía en tomar un menor número de nauplios más grandes para llenar sus requerimientos nutricionales (Sorgeloos, 1995).

Las larvas de algunas especies de peces marinos, ej.: pargo, robalo y peces planos, solo pueden ser alimentadas con *Artemia* luego de una semana con una presa más pequeña de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) (Sorgeloos, 1995).

En contraste con las larvas de crustáceos, las larvas de peces marinos son cultivadas con *Artemia* por un período más largo, ej.: 20 a 40 días. El consumo de cistos de *Artemia* es además el más alto en larvicultura de peces marinos y va desde 200 a 500 g por cada

1000 larvas producidas. Biomásas de *Artemia* vivas o congeladas son a menudo aplicadas como dieta transicional para larvas cuando se cambia de dieta viva a dieta inerte (destete o "weaning") (Sorgeloos, 1995).

En bioensayos realizados con larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*), se determinó el efecto de dietas de *Artemia* con diferentes contenidos de ácidos grasos, sobre larvas provenientes de reproductores en cautiverio y salvajes, obteniéndose como resultado, una variación substancial en tamaño y peso, con crecimientos y supervivencias correlacionados negativamente entre ambos grupos de larvas. Las supervivencias fueron iguales pero con un mejor resultado por parte de las larvas provenientes de los reproductores salvajes (Navarro, 1992). Por lo tanto, el origen larval es un factor muy importante dentro de experimentos nutricionales con dietas vivas.

1.5.4. Bioenriquecimiento

Los estudios sobre requerimientos de ácidos grasos han demostrado que el factor crítico que determina el valor nutricional de las dietas vivas, rotíferos y/o *Artemia*, es la concentración de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA's) tales como el EPA (20:5 n-3) y el DHA (22:6 n-3), los así llamados ácidos grasos esenciales para los peces marinos (Gajardo *et al.*, 1994).

Según las últimas observaciones se sugiere que la relación DHA/EPA es importante para promover el crecimiento, resistencia al estrés y pigmentación de las larvas (Watanabe, 1993 *vide* Gajardo *et al.*, 1994).

Como resultado de lo anteriormente expresado, se han hecho considerables esfuerzos para incorporar altos niveles de DHA así como altos ratios de DHA/EPA en alimentos vivos, obteniéndose un incremento del 45% de DHA y un ratio de 1.60, en lugar de 0.75, de DHA/EPA con el autoemulsificante alto en DHA Super Seleo[®] (INVE

Aquaculture N.V., Belgium) al compararlo con otros productos tales como Super Selco y Selco (Lavens *et al.*, 1995).

En especies como el rodaballo (*Scophthalmus maximus*), la deficiencia de DHA en la dieta viva produce una condición pobre de la larva en lo que respecta a la percepción visual y otros aspectos de su comportamiento (Sorgeloos *et al.*, 1994). Estos resultados coinciden con los observados por Sargent *et al.* (1993) en la misma especie.

La relevancia biológica de la vitamina C en peces y camarones está bien documentada. Este nutriente es esencial para la formación de cartílagos y huesos, probablemente juega un rol importante en la reproducción y se han reportado mejoras en la resistencia de peces contra enfermedades infecciosas y estrés (Sandnes, 1991 *fide* Nelis *et al.*, 1995).

Como consecuencia de lo anterior, se han probado diferentes derivados estables de la vitamina C tales como ácido ascórbico-2-sulfato o ácido ascórbico-2-mono o polifosfato, como alternativas para enriquecer el alimento vivo, otro producto utilizado vía bio-encapsulación es el ácido ascórbico-6-Palmitato (Nelis *et al.*, 1995).

1.5.4.1. Enriquecimiento de rotíferos con HUFA's (n-3)

Las microalgas marinas son probablemente la fuente de alimentación más recomendable para rotíferos. Tienen un alto valor nutricional, una excelente flotabilidad y no contaminan el agua. Además, como ya lo habíamos expresamos, actúan como condicionadores del medio, controlando la calidad del agua y algunas poseen propiedades bacteriostáticas. Sin embargo el cultivo de microalga es bastante costoso.

Por otro lado la levadura, un producto económico, fácilmente disponible y con alto contenido proteico, es a menudo usada como un sustituto parcial de microalgas. Lamentablemente por su bajo contenido de ácidos grasos esenciales no podría constituirse en un sustituto total de dichas microalgas (Sorgeloos, 1995).

Sin embargo, dentro de larvicultura de peces marinos, siempre se desea obtener los mejores resultados en cuanto a supervivencia y crecimiento; por lo tanto, se debe asegurar al cultivo, un rotífero que contenga altos niveles de enriquecimiento. Se puede usar como alternativa para este propósito, el autoemulsificante Super Selco cuya composición en cuanto a ácidos grasos es de 450 mg HUFA's (n-3)/g de peso seco (Sorgeloos, 1995) y cuya eficiencia ha sido comprobada en muchos estudios sobre bioenriquecimiento de rotíferos y *Artemia*.

1.5.4.2. Enriquecimiento de *Artemias* con HUFA's (n-3)

La aplicación de HUFA's (n-3) en la dieta de *Artemia* ha tenido un efecto muy importante en larvicultura de peces marinos, sobretodo en incrementos en la supervivencia y en una menor variabilidad en la producción de semillas. Lo último es muy importante desde que fue el eslabón perdido en el desarrollo comercial de este alimento vivo. Además, la calidad de la larva en términos de: resistencia al estrés, mejor pigmentación, reducción de enfermedades, mejor formación de vejiga natatoria y mayor energía, es relacionada con el enriquecimiento con HUFA's (n-3) de su dieta larval (Sorgeloos, 1995).

En estudios realizados por Izquierdo *et al.* (1990) se determinó que si bien las larvas de lenguado *Paralichthys olivaceus* sobrevivían por un largo período con *Artemia* pobremente enriquecida con HUFA's (n-3) (1.8% en base seca); la longitud total y el peso corporal de las larvas se incrementa significativamente con el incremento de niveles de HUFA's (n-3) en *Artemia* enriquecida (por sobre 3.5%), encontrándose un monto considerable de DHA 22:6 (n-3) en las fracciones lipídicas tanto polares como neutrales del pez, sugiriéndose que éste ácido graso juega un rol muy importante en el metabolismo lipídico de las larvas de lenguado.



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

1.6. PARAMETROS FISICO-QUIMICOS

1.6.1. Oxígeno disuelto

El oxígeno es aparentemente un limitante sólo a bajos niveles. Sin embargo, soluciones supersaturadas pueden ser peligrosas si las burbujas de aire son tragadas por la larva (Blaxter, 1969). Esta enfermedad gaseosa es fatal si la larva no puede eliminar las burbujas del intestino con las consecuentes fallas en su flotabilidad (Bishai, 1960 *fide* Blaxter, 1969). Los huevos de varios salmónidos fueron sometidos a bajas tensiones de oxígeno, y según Hayes *et al.* (1951 *fide* Blaxter, 1969) resistieron niveles de hasta 2.5 ppm; sin embargo, el desarrollo fue retardado y la larva fue más pequeña al eclosionar. Alberdice *et al.* (1958 *fide* Blaxter, 1969) midió el retardo en la eclosión con bajos niveles de oxígeno a diferentes estadios de desarrollo en huevos de salmón, concluyendo que los estadios intermedios fueron los más susceptibles a bajos niveles de oxígeno. Hayes *et al.* (1951 *fide* Blaxter, 1969) definió la tensión límite como la tensión a la cual el consumo normal de oxígeno comienza a descender. En huevos de *Salmo salar* fue de 3.0 ppm a 20 días, 7.5 ppm a 45 días, y 4.7 ppm al momento de la eclosión.

En larvas marinas como las del arenque, la eclosión fue restringida a 2.7 y 3.2 ppm. En larvas de "lumpsucker" (*Cyclopterus lumpus*), solo toleraron hasta 4.3 ppm, 3 semanas después de la eclosión y platijas jóvenes (4 a 5 cm de longitud) solo toleraron hasta 1.4 ppm. En lo que respecta a las larvas de salmónidos, tanto el *Salmo salar* como el *Salmo trutta* pueden sobrevivir a muy bajos niveles de saturación (0.3 a 1.0 ppm luego de la eclosión) pero esta habilidad decrece con la edad siendo el mínimo nivel tolerable de 1.6 a 2.8 ppm (Bishai *et al.* 1960 *fide* Blaxter, 1969).

1.6.2. pH

Bishai *et al.* (1960 *fide* Blaxter, 1969) sumariizó varios datos del efecto del pH sobre larvas de peces y encontró que la larvas de arenque pueden sobrevivir con valores entre 6.5 y 8.5, en la platija (4 a 5 cm), 6.2 y 6.5, mientras que las larvas de salmónidos tienen un amplio rango de tolerancia que va desde 5.8 hasta 9.0.

El crecimiento larval cesó a pH de 6.9 a 0.38 mg N/L para solea y 0.3 mg N/L para rodaballo. A pH 7.0, el crecimiento cesó a 0.77 mg N/L para solea y 0.9 mg N/L para rodaballo. Daños histológicos mínimos en las branquias fueron observados en peces expuestos a niveles altos de amoníaco (Tucker y Boyd, 1985 *fide* Boyd, 1990).

1.6.3. Amoníaco

La mayor fuente de amoníaco en agua de cultivo es la excreción directa del amoníaco por peces (Tucker y Boyd, 1985 *fide* Boyd, 1990). El efecto del amoníaco sobre especies como el solea y rodaballo fue investigado por Alderson (1979 *fide* Liewes, 1984), quien notó que el nivel límite de amoníaco, debajo del cual no hubo efecto sobre el crecimiento, fue de 0.066 mg N/L para solea y 0.11 mg N/L para rodaballo (a 16°C y 34 ups de salinidad). La mortalidad de animales acuáticos en sistemas semi-intensivos e intensivos es causada a menudo por amoníaco, denotando que este parámetro es un importante regulador de la salud y crecimiento del animal (Boyd, 1990).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. OBTENCION DE HUEVOS

Desde hace aproximadamente 2 años, el Departamento de Piscicultura del CENAIM, ha venido manteniendo en cautiverio un grupo de lenguados reproductores (*Paralichthys woolmani*) alimentados a base de pescado fresco congelado junto con pre-mezclas vitamínicas enriquecidas con Super Selco como fuente de ácidos grasos esenciales en un tanque negro ovalado de 17.5 Ton de capacidad con temperaturas de 19°C a 23°C y fotoperíodo de 12 horas luz (06h:00 a 18h:00).

Para la realización del siguiente proyecto los huevos fertilizados fueron obtenidos por desoves naturales durante los meses de Julio y Agosto de 1996.

2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para ambas fases experimentales se utilizaron 9 unidades experimentales, las cuales fueron divididas en 3 tratamientos: T20 (tratamiento a temperaturas de 20°C), T24 (tratamiento a temperaturas de 24°C) y, T28 (tratamiento a temperaturas de 28°C). Cada tratamiento se corrió por triplicado.

El experimento consistió en evaluar el efecto de 3 diferentes temperaturas, estableciéndose mediante análisis estadístico diferencias significativas entre tratamientos.

2.3. SISTEMA DE CULTIVO

Dentro del presente trabajo, se realizaron dos fases experimentales con 3 temperaturas de prueba: 20°C, 24°C y 28°C, mismas que fueron seleccionadas según los rangos de

fluctuación anuales que se dan en las costas de San Pedro de Manglaralto (frente al CENAIM).

Se trató de determinar si las temperaturas seleccionadas podrían causar algún efecto tanto en el desarrollo embrionario como en el crecimiento larval del lenguado (*Paralichthys woolmani*) basado en índices de crecimiento, supervivencia y tiempos de desarrollo.

Para ambas fases experimentales se utilizó el mismo sistema de cultivo (Fig. 3) con tanques planos blancos de policarbonato de 30 L de capacidad, equipados con piedras de aeración y suplementados con agua temperada mantenida en reservorios (Fig. 4).

2.3.1. Unidades de enfriamiento y calentamiento

Es importante señalar además, que para mantener las temperaturas de experimentación en los diferentes tratamientos, se utilizó el sistema de Baño María, mediante el cual los tanques de cultivo se mantuvieron a las temperaturas establecidas por medio de agua mantenida en tanques rectangulares de 0.5 Ton y temperada a través de termostatos o enfriadores MITSUBISHI modelo: NV30-CA; REI-SEA modelo: HCR-1D y calentadores de plancha EARTH CORPORATION.

2.3.2. Suplemento del agua

Para realizar los recambios en los tanques de cultivo, durante la segunda fase experimental, se utilizó un sistema de flujo continuo con agua filtrada y pasada por U.V. proveniente de reservorios mantenidos a las diferentes temperaturas de experimentación.



