

**EFFECTO DE LA MICROALGA *Isochrysis galbana* EN EL CULTIVO TEMPRANO DE LARVAS DE *Paralichthys adspersus***

**EFFECT OF THE MICROALGA *Isochrysis galbana* ON THE EARLY LARVAL CULTURE OF *Paralichthys adspersus***

A. Silva

Departamento de Acuicultura  
Facultad de Ciencias del Mar  
Universidad Católica del Norte  
Casilla 117

Coquimbo, Chile

E-mail: [asilva@socompa.cecun.ucn.cl](mailto:asilva@socompa.cecun.ucn.cl)

*Recibido en septiembre de 1997; aceptado en enero de 1999*

**RESUMEN**

Para determinar el efecto del uso de la microalga *Isochrysis galbana* en el medio de cultivo y como enriquecedor de rotíferos para el cultivo larval de lenguado chileno *Paralichthys adspersus*, se realizó una experiencia con 4500 larvas mantenidas en nueve tanques de 25 L con agua verde y con agua clara, y alimentadas con rotíferos enriquecidos con el producto DHA Selco e *I. galbana*. Los resultados se evaluaron en términos de la supervivencia, el crecimiento, el desarrollo y la resistencia de las larvas al estrés. Los resultados reflejan que las larvas mantenidas en agua verde con rotíferos enriquecidos con DHA Selco (AV-R-DHA) y las larvas mantenidas en agua clara con rotíferos enriquecidos con *I. galbana* (AC-R-IG) son significativamente mayores que las mantenidas en agua clara con rotíferos enriquecidos con DHA Selco (AC-R-DHA). No se detectaron diferencias significativas en la supervivencia, el crecimiento y el estado de desarrollo entre las larvas en AV-R-DHA y las larvas en AC-R-IG, lo que sugiere que *I. galbana* es capaz de aportar y mantener en los rotíferos los requerimientos nutricionales necesarios para el desarrollo de las larvas de lenguado. La mayor viabilidad comparativa mostrada por las larvas mantenidas en agua verde y el alto nivel de ácido docosahexaenoico (DHA) mostrado por *I. galbana* podría implicar un importante papel del DHA en la calidad final de las larvas de lenguado.

*Palabras clave:* *Paralichthys adspersus*, larva, agua verde, *Brachionus plicatilis*, (n-3) HUFA.

**ABSTRACT**

A first feeding experiment on Chilean flounder larvae (*Paralichthys adspersus*), using *Isochrysis galbana* in culture tanks and a rotifer enrichment technique, was performed with 4500 larvae in nine 25-L tanks with green and clear water, and fed rotifers enriched with DHA Selco and *I. galbana*. The results were evaluated in terms of survival, growth, development and larval viability (stress-test). Larvae in green water with rotifers enriched with DHA Selco (AV-R-DHA) and larvae in clear water with rotifers enriched with *I. galbana* (AC-R-IG) showed significant differences in survival, growth, development and viability, compared to larvae in clear water with rotifers enriched with DHA Selco (AC-R-DHA). Furthermore, there were no significant differences in survival, growth and development between larvae in

AV-R-DHA and larvae in AC-R-IG, suggesting that *I. galbana* could improve and support satisfactory nutritional levels in rotifers to sustain development of flounder larvae. The high viability shown by larvae in green water and the high level of docosahexaenoic acid (DHA) content in *I. galbana* suggest a important role of DHA in the final quality of flounder larvae.

*Key words:* *Paralichthys adspersus*, larvae, green water, *Brachionus plicatilis*, (n-3) HUFA.

## INTRODUCCIÓN

Una de las etapas más críticas del cultivo comercial de peces marinos es la etapa de producción larval, la cual comienza con un régimen de alimento vivo compuesto por rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y *Artemia*, con o sin adición de microalgas al tanque (Gatesoupe, 1990; Reitan *et al.*, 1993).

Estudios recientes demuestran la importancia del contenido de los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), especialmente de la serie n-3, como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) (Kanazawa, 1985; Koven *et al.*, 1992), en el valor nutricional de las presas vivas utilizadas en esta etapa y que la microalga agregada a los estanques o utilizada como enriquecedor altera la composición de proteínas, lípidos y ácidos grasos de las presas vivas (Ben-Amotz *et al.*, 1987; Reitan *et al.*, 1994, 1997; Oie *et al.*, 1997). El uso de microalgas depende de los costos involucrados, de las facilidades existentes y de los resultados de producción obtenidos para la especie en producción. Aun cuando todavía se discute si las algas actúan por ingesta directa de las larvas o mejoramiento nutricional de las presas vivas, o si su presencia mejora la comunidad microbiológica del agua, de los rotíferos y de las larvas, o incrementa el consumo de presas por efecto de un cambio en las condiciones de luz del tanque, en términos generales las experiencias con producción de larvas de peces planos muestran mejores resultados con su utilización (Naas *et al.*, 1992; Reitan *et al.*, 1993, 1997; Silva *et al.*, 1996; Oie *et al.*, 1997).

