

Fisiología de la Digestión en Larvas de Peces Marinos y sus Aplicaciones al Cultivo Larvario en Masa.

[Alarcón López, F.I.](#) y [Martínez Díaz, M.I.](#)

Dpto. Biología Aplicada, Escuela Politécnica Superior
Universidad de Almería
La Cañada de San Urbano, 04120 Almería (España)

1. Introducción

Antes de los años 70, la producción acuícola de peces marinos se sustentaba exclusivamente de la captura de alevines en el medio natural para su posterior engorde en cautividad. Por tanto, se puede decir que la domesticación de algunas de estas especies ha sido un logro relativamente reciente que ha tenido lugar en las dos últimas décadas. A título de ejemplo, en 1996 la producción de larvas de las principales especies acuicultivadas (dorada y lubina) en los criaderos de los países mediterráneos ascendió a 202 millones de individuos en un total de 85 hatcheries. Por contra, entre los años 1972-82 solo se produjeron algunos cientos de miles de larvas, con una tasa de mortalidad del 95-100 % y de mala calidad. Este éxito se debe fundamentalmente a la mejora de la tecnología utilizada en la reproducción, cultivo larvario y engorde, respaldada con la utilización de nuevos datos biológicos y bioquímicos obtenidos en los laboratorios de investigación españoles, franceses e ingleses.

La cría en masa de grandes cantidades de larvas es el paso previo para la puesta en cultivo a una escala comercial de cualquier pez marino. En la actualidad, los esfuerzos de investigación se dirigen a determinar las condiciones que incrementen la supervivencia y viabilidad de las larvas, así como a caracterizar la evolución fisiológica de las mismas, con objeto de planificar mejor las pautas de alimentación. En este último caso, los estudios se basan en el conocimiento detallado de la fisiología digestiva en las distintas etapas de vida larvaria mediante la determinación de las actividades enzimáticas digestivas como son las actividades proteasa, amilasa, fosfatasa, etc., y resultan tan importantes ya que se ha comprobado que el nivel de actividad de algunas enzimas actúa como un buen indicador del estado nutricional de la larva, de manera que los datos obtenidos pueden ser relevantes para establecer el momento más óptimo para realizar el destete (UEBERSCHÄR, 1993). Otra de las utilidades es que la información obtenida permite realizar comparaciones con otras especies con un posible potencial acuícola, evaluando de esta forma el grado de desarrollo e incluso la posibilidad de utilización de dietas artificiales para reducir los costos de producción en los criaderos.

Como era de esperar, en los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre el desarrollo ontogénico del sistema digestivo en las fases larvarias de numerosas especies de peces marinos, tales como el lenguado (CLARK *et al.*, 1986), rodaballo (SEGNER *et al.*, 1993), bacalao (KJORSVIK *et al.*, 1991), lubina (Cahu y Zambonino, 1995), dorada (SARASQUETE *et al.*, 1993; YÚFERA *et al.*, 1993; MOYANO *et al.*, 1996) y dentón (MARTINEZ *et al.*, 1997).

2. Fisiología digestiva en larvas de peces marinos

Desde un punto de vista ilustrativo se va tratar por un lado, el desarrollo del sistema digestivo (base física para la digestión) y por otro, el desarrollo de la capacidad digestiva (función digestiva

propia mente dicha).

2.1. Desarrollo del sistema digestivo

Las larvas de pez, más concretamente las de peces marinos, son las formas funcionales e independientes más pequeñas de los vertebrados. A pesar de estas limitaciones poseen tasas de crecimiento muy elevadas (hasta mil veces partiendo de escasas decenas de microgramos en peso seco) y una progresiva diferenciación durante la etapa larvaria hasta completar el desarrollo de sus órganos y funciones en las fases juvenil y adulta (BLAXTER, 1988). Para llevar a cabo con eficiencia todos estos cambios, la larva debe estar capacitada para ingerir (acción que implica la búsqueda y captura del alimento) y procesar (digestión, absorción y metabolismo) el alimento. No obstante, hay que considerar que el sistema digestivo de las larvas de peces es morfológica, histológica y fisiológicamente menos desarrollado que el de los peces adultos (GOVONI *et al.*, 1986). En general, BALON (1975) distinguió cinco periodos a lo largo del desarrollo de un pez: embrionario, larval, juvenil, adulto y senescente. El periodo embrionario comprende desde la eclosión hasta el inicio de la alimentación exógena (aunque algunos autores lo consideran hasta la eclosión y denominan fase de prelarva al intervalo comprendido entre ésta y el inicio de la primera alimentación exógena (IL'INA y TURETSKIY, 1988). Durante las fases juvenil y senescente los peces presentan las mismas características que los adultos, salvo la capacidad reproductora. En todas las especies la duración de cada una de estas fases está influenciada tanto por factores ambientales (temperatura del agua, fotoperiodo) como nutricionales (cantidad y calidad del alimento).

A efectos prácticos, DABROWSKI (1982) estableció tres categorías de peces considerando los principales eventos que tienen lugar durante la evolución y desarrollo de su sistema digestivo;

1. En un primer grupo, consideró a los salmónidos y algunos cíclidos, que al inicio de la alimentación exógena presentan ya un estómago bien desarrollado y además funcional. Un desarrollo de este tipo determina que se puede iniciar la alimentación de estas especies directamente con dieta inerte.
2. En el segundo grupo, se engloban la mayoría de los peces marinos, en los que el estómago aparece después de iniciar la alimentación exógena, existiendo en algunas especies hasta cierto desfase entre su aparición y funcionalidad (LAUFF y HOFFER, 1984).
3. En el tercer grupo, se incluyen los peces que permanecen sin estómago a lo largo de toda su vida, como son los ciprínidos, siendo lo más común durante su desarrollo larvario el notable incremento de la longitud del intestino.

Por otra parte, numerosos estudios han demostrado que el sistema digestivo de larvas que nacen de huevos grandes y pesados (*demersales*) está bastante más desarrollado que el de aquellas que nacen de huevos pequeños y flotantes (*pelágicos*).

En las larvas de peces marinos recién eclosionadas el digestivo es un tubo recto y sin diferencias histológicas en su longitud que descansa dorsalmente sobre la vesícula vitelina y está cerrado por ambos extremos (boca y ano). Tan sólo después de la absorción de las reservas vitelinas se pueden observar varias regiones con diferencias histológicas y funcionales (GOVONI, 1980). Existen curiosas excepciones como en los embriones del pez ovovivíparo *Sebastes melanops*, que presentan un digestivo abierto por ambos extremos y además reciben un aporte de alimento adicional a partir del fluido ovárico durante toda la gestación (BOEHLERT y YOKLAVICK, 1984). La metamorfosis de larva a juvenil supone el desarrollo del estómago, así como de los ciegos pilóricos intestinales.