BIBLIOTECA
IAC. ING.
MARÍTIMA

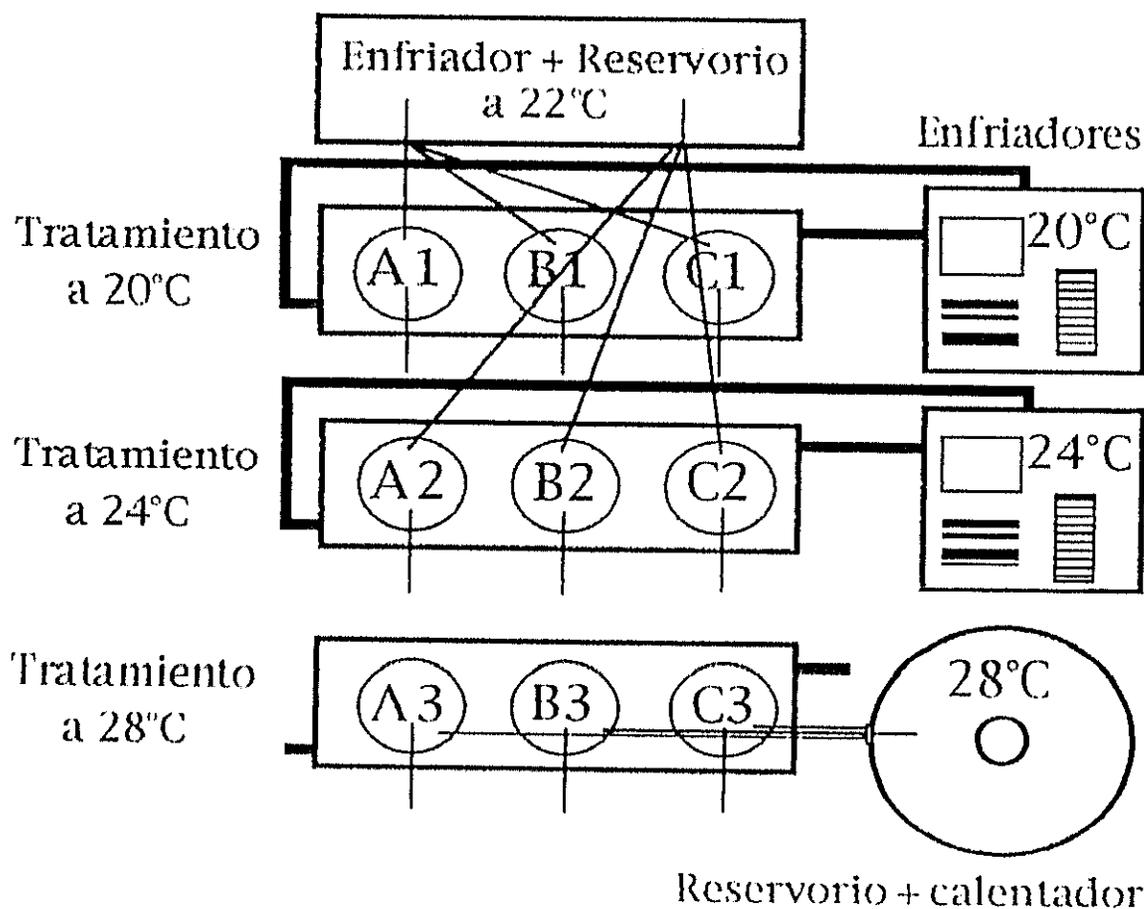


Fig. 3. Disposición del sistema de cultivo. Las líneas finas y gruesas indican el flujo de agua en los respectivos tanques

2.3.3. Tanques de cultivo

Para la segunda fase, se incorporaron en medio de los tanques, tubos centrales de recambio perforados y forrados con mallas de $400\ \mu\text{m}$. Una vez que las larvas aceptaron *Artemia*, se cambiaron estas mallas por unas más grandes ($600\ \mu\text{m}$) a fin de permitir el paso del alimento acumulado no consumido y heces, los cuales podrían contaminar el agua y limitar el crecimiento larval.

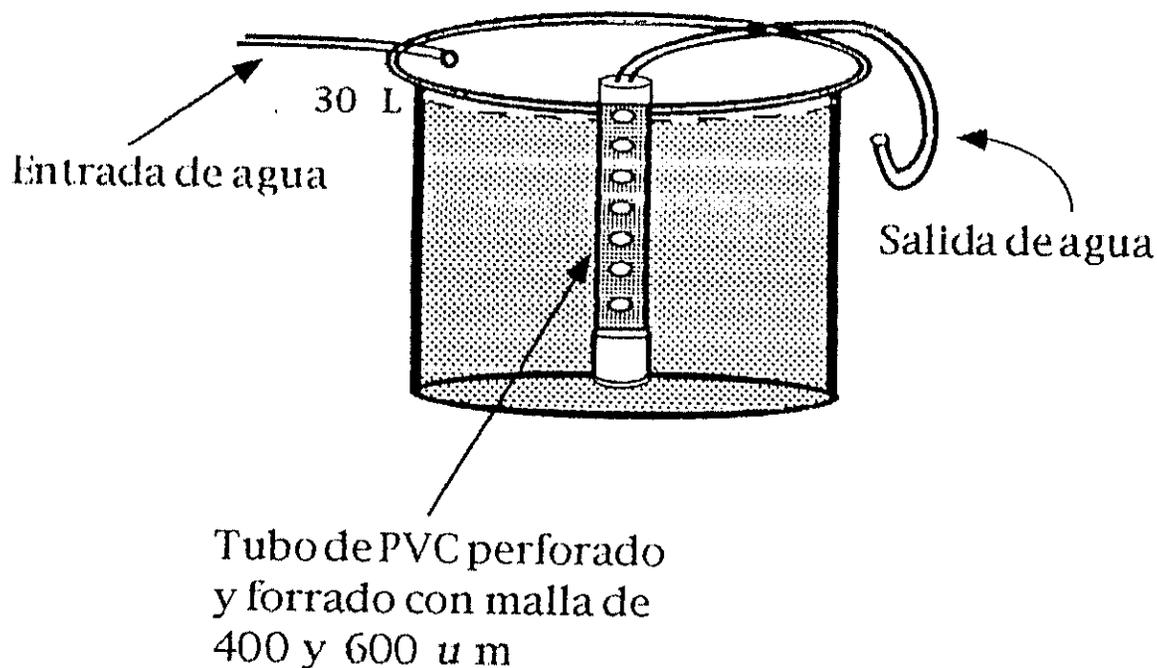


Fig. 4. Tanque de cultivo utilizado durante ambas fases experimentales. El tubo de recambio se lo incorporó en la segunda fase experimental

2.4. CONDICIONES EXPERIMENTALES

Para la realización de la primera fase experimental los huevos viables (flotantes) obtenidos por desoves naturales de reproductores maduros, fueron separados de los no viables (no flotantes) en un tanque cónico transparente de 50 L de policarbonato, procediéndose posteriormente a establecer el volumen de siembra en los tanques de cultivo.

Para la realización de la segunda fase experimental se efectuó el mismo procedimiento que en la primera fase, incubándolos posteriormente en un tanque cónico transparente de 200 L de policarbonato con aeración suave y flujo continuo de agua. Una vez eclosionados se procedió a establecer el volumen de siembra en los tanques de cultivo.

2.4.1 Fase I: Efecto de la temperatura sobre el desarrollo embrionario

Durante los 3 días que duró esta fase, se probó el efecto de tres diferentes temperaturas sobre tiempos de desarrollo embrionario, medidas biométricas (tallas de eclosión) y supervivencias pre-larvales del lenguado *Paralichthys woolmani*.



2.4.1.1. Siembra

Los huevos fueron contados por volumetría y posteriormente sembrados a razón de 15,000 huevos por tanque. Debido al tiempo empleado en la colecta y separación de los huevos viables de los no viables, éstos se sembraron en estadio de 16 células (2 h después de la fertilización con temperaturas de 22 a 23°C).

BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMO

2.4.1.2. Muestras

El muestreo de los huevos fue al azar y con una frecuencia de 30 min durante los primeros estadios de desarrollo embrionario (mórula), ampliándose luego a 1 h, hasta cubrir por completo todas las etapas hasta la eclosión. Para observaciones de los estadios de desarrollo embrionario, se utilizó un microscopio OLYMPUS BO71 provisto de una cámara fotográfica OLYMPUS C-35AD-4. Los tiempos de desarrollo embrionario se determinaron en base a un 70% de eclosión.

La clasificación de los estadios embrionarios fue la siguiente: 4 (16 células), 5 (32 células), 6 (Mórula), 7 (Blástula), 8 (Gástrula), 9 (desarrollo del embrión), 10 (desarrollo de vesícula óptica), 11 (desarrollo de vesícula de cobre), 12 (desarrollo de vesícula auditiva), 13 (cromatóforos en el saco y formación del corazón), 14 (latidos del corazón), 15 (formación de pliegues de las aletas), 16 (listo para eclosionar), 17 (eclosión) (Según Tomiyama, 1984).

En cuanto a las mediciones biométricas, se muestrearon aleatoriamente 10 pre-larvas por tanque en los que se midió: longitud total y ancho total. Se utilizó un Perfilador MITUTOYO PJ-300 con pantalla.

Los porcentajes de supervivencia de cada tanque fueron obtenidos por volumetría, al final de esta primera fase experimental.

2.4.2. Fase II: Efecto de la temperatura sobre el crecimiento larval

Se trató de probar, a través de los 35 días de cultivo larval, el efecto de la temperatura sobre: tiempos de residencia en cada estadio, medidas biométricas (tallas de cultivo), y supervivencias larvales a lo largo del cultivo.

2.4.2.1. Siembra

Las pre-larvas fueron sembradas por volumetría a razón de 1,500 larvas por tanque, hasta volúmenes de 25 L, tratando de no maltratarlas en exceso debido a su gran sensibilidad en este estadio. Posteriormente, el volumen de agua se incrementó hasta 30 L, manteniéndose en este nivel hasta el final de la segunda fase experimental.

2.4.2.2. Muestreos

Para realizar el seguimiento del crecimiento larval el muestreo fue al azar, con una frecuencia diaria hasta cubrir eventos importantes tales como: consumo de saco vitelino, apertura de la boca, pigmentación del ojo y primera alimentación; posteriormente se lo hizo con una frecuencia de 3 a 5 días. Las observaciones del crecimiento larval se las realizó con ayuda de un Estereomicroscopio OLYMPUS SZ-PT provisto de una cámara fotográfica OLYMPUS C-35AD-4.

La clasificación de los estadios larvales según Minami (1982 *vide* Seikai *et al.*, 1986) y ligeramente modificado para este trabajo, fue la siguiente: P1 (pre-larva con saco vitelino), A (Apertura de la boca, pigmentación del ojo, intestino con curvatura simple), B (Base de los radios elongados anteriores de la aleta dorsal ó r.e.a.a.d.), C (3-4 r.e.a.a.d., base de radios de la aleta caudal), D (comienzo de la compresión del cuerpo, 5-6 r.e.a.a.d., radios de aletas caudales), E (notocordio flexionado hacia arriba en 45°, base de radios de aletas dorsal y anal), F (7-9 r.e.a.a.d., proliferación de radios de las aletas dorsal y anal, ojo derecho no observable desde el lado izquierdo), G (ojo derecho observable desde el lado izquierdo), H (migración del ojo derecho sobre el borde dorsal o la cabeza), I (metamorfosis).

En cuanto a las mediciones biométricas, se muestrearon cada 5 días, 10 animales por tanque para medir: longitud total, longitud estándar, ancho total y ancho del saco vitelino (consumo a las 40 h de siembra). Las mediciones se las realizó con ayuda de un Perfilador MITUTOYO PJ-300 con pantalla. Los animales fueron previamente anestesiados con MS-222.

Además se realizaron muestreos semanales de supervivencia por volumetría, tomando como mínimo dos muestras por tanque en cada conteo con un beaker de 1000 ml.

2.4.3. Alimentación

2.4.3.1. Calidad del alimento (Enriquecimiento)

Tanto rotíferos (*Brachionus plicatilis* Tipo S) (Stock natural, Dpto. Fitoplancton y Zooplancton, CENAIM) como *Artemia* (Great Salt Lake, INVE Aquaculture N.V., Bélgica) fueron previamente enriquecidos con Super Selco[®] (INVE Aquaculture N.V., Bélgica), siendo los rotíferos enriquecidos además con vitamina C vía bio-encapsulación de ácido ascórbico-6-palmitato. Las microalgas (*Nannochloropsis oculata* + *Tetraselmis*

maculata) se agregaron al tanque de cultivo (técnica del agua verde) durante los primeros días de cultivo larval a fin de mantener la calidad de los rotíferos así como por sus propiedades antibacteriales.

En lo que respecta al alimento artificial utilizado para el destete (OTOHIME de 250 a 400 μm) posee una coloración similar a la *Artemia*, y un alto porcentaje de proteína (48%); todo lo cual, lo convierte en una dieta muy adecuada para estadios pre y post-metamorfosis (9.7 a 17 mm de longitud total del pez).

2.4.3.2. Régimen alimenticio

El régimen de alimentación a seguirse (Fig. 5) estuvo sujeto a variaciones debido al grado del consumo de saco vitelino, grado de desarrollo larval, supervivencia, cantidad de alimento vivo, y concentración de éste en el tanque de cultivo (remanente).

Edad (días) Dieta	D1	D5	D10	D15	D20	D25	D30	D35
Rotíferos		5-15 rot/ml						
<i>Artemia</i> spp.					1 - 6 ml/ml			
Alimento Art.							ad libitum	

Fig. 5. Régimen alimenticio aplicado durante la segunda fase experimental



2.4.3.3. Método de alimentación

Durante los 5 primeros días de cultivo se administró concentraciones de 200,000 cel/ml de algas suspendiéndose una vez que comenzó el recambio de agua. Se suministró, tanto alimento vivo como artificial, 2 veces al día (09h:00 y 15h:00). En cuanto al alimento vivo, antes de cada ración se observó, por volumetría, la cantidad de alimento sobrante (remanente) en cada uno de los tanques de cultivo para establecer la cantidad de alimento que se necesitaba adicionar para alcanzar la concentración deseada. En los últimos cinco

días de cultivo se utilizó tanto *Artemia* como OTOHIME (alimento artificial) disolviendo éste último en agua para un mejor consumo por parte de las larvas.

2.4.4. Condicionantes Físico-Químicas Del Medio

En la primera fase experimental, se controlaron las temperaturas de los diferentes tratamientos con una frecuencia de 3 a 4 h por día.

En la segunda fase experimental, se controlaron temperaturas (2 veces al día); oxígeno y pH (1 vez al día). El control tanto de temperatura como de oxígeno se lo realizó con un Oxigenómetro SIBATA UC-12; mientras que para controlar el pH se utilizó un pHmetro SIBATA UC-23.

Además los niveles de amoníaco fueron medidos mediante el método del Salicilato por test de fotometría con el espectrofotómetro DR-2000 (HACH), para ello se utilizaron dos clases de reactivos: Cianurato de amoníaco y Salicilato de amoníaco[®](HACH).