El presente trabajo forma parte del programa de desarrollo tecnológico para el cultivo de lenguado chileno *Paralichthys adspersus* y su

## INTRODUCTION

One of the most critical stages in the commercial culture of marine fish is that of larval production, which begins with a regimen of live feed made up of rotifers (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia*, and may or may not include the addition of microalgae to the tank (Gatesoupe, 1990; Reitan *et al.*, 1993).

Recent studies indicate the importance of the highly unsaturated fatty acid (HUFA) content, especially that of the n-3 series, such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) (Kanazawa, 1985; Koven *et al.*, 1992), in the nutritional value of the live prey used in this stage and that the microalga added to the tanks or used for enrichment alters the composition of the proteins, lipids and fatty acids of the live prey (Ben-Amotz *et al.*, 1987; Reitan *et al.*, 1994, 1997; Oie *et al.*, 1997). The use of microalgae depends on the costs involved, on the facilities available and on the production results obtained for the culture species. Even though it has not been determined if the effectiveness of the algae is due to the direct ingestion by the larvae or a higher nutritional value of the live prey, or if their presence improves the microbiological community of the water, rotifers or larvae, or if changes in light in the tank increases prey consumption, experiments on flatfish larval production show better results with their use (Naas *et al.*, 1992; Reitan *et al.*, 1993, 1997; Silva *et al.*, 1996; Oie *et al.*, 1997).

This study is part of a research program for the culture of Chilean flounder *Paralichthys adspersus* and aims to identify the effects of using the microalga *Isochrysis galbana* in the culture medium and for rotifer enrichment in the early

objetivo es identificar el efecto del uso de la microalga *Isochrysis galbana* en el medio de cultivo y como enriquecedor de rotíferos en la producción larval temprana de lenguado, en términos de supervivencia, crecimiento, desarrollo y calidad de las larvas producidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de esta experiencia se cultivaron 5000 larvas de *P. adspersus* provenientes del desove de una misma hembra, las cuales fueron mantenidas durante 17 días alimentadas con rotíferos (*B. plicatilis*) cultivados en estanques cónicos de 500 L (34‰, 25°C) y mantenidos con levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) a razón de 1 g de levadura por millón de rotíferos por día. Antes de ser entregados a las larvas, los rotíferos fueron enriquecidos por 12 horas con DHA Selco (INVE Aquaculture N.V./S.A., Bélgica). La experiencia se inició con la selección de 4500 de estas larvas de 18 días de edad ( $7.25 \pm 0.38$  mm LN), las cuales fueron colocadas en nueve tanques cilíndricos de 25 L cada uno, a una densidad de 20 larvas por litro de agua de mar (34‰) filtrada a  $5 \mu\text{m}$  y esterilizada por UV. Los tanques fueron mantenidos con iluminación continua y a temperatura ambiente.

El diseño del experimento constó de tres tratamientos, cada uno mantenido en triplicado:

- (A) Larvas mantenidas en agua clara y alimentadas con rotíferos enriquecidos con *I. galbana* (AC-R-IG).
- (B) Larvas mantenidas en agua clara y alimentadas con rotíferos enriquecidos con DHA Selco (AC-R-DHA).
- (C) Larvas mantenidas en agua verde y alimentadas con rotíferos enriquecidos con DHA Selco (AV-R-DHA).

El tratamiento con agua verde contiene la microalga *I. galbana* (cepa Tahiti) en el medio, a una concentración de 500,000 a 600,000 cel/mL,

larval production of flounder, in terms of survival, growth, development and quality of the larvae produced.