Morfológicamente, en el digestivo diferenciado de la larva se distinguen tres segmentos; 1) el intestino anterior que comprende el 60-75% de la longitud e interviene en los procesos de degradación de lípidos, 2) el intestino medio cuyas células absorptivas muestran vacuolas supranucleares electrodensas procedentes de procesos de pinocitosis de proteínas y 3) el intestino posterior que

representa un 5% de la longitud intestinal y dadas las características de sus enterocitos (menor cantidad de microvellosidades) parece intervenir principalmente en procesos de recuperación de agua e iones.

2.2. Desarrollo de la capacidad digestiva.

En la mayoría de los estudios realizados se observa un incremento progresivo en la actividad de las enzimas digestivas con la edad, aunque en muchos casos puede verse interrumpido temporalmente por descensos bruscos, posiblemente debidos a los cambios morfológicos (maduración del digestivo) y/o nutricionales (cambio de alimentación) que tienen lugar durante los distintos estadios del desarrollo larvario (HOLT, 1993; UEBERSCHAR, 1993). No es sorprendente, dado el alto contenido proteico tanto en las presas vivas como en las dietas inertes, que una gran proporción de los trabajos científicos verse sobre las proteasas digestivas. Se ha comprobado que la actividad más temprana corresponde a proteasas alcalinas, lo que resulta lógico dado que la actividad proteasa ácida está estrechamente relacionada con la aparición de un estómago funcional, fenómeno que tienen lugar más tardíamente.

A efectos comparativos en la Figura 1 se muestra el esquema del desarrollo ontogénico de varias especies de peces elaborado a partir de datos de otros autores.

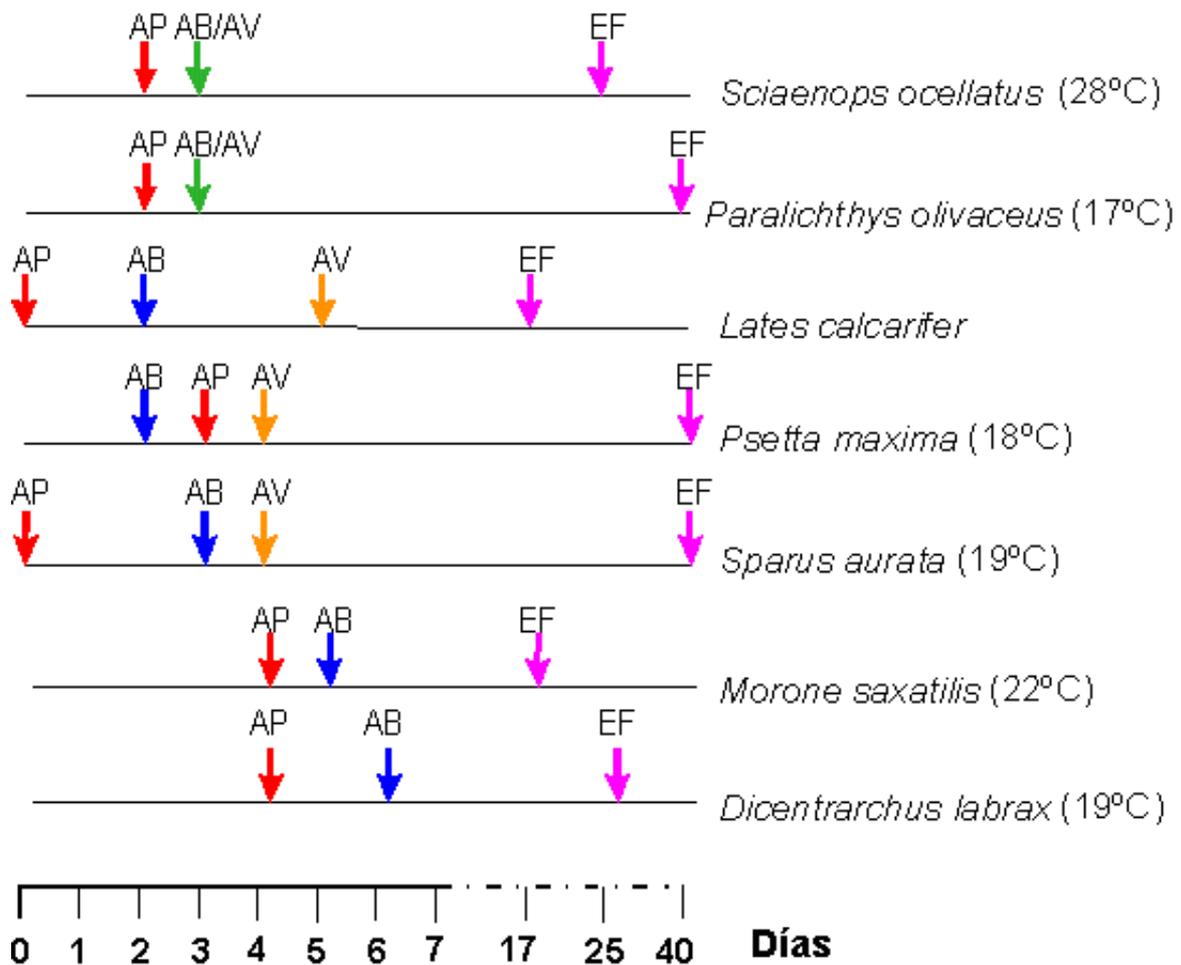


Figura 1. Comparación de los principales eventos que tienen lugar en el sistema digestivo durante el desarrollo larvario de varias especies de peces marinos. AP: actividad proteasa, AB: apertura de la boca, AV: absorción del vitelo, EF: estómago funcional (modificado de MOYANO *et al.*, 1996).

