

JACUMAR
JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS

PLANES NACIONALES DE CULTIVOS MARINOS

CULTIVO DEL LENGUADO

Informe Final

PLAN NACIONAL PARA EL CULTIVO DEL LENGUADO

1. DATOS ADMINISTRATIVOS

TITULO: Desarrollo de los principales aspectos para el cultivo integral del lenguado (*Solea senegalensis*)

PLAN NACIONAL DE: Cultivo del lenguado

FECHAS DE REALIZACION

Inicio del Plan: Enero 2002

Finalización del Plan: Diciembre 2004

PARTICIPANTES

1. Comunidad Autónoma de Andalucía.

Responsable en la Comunidad: José Carlos Manzano.

Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica. Junta de Andalucía

Tabladilla s/n. 41071. Sevilla.

Teléfono 955032090. Fax 955032142.

e-mail: josec.manzano@juntadeandalucia.es.

Responsable del subproyecto: José Pedro Cañavate.

Centro de Investigación y Formación Acuicola y Pesquera “El Toruño”. Apartado 16. 11500 Puerto de Santa María. Cádiz.

Teléfono: 956011312. Fax: 956011324.

e-mail: josep.canavate@juntadeandalucia.es.

2. Comunidad Autónoma de Cantabria.

Responsable en la Comunidad: Paloma Lanuza.

Consejería de Ganadería, Agricultura y Pesca. Gobierno de Cantabria.

C/ Gutierrez Solana, s/n (Edificio Europa). 39011. Santander.

Teléfono: 942207835. Fax: 942207803.

e-mail: lanuza_pm@gobcantabria.es.

Responsable del subproyecto: Olvido Chereguini.

Centro Costero del Instituto Español de Oceanografía de Santander.

Planta de Cultivos “El Bocal”. Barrio Corbanera, s/n (Monte). 39012 Santander.

Teléfono: 942321513. Fax: 942323486.

e-mail: o.chereguini@st.ieo.es.

3. Comunidad Autónoma de Cataluña.

Responsable en la Comunidad: Ramón Jordana

Departament de Agricultura, Ramaderia y Pesca. Generalitat de Catalunya.

Institut de Recerca i Tecnologia Agrialimentaries (IRTA).

Ctra. Poble Nou km 6. Apartado 200. 43540 San Carlos de la Rápita. Tarragona.
Teléfono: 977745427. Fax: 977744138.

e-mail: .

Responsable del subproyecto: Joan Cerdá

Institut de Recerca i Tecnologia Agrialimentaries (IRTA).

Ctra. Poble Nou km 6. Apartado 200. 43540 San Carlos de la Rápita. Tarragona.

Unidad de Cultivos Experimentales, Centro de Acuicultura-IRTA.

Teléfono: 977745427. Fax: 977744138.

e-mail: joan.cerda@irta.es

4. Comunidad Autónoma de Galicia.

Responsable en la Comunidad: Luis Rodríguez.

Conselleria de Pesca, Marisqueo e Acuicultura.

Edificio San Caetano. 15771 Santiago de Compostela.

Teléfono: 981545011. Fax: 981545025.

e-mail: luis.rodriguez.gonzalez@xunta.es.

Responsable del subproyecto: José Benito Peleteiro.

Centro Oceanográfico de Vigo. Instituto Español de Oceanografía.

Cabo Estay/Canido. Apartado 1552. 36280 Vigo. Pontevedra.

Teléfono: 986462929. Fax: 986492351.

e-mail: tito.peleteiro@vi.ieo.es.

5. Comunidad Autónoma de Murcia.

Responsable en la Comunidad: Benjamín García.

Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente de Murcia.

Puerto San Pedro del Pímar. 30740 San Pedro del Pinatar. Murcia. Teléfono 968184518.
Fax: 968184518.

e-mail: benjamin.garcia@carm.es.

Responsable del subproyecto: Benjamín García.

Instituto Murciano de Desarrollo Agrario y Alimentario. Equipo de acuicultura.

Puerto San Pedro del Pinatar. 30740 San Pedro del Pinatar. Murcia. Teléfono 968184518.
Fax: 968184518

e-mail: benjamin.garcia@carm.es.

DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO

Nombre y Apellidos: José Pedro Cañavate Hors

Organismo/ Centro: Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera,
Alimentaria y de la Producción Ecológica. Junta de Andalucía

Departamento: Centro de Investigación y Formación Acuicola y Pesquera “El Toruño”

Teléfono: 956011312

Fax: 956011324

Correo electrónico: josep.canavate@juntadeandalucia.es.

Dirección postal completa: Apartado 16. 11500 Puerto de Santa María. Cádiz.

2. RESULTADOS TECNICOS DEL PLAN NACIONAL

OBJETIVOS INICIALES

Cuando este proyecto es planteado en el año 2001, la situación técnica y el desarrollo del cultivo del lenguado en España, recomendaba la propuesta de unos objetivos lo suficientemente amplios y generales, que permitieran realizar una primera valoración sobre las posibilidades de cultivo de esta especie en puntos de la geografía nacional, diferentes de los de Andalucía, Comunidad en la que se cultivaba el lenguado senegalés desde hacia diez años. De esta manera, los objetivos de los centros de investigación de las cinco Comunidades Autónomas implicadas en la ejecución de este proyecto, fueron los siguientes:

- a) Desarrollar técnicas para obtener con regularidad y de forma programada huevos embrionados a partir de reproductores mantenidos en cautividad.
- b) Producir alevines de lenguado capaces de crecer correctamente solo con piensos inertes.
- c) Conocer la capacidad de crecimiento del lenguado bajo diferentes condiciones de engorde.
- d) Diseñar una planta tipo de engorde de lenguado y realizar un análisis económico-financiero.

OBJETIVOS REALIZADOS

Los cuatro objetivos específicos inicialmente planteados en el proyecto han sido cubiertos. Unos han alcanzado un grado casi completo de cumplimiento, caso de los objetivos b y c, los cuales han sido además confirmados en varios lugares. El objetivo a) ha sido cumplido en su práctica totalidad en lo que a desarrollo tecnológico se refiere, desde una óptica cualitativa. Sin embargo, este desarrollo no se ha generalizado de la misma manera entre todos los participantes involucrados. Ello ha sido debido a la complejidad existente para la captura, transporte y aclimatación de reproductores de lenguado en las diversas localidades. Por último, el objetivo d) se ha cubierto, pero los modelos bio-económicos producidos presentan una mayor cantidad de parámetros teóricos, frente a los inicialmente previstos. Esta falta de información básica ha sido motivada por la elevada incidencia de patologías, que dificultaron la realización de los ensayos de producción necesarios.

METODOLOGIA

Dentro de las cinco líneas generales de trabajo, los métodos utilizados fueron los siguientes:

Línea 1. Reproducción en cautividad de *Solea senegalensis*.

En las instalaciones del CIFPA “El Toruño” se produjeron los huevos embrionados de lenguado que fueron utilizados por los demás componentes del proyecto para realizar los primeros cultivos larvarios en sus correspondientes instalaciones. En este Centro la investigación estuvo encaminada a aumentar el conocimiento sobre su ciclo reproductor en cautividad, y la obtención de puestas en condiciones naturales y mediante un control del medio por manipulación de la temperatura del agua. Aun siendo el fotoperiodo uno de los principales factores que afecta a la reproducción en los peces, la temperatura actúa de forma secundaria sobre el final de la maduración de los gametos, ovulación y puesta (Bromage et al., 2001). Dada la escasa información existente sobre el efecto de la temperatura del agua sobre la reproducción del lenguado senegalés, se planteó llevar a cabo un estudio detallado acerca de la influencia de la temperatura en la reproducción en cautividad de estos peces planos. La experimentación llevada a cabo sobre el control de la reproducción del lenguado se ha llevado a cabo por el IRTA, a través de la investigación de los mecanismos endocrinos durante la reproducción y el desarrollo de métodos para la inducción a la puesta en cautividad. Aunque en el lenguado la reproducción en cautividad de animales salvajes ha sido conseguida (Dinis et al., 1999; Imstrand et al., 2003; Anguis y Cañavate, 2005), es necesario establecer protocolos que permitan controlar el proceso reproductor así como predecir el momento y la calidad de la puesta.

Para el desarrollo de los objetivos planteados se han utilizado un total de 100 reproductores de *S. Senegalensis*, 55 machos y 45 hembras, de origen salvaje, obtenidos mediante capturas realizadas con nasas en los estanques existentes en el propio Centro. Los individuos fueron adaptados a condiciones en cautividad dentro de las instalaciones del CIFPA “El Toruño”. Tras un periodo de aclimatación, caracterizado por la existencia de tratamientos preventivos de desinfección, y una dieta basada en poliquetos con el objeto de facilitar la aceptación de alimento en condiciones de cautividad, los individuos fueron estabulados manteniendo el fotoperiodo natural y teniendo en cuenta la temperatura como el principal factor limitante. Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

Termoperiodo natural simulado (TPN): en periodo estival (julio y agosto) cuando las temperaturas máximas registradas superaron los 23°C los individuos se trasladaron a condiciones de temperatura regulada a 20 ± 2 °C. Circuito abierto. Los individuos se estabularon en dos tanques de 25 m³.

Termoperiodo constante 20 ± 2 °C (TPC). Circuito abierto. Los individuos se estabularon en dos tanques de 10 m³.

Termoperiodo natural amortiguado (TPNA) a 18 ± 1 °C mediante una máquina de frío que actuaba cuando la temperatura natural registrada superaba dicho valor, amortiguando los

cambios bruscos de temperatura que normalmente tienen lugar al comienzo de la época estival y del otoño. Presentan un circuito cerrado con una renovación diaria del 10% con agua procedente del Río San Pedro (caño interno de las marismas de la Bahía de Cádiz). Los sistemas de tratamiento del agua consistieron en filtro biológico, filtro mecánico, separadores de urea, estabilizadores y luz ultravioleta. Los individuos se estabularon en un sistema de circuito cerrado formado por dos tanques de 15m³.

El peso y talla media inicial de los reproductores utilizados en este proyecto han estado por encima de 1 kg. y 43 cm, respectivamente. Las hembras siempre presentaron mayor peso y talla que los machos. La densidad en cada uno de los lotes correspondientes a las distintas condiciones experimentales nunca fue superior a 3 kg/m² y la relación machos/hembras fue 10♂:15♀ (TPN), 8♂:5♀ (TPNA) y 11♂:4♀ (TPC). Todos los tanques fueron cubiertos con una malla de sombreado para reducir la intensidad lumínica.

El control de la calidad del agua se realizó mediante el seguimiento diario de temperatura máxima y mínima, oxígeno disuelto, saturación de oxígeno y pH, y control semanal de turbidez, salinidad, amonio, nitrito y nitrato. La dieta de los reproductores estuvo basada en moluscos, chipirón (*Loligo sp.*) y mejillón (*Mytilus sp.*), aportados 4 y 2 veces a la semana, respectivamente. La ración diaria osciló entre el 1 y 3% de la biomasa total, dependiendo de las sobras observadas en los tanques.

Periódicamente se realizaron muestreos para el estudio de variables morfométricas (peso y longitud total), sexo y madurez sexual aparente. Los datos de peso (W) y longitud (L) fueron usados para calcular el índice de condición (CI) de acuerdo a la expresión: $CI=W/L^3$. Coincidiendo con el primer muestreo se insertaron en los individuos unas marcas internas PIT (Passive integrated transponder) facilitando con ello la identificación individualizada en los muestreos siguientes. Como anestesia se utilizó 500 ppm de fenoxietanol, y como dosis de sedación, previo a la captura de los individuos, se suministró 100 ppm.

Aunque el lenguado no presenta caracteres sexuales externos, la determinación del sexo se hizo mediante palpación de la cavidad abdominal, en el ejemplar vivo y anestesiado, detectándose de esta manera el ovario en las hembras y el testículo en el caso de los machos. Mediante palpación del ovario se estableció el grado de desarrollo sexual de cada hembra (madurez aparente) clasificándose en 5 estadios: estadio 0 con el ovario indetectable externamente; estadio I cuando el ovario se detecta solamente a través de la palpación abdominal, estadio II y III correspondientes a dos niveles (inicial e intermedio) de inflamación externa visible del ovario; y estadio IV con el máximo desarrollo del ovario, de color anaranjado por el lado ciego con signos de vascularización y bastante sobresaliente por el lado ocular. En los machos, se estableció como criterio de madurez aparente en inmaduros aquellos en los que tras la palpación abdominal se detectaba un testículo duro y de tamaño normal; mientras que los machos fueron considerados maduros cuando se observaba un aumento en el tamaño del testículo y consistencia algo más laxa. En este último caso, mediante palpación y una pequeña presión sobre el testículo, se observaba efluente seminal.

Diariamente se controló la existencia de puestas según condición experimental lo que permitió llevar a cabo un análisis cuantitativo y cualitativo según el régimen de temperaturas. La recogida de los huevos se hizo mediante sifonado del colector y posteriormente fueron trasvasados a recipientes de volumen conocido que permitieron su recuento. El análisis cuantitativo de las puestas se estimó por conteo de sub-muestras del total y volumétricamente, determinándose huevos flotantes y no flotantes. En ambos casos el resultado fue similar. Para la incubación de las puestas, durante los años 2002 y 2003, se utilizaron incubadores cilíndricos cónicos de 100 l y 300 l a una densidad máxima aproximada de 2000 huevos l⁻¹, a temperatura constante de 20°C. A las 24/48 horas y tras la eclosión se procedía al recuento de las larvas. Durante el año 2004, con el objeto de aumentar la disponibilidad y uso de los incubadores presentes en nuestras instalaciones, se optó por la incubación en placas de 96 pocillos con agua de mar filtrada y esterilizada. Transcurridas 24/48 horas se procedió a observar en la lupa binocular el desarrollo de los huevos y/o la existencia de larva, determinándose la tasa de fecundación y de eclosión de la puesta.

Para la formación en el CA-IRTA de stocks de reproductores de lenguado se han seguido dos estrategias distintas: la captura de animales salvajes y la obtención de animales adultos criados en cautividad. La captura y el transporte de animales salvajes se ha realizado en dos ocasiones y desde áreas geográficas distintas, el Delta del Ebro y Cádiz. En estos casos la viabilidad de estos ejemplares ha sido muy baja. Ello es principalmente debido a la dificultad para que los animales se adapten y alimenten en cautividad, lo que provoca altas tasas de mortalidad a corto y medio plazo. Es claro por tanto que este aspecto debe ser estudiado con más detalle en futuros proyectos de investigación sobre el lenguado ya que es de gran relevancia para el desarrollo del cultivo integral de esta especie. El transporte y aclimatación de ejemplares criados en cautividad en instalaciones comerciales se ha realizado con éxito, ya que estos animales se encuentran mejor adaptados a la cautividad y pueden alimentarse con piensos comerciales. En estos casos, los animales transportados tenían pesos desde 500 g a 1 kg, lo que ha permitido la realización de los experimentos sobre el control de la reproducción en el lenguado. Desde el inicio del proyecto de investigación se han acondicionado algunos de los sistemas de cultivo del CA-IRTA, de acuerdo a las necesidades de los reproductores de lenguado. De este modo se han acondicionado sistemas de refrigeración, fotoperiodo y para la recolección de huevos en módulos con sistema de recirculación que permiten el control de la temperatura. La ampliación de este tipo de instalaciones ha sido esencial para la consecución de este proyecto, y especialmente para la experimentación sobre la inducción hormonal de la reproducción del lenguado bajo condiciones controladas de termoperiodo y fotoperiodo (incluyendo temperatura estable, rampas de temperatura, etc).

El stock de reproductores de *Solea senegalensis* en el IEO de Santander se constituyó con 81 ejemplares procedentes de Andalucía, con pesos medios de alrededor de 700 gr. Estos ejemplares se acondicionaron en dos tanques rectangulares de 14 m³ con renovación de agua de mar continua a 18 ° C, y fueron cubiertos con malla de sombreado, obteniéndose una intensidad de iluminación de 50 lux. Los dos primeros días se les aplicó un tratamiento profiláctico, y posteriormente se inició su alimentación “ad libitum”, con mejillón y calamar durante 5 días semanales. En primavera esta alimentación se complementó con poliquetos

(*Nereis diversicolor*). La mortalidad registrada fue muy escasa, a pesar de las altas temperaturas registradas durante el verano, que llegaron a alcanzar 24.7° C, temperaturas no habituales en esta zona. No se ha detectado ninguna patología. Los ejemplares del stock se marcaron con “microchips” y se estimó que la relación H/M era de 2,5 en ambos tanques. El peso de las hembras variaba entre 958-1270 g y el de los machos entre 556-565g.

En el IEO de Vigo, para conseguir reproductores salvajes, se contactó con el proveedor habitual de peces vivos. Fue sorprendente comprobar que *Solea senegalensis* y *Solea solea*, se pescaban prácticamente al 50%, y que los pescadores diferenciaban el lenguado común del senegalés, llamándole a éste último “pintado”. La época de captura se extendió desde el mes de septiembre hasta el mes de abril. Estos peces fueron desinfectados, desparasitados y sometidos a una cuarentena durante la cual fueron adaptados a cautividad, suministrándoles como primer alimento miñoca (*Nereis diversicolor*), de la utilizada en pesca deportiva, y a continuación mejillón. Una vez adaptados al nuevo medio fueron alimentados con un pienso húmedo, elaborado en la propia instalación, marcados con microchips y estabulados en condiciones óptimas para la reproducción, es decir en penumbra y con fotoperíodo y termoperíodo naturales.

Se incorporaron también reproductores procedentes de la cría en cautividad. Para ello, se compraron ejemplares a la empresa Stolt Sea Farm, los cuales no necesitaron aclimatación puesto que eran ejemplares nacidos en cautividad y ya comían pienso comercial. Se probó un control de termoperíodo en el primer año de proyecto utilizando hembras salvajes en estadios de madurez avanzados pero sin resultados positivos.

En otoño de 2003 se llevó a cabo un experimento conjunto Toruño-I.R.T.A., para estudiar los efectos de la inducción hormonal en la puesta del lenguado en condiciones naturales de temperatura y fotoperíodo. Para ello, a finales del mes de octubre y coincidiendo con la existencia de madurez aparente tanto en machos como en hembras, se estabularon 18 hembras y 18 machos en condiciones de temperatura y fotoperíodo natural (circuito abierto) de la siguiente forma:

- tanque control: 6 hembras y 6 machos a los que se inyectó semanalmente 100µl/Kgr de suero salino.
- dos tanques con 3 hembras y 3 machos cada uno a los que se inyectó semanalmente 1µgr/Kgr de la hormona inductora de la maduración LHRH (100µl/Kgr).
- dos tanques con 3 hembras y 3 machos cada uno a los que se inyectó semanalmente 5µgr/Kgr de la misma hormona (100µl/Kgr).

Posteriormente, durante las cuatro semanas siguientes (un total de 30 días) se contabilizaron las puestas 3 veces al día, anotando la producción de huevos, así como el porcentaje de fertilización y eclosión. Semanalmente se extraían 500µl de sangre de cada individuo para el posterior análisis de esteroides y hormonas presentes en el plasma y se medía la cantidad y calidad del esperma en los machos: volumen de esperma, número de espermatozoides, espermatozocrito y movilidad. Este experimento formó parte de las investigaciones específicas, asignadas al IRTA sobre el control de la reproducción del lenguado en cautividad. Estas se dirigieron a la investigación de los mecanismos endocrinos

durante la reproducción, y al desarrollo de métodos para la inducción a la puesta en cautividad. Este experimento representaba una réplica de un mismo tratamiento hormonal, efectuado bajo condiciones diferentes, tanto de manejo, como de calidad de peces. Previamente a él, en el IRTA se había realizado la primera parte, en la que ejemplares de aproximadamente 1 kg, criados bajo condiciones intensivas de producción en las instalaciones de diversas empresas privadas, fueron transportados al CA-IRTA. Después de un tiempo de aclimatación, los animales fueron sexados de forma preliminar mediante la detección de vitelogenina plasmática utilizando Western blot y un anticuerpo específico. Durante los meses de Abril y Mayo se llevó a cabo el experimento de inducción hormonal con inyección de LH-RH intramuscular, para lo cual 36 animales se distribuyeron en 6 tanques (3 machos y 3 hembras por tanque) con recolectores individuales de huevos y conectados a un sistema de recirculación provisto de filtros biológicos. Los tratamientos (por duplicado) fueron los siguientes: inyección de salino (0,6% NaCl) cada 3 días, inyección de 5 µg/kg LH-RH 1 vez por semana, e inyección de 5 µg/kg LH-RH cada 3 días. El fotoperiodo fue constante (13h luz:11h oscuridad) mientras que la temperatura se controló para inducir cambios cíclicos semanales desde 16°C hasta 19°C. Una vez por semana se tomó una muestra de sangre (0,5 ml) de todos los animales para la medida de los niveles de esteroides sexuales en plasma.

