

**HUFA CONTENT AND DHA/EPA IMPROVEMENTS OF
Brachionus plicatilis FOR SEA BREAM (*Sparus aurata*) LARVAE**

**CONTENIDO DE HUFA Y MEJORAMIENTO EN LA DHA/EPA DE
Brachionus plicatilis PARA LARVAS DE PARGO DORADO (*Sparus aurata*)**

P. Pousão-Ferreira¹
O. Luís²
A. Passos²
L. Narciso²⁺

¹ IPIMAR/CIMSul
Av. 5 de Outubro s/n
87000 Olhão, Portugal

² Departamento de Zoologia e Antropologia
Faculdade de Ciências
Universidade de Lisboa
Laboratório Marítimo da Guia Estrada do Guincho
2750 Cascais, Portugal

Recibido en junio de 1997; aceptado en abril de 1998

ABSTRACT

The relative concentration of n-3 and n-6 fatty acids and the DHA/EPA ratio are important factors in the survival and growth of marine larvae. The main objective of the present work was to compare the fatty acid content of one-day post-hatch sea bream larvae with the fatty acid content of several dietary enrichment products (*Chlorella* sp., Protein Selco and Super Rotifer) and *Brachionus plicatilis* after enrichment. Generally, enriched *B. plicatilis* are added to larval culture tanks and they remain the only source of nutrients for up to 12 h. It was therefore decided to also study the fatty acid profile of *B. plicatilis* 3, 6 and 24 h after enrichment. Some of the enrichment products were found to have a higher HUFA content than the sea bream larvae, but the ratio of DHA/EPA was always inferior. *Brachionus plicatilis* was rapidly depleted in HUFA 3 and 6 h after enrichment and after 24 h, *B. plicatilis* could not be considered enriched.

Key words: *Sparus aurata*, *Brachionus plicatilis*, enrichment, HUFA, DHA/EPA.

RESUMEN

La concentración relativa de los ácidos grasos n-3 y n-6 y la razón DHA/EPA son factores importantes para la supervivencia y crecimiento de larvas marinas. El objetivo del presente estudio fue comparar el contenido de ácidos grasos en larvas de pargo dorado de un día de edad con el contenido de ácidos grasos de varios productos alimenticios de enriquecimiento (*Chlorella* sp., Protein Selco y Super Rotifer) y con *Brachionus plicatilis* después de enriquecimiento. Generalmente, se añaden *B. plicatilis* enriquecidos a los tanques de cultivo larvario y son la única fuente de nutrientes por hasta 12 h. Por tal motivo, se decidió analizar el perfil de ácidos grasos de *B. plicatilis* 3, 6 y 24 h después de enriquecimiento. Se encontró que algunos de los productos de enriquecimiento presentaron un

+ Corresponding author.

contenido de HUFA mayor que el de las larvas de pargo dorado, pero la razón de DHA/EPA siempre fue menor. El HUFA se redujo rápidamente en *B. plicatilis* 3 y 6 h después de enriquecimiento y después de 24 h, no se podía considerar a *B. plicatilis* como enriquecido.

Palabras clave: *Sparus aurata*, *Brachionus plicatilis*, enriquecimiento, HUFA, DHA/EPA.

INTRODUCTION

Aquatic organisms have high requirements for long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFA) and, in marine fishes, fatty acids of the n-3 series are considered to be essential. In mammals and other homeothermic animals the fatty acids of both the n-3 and n-6 series are considered essential, but the latter have been proposed as the most important (Watanabe, 1987, 1988).

In the larviculture of sea bream, *Sparus aurata*, and the majority of marine fishes, it is necessary to produce live feeds, such as the rotifer *Brachionus plicatilis* and the branchiopod *Artemia* sp. Although these organisms have good morphological and physiological characteristics, they present quantitative and qualitative nutritional deficiencies in highly unsaturated fatty acids (HUFA; $C \geq 20$). Both eicosapentaenoic acid (EPA; 20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3), which are essential for cell membranes and as a source of energy in the sea bream larvae, are present in very low concentrations (Castell *et al.*, 1986; Koven *et al.*, 1992, 1993; Mourente *et al.*, 1993; Ibeas *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1994a, b; Salhi *et al.*, 1994).