Por un lado, se han destacado los principales eventos en el desarrollo del sistema digestivo y por otro, la aparición de la actividad proteasa alcalina. Estos datos podrían ser utilizados para evaluar la capacidad que tienen las larvas de las distintas especies comparadas para utilizar dietas artificiales. Por ejemplo, en todos los casos (a excepción del rodaballo) se detecta actividad proteasa alcalina antes de la apertura de la boca, lo que demuestra que antes de ingerir su primer alimento las larvas

comienzan a desarrollar su equipamiento enzimático. En todos los casos, salvo para rodaballo, existe un periodo relativamente largo entre la apertura de la boca y el desarrollo de un estómago funcional. Dado el papel crucial que tiene el estómago en la digestión proteica, los altos niveles de proteasas alcalinas detectados en algunas de estas especies podrían compensar la carencia de estómago durante los primeros estadios del desarrollo larvario.

3. Aplicaciones del conocimiento de las enzimas digestivas.

Como se dijo anteriormente, es usual en la cría larvaria de peces utilizar ciertos indicadores del estado nutricional del cultivo. Entre ellos se emplean índices basados en parámetros histológicos (diámetro nuclear de los hepatocitos, tamaño de los enterocitos) y bioquímicos tales como el índice RNA/DNA (BRIHTMAN *et al*, 1997). Aunque son bastante fiables, resultan muy tediosos de calcular y no detectan las variaciones que se producen a corto plazo. Por contra, el análisis de las proteasas digestivas resulta muy sencillo y además, algunos autores han relacionado sus niveles con la viabilidad de las larvas y más concretamente con su capacidad de crecimiento (UEBERSCHAR, 1988).

El estudio de la evolución de las principales actividades enzimáticas digestivas (proteasas, amilasas, lipasas, etc.) durante el desarrollo larvario puede proporcionar una información muy útil para evaluar el estado general del cultivo. Con este propósito se emplean diversas técnicas bioquímicas y electroforéticas (basadas en el uso combinado de sustratos, inhibidores específicos y electroforesis en geles de poliacrilamida) que permiten conocer de manera más detallada y precisa el tipo y niveles de enzimas digestivas presentes en cada momento del desarrollo larvario de cualquier especie.

Por un lado, mediante simples ensayos bioquímicos en tubo se pueden determinar las principales actividades enzimáticas digestivas de las larvas y hacer un seguimiento de éstas durante su desarrollo ontogénico. En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos durante el desarrollo larvario de dorada y dentón. En ambos casos se comprueba un notable incremento de las diferentes actividades con la edad. Con estos datos se puede afirmar que las condiciones de cultivo determinan un desarrollo adecuado de las larvas ya que los valores de actividad encontrados son similares a los determinados en otras especies marinas en las que su cultivo está optimizado. Curiosamente y a pesar de tener un esquema de alimentación similar se aprecia un desarrollo del equipo enzimático más acelerado en el dentón que en la dorada (nótese las diferencias en la escala).

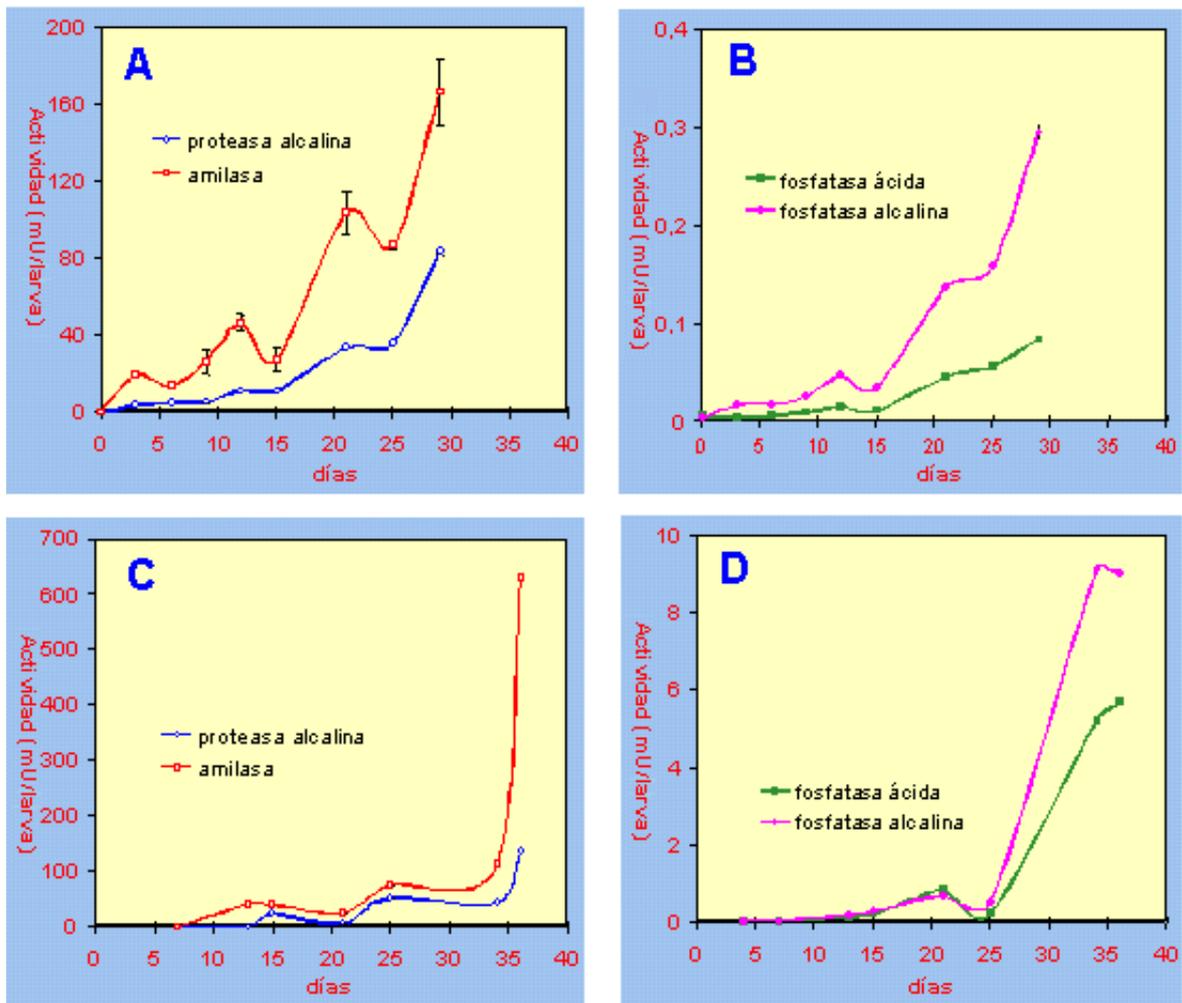


Figura 2. Evolución de las actividades proteasa y amilasa (A y C) y fosfatasa ácida y alcalina (B y D) expresadas en mU/larva a lo largo del desarrollo ontogénico de dorada (A y B) y dentón (C y D).

