

Nutrición de Larvas de Peces

Akio Kanazawa

Faculty of Fisheries, Kagoshima University, Kagoshima, Japón.
4-50-20 Shimoarata, 890, C.P. 890-0046, Kagoshima, Japón. Tel: 81-99-251-6272

Introducción

En la producción de semilla de animales acuáticos para acuicultura, organismos como diatomeas, rotíferos *Brachionus plicatilis* y *Artemia salina* han sido utilizados como alimento vivo en los laboratorios de producción de todo el mundo. Es sabido que existen ciertas dificultades debido a las fluctuaciones en las condiciones naturales y a los altos requerimientos en términos de infraestructura, equipo, gastos de mantenimiento y de mano de obra, por lo que la producción de una cantidad constante de alimento vivo no se logra consistentemente. La calidad nutricia de los rotíferos y la *Artemia* para las larvas de peces es variable, indicando que el valor nutricional de estos alimentos vivos varía en función de su contenido en ácidos grasos n-3 altamente insaturados (n-3 HUFA), tal como los ácidos eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3).

Por lo tanto es necesario desarrollar dietas microparticuladas como un sustituto del alimento vivo para incrementar aún más la productividad de la semilla para el cultivo de peces. Los componentes nutricionales de las dietas microparticuladas para larvas de peces deben ser determinados en base a los requerimientos en proteína, aminoácidos, lípidos, ácidos grasos, carbohidratos, vitaminas y minerales de las larvas. Como un paso inicial hacia el desarrollo de dietas microparticuladas, la composición en nutrientes de las larvas es determinado para entender la acumulación y la utilización, desde el estadio embrionario hasta el desarrollo larval y poslarval. En años recientes, se han incrementado los esfuerzos dedicados al estudio de la nutrición proteica y lipídica durante el desarrollo de los peces (Kanazawa, 1995). El presente trabajo de revisión se centra en los siguientes temas: 1) Fuentes de energía durante el desarrollo embrionario de peces marinos, 2) dietas microparticuladas ajustadas en base a los patrones de aminoácidos de larvas de peces, (3) importancia de los lípidos para las larvas de peces marinos, y 4) efectos del DHA, los fosfolípidos y la vitamina C sobre la tolerancia al estrés de larvas de peces.

1. Fuentes de energía durante el desarrollo embrionario y larvario de peces.

La disponibilidad de aminoácidos y ácidos grasos como fuentes de energía durante el desarrollo embrionario y larvario del pargo japonés (*Pagrus major*) fueron estudiados. Los huevos recién eclosionados se mantuvieron en un tanque de 500 L con flujo de agua continuo bajo. Los huevos, de una hora después de haber sido desovados hasta la eclosión, y larvas recién eclosionadas hasta el estadio en que abren la boca, se muestrearon cada 4 horas y se analizaron para conocer su contenido en aminoácidos y ácidos grasos. El contenido en aminoácidos fue analizado por cromatografía líquida de alta presión, después que las muestras fueron hidrolizadas con ácido metano sulfónico 4N. Los lípidos totales fueron extraídos por el método de Bligh & Dyer. Los lípidos fueron divididos en lípidos neutros y polares usando

Kanazawa A. 2000. Nutrición de larvas de peces. pp 53-64 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.

cartuchos de sílice Sep-Pak . Los ésteres metílicos de ácidos grasos fueron determinados por cromatografía gas-líquido.

A medida que avanzaron el desarrollo embrionario y larvario del pargo japonés *Pagrus major*, los aminoácidos libres (FAA) disminuyeron gradualmente (Figura 1). El contenido de ácidos grasos en los lípidos polares y neutros fueron casi constantes durante el desarrollo embrionario; sin embargo, después de la eclosión los ácidos grasos en los lípidos neutros disminuyeron gradualmente (Figura 2). A partir de estos resultados, se demostró que los aminoácidos libres son usados durante el desarrollo embrionario; mientras que los aminoácidos libres y los lípidos neutros son utilizados después de la eclosión, resaltando su importancia como fuentes de energía en los huevos y las larvas (Figura 3).

