

Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos

Civera-Cerecedo, R.¹, Alvarez-González, C.A.² y Moyano-López, F.J.³

¹ Laboratorio de Nutrición Acuícola. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Santa Rita. 23090, La Paz, B.C.S.

México. Correo electrónico: rcivera04@cibnor.mx

² Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas. Carretera Villahermosa-Cárdenas Km 0.5 s/n. 86039, Villahermosa, Tabasco, México.

Correo electrónico: alfonso.alvarez@dacbiol.ujat.mx

³ Departamento de Biología Aplicada, Escuela Politécnica Superior. Universidad de Almería. Edif. CITE IIB, La Cañada de San Urbano, 04120, Almería, España. Correo electrónico: fjmoyano@ual.es

Palabras clave: nutrición, alimentación, larvicultura, peces marinos.

1. Introducción

Es bien conocido que en el ambiente, la supervivencia de las larvas presenta altas fluctuaciones, debido a múltiples factores que provocan valores de supervivencia desde 10% hasta 0.1% (Hempel, 1979). Estos factores se pueden dividir en: 1) factores externos y 2) factores internos. 1) Los factores externos se pueden subdividir en dos grupos: a) los físicos, como la temperatura, la iluminación, el flujo de agua, corrientes, etc., y b) los químicos, como el oxígeno disuelto, el amonio, la salinidad, el pH, etc., que pueden ser considerados algunos de los más limitantes para la supervivencia y crecimiento. 2) En el caso de los factores internos, pueden ser subdivididos en cuatro tipos: a) los genéticos, los cuales son conferidos por los padres a través del material heredado, b) los etológicos, que se relacionan directamente con el comportamiento alimenticio y procesos de escape para evitar ser capturada, c) los biológicos, donde la competencia y depredación rigen su supervivencia, y d) los nutricionales, los cuales conferirán a las larvas la energía necesaria para mantener su metabolismo, crecer y asegurar su supervivencia.

De todos los factores antes mencionados, los relacionados con la alimentación y la nutrición de larvas de peces marinos son los que más afectan la supervivencia y crecimiento de las larvas. Para entender estos factores, podemos definir *la alimentación* como el

proceso de captura e ingesta del material de origen biológico necesario para el funcionamiento de los organismos vivos. Estos compuestos contienen cantidades variables de agua, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales y otros compuestos, incluyendo los que imparten aroma, sabor y color (Bdai, 1988). Mientras que **la nutrición** se define como el proceso por el que los organismos utilizan el alimento para la obtención de la energía para el crecimiento, mantenimiento y reparación de los tejidos (Real Academia de las Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 2001). De esta manera, si se habla de la nutrición y alimentación de los peces, se tiene que considerar como toda una ciencia encargada de determinar los requerimientos y necesidades alimenticias, así como las técnicas de alimentación durante todos los períodos de desarrollo de estos organismos.

En el caso específico del período larvario de los peces, se debe hacer énfasis en los requerimientos mínimos necesarios para asegurar la supervivencia y mantener el crecimiento de las larvas, las cuales presentan una problemática especial al no tener un sistema digestivo completamente formado desde su eclosión, además de que deben atravesar por un proceso de transformación hasta juvenil. Esta problemática se agudiza, ya que durante el período larvario requieren alimentarse con presas vivas de tamaño muy pequeño (Tucker, 1998).

2. Generalidades Sobre el Desarrollo de Peces

En los peces existen dos tipos de ontogenia (Figs. 1 y 2): a) **ontogenia indirecta** (Balon, 1984), que se caracteriza por tener cinco períodos, 1) embrionario, 2) larvario, 3) juvenil, 4) adulto y 5) senectud, y b) **ontogenia directa**, que carece de un período larvario, por lo que al eclosionar el organismo ya presenta todas las características de un juvenil como es el caso de los poecílidos y algunas especies de cíclidos entre otros (Kendall, Ahlstrom, & Moser, 1984).

Es importante resaltar que las siguientes descripciones son aplicadas exclusivamente a los peces que presentan **ontogenia indirecta**, ya que son las especies que presentan una problemática más compleja para su alimentación y nutrición.

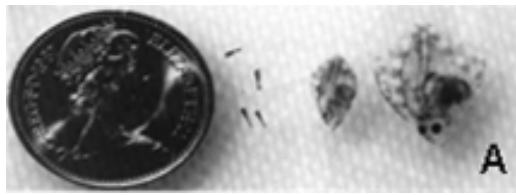


Figura 1. Ejemplos del tipo de ontogenia A. Indirecta (larvas de *Scophthalmus maximus*, Linnaeus 1758); B. Directa (alevines de salmón) (Tomado de Tucker, 1998).

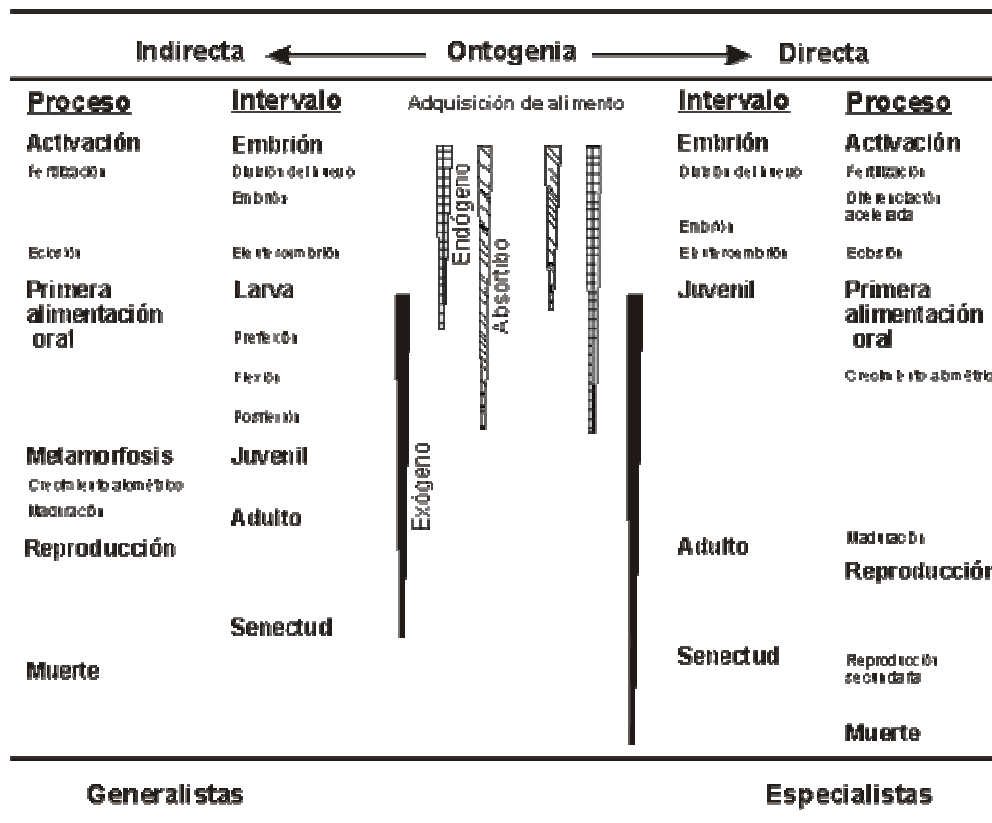


Figura 2. Comparación de los tipos de adquisición del alimento entre la ontogenia indirecta y ontogenia directa (tomado de Balon, 1984).

2.1. Período embrionario. Inicia una vez que el oocito ha sido fecundado y termina cuando la larva ha absorbido completamente el vitelo y glóbulo de aceite. Este período se divide en tres fases: a) la fase de segmentación, que inicia cuando se fecunda el óvulo y termina antes del cierre del blastoporo. La fase embrión, que inicia con el cierre del blastoporo y termina con la eclosión del huevo, y la fase eleuteroembrión (embrión libre),

que inicia con la eclosión del huevo y termina cuando se da la completa absorción del vitelo y glóbulo de aceite (Balon, 1984).

En general, los huevos y eleuteroembriones de la mayoría de los peces marinos presentan características comunes como son: diámetro del huevo pequeño, tiempos de eclosión cortos, presentan un vitelo restringido que dura poco tiempo, por lo que la alimentación exógena tiene que realizarse antes que el organismo este totalmente formado. En el caso de los huevos, las estructuras más importantes son: el corion, que es una capa lipoproteínica que protege al cigoto; el vitelo, que es una reserva de origen materno, la cual contiene glucógeno y de aminoácidos libres, que son usados principalmente como fuente de energía (Fyhn & Govoni, 1995); el glóbulo de aceite, que contiene triacilglicéridos, los cuales son usado como fuente de energía y fuente de ácidos grasos esenciales (Parra, Rønnestad, & Yúfera, 1999); el espacio perivitelino (que contiene fluido), el cual separa el corion del embrión; el micrópilo, que es un poro por el cual el espermatozoide penetra y fertiliza el huevo. Después de la fertilización el huevo absorbe agua, se cierra el micrópilo y se engrosa el corion con lo que inicial el proceso de formación del embrión (Yamamoto & Kobayashi, 1992).

Diámetro del huevo

Entre las diferentes especies, el diámetro del huevo y el tiempo de incubación están directamente relacionadas entre ellas e inversamente relacionados con la temperatura (Pepin, 1991). Los huevos de muchas especies de peces son pequeños en su mayoría, aproximadamente de 0.6 a 20 mm de diámetro, por lo que las especies de peces con afinidad tropical son las que presentan los de menor talla; mientras que las especies con afinidad templada presentan huevos con diámetros mayores (Ware, 1975).

Tiempo de eclosión

Los peces de aguas cálidas usualmente eclosionan entre las 10-48 horas después de la fertilización; sin embargo, las especies de aguas frías con huevos de mayor talla pueden tardar varias semanas o hasta meses para su maduración. Por ejemplo, las larvas de *Siganus guttatus* (Bloch, 1787), requiere de 44.5 h para absorber el vitelo; 47 h para las larvas de *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsskål, 1775), que presenta larvas deficientes en cuanto al desarrollo corporal, capacidad de alimentación y nutrición endógena, por lo cual su crianza es muy complicada y 74 h para las de *Lates calcarifer* (Bloch, 1790), el cual además tiene boca y cuerpo pequeño, pero se alimentan bien y tiene suficiente reserva vitelina por al menos tres días después de que la alimentación exógena se ha iniciado. En el caso de las larvas de *Chanos chanos* (Forsskål, 1775), se compensa la rápida absorción (12 h) con la presencia de una boca grande (258 μm de ancho), la cual facilita la alimentación. Las larvas de *Siganus canaliculatus* (Park, 1797), tienen vitelo para dos días y el glóbulo de aceite está presente cuando inician la alimentación exógena, aunque la boca es muy chica (187 μm de ancho) (Lim, 1991).

2.2. Período larvario. El período larvario comprende tres fases, la fase preflexión que inicia a partir de la completa absorción de las reservas endógenas y termina hasta antes del inicio de la flexión de la notocorda. La fase flexión, inicia a partir de la flexión de la notocorda y termina hasta la completa formación de la placa hipúrica. La fase posflexión, que inicia al estar completamente formada la placa hipúrica y termina con la completa formación de los elementos de las aletas pares e impares. En esta fase, la larva está casi completamente formada, aunque todavía no presenta todas las características morfológicas finales de un juvenil; sin embargo, su capacidad de búsqueda y captura es total y puede alimentarse de presas de mayor talla (Kendall *et al.*, 1984).

Desde el punto de vista de la alimentación, la larva se enfrenta a la necesidad de aprender a cazar con rapidez y que además se complica aun más ya que no tienen un sistema digestivo completamente formado. Durante este período, el desarrollo del canal alimentario abarca cambios morfológicos, fisiológicos e histológicos que están sincronizados por procesos genéticos y ambientales (Fig. 3).

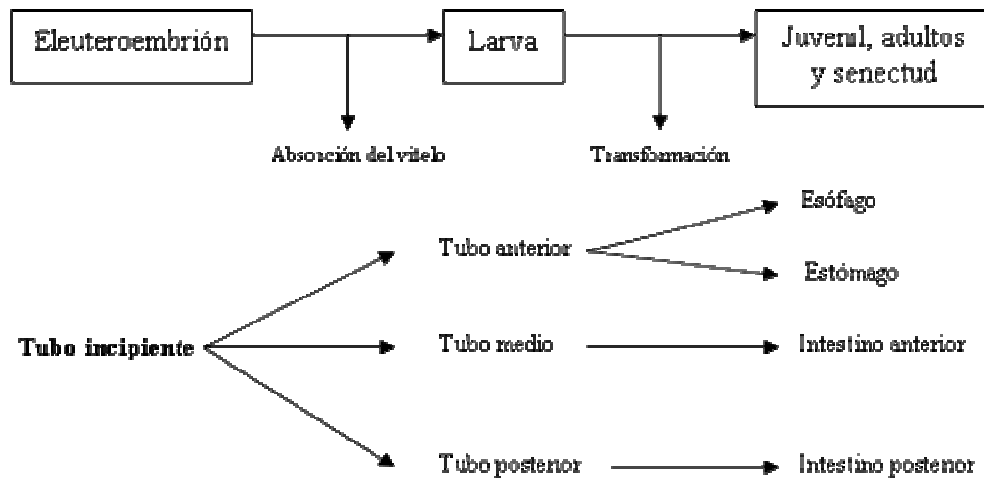


Figura 3. Derivación, secuencia y secciones del sistema digestivo durante la ontogenia de peces (tomado de Govoni *et al.*, 1986).

Inicialmente, el canal alimentario se desarrolla a partir de las células columnares endodérmicas por arriba de la sección del vitelo (Devillers, 1961). Al eclosionar, el canal alimentario es un tubo recto que pasa por encima del saco vitelino y está cerrado hacia la boca y ano en muchas especies; además, es histológicamente indiferenciado a lo largo del tubo (Vu, 1976). El tubo incipiente permanece sin cambios hasta la completa absorción del vitelo y el glóbulo de aceite, en este momento el tubo se segmenta por válvulas musculares en bucofaringe, tubo anterior, medio y posterior (Govoni, 1980; O'Connell, 1981). Con excepción de algunos peces, entre ellos salmónidos, gasteroidéos y cíclidos, la mayoría de los peces carecen de un estómago morfológicamente funcional; la región posterior del tubo anterior y del tubo medio puede expandirse y funcionar para almacenar el alimento en algunas larvas.

El canal alimentario larval permanece indiferenciado durante cierto tiempo hasta el inicio de la transformación a juvenil. El desarrollo de un estómago y ciegos pilóricos de la parte posterior del tubo anterior se da durante la transformación a juvenil y constituye el último cambio morfológico del canal alimentario. El hígado y páncreas, a lo largo de los

conductos, están formados desde la eclosión y son funcionales aún cuando la absorción del vitelo no ha concluido (O'Connell, 1981; Watanabe & Sawada, 1985).

Morfológicamente, en el intestino anterior es posible distinguir un epitelio formado por una capa sencilla de células intercaladas con células secretoras de mucus, en tanto que en el intestino medio y posterior existe una capa sencilla de células provistas de borde estriado (microvellosidades) y sujetas por tejido conectivo. La parte anterior comprende el 60-75% de la longitud. En cuanto al segundo segmento, las células absorptivas muestran vacuolas supranucleares electrodensas procedentes de procesos de pinocitosis de proteínas. El tercer segmento intestinal representa un 5% de la longitud intestinal y dadas las características de sus enterocitos (menor cantidad de microvellosidades) parece intervenir principalmente en procesos de recuperación de agua e iones (Govoni, Boehlert, & Watanabe, 1986).

Desde el punto de vista anatómico, se dan fuertes cambios durante períodos específicos en la vida de las larvas, estos cambios se correlacionan con el crecimiento alométrico que se ha observado en muchas especies de peces. En las larvas de perca amarilla *Perca flavescens* (Mitchill, 1814) (Fig. 4), se observa la formación del estómago a los 10 mg (14 mm de longitud total), en este momento los cambios se hacen menos evidentes y para los 800 mg (28 mm de longitud total) el tracto digestivo ya no cambia en lo absoluto (Dabrowski, Culver, Brooks, Boss, Binkowski, Yeo, & Baloguin, 1991). En el caso de las larvas de *Brama brama* (Bonnaterre, 1788) y brema roja *Pagrus major* (Temminck & Schlegel, 1843) tardan aproximadamente tres semanas en completar su desarrollo, seis semanas para el *Chanos chanos*, tres semanas para *Morone saxatilis* (Walbaum, 1792), siete semanas para el lenguado *Paralichthys dentatus* (Linnaeus, 1766), catorce semanas para el *Plecoglossus altivelis* (Temminck & Schlegel, 1846) y un mes para la lobina Europea *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (Kurokawa & Suzuki, 1996; Huang *et al.*, 1998a y b; Watanabe & Kiron, 1994; Gennari, Roncarati, Melotti & Mordenti, 1992).

Por otra parte, en las larvas de peces herbívoros, los cambios anatómicos en el sistema digestivo se dan de forma diferente comparados con las larvas de peces carnívoros, como se

observa en el *Melanogrammus aeglefinus* (Linnaeus, 1758), donde las constricciones para la separación de los diferentes órganos comienza en el día 3 DE. La torsión del intestino en el día 22 DE, la aparición de los ciegos pilóricos en el día 34 DE y la formación final del tracto digestivo (como la de los adultos) para el día 51 DE (Hamlin, Von Herbing, & Kling, 2000) (Fig. 5).

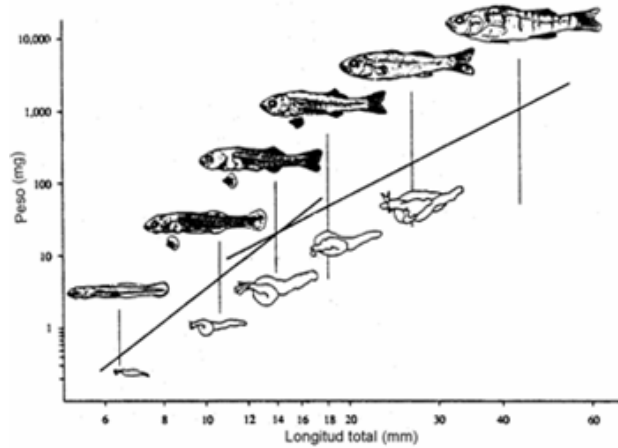


Figura 4. Crecimiento alométrico longitud-peso de *Perca flavescens*, y esquematización del crecimiento y cambios del tracto digestivo hasta su transformación a juvenil.

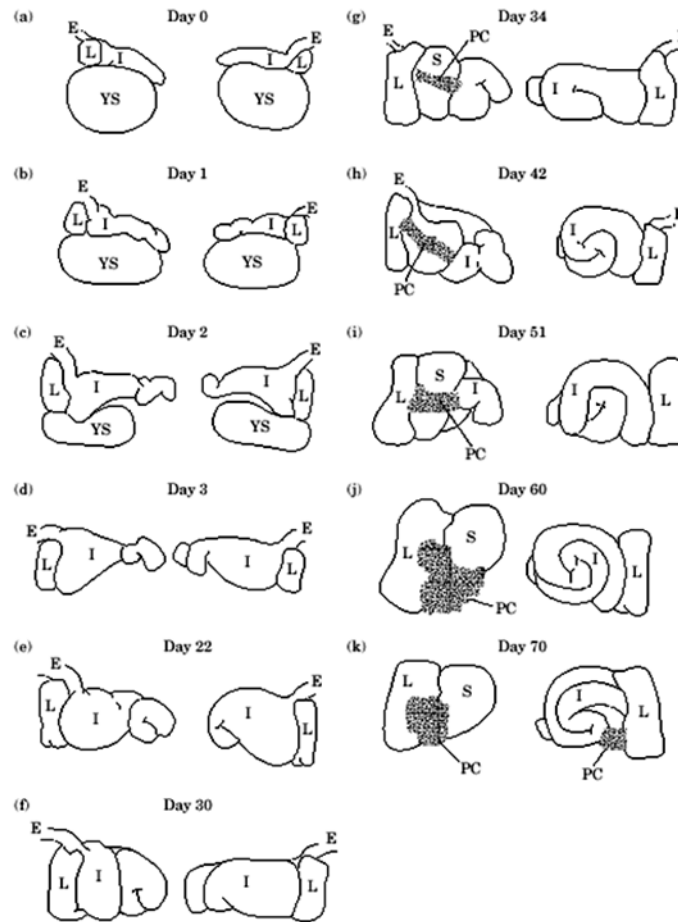


Figura 5 a–k. Desarrollo intestinal de *Melanogrammus aeglefinus* durante la ontogenia inicial. El diagrama izquierdo de cada par, representa la vista lateral del lado izquierdo del intestino y estructuras asociadas, y el diagrama derecho representa la vista lateral del lado derecho. E, Esófago; I, Intestino; L, Hígado; PC, ciegos pilóricos; S, Estómago; YS, Vitelo (Tomado de Hamlin *et al.*, 2000).

Dabrowski (1982), a efectos prácticos, estableció tres categorías de peces en función del desarrollo del sistema digestivo. En un primer grupo, consideró a aquellos que al comienzo de su primera alimentación exógena presentan un estómago funcional, con lo que se puede iniciar la alimentación de estas especies directamente con alimento inerte como en el caso de los salmónidos y algunos cíclidos. En el segundo grupo, aquellos en los que el estómago aparece más tardíamente, una vez iniciada la alimentación exógena, existiendo incluso en algunas especies cierto desfase entre su aparición y funcionalidad, donde se engloban la

mayoría de los peces marinos (Lauff & Hoffer, 1984). 3) En el tercer grupo, se incluyen los peces que permanecen sin estómago a lo largo de toda su vida, como los ciprínidos, siendo común durante el desarrollo larvario un incremento de la longitud del intestino.

La mayoría de las larvas de peces marinos con afinidad tropical pertenecen al tipo 2, siendo las formas funcionales e independientes más pequeñas de los vertebrados, por lo que poseen tasas de crecimiento muy elevadas (hasta mil veces, partiendo de escasas decenas de microgramos en peso seco) y una progresiva diferenciación durante la etapa larvaria hasta completar el desarrollo de sus órganos y funciones en las fases juvenil y adulta (Blaxter, 1988). Para llevar a cabo con eficiencia todos estos cambios, la larva debe estar capacitada para 1) *ingerir el alimento* (búsqueda y captura), que involucra procesos de atrapar y degluir la presa y procesar el alimento, 2) *la digestión*, donde se deben entender los procesos que permiten poner a disponibilidad los nutrientes, y finalmente 3) *la absorción de nutrientes*, que involucra los procesos de transporte al interior de las células, para continuar con la digestión intracelular y su posterior resíntesis para ser utilizados en otras partes del cuerpo.

3. Alimentación y Nutrición de Larvas de Peces Marinos

3.1. La alimentación natural

En el ambiente la alimentación de las larvas de peces marinos se compone de complejas redes tróficas que van cambiando en función del crecimiento (Fig. 6). La alimentación se basa en diatomeas, dinoflagelados, flagelados, tintínidos, ciliados, cladóceros, copépodos, huevos de bivalvos, quetognatos, lamelibranquios, gastrópodos, poliquetos, decápodos, otras larvas de peces, entre muchos otros tipos de organismos (Blaxter & Hunter, 1982; Kane, 1984; Jenkins, 1987; Fortier & Harris, 1989; Heat *et al.*, 1989; Ozawa *et al.*, 1991; Sánchez-Velázco & Norbis, 1997). Es por esto, que para que las larvas aseguren su supervivencia deberán seleccionar una presa de tamaño adecuado y de movimiento lento; además que esta presa una vez ingerida sea fácil de digerir y que cubra sus requerimientos

nutricionales mínimos. La mayoría de las larvas de peces son cazadores planctónicos visuales sin importar los hábitos alimenticios que tendrán cuando sean adultos (herbívoros, filtradores, carnívoros pelágicos, omnívoros bentónicos) (Hunter, 1981). En algunas especies, los cambios en la dieta son requeridos al ir incrementando el tamaño del organismo; por ejemplo, las larvas de anchoa Californiana *Engraulis mordax* (Girard, 1854), que se alimentan con dinoflagelados muestran bajos crecimientos hasta que la dieta se les cambia (Hunter, 1977). Desde el punto de vista de la alimentación, las larvas usualmente de menor talla y más delicadas, requieren alimento vivo entre tres y cinco semanas después de la eclosión (en algunas ocasiones más de ocho semanas). Para algunas especies la desventaja de una talla pequeña, puede ser compensada modificando otros factores como el tamaño de la boca, tipo de dentición o que las larvas se desarrollen donde exista una gran abundancia y diversidad de presas. A excepción de algunos peces de agua dulce, la mayoría de las larvas de peces marinos desarrollan la habilidad de capturar y digerir presas zooplanctónicas. Por ejemplo, las larvas de *Coryphaena hippurus* (Linnaeus, 1758) son muy grandes, siendo depredadores activos al momento de la primera alimentación (Kraul, 1993).

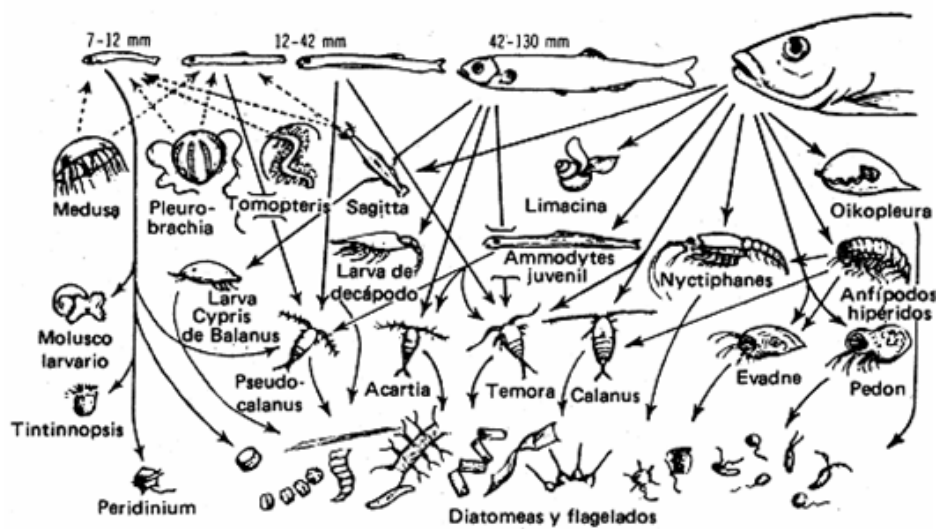


Figura 6. Resumen diagramático de las relaciones alimenticias de *Clupea harengus* durante su desarrollo (tomado de Lagler *et al.*, 1984).

Para muchas larvas, los copépodos son probablemente las presas principales, y aparentemente, los de mejor calidad nutricional (May, 1974). Sin embargo, en cultivo la ingestión se ha restringido a un grupo muy reducido de presas, con las cuales tratan de cubrir los requerimientos nutricionales para larvas de peces marinos; estos alimentos son:

- a) Microalgas. (2-20 μm) Las microalgas más empleadas para la alimentación de las presas y control de la calidad de agua en los sistemas de cultivo son: *Chlorella vulgaris*, *Tetraselmis* spp., *Isochrysis galvana*, *Monochrysis lutheri*, *Nannochloris* sp, etc., ya que tienen gran potencial para formar cultivos con abundante biomasa, tamaño celular, digestibilidad y valor nutricional (Muller-Feuga, 2000) (Fig. 7).

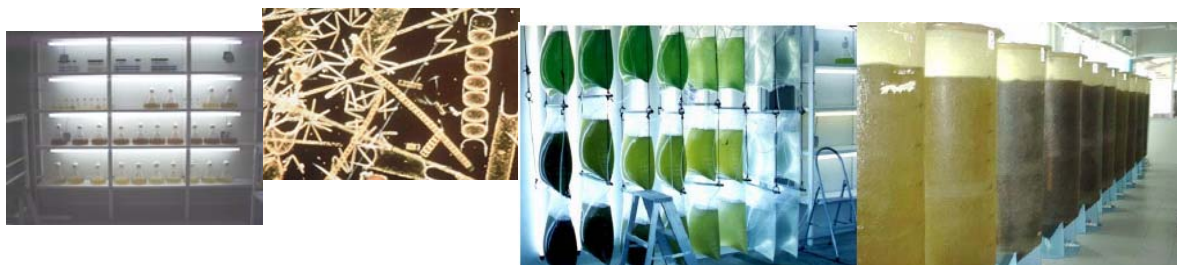


Figura 7. Cultivo de microalgas en bolsa y en tolva.

- b) Rotíferos (*Brachionus plicatilis*) (50-250 μm). Generalmente, son usados como el primer alimento para las larvas de peces marinos (Fukusho, 1989), ya que el tamaño de la boca (100-400 μm) no les permite capturar presas mayores. Se cultivan a base de microalgas o con levadura de pan, y realizando su enriquecimiento a base de emulsiones lipídicas comerciales, asegurando así un incremento en el nivel de ácidos grasos altamente polinsaturados de la serie n-3 (Léger *et al.*, 1989) (Fig. 8).

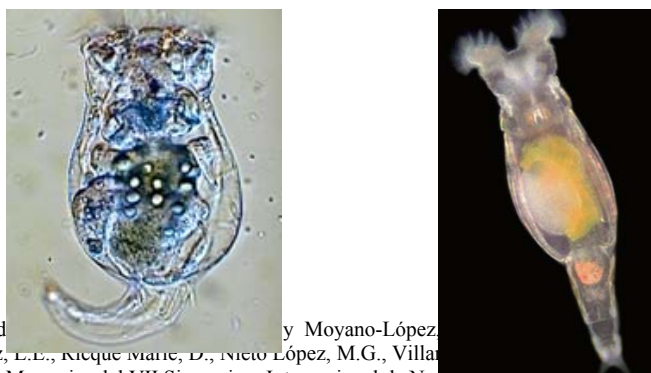


Figura 8. Cultivo de rotíferos.