Since rotifer and branchiopods are non-selective filter feeders, it is possible to manipulate their nutritional composition through enrichment. By combining various enrichment products and using different enrichment regimes it is possible to generate live feeds with different fatty acid compositions and concentrations (Sorgeloos, 1995). The enriched feed is generally introduced into culture tanks and the larvae feed on them throughout the day, suggesting it may be important to characterize the nutritional alteration in enriched live prey as they reside in the culture tanks. By characterizing the nutritional requirements of sea bream larvae and developing enrichment regimes for live food (*Brachionus* sp. and

INTRODUCCIÓN

Los organismos acuáticos requieren ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de cadena larga y, para los peces marinos, los ácidos grasos de la serie n-3 se consideran esenciales. Para los mamíferos y otros animales homeotérmicos, los ácidos grasos de las series n-3 y n-6 son esenciales, pero se ha propuesto que la n-6 es la más importante (Watanabe, 1987, 1988).

Para la larvicultura de pargo dorado, *Sparus aurata*, y la mayoría de los peces marinos, es necesario producir alimentos vivos, tales como el rotífero *Brachionus plicatilis* y el branquiópodo *Artemia* sp. A pesar de que estos organismos poseen características morfológicas y fisiológicas adecuadas, presentan deficiencias cuantitativas y cualitativas nutritivas en ácidos grasos altamente insaturados (HUFA; $C \geq 20$). Tanto el ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3) como el ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3), que son esenciales para las membranas de las células y como fuente de energía en las larvas de pargo dorado, se presentan en concentraciones muy bajas (Castell *et al.*, 1986; Koven *et al.*, 1992, 1993; Mourente *et al.*, 1993; Ibeas *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1994a, b; Salhi *et al.*, 1994).

Ya que los rotíferos y los branquiópodos son filtradores no específicos, es posible manipular su composición nutritiva a través de enriquecimiento. Al combinar varios productos de enriquecimiento así como utilizar diferentes regímenes de enriquecimiento, se pueden generar alimentos vivos con composiciones y concentraciones diferentes de ácidos grasos (Sorgeloos, 1995). Generalmente, se introduce el alimento enriquecido al tanque de cultivo y las larvas se alimentan de él durante el día, por lo que es importante caracterizar la alteración nutritiva de las presas vivas enriquecidas mientras permanecen en los tanques de cultivo. Con la caracterización de los requisitos nutritivos de las larvas de pargo dorado y el

Artemia sp.), it should be possible to optimize the nutrition of each larval stage.

MATERIAL AND METHODS

Mass production of *B. plicatilis* was carried out in 500-L conical tanks at 20‰ salinity and a temperature of 26°C. They were cultured in baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), which is poor in PUFA (20:5n-3 and 22:6n-3), filtered, washed and bioencapsulated according to requirements. Three enrichment products for the rotifers were used: marine *Chlorella* sp. and two commercial emulsions, Protein Selco and Super Rotifer. The enrichment was carried out in 250-L conical tanks with strong aeration from the bottom. During the enrichment procedure (table 1), the physical and chemical conditions were maintained constant for all the production tanks.

Brachionus plicatilis were fed twice daily (enrichment treatments 1 and 2) with Protein Selco (125 mg/L, 500 rotifer/mL tank volume) and Super Rotifer (40 mg/L, 200 rotifer/mL tank volume). To mimic the alteration in their composition with time, *B. plicatilis* were enriched as normal and then starved for 3, 6 and 24 h; samples were then removed and stored at -70°C until analysis. When enrichment was carried out twice daily, for practical reasons the doses were given at 1800 and 0600 h.

Fertilized eggs, collected from naturally spawning *S. aurata*, were placed in 200-L cylindrical tanks containing gently aerated seawater, at 19 ± 1°C, until hatching. Hatched sea bream were collected and pooled to give samples of 1.0 g and stored frozen at -70°C until fatty acid analysis. The fatty acid profile of these larvae served as a reference against which the fatty acid composition of the *B. plicatilis* and enrichment products were compared.