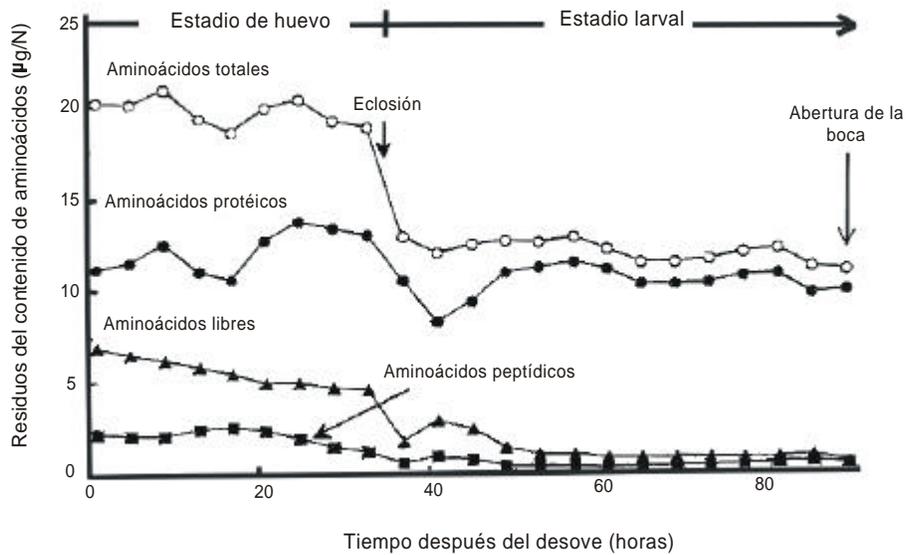


Figura 1. Total de aminoácidos libres, peptídicos y protéicos durante el desarrollo embrionario y larvario del pargo japonés *Pagrus major*.

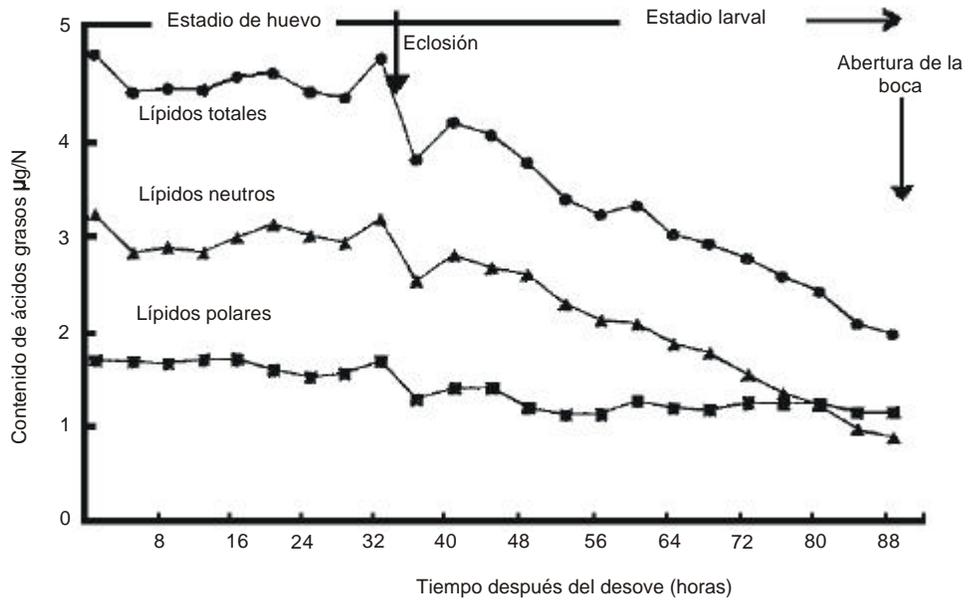


Figura 2. Ácidos grasos durante el desarrollo embrionario y larvario del pargo japonés *Pagrus major*.