Un nivel constante de iluminación obtenido a través de luces fluorescentes dieron un valor de 1,000 a 1,500 lux; manteniéndose de esta manera, un fotoperíodo de 12 horas luz (08h:00 a 20h:00).

Los tanques de cultivo fueron sifoneados 2 veces a la semana durante los primeros 20 días de cultivo, para evitar un incremento de mortalidad por sifoneo debido a la gran debilidad de la larva en los primeros días de cultivo. Posteriormente, una vez que las larvas fueron alimentadas con *Artemia*, los tanques fueron sifoneados 2 veces al día hasta la finalización de la segunda fase experimental.

Las altas tasas de recambio consideradas (Tabla 4), se debieron a las altas densidades de cultivo.

Tabla 4. Recambio de agua en los tanques de cultivo durante la segunda fase experimental

Días de cultivo	Porcentajes de recambio
1-6	0-60
6-10	60-150
10-15	150-300
15-35	300-500

Los niveles de aeración fueron de 100 a 150 ml/min durante ambas fases experimentales.

2.5. METODOLOGIA ESTADISTICA

Los tiempos de desarrollo, datos biométricos y supervivencias obtenidos durante ambas fases experimentales fueron analizados mediante un Análisis de varianza (ANOVA). Si entre los tratamientos se presentaban diferencias significativas ($p < 0.05$), se aplicaba un test de rangos múltiples (SCHEFFE).

Se realizaron además tablas de regresión lineal para correlacionar las mediciones biométricas entre sí.



BIBLIOTECA
IAC. ING.
MARITIMA

3. RESULTADOS

3.1. DESARROLLO EMBRIONARIO

Durante el desarrollo de esta primera fase experimental se observaron diferencias significativas entre tratamientos en cuanto a medidas biométricas y supervivencias, principalmente en los tratamientos con temperaturas a 20°C (T20) y 28°C (T28).

El tratamiento con temperatura a 24°C (T24) fue significativamente superior ($p < 0.05$) en cuanto a supervivencia (93%) y longitud total pre-larval (2.49 ± 0.08 mm) con respecto a T28; mientras que con respecto a T20, tan sólo fue significativamente superior en cuanto a longitud total pre-larval, gracias a un aceptable porcentaje de supervivencia (81%) del tratamiento a 20°C. En cuanto a T28, reportó la más baja supervivencia final (34%) y longitud total pre-larval (2.23 ± 0.09 mm), resultados significativamente inferiores a los otros tratamientos (Tabla 5).

3.1.1. Tiempos de desarrollo embrionario

Los tiempos de desarrollo embrionario, desde el estadio de 16 células hasta el estadio pre-larval, fueron de 32.10 h, 23.40 h y 18.30 h para T20, T24 y T28, respectivamente (Fig. 6). Estos tiempos se consideraron en base a un 70% de eclosión existiendo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos. Se incluyen estadios embrionarios del lenguado (Fig. 7 a 13).

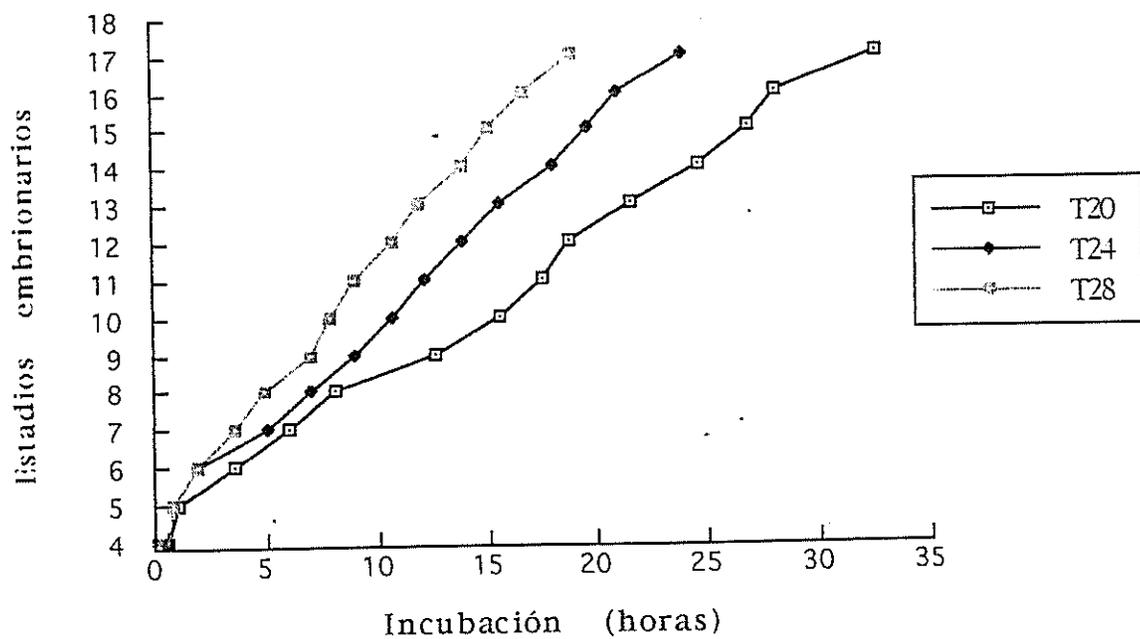


Fig. 6. Desarrollo embrionario del lenguado *Paralichthys woolmani* bajo tres diferentes regímenes de temperaturas

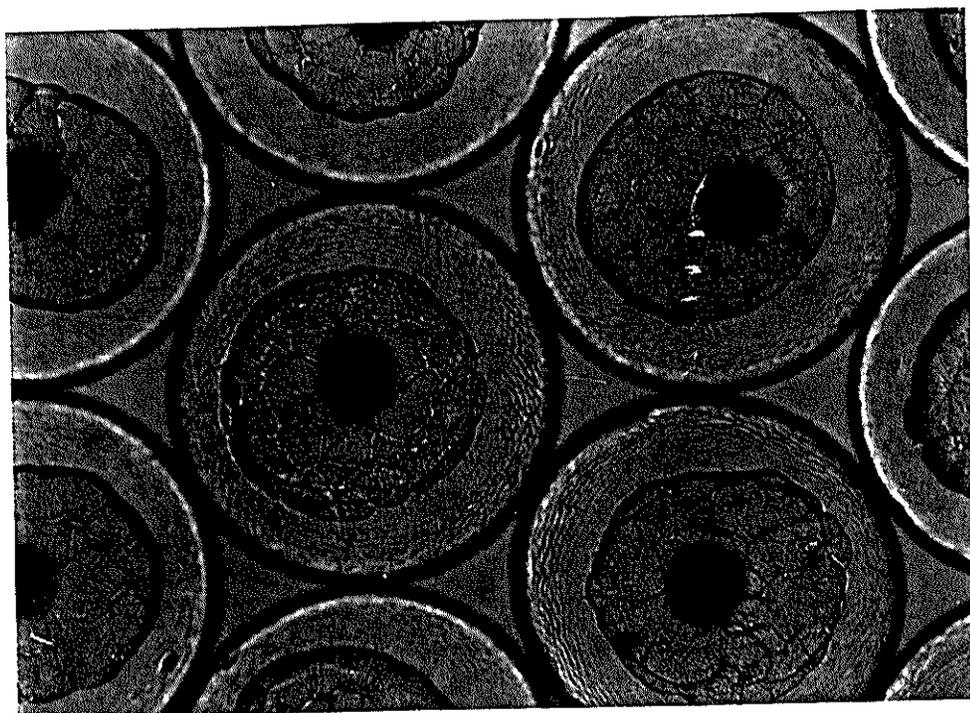


Fig. 7. Estadio de 32 células. 27 min luego de la siembra (16 células)