Crustáceos (*Artemia spp.*) (200-500 μm). Este microcrustáceo representa, en la escala trófica de las larvas de peces marinos, la etapa sucesiva al rotífero; además constituye el nexo con la alimentación a base de dieta inerte. No es necesario mantener un cultivo auxiliar para esta fase, ya que se almacena durante bastante tiempo enquistado. Sin embargo, durante el crecimiento de las larvas es necesario adicionar este crustáceo en estadios posteriores, por lo que su cultivo se complica (Sorgeloos *et al.*, 2001) (Fig. 9).

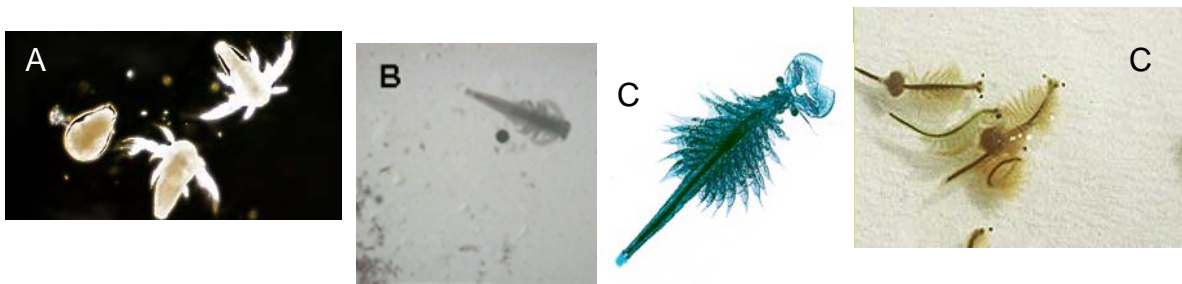


Figura 9. Cultivo de Artemia. A) Nauplio, B) Juvenil y C) Adultos de *Artemia spp.*

c) Copépodos. Los copépodos son el alimento natural de la mayoría de las larvas de peces y comprenden un gran número de especies. De todas esas especies las utilizadas actualmente son los copépodos calanoideos y algunos harpacoideos (*Tigriopus japonicus*, *Tisbe furcata*, *Acartia sp.* y *Euterpina acutifrons*), los cuales están siendo cultivados (Støttrup & Norsker, 1997; Nanton & Castell, 1998; Schipp *et al.*, 1999). Las ventajas que presentan estos organismos comparados con los rotíferos y la *Artemia sp.*, es que contienen todos los nutrientes esenciales que las larvas requieren, por lo que no necesitan ser enriquecidos. Sin embargo, presentan limitaciones ya que estos organismos presentan ciclos de vida largos, comparados con los otros alimentos vivos, además se debe tener cuidado con la selección de la especie de copépodo, ya que una selección errónea conllevaría a disminuir la posibilidad de su captura por parte de la larva (Fig. 10).

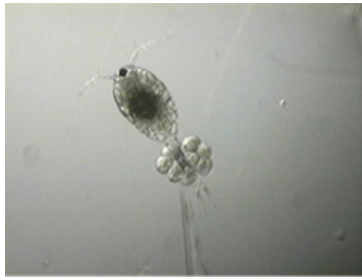


Figura 10. Cultivo de copéodos

Todos estos alimentos, tanto los naturales como los utilizados para el cultivo, deben cubrir la mayor cantidad de una serie de requisitos mínimos los cuales permitirán asegurar la supervivencia y el crecimiento de las larvas. Las características más importantes del alimento son: 1) disponibilidad, 2) densidad, 3) apariencia, 4) tamaño, y 5) estímulo químico por el alimento, aunque esto variará en función de la especie.

3.2. La captura del alimento

3.2.1. Disponibilidad En el caso de los alimentos naturales, las larvas deben de localizarse en el sitio adecuado para encontrar la suficiente cantidad de presas. Por otra parte, en el caso de los rotíferos y *Artemia*, estos poseen fototropismo positivo y tienden a acumularse cerca de las zonas más luminosas y por ende su disponibilidad no es uniforme, por lo cual se recomienda asegurarse de que la iluminación de los tanques sea homogénea. Asimismo, el color de los tanques también tiende a afectar de la misma manera la distribución de las presas. (Papoutsoglou, 2000).

3.2.2. Densidad La densidad de presas usada para el cultivo de larvas de peces marinos varían entre 0.05 copéodos/ml (Houde & Schekter, 1980) a 200 dinoflagelados/ml (Hunter, 1980 y 1984). Las densidades usuales fluctúan entre 100 dinoflagelados/ml, 5-20 rotíferos/ml, 1-10 nauplios de copéodo/ml, 0.5-6 nauplios de *Artemia* y 0.5-3 copéodos adultos; aunque esto variará dependiendo de la especie, por lo que estas densidades deben

ser cuidadosamente estudiadas y controladas ya que si son excedidas la calidad del agua se deteriorará rápidamente, o por el contrario, si la densidad es baja no habrá suficientes presas para alimentar a todas las larvas; en ambos casos se reflejará esto en la supervivencia y crecimiento de ellas (Cunha & Planas, 1999).

El cálculo de la densidad de alimento vivo es meramente teórico, ya que las presas tienden a agruparse en manchones en posiciones específicas dentro del tanque, lo que reduce considerablemente la densidad en algunas zonas y la aumenta en otras; esta es la situación real en el cual las larvas deben alimentarse. Por estas razones, la larva debe eficientizar al máximo su red de captura de alimento. Cuando la densidad de larvas es baja tiende a haber un efecto adverso sobre ellas, donde al excederse la densidad de alimento resultará en una sobrealimentación, la cual provocará problemas en la eficiencia de la digestión, sobre todo antes de la transformación y por ende provocará altas mortalidades en larvas aparentemente sanas y con presas en el sistema digestivo (Glasser & Oswald, 2001).

La densidad de presas puede ser un factor muy apremiante para larvas con menor capacidad de natación. Gulbrandsen (1991), ha reportado concentraciones óptimas de 12 rotíferos/ml para larvas de halibut del Atlántico *Hippoglossus hippoglossus* (Linnaeus, 1758); mientras que para larvas de *Scophthalmus maximus* se reportan densidades óptimas de 1 rotífero/ml (Hagen, 1993). Las larvas de dorada *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) de 15 días de edad requieren al menos 5 rotíferos/ml (Ounaïs-Guchemann, 1989). El crecimiento y supervivencia de las larvas de *Macquaria novemaculeata* (Steindachner, 1866) fueron las mayores utilizando densidades de 9-15 rotíferos/ml y 9 nauplios/ml (Van der Wal & Nell, 1986). Las larvas del pargo *Lutjanus argentimaculatus* (Forsskål, 1775) fueron exitosamente cultivadas utilizando densidades de 5-20 rotíferos/ml (Duray *et al.*, 1996). Con larvas de *Coryphaena hippurus*, se alcanzaron mejores supervivencias cuando fueron alimentadas a una densidad de 5-20 rotíferos/ml (Ostrowski, 1989).

3.2.3. Apariencia. Muchas larvas de peces marinos no pueden ver adecuadamente aunque nadan relativamente bien, y capturan su alimento entre el primer y séptimo día después de

la eclosión. Los ojos usualmente se pigmentan y son funcionales para la primera alimentación (Blaxter, 1986). Los sentidos del gusto y el olfato se desarrollan tempranamente entre la eclosión y los 16 días después de la eclosión (Iwai, 1980). El color del tanque juega un papel importante en este punto, ya que tanques con paredes negras y fondos claros incrementan la capacidad de visión de las larvas, además facilitan a los criadores ver las larvas. Las larvas de *Dicentrarchus labrax* crecieron y sobrevivieron mejor en tanques con paredes negras que los blancos, el color negro permite mejorar el contraste de las presas y ser más fácilmente encontradas y capturadas (Ronzani-Cerqueira, 1986). De la misma manera, las larvas de *Sparus aurata* crecieron y sobrevivieron mejor cultivadas en tanques de color negro (Ounaïs-Guschemann, 1989).

3.2.4. Tamaño. El tamaño óptimo del alimento para las larvas de peces marinos, parece ser adecuada cuando la presa mide aproximadamente 25 % del ancho de la boca, para la primera alimentación y se debe incrementar al 50 % conforme los días pasan (Hunter, 1984). En un experimento utilizando larvas de *Sparus aurata*, se determinó que el ancho de la boca fue de ~ 250 µm pudiendo comer micropartículas menores a 100 µm de preferencia en un intervalo entre 25 y 50 µm (Fernández-Díaz *et al.*, 1994). Shiota (1970) estudió 40 especies de larvas de peces marinos a fin de comparar el ancho de la boca y la relación con las presas ingeridas; en este estudio se demostró que dependiendo de la especie, la ingesta de rotíferos, *Artemia*, copépodos, etc., varía en relación del tamaño de las larvas. Algunos ejemplos del diámetro de la boca al momento de la apertura de la boca son: ~ 278 µm para el *Dentex dentex* (Linnaeus, 1758), ~ 420 µm para el *Diplodus prayensis* (Cadenat, 1964) (Glamuzina *et al.*, 1989). Es por esto que en condiciones de cultivo el rotífero es considerado como el primer alimento ya que es de tamaño pequeño y puede ser cultivado fácilmente (Lubzens, 1987).

Usualmente, existen dos formas para cubrir los requerimientos de las larvas, 1) ofrecer la cepa de rotífero que sea adecuado al tamaño de la boca, debido a que el ancho de las hembras de rotífero adultas varía entre 92-199 µm (Snell & Carrillo, 1984) y 2) separar los

neonatos o huevos de los rotíferos de cepas mayores para darlos como primer alimento (80-
Civera-Cerecedo, R.¹, Alvarez-González, C.A.² y Moyano-López, F.J.2004. Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. 23
In: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. 2004. Avances en Nutrición
Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora,

110 μm). Es importante resaltar que además de estas formas, al variar las condiciones ambientales de cultivo de las cepas, el tamaño, forma y cantidad de rotíferos producidos, hasta el grado que se pueden obtener machos que son de mucho menor talla que las hembras (aproximadamente 50 % menores), pero los cuales no cubren los requerimientos nutricionales (Lubzens *et al.*, 1989).

La *Artemia* es otro organismo ampliamente usado para el cultivo de larvas de peces marinos ya sea como primer o segundo alimento dependiendo de la especie. En primer lugar se utilizan los nauplios que tienen en promedio 350 μm de longitud dependiendo del origen de la cepa. Fernández-Díaz *et al.* (1994) usó una cepa de *Artemia* que mide 176 x 451 μm . Otros intervalos de talla varían de 375 a 428 μm para la cepa de San Francisco Bay, y otra que varía de 450 a 517 μm de Italia (Léger *et al.*, 1986). La longitud de los metanauplios se incrementa de 500 a 800 μm durante los cuatro estadios, lo cual ocurre en aproximadamente 0.5 a 5 días después de la eclosión (Bengston *et al.*, 1991). Orhum (1989) reportó que los nauplios de la Bahía de San Francisco son de aproximadamente 428 μm de longitud, mientras que los metanauplios miden 578 y 679 μm dependiendo del estadio.

3.2.5. El estímulo químico por el alimento. Se ha demostrado histológicamente que las larvas de *Pagrus major* presentan órganos olfatorios desde los 8 días después de la eclosión y requiere 16 días para formar las células gustativas. Las larvas de *Hippoglossus hippoglossus* abren la boca hasta el día 26 después de la eclosión, sin embargo, se detectó la presencia de células olfatorias desde el día 8 (Doving & Knutsen, 1993). Así, se ha discutido que la presencia de órganos sensoriales (gusto y olor) no están totalmente desarrollados en muchas de las especies durante los primeros días, por lo que se ha propuesto que el primer estímulo de alimentación es el movimiento y tamaño de las presas, aunque sin descartar del todo el estímulo químico. Bajo condiciones de cultivo, al utilizar alimentos completos (micropartículas o microcápsulas), los estímulos olfatorios y gustatorios pueden ser útiles y hasta esenciales, como se ha comprobado para juveniles de *Seriola dumerili* (Risso, 1810), donde la adición de aminoácidos libres (prolina, alanina,

metionina y monofosfato de inosina) incrementa el crecimiento y consumo (Masuma *et al.*, 1990). Lo anterior es debido a que las larvas, al no tener un sistema digestivo completo, tienen una capacidad limitada para poner a disposición los aminoácidos libres a partir de los aminoácidos polimerizados, por lo que alimentos que contiene ciertas concentraciones de aminoácidos libres pueden ser absorbidos con mayor facilidad que aquellos que contienen proteínas complejas (Rønnestad *et al.*, 1999).

3.3. La digestión del alimento.

3.3.1. El tránsito digestivo

Una vez que la larva ha capturado a la presa, tiene que mantenerla dentro del sistema digestivo durante un tiempo determinado para que empiece el proceso de digestión; de esta manera se han realizado estudios sobre la capacidad peristáltica y las tasas de evacuación en el canal alimentario de las larvas. Estos procesos han sido estudiados de manera gruesa en larvas vivas (Blaxter & Hempel, 1961; Chitty, 1981; Pedersen, 1984), aunque también se ha utilizado el método de recolección de heces de las larvas, aunque sin mucho éxito. Por otra parte, se han conseguido mejores aproximaciones de las tasas de evacuación alimentando a las larvas con dietas marcadas y alternando con dieta sin marcar (Laurence, 1971). Otro método utilizado es el marcaje radioactivo del alimento.

El paso del alimento a través del canal alimentario de las larvas de peces ocurre más rápidamente que en el digestivo de los adultos (Kapoor *et al.*, 1975; Fange & Grove, 1979). Tasas extremadamente rápidas han sido observadas con algunas larvas de clupeidos. Por ejemplo, las larvas de *Anchoa mitchilli* (Valenciennes, 1848), defeca unos minutos después de alimentarse (Chitty, 1981). Las larvas de *Melanogrammus aeglefinus* defecan de 1 a 2 horas después de la ingestión. Además, se ha observado que la edad de las larvas no afecta la tasa de evacuación (Pedersen, 1984). Las tasas de evacuación son mayores en larvas alimentadas continuamente que en las larvas que solamente se alimentan una sola vez (Blaxter, 1965; Laurence, 1971) y están positivamente relacionadas al tamaño de la ración

(Werner & Blaxter, 1980). Estas tasas están también positivamente relacionadas con la temperatura (Laurence, 1971). En algunos casos, la digestión y absorción en las larvas es muy rápida. Fossum (1983) observó que la digestión de los nauplios de copépodos y larvas de poliquetos se realizó 1.5 h después de la ingestión en larvas de *Clupea harengus*. Govoni *et al.* (1982) observaron la eliminación de $^{14}\text{CO}_2$ después de 3 h de la ingestión de alimento marcado con ^{14}C , lo que indicó que el alimento fue digerido, absorbido y metabolizado en un corto período.

Se han observado constricciones de la capa simple de músculo circular suave, que progresivamente se mueven como olas a efecto de lograr el movimiento peristáltico y transportar el alimento hacia el ano de la larva; esto se ha detectado en *Brevoortia tyrannus* (Latrobe, 1802), *Leiostomus xanthurus* (Lacepède, 1802) y *Sebastes spp.* Blaxter (1969) y Rosenthal & Hempel (1970) han reportado que los nauplios de *Artemia* se mueven rápidamente y no son digeridos en el tubo medio de las larvas de *Clupea harengus harengus*. En contraste, se ha observado que los copépodos ingeridos pasan a través del tubo anterior de la sardina en segundos, permanecen algunos minutos en la parte anterior del tubo medio y se detienen en la parte posterior del tubo medio por acción de la válvula iliocloacal. Los copépodos permanecen en la parte posterior del tubo medio por varias horas. Las constricciones de la válvula iliocloacal son las que permiten el paso del alimento del tubo medio al tubo posterior.

Las larvas de peces carecen de capas de músculos suaves longitudinalmente alineados, que son característicos en peces adultos, pero algunas tienen medios auxiliares para transportar el alimento. Iwai (1964, 1967a y b), Iwai & Rosenthal (1981) y Watanabe (1984b) han observado células ciliadas y movimientos ciliares que permiten el transporte de alimento por el canal de algunas larvas de plecoglosoideos, osméricos, clupeidos y salángidos. Las células ciliadas han sido también observadas en algunos peces adultos que presentan un desarrollo muscular pobre (Ferraris & Ahearn, 1984).

3.3.2. La bioquímica digestiva

Una vez que las reservas de aminoácidos libres se han agotado totalmente, se debe iniciar con la alimentación exógena y la larva tiene que aprender a comer rápidamente. Sin embargo, estos organismos presentan desventajas ya que fisiológicamente el sistema digestivo no está completamente desarrollado, por lo que la actividad enzimática es restringida y se eficientiza hasta que se ha formado totalmente el sistema digestivo (formación del estómago y glándulas gástricas) y se da la secreción de ácido clorhídrico y la pepsina (Walford & Lam, 1993). La tripsina es considerada una enzima clave ya que activa otras proteasas pancreáticas. La actividad relativa y el contenido de enzimas tipo tripsina se incrementan durante la primera alimentación, luego disminuyen para mantenerse bajos hasta la transformación a juvenil, cuando el estómago se vuelve funcional (Hjelmeland *et al.*, 1984, 1988; Pedersen *et al.*, 1987; Pedersen & Hjelmeland, 1988; Hjelmeland, 1995). Además se cuenta con datos actuales sobre la actividad enzimática (leucina aminopeptidasa y alanina-leucina peptidasa) de las células del borde de cepillo (Cahu & Zambonino-Infante, 1997) que reportan que la secreción de estas enzimas está relacionada al tipo de alimento ingerido. A modo comparativo, la secreción de estas enzimas cuando se alimenta a las larvas con alimentos inertes es baja, mientras que al suministrar presas vivas la secreción aumenta. Así, el tubo digestivo de larvas de peces tiene una limitada habilidad extracelular para digerir moléculas de alto peso molecular, particularmente polímeros complejos y largos como las proteínas.

Una de las primeras aproximaciones para determinar la capacidad digestiva de las larvas ha sido a través de los estudios de ontogenia y caracterización enzimática, que permiten comprender en que momento las larvas presentan un equipo enzimático completo, y por consiguiente tiene la habilidad de digerir eficientemente el alimento. La capacidad digestiva de las larvas, dependerá en gran medida de la maquinaria enzimática con la que cuentan. Las enzimas se encuentran en todo el sistema digestivo, ya sea en el lumen o en las células epiteliales, también llamadas enterocitos. Existen dos principales tipos de enzimas, 1) las enzimas citosólicas, principalmente peptidasas encontradas en el citoplasma celular, y 2)

las de la membrana del borde de cepillo, que están ligadas a la membrana celular. Se pueden detectar diferentes tipos de enzimas membranales como peptidasas, disacaridasas y esterases. Estas enzimas encontradas en el tracto gastrointestinal son frecuentemente complementarias, estos procesos enzimáticos dirigen la digestión total de los componentes dietarios en nutrientes para permitir su absorción y transporte por los enterocitos (Zambonino-Infante & Cahu, 2001).

Las enzimas digestivas de las larvas de peces han sido estudiadas usando las actividades enzimáticas de tejidos homogenizados contra sustratos disueltos (Tanaka *et al.*, 1972a; Kawai & Ikeda, 1973a y b; Dabrowski, 1982) con lo que los productos de reacción o la desaparición del sustrato son medidos fotométricamente. También se puede probar la actividad enzimática de las secciones de los tejidos contra películas de sustrato, observando la desaparición del sustrato con microscopía luminosa después de una tinción histoquímica (Szlaminska, 1980; Vu, 1983). La actividad amilasa, maltasa, tripsina, quimotripsina y aminopeptidasa han sido evaluadas en tejidos homogenizados: La actividad amilasa, pepsina, tripsina, quimotripsina y lipasa han sido medidas en películas de sustrato., mientras que la actividad tripsina y tripsinógeno han sido realizadas por medio de radioinmunoensayos (Govoni, 1980).

Los primeros ensayos enzimáticos en el canal alimentario de larvas de peces, se realizaron de forma puntual y no en relación a los cambios morfofisiológicos, éstos indican la presencia de varios tipos de enzimas activas que están presentes en muchas larvas de peces marinos y de agua dulce (Tabla 1).

Tabla 1. Actividades enzimáticas digestivas reportadas para larvas de peces. Signo positivo (+) indica presencia, signo negativo (-) indica ausencia y (NE) indica no ensayado.

Especie	Tiempo total (días)	Pepsina	Tripsina	Quimo-tripsina	Amino-peptidas a	Lipas a	Amilas a	Maltas a	Referencia
<i>O. mykiss</i>	2-110	NE	+	+	+	NE	NE	NE	Lauff & Hoffer, 1984
<i>O. mykiss</i>	2-66	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	Dabrowski, 1982
<i>O. mykiss</i>	0-60	+	+	NE	NE	NE	+	+	Kawai & Ikeda, 1973a
Híbridos de <i>Coregonus</i>	2-130	NE	+	+	+	NE	NE	NE	Lauff & Hoffer, 1984
<i>Coregonus pollan</i>	2-42	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	Dabrowski, 1982
<i>Plecoglossus altivelis</i>	2-30	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	Tanaka <i>et al.</i> , 1972a
<i>Exos lucius</i>	18 d	+	+	NE	NE	-	-	NE	Szlaminska, 1980
<i>Cyprinus carpio</i>	0-125	+	+	NE	NE	NE	+	+	Kawai & Ikeda, 1973b
<i>Gadus morhua</i>	0-30	NE	+	NE	NE	NE	NE	NE	Hjelmeland <i>et al.</i> , 1983
<i>Acanthopagrus shlegelii</i>	0-35	+	+	NE	NE	NE	+	NE	Kawai & Ikeda, 1973b
<i>Dicentrarchus labrax</i>	0-30	+	+	+	NE	NE	NE	NE	Alliot <i>et al.</i> , 1977

Por ejemplo, en el caso de las lipasas de larvas, se ha observado que el hígado y el epitelio mucoso son la fuente general de esta actividad al observarse zimógenos granulares por medio de técnicas histológicas, los cuales son los precursores de dicha actividad (Kapoor *et al.*, 1975). El páncreas está bien desarrollado al momento de la eclosión y sus células acinares, han sido investigadas por la presencia de zimógenos granulares, ya que se piensa que son los precursores de la actividad tripsina y quimotripsina (O'Connell, 1976; Govoni, 1980). La aminopeptidasa que es otra enzima secretada por las células epiteliales de la mucosa, no tiene clara evidencia de la presencia de zimógenos. La pepsina es una enzima secretada por la mucosa gástrica y no se detecta claramente en aquellos peces que carecen

de estómago, al menos hasta que las glándulas gástricas han aparecido y el estómago se convierte en funcional durante la transformación (Alliot *et al.*, 1977; Vu, 1983).

Existen algunos indicios de que las enzimas digestivas presentan baja actividad desde la primera alimentación durante el período larvario y hasta la transformación a juvenil. Kawai & Ikeda (1973a) observaron que la actividad amilasa, maltasa y tripsina se incrementó en las larvas después de la absorción del vitelo. En contraste, Hjelmeland *et al.* (1983) observaron que después de un incremento inicial de la actividad tripsina y quimotripsina entre la eclosión y la absorción del vitelo, ambas actividades fueron decreciendo paulatinamente hasta el día 14 hasta ser muy bajas, para después volverse a incrementar. En otro caso, Lauff & Hoffer (1984), encontraron que la actividad tripsina exógena fue estimulada a pH 9 en el tubo posterior de las larvas de *Coregonus spp.*, además de contribuir de manera importante a la actividad trípica total. La estimulación enzimática no ha sido observada, pero sí el deterioro de los zimógenos granulares pancreáticos y de la actividad proteolítica en el canal alimentario de las larvas en inanición, lo que implica que la producción de enzimas es variable y depende de muchos factores, tanto internos como externos (Dabrowski, 1982; Hjelmeland, 1983).

Estudios sobre ontogenia temprana de enzimas digestivas en peces marinos, han sido realizados por varios grupos de investigación en años recientes, para especies que en la actualidad ya son cultivadas comercialmente. Algunos de estos estudios han reflejado que a pesar de no estar completamente formados los sistemas digestivos de las larvas, presentan un equipo enzimático rudimentario que es lo suficientemente poderoso como para digerir tanto alimentos vivos como ciertos tipos de microdietas inertes. Algunos ejemplos de estos estudios se han llevado a cabo con las larvas de *Lates calcarifer*, las cuales al principio tienen un tubo recto y para el día 11 después de la eclosión está completamente formado. Desde el punto de vista fisiológico, la actividad tipo tripsina está presente desde el principio y varía en cantidades durante las primeras semanas, desapareciendo totalmente para el día 30 (Walford & Lam, 1993). Asimismo, se ha descrito en numerosos estudios que la actividad de las enzimas digestivas en el momento de la eclosión es muy baja y podría ser

debida a las enzimas proteolíticas que intervienen en la rotura del corion. No obstante, sus niveles se incrementan progresivamente con la edad, aunque este incremento paulatino puede estar interrumpido por descensos bruscos, que posiblemente estén relacionados con los cambios morfológicos (maduración del digestivo) o nutricionales (cambio de alimentación) durante el desarrollo de la larva (Holt, 1993; Ueberschär, 1993).

Se ha comprobado que las proteasas alcalinas se detectan con anterioridad a las ácidas, ya que la actividad de éstas últimas está estrechamente relacionada con la aparición de un estómago funcional. Generalmente, las larvas pueden controlar parcialmente la secreción de enzimas de acuerdo con la composición del alimento y su tasa de consumo. En cualquier caso, las pautas enzimáticas que aparecen durante el desarrollo se deben a la interacción de factores genéticos y nutricionales (Buddington & Diamond, 1989). Moyano *et al.* (1996), con larvas de la *Sparus aurata*, se observó la actividad proteasa alcalina desde el inicio de la alimentación exógena, y la aparición y fluctuaciones del resto de las enzimas (lipasa, amilasa, tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa, fosfatasas) en los días subsiguientes. Además, en el día 40 DE, se detectó la presencia de proteasas ácidas, dando inicio la secreción de HCl y pepsina. Al comparar estos resultados con los de otras especies (Fig. 11), se determinó que el desarrollo de sus enzimas fue similar al de especies con afinidad templada.

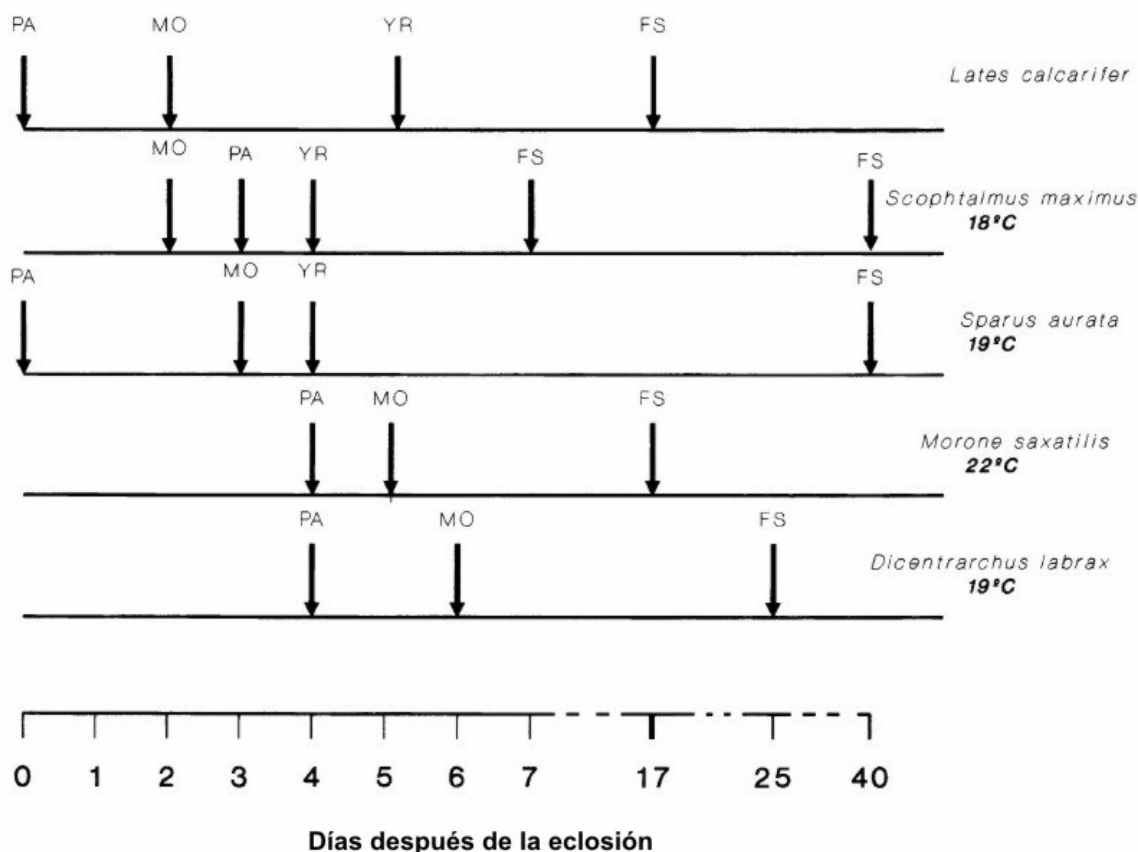


Figura 11. Comparación de los principales eventos que tienen lugar en el sistema digestivo durante el desarrollo larviano de varias especies de peces marinos. PA: actividad proteasa, MO: apertura de la boca, YA: absorción del vitelo, FS: estómago funcional (Moyano *et al.*, 1996).