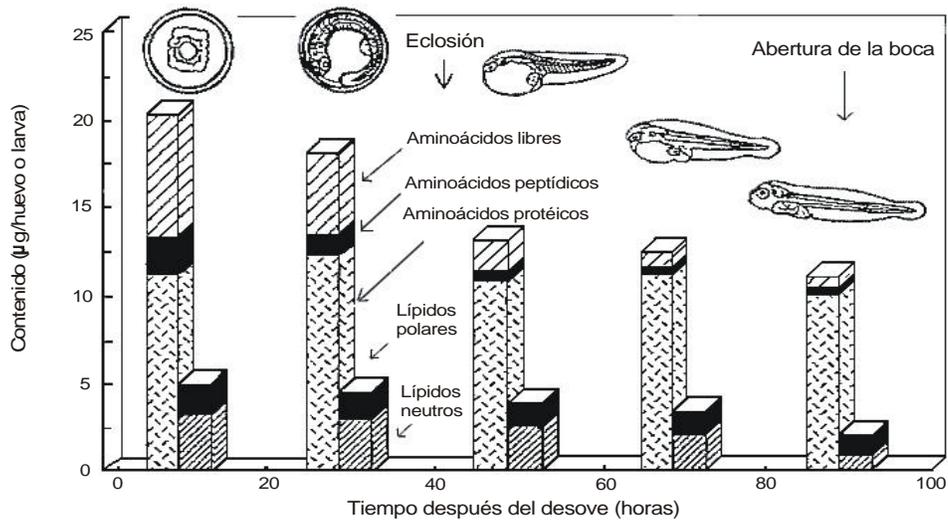


Figura 3. Variación de aminoácidos y lípidos durante el desarrollo embrionario y larvario del pargo japonés *P. major*.

2. Dietas microparticuladas ajustadas en base a los patrones de aminoácidos del Lengado japonés *Paralichthys olivaceus*.

Por lo general, las proteínas que tienen un patrón de aminoácidos esenciales (EAA) similar al del cuerpo del organismo en estudio o a la proteína de huevo pueden tener un alto valor nutricional para peces. El autor de esta revisión analizó la composición en aminoácidos de las proteínas del cuerpo del lengado japonés *Paralichthys olivaceus* e hizo cuatro dietas experimentales usando varias fuentes de proteína para simular el patrón de aminoácidos de las proteínas del cuerpo de las larvas del lengado japonés. Cuatro dietas microparticuladas fueron formuladas con los siguientes ingredientes: harina blanca de pescado, harina café de pescado, polvo de bonito, levadura en polvo, harina de cangrejo, harina de gluten y/o harina de krill (Tabla 1 y 2). Los valores nutricionales de las dietas fueron comparados con una dieta control a base de alimento vivo, mediante un bioensayo nutricional que se desarrolló desde algunos estadios larvarios hasta el período en que los peces nadan primordialmente en el fondo. La Tabla 3 muestra los resultados del bioensayo de alimentación, mismo que tuvo una duración de 38-días. Los organismos que se alimentaron con las dietas experimentales tuvieron 36.1-44.8% de sobrevivencia y 19.5-19.7 mm de longitud total, mientras que aquellos del alimento control, recibiendo rotíferos y Artemia, alcanzaron 51.7% de sobrevivencia y 21.4 mm de longitud total.

Tabla 1. Composición de dietas microparticuladas para el lengado japonés *Paralichthys olivaceus*.

Ingrediente	Dieta			
	1	2	3	4
	(g/100 g de dieta seca)			
Harina blanca de pescado	30.0			
Polvo de bonito	11.9	11.9	13.2	
Cartílago de calamar	9.0		8.5	
Levadura en polvo	25.0			14.0
Harina café de pescado		45.9		
Harina de cangrejo		15.0		
Harina de soya			16.8	25.0
Harina de gluten			22.5	
Harina de krill			12.0	20.0
Albúmina de huevo				10.0
Caseína de leche				2.5
Celulosa	2.1	5.2	5.0	6.5
Aceite de hígado de calamar	8.0	8.0	8.0	8.0
Lecitina de soya	3.0	3.0	3.0	3.0
Mezcla de minerales	5.0	5.0	5.0	5.0
Mezcla de vitaminas	6.0	6.0	6.0	6.0
Total	100	100	100	100

3. Importancia de los lípidos en larvas de peces marinos.

El mero de pintas rojas (*Epinephelus akaara*), es una de las nuevas especies empleadas en la acuicultura japonesa. Sin embargo, el crecimiento y la sobrevivencia durante el estadio larvario aún son bajos. La composición de ácidos grasos y aminoácidos de las larvas vivas con alta vitalidad, y las larvas que murieron por shock durante la transferencia y cosecha de *Epinephelus akaara* fue analizada (Tabla 4). La composición de las clases de lípidos del cuerpo de este pez mostró que el contenido en triglicéridos de las larvas muertas por shock es bajo (Tabla 5). En la fracción de lípidos neutros, ácidos grasos poliinsaturados tales como ácido linoléico (18:2n-6), ácido linolénico (18:3n-3), EPA y DHA fueron más altos en las larvas vivas que en las larvas muertas por shock (Tabla 6). En la fracción de lípidos polares, el DHA en las larvas vivas fue más alto que en las larvas muertas (Tabla 7). Los resultados indicaron que la alta vitalidad de las larvas de esta especie es debida a una mayor cantidad de DHA en el cuerpo.