De otro, utilizando inhibidores específicos se puede conocer la clase de enzimas que actúan en el digestivo de la larva. Mediante este análisis se puede evaluar la importancia relativa de las enzimas exógenas (presentes en el alimento vivo) en la digestión final del alimento ingerido por la larva. En el caso concreto de las proteasas, la caracterización se lleva a cabo mediante inhibidores comerciales que indican la clase de enzimas que componen un extracto. Continuando con el ejemplo de las larvas de dorada, sus proteasas alcalinas (Tabla 1) son principalmente enzimas de clase serina proteasa (inhibición con SBTI, inhibidor trípico de la soja), principalmente de tipo quimotripsina aunque también se detecta la presencia de tripsina. Por lo que respecta a los extractos de rotíferos y nauplios de *Artemia* también muestran enzimas de clase serina proteasa pero con un perfil de inhibición muy diferente al encontrado en los extractos digestivos larvarios. Las diferencias encontradas en los perfiles de inhibición de ambos tipos de extractos (presas vivas y larvas) evidencian que la mayoría de las proteasas presentes en el digestivo de la larva no se corresponden con las de sus presas.

		Porcentaje de inhibición									
Inhibidor	Clase caracterizada	Muestras									
		L3	L4	L5	L6	L8	L15	L21	L30	R	N
<i>PMSF</i>	Serina proteasas	0	33	22	22	21	nd	23	22	10	100
<i>SBTI</i>	Serina proteasas	0	83	76	62	78	63	64	74	39	100
<i>TLCK</i>	Tripsina	0	25	2	6	12	4	8	10	0	56

TPCK	Quimotripsina	0	0	0	35	49	24	11	39	0	73
ZPCK	Quimotripsina	0	0	8	39	53	7	12	47	0	8
Abreviaturas: L = Larvas de dorada (<i>Sparus aurata</i>) con n (3 hasta 30) días de vida. R = Rotífero (<i>Brachionus plicatilis</i>). N = Nauplios de <i>Artemia</i> .. nd = no determinado.											

Tabla 1. Caracterización bioquímica de las proteasas presentes en los distintos extractos mediante inhibidores específicos usando caseína como sustrato (modificado de DÍAZ *et al.*, 1997).

Finalmente, esta caracterización bioquímica se puede complementar con estudios de electroforesis (DÍAZ *et al.*, 1997). Los estudios de electroforesis representan una herramienta fundamental en la valoración y caracterización del equipamiento enzimático digestivo de una especie determinada, tanto de larvas como adultos. Generalmente, en la mayoría de los peces la actividad digestiva más ampliamente estudiada corresponde a las proteasas digestivas, lo que parece razonable dada la importancia de la proteína en sus dietas (hasta un 50 %), sin embargo se puede hacer extensiva a otras enzimas digestivas tales como la actividad amilasas y lipasa.

Mediante esta técnica se puede hacer un seguimiento de la evolución ontogénica de las enzimas digestivas a lo largo del desarrollo larvario de cualquier especie acuicultivada. Se puede determinar cuando se deben de realizar los cambios de alimentación y cual es el momento más adecuado para el destete.

Con esta técnica, en dorada y dentón (Figura 3) se confirmó la presencia de dos enzimas diferentes con actividad caseinolítica (degradan la caseína) al inicio de la alimentación exógena y un incremento en su número a medida que lo hace la edad de la larva. Para el dentón, en el momento del destete (sobre el día 32 de cultivo larvario) se comprobó que estaban presentes todas las bandas detectadas en los ejemplares juveniles (animales con sus capacidades digestivas plenamente desarrolladas). Por el contrario, las larvas de dorada con 30 días sólo mostraron tres proteasas comunes con los ejemplares juveniles. Confirmando los resultados obtenidos con inhibidores específicos, en ninguno de los zimogramas larvarios se observa la presencia de las proteasas presentes en el alimento vivo, lo que manifiesta tan sólo un posible efecto cualitativo de estas últimas en el proceso digestivo de las larvas.

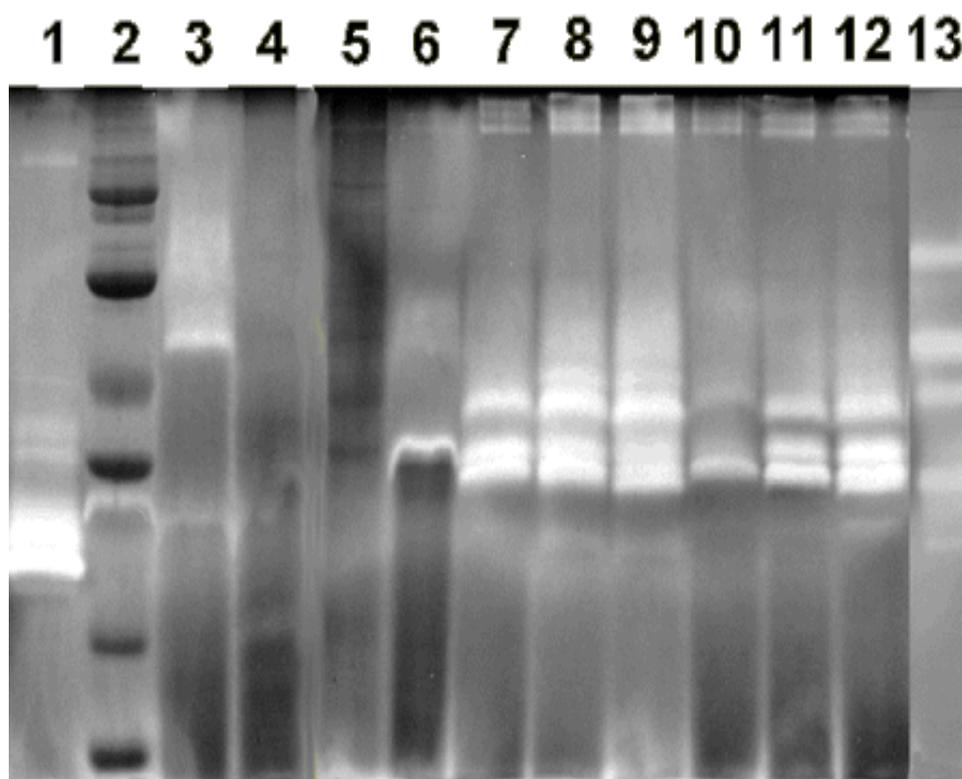


Figura 3.a. Sustrato-SDS-PAGE obtenido a partir de los extractos larvarios de dorada a diferentes días después de la

eclosión, ciegos pilóricos de dorada juvenil, nauplios de *Artemia* y rotíferos. Carril 1 = tripsina de bacalao (10 m g), carril 2 = MWM, marcador de masas moleculares (5 m g), carril 3 = rotífero, carril 4 = nauplios de *Artemia*, carriles 5 a 12 = extractos de larvas de 3, 4, 5, 6, 8, 15, 21 y 30 días y carril 13 = extracto de ciegos pilóricos de dorada juvenil.