Tal y como se ha descrito previamente, para iniciar el desarrollo de técnicas hormonales para el control de la reproducción en el lenguado, en el presente proyecto se han empleado metodologías basadas en el suministro de hormona liberadora de la hormona luteinizante (LH-RH) mediante inyección intramuscular o implantes para la liberación sostenida de la hormona. Los experimentos se han centrado principalmente en animales criados en cautividad (F1) ya que actualmente estos presentan importantes problemas para su reproducción en condiciones intensivas de cultivo. Los métodos más efectivos para la inducción de la puesta se basan en el suministro de LH-RH en los reproductores cuando se encuentran en el estado gonadal adecuado (Mylonas y Zohar, 2001). La LH-RH induce la liberación de gonadotropinas (GtHs) por la pituitaria, que son las principales hormonas que regulan los procesos de crecimiento y maduración gonadal.

La inducción hormonal a la puesta y la espermiación se realizó también mediante la utilización de implantes de LH-RH, los cuales producen una liberación sostenida de la hormona y pueden inducir un número más elevado de puestas. En estos experimentos se emplearon reproductores F1 durante los meses de Abril y Mayo. El diseño experimental consistió en un grupo de reproductores control al que se le suministró un implante con salino, un grupo inyectado intramuscularmente con LH-RH (5 µg/kg), y tres grupos a los que se les colocó implantes de LH-RH de 5, 25 y 50 µg/kg. Las concentraciones de LH-RH en los implantes son mayores que en la inyección, ya que en los implantes la cantidad de hormona que se va liberando progresivamente es más baja. La temperatura en los tanques se mantuvo entre 19-20°C, sin la inducción de ninguna oscilación, ya que los anteriores experimentos indican que las variaciones en la temperatura no tienen ningún efecto beneficioso sobre la puesta de los ejemplares F1.

Con el fin de desarrollar métodos alternativos para la inducción a la puesta en el lenguado, se ha iniciado el aislamiento de las gonadotropinas (GtHs) en esta especie. La

disponibilidad de las GtHs puede hacer posible el diseño de protocolos de inducción hormonal más efectivos basados en el suministro de GtHs purificadas a los animales (Zohar y Mylonas, 2001). No obstante, para la purificación de las GtHs por métodos convencionales de cromatografía se requiere un número muy elevado de pituitarias, lo que implica el sacrificio de sendos individuos reproductores. Las técnicas de DNA recombinante ofrecen una alternativa válida que se está empezando a ser empleada en otras especies de teleósteos. Esta consiste en el aislamiento de los DNA copia (cDNA) que codifican para las dos GtHs, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), y su expresión en células bacterianas o de insecto para la su producción en masa, las cuales son purificadas directamente del medio de cultivo mediante cromatografía (Kobayashi et al., 2003).

En la primavera de 2004 se realizaron ensayos de criopreservación en el CIFPA “El Toruño”, en los que participaron expertos de los Centros de Santander y Vigo del IEO. En un tanque exterior se mantuvieron reproductores, y a los machos se les extrajo periódicamente líquido seminal. Estas muestras fueron tratadas con diferentes medios de conservación, congeladas en nitrógeno líquido, descongeladas, y finalmente se determinó la actividad de los espermatozoides. El esperma de lenguado se valoró a partir de 37 ejemplares. El esperma, mediante presión abdominal, se recogió en jeringuillas de 1 mL, eliminándose previamente la orina y se guardó en frío (0°C) hasta su valoración. Se registró el volumen eyaculado de cada macho y se valoró la movilidad y densidad por observación microscópica a 400x según los protocolos estandarizados (Chereguini et al. 1992 a,b; 1995). La movilidad se determinó a partir de una dilución 1:5 del esperma en la solución inactivante Ringer 200 mOsmol L-1, y su posterior activación, que se induce al añadir agua de mar a 4°C mediante otra dilución 1:20 del esperma inmovilizado con el agua. Inmediatamente la movilidad se cuantificó según la tabla de Sánchez-Rodríguez (1975) que va de 0 a 5 dependiendo del porcentaje de espermatozoides móviles. La movilidad del esperma se valoró a diferentes tiempos de conservación a 4°C (0, 24, 48, 72 h) y se registró la duración de la activación. La densidad se valoró mediante el recuento de espermatozoides en cámara hematocrito, tras la doble dilución 1:20 del esperma en una solución de formólico al 1% con bicarbonato sódico. Por otro lado, se seleccionaron 12 machos, de los cuales 6 fueron tratados con la hormona LHRH (5 µL/Kg). A diferentes tiempos (0, 48 y 72 h) del tratamiento hormonal se registró el volumen eyaculado de esos machos para determinar su posible efecto.

Para la crioconservación de esperma de lenguado se empleó la técnica de rodaballo (Chereguini et al. 1997, 2001; Chereguini 2004). Se seleccionó esperma con alta movilidad, y a 0°C se mezcló con el medio Mounib modificado por Legendre y Billard (1980)(1:1), se llenó una pajuela de 0.5 cc, y se cerraron ambos extremos con pinzas de calor. La congelación se realizó sobre vapores de nitrógeno líquido en caja de poliestireno expandido llenado previamente con el nitrógeno, y que en su interior tiene un flotador del mismo material, en forma de catamaran, situado a 5 cm de la superficie del nitrógeno, en el que se colocan horizontalmente las pajuelas. Se cerró la caja durante 7 minutos, consiguiéndose una tasa de congelación de -10°C/ min, y a continuación se sumergieron las pajuelas directamente en el nitrógeno hasta su uso. La descongelación se realizó introduciendo la pajuela en baño María programado a 40°C durante 7 segundos. La pajuela se abrió cortando los extremos sobre un Eppendorf, valorando entonces su movilidad.

Línea 2. Optimización y unificación de los métodos para el cultivo larvario. Producción de alevinaje para experimentación.

Se han efectuado cultivos larvarios en las instalaciones del CIFPA “El Toruño”, IRTA, IEO de Vigo, e IEO de Santander. En todos los casos se utilizaron larvas procedentes de puestas naturales del CIFPA “El Toruño”, salvo los cultivos llevados a cabo durante el tercer año de ejecución del proyecto en el IEO de Santander, donde se emplearon las primeras puestas que se comenzaron a obtener con los lotes de reproductores aclimatados en estas instalaciones. El procedimiento básico para el cultivo del lenguado en todas las instalaciones fue el descrito en la Tabla 2.1. A partir de este modelo de cultivo, inicialmente desarrollado en El Toruño, se realizaron las modificaciones pertinentes de diferentes factores, de acuerdo a las necesidades experimentales de cada momento y lugar.

Tabla 2.1. Esquema básico para el cultivo larvario del lenguado senegalés.

Temperatura 19-21°C Salinidad 30-38 ppt pH 7.50-8.20
 Aireación: muy suave alrededor de malla central de desagüe (300 micras)
 Fotoperiodo: 16 L : 8 D
 Intensidad de luz: 600-800 lux
 Densidad inicial de larvas: 30-40 larvas por litro.
 Secuencia de alimentación y patrón de renovación de agua:

Edad larvas	Alga (a) Nannochlorop Isochrysis (cells/ml/día)	Rotíferos (b) (ind/ml/día)	Artemia (c) (ind/ml/día)	Pienso (d) (Tamaño y mg/l/día)	Renovación (% diario)
3, 4, 5, 6	300.000 50.000	10			0
7, 8, 9	300.000 50.000	15	1	0.1-0.3 mm 1.5 mg/l	30
10, 11, 12			3	0.1-0.3 mm 3 mg/l	30
13, 14, 15, 16, 17			4	0.2-0.4 mm 5 mg/l	50
18, 19, 20			5	0.2-0.4 mm 5 mg/l	80

En El Toruño, los cultivos larvarios se realizaron en tanques cilíndricos de 400 y 700 l de capacidad. A los 21 días de edad los lenguados fueron trasladados a tanques rectangulares de 3 m² con 30 cm de profundidad de agua, en los que se mantuvieron hasta finalizar el destete. Las puestas utilizadas en el CA-IRTA fueron incubadas en tanques de 500 l troncocónico de color negro en los que llevó a cabo el cultivo larvario, a una temperatura de

18.5 °C, 6.5-7.5 mg/l de O₂ y pH 8. Se controló la eclosión, la talla y el peso seco inicial de las puestas. Las larvas eclosionadas se mantuvieron durante 3 días en agua con fitoplancton. El tercer día se suministraron rotíferos de la cepa S-1 (*Brachionus plicatilis*; 5 rot/ml) a una temperatura de 18±0.5°C y 12hL:12hO de fotoperiodo. Las larvas se pasaron a un tanque de 2000 l con alimentación con nauplios de *Artemia* (INVE cepa EG o “enrichment grade”) enriquecidos, inicialmente a una densidad de 0.35 NA/ml y continuando el suministro en cantidades crecientes hasta finalizar el destete. Se tomaron muestras periódicamente para estimar el crecimiento en talla y peso seco.

La metodología utilizada en el IEO de Santander fue similar, comenzando con una incubación en tanques de 70 litros. Posteriormente, las larvas se trasladaban a tanques cilíndricos de 280 litros de capacidad con una densidad aproximada de 50 larvas/litro a temperatura ambiente. La iluminación de los tanques fue de 2000 lux sobre la superficie del agua y continúa durante 24 horas, a partir de la metamorfosis se cambió el fotoperiodo a 16 h. L: 8 h. O hasta el destete. El régimen alimenticio vivo-inerte se realizó inicialmente según el protocolo de la Tabla 2.1. Durante el segundo año se realizaron dos cultivos larvarios, en abril y noviembre. En el primero se compararon cuatro tipos de alimentación: el tradicional, con fitoplancton y rotífero enriquecido, y la alimentación directa con tres cantidades diferentes de nauplios de *Artemia* enriquecidos (48 h), cantidades que fueron incrementadas proporcionalmente cada dos o tres días. El segundo cultivo se realizó con la alimentación tradicional y a partir del día 27 se inició una coalimentación con cuatro diferentes piensos: Proton 4 (INVE), Aglonorse 0 (EWOS), Gemma 0.3 (TROUW) y Microbaq 0 (DIBAQ). Durante el tercer año se ha repetido la experiencia de comparación de cuatro tipos de alimentación: el tradicional, con fitoplancton y rotífero enriquecido, y la alimentación directa con tres cantidades diferentes de nauplios de *Artemia* enriquecidos (24 h), cantidades que se incrementaron proporcionalmente cada dos o tres días. Además se realizaron cuatro cultivos larvarios, con protocolos diferentes de alimentación, con larvas procedentes de las puestas naturales conseguidas en el IEO de Santander. Se han realizado análisis bioquímicos de las larvas a diferentes días del cultivo.

Larvas recién eclosionadas en “El Toruño” fueron transportadas por carretera hasta el CA-IRTA. Una vez allí, las larvas se distribuyeron homogéneamente en 12 cubiletes de malla (150 micras) de 35 litros de capacidad, dotados de air-lift y mantenidos en 4 tanques (3 cubiletes/tanque) conectados a su vez a un módulo de recirculación. Se ubicaron 1750 larvas por cubilete a fin de mantener una densidad inicial de 50 larvas/litro. Las larvas se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 18hL:6hO y no se añadió fitoplancton al agua a fin de evitar posible influencia de la composición del mismo.

Las larvas se alimentaron desde el día 3 al 9 con rotíferos (10 rot/ml) y desde el día 5 hasta el 35 con nauplios de *Artemia* enriquecidos. La ración diaria (en peso) se ajustó a fin de distribuir un 70% del peso de la larva entre los días 5 y 15, el 20% entre los días 16 y 25 y el 15% desde el día 26 hasta el final de la experiencia, según los datos facilitados por P. Cañavate. Ambos tipos de presas vivas se enriquecieron usando emulsiones preparadas usando mezclas de aceites a fin de conseguir distintos niveles de DHA, según la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Niveles de DHA utilizados en las dietas experimentales

Ingredientes (mg/g)	DHA- N	DHA- L	DHA- M	DHA- H
Aceite	0	252	504	757
Neuromins				
Aceite Vevodar	50	50	50	50
Aceite vegetal	0	35	69	103
Aceite de oliva	860	573	287	0
Suplementos	90	90	90	90

Aceite Neuromins, Martek Biosciences, columbia, MD, USA

Aceite Vevodar, DSM Foods Specialties, Delft, Holanda

Aceite vegetal, mezcla de aceites de canola y soja

Aceite de oliva, Lakeland Olives, NSW, Australia

Suplementos, lecitina de soja, 70 mg, vitamina E, 20 mg

Las presas se distribuyeron 2 veces/día (a las 9.00 y 16.00 h). Se midieron longitudes y pesos secos de 20 larvas los días 1, 4, 6, 10, 12, 15, 20, 30 y 35, así como el estadio de desarrollo anotando los estados de migración del ojo para calcular posteriormente el índice de migración del ojo. Al principio y al final de la experiencia se recogieron muestras por triplicado de los peces y se diseccionaron cabezas, digestivos y carcasas (en los peces de 35 días) para estudiar la composición en lípidos de los tejidos.

Los lípidos se extrajeron mediante cloroformo-metanol 2:1 y se cuantificaron gravimétricamente. La metilización se llevó a cabo con metanol-sulfúrico y los metilesteres analizados por cromatografía gas-liquido en un Termo Electrón TraceGC. La cuantificación de los ácidos grasos se llevó a cabo mediante la inclusión de un estándar interno (17:0) previo a la metilación.

En el IEO de Vigo, el cultivo larvario se realizó sólo en 2002 con huevos embrionados procedentes del Toruño, utilizándose el protocolo descrito en la Tabla 2.1. En una primera parte, se tomaron muestras de larvas a los días 0, 8, 20 y 30 de vida para su caracterización bioquímica.

Línea 3. Desarrollo de métodos para el tránsito de alimento vivo a inerte, e influencia de factores de cultivo sobre el crecimiento de alevines durante y después del destete.

Los cultivos de producción de alevines desarrollados en el CIFPA “El Toruño” se realizaron de acuerdo al esquema general de alimentación descrito en la Tabla 3.1. El fotoperiodo se mantuvo en 14 horas de iluminación, y la intensidad lumínica se redujo a 50 lux. La densidad inicial de estos cultivos osciló entre 3000 y 5000 individuos por metro cuadrado. Este esquema de cultivo fue usado como referente en los diferentes ensayos de destete de lenguado llevados a cabo por los componentes del proyecto. El pienso referido en la Tabla 3.1 es el fabricado por la casa Aglo Norse, el cual era, en el momento de la planificación de los experimentos, el único que había demostrado su capacidad para destetar eficazmente el lenguado.

Tabla 3.1. Secuencia de alimentación y renovación de agua

Edad (días)	Artemia (indiv/m ² /día)	Pienso (tamaño g/m ² /día)	Renovación de agua (% diario)
21 a 30	5x10 ⁶	0.2-0.4mm*: 5 g	150
31 a 40	7x10 ⁶	0.3-0.5mm*: 12 g	150
41 a 50	9x10 ⁶	0.3-0.5mm*: 20 g	200
51 a 60	5x10 ⁶	0.5-0.8mm*: 30 g	300
61 a 70	1x10 ⁶	0.6-1.0mm**: 50 g	300
71 a 80		0.6-1.0mm**: 60 g	400
81 a 90		0.6-1.0mm**: 90 g	400
91 a 100		1.0-1.2mm**: 110 g	500

En el IEO de Santander, se realizó un estudio sobre el efecto de la densidad y la iluminación durante el destete. Esta experiencia se llevó a cabo por triplicado en tanques del mismo tipo que los empleados en el cultivo larvario, con baja densidad de individuos (200 ind/m²) y sometidas a dos niveles de iluminación: en oscuridad e iluminación de 200 lux. Por otra parte, el destete también se realizó con densidades altas, entre 1000-1500 individuos/m² en dos tipos de tanques, unos alargados de 3 m² y 450 l de capacidad (S), y otros circulares de 1,54 m² y 430 l (LE). Los piensos comerciales utilizados fueron NRD 5/8 (INVE) y Perla Plus 0 (Trouw).

La experiencia de destete con los individuos producidos a partir de la puesta natural de septiembre de 2004 en el IEO de Santander utilizó la técnica de coalimentación, y se realizó por duplicado utilizando cuatro piensos diferentes: Proton 4 (INVE), Aglonorse 0 (EWOS), Gemma 0,3 (TROUW) y Microbaq 0 (DIBAQ). La densidad inicial fue de 2.079 individuos/m², siendo alimentados 8 veces al día con sus respectivos piensos, incrementando la cantidad y tamaño del gránulo a lo largo del estudio. Para la determinación del crecimiento en longitud y peso se tomaron muestras de 20 ejemplares por tanque cada 5 días hasta el día 90 y posteriormente cada semana, ajustándose entonces la alimentación al 10% de la carga total.

Las tasas de crecimiento parciales se calcularon a día 43, 74, 95 y 130 DAH. La supervivencia se registró a día 50, 70 y 90. Los contenidos en proteínas y lípidos totales, y la composición de ácidos grasos fueron analizados al día 65 DAH.

Con los peces resultantes de los cultivos larvarios en el CA-IRTA Se hicieron dos experimentos de co-alimentación consecutivos, en los años 2003 y 2004, y usando distintos piensos. En el primer experimento se utilizó únicamente pienso Aglonorse, y en el segundo, debido a problemas de importación del Aglonorse, se utilizaron piensos nacionales. En el segundo experimento se usaron los juveniles provenientes del experimento llevado a cabo en 2003 para estudiar el requerimiento de ácido araquidónico (20:4n-6, ARA) en las larvas de lenguado. Se distribuyeron 1500-2000 peces de 37 días de edad y aproximadamente 40 mg de peso fresco en 4 tanques de 500 litros con 1 m² de superficie. La distribución de Artemia fue manual, mientras que la distribución de pienso se realizó mediante alimentadores automáticos de disco, con una distribución de pienso horaria y una duración de 20 segundos, de forma que en cada toma la distribución era de aproximadamente 0.2 mg/pienso, y el total distribuido diariamente por pez de aproximadamente 0.7 mg/día/pez. El experimento comenzó en enero de 2004 y se mantuvo hasta el mes de noviembre cuando los peces supervivientes se donaron a la C.A. de Murcia para posteriores ensayos.

Se evaluaron crecimiento y supervivencia, sin observarse diferencias significativas en ninguno de los 2 parámetros. La distribución de Artemia se suprimió cuando los peces alcanzaron los 200 mg de peso medio. En el mes de junio los peces pesaban sobre 0.5 g de media y, debido a una mortalidad continua y constante, se procedió a reagrupar los peces en 2 tanques, dejando el tanque A para los peces bien pigmentados y el D para los peces albinos.

Línea 4. Cultivo de juveniles en estanques de tierra.

Los cultivos de este tipo se realizaron en estanques de tierra del CIFPA “El Toruño”, especialmente acondicionados para este efecto. Se utilizaron dos estanques de 900 m² y otros dos estanques de 1400 m², todos con una profundidad media de 50 cm de agua, fondo de fango natural, y compuertas de alimentación y drenaje dentro del sistema de granja marina experimental existente en este Centro. En torno a las compuertas se realizó una obra, consistente en el relleno de una semicircunferencia con grava, al objeto de evitar el acceso a los estanques de potenciales depredadores o competidores de los lenguados sembrados con las sucesivas renovaciones de agua. Los estanques fueron además cubiertos con una trama de hilos de nylon, como medida preventiva para controlar el acceso a estos de la avifauna de la zona.

Los peces utilizados fueron siempre alevines entre 50 y 60 días de edad, procedentes de cultivo convencional en el criadero de “El Toruño”. Se trataba de peces alimentados básicamente con alimento vivo (*Artemia*), y nunca sometidos a destete, dado que la alimentación que iban a seguir en los estanques era exclusivamente zooplancton natural. Tres lotes diferentes de 50.000 alevines de la edad antes indicada fueron producidos cada uno de los tres años del proyecto, de manera que hacia final de primavera estuvieran disponibles para su siembra en los estanques. Estos peces, después de ser sometidos a muestreo (peso y talla) y su número estimado, fueron tranquilizados con fenoxietanol, concentrados en bolsas de plástico con agua y aire, y trasladados a los estanques de tierra. Una vez en ellos, las bolsas fueron colocadas flotando sobre el agua para equilibrar temperaturas. Posteriormente, las bolsas fueron abiertas y los dos tipos de agua mezclados lentamente, antes de proceder a la liberación de los peces en los estanques.

