

Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos.¹

Juan Pablo Lazo

Departamento de Acuicultura

Centro de Investigación Científica y de Estudios Superiores de Ensenada. Km. 107 Carretera Tijuana-Ensenada Ensenada, Baja California 22680. Tel (6) 1-74-50-50 ext. 24484. jplazo@cicese.mx

RESUMEN: La investigación realizada durante los últimos veinte años con el fin de desarrollar dietas artificiales para larvas de peces marinos no ha logrado producir una dieta que reemplace totalmente la utilización de alimento vivo. Sin embargo, avances recientes en el conocimiento de la capacidad digestiva y requerimientos nutricionales de las larvas indican que no estamos muy lejos de lograr este objetivo. La mayoría de los estudios que han examinado dietas artificiales indican crecimiento y supervivencia inferior comparadas con la utilización del alimento vivo. Anteriormente, esto había sido atribuido a una baja actividad enzimática en las larvas y al efecto compensatorio de las enzimas exógenas presentes en el alimento vivo. En contraste, investigaciones recientes indican que el aporte de las enzimas exógenas a la actividad total es relativamente insignificante. El reto actual en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos, consiste en identificar y caracterizar la estructura química de los nutrientes requeridos, y de proveerlos en las proporciones adecuadas para que el sistema digestivo pueda digerirlos y absorberlos. El presente trabajo intenta integrar los conocimientos actuales sobre la capacidad digestiva de las larvas, los requerimientos nutricionales y la tecnología de producción de dietas, para lograr el desarrollo de dietas que permitan exitosamente reemplazar la utilización de alimento vivo en el cultivo de larvas de peces marinos. Para ello se revisan el desarrollo y fisiología digestiva de las larvas, sus requerimientos nutricionales, los tipos de dietas actualmente utilizados y finalmente se sugieren algunos índices de tipos y niveles de nutrientes que podrían ser utilizados como guía para formular una dieta artificial "ideal".

PALABRAS CLAVE: dietas artificiales, peces marinos, requerimientos nutricionales.

INTRODUCCION

El éxito comercial del cultivo de peces marinos depende en gran medida de la producción controlada de un número suficiente de juveniles de la especie a cultivar. Dentro de este contexto, la supervivencia de las larvas bajo cultivo es un aspecto esencial que está directamente relacionado con la plena satisfacción de sus requerimientos nutricionales. De aquí, que la nutrición de las larvas determine la disponibilidad de peces en las unidades de producción acuícola. Sin embargo, hasta el momento, la falta de desarrollo de métodos adecuados de alimentación durante la etapa larvaria ha venido constituyendo una de las principales limitantes en el cultivo de varias especies.

Esto se debe en gran parte a la necesidad de asegurar la ingestión de alimento, así como a las particularidades del sistema digestivo características de la etapa larval, las cuales implican cambios

¹ Lazo, J., 2000. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Symposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico..

inherentes a una diferenciación estructural y funcional, relacionados con la evolución de los procesos enzimáticos y finalmente con los mecanismos de absorción de los nutrientes necesarios.

Desde hace algunos años se han venido utilizando dos estrategias para la alimentación de larvas de peces marinos:

- La primera implica la utilización de presas vivas, tales como rotíferos, *Artemia* o copépodos.
- La segunda ha sido enfocada al desarrollo de dietas artificiales, y en particular de micropartículas.

En general, la producción de alimento vivo no solo es difícil de mantener, sino que además requiere extensa labor y espacio. Contrariamente, las dietas artificiales resultan más fáciles de producir, y su costo de producción suele ser menor. No obstante, hasta la fecha no se han obtenido resultados tan satisfactorios con dietas artificiales como con el alimento vivo.

La mayoría de los estudios dirigidos hacia el análisis de los métodos de alimentación en larvas de peces marinos indican un menor desempeño en cuanto a crecimiento y supervivencia asociada a la utilización de dietas artificiales, lo cual se ha atribuido, por una parte, a la falta de un sistema digestivo plenamente desarrollado y con baja actividad enzimática, y por otro lado, a la complejidad de las dietas suministradas. De esta manera, para poder desarrollar micro-dietas destinadas a la etapa larvaria, es necesario adecuar la formulación de las dietas a la capacidad digestiva y los requerimientos nutricionales de las especies con mayor potencial para la acuicultura.

