

DESARROLLO DEL CULTIVO DE LENGUADO, *Paralichthys californicus*: AVANCES SOBRE LA FISIOLOGIA DIGESTIVA Y NUTRACION DE LARVAS Y JUVENILES

Juan Pablo Lazo
Laboratorio de Nutrición de Peces
Departamento de Acuicultura
CICESE



Esquema de la platica

- Introducción
- Cultivo larvario
 - Ontogenia del sistema digestivo y capacidad digestiva
 - Digestibilidad *in vitro*
 - Microdietas y protocolos de destete
 - Pigmentación
- Cultivo de Juveniles
 - Temperatura óptima
 - Efecto de la relación E/P
 - Tasas de alimentación

Laboratorio de Nutrición de Peces Marinos

● Participantes:

- Benjamín Barón-Sevilla
- Emmanuel Martínez
- Verónica Vizcaino
- Mario Galaviz
- Magali Zacarias
- Jean Benoit Muguet
- Sharon Herzka
- Armando García-Ortega
- Mark Drawbridge
- Nathaniel Schmit
- Jesús Mariscal
- Daniel Vargas
- Héctor Canseco
- Luz López

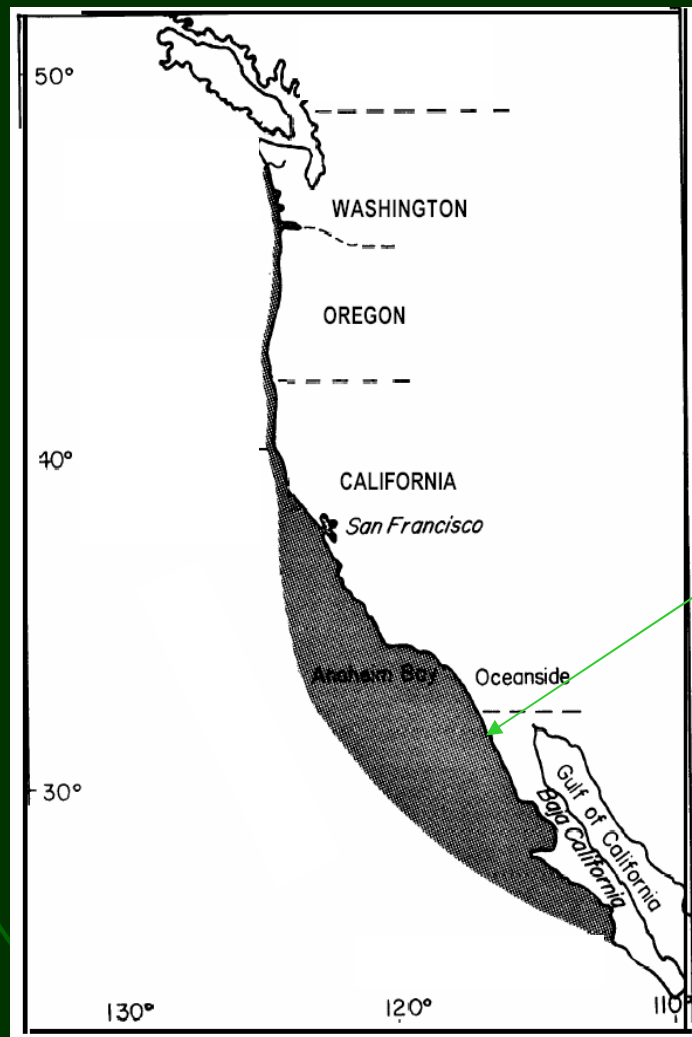
¿Por qué cultivar Peces Marinos?

- La pesca mundial ha llegado a un tope de cosecha (aprox. 90-100 millones de toneladas)
- La mayoría de las poblaciones naturales están sobreexplotadas y disminuyendo
- A través del cultivo de peces marinos se puede:
 - Disminuir la presión pesquera sobre las poblaciones naturales
 - Repoblar especies nativas en vía de extinción
 - Estudiar la biología básica en el laboratorio (ecofisiología y ontogenia)
- Excelente fuente alternativa de proteína y lípidos
- Alternativa para la acuicultura en Latino América

Lenguado, *Paralichthys californicus*

- El lenguado es un recurso pesquero nativo de gran importancia en las costas del Pacífico Mexicano y del sur de California de los Estados Unidos Americanos
- Se distribuye desde Canadá hasta Bahía Magdalena Baja California, México
- Es la especie que alcanza mayores tallas de toda la familia Paralichthidae, alcanzando tallas de **1.5 m** de longitud total y un peso de **32 Kg**
- Tiene gran aceptación comercial por la textura y sabor de su carne
- Se comercializa a precios del orden de \$10 a \$20 USD, dependiendo de su presentación

Distribución natural



Situación actual pesquerías

- Se han reportado reducciones de más del 80% en la capturas totales multiespecíficas de lenguados en las costas de la Baja California
- A nivel nacional, se puede generalizar que las capturas de lenguado han disminuido en un 33% en los últimos veinte años

Estado actual del cultivo

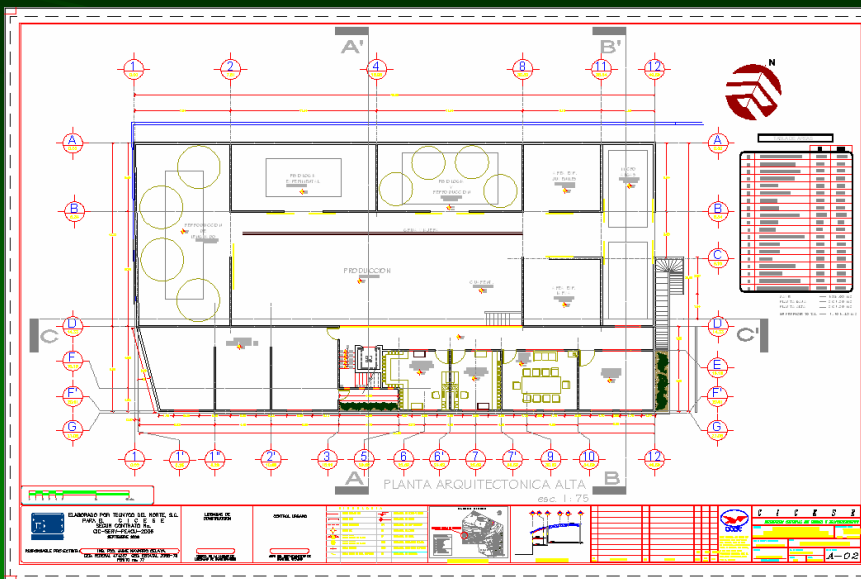
- Reproducción controlada en cautiverio
- Cultivo larvario con alta supervivencia (hasta un 80%)
- Producción comercial de semilla por el CICESE
 - Capacidad actual 50,000 a 70,000 juveniles
 - Nuevo Laboratorio con capacidad de 250,000
- Varias granjas comerciales cultivando juveniles en Baja California
- Comercializado en Baja California con precios de \$10 dólares el kilo pez entero

Nuevo Laboratorio Comercial

- Instalaciones de 1000 m² en el CICESE
- Capacidad de producir 250,000 juveniles de lenguado y/o jurel aleta amarilla
- Primer laboratorio comercial de peces marinos en el país



Laboratorio de Cultivo de Peces Marinos



Reproducción en cautiverio



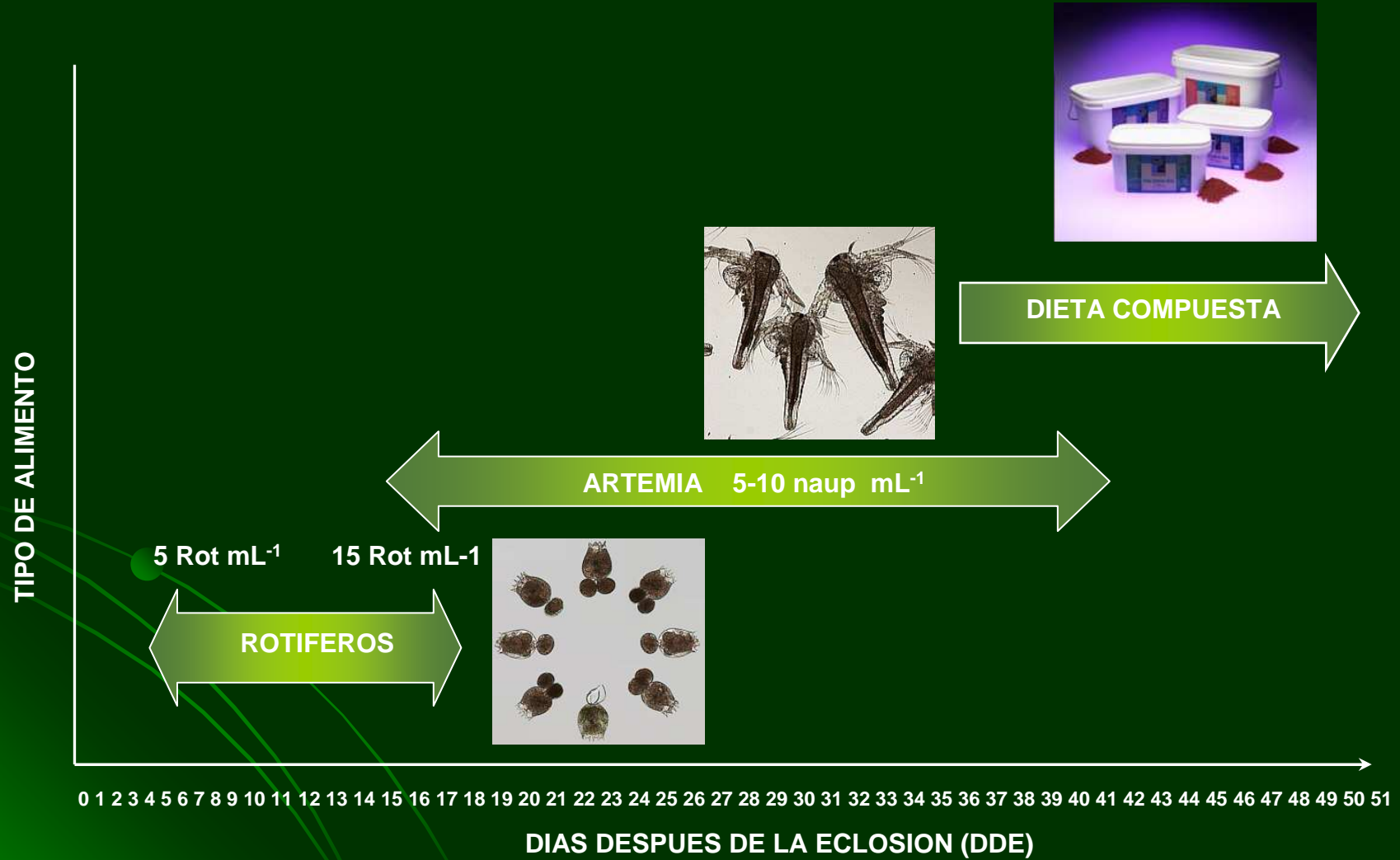
Desoves naturales



Desoves inducidos



Cultivo Larvario



Protocolo de Alimentación

Engorda en Granja Comercial



Pezco S.A. de C.V.

Problemas

- Altos costo de producción de alimento vivo y mortalidad en el destete (transición de alimento vivo a microdietas)
- Producción de juveniles con pigmentación anormal
- Temperatura altas durante la engorda en B.C.
- Crecimiento moderado (500 a 600 g en 12 meses)
- Canibalismo en juveniles tempranos

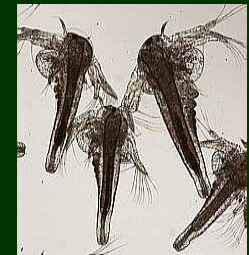
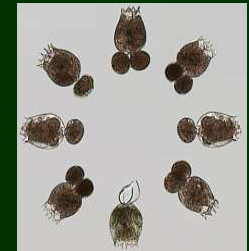
Cultivo de Peces Marinos

- La etapa larvaria es considerada la más crítica
- La mayoría de los problemas están asociados con la nutrición y alimentación
- Para satisfacer sus requerimientos nutricionales las larvas deben:
 - Ingerir alimento
 - Digerirlo a través de procesos enzimáticos
 - Absorber y metabolizar los nutrientes necesarios
- Se considera que las larvas poseen un sistema digestivo poco desarrollado:
 - carecen de estómago funcional que secreta HCl y pepsina

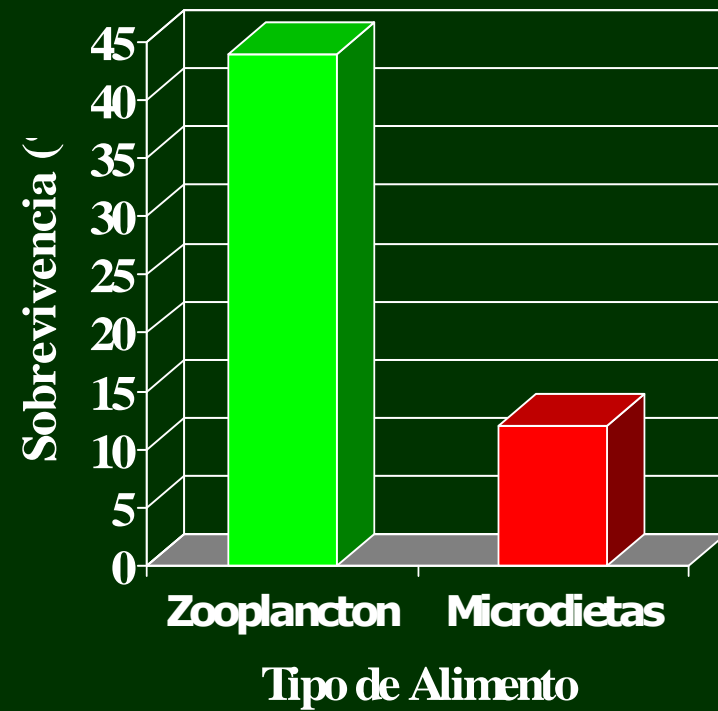
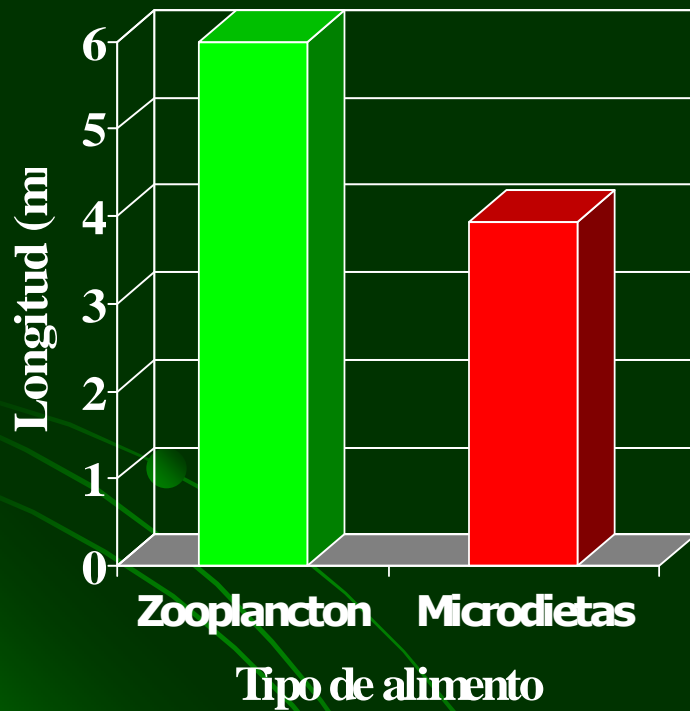
Alimentación de larvas