Se estableció una densidad inicial de siembra de 10 alevines por metro cuadrado en todos los casos. Con antelación a la introducción de los alevines de lenguado, los estanques de tierra fueron acondicionados, de cara a estimular la producción de plancton natural y limitar en la mayor medida de lo posible el acceso a los mismos de especies que pudieran competir o depredar sobre unos lenguados de tan pequeño tamaño. Para ello, un mes antes de la siembra de lenguados, los estanques fueron vaciados y expuestos a la acción del sol durante dos semanas. Se trataba de esta manera, de eliminar especies que se hubieran desarrollado en ellos en los cultivos previos. Esta maniobra era aprovechada también para limpiar los fondos y taludes de los estanques de macroalgas que habían crecido. A continuación los estanques fueron llenados con agua de mar que era filtrada a través de la grava antes mencionada. Una vez los estanques llenos, se dejó el agua estancar durante otras dos semanas, de manera que la productividad natural era estimulada para maximizar zooplancton y zoobentos. En esta fase nunca se adicionó fertilizante alguno. Una vez sembrados los lenguados, los estanques de tierra fueron sometidos a renovaciones parciales de agua, inicialmente calculadas en un 20% al día.

El seguimiento del crecimiento de los peces en los estanques se realizó mediante muestreos periódicos (mensual o bimensual) de peso y talla, de los peces que eran capturados

pasivamente durante la noche en nasas. Estos cultivos de preengorde se llevaron a cabo de acuerdo a dos procedimientos principales. Uno, en el que no se adicionó alimento ni fertilizante alguno, a lo largo de todo el tiempo que duró el cultivo; y otro en el que se ensayó un régimen selectivo de fertilización bentónica muy ligera. Este régimen de fertilización consistió en añadir una dosis de 1 g/m^2 de pienso inespecífico a los estanques de tierra, cinco días a la semana. La adición de estos piensos no tenía como objetivo alimentar directamente a los lenguados, ya que lo que perseguía era estimular la productividad natural de microorganismos bentónicos en los propios estanques de tierra.

A la finalización de los cultivos, los juveniles de lenguado fueron capturados y extraídos de los estanques mediante sucesivas capturas masivas con un número elevado de nasas. Los peces eran trasladados a otros estanques, o tanques interiores hasta que el número de captura en las nasas era muy bajo. En ese momento, se procedía a reducir al mínimo el nivel de los estanques y capturar a mano los individuos restantes.

Línea 5. Cultivo intensivo de juveniles.

Los experimentos de engorde intensivo de lenguado se llevaron a cabo en los Centros del IEO de Vigo y Santander, y en las instalaciones del IMIDA de Murcia. En Santander, se compararon tres dietas comerciales durante un año: Europa 10, Europa 22 (Trouw) y Solea (Proaqua). Los ejemplares con longitudes y pesos iniciales de 9.36 ± 0.20 cm y 10.89 ± 0.36 respectivamente, fueron distribuidos en tanques de 2 m^2 con una carga de 411 g m^{-2} . Los ejemplares fueron alimentados ad libitum dos veces al día. Mensualmente se realizaron muestreos de todos los ejemplares y las tasas de crecimiento, en longitud y peso, obtenidas se compararon mediante T-test para la comparación de pendientes. Además se calcularon los índices de crecimiento parcial y global: factor de condición (CF), Tasa de crecimiento específico (SGR), Eficiencia de crecimiento (GE) y Eficiencia de crecimiento diaria (DGE). Al final del estudio se analizó según los Métodos estandarizados del MAPA la composición del músculo (proteína total, lípidos, carbohidratos, humedad y cenizas). La localización de lípidos en músculo se observó tras tinción con oil-red 0 y hematoxilina-eosina. La supervivencia fue registrada.

Para la determinación de la composición bioquímica en el IMIDA de Murcia, se tomaron muestras del músculo de lenguados de distinta procedencia (6 individuos de cada tipo). Salvajes pescados en el Mar Menor (peso medio: 121.7 ± 12.8 g) (capturados en mayo/junio de 2003). Salvajes procedentes del Mar Menor (capturados en noviembre 2002 / enero 2003) y mantenidos en cultivo comiendo primero mejillón y pienso comercial desde marzo de 2003 (peso medio: 98.9 ± 5.1 g). Cultivados procedentes de “El Toruño” (CIFPA) (llegaron en noviembre de 2002 con un peso de 2-8 g) han comido pienso comercial desde el principio (peso medio: 95.2 ± 11.4 g). El pienso utilizado ha sido de la casa Skretting de composición: proteína: 50.7, grasa: 18.7, minerales: 12.2 y humedad: 5.2%. Se ha analizado su composición en macronutrientes (proteínas totales, lípidos totales, cenizas y humedad) y ácidos grasos. Se siguen los métodos propuestos por la AOAC (1990) y la normativa española para análisis de piensos (BOE 2 Marzo 1995). La humedad se determina por desecación a 105 ± 1 °C durante 24 horas y las cenizas por incineración a 450 °C durante 24 horas. El porcentaje de proteína se mide utilizando el método Kjeldahl, el de grasa por el método Soxhlet y el de fibra por el método de Weende. La extracción de grasas para la determinación de ácidos grasos se realiza con la técnica de Folch et al. (1957). La posterior metilación de sus ácidos grasos se realiza mediante el método de Stoffel et al. (1959) y son analizados en un cromatógrafo de gases VARIAN 3900 GC equipado con un detector FID, y utilizando una columna CP-Sil 88 (50 m long, 0,25 mm i.d.). La identificación de picos se llevó a cabo por comparación con un estándar comercial (Sigma).

Para el estudio de preengorde y engorde de alevines con dos piensos: Gemma (Trouw) y Microbaq (Dibaq) con diferentes cantidades totales de proteína (58 y 64%) y lípidos (17 y 8%), se realizó un cultivo durante 8 meses en el IEO de Santander. Los alevines con longitudes y pesos iniciales de $5,41 \pm 0,045$ cm y $2,46 \pm 0,058$ respectivamente, fueron distribuidos en tanques de 4 m^2 a una densidad de 130 alevines m^{-2} . La alimentación, administrada mediante comederos automáticos durante 24 h, varió desde un 10 a 3% de la

carga total, desde el inicio al final de la experiencia. Mensualmente se realizaron similares a los ya descritos.

En otros ensayos de engorde, se realizaron varias experiencias para estudiar el efecto de la temperatura (de 13,7 a 21,5 °C). Para ello se cultivaron por duplicado alevines desde 7 a 13 meses de edad y en grupos de tamaño que van de 9,4 g hasta 87 g. Los experimentos se realizaron en 4 tanques de forma cuadrangular de 500 L, dos control (AM-34 y AM-9) y dos con probiótico (AM-20 Y AM-8). Las experiencias se llevaron a cabo con pienso GEMMA (1,2 y 1,8), suministrado al 4 y 3 % según el tamaño de los alevines. El probiótico fue seleccionado e incorporado al pienso en el Dpto. Microbiología de la Universidad de Málaga administrándolo al 100% en días alternos y conservado en nevera hasta su adición al tanque. Se tomaron muestras de digestivo por triplicado para analizar la incorporación y retención del probiótico en la flora intestinal, parámetro de gran interés para la comprensión de la vía de actuación del probiótico (Chabrillon et al. 2004).

En el IEO de Vigo se realizaron tres pruebas de engorde de juveniles, la primera con ejemplares comprados en Cádiz procedente de los caños de San Fernando, la segunda con alevines procedentes del Toruño de 1,6 gr aproximadamente que se engordaron durante 20 meses y la tercera con los alevines mismos alevines cultivados en Vigo de huevos procedentes del Toruño que se han mantenido hasta la fecha y en la actualidad son los únicos supervivientes al vertido del PRESTIGE que se están utilizando como futuro stock de reproductores F-1. Para la realización de la primera experiencia se adquirieron 140 lenguados pescados en los caños en San Fernando (Cádiz) por la empresa Blenius S.A., que fueron transportados a Vigo por tierra en camión y estabulados y adaptados a las nuevas condiciones durante un mes aproximadamente. Una vez adaptados se inició una prueba de engorde utilizando un pienso comercial de rodaballo de 16% de contenido en lípidos y estandarizado con los demás equipos para que los resultados fueran comparables. Para ello se hicieron dos lotes de peces que fueron separados por peso en dos grupos, uno de ellos de 44.70±13.66 gr y el otro de 98.83±29.40 gr, alcanzando a los doce meses 288.18±104.43 y 512.26±122.37 gr respectivamente, siendo los meses 0 y 12 los correspondientes a octubre del 2001 y 2002. estos peces estuvieron estabulados en tanques de 5 m³ hasta su muerte en enero del 2004.

Para la segunda experiencia se utilizaron dos piensos de diferentes casas comerciales (INVE y TROUW) con diferente composición bioquímica. Esta experiencia se comenzó el 28/09/2002 y se concluyó el 18/06/2004 siendo considerados a partir de aquí adultos del stock de reproductores.

Para los experimentos de crecimiento realizados en el IMIDA de Murcia, se utilizaron ejemplares suministrados por el CIFPA “El Toruño”. Tras unos días de aclimatación, los ejemplares se clasificaron en dos lotes: L1 formado por 112 ejemplares con un peso medio de 1,90±0,20 (± límites de confianza al 95%); y L2 compuesto por 64 ejemplares de 8,39±0,29 g. Los peces se estabularon en dos tanques de 6,5x1x1 de 4000 litros de volumen útil, que funcionaban en circuito cerrado. Dicho circuito estaba formado por filtro mecánico y biológico, luz ultravioleta y resistencia calentador. La temperatura del agua se ha mantenido en torno a los 18°C, el oxígeno disuelto con valores superiores al 90% de saturación, la

salinidad próxima al 38 ppm, y amoníaco, nitritos y nitratos en valores muy bajos, no limitantes. Se alimentaron con un pienso comercial de la casa TROW (LE-1 PERLA PLUS SANOSTIN), que se distribuyó mediante un comedero automático que suministraba el pienso en continuo durante 12 horas. La cantidad de pienso suministrada fue en exceso, y para ello al día siguiente se tenía que observar una pequeña cantidad de pienso sobrante en el fondo, que era retirado mediante sifón.

Los peces fueron muestreados periódicamente (entre 15 y 30 días), se midió el peso corporal húmedo (g) y la longitud total (cm). Se determinó la tasa de crecimiento absoluto (TCA= (Pf-Pi)/t) y la tasa de crecimiento relativo (TCR=100(LnPf-LnPi)/t). Donde Pf es el peso medio final en un periodo de tiempo t en días y Pi el peso al inicio. Los datos obtenidos se han ajustado mediante el análisis de regresión al modelo $Y=aX^b$, que en forma lineal es $\ln Y=\ln a+b\ln X$, donde Y es TCA o TCR, X es el peso medio en el periodo considerado ($P_m=(P_i+P_f)/2$), y a y b son coeficientes que calcula el análisis de regresión. Por otro lado, todos los datos registrados de peso corporal y talla se ajustaron al modelo $P=aL^b$, o igualmente $\ln P=\ln a+b\ln L$, donde P es el peso corporal (g) y L la longitud total (cm), a partir de la ecuación se estimó el índice de condición K ($100P/L^3$).

El consumo de oxígeno (Mo_2) es un indicador de la tasa metabólica y proporciona una estimación de las necesidades energéticas del pez así como de los caudales y tratamiento de agua en piscifactorías. En condiciones de cultivo intensivo las variaciones en el consumo de oxígeno dependen fundamentalmente de la alimentación, el peso corporal y la temperatura del agua. Waller (1992) apuntó que la tasa de crecimiento y la de metabolismo guardan la misma relación con respecto a la temperatura y consiguen la eficiencia óptima en el punto de inflexión de la curva parabólica. En el presente trabajo se desarrollan modelos de Mo_2 en función de peso y temperatura en juveniles de *Solea senegalensis* en condiciones de engorde intensivo y se estima a partir de dichas ecuaciones la temperatura óptima fisiológica.

Se utilizaron tanques-respirómetro de 314 l, operando en un circuito cerrado. Los ejemplares fueron alimentados a saciedad distribuyendo el alimento en 4 tomas con un pienso comercial. El consumo de oxígeno expresado en $mgO_2 h^{-1}$, fue obtenido a partir de la ecuación $Mo_2;hour =((O_e-O_s)Q)/N$. Las medidas de consumo de oxígeno se realizaron ininterrumpidamente durante 36 horas. Se realizaron cuatro medidas de Mo_2 para cada una de las temperaturas siguientes: 18.3°C, 19.0°C, 21.5°C y 23.8°C; y para cada temperatura se midió sobre tres lotes de distinto peso corporal. El peso varió entre 17 y 92 g. Mo_2 se representó gráficamente como una función del tiempo y se calcularon los siguientes parámetros (Cerezo y García García, 2004):

- $Mo_2;day$: Consumo medio diario en las 24 horas siguientes a la alimentación;
- $Mo_2routine$: Consumo de oxígeno de rutina, definido como el valor medio eliminando el período influenciado por la alimentación (o periodo SDA);
- Mo_2sda : Consumo de oxígeno Post-prandial , como el valor medio de Mo_2hour en el periodo SDA;
- Mo_2peak : Pico de máximo consumo de oxígeno inducido por la alimentación;
- $Dsda$: Duración del consumo de oxígeno post-prandial en horas;

-Dpeak: Tiempo que transcurre desde que se suministra el alimento y el Mo2peak en horas.

Los datos de Mo2:day, Mo2routine, Mo2sda y Mo2peak se ajustaron mediante el análisis de regresión múltiple al siguiente modelo $\ln Mo_2 = \ln a + b \ln W + cT + dT^2$.

Para el desarrollo por parte del IMIDA de Murcia de un modelo econométrico de viabilidad/rentabilidad para el engorde de lenguado en tanques de tierra con bombeo de agua de pozo, se utilizaron los parámetros indicados en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Carga final, producción y número de tanques de preengorde en función del tipo de instalación.

Instalación	Carga final (Kg/m2)	Producción (Tn)	Tanques Preengorde (5 m diáme)	Superficie de ocupación (ha)
A	10	100	22	3,5
B	20	200	42	3,7
C	30	300	64	3,9
D	40	400	86	3,9

Todas las instalaciones: 88 tanques de 12 m de diámetro.

En las cuatro instalaciones el número de tanques de engorde es el mismo (88 tanques de 12 de diámetro), pero el número de tanques de preengorde (5 m de diámetro) varía desde 22 a 86 (Tabla 5.1) ya que el número de alevines también varía según sea la carga final de cultivo. Los tanques de engorde son exteriores pero disponen de una cubierta o umbráculo construido en hierro galvanizado y cubierto con malla doble plástica, y los de preengorde se ubican en una nave. En todos los casos se bombea de agua de pozo, ya que en principio mantiene una temperatura constante de 19-20°C, que coincidiría con la temperatura óptima del lenguado. Para disminuir los costos de bombeo se utiliza también oxígeno líquido. Los caudales y necesidades de oxígeno líquido se calculan a partir de las ecuaciones de consumo de oxígeno para esta especie (García García et al., 2004), y a partir de éstos se realizan los correspondientes cálculos hidráulicos para el dimensionamiento de las conducciones, tanto de entrada como de salida de los tanques.

Todas las plantas cuentan con un edificio multiuso, caseta de bombeo, nave para tanques de preengorde, maquinaria y equipamiento, etc. El resumen de la inversión inicial queda definida en la Tabla 5.2, incluyendo asimismo los equipos y maquinaria necesarios para el desarrollo de esta actividad y gastos varios tales como mobiliario, licencia de obras, proyecto y dirección de obra.

Tabla 5.2. Resumen de los capítulos del presupuesto de inversión en las cuatro plantas.

CAPÍTULO	Planta A	Planta B	Planta C	Planta D
Movimientos de tierras	65.100	68.820	72.540	72.540
Edificio multiuso/caseta de bombeo	179.695	239.410	299.125	348.388
Conducciones entrada de agua	18.770	20.825	22.939	23.588
Desagües y canalizaciones	21.400	23.423	25.478	26.481
Equipo de bombeo y pozos	189.000	298.400	383.800	469.200
Nave: Tanques de preengorde	183.650	342.775	508.300	668.950
Tanques	1.125.376	1.125.376	1.125.376	1.125.376
Tanque de decantación/emisario	87.218	112.548	130.598	144.098
Urbanización	60.490	64.430	68.687	69.868
Instalación inyección O ₂ , y distribución	12.000	16.000	19.000	22.000
Maquinaria y equipamiento	75.000	112.500	140.625	161.720
Varios	132.755	168.832	199.166	224.040
TOTAL:	2.150.454	2.593.338	2.995.633	3.356.248

La inversión (K) varía entre los 2 y 3 millones de euros (Tabla 2) y existe una relación directa significativa entre la carga final de cultivo (CF) o tipo de explotación y la inversión necesaria (Figura 5.1), que se puede expresar mediante la ecuación: $K=40.197CF+2 \cdot 10^6$

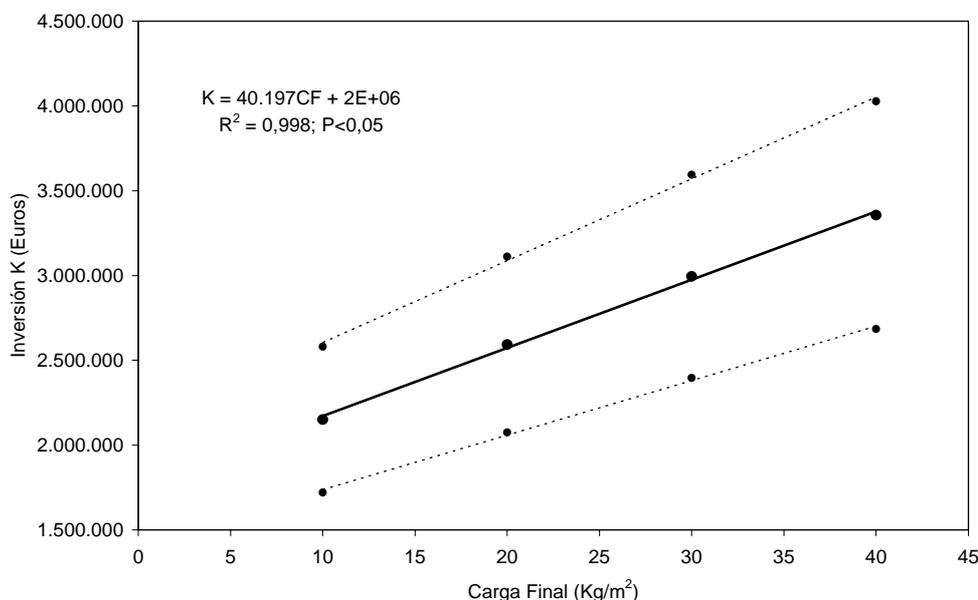


Figura 5.1. Relación entre la carga final de engorde (Kg/m^2) y la inversión (K) necesaria.

Respecto a los costes de producción, el régimen de producción considerado es el intensivo, utilizando como alimento un pienso comercial para lenguado. Según los resultados experimentales obtenidos hasta el momento (Rodríguez y Souto, 2003; Chereguini et al., 2004) se ha estimado que el índice de conversión puede estar próximo a 1 (IC1=1). No obstante, dado que el lenguado come del fondo y no muestra una gran actividad por capturar el pienso cuando este le es suministrado, es de esperar que en condiciones industriales de engorde haya una pérdida de pienso que puede representar al menos un 20%, por lo que el índice de conversión sería de 1,2 (IC2=1,2). Por otro lado, el índice de conversión también se ve afectado por la mortalidad. Como para esta especie aún no existe un dato promedio de cual puede ser la supervivencia en condiciones industriales los cálculos se han hecho para un rango del 60 al 100% de supervivencia. Así, para cada valor de supervivencia se ha calculado el índice de conversión (IC3) mediante la siguiente fórmula:

$$IC3=(AV+AM)/BP$$

donde AV es el pienso consumido por los supervivientes (IC2); AM el pienso consumido por las bajas suponiéndoles un peso medio de 200g; BP la biomasa producida. El precio del kg de pienso comercial para lenguado (IVA incluido) es de 1,5 euros. En la Tabla 5.3 se muestra el efecto de la supervivencia sobre el índice de conversión y sobre el coste de la alimentación por kg de lenguado producido.

Tabla 5.3. Índice de conversión (IC3) y coste de la alimentación por Kg producido (C_p) en función de la supervivencia.

	100	90	80	70	60
IC3	1,20	1,27	1,35	1,46	1,60
C_p (E/Kg)	1,80	1,90	2,03	2,19	2,40

Para determinar los costes de bombeo de agua así como de oxígeno líquido se han utilizado los modelos de consumo de oxígeno desarrollados para esta especie (García García, et al., 2004). Para calcular las necesidades promedio de oxígeno se ha asumido que el peso medio de los ejemplares cultivados en cualquier momento del años es de 200 g, resultando los siguientes valores de consumo de oxígeno:

- CO medio diario: 134,60 mgO₂/Kg/h – Costes de electricidad y de inyección de oxígeno.
- CO rutina: 90,28 mgO₂/Kg/h- Se podría utilizar para optimizar los costes.
- CO máximo debido a la alimentación: 159,09 mgO₂/Kg/h
- Dimensionamiento bombas.