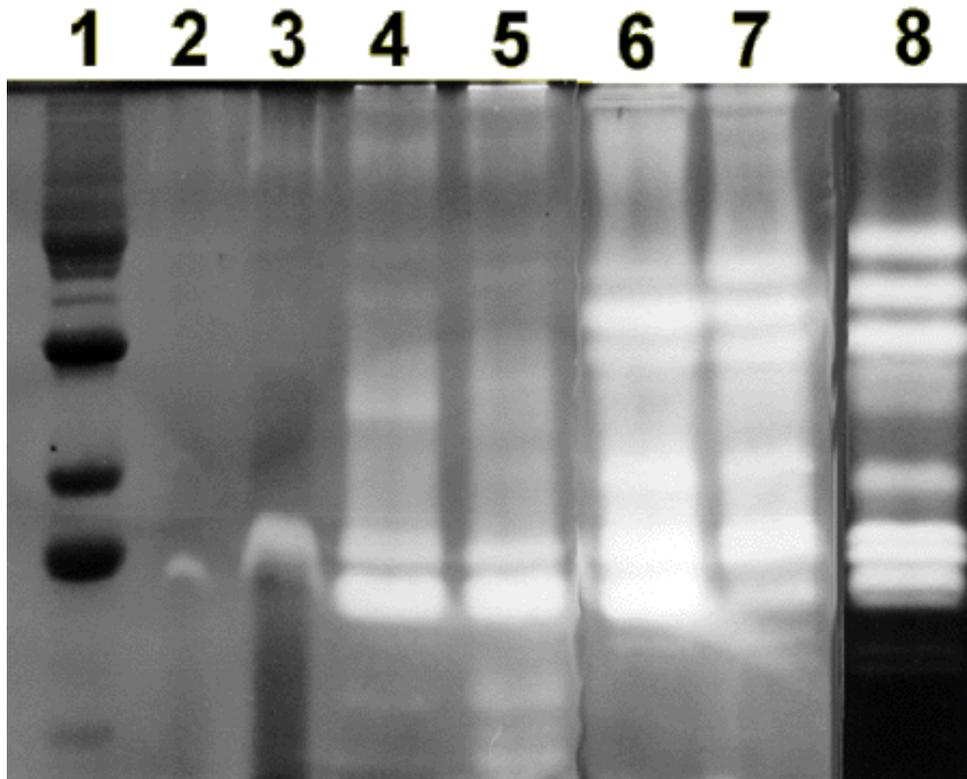


Figura 3.b. Sustrato-SDS-PAGE obtenido a partir de los extractos larvarios de dentón a diferentes días después de la eclosión y ciegos pilóricos de dentón juvenil. Carril 1 = MWM (5 m g), carril 2 a 7 = extractos de larvas de 4, 7, 13, 25, 32 y 36 días y carril 8 = extracto de ciegos pilóricos de dentón juvenil.

4. Aplicaciones del conocimiento de la fisiología digestiva en el diseño de dietas inertes.

Puede llegar a ocurrir que desde un punto de vista nutricional, el alimento vivo no siempre sea el más adecuado para el cultivo larvario. Es común que el suministro de este tipo de alimento puede verse interrumpido por problemas en su cultivo ocasionados por múltiples factores. Por ejemplo, la calidad nutritiva y precio de los nauplios de *Artemia* puede variar en función del lugar de origen de los quistes (VERSICHELLE *et al.*, 1989), igualmente no en pocos casos se han descrito como vectores de ciertas enfermedades que han causado serios problemas en el cultivo (parásitos, bacterias, virus, etc.). Además, en un cultivo masivo de alimento vivo se requiere espacio, energía, mano de obra, etc.. Las dietas artificiales ofrecen, en contraposición, fácil disponibilidad, más bajos costos de producción, mayor flexibilidad en las fórmulas y la posibilidad de adelantar el destete. A pesar de todas estas ventajas, los esfuerzos por sustituir las presas vivas por alimento inerte sólo han tenido un éxito parcial, tanto en lo que se refiere al número de especies a las que se puede aplicar, como a la supervivencia obtenida.

Llegado a este punto, es necesario diferenciar entre microdietas y dietas microencapsuladas. Las primeras son preparados heterogéneos con un tamaño de partícula limitado por el proceso mecánico de rotura. El diámetro de las partículas determina que no se puedan suministrar durante las primeras fases larvarias de un cultivo de peces marinos, limitando su uso a las fases intermedias del cultivo, sobre todo en el momento del destete. Por contra, el segundo tipo de preparados resulta muy homogéneo en su composición y aunque resultan más laborioso el proceso para su fabricación, se pueden preparar micropartículas que puedan ser ingeridas sin dificultad por larvas con escasos días de vida. Resulta evidente la potencialidad de este último tipo de dietas para poder llegar a sustituir a los

hasta ahora siempre necesarios cultivos auxiliares.