A partir de todos estos estudios, se han generado dos hipótesis acerca de la adquisición de enzimas digestivas. La primera que indica que los alimentos vivos (rotíferos y *Artemia*) son la única fuente de estas enzimas, por lo cual sin estos alimentos las larvas no sobrevivirían (dependencia estricta; Munilla-Morán *et al.*, 1990). Un ejemplo de esto son las larvas de *Scophthalmus maximus*, donde la actividad amilasa contribuye del 15 al 27 % de la actividad total, del 43 al 60 % de la actividad proteasa, del 79 al 88 % de la actividad exonucleasa y del 84 al 94 % de la actividad lipasa. Las presas de larvas de esta especie de 30 días de edad pueden contribuir desde 100 hasta 1000 veces la actividad de enzimas digestivas. En el segundo caso, las larvas presentan una maquinaria enzimática restringida,

pero lo suficientemente activa para digerir los alimentos, por lo que el alimento vivo no contribuye de manera significativa a la digestión; aunque su presencia incrementa la actividad enzimática, pero no es necesariamente perteneciente al alimento vivo. Un ejemplo, son las larvas de *Sparus aurata* y *Dentex dentex*, que se desarrollan y capturan rápidamente a las presas. Se ha cuantificado que la actividad relativa del alimento vivo (rotíferos y *Artemia*) apenas llega a ser del 2 % del total de la actividad enzimática digestiva de las larvas (Moyano *et al.*, 1996).

3.4. La absorción de nutrientes

Los estudios sobre la absorción de los nutrientes en larvas de peces marinos son relativamente recientes, realizándose primeramente en especies con interés pesquero como *Clupea harengus* por medio de técnicas histológicas. En estos estudios la función del tubo posterior y el tubo medio han recibido considerable atención debido a que las funciones son similares, en muchos aspectos a las del intestino medio y posterior de los peces sin estómago. Además, ha habido controversia acerca de los mecanismos de digestión y absorción (O'Connell, 1976; Govoni, 1980; O'Connell, 1981). Evidencia citológica sugiere que las grandes estructuras supranucleares, vacuolares y electrolúcidas de las células de la mucosa epitelial del tubo medio se caracterizan por presentar inclusiones lipídicas resultantes de la hidrólisis extracelular de lípidos en ácidos grasos y monoglicéridos, y su posterior resíntesis en el retículo endoplasmático liso, donde se les añade algún componente proteínico para formar complejos lipoproteínicos, principalmente quilomicrones y VLDL (lipoproteínas de baja densidad) (Iwai, 1968a y b; Iwai, 1969; Iwai & Tanaka, 1968a y b; Tanaka, 1972a y b; Umeda & Ochiai, 1973 y 1975; Stroband & Kroon, 1981; Watanabe & Sawada, 1985). En contraste, los cuerpos de inclusión supranucleares acidofílicos, granulares, electro-opacos de las células epiteliales del tubo posterior, son el resultado de la absorción pinocítica de macromoléculas a partir del lumen.

Algunos autores consideran que la pinocitosis de proteínas esta asociada a la absorción y posterior digestión intracelular como un mecanismo para compensar la incompleta

digestión extracelular debida al escaso desarrollo del sistema digestivo de las larvas y/o la ausencia de estómago en las primeras fases de desarrollo, tal y como ocurre en crías de mamífero (Krause *et al.*, 1977). Tanaka (1972b), demostró que los cuerpos de inclusión supranucleares acidofílicos electro-opacos son indistintos con el desarrollo del estómago y glándulas gástricas durante la transformación, además están presentes todo el tiempo en los peces adultos sin estómago. Sin embargo, Govoni (1980) encontró que los cuerpos de inclusión supranucleares acidofílicos en peces juveniles que poseen un estómago funcional son similares a los de las larvas que aún no han desarrollado el estómago. Además, O'Connell (1981) no encontró depósitos lipídicos en las células epiteliales del tubo medio, aunque si detectó los cuerpos de inclusión granulares acidofílicos en el epitelio del tubo posterior, los cuales se tiñeron fuertemente con OsO₄ (O'Connell, 1976).

Watanabe (1981, 1982a, 1984a), usando peroxidasa de rábano (HRP) como un trazador histoquímico de las proteínas, observó la absorción pinocítica y digestión intracelular de macromoléculas proteicas en la mucosa epitelial del tubo posterior, apoyándose de los estudios de Iwai (1969) sobre la absorción de proteínas. Al inyectar a las larvas con HRP y teñir el tubo posterior con H₂O₂, observó la presencia de cuerpos de inclusión. Mientras, que las larvas control no mostraron productos de reacción, por lo que se concluyó que el HRP había sido absorbido sin afectar la actividad enzimática dentro de las células. Las moléculas de peroxidasa de rábano (HRP) fueron digeridas dentro de las células epiteliales en cinco pasos sucesivos: pinocitosis, transporte, acumulación, digestión y extinción (Fig. 12).

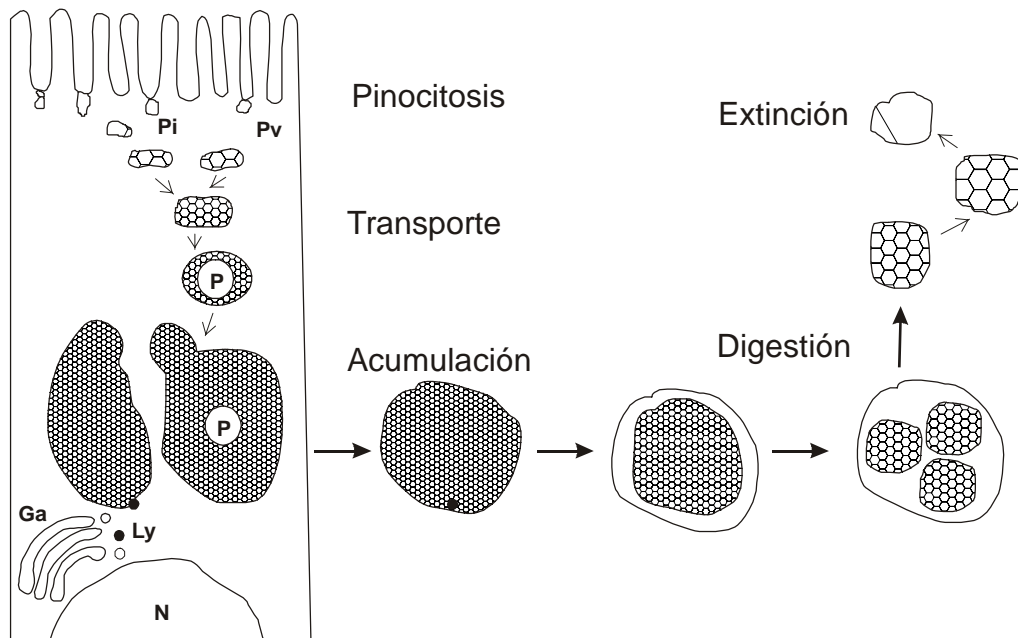


Figura 12. Sucesión para la absorción de proteínas y digestión intracelular en el tubo posterior de las células epiteliales de larvas de peces. Organos que incluyen invaginaciones pinocíticas (Pi). Vesículas pinocíticas (Pv). Cuerpos de inclusión proteínica (P). Aparato de Golgi (Ga). Lisosomas (Ly). Núcleo (N) (tomado de Govoni *et al.*, 1986).

La pinocitosis de las moléculas de HRP ocurrió en la membrana plasmática en las intermicrovellosidades. Dentro de las células, a través del borde membranal, las vesículas pinocíticas se mueven hacia el núcleo. Las moléculas de HRP fueron entonces acumuladas dentro de los cuerpos de inclusión supernucleares por la coalescencia de las vesículas. Los lisosomas presumiblemente derivados del aparato de Golgi, se asocian con esos cuerpos de inclusión inmediatamente después de su formación. Las moléculas de HRP en los cuerpos de inclusión supranucleares finalmente pierden su actividad enzimática, como fue indicado por la disminución de los productos de reacción, probablemente como resultado de la hidrólisis lisosomal y eventualmente se extinguen.

El tiempo total requerido para la digestión del HRP difiere entre las especies desde 10 horas hasta 2 semanas (Govoni *et al.*, 1986). El tiempo de digestión intracelular también depende del desarrollo de los peces, siendo menor en larvas que en juveniles.

En la mayoría de las larvas de peces marinos, se puede esperar una alta absorción pinocítica de macromoléculas proteínicas parcialmente digeridas por las células epiteliales del tubo posterior en larvas antes de la transformación a juvenil y peces adultos que carecen de estómago para una previa digestión proteínica. Basados en la absorción de HRP, la capacidad pinocítica para absorber proteínas aparece antes de la absorción del vitelo y la primera alimentación, y permanece hasta la aparición de las glándulas gástricas (Gardner, 1984). La cantidad de proteína absorbida del alimento por pinocitosis, como lo indica la cantidad de gránulos electro-opacos en los cuerpos de inclusión epitelial, fue mayor en peces de ontogenia indirecta que en los de ontogenia directa, aunque disminuye después de la transformación. Estas diferencias en la digestión intracelular, puede ser el resultado de cambios adaptativos para compensar una digestión incompleta por medio de la absorción de macromoléculas proteínicas, y se ha observado en el metabolismo de algunos otros cordados, incluyendo en varios estadios de mamíferos (Yamamoto, 1982; Kapoor *et al.*, 1975; Noaillac-Depeyre & Gas, 1976; Weinberg, 1976; Stroband, 1977; Stroband & Veen, 1981).

Los lípidos son aparentemente digeridos a ácidos grasos y monoglicéridos en el lumen del tubo medio, absorbidos dentro del epitelio del tubo medio, resintetizados en el retículo endoplasmático granular y depositados en grandes gotas lipídicas (Watanabe & Sawada, 1985) en las células epiteliales de la mucosa, pero el mecanismo exacto para la absorción de lípidos es aún desconocido. Aparentemente, en los peces adultos los lípidos son digeridos y absorbidos en el intestino anterior de la misma manera que en las larvas (Barrington, 1957; Kapoor *et al.*, 1975; Fange & Grove, 1979). Los lípidos observados como inclusiones en el tubo medio de larvas de peces y en el intestino anterior de peces adultos sin estómago, son almacenados temporalmente (Tanaka, 1972a; Stroband & Dabrowski, 1979; Watanabe & Sawada, 1985).

La absorción de lípidos en larvas y peces adultos es similar a la de los mamíferos. Después de la hidrólisis intraluminal, la grasa dietaria es absorbida por las células epiteliales del intestino para posteriormente ser sintetizadas a través de dos vías: 1) La vía de los

monoglicéridos en el retículo endoplasmático suave, el cual sintetiza triglicéridos. 2) La vía del L- α -glicerofosfato en la cual el retículo endoplasmático liso y rugoso sintetizan triacilglicéridos y fosfolípidos (Sire *et al.*, 1981). Los lípidos absorbidos son finalmente descargados en la submucosa como VLDL o partículas tipo quilomicrones, la importancia relativa de ambas vías de síntesis de lípidos y lipoproteínas en peces han sido discutidas por diversos autores (Sire *et al.*, 1981; Léger *et al.*, 1988) y parece ser afectado por los lípidos dietarios (Sire & Vernier, 1981).

Al comienzo de la alimentación exógena las larvas de muchas especies son capaces de absorber lípidos por el epitelio intestinal. Se han detectado diferentes secciones de absorción, que varían para cada especie. Así, las larvas de *Coregonus lavaretus* (Linnaeus, 1758) absorben lípidos principalmente en la parte anterior del intestino (Segner *et al.*, 1989), las larvas de *Sparus aurata* y *Dicentrarchus labrax* presentan la mayor absorción, principalmente a lo largo del intestino prealvular, aunque en la lobina se marca en la porción distal, permaneciendo durante todo el período larvario y ha sido relacionado a la diferenciación incompleta del tracto digestivo, especialmente por la ausencia de un estómago funcional (Deplano *et al.*, 1991).

La habilidad de las larvas de absorber lípidos se mantiene hasta el final de la fase lecitotrófica a través de los enterocitos, aunque éstos están pobremente desarrollados, mostrando un escaso retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Deplano *et al.*, 1991). De esta manera, solamente una pequeña proporción de los lípidos es absorbida e incorporada dentro de partículas lipoproteínicas. Lo anterior sugiere una reducción en la capacidad de transporte de lípidos. En los días subsiguientes de la alimentación con zooplancton, un mayor número de vacuolas lipídicas son observadas. La eficiencia de transporte de lípidos mejora a partir del día 9 en adelante, cuando una clara intensificación de la síntesis de lipoproteínas se conjunta con un incremento del depósito de glicógeno en el hígado (Deplano *et al.*, 1991). A partir del día 18, Deplano *et al.* (1989), sugieren un incremento en la capacidad de síntesis y el transporte de lipoproteínas en los adultos de la lobina, basándose en el desarrollo extremo del retículo endoplásmico rugoso y en el aparato de

Golgi. Sin embargo, si las larvas de *Dicentrarchus labrax* son alimentadas con dietas artificiales, la capacidad de transporte de lípidos se reduce aparentemente debido al pobre desarrollo del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi en los enterocitos (Deplano *et al.*, 1991). Este bajo transporte de lípidos se incrementará si la proporción de fosfolípidos en la dieta es aumentada (Kanazawa, 1993a; Fontagné, 1996).

Para comprender los avances de la absorción de lípidos durante la ontogenia temprana de *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata*, *Stizostedion lucioperca* (Linnaeus, 1758), Díaz *et al.* (2002), clasificaron este proceso dividiéndolo en tres fases (Fig. 13): 1) Endotrófica, donde la larva se alimenta exclusivamente de las reservas vitelinas. La vesícula vitelina localizada en el borde del tracto digestivo contiene dos tipos de reserva, el vitelo externo y el glóbulo de aceite interno. Durante este período, la circulación vitelina se establece por la presencia de una gran cantidad de vasos sanguíneos que rodean la vesícula y están ligadas cercanamente con la red de circulación del hígado. El periblasto absorbe el vitelo y una gran cantidad del glóbulo de aceite desde la eclosión hasta los primeros días después de la apertura de la boca. 2) Endo-exotrófica, donde la larva todavía usa las reservas vitelinas pero inicia el proceso de alimentación; este proceso se caracteriza por la absorción del glóbulo de aceite, sin embargo no se lleva a cabo la síntesis ni liberación de lipoproteínas. La completa desaparición de la vesícula vitelina marca el fin de este período. 3) Exotrófica, que inicia con la acumulación de glucógeno en el hígado a partir de los 4 DDE, con la completa formación del tracto digestivo y cuando las actividades hepáticas, pancreáticas e intestinales de la larva son realizadas como en los adultos. En este período se observan dos tipos de inclusiones lipídicas en los hepatocitos, los primeros son las lipoproteínas de bajo peso molecular (VLDL) que tienen de 20 a 70 nm y los quilomicrones que tienen de 70 a 500 nm y los segundos que probablemente sean triglicéridos de un diámetro mayor a 6 µm. Aunque este trabajo aporta una gran cantidad de información, existe todavía una gran cantidad de lagunas del conocimiento, pero que se están abordando gradualmente.

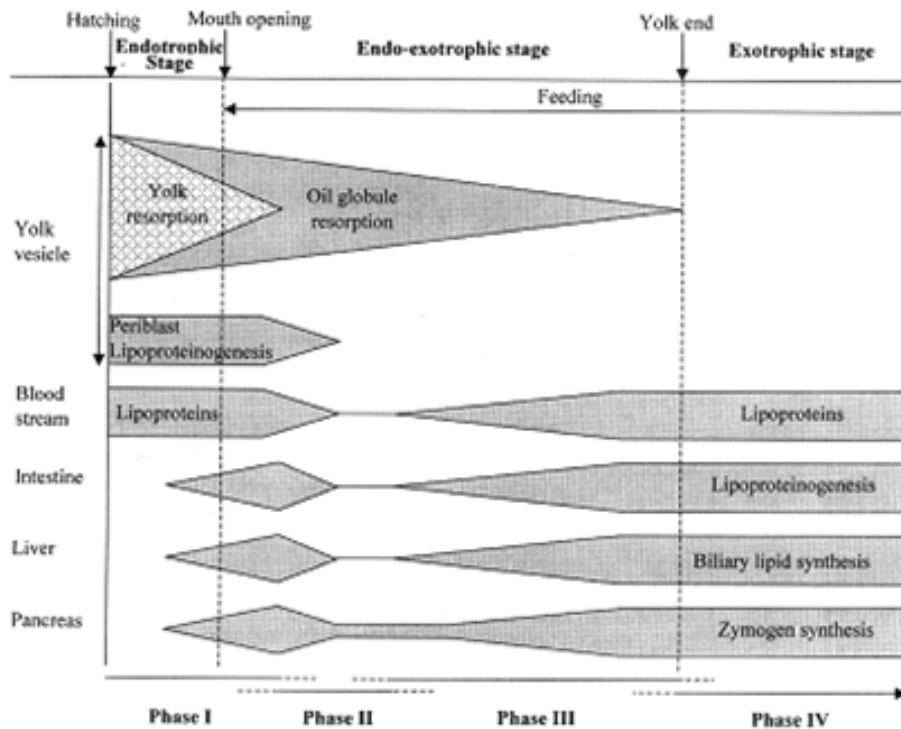


Figura 13. Períodos fisiológicos principales del metabolismo de los lípidos durante el desarrollo de *D. labrax*, *S. aurata* y *S. lucioperca*.

La posición morfológica y mecanismos de absorción de carbohidratos es un campo poco estudiado en larvas de peces. La alta cantidad de mitocondrias en las células epiteliales del tubo medio, son las que están asociadas con las gotas de lípidos (Iwai & Tanaka, 1968a y b; Iwai, 1969). Estos autores sugieren también que estas células son energéticamente activas y capaces de realizar el transporte activo, aunque no se sabe si son afectados por influjos no saturables o por transporte activo dependiente de sodio (Crane, 1975; Ferraris & Ahearn, 1984). Los mecanismos de absorción de carbohidratos aun son desconocidos. Sin embargo, una de las teorías más estudiadas indica que una vez dentro de la célula, la glucosa debe ser fosforilada en glucosa-6-fosfato por acción de la hexoquinasa (HK), para asegurar un transporte por gradiente de glucosa. Las hexoquinasas son una familia de enzimas de mamíferos como la HK I-IV o A-D, que permiten mantener los niveles de glucosa en la sangre de los peces (Iynedjian, 1993), los cuales son presumiblemente hiperglucémicos, siendo esta una condición normal en ellos (Wilson, 1994). Por lo anterior, de manera

general se considera que el uso de aproximaciones fisiológicas energéticas (Brett & Groves, 1979) y radiomarcadores (Sorokin, 1966) han permitido evaluar la eficiencia de absorción de todos los nutrientes dentro del canal alimentario de las larvas. La absorción suele ser un parámetro fisiológico complejo de medir para estos organismos, al ser de tallas muy pequeñas, vivir en un hábitat planctónico y la escasa producción de heces que se pierden rápidamente (Johannes & Satomi, 1967; Conover, 1978). El canal alimentario de las larvas de peces descarga al mismo tiempo agua y heces sólidas, siendo casi imposible el separar los productos del metabolismo una vez que la larva ha defecado y las heces se han disuelto. Como resultado de lo anterior, el cálculo de la eficiencia de absorción, solamente se ha obtenido por diferencia; como por ejemplo, por el cálculo de otros parámetros energéticos a partir de la materia o de la energía del alimento. Usando los métodos de radiomarcaje, se obtienen resultados directos y a corto plazo de la medida de la absorción, aunque están sujetas a error. Basándose en la retención de los trazadores metabólicos activos (^{14}C , ^3H o ^{32}P), las estimaciones de la absorción pueden ser sesgadas si existe actividad específica de los marcadores en los cambios de alimento o si hay grupos metabólicos desconocidos y tasas de retorno rápidas, que resulten en una pérdida del marcador en el animal (Conover & Francis, 1973). Las aplicaciones de los métodos de radiomarcadores en larvas de peces son ampliamente discutidos en Govoni *et al.* (1982), y Boehlert & Yaklavich (1984b).

Los presupuestos de masa y energía (fisiológicamente energéticos), así como los experimentos con radiomarcadores indican que la eficiencia de alimentación de las larvas (porcentaje de la ración alimenticia que es absorbida después de eliminar las heces) es ligeramente menor que la eficiencia de alimentación de los peces adultos (Kapoor *et al.*, 1975; Conover, 1978; Brett & Groves, 1979). Por ejemplo, La eficiencia de alimentación en larvas varía del 67 al 90 %, mientras que la eficiencia de alimentación en adultos es menor, variando entre 67 a 99 %. Los coeficientes de utilización (la fracción de materia o energía retenida después de la excreción de las heces y orina) para larvas de peces es generalmente más baja en las larvas que en los adultos. Los coeficientes de utilización varían del 9 al 80 % en larvas y alrededor del 70 % en peces adultos (Ware, 1975).

Los efectos del tipo de alimento y el tamaño de ración en las eficiencias de alimentación son pobremente conocidas para larvas de peces. En larvas de *Syngnathus fuscus* (Storer, 1839), se observó una evacuación lenta con raciones pequeñas, sugiriendo que la tasa de absorción podría incrementarse con raciones menores cuando el tiempo de residencia de las partículas individuales de alimento de incrementan (Ryer & Boehlert, 1983). En las larvas de *Clupea harengus*, se observó que raciones altas de alimento provocaron que el alimento fuera altamente excretado sin digerir; de hecho, se ha observado que al exceder la cantidad de *Artemia*, esta pasa por el canal alimentario y es defecada viva (Werner & Blaxter, 1980). Estas observaciones concuerdan con los tiempos extremadamente rápidos de evacuación en larvas de *Anchoa mitchilli*, implicando que raciones grandes pueden provocar eficiencias de absorción bajas, especialmente en larvas con canales alimentarios rectos (Chitty, 1981). Esto ha sido experimentalmente comprobado en las larvas de arenque del Pacífico *Clupea harengus payáís* (Valenciennes, 1847), donde la toma y retención de alimento marcado con ^{14}C disminuyó significativamente con el incremento de la concentración del alimento y la ración (Boehlert & Yoklavich, 1984a). Sin embargo, es imprescindible repetir estos estudios con larvas de peces marinos carnívoros que tienen intestinos más cortos. Estudios como el de Houde & Schekter (1980, 1983), han demostrado que las tasas de absorción varían dependiendo de las estrategias de alimentación de cada especie. Los clupeidos se han adaptado experimentalmente a alimentarse por medio de una ingesta continua en altas concentraciones; sin embargo, la eficiencia de alimentación y el crecimiento pueden decrecer, la energía total adquirida se incrementa, resultando en una ganancia en la red energética para la larva. Checkley (1984), observó que la eficiencia de crecimiento tuvo su punto más alto cuando la densidad de alimento fue adecuada y disminuyó si se excede cierta cantidad; se ha observado un patrón similar en peces adultos (Brett & Groves, 1979).

Algunos trabajos han demostrado que las bajas eficiencias de absorción de las larvas de peces, permanecen durante todo el período larvario hasta la transformación a juvenil. En el caso de peces carnívoros la eficiencia mejora cuando se forma el estómago, mientras que en los peces herbívoros mejorará al aumentar el tamaño del intestino (Laurence, 1977). Sorokin & Panov (1966) y Govoni *et al.* (1982), usando ^{14}C como trazador y Houde & Schekter

(1983), por medio del cálculo de la energía de crecimiento y metabolismo a partir de la energía del alimento, no encontraron cambios en la absorción antes de la transformación a juvenil. Buckley & Dillmann (1982) llegaron a la misma conclusión cuando midieron el nitrógeno excretado como amonio en la orina y defecado como aminos primarias en las heces del lenguado *Paralichthys dentatus* (Linnaeus, 1766). Ellos reportaron que la defecación es primeramente aminos, que representan la fracción no asimilada del nitrógeno ingerido, la cual decrece con la edad. Mientras que el amonio, que representa la absorción de la fracción metabolizada, decreció después de 35 horas y luego se incrementó nuevamente. Más importante, el coeficiente de utilización del nitrógeno se incrementó con la edad durante el período larvario. Cetta & Capuzzo (1982), encontraron un patrón similar de la pérdida de nitrógeno en larvas del lenguado *Pseudopleuronectes (=Paralichthys) americanus* (Walbaum, 1792). Buckley & Dillmann (1982) explican estos incrementos evaluando los cambios en la absorción, aunque no hay evidencia citológica del aumento de la capacidad del páncreas para producir estas enzimas; el páncreas tiene muchos gránulos de zimógenos desde la absorción del vitelo y son evidentes durante todo el desarrollo, Es por esto que el mejoramiento de la eficiencia de absorción está ligado con el desarrollo de un estómago funcional con glándulas gástricas y ciegos pilóricos durante la transformación, debido a la digestión ácida y la acción de la pepsina, además del incremento de la superficie de absorción del canal alimentario. Mironova (1974) reportó incremento en la eficiencia de absorción de tilapia *Oreochromis mosambicus* (Peters, 1852) en el momento de la transformación a juvenil.

Las técnicas de histológicas estándar, microscopía luminosa, microscopio de transmisión de electrones (TEM) y microscopio de barrido de electrones (SEM). Los procedimientos estándar de inclusión en parafina han sido usados exitosamente junto con la microscopía luminosa (O'Connell, 1981), pero las técnicas que usan el glicol metacrilato como medio de inclusión son más eficientes (Govoni, 1984). Finalmente, las técnicas TEM y SEM son mucho más sensibles y específicas para la preparación de tejidos suaves de las larvas (Iwai, 1969; Boehlert, 1984).

El uso de peroxidasa de rábano (HRP) como marcador histoquímico, ha mostrado los sitios morfológicos y mecanismos citológicos donde se lleva a cabo la absorción de las proteínas en larvas de peces (Stroband *et al.*, 1979; Stroband & Kroon, 1981; Watanabe, 1981, 1982a y 1984a). Una ventaja de las técnicas de HRP es que en adición a las observaciones de los sitios de absorción de las proteínas, también se puede evaluar la hidrólisis enzimática. Ikeda (1959) y Prakash (1961), detectaron fosfatasa alcalina en el canal alimentario de larvas de peces. Ambos usaron métodos de histoquímica en parafina estándar, además de desarrollar técnicas con glicol metacrilato.

Más allá de las aplicaciones histoquímicas del HRP que definen el mecanismo de la digestión y absorción de las proteínas, son pocos los estudios que han examinado el desarrollo del canal alimentario por medio de técnicas histoquímicas. Prakash (1961), encontró incremento en la actividad de fosfatasa alcalina en el borde estriado del tubo posterior de los alevines de *Onchorhynchus mykiss*. Además observó grandes cambios en la intensidad de la actividad durante la transformación. Ikeda (1959), relacionó la actividad fosfatasa con el desarrollo de un estómago funcional en *Oryzias latipes* (Temminck & Schlegel, 1846). Puesto que la actividad de fosfatasa alcalina esta relacionada con el transporte de mediadores activos de sodio en tejidos de absorción (Ugolev, 1965), así como cambios en la actividad de las reacciones de la fosfatasa alcalina que pueden indicar un incremento en la absorción a través de transporte activo.

4. Requerimientos Nutricionales para Larvas de Peces Marinos

Los requerimientos nutricionales de embriones, eleuteroembriones y larvas todavía no han sido bien definidos. Aunque, se espera que sean parecidos a la composición del vitelo que abastece a la larva antes de la primera alimentación. Más allá, la elucidación de las necesidades nutricionales de fases tempranas ha sido complicada por la dificultad en alterar la composición de las reservas vitelinas endógenas descifrando los requerimientos (Heming & Buddington, 1988). Los cambios anatómicos y fisiológicos durante la ontogenia probablemente demarcan las necesidades nutricionales específicas de acuerdo al estadio de

desarrollo. Aún después de la aparición del sincitium vitelino, el hígado y sintetasas relacionadas no se han desarrollado (Takahashi *et al.*, 1978) y así, las larvas antes de la primera alimentación tienen una mayor cantidad de nutrientes que en estadios de desarrollo posteriores (Heming & Buddington, 1988). Por consiguiente, los requerimientos nutricionales para peces juveniles y adultos son menores que en las larvas.

De los nutrientes contenidos en el huevo (Tabla 2), el glicógeno es el carbohidrato principal en todos peces estudiados y se ha relacionado como una fuente de energía en estadios embrionarios tempranos (Vetter *et al.*, 1983). Los carbohidratos son los nutrientes utilizados mayormente desde la fertilización hasta la eclosión y se le han atribuido roles nutricionales en el proceso inicial de la segmentación (Moroz & Luzhin, 1976). La proteína, es el componente más abundante, residiendo en mayor cantidad en el vitelo como aminoácidos libres. El vitelo provee de estos aminoácidos para el crecimiento de tejidos y energía por medio de procesos catabólicos. Los lípidos, son el siguiente componente en mayor cantidad, variando de 0.1 % en el peso de los huevos de *Pleuronectes platessa* hasta el 45 % en el *Labeotrophus spp.* (Balon, 1975, 1979 y 1981). Los lípidos son usados principalmente como componentes estructurales en las membranas celulares o para la producción de energía. Los requerimientos energéticos se incrementan después de la eclosión y se mantienen por medio de triglicéridos y ésteres céricos. Además, solamente disponibles en pequeñas cantidades relativas, los carbohidratos vitelinos están presentes en dos formas, de forma libre y en glicoproteínas.

Tabla 2. Composición química de huevos de varias especies de peces (% base seca).