Dos alternativas:

- 1) La utilización de presas vivas como rotíferos o *Artemia*
 - **Difícil de mantener**
 - **Laborioso y costoso (70-80 % del costo producción)**
 - **Valor nutricional subóptimo**
- 2) Microdietas formuladas
 - Buen perfil nutricional
 - Tamaño adecuado
 - Poco éxito con estas dietas



Dietas formuladas



PROBLEMAS CON LA PIGMENTACION





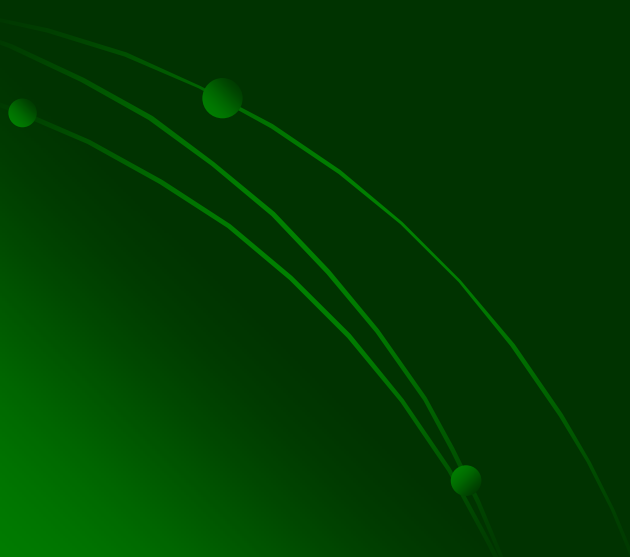
Larvas: Estudios de Fisiología Digestiva



Estrategias de investigación

- Morfología e histología durante la ontogenia del sistema digestivo
- Estudios de actividad enzimática: ¿cual es la capacidad digestiva?
- Digestibilidad *in vitro*: selección de ingredientes adecuados
- Aplicaciones practicas de la fisiología digestiva:
 - Desarrollo de microdietas
 - Protocolos de destete

Ontogenia del sistema digestivo

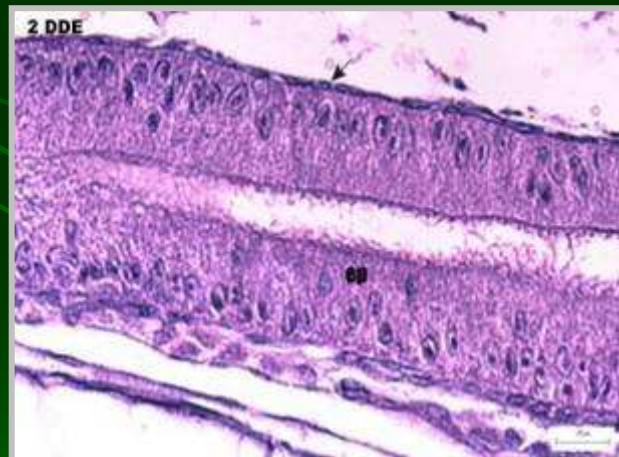




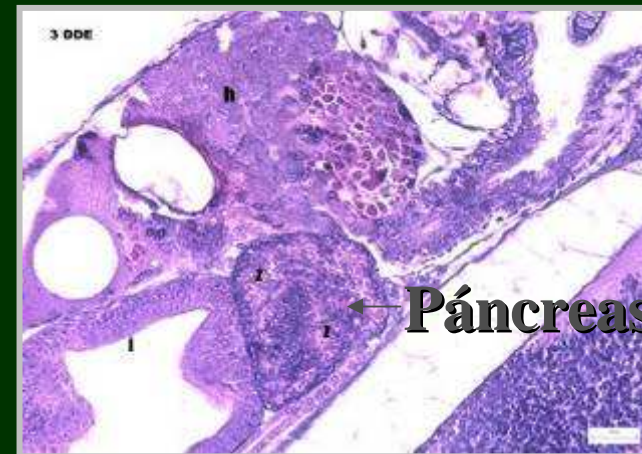
2 DDE. Zona prevalvular (pr), gota de aceite (*), ángulo de constricción (→).



2 DDE. Intestino tubular (it), saco vitelino (s), ojo (o). H-E (10X).



2 DDE. Epitelio cilíndrico con microvellosidades eosinófilas formando el borde en cepillo (ep), serosa (→). H-E (63X).

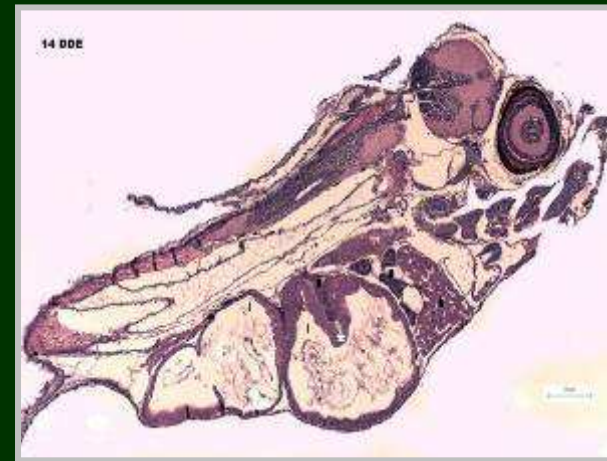


3 DDE. Gránulos de zimógeno (z), hígado (h), intestino (i). H-E (40X).

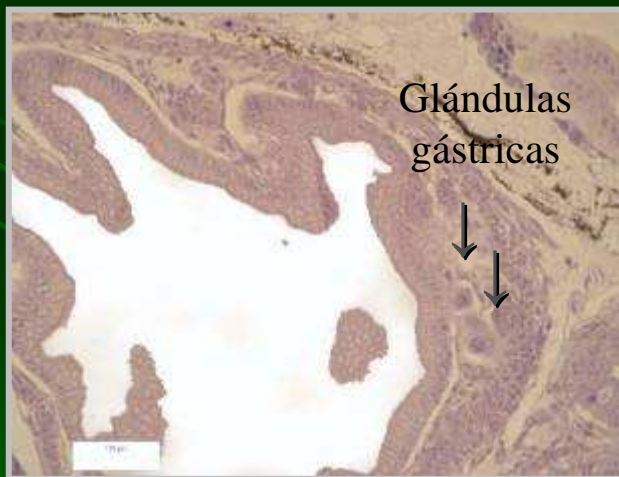
← Páncreas



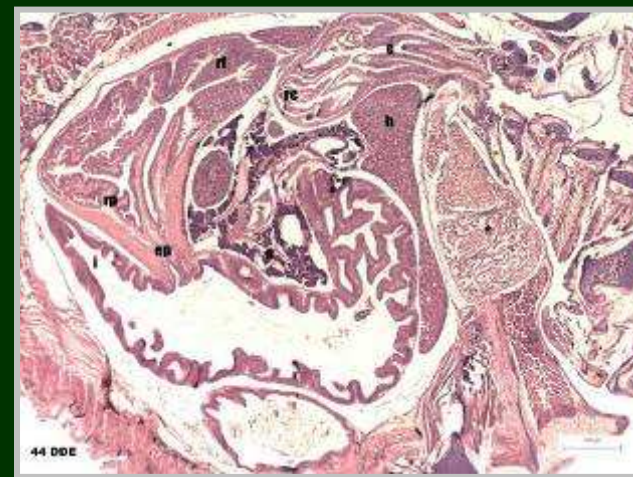
13 DDE. Asa intestinal (→).



14 DDE. Asa intestinal (*), páncreas (p), hígado (h), intestino (i). H-E (10X).

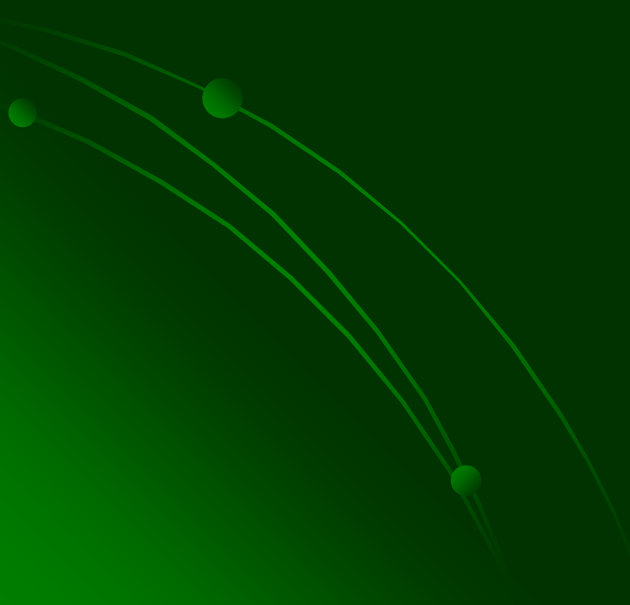


26 DDE; primeros esbozos de las glándulas digestivas H-E, 400X



44 DDE. Región cardiaca (rc), región fúndica (rf), región pilórica (rp), hígado (h), páncreas (p), intestino (i), H-E (5X).

Capacidad digestiva

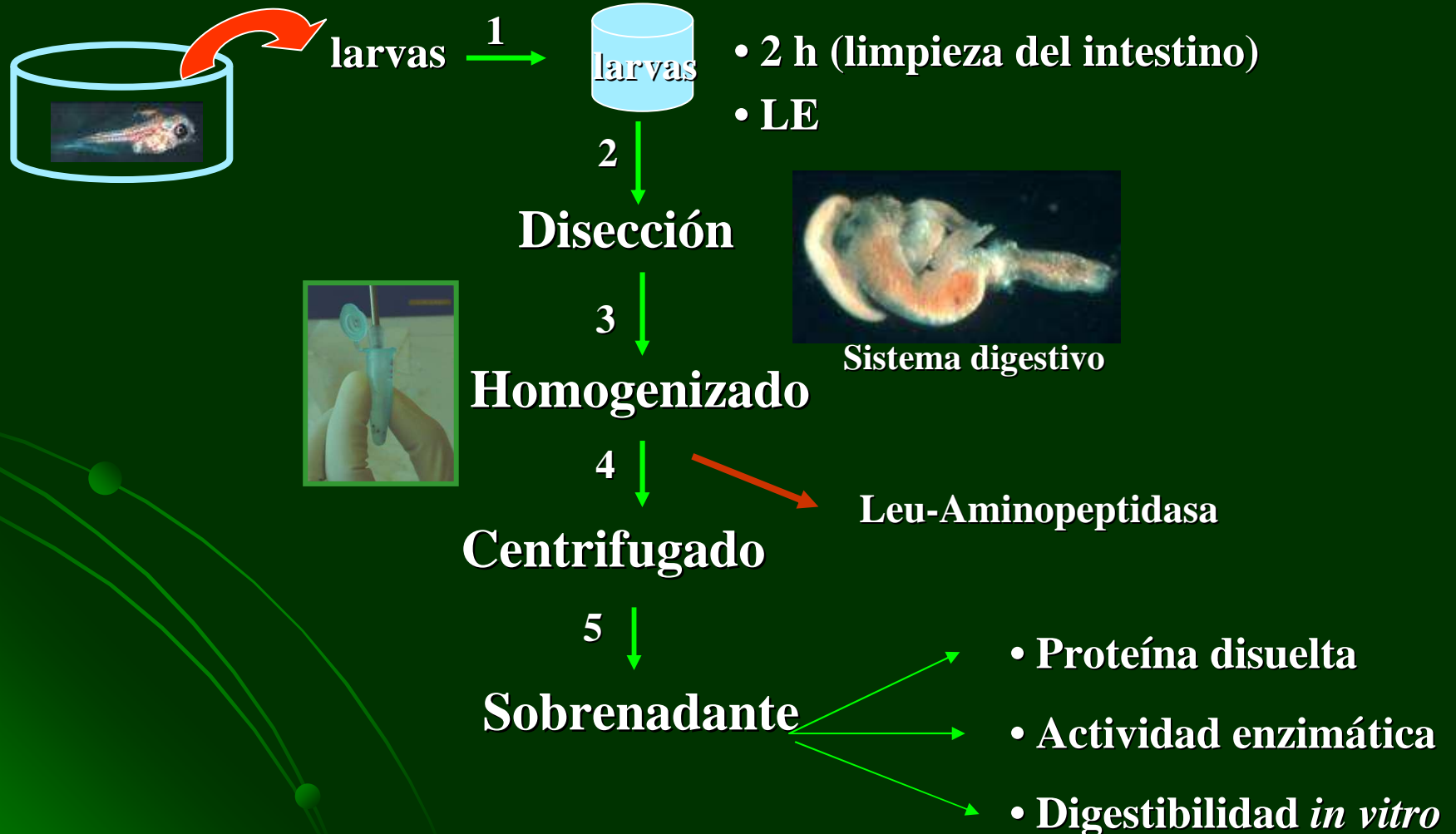


Enzimas Digestivas

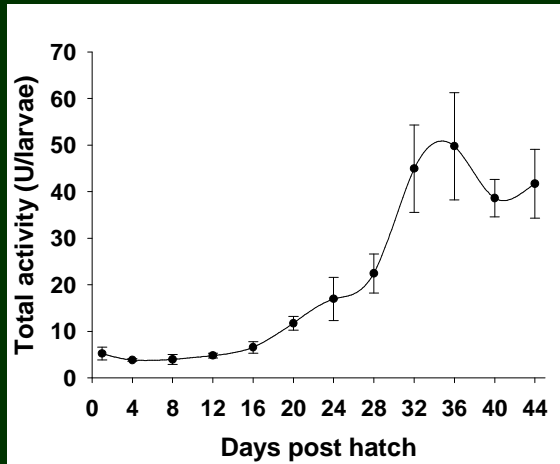
- Proteasas (digestión de proteínas)
 - Proteasas ácidas (pH 2)
 - Proteasas alcalinas (pH 7-10)
 - Tripsina y Quimiotripsina (proteasas pancreáticas típicas)
 - Aminopeptidasa, fosfatasa alcalina (epitelio intestinal)
 - Peptidasas, catepsinas, (intracelulares)
- Lipasas (digestión de lípidos)
 - Lipasas generales
 - Lipasas dependiente de sales biliares,
 - Fosfolipasas
- Amilasas (digestión de C.H.)
 - Amilasas
 - Maltasas

Metodología para estudiar enzimas digestivas

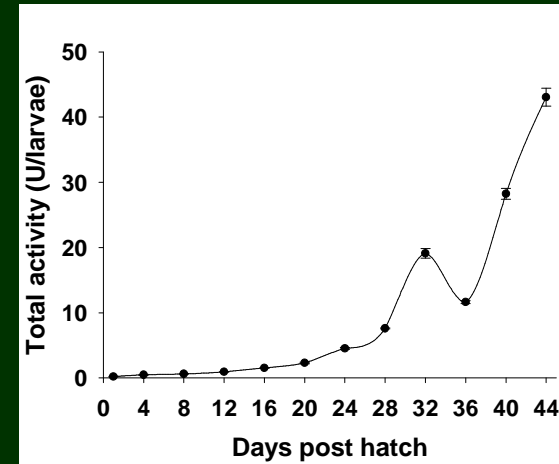
Muestreo y preparación de los extractos:



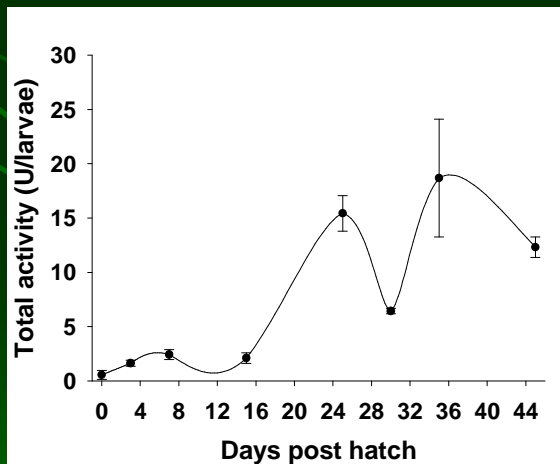
Proteasas



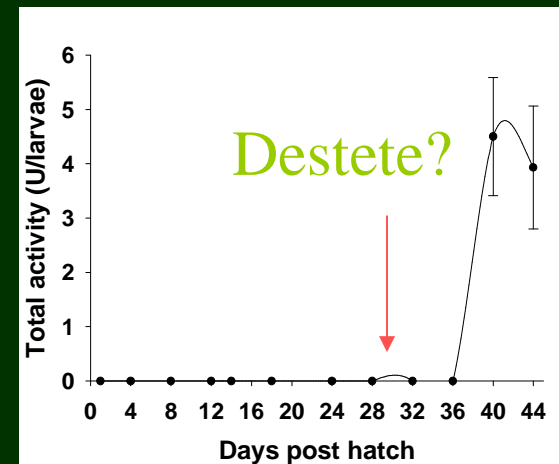
Tripsina



Aminopeptidasas



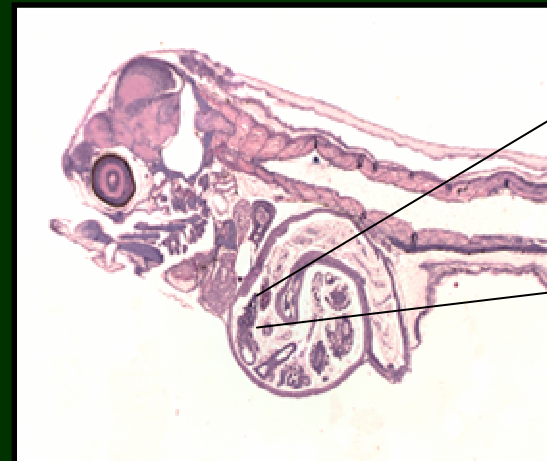
Proteasas alcalinas



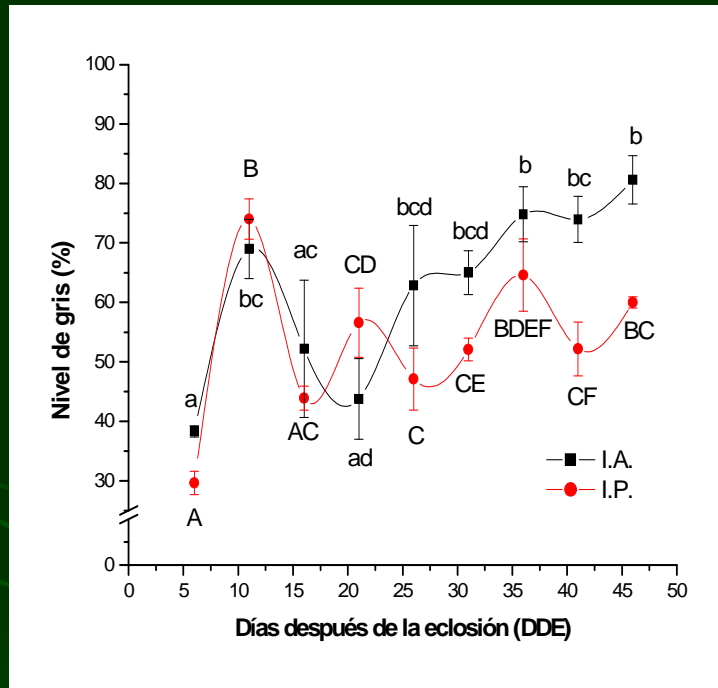
Proteasas acidas

Histoquímica

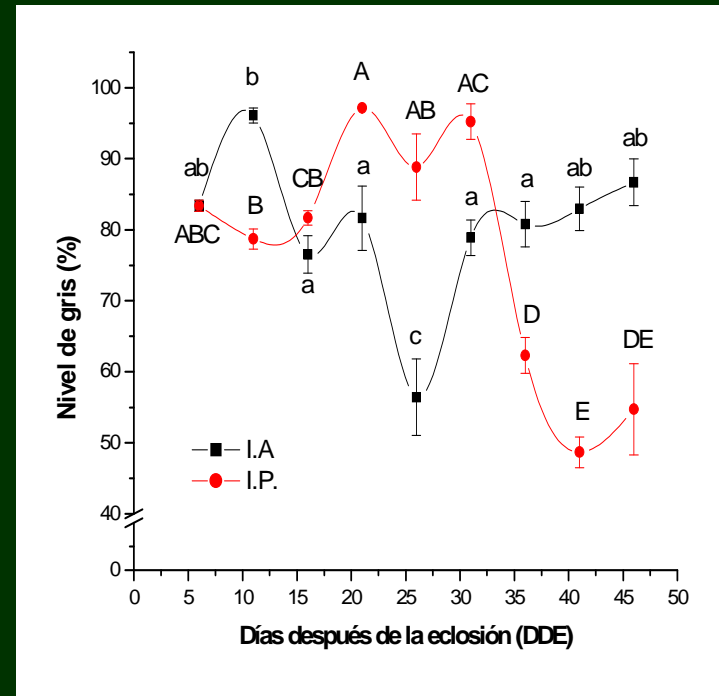
- Enzimas digestivas:
 - Tripsina (endoproteasa alcalina por excelencia)
 - Lipasas (digestión de lípidos)
 - Amilasas (digestión carbohidratos)
 - Aminopeptidasas (exoproteasa de la membrana intestinal, indicador de maduración del intestino)
 - Fosfatasa ácida (digestión intracelular)
 - Fosfatasa alcalina (enzima de la membrana intestinal)



Histoquímica



Actividad de la fosfatasa alcalina en el intestino de *P. californicus*, durante su desarrollo larvario. Media \pm D.E. (n=3).



Actividad de la fosfatasa acida en el intestino de *P. californicus*, durante su desarrollo larvario. Media \pm D.E. (n=3).

Eclosión

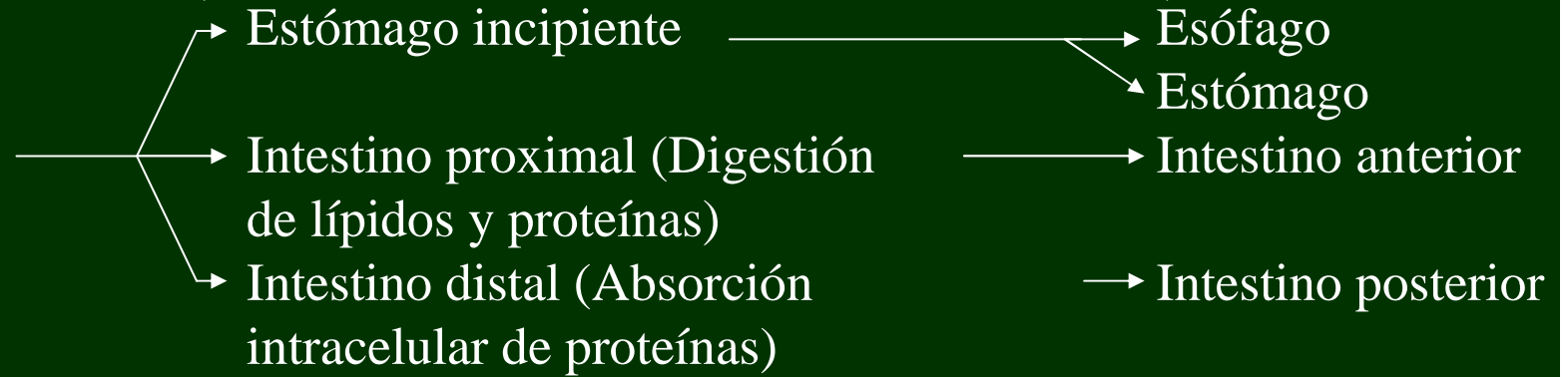


Sistema digestivo prematuro

Inicio de alimentación



Metamorfosis



Modelo ontogénico

Embrión

d 0

Etapa larvaria

d 2-5

Juvenil

d 30-40

• Tripsina

• Quimotripsina

Digestión proteica { Pepsina

• Aminopeptidasa

• Fosfatasa

Digestión de péptidos

Extracelular

• Amilasa

• Lipasa

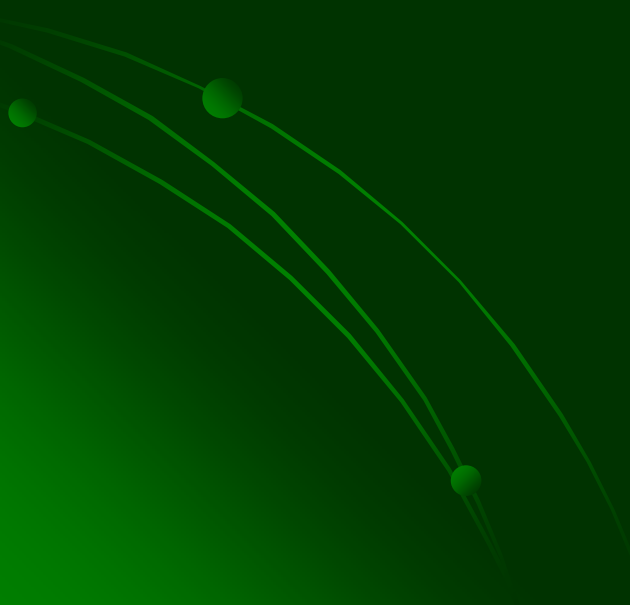
Carbohidratos

Lípidos

• Lisosomas

Intracelular

Digestibilidad *in vitro*



Digestibilidad *in vivo*

- La digestibilidad integra los procesos digestivos con los de absorción de los nutrientes
- Permite inferir el grado de aprovechamiento del alimento
- Limitantes en el estudio de larvas de peces marinos
 - Muy difícil recolectar heces
 - Difícil cuantificar alimento consumido
 - Muchas especies no aceptan microdietas formuladas al inicio de la alimentación exógena
- Algunos estudios de digestibilidad en larvas peces
 - Aun no se consideran los cambios ontogénicos

Digestibilidad *in vitro*

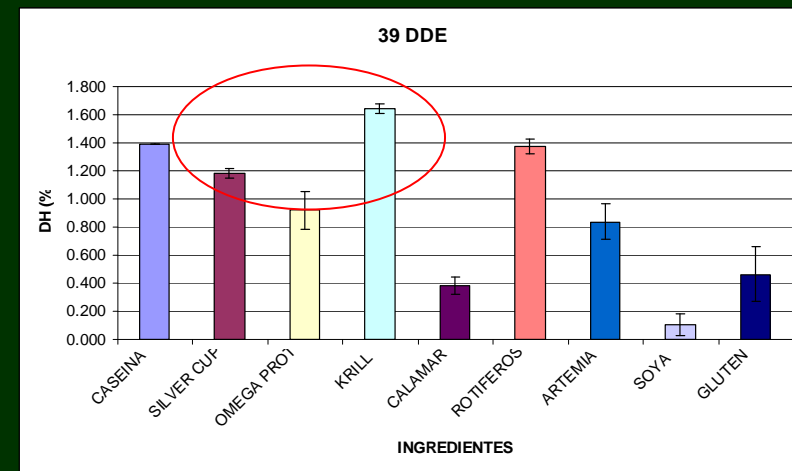
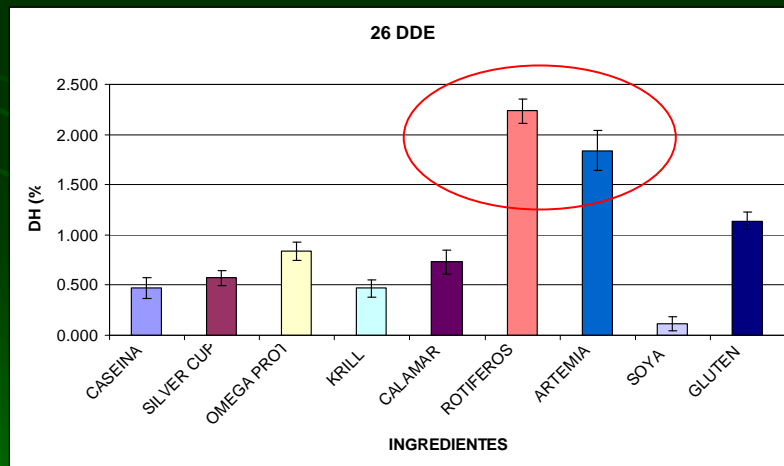
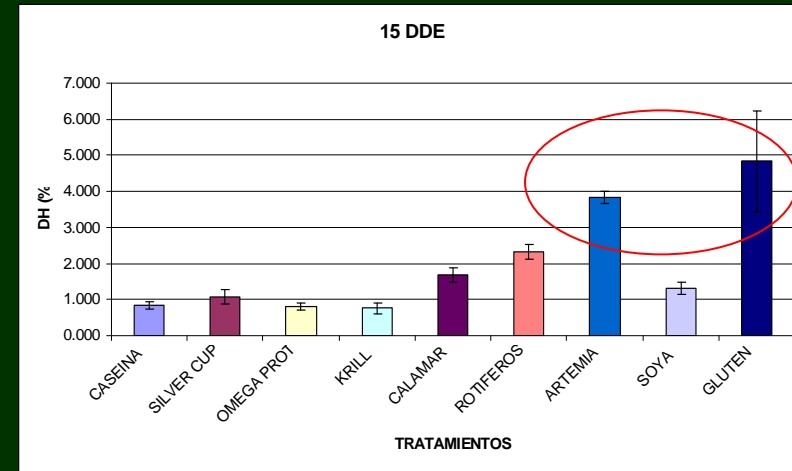
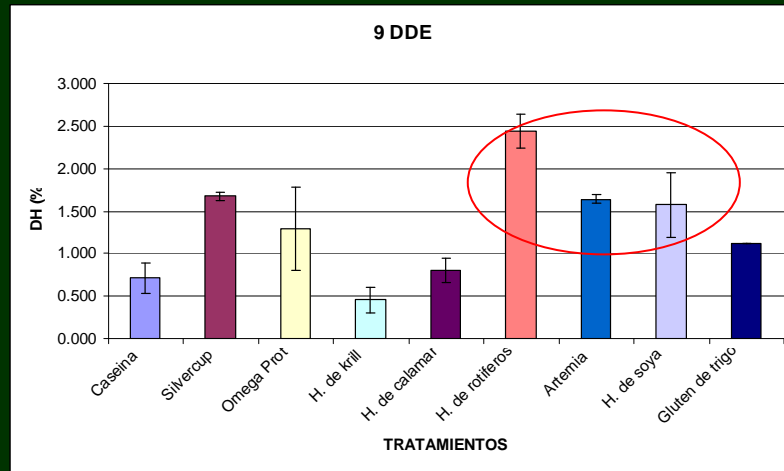
- Técnicas alternativas
- Ensayos sencillos y de bajo costo
- Evaluación rápida de la calidad de los ingredientes
- Uso de extractos enzimáticos de larvas o enzimas comerciales
- Evaluación de la digestibilidad de:
 - proteínas (por amino ácidos)
 - lípidos (por ácidos grasos)