No obstante existen ciertas limitaciones en el uso de este tipo de alimentos. Entre ellas se pueden destacar:

1. **Equilibrio nutritivo de la fórmula.** Es fundamental conocer los requerimientos nutricionales de las larvas de distintas especies a la hora de diseñar una dieta artificial con la que sustituir el alimento vivo, además para su formulación debe de tenerse en cuenta la composición química tanto del zooplanctón del que se alimentan como la composición corporal de cada especie en cuestión. Hasta la fecha las aproximaciones para conocer los requerimientos específicos de los diferentes estadios larvarios se basaban en resultados de composición corporal, crecimiento y mortalidad, lo que refleja la falta de conocimiento para el diseño de dietas inertes.
2. **Homogeneidad de las partículas y tamaño de las partículas.** En función del desarrollo del cultivo larvario es necesario suministrar un tipo de partícula concreta.
3. **Densidad de las partículas.** El mantenimiento de las micropartículas en suspensión en los tanques de cría a densidades suficientemente altas y moviéndose con suficiente lentitud es necesario para permitir una fácil captura por parte de la larva.
4. **Estabilidad en el agua.** El diseño de las microdietas o microcápsulas debe de evitar las pérdidas de nutrientes por lavado en el agua.
5. **Solubilidad y digestibilidad.** Una vez en el interior del digestivo deben de ser fácilmente solubilizadas para mejorar su digestibilidad. La estructura y composición de la micropartícula debe permitir a la larva su digestión, ya que la existencia de un digestivo poco desarrollado en los primeros estadios dificulta el procesado de este alimento.
6. **Atracción de la larva por la micropartícula.** No hay demasiados estudios sobre el uso de atrayentes para aumentar la tasa de ingesta, sin embargo se sabe que un extracto de músculo de mejillón o una mezcla sintética de sustancias que lo imiten aumenta el apetito de peces jóvenes (TANDLER *et al.*, 1982).
7. **Estabilidad en el envasado y almacenado.**

Resulta sorprendente que la mayoría de los factores son de naturaleza física y por tanto reflejan la importancia de adecuar el alimento a la morfología, fisiología y el medio físico de la larva.

En algunas especies se ha constatado la ingestión, pero no digestión, de microcápsulas, siempre que éstas se proporcionaron como único alimento a edades demasiado tempranas (VAN DAMME *et al.*, 1989; KÖCK y HOFER, 1989; HOLT, 1993; WALFORD y LAM, 1993). Algunos autores han propuesto, como solución a la baja digestibilidad encontrada con este tipo de alimento, la elaboración de microcápsulas que incorporen aminoácidos libres en mayor cantidad, así como moléculas de bajo peso que puedan ser fácilmente absorbidas por los enterocitos de las paredes intestinales. A esta solución se planteó el inconveniente de que las técnicas de elaboración de microcápsulas implican la existencia de poros en las cubiertas que ocasionarían la pérdida de tales sustancias al exterior por lavado en el agua marina del cultivo. Desde esta perspectiva, los últimos estudios apuntan hacia el diseño de microcápsulas más complejas que tengan la capacidad de liberar atrayentes de bajo peso molecular, tales como aminoácidos libres, con objeto de aumentar la ingestión por parte de la larva pero que a su vez retengan con mayor eficacia vitaminas, minerales y en general su contenido nutritivo (OZKIZILCIK y CHU, 1996) (Figura 4).

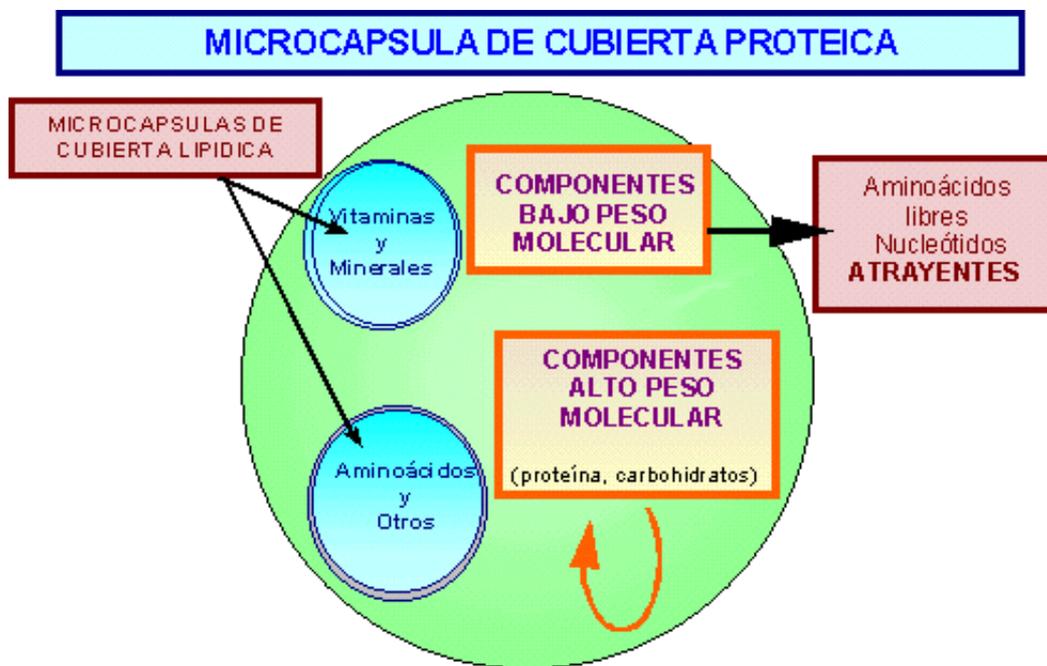


Figura 4. Modelo de dieta microencapsulada para larvas de peces marinos. Modificada de GABOTT *et al.*, (1976).

A pesar de todos estos inconvenientes las expectativas futuras en este campo son bastante prometedoras, sobre todo por el uso de técnicas *in vitro* que facilitan en gran medida el diseño de dietas microencapsuladas mucho más eficaces. Recientemente se ha sustituido totalmente en un cultivo larvario de dorada el alimento vivo por una dieta microencapsulada elaborada de acuerdo con una serie de orientaciones obtenidas mediante este tipo de ensayos. Los resultados obtenidos son bastante alentadores ya que las tasas de crecimiento registradas son similares a las de un lote control alimentado con presas vivas (YUFERA *et al.*, 1996). En la Figura 5 se muestra la degradación de dos tipos diferentes de microcápsulas, una elaborada con caseína y otra con ovoalbúmina como principales ingredientes proteicos, por las proteasas digestivas de larvas de dorada de 8 días de edad. La realización de electroforegramas secuenciales durante el transcurso de la hidrólisis enzimática y la representación gráfica de la variación de densidad óptica de las principales proteínas en densitogramas permite visualizar con más detalle el proceso de hidrólisis de la proteína en cada tipo de microcápsula. Nótese que al comparar el proceso de degradación, se aprecia una marcada disminución de las fracciones proteicas de las microcápsulas fabricadas con caseína en tanto que para la que contienen ovoalbúmina se observa una persistencia de las principales proteínas que la componen que indica la baja degradabilidad de éstas por las enzimas digestivas larvarias.