Especie	Proteína	Lípidos	Carbohidratos	Cenizas	Referencia
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	59.8-71.3	11.4	0.6	3.8-3.9	Satia <i>et al.</i> , 1974
<i>Cyprinus carpio</i>	58.3-59.2	5.4-29.3	1.5-6.2	6-3	Moroz & Luzhin, 1976
<i>Salmo salar</i>	52.2	36.1	1.0	2.8	Hamor & Garside, 1977
<i>Sciaenops ocellatus</i>	28.1	33.7	0.4	-	Vetter <i>et al.</i> , 1983
<i>Coregonus lavaretus</i>	60.3	27.7	-	9.8	Dabrowski & Luczynski, 1984
<i>Acipenser transmontanus</i>	67.0	30.0	-	3.0	Wang <i>et al.</i> , 1987

Desde el punto de vista nutricional, las larvas tiene capacidades fisiológicas limitadas, por lo que se requieren dietas específicas, sean alimentos vivos o dietas formuladas que contengan nutrientes fáciles de digerir y absorber para asegurar la supervivencia y el crecimiento. Una variedad de alimentos vivos han sido usados en el larvicultivo particularmente porque los componentes ideales nutricionales para la utilización de microalimentos tienen que ser todavía investigados. Desde hace algunas décadas los estudios se han enfocado en el uso de *Artemia* y rotíferos, y sus formas enriquecidas para ser utilizadas exitosamente como alimentos durante el desarrollo temprano de los peces. Sin embargo, el diseño de una dieta artificial es el principal objetivo para ser utilizada durante el larvicultivo, aunque falta conocer ampliamente los requerimientos nutricionales específicos para lograr este fin. Desde esta perspectiva, la aplicación de los estudios de crecimiento estándar en larvas es complicada, por lo que los requerimientos nutricionales se han enfocado en la composición del vitelo para fijar algunos de estos requerimientos en períodos posteriores (Watanabe *et al.*, 1983).

No son muchos los estudios que se han enfocado en tratar de calcular los requerimientos nutricionales óptimos para la alimentación de las larvas de peces marinos. Desde este punto de vista, se deben cuidar todos los aspectos para asegurar que la larva reciba la cantidad y calidad de los combustibles que le permitan asegurar su crecimiento y supervivencia. Estos combustibles se pueden dividir en 1) proteínas y aminoácidos, 2) lípidos y ácidos grasos, 3) carbohidratos, 4) vitaminas y 5) minerales, que a continuación se describen:

4.1. Proteínas y aminoácidos

Para las larvas de peces marinos la determinación de los requerimientos de proteínas no han sido claramente establecidos, por la dificultad que implica suministrar dietas inertes con diferentes proporciones de proteína, las cuales sean aceptadas por las larvas. Se debe recordar que durante este período de vida las larvas son microdepredadores activos las cuales deben aprender a cazar, por lo que la aceptación de alimentos inertes es limitada.

Se ha establecido que los requerimientos de proteína durante el período larvario son mayores que los de los juveniles y adultos debido principalmente a que las larvas se encuentran en una fase de crecimiento exponencial, por lo que requieren mayor cantidad de proteína para la formación de los tejidos que organismos de su misma especie, pero en períodos de vida más desarrollados. La tabla 3 muestra los requerimientos de larvas y alevines de algunos peces de importancia comercial. En este mismo contexto, una vez que las larvas completan su formación y se transforman a juveniles sus requerimientos en proteína disminuyen, además de que cambian su comportamiento alimenticio y adoptan la manera de alimentarse de adultos (carnívoros, herbívoros y omnívoros), cambiando su metabolismo y derivando parte de la energía del alimento en nuevas funciones como la reproducción. De manera cotidiana se ha establecido que la cantidad mínima de proteína dietaria para la alimentación de las larvas es mayor al 50 % (Tucker, 1998). Sin embargo, esta cantidad de proteína deberá ser establecida para cada especie.

Tabla 3. Requerimientos proteínicos de larvas y alevines de peces
(Expresados como porcentaje de la dieta en base seca)

Especie	Requerimiento	Referencia
Agua dulce		
<i>Oreochromis niloticus</i>	35	Santiago <i>et al.</i> , 1982
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	41-43	Jauncey, 1981
<i>Ictalurus punctatus</i>	36	Prather & Lovell, 1973
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	40-45	Zeitoun, 1973
<i>Cyprinus carpio</i>	47	Escaffre <i>et al.</i> , 1997
Agua marina		
<i>Anguilla japonica</i>	44.5	Nose & Arai, 1973
<i>Sparus aurata</i>	38.5	Sabaut & Luquet, 1973
<i>Salvelinus alpinus</i>	40	Satia, 1974
<i>Chanos chanos</i>	40	Lim <i>et al.</i> , 1979
<i>Micropterus dolomieu</i>	40-41	Anderson <i>et al.</i> , 1981
<i>Morone saxatilis</i>	47	Millikin, 1983
<i>Sciaenops ocellatus</i>	50	Brinkmeyer & Holt, 1995
<i>Dicentrarchus labrax</i>	50	Péres <i>et al.</i> , 1996
<i>Rhombosoles tapirina</i>	44-52	Hart & Puser, 1996
<i>Sparus aurata</i>	63	Salhi <i>et al.</i> , 1997
<i>Gadus morhua</i>	57	Baskerville-Bridges & Kling, 2000

Tomada de Tacon (1988) y ampliada.

El porcentaje de proteína de los alimentos vivos (rotíferos y *Artemia*) utilizados tradicionalmente para la alimentación de las larvas son muy altos (57 % y 55.8 % respectivamente) (Lie *et al.*, 1997; Abatsopoulos *et al.*, 1997), por lo que se considera que el requerimiento de proteína es cubierto totalmente con el uso de estas presas. De esta manera, es necesario que si se pretende fabricar alimentos para realizar la sustitución temprana del alimento vivo es necesario incluir altos niveles de proteína, pero tomando en cuenta la baja capacidad digestiva de las larvas durante los primeros días de vida, por lo que una correcta selección de ingredientes de alta calidad es importante (harinas de pescado premium, hidrolizados proteínicos de pescado o harinas de calamar) para facilitar su digestión y asimilación (Kolkovski, 2001).

Desde otra perspectiva, no solamente una alta inclusión de proteínas en los alimentos para las larvas debe ser considerado, sino también el perfil de aminoácidos que contengan los alimentos. El papel que juegan los aminoácidos en la fisiología nutricional de las etapas tempranas de larvas de peces marinos se da principalmente durante la maduración del oocito y su subsiguiente caída en el desarrollo desde embrión hasta la absorción total del

vitelo en los eleuteroembriones. Se debe tener una atención especial a las fuentes de aminoácidos derivadas del alimento vivo y de los alimentos compuestos para su utilización en relación a su función en el canal alimentario. El “turnover” proteínico es provocado por los flujos de aminoácidos entre los grupos de aminoácidos libres y los aminoácidos que forman las proteínas durante el crecimiento de las larvas. Este tipo de estudios son explicados con mayor detalle por Houlihan *et al.* (1995) y Conceição *et al.* (1997).

Fyhn (1989) y Fyhn *et al.* (1993), comentan que ciertos aminoácidos libres son importantes como fuente de energía (taurina en larvas de peces demersales, y leucina, valina, isoleucina, alanina, serina, entre otros, para larvas de peces pelágicos), no solamente durante el período embrionario sino también durante la alimentación de la larva; por lo que se piensa que el alimento vivo es superior a los alimentos inertes por la presencia de diferentes grupos de aminoácidos esenciales (EAA) y aminoácidos libre (FAA) que provocan estímulos químicos en las larvas, además del componente del comportamiento alimenticio que ocasiona que las presas atraigan a las larvas (Fig. 14), por lo que se sugiere que esos aminoácidos deben ser incorporados a las dietas inertes (Rønnestad *et al.*, 1999).

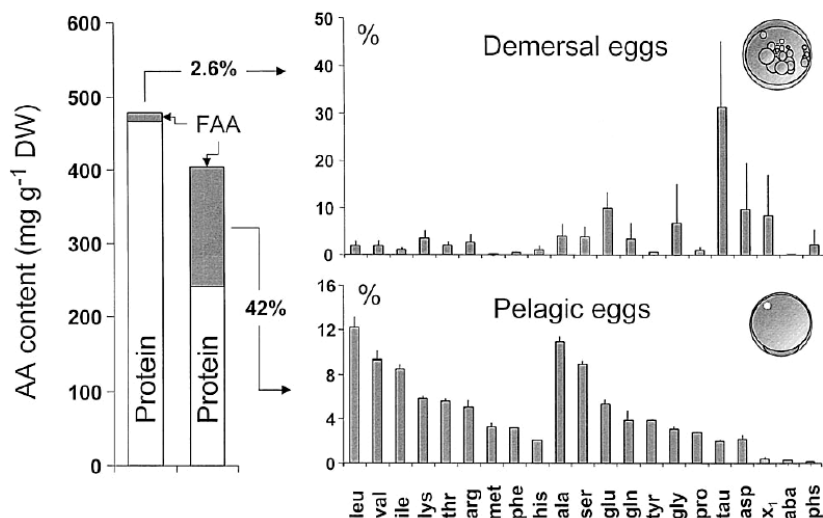


Figura 14. Contenido de proteína y FAA en desoves de 23 especies de peces marinos del área de Panamá. El promedio de los perfiles de FAA de huevos pelágicos y demersales están en Rønnestad *et al.* (1996). leu: leucina; val: valina; ile: isoleucina; lys: lisina; thr: treonina; arg: arginina; met: metionina; phe: fenilalanina; his: histidina; ala: alanina; ser: serina; glu: ácido glutámico; gln: glutamina; tyr: tirosina; gly: glicina; pro: prolina; tau: taurina; asp: ácido aspártico; x1: desconocido; aba: ácido α -amino butírico; pbs: 1 fosfoserina.

En el huevo, los aminoácidos libres más importantes son los neutros, tales como leucina, valina, isoleucina, alanina y serina. Este amplio grupo de aminoácidos, varían en concentración entre 150–200 mM, generalmente representan cerca del 50% de la osmolaridad del vitelo y en términos de composición relativa, es altamente conservativo en la mayoría de las especies estudiadas (Thorsen *et al.*, 1993; Rønnestad *et al.*, 1996). El contenido de aminoácidos libres en huevos de peces marinos pelágicos es establecido durante al final de la formación del oocito y su liberación es derivada de la hidrólisis del vitelo. Empleando técnicas estequiométricas se ha logrado entender que la desaparición de aminoácidos libres proveen la energía básica para el metabolismo aeróbico durante las fases tempranas de desarrollo (Finn, 1994). Además, cuando los aminoácidos libres se han agotado, los aminoácidos polimerizados con proteínas son utilizados para sostener el metabolismo de la larva (Fig. 15).

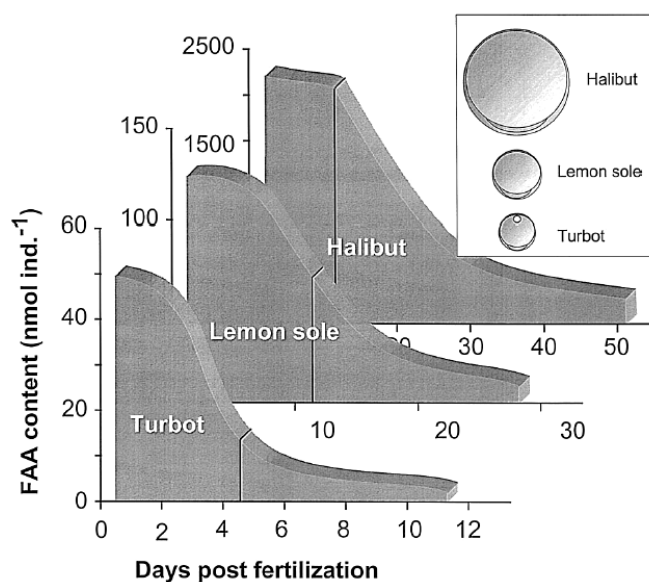


Figura 15. Cambios ontogenéticos en el perfil de aminoácidos libres (FAA) desde huevo de tres peces marinos pelágicos. La eclosión es representada por medio de líneas verticales (esquema tomado de Rønnestad *et al.* (1999)).

Rust (1995) determinó las tasas de absorción de nutrientes de varias especies de larvas de peces a diferentes edades, por medio de experimentos tipo “force-fed”. A través de estos

experimentos se reveló que las larvas de peces marinos que carecen de estómago en la primera alimentación, absorben aminoácidos libres más eficientemente que los aminoácidos polimerizados. Esta absorción, variará en función del tipo de alimento suministrado. Los alimentos vivos, tal como el fitoplancton, rotíferos, *Artemia* y tipos variados de zooplancton, contienen una cantidad significativa de aminoácidos libres (Frolov *et al.*, 1991; Fyhn *et al.*, 1993; Helland, 1995). Por ejemplo, algunos copépodos calanoideos contienen más del doble de concentración de aminoácidos libres por gramo en base húmeda que la *Artemia* (Næss *et al.*, 1995). Consecuentemente, los aminoácidos libres pueden variar y modularse dependiendo del estadio de desarrollo y las condiciones de cultivo (Fyhn & Govoni, 1995). Se ha determinado, que las larvas de peces marinos regulan la absorción de aminoácidos de manera similar a los invertebrados marinos usando el alimento vivo. Estos organismos son generalmente isosmóticos y regulan dinámicamente el volumen celular ajustando la concentración de osmolito en respuesta a los cambios de salinidad, por lo cual logran esta regulación a través del manejo de osmolitos orgánicos como los aminoácidos (Yancey *et al.*, 1982). Cuando se enfrentan a condiciones de hiperósmosis, el contenido intracelular de aminoácidos libres se incrementa vía síntesis o transporte transmembrana. Mientras que en condiciones hiposmóticas, los aminoácidos libres son catabolizados o excretados (Hawkins & Hilbish, 1992).

4.2. Lípidos

Los lípidos son indispensables en los estadios tempranos de los peces ya que son la fuente principal de energía desde la formación de la gástrula hasta la eclosión del embrión (Vetter *et al.*, 1983). La pérdida exponencial de las reservas lipídicas en las larvas de peces durante la privación de alimento es el primer proceso que se ha observado (Ehrlich, 1974; Tandler *et al.*, 1989). Muchos huevos presentan glóbulos de aceite característicos constituidos principalmente por triacilglicéridos (Nakagawa & Tuschiya, 1971), por lo que el rol de los lípidos permite mantener las muchas funciones esenciales en la nutrición larval de los peces (Cowey & Sargent, 1979; Watanabe, 1982a; Kanazawa, 1985). De esta manera, de todos los lípidos presentes en los organismos, los AG son los más importantes al cubrir muy

diversas e importantes funciones en el cuerpo. De todos los ácidos grasos estudiados los altamente insaturados (HUFA), son los más importantes, en particular el ácido araquidónico (ARA, 20:4 n-6), el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3). Cabe resaltar, que tanto los rotíferos como la *Artemia* presentan carencias de estos ácidos grasos, por lo que para mejorar su calidad deben ser enriquecidos con emulsiones lipídicas comerciales (Watanabe *et al.*, 1983). El contenido de lípidos y la composición de ácidos grasos de rotíferos, *Artemia*, *Daphnia pulex* y *Moina sp.* depende del tipo de alimento que se les haya proporcionado. Sin embargo, para los microorganismos recién nacidos como para los machos del rotífero (los cuales no comen), su cantidad y composición es baja (Léger *et al.*, 1986; Rainuzzo *et al.*, 1989; Mims *et al.*, 1991). Los copépodos son un excelente alimento, ya que tienden a mantener constante su cantidad y composición, además de contener buenas cantidades de EPA y DHA, aunque también se pueden enriquecer (Fukusho *et al.*, 1980).

Deficiencias en ácidos grasos y posiblemente en aminoácidos han sido reportadas en *Artemia*, por lo que su utilización sin enriquecer puede ser riesgoso durante el larvicultivo. Cuando el alimento de la *Artemia* es carente de EPA y DHA, puede convertir pequeñas cantidades de ácido linoléico (18:2-n6) y ácido linolénico (18:3-n3) en EPA y DHA, aunque no en cantidades suficientes para cubrir los requerimientos de las larvas. De la misma manera, se ha detectado que una buena cantidad de especies de peces tienen la habilidad de transformar el ácido linolénico en DHA, pero aparentemente no lo suficiente para cubrir sus requerimientos (Schauer & Simpson, 1985). Robin (1995) concluye que el ácido araquidónico (ARA, 20:4 n-6) puede ser un precursor para el EPA y DHA en algunas especies de peces marinos. Algunas cepas de *Artemia* pueden o no contener dichos nutrientes. Ishizaki *et al.* (1998), reportaron bajas supervivencias y crecimientos para larvas de *Seriola dumerili* dando *Artemia* enriquecida con ácido araquidónico comparado con las enriquecidas con DHA, EPA o ácido oléico.

Scout & Middlton (1979) reportaron que el crecimiento y supervivencia de las larvas de *Scophthalmus maximus* cultivadas con rotíferos alimentados con *Dunaliella tertiolecta* y

agregados en los tanques de las larvas fue muy bajo comparado con aquellas cultivadas con *Phaeodactylum tricornutum*, *Pavlova lutheri* ó *Isochrysis galbana*. Los autores presentaron evidencia de que los rotíferos alimentados con *D. tertiolecta* no cubrieron los requerimientos nutricionales para las larvas debido a la carencia de EPA y DHA. Experimentos con nauplios de *Artemia* indicaron que las larvas del turbot no pueden sintetizar EPA y DHA, ellos sugieren que se usen dinoflagelados (los cuales contienen de 15 a 34 % de DHA), ya que se consideran como un alimento fácil de digerir, mientras que el uso de microalgas probablemente no sea adecuado ya que no son fáciles de digerir. Moffat (1981), reportó que las larvas de *Engraulis mordax* obtuvieron beneficios nutricionales al ingerir células de *Chlorella* sp., posiblemente obteniendo energía extra y elementos traza adicionales. Retain *et al.* (1991 y 1994) reportaron que las larvas de halibut *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel, 1846) ingirieron un gran número de células de *Tetraselmis* sp., aunque la eficiencia de absorción fue insignificante (1-5 %).

Algunas larvas de peces marinos requieren EPA y DHA, mientras otras parecen requerir uno u otro. Las larvas de *Scophthalmus maximus* requieren ambos, pero las larvas de *Clupea harengus* y *Pleuronectes platessa* solamente necesitan EPA (Lubzens *et al.*, 1989). Para las larvas de *Solea solea* (Linnaeus, 1758) ambos son esenciales (Dendrinis & Thorpe, 1987; Gatesoupe *et al.*, 1977) (Tabla 4).

Tabla 4. Requerimientos lipídicos y de ácidos grasos para larvas de peces marinos (expresados como porcentaje de la dieta en base seca).

Lípidos	Especie	Requerimiento	Tipo de dieta	Referencia
	<i>Sparus aurata</i>	18 %	Micropartícula	Salhi <i>et al.</i> , 1999
	<i>Sparus aurata</i>	29-37 %	<i>Artemia</i>	Koven <i>et al.</i> , 1992
	<i>Paralichthys olivaceus</i>	25 %	<i>Artemia</i>	Furuita, 2000
	<i>Scienops ocellatus</i>	18 %	Alimento vivos	Brinkmeyer & Holt, 1995
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	12 %, 7 % fosfolípidos	Alimento vivo	Geurden <i>et al.</i> , 1997
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	30 %, 6.6 % fosfolípidos	Micropartícula	Zambonino-Infante & Cahu, 1999
	<i>Scophthalmus maximus</i>	10 %	<i>Artemia</i>	Sargent <i>et al.</i> , 1999
	<i>Rhombosolea tapirina</i>	14.5- 17.5 %	Micropartícula	Hart & Puser, 1996
	<i>Gadus morhua</i>	20 %	Micropartícula	Baskerville-Bridges & Kling, 2000
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	10 %, 25 % fosfolípidos	Micropartícula	Coutteau <i>et al.</i> , 1996

Civera-Cerecedo, R.¹, Alvarez-González, C.A.² y Moyano-López, F.J. 2004. Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. In: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. 2004. Avances en Nutrición Acuicola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México

Ácidos Grasos			
Especie	Requerimiento	Tipo de dieta	Referencia
<i>Paralichthys olivaceus</i>	1 % DHA	Alimento vivo	Watanabe & Kirón, 1994
<i>Seriola quinqueradiata</i>	1 % DHA	Alimento vivo	Watanabe & Kirón, 1994
<i>Sparus aurata</i>	2.2-4.4 % DHA/EPA, 1 % HUFA	Alimento vivo	Coutteau, 1996
<i>Dicentrarchus labrax</i>	2.2-4.4 % DHA/EPA, 1 % HUFA	Alimento vivo	Coutteau, 1996
<i>Dicentrarchus labrax</i>	4.4 % ARA, 1 % HUFA	Alimento vivo	Geurden <i>et al.</i> , 1997
<i>Sparus aurata</i>	1.4 % DHA/EPA	Micropartícula	Rodríguez <i>et al.</i> , 1998
<i>Sparus aurata</i>	1.5 % HUFA	Rotíferos enriquecidos	Rodríguez <i>et al.</i> , 1998
<i>Dicentrarchus labrax</i>	3 % EPA/DHA	Micropartícula	Cahu <i>et al.</i> , 1999

El DHA parece ser más importante que el EPA para algunas especies como *Clupea harengus*, *Gadus morhua*, *Caranx sp.*, *Seriola dumerili*, *Sparus aurata*, *Oplegnathus fasciatus* (Krøyer, 1845), *Paralichthys olivaceus*, *Scophthalmus maximus* y *Pseudopleuronectes yokohamae* (Günther, 1877) (Watanabe & Kiron, 1994; Takeuchi *et al.*, 1996; Kanazawa, 1997; Sargent *et al.*, 1997). Takeuchi *et al.* (1996), encontró que enriqueciendo *Artemia* con 1.6 a 2.2 % de DHA (0.9-1.1 % EPA en 3.3 a 5 % de n-3 HUFA) incrementó la supervivencia y vitalidad de larvas de *Caranx sp.* Furuita *et al.* (1996), reportaron supervivencias similares en larvas del *Seriola dumerili* alimentadas con *Artemia* conteniendo 2.9 % n-3 HUFA con concentraciones de 1 % de EPA y 1.8 % de DHA; así como, 5.2 % n-3 HUFA conteniendo 1.6 % de EPA y 3.3 % de DHA, aunque sugieren que porcentajes mayores mejorarán la vitalidad y el crecimiento.

El DHA es especialmente importante para los ojos y otros tejidos neurales, por lo que su concentración debe ser elevada y las proporciones adecuadas de ARA/EPA/DHA deben calcularse (Mourente & Tocher, 1992, Bell *et al.*, 1996; Tocher *et al.*, 1997). Aparentemente el DHA es más importante en larvas que en peces adultos. Larvas en inanición de la *Sparus aurata* retienen relativamente más n-3 HUFA que otros ácidos grasos (particularmente DHA).

Generalmente, el crecimiento y la supervivencia de organismos marinos, observado en diferentes estudios, ha sido bueno cuando se utiliza *Artemia* como alimento con niveles por

arriba del 4 % de EPA y malo cuando tiene menos de 3 % (Léger *et al.*, 1986; Izquierdo *et al.*, 2000). Sin embargo, el contenido de EPA (base seca) también depende del porcentaje total de lípidos, por lo que un enriquecimiento con DHA que puede compensar la falta de EPA en la dieta.

El EPA varía en cuatro cepas de *Artemia* de 1.2-10.4 % (del total de lípidos). Nauplios que contengan concentraciones de 9.3 a 10.4 % de EPA mejoran el crecimiento y la supervivencia de larvas de *Morone saxatilis*. Izquierdo *et al.* (1989), reportan que para mejorar el crecimiento de larvas de brema roja *Pagrus major* se necesitan 3.3 a 3.5 % de n-3 HUFA en los rotíferos. Para las dietas se demostró que es necesario que contengan 6.8 % de EPA y 3.6 de DHA en la *Artemia* (Watanabe & Kiron, 1994). Las larvas de *Opleognathus sp.*, requieren más del 3 % de n-3 HUFA en los rotíferos (Watanabe & Kiron, 1994). Tamaru *et al.* (1991) sugiere un contenido mínimo de 0.7 % de EPA y 0.5 % de DHA en los rotíferos para las larvas de lisa *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758).

La adición general de fosfolípidos (PL) en las dietas mejora el crecimiento y la supervivencia en muchas especies, tales como el *Plecoglossus altivelis* (Kanazawa *et al.*, 1985), la carpa *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) (Radünz-Neto *et al.*, 1994), el *Paralichthys olivaceous*, el *Oplegnatus fasciatus* (Kanazawa *et al.*, 1983) y el *Pagrus major* (Kanazawa, 1993a). La fosfatidilcolina (PC) y el fosfatidilinositol (PI) son los componentes principales de los fosfolípidos y son responsables de los incrementos en peso y supervivencia. Además, aparentemente cada clase lipídica, tiene un papel diferente. De esta manera, la PC parece ser más efectiva para promover el crecimiento que la PI en las larvas de (Kanazawa, 1993a) y carpa *Cteropharhyngodon idella* (Valenciennes, 1844). En el caso de la PI parece ser más efectivo para mejorar la supervivencia y prevenir deformidades óseas que la PC en larvas de *Cteropharhyngodon idella*. El beneficio de ambos lípidos en la nutrición larval es indiscutible y se debe tener cuidado al agregarlos durante la fabricación de dietas inertes o cuando se enriquecen los alimentos vivos (Geurden *et al.*, 1995a y b).

En el caso de los ácidos grasos, la deficiencia de n-3 HUFA retrasa el crecimiento, induce altas mortalidades y reduce la resistencia al manejo en larvas (Izquierdo, 1996) así como en juveniles (Montero *et al.*, 1998). Adicionalmente, las deficiencias se han asociado con alteraciones anatómicas como la hipomelanosis en el lado ocular de *Pleuronectes platessa* (Kanazawa, 1993b), rompimiento del epitelio de las branquias e hidropesía. Algunos de estos síntomas parecen estar relacionados con desórdenes nutricionales como la insuficiencia de vitaminas liposolubles o el contenido de fosfolípidos (PL) en la dieta, basado en estos datos, los niveles óptimos de n-3 HUFA han sido determinados para muchas larvas de peces marinos entre 0.3 y 39 g /kg (dieta formulada o alimento vivo) en base seca (Izquierdo, 1996).

Estudios recientes han demostrado la importancia del ácido araquidónico (ARA) en algunas larvas de peces marinos. En juveniles de *Scophthalmus maximus*, el alto crecimiento obtenido se ha relacionado con los fosfolípidos (PL) de la yema del huevo de gallina, en especial con el contenido de ARA (Castell *et al.*, 1994). Sin embargo, la alta incorporación de ARA en la fracción de lípidos polares en larvas de *Sparus aurata* causada por el incremento de lecitina de soya dietaria en las dietas que contenían fosfolípidos marinos, no promovieron un mayor crecimiento de los peces (Salhi *et al.*, 1995). En las larvas de esta especie, el ARA dietario parece ser importante para su supervivencia, pero no es eficiente para promover un incremento en el crecimiento como el DHA o EPA. De esta manera, los niveles óptimos de ARA deben estar entre 0.1 a 1.0% para las microdietas de las larvas de *Sparus aurata*. Los lípidos totales y polares en las larvas, particularmente la PC, incrementados con el ARA dietarios, así como la incorporación en lípidos neutros (NL) y PL, parecen jugar un importante papel en la pigmentación de *Paralichthys olivaceous* (Estévez *et al.*, 1997).

4.3. Carbohidratos

En el caso de las larvas de peces marinos, es aun más marcada esta carencia del conocimiento, aunque ha habido algunos estudios que han intentado profundizar en este,

por ejemplo Díaz *et al.* (1994), resalta que la utilización de carbohidratos, en especial la glucosa disuelta por parte de las larvas de *Dicentrarchus labrax* es muy alta y menor en *Pagrus major*, por lo que concluyen que la utilidad de los carbohidratos durante los períodos de iniciación puede ser significativa. Lo anterior no ha sido evaluado al utilizar dietas inertes, aunque es evidente que los nutrientes disueltos pueden ser absorbidos por las larvas. Sin embargo debe considerarse que la digestibilidad de los carbohidratos puede ser afectada dependiendo de la complejidad de la molécula, la concentración en la dieta, la cantidad digerida y la tecnología de tratamiento aplicada a la fuente de carbohidratos (Kaushik & Médale, 1994; Pfeffer, 1995).

4.4. Vitaminas

Desafortunadamente los conocimientos sobre los requerimientos de vitaminas en larvas de peces marinos son muy escasos. De estos estudios se pueden mencionar los de Miki *et al.* (1990) con larvas de *Paralichthys olivaceus*, quienes encontraron que las anomalías en el color pueden ser reducidas alimentando a las larvas con rotíferos enriquecidos con vitamina A utilizando 500,000 UI por cada 10 litro de medio de cultivo. Sin embargo, Dedi *et al.* (1995) demostró que al utilizar concentraciones superiores a 50 UI de vit. A/g (20 mg/10 l de medio) en los rotíferos y la *Artemia*, aumenta hasta en un 100 % la frecuencia de malformaciones del esqueleto. Estas malformaciones pueden ser debidas a una hipervitaminosis, ya que se acelera la secuencia de células cartilaginosas que son las promotoras de la formación de huesos (Wolbach, 1947).