Para hacer los cálculos de caudal de agua (tabla 4) y de aporte de oxígeno líquido (Tabla 5.5) se han establecido los siguientes valores:

- [O₂] agua de pozo: 60% de saturación (4,38 g/m³).
- [O₂] agua entrada al tanque 180% (13,13 g/m³)
- [O₂] agua salida tanque 90% (6,56 g/m³)

-[O₂] salida de tanque: 90% saturación

Tabla 5.4. Caudales de agua de pozo en las distintas instalaciones

	Qmed (m ³ /h)	Qmin (m ³ /h)	Qmax (m ³ /h)
A	1.025	688	1.212
B	2.051	1.375	2.424
C	3.076	2.063	3.636
D	4.101	2.751	4.848

Tabla 5.5. Necesidades y coste de la inyección de oxígeno en las distintas instalaciones. En los costes se ha repercutido el coste del oxígeno líquido, el alquiler de los depósitos de almacenamiento y la tasa de descarga del producto.

	Inyección O2 (m ³ /h)	Inyección O2 (m ³ /año)	Coste anual (Euros)	Coste Kg producido (Euros/Kg)
A	6,68	58.560	12.385	0,248
B	13,37	117.119	20.594	0,206
C	20,05	175.679	28.803	0,192
D	26,74	234.239	37.012	0,185

El coste de alevines por kg producido de lenguado (C_A) también varía en función de cual sea la supervivencia. Por ello, también se ha calculado como repercute la supervivencia sobre este coste (Tabla 5.6). El precio del alevín se ha fijado en un 1,00 Euro/ud. (IVA incluido).

Tabla 5.6. Número de alevines iniciales para producir un Kg de producto (N/Kg) y coste de los mismos (C_A) según la supervivencia. Peso medio comercial: 400g.

	100	90	80	70	60
N/Kg	2,50	2,78	3,13	3,57	4,17
C_A (Euro/Kg)	2,50	2,78	3,13	3,57	4,17

En las tablas 7 a 10 se muestra la corriente de pagos y cobros para el año 2 y sucesivos en el caso de la hipótesis inicial. Para los cobros se ha estimado un precio de venta medio de 11,5 euros.

Tabla 5.7. Corriente de pagos y cobros ordinarios y extraordinarios de la Planta-A (Carga final 10 Kg/m²).

SISTEMA DE PRODUCCION PLANTA A			
PAGOS ORDINARIOS	AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3 y ss.
1. Alevines	334.000	334.000	334.000
2. Pienso	210.000	210.000	210.000
3. Energía eléctrica bombeo	72.030	72.030	72.030
4. Oxígeno líquido	12.400	12.400	12.400
5. Personal	263.000	263.000	263.000
6. Combustible (Bomba trasvase, clasificador...)	3.000	3.000	3.000
7. Agua, energía, teléfono oficinas	2.460	2.460	2.460
8. Seguros sobre producción	57.000	57.000	57.000
9. Gastos de mantenimiento	9.703	19.406	19.406
10. Tratamientos	3.000	3.000	3.000
11. Otros (Concesión, etc.)	3.450	3.450	3.450
12. Arrendamiento	3.150	3.150	3.150
15. Promoción y publicidad	5.750	5.750	5.750
TOTAL:	978.943	988.646	988.646
PAGOS EXTRAORDINARIOS			
1. Equipo inyección oxígeno (en Año 10)			12.000
2. Equipo de bombeo y maquinaria (en Año 10)			163.000
COBROS ORDINARIOS			
	AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3 y ss.
1. Venta de lenguado	1.150.000	1.150.000	1.150.000
TOTAL:	1.150.000	1.150.000	1.150.000
COBROS EXTRAORDINARIOS			
1. Subvención (30% inversión)		645.136	
2. Venta equipos (en años 10 y 20)			17.500

Tabla 5.8. Corriente de pagos y cobros ordinarios y extraordinarios de la Planta-B
 (Carga final 20 Kg/m²).

SISTEMA DE PRODUCCION			
PLANTA B			
PAGOS ORDINARIOS	AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3 y ss
1. Alevines	668.000	668.000	668.000
2. Pienso	420.000	420.000	420.000
3. Energía eléctrica bombeo	144.060	144.060	144.060
4. Oxígeno líquido	20.600	20.600	20.600
5. Personal	331.000	331.000	331.000
6. Combustible (Bomba trasvase, clasificador...)	6.000	6.000	6.000
7. Agua, energía, teléfono oficinas	3.696	3.696	3.696
8. Seguros sobre producción	114.000	114.000	114.000
9. Gastos de mantenimiento	11.698	23.397	23.397
10. Tratamientos	6.000	6.000	6.000
11. Otros (Concesión, etc.)	6.900	6.900	6.900
12. Arrendamiento	3.330	3.330	3.330
15. Promoción y publicidad	11.500	11.500	11.500
TOTAL:	1.746.784	1.758.483	1.758.483
PAGOS EXTRAORDINARIOS			
1. Equipo inyección oxígeno (en Año 10)			16.000
2. Equipo de bombeo y maquinaria (en Año 10)			270.900
COBROS ORDINARIOS			
	AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3 y ss.
1. Venta de lenguado	2.300.000	2.300.000	2.300.000
TOTAL:	2.300.000	2.300.000	2.300.000
COBROS EXTRAORDINARIOS			
1. Subvención (30% inversión)		778.001	
2. Venta equipos (en años 10 y 20)			28.690

Tabla 5.9. Corriente de pagos y cobros ordinarios y extraordinarios de la Planta-C (Carga final 30 Kg/m³).

SISTEMA DE PRODUCCION PLANTA C:			
PAGOS			
PAGOS ORDINARIOS	AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3 y ss.
1. Alevines	1.002.000	1.002.000	1.002.000
2. Pienso	630.000	630.000	630.000
3. Energía eléctrica bombeo	215.837	215.837	215.837
4. Oxígeno líquido	28.800	28.800	28.800
5. Personal	399.000	399.000	399.000
6. Combustible (Bomba trasvase, clasificador...)	9.000	9.000	9.000
7. Agua, energía, teléfono oficinas	4.920	4.920	4.920
8. Seguros sobre producción	171.000	171.000	171.000
9. Gastos de mantenimiento	13.525	27.049	27.049
10. Tratamientos	9.000	9.000	9.000
11. Otros (Concesión, etc.)	10.350	10.350	10.350
12. Arrendamiento	3.510	3.510	3.510
15. Promoción y publicidad	17.250	17.250	17.250
TOTAL:	2.514.192	2.527.716	2.527.716
PAGOS EXTRAORDINARIOS			
1. Equipo inyección oxígeno (en Año 10)			19.000
2. Equipo de bombeo y maquinaria (en Año 10)			369.425
COBROS ORDINARIOS			
	AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3 y ss.
1. Venta de lenguado	3.450.000	3.450.000	3.450.000
TOTAL:	3.450.000	3.450.000	3.450.000
COBROS EXTRAORDINARIOS			
1. Subvención (30% inversión)		898.690	
2. Venta equipos (en años 10 y 20)			38.843

Tabla 5.10. Corriente de pagos y cobros ordinarios y extraordinarios de la Planta-D (Carga final 40 Kg/m²).

SISTEMA DE PRODUCCION			
PLANTA D: PAGOS			
PAGOS ORDINARIOS	AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3 y ss.
1. Alevines	1.336.000	1.336.000	1.336.000
2. Pienso	840.000	840.000	840.000
3. Energía eléctrica bombeo	287.867	287.867	287.867
4. Oxígeno líquido	37.200	37.200	37.200
5. Personal	467.000	467.000	467.000
6. Combustible (Bomba trasvase, clasificador...)	12.000	12.000	12.000
7. Agua, energía, teléfono oficinas	5.664	5.664	5.664
8. Seguros sobre producción	228.000	228.000	228.000
9. Gastos de mantenimiento	15.188	30.377	30.377
10. Tratamientos	12.000	12.000	12.000
11. Otros (Concesión, etc.)	13.800	13.800	13.800
12. Arrendamiento	3.510	3.510	3.510
15. Promoción y publicidad	23.000	23.000	23.000
TOTAL:	3.281.229	3.296.418	3.296.418
PAGOS EXTRAORDINARIOS			
1. Equipo inyección oxígeno (en Año 10)			22.000
2. Equipo de bombeo y maquinaria (en Año 10)			460.920
COBROS ORDINARIOS			
	AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3 y ss.
1. Venta de lenguado	4.600.000	4.600.000	4.600.000
TOTAL:	4.600.000	4.600.000	4.600.000
COBROS EXTRAORDINARIOS			
	AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3 y ss.
1. Subvención (30% inversión)		839.062	
2. Venta equipos (en años 10 y 20)			48.292

En el análisis de sensibilidad y modelo econométrico, Los flujos de caja se establecen para una vida útil de 20 años y se calculan a partir de los correspondientes cobros y pagos ordinarios y extraordinarios. Para realizar el análisis de sensibilidad se han utilizado las siguientes variables: Inversión (K), Costes energético y de oxígeno por Kg producido (C_E), coste del alimento por Kg producido (C_P), coste de alevines por Kg producido (C_A), precio de venta (PV). Los rangos preestablecidos de las variables se muestran en la tabla 5.8. Se generaron 243 alternativas mediante el uso de las correspondientes hojas de cálculo para cada una de los cuatro tipo de plantas, y los datos así obtenidos se ajustaron mediante el análisis de regresión múltiple a la siguiente ecuación: $Y = a + bK + cC_E + dC_P + eC_A + fPV$, donde Y es el VAN o el TIR, y a, b, c, d, e y f son coeficientes que determina el análisis de regresión múltiple.

Tabla 5.11. Rango utilizado de las variables para realizar el análisis de sensibilidad y el posterior análisis econométrico.

	K	C_E	C_P	C_A	PV
A	1.720.363-2.580.545	0,68- 1,01	1,80- 2,40	2,50- 4,17	10-13
B	2.074.671-3.112.006	0,66- 0,99	1,80- 2,40	2,50- 4,17	10-13
C	2.396.506-3.594.759	0,65- 0,98	1,80- 2,40	2,50- 4,17	10-13
D	2.684.998-4.027.498	0,65- 0,48	1,80- 2,40	2,50- 4,17	10-13

Inversión (K), Costes energético y de oxígeno por Kg producido (C_E), coste del alimento por Kg producido (C_P), coste de alevines por Kg producido (C_A), precio de venta (PV).

RESULTADOS

Línea 1. Reproducción en cautividad de *Solea senegalensis*.

Caracterización de puestas naturales en el lenguado en función de la temperatura y la época del año.

Los reproductores de lenguado mantenidos en las instalaciones del CIFPA “El Toruño” efectuaron puestas a lo largo de los tres años de estudio. Los periodos en los que se registraron puestas (Figura 1.1) siguieron un patrón característico, según el régimen térmico, no observándose diferencias importantes entre años.

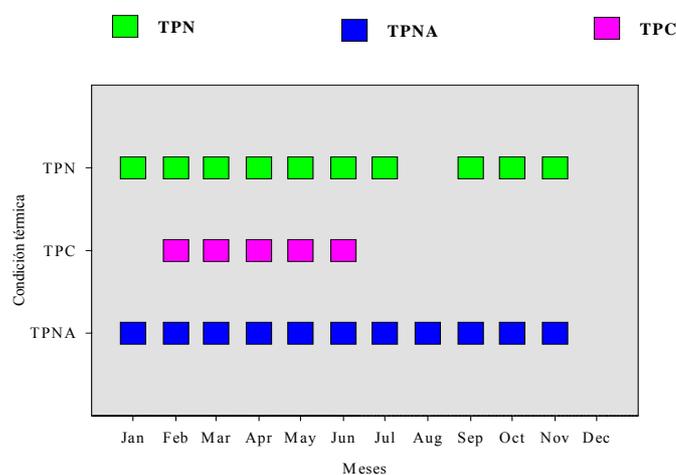


Figura 1.1. Periodo de puesta en cautividad de *S.senegalensis* en función del termoperiodo. TPN: Termoperiodo natural. TPC: Termoperiodo controlado a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. TPNA: Termoperiodo natural amortiguado

En los cultivos con temperatura natural (Figura 1.2) se han obtenido dos periodos de puesta bien diferenciados, el primero con mayor frecuencia de puestas abarcó de enero-febrero a junio-julio y un segundo periodo, que representó aproximadamente el 8-9 % del total de puestas anuales, y tuvo lugar durante los meses de septiembre-octubre-noviembre, lo que apoya la existencia, ya demostrada, de un periodo de puesta biestacionario (Primavera y Otoño) en las costas de Cádiz (Arias y Drake, 1990).

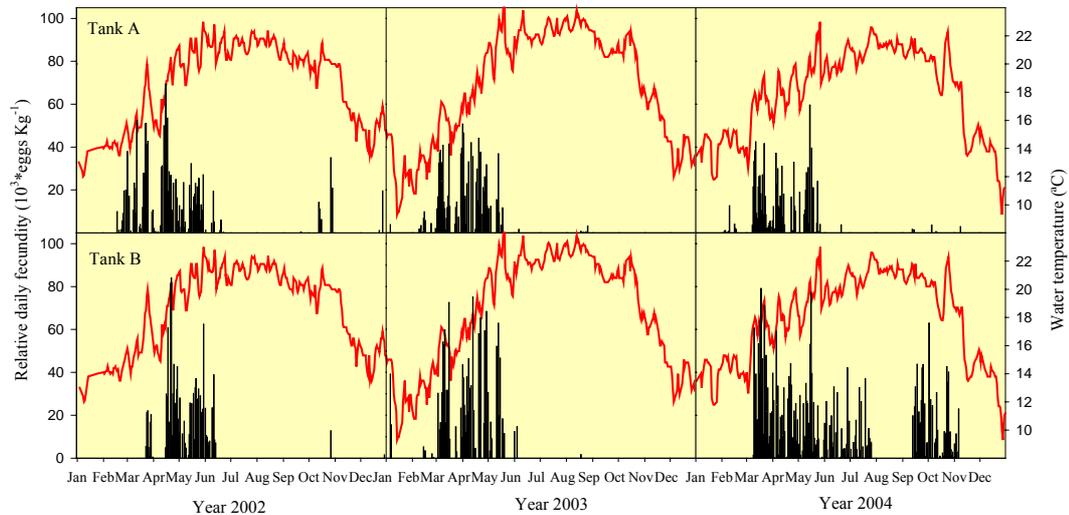


Figura 1.2. Fecundidad relativa diaria de *S.senegalensis* a lo largo de tres años en dos tanques replicados y sujetos a termoperiodo natural.

En los lotes con termoperiodo natural controlado a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, solo se obtuvieron puestas en uno de los dos tanques replicados, existiendo un único periodo de puesta coincidente con el primer periodo de puesta observada en condiciones térmicas naturales. Sin embargo, cuando el termoperiodo era amortiguado se registraron puestas a lo largo de todo el ciclo anual, sin existir diferenciación en dos periodos de puesta, aunque el tamaño de las puestas fue menor (Figura 1.3).

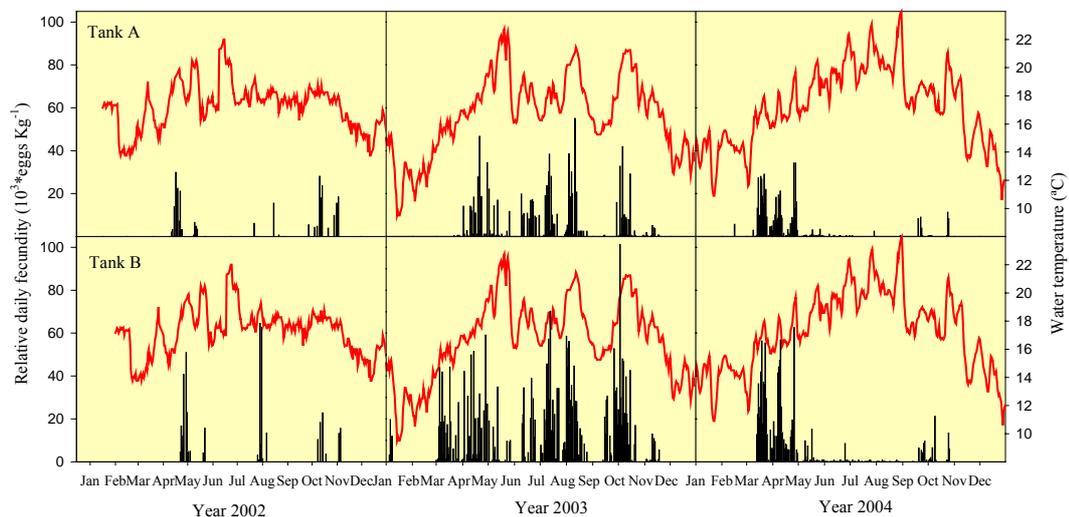


Figura 1.3. Fecundidad relativa diaria de *S.senegalensis* a lo largo de tres años en dos tanques replicados y sujetos a termoperiodo natural amortiguado.

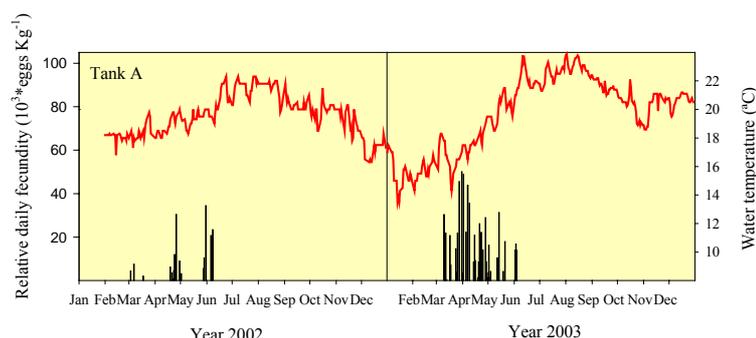


Figura 1.4. Fecundidad relativa diaria de *S.senegalensis* a lo largo de dos años y sujetos a termoperiodo controlado a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$

El rango de temperaturas en el que tuvieron lugar las puestas fue de $13\text{-}23^{\circ}\text{C}$ en condiciones de termoperiodo natural, de $12\text{-}21^{\circ}\text{C}$ en condiciones de termoperiodo natural amortiguado y de $14\text{-}21.5^{\circ}\text{C}$ cuando el termoperiodo estuvo controlado a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$.

La fecundidad total por condición y año varió entre los valores mas bajos, 0.2×10^6 y 0.3×10^6 huevos Kg^{-1} , en condiciones de termoperiodo natural amortiguado y termoperiodo controlado a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, los valores mas elevados encontrados con termoperiodo natural, 1.26×10^6 y 1.66×10^6 huevos Kg^{-1} . (Tabla 1.1)

Tabla 1.1. Numero de puestas registradas, fecundidad media diaria, y fecundidad total anual obtenida para reproductores de *S.senegalensis* durante tres años de reproducción y según condición térmica aplicada.

CONDICIÓN TÉRMICA	AÑO	Nº de puestas	Fecundidad media (10^3 huevos Kg^{-1})	Fecundidad total (10^6 huevos Kg^{-1})
TPN	2002	64	19.7 ± 17.8	1.26
TPN	2003	72	23.1 ± 17.1	1.66
TPN	2004	167	7.8 ± 5.7	1.3
TPNA	2002	28	10.5 ± 8.7	0.3
TPNA	2003	111	9.5 ± 7	1
TPNA	2004	117	7.1 ± 11	0.83
TPC	2002	16	11.1 ± 10.4	0.2
TPC	2003	47	15.9 ± 14.7	0.7

La producción de huevos global teniendo en cuenta las producciones en cada una de las condiciones térmicas experimentales durante los tres años de estudio asciende a un total de 296 millones, distribuidas en 194.6, 91.4, y 9 millones según el termoperiodo aplicado fuese natural, natural amortiguado o controlado a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

En condiciones de termoperiodo natural se obtuvo el mayor porcentaje de producción total, representando una media de 67%, frente a un 30% con termoperiodo natural amortiguado. La menor producción de huevos correspondió al termoperiodo controlado a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, con escasez de oscilaciones térmicas (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Porcentajes de producción total de huevos obtenidos en reproductores de *S.senegalensis* cultivados en cautividad a lo largo de tres años consecutivos de reproducción y según la condición térmica experimental aplicada.