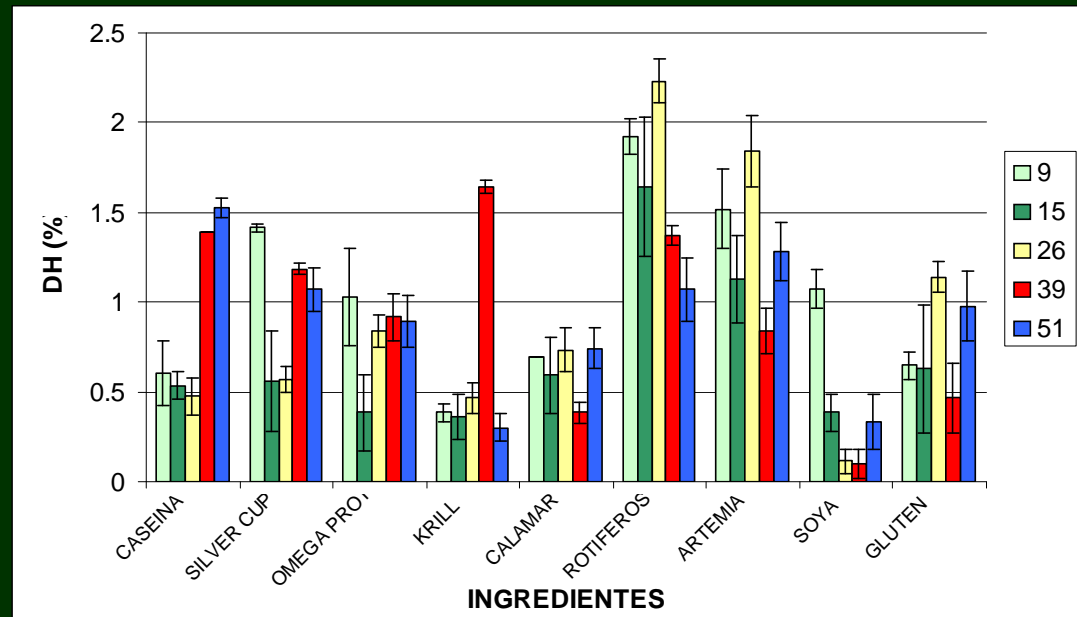
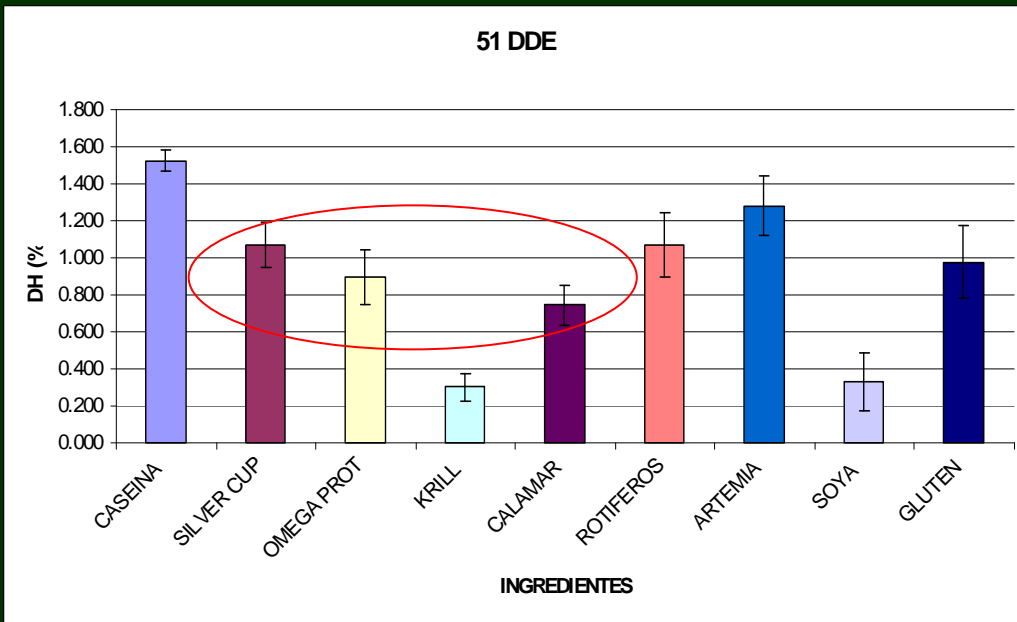
Parámetros: técnica pH-STAT

- Extracto de enzimas de larvas de lenguado
- Proporción de [E]:[S]
 - 30 Unidades de enzima por ensayo
 - 8 mg/ml proteína por ingrediente
- Rx: pH 8.0
- Base: 0.1 N NaOH
- Temp: 25 °C
- Tiempo de Rx: 1h

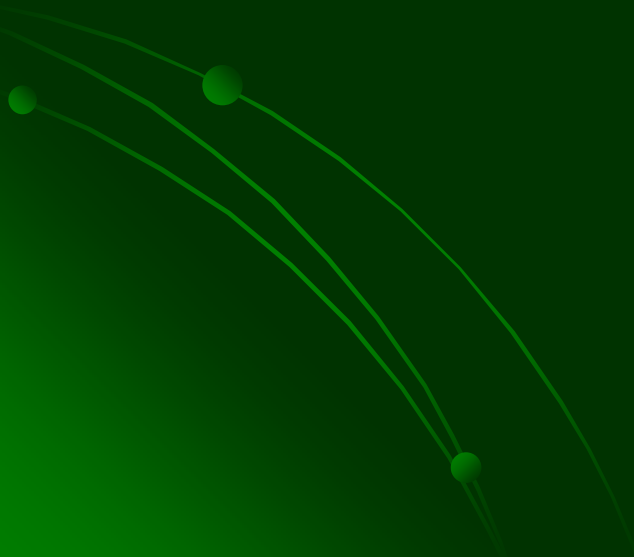


Ontogenia de la digestibilidad





Microdieta



Diseño experimental

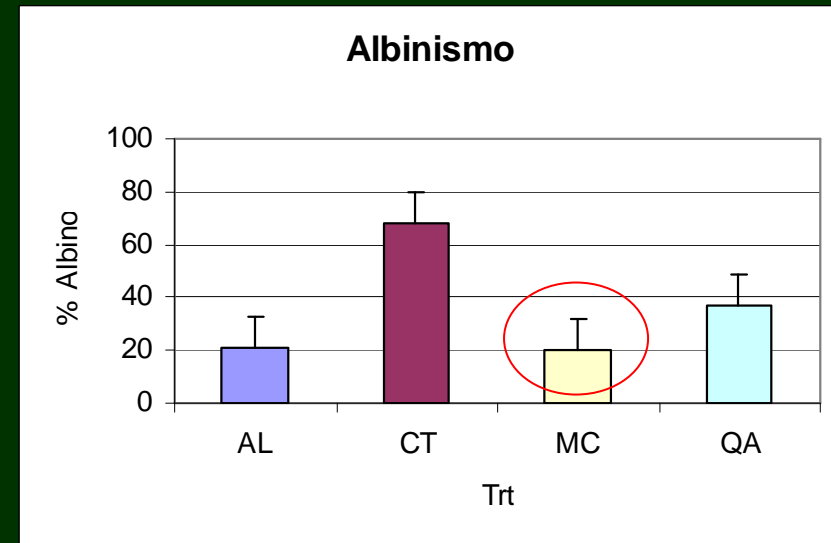
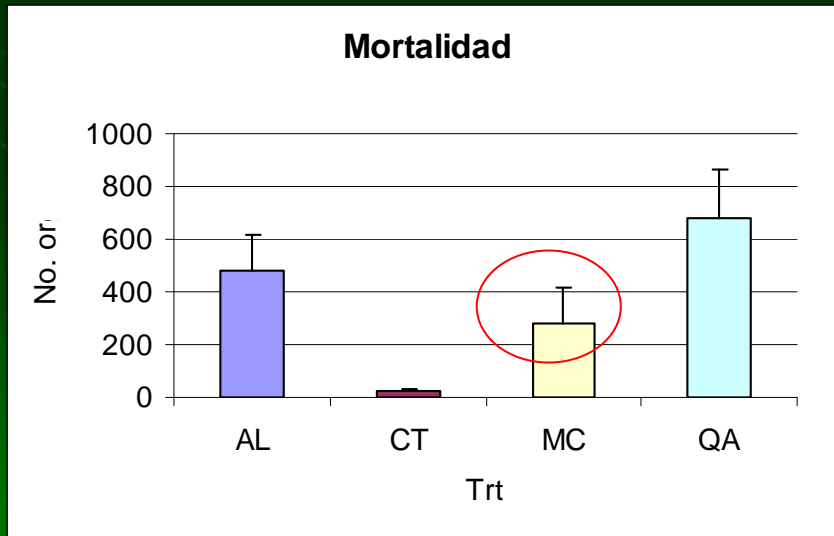
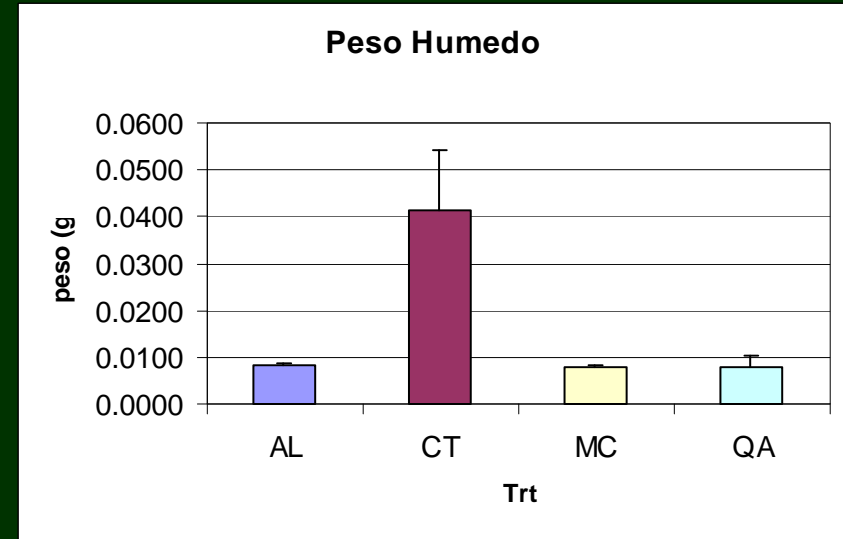
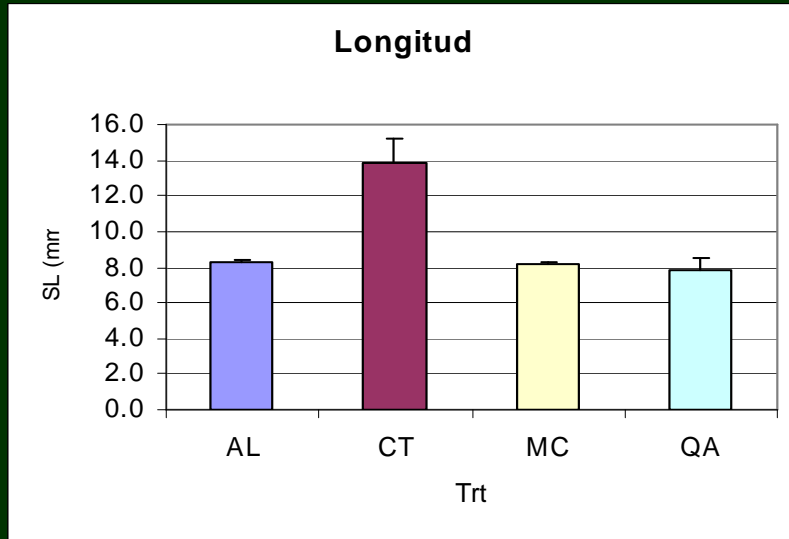
- Se formularon 2 dietas, 1 comercial y 1 control
- Bioensayo por 42 días
- Larvas alimentadas con alimento vivo enriquecido con HUFA n-3
 - Rotíferos @ 5 por ml iniciando 3 DDE
 - Artemia @ 5-7/ml iniciado 16 DDE
- Co-alimentación al día 20 DDE
- Completamente destetados para el día 26
- Se alimento en exceso (> 30-20% peso)



Composition of experimental diets

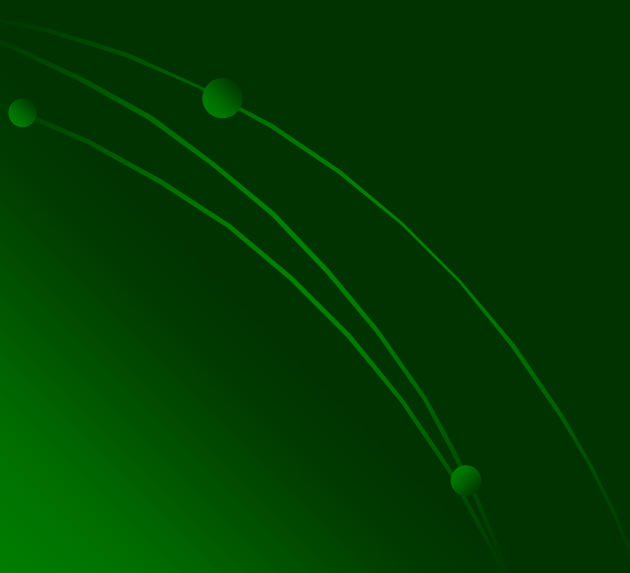
| Ingredient | Diets (g/100 g dry weight) | | |
|-------------------------------------|----------------------------|------|----|
| | QA | MC | AL |
| <i>Artemia</i> decapsulated cysts | 74 | | |
| Sardine fishmeal | 15.7 | | |
| Menhaden fish meal | | 49.4 | |
| CPS90 (Prot hydrolysate) | | | |
| Skipjack muscle | | 9.8 | |
| Cod liver oil | 2.6 | | |
| Skipjack orbit oil | | 14.8 | |
| Vitamin premix | 1.7 | 2 | |
| Mineral premix | 1 | 1 | |
| Mesquite gum | | 3.1 | |
| Carrageen | | 0.6 | |
| CMC | 5 | | |
| Whey protein concentrate | | 0.6 | |
| Sodium alginate | | 0.6 | |
| Proximate composition (% dw) | | | |
| Protein | 49.5 | 67 | 56 |
| Lipid | 18.3 | 21 | 15 |
| Ash | 9.7 | 10 | 12 |
| Dry matter | 92.4 | 93 | 93 |

Resultados



AL= alimnt comercial, CT = alimento vivo, MC = Microcapsulas, QA = dieta quistes

Destete



Tiempo del destete

- Diseño experimental I
 - Determinar la fecha mas temprana para realizar el destete
 - Larvas alimentadas inicialmente con rotíferos y artemia (tratamiento control)
 - 4 fechas de destete: 16, 26, 36 y 46 DDE
 - 3 días de periodo de co-alimentación
 - 3 replicas por tratamiento