Tabla 2. Proporción relativa de aminoácidos esenciales (EAA) respecto a metionina en el lenguado japonés y en las dietas.

AAE	Lenguado Japonés	Dieta			
		1	2	3	4
Met	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Tre	1.34	1.34	1.20	1.37	1.15
Val	1.46	1.57	1.45	1.67	1.63
Ile	1.32	1.50	1.37	1.67	1.63
Leu	2.45	2.91	2.69	4.30	2.88
Fen	1.30	1.57	1.51	2.17	1.68
His	.70	0.69	0.64	0.81	0.69
Lis	3.19	2.98	2.65	2.85	2.45
Tri	0.78	0.83	0.92	1.40	1.09
Arg	1.95	2.29	2.13	2.14	1.89

Tabla 3. Efecto de dietas microparticuladas en el crecimiento y sobrevivencia del lenguado japonés

Dieta no.	Inicial	Final	
	Longitud total (mm)	Tasa de sobrevivencia (%)	Longitud total (mm)
1	4.9 ± 0.5	39.2	19.6 ± 1.6
2	4.9 ± 0.5	36.1	19.6 ± 1.3
3	4.9 ± 0.5	44.8	19.6 ± 1.5
4	4.9 ± 0.5	43.9	19.7 ± 1.5
Control (alimento vivo)	4.9 ± 0.5	51.7	21.4 ± 2.0

Tabla 4. Condiciones experimentales, tratamientos dietéticos y efectos en las larvas del mero de pintas rojas (*Epinephelus akaara*).

Tanque A		Tanque B
Régimen alimenticio		
Tamaño del tanque	54 Ton.	54 Ton.
Dieta	Rotífero + Artemia Dieta microparticulada desde los 17 días después de la eclosión	Rotífero + Artemia Dieta microparticulada desde los 24 días después de la eclosión
Período de alimentación	45 días	45 días
Resultados		
Longitud total final	22 mm	21 mm
Peso final del cuerpo	112 mg	112 mg
Mortalidad al cosechar (Muerte por shock)	0 %	10 %
Muestra analizada	Larva viva	Larva muerta

Tabla 5. Contenido en clases de lípidos (mg/g) del cuerpo entero del mero de pintas rojas (*Epinephelus akaara*).

Clase de lípidos	Larva viva	Larva muerta	Juvenil
Lípidos neutros	84.0	36.0	119.5
SE	1.0	3.4	0.6
TG	77.5	14.2	114.2
FFA	1.1	3.1	0.9
CHO	3.3	13.4	1.4
DG	1.2	0.7	2.4
MG	tr	0.9	tr
Desconocido	tr	0.4	tr
Lípidos polares	62.8	64.4	45.7
PE	tr	tr	tr
PI + PS	7.4	5.3	3.8
PC	54.2	52.7	35.7
SM	1.2	4.2	4.0
LPC	tr	tr	tr
Desconocido	tr	2.2	2.3
Total	146.8	100.4	165.2

SE: Esteril ester TG: Triglicéridos, FFA: Ácidos Grasos libres, CHO: Colesterol, DG: Diglicéridos, MG: Monoglicéridos, PE: Fosfatidil etanolamina, PI: Fosfatidil inositol, PS: Fosfatidil serina, PC: Fosfatidil colina, SM: Esfingomielina, LPC: Liso-fosfatidilcolina. Tr: trazas.

Tabla 6. Contenido en ácidos grasos (mg/g) de los lípidos neutros del mero de pintas rojas (*Epinephelus akaara*).

Acidos grasos	Poslarva viva	Poslarva muerta	Juvenil
14:0	1.40	0.24	4.20
16:0	9.61	2.03	17.08
16:1	3.30	0.72	6.08
16:2 + 17:0	0.49	0.11	0.69
17:1 +16:4n-3	0.74	0.19	0.86
18:0	3.06	1.05	3.48
18:1	16.09	3.79	23.70
18:2n-6	6.35	0.95	10.94
18:3n-3	7.90	3.36	2.34
18:4n-3	1.55	0.52	1.07
20:1	1.20	0.17	2.57
20:3n-3 + 20:4n-6	0.97	0.42	1.02
20:4n-3	0.82	0.28	0.84
20:5n-3	3.33	0.77	9.26
22:5n-3	0.51	0.19	1.25
22:6n-3	3.25	0.44	7.87
Total	61.48	15.70	93.94

Tabla 7. Contenido de ácidos grasos (mg/g) de lípidos polares del mero de pintas rojas *Epinephelus akaara*.