CONDICIÓN TÉRMICA	% PRODUCCIÓN HUEVOS TOTALES		
	AÑO		
	2002	2003	2004
TPN	76	59	66
TPNA	22	34	35
TPC	2	7	

En los tres regímenes térmicos se observó una producción total mayor durante los meses de marzo, abril y mayo, siendo más destacada con termoperiodo natural (Figura. 1.5)

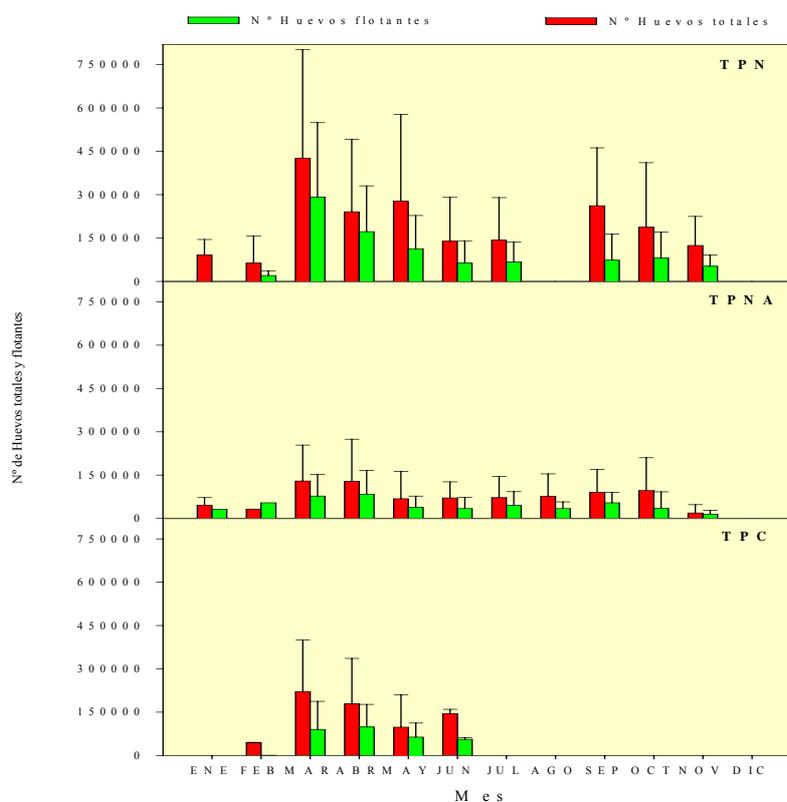


Figura 1.5. Distribución mensual del tamaño de puesta de *S.senegalensis* según la condición térmica aplicada.

Fuera del CIFPA “El Toruño”, las únicas puestas naturales obtenidas con los stocks de reproductores formados durante la ejecución del proyecto, ocurrieron en el IEO de Santander. Las primeras puestas se obtuvieron en 2003 sin realizar manipulación de la temperatura, observándose días antes de la puesta pequeñas variaciones en la temperatura. En el 2004 se manipuló el termoperiodo a principios de Febrero en los dos stocks, incrementando 0,5 °C por semana, y a primeros de Marzo comenzaron las puestas, que continuaron hasta Septiembre (Figuras 1.6 y 1.7). El porcentaje de fecundación fue bajo y los volúmenes pequeños, pero estas cantidades permitieron realizar cultivos larvarios a lo largo de este periodo.

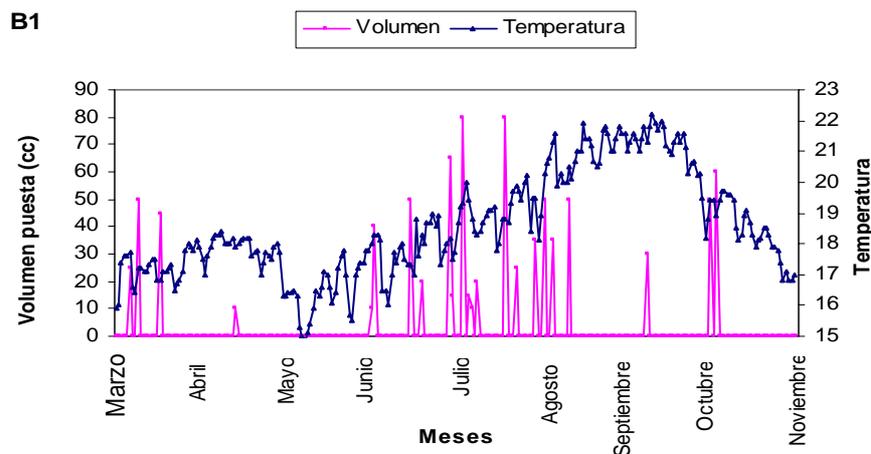


Figura 1.6. Volumen de puestas (cc) del stock B1 de lenguado tras manipulación del termoperiodo.

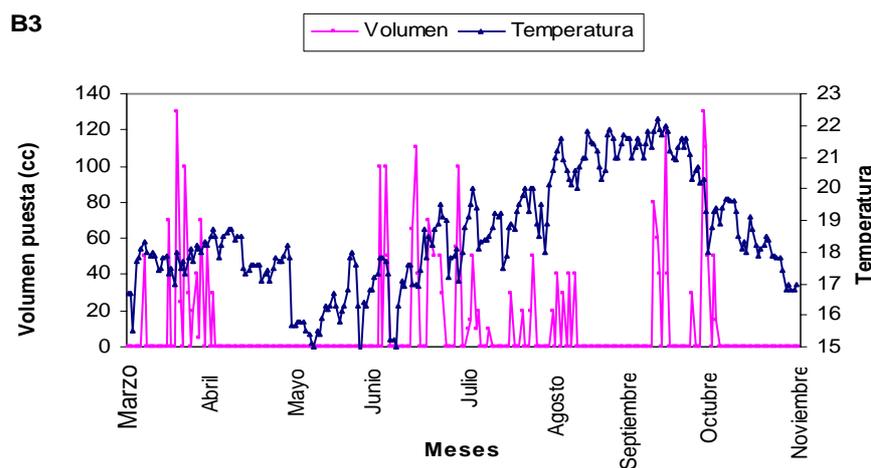


Figura 1.7. Volumen de puestas (cc) del stock B3 de lenguado tras manipulación del termoperiodo.

Evaluación del estado de maduración sexual

En la variación mensual del índice de condición se ha observado que independientemente del régimen térmico aplicado los valores máximos se encuentran entre los meses de febrero y marzo, momento previo al comienzo del periodo de puesta (K=1,23 TPN; K=1,15 TPNA; K=1,17 TPC) produciéndose luego una disminución hasta alcanzar los valores mínimos (K=1,07 TPN; K =1,06 TPNA; K =1,13 TPC) durante los meses de junio y julio, finalización del primer y principal periodo de puesta. En general podemos observar un comportamiento de este parámetro muy parecido entre individuos sometidos a termoperiodo natural y natural amortiguado, siendo la variación mucho más atenuada en condiciones de termoperiodo controlado.

La variación observada en el estado de madurez sexual aparente en hembras sometidas a termoperiodo natural muestra la existencia de dos periodos bien diferenciados, de enero a mayo y de septiembre a noviembre, en los que la existencia de hembras en estado 3 y 4 son superiores a lo observado para hembras en estados 1 y 2. Sin embargo, esta diferenciación biestacional no ocurre cuando el termoperiodo fue natural amortiguado, donde se observó la existencia de hembras maduras (estados 3 y 4) prácticamente a lo largo de todo el ciclo anual, aunque si manifestó su mayor porcentaje durante los meses de marzo y abril y posteriormente en septiembre y octubre (Figura 1.8)

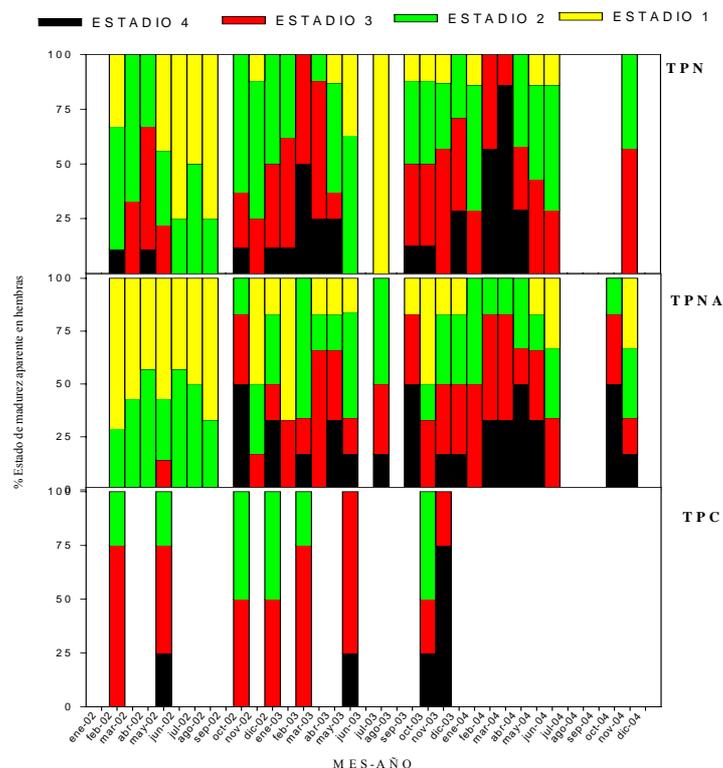


Figura 1.8. Evolución del estado de madurez sexual aparente en hembras de *S.senegalensis* a lo largo de tres años consecutivos según la condición térmica aplicada.

En el caso de los machos, y a diferencia de las hembras, se han observado individuos que emitieron esperma ante el masaje realizado a lo largo de todo el ciclo anual, aunque la máxima proporción de ellos ocurre entre los meses de febrero y abril, y entre octubre y noviembre, tanto en condiciones de termoperiodo natural como el amortiguado (Figura 1.9)

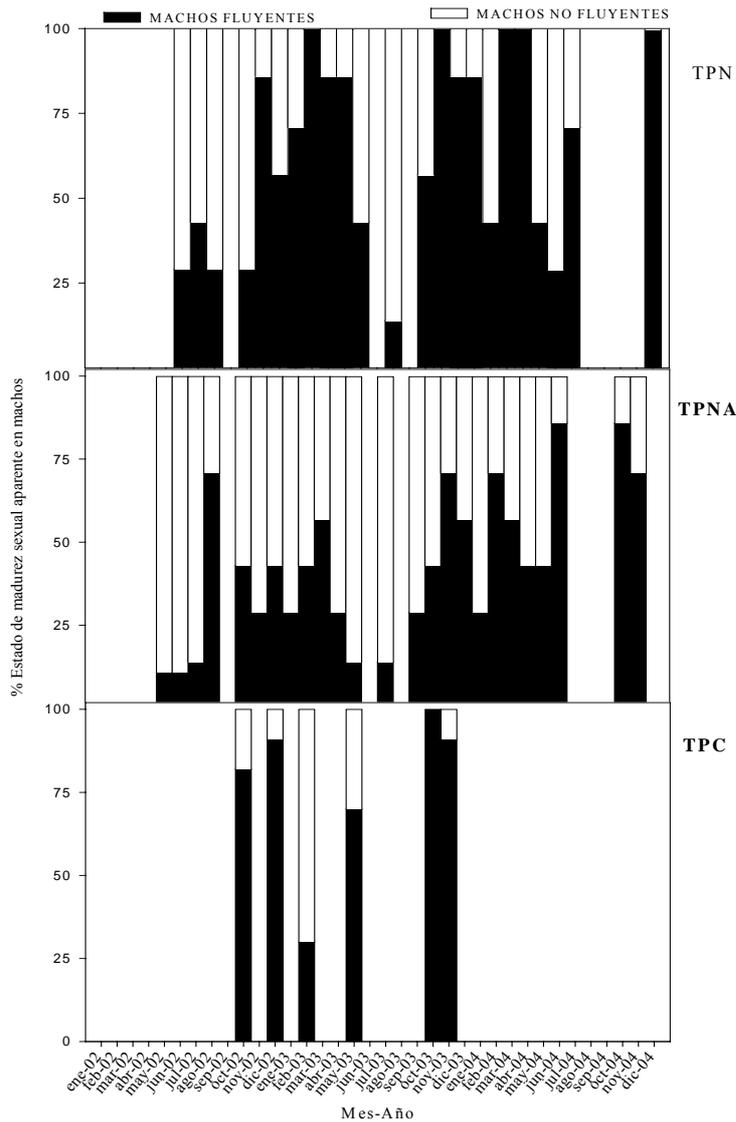


Figura 1.9. Evolución del estado de madurez aparente en machos de *S.senegalensis* a lo largo de tres años consecutivos según la condición térmica.

Calidad de huevos obtenidos en puestas naturales

El estudio de la calidad de la puesta basada en parámetros cualitativos como las tasas de fertilización y eclosión, ha mostrado los mejores resultados en condiciones naturales de luz y temperatura con una fertilización de $54 \pm 19\%$ y una tasa de eclosión de $64 \pm 24.4\%$.

En el resto de las condiciones térmicas experimentales la fertilización estuvo comprendida entre $42 \pm 14.7\%$ obtenida en los cultivos desarrollados con termoperiodo natural amortiguado (Figura 1.10); y algo menor, $38 \pm 18.4\%$, en aquellos en los que se anuló el efecto térmico estacional con termoperiodo controlado a $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

En cuanto a la tasa de eclosión, los valores registrados en condiciones de termoperiodo natural amortiguado y termoperiodo controlado a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, fueron muy similares, $53.3 \pm 16.3\%$ y $53.7 \pm 19.6\%$, respectivamente, y siempre inferiores a los obtenidos con un régimen térmico natural.

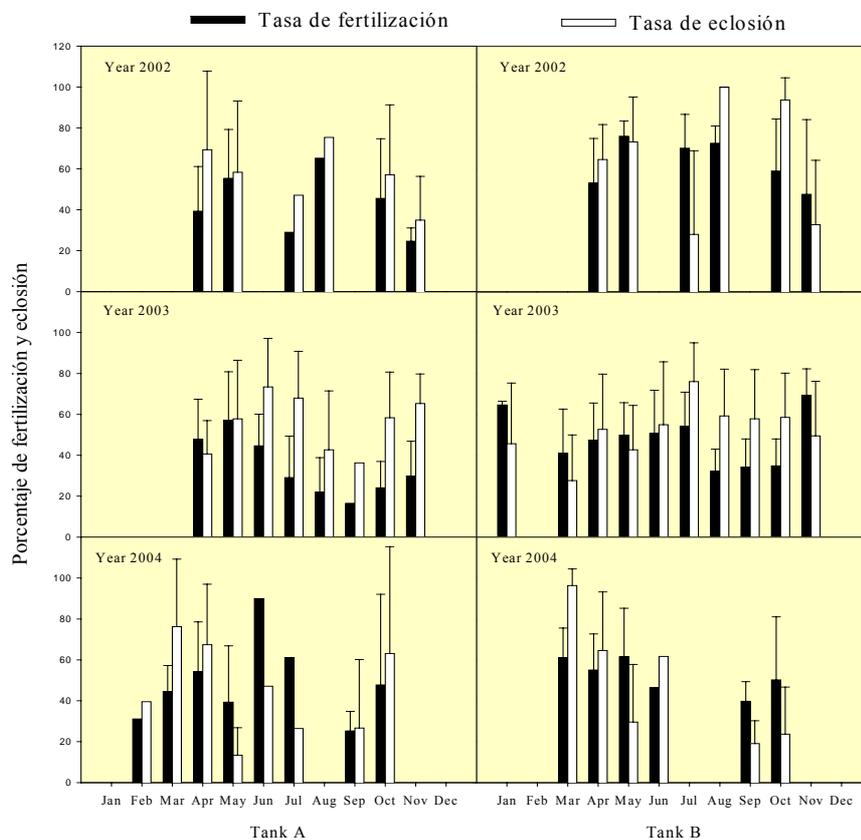


Figura 1.10. Variabilidad mensual de la calidad de puesta *S. senegalensis* a lo largo de tres años consecutivos de reproducción en cautividad en condiciones de termoperiodo natural amortiguado.

Aunque la calidad de puesta, desde el punto de vista cualitativo, obtenida en condiciones de termoperiodo controlado a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ fue muy pareja a la conseguida con el resto de condiciones térmicas experimentales, sin embargo, los resultados cuantitativos marcaron una gran diferencia con el resto. En los tres años de desarrollo del presente proyecto solamente se obtuvieron un total de 63 puestas frente a las 256 con termoperiodo natural amortiguado y 303 con termoperiodo natural. De igual forma, el porcentaje de producción total de huevos, 3%, también fue el menor observado.

Control hormonal de la reproducción del lenguado senegalés en cautividad.

Las pruebas preliminares de inducción hormonal a la puesta realizadas durante el año 2002 en el CA-IRTA, utilizando la inyección intramuscular de LH-RH, resultaron en un pobre efecto sobre la estimulación de la puesta lo cual produjo además un 100% de huevos no fertilizados (datos no mostrados). Para estos experimentos se emplearon animales F1 de aproximadamente 500-800 g. de peso, y por tanto se pensó que el potencialmente estadio temprano de maduración sexual de los animales seleccionados podría ser la causa del escaso efecto observado en las hembras y la ausencia de estimulación de la espermiación en los machos. Con el fin de comprobar estas hipótesis iniciales, durante los años posteriores se han llevado a cabo diferentes experimentos de inducción hormonal a la puesta con LH-RH, tanto sobre animales F1 como sobre reproductores salvajes adaptados a la cautividad.

En la Tabla 1.3 y Figura 1.11 se muestran los resultados obtenidos en este experimento. Las hembras respondieron al tratamiento de LH-RH, y aquellas que fueron inyectadas cada tres días mostraron un número más elevado de puestas y una producción total de huevos más elevada. Se recogieron las puestas más elevadas aproximadamente a los tres días de la inyección (Figura 1.11). No obstante, los huevos producidos no estuvieron fecundados, lo que pudo estar relacionado con una ineficacia de la LH-RH para inducir la espermiación en machos. Estos experimentos confirmaron la ausencia de efectividad de la inyección intramuscular de LH-RH sobre la estimulación de la espermiación en machos de lenguado. No obstante, para comprobar que este efecto no era debido al hecho de que los animales utilizados fueron F1, o a que se empleó una proporción de machos baja en cada tanque, el mismo diseño experimental fue aplicado sobre ejemplares salvajes adaptados a la cautividad en las instalaciones del CICEM “El Toruño”.

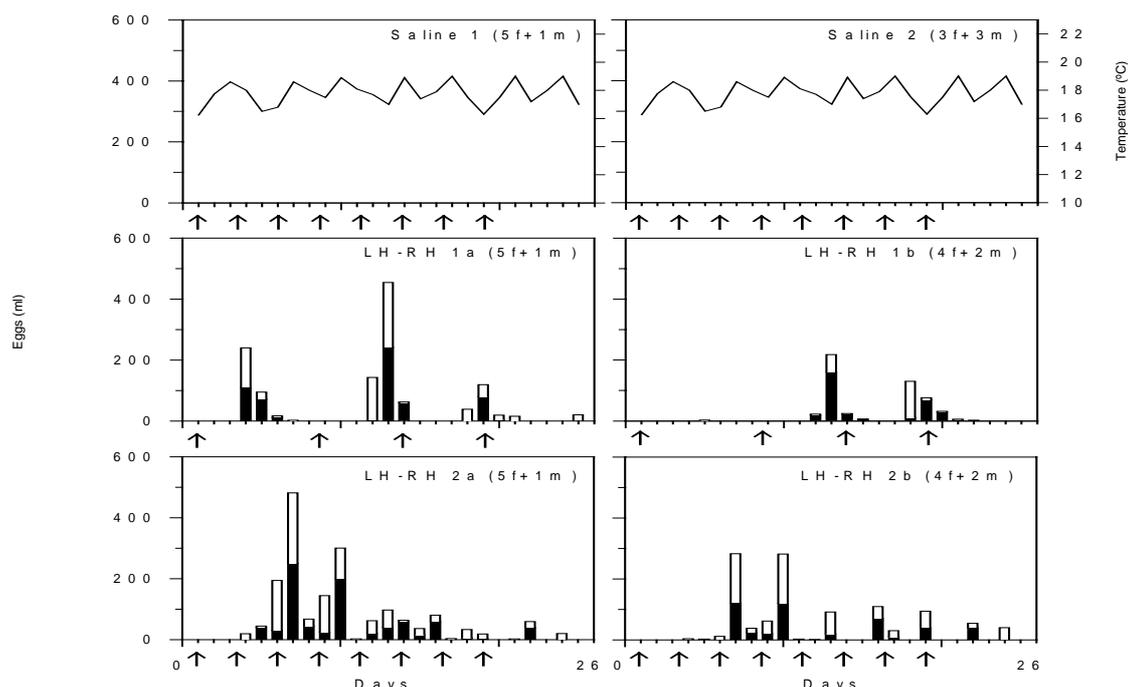


Figura 1.11. Inducción a la puesta mediante inyección intramuscular de LH-RH en lenguados F1 durante el mes de Abril y Mayo de 2003. Las flechas indican el día de la inyección. Barras negras = % huevos no flotantes; barras blancas = % huevos flotantes.