The samples used for fatty acid analysis were freeze dried and then ground in a homogenizer with chloroform/methanol/water (2/2/1.8) (Bligh and Dyer, 1959); an internal standard C19:0 fatty acid was included in the extracts. The extracted material was subjected to saponification and esterification using the procedure described by Metcalfe and Schmitz (1961), and the resulting fatty acid methyl esters (FAME)

desarrollo del régimen de enriquecimiento para el alimento vivo (*Brachionus* sp. y *Artemia* sp.), debería ser posible optimizar la alimentación de cada etapa larvaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

La producción masiva de *B. plicatilis* se realizó en tanques cónicos de 500 L, con una salinidad de 20‰ y temperatura de 26°C. Se cultivaron en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), que es baja en PUFA (20:5n-3 y 22:6n-3), y se filtraron, lavaron y bioencapsularon según las necesidades. Se utilizaron tres productos de enriquecimiento para los rotíferos: *Chlorella* sp. marino y dos emulsiones comerciales, Protein Selco y Super Rotifer. El enriquecimiento se llevó a cabo en tanques cónicos de 250 L, con una fuerte aeración desde el fondo. Las condiciones físicas y químicas se mantuvieron constantes para todos los tanques de producción durante el procedimiento de enriquecimiento (tabla 1).

Se alimentaron *B. plicatilis* dos veces al día (tratamientos de enriquecimiento 1 y 2) con Protein Selco (125 mg/L, 500 rotíferos/mL de volumen de tanque) y Super Rotifer (40 mg/L, 200 rotíferos/mL de volumen de tanque). Para imitar la alteración en su composición con el tiempo, se enriquecieron *B. plicatilis* normalmente y luego se les privó de alimento durante 3, 6 y 24 h. Se recolectaron las muestras y se almacenaron a -70°C hasta su análisis. Por razones prácticas, cuando se realizó el enriquecimiento dos veces al día, las dosis se dieron a las 1800 y 0600 h.

Se colocaron huevos fertilizados recolectados de desoves naturales de *S. aurata* en tanques cilíndricos de 200 L que contenían agua de mar, con una suave aeración, a 19 ± 1°C, hasta su eclosión. Los pargos dorados eclosionados se recolectaron y agruparon para lograr muestras de 1.0 g y se almacenaron congelados a -70°C hasta el análisis de ácidos grasos. El perfil de los ácidos grasos de estas larvas se usó como referencia en la comparación de la composición de los ácidos grasos de *B. plicatilis* y los productos de enriquecimiento.

Las muestras utilizadas para el análisis de ácidos grasos se deshidrataron por congelación

Table 1. *Brachionus plicatilis* enrichment methods.**Tabla 1.** Métodos de enriquecimiento para *Brachionus plicatilis*.

Product	Density (rotifer/mL)	Dose	No. of doses	Duration (h)
<i>Chlorella</i> sp.	<350	>30 × 10 ⁶ cell/mL	1	18
Super Rotifer	<200	0.04 g/L	2	4, 6, 8 and 18
Protein Selco	<500	0.125 g/L	2	4, 6, 8 and 18

were injected into a capillary column (30 m fused silica, 0.32 ID) installed in a Varian Star 3400CX gas-liquid chromatograph. Helium was used as carrier gas, at a flow rate of 1 mL/min; oven temperature was 180°C for 7 min, then 200°C (with a temperature gradient of 4°C/min) over a period of 71 min. Both the injector and FID detector were set at 250°C. Peak quantification was carried out with a Star chromatography workstation installed in an IBM PS/1.

RESULTS AND DISCUSSION

The concentration of the principal fatty acids measured in enriched *B. plicatilis*, enrichment products alone and one-day post-hatch (DPH) sea bream larvae, is shown in figure 1. The PUFA composition (20:4n-6, 20:5n-3 and 22:6n-3) of *Chlorella* sp. was significantly lower than that observed in sea bream larvae. In contrast, Protein Selco and Super Rotifer were notably higher in all the fatty acids analysed. Figure 2 demonstrates the degree of enrichment of *B. plicatilis* achieved when cultured in the presence of Protein Selco or Super Rotifer for different lengths of time.