Desarrollo y fisiología digestiva de las larvas

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

Con el fin de ganar un mayor entendimiento sobre la ecología y fisiología de las distintas larvas de peces Dabrowski (1984) implementó un sistema de clasificación basado en el grado de desarrollo del sistema digestivo en el momento en el cual el contenido del saco vitelino había sido completamente absorbido y se iniciaba la alimentación exógena. Este sistema permitió separar dos grandes grupos:

- Un grupo se conforma por peces que producen huevos demersales con grandes cantidades de material vitelino. En este caso, el desarrollo embrionario es relativamente largo y al iniciarse la alimentación exógena, las larvas muestran tractos digestivos relativamente completos y funcionales. Esta estrategia es típica de los salmónidos y muchas especies de agua dulce.
- El segundo grupo está integrado por peces que producen huevos pelágicos de pequeño tamaño, los cuales contienen una cantidad limitada de material vitelino. En este caso, el desarrollo embrionario es rápido y la alimentación exógena se inicia, cuando aún hay una capacidad digestiva mínima. La gran mayoría de las larvas de especies de peces marinos se ubican dentro de esta categoría.

Ontogenia del sistema digestivo

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

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

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

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

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

al 10%) (Bagari y Lovell, 1986; Cahu y Zambonino, 1997; Díaz *et al.* 1997; Kurokawa *et al.* 1998; Lazo *et al.*, 2000a). Estos autores argumentan que el pobre crecimiento y baja supervivencia exhibido por larvas alimentadas con dietas artificiales no son atribuibles a una deficiencia enzimática, sino más bien al no haber proporcionado a la larva una dieta artificial adecuada que cubra todos los requerimientos nutricionales. Así como al hecho de que la dieta no haya sido ingerida satisfactoriamente y/o que no haya estimulado la secreción de sus propias enzimas digestivas. Por lo tanto, el que el sistema digestivo no este completamente desarrollado durante la etapa larvaria, no implica que no sea funcional. Considerando esta premisa, el reto actual consiste en identificar y caracterizar la estructura química de los nutrientes requeridos, y de proveerlos en las proporciones adecuadas para que el sistema digestivo pueda digerirlos y absorberlos.

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

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

Requerimientos nutricionales de las larvas

Los requerimientos nutricionales de las larvas de peces marinos no han sido aún completamente determinados. Debido al limitado conocimiento actual, el diseño de dietas artificiales se ha venido basando en la composición del saco vitelino de las larvas de la especie de interés, del zooplancton natural del cual se alimentan, o el de las presas vivas que han resultado efectivas bajo condiciones de cultivo.

1. Principales fuentes de nutrientes y energía.

Existe poca información sobre las proporciones adecuadas de las principales fuentes de energía. La mayor parte de la energía utilizada para el desarrollo, crecimiento y procesos metabólicos es obtenida de amino ácidos libres y ácidos grasos.

Muchas especies exhiben un crecimiento extremadamente rápido durante la etapa larvaria, por lo cual requieren grandes cantidades de amino ácidos para la producción de las proteínas que conformarán los tejidos durante el crecimiento y suplirán además la energía requerida para el metabolismo (Ronnestad *et al.* 1999). Esta realidad es reflejada en el hecho de que el zooplancton que sirve de alimento en el medio ambiente natural contiene un alto nivel de proteína y amino ácidos libres. Por lo general, se utilizan niveles de proteína del 55 al 60%.

Por otro lado, los lípidos tienen un alto contenido energético, además de proveer los ácidos grasos esenciales y fosfolípidos necesarios para la constitución de las membranas de las células durante el crecimiento. Las dietas artificiales suelen estar compuestas de un 10 a 20% de lípidos.

En lo que respecta a los carbohidratos, aunque las dietas naturales exhiben un bajo contenido, y estos no son bien digeridos por los peces carnívoros, se han logrado incluir en las dietas algunas formas muy digeribles de carbohidratos en cantidades que van del 10 al 20% de la dieta sin llegar a afectar el crecimiento de forma significativa (Person-LeRuyet, 1989).

2. Amino ácidos esenciales

Los requerimientos de amino ácidos (a.a) esenciales son satisfechos comúnmente suministrando dietas que reflejen directamente la composición de las larvas, como por ejemplo, utilizando harina de pescado, músculo de pescado liofilizado o hidrolizados enzimáticos de este (Kanazawa *et al.* 1988; Holt, 1993). Durante las últimas dos décadas, se ha demostrado que los huevos pelágicos de peces marinos contienen una gran cantidad de amino ácidos libres (hasta un 50% de los a.a. totales; Fyhn, 1987; Rønnestad *et al.* 1999). Durante la ontogenia, las reservas de estos a.a. libres se reducen drásticamente (de un 60% a un 10%). Una fuente suplementaria de a.a. libres es el alimento natural de las larvas, el cual también contiene cantidades importantes. Dentro de este contexto, Rønnestad (1992) demostró que los a.a. libres son utilizados principalmente como fuente de energía para el metabolismo. De estas investigaciones se deriva la importancia de los a.a. libres en la alimentación para el desarrollo embrionario y larvario, así como la necesidad de incluir fuentes de a.a. libres en las dietas de destete. Es importante mencionar que se han encontrado límites al nivel de inclusión de a.a. libres o péptidos en las dietas para larvas. A este respecto, Zambonino-Infante *et al.* (1997) y Cahu *et al.* (1999) reportaron una reducción en el crecimiento y supervivencia de la lubina (*Dicentrarchus labrax*), al administrarse altos niveles de péptidos y a.a. libres. Este efecto ha sido atribuido a una posible saturación de los sistemas de transporte de estos compuestos en las larvas. Por consiguiente, es imperativo encontrar un punto de equilibrio entre los niveles de a.a. libres, péptidos y proteínas.