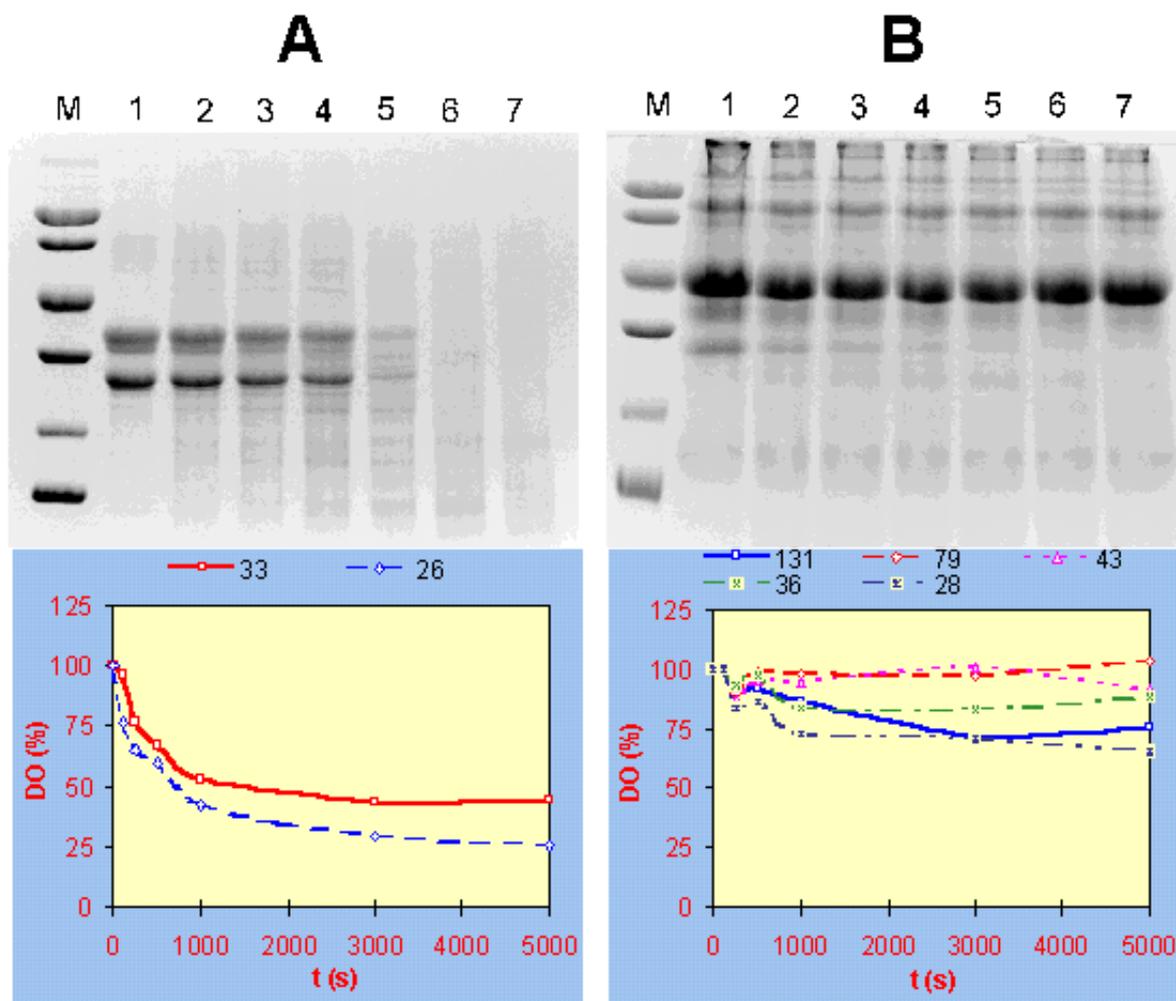


Figura 5. Variación del perfil densitométrico (expresado en % sobre DO inicial) a diferentes intervalos de tiempo (en segundos) durante el proceso de digestión por extractos enzimáticos larvarios de las principales fracciones proteicas presentes en los electroforegramas de (A) microcápsulas de caseína y (B) microcápsulas de ovoalbúmina. M = marcador de masa molecular. Carriles 1 a 7 = corresponden a muestras tomadas a los 0, 100, 250, 500, 1000, 3000 y 5000 s de hidrólisis. La masa molecular de las principales bandas proteicas se expresa en kDa.

Otra de las líneas de mejora de este tipo de dietas se basa en la adición de enzimas exógenas que faciliten su digestión por las larvas. Hasta la fecha los datos para dorada y lubina confirman una mejor digestibilidad de las microcápsulas suplementadas con enzimas de mamíferos (KOLKOVSKI *et al.*, 1993; KOLKOVSKI *et al.*, 1997). Una aportación más es el desarrollo de microencapsulados que incorporen probióticos, sobre todo teniendo en cuenta la resistencia que confieren frente a ciertos patógenos. En este último campo se han realizado algunas experiencias encontrándose cierta mejora en los resultados de supervivencia del cultivo larvario (GARCÍA DE LA BANDA *et al.*, 1992; METAILLER y HOLLOCOU, 1991).

Los datos obtenidos en todos estos experimentos indican buenas perspectivas en el desarrollo de este tipo de alimento. No obstante, se debe ser prudente sobre todo considerando que por el momento la mayoría de los indicadores empleados para determinar el estado en que se encuentra un cultivo larvario se basan en datos cuantitativos de crecimiento y supervivencia. Numerosos investigadores sugieren la necesidad de otros indicadores que evidencien con más detalle los cambios morfológicos y funcionales que tienen lugar en la larva como respuesta a los diferentes tipos de dietas suministradas. Estos estudios se basan en observaciones al microscopio electrónico del grado de desarrollo del sistema digestivo así como de otros órganos relacionados con el estado nutricional de la larva (SEGNER *et al.*, 1993) y con determinaciones de las actividades enzimáticas digestivas (MOYANO *et al.*, 1996).

Se puede concluir que para cada especie y etapa del cultivo larvario se requiere un control y conocimiento exhaustivo de todos los parámetros implicados en el proceso, desde los meramente

medioambientales hasta otros relacionados con la alimentación, la nutrición y el desarrollo fisiológico. Como se ha reflejado en esta revisión, en la actualidad ya se dispone de numerosas herramientas muy útiles para mejorar la producción, rentabilidad y diversificación de los cultivos larvarios de peces marinos.