## MATERIALS AND METHODS

For this experiment, 5000 larvae of *P. adspersus* from the spawn of a single female were cultured. They were fed rotifers (*B. plicatilis*) for 17 days, which had been cultured in 500-L conical tanks (34‰, 25°C) in baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) at a rate of 1 g yeast per million rotifers per day. Before the rotifers were given to the larvae, they were enriched for 12 hours with DHA Selco (INVE Aquaculture N.V./S.A., Belgium). The experiment started with the selection of 4500 18-day-old larvae ( $7.25 \pm 0.38$  mm NL), which were placed in nine 25-L cylindrical tanks, at a density of 20 larvae per liter of sea water (34‰), filtered through  $5 \mu\text{m}$  and sterilized with UV. The tanks were kept at ambient temperature with constant light.

The experiment consisted of three treatments conducted in triplicate:

- (A) Larvae kept in clear water and fed rotifers enriched with *I. galbana* (AC-R-IG).
- (B) Larvae kept in clear water and fed rotifers enriched with DHA Selco (AC-R-DHA).
- (C) Larvae kept in green water and fed rotifers enriched with DHA Selco (AV-R-DHA).

The green-water treatment contained the microalga *I. galbana* (T. iso) in the medium, at a concentration of 500,000 to 600,000 cells/mL, which had been cultured in 10-L bottles with filtered, sterilized sea water, Matthiensen and Toner culture medium modified by Uribe (1992), illumination of 2500 lux and temperature of  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . The cultures were always harvested in their stationary phase. For rotifer enrichment with the microalga *I. galbana*, a 20-L recipient was used that contained sea water and the microalga at a concentration of

las que fueron previamente cultivadas en botellas de 10 L con agua de mar filtrada, esterilizada, medio de cultivo de Matthiensen y Toner modificado por Uribe (1992), iluminación de 2500 lux y temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Los cultivos fueron siempre cosechados en su fase estacionaria. Para el enriquecimiento de rotíferos con la microalga *I. galbana* se utilizó un recipiente de 20 L con agua de mar y microalga a una concentración de 5 millones cel/mL de *I. galbana*, en el que los rotíferos fueron mantenidos por 12 horas previo a su cosecha, lavado y entrega a las larvas. Para el enriquecimiento de rotíferos con DHA Selco se usaron similares recipientes con agua de mar, a los cuales se les agregó 0.1 g de DHA Selco por cada litro de medio de enriquecimiento, de acuerdo con las instrucciones indicadas por el fabricante. En ellos los rotíferos fueron mantenidos también por 12 horas previo a su cosecha, lavado y entrega a las larvas. Una vez completado el tiempo de enriquecimiento, se tomó una muestra de rotíferos enriquecidos con *I. galbana* y otra con DHA Selco para analizar los niveles de (n-3) HUFAs, EPA y DHA contenidos en cada una. El análisis de las muestras se realizó utilizando una modificación de la técnica de Bligh y Dyer (1959) y descrita por Rainuzzo *et al.* (1994).

El siguiente día de iniciada la experiencia se repusieron las larvas muertas aparecidas producto del manejo. Para la alimentación larval se utilizó una concentración inicial de 5 rotíferos/mL, la cual cada 12 horas fue evaluada y restablecida. La duración de la experiencia fue de 20 días, durante los cuales cada 24 horas se hizo recambio del 50% del volumen de agua, cuidando en el tratamiento con agua verde de mantener la densidad celular de microalgas inicialmente especificada para el medio. Diariamente se procedió a monitorear la temperatura y el pH, y se eliminó mediante sifón la materia orgánica y las larvas muertas para mantener limpio el sistema. Al final de la experiencia se realizó un conteo final y se procedió a muestrear el 30% de las larvas supervivientes, a las cuales se les midió la longitud total, se evaluó el estado de desarrollo de acuerdo con la clasificación hecha por Zúñiga y Acuña (1992) y se les

5 million cells/mL. Prior to the harvest, the rotifers were kept for 12 hours in the recipient, then washed and given to the larvae. For rotifer enrichment with DHA Selco, similar recipients containing sea water were used, to which 0.1 g of DHA Selco was added per liter of enrichment medium, according to the manufacturer's instructions. The rotifers were kept for 12 hours in the recipient prior to their harvest, then washed and given to the larvae. Once the enrichment time had lapsed, a sample of rotifers enriched with *I. galbana* and another with DHA Selco was taken to analyze the levels of (n-3) HUFAs, EPA and DHA contained in each. The samples were analyzed with a modification of the technique of Bligh and Dyer (1959), described by Rainuzzo *et al.* (1994).