Tabla 1.3. Resultados de la inducción hormonal mediante inyección intramuscular de LH-RH durante el mes de Abril y Mayo en lenguados criados en cautividad (F1)

Tratamiento ¹	Rép	Peso hembras (kg)	Nº Puestas	Nº huevos Fecund (x10 ⁶)	Huevos Fecund (huevo/kg)	Huevos Flotantes (%)	Tasa de Fertilizac. (%)
Salino	1	1,334±144	0	—	—	—	—
	2	1,257±80	0	—	—	—	—
5µg LH-RH/k (semanal)	1	1,310±104	11	1.2	931.298	63,21±7,80	0
	2	1,258±73	6	0.502	399.046	37,30±11,04	0
5µg LH-RH/k (cada 3 días)	1	1,268±77	16	1.729	1.363.565	51,74±6,42	0
	2	1,206±88	13	1.1	912.106	56,00±7,55	0

¹La inyección se suministró una vez a la semana o cada 3 días durante un periodo total de 4 semanas.

El experimento sobre individuos salvajes se llevó a cabo durante la segunda época puesta del lenguado (otoño). Para este experimento las dosis de LH-RH fueron de 1 y 5 µg/kg suministradas intramuscularmente una vez por semana tanto a machos como a hembras. De modo similar a lo observado en las hembras F1, las hembras salvajes respondieron al tratamiento de LH-RH, incluso con dosis de 1 µg/kg suministrada una vez por semana, mientras que el grupo control no mostró ninguna puesta (Tabla 1.4). No obstante, las hembras tratadas con una dosis de 5 µg/kg produjeron un menor número de puestas y huevos, con una calidad en términos de flotabilidad del huevo sensiblemente menor en comparación con el

grupo tratado con 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La producción de huevos de estas hembras fue de 49.516 huevos/kg en el mejor de los casos, lo cual contrasta con lo obtenido en los animales F1 (931.298 huevos/kg) durante los meses de Abril y Mayo. Ello pudo ser debido a que este segundo experimento se llevó a cabo durante la segunda época de puesta, en la que es conocido que no se observa la misma capacidad reproductora. No obstante, volvió a ser llamativo el hecho de observarse en este experimento que las hembras producen huevos aproximadamente al cabo de 3 días desde la inyección con LH-RH, lo cual puede sugerir la existencia de ciclos ovulatorios de esta duración en el lenguado. Futuros experimentos deberán orientarse a investigar este hecho mediante la utilización de hembras aisladas.

Tabla 1.4. Resultados de la inducción hormonal mediante inyección intramuscular de LH-RH durante el mes de Octubre en lenguados salvajes adaptados a la cautividad¹

Tratamiento	Rép	Peso hembras (kg)	n N° Puestas	N° Huevos ($\times 10^6$)	Fecund (huevo/kg)	Huevos flotantes (%)	Tasa Fertilizac. (%)
Salino	1	1,644 \pm 143 (n = 6)	0	–	–	–	–
1 μg LH-RH/l	1	1,999 \pm 334 (n = 3)	4	0.297	49.516	45	0
	2	1,714 \pm 222 (n = 3)	7	0.102	19.840	13	0
5 μg LH-RH/l	1	1,963 \pm 368 (n = 3)	2	0.009	1.528	0	0
	2	1,768 \pm 220 (n = 3)	2	0.071	13.386	8	0

¹La inyección se suministró una vez a la semana durante un periodo total de 4 semanas.

A pesar de la efectividad de la LH-RH que se observó en las hembras salvajes, el porcentaje de fertilización de los huevos volvió a ser nulo. Esta observación confirma los resultados anteriores obtenidos en animales F1, y por tanto parece indicar que los machos de lenguado no responden a los tratamientos de inyección con LH-RH. Los datos presentados en la Tabla 1.5 confirman esta hipótesis, ya que no se detectó ninguna diferencia en el número de animales espermiantes, el volumen de esperma, el espermatozocrito o el número de espermatozoides entre el grupo control y los inyectados con LH-RH. Sin embargo, la calidad del esperma producido por los animales inyectados con LH-RH fue claramente inferior al esperma producido por los animales control. Los espermatozoides inducidos con LH-RH presentaron una cola con evidentes malformaciones, lo que puede estar relacionado con una menor movilidad de los espermatozoides y por tanto una reducida capacidad para la fecundación (Figura 1.12).

Tabla 1.5. Efecto de la inyección intramuscular de LH-RH durante el mes de Octubre en machos de lenguado salvajes adaptados a la cautividad

Tratamiento	Réplic	Peso machos (kg)	n N° espermiantes	Volumen esperma (μ)	Espermatocritc (%) ^{1,2}	No. Esp/m ³ ($\times 10^9$) ^{1,2}
Salino	1	1,353 \pm 118 (n = 6)	5	33,80 \pm 6,14	18,63 \pm 5,56 (n = 4)	2,00 \pm 1,01 (n = 5)
1 μ g LH-RH/l	1	1,140 \pm 242 (n = 3)	2	30,0	30,59 \pm 11,82 (n = 5)	3,63 \pm 1,46 (n = 5)
	2	1,350 \pm 127 (n = 3)	3	29,33 \pm 7,97		
5 μ g LH-RH/l	1	1,327 \pm 159 (n = 3)	3	20,50 \pm 7,29	17,86 \pm 5,72 (n = 4)	2,58 \pm 1,00 (n = 3)
	2	1,167 \pm 233 (n = 3)	2	36,50		

¹Para el cálculo se ha tomado el valor máximo para cada macho medido durante el experimento.

²Para el cálculo de la media se han combinado las réplicas.

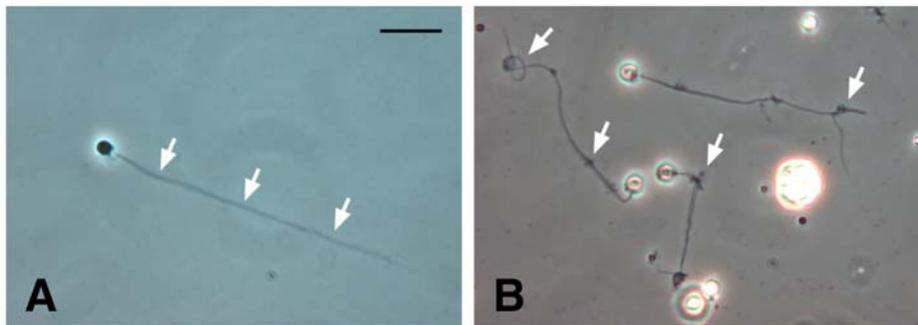


Figura 1.12. Características de los espermatozoides producidos por machos control (A) o tratados con LH-RH (B). Como es evidente, los espermatozoides aislados de machos tratados con LH-RH presentan una cola deforme (flechas), lo que puede afectar a su movilidad disminuyendo de este modo su capacidad de fertilización. Escala, 10 μ m.

Inducción con implantes de LH-RH

Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 1.13 y la Tabla 1.6, en las cuales se aprecian los datos comparados sobre las puestas producidas por las hembras inyectadas o con implante de LH-RH. Con los implantes la dosis de LH-RH necesaria para inducir a la puesta fue mayor que la dosis efectiva por inyección, ya que para la primera sólo se observó un efecto con 50 μ g/kg (Tabla 1.7). Sin embargo, la liberación sostenida de LH-RH produjo un número mucho más elevado de puestas y por tanto una producción de huevos total mayor. La calidad de los huevos, determinada por el porcentaje de flotabilidad, fue sensiblemente más baja en términos absolutos en los animales tratados con implante, aunque algunas puestas mostraron un porcentaje de flotabilidad del huevo elevado y por tanto similar

al observado en las hembras inyectadas. Sin embargo, también en este caso se observó que los huevos no se encontraban fertilizados, lo que indica que el tratamiento de los machos con implantes de LH-RH no produjo ningún efecto beneficioso sobre la capacidad de fertilización del esperma. Estos resultados parecen confirmar por tanto la ineficacia del tratamiento de LH-RH en machos para la inducción o el aumento de la espermiación.

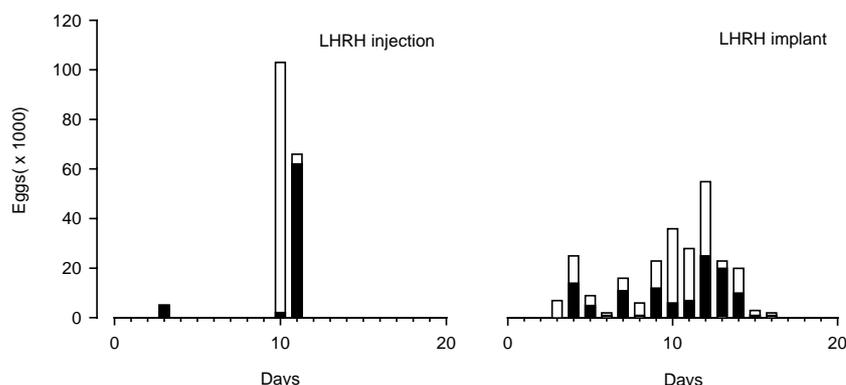


Figura 1.13. Inducción a la puesta mediante inyección intramuscular ($5 \mu\text{g}/\text{kg}$) o implantes ($50 \mu\text{g}/\text{kg}$) de LH-RH en lenguados F1 durante el mes de Abril y Mayo. Barras negras = % huevos no flotantes; barras blancas = % huevos flotantes

Tabla 1.6. Efecto de la inyección o implantes de LH-RH durante el mes de Abril y Mayo en hembras de lenguado criados en cautividad (F1)

Tratamiento	Peso medio (kg)	Nº Puestas	Nº huevos	Fecundidad relativa	Flotabilidad del huevo (%)	Fertilizac. (%)
Salino inyecci	1,30	0	0	—	—	—
	(n = 5)					
Salino implan	1,2	2	86.000	11.500	93±18,5	0
	(n = 6)					
Inyección ¹						
5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1,20	3	174.000	29.000	61,5±14,5	0
	(n = 5)					
Implantes						
5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1,0	0	0	—	—	—
	(n = 6)					
25 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1,10	1	1.000	152	—	—
	(n = 6)					
50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1,24	14	255.000	41.000	51±3,67	0
	(n = 5)					

¹ Inyección intramuscular de LH-RH semanal.

Niveles hormonales en animales tratados con LH-RH

Los niveles plasmáticos de esteroides sexuales en los reproductores reflejan el distinto comportamiento reproductor en respuesta a los tratamientos con LH-RH. Los esteroides

sexuales que se han determinado, testosterona (T), 17 β -estradiol (E2) y 11-ketotestosterona (11-KT), están directamente implicados con importantes funciones en la maduración gonadal (11-KT), o son precursores de otros esteroides los cuales ejercen estas funciones (E2).

En las hembras, niveles altos de E2 parecen relacionados con la inducción a la puesta, mientras que los niveles de testosterona (T) no muestran variaciones significativas. En hembras tratadas con elevadas dosis de LH-RH (5 μ g/kg), así como con inyecciones frecuentes, los niveles de E2 aumentan de modo marcado en los primeros días para luego volver a disminuir, y ello está relacionado con un aumento en el número de las puestas (Figuras 1.14 y 1.16). Sin embargo, cuando los tratamientos de LH-RH son suministrados durante los meses de otoño (Octubre), se observa que altas dosis de LH-RH inhiben los niveles de E2 en plasma (Figura 1.15). Estos efectos distintos en la acción de la LH-RH entre los meses de primavera y otoño podría estar relacionados con un diferente estado fisiológico de los tejidos diana del cerebro (pituitaria) o con sistemas de regulación para la síntesis de GtHs variables según la época del año. De este modo, dosis altas de LH-RH parecen ser efectivas durante la época normal de puesta en la primavera, mientras que estas mismas dosis serían negativas para la reproducción si se suministran durante el segundo periodo de reproducción en otoño. Los mecanismos fisiológicos que podrían explicar este comportamiento distinto deben ser investigados con detalle en futuros proyectos.

En los machos, los tratamientos con LH-RH, tanto mediante implantes como por inyección, inducen un claro aumento en los niveles de 11-KT, hormona que en otras especies de teleósteos se encuentra relacionada con los procesos finales de la espermiogénesis (Figuras 1.14 y 1.16). Los niveles de T, precursor en la síntesis de 11-KT, también parecen aumentar ligeramente después del tratamiento con LH-RH. Al igual que se observa en las hembras, durante los meses de otoño los tratamientos de LH-RH tienen un efecto negativo sobre la síntesis de 11-KT, lo que podría estar relacionado con los mismos mecanismos citados anteriormente. Sin embargo, a pesar de que el tratamiento con LH-RH induce niveles elevados de 11-KT en primavera, ello no redundará en la producción de un volumen mayor de esperma o en una concentración más elevada de espermatozoides (Tabla 1.7). Además, el esperma producido no parece ser de buena calidad, ya que aparentemente no es capaz de fertilizar los huevos producidos por las hembras. La ineficacia de la LH-RH para inducir la espermatogénesis ha sido observada en otras especies de peces planos (Berlinsky et al., 1996, 1997), y por tanto nuestras observaciones en el lenguado no resultan del todo sorprendentes. En esta especie, el origen de las malformaciones del esperma inducido por LH-RH, las cuales puede resultar en una baja movilidad de los espermatozoides y por tanto en una reducida capacidad de fertilización, son sin embargo desconocidas. Una alimentación deficiente, o un régimen de termoperiodo inadecuado, podrían ser factores de gran importancia para la calidad del esperma en el lenguado, los cuales deben ser investigados en el futuro.

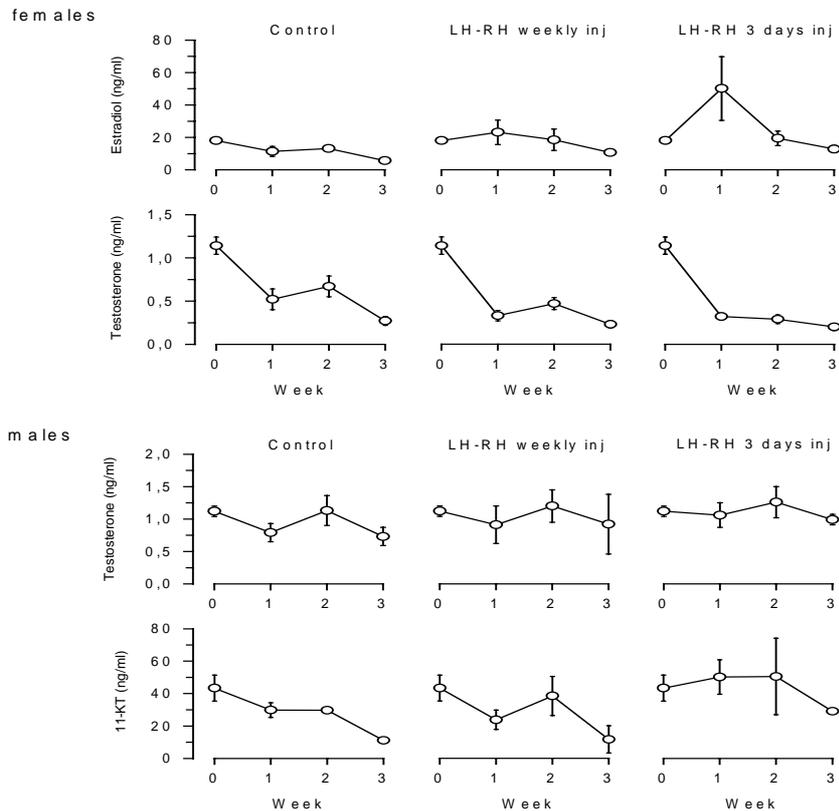


Figura 1.14. Niveles de esteroides sexuales plasmáticos en machos y hembras de lenguado F1 control o con inyección intramuscular de LH-RH (una vez por semana o cada tres días) durante los meses de Abril y Mayo. 11-KT, 11-ketotestosterona.

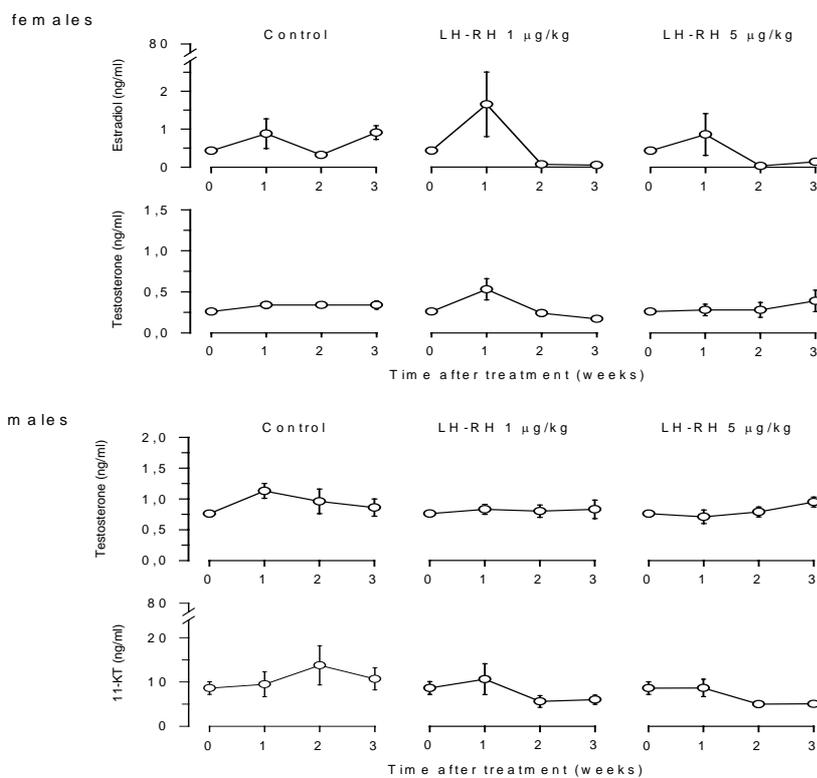


Figura 1.15. Niveles de esteroides sexuales plasmáticos en machos y hembras de lenguado salvajes control o con inyección intramuscular de LH-RH (1 o 5 µg/kg) una vez por semana durante los meses de Otoño (Octubre). 11-KT, 11-ketotestosterona.

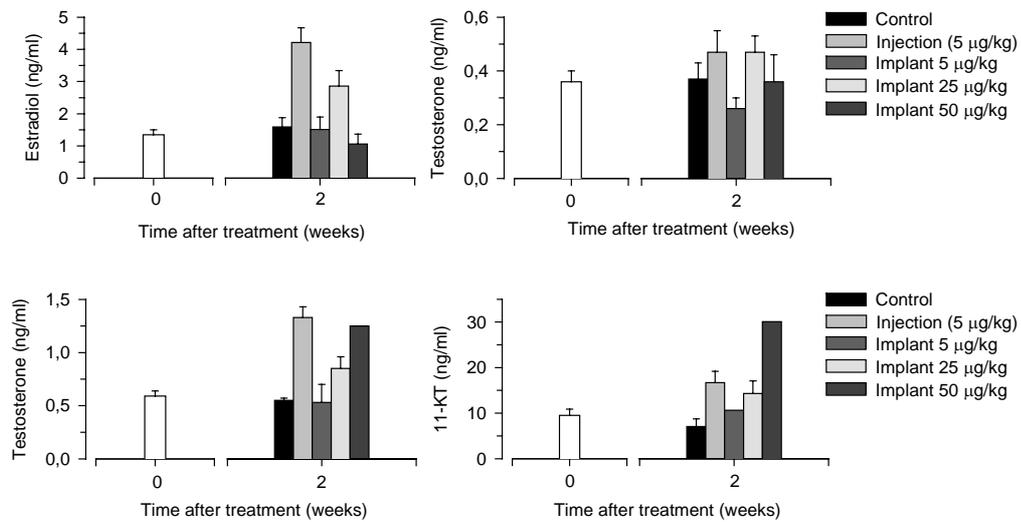


Figura 1.16. Niveles de esteroides sexuales plasmáticos en machos (abajo) y hembras (arriba) de lenguado F1 tratados con inyección intramuscular de LH-RH una vez por semana o con implantes de LH-RH con diferentes dosis. Este experimento se llevó a cabo durante los meses de primavera (Abril-Mayo). 11-KT, 11-ketotestosterona.

Aislamiento de las gonadotropinas del lenguado Senegalés. Clonación de GtHs

Para el aislamiento de los cDNAs de las subunidades b de la FSH y LH del lenguado se diseñaron oligonucleótidos cebadores para ser empleados en experimentos de PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR). El cDNA utilizado para el PCR fue sintetizado a partir de RNA total del cerebro (incluyendo pituitaria) de una hembra mediante el oligo dT (LifeTechnol). En el PCR, los oligos “forward” diseñados (uno para la FSH y otro para la LH) correspondieron a regiones altamente conservadas en la secuencia de nucleótidos de las subunidades β de distintos teleósteos (anguila, carpa, lubina, halibut, trucha y mero), mientras que los oligos “reverse” fueron los cebadores AUAP (LifeTechnol, correspondientes a la secuencia específica del oligo dT). Con esta estrategia potencialmente se facilita el aislamiento de cDNAs parciales codificadores de la FSH y LH pero portadores de los extremos 3' con las regiones UTR.