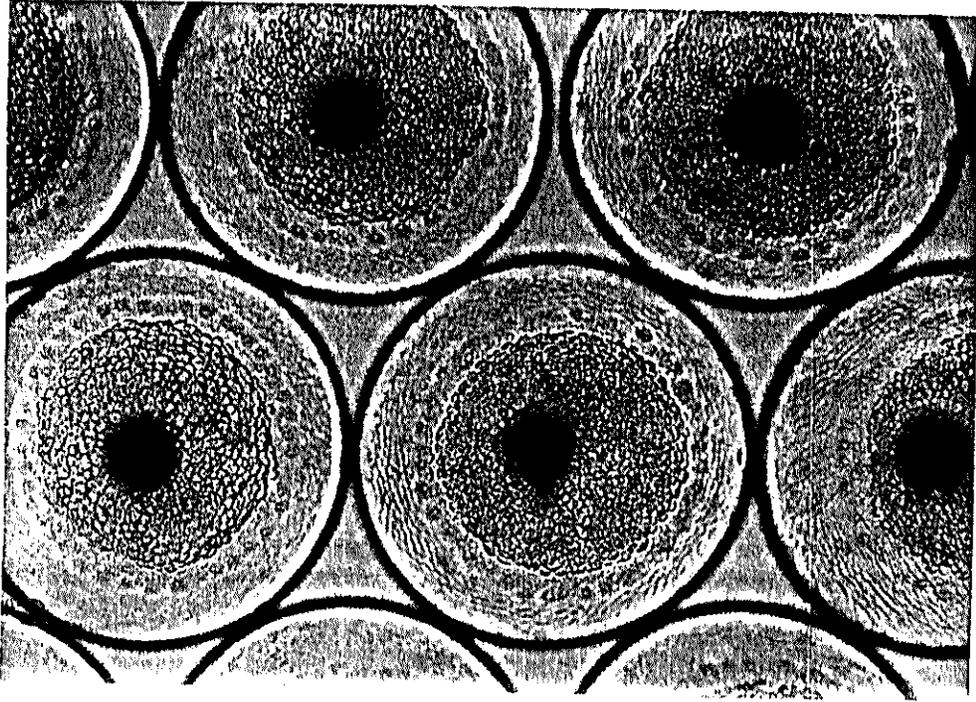


Fig. 8. Estadio de Mórula; 1 h y 37 min luego de la insección



BIBLIOTECA
IAC. 166.
MARIHWA

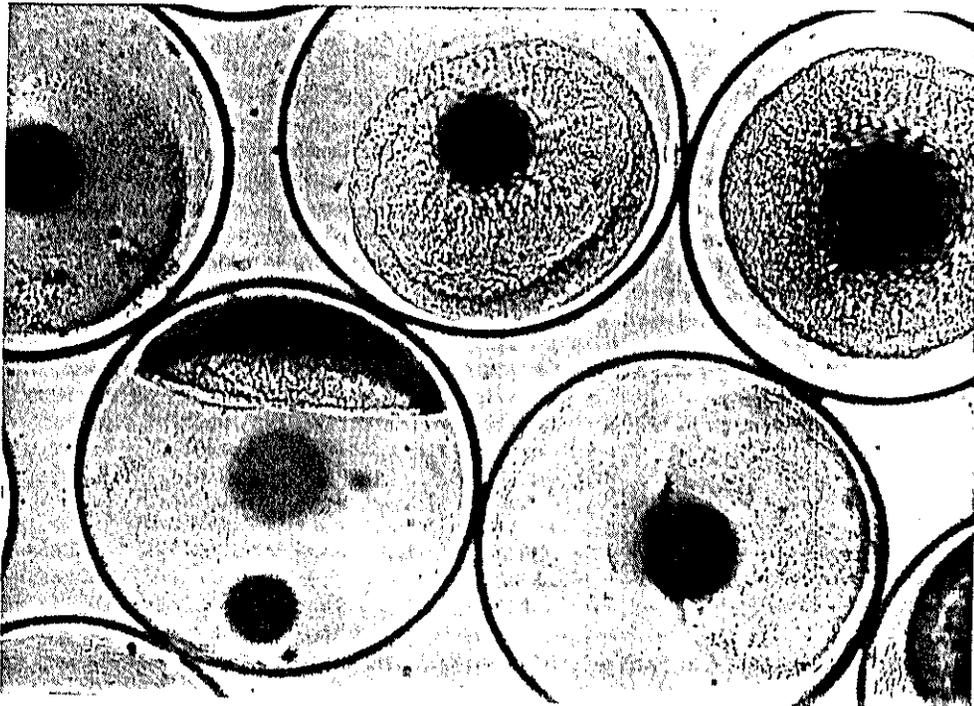


Fig. 9. Estadio de Blistula; 1 h y 15 min luego de la insección

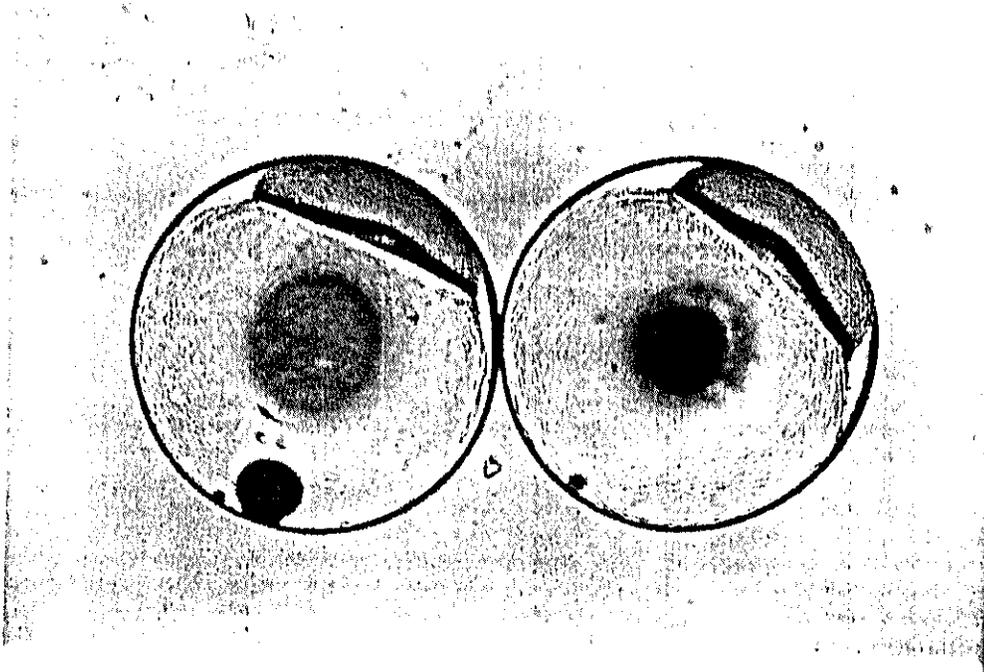


Fig. 10. Estado de gástrula; 6 h y 30 min luego de la siembra

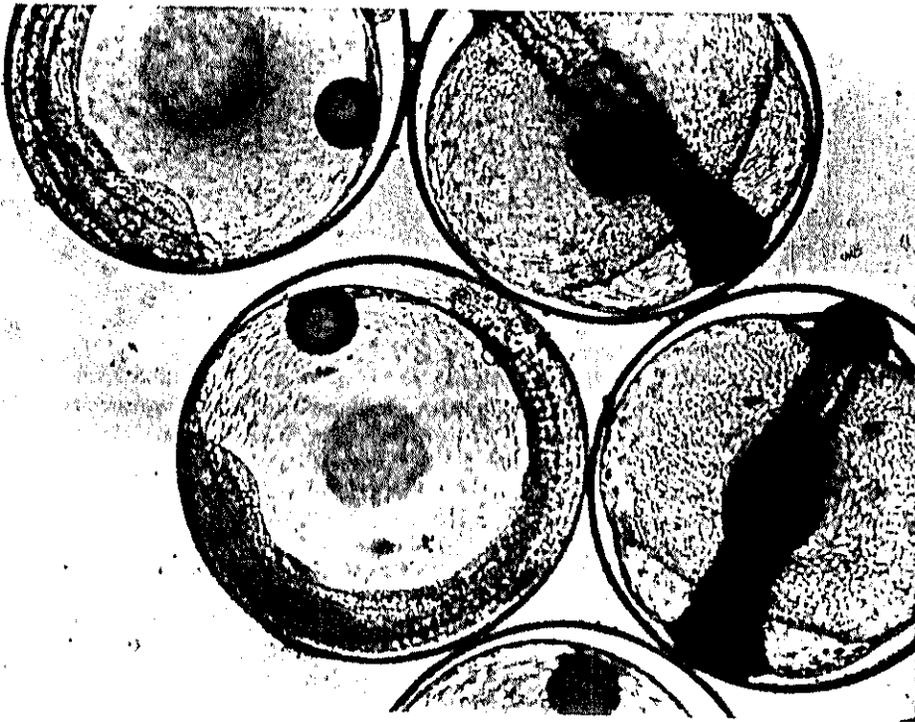


Fig. 11. Embrión con la formación del corazón; 15 h luego de la siembra

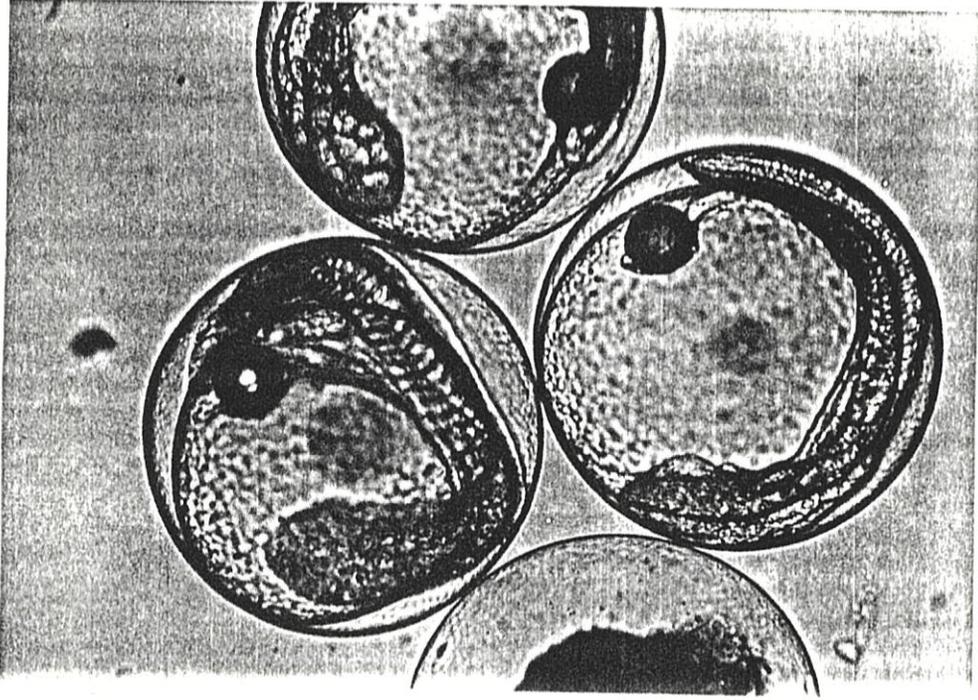


Fig. 12. Embrión listo para eclosionar; 20 h y 40 min luego de la siembra

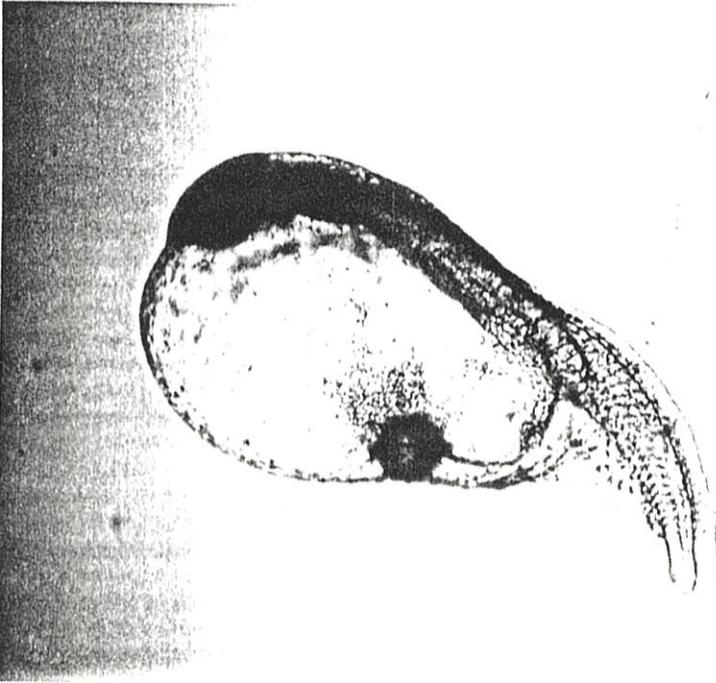


Fig. 13. Eclosión (70%); 23 h y 40 min luego de la siembra

3.1.2. Supervivencia pre-larval

Las supervivencias pre-larvales obtenidas al final de esta fase experimental fueron 81.3%, 93% y 34% para T20, T24 y T28, respectivamente. Estos resultados se registraron luego de 40 h de siembra, considerándose este tiempo, suficiente para alcanzar el máximo porcentaje de eclosión en los tres tratamientos. El análisis estadístico de estos porcentajes demostró que entre T20 y T24 no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$), mientras que T28 si fue significativamente diferente con respecto a T20 y T24.

3.1.3. Mediciones biométricas en pre-larvas de cultivo

Medidas biométricas tales como longitud total (Lt), ancho total (At) y ancho del saco vitelino (ASv) fueron registradas luego del 70% de eclosión en los tres tratamientos (Tabla 5).

Los tratamientos, en lo que respecta a Lt, mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre sí, obteniendo T24 las mayores longitudes de eclosión. En cuanto a At, el tratamiento T24 mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a T28, mientras que T20 no fue significativamente diferente con respecto a T24 y T28. Los ASv no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos

3.1.4. Temperatura

Los valores de temperatura se mantuvieron muy estables en los tres tratamientos (Fig. 14) con una ligera variación de 0.1°C, esto es 19.9°C-20.0°C; 23.9°C-24.0°C y 27.9°C-28°C durante esta fase experimental. Las mediciones de temperaturas se realizaron a diferentes horas del día durante la primera fase experimental, correspondiente a 3 días.



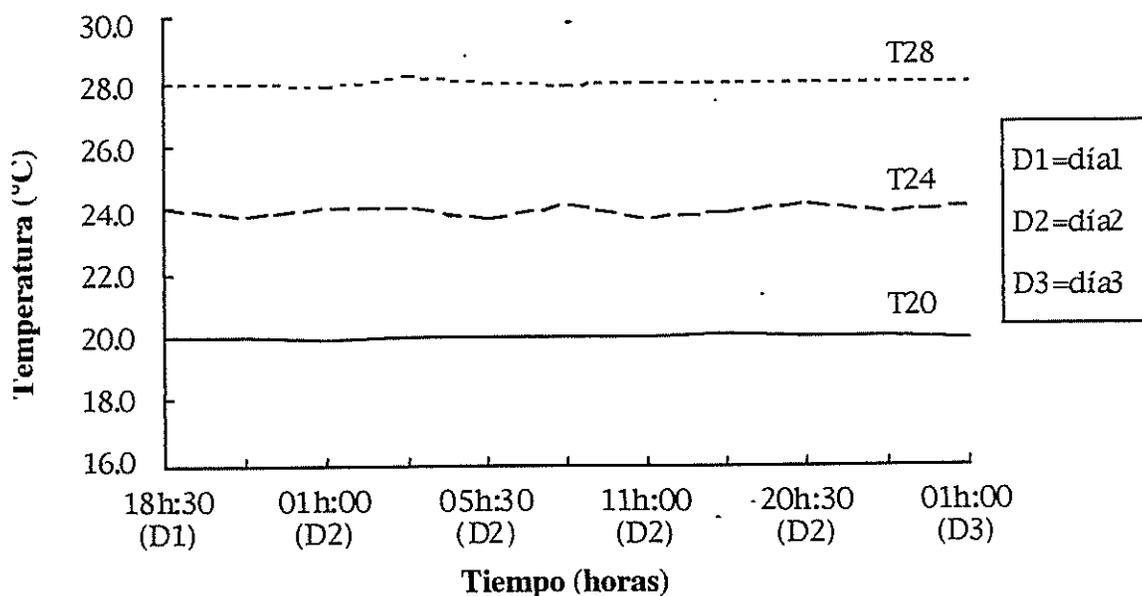


Fig. 14. Niveles de temperatura mantenidos durante la primera fase experimental

Tabla 5. Parámetros finales de la primera fase experimental (valores medios \pm desviación estándar de tres réplicas)

PARAMETROS	TRATAMIENTOS		
	T20	T24	T28
Temperatura (°C)	20.0 \pm 0.1	23.9 \pm 0.1	27.9 \pm 0.1
Desarrollo embrionario (h)	32.10 \pm 0.15 ^a	23.40 \pm 0.10 ^b	18.30 \pm 0.10 ^c
Supervivencia final (%)*	81.0 \pm 14.5 ^a	93.3 \pm 6.1 ^a	34.0 \pm 7.5 ^b
Longitud total (mm)*	2.39 \pm 0.06 ^a	2.49 \pm 0.08 ^b	2.23 \pm 0.09 ^c
Ancho total (mm)*	0.89 \pm 0.06 ^{ab}	0.91 \pm 0.05 ^a	0.86 \pm 0.07 ^b

valores con la misma letra no tuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$)

*Valores medidos luego de 40 h de siembra en estadios pre-larvales

3.2. CRECIMIENTOLARVAL

Los resultados finales del crecimiento larval señalaron que el tratamiento a 24°C (T24) fue significativamente superior a los otros tratamientos, tanto en supervivencia (8.9%) como en longitud total (11.31 ± 1.87) (Tabla 6). Los tratamientos a 20°C y 28°C (T20 y T28) evidenciaron ser temperaturas muy limitantes en cuanto a crecimiento y supervivencia larval de esta especie.

3.2.1. Tiempo de crecimiento larval

Durante los 35 días de la segunda fase experimental se observaron variaciones en las tallas larvales de un mismo tratamiento, lo cual produjo que no todas las larvas alcancen un determinado estadio larvario al mismo tiempo. Así al día 30 de cultivo se obtuvo en T20 un 50% en estadio F, 25% en E y 25% en D; al día 35 para T24 un 25% en G, 60% en H, 25% en G y 10% en I, y para T28 un 25% en F, 60% en G y 9% en H (Fig. 15). El ancho del saco vitelino (Asv) tuvo variaciones significativas entre tratamientos (Tabla 6) a las 40 h luego de la siembra.