The day after the experiment began, the larvae that had died from handling were replaced. For the larval feeding, an initial concentration of 5 rotifers/mL was used, which was evaluated and re-established every 12 hours. The experiment lasted 20 days, and every 24 hours, 50% of the water was changed, taking care to keep the initial cellular density of the microalga in the green-water treatment. Temperature and pH were recorded daily and the organic matter and dead larvae were siphoned off to keep the system clean. At the end of the experiment, a final count was taken and 30% of the larvae that had survived were sampled. Total length was recorded, as well as the stage of development according to the classification of Zúñiga and Acuña (1992). A quality test was also made that consisted of removing a group of larvae from the water for 30 seconds, then returning them to the tank and, after 24 hours, recording the mortality among them.

The results of each treatment were compared with a one-way analysis of variance (ANOVA) with a confidence interval of 95%, followed by Tukey's multiple comparison test. Arcsine (survival data) or natural logarithm (length data) transformations were made prior to the analysis when the variances were not homogeneous.

**Tabla 1.** Composición promedio (mg/g de peso seco) de EPA, DHA, sumatoria (n-3) HUFA y relación DHA/EPA en rotíferos enriquecidos con *Isochrysis galbana* y DHA Selco durante 12 horas. Desviación estándar (SD) de dos muestras.

**Table 1.** Average composition (mg/g dry weight) of EPA, DHA, sum (n-3) HUFA and DHA/EPA ratio in rotifers enriched with *Isochrysis galbana* and DHA Selco for 12 hours. Standard deviation (SD) of two samples.

	EPA ± SD	DHA ± SD	Sum (n-3) HUFA ± SD	Relación DHA/EPA
Rotífero- <i>I.g.</i>	15.0 ± 0.21	20.0 ± 1.4	39.1 ± 0.56	1.33
Rotífero-DHA	12.1 ± 0.9	25.2 ± 0.2	42.3 ± 1.3	2.08

sometió a una prueba de calidad, consistente en mantener fuera del agua a un grupo de larvas por 30 segundos, para luego regresarlas al tanque y después de 24 horas registrar la mortalidad existente entre ellas.

Para la comparación de los resultados obtenidos por cada tratamiento, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, utilizando un nivel de confianza de 95%, seguido por una prueba de comparación múltiple de Tukey. Transformaciones de arcoseno (datos de supervivencia) o logaritmo natural (datos de longitud) fueron hechos antes del análisis cuando las varianzas no eran homogéneas.

## RESULTADOS

La tabla 1 muestra los resultados de los niveles de (n-3) HUFA, EPA y DHA contenidos en los rotíferos enriquecidos utilizando los métodos ya señalados. Los niveles alcanzados son en general altos, tanto para la sumatoria de los (n-3) HUFA como los alcanzados por EPA y DHA, respecto a los citados por otros autores en la literatura (Lubzens *et al.*, 1985; Fernández-Reirez y Labarta, 1996), lo que asegura un buen nivel de los ácidos grasos considerados esenciales y necesarios para el desarrollo de las larvas de peces marinos en general.

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos después de 20 días de experimentación, durante

## RESULTS

Table 1 shows the levels of (n-3) HUFA, EPA and DHA in the enriched rotifers. The levels of sum (n-3) HUFA and EPA and DHA are in general high, with respect to those cited by other authors in the literature (Lubzens *et al.*, 1985; Fernández-Reirez and Labarta, 1996). This indicates an appropriate level of essential fatty acids necessary for the development of marine fish larvae.

Table 2 shows the results obtained after 20 days of the experiment, during which time temperature ranged from a minimum of 16.1°C to a maximum of 18.8°C and pH from 8.1 to 8.3, indicating stable water quality of the treatments.

Even though the average survival for the AC-R-DHA larvae (58.3%) was good, it was notably lower and significantly different ( $P \leq 0.05$ ) from that for the AC-R-IG (70.7%) and AV-R-DHA larvae (70.8%); however, no significant differences ( $P \leq 0.05$ ) were observed between the latter two treatments. The averages of total length ( $9.09 \pm 0.07$ ) and daily growth (0.09 mm) of the larvae in the AC-R-DHA treatment at the end of the experiment were greater and significantly different ( $P \leq 0.05$ ) from those of the AC-R-IG and AV-R-DHA treatments; no significant differences were observed between the latter two treatments.

**Tabla 2.** Supervivencia (S), longitud total (LT), estado de desarrollo, prueba de calidad (PC) e incremento diario (ID) de larvas de lenguado *Paralichthys adspersus* en diferentes tratamientos entre los 18 y 38 días de edad. Pre-F = preflexión tardía, flex. = flexión, post-F = postflexión temprana y MT = metamorfosis temprana.