En la Figura 1.17 se ilustra la secuencia de nucleótidos, y su correspondiente secuencia de aminoácidos, del cDNA parcial de la subunidad β de la FSH clonado mediante el sistema arriba mencionado. La secuencia parcial de aminoácidos de este cDNA presentó una homología de un 75-80% con las subunidades β de la FSH de otros teleósteos, siendo los valores más altos cuando se comparó con la FSH de otras especies de peces planos.

```

aacgtctggatcacctggagagctgtggcaacaccgagtatatctacaccactatgtgt
N V W I T V E S C G N T E Y I Y T T M C
gcaggacagtgctaccacgaggacccaaactacatccatgaacttggcatggatagacag
A G Q C Y H E D P N Y I H E L G M D R Q
gtgatctgtaacggggactggacctatgaagtgaaacgcattaatggatgtccacaggca
V I C N G D W T Y E V K R I N G C P Q A
gtgacctaccctgtggccacaaactgccactgtacttcatgtaatccagacaacactcac
V T Y P V A T N C H C T S C N P D N T H
tgtggccgctttcctggagagattgccagctgtctgtccttttaaaaagaaaacaaaca
C G R F P G E I A S C L S F -
aaaacagtgatcattcttataatttccctgtttcccttgacatgggactgaaataaacaag
cttcgctgctaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
    
```

Figura 1.17. Secuencia de nucleótidos y su correspondiente traslación en aminoácidos del cDNA parcial codificante de la subunidad β de la gonadotropina FSH del lenguado senegalés. El extremo 5' del cDNA no está presente.

No obstante, el mismo protocolo empleado para la FSH no funcionó para el clonaje de la subunidad β de la LH. Ello quizá estuvo relacionado con la utilización de RNA del cerebro de una hembra que no se encontraba en estado de máxima maduración, y por tanto expresando bajos niveles de RNA codificante para la LH. A la vista de estos resultados, los experimentos en curso se encuentran dirigidos a la clonación del extremo 5' de la subunidad β de la FSH, así como al aislamiento de los cDNAs completos de la subunidad β de la LH y de la subunidad α (común a las dos GtHs). La disponibilidad de estos cDNAs completos es indispensable para la correcta expresión de las GtHs en cultivos celulares y la obtención de hormonas recombinantes fisiológicamente activas.

Estudio del ciclo de crecimiento ovocitario bajo condiciones naturales. Aislamiento de vitelogenina y desarrollo de métodos para su determinación en hembras de lenguado

El ciclo reproductor del lenguado en cautividad, incluyendo las fases de crecimiento ovárico, maduración y ovulación, es un aspecto muy desconocido que condiciona en gran medida el desarrollo de metodologías para el control de la puesta en esta especie. Con el fin de investigar el ritmo de crecimiento ovárico anual en hembras de lenguado se ha iniciado el estudio del proceso de vitelogénesis en esta especie, y para ello se está desarrollando un método para la detección y cuantificación de la vitelogenina (VTG) plasmática. La técnica llamada "Enzyme-linked Immunosorbent Assay" o EIA es el método normalmente empleado para la cuantificación de la VTG en teleósteos y se basa en la purificación de VTG y la posterior obtención de anticuerpos específicos. Para la purificación de la VTG en el lenguado se han inyectado individuos machos con 17β -estradiol (E2), hormona inductora de la síntesis de VTG en el hígado. La VTG sintetizada en los machos es acumulada en plasma de donde es purificada mediante dos pasos cromatográficos consecutivos. En la Figura 1.18 se ilustra este procedimiento, en la cual se puede ver que la VTG se encuentra presente tanto en hembras como en machos inyectados con E2 (carriles 1, 2, 5, 6, 1' y 5'), mientras que los machos no inyectados no muestran VTG en el plasma (carriles 3, 4 y 3'). En este caso, se ha encontrado que un anticuerpo monoclonal contra la VTG del fúndulo (*Fundulus heteroclitus*) posee reacción cruzada con la VTG del lenguado, y por tanto este anticuerpo puede utilizarse para la detección de VTG en esta especie (Figura 1.18). Utilizando este procedimiento se ha

purificado VTG plasmática la cual está siendo empleada en el desarrollo de un EIA. Esta técnica estará disponible en unos 3 meses.

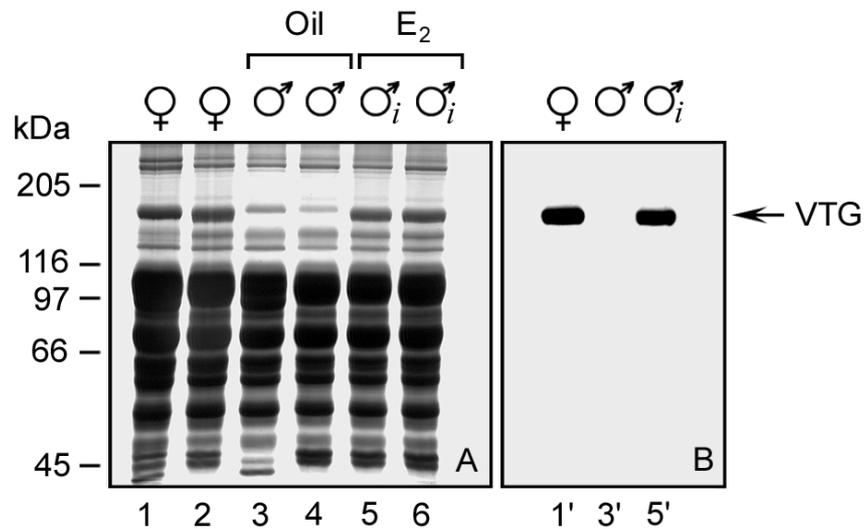


Figura 1.18. Electroforesis de proteínas del plasma de hembras, machos y machos inyectados con E2 (A), y posterior detección de VTG en plasma mediante un anticuerpo monoclonal contra la VTG de *Fundulus heteroclitus* (B).

El proceso de crecimiento del oocito de peces depende de la incorporación de VTG plasmática, lo cual está controlado por un receptor específico en el oocito (Wallace et al. 1983; Schneider, 1996). El estudio de la regulación génica de este receptor en el lenguado puede indicar el modelo específico de crecimiento del oocito, y por tanto ser de gran interés para el conocimiento de la fisiología de la maduración gonadal en esta especie. Con este objetivo, en el presente proyecto se ha clonado el receptor de vitelogenina (VTGr) en el lenguado. A partir de RNA total de ovario se construyó una genoteca de cDNA de ovario vitelogénico de lenguado. Esta librería fue posteriormente cribada con una sonda de cDNA correspondiente al receptor de vitelogenina del pez zebra (*Danio rerio*) a baja estrictencia. Como resultado se aislaron y secuenciaron dos clones de unos 5.000 pares de bases, de los cuales uno presenta una alta similitud al VTGr de otras especies de teleósteos. Como ocurre en otras especies, la expresión del gen del VTGr en el lenguado es específica en el ovario, no observándose expresión detectable en otros tejidos (Figura 1.19). A partir de la secuencia del cDNA del VTGr se han diseñado cebadores específicos que están siendo empleados para el estudio de la expresión de este gen durante el desarrollo ovocitario y también durante diferentes épocas del año, empleando tanto técnicas cuantitativas para medir RNA de VTGr como técnicas cualitativas como hibridación in situ. Los resultados de esta investigación serán indudablemente de gran interés para conocer los mecanismos moleculares de regulación del proceso de vitelogénesis en el lenguado, y especialmente durante la época estival previa al segundo evento de puesta que se ha observado en esta especie.

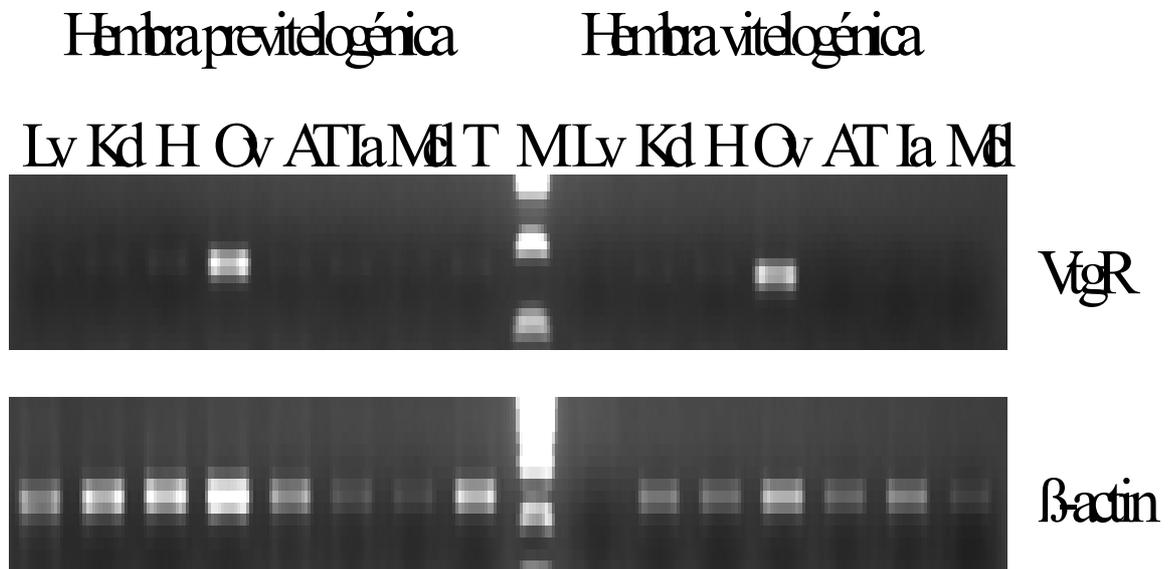


Figura 1.19. Expresión del gen del receptor de VTG (VtgR) en diversos tejidos de hembras de lenguado en estado previtelogénico y vitelogénico mediante RT-PCR. Lv, hígado; Kd, riñón; H, cerebro; Ov, ovario; AT, intestino anterior; Ia, intestino posterior; Mcl, músculo; T, testículo. Nótese que la expresión del gen es específica en el ovario. La amplificación del gen de actina se utiliza como control de la integridad del RNA total extraído de los diferentes tejidos.

Características del esperma y crioconservación.

Los volúmenes de esperma obtenidos por presión abdominal variaron entre 20-110 μL . La densidad varió entre $0,03-7,78 \times 10^9$ espermatozoides mL^{-1} . El esperma presentó buena movilidad, con una duración media tras la activación de 1 minuto, aproximadamente (50% de los espermatozoides). Esta movilidad del esperma fresco decrecía con el tiempo durante su conservación a 4°C , sin embargo diluido en la solución de inmovilización Ringer 200 mOsm, presentaba buena movilidad tras 24 h, y el decrecimiento fue menos rápido (Figura 2.20). El volumen de esperma obtenido después de 48 h de aplicar la hormona se incrementó ligeramente, sin embargo sería necesario aumentar el número de ejemplares y observar el efecto producido durante un tiempo mayor, para poder concluir (Figura 2.21).

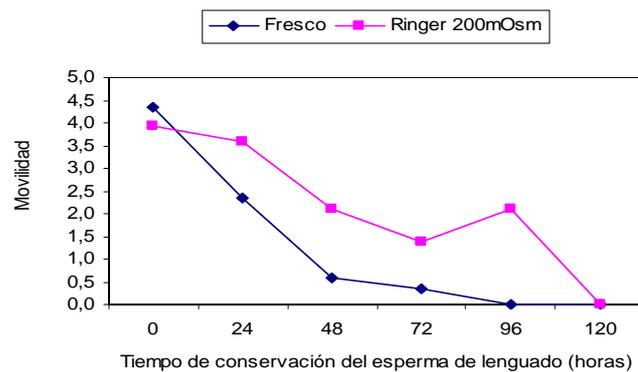


Figura 2.20. Movilidad del esperma fresco y diluido en solución de inmovilización Ringer 200 mOsm (N=37) durante su conservación a 4°C .

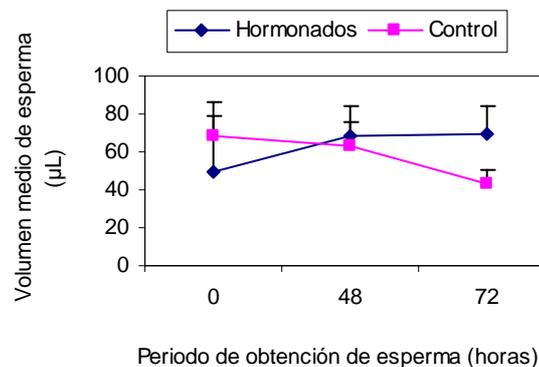


Figura 2.21. Volumen medio de esperma (μL) obtenido tras 48 y 72 h del tratamiento hormonal de seis machos frente al Control.

El esperma fresco seleccionado para la crioconservación presentó una movilidad máxima de 5. Después de ser almacenado 24 horas en nitrógeno líquido se descongeló, presentando entonces una movilidad calificada con 4 dentro de la escala establecida en la metodología.

Línea 2. Optimización y unificación de los métodos para el cultivo larvario. Producción de alevinaje para experimentación.

Cultivos de producción y caracterización de huevos y larvas

A partir de los datos de peso y longitud de larvas cultivadas, tanto en “El Toruño” como en otras instalaciones comerciales a las que se suministraron huevos embrionados de lenguado para la realización de cultivos masivos, se elaboró un modelo de crecimiento óptimo hasta la finalización de la metamorfosis en el lenguado. El crecimiento, medido como incremento de biomasa seca diaria, encontrado hasta el momento como óptimo en el cultivo masivo de larvas de lenguado, se puede definir de acuerdo al modelo presentado en la Figura 2.1.

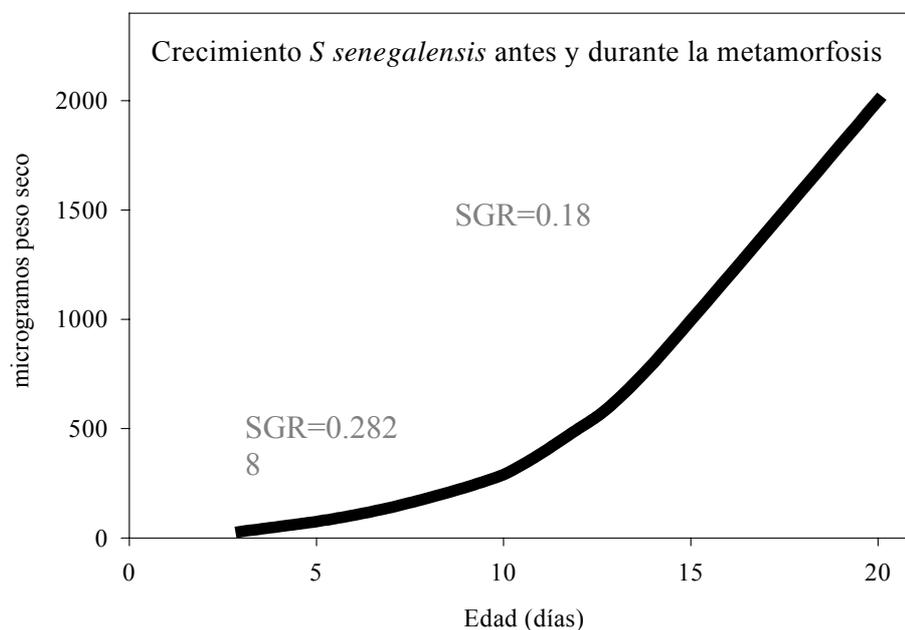


Figura 2.1: Modelo general optimizado para el crecimiento en peso del lenguado senegalés en cultivo masivo. SGR son las tasas específicas de crecimiento (d⁻¹) para el periodo planctónico, hasta los 11 días, y durante la metamorfosis.

Los cultivos de producción, sirvieron además para abastecer con ejemplares de mas edad las diferentes necesidades experimentales de otras líneas de trabajo de los componentes del Grupo de Trabajo. La producción media de alevines se estima en una cifra de 160000 anuales. Estos peces fueron mantenidos hasta diferentes edades en las instalaciones de cría de El Toruño, hasta su utilización en diversos Centros de Investigación implicados en el proyecto.

En la Tabla 2.3 se indican los valores de peso y talla registrados en el IRTA, después de recibir las puestas de lenguado. Tanto el peso como la talla de los huevos coinciden con los normalmente registrados en la mayoría de las ocasiones. En la Figura 2.2 se ilustra de manera muy interesante el crecimiento de la larva en función del consumo de vitelo.

Tabla 2.3. Talla y peso de huevos de lenguado utilizados en el IRTA.

Huevo		Max - Min
Diámetro (mm)	0.994±0.018	1.025– 0.975
Peso seco (µg)	43.10±2.12	44.67– 40.83
Vol. huevo (mm ³)	0.514±0.028	0.564 – 0.485

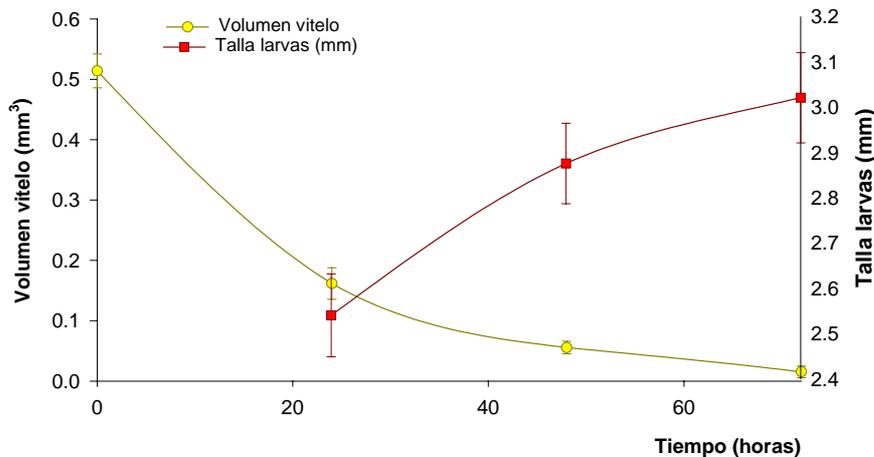


Figura 2.2. Crecimiento de larvas de lenguado en función de la utilización del vitelo.

El crecimiento larvario del lenguado bajo las condiciones experimentales del IRTA esta representado en la Tabla 2.4. A partir de los parámetros medidos (talla y peso) se derivan unas tasas específicas de crecimiento inferiores a las descritas en la Figura 2.1. No obstante, se aprecia igualmente como la tasa de crecimiento desciende notablemente durante el periodo en el que las larvas de lenguado experimentan la metamorfosis.

Tabla 2.4. Características del crecimiento de larvas en el CA-IRTA

Día 0	Talla	2.54 ± 0.092 mm	
	Peso	37.56 ± 0.53 µg	
Día 15	Talla	5.49± 0.21 mm	SGR ₀₋₁₅ = 5.14% día ⁻¹
	Peso	526.92± 133.21 µg	SGR ₀₋₁₅ = 17.61% día ⁻¹
Día 30	Talla	10.69 ± 1.27 mm	SGR ₁₅₋₃₀ = 4.44% día ⁻¹
	Peso	2099.17 ± 368.87 µg	SGR ₁₅₋₃₀ = 9.21% día ⁻¹

En los cultivos larvarios llevados a cabo en el IEO de Santander, los resultados de crecimiento en peso seco para las primeras experiencias, fueron algo inferiores (Figura 2.3) a

los descritos previamente para los otros dos centros. A partir de la primera ecuación de crecimiento, descrita para el periodo 0-22 días, se puede observar una tasa global de 0,087 para todo el periodo larvario.

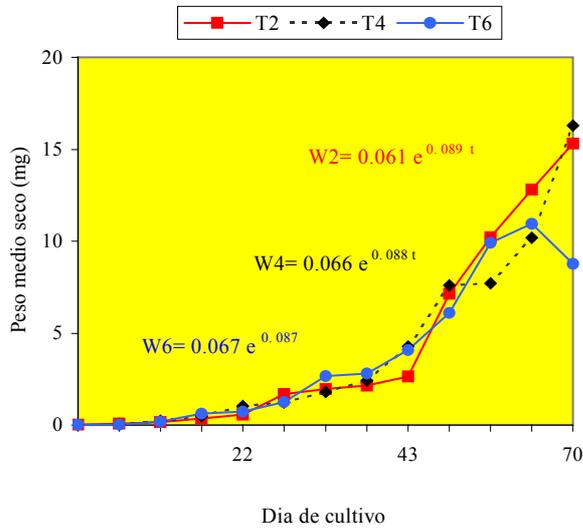


Figura 2.3. Peso seco medio de larvas y post-larvas de lenguado en tres tanques del IEO de Santander, hasta los 70 días de edad.