Evaluación de edad para el destete

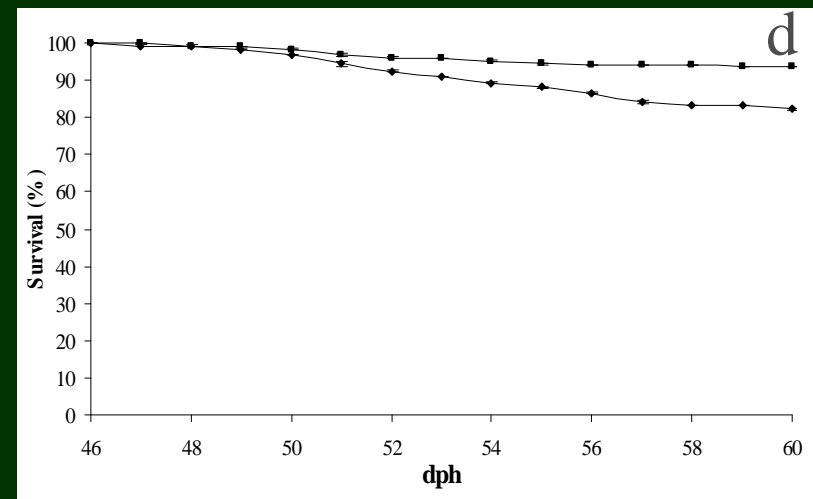
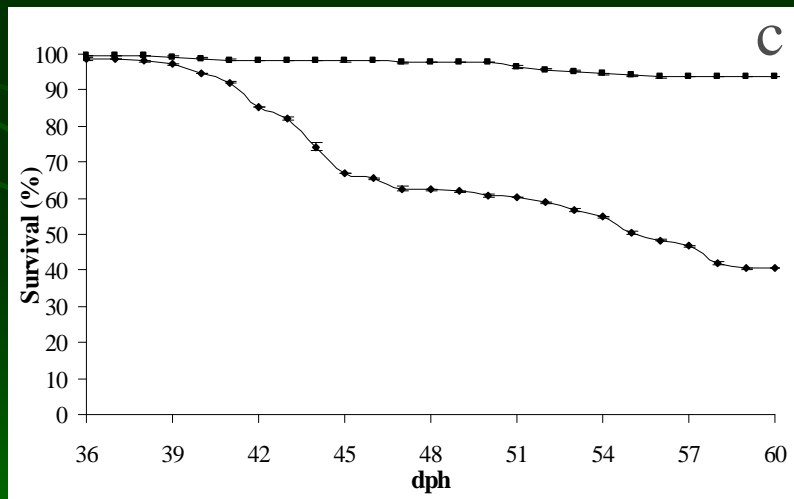
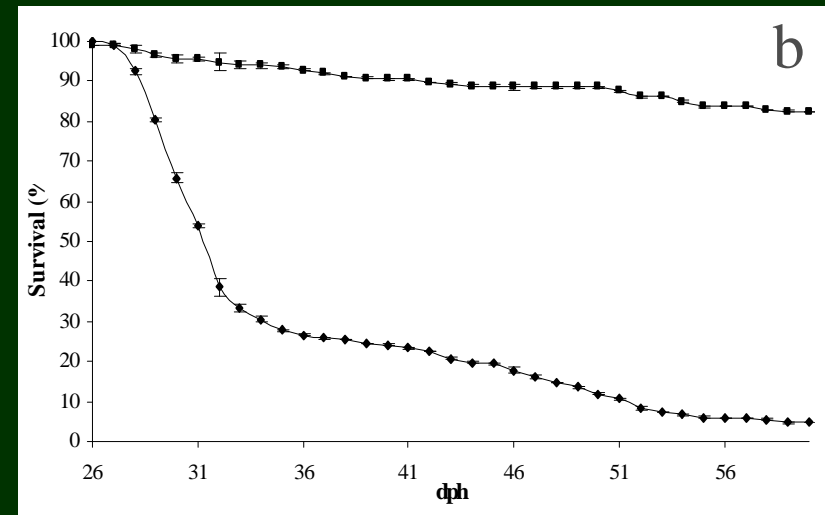
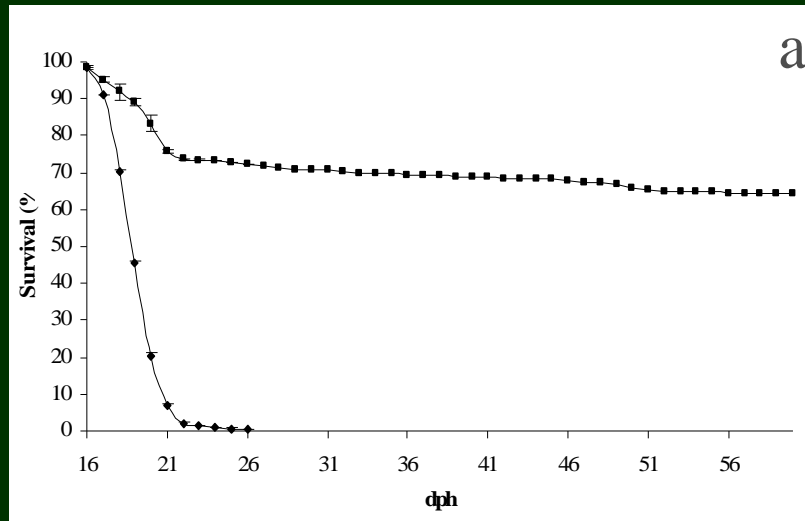
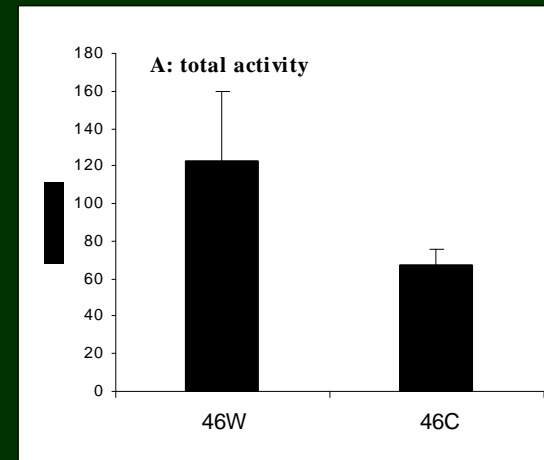
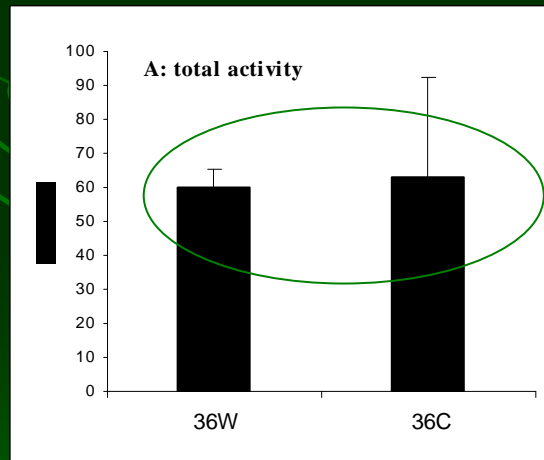
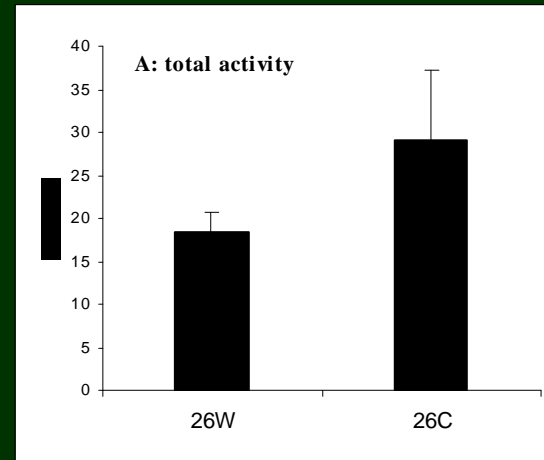
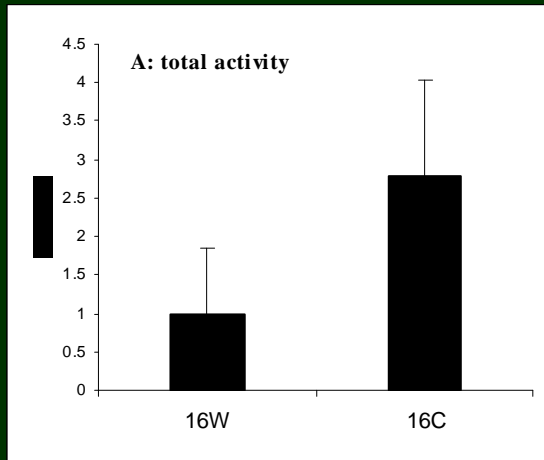


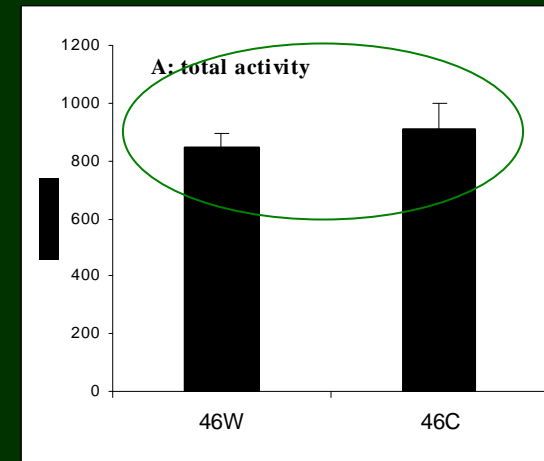
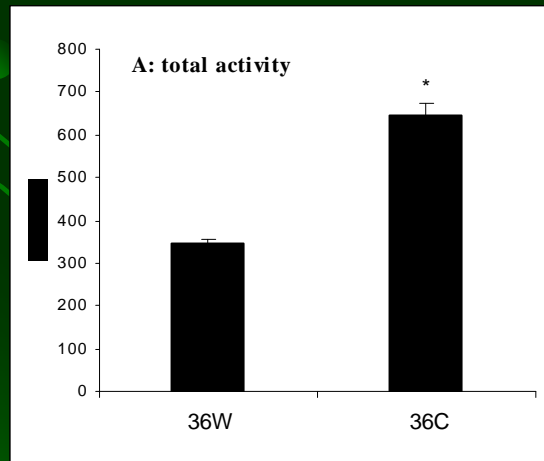
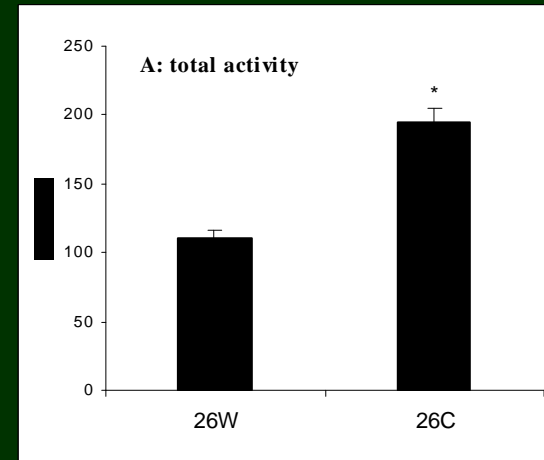
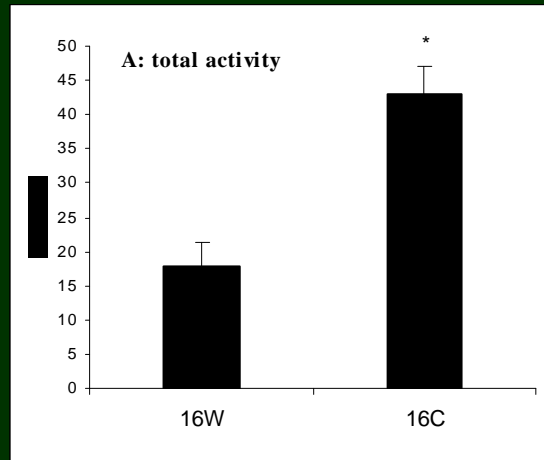
Figure 1. Survival rate (n=3) of larvae weaned at 16 (a), 26 (b), 36 (c) and 46 (d) dph.

Muguet et al., 2004

Actividad enzimática: tripsina



Leucino-aminopeptidasa

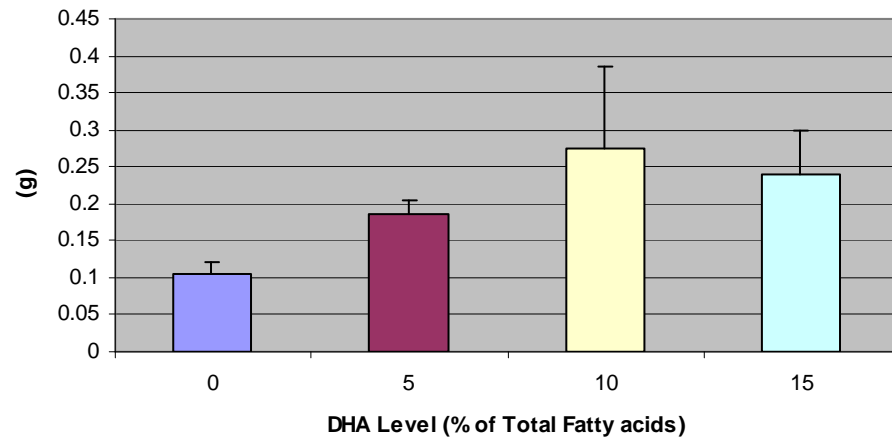


Efecto del nivel de DHA en el destete

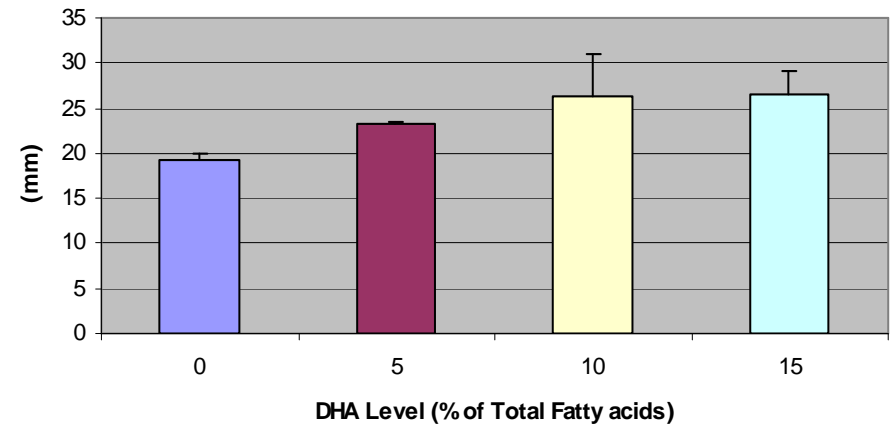
- DHA nutrientes esencial
- Diseño experimental II
 - Antecedentes en Japón (Kanazawa, 90's)
 - Cuatro niveles de DHA en el enriquecimiento con Artemia
 - DHA 0, 5, 10 y 15 % del total de los ácidos grasos en la emulsión enriquecedora
 - Destete total en el día 36
 - Bioensayo 78 días