La vitamina C (ácido ascórbico) es considerada esencial para especies marinas, ya que como es bien sabido, los animales superiores son capaces de sintetizarla a partir del ácido gluclorónico. Sin embargo, los peces y crustáceos carecen de la enzima oxidasa gluconolactona necesaria en el último paso para la biosíntesis (Chatterjee, 1973). Los requerimientos de esta vitamina para peces juveniles han sido calculados entre 25 a 50 mg/kg de dieta. Sin embargo, este requerimiento no es el mismo en larvas, ya que su metabolismo es más acelerado que los de juveniles y adultos, por lo cual las

concentraciones necesarias para mantener su desarrollo puede ser mayor (Dabrowski, 1990). Durante el larvicultivo el requerimiento de vitamina C de diversas especies ha sido calculado, para bagre *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), *Dicentrarchus labrax* y *Scophthalmus maximus*, se observó que los diferentes niveles de vitamina C no influyeron sobre la supervivencia los primeros días de vida de las larvas; sin embargo, a partir del día 7 se detectó un mayor crecimiento. Al final del experimento el peso había superado por un 30 % a las de las larvas que no se les suplementó con vitamina C. Se recomendó utilizar un intervalo de concentraciones de vitamina C entre 1400 y 2200 µg/g de dieta en base seca (Merchie *et al.*, 1995a y b; Merchie *et al.*, 1996). En otro estudio realizado por Gapasin *et al.* (1998) con larvas de *Chanos chanos*, se determinó que al enriquecer los alimentos vivos con un enriquecedor comercial (Selco plus vitamin C 20% AP), se incrementó el crecimiento, tuvieron mejor supervivencia a una prueba de estrés y el porcentaje de deformidades disminuyó significativamente comparado con las larvas alimentadas con dietas enriquecidas solamente con enriquecedores comerciales y sin ninguna vitamina. Este autor menciona que la importancia de esta vitamina esta dada por el papel que juega en la síntesis de colágeno necesario para la formación del tejido conectivo y las matrices óseas (Sandel & Daniel, 1988).

En un estudio realizado con huevos y alevines de salmon del Atlántico *Salmo salar* (Linnaeus, 1758), se probó una concentración de tiamina (10 g/l) en una solución, dándole baños a los huevos, además de diluir esta misma cantidad de vitamina en aceite de sardina, esparciéndola sobre los pellets para la alimentación de los alevines. Los resultados mostraron que la adición de tiamina incrementó la supervivencia, además de incrementar la respuesta humoral en contra de enfermedades como el síndrome de Cayaga, A pesar de la incorporación de vitamina B1, se determinó que existe una fuerte actividad tiaminasa, que disminuye de manera importante la concentración de esta vitamina en la sangre y tejidos, lo que provocó altas mortalidades (Fisher *et al.*, 1998).

Otra de las vitaminas que se ha estudiado con cierto interés, es la vitamina E (α -tocoferol), que de manera natural es un antioxidante de las grasas, fortaleciendo los alimentos usados

en acuicultura, previniendo enfermedades y aumentando la resistencia al estrés. Mourente *et al.* (1999) relaciona la presencia de vitamina E, enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión-S-transferasa (GST), además de la formación de malondialdehído (MDA) y el consumo de ácidos grasos durante el desarrollo embrionario y larvario de *Dentex dentex*. Los resultados mostraron que la formación de MDA (malondialdehído) aumenta después de la eclosión, por lo que la cantidad de ácidos grasos es rápidamente oxidada por la presencia de radicales libres (Janssens *et al.*, 2000). Asimismo, la formación de enzimas como la SOD, catalasa, GPX y GST, aumenta rápidamente. Los autores concluyen que la peroxidación lipídica aparentemente no provoca un estrés adicional significativo en las larvas de peces marinos en inanición, aunque faltan estudios para relacionar los cambios de dichos compuestos durante el proceso de alimentación y cambios de alimento durante el larvicultivo.

De esta manera, se necesita continuar con los estudios sobre los requerimientos de vitaminas en larvas de peces marinos, sabiendo que al ser organismos morfológicamente y fisiológicamente no desarrollados sus requerimientos deberán ser mayores que los de adultos, además de manera forzosa deberán ser incluidos en las dietas, ya sea enriqueciendo los alimentos vivos o incluyéndolos en las dietas inertes, a fin de lograr que lleguen a las larvas y puedan realizar sus diversas funciones.

4.5. Minerales

En el caso de peces adultos, la información acerca de los requerimientos de minerales ha sido bastante documentada para algunos de los elementos (Watanabe *et al.*, 1988; Hilton, 1989; Lall, 1989; Steffens, 1989). Sin embargo, en larvas de peces marinos, no ha sido estudiado con profundidad, por lo cual solamente se pueden mencionar algunos ejemplos donde se ha intentado realizar los estudios de sustitución de presas vivas por alimento inerte, por lo que no se determinan los requerimientos específicos para cada mineral, sino se adicionan altas cantidades de todos ellos a fin de evitar alguna carencia. De esta manera,

se han elaborado diferentes fórmulas con concentraciones de premezclas de minerales entre 5 y 7 % en función de la dieta (base seca) dependiendo de la especie (Hung *et al.*, 2002).

5. Prioridades Para la Cría Larvaria de Peces Marinos

5.1. Situación actual y condicionantes

La piscicultura marina actual, en contraposición a la piscicultura tradicional, es comparable a una cría controlada de alta densidad en agua de mar y constituye una actividad relativamente reciente. Iniciada hace una veintena de años, en la actualidad se ha convertido en una actividad comercial para las especies o grupos más avanzados, como es el caso de salmónidos, *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *Scophthalmus maximus* entre otros, estando integrada en los programas acuícolas desde los años 70, sin alcanzar por el momento niveles de producción saturantes. En consecuencia, es indispensable el desarrollo de técnicas que permitan un aprovisionamiento adecuado de semilla para controlar el ciclo productivo, asegurando y mejorando los niveles de producción actuales.

Entre las dificultades encontradas en el cultivo de peces marinos, destacan su pequeño tamaño y la fragilidad de sus larvas después de la eclosión, comparados con alevines de salmón que posee reservas vitelinas suficientes para ingerir dieta artificial desde el inicio de la eclosión. Mientras que las larvas de peces marinos, tienen reservas vitelinas muy escasas y son rápidamente absorbidas, por lo que deben ingerir su primer alimento (fito y zooplancton) a los pocos días de vida. Debido a estas limitaciones la salmonicultura ha conseguido sus logros a un ritmo mucho mayor que la acuicultura de especies con ontogenia indirecta. Asimismo, entre los 40 y 60 días sucesivos a la eclosión, es la fase más delicada y crítica en el ciclo productivo, con una mortalidad que a veces rebasa el 90%. De esta manera, es preciso establecer y mantener paralelamente al cultivo larvario, cultivos auxiliares que garanticen la ingesta de un alimento exógeno adecuado. Todas estas técnicas adaptadas a escala de producción representan una carga costosa y delicada, que puede convertirse en un factor limitante del cultivo larvario. Por ejemplo, para 300 m² de

instalaciones de cultivo larvario de *Seriola* sp., es necesario disponer de un equivalente de 1100 m² para la producción de cultivos auxiliares. En este sentido, desde hace varios años, se ha intentado poner a punto una alimentación inerte que sustituya total o parcialmente a estos cultivos asociados a la cría de larvas (Alarcón, 1997; Yúfera *et al.*, 1999).

Entre muchas de las causas por las que se justifica la estrecha dependencia que tienen los cultivos larvarios de peces marinos con los cultivos auxiliares, algunos autores postulan la posibilidad de que las enzimas exógenas presentes en el alimento vivo poseen un efecto de activación de los zimógenos presentes en la larva (Jancarik, 1964), mientras que otros, valoran el aporte enzimático exógeno de un 60 a 90% de la actividad total (en función del contenido en enzimas de las presas y de su número en el tracto digestivo) (Lauff & Hofer, 1984). Por otra parte, Fluchter (1980) sugirió la existencia de un factor de crecimiento liposoluble y termolábil en los alimentos vivos, que es necesario para un adecuado desarrollo y crecimiento larvario. Sin embargo, muchas especies pueden ser deshabitadas al alimento vivo con el uso de alimento artificial justo en el momento de la transformación a juvenil. Especies como *Paralichthys dentatus* tienen un estómago completamente funcional durante el período larval en el momento de la transformación, por lo cual son considerados como juveniles y eliminando el uso de alimento vivo en este momento (Bisbal & Bengston, 1995). La posibilidad de reducir el uso de alimento vivo dependerá principalmente de los avances científicos en dos áreas de investigación: selección y digestibilidad de nutrientes, y comportamiento alimenticio. Las larvas que no tienen completamente desarrollado el sistema digestivo, probablemente requieran la adición de aminoácidos libres en las presas para después ser agregados en las dietas compuestas con el fin de ser asimiladas (Dabrowski & Rusiecki, 1983; Fyhn, 1989). Aunado a lo anterior, existe el problema para la aceptación de las dietas compuestas ya que se tienen que agregar partículas que no presentan movimiento, por lo cual no son tan atractivas para las larvas.

5.2. El empleo de alimentos artificiales

Como ya se mencionó, varios tipos de alimentos vivos han sido usados extensivamente en todo el mundo para el cultivo de larvas de peces y crustáceos. Sin embargo, el costo en infraestructura, trabajo y energía representan un costo muy alto en inversión. Además, la provisión de alimento vivo puede tener problemas como una provisión y calidad nutricional variables (Sorgeloos, 1980; Watanabe *et al.*, 1983). Consecuentemente, existe gran interés de desarrollar microdietas (MD) como una alternativa económica, en vez de la producción de alimentos vivos. De esta forma, las MD ofrecen la oportunidad de introducir nutrientes que no están disponibles en el alimento vivo (Rosenlund *et al.*, 1997).

Desde un punto de vista nutricional, el alimento vivo no siempre es el más adecuado. Es común que el suministro de este tipo de alimento puede verse interrumpido por problemas en el cultivo ocasionados por múltiples factores. Por ejemplo, la calidad nutritiva y precio de los nauplios de *Artemia* puede variar en función del lugar de origen de los quistes (Versichelle *et al.*, 1989), igualmente pueden ser vectores de ciertas enfermedades (parásitos, bacterias, virus, etc.). Además, el cultivo masivo de alimento vivo requiere de espacio, energía, mano de obra, etc. En contraposición las MD ofrecen una fácil disponibilidad, costos de producción más bajos y una mayor flexibilidad en las fórmulas, aunque Alarcón (1997) menciona que se requieren de cubrir una serie de características para lograr el uso de alimento artificial en la alimentación de las larvas de peces marinos como son:

1. Balance nutritivo de la fórmula. Es fundamental conocer los requerimientos nutricionales de las larvas de distintas especies a la hora de diseñar una dieta artificial con la que sustituir el alimento vivo, además para su formulación debe tenerse en cuenta la composición del zooplancton del que se alimentan. Sin embargo, hasta la fecha la metodología que se emplea para conocer los requerimientos específicos de los estadios larvarios se basa en resultados de composición corporal, crecimiento y mortalidad, lo que refleja la falta de conocimiento para el diseño de dietas inertes.

2. Homogeneidad de las partículas. Que todas las partículas contengan la misma cantidad de nutrientes, para evitar que algunas larvas crezcan más rápido o estén mejor nutridas que otras.
3. Tamaño de las partículas. En función del desarrollo del cultivo larvario es necesario suministrar un tipo de partícula concreta.
4. Densidad de las partículas. El mantenimiento de las micropartículas en suspensión en los tanques de cría a densidades suficientemente altas y moviéndose con suficiente lentitud es necesario para permitir una fácil captura por parte de la larva.
5. Estabilidad en el agua. El diseño de las microdietas o microcápsulas debe de evitar las pérdidas de nutrientes por lavado.
6. Solubilidad. Una vez en el interior del digestivo deben de ser fácilmente solubilizadas para mejorar su digestibilidad.
7. Estabilidad en el envasado. Este punto es fundamental para que en el momento que la dieta ni sea utilizada, mantenga sus propiedades nutricionales durante largo tiempo hasta su utilización, evitando de esta manera la oxidación de los lípidos y otros compuestos esenciales.
8. Atracción de la larva por la micropartícula. No hay demasiados estudios sobre el uso de atrayentes para aumentar la tasa de ingesta, sin embargo se sabe que un extracto de músculo de mejillón o una mezcla sintética de sustancias que lo imiten aumenta el apetito de peces jóvenes gracias a su alto contenido de aminoácidos libres y otros componentes químicos que provocan alta atractabilidad y palatabilidad (Tandler *et al.*, 1982).
9. Digestibilidad. La estructura y composición de la micropartícula debe permitir a la larva su digestión, ya que la existencia de un digestivo poco desarrollado en los primeros estadios dificulta el procesado de este alimento.
10. Contenido de agua. Actualmente, se recomienda el uso de microdietas con contenidos de humedad altos (> 20 %), ya que esto permitirá a la larva facilitar su tragado, digestión y absorción de nutrientes; sin embargo, es difícil mantener la composición nutricional y la calidad del alimento conforme aumente el contenido de humedad, por lo que se deberá encontrar un balance entre la cantidad de agua de la dieta y su calidad.

Es evidente que la mayoría de los factores son de naturaleza física y reflejan la importancia de adecuar el alimento a la morfología, fisiología y el medio físico de la larva.

Los tres principales tipos de alimentos desarrollados para la alimentación de larvas son: a) Las micropartículas, b) los microencapsulados y c) las partículas complejas. Los microparticulados, utilizan ligantes para mantener juntas las partículas. Los microencapsulados se fabrican por medio de paredes semipermeables que protegen los nutrientes de la lixiviación, especialmente aquellos solubles en agua. Las micropartículas complejas son una combinación de dos o más métodos en una sola partícula.

a) Las *micropartículas* se pueden separar en dos grupos principales, 1) las de pastel quebrado (crumbled cake), que a su vez se dividen en migajas y hojuelas, las cuales se producen por medio del peletizado y después quebrándolas en pedazos menores, y 2) las de tamaño homogéneo, que son un peletizado que no requiere de ser quebrado y se fabrica de un mismo tamaño. Este tipo de alimento tiene la ventaja de que no tiene pérdidas por el proceso de quebrado.

Los alimentos de pastel quebrado son fabricados utilizando sistemas de ligado. Para lograr la unión de las partículas se incorpora alginato, zeína, geles de agua fría, almidón, carragenanos, gelatinas o albúmina de huevo. Estos alimentos se fabrican en forma de largas matrices, que después son quebradas al tamaño deseado. Su efectividad en engorda de organismos acuáticos es alta y se usan en la alimentación de larvas de peces.

En el caso de las migajas, éstas se pueden dividir en dos tipos: las de peletizado con vapor o migajas extruidas. Estos tipos se han usado ampliamente en la engorda de salmónidos; sin embargo, no han sido muy efectivos en el cultivo de larvas, aunque se están intentando usar para formar partículas complejas en su alimentación. Las hojuelas se usan básicamente para alimentar peces de acuario. Estas se fabrican utilizando el método de doble tambor, además de que los tambores utilizan vapor como fuente de calor para secar el alimento. Estos

alimentos poseen la particularidad de tener una amplia superficie de contacto con el agua, por lo que son alimentos flotantes.

Los alimentos de tamaño homogéneo, se han utilizado ampliamente, además de tener muchas aplicaciones en procesos farmacéuticos. Estos alimentos se fabrican a través de diversos procesos. El primer proceso de fabricación que fue desarrollado es el de “microextrusión marumerización” (MEM), que es un proceso de dos pasos que resulta en productos extruidos en frío. Se usan muchos tipos de ligantes, además que la humedad es baja y no necesitan procesos de secado por calor. La característica principal de los alimentos elaborados por MEM es que son esféricos, lisos, su tamaño puede variar de 250-700 μm y tienen alta densidad, por lo que son partículas de hundimiento rápido, y tienen algunas limitaciones para ser utilizadas efectivamente en la crianza de larvas, aunque se pueden lograr alimentos flotantes con el uso de compuestos hidrofóbicos.

El segundo proceso es el de aglomeración rotacional de partículas asistidas (PARA), que de la misma manera utiliza el marumerizador. En éste, el extrusor no es utilizado. La rotación en el marumerizador proporciona la energía a las partículas las cuales transfieren esta energía a la mezcla húmeda, con lo que se producen alimentos esféricos en una amplia cantidad de tamaños. La formulación y el contenido de humedad son muy importantes con este proceso. Una ventaja de este proceso al compararse con el MEM es el menor costo durante la fabricación. Se usan los mismos ligantes que en el MEM, aunque tiene la desventaja de que las partículas no son de una forma homogénea. Además, la distribución de tamaños en el PARA es mayor que en el MEM. Asimismo, la densidad del alimento es menor, por lo que el alimento es de hundimiento lento, siendo adecuado para la alimentación de larvas de peces.

Recientemente se introdujo a la industria otro proceso para fabricación de alimentos para larvas, conocido como Sphere-izer Agglomeration System (SAS), que es muy similar al sistema MEM, pero puede trabajar de manera continua y a mayor escala. Un aspecto importante, es que los ingredientes deben ser previamente pulverizados (a 100 μm para

obtener alimentos de 500 μm) y que se emplea extrusión a baja temperatura por lo que la calidad nutricia del alimento no se altera durante la fabricación. Requieren de secado y tamizado de partículas, aunque su homogeneidad es alta. Los microalimentos obtenidos por SAS tienen forma esférica u ovoide, su tamaño puede ser tan pequeño como 300 μm , tiene buena estabilidad en el agua y en general, su calidad es mejor que la de las migajas obtenidas por peletización y extrusión convencional, por lo que son aptos para la alimentación de larvas de peces.

Otro proceso es el de “spray beadlets”, donde se producen microalimentos esparciendo partículas dentro de un líquido que ayuda en la formación de los micropellets; en este caso, los ligantes más comunes son los alginatos y la gelatina. En este proceso se producen una amplia gama de tamaños de partículas por lo que se pueden usar durante diferentes períodos del cultivo de larvas.

b) Los alimentos *microencapsulados* se componen de una pared semipermeable que rodea el núcleo el cual contiene los nutrientes que se desean proteger. Esta tecnología tiene muchas aplicaciones y ha sido adoptada para el desarrollo de alimentos para larvas. Las microcápsulas se pueden dividir en dos grupos, 1) impermeables y 2) de liberación controlada. La composición de la cápsula se determina por el tipo de pared ya que dependiendo de la naturaleza del nutriente que se desee encapsular será el tipo de cubierta que químicamente se podrá desarrollar. Debido a la gran cantidad de aplicaciones que tienen las microcápsulas, no todas las sustancias utilizadas para la cápsula son adecuadas para elaborar alimentos para larvas ya que algunas son de alta toxicidad, de baja digestibilidad o no permiten la liberación de ciertas sustancias atractantes en el agua. Las más adecuadas son las microcápsulas formadas por paredes de proteínas (cross-linked protein) y de lípidos (lipid-walled). Sin embargo, se deberán hacer pruebas de calidad con la intención de cubrir ciertas características como son una alta retención de nutrientes, que la pared pueda ser digerida, alta estabilidad y durabilidad. El objetivo principal es evitar la pérdida de nutrientes en el agua, además que se debe considerar que la pared en si misma es otro nutriente que se puede utilizar. Algunos tipos de microcápsulas tienen una baja carga

de nutrientes en el núcleo, por lo que solamente se pueden utilizar para acarrear ciertos nutrientes esenciales, pero no todos los que son requeridos.

Otro método empleado es el de doble emulsión que se usa para producir cápsulas lipídicas por medio de la emulsificación de cargas acuosas en materiales de pared lipídica. Una emulsión secundaria es formada colocando la emulsión primaria dentro de una solución acuosa.

c) Finalmente, se pueden utilizar las *partículas complejas* (Fig. 16) que se piensa serán las de mayor éxito para la alimentación de larvas. Estos alimentos tienen más flexibilidad y pueden contener todos los nutrientes requeridos (Ozkizilcik & Chu, 1996). Todos los métodos para la elaboración de alimentos para larvas tienen sus ventajas y desventajas. El problema con las partículas complejas, al ser la combinación de varios métodos es el tamaño que llegan a alcanzar, pudiendo ser muy grande para algunas especies, por lo que la eliminación del alimento vivo no es totalmente posible. Otra desventaja es que al estar elaboradas por varios métodos, dificulte la digestión dentro del sistema digestivo de la larva, sobretodo al no tenerlo totalmente desarrollado (Barrows, 2000).

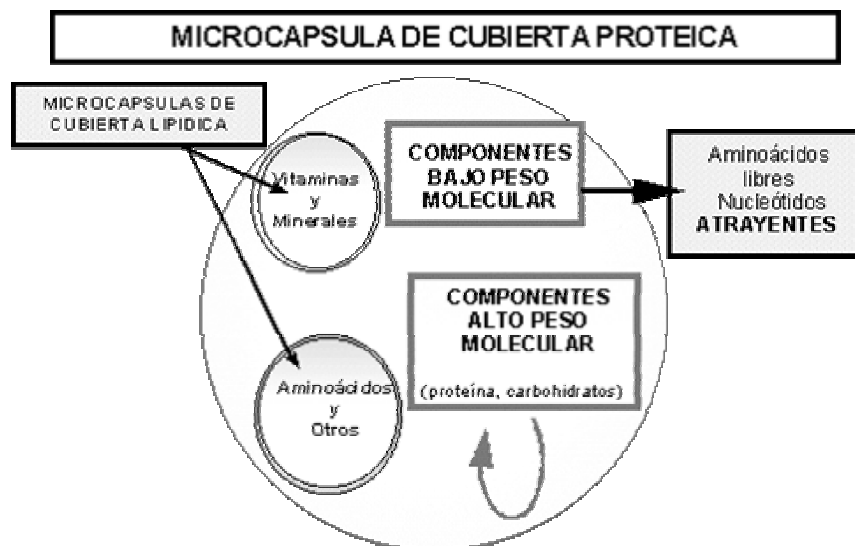


Figura 16. Modelo de alimento microencapsulado para larvas de peces marinos. (Gabott *et al.*, 1976 modificada).

El desarrollo de un alimento inerte disponible para remplazar el alimento vivo usado en la crianza de larvas de peces marinos es obviamente una alternativa de alto interés para la industria acuícola. Desde los primeros experimentos en los setentas como los de Adron *et al.* (1974) y Barnabé (1976), se han usado diferentes tipos de partículas para la alimentación de larvas de peces marinos (Kanazawa & Teshima, 1988; Jones *et al.*, 1993; Person-Le Ruyet *et al.*, 1993; Watanabe & Kiron, 1994). Sin embargo, siempre ha habido limitaciones para la completa sustitución del alimento vivo, por lo que el larvicultivo basado exclusivamente en el uso de las MD ha probado tener una serie de problemas que necesitan ser evaluados entre la complejidad que involucra el conocimiento de los requerimientos nutricionales de las larvas y el desarrollo de la tecnología de alimentos que permita la producción de alimentos de buen tamaño, atracción y digestibilidad para las larvas de peces marinos. Una buena cantidad de estudios se han llevado a cabo para lograr la sustitución del alimento vivo por MD (Dabrowski, 1984; Foscarini, 1988; Hardy, 1989), aunque esta introducción no ha sido del todo exitosa, dependiendo de la especie y del conocimiento de su fisiología (Adron *et al.*, 1974; Barnabé, 1976; Kanazawa *et al.*, 1982; Appelbaum & Van Damme, 1988; Walford *et al.*, 1991). También, se ha concluido que la baja aceptación de la MD está relacionada con problemas de aceptación y atracción de las partículas. Tandler & Kolkovski (1991) encontraron que las larvas de *Sparus aurata* consumieron una décima parte de una MD experimental comparado con la cantidad total de alimento vivo, lo cual ocasionó un bajo crecimiento y supervivencia.

En algunas especies se ha constatado la ingestión, pero no digestión de microcápsulas, siempre que éstas sean proporcionadas como único alimento a edades demasiado tempranas (Köck & Hofer, 1989; Van Damme *et al.*, 1989). En el caso de utilizar microcápsulas, son diversos los factores que intervienen en el procesado digestivo de las mismas (tamaño, composición). Las larvas bien alimentadas con rotíferos presentan estructuras normales observadas a través de histología. Por el contrario, las larvas alimentadas con microcápsulas muestran síntomas de inanición con una reducción en el tamaño general del cuerpo que afecta principalmente al tubo digestivo y al hígado (Sarasquete *et al.*, 1995; Yúfera *et al.*, 1996). A nivel histológico, las alteraciones más notables son el adelgazamiento y

destrucción del epitelio del intestino anterior, desorganización y necrosis del tejido hepático y pancreático, y la ausencia de inclusiones supranucleares (proteínas y mucosustancias) en el intestino posterior.

El escaso o nulo crecimiento larvario, así como el aumento de mortalidad que se obtiene cuando la alimentación es exclusivamente inerte, puede estar relacionado con alteraciones de la mucosa intestinal. La acumulación de lípidos en el intestino puede relacionarse con deficiencias en su movilización hacia otros lugares y se ha detectado en larvas alimentadas con dietas inertes, pero no en aquellas alimentadas con zooplancton. Además, la dilatación observada en la vesícula biliar de larvas alimentadas con dietas inertes supone un cúmulo de sales biliares y colesterol que, al no salir al intestino, impiden una adecuada digestión de los lípidos (Shen *et al.*, 2001).

Algunos autores proponen, como solución a la baja digestibilidad encontrada con los alimentos microencapsulados, la elaboración de microcápsulas que incorporen aminoácidos libres en mayor cantidad, así como moléculas de bajo peso que puedan ser fácilmente absorbidas en vacuolas pinocíticas. Esto presenta el inconveniente de que las actuales técnicas de elaboración de microcápsulas implican la existencia de poros en las cubiertas que permitirían el paso de tales sustancias al exterior. Para prevenir este efecto, Villamar & Langdon (1993) desarrollaron un tipo de microcápsulas que si bien, retenían los micro y macronutrientes, tenía escasa aceptabilidad por parte de las larvas. En este sentido, los últimos estudios apuntan hacia el diseño de microcápsulas más complejas que tengan la capacidad de liberar atrayentes de bajo peso molecular, tales como aminoácidos libres, con objeto de aumentar la ingestión por parte de la larva, pero que a su vez retengan con mayor eficacia vitaminas, minerales, y en general su contenido nutritivo (Ozkizilcik & Chu, 1996).

Otra alternativa utilizada es el uso de técnicas de coalimentación como las empleadas por Walford *et al.* (1991) quienes han reportado que las membranas proteínicas de las microcápsulas para larvas de *Lates calcarifer* fueron rotas solamente cuando se agregaron rotíferos al mismo tiempo. En el estudio de Lazo *et al.* (2000) con larvas de *Sciaenops*

ocellatus (Linnaeus, 1766) utilizaron una combinación de alimento vivo y microparticulados, logrando los mismos resultados que al utilizar exclusivamente alimento vivo. Algunos trabajos con larvas de *Sparus aurata* han permitido el desarrollo de alimentos microencapsulados que tienen una alta aceptación e ingestión, aunque la producción es limitada (Yúfera *et al.*, 1996; Fernández-Díaz & Yúfera, 1997). El primer aspecto que se debe considerar es la composición e interrelación entre la larva y el agua de mar, y la partícula y el agua de mar, por lo que el mantenimiento de la calidad de la partícula y la calidad del agua durante la crianza es esencial. En estudios previos, Fernández-Díaz & Yúfera (1997) desarrollaron un sistema de crianza estandarizado para evaluar el crecimiento durante el período larvario utilizando alimento inerte. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios en cuanto a la aceptación de las micropartículas con supervivencias por arriba del 60 %, pero se requiere evaluar su costo antes de desarrollarlo comercialmente. Recientemente, se han hecho modificaciones al prototipo de este alimento, lo que ha permitido mejorar los microencapsulados y sus usos. Como un resultado adicional, todos estos cambios en los tipos de microcápsulas han mejorado la eficiencia cuando se usa junto con el alimento vivo en la alimentación de larvas de peces marinos.

En la actualidad, estos microalimentos se están utilizando para evaluar los requerimientos nutricionales específicos para las larvas de *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata* (Yúfera *et al.*, 1999). Por otra parte, la evaluación de los requerimientos nutricionales larvarios usando micropartículas se ha limitado casi exclusivamente a los requerimientos en ácidos grasos (Izquierdo, 1996; Bessonart *et al.*, 1999; Sargent *et al.*, 1999), solamente algunos estudios se han enfocado a vitaminas liposolubles y lecitina (Izquierdo & Fernández-Palacios, 1997). Recientemente, el efecto de los lípidos dietarios ha sido evaluado para las larvas de *Dicentrarchus labrax* (Zambonino-Infante & Cahu, 1999). En referencia a las proteínas, los estudios se han enfocado principalmente en la ontogenia enzimática y la inclusión de enzimas para ayudar a la digestión de las larvas (Cahu & Zambonino-Infante, 1994; Zambonino-Infante & Cahu, 1994a y b) y en la utilización de aminoácidos y fracciones proteínicas (Carvalho *et al.*, 1995; Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999). El resultado alcanzado hasta la fecha es que se ha logrado sustituir el alimento vivo

totalmente, igualando los resultados en crecimiento al utilizar microcápsulas para las larvas de *Sparus aurata*, aunque su industrialización es un proceso muy caro que todavía requiere de mejoras en los procesos de fabricación, a fin de hacer rentable su utilización (Yúfera *et al.*, 1999).

6. Tendencias de la Investigación en la Alimentación y Nutrición de Larvas de Peces Marinos

6.1. Tamaño de la presa

El tamaño de la presa puede afectar la ingesta de las larvas, por ejemplo, el uso de diferentes cepas/especies de rotíferos es requerido para proveer un tamaño de presa óptimo para las larvas. Se ha comprobado que el uso de rotíferos pequeños mejora el rendimiento de alimentación inicial en las larvas de *Scophthalmus maximus* y especialmente con larvas de *Sparus aurata* en las etapas tempranas de desarrollo (Polo *et al.*, 1992; Cunha & Planas, 1999). El efecto en la alimentación al usar rotíferos pequeños como el *Brachionus rotundiformis* puede incrementar la incidencia de alimentación así como la tasa de ingesta (Cunha, 1996).

Asimismo, existen una serie de alternativas que se están investigando como es el uso de microalgas (Retain *et al.*, 1994), larvas de moluscos, nuevas especies de copépodos (*Tisbe sp.*) que se están domesticando (Nanton & Castell, 1998), mezclas de zooplancton filtradas del ambiente (Doi *et al.*, 1997), así como la utilización de los alimentos vivos tradicionales, pero en forma de coalimentación a bajas densidades de presas, que promueven el aprendizaje de caza, mejorando los resultados obtenidos hasta la fecha con presas vivas exclusivamente (Kolkovski, 2001).