The effect of starvation of rotifers after enrichment is shown in figure 3 and clearly demonstrates that after 3 h the rotifer PUFA content has decreased significantly. The results of the present study show that the feeding regimes currently used may not be the most adequate, as 3-h post-enrichment *B. plicatilis* are greatly depleted in fatty acids. Such alterations in the fatty acid composition are clearly an important factor to consider when developing larval feeding regimes. Although enrichment procedures are generally considered

y luego se trituraron en un homogeneizador con cloroformo/metanol/agua (2/2/1.8) (Bligh y Dyer, 1959). Se incluyó en los extractos un estándar interno del ácido graso C19:0. El material extraído fue sujeto a saponificación y esterificación utilizando el método descrito por Metcalfe y Schmitz (1961), y los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME) resultantes fueron inyectados en una columna capilar (30 m de sílica fundida, 0.32 DI), instalada en un cromatógrafo de gas-líquido Varian Star 3400CX. Se utilizó helio como el gas transportador, a una razón de flujo de 1 mL/min; la temperatura del horno fue de 180°C durante 7 min, hasta 200°C (con un gradiente de temperatura de 4°C/min), durante un periodo de 71 min. Tanto el inyector como el detector FID se establecieron a 250°C. La cuantificación de los picos se realizó con una estación de trabajo de cromatografía Star instalada en una IBM PS/1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra la concentración de los ácidos grasos principales medidos en *B. plicatilis* enriquecido, sólo en los productos de enriquecimiento y en las larvas de pargo dorado de un día de edad. La composición de PUFA (20:4n-6, 20:5n-3 y 22:6n-3) de *Chlorella* sp. fue significativamente menor que la observada en las larvas de pargo dorado. Sin embargo, Protein Selco y Super Rotifer fueron notablemente mayores en todos los ácidos grasos analizados. La figura 2 muestra el grado de enriquecimiento logrado para *B. plicatilis* cuando se cultiva en presencia de Protein Selco o Super Rotifer durante diferentes periodos de tiempo.

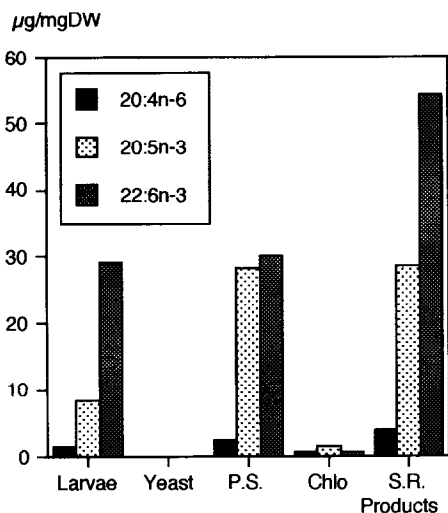


Figure 1. Comparison of the PUFA composition of larvae and products used to enrich *Brachionus plicatilis*. P.S. = Protein Selco; Chlo = *Chlorella* sp.; S.R. = Super Rotifer.

Figura 1. Comparación de la composición de PUFA de las larvas y productos utilizados para enriquecer *Brachionus plicatilis*. P.S. = Protein Selco; Chlo = *Chlorella* sp.; S.R. = Super Rotifer.

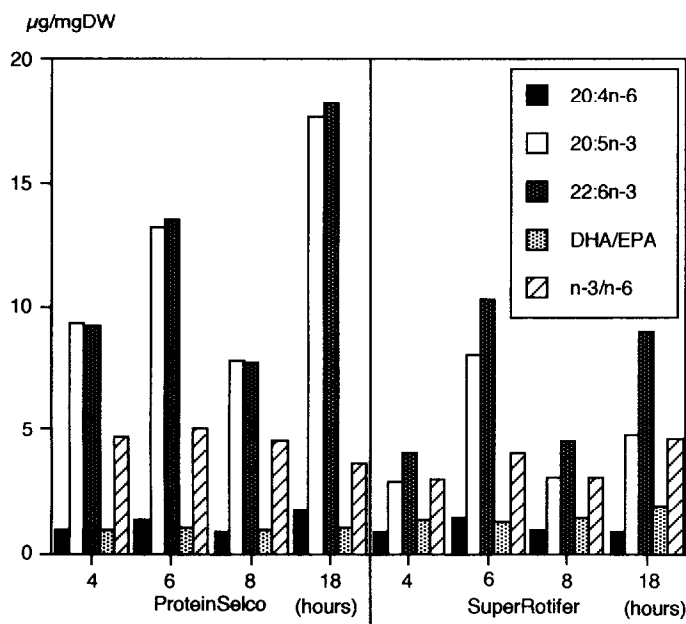


Figure 2. The effect of the enrichment period of *Brachionus plicatilis* with the two commercial products, Protein Selco and Super Rotifer, used in the study.