5. Bibliografía.

- **Ballon, E.K.** (1975). Terminology of intervals in fish development. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 32: 1663-1670.
- **Blaxter, J.H.S.** (1988). Pattern and variety in development. In: *Fish Physiology*, vol XIA (Hoar, W.S. & Randall, D.J., eds.). Academic Press, San Diego, pp 1-58.
- **Boehlert, G.W. & Yoklavich, M.M.** (1984). Reproduction, embryonic energetic and the maternal-fetal relationship in the viviparous genus *Sebastes*. *Biol. Bull.*, 167: 354-370.
- **Brightman, R.I., Torres, J.J., Donnelly, J. & Clarke, M.E.** (1997). Energetics of larval red drum, *Sciaenops ocellatus*. 2. Growth and biochemical indicators. *Fish. Bull.*, 95(3): 431-444.
- **Cahu, C.L. & Zambonino Infante, J.L.** (1995). Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiol. Biochem.*, 14(6): 431-437.
- **Clark, J., Murray, K. R. & Stark, J. R.** (1986). Protease development in Dover sole (*Solea solea*). *Aquaculture*, 53: 253-262.
- **Dabrowski, K.** (1982). Proteolytic enzyme activity decline in starving fish alevins and larvae. *Env. Biol. Fish.*, 7: 73-76.
- **Diaz, M., Moyano, F.J., Garcia-Carreño, F.L., Alarcon, F.J. & Sarasquete, M.C.** (1997). Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aqu. Inter.*, 5: 00-00. (In press)
- **Gabott, P.A., Jones, D.A. & Nichols, D.H.** (1976). Studies on the design and acceptability of micro-encapsulated diets for marine particle feeders. II Bivalve molluscs. *Eur. Symp. Mar. Biol.*, 1: 127-141.
- **García de la Banda, I., Chereguini, O. & Rasines, I.** (1992). Influencia de la adición de bacterias lácticas en el cultivo larvario de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 8(2): 247-254.
- **Govoni, J. J., Boehlert, G. W. & Watanabe, Y.L.** (1986). The physiology of digestion in fish larvae. *Envir. Biol. Fish.*, 16: 59-77.
- **Govoni, J.J.** (1980). Morphological, histological and functional aspects of alimentary canal and associated organ development in larval *Leiostomus xanthurus*. *Rev. Can. Biol.*, 39: 69-80.
- **Holt, G.J.** (1993). Feeding larval red drum on microparticulate diets in a closed recirculating water system. *J. World Aquac. Soc.*, 24(2):225-230.
- **Il'ina, I. D. & Turetskiy, V.I.** (1988). Development of the digestive function in fishes. *J. Ichthyol.*, 28(1): 74-82.
- **Kjorsvik, e., Van der Meeren, T., Kryvi, H., Arnfinnson, J. & Kvenseth, P.G.** (1991). Early development of the digestive tract of cod larvae, *Gadus morhua* L., during start-feeding and starvation. *J. Fish. Biol.*, 38: 1-15.
- **Köck, G. & Hofer, R.** (1989). The effect of natural and artificial diets upon trypsin activity of roach (*Rutilus rutilus*) and whitefish (*Coregonus sp.*) larvae. *Pol Arch. Hydrobiol.*, 36(4): 443-453.
- **Kolkovski, S., Tandler, A. & Izquierdo, M.S.** (1997). The effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*
- **Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G. WM. & Gertler, A.** (1993). The effects of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 12: 203-209.
- **Lauff, M. & Hofer, R.** (1984). Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture*, 37: 335-346.

- **Martínez, M.I., Alarcón, F.J., Dehesa, M.R. & García, A.** (1997). Evolución del equipamiento enzimático digestivo a lo largo del desarrollo larvario del dentón (*Dentex dentex*). *Actas VI Congr. Nac. Acuicultura*, (pp. 509-514).
- **Metallier, R. & Hollocou, Y.** (1991). Incorporation de quelques probiotiques dans l'alimentation du juvenile de bar (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Nutrition in Practice, Biarritz Ed. INRA, PARIS (Les Colloques)* 61: 429-432.
- **Moyano, F.J., Diaz, M., Alarcon, F.J. & Sarasquete, M.C.** (1996). Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.*, 15: 121-130.
- **Ozkicilzik, S. & Chu, F.L.E.** (1996). Preparation and characterization of a complete microencapsulated diet for striped bass *Morone saxatilis* larvae. *J. Microencapsulation*, 13(3): 331-43.
- **Sarasquete, M. C., Polo, A. & Gonzalez de Canales, M. L.** (1993). A histochemical and immunohistochemical study of digestive enzymes and hormones during the larval development of *Sparus aurata* L. *Histochem. J.*, 24: 337-344.
- **Segner, H., Rösch, R., Verreth, J. & Witt, U.** (1993). Larval nutritional physiology: studies with *Clarias gariepinus*, *coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. *J. World Aquacult. Soc.*, 24: 121-139.
- **Smoragiewicz, W., Bielecka, M., Babuchowski, A., Boutard, A. & Dubeau, H.** (1993). Les probiotiques. *Can. J. Microbiol.* 39. 1089-1095.
- **Tandler, A., Kanazawa, A. & Sakamoto, M.** (1982). Effect of food attractants on appetite and growth rate of gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *J. Fish Biol.*, 20: 673-681.
- **Ueberschär, B.** (1988). Determination of the nutritional condition of individual marine fish larvae by analyzing their proteolytic enzyme activities with a highly sensitive fluorescence technique. *Meeresforsch. Rep. Mar. Res.*, 32: 144-154.
- **Ueberschär, B.** (1993). Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. In: *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. (Walther, B. T. & Fuhn, H. J., Eds.), Univ. of Bergen, Norway.
- **Van Damme, P., Janssen, G. & Ollevier, F.** (1989). Proteolytic enzymes in *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) larvae fed with dry diets. *Eur. Aquac. Soc. Esp. Public.*, 10: 255-256.
- **Versichelle, D., Léger, P., Lavens, P. & Sorgeloos, P.** (1989). L'utilisation d'artémia. In: *Aquaculture* (G. Barnabé, ed.). Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, pp. 241-259.
- **Walford, J. & Lam, T.J.** (1993). Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 109: 187-205.
- **Yufer, M., Pascual, E., Polo, A. & Sarasquete, M.C.** (1993). Effect of starvation on the feeding ability of gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae at first feeding. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 169: 259-272.
- **Yufer, M., Sarasquete, M. C. & Fernandez-Diaz, C.** (1996). Testing protein-walled microcapsules for the rearing of first-feeding gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Mar. Freshwater Res.*, 47:211-216.