**Table 2.** Survival (S), total length (LT), stage of development, quality test (PC) and daily increase (ID) of the flounder *Paralichthys adspersus* larvae in different treatments between 18 and 38 days of age. Pre-F = late preflexion, flex = flexion, post-F = early postflexion and MT = early metamorphosis.

Tratamiento	Tanque No.	S %	LT mm (SD)	Estado de desarrollo				PC %S	ID mm
				Pre-F	Flex.	Post-F	MT		
<b>A</b>									
AC-R-IG	E3	67.2	10.05 (1.29)	7.8	21.1	71.1	0.0	90.2	0.14
	E4	72.4	10.01 (0.87)	5.2	20.7	74.1	0.0	90.9	0.14
	E6	72.6	9.71 (1.03)	6.1	21.3	70.3	2.3	90.1	0.12
Promedio		70.7	9.92 (0.18)	6.4	21.0	71.8	2.3	90.4	0.13
<b>B</b>									
AC-R-DHA	E1	56.8	9.10 (0.82)	10.0	53.6	36.4	0.0	86.9	0.09
	E5	60.2	9.16 (0.87)	10.4	47.9	41.7	0.0	85.2	0.10
	E9	58.0	9.01 (1.02)	5.1	38.5	56.4	0.0	86.7	0.09
Promedio		58.3	9.09 (0.07)	8.5	46.7	44.8	0.0	86.3	0.09
<b>C</b>									
AV-R-DHA	E2	67.8	10.11 (1.42)	5.8	20.3	73.9	0.0	93.3	0.14
	E7	71.2	9.95 (1.05)	7.3	19.8	72.9	0.0	91.7	0.14
	E8	73.4	9.67 (0.96)	5.6	20.8	72.0	1.6	93.7	0.12
Promedio		70.8	9.91 (0.22)	6.2	20.3	72.9	1.6	92.9	0.13

los cuales las temperaturas oscilaron entre 16.1°C, la mínima, y 18.8°C, la máxima, y el pH entre 8.1 y 8.3, esto último reflejando una estabilidad en la calidad del agua en todos los tratamientos.

La supervivencia promedio obtenida para las larvas AC-R-DHA (58.3%), aunque buena, fue notoriamente menor y significativamente diferente ( $P \leq 0.05$ ) a la alcanzada por las larvas AC-R-IG (70.7%) y AV-R-DHA (70.8%); no se

The same trend is observed in the developmental stages. There is a significantly greater proportion of larvae in the postflexion phase in the AC-R-IG (71.8%) and AV-R-DHA (72.9%) treatments than in the AC-R-DHA (44.8%) treatment. There were no significant differences ( $P \leq 0.05$ ) between the AC-R-IG and AV-R-DHA treatments in the developmental stages of the larvae.

detectaron, sin embargo, diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre estos dos últimos tratamientos. De igual forma, los promedios de longitud total ( $9.09 \pm 0.07$ ) e incremento diario (0.09 mm) alcanzados por las larvas del tratamiento AC-R-DHA al final de la experiencia, fueron menores y muestran diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) con los alcanzados en los tratamientos AC-R-IG y AV-R-DHA, no detectándose tampoco diferencias significativas entre estos últimos tratamientos.

En términos de los estados de desarrollo se muestra la misma tendencia. Existe significativamente una mayor proporción de larvas en estado de postflexión en los tratamientos AC-R-IG (71.8%) y AV-R-DHA (72.9%) respecto al de AC-R-DHA (44.8%), y no se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en el desarrollo de las larvas entre los tratamientos AC-R-IG y AV-R-DHA.

Analizando los datos de la prueba de calidad, se detectaron diferencias significativas entre los tres tratamientos ( $P \leq 0.05$ ), obteniéndose la mejor calidad de larvas en el tratamiento AV-R-DHA (92.9%), en segundo lugar en el tratamiento AC-R-IG (90.4%) y en tercer lugar en el tratamiento AC-R-DHA (86.3%).

## DISCUSIÓN

El presente trabajo confirma que el uso de la microalga *I. galbana*, ya sea como parte del medio de cultivo (agua verde) o como fuente de enriquecimiento de los rotíferos usados como alimento, mejora significativamente el rendimiento del cultivo larval de *P. adspersus* en términos de supervivencia, crecimiento, desarrollo y calidad de las larvas, respecto a su ausencia total del sistema (agua clara) o el uso de DHA Selco como enriquecedor. Estos resultados concuerdan con lo descrito para halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) por Naas *et al.* (1992), para turbot (*Scophthalmus maximus*) por Reitan *et al.* (1993) y Oie *et al.* (1997), y para lenguado (*Paralichthys microps*) por Silva *et al.* (1996).