3. Ácidos grasos esenciales

Los peces marinos contienen niveles altos de ácidos grasos insaturados (HUFA), dentro de los que destacan el ácido eicosapentanoico (EPA) 20:5(w-3) y el ácido docosahexanoico (DHA) 22:6(w-3). Estos ácidos grasos esenciales, juegan un papel importante tanto en la estructura, como en la función de las membranas celulares (Sargent *et al.* 1997). Sin embargo, las larvas tienen una capacidad extremadamente limitada para convertir ácido linolénico 18:3(w-3) a 20:5(w-3) y posteriormente a 22:6(w-3). Esto se debe a una deficiencia en la enzima (δ -5-desaturasa) responsable de alargar y desaturar ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) (Sargent *et al.* 1997). Por esta razón, existe un requerimiento esencial de DHA y EPA. Recientemente se ha publicado una excelente revisión al respecto (Sargent *et al.* 1997).

El requerimiento de DHA es mayor al de EPA debido a su importancia en diversas funciones fisiológicas. Por otro lado, DHA y EPA deben ser incluidos en las dietas artificiales en una proporción adecuada para evitar un efecto negativo en los sistemas neurológicos y visuales (Sargent *et al.* 1999b). Como norma general, la proporción utilizada en la formulación de dietas es de 2:1 (DHA:EPA).

Además del DHA y EPA, existe otro ácido graso que resulta esencial, el ácido araquidónico, o 20:4(w-6). Este es el principal precursor de las prostaglandinas y los leucotrienos, sustancias hormonales de

actividad parácrina importantes en la respuesta fisiológica al estrés y en los procesos de coagulación y anti-inflamación (Castell *et al.* 1994; Sargent *et al.* 1997). Los prostaglandinas y los leucotrienos producidos a partir de 20:4 (w-6) tienen mayor actividad biológica que los derivados de 20:5 (w-3) (Sargent *et al.* 1999b), por lo que es indispensable incluir una proporción adecuada de estos en las dietas. Hasta el momento, esta proporción no ha sido bien definida, pero se recomienda 1.5:1 (Sargent *et al.* 1997). El aceite de pescado contiene aproximadamente 1% de 20:4(ω -6) con respecto a los ácidos grasos totales, lo cual generalmente es considerado suficiente. Un exceso de 20:4 (w-6) en la dieta puede inducir una reacción generalizada de estrés en las larvas como consecuencia de una producción excesiva de prostaglandinas (Sargent *et al.* 1999). Por otro lado, los altos niveles de EPA pueden inhibir la producción de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico por inhibición enzimática competitiva (Sargent *et al.* 1999a). Por ello, es importante tener en cuenta que al manipular la proporción de DHA:EPA, la proporción de EPA:ácido araquidónico también se ve afectada.

Varios autores han sugerido que los fosfolípidos son una mejor fuente de ácidos grasos esenciales para las larvas que los triglicéridos (Olsen *et al.* 1991; Koven *et al.* 1993; Sargent *et al.* 1993). La proporción de DHA:EPA en los fosfolípidos de copépodos es de 2:1, mientras que en el aceite de pescado, compuesto mayormente de triglicéridos, es menor o igual a 1:1. Como consecuencia, se ha sugerido que la proporción de DHA:EPA en el aceite de pescado puede resultar subóptima. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que los efectos positivos de los fosfolípidos no son solamente atribuibles a su composición y proporción en ácidos grasos esenciales o a sus propiedades emulsificadoras, sino más bien a su estructura básica glicero-fosfórica (*eg.*, fosforoglicerocolina). Esta estructura sirve de esqueleto para la síntesis de fosfolípidos por parte de la larva, lo cual es sumamente importante dada la limitada capacidad que tienen las larvas para sintetizar *de novo* la estructura glicero-fosfórica (Guerden *et al.* 1995, Coutteau *et al.* 1997; Sargent *et al.* 1999). Adicionalmente, los fosfolípidos juegan un papel esencial en el transporte de ácidos grasos que son absorbidos a través de la mucosa intestinal hacia la linfa, y posteriormente al plasma.