Figura 2. Efecto del periodo de enriquecimiento de *Brachionus plicatilis* con los dos productos comerciales, Protein Selco y Super Rotifer, utilizados en este estudio.

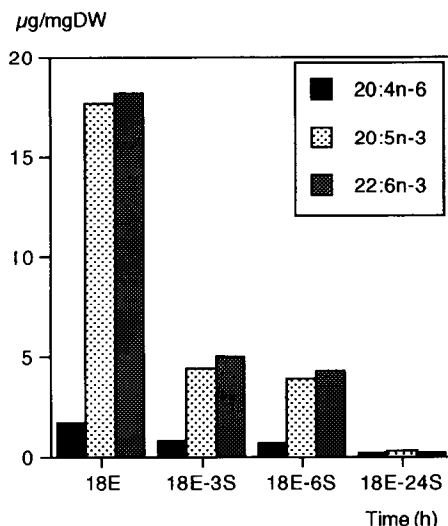


Figure 3. Alteration in PUFA of *Brachionus plicatilis* enriched for 18 h with Protein Selco after 0, 3, 6 and 24 h of starvation.

Figura 3. Alteración de PUFA en *Brachionus plicatilis* enriquecido durante 18 h con Protein Selco después de 0, 3, 6 y 24 h de inanición.

straightforward, it is clear from the present study that greater attention should be paid to developing the correct enrichment schedule and controlling the post-enrichment nutritional profile of *B. plicatilis*.

The present study will allow development of optimized feeding schedules which take into account the composition and assimilation of *B. plicatilis* and their PUFA retention ratios. From the results we can conclude that at the beginning of the first enrichment treatment, *B. plicatilis* initially incorporate essential PUFAs; however, 6 h after enrichment is initiated, the fatty acid composition starts to decline until the second enrichment treatment is initiated when there is an abrupt increase in the profile of fatty acids detected (fig. 2). There is a radical alteration in the fatty acid composition of *B. plicatilis* when they are subjected to starvation and as little as 3 h starvation is sufficient to produce a highly significant reduction in their PUFA composition, rendering them inadequate as a food for *S. aurata* larvae. Indeed, in a previous study we demonstrated that the fatty acid

El efecto de inanición después de enriquecimiento se muestra en la figura 3. Se aprecia claramente que después de 3 h, el contenido de PUFA del rotífero ha disminuido significativamente. Los resultados del presente estudio indican que los regímenes de alimentación utilizados actualmente posiblemente no sean los más apropiados, ya que 3 h después del enriquecimiento se presenta una reducción notable en los ácidos grasos de *B. plicatilis*. Estas alteraciones en la composición de los ácidos grasos son factores importantes y se deben considerar en el desarrollo de los regímenes alimenticios larvarios. A pesar de que los procedimientos de enriquecimiento generalmente se consideran simples, este estudio demostró que se debe poner más atención en el desarrollo del régimen de enriquecimiento y en controlar el perfil nutritivo de *B. plicatilis* después del enriquecimiento.

El presente estudio permitirá desarrollar regímenes de alimentación óptimos que consideren la composición y asimilación de *B. plicatilis*, así como sus razones de retención de

profile is correlated with the composition of the enrichment diet (Pousão-Ferreira *et al.*, 1997), emphasizing the importance of feed enrichment regimes and enrichment product composition and the larval feeding regimes in successful marine larval culture.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the contributions of NATO for stability (PO Sea bream).