Numerosos estudios han demostrado la importancia de los HUFA, especialmente del tipo

Significant differences were observed in the quality test among the three treatments ( $P \leq 0.05$ ). The best quality larvae were obtained in the AV-R-DHA treatment (92.9%), followed by the AC-R-IG treatment (90.4%) and the AC-R-DHA treatment (86.3%).

## DISCUSSION

This work confirms that the microalga *I. galbana*, either as part of the culture medium (green water) or as a source of enrichment for the rotifers used as feed, significantly improves the yield in the culture of *P. adspersus* larvae in terms of survival, growth, development and larval quality, compared to their total absence (clear water) or DHA Selco enrichment. These results concur with those described for halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) by Naas *et al.* (1992), for turbot (*Scophthalmus maximus*) by Reitan *et al.* (1993) and Oie *et al.* (1997), and for flounder (*Paralichthys microps*) by Silva *et al.* (1996).

Many studies have reported the importance of HUFA, especially n-3, and the need to maintain high levels of DHA and EPA and the DHA/EPA ratio for successful growth and survival in the culture of marine fish larvae (Watanabe, 1982; Kanazawa, 1985; Bell *et al.*, 1985; Izquierdo *et al.*, 1989; Koven *et al.*, 1992). It has been shown that enrichment and microalgae have a direct and positive effect on the nutritional quality and fatty acid profile of the rotifers (Oie *et al.*, 1994; Reitan *et al.*, 1997). The latter is confirmed by the initial high levels of fatty acids (n-3 HUFA, EPA, and DHA) in the rotifers used in this study. Reitan *et al.* (1993) and Oie *et al.* (1997) indicate that rotifers kept in clear-water culture tanks have lower levels of protein and lose between 19 and 20% of their original lipidic content daily, and that the levels of (n-3) HUFA and the DHA/EPA ratio decrease at a rate of 7% per day. On the other hand, if a microalga is added to the tank, the rotifers tend to maintain or modify their composition, depending on the microalga. Thus, even though the rotifers used in the treatments initially show high levels of (n-3) HUFA and especially

n-3, así como la necesidad de mantener altos niveles de DHA y EPA y la relación DHA/EPA, para el éxito del crecimiento y supervivencia en el cultivo larval de peces marinos (Watanabe, 1982; Kanazawa, 1985; Bell *et al.*, 1985; Izquierdo *et al.*, 1989; Koven *et al.*, 1992). Por otro lado, se ha comprobado que el uso de enriquecedores y microalgas influye directa y positivamente en la calidad nutricional y el perfil de ácidos grasos contenidos en los rotíferos (Oie *et al.*, 1994; Reitan *et al.*, 1997), esto último corroborado en los altos niveles de ácidos grasos (n-3 HUFA, EPA y DHA) que alcanzan inicialmente los rotíferos utilizados en esta experiencia. Por su parte, Reitan *et al.* (1993) y Oie *et al.* (1997) señalan que los rotíferos retenidos en los tanques de cultivo con agua clara bajan los niveles proteicos y pierden diariamente entre 19 y 20% de su contenido lipídico original, disminuyendo los niveles de (n-3) HUFA y los valores de la relación DHA/EPA a razón de 7% por día. En cambio, si es agregada la microalga a los estanques de cultivo, los rotíferos retenidos tienden a mantener o modificar su constitución dependiendo de la microalga presente. Por tanto, si bien todos los rotíferos utilizados en los tratamientos muestran inicialmente altos niveles de (n-3) HUFA y especialmente DHA, comprobando que el producto DHA Selco y la microalga *I. galbana* son ricos en estos compuestos (Lubzens *et al.*, 1985; Ben-Amotz *et al.*, 1987; Whyte *et al.*, 1994), después de algunas horas los rotíferos retenidos en los tanques de cultivo larval mantienen o pierden parte de las proteínas y lípidos y modifican su perfil original de los ácidos grasos esenciales adquiridos, dependiendo de la presencia o ausencia de *I. galbana* en los tanques de cultivo larval.