Watanabe (1995) recomienda niveles de inclusión de 3% del peso seco de la dieta o más de HUFAs ω -3. Sargent y colaboradores recomiendan incluir fosfolípidos marinos (huevos de peces) ricos en HUFAs w-3 a niveles del 10% del peso seco de la dieta (Sargent *et al.* 1999b). Por último, es importante mencionar que en términos energéticos, la inclusión de altos niveles de HUFAs en las dietas puede resultar en una limitante energética para las larvas, ya que estos son sustratos relativamente pobres para los sistemas generadores de energía vía oxidación de ácidos grasos. Por lo cual, es necesario un balance adecuado entre ácidos grasos poli-insaturados, monosaturados e insaturados, y este puede ser obtenido mediante la inclusión de fosfolípidos en las dietas, como lo sugieren Sargent y colaboradores.

4. Vitaminas y minerales.

Se conoce muy poco sobre los requerimientos de vitaminas y minerales de larvas de peces marinos. La mayoría de la investigación se han enfocado en las vitaminas C y E, aunque existen algunos estudios sobre la vitamina A (Person-LeRuyet, 1989; Dodi *et al.* 1996). En la práctica, los niveles de estas vitaminas se suministran a niveles superiores a los requeridos, con la finalidad de compensar la pérdida de estos compuestos durante la fabricación de dietas. Por esto, en el caso de la vitamina C, se recomienda incluir de 2 a 3% del peso seco de la dieta, ya que las pérdidas pueden ser del orden de 20 a 80%. Igualmente, en el caso de la vitamina E, se incorporan de 30 a 50 UI por Kg. de dieta para evitar deficiencias nutricionales e impedir la oxidación de los lípidos durante el almacenamiento (Person-LeRuyet, 1989).

La mayoría de los minerales son absorbidos directamente del medio. El más importante es probablemente el fósforo, ya que se encuentra en muy bajas concentraciones en el agua de mar. Por esta razón, se incluyen niveles de fósforo disponible de 0.6% en las dietas (Person-LeRuyet, 1989). Actualmente, en la práctica se utilizan mezclas de vitaminas y minerales para juveniles de salmónidos.

Tipo de dietas

Las investigaciones conducidas durante los últimos veinte años han llevado al desarrollo de múltiples estrategias alimenticias para criar larvas de peces marinos. Sin embargo, sólo algunas han tenido éxito a nivel industrial. Todas las estrategias alimenticias usadas en los cultivos comerciales incluyen al inicio de la cría, el uso de alimento vivo. Aproximadamente 20 especies de algas (2-20 microm.) son comúnmente cultivadas y utilizadas para alimentar invertebrados marinos (eg., rotíferos, copépodos), los cuales sirven finalmente como presas para las larvas. Las especies de algas que frecuentemente se utilizan para alimentar a estos invertebrados incluyen, *Isochrysis galbana*, *Chlorella* sp., *Nanochloris* sp., *Nanochloropsis* sp., y *Tetraselmis* sp.

1. Alimento vivo

Como se mencionó anteriormente, no se ha podido cultivar con éxito a nivel comercial ninguna especie de pez marino a través de la etapa larvaria sin proporcionar alimento vivo tras el inicio de la alimentación exógena. La dependencia del alimento vivo varía según la especie (5 a 30 días), tratándose de reducir su suministro al mínimo debido a su alto costo. Las dos especies universalmente utilizadas son el rotífero *Brachionus plicatilis* y el branquiopodo *Artemia* sp. Sin embargo, los mejores resultados se han obtenido utilizando copépodos (*Tigriopus*, *Calanus* y *Acartia*), pero estos son difíciles de producir en el laboratorio y la producción en gran escala no esta resuelta.

Los rotíferos y *Artemia* son de forma natural deficientes en HUFAs de la serie w-3, en especial en DHA (Rainuzzo *et al.* 1994; Sargent, 1997). Debido a esta deficiencia, y al requerimiento esencial de los HUFAs w-3 en larvas de peces marinos, es indispensable enriquecer el alimento vivo con productos ricos en HUFAs w-3 antes de suministrarlo a las larvas. Para lograr esto, se utilizan ciertas combinaciones de algas, protistas, levaduras especiales, microdietas, aceites y emulsiones ricas en HUFAs w-3. Con referencia a esto, existen dos estrategias de enriquecimiento:

- 1) **Método directo:** Los organismos son enriquecidos directamente con productos ricos en HUFAs ω -3. Existen varios productos comerciales en forma de microdietas o aceites que contienen ácidos grasos, ya sea en forma de tioésteres o triglicéridos (e.g., Selco, SuperSelco y RotiMac). Adicionalmente, existen productos basados en algas o protistas liofilizados, como Algamat 2000. Recientemente, se han lanzado al mercado productos comerciales con alto contenido de fosfolípidos ricos en HUFAs w-3, como los productos AquaGrow de la compañía Martek. También es posible hacer una emulsión de aceite de pescado, yema de huevo y vitaminas, licuando los ingredientes en agua y agregando la solución emulsificada al cultivo de rotíferos o *Artemia* unas 6 a 12 horas antes de alimentar las larvas.
- 2) **Método indirecto:** El producto que servirá para alimentar las presas es a su vez previamente enriquecido con los nutrientes de interés. La estrategia más común involucra el cultivo de levadura de pan, la cual es de forma natural deficiente en HUFAs ω -3, en un medio rico en aceite de pescado (Watanabe *et al.*, 1993). A través de este proceso, se produce una levadura rica en HUFAs w-3, la cual es utilizada para alimentar rotíferos.