6.2. Composición bioquímica de la presa

Se han realizado avances significativos en la manipulación de la composición bioquímica de las presas. Se ha puesto la mayor atención en los n-3 HUFA, y se ha establecido que la composición de las presas refleja la composición de las dietas, principalmente en relación a los lípidos. Otra área de estudio que se está explorando es la relacionada con la manipulación de las dietas de las presas (microalgas y levaduras) (Rainuzzo *et al.*, 1997). La formulación de estas dietas para enriquecer a las presas ha mejorado grandemente, resultando en una alta cantidad de lípidos y proteínas en las presas, además de mejorar los contenidos de DHA, EPA, ARA, diversas clases de lípidos y la incorporación de vitaminas como el ácido ascórbico.

La importancia de los lípidos ha sido ampliamente estudiada y fue mencionado en los apartados anteriores, siendo los ácidos grasos los más estudiados, en especial aquellos que provienen de fosfolípidos, al poder ser utilizados directamente en vez de los ácidos grasos poliinsaturados provenientes de triglicéridos (Castell *et al.*, 1994; Izquierdo *et al.*, 2000). Uno de los ácidos grasos más importantes es el ácido araquidónico (ARA, 20:4 n-6), ya que se considera el precursor del EPA y DHA, por lo que su presencia en los alimentos para larvas es fundamental. Se debe continuar dando énfasis en los estudios sobre las proporciones adecuadas de los ácidos grasos EPA/DHA, EPA/ARA, DHA/ARA, además de las proporciones de n-6/n-3 (Estévez, 1996). Es imprescindible continuar estudiando los requerimientos en lípidos para larvas, ya sea en el alimento vivo o en alimentos inertes en la medida que la sustitución de presas lo permita. Asimismo, se requieren buscar fuentes lipídicas alternativas que puedan sustituir los aceites de pescado. Sin embargo, los requerimientos de ácidos grasos variarán en función de la especie y del estadio de desarrollo en el que se encuentre. Aunado a esto, la limitada capacidad lipasa/esterasa que presentan las larvas de peces marinos, hacen imprescindible estimar adecuadamente el requerimiento de ARA, DHA y EPA (Cousin *et al.*, 1987) ya que si estas concentraciones no se calculan adecuadamente pueden provocar efectos adversos sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas (Bell *et al.*, 1996).

Se están estudiando mejores métodos de enriquecimiento de presas por períodos largos y/o cortos (Han *et al.*, 2000). Por ejemplo, una mezcla de levadura, más 10 % de emulsión lipídica, es usada en el método de enriquecimiento largo, lo que ocasiona que los rotíferos cultivados con la misma emulsión por más de cinco generaciones obtendrán más del 95 % de la biomasa total con la misma composición de ácidos grasos que la dieta (Olsen *et al.*, 1993).

Compuestos como la betaina, los aminoácidos libres secretados (glicina, alanina y arginina), la pancreatina y los fosfolípidos han sido identificados como factores que incrementan la ingestión, por lo que se deberá seguir estudiando sustancias atractantes que permitan mejorar el uso de los alimentos para larvas (Kolkovski *et al.*, 1993; Coutteau *et al.*, 1997). Además de desarrollar alimentos de flotabilidad media que inclusive lleguen a tener movimiento para atraer a las larvas, estas microcápsulas se pueden desarrollar por medio de la inclusión de la adición de aceites no volátiles dentro del núcleo (Lee *et al.*, 2001).

6.3. Uso de probióticos

El uso de probióticos en la nutrición de las larvas, puede contribuir en dos aspectos a mejorar la nutrición y condición de las larvas. El primero se relaciona con poblar la superficie intestinal con microflora benéfica que sustituya a la posible flora patógena que se pueda adherir y por ende matar a la larva. El segundo aspecto permitirá que las poblaciones de bacterias benéficas contribuyan a la nutrición de las larvas por medio de la secreción de sustancias que permitirán la maduración precoz de los enterocitos; asimismo, como fuente de nutrientes al ser digeridos en cierta medida los probióticos (Tovar *et al.*, 2002). La adición de este tipo de probióticos como *Saccharomyces cerevisiae* o *Debarymyces hansenii* (la cual secreta altas cantidades de poliaminas) se puede hacer a través de la microdieta o alimentando a las presas vivas para ser usadas como vectores de probióticos para las larvas (Péres *et al.*, 1997).

6.4. Fisiología y bioquímica digestiva

A pesar de todos estos avances en las investigaciones sobre la alimentación y nutrición de larvas de peces marinos, muchas preguntas permanecen sin contestar, como los estudios sobre modelos de crecimiento y supervivencia; información sobre la habilidad digestiva y de absorción durante el desarrollo de las larvas hasta su transformación a juvenil. La longitud así como la superficie de absorción del canal alimentario deben ser medidas y relacionadas con la longitud de la larva. Estas comparaciones podrían indicar incrementos desproporcionados en la superficie de absorción con el desarrollo y puede proveer una clara explicación que permita mejorar la eficiencia de alimentación.

Estudios histoquímicos de los estadios de desarrollo de más especies podrían también contribuir a entender los cambios en la absorción. Sería importante estudiar las enzimas, enfocándose en las lipasas y esterasas, ya que la evidencia histológica de estas enzimas podría indicar la capacidad de las larvas para digerir y absorber lípidos. Se deben considerar los estudios de fosfatasas alcalinas, ácidas y su relación con mediadores de sodio para el transporte activo, además de su asociación con cuerpos de inclusión supranucleares y absorción pinocítica (Ugolev, 1965; Watanabe, 1984a). Es recomendable hacer estudios de histoquímica usando diversas reacciones para la determinación de los sitios de absorción y digestión intracelular a través de densitometría, con lo que se podrá cuantificar una concentración específica y por ende la capacidad digestiva y de absorción de las larvas conforme avanza su desarrollo.

Los cuestionamientos sobre la estimulación enzimática deben ser resueltos para poder desarrollar los alimentos para las larvas. Otro tipo de estudios que también son necesarios son los de radioinmunoensayos, ya que las reacciones anticuerpo-antígeno durante estos períodos son muy sensibles, permitiendo medir las diferentes actividades enzimáticas en las diferentes zonas del tracto digestivo (Hjelmeland, 1983; Hjelmeland *et al*, 1983).

El papel que juegan los péptidos en las neuronas y células endócrinas del sistema gastrointestinal en peces, especialmente en larvas, esta todavía poco explorado con solamente unos cuantos trabajos en larvas de peces. Se han identificado diferentes neuropéptidos en peces como la 5-hydroxitriptamina, bombesina, gastrin r colecistoquinina (CCK), esomatostatina, substancia P y péptidos intestinales vasoactivos (Tagliaferro *et al.*, 1989; Chan & Hale, 1992; Holmgren *et al.*, 1992; Kiliaan *et al.*, 1992; Holmgren, 1993). El efecto de estos neuropéptidos y de otras hormonas, como las de crecimiento, hormonas tiroideas T3 y T4 deberán ser investigadas en relación al desarrollo del sistema digestivo en las larvas de peces (Kamisaka *et al.* 2001).

Kolkovski *et al.* (1997b) encontró un incremento de 300 % de la bombesina en larvas de *Sparus aurata*, alimentadas con nauplios de *Artemia*, lo que indica que los nauplios estimulan la actividad bombesina de alguna manera, incrementando los movimientos peristálticos y asistiendo en el proceso de digestión. Una hipótesis que se maneja para explicar la estimulación de la bombesina es el movimiento del alimento vivo. Otros estudios que pretenden incrementar la actividad enzimática han sido a través del uso de neuropéptidos suplementados en las MD, estos neuropéptidos incrementan la actividad del sistema digestivo por medio de los movimientos peristálticos. La bombesina, un tetradecapéptido (McDonald *et al.*, 1979), está cercanamente relacionado con el péptido liberador de gastrina en mamíferos (GRP) y ha sido probado en *Gadus morhua* (Holstein & Humphrey, 1980). La bombesina tiene un efecto exitatorio en los músculos estomacales en *Oncorhynchus mykiss* (Holmgren, 1993), *Myoxocephalus scorpius* y *Gadus morhua* (Thorndyke *et al.*, 1984; Thorndyke & Holmgren, 1990) y en el recto de *Squalus acanthias* (Lundin *et al.*, 1984).

Las larvas de peces marinos en general ingieren sus presas y éstas permanecen vivas en el esófago. El movimiento de las presas puede causar movimientos en las paredes del intestino y de las microvellosidades, estimulando la liberación de los neuropéptidos. Al alimentarse las larvas con dietas inertes, la carencia de movimiento en las microvellosidades puede ser muy baja o no existir, por lo que la suplementación de la bombesina puede corregir este

problema. Sin embargo, Kolkovski *et al.* (2000a) no encontraron diferencias en el crecimiento o la actividad de pepsina y tripsina en juveniles de perca Europea *Perca fluviatilis* (Linnaeus, 1758), con dietas suplementadas con bombesina. Una explicación fue la retroalimentación negativa del neuropéptido exógeno, suprimiendo la liberación de bombesina endógena y de otros neuropéptidos. Un método indirecto para incrementar la actividad proteasa del sistema digestivo fue reportado por Kolkovski (1995). Este autor reportó un incremento total de la actividad proteolítica tipo tripsina en larvas de dorada desde el día 3 hasta el 18 después de la eclosión, cuando se agregó *Artemia* al tanque de crianza. El agua contenía aminoácidos libres y otros compuestos, los cuales pudieron servir de atrayentes. Kolkovski *et al.* (1997a), por otra parte, al agregar nauplios de *Artemia*, promoviendo el estímulo visual, sin agregar ningún alimento seco o vivo también obtuvo un incremento de la actividad enzimática. Los autores centrifugaron hidrolizado de krill líquido *Euphasia pacifica* (Hansen, 1911) y agregaron el sobrenadante directamente al tanque de cultivo de larvas junto con la microdieta. Se tomaron muestras de larvas desde el día 2 hasta el 20, en cada día se tomaron las muestras 5 min después de agregar la MD y el sobrenadante del hidrolizado de krill. El estudio mostró un incremento significativo en la actividad tripsina al alimentar de esta manera. Asimismo, un incremento significativo en la actividad de la bombesina se detectó después de agregar la dieta y el sobrenadante. Kolkovski *et al.* (2000b) reportaron tasas de ingestión significativamente mayores con la MD y el sobrenadante del hidrolizado de krill en larvas de *Perca fluviatilis* y de *Coregonus clupeaformis* (Mitchill, 1818).

Los estudios más recientes muestran la posibilidad de mejorar el crecimiento y la supervivencia de las larvas y juveniles por medio de la preparación de hormonas de crecimiento a través de técnicas recombinantes (Ben-Atia *et al.*, 1999). Los estudios de absorción de nutrientes a través de micromanipulación y técnicas de radioinmunoensayos (Rønnestad *et al.*, 2001) (Fig. 17 y 18).

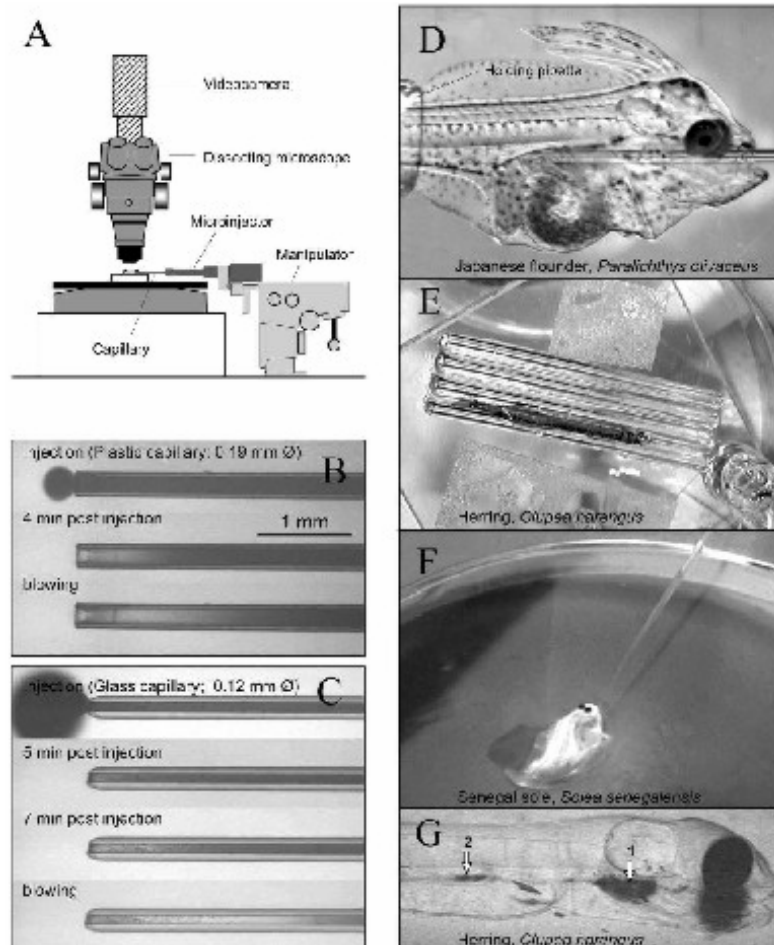


Figura 17. Método *in vivo* de alimentación por tubo. A. Equipo experimental, B y C. Expulsión y dilución de un líquido de prueba (compuesto en la punta de plástico u vidrio del capilar). D. lenguado japonés Estadio D siendo alimentado por el tubo con un líquido coloreado. E. Equipo para la mantener fija a la larva para la alimentación. F. Tubo de alimentación en una larva post-metamorfica de *Solea senegalensis*. G. Transporte pesintálico de la dieta inyectada de la boca al tubo medio en el herring (Tomado de Rønnestad *et al.*, 2001).

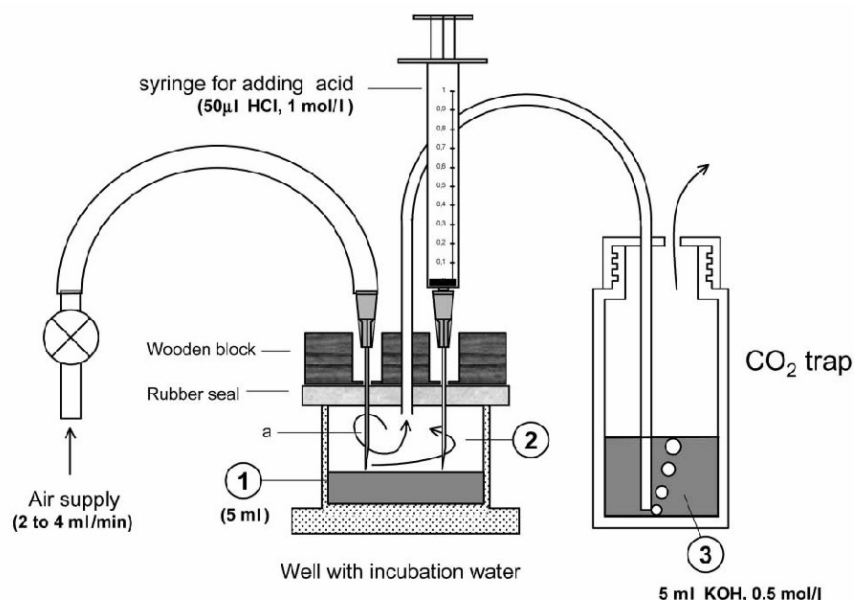


Figura 18. Equipo experimental para coleccionar el CO₂ metabólico producido durante la alimentación post-tubo. En el 2 final del período de muestreo, el ¹⁴C-marcado en los nutrientes vaciado del intestino se encuentra en el compartimiento 1, mientras que el ¹⁴C-CO₂ originado del catabolismo de la absorción de nutrientes está en el compartimiento 3 de la trampa de CO₂ (Tomado de Rønnestad *et al.*, 2001).

Para finalizar, los estudios más recientes tratan de involucrar las herramientas de biología molecular, por medio de técnicas de PCR y RT-PCR como es el estudio de Douglas *et al.* (1999) quienes determinaron la expresión genética de la pepsina durante la ontogenia de *Paralichthys americanus*, con el fin de conocer en que momento se realiza la transformación de larva a juvenil, encontrando que la maduración del sistema digestivo se da para el día 20 DE, con lo que sugieren realizar la sustitución de alimentos vivos por inertes una semana antes de lo que normalmente se hace.

El estudio de todos estos factores será claramente ventajoso para diferenciar morfológica y fisiológicamente entre taxa. Aunado a esto, los estudios sobre fisiología digestiva, las estrategias de alimentación, el potencial de crecimiento de las larvas de peces marinos, contribuirán en el entendimiento de su alimentación y nutrición con el fin de mejorar su supervivencia y la posibilidad de desarrollar tecnologías de cultivo para peces marinos con potencial acuícola.

7. Conclusiones

1. En relación a la ontogenia, se debe resaltar que las larvas de peces marinos (especialmente las de ontogenia indirecta), presentan limitaciones anatómicas y fisiológicas, por lo cual su alimentación y nutrición es más compleja y se deberá abordar más intensamente.
2. El nivel óptimo de proteína: energía en dietas para las larvas de muchas especies de peces marinos, debe contener al menos 50 a 55% de proteína, teniendo un cuidado particular en la cantidad y tipo de aminoácidos.
3. Un mínimo de 15 a 20% de lípidos totales es recomendable para la alimentación de larvas de peces marinos. Asimismo, una adecuada cantidad de aceite de pescado debe ser incluida en las dietas para cubrir los requerimientos de HUFA (ácido araquidónico, EPA y DHA). Esto garantizará la calidad de la semilla producida, además se debe poner cuidado especial en el nivel de inclusión y la fuente de lípidos. Es recomendable incrementar la fuente de fosfolípidos por arriba de los triacilglicéridos.
4. En cuanto a los requerimientos de carbohidratos, las larvas parecen tener una capacidad limitada tanto para la digestión como para la absorción de este tipo de moléculas, por lo que no es recomendable incluir una alta cantidad de este tipo de compuestos en las dietas, sean alimentos vivos o microdietas.
5. Se necesita mayor información en cuanto a los requerimientos de vitaminas y minerales durante el período larvario para poder formular dietas inertes adecuadas que cubran sus necesidades alimenticias.
6. Los requerimientos nutricionales larvarios han sido estimados indirectamente, por medio de la manipulación de las presas vivas. Sin embargo, el desarrollo de dietas inertes (microcápsulas, micropartículas o dietas complejas) para la crianza de las larvas contribuirá a una mejor evaluación de sus requerimientos.
7. Se están desarrollando técnicas finas para lograr entender no solamente los procesos de ingestión y digestión de las larvas, sino también los procesos de absorción, ya sea por el uso de herramientas moleculares, marcadores radioactivos y estudios *in vivo* en el tracto digestivo de las larvas.

8. La inclusión de sustancias químicas en las microdietas (neuropéptidos, poliaminas y/o enzimas digestivas, puede contribuir de manera importante, tanto en el proceso de digestión como de absorción de nutrientes.
9. Se requiere mayor cantidad de investigaciones como son, las relacionadas al comportamiento alimenticio, las capacidades digestivas, los procesos de absorción, y manipulación genética para lograr incrementar y mejorar la calidad de la semilla de peces marinos, a fin apoyar la producción de alimento que permita satisfacer la demanda a una escala mundial.

8. Bibliografía

- Abatsopoulos, T.J., Triantaphyllidis, G.V., Beardmore, J.A. & Sorgeloos, P. (1997) Cyst membrane protein composition as a discriminant character in the genus *Artemia* (International Study on Artemia LV). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **265**-268.
- Adron, J.W., Blair, A. & Cowey, C.B. (1974) Rearing of plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae to metamorphosis using artificial diet. *Fish. Bull.* **72**, 353–357.
- Alarcón, F.J. (1997) Procesos digestivos en peces marinos: Caracterización y aplicaciones prácticas. Ph.D. Thesis, Universidad de Almería, Spain. 101 pp.
- Alliot, E., Pastoureaud, A. & Trellur, J. (1977) Evolution des activités enzymatiques dans le tube digestif au cours de la vie larvaire du bar (*Dicentrarchus labrax*). Variations des protéinogrammes et des zymogrammes. *Colloq. Int. Cent. Nat. Rech. Sci.* **4**, 85-91.
- Anderson, R.J., Kienholz, E.W. & Flickinger, S.A. (1981) Protein requirements of smallmouth bass and largemouth bass. *J. Nutr.* **11**, 557-561.
- Appelbaum, S. & Van Damme, P. (1988) The feasibility of using exclusively dry diet for rearing of Israeli *Ž. Clarias gariepinus* Burchell larvae and fry. *J. Appl. Ichthyol.* **4**, 105–110.
- Balon, E.K. (1975) Terminology of intervals in fish development. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **32**, 1663-1670.
- Balon, E.K. (1979) The juvenilization process in phylogeny and the altricial to precocial forms in the ontogeny of fishes. *Env. Biol. Fish.* **4**, 193-198.
- Balon, E.K. (1981) Saltatory processes and altricial to precocial forms in the ontogeny of fishes. *Amer. Zool.* **21**, 573-596.
- Balon, E.K. (1984) Reflections on some decisive events in the early life of fishes. *Trans. Am. Fish. Soc.* **113**, 178-185.
- Barnabé, G. (1976) Elevage larvaire du loup (*Dicentrarchus labrax* L.; Pisces, Serranidae) l'aide d'aliment sec composé. *Aquaculture* **9**, 237–252.
- Barrington, E.J.W. (1957) The alimentary canal and digestion. In: *The Physiology of Fishes*. (Ed. by M.E. Brown). pp. 105-161. Vol 1, Academic Press, NY.
- Barrows, F.T. (2000) Larval feed production. *Aqua Feed* **2**, 15-20.
- Baskerville-Bridges, B. & Kling, L.J. (2000) Early weaning of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae onto a microparticulate diet. *Aquaculture* **189**, 109-117.
- Bdui, S. (1988) Diccionario de tecnología de los alimentos. Editorial Alhambra Mexicana, México, D.F. 300 pp.
- Bell, M.V., Mc Evoy, L.A., M. & Navarro, J.R. (1996) Deficit of dicosahexanoyl phospholipid in eyes of larval sea bass fed an essential fatty acid deficient diet. *J. Fish. Biol.* **49**, 941-952.
- Ben-Atia, I., Fine, M., Tandler, A., Funkenstein, B., Maurice, S., Cavari, B. & Gertler, A. (1999) Preparation of recombinant gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone and its use for stimulation of larvae growth by oral administration. *Gen. Comp. Endocr.* **113**, 155–164

- Bengston, B.-E., Léger, P. & Sorgeloos, P. (1991) Use of *Artemia* as a food source for aquaculture. In: *Artemia Biology*. (Ed. by R.A. Brown, P. Sorgeloos & C.N.A. Trotman). pp. 255-285. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernandez-Cruz, C.M., Gonzalez, M.M. & Fernández-Palacios, H. (1999) Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture* **179**, 265-275.
- Bisbal, G.A. & Bengston, D.A. (1995) Development of the digestive tract in larval summer flounder. *J. Fish Biol.* **47**, 277-291.
- Blaxter, J.H.S. & Hempel, G. (1961) Biologische Beobachtungen bei der Aufzucht von Herringsbrut. *Helgol. Wiss. Meeresunters.* **7**, 260-283.
- Blaxter, J.H.S. (1965) The feeding of herring larvae and their ecology in relation to feeding. *Calif. Coop. Oceanic. Fish. Invest. Rep.* **10**, 79-88.
- Blaxter, J.H.S. (1969) Development of eggs and larvae. In: *Fish Physiology*. (Ed. by W.S. Hoar & D.J. Randall). pp. 178-252. Vol. III, Academic Press, New York.
- Blaxter, J.H.S. & Hunter, J.R. (1982) The biology of clupeoid fishes. *Adv. Mar. Biol.* **28**, 211-240.
- Blaxter, J.H.S. (1986) Development of sense organs and behaviour of teleost larvae with special reference to feeding and predator avoidance. *Trans. Am. Fish. Soc.* **115**, 98-114.
- Blaxter, J.H.S. (1988) Pattern and variety in development. In: *Fish Physiology*. (Ed. by Hoar, W.S. & Randall, D.J.). pp. 1-58. Vol. XIA. Academic Press, San Diego.
- Boehlert, G.W. (1984) Scanning electron microscopy. In: *Ontogeny and systematics of fishes*. (Ed. by H.G. Moser, W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall & S.L. Richardson). pp. 43-48. Amer. Soc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Publ. 1, Lawrence.
- Boehlert, G.W. & Yoklavich, M.M. (1984a) Carbon assimilation as a function of ingestion rate in larval Pacific herring, *Clupea harengus pallasii* Valenciennes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **79**, 251-262.
- Boehlert, G.W. & Yoklavich, M.M. (1984b). Reproduction, embryonic energetics, and the maternal-fetal relationship in the viviparous genus *Sebastes*. *Biol. Bull.* **167**, 354-370.
- Brett, J.R. & Groves, T.D.D. (1979) Physiological energetics. In: *Fish Physiology*. (Ed. by W.S. Hoar, D.J. Randall & J.R. Brett). pp. 279-352. Vol. 8. Academic Press, New York.
- Brinkmeyer, R.L., & Holt, G.J. (1995) Response of red drum larvae to graded levels of menhaden oil in semipurified microparticulate diets. *Prog. Fish-Cult.* **57**, 30-36.
- Buckley, L.J. & Dillmann, D.W. (1982) Nitrogen utilization of larval summer flounder, *Paralichthys dentatus* (Linnaeus), *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **59**, 243-256.
- Buddington, R.K. & Diamond, J.M. (1989) Ontogenic development of intestinal nutrients transporters. *A. Rev. Physiol.* **51**, 601-619.
- Cahu, C.L. & Zambonino-Infante, J.L. (1994) Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: Effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* **109A**, 213-222.
- Cahu, C.L. & Zambonino-Infante, J.L. (1997) Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding? *Aquacult. Int.* **5**, 151-160.
- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., Quazuguel, P. & Le Gall, M.-M. (1999) Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diet for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* **171**, 109-119.
- Carvalho, A.P. Ferreira, M.L., Oliva Teles, A. & Bergot, P. (1995) Utilization of a fish protein hydrolysate in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) post-larvae. In: *Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura* (Ed. by F. Castelló A. Orsay & C. Reig). pp. 415-419. Publ. Universitat de Barcelona.
- Castell, J.D., Bell, J.G., Tocher, D.R. & Sargent, J.R. (1994) Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile rodaballo (*Scophthalmus maximus*) *Aquaculture* **155**, 149-164.
- Cetta, C.M. & Capuzzo, J.M. (1982) Physiological and biochemical aspects of embryonic and larval development of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Mar. Biol.* **71**, 327-337.
- Chan, C.B. & Hale, E. (1992) Effect of somatostatin on intragastric pressure and smooth muscle contractility of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *J. Fish Biol.* **40**, 545-556.
- Chatterjee, I.B. (1973) Evolution and biosynthesis of ascorbic acid. *Science* **182**, 1271-1272.
- Checkley, D.M. (1984) Relation of growth to ingestion for larvae of Atlantic herring *Clupea harengus* and other fish. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **18**, 215-224.

- Chitty, N. (1981) Behavioral observation of feeding larvae of bay anchovy, *Anchoa mitchilli*, and bigeye anchovy, *Anchoa lamprotaenia*. *Rapp. P.-V. Reun. Cons. Int. Explor. Mer* **178**, 320-321.
- Conceição, L.E.C., Houlihan, D.F. & Verreth, J.A.J. (1997) Fast growth, protein turnover and costs of protein metabolism in yolk-sac larvae of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiol. Biochem.* **16**, 291-302
- Conover, R. J. & Francis, V. (1973) The use of radioactive isotopes to measure the transfer of materials in aquatic food chains. *Mar. Biol.* **10**, 272-283.
- Conover, R.J. 1978. Transformation of organic matter. In: *Marine Ecology*. (Ed. by O. Kinne). pp. 221- 500. Vol. 4, Wiley. New York.
- Cousin, J.C.B., Baudin-Laurencin, F. & Gabaudan, J. (1987) Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting rodaballo, *Scophthalmus maximus* L. *J. Fish Biol.* **30**, 15-33.
- Coutteau, P. (1996) Determination of fatty acid requirements during weaning and first outgrowth of marine fish using a standard diet. Proceedings of a workshop on fish and mollusc larviculture improvement of the commercial production of marine aquaculture species, Santiago, Chile, Impresora Creces.
- Coutteau, P., Van Stappen, G. & Sorgeloos, P. (1996) A standard experimental diet for the study of fatty acid requirements of weaning and first on-growing stages of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. comparison of extruded and extruded/coated diets. *Arch. Anim. Nutr.* **49**, 49-59.
- Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M.R., Bergot, P. & Sorgeloos, P. (1997) Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture* **155**, 149-164.
- Cowey, C.B. & Sargent, J.R. (1979) Nutrition. In: *Fish Physiology*. (Ed. by W.S. Hoar, D.J. Randall & J.R. Brett). pp. 1-69. Vol. III, Academic Press, New York.
- Crane, R.K. (1975) A digestive-absorptive surface as illustrated by the intestinal cell brush border. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* **94**, 529-544.
- Cunha, I. (1996) Comportamiento trófico y fisiología energética de las larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) en condiciones de cultivo. Ph.D. Thesis, University of Santiago de Compostela, Spain, 283 pp.
- Cunha, I. & Planas, M. (1999) Optimal prey size for early rodaballo larvae *Scophthalmus maximus* L. based on mouth and ingested prey size. *Aquaculture* **175**, 103-110.
- Dabrowski, K. (1982) Proteolytic enzyme activity decline in starving fish alevins and larvae. *Env. Biol. Fish.* **7**, 73-76.
- Dabrowski, K. & Rusiecki, M. (1983). Content of total and free amino acid in zooplanktonic food of fish larvae. *Aquaculture* **30**, 31-42.
- Dabrowski, K. (1984) The feeding of fish larvae: present -state of the art- and perspectives. *Reprod. Nutr. Develop.* **24**, 807-833.
- Dabrowski, K. & Luczynski, M. (1984) Utilization of body stores in embryonated ova and larvae of two coregonid species *Coregonus lavaretus* L. and *C. albula* L. *Comp. Biochem. Physiol.* **79A**, 329-334.
- Dabrowski, K. (1990) Ascorbic acid status in the early life of whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Aquaculture* **84**, 61-70.
- Dabrowski, K., Culver, D.A., Brooks, C.L., Boss, A.C., Binkowski, F.P., Yeo, S.E. & Baloguin, A.M. (1991) Biochemical aspects of the early life history of yellow perch (*Perca flavescens*). In: *Fish nutrition in practice*. (Ed. by Kaushik, S.J. & Luquet, P.). pp. 531-539. Biarritz, Francia.
- Dedi, J., Takeuchi, T., Seikai, T. & Watanabe, T. (1995) Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed *Artemia* nauplii. *Aquaculture* **133**, 135-146.
- Dendrinis, P. & Thorpe, J.P. (1987) Experiments on the artificial regulation of the amino acid and fatty acid content in food organism to meet the assessed nutritional requirements of larval, post-larval and juvenile dover sole (*Solea solea*, L.) *Aquaculture* **61**, 121-154.
- Deplano, M., Connes, R., Díaz, J.P. & Paris, J. (1989) Intestinal steatosis in the farm reared seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Dis. Aquat. Org.* **6**, 121-130.
- Deplano, M., Díaz, J.P., Connes, R., Kentouri-Divanach, M. & Cavalier, F. (1991) Appearance of lipid-absorption capacities in larvae of the sea bass *Dicentrarchus labrax* during transition to the exotrophic phase. *Mar. Biol.* **108**, 361-371.
- Devillers, C. (1961) Structural and dynamic aspects of the development of the teleostean egg. *Adv. Morphol.* **1**, 379-428.