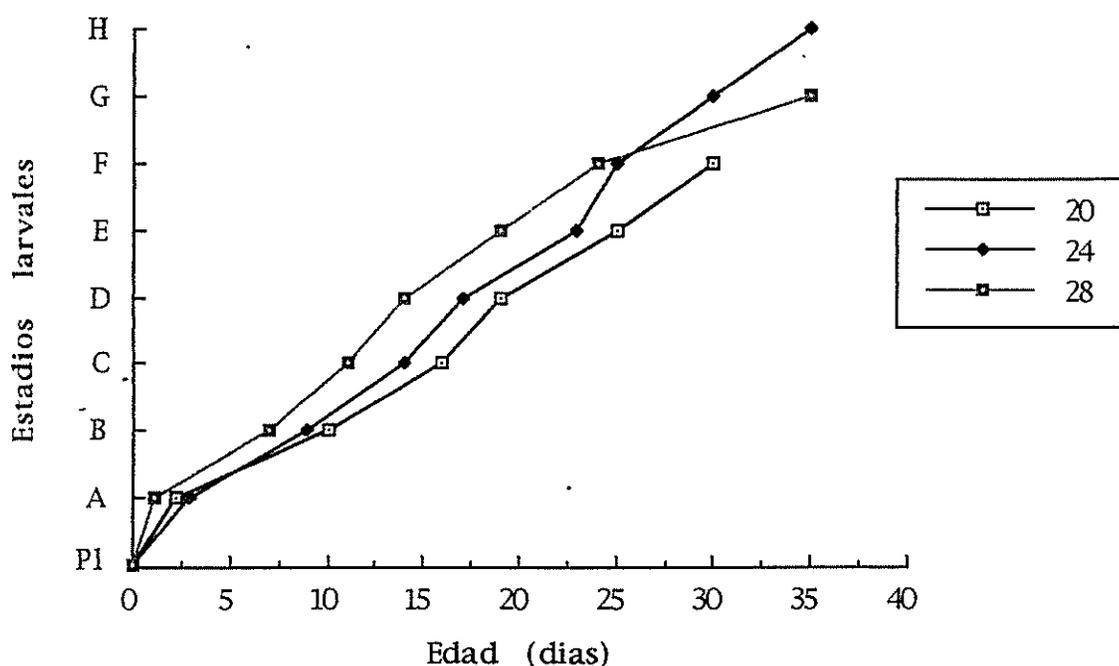


Fig. 15. Crecimiento larval del lenguado *Paralichthys woolmani* bajo tres diferentes regímenes de temperaturas. Los tiempos de crecimiento larval se tomaron con un mínimo de 50% de larvas que hayan alcanzado determinado estadio de desarrollo

Características de estadios larvales (Fig. 16 a 21) se ilustran a continuación:

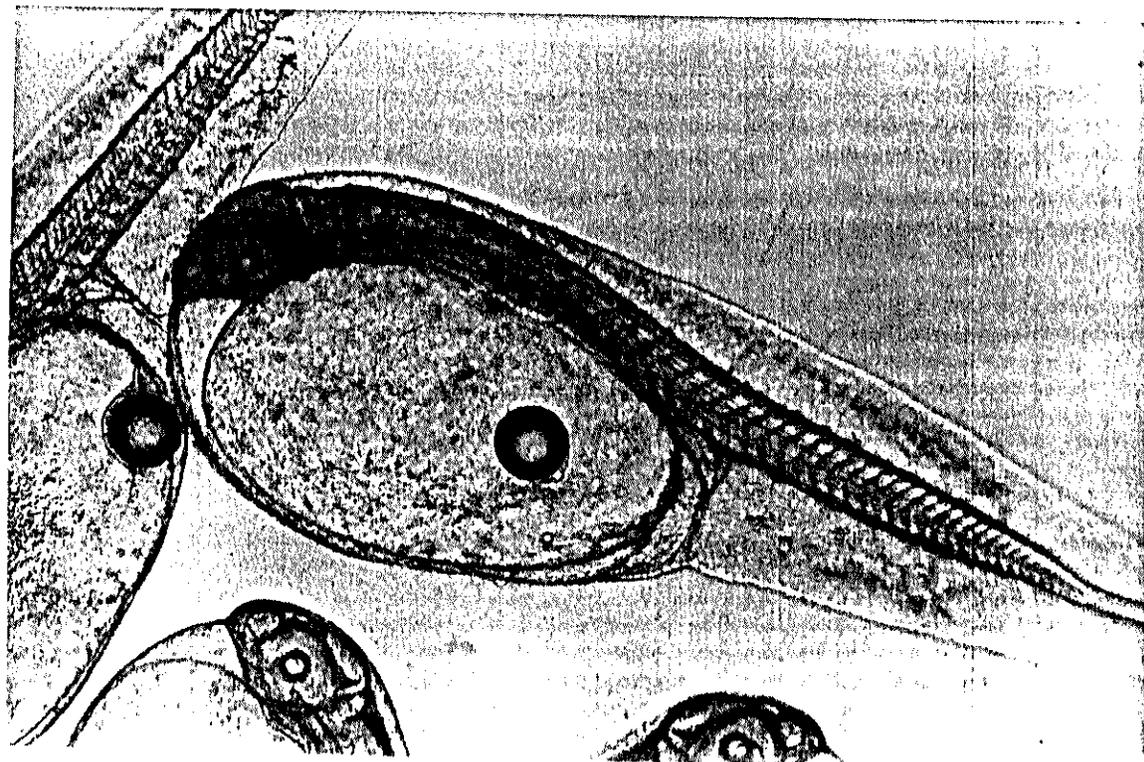
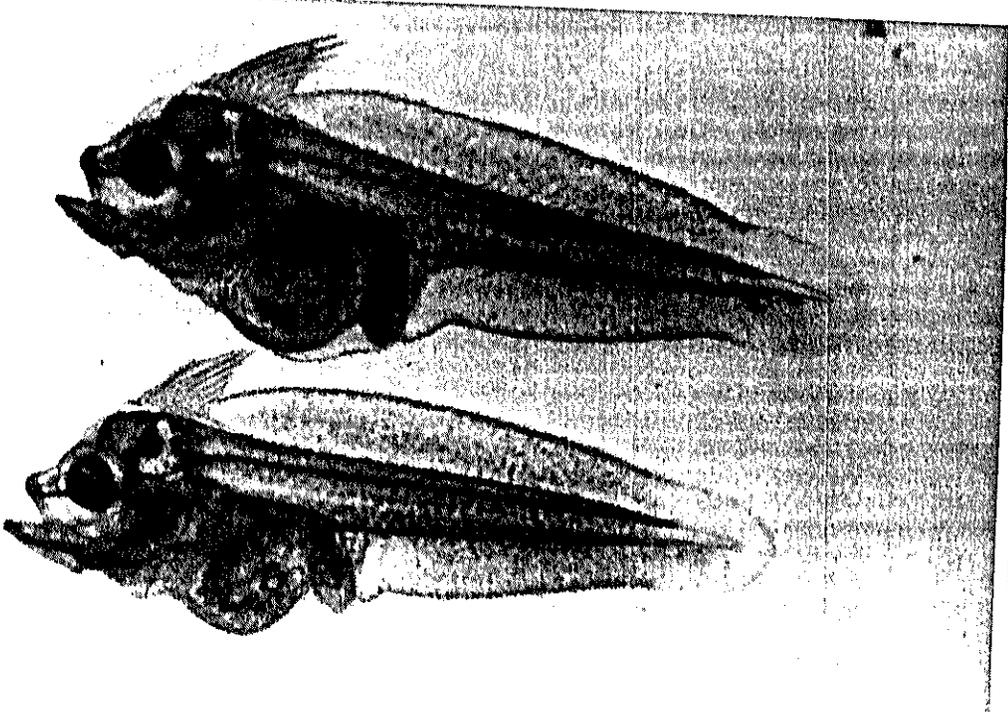


Fig. 16. Estadio pre larval. Día 1 de cultivo extra útero.



Fig. 17. Apertura de la boca. Día 2 de cultivo. Estadio A.



BIBLIOTECA
DEL INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
MARITIMAS

Fig. 18. Formación de 4-5 r.e.a.a.d. Estado D

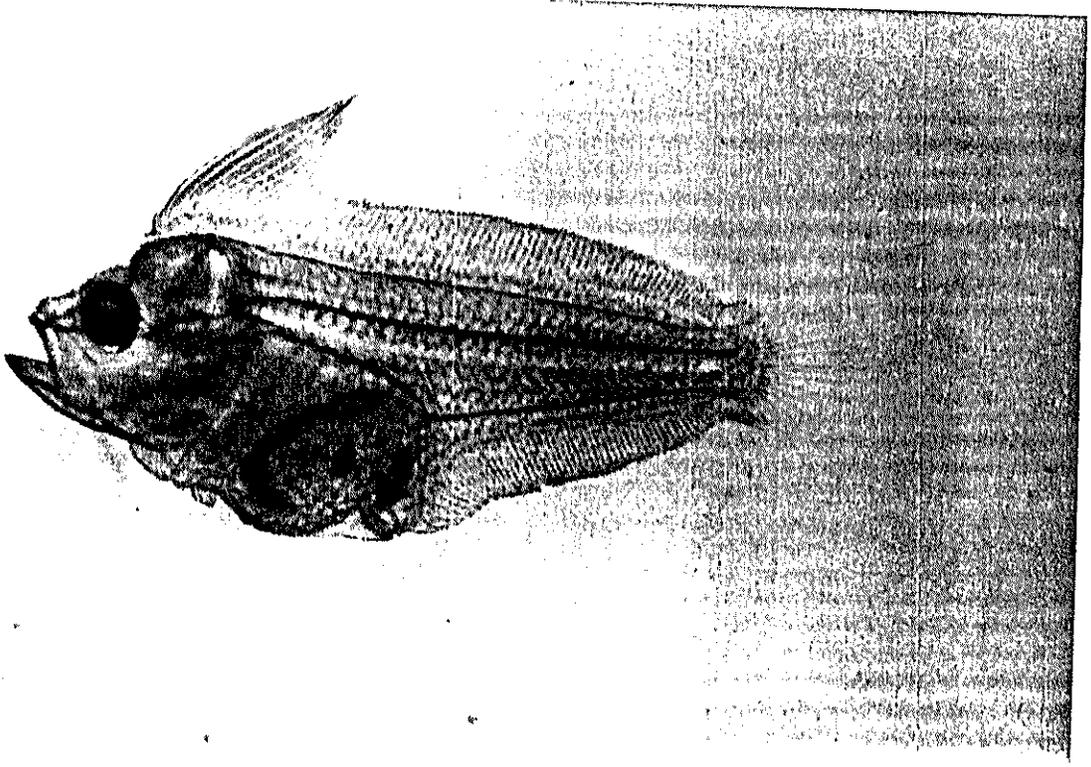


Fig. 19. Formación de 7-9 r.e.a.a.d. Estado F

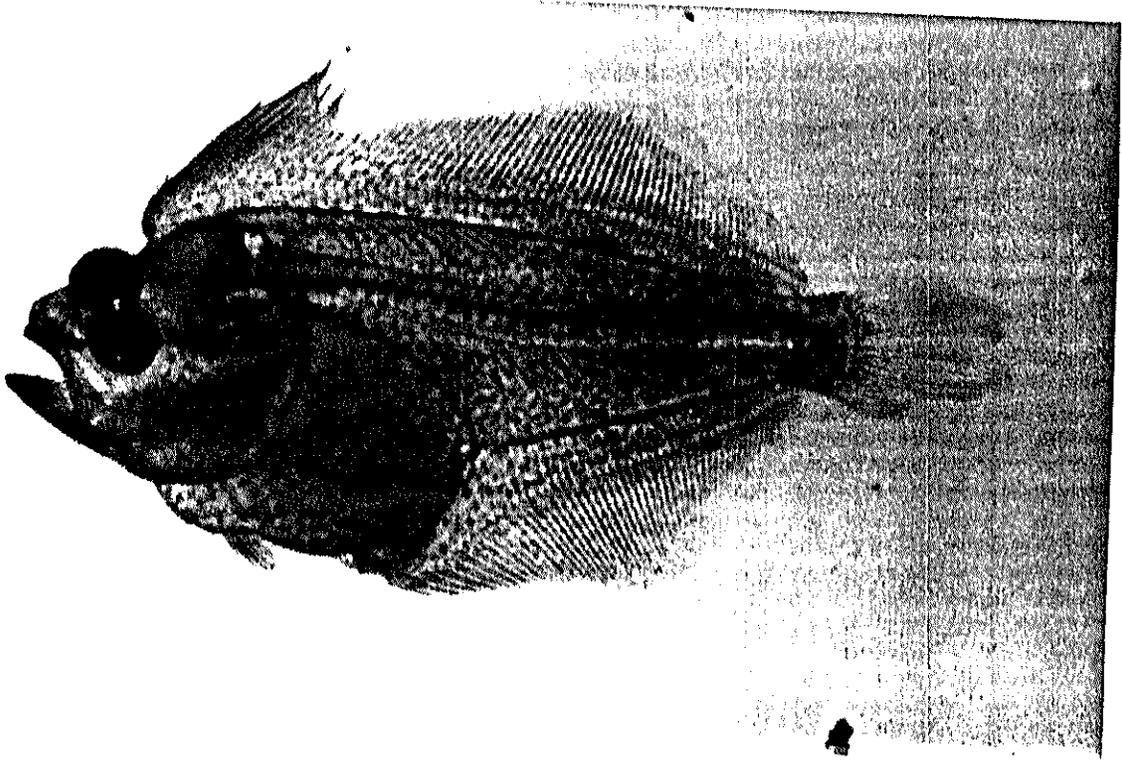


Fig. 20. Ojo derecho observable desde el lado izquierdo. (F. Toledo)

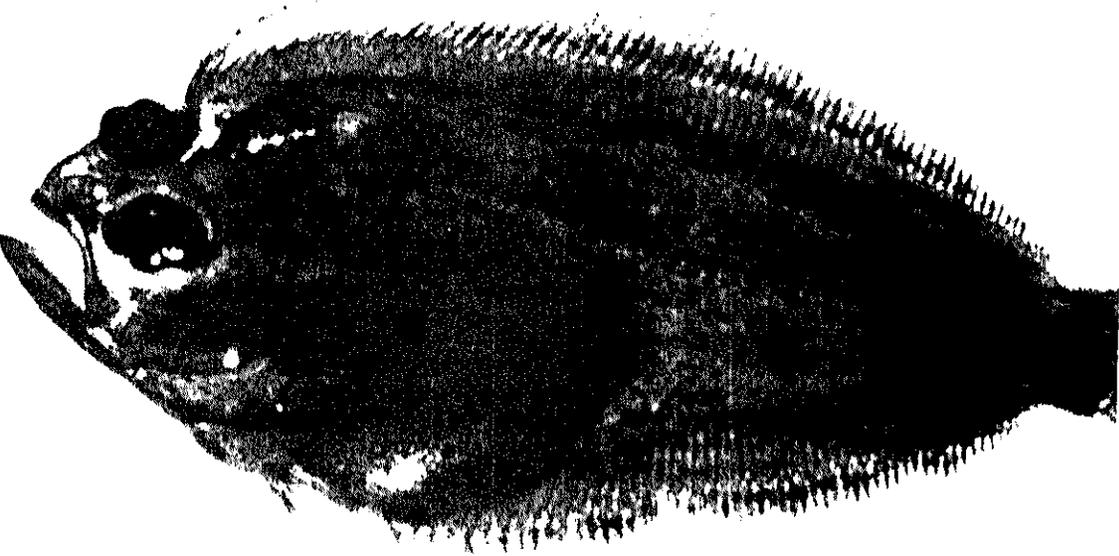


Fig. 21. Migración completa del ojo (D^o) de la izquierda. (F. Toledo)

3.2.2. Supervivencia larval

En T20 se registró una supervivencia de 0% al día 30 de cultivo, mientras que al día 35 de cultivo los porcentajes fueron de 8,9 y 0,9% para T24 y T28, respectivamente (Tabla 6 y Fig. 22). En el análisis estadístico, los valores de supervivencia en T24 sí mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a T20 y T28 a lo largo del cultivo larvario; sin embargo, durante los días 12 a 19, los valores de T20 y T24 no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$) entre sí.