Acidos grasos	Poslarva viva	Poslarva muerta	Juvenil
14:0	0.24	0.19	0.30
16:0	6.43	5.77	4.93
18:0	2.79	2.98	1.99
18:1	5.07	5.43	3.71
18:2n-6	2.34	1.62	1.48
18:3n-3	1.26	3.09	0.14
20:1	0.27	0.21	0.32
20:3n-3+20:4n-6	0.91	1.01	0.52
20:4n-3	0.22	0.43	0.03
20:5n-3	2.16	2.02	1.80
22:5n-3	0.53	0.61	0.36
22:6n-3	4.81	2.16	4.68
Total	27.94	26.67	20.90

Los ácidos grasos altamente insaturados de la familia n-3 fueron muy efectivos como ácidos grasos esenciales para peces marinos tales como el pargo japonés (*Pagrus major*), la castañeta (*Brama brama*), la brema de piedra (*Oplegnathus fasciatus*), el jurel amarillo, el cocinero (*Carangoides vinctus*) y el botete (Kanazawa, 1985).

Varios trabajos han mostrado que el ácido graso esencial DHA es más eficiente que el EPA para el pargo japonés (Watanabe et al., 1989a; Izquierdo et al., 1989; Takeuchi et al., 1990), el la brema de roca (Kanazawa, 1993a) y el cocinero (Watanabe et al., 1989b). En todos los casos, el crecimiento, sobrevivencia y vitalidad fueron mejorados en peces alimentados con dietas que contenían altos niveles de DHA. En el presente estudio, los efectos de EPA y DHA sobre el crecimiento de larvas del lenguado japonés (*P. olivaceus*) fueron estudiados. Se realizaron experimentos nutricionales con larvas de nueve días después de la eclosión, con una longitud total de 4.90 ± 0.44 mm. Mil quinientas larvas fueron mantenidas en tanques de 200-L. La fuente de proteína en la dieta fue la caseína y el aglutinante fue la zeína. La preparación de las dietas microparticuladas se hizo como ha sido reportada en experimentos previos (Teshima et al., 1982; Kanazawa y Teshima, 1988). La pureza de EPA y DHA fue de 77.15% y 81.8%, respectivamente. Las dietas semipurificadas contenían ya sea EPA o DHA a niveles de 0.5, 1.0, y 2.0% (Tabla 8) y fueron distribuidas a las larvas de lenguado japonés durante 30 días. Las larvas alimentadas con las dietas que contenían DHA crecieron más que las alimentadas con dietas conteniendo EPA (Fig. 4). Los resultados sugieren que DHA es un ácido graso esencial más efectivo e importante que el EPA para larvas de peces.

Tabla 8. Efecto de EPA y DHA sobre el crecimiento y sobrevivencia del lenguado japonés (*P. olivaceus*).

Tratamiento ¹	Longitud total (mm) ²	Tasa de sobrevivencia (%)
PLO 6.0%	13.07 ± 1.4^a	65
EPA 0.5%	10.79 ± 1.43^{de}	13
EPA 1.0%	11.15 ± 1.34^{cd}	28
EPA 2.0%	10.99 ± 1.10^{cd}	39
DHA 0.5%	11.62 ± 1.65^{bc}	44
DHA 1.0%	12.26 ± 1.26^{ab}	43
DHA 2.0%	11.32 ± 1.17^{cd}	36
n-3 HUFA free	10.24 ± 1.05^e	12

¹ PLO Aceite de hígado de bacalao, EPA ácido eicosapentaenoico, DHA docosahexaenoico, n-3 HUFA ácidos grasos n-3 altamente insaturados.

² Longitud total inicial 4.90 ± 0.44 mm. Los promedios de los tratamientos con el mismo superíndice no son diferentes significativamente ($P > 0.05$).

Durante el curso de la investigación de dietas microparticuladas, encontramos que las fuentes de fosfolípidos son esenciales para un crecimiento normal y una buena sobrevivencia en larvas de peces como el ayu *Plecoglossus altivelis* (Kanazawa et al., 1981; 1985) y el pargo japonés (Kanazawa et al., 1983). Los efectos de los fosfolípidos de la dieta sobre la incidencia de malformaciones en las larvas de ayu fueron investigadas. La incidencia de escoliosis y enroscamiento de la boca fue reducido con la adición de lecitina (Kanazawa et al., 1981).