Aunque estos métodos de enriquecimiento incrementan los niveles de HUFAs ω -3 en el alimento vivo, estos ácidos grasos se incorporan en el alimento vivo, principalmente en los lípidos neutros (triglicéridos) y no en los polares (fosfolípidos). Como se mencionó anteriormente, estos últimos son mejor utilizados y cumplen una mejor función en el transporte de los ácidos grasos esenciales absorbidos por el intestino.

2. Dietas artificiales

Después de dos décadas de investigación, no se ha podido producir una dieta artificial que remplace totalmente al alimento vivo en el cultivo de larvas de peces marinos. En general, los principales problemas en el desarrollo de dietas artificiales han sido la pobre ingestión y digestión de las mismas, dificultades para proveer los nutrientes en forma asimilable, y la inclusión de niveles inadecuados de ciertos nutrientes esenciales que aún se desconocen.

Las dietas artificiales pueden ser clasificadas en 3 grupos:

- a) **Microdietas secas:** Los ingredientes se pulverizan a un tamaño adecuado (20-80 μm), se mezclan con un aglutinante (agar, zeína, gelatina) para mantenerlos unidos y son peletizados. Finalmente, son molidos mediante procesos mecánicos para obtener un tamaño adecuado (por lo general menor a 200 μm). Lamentablemente, las micropartículas tienden a perder ingredientes en el agua como resultado de lixiviación de los ingredientes solubles, ya que carecen de una capa impermeable que impida esta pérdida. En consecuencia, se reduce la calidad nutricional original, además de causar un rápido deterioro de la calidad del agua en el cultivo.
- b) **Dietas microencapsuladas:** Los ingredientes secos, húmedos o en solución son encapsulados en un polímero orgánico natural o sintético (como albúmina de huevo, proteína-nylon, nylon-agar o colesterol y lecitina). Este polímero debe ser semipermeable y fácilmente digerible a través de procesos enzimáticos o bacteriológicos, o bien, debe ser sensible a cambios de pH. En su fabricación primero se emulsifican los ingredientes de la dieta en una solución de alcohol y lecitina. Posteriormente, esta mezcla se añade a una solución de alguna proteína (como caseína) y por medio de un reactivo (eg, cloruro de trimesoíl) se estimula la polimerización de esta, formando una cápsula alrededor de los ingredientes. Las dietas microencapsuladas reducen las pérdidas de componentes de alto peso molecular (nutrientes esenciales), sin embargo, permiten la lixiviación de ciertos compuestos de bajo peso molecular que se utilizan como atrayentes (eg, betaína, taurina, alanina). Estas dietas muestran una buena estabilidad en el agua, no obstante, en ocasiones la cápsulas no son bien digeridas por las larvas (Yufera *et al.* 1996). Recientemente, se han logrado obtener resultados positivos modificando el proceso de microencapsulación, lo que ha permitido alcanzar tasas de crecimiento similares a las obtenidas utilizando presas vivas (Yufera *et al.* 1999). Adicionalmente, existen microcápsulas más complejas que implican la inclusión de liposomas (Ozkizilcik y Chu, 1996). Los liposomas son microcápsulas de cubierta lipídica que tienen la ventaja de impedir la lixiviación de componentes de bajo peso molecular que son utilizados como nutrientes esenciales (eg., a.a. libres, vitaminas hidrosolubles). Este tipo de microencapsulación compleja tiene la ventaja de retener los nutrientes esenciales y de permitir la lixiviación de atrayentes.
- c) **Hojuelas:** Los ingredientes molidos se cuecen bajo presión junto con algún aglutinante y son compactados a altas temperaturas (130-190 °C) en un tambor rotativo. Se obtienen hojuelas que pueden ser molidas fácilmente para obtener el tamaño adecuado para las larvas. Sin embargo, este método tiene los mismos problemas de lixiviación que las microdietas secas. Este tipo de dieta se usa comúnmente en la acuariofila.