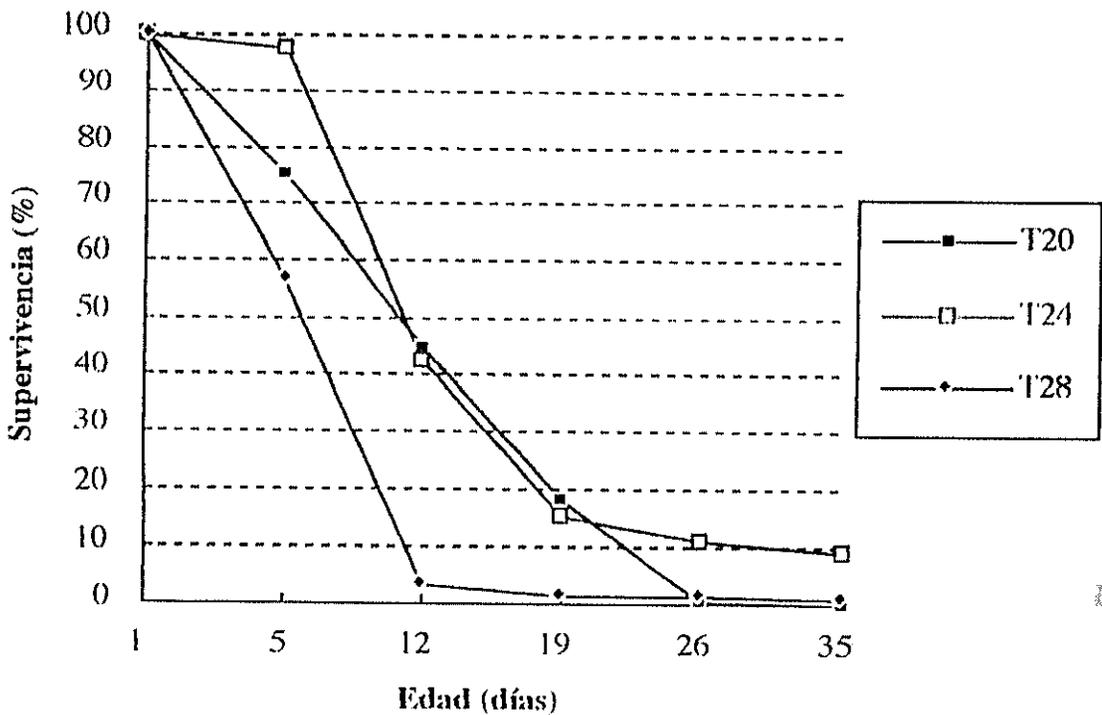


Fig. 22. Supervivencias larvales registradas durante la segunda fase experimental en estadios primarios de metamorfosis

3.1.3. Mediciones biométricas en larvas de cultivo

A pesar de que los 3 tratamientos a lo largo de los 35 días de cultivo no mostraron una misma tendencia en cuanto a longitud total (LT) (Fig. 23), los resultados significativos más altos, al final de esta segunda fase experimental, se obtuvieron en T24 (Tabla 6).

Durante los tres primeros días de cultivo, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre T20 y T24 con respecto a T28. Al 5^o día, T24 y T28 fueron significativamente superiores a T20. Del día 10 al 15, T20 registró valores significativamente superiores ($p < 0.05$) con respecto a T28, siendo inclusive superior a T24 al día 10 de cultivo; sin embargo, en los días subsiguientes, los valores de Lt en este tratamiento se redujeron hasta valores significativamente inferiores con respecto a los demás. En cuanto a T24 y T28 demostraron (exceptuando los días 3 y 10 de cultivo) no ser significativamente diferentes ($p > 0.05$) entre sí hasta el día 30. Finalmente, los valores de Lt en T24 aumentaron notablemente siendo significativamente superiores con respecto a los obtenidos para T28, al final de esta segunda fase experimental.

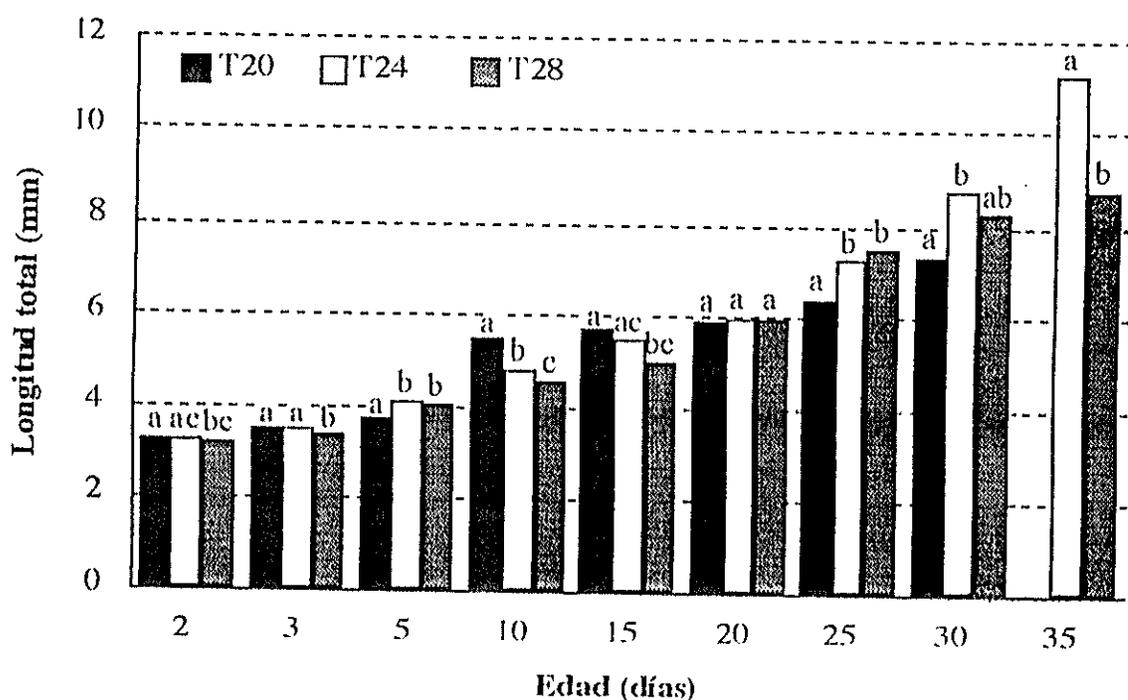


Fig. 23. Crecimientos en longitud total larval registrados durante la segunda fase experimental. Valores con la misma letra no tuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$)

En cuanto a las medidas de ancho total (At) (Fig. 24), mostraron una tendencia similar a Lt para todos los tratamientos con ligeras variaciones en los niveles de significancia de T28, especialmente durante los días 10 a 25 de cultivo; observándose también un crecimiento significativamente superior ($p < 0.05$) de T24 con respecto a T28, al final de esta segunda fase experimental.

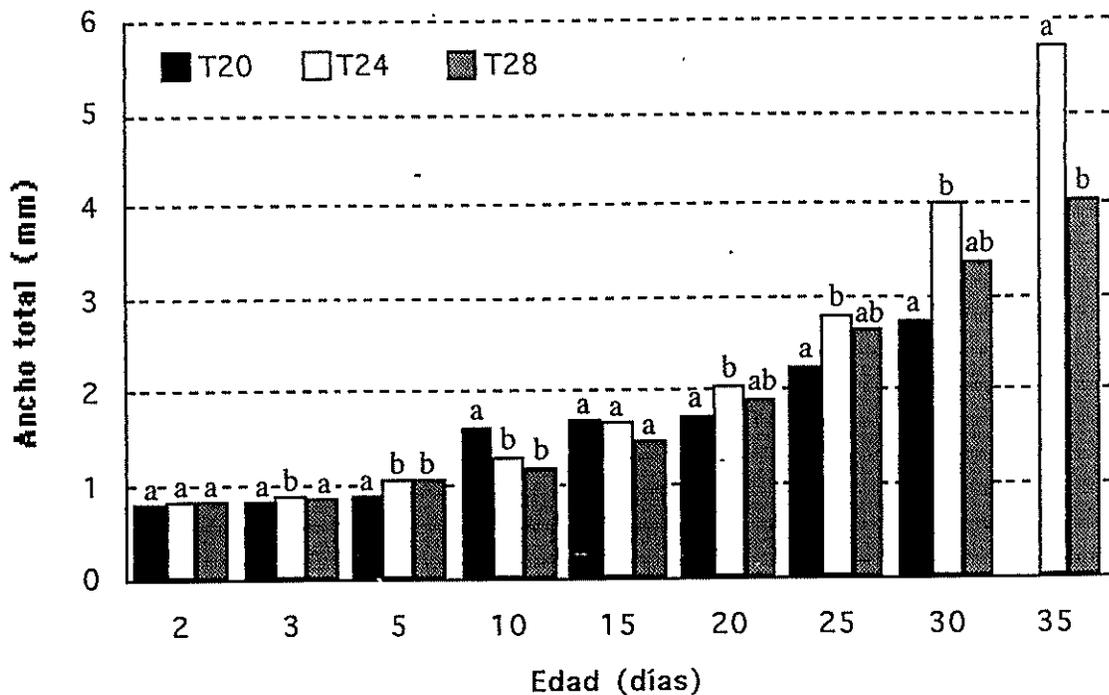


Fig. 24. Crecimientos en ancho total registrados durante la segunda fase experimental. Valores con la misma letra no tuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$)

La tabla de regresión mostró una correlación lineal positiva (Fig. 25) entre At y Lt.

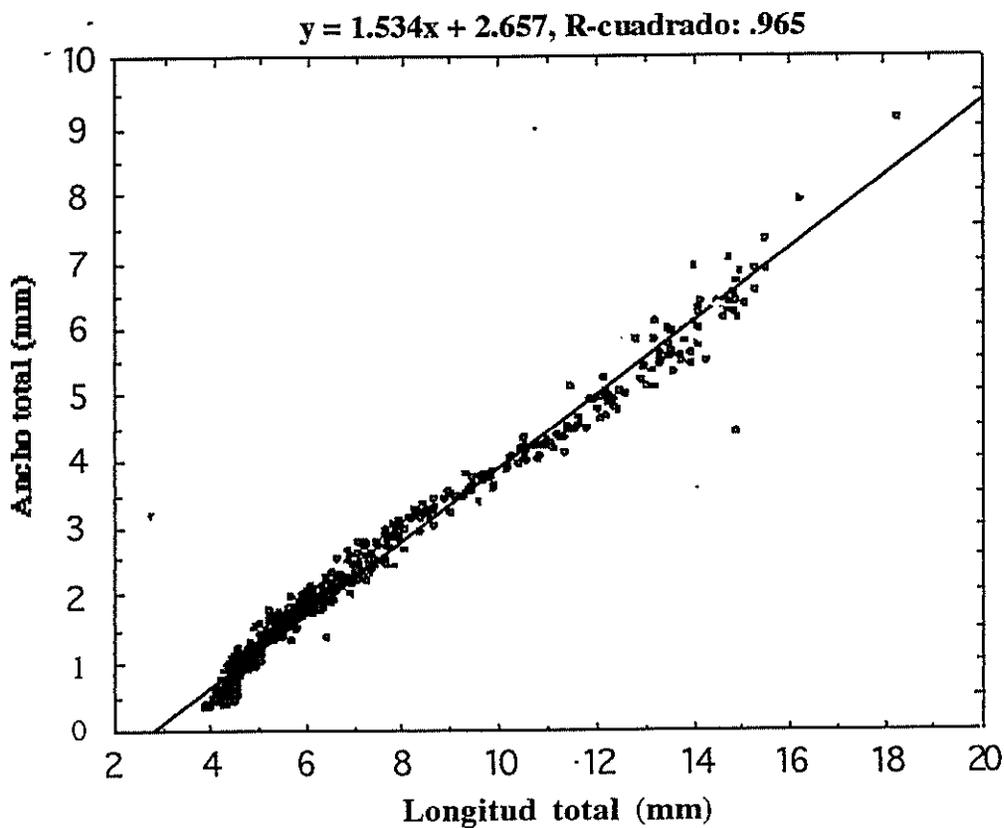


Fig. 25 Crecimiento relativo de larvas de lenguado *Paralichthys woolmani* durante la segunda fase experimental

Tabla 6. Parámetros finales de la segunda fase experimental (valores medios \pm desviación estándar de tres réplicas)

PARAMETROS	TRATAMIENTOS		
	T20	T24	T28
Longitud total (mm)*	—	11.31 \pm 1.87 ^a	8.76 \pm 0.71 ^b
Longitud estándar (mm)*	—	8.99 \pm 1.34 ^a	7.24 \pm 0.45 ^b
Ancho total (mm)*	—	5.71 \pm 1.15 ^a	4.05 \pm 0.83 ^b
Ancho del saco vitelino (mm)**	0.52 \pm 0.04 ^a	0.45 \pm 0.06 ^b	0.31 \pm 0.05 ^c
Supervivencia final (%)	0 ^a	8.9 \pm 2.8 ^b	0.9 \pm 1.5 ^a

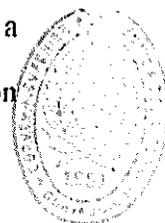
Valores con igual letra no tienen diferencias significativas ($p > 0.05$)

*Valores finales luego de 35 días de cultivo

**Valores correspondientes a 40 h luego de la siembra

3.2.4. Parámetros físico-químicos

Los niveles tanto de pH, OD (oxígeno disuelto) y temperatura se mantuvieron estables a lo largo de esta segunda fase experimental; mientras que los niveles de amoníaco variaron entre tratamientos durante los primeros días de cultivo (día 9) (Tabla 7).