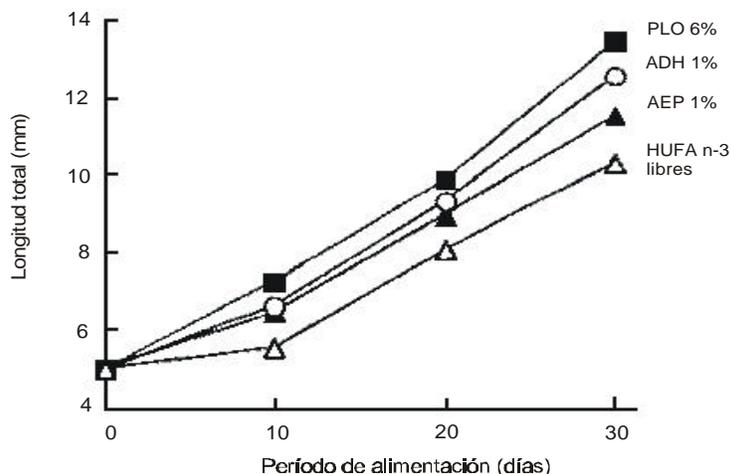


Figura 4. Longitud total de las larvas de Lengado japonés alimentado con dietas conteniendo aceite de hígado de bacalao (PLO), Acido docosahexaenoico (ADH) Acido eicosapentaenoico (AEP) o sin n-3 HUFA.

Los fosfolípidos no solo fueron efectivos durante el estadio larval, sino también durante la etapa juvenil del lenguado japonés (Kanazawa, 1993b). Desde que se descubrió la necesidad de aportar fosfolípidos para el buen crecimiento de las larvas de peces, las dietas con fosfolípidos como lecitina de soja son ampliamente usadas en acuicultura para la producción de semilla. El efecto de los fosfolípidos sobre la ganancia del peso del cuerpo de la brema de roca *Oplegnathus fasciatus* fue investigado.

Cien larvas de brema de roca con longitud total de 12.5 ± 0.7 mm, peso del cuerpo 26 ± 2.7 mg, fueron puestas en tanques de 100 L y mantenidas a una temperatura de $26.5-29.2^{\circ}\text{C}$. La talla de la partícula de la dieta microparticulada fue de 250-1000 micras.

Las larvas fueron alimentadas con las dietas microparticuladas 10 veces al día, durante 28 días. La tasa de recambio de agua de mar fue de 6-10% al día. Los resultados del experimento de alimentación son presentados en la tabla 9.

Tabla 9. Efecto de la lecitina de soja en el crecimiento de la brema roja *Oplegnathus fasciatus*

Dieta	Longitud total (mm)		Peso ganado del cuerpo (%)	Tasa de sobrevivencia (%)	Vitalidad(%)*
	Inicial	Final			
Lecitina de soja					
0 %	12.5	29.7	1765	65	33
3 %	12.5	33.2	2462	73	80
5 %	12.5	39.1	4581	63	92
7 %	12.5	39.8	4400	72	67
Alimento vivo (Rotífero + Artemia)	12.5	35.3	2398	75	67

Tasa de sobrevivencia de los peces 20 min. después de haber sido expuestos al aire por 4 min.

El crecimiento, la sobrevivencia y la vitalidad de larvas de peces alimentadas con la dieta conteniendo 5.0% de lecitina de soya fue superior a aquellas alimentados con las dietas que contenían 0, 3 ó 7% de lecitina de soya y alimento vivo (rotíferos y Artemia).

4. Efectos de DHA, fosfolípidos y vitamina C sobre la tolerancia al estrés en peces.

Los efectos del DHA, los fosfolípidos (lecitina de soya) y la vitamina C (L-ascorbyl-2-fosfato Mg) sobre la tolerancia al estrés del lenguado “marbled sole” (*Limanda yokohamae*), fue estudiado en bioensayos de alimentación con duración de 30 días.

La tolerancia de este lenguado a factores de estrés tales como cambios en la temperatura y la salinidad del agua fueron determinados. Siete dietas conteniendo dos niveles de DHA (0 y 2%), lecitina de soya (0 y 3%), vitamina C (0 y 0.1%) y alimento vivo (rotíferos y Artemia) fueron formuladas. Las dietas microparticuladas conteniendo zeína (8%) como ligante. El tamaño de partícula de las dietas microparticuladas fue de 180-350 μ m. Larvas de *Limanda yokohamae* (de 20 días después de la eclosión, con longitud total de 8.81 ± 0.62 mm) fueron distribuidas a razón de 500 por tanque en tanques de 100 L por duplicado para cada dieta. Las larvas fueron alimentadas con las dietas microparticuladas 13 veces por día durante 30 días. Durante el bioensayo, el flujo de agua de mar fue de 175-350 ml/min y la temperatura del agua de 13.5-15.0 °C.