- Díaz, R.J., Mani-Ponset, L., Guyot, E. & Connes, R. (1994) Assimilation of dissolved glucose from sea water by the seabass *Dicentrarchus labrax* and the sea bream *Sparus aurata*. *Mar. Biol.* **120**, 181-186.
- Díaz, J.P., Mani-Poset, L., Blasco, C. & Connes, R. (2002) Cytological detection of the main phases of lipid metabolism during early post-embryonic development in three teleost species: *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata* and *Stizostedion lucioperca*. *Aquat. Living Resour.* **15**, 169-178.
- Doi, M., Toledo, J.D., Golez, M.S.N., de los Santos, M. & Ohno, A. (1997) Preliminary investigation of feeding performance of larvae of early red-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, reared with mixed zooplankton. *Hydrobiologia* **358**, 259-263.
- Douglas, S.E., Gawlicka, A., Mandla, S. & Gallant, J.W. (1999) Ontogeny of the stomach in winter flounder: characterization and expression of the pepsinogen and proton pump genes and determination of pepsin activity. *J. Fish Biol.* **55**, 897-915.
- Doving, K.B. & Knutsen, J.A. (1993) Chemokinesis in marine fish larvae. In: *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. (Ed. by B.T. Walther & H.J. Fhyn) pp. 139-145. Univ. Bergen, Norway.
- Duray, M.N., Alpasan, L.G. & Estudillo C.B. (1996) Improved hatchery rearing of mangrove red snapper *Lutjanus argentimaculatus*, in large tanks with small rotifers (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia*. *Bamidegh.* **48**, 123-132.
- Ehrlich, K.F. (1974) Chemical changes during growth and starvation of herring larvae. In: *The early life history of fish*. (Ed. by J.H.S. Blaxter) pp. 301-323. Springer-Verlag, New York.
- Escaffre, A.M., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., Mambrini, M., Bergot, P. & Kaushik, S.J. (1997) Nutritional value of soy protein concentrate for larvae of common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture* **153**, 60-83.
- Estévez, A. (1996) Effects of lipids and vitamin A on pigmentation success of flatfish. Ph.D. Thesis, University of Kagoshima, Japan, 149 pp.
- Estévez, A., Izhikawa, M. & Kanazawa, A. (1997) Effects of arachidonic acid on pigmentation and fatty acid composition of Japanese flounder, *Paralychthys olivaceous* (Temminck and Schlegel). *Aquacult. Res.* **28**, 279-289.
- Fänge, R. & Grove, D. (1979) Digestion. In: *Fish Physiology*. (Ed. by W.S. Hoar, D.J. Randall & J.R. Brett) pp. 161-260. Vol. 8, Academic Press. New York.
- Fernández-Díaz, C., Pascual, E. & Yúfera, M. (1994) Feeding behaviour and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. *Mar. Biol.* **118**, 823-828.
- Fernández-Díaz, H. & Yúfera, M. (1997) Detecting growth in gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae fed microparticules. *Aquaculture* **153**, 93-102
- Fernández-Palacios, H., Montero, D., Socorro, J., Izquierdo, M.S. & Vergara, J.M. (1994) First studies on spawning, embryonic and larval development of *Dentex gibbosus* (Rafinesque, 1810) (Osteichthyes, Sparidae) under controlled conditions. *Aquaculture* **122**, 63-73.
- Ferraris, R.P. & Ahearn, G.A. (1984) Sugar and amino acid transport in fish intestine. *Comp. Physiol.* **77A**, 397-413.
- Finn, R.N. (1994) Physiological energetics of developing marine fish embryos and larvae. Ph.D. Thesis, University of Bergen, Bergen, Norway.
- Fisher, J.P., Brown, S.B., Wooster, G.W. & Bowser, P.R. (1998) Maternal Blood, Egg and Larval Thiamin Levels Correlate with Larval Survival in Landlocked Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *J. Nutr.* **128**, 2456-2466.
- Fluchter, J. (1980) Review of the present knowledge of rearing whitefish (*Coregonidae*) larvae. *Aquaculture* **19**, 191-208.
- Fontagné, S. (1996) Effet des phospholipides alimentaires sur la structure histologique du foie et de l'intestin de larves de carpe. Ph.D. Thesis, Université de Bordeaux, France. 120 pp.
- Fortier, L. & Harris, R.P. (1989) Optimal foraging and density-dependent competition in marine fish larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **51**, 19-33.
- Foscarini, R. (1988) A review: intensive farming for red sea bream (*Pagrus major*) in Japan. *Aquaculture* **72**, 191-246.
- Fossum, P. (1983) Digestion rate of food particles in the gut of larval herring. *Fiskeridir Skr. Ser. Havunders.* **17**, 347-357.

- Frolov, A.V., Pankov, S.L., Geradze, K.N. & Pankova, S.A. (1991) Influence of salinity on the biochemical composition of the rotifer (*Brachionus plicatilis*, Muller) aspects of adaptation. *Comp. Biochem. Physiol.* **99A**, 541–550.
- Fukusho, K., Arakawa, T. & Watanabe, T. (1980) Food value of a copepod, *Tigriopus japonicus*, cultured with ω -yeast for larvae and juvenile of mud dab *Limanda yokohamae*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **46**, 499–503.
- Fukusho, K. (1989) Biology and mass production of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Int. J. Aquac. Fish. Technol.* **1**, 232–240.
- Furuita, H., Takeuchi, T., Watanabe, T., Fujimoto, H., Sekiya, S. & Imaizumi, K. (1996) Requirements of larval yellowtail for eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, and n-3 highly unsaturated fatty acid. *Fisheries Science* **62**, 372–379.
- Furuita, H., Tanaka, H., Yamamoto, T., Shiraishi, M. & Takeuchi, T. (2000) Effects of n y 3 HUFA levels in broodstock diet on the reproductive performance and egg and larval quality of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* **187**, 387–398
- Fyhn, H.J. (1989) First feeding of marine fish larvae: are a free amino acids the source of energy? *Aquaculture* **80**, 111–120.
- Fyhn, H.J., Finn, R.N., Helland, S., Rønnestad, I. & Lomslund, E.R. (1993) Nutritional value of phyto and zooplankton as live food for marine fish. In: *Fish Farming Technology*. (Ed. by H. Reinersten, L.A. Dahle, L. Jorgensen, K. Tvinnereim). pp. 121–126. Balkema, Rotterdam.
- Fyhn, H.J. & Govoni, J.J. (1995) Endogenous nutrient mobilization during egg and larval development in two marine fishes – Atlantic menhaden and spot. *ICES Mar. Sci. Symp.* **201**, 64–69.
- Gabott, P.A., Jones, D.A. & Nichols, D.H. (1976) Studies on the design and acceptability of micro-encapsulated diets for marine particle feeders. II Bivalve molluscs. *Eur. Symp. Mar. Biol.* **1**, 127–141.
- Gapasin, R.S.J., Bombo, R., Lavens, P., Sorgeloos, P. & Nelis, H. (1998) Enrichment of live food with essential fatty acids and vitamin C: effects on milkfish (*Chanos chanos*) larval performance. *Aquaculture* **162**, 269–286.
- Gardner, M.L.G. (1984) Intestinal assimilation of intact peptides and proteins from the diet - a neglected field? *Biol. Rev.* **59**, 289–331.
- Gatesoupe, F.J., Léger, C., Boudon, M., Metailler, R. & Luquet, P. (1977) Alimentation lipidique du rodaballo (*Scophthalmus maximus*, L.). II. Influence de la supplementation en esters methyliques de l'acide lenolenique es de la complementation en acides gras de la serie n-3 sur la croissance. *Ann. Hydrobiol.* **8**, 247–254.
- Gennari, L., Roncarati, A., Melotti, P. & Mordenti, O. (1992) Effects on early weaning on growth and survival of sea bass. *Rivista Ital. Acquac.* **27**, 133–143.
- Geurden, I., Charlon, N., Marion, D. & Bergot, P. (1995a) Dietary phospholipids and body deformities in carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. In: *Larvi' 95*. (Ed. by P. Lavens, E. Jaspers & I. Roelants). pp. 162–165. EAS Special Publication No. 24. Gent.
- Geurden, I., Radunz-Neto, J. & Bergot, P. (1995b) Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* **131**, 303–314.
- Geurden, I., Coutteau, P. & Sorgeloos, P. (1997) Effect of a dietary phospholipid supplementation on growth and fatty acid composition of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) juveniles from weaning onwards. *Fish Physiol. Biochem.* **16**, 259–272.
- Glamuzina, B., Jud-Dujakovic, J. & Katavic, I. (1989) Preliminary studies on reproduction and larval rearing of common dentex *Dentex dentex* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* **77**, 75–84.
- Glasser, F. & Oswald, M. (2001) High stocking densities reduce *Oreochromis niloticus* yield: model building to aid the optimisation of production. *Aquat. Living Resour.* **14**, 319–326.
- Govoni, J.J. (1980) Morphological, histological, and functional aspects of alimentary canal and associated organ development in larval *Leiostomus xanthurus*. *Rev. Can. Biol.* **39**, 69–80.
- Govoni, J.J., Peters, D.S. & Merriner, J.V. (1982) Carbon assimilation during the larval development of the marine teleost *Leiostomus xanthurus* Lacépède. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **64**, 287–299.
- Govoni, J.J. (1984) Histology. In: *Ontogeny and Systematics of Fishes*. (Ed. by H.G. Moser, W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall & S.L. Richardson). pp. 40–42. Amer. Soc. Ichthyol. Herpetol, Spec. Publ. 1, Lawrence.

- Govoni, J.J., Boehlert, G.W.L. & Watanabe, Y. (1986) The physiology of digestion in fish larvae. *Environ. Biol. Fishes.* **16**, 59-77.
- Gulbrandsen, J. (1991) Effect of the light intensity on feeding success of Atlantic halibut larvae. *Eur. Aquac. Soc. Spec. Pub.* **15**, 336-338.
- Hagen, N. (1993) Effect of different prey and larval densities on the gut content of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) at initial feeding. In: *Physiological and biochemical aspects of fish development*. (Ed. by B.T. Walther & H.J. Fyhn). pp. 180-182. Univ. Bergen. Norway.
- Hamlin, H.J., von Herbing, I.H. & Kling, L.J. (2000) Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *J. Fish Biol.* **57**, 716-732.
- Hamor, T. & Garside, E.T. (1977) Quantitative composition of the fertilized ovum and constituent parts in the Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Can. J. Zool.* **55**, 1650-1655.
- Han, K., Geurden, I. & Sorgeloos, P. (2000) Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture* **183**, 335-347.
- Hardy, R.W. (1989) Diet preparation. In: *Fish Nutrition*. (Ed. by Halver, J.E.). pp. 476-544. 2nd edn. Academic Press.
- Hart, P.R. & Purser, G.J. (1996) Weaning of hatchery-reared greenblack flounder (*Rhombosolea tapirina*, Günther) from live to artificial diets: Effect of age and duration of the change over period. *Aquaculture* **145**, 171-181.
- Hawkins, A.J.S. & Hilbish, T.J. (1992) The cost of cell volume regulation: protein metabolism during hyperosmotic adjustment. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* **72**, 569-578.
- Heat, M., Leaver, M., Matthews, A. & Nicoll, N. (1989) Dispersion and feeding of larval herring (*Clupea harengus*, L.) in the Moray Firth during September 1985. *Est. Coastal Shelf Sci.* **28**, 549-566.
- Helland, S. (1995) Modulation of the free amino acid pool and protein content in the brine shrimp *Artemia*. Ph.D. Thesis Cand. Scient, University of Bergen, Bergen, Norway.
- Heming, T.A. & Buddington, R.K. (1988) Yolk absorption in the embryonic and larval fishes. In: *Fish Physiology*. (Ed. by W.S. Hoar & D.J. Randall). pp. 407-446. Vol XI, Parte A. Academic Press, New York.
- Hempel, G. (1979) Early life history of marine fish. Washington Sea Grant Publication, Seattle, E.U.A. 70 pp.
- Hilton, J.W. (1989) The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. *Aquaculture* **79**, 223-244.
- Hjelmeland, K. (1983) Proteinase inhibitors in the muscle and serum of cod (*Gadus morhua*). Isolation and characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* **76B**, 365-372.
- Hjelmeland, K., Huse, I., Jorgensen, T., Molvik, G. & Raa, J. (1983) Trypsin and trypsinogen as indices of growth and survival potential of cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Flodevigen Rapp.* **3**, 1-17.
- Hjelmeland, K., Huse, I., Jorgensen, T., Molvik, G. & Raa, J. (1984) Trypsin and trypsinogen as indices of growth and survival potential of cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Flodevigen Rapportser.* **1**, 189-201.
- Hjelmeland, K., Pedersen, B.H. & Nilssen, E.M. (1988) Trypsin content in intestines of herring larvae, *Clupea harengus*, ingesting inert polystyrene spheres or live crustacean prey. *Mar. Biol.* **98**, 331-335.
- Hjelmeland, K. (1995) Trypsin in fish. Ph.D. Thesis, University of Tromsø, Tromsø, Norway.
- Holmgren, S., Axelsson, M. & Farrell, A.P. (1992) The effect of catecholamines, substance P and vasoactive intestinal polypeptide on blood flow to the gut in the dogfish *Squalus acanthias*. *J. Exp. Biol.* **168**, 161-175.
- Holmgren, S. (1993) The effect of putative non-adrenergic, non-cholinergic autonomic transmitters on isolated strips from the stomach of the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.* **74**, 229-238.
- Holstein, B. & Humphrey, C.S. (1980) Stimulation of gastric acid secretion and suppression of VIP-like immunoreactivity by bombesin in the Atlantic codfish, *Gadus morhua*. *Acta Physiol. Scand.* **109**, 217-223.
- Holt, G.J. (1993) Feeding larval red drum on microparticulate diets in a closed recirculating water system. *J. World Aquac. Soc.* **24**, 225-230.
- Houde, E.D. & Schekter, R.C. (1980) Feeding by marine fish larvae: developmental and functional responses. *Env. Biol. Fish.* **5**, 315-334.

- Houde, E.D. & Schekter, R.C. (1983) Oxygen uptake and comparative energetics among eggs and larvae of three subtropical marine fishes. *Mar. Biol.* **72**, 283-293.
- Houlihan, D.F., Carter, C.G. & McCarthy, I.D. (1995). Protein synthesis in fish. In: *Fish Molecular Biology and Biochemistry*. (Ed. by P. Hochachka & T. Mommsen). pp. 191-220. Vol. 4, Elsevier Press, Amsterdam.
- Huang, L., Miwa, S., Bengston, D.A. & Specker, J.L. (1988a) Effect of triiodothyronine on stomach formation and pigmentation in larval striped bass (*Morone saxatilis*). *J. Exp. Zool.* **280**, 231-237.
- Huang, L., Scriber, A.M., Soffientino, B., Bengston, D.A. & Specker, J.L. (1998b) Metamorphosis of summer flounder (*Paralichthys dentatus*): thyroid status and the timing of gastric gland formation. *J. Exp. Zool.* **280**, 413-420.
- Hung, L.T., Tuan, N.A. Cacot, P. & Lazard, J. (2002) Larval rearing of the Asian Catfish, *Pangasius bocourti* (Siluroidei, Pangasiidae): alternative feeds and weaning time *Aquaculture* **212**, 115-127.
- Hunter, J.R. (1977) Behavior and survival of northern anchovy *Engraulis mordax* larvae. *Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep.* **19**, 138-146.
- Hunter, J.R. (1980) The feeding behaviour and ecology of marine fish larvae. In: *Fish behaviour and its use in the capture and culture of fishes*. (Ed. by J.E. Bardach, J.J. Magnuson, R.C. May & J.M. Reinhart). pp. 287-230. ICLARM Conf. Proc.
- Hunter, J.R. (1981) Feeding ecology and predation of marine fish larvae. In: *Marine Fish Larvae: Morphology, Ecology, and Relation to Fisheries*. (Ed. by R. Lasker). pp. 34-77. Washington Sea Grant Program, Seattle.
- Hunter, J.R. (1984) Synopsis of culture methods for marine fish larvae. *Am. Soc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Pub.* **1**, 24-27.
- Ikeda, A. (1959) Embryological and histochemical studies on the development of the digestive system in a teleost fish, *Oryzias latipes*. *Hiroshima J. Med. Sci.* **8**, 71-88.
- Ishizaki, Y., Takeuchi, T., Watanabe, T., Arimoto, M. & Shimizu, K. (1998) A preliminary experiment on the effect of *Artemia* enriched with arachidonic acid on survival and growth of yellowtail. *Fish. Sci.* **64**, 295-299.
- Iwai, T.R. (1964) Feeding and ciliary conveying mechanisms in larvae of salmonid fish *Plecoglossus altivelis* Temminck et Schlegel. *Physiol. Ecol. Jpn.* **12**, 38-44.
- Iwai, T.R. (1967a) The comparative study of the digestive tract of teleost larvae - I, Fine structure of the gut epithelium in larvae of Ayu. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **33**, 489-496.
- Iwai, T. (1967b) The comparative study of the digestive tract of teleost larvae - II, Ciliated cells of the gut epithelium of pond smelt larvae. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **33**, 1116-1119.
- Iwai, T. (1968a) The comparative study of the digestive tract of teleost larvae - V. Fat absorption in the gut epithelium of goldfish larvae. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **34**, 973-978.
- Iwai, T. (1968b) Fine structure and absorption patterns of intestinal epithelial cells in rainbow trout alevins. *Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **91**, 366-379.
- Iwai, T.R. & Tanaka, M. (1968a) The comparative study of the digestive tract of teleost larvae - III. Epithelial cells in the posterior gut of halfbeak larvae. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **34**, 44-48.
- Iwai, T.R. & Tanaka, M. (1968b) The comparative study of the digestive tract of teleost larvae - IV. Absorption of Fat by the gut of halfbeak larvae. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **34**, 871-875.
- Iwai, T. (1969) Fine structure of gut epithelial cells of larval and juvenile carp during absorption of fat and protein. *Arch. Histol. Jpn.* **30**, 183-199.
- Iwai, T.R. (1980) Sensory anatomy and feeding of fish larvae. In: *Fish behaviour and its use in the capture and culture of fishes*. (Ed. by J.E. Bardach, J.J. Magnuson, R.C. May, J.M. Reinhart). pp. 124-145. ICLARM Conf. Proc.
- Iwai, T. & Rosenthal, H. (1981) Ciliary movements in guts of early clupeoid and salangid larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **4**, 365-367.
- Iynedjian, P.B. (1993) Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem. J.* **293**, 1-13.
- Izquierdo, M.S., Watanabe, T., Takeuchi, T., Arakawa, T. & Kitajima, C. (1989) Requirement of larval red seabream *Pagrus major* for essential fatty acids. *Nippon Suisan Gakkaishi* **55**, 859-867.
- Izquierdo, M.S. (1996) Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* **2**, 183-191.

- Izquierdo, M. & Fernández-Palacios, H. (1997) Nutritional requirements of marine fish larvae and broodstock. In: *Feeding Tomorrow's Fish*. pp. 243-264. Cahiers Options Méditerranéennes 22.
- Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L. & Hernández-Cruz, C.M. (2000) Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiol Biochem.* **22**, 97-107.
- Jancarik, A. (1964) Die Verdauung der Hauptnährstoffe beim Karpfen. *Z. Fisch. Hilfswiss.* **12**, 601-684.
- Janssens, B., Childress, J.J., Baguet, F. & Rees, J.F. (2000) Reduce enzymatic antioxidative defense in deep sea fish. *J. Exp. Biol.* **203**, 3717-3725.
- Jauncey, K. (1981) The effects of varying dietary composition on mirror carp (*Cyprinus carpio*) maintained in thermal effluents and laboratory recycling systems. In: *Proceedings of World Symposium on Aquaculture in Heated effluent and Recirculation systems*. (Ed. by Heeneman GmbH). pp. 247-261. Vol. 1, Berlin.
- Jenkins, G.P. (1987) Comparative diets, prey selection, and predatory impact of co-occurring larvae of two flounder species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **110**, 147-170.
- Johannes, R.E. & Satomi, M. (1967) Measuring organic matter retained by aquatic invertebrates. *J. Fish. Res. Board Can.* **24**, 2467-2471.
- Jones, D.A., Kamarudin, M.S. & Le Vay, L. (1993) The potential for replacement of live feeds in larval cultures. *J. World Aquacult. Soc.* **24**, 199-210.
- Kamisaka, Y., Totland, G.K., Tagawa, M., Kurokawa, T., Suzuki, T., Tanaka, M. & Rønnestad, I. (2001) Ontogeny of cholecystokinin-immunoreactive cells in the digestive tract of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* **123**, 31-37.
- Kanazawa, A., Teshima, S., Inamori, S., Sumida, S. & Iwashita, T. (1982) Rearing of larval red sea bream and ayu with artificial diets. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.* **31**, 183-192.
- Kanazawa, A., Teshima, S., Inamori, S. & Matsubara, H. (1983) Effects of dietary phospholipids on growth of the larval red sea bream and knife jaw. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* **32**, 115-120.
- Kanazawa, A. (1985) Essential fatty acid and lipid requirement of fish. In: *Nutrition and feeding in fish*. (Ed. by C.B. Cowey, A.M. Mackie & J.G. Bell). pp. 281-298. Academic Press, London.
- Kanazawa, A., Teshima, S. & Sakamoto, M. (1985) Effects of dietary bonito-egg phospholipids and some phospholipids on growth and survival of the larval ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Apl. Ichthyol.* **4**, 165-170.
- Kanazawa, A. & Teshima, S. (1988) Microencapsulate diets for fish larvae. *NOAA Tech. Rep. NMFS 70. Natl. Mar. Fish. Serv. Seattle, WA.* 57-62.
- Kanazawa, A. (1993a) Essential phospholipids of fish and crustaceans. In: *Fish nutrition in practice*. (Ed. by S.J. Kaushik & P. Luquet). pp. 519-530. INRA, Paris.
- Kanazawa, A. (1993b). Nutritional mechanisms involved in the occurrence of abnormal pigmentation in hatchery reared flatfish. *J. World Aquaculture Soc.* **24**, 162-166.
- Kanazawa, A. (1997) Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. *Aquaculture* **155**, 129-134.
- Kane, J. (1984) The feeding habits of co-occurring cod and haddock larvae from Georges Bank. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **16**, 9-20.
- Kapoor, B.G., Smit, H. & Vengfiina, I.A. (1975) The alimentary canal and digestion in teleosts. *Adv. Mar. Biol.* **13**, 109-239.
- Kaushik, S.J. & Medale, F. (1994) Energy requirements, utilization and dietary supply to salmonids. *Aquaculture* **124**, 81-97.
- Kawai, S. & Ikeda, S. (1973a) Studies on digestive enzymes of fishes III. Development of the digestive enzymes of rainbow trout after hatching and the effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in the juvenile stage. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **39**, 819-823.
- Kawai, S. & Ikeda, S. (1973b) Studies on digestive enzymes of fishes – IV. Development of the digestive enzymes of carp and red sea bream after hatching. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **39**, 877-881.
- Kendall, A.W., Ahlstrom, E.H. & Moser, H.G. (1984) Early life history stages of Fishes and their characters. In: *Ontogeny and Systematics of Fishes*. (Ed. by H.G. Molser, W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall & S.L. Richardson). pp. 11-24. Amer. Soc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Publi. I. Lawrence.
- Kiliaan, A., Holmgren, S., Jonsson, A.-C., Dekker, K. & Groot, J. (1992) Neurotensin, Substance P, Gastrin and Cholecystokinin, and Bombesin in the intestine of the Tilapia *Oreochromis mossambicus* and the Goldfish

- Carassius auratus*: immunochemical detection and effects on electrophysiological characteristics. *Gen. Comp. Endocrinol.* **88**, 351–363.
- Köck, G. & Hofer, R. (1989) The effect of natural and artificial diets upon trypsin activity of roach (*Rutilus rutilus*) and whitefish (*Coregonus sp.*) larvae. *Pol. Arch. Hydrobiol.* **36**, 443–453.
- Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G.Wm. & Gertler, A. (1993) The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. *Fish. Physiol. Biochem.* **12**, 203–209.
- Kolkovski, S. (1995) The mechanism of the action of live food on utilization of microdies in gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. Ph.D. Thesis. Hebrew University, Jerusalem, 120 pp.
- Kolkovski, S., Arieli, A. & Tandler, A. (1997a) Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae. *Aquacult. Int.* **5**, 527–536.
- Kolkovski, S., Koven, W. & Tandler, A. (1997b) The mode of action of *Artemia* in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture* **155**, 193–205.
- Kolkovski, S., Yackey, C., Czeny, S. & Dabrowski, K. (2000a) The effect of microdiets supplementation of dietary digestive enzymes and hormones on growth and enzyme activity in yellow perch juveniles. *North Americ. J. of Aquacult.* **62**, 130–134.
- Kolkovski, S., Czeny, S. & Dabrowski, K. (2000b) Use of krill hydrolysate as feed attractant for fish larvae and juvenile. *J. World Aquacult. Soc.* **31**, 81–88.
- Kolkovski, S. (2001) Digestive enzymes in fish larvae and juveniles -Implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* **200**, 181–201.
- Koven, W.M., Tandler, A., Kissil, G.Wm. & Sklan, D. (1992) The importance of *n*-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. *Aquaculture* **104**, 91–104.
- Kraul, S. (1993) Larviculture of the Mahimahi, *Coryphaena hippurus* in Hawaii, USA. *J. World Aquacul. Soc.* **24**, 410–421.
- Krause, W.J., Cutts, J.H. & Leeson, C.R. (1977) The postnatal development of the alimentary canal in opossum: III. Small intestine and colon. *J. Anat.* **123**, 21–46.
- Kurokawa, T. & Suzuki, T. (1996) Formation of the diffuse pancreas and the development of digestive enzyme synthesis in larvae of the japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **141**, 267–276.
- Lagler, K.F., Bardach, J.E., Miller, R.R. & May Pasino, D.R. (1984) Ictiología. AGT Editor. México, 489 pp.
- Lall, S.P. (1989) The minerals. In: *Fish Nutrition*. (Ed. by J.E. Halver & R.W. Hardy). pp. 219–257. 2nd Ed. Academic Press, New York.
- Lauff, M. & Hofer, R. (1984) Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture* **37**, 335–346.
- Laurence, G.C. (1971) Digestion rate of larval largemouth bass. *N.Y. Fish. Game J.* **18**, 52–56.
- Laurence, G.C. (1977) A bioenergetic model for the analysis of feeding and survival potential of winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, larvae during the period from hatching to metamorphosis. *U.S. Fish. Bull.* **75**, 529–546.
- Lazo, J.P., Dinis, M.T., Holt, G.J., Faulk, C. & Arnold, C.R. (2000) Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* **180**, 339–351.
- Lee, J.-H., Park, T.G., Lee, Y.-B., Shin, S.-C. & Cho, H.-K. (2001) Effect of adding non-volatile oil as a core material for the floating microspheres prepared by emulsion solvent diffusion method. *J. Microencapsulation* **1**, 65–75.
- Léger, P., Bengston, D.A. & Simpson, K.L. (1986) The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **24**, 521–623.
- Léger, C. (1988) Digestion, absorption and transport of lipids. In: *Nutrition and feeding in fish*. (Ed. by Cowey, C.B., Mackie, A.M. & Bell, J.G.). pp. 299–331. Academic Press, London.
- Léger, P.D., Grymonpré, E., Van Ballaer, E. & Sorgeloos, P. (1989) Advances in the enrichment of rotifers and *Artemia* as food sources in marine larviculture. *Eur. Aquac. Soc. Esp. Public.* **10**, 141–142.
- Lie, Ø., Haaland, H., Hemre, H.I., Maage, A., Lied, E., Rosenlund, G., Sandnes, K. & Olsen, Y. (1997). Nutritional composition of rotifers following a change in diet from yeast and emulsified oil to microalgae. *Aquaculture International* **5**, 427–438.