Efecto del DHA en el éxito del destete

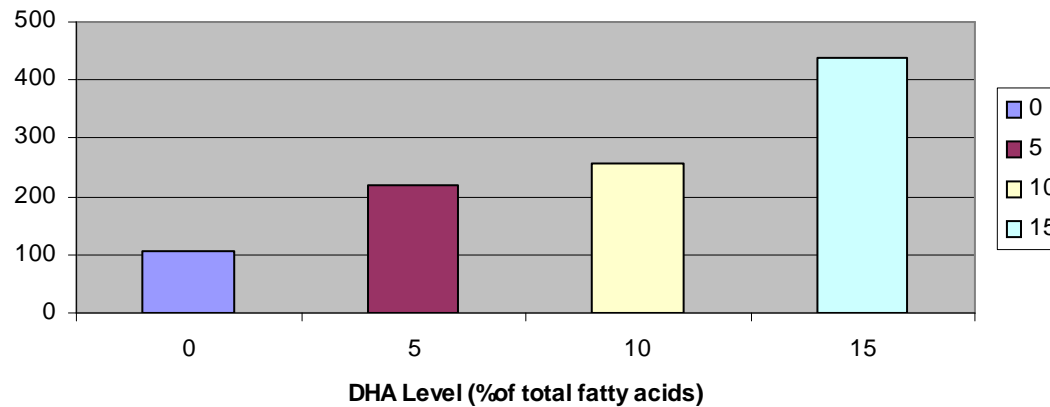
Peso final



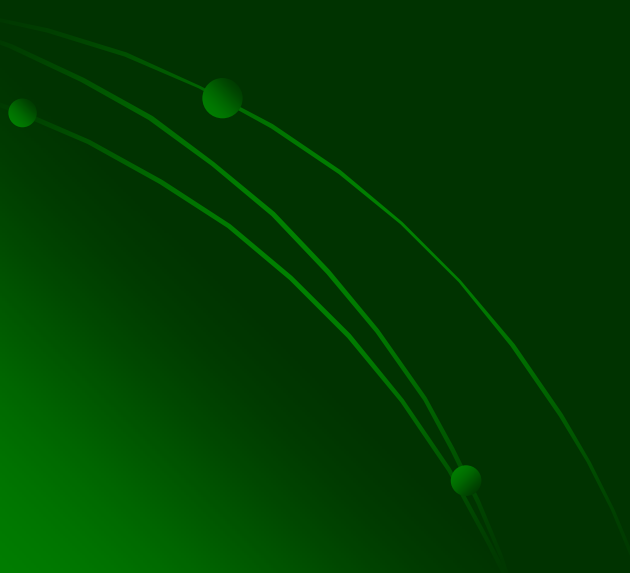
Talla Final



No.final



Pigmentación



Causas de la malpigmentación

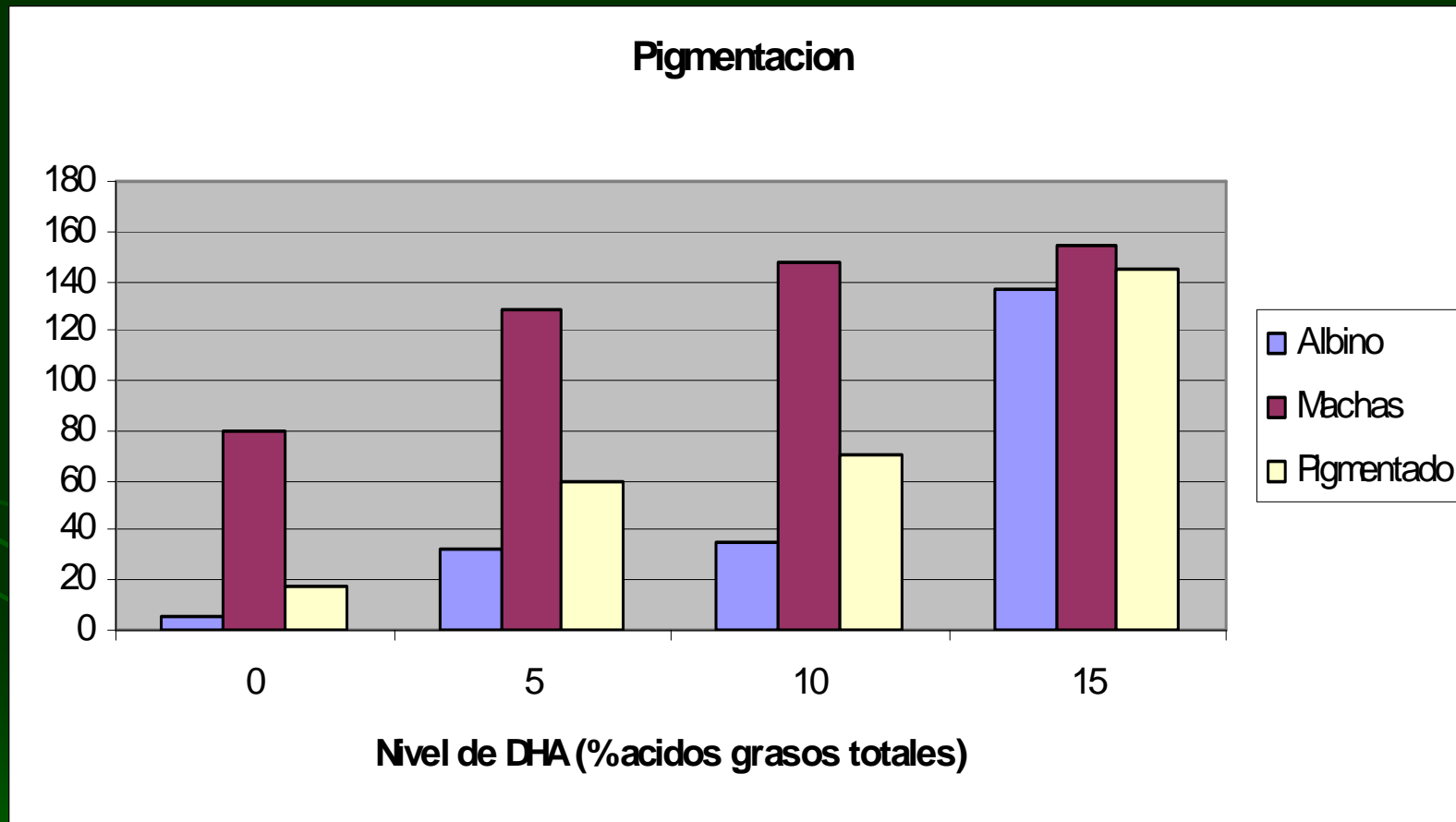
- Nutricionales

- Ácidos grasos: DHA, EPA y ARA
- Vitamina A
- Yodo: hormonas tiroedias

- Ambientales

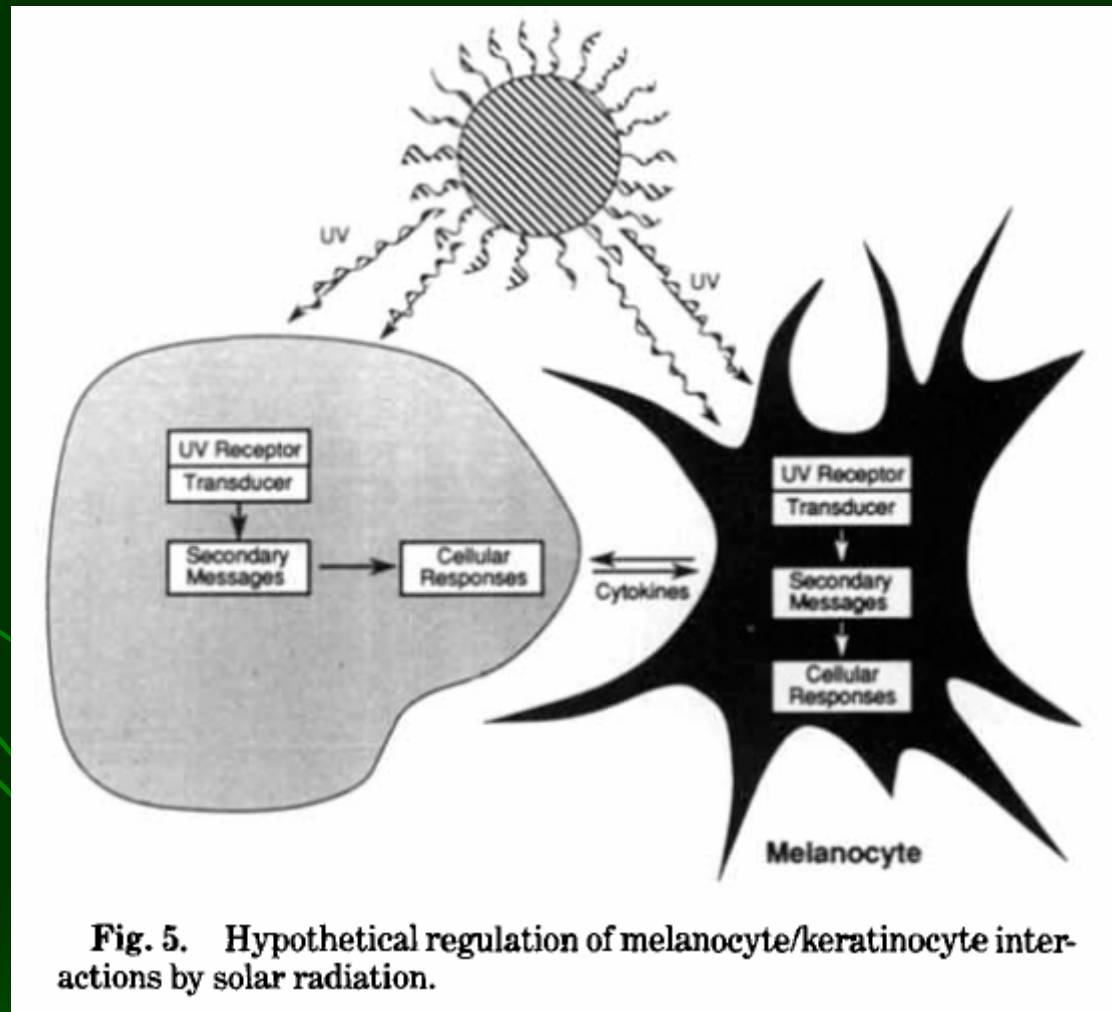
- Calidad de la Luz
- Intensidad de la luz
- UV