Así entonces, las diferencias detectadas entre las larvas con y sin microalgas en el medio (tratamientos AV-R-DHA y AC-R-DHA) están dadas básicamente por la diferencia nutricional que presentan las presas en ambos medios de cultivo, de acuerdo con el tiempo que tardan en ser consumidas, sin que se pueda descartar los posibles efectos positivos de la modificación de la flora bacteriana en los rotíferos y larvas que ejerce la

DHA, which proves that the DHA Selco product and the microalga *I. galbana* are rich in these compounds (Lubzens *et al.*, 1985; Ben-Amotz *et al.*, 1987; Whyte *et al.*, 1994), after a few hours the rotifers either maintain or lose part of the proteins and lipids and modify their original essential fatty acid profile, depending on the presence or absence of *I. galbana* in the larval culture tanks.

Therefore, the differences detected in the larvae either with or without the microalga in the medium (AV-R-DHA and AC-R-DHA treatments) are basically due to different nutritional values of the prey in both culture mediums, with respect to the time it takes for them to be consumed; however the possible positive effects due to changes in the bacterial flora of the rotifers and larvae produced by the microalga cannot be ignored (Reitan *et al.*, 1997). The differences noted for all the parameters between the AC-R-DHA and AC-R-IG treatments (both clear-water treatments, the only distinction being the use of *I. galbana* for rotifer enrichment) suggest that this microalga is capable of transmitting a more stable and/or complete nutritional profile (proteins, lipids, vitamins) than the commercial product for the culture of flounder larvae; however, this should be more thoroughly researched. The effect of the microalga on the nutritional quality of the rotifer, rather than changes in the bacterial flora and water quality of the culture (Nicolas *et al.*, 1989) or light that helps the larvae detect prey in the medium (Nass *et al.*, 1992), is confirmed by the similar results obtained with the AC-R-IG (*I. galbana* used for enrichment) and AV-R-DHA (*I. galbana* used in the culture medium) treatments. The only significant difference is found in the quality of the larvae, characteristic that has recently been related to the greater presence of DHA and phospholipids in the diet (Kanazawa, 1997). Taking into consideration that the presence of *I. galbana* in the culture medium assures stability, in particular high levels of DHA in the rotifers (Reitan *et al.*, 1993), it is possible to assume that the level of DHA has an important effect on the viability or final quality of the flounder larvae



presencia de microalgas (Reitan *et al.*, 1997). Al mismo tiempo, las diferencias anotadas en todos los parámetros examinados entre los tratamientos AC-R-DHA y AC-R-IG, ambos mantenidos en agua clara y cuya diferencia estriba solamente en el uso de *I. galbana* como enriquecedor de los rotíferos, sugiere que esta microalga es capaz de transmitir al rotífero un perfil nutritivo (proteínas, lípidos, vitaminas) más estable y/o más completo que el producto comercial para la cría de la larva de lenguado, lo cual debe ser más ampliamente investigado. El efecto de la microalga en la calidad nutricional del rotífero, más que en la modificación de la flora bacteriana y calidad del agua de cultivo (Nicolas *et al.*, 1989), o la modificación lumínica del medio que permitiría una mejor detección de la presa por las larvas (Naas *et al.*, 1992), se ve corroborado por la similitud de los resultados obtenidos entre los tratamientos AC-R-IG (*I. galbana* utilizada como enriquecedor) y AV-R-DHA (*I. galbana* utilizada en el medio de cultivo), cuya única diferencia significativa observada se encuentra en el ítem calidad de larvas, característica que ha sido relacionada recientemente con la mayor presencia de DHA y fosfolípidos en la dieta (Kanazawa, 1997). En este sentido y considerando que la presencia de *I. galbana* en el medio de cultivo asegura la estabilidad especialmente de altos niveles de DHA en el rotífero presente (Reitan *et al.*, 1993), es posible suponer un importante efecto del nivel de DHA sobre la viabilidad o la calidad final de las larvas de lenguado.

Los resultados obtenidos permiten recomendar el uso del sistema de agua verde para mejorar la producción y viabilidad de las larvas tempranas de lenguado *P. adspersus*. Al mismo tiempo se hace preciso llevar a cabo estudios más profundos referentes a la cuantificación de las necesidades reales de ácidos grasos para el cultivo larval de *P. adspersus* y el comportamiento, interacción y estabilidad de los ácidos grasos entre alimento, la presa y las larvas, con el objeto de lograr un mejor entendimiento del papel de las microalgas en el sistema de cultivo en agua verde.