Una vez terminado el bioensayo, los peces se dejaron en ayuno por un día y 30 peces de cada tratamiento fueron mantenidos en 8 jaulas, divididas en contenedores de 500 L, bajo condiciones de oxígeno controladas. La temperatura del agua en los contenedores se fue incrementando 1 °C por hora desde 16 hasta 32 °C, manteniéndose los peces durante una hora a cada temperatura. Para la prueba de estrés de baja salinidad, los peces se dejaron en ayuno por un día y 30 de cada tratamiento fueron transferidos a 8 jaulas divididas en contenedores de 500 L. Después de 8 h, el agua de mar fue diluida con agua dulce, de 35g/l a 3g/L para reducir la salinidad a una tasa de 3g/L por hora. Se midió el tiempo de exposición a la salinidad de 3g/L cuando el 50% de los peces habían muerto.

El DHA, la lecitina de soya y la vitamina C fueron efectivos para incrementar la tolerancia de los peces a varias condiciones de estrés (Fig. 5). Particularmente, las larvas de la dieta con DHA mostraron muy alta tolerancia al incremento de la temperatura del agua, y las dietas con lecitina de soya y vitamina C incrementaron la resistencia de las larvas al estrés por baja salinidad. Estos resultados son similares a los reportados en investigaciones previas (Kanazawa, 1997).

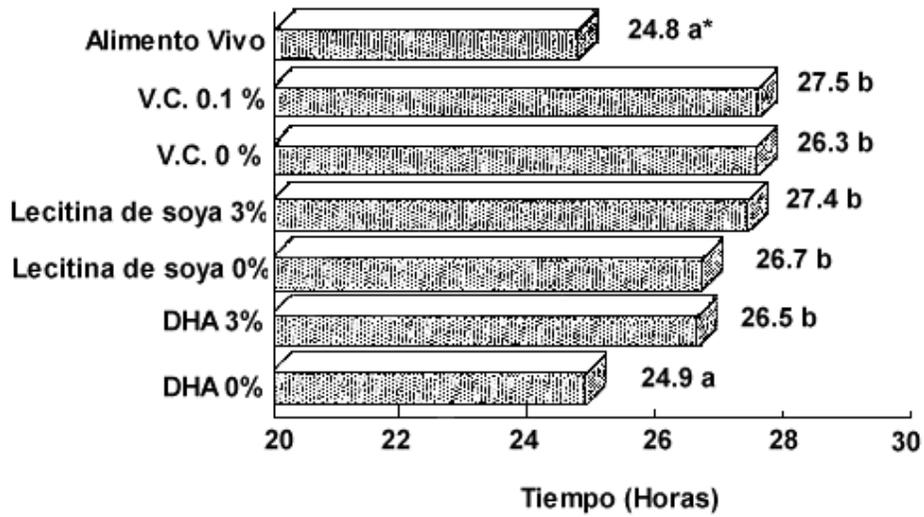


Figura 5a. Tiempo de exposición al incremento de temperatura para que el 50 % de los peces murieran.
 *Los valores con superíndices iguales no son significativos a $P=0.05$