Protocolos de alimentación

Se han desarrollado diferentes estrategias para el uso de dietas artificiales en el cultivo de larvas de peces marinos

- 1) **Uso directo:** En este caso, las dietas artificiales se suministran cuando las larvas presentan un estado avanzado de desarrollo al iniciarse la alimentación exógena. Se emplea en especies de agua dulce y salmónidos.
- 2) **Destete tardío:** Una vez que la larva desarrolla un estomago funcional, es posible alimentarlas directamente con alimento artificial, este proceso se denomina destete. Por lo general, se lleva a cabo entre el primer y segundo mes de desarrollo. En ocasiones es difícil lograr que el animal acepte la dieta artificial una vez que se ha habituado al alimento vivo por un período prologando. Por ejemplo, el barramundi (*Lates calcarifer*) (Person-LeRuyet, 1989).
- 3) **Destete progresivo:** El alimento artificial se suministra en conjunto con el alimento vivo desde el inicio de la alimentación exógena. A través del tiempo, se incrementa la proporción de la dieta artificial y se reduce el alimento vivo. Esta estrategia es la que ha tenido mayor éxito con diversas especies de peces marinos (Holt, 1993; Person-Leruyet, 1993).

Cultivo en agua verde

Los estadíos larvarios son en su gran mayoría carnívoros. En ocasiones se cultiva las larvas de peces marinos utilizando alimento vivo o dietas artificiales en aguas con una concentración de algas de 50,000 a 150,000 células por ml. Aunque las especies con potencial económico que se cultivan actualmente no son filtradoras (no parecen requerir de algas para su crecimiento), en algunos casos estos cultivos en aguas verdes han resultado en mejor crecimiento y supervivencia (Reitan *et al.* 1997). Recientemente, se han criado larvas de corvina dorada (*Sciaenops ocellatus*) únicamente con una combinación de dieta artificial y algas (*Isochrysis*), sin zooplancton, lográndose tasas de crecimiento comparables a las obtenidas utilizando rotíferos (Lazo *et al.*, 2000). Existen diferentes hipótesis que intentan explicar los efectos positivos de la utilización de algas en el cultivo larvario. El alga puede estimular el consumo de la microdieta por medio de una estimulación química de la tasa de ingestión, o al incrementar el contraste entre las partículas de alimento y el fondo, favoreciendo así su visualización. Las algas también pueden estimular la producción y/o secreción de enzimas digestivas, actuar como estimulantes no específicos del sistema inmunológico, y contribuir al establecimiento de la flora intestinal (Lazo *et al.* 2000). Algunos investigadores han reportado algas en los intestinos de las larvas, los que parece sustentar la hipótesis de que las algas también sirven como alimento (Moffat, 1981).

Adicionalmente, es posible que algunos nutrientes ausentes en los rotíferos y la *Artemia* están presentes en las algas (eg , a.a. libres, vitaminas)

Tras una dieta ideal

En un intento por integrar los conocimientos actuales sobre la capacidad digestiva de las larvas y sus requerimientos nutricionales, en la Tabla 1 se sugieren algunos índices de tipos y niveles de nutrientes que podrían ser utilizados como guía para formular una dieta artificial "ideal". Ya que el propósito es desarrollar microdietas adecuadas para el cultivo larvario de peces marinos, es importante mencionar que no existe una dieta ideal para todas las especies. Los requerimientos nutricionales y las

características de la capacidad digestiva son específicos para cada especie. Sin embargo, los índices y niveles de nutrientes presentados en la Tabla 1 intentan establecer un equilibrio entre la fisiología digestiva, los requerimientos nutricionales y factores prácticos de producción de dietas para larvas de peces marinos.

Tabla 1. Recomendaciones de niveles de nutrientes para la dieta "ideal" de larvas de peces marinos.

Nutriente	gramos por 100 g de dieta seca	
	Mínimo	Máximo
Proteínas ¹	50	65
Amino ácidos libres		10
Péptidos		20
Proteína natural	30	
Lípidos ²	10	20
Triglicéridos		5
Fosfolípidos	10	
22:6n-3	2	
20:5n-3	1	
20:4n-6	0.1	
DHA:EPA	2	
EPE:ARA	5	10
HUFAs n-3 ³	3	5
Carbohidratos		10
Fibra		2
Cenizas		10
Vitaminas	5	
Ácido Ascórbico	0.5	
Minerales	4	
Atrayentes ⁴	2	4

¹ Basado en Cahu *et al.* (1994) y Ronnestad *et al.* (1999)

² Basado en Sargent *et al.* (1999)

³ Basado en Brikmayer and Holt (1998); Watanbe (1995); Sargent *et al.* (1999)

⁴ Por ejemplo betaina, alanina, 5-inofosfato

CONCLUSIONES

Aunque la dieta "ideal" no ha sido plenamente definida, los avances recientes en el conocimiento de la capacidad digestiva y los requerimientos nutricionales de las larvas indican que no estamos muy lejos de lograr una dieta que permita remplazar la utilización de alimento vivo. Sin embargo, existen varios requerimientos nutricionales que aún quedan por determinar para facilitar el desarrollo de dietas adecuadas para el cultivo larvario de peces marinos. Considerando esto, los principales objetivos de la investigación y desarrollo se deben dirigir hacia:

- 1) La determinación de los niveles de inclusión y proporciones entre a.a. libres, péptidos y proteínas. Se debe tomar en cuenta que estos valores son susceptibles de variar durante el desarrollo larvario. Por ejemplo, es probable que las larvas exhiban un requerimiento alto de a.a. libres durante los primeros días de alimentación exógena, seguido por una mayor utilización de péptidos y finalmente la digestión eficiente de proteínas intactas.
- 2) En el caso de los lípidos (eg, HUFAs w-3, DHA:EPA:Ácido Araquidónico, fosfolípidos en relación con triglicéridos), la identificación de los niveles y proporciones adecuados han sido determinados casi en su totalidad (Sargent *et al.* 1999). Por lo tanto, el reto actual es más técnico que

académico, ya que es necesario encontrar ingredientes comerciales que sirvan como fuente de estos nutrientes y que puedan ser incluidos en las dietas sin elevar mucho el costo de producción.

- 3) Es necesario identificar el equilibrio adecuado entre la fuente de ácidos grasos esenciales (como los HUFAs ω -3) y aquellos que no se consideran esenciales (como los insaturados y monosaturados) y que sirven como sustrato para el metabolismo energético.
- 4) Se debe evaluar la digestibilidad de los ingredientes *in vitro* y las interacciones inhibitorias que puedan tener algunos ingredientes con las enzimas digestivas de la especie de interés.
- 5) Determinar compuestos y técnicas alimenticias que incrementen el consumo de las dietas artificiales. Por ejemplo, la inclusión de sustancias naturales como la betaína, alanina y/o sustancias homólogas que cumplan la misma función (DMSP).
- 6) Desarrollar dietas que estimulen la secreción de zimógenos y enzimas digestivas al tubo digestivo para incrementar su digestión.
- 7) Evaluar la utilización de probióticos que incrementen la eficiencia de utilización de las dietas artificiales en sistema de cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Dr. Roberto Mendoza, Dra. Sharon Herzka, Rafael Perez, Mari Carmen Alvarez y Paola Lazo por sus sugerencias editoriales en la elaboración de este manuscrito.

REFERENCIAS

- Baragi, V., Lovell, R.T., 1986. Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larval development. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 115:478-484.
- Brinkmeyer, R., Holt, G. J., 1998. Highly unsaturated fatty acids in diets for red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. *Aquaculture*, 161:53-268.
- 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.*, 109, 213-222.
- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., 1995. Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: Response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases. *Fish Physiol. Biochem.*, 14: 209-214.
- 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 diets for 10-day old seabass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*. 171, 109-119.
- Castell, J.D., Bell, J.G., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1994. Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*. 128, 315-333.
- Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M.R., Bergot, P., Sorgelos, P. 1997. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture*. 155, 149-164.
- Dabrowski, K., 1979. The role of proteolytic enzymes in fish digestion. *In Cultivation of Fish Fry and its Live Food*, Vol. 4, E. Styczunska-Jurewivcsk, T. Jaspers and E. Persoone (Ed.), European Mariculture Society, Belgium, pp. 107-126.
- Dabrowski, K., 1984. The feeding of fish larvae: Present "state of the art" and perspectives. *Reprod. Nutr. Dev.*, 24:807-833.
- Diaz, M., Moyano, F.J., Garcia-Carreno, F.L., Alarcon, F.J., Sarasquete, M.C., 1997. Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aquacult. Int.*, 5,461-471.