Based on the results obtained, the green-water system is recommended to improve the production and viability of early larvae of the flounder *P. adspersus*. However, more studies are needed to determine the precise fatty acid requirements for the culture of *P. adspersus* larvae, as well as the behavior, interaction and stability of the fatty acids in the food, prey and larvae, in order to achieve a better knowledge of the role microalgae have in the green-water culture system.

English translation by Jennifer Davis.

---

## REFERENCIAS

- Bell, M.V., Henderson, R.J., Pirie, B.J.S. and Sargent, J.R. (1985). Effects of dietary polyunsaturated fatty acid deficiencies on mortality, growth and gill structure in the turbot, *Scophthalmus maximus*. *J. Fish Biol.*, 26: 181–191.
- Ben-Amotz, A., Fishler, R. and Schneller, A. (1987). Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. *Mar. Biol.*, 95: 31–36.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Comp. Biochem. Physiol.*, 37: 911–917.
- Fernández-Reirez, M.J. and Labarta, U. (1996). Lipid classes and fatty acid composition of rotifers (*Brachionus plicatilis*) fed two algal diets. *Hydrobiologia*, 330: 73–79.
- Gatesoupe, F.J. (1990). The continuous feeding of turbot larvae *Scophthalmus maximus* and control of the bacterial environment of rotifers. *Aquaculture*, 89: 139–148.
- Izquierdo, M.S., Watanabe, T., Takeuchi, T., Arakawa, T. and Kitajima, C. (1989). Requirement of larval sea bream *Pagrus major* for essential fatty acids. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 859–867.
- Kanazawa, A. (1985). Essential fatty acid and lipid requirements of fish. In: C.B. Cowey, A.M. Mackie and J.G. Bell (eds.), *Nutrition and Feeding in Fish*. Academic Press, London, pp. 232–281.
- Kanazawa, A. (1997). Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. *Aquaculture*, 155: 129–134.

- Koven, W.M., Tandler, A., Kissil, G.W. and Sklan, D. (1992). The importance of w3 highly unsaturated fatty acids for growth in larvae *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. *Aquaculture*, 104: 91–104.
- Lubzens, E., Marko, A. and Tietz, A. (1985). De novo synthesis of fatty acids in the rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 47: 27–37.
- Naas, K.E., Naess, T. and Harboe, T. (1992). Enhanced first feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in green water. *Aquaculture*, 105: 143–156.
- Nicolas, J.L., Robic, E. and Ansquer, D. (1989). Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture*, 83: 237–248.
- Oie, G., Reitan, K.I. and Olsen, Y. (1994). Comparison of rotifer culture quality with yeast plus oil and algal based cultivation diets. *Aquacult. Int.*, 2: 225–238.
- Oie, G., Makridis, P., Reitan, K.I. and Olsen, Y. (1997). Protein and carbon utilization of rotifers (*Brachionus plicatilis*) in first feeding of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 153: 103–122.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I. and 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.I., Rainuzzo, J.R., Oie, G. and Olsen, Y. (1993). Nutritional effects of algal addition in first feeding of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture*, 118: 257–275.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R. and Olsen, Y. (1994). Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. *Aquacult. Int.*, 2: 33–48.
- Reitan, K.J., Rainuzzo, J.R., Oie, G. and Olsen, Y. (1997). A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture*, 155: 207–221.
- Silva, A., Martínez, D., Gracia, V. y Castelló, F. (1996). Antecedentes preliminares sobre el uso de microalgas “green water” en el cultivo temprano de larvas de lenguado chileno *Paralichthys microps* (Gunther, 1881). En: A. Silva y G. Merino (eds.), *Acuicultura en Latinoamérica*. Univ. Católica del Norte, Asoc. Latinoamericana de Acuicultura, Coquimbo, Chile, pp. 357–361.
- Uribe, E. (1992). Cultivo de microalgas. En: Programa de Cooperación Técnica, Chile-Japón (eds.), 5to Curso Internacional en Cultivo de Moluscos. Univ. Católica del Norte, Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA), pp. 39–81.
- Watanabe, T. (1982). Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B: 3–15.
- Whyte, J.N.C., Clarke, W.C., Ginther, N.G., Jensen, J.O.T. and Townsend, L.D. (1994). Influence of composition of *Brachionus plicatilis* and *Artemia* on growth of larval sablefish (*Anoplopoma fimbria* Pallas). *Aquaculture*, 119: 47–61.
- Zúñiga, H. and Acuña, E. (1992). Larval development of two sympatric flounder *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) and *Paralichthys microps* (Gunther, 1881) from the Bay of Coquimbo, Chile. *Fish. Bull.*, 90: 607–620.