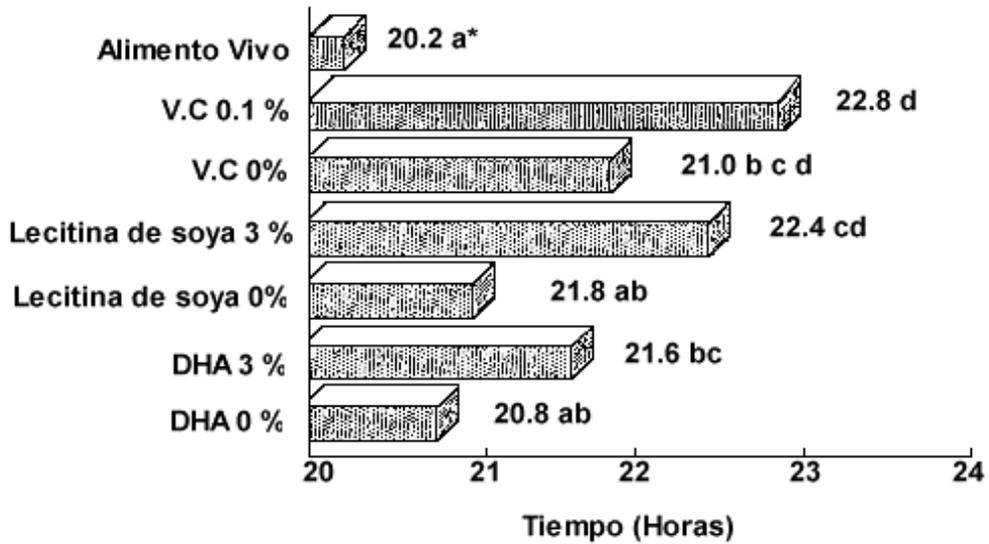


Figura 5b. Tiempo de exposición a baja salinidad para que el 50 % de los peces murieran.
 *Los valores con superíndices iguales no son significativos a $P=0.05$

Referencias:

- Fyhn, H.J.**, 1989. First feeding of marine fish larvae: are free amino acids the source of energy? *Aquaculture*, 80: 111-120.
- Izquierdo, M.S., Watanabe, T., Takeuchi, T., Arakawa, T. and Kitajima, C.**, 1989. Requirement of larval red sea bream *Pagrus major* for essential fatty acids. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55:859-867.
- Kanazawa, A.**, 1985. Essential fatty acid and lipid requirement of fish. In: C.B. Cowey, A.M. Mackle and J.G. Bell (Editors), *Nutrition and Feeding in Fish*. Academic Press, London, pp. 281-298.
- Kanazawa, A.**, 1993a. Importance of dietary docosahexaenoic acid on growth and survival of fish larvae. In: C.S. Lee, M.S. Su and I.C. Liao (Editors). *Proc.of Finfish Hatchery in Asia '91*. TML Conf Proc. 3, Tungkang Marine Lab.,TFRI, Taiwan, pp.87-95.
- Kanazawa,A.**, 1993b. Essential phospholipids of fish and crustaceans. In:S.J.Kaushik and P.Luquet (Editors), *Fish Nutrition in Practice*. INRA Edition, Paris Les Colloques, No. 61, pp.519-530.
- Kanazawa,A.**, 1995. Nutrition of larval fish. In: C.E.Lim and D.J. Sessa (Editors), *Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture*. AOCS Press, Illinois, no. 50- 59.
- Kanazawa,A.**, 1997. Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. *Aquaculture*, 155: 129-134.
- Kanazawa, A. and Teshima, S.**, 1988. Microparticulate diets for fish larvae. In: A.K. Sparks (Editor), *New and Innovative Advances in Biology/Engineering with Potential for Use in Aquaculture*. NOAA Tech. Rep. NMFS 70, Nat'l. Mar. Fish. Serv., Seattle, pp. 57-62.
- Kanazawa, A., Teshima,S. and Sakamoto, M.**, 1985. Effects of dietary bonito-egg phospholipids and some phospholipids on growth and survival of the larval ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Z. Angew. Ichthyol.*, 4: 165-170.
- Kanazawa,A., Teshima,S., Inamori,S. and Matsubara,H.**,1983. Effects of dietary phospholipids on growth of the larval red sea bream and knife jaw. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, 32: 109-114.
- Kanazawa,A., Teshima,S., Inamori,S., Iwashita,T. And Nagao,A.**, 1981. Effects of phospholipids on growth, survival rate, and incidence of malformation in the larval Ayu. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, 30: 301-309.
- Ronnestad, I. and Fyhn, H.J.**, 1993. Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae. *Reviews in Fisheries Science*, 1:239-259.
- Takeuchi, T., Toyota, M., Satoh, S. and Watanabe, T.**, 1990. Requirement of juvenile red sea bream for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56: 1263-1269.
- Teshima, S., Kanazawa, A. and Sakamoto, M.**, 1982. Microparticulate diets for the larvae of aquatic animals. *Mini Rev. Data File Fish. Res.* 2:67-86.
- Watanabe,T., Izquierdo,M.S., Takeuchi,T., Satoh,S. And Kitajima,C.**, 1989a. Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficiency in larval red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 1635-1640.
- Watanabe,T., Arakawa,T, Takeuchi,T. and Satoh,S.**, 1989b. Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficiency in juvenile striped jack *Pseudocaranx dentex*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 1989-1995.