Efecto del DHA en la pigmentación

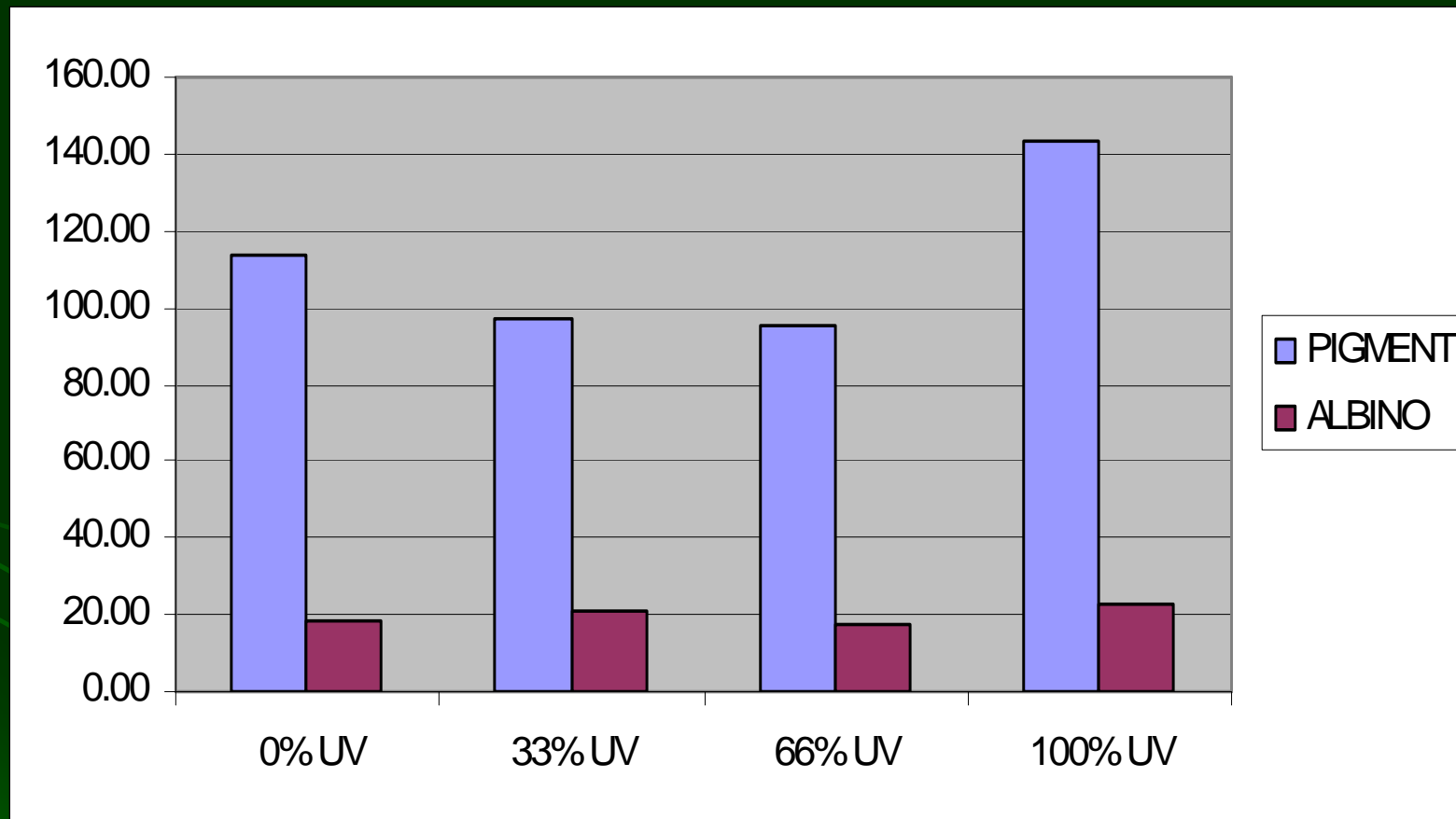


NIVEL ADECUADO DE DHA ENTRE 10-15 % AGT

Modelo del efecto del UV

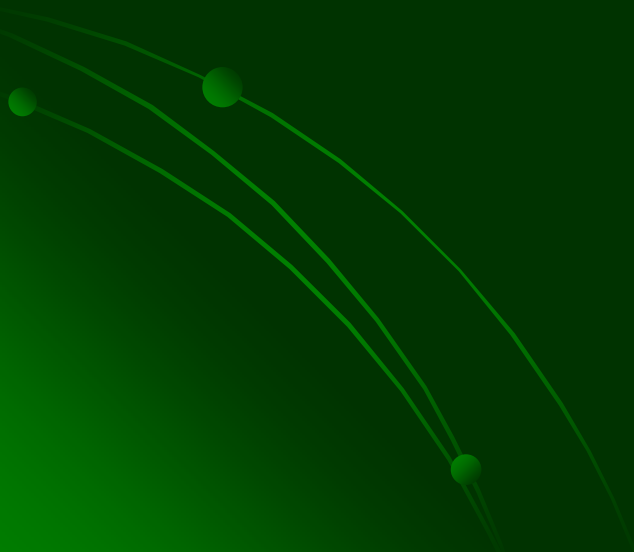


Efecto de la luz UV



Las larvas requieren niveles de UV normales para una pigmentación adecuada

Nutrición y Cultivo de Juveniles



Requerimientos nutricionales

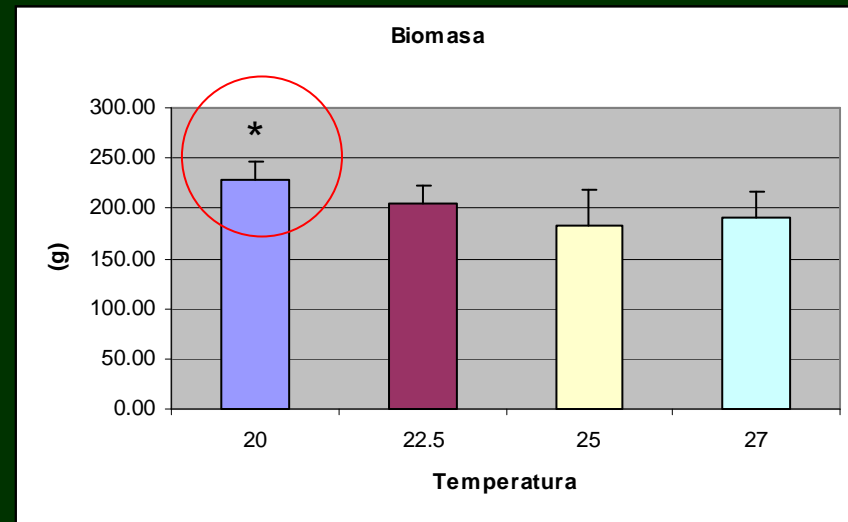
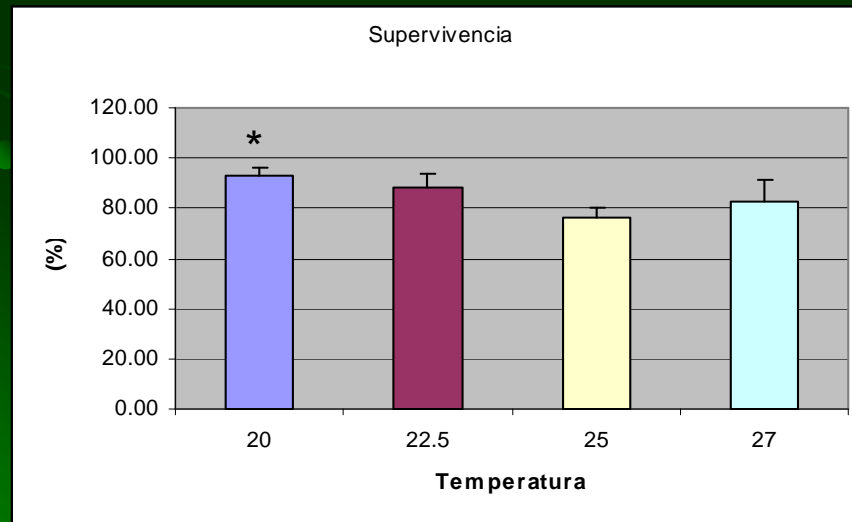
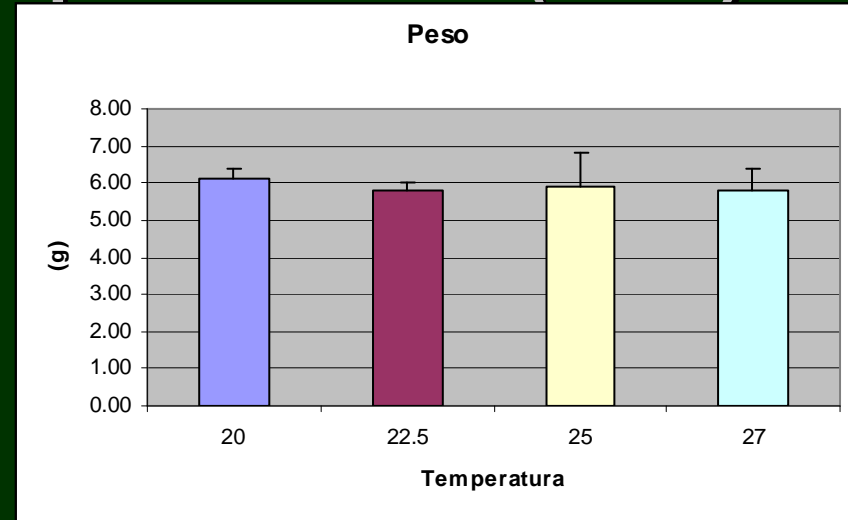
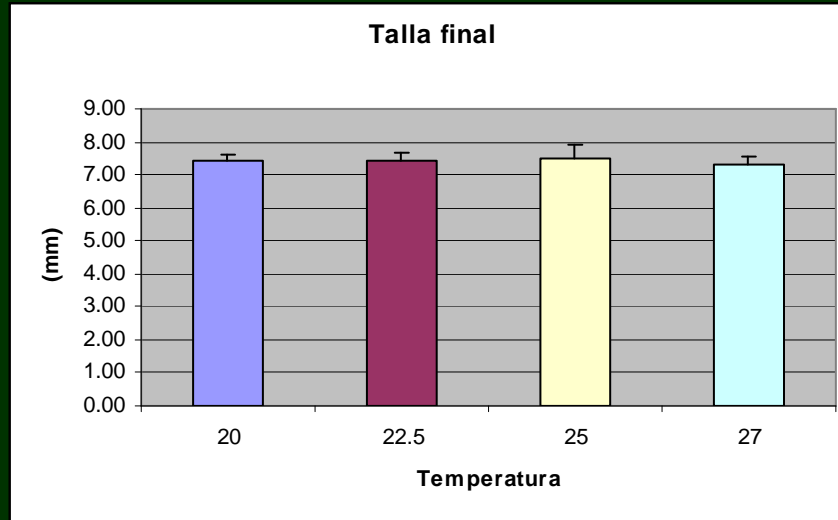
- Aproximación utilizando información de otras especies similares como el *P. olivacius*, *P. dentatus* y *P. lethostigma*.
 - Proteína (45-55%)
 - Lípidos (10-16%)
 - Energía (18-20 kJ/100 g)
 - Cenizas (10%)
 - Carbohidratos (<15%)
 - Vitaminas y minerales (3-5%)



Efecto de la temperatura

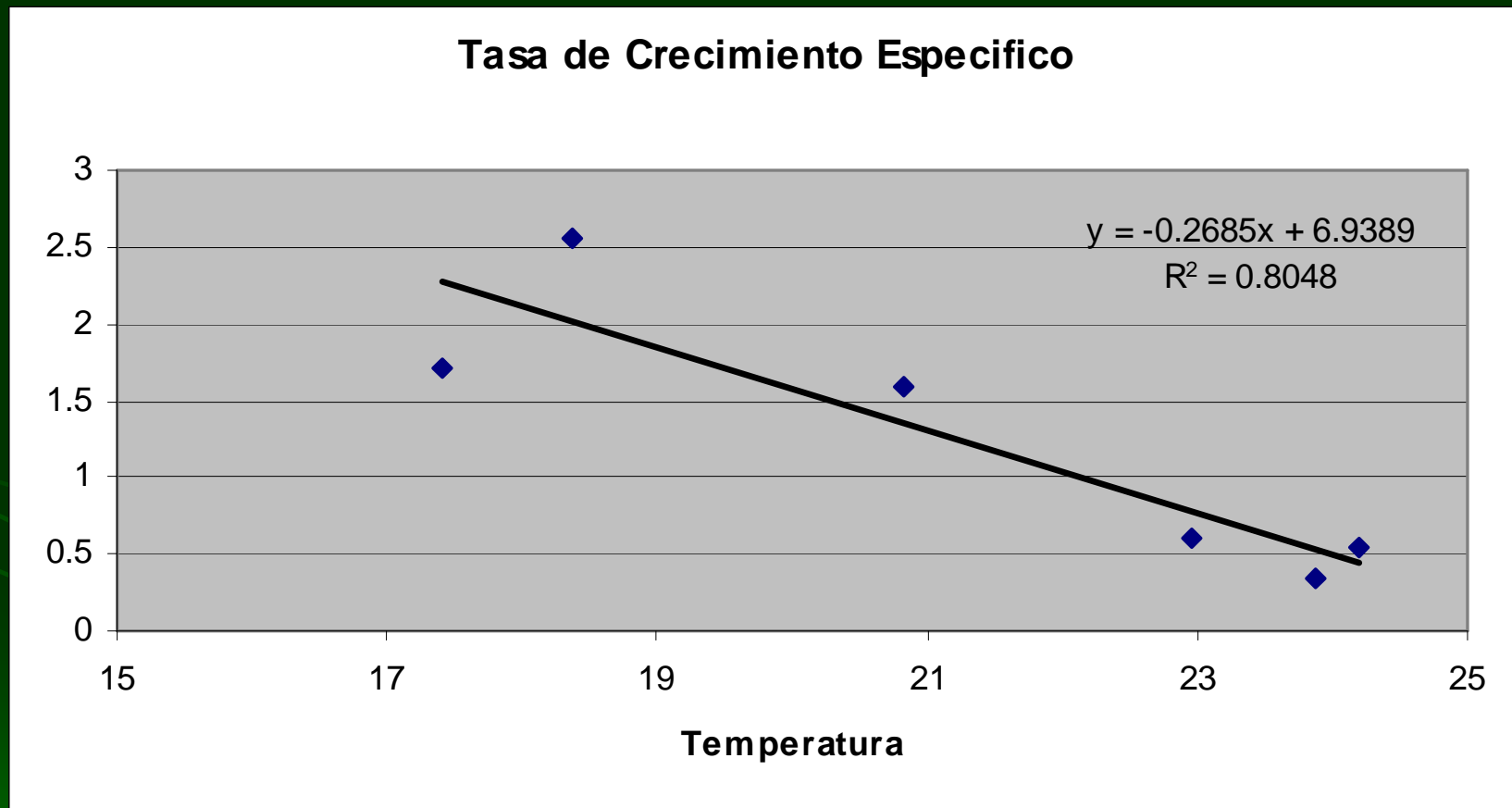
- Que pasa con los organismos a temperaturas mayores a 20 °C?
 - i.e., durante el verano y en el Centro y Sur de México
- Diseño experimental
 - Cuatro temperaturas: 20, 22.5, 25 y 27.5 °C
 - Juveniles de 0.5 g
 - Tres replicas por tratamiento

Efecto de la temperatura (lab)

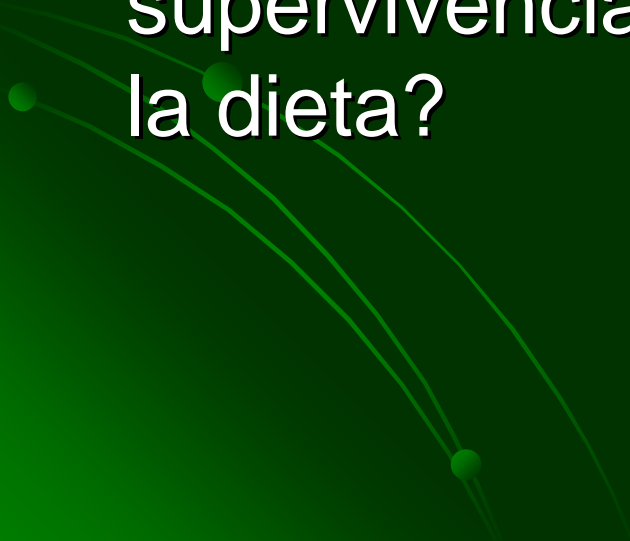


TCA y TEP menores a mayores temperaturas

Efecto de la temperatura Cultivo en granja



Relación E/P y la Temperatura

- Al incrementar la temperatura se incrementa el metabolismo
 - Mayor costo energético
 - Se podría mejorar el crecimiento y la supervivencia incrementando la energía en la dieta?
- 

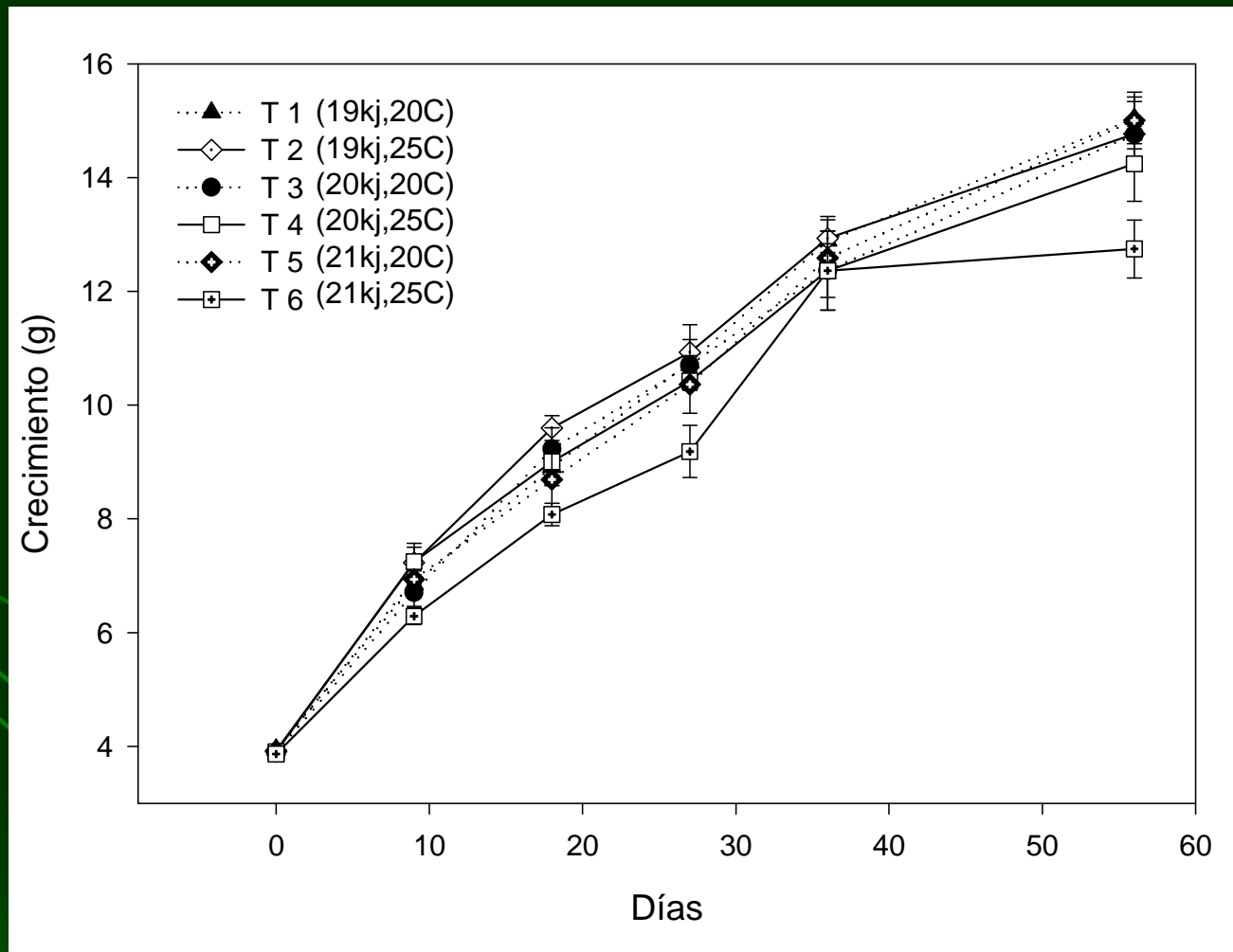
Efecto de E/P vs. Temperatura

- Diseño experimental
 - Incremento de la relación E/P incrementa TCA y TEP a mayores temperaturas?
 - 3 dietas (50% P) experimentales
 - (19, 20, 21 kJ/100g)
 - evaluadas a 2 temperaturas (20 y 25 °C)
 - Juveniles de 3.9 g
 - Tres replicas por tratamiento (3X2 factorial)