- Fyhn, H.J., 1993. Multiple function of free amino acids during embryogenesis in marine fishes. *In* Physiological and biochemical aspects of fish development. B.T. Walther and H. Jorgen-Fyhn (Eds.) University of Bergen, Norway, pp 299-308.
- Geurden, I., Radunz-Neto, J., Bergot, P., 1995. Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture*. 131, 303-314.
- Geurden, I., Bergot, P., Schwartz, L. Sorgeloos, P., 1998. Relationship between dietary phospholipid classes and neutral lipid absorption in newly-weaned turbot, *Scophthalmus maximus*. *Fish Physiol. Biochem.* 19, 217-228.
- Gjellesvik, D. R., Lombardo, D., Walther, B.T., 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties. *Biochim. Biosphys. Acta*, 1124:123-134.
- Govoni, J.J., Boehlert, G.W., Watanabe, Y., 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environ. Biol. Fish.*, 16:59-77.
- Hjelmeland, K, Huse, I., Jorgensen, T., Molovik, G., Raa, J., 1984. Trypsin and trypsinogen as indices of growth and survival potential of cod (*Gadus morhua*) larvae *In* The Propagation of Cod (*Gadus morhua*) Dahl E., D. Danielsen, E. Moksness and P. Solemdal (Eds.) Arendal, Norway, pp. 189-202
- 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.
- Holt, G. J., 1993. Feeding larval red drum on microparticulate diets in closed recirculating water system. *J. World Aquacult. Soc.*, 42:225-240.
- Kolkovski, S., Tandler A., Kissil G. W., Gertler, A., 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. *Fish Phys. Biochem.*, 12:203-209.
- Koven, W.M., Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G. Wm., Sklan, D., 1993. The effect of dietary lecithin and lipase, as function of age, on n-9 fatty acid incorporation in the tissue lipids of *Sparus aurata* larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 13, 275-283.
- Kurokawa, T., Shiraiishi, M., Suzuki, T., 1998. Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine (*Sardinops melanotictus*) larvae. *Aquaculture*, 161:491-499.
- Lauf, M., Hoffer, R., 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture*, 37, 335-346.
- Lavens, P., Sogeloos, P., Dhert, P., Devresse, B., 1995. Larval food *In* Broodstock Management and Egg and Larval Quality. N. R. Broome and R. J. Roberts (Ed.) Blackwell Science, U.K., pp 373-398
- Lazo, J.P., 1999. Development of the digestive system in Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. P.h.D. Dissertation. The University of Texas at Austin. USA.
- Lazo, J.P., Holt, G.J., Arnold, C.R., 2000. Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture Nutrition* 6:183-192.
- Lazo, J.P., Dinnis, M.T., Faulk, C., Holt, G.J., Arnold, C.R., 2000. Co-feeding microparticulate diets with algae: Toward eliminating the need for zooplankton at first feeding in larval red drum. *Aquaculture* 188, 339-351.
- 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.
- Munilla- Moran, R., Stark, J.R., Babour, A., 1990. The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 88: 337-350.
- Moffatt, N.M., 1981. Survival and growth of northern anchovy larvae on low zooplankton densities as affected by the presence of a *Chlorella* bloom. *Rapp. P.-V. Reun. Cons. Int. Explor. Mer*, 178:475-480.
- Olsen, R.E., Henderson, R.J., Pedersen, T., 1991. The influence of dietary lipid classes in the fatty acid composition of small cod *Gadus morhua* L. juveniles reared in an enclosure in northern Norway. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 148, 59-76.
- Ozkizilcik, S., Chu, F.-L. E., 1996. Preparation and characterization of a complex microencapsulated diet for striped bass *Morone saxatilis* larvae. *J. Microencapsulation*. 13, 331-343.
- Person-Le Ruyet, J., 1989. Early weaning of fish larvae onto microdiets: constraints and perspectives. *In* Advances in Tropical Aquaculture, Aquacop. Infremer, Actes de Colloque 9, pp 625-642.
- Person-LeRuyet, J., Alexandre, J.C., Thebaud, L. T., Mugnier, C., 1993. Marine Fish Larvae Feeding: Formulated diets or live prey?. *J. World Aquacult. Soc.*, 42:211-224.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1994. Effect of short and long-term lipid enrichment on total lipids, lipid class and fatty acid composition in rotifers. *Aquacult. Int.*, 2:19-32.
- Reitan, K., Rainuzzo, J. R., Oie, G., Olsen, Y., 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture* 155:207-221
- Ronnestad, I., Fyhn, H.J., Gravningen, 1992. The importance of free amino acids to the energy metabolism of eggs and larvae of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Mar. Biol.* 120, 187-196.
- Ronnestad, 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.

- Sargent, J.R., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J., Rocher, D.J., 1993. The metabolism of phospholipids and polyunsaturated fatty acids in fish. In: Lahlou, B., Vitiello, P. (Eds.) *Aquaculture: Fundamentals and Applied Research*. Coastal and Estuarine Studies 43, American Geophysical Union, Washington, D.C., pp. 103-124.
- Sargent, J.R., McEnvoy, 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., Bell, G., McEnvoy, L., Tocher, D., Estevez A., 1999a. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*. 177,191-199.
- Sargent, J., McEnvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D., 1999b. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*. 179, 217-229.
- Smith, L., 1989. Digestive Functions in Teleost Fishes *In Fish Nutrition*. J. Halver (Ed.) Academic Press, Inc. London. pp 332-422.
- Tanaka, M., 1973. Studies in the structure and function of the digestive system of teleost larvae. D. Agric. Thesis, Kyoto University, Japan.
- Watanabe, T., Tamiya, T., Oka, A., Hirata, C., Kitajima, C. S., Fujita, 1983. Improvement of dietary value of live foods for fish larvae by feeding them on w3 highly unsaturated fatty acids and fat-soluble vitamins. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 50:1015-1022.
- Watanabe, Y., Kiron, V., 1994. Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture* 124:223-251.
- Yúfera, M., Sarasquete, M.C., Fernández-Díaz, C., 1996. Testing protein-walled microcapsules for the rearing of first-feeding gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Mar. Freshwater Res.* 47, 211-216.
- Yúfera, M., Pacual, 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., 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, 12:399-408.
- 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.