- Lim, C., Sukhawongs, S., & Pascual, F.P. (1979) A preliminary study on the protein requirement of *Chanos chanos*, (Forsk.) fry in controlled environment. *Aquaculture* **17**, 195-201.
- Lim, L.C. (1991) Larviculture of grasy grouper (*Epinepheus tauvina* F.) and brown-marbled grouper (*E. fuscoguttatus* F.) in Singapore, *Eur. Aquac. Soc. Spec.* **15**, 321-322.
- Lubzens, E. (1987) Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia* **147**, 245-255.
- Lubzens, E., Tandler, A. & Minkoff, G. (1989) Rotifers as food in aquaculture *Hydrobiologia* **186/187**, 387-400.
- Lundin, K., Holmgren, S. & Nilsson, S. (1984) Peptidergic functions in the dogfish rectum. *Acta Physiol. Scand.* **12A**, 46-55.
- Masuma, S., Kanematu, M., & Teruya, K. (1990) Embryonic and morphological development of larval and juveniles of the amberjack, *Seriola dumerili*, *Jpn. J. Ichthyol.* **37**, 164-169.
- May, R.C. (1974) Larval mortality in marine fishes and the critical period concept. In: *The early life history of fish*. (Ed. by Blaxter, J.H.S.). pp. 1-19. Springer-Verlag, New York.
- McDonald, T.J., Jorvall, H., Nilsson, G., Vagne, M., Ghattei, M., Bloom, S.R. & Mutt, V. (1979) Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**, 227-233.
- Merchie, G., Lavens P., Dhert, Ph., Dehasque, M., Nelis, H., De Leenheer, A. & Sorgeloos, P. (1995a) Variation of ascorbic acid content in different live food organism. *Aquaculture* **134**, 325-337.
- Merchie, G., Lavens P., Dhert, Ph., Pector, R., Mai Soni, A.F., Abbes, M., Nellis, H., Ollevier, F., De Leenheer, A. & Sorgeloos, P. (1995b) Live food mediated vitamin C transfer to *Dicentrarchus labrax* and *Clarias gariepinus*. *J. Appl. Ichthyol.* **11**, 336-341.
- Merchie, G., Lavens, P., Storch, P., Übel, U., Nelis, H., De Leenheer, A. & Sorgeloos, P. (1996) Influence of dietary vitamin C dosage on rodaballo (*Scophthalmus maximus*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nursery stages. *Comp. Biochem. Physiol.* **114A**, 123-133.
- Miki, N., Taniguchi, T., Hamakawa, H., Yamada, Y. & Sakurai, N. (1990) Reduction of albinism in hatchery reared flounder "hirame" *Paralichthys olivaceus* by feeding on rotifers enriched with vitamin A. *Susanzoshoku* **38**, 147-155. (In Japanese).
- Millikin, M.R. (1983) Interactive effects of dietary protein and lipid on growth and protein utilization of age-0 striped bass. *Trans. Am. Fish. Soc.* **112**, 185-193.
- Mims, S.D., Webster, C.D., Tidwell, J.H. & Yancey, D.H. (1991) Fatty acid composition of *Daphnia pulex* cultured by two different methods. *J. World. Aquac. Soc.* **22**, 153-156.
- Mironova, N.V. (1974) The energy balance of *Tilapia mossambica*. *J. Ichthyol.* **14**, 431-438.
- Moffat, N.M. (1981) Survival and growth of northern anchovy larvae on the low zooplankton densities as affected by the presence of a Chlorella bloom. *Rapp. P.-v. Réun. Cons. Int. Explor. Mer* **178**, 475-480.
- Montero, D., Tort, L., Izquierdo, M.S., Robaina, L. & Vergara, J.M. (1998) Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead seabream caused by alpha-tocopherol and n-3 HUFAs dietary deficiencies. *Fish Physiol. Biochem.* **18**, 399-407.
- Moroz, I.Y. & Luzhin, B.P. (1976) Dynamics of metabolism in the embryonic and early post-embryonic development of the carp *Cyprinus carpio*. *J. Ichthyol.* **16**, 964-970.
- Mourente, G. & Tocher, D.R. (1992) Effect of weaning onto a pelleted diet on docosahexaenoic acid (22:6n-3) levels in brain of developing rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* **105**, 363-377.
- Mourente, G., Tocher, D.R., Diaz, E., Grau, A. & Pastor, E. (1999) Relationships between antioxidants, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products during early development in *Dentex dentex* eggs and larvae. *Aquaculture* **179**, 309-324.
- Moyano, F.J., Díaz, M., Alarcón, F.J. & Sarasquete, M.C. (1996) Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* **15**, 121-130.
- Muller-Feuga, A. (2000) The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *J. Appl. Phycol.* **12**, 527-534.
- Munilla-Morán, R., Stark, J.R. & Barbour, A. (1990) The role of exogenous enzymes in digestion in culture of rodaballo larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* **88**, 337-350.
- Næss, T., Germain-Henry, M. & Naas, K.E. (1995) First feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) using different combinations of *Artemia* and wild plankton. *Aquaculture* **130**, 235-250.

- Nakagawa, H., & Tuschiya, Y. (1971) Studies on the rainbow trout eggs *Salmo gairdneri irideus*. III. Determination of lipid composition of oil globule and lipoprotein. *J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ.* **10**, 11-19.
- Nanton, D.A. & Castell, J.D. (1998) The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, *Tisbe* sp., for use as a live food for marine fish larvae. *Aquaculture* **163**, 251-261.
- Noaillac-Depeyre, J. & Gas, N. (1976) Electron microscopic study on gut epithelium of the tench (*Tinca tinca* L.) with respect to its absorptive functions. *Tissue Cell* **8**, 511-530.
- Nose, T. & Arai, S. (1973) Optimum level of protein in purified diet for eel, *Anguilla japonica*. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab. Tokyo.* **22**, 145-155.
- O'Connell, C.P. (1976) Histological criteria for diagnosing the starving condition in early post yolk sac larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax* Girard. *Exp. Mar. Biol. Ecol.* **25**, 285-312.
- O'Connell, C.P. (1981) Development of organ systems in the northern anchovy, *Engraulis mordax*, and other teleosts. *Amer. Zool.* **21**, 429-446.
- Olsen, Y., Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I. & Vadstein, O. (1993) Manipulation of lipids and n-3 fatty acids in *Brachionus plicatilis*. In: *Proceedings of the first international conference on fish farming technology*. (Ed. by H. Reinertsen, L.A. Dahle, L. Jørgensen & K. Tvinnereim). pp. 101-108. 9-12 August 1993. Trondheim, Norway. A.A. Balkema, Rotterdam.
- Orhum, O.H. (1989) Early life history of white seabass *Atractoscion nobilis*. Ms.C. Thesis. San Diego State Univ. California, U.S.A. 162 pp.
- Ostrowski, A.C. (1989) Effect of rearing tank background color on early survival of dolphin larvae. *Prog-Fish Cult.* **51**, 161-163.
- Ounaïs-Guchemann, N. (1989) Definition d'un modele d'élevage larvaire intensif pour la daurade *Sparus aurata*. Ph.D. Thesis d'Aix Marseille II 184 pp.
- Ozawa, T., Kawai, K. & Uotani, I. (1991) Stomach content analysis of chub mackerel *Scomber japonicus* larvae by quantification method. *Nippon Suisan Gakkaishi* **57**, 1241-1245.
- Ozkizilcik, S. & Chu, F.L.E. (1996) Preparation and characterization of a complete microencapsulated diet for striped bass *Morone saxatilis* larvae. *J. Microencapsulation* **3**, 331-43.
- Papoutsoglou, S.E., Mylonakis, G., Miliou, H., Karakatsouli, N.P. & Chadio, S. (2000) Effects of background color on growth performances and physiological responses of scaled carp (*Cyprinus carpio* L.) reared in a closed circulated system. *Aquacultural Engineering* **22**, 309-318.
- Parra, G., Rønnestad, I. & Yúfera, M. (1999). Energy metabolism in eggs and larvae of the Senegal sole. *J. Fish Biol.* **55**, 205-214.
- Pedersen, B.H. (1984) The intestinal evacuation rates of larval herring (*Clupea harengus* L.) predation on wild plankton. *Dana Rep.* **3**, 321-330.
- Pedersen, B. H., Nilssen, E. M. & Hjeldman, K. (1987) Variations in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring (*Clupea harengus*) digesting copepod nauplii. *Mar. Biol.* **94**, 171-181.
- Pedersen, B. H. & Hjelmeland, K. (1988) Fate of trypsin and assimilation efficiency in larval herring (*Clupea harengus*) following of copepods. *Mar. Biol.* **97**, 467-476.
- Pepin, P. (1991) Effect of temperature and size on development, mortality, and survival rates of the pelagic early life history stages of marine fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **48**, 503-518.
- Péres, A., Cahu, C., Zambonino-Infante, J.L., Le Gall, M.M. & Quazuguel, P. (1996) Amylase and trypsin response to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the development stage in sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Fish Physiol. Biochem.* **15**, 237-242.
- Péres, A., Cahu, C.L. & Zambonino-Infante, J.L. (1997) Dietary spermine supplementation induces intestinal maturation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* **16**, 479-485.
- Person-Le Ruyet, J., Alexandre, J. C., Thébaud, L. & Mugnier, C. (1993) Marine fish larvae feeding: formulated diets or live prey? *J. World Aquac. Soc.* **24**, 211-224.
- Pfeffer, E. (1995) Carbohydrate utilization and its determination. *J. Appl. Ichthyol.* **11**, 175-182.
- Polo, A., Yúfera, M. & Pascual, E. (1992) Feeding and growth of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae in relation to size of the rotifer strain used as food. *Aquaculture* **79**, 157-161.
- Prakash, A. (1961) Distribution and differentiation of alkaline phosphatase in the gastro-intestinal tract of steelhead trout. *J. Exp. Zool.* **146**, 237-251.

- Prather, E.E. & Lovell, R.T. (1973) Response of intensively fed channel catfish to diets containing various protein-energy rations. *Proc. of 27th. Ann. Conf. of South Eastern Assoc. of Game ans Fish. Comm.* 455-459.
- Radünz-Neto, J., Corraze, G., Charlon, N. & Bergot, P. (1994) Lipid supplementation of casein-based purified diets for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* **128**, 153–161.
- Rainuzzo, J.R., Olsen, Y. & Rosenlund, G. (1989) The effect of enrichment diets on the fatty acid composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* **79**, 157-161.
- Rainuzzo, J., Retain, K.I. & Olsen, Y. (1997) The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture* **155**, 103-115.
- Real Academia de las Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 2001. Diccionario esencial de las Ciencias Sielo XXI. ESPASA. 1022 pp.
- Retain, K.I., Bolla, S. & Olsen, Y. (1991) Ingestion and assimilation of microalgae in yolk sac larvae of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *Eur. Aquac. Soc. Spec. Pub.* **15**, 332-334.
- Retain, K.I., Bolla, S. & Olsen, Y., 1994. A study of the mechanism of algal uptake in yolk sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *J. Fish Biol.* **44**, 303-310.
- Robin, J.H. (1995) The importance of n-6 fatty acids in the culture of marine fish larvae. *ICES Mar. Sci. Symp.* **201**, 106-111.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Badía, P., Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H. & Lorenzo-Hernández, A. (1998) The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae when using an appropriate DHA / EPA ratio in the diet. *Aquaculture* **169**, 9–23.
- Rønnestad, I., Robertson, R.R. & Fyhn, H.J. (1996) Free amino acids and protein content in pelagic and demersal eggs of tropical marine fishes. In: *The Fish Egg*. (Ed. by MacKinlay, D.D., Eldridge, M.). pp. 81–84. American Fisheries Society, Physiology Section, Bethesda.
- Rønnestad, I., Thorsen, A. & Finn, R.N. (1999) Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids *Aquaculture* **177**, 201–216.
- Rønnestad, I., Rojas-García, C.R., Tonheim, S.K. & Conceição, L.E.C. (2001) *In vivo* studies of digestion and nutrient assimilation in marine fish larvae. *Aquaculture* **201**, 161–175.
- Ronzani-Cerqueira, V. (1986) L'élevage larvaire intensif du loup, *Dicentrarchus labrax*: influence de la lumière, de la densité en proies et de la température sur l'alimentation, sur le transit les performances zootechniques. Ph.D. Thesis, Univ. D'Aix Marseille, II 191 pp.
- Rosenlund, G., Stoss, J. & Talbot, C. (1997) Co-feeding marine fish larvae with inert and live diet. *Aquaculture* **155**, 183-191.
- Rosenthal, H. & Hempel, G. (1970) Experimental studies in feeding and food requirements of herring larvae (*Clupea harengus* L.). In: *Marine Food Chains*. (Ed. by J.H. Steele). pp. 344-364. University of California Press, Berkeley.
- Rust, M. (1995) Quantitative aspects of nutrient assimilation in six species of fish larvae. Ph.D. Thesis, University of Washington, School of Fisheries.
- Ryer, C.H. & Boehlert, G.W. (1983) Feeding: chronology, daily ration, and the effects of temperature upon gastric evacuation in the pipefish, *Syngnathus fuscus*. *Env. Biol. Fish.* **9**, 301-306.
- Sabaut, J.J. & Luquet, P. (1973) Nutritional requirements of gilthead sea bream *Chrysophrys aurata*. Quantitative protein requirements. *Mar. Biol.* **18**, 50-54.
- Salhi, M., Kolkovski, S., Izquierdo, M.S. & Tandler, A. (1995) Inclusion of lecithin and polar or neutral lipids high in n-3 HUFA in microdiets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. In: *Larvi' 95*. (Ed. by P. Lavens, E.Jaspers & I. Roelants). pp. 184–187. EAS Special Publication No. 24. Gent.
- Salhi, M., Izquierdo, M.S., Hernández-Cruz, C.M., Socorro, J. & Fernández-Palacios, H. (1997) The improved incorporation of polyunsaturated fatty acids and changes in liver structure in larval gilthead seabream fed on microdiets. *J. Fish Biol.* **51**, 869-879.
- Salhi, M., Hernández-Cruz, C.M., Bessonart, M., Izquierdo, M.S. & Fernández-Palacios, H. (1999) Effect of different dietary polar lipid levels and different n-3 HUFA content in polar lipids on gut and liver histological structure of gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture* **179**, 253-263.
- Sánchez-Velázquez, L. & Norbis, W. (1997) Comparative diets and feeding habits of *Boops boops* and *Diplodus sargus* larvae, two sparids fishes co-occurring in the northwestern Mediterranean (May 1992). *Bull. Mar. Sci.* **61**, 821-835.

- Sandel, L.J. & Daniel, J.C. (1988) Effect of ascorbic acid on collagen in RNA levels in short term chondrocyte cultures. *Connect. Tissue Res.* **17**, 11–22.
- Santiago, C.B., Banes-Aldaba, M. & Laron, M.A. (1982) Dietary crude protein requirement of *Tilapia nilotica* fry. *Philipp. J. Biol.* **11**, 255-265.
- Sarasquete, M. C., Polo, A. & Yúfera, M. (1995) Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture* **78**, 79-92.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A. & Bell, J.G. (1997) Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* **155**, 117-127
- Sargent, J., McEvoy, Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. & Tocher, D. (1999) Lipid nutrition of marine fish during early development: Current status and future directions. *Aquaculture* **179**, 217–229.
- Satia, B.P. (1974) Quantitative protein requirements of rainbow trout. *Prog. Fish-Cult.* **36**, 80-85.
- Satia, B.P., Donaldson, L-R., Smith, L.S. & Nightgale, J.N. (1974) Composition of ovarian fluid and egg of the University of Washington strain of rainbow trout eggs during development. *Nippon Suisan Gakkashi* **53**, 795-799.
- Schauer, P.S. & Simpson, K.L. (1985) Bioaccumulation and bioconversion of dietary labeled fatty acids in *Artemia* and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **42**, 1430-1438.
- Schipp, G.R., Bosmans, J.M.P. & Marshall, A.J. (1999) A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture* **174**, 81–88.
- Scout, A.P. & Middlton, C. (1979) Unicellular algae as a food for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae- the importance of dietary long chain polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture* **18**, 227-240.
- Segner, H., Rosch, R., Schmidt, H. & von Poeppinghausen, K.J. (1989) Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus* L. *J. Fish Biol.* **35**, 249-263.
- Shen, H., Howles, P. & Tso, P. (2001) From interaction of lipidic vehicles with intestinal epithelial cell membranes to the formation and secretion of chylomicrons. *Adv. Drug Del. Rev.* **50**, S103–S125.
- Shirota, A. (1970) Studies on the mouth size of fish larvae. *Bull. Jpn. Soc. Sci.* **36**, 353-368.
- Sire, M.F. & Vernier, J.M. (1981) Étude ultrastructurale de la synthèse de chylomicrons au cours de l'absorption intestinale des lipids chez la truite. Influence de la nature des acides gras ingérés. *Biol. Cell* **40**, 47–62.
- Sire, M.F., Lutton, C. & Vernier, J.M. (1981) New views on intestinal absorption of lipids in teleostean fishes: an ultrastructural and biochemical study in the rainbow trout. *J. Lipid Res.* **22**, 81–94.
- Snell, T.W., & Carrillo, K. (1984) Body size variation among strains of rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* **37**, 359-367.
- Sorgeloos, P. (1980) The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. In: *The brine shrimp Artemia. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture.* (Ed. by Persoone, G., Sorgeloos, P., Ž. Roels, O., Jaspers, E.). pp. 25–46. Vol. 3. Universal Press, Wetteren.
- Sorgeloos, P., Dhert, P. & Candreva, P. (2001) Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture* **200**, 147–159.
- Sorokin, Ju.I. (1966) Carbon-14 method in the study of the nutrition of aquatic animals. *Int. Rev. Gesamten Hydrobiol.* **51**, 209-224.
- Sorokin, Ju.I., & Panov, D.A. (1966) The use of C¹⁴ for the quantitative study of the nutrition of fish larvae. *Int. Rev. Gesamten Hydrobiol.* **51**, 743-756.
- Steffens, W. (1989) Principles of Fish Nutrition, Ellis Horwood, London. 518 pp.
- Støttrup, G.J. & Norsker, N.H. (1997) Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture* **155**, 231-247.
- Stroband, H.W.J. (1977) Growth and diet dependent structural adaptations of the digestive tract in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, Val.). *J. Fish Biol.* **11**, 167-174.
- Stroband, H.W.J., Meer, H. v.d. & Timmermans, L.P.M. (1979) Regional functional differentiation in the gut of the grasscarp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Histochemistry* **64**, 235-249.
- Stroband, H.W.J. & Dabrowski, K.R. (1979) Morphological and physiological aspects of the digestive system and feeding in freshwater fish larvae. In: *La Nutrition des Poissons.* (Ed. By M. Funtaine) pp. 355-376. CNERNA, Paris.
- Stroband, H.W.J. & Kroon, A.G. (1981) The development of the stomach in *Clarias lazera* and the intestinal absorption of protein macromolecules. *Cell Tissue Res.* **215**, 397-415.

- Stroband, H.W.J. & Veen, F.H. v.d. (1981) Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of the grasscarp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.), *J. Exp. Zool.* **218**, 149-156.
- Szlaminska, M. (1980) A histochemical study of digestive enzymes in pike larvae. *Fish. Manage.* **11**, 135-140.
- Tacon, A.G.J. (1988) The nutrition and feeding of farm fish and shirmp - a training manual. 3. Feeding methods. FAO, Brasilia, Brasil, GCP/RLA/075/ITA Field Doc. 7/E, 208 pp.
- Tagliafierro, G.G., Rossi, G., Bonini, E., Faraldi, G. & Farina, L. (1989) Ontogeny and differentiation of regulatory peptide and serotonin immunoreactivity in the gastrointestinal tract of an elasmobranch. *J. Exp. Zool. Suppl.* **2**, 165-174.
- Takahashi, K., Hatta, N., Sugawara, Y. & Sato, R. (1978) Organogenesis and functional revelations of alimentary tract and kidney of chum salmon. *Tohoku J. Agric. Res.* **29**, 98-109.
- Takeuchi, T., Masuda, R., Ishizaki, Y., Watanabe, T., Kanematsu, M., Imaizumi, K. & Tsukamoto, K. (1996) Determination of the requirement of larval striped jack for eicosapentaenoic acid and docosaheanoic acid using enriched *Artemia* nauplii. *Fish. Sci.* **62**, 760-765.
- Tamaru, C.S., Lee, C.-S. & Ako, H. (1991) Improving the larval rearing of striped mullet, *Mugil cephalus*, by manipulating quantity and quality of rotifer, *Brachionus plicatilis*. In: *Rotifer and microalgae culture systems, Proc. of US-Asia Workshop*. (Ed. by W. Fulks & K. Main). pp. 89-103. Oceanic Inst., Honolulu.
- Tanaka, M. (1972a) Studies on the stucture and function of the digestive system in teleost larvae - IV, Changes in the epithelium related to fat absorption in the anteriomedium part of the intestine after feeding. *Jpn. J. Ichthyol.* **19**, 15-25 (In Japanese).
- Tanaka, M. (1972b) Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae - V. Epithelial changes in the posterior gut and protein ingestion. *Jpn. J. Ichthyol.* **19**, 172-180. [In Japanese].
- Tandler, A., Kanazawa, A. & Sakamoto, M. (1982) Effect of food attractants on appetite and growth rate of gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *J. Fish Biol.* **20**, 673-681.
- Tandler, A., Watanabe, T., Satoh, S. & Fukusho, K. (1989) The effect of food depravation on the fatty acid and lipid profile of red seabream (*Pagrus major*) larvae. *Br. J. Nutr.* **62**, 349-361.
- Tandler, A. & Kolkovski, S. (1991) Rates of ingestion and digestion as limiting factors in the successful use of microdiets in *Sparus aurata* larval rearing. In: *Larvi'95 Fish and Shellfish Larviculture Symposium*. (Ed by P. Lavens, Jaspers, E. & Roelants, I.). pp. 169. European Aquaculture Society. Special Publication 24 Gent, Belgium.
- Thorndyke, M., Holmgren, S., Nilsson, S. & Falkmer, S. (1984) Bombesin potentiation of the acetylcholine response in isolated strips of fish stomach. *Regul. Pept.* **9**, 350-355.
- Thorndyke, M. & Holmgren, S. (1990) Bombesin potentiates the effect of acetylcholine on isolated strips of fish stomach. *Regul. Pept.* **30**, 125-135.
- Thorsen, A., Fyhn, H.J. & Wallace, R. (1993) Free amino acids as osmotic effectors for oocyte hydration in marine fishes. In: *Physiology and biochemistry of fish larval development*. (Ed. by Walther, B.T. & Fyhn, H.J.). pp. 94-98. University of Bergen, Bergen.
- Tocher, D.R., Mourente, G. & Sargent, J.R. (1997) The use of silages prepared from fish neural tissues as enrichers for rotifers (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* in the nutrition of larval marine fish. *Aquaculture* **148**, 213-231.
- Tookwinas, S (1990) Larviculture of sea bass (*Lates calcarifer*) and grouper (*Epinephelus malabaricus*) in Thailand, Advances in tropical aquaculture, *AQUACOP, IFREMER, Actes. Coloq.* **9**, 645-659.
- Tovar, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R. & Lésel, R. (2002) Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bas (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* **204**, 113-123.
- Tucker, J.W. Jr. (1998) Marine fish culture. Kluger Academic Publishers, Massachusetts, E.U.A. 750 pp.
- Ueberschär, B. (1993) Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. In: *Physiological and biochemical aspects of fish development*. (Ed. by Walther, B. T. & Fuhn, H. J.). Univ. of Bergen, Norway.
- Ugolev, A.M. (1965) Membrane (contact) digestion. *Physiol. Rev.* **45**, 555-595.
- Umeda, S. & Ochiai, A. (1973) On the development of the structure and function of the alimentary tract of the yellowtail from the larval to the juvenile stage. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **39**, 923-930. (In Japanese).

- Umeda, S. & Ochiai, A. (1975) On the histological structure and function of digestive organs of the fed and starved larvae of the yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Jpn. J. Ichthyol.* **21**, 213-219. (In Japanese).
- Van Damme, P., Janssen, G. & Ollevier, F. (1989) Proteolytic enzymes in *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) larvae fed with dry diets. *Eur. Aquac. Soc. Esp. Public.* **10**, 255-256.
- Van der Wal, E.J. & Nell, J.A. (1986) Effect of food concentration on the survival and growth of Australian bass (*Macquaria novemaculeata*) larvae. *Prog-Fish Cult.* **48**, 202-204.
- Versichelle, D., Léger, P., Lavens, P. & Sorgeloos, P. (1989) L'utilisation d'artémia. In: *Aquaculture*. (Ed. by G. Barnabé). pp. 241-259. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- Vetter, R.D., Houdson, R.E. & Arnold, C. (1983) Energy metabolism in a rapidly developing marine fish eggs the red drum *Sciaenops ocellata*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **40**, 627-634.
- Villamar, D.F. & Langdon, C.J. (1993) Delivery of dietary components to larval shrimp (*Penaeus vannamei*) by means of complex microcapsules. *Mar. Biol.* **115**, 635-642.
- Vu, T.T. (1976) Étude du développement du tube digestif des larves de bar *Dicentrarchus labrax* (L.). *Arch. Zool. Exp. Gen.* **117**, 493-509.
- Vu, T.T. (1983) Etude histoenzymologique des activités protéasiques dans le tube digestif des larves et des adultes de bar, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Aquaculture* **32**, 57-69.
- Walford, J., Lim, T.M. & Lam, T.J. (1991) Replacing live foods with microencapsulated diets in the rearing of seabass (*Lates calcarifer*) larvae; do the larvae ingest and digest protein-membrane microcapsules? *Aquaculture* **92**, 225-235.
- Walford, J. & Lam T.J. (1993) Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture* **109**, 187-205.
- Wang, Y.L., Buddington, R.K. & Doroshov, S.I. (1987) Influence of temperature on yolk utilization by the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *J. Fish. Biol.* **30**, 263-271.
- Ware, D.M. (1975) Growth, metabolism, and optimal swimming speed of a pelagic fish. *J. Fish. Res. Board Can.* **32**, 33-11.
- Watanabe, T. (1981) Ingestion of horseradish peroxidase by the intestinal cells in larvae or juveniles of some teleosts. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **57**, 1299-1307.
- Watanabe, T. (1982a) Intracellular digestion of horseradish peroxidase by the intestinal cells of teleost larvae and juveniles. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **48**, 37-12.
- Watanabe, T. (1982b) Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **73B**, 1-16.
- Watanabe, T., Kitajima, C. & Fujita, S. (1983) Nutritional value of live organism used in Japan for mass propagation of fish: A review. *Aquaculture* **34**, 115-143.
- Watanabe, T. (1984a) An ultrastructural study of intracellular digestion of horseradish peroxidase by the rectal epithelium cells in larvae of a freshwater cottid fish *Cottus nozawae*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **50**, 409-416.
- Watanabe, T. (1984b) Morphological and functional changes in rectal epithelium cells of pond smelt during postembryonic development. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **50**, 805-814.
- Watanabe, T. & Sawada, N. (1985) Larval development of digestive organs and intestinal absorptive functions in the freshwater goby *Chaenogobius annularis*. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.* **37**, 1-10.
- Watanabe, T., Satoh, S. & Takeuchi, T. (1988) Availability of minerals in fishmeal to fish. *Asian Fish. Sci.* **1**, 175-195.
- Watanabe, T. & Kiron, V. (1994) Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture* **124**, 223-251.
- Weinberg, S. (1976) Morphology of the intestine of the goldfish (*Carassius auratus*). *Bijdr. Dierk.* **46**, 35-46.
- Werner, R.G. & Blaxter, J.H.S. (1980) Growth and survival of larval herring (*Clupea harengus*) in relation to prey density. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **37**, 1063-1069.
- Wilson, R.P. (1994) Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* **124**, 67-80.
- Wolbach, S.B. (1947) Vitamin A deficiency and excess in relation to skeletal growth. *J. Bone Jt Surg.* **29**, 171-192.
- Yamamoto, T.S. (1982) Ultrastructural basis of intestinal absorption. *Arch. Histol. Jpn.* **45**, 1-22.
- Yamamoto, T.S. & Kobayashi, W. (1992) Closure of micropyle during embryonic development of some pelagic fish eggs. *J. Fish Biol.* **40**, 225-241.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. & Somero, G.N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**, 1214-1222.

- Yúfera, M., Sarasquete, M.C. & Fernández-Díaz, C. (1996) Testing protein-walled microcapsules for the rearing of first-feeding gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Mar. Freshwater Res.* **47**, 211-216.
- Yúfera, M., Pascual, E. & Fernández-Díaz, C. (1999) A highly efficient microencapsulated food for rearing early larvae of marine fish. *Aquaculture* **177**, 249-256.
- Zambonino-Infante J.L. & Cahu, C. (1994a) Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish. Physiol. Biochem.* **12A**, 399-408.
- Zambonino-Infante, J.L. & Cahu, C.L. (1994b) Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* **109A**, 209-212.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L. & Péres, A. (1997) Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.* **127**, 608-614.
- Zambonino-Infante, J.L. & Cahu, C. (1999) High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.* **129**, 1195-1200.
- Zambonino-Infante, J.L. & Cahu, C.L. (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* **130C**, 477-487
- Zeitoun, I.H. (1973) Influence of salinity on protein requirements of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fingerlings. *J. Fish. Res. Board. Can.* **30**, 1867-1873.