Efecto de E/P vs. Temperatura

| Ingredientes | Dieta 1 | Dieta 2 | Dieta 3 |
|------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Harina de músculo de pescado | 45 | 45 | 45 |
| Harina de krill | 7.9 | 7.9 | 7.9 |
| Aceite de pescado | 8 | 10 | 12.1 |
| Almidón | 9 | 10.5 | 11.5 |
| Celulosa | 13.8 | 10.3 | 7.2 |
| Ensílage | 5 | 5 | 5 |
| Gelatina | 5 | 5 | 5 |
| Minerales | 3 | 3 | 3 |
| Vitaminas | 3 | 3 | 3 |
| Cholina | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| α -Tocoferol | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| Composición proximal | | | |
| Proteínas | 52.44 | 51.73 | 50.94 |
| Lípidos | 14.98 | 17.36 | 19.01 |
| Cenizas | 6.94 | 7 | 7 |
| E. L. N | 25.64 | 23.91 | 23.05 |
| Energía (kcal/kg) | 5455.36 | 5536.87 | 5678.32 |
| Energía (kJ) | 19 | 20 | 21 |

Efecto de E/P vs. Temperatura

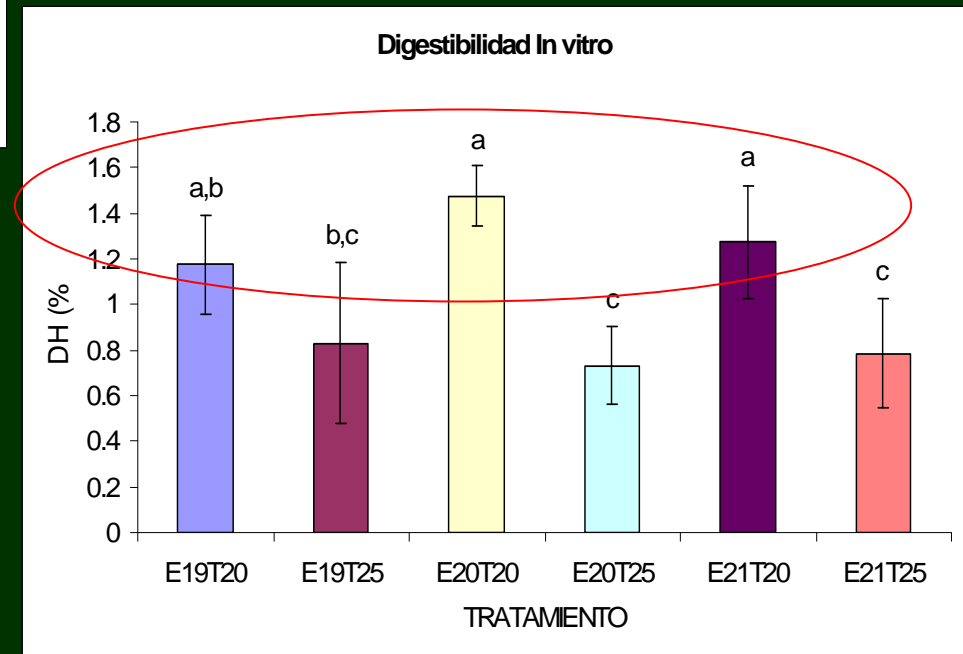
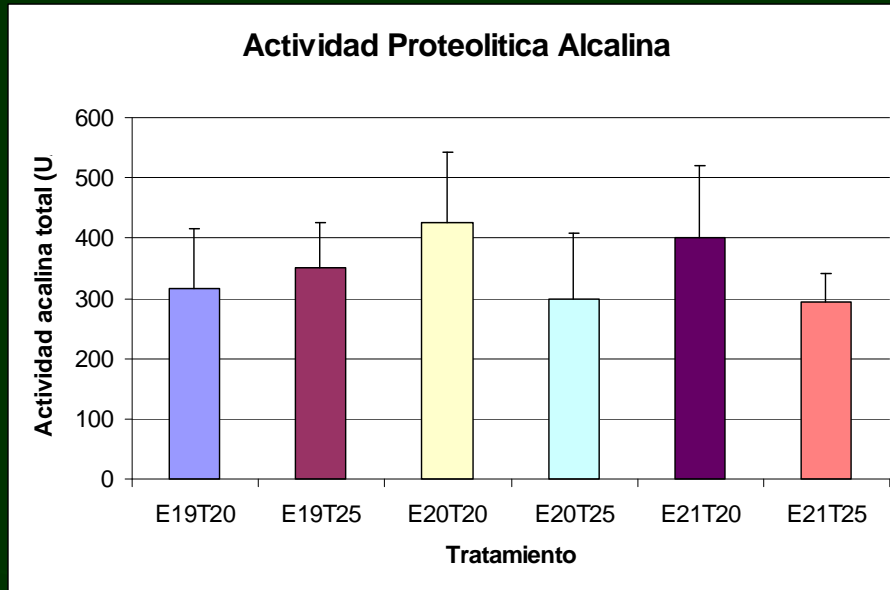


Efecto de E/P vs. Temperatura

| Parámetros | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 |
|--------------------------|------------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | 20°C, 19 kJ | 25°C, 19kJ | 20°C, 20kJ | 25°C, 20kJ | 20°C, 21k | 25°C, 21kJ |
| Longitud inicial (cm) | 6.6±0.05 | 6.6±0.04 | 6.5±0.05 | 6.5±0.06 | 6.7±0.06 | 6.5±0.05 |
| Longitud final (cm) | 9.9±0.18 ^a | 9.5±0.11 ^a | 9.8±0.09 ^a | 9.7±0.37 ^a | 10.1±0.25 ^a | 9.1±0.09 ^b |
| Aumento en longitud (cm) | 3.3±0.19 ^a | 2.9±0.15 ^a | 3.2±0.08 ^a | 3.1±0.31 ^a | 3.4±0.29 ^a | 2.5±0.04 ^b |
| Peso inicial (gr) | 3.9±0.02 | 3.9±0.03 | 3.8±0.05 | 3.9±0.04 | 3.9±0.03 | 3.9±0.02 |
| Peso final (gr) | 15.0±0.38 ^a | 14.7±0.17 ^a | 14.7±0.58 ^a | 14.2±0.66 ^a | 15.1±0.5 ^a | 12.7±0.51 ^b |
| Aumento en peso (gr) | 11.0±0.37 ^a | 10.8±0.16 ^a | 10.8±0.57 ^a | 10.3±0.67 ^a | 11.0±0.4 ^a | 8.7±0.52 ^b |
| TCE (% peso corporal/d) | 5.0±0.05 ^a | 4.9±0.02 ^a | 4.9±0.08 ^a | 4.9±0.10 ^a | 5.0±0.07 ^a | 4.6±0.09 ^b |
| Sobrevivencia | 100±0^a | 92.5±2.5 ^e | 98.3±.83 ^{cab} | 88.3±8.2 ^f | 99.2±.83 ^{ba} | 95±1.4 ^{dabc} |
| IHS | 1.19±0.05 | 1.30±0.10 | 1.35±0.20 | 1.27±0.13 | 1.53±0.14 | 1.14±0.09 |
| TCA | 1.3±0^c | 1.4±0 ^b | 1.4±0 ^b | 1.4±0 ^b | 1.3±0 ^c | 1.6±0 ^a |
| TEP | 1.33±0.04^a | 1.20±0.05 ^b | 1.28±0.08 ^a | 1.10±0.14 ^c | 1.32±0.05 ^a | 1.01±0.07 ^c |
| Digestibilidad (CDA %) | 66.4±0.50 ^a | 67.1±0.84 ^a | 60.2±1.43 ^d | 64.7±1.1 ^b | 62.4±0.26 ^c | 63.1±2.20 ^b |

Mayor aprovechamiento del alimento a 20 C comparado con 25 C
 ¿¿Porque??

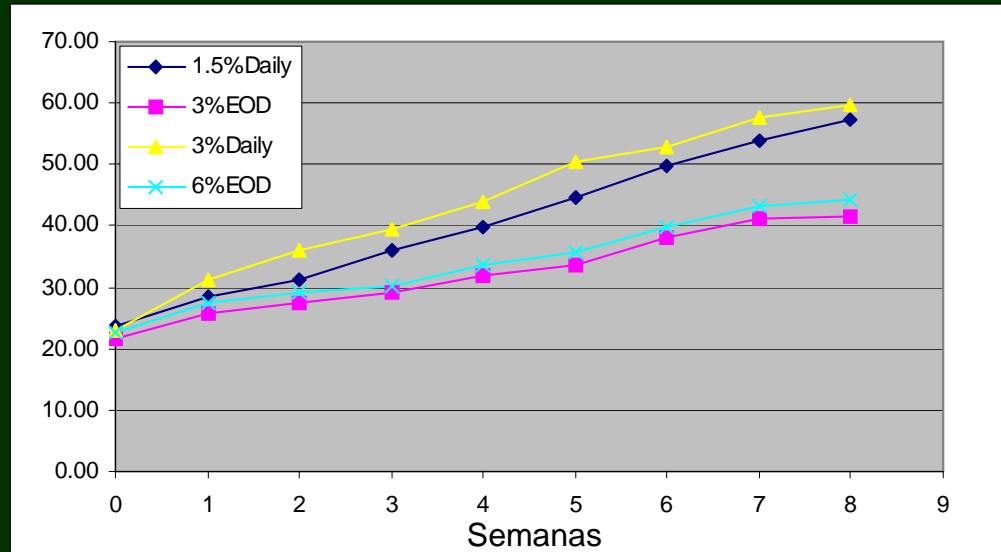
Efecto de la temperatura en la digestibilidad



Efecto de la tasa y frecuencia de alimentación

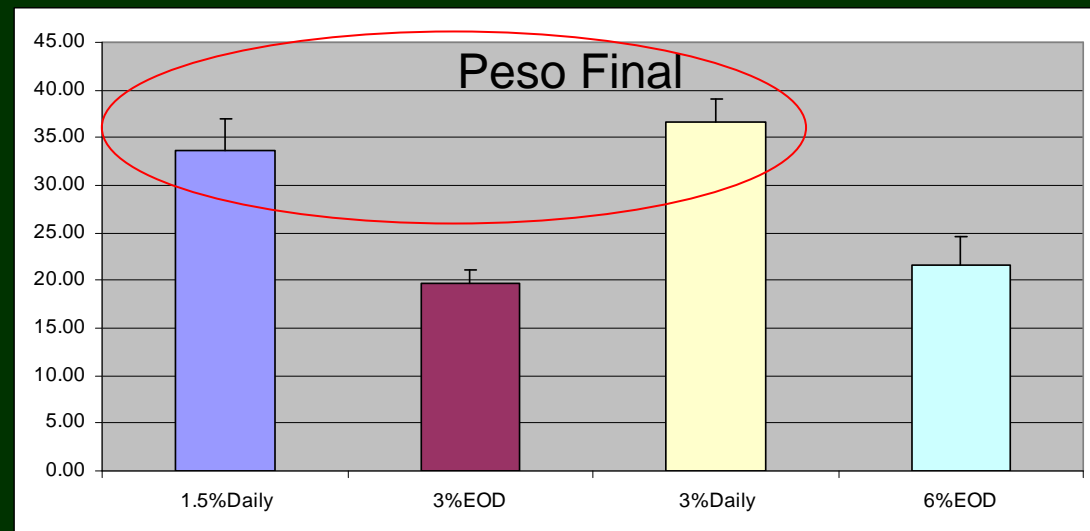
- Antecedentes en Japón (optimo 3-5 % p.c)
- Información anecdotal de alta TCA si no se alimenta diariamente
- Diseño experimental
 - Estudios de condición nutricional y tasas de crecimiento juveniles silvestres
 - Cuatro tasas de alimentación: 1.5% diario, 3% cada dos días, 3% diario y 6% cada dos días
 - Alimentados 2 veces por día
 - 3 replicas por tratamiento
 - Se evaluó el consumo real cada semana

Efecto de la tasa y frecuencia de alimentación



RESULTADOS

Crecimiento



Efecto de la tasa y frecuencia de alimentación

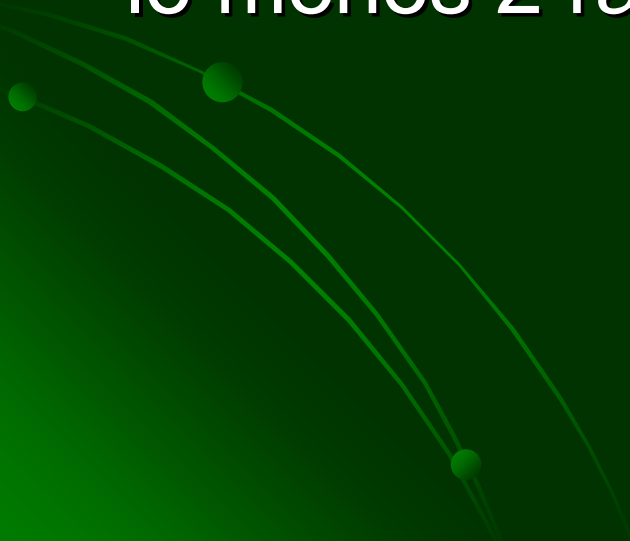
| | 1.5% diario | 3% C2D | 3% diario | 6% C2D |
|--------------------------|-------------|--------|-----------|--------|
| Ganancia en peso g | 33.58 | 19.66 | 36.63 | 21.59 |
| Peso final (g) | 57.39 | 41.38 | 59.76 | 44.37 |
| Supervivencia % | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| Tasa de Crec. Esp. | 1.28 | 1.03 | 1.34 | 1.06 |
| Consumo teórico | 32.35 | 26.13 | 70.20 | 55.02 |
| Consumo real | 27.26 | 16.83 | 30.93 | 22.90 |
| TCA teórico | 0.97 | 1.34 | 1.92 | 2.58 |
| TCA real | 0.82 | 0.86 | 0.85 | 1.07 |
| Consumo Proteína teórica | 17.47 | 14.11 | 37.91 | 29.71 |
| TEP de C.P.T. | 1.92 | 1.40 | 0.97 | 0.73 |
| Consumo Proteína real | 14.72 | 9.09 | 16.70 | 12.37 |
| TEP de C.P.R. | 2.28 | 2.18 | 2.20 | 1.74 |

Conclusiones

- Se puede realizar el destete temprano premetamorfosis (36 DDE)
- Muy importante considerar cambios en la capacidad digestiva de las larvas en la formulación de microdietas para el destete
 - Elaborar dietas estadio específicas
- Se requiere 15% DHA en el enriquecedor de alimento vivo para un buen éxito en el destete

Conclusiones

- No cultivar juveniles a temperaturas superiores 22 C
- Tasa de alimentación del 1.5 a 2% peso corporal y alimentados diariamente en por lo menos 2 raciones



Perspectivas

- Incrementar tasas de ingestión de microdietas
- Evaluar efecto la relación DHA/EPA en el proceso de pigmentación
- Incrementar las tasas de crecimiento con cultivos mosexuales (hembras crecen hasta 3 veces mas)
- Densidad de siembra (500, 750, 1000 o 1500 org/m²)
- Densidad de cultivo (15, 30 o 45 kg/m²)?
- Interés actual de producir 500 TM en los siguientes 2 años

Gracias por su atención



Nota: Aquellos interesados en aspectos prácticos del cultivo del lenguado mañana habrá un taller sobre su cultivo de las 9 a las 12 am