REFERENCES

- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911–917.
- Castell, J.D., Conklin, D.E., Craigie, J.S., Lall, S.P. and Norman-Boudreau, K. (1986). Aquaculture nutrition. In: M. Bilio, H. Rosenthan and C. Sindermann (eds.), *Realism in Aquaculture: Achievements, Constraints, Perspectives*. EAS, Bredene, Belgium, pp. 251–305.
- Ibeas, C., Izquierdo, M.S. and Lorenzo, A. (1994). Effect of different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids on growth and fatty acid composition of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 127(2–3): 177–188.
- Koven, W.M., Tandler, A., Kissil, G.W. and Sklan, D. (1992). The importance of n-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. *Aquaculture*, 104(1–2): 91–104.
- Koven, W.M., Tandler, A., Sklan, D. and Kissil, G.W. (1993). The association of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the main phospholipids of different-age *Sparus aurata* larvae with growth. *Aquaculture*, 116(1): 71–82.
- Metcalfe, L.D. and Schmitz, A.A. (1961). The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.*, 33(3): 363.
- Mourente, G., Rodríguez, A., Tocher, D.R. and Sargent, J.R. (1993). Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) on lipid and fatty acid compositions and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae during first feeding. *Aquaculture*, 112(1): 79–98.
- Pousão-Ferreira, P., Cairrão, F., Nery, F. and Narciso, L. (1997). The fatty acid profile of *Sparus aurata* larvae is correlated to the composition of the

PUFA. Se puede concluir de los resultados que, al inicio del primer tratamiento de enriquecimiento, *B. plicatilis* incorpora a los PUFA esenciales; sin embargo, 6 h después del inicio del enriquecimiento, la composición de los ácidos grasos empieza a disminuir hasta el inicio del segundo tratamiento de enriquecimiento, cuando hay un incremento abrupto en el perfil de los ácidos grasos detectados (fig. 2). Hay una alteración radical en la composición de los ácidos grasos de *B. plicatilis* cuando se les priva de alimento, y un periodo de inanición de tan solo 3 h es suficiente para provocar una reducción significativamente alta en su composición de PUFA, la cual los hace que sean inadecuados como alimento para larvas de *S. aurata*. De hecho, en un estudio anterior se demostró que el perfil de ácidos grasos se correlaciona con la composición de la dieta de enriquecimiento (Pousão-Ferreira *et al.*, 1997), y se enfatizó la importancia de regímenes de enriquecimiento de alimentos, la composición del producto de enriquecimiento y los regímenes alimenticios larvarios para el cultivo exitoso de larvas marinas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen las contribuciones de la OTAN para estabilidad (PO Sea bream).

Traducido al español por Jennifer Davis.

- enrichment diets of *Brachionus plicatilis* and *Artemia* sp. *Ciencias Marinas*, 23(1): 83–92.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Izquierdo, M.S., Mora, J., Lorenzo, A. and Fernández-Palacios, H. (1994a). Essential fatty acid requirements of larval gilthead sea bream, *Sparus aurata* (L.). *Aquacult. Fish. Manage.*, 25(3): 295–304.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Lorenzo, A., Izquierdo, M.S. and Cejas, J.R. (1994b). n-3 HUFA requirement of larval gilthead sea bream *Sparus aurata* when using high levels of eicosapentaenoic acid. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107(4): 693–698.
- Salhi, M., Izquierdo, M.S., Hernández-Cruz, C.M., González, M. and Fernández-Palacios, H. (1994). Effect of lipid and n-3 HUFA levels in microdiets on growth, survival and fatty acid

- composition of larval gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 124(1-4): 275-282.
- Sorgeloos, P. (1995). Live feeds and their substitution products for larval nutrition of fish, shrimp and prawn. In: Fifth International Course on Fish Larvae Nutrition. ERASMUS ICP-94/NL-1139/01, Wageningen, Netherlands, 1-9 May, 1995, IX: 1-34.
- Watanabe, T. (1987). Requerimientos de ácidos grasos y nutrición lipídica en los peces. En: J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta (eds.), *Nutrición en Acuicultura II*. CAYCT, Madrid, pp. 99-165.
- Watanabe, T. (1988). Nutrition and growth. In: J. Shepherd and N. Bromage (eds.), *Intensive Fish Farming*, pp. 154-165.