3.2.4.1. Temperatura

Los valores diurnos de temperaturas (Fig. 26A) obtenidos en los tratamientos tuvieron fluctuaciones entre réplicas de: 20.4 \pm 0.2 a 20.5 \pm 0.2; 24.0 \pm 0.6 a 24.1 \pm 0.6; y, 27.7 \pm 1.1 a 27.9 \pm 0.8 para T20, T24 y T28, respectivamente.

BIBLIOTECA
I.T.E.S.O.
MARTINEZA

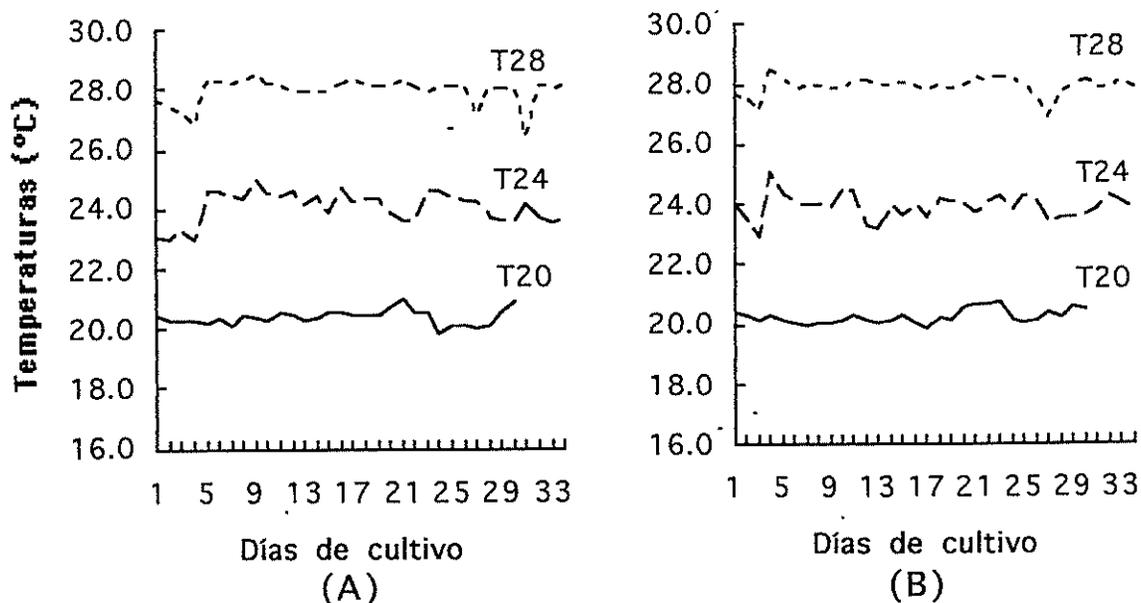


Fig. 26A y B. Temperaturas diurnas (A) y nocturnas (B) registradas durante la segunda fase experimental

Las temperaturas nocturnas registradas (Fig. 26B) fluctuaron entre: 20.2 ± 0.2 a 20.3 ± 0.2 , 23.9 ± 0.4 a 24.0 ± 0.4 y 27.9 ± 0.3 a $27.9 \pm$ para T20, T24 y T28, respectivamente.

3.2.4.2. Oxígeno

Los niveles de oxígeno disuelto (OD) mostraron, como era de esperarse, una relación inversamente proporcional con respecto a las temperaturas de prueba a lo largo de esta segunda fase experimental (Fig. 27).

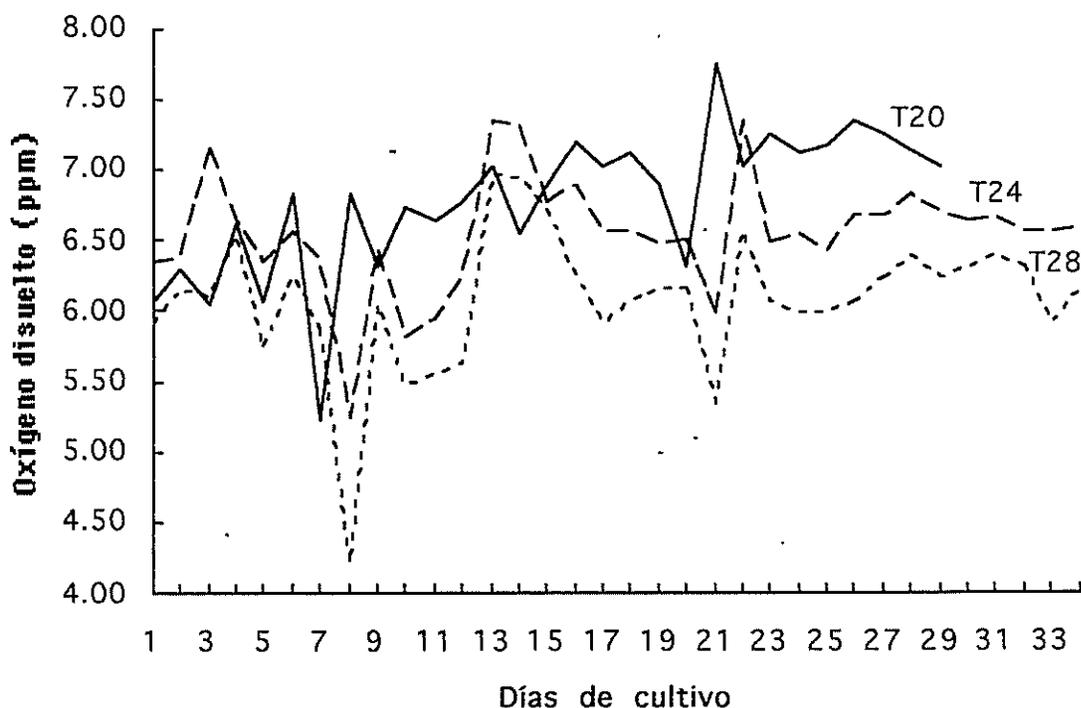


Fig. 27. Niveles de oxígeno disuelto (ppm) durante la segunda fase experimental.

3.2.4.3. Amoníaco

Los niveles de amoníaco fueron altos durante los primeros días de cultivo (Fig. 28), registrando al 9^{no} día un promedio de 0.14 ppm (T20), 0.26 ppm (T24) y 0.41 ppm (T28) y estabilizándose en los días 18 y 27 en valores que fluctuaron entre 0.03 ppm y 0.01 ppm para los tres tratamientos, terminando T24 al día 35 de cultivo con 0.03 ppm más que T28, debido probablemente a una mayor concentración de alimentación que se requería para el mantenimiento de las larvas de cultivo.

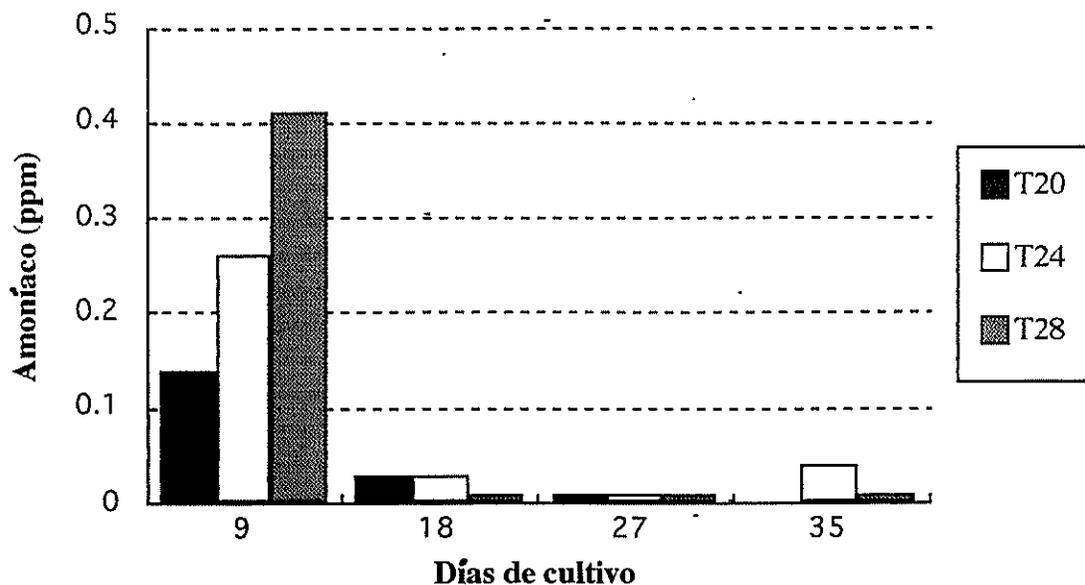


Fig. 28. Niveles de amoníaco registrados durante la segunda fase experimental.

Tabla 7. Parámetros físico-químicos registrados durante la segunda fase experimental (valores medios \pm desviación estándar de tres réplicas)

PARAMETROS	TRATAMIENTOS		
	T20	T24	T28
Temperatura (°C) (am)	20.4 \pm 0.2	24.0 \pm 0.6	27.8 \pm 1.0
Temperatura (°C) (pm)	20.2 \pm 0.2	23.9 \pm 0.4	27.9 \pm 0.4
Oxígeno disuelto (ppm)	6.75 \pm 0.53	6.55 \pm 0.44	6.04 \pm 0.64
pH	8.04 \pm 0.29	7.99 \pm 0.25	8.00 \pm 0.21
Amoníaco (NH ³)	0.06 \pm 0.07	0.12 \pm 0.17	0.21 \pm 0.29



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARTIMA

4. DISCUSION

Debido a que la temperatura es uno de los factores ambientales más influyentes sobre los tiempos de eclosión en huevos de peces (Blaxter, 1969), las diferencias significativas ($p < 0.05$) obtenidas en cuanto a tiempo de eclosión en horas durante la primera fase experimental, se debieron seguramente a la amplitud de temperaturas de incubación (20°C, 24°C y 28°C). En trabajos realizados con huevos de otras especies de peces planos como el halibut (*Hippoglossus stenolepis*) (Liu *et al.*, 1994) y rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Jones, 1972), también se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos, con rangos de 3°C a 15°C.

En cuanto a las tallas de eclosión, Ahlstrom *et al.* (1984) describió que el rango para el género *Paralichthys* es de 2.0 a 2.8 mm de longitud total; adicionalmente Blaxter (1969) y Kamler (1992) señalaron que la eclosión a bajas temperaturas producen tallas larvales más grandes que a altas temperaturas. Sin embargo, las tallas pre-larvales obtenidas para el lenguado *Paralichthys woolmani*, fueron significativamente superiores a 24°C que a 20°C y 28°C, por lo que podríamos considerar temperaturas cercanas a 24°C como apropiadas para desarrollos embrionarios, mientras que alrededor de 20°C y 28°C podrían ser temperaturas limitantes, en lo que respecta a tallas de eclosión.

La temperatura además, tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la supervivencia pre-larval, siendo ésta significativamente inferior a 28°C que a 20°C y 24°C. Estos resultados nos indican que para lograr una eclosión exitosa se requiere de temperaturas inferiores a 28°C.

El grado de desarrollo larval tuvo amplias variaciones entre temperaturas, obteniéndose mejores índices de crecimiento y supervivencias con temperaturas a 24°C. Además se desarrollaron, a dicha temperatura, estadios larvales más avanzados que en las otras temperaturas experimentales al día 35 de cultivo; observándose contradictoriamente a

28°C (por la relación directa entre temperatura y crecimiento larval), un retardo en el grado de desarrollo larval alcanzando tan sólo el estadio G al final de esta segunda fase experimental.

La variabilidad existente en tallas larvales al momento de la siembra puede ser explicado por el hecho de que estas larvas provenían de desoves de más de una hembra; ya que según Kamler (1992), los tamaños larvales son influenciados tanto por el tamaño, edad y grado de alimentación del reproductor dando como resultado las diferencias en cuanto a grado de desarrollo larval entre larvas cultivadas a una misma temperatura.

Seikai *et al.*, (1986) obtuvo que los resultados más interesantes se observaron en la dependencia del tamaño metamórfico y la duración del período larval con respecto a la temperatura en larvas de lenguado *Paralichthys olivaceus*, y que esta dependencia se reflejaba en las amplias variaciones (días de cultivo) entre temperaturas experimentales. Estos resultados coinciden con los obtenidos para nuestra especie, sobretodo por las grandes variaciones, en cuanto a la duración de períodos larvales, entre tratamientos.

El hecho de que la temperatura intermedia de prueba (24°C) tenga los mejores índices de evaluación, supone que temperaturas próximas a ésta sean adecuadas para el desarrollo del *Paralichthys woolmani*, como sucede en especies similares como el "greenback flounder" (*Rhombosolea tapirina*) en el cual a valores superiores a 15°C las larvas fueron más pequeñas y con deficiente absorción del saco vitelino, mientras que a valores menores a 15°C el crecimiento larval fue más lento (Hart y Purser, 1995).

En cuanto a las larvas mantenidas a 20°C, las grandes mortalidades producidas durante los días 19 a 26 se debieron probablemente al tamaño no adecuado de alimento vivo (*Artemia*) con respecto al tamaño larval de la boca y a enfermedades bacterianas (vibriosis) debido a la contaminación del tanque de cultivo por acumulación de alimento vivo y desechos metabólicos larvales. Además Blaxter (1969) señala que la tolerancia a una temperatura puede variar con la edad; por lo cual, basándonos en los resultados del

presente experimento, aumentos graduales en las temperaturas de cultivo (20°C a 24°C), podrían mejorar los índices de crecimiento y supervivencia larval. Cabe resaltar que en los cultivos de rodaballo (*Scophthalmus maximus*), se utilizan niveles de temperaturas desde 13°C hasta 18 ó 19°C (Person-Le Ruyet, 1989), obteniéndose buenos resultados

En cuanto a las larvas cultivadas a 28°C, las bajas supervivencias reportadas hasta el día 12 de cultivo, nos harían suponer que temperaturas de 28°C, bajos niveles de oxígeno, así como los niveles de amoníaco registrados (0.41 mg/L), influyeron decisivamente tanto en el estado fisiológico como en la supervivencia larval. Mas aún, y considerando que con temperaturas altas, la tasa de amoníaco es mayor que con temperaturas bajas (Reichenbach-Klinke, 1966), debemos mencionar que durante los 5 a 6 primeros días de cultivo larvario en que no se efectuó recambios de agua en los tanques de cultivo, tanto las concentraciones iniciales de rotíferos (3 rot/ml) y de microalgas (200,000 cel/ml) junto con las densidades de cultivo utilizadas (50 larvas/L) fueron factores que también contribuyeron a los niveles tan altos de amoníaco obtenidos; ya que, cuanto más pequeño es el pez, es más sensible a este parámetro químico.

Cabe anotar que el uso de antibióticos (Oxitetraciclina y tetraciclina) durante los días 15 a 18 de cultivo, debido a una severa vibriosis (comunicación personal Annick Bolland); así como los altos porcentajes de recambio de agua utilizados en todos los tratamientos, ayudaron a mantener tanto las condiciones fisiológicas larvales como la calidad del agua.



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARÍTIMA

5. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo, la temperatura demostró ser un factor muy influyente en lo que respecta a tiempos de desarrollos, crecimientos y supervivencias tanto en desarrollo embrionario como en crecimiento larval del lenguado *Paralichthys woolmani*.
- Los tamaños pre-larvales de eclosión significativamente superiores a los otros tratamientos así como los altos porcentajes de supervivencias obtenidos a 24°C, demostraron que rangos alrededor a esta temperatura serían apropiadas como temperaturas de incubación.
- Las temperaturas a 20°C limitaron un adecuado crecimiento larval, causando problemas de alimentación y enfermedades que influyeron en las altas mortalidades dadas durante los días 19 a 26 de cultivo larvario.
- Las temperaturas a 28°C, junto con los altos niveles de amoníaco dados en los primeros días de cultivo (0.41 mg/L) y las altas densidades de siembra (50 larvas/L) provocaron las bajas supervivencias obtenidas al día 12 de cultivo.
- El régimen alimenticio demostró ser dependiente de la temperatura de cultivo. Debido a que las larvas de peces seleccionan el tamaño de su presa de acuerdo a su estado de desarrollo (tamaño de la boca), la adecuada introducción de presas de mayor tamaño en relación a los rotíferos (nauplios o metanauplios de *Artemia*), influyó sobre la tasa de supervivencia larval.
- Los resultados obtenidos nos permiten concluir que, con rangos de temperaturas cercanas a 24°C y bajo condiciones controladas de cultivo (laboratorios), se podría asegurar una producción constante tanto de pre-larvas como de alevines de lenguado *Paralichthys woolmani*, con tamaños larvales y con rangos de supervivencia aceptables para larvas de peces marinos.

6. RECOMENDACIONES

- Sería recomendable realizar nuevos bioensayos para probar el efecto de la temperatura sobre el cultivo larval pero utilizando una menor densidad de cultivo, a fin de mejorar la calidad del agua y reducir la acumulación de desechos y alimento vivo; de esta manera, se podrían reducir los porcentajes de recambio de agua a lo largo del cultivo larvario.
- En vista de que el rango óptimo de cultivo de larvas de *Paralichthys woolmani* está alrededor de 24°C, se podría reducir aún más los rangos de temperaturas experimentales, desechando temperaturas tan extremas como las utilizadas en el presente trabajo.
- Probar el aumento gradual de temperaturas (20°C a 24°C) a fin de mejorar las supervivencias larvales
- A fin de asegurar una mayor movilidad de las larvas, se debería probar tanques de mayor capacidad conjuntamente con varias densidades de cultivo.
- Tratar de mantener una buena calidad del agua en lo que respecta a niveles de amoníaco ya que este parámetro es muy limitante en cuanto a supervivencias en peces.
- Realizar mediciones biométricas periódicas del ancho de la boca para determinar un régimen alimenticio adecuado, a fin de obtener mejores crecimientos y supervivencias larvales.
- Uso de antibióticos en el suplemento de alimento vivo para evitar posibles contaminaciones en el tanque de cultivo.



BIBLIOTECA
FAC. CIEN.
MARITIMAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AHLSTROM, E.H., AMAOKA, K., HENSLEY, D.A., MOSER, H.G. & SUMIDA, B.Y. 1984. Pleuronectiformes: Development. En: Moser, H.G. (ed.) Ontogeny and Systematics of Fishes. La Jolla, California, Special publication N°1, 640-687.
- AIKEN, D. 1990. Shrimp farming in Ecuador. An aquaculture success story. World Aqua., 21, 1, 7-16.
- ALLEN, G.R. & ROBERTSON, D.R. 1994. Fishes of the Tropical Eastern Pacific. Honolulu, Hawaii., University of Hawaii Press, 289 p.
- BARNABE, G. 1990. Aquaculture. Ellis Horwood Series In Aquaculture And Fisheries Support, Volumen 1, 38-45.
- BENETTI, D.D., ACOSTA, C.A, & AYALA, J.C. 1995. Cage and Pond Aquaculture of Marine Finfish in Ecuador. En: World Aquaculture. 26(4): 7-13.
- BLAXTER, J.H.S. 1969. Development: eggs and larvae. En: "Fish physiology" Hoar, W.S. & Randall, D.J. (ed.), Academic press, New York and London, Vol. 3, 178-241.
- BOYD, C.E. 1990. Water Quality in Ponds for Aquaculture. Environmental requirements. Birmingham Publising Co. Birmingham, Alabama, U.S., 4, 135-159.
- BURGESS, W.E., AXELROD, H.R. 1984. Fishes of California and Western Mexico. Pacific marine fishes. California, TFH Publications, Inc. Ltd, Book 8, 2170 p.
- GAJARDO, G., CURE, K., COUTTEAU, P. & SORGELOOS, P. 1994. Optimización en la producción y manejo de dietas vivas como factor de éxito en el cultivo de peces marinos. En: Diagnóstico y perspectivas de las pesquerías artesanales de América austral, Puerto Montt, Chile, 1-13 (en prensa).
- HART, P.R. & PURSER, G.J. 1995. Effects of salinity and temperature on eggs and yolk sac larvae of the greenback flounder (*Rhombosolea tapirina* Günther, 1862). Aquaculture, 136, 221-230.

- HOWELL, B.R. 1979. Problems associated with the feeding of certain flatfish larvae. Inf. Tec. Inst. Invest. Cient., Barcelona, 14, 109-116.
- IGLESIAS, J., RODRIGUEZ-OJEA, G. & PELETERO, J.B. 1993. Effect of light and temperature on the development of Turbot eggs (*Scophthalmus maximus* L.). Lab. for Aquaculture & Artemia Reference Center, N°: 2990, 1-15.
- IZQUIERDO, M.S., ARAKAWA, T., TAKEUCHI, T., HAROUN, R. & WATANABE, T. 1990. Effect of $w-3$ HUFA levels in *Artemia* on growth and survival of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fuente: Development and aquaculture of marine larvae, Program & Abstracts, Bergen, Norway, 20.
- JAMES, C.M., AL-HINTY S., & SALMAN, A.E. 1989. Growth and $w3$ Fatty Acid and Amino Acid Composition of Microalgae Under Different Temperature Regimes. Aquaculture, 77, 337-351.
- JONES, A. 1972. Studies on egg development and larval rearing of Turbot, *Scophthalmus maximus* L., and Brill, *Scophthalmus rhombus* L., in the laboratory. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 52, 965-986.
- KAMLER, E. 1992. Early life history of fish. An energetics approach. Chapman & Hall, Fish and Fisheries Series 4, 4, 108-146.
- KASHIWAGI, M., DENG, Y.G. & IWAI, T. 1992. Change of Susceptibility to Thermal Shock in Developing Eggs of Japanese Halibut, *Paralichthys olivaceus*. Suisanzoshoku, 4, 1-5.
- LAVENS, P., SORGFLOOS, P., DHERT, P. & DEVRESSE B. 1995. Larval foods. En: Bromage, N.R. & Roberts, R.J. (ed.). Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell Science Ltd., Cambridge, U.K., 373-377.
- LIEWES F. W. (1984): Culture, Feeding and Diseases of Commercial Flatfish Species. A. A. Balkema, Rotterdam. 35-36.
- LIU, H.W., STICKNEY, R.R., DICKHOFF, W.W. & McCAUGHRAN, D.A. 1994. Effects of environmental factors on egg development and hatching of Pacific Halibut (*Hippoglossus stenolepis*). J. World Aquac. Soc., 25, 317-321.

NAVARRO, J.C., VARO, I. & AMAT, F.- 1992. Effect of *Artemia* diets on Sea Bass larvae from two different broodstocks. Fuente: Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Programme, Abstract, Book and List of Delegates. U.K., N°91.

NASHIDA, K. & TOMINAGA, O. 1987. Seasonal Changes of Feeding Habits and Daily Rations of Young Flounder, *Paralichthys olivaceus*. Bull. Jap. Sea Reg. Fish. Res. Lab., 37, 39-56.

NELIS, H.J., MERCHIE, G., LAVENS, P., SORGELOOS, P. & DE LEENHEER, A.P. 1995. Liquid chromatographic determination of vitamin C in aquatic organisms. Anal. Chem., submitted.

PARKER, R. 1995. Aquaculture Science. Water requirements for aquaculture. Delmar Publishers, U.S., 7, 357-359.

PERSON-Le RUYET, J. 1989. The hatchery rearing of turbot larvae (*Scophthalmus maximus*). En: Ediciós do Castro, Cuadernos de Areas de Ciencias Mariñas, Seminario de Estudos Galegos, Sada, A Coruña, 3, 57-91.

QUANTZ, G. 1989. Larvae feeding. En: Ediciós do Castro, Cuadernos de Areas de Ciencias Mariñas, Seminario de Estudos Galegos, Sada, A Coruña, 3, 37-55.

REICHENBACH-KLINKE, H.H. 1982. Enfermedades de los peces. Editorial Acribia, Zaragoza, España, 405-407.

SARGENT, J.R., BELL, M.V. & TOCHER D.R. 1993. Docosahexaenoic acid and the development of brain and retina in marine fish. En: Drevon, C.A., Baksaas, I. & Erokan, H.E. (ed.). Omega-3 Fatty acids: Metabolism and biological effects. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland, 139-149.

SEIKAI, T., TANANGONAN, J., TANAKA, M. 1986. Temperature influence on larval growth and metamorphosis of the Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* in the laboratory. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 52(6), 977-982.

SHEPHERD, C.J., BROMAGE N.R. 1988. Intensive Fish Farming. Blackwell Scientific Publications Ltd, London, U.K., 18 p.



UNIVERSIDAD DE MURCIA
BIBLIOTECA
1995
MURCIA

SILVA, A. 1988. Observaciones sobre el desarrollo del huevo y estadios larvarios del lenguado *Paralichthys microps* (Gunther, 1881). Rev. Lat. Acui., 35, 21-44.

SILVA, A. 1991. Nuevos y seguros pasos en Acuicultura. Peces planos: desarrollo a dos frentes. IV región, la capital de los lenguados. Aquanoticias internacional, 8-19 p.

SILVA, A. 1994. Spawning of the Chilean Flounder *Paralichthys microps* (Gunther, 1881) in captivity. J. World Aqua. Soc, 25, 342-344.

SILVA, A., & FLORES H. 1989. Consideraciones sobre el desarrollo y crecimiento larval del lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1987) cultivado en laboratorio. Rev. Pac. Sur (Número especial), 629-634.

SILVA, A., HENRIQUEZ, C. & MUNITA, C. 1994. Desafío del Lenguado: De Cultivo Experimental pasar a Etapa Piloto. Fundación Chile, AQUA Noticias Internacionales, 22, 42-51.

SORGELOOS, P. 1995. Live food production in aquaculture. Course. Faculty of Sciences, University of Ghent, 36-101.

SORGELOOS, P., DEHASQUE, M., DHERT, P. & LAVENS, P. 1994. Larviculture of marine finfish: the current status. En: Jones (ed.). Infofish International, 4, 49-54.

SORGELOOS, P., DEHASQUE, M., DHERT, P. & LAVENS, P. 1995. Review on present status of marine fish larviculture. En: Calderón, J. & Sorgeloos, P. (eds.). Memorias II Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, 89-93.

STOTTRUP, J.G., GRAVNINGEN, K. & NORSKER, N.H. 1993. The role of different microalgae on the growth and survival of Turbot larvae in intensive cultivation systems. ICES, Mass Rearing Symposium, 28, 1-21.

TANDLER, A., HAREL, M., WILKS, M., LEVINSON, A., BRICKELL, L., CHRISTIE, S., AVITAL, E. & BARR, Y. 1989. Effect of environmental temperature on survival, growth and population structure in the mass rearing of the "gilthead seabream" (*Sparus aurata*). Aquaculture, 78, 277-284.

TOMIYAMA, T. 1984. Fisheries in Japan Flatfish. Japan Marine Products Photo Materials Association, 44-49.

WEBB, J.E., WALLWORK, J.A. & ELGOOD, J.H. 1981. Guide to living fishes. London and Basingstoke, MacMillan Press Ltd, 164 p.

ZUÑIGA, H. & ACUÑA, E. 1992. Larval development of two sympatric flounders, *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) and *Paralichthys microps* (Gunther, 1881) from the Bay of Coquimbo, Chile. Fish. Bull. U.S., 90, 607-620.