Los cultivos larvarios realizados en el IEO de Vigo durante el primer año de ejecución del proyecto, revelaron un crecimiento inferior (Figura 2.4), con una demora sobre 8-9 días, en comparación con los datos de referencia reflejados en la Figura 2.1.

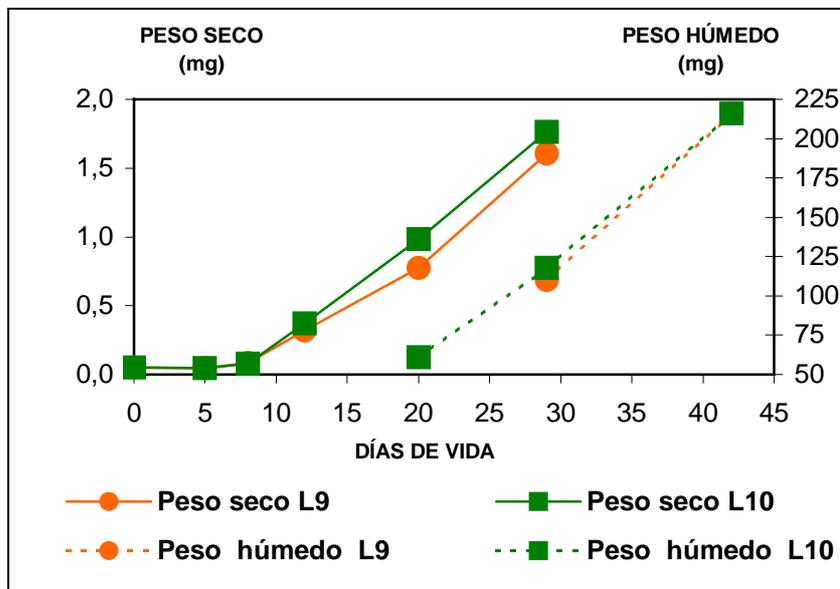


Figura 2.4. Crecimiento de larvas de lenguado, hasta los 30 días de edad, en las instalaciones del IEO de Vigo.

Sobre estos cultivos se realizó una caracterización bioquímica de las larvas, al objeto de conocer la composición bioquímica desde la eclosión y durante todo el período de

utilización de alimentación viva (día 0 de vida, larvas recién eclosionadas con el saco vitelino completo; día 8 de vida, larvas alimentadas con rotífero; día 20 de vida, larvas alimentadas con nauplius de *Artemia*, y día 30 de vida, larvas alimentadas con *Artemia* A1+A2. Los resultados (Figura 2.5) indican que las larvas de lenguado tienen un contenido proteico que oscila durante el período de alimentación viva entre el 34 y el 47%. El contenido lipídico varía desde el 27,5% en larvas recién eclosionadas hasta el 18% a día 30 de vida.

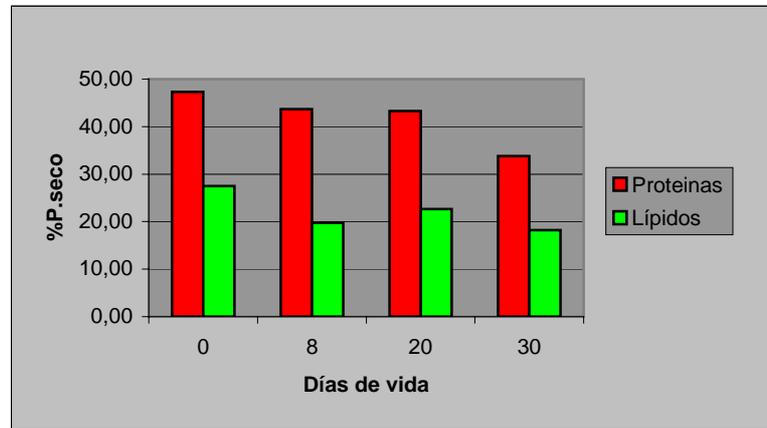


Figura 2.5. Composición en proteínas y lípidos de larvas de lenguado en la fase de alimento vivo

Los análisis bioquímicos de larvas se completaron con la determinación de ácidos grasos. Los resultados obtenidos muestran que el contenido en ácidos grasos poliinsaturados y saturados (ng/ug P.seco) desciende durante el período de alimentación viva mientras que los monoinsaturados se mantienen (Figura 2.6). Así, mientras que Los PUFA de la serie (n-3) representan tras la eclosión 60 ng/ugP.seco (41% del total de ácidos grasos), a día 30 de vida suponen tan solo 15 ng/ug p.seco (18,5% del total).

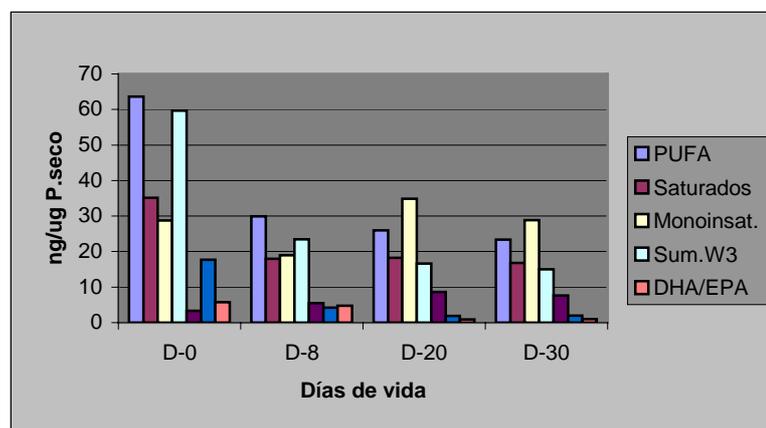


Figura 2.6. Composición en ácidos grasos de larvas de lenguado

Experimentos de cultivo larvario con el lenguado. Efecto del fotoperiodo.

Los experimentos de cultivo larvario llevados a cabo en El Toruño sirvieron para conocer la influencia del fotoperiodo sobre el crecimiento y la supervivencia tras la metamorfosis. Dos series de cultivos experimentales, que correspondieron a un total de cuatro

tanques replicados por tratamiento fueron utilizados para determinar el efecto de diferentes regímenes de duración de la fotofase sobre diversos parámetros biológicos en larvas de lenguado. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: A: Fotoperiodo de 24 h. B: Fotoperiodo de 14 h, desde las 08:00 hasta 22:00 (fotoperiodo invertido). C: Fotoperiodo de 14 h, desde las 18:00 hasta 08:00.

No se encontró diferencia significativa (ANCOVA, $p > 0,05$) en el peso durante el proceso global de cultivo, hasta la finalización de la metamorfosis, el día 20, según la fotofase utilizada. Sin embargo, descomponiendo el periodo estudiado en dos subperiodos, uno para la etapa previa a la metamorfosis, y otro, para el desarrollo de la misma, se detectó un comportamiento diferente entre ambos. Así, en la primera etapa un análisis ANCOVA del peso determinado por la fotofase, utilizando la edad como covariable, reveló la existencia de diferencia significativa, aunque con un nivel bajo de significación ($F=2,89$ $p=0,0638$) en el peso. El análisis multinivel posterior indicó que fue el grupo de fotofase invertida el que presentó un ligero peso inferior al de los otros dos grupos. Posteriormente, durante la metamorfosis, no existieron diferencias de peso ($p > 0,1$) debidas al fotoperiodo. Los resultados de peso obtenidos para diferentes edades del lenguado se muestran en la Figura 2.7.

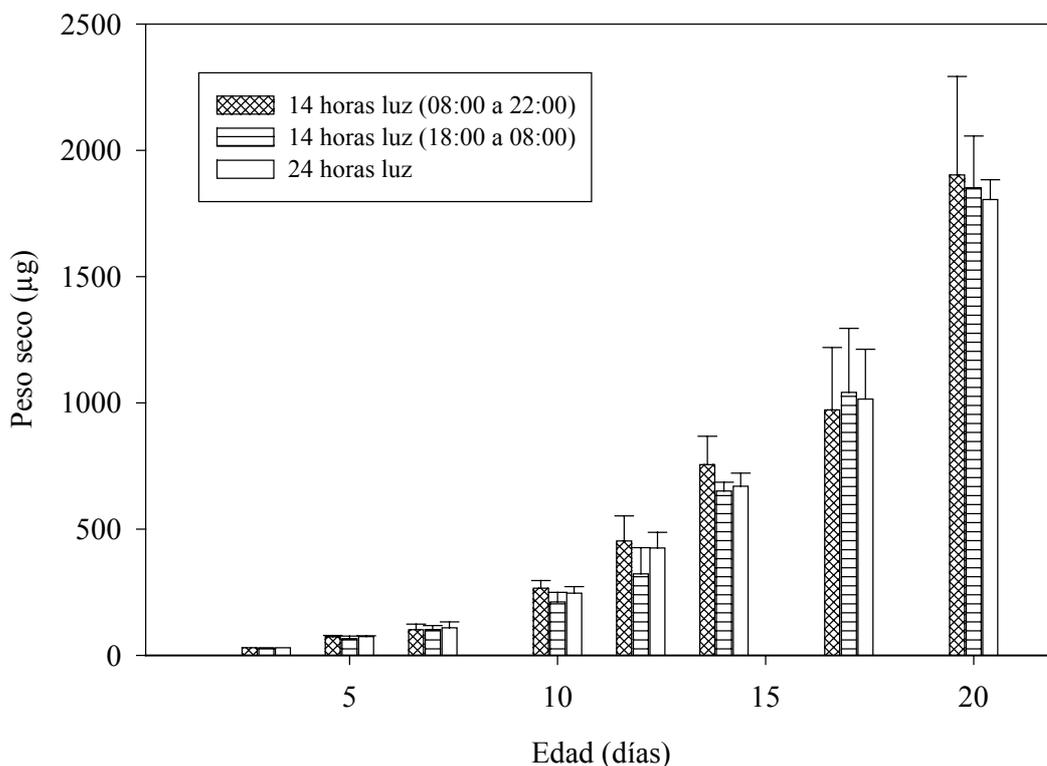


Figura 2.7: Crecimiento del lenguado antes y durante la metamorfosis, en función de tres fotoperiodos diferentes.

La supervivencia fue también igual (One-way ANOVA, $p > 0,05$) en los tres grupos estudiados, variando entre 75% y 85% en todos los casos. Según estos resultados de crecimiento y supervivencia, la utilización de un fotoperiodo natural de 14 horas no modifica estos dos parámetros de producción. No obstante, entre las diversas observaciones realizadas en los cultivos, pudo apreciarse que en aquellos sujetos a fotoperiodo permanente, apareció un porcentaje cercano al 2% de la población de individuos que presentaron alteración en la

migración del ojo durante la metamorfosis (Figura 2.8), mientras que en los cultivos llevados a cabo con 14 horas de luz no se detectó esta anomalía.



Figura 2.8: Alevín de *Solea senegalensis* afectado por fallo en la migración ocular

Además de parámetros típicamente productivos como los anteriormente mencionados, se estudió el efecto de la fotofase sobre la alimentación de las larvas de lenguado. En primer lugar se observó el ciclo de ingestión de presas zooplanctónicas en función de la disponibilidad de luz. En la figura 2.9 se representa el porcentaje de la población larvaria entre 3 y 10 días de edad que presenta presas en el estómago en dos momentos seleccionados del día. A las 08:00, justo antes de encender la luz el fotoperiodo natural prácticamente no se aprecian presas en larvas hasta los 8 días. A partir de los 9 días de edad sobre un 50% de las larvas presentaron alimento en su estómago después del periodo oscuro. Por el contrario, las muestras obtenidas a las 15:00 presentaron elevados porcentajes de presas en el estómago en todas las edades (Figura 2.9). Estos resultados sugieren la importancia del estímulo visual en la detección de las presas en larvas de lenguado, al menos hasta los 8 días de edad.

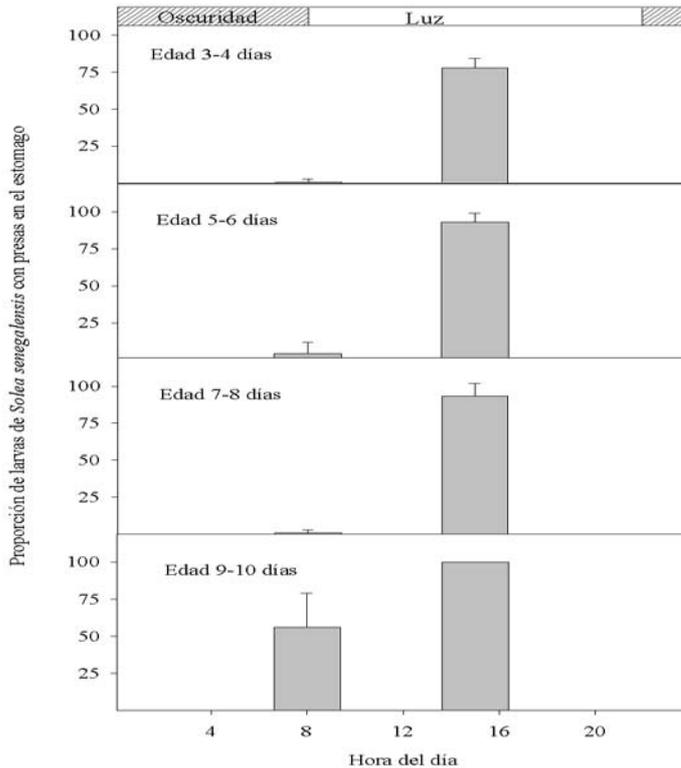


Figura 2.9: Proporción de larvas de *Solea senegalensis* con presas en el estómago en ausencia y en presencia de luz, en cultivos realizados con fotoperiodo natural

Un patrón similar de ingestión de presas se observó cuando el mismo tipo de fotofase se aplicó, pero de forma desfasada (Figura 2.10). En estas condiciones, durante la fase de oscuridad se observa una clara disminución de la ingestión de presas, aunque no tan marcada como en el primer caso. Ello pudo ser debido probablemente al menor intervalo existente en el fotoperiodo natural desfasado desde el inicio del periodo de oscuridad hasta la toma de muestra.

Hasta el momento el régimen lumínico que se ha aplicado en el cultivo larvario del lenguado ha sido similar al utilizado en el cultivo de espáridos. A partir de los resultados obtenidos aplicando un fotoperiodo no permanente, es posible intuir la menor dependencia de la existencia de intensidades de luz similares a las utilizadas hasta el momento, a partir de los 10 días de edad, justo antes de comenzar la metamorfosis esta especie. Por tanto, el diseño de futuros cultivos larvarios de lenguado deberá contemplar un punto de inflexión, en lo que a régimen de iluminación se refiere, coincidiendo con el inicio de la metamorfosis.

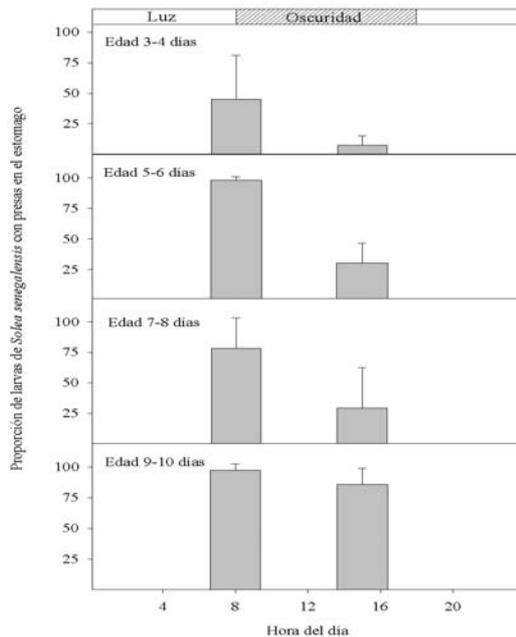


Figura 2.10: Proporción de larvas de *Solea senegalensis* con presas en el estómago en ausencia y en presencia de luz, en cultivos realizados con fotoperiodo natural desfasado

La utilización de iluminación permanente sobre los cultivos larvarios produjo un patrón de ingestión en el tiempo similar al observado para el fotoperiodo natural. Solo las incidencias de alimentación a primera hora de la mañana fueron levemente superiores hasta los 8 días de edad (Figura 2.11) cuando durante la noche se iluminaron los tanques. En teoría, una larva que consuma presas continuamente siempre que exista un nivel de iluminación adecuado, debería mostrar similares proporciones de alimentación en los muestreos realizados a las 08:00 y a las 15:00, siempre que la luz sea permanente. Las diferencias reflejadas en la Figura 2.11 sugieren la posible existencia de un ritmo endógeno de alimentación en las larvas de lenguado, al menos hasta los 8 días de edad. Este ritmo, estaría relacionado con la existencia de una pausa o descanso en el régimen alimentario diario. Dicha pausa no tendría por que estar asociada a una hora determinada del día, dado el patrón de ingestión observado a las 08:00 con el fotoperiodo natural desfasado (Figura 2.10).

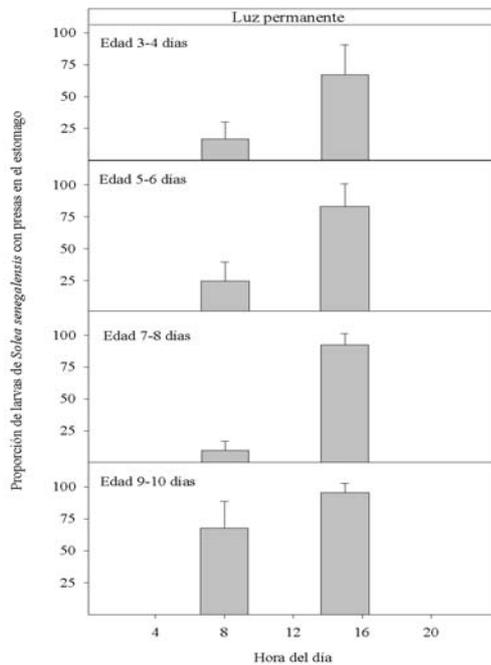


Figura 2.10: Proporción de larvas de *Solea senegalensis* con presas en el estómago en ausencia y en presencia de luz, en cultivos realizados con fotoperiodo permanente.

Por último, se estimó la posible influencia que el fotoperiodo podría ejercer sobre la tasa de alimentación de las larvas de lenguado. Una primera valoración global de resultados indica que la ración diaria de alimentación, medida como porcentaje de alimento seco ingerido por unidad de biomasa seca de larvas, no varió según el régimen de luz seguido. Un Anova de una vía reveló la ausencia ($P > 0,05$) de diferencias significativas entre los valores medios de ración correspondiente a los tres fotoperiodos experimentales. Estos valores medios fueron 49.8 ± 35.9 , 48.8 ± 31.7 y 50.5 ± 38.5 mg de alimento seco por mg de biomasa seca de larva para los fotoperiodos natural, natural desfasado y permanente, respectivamente. Cuando los resultados por edad fueron agrupados de acuerdo al ritmo diario de consumo de alimento, los valores medios para la ración diaria entre los días 3 y 9 de edad (menor consumo de presas en oscuridad o durante la noche) se situaron en 69.5, 71.9 y 83.1, respectivamente para los mismos fotoperiodos. A pesar del mayor valor registrado para el tercer fotoperiodo, el Anova de una vía indicó la inexistencia de diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tres niveles.

En el siguiente grupo de edad, entre 10 y 20 días, cuando el consumo de alimento se supone independiente de la fotofase, los correspondientes valores para la ración diaria fueron 33.5, 37.2 y 37.6 para los fotoperiodos natural, natural desfasado y permanente, respectivamente. Estas raciones medias fueron iguales entre fotoperiodos ($P > 0.05$), pero al comparar este grupo de edad con las larvas pre-metamorfosis, se encontró un valor medio de ración significativamente mayor en estas (74.8) frente a las que superaron la edad de 10 días (36.1).

Experimentos de cultivo larvario con el lenguado. Efecto de la alimentación con dietas inertes.

Los cultivos larvarios de lenguado senegalés llevados a cabo en tanques experimentales con 300 l de capacidad en el CIFPA “El Toruño”, con la colaboración del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC) en la elaboración de las dietas microencapsuladas, produjeron unos resultados que indicaron una muy pobre eficiencia en esta especie de dos tipos de dietas inertes, específicas para fases larvarias de peces marinos (Figura 2.12). En esta figura se resumen los resultados de cuatro experimentos replicados en los que se utilizaron dietas microencapsuladas, fabricadas específicamente con una formulación que había previamente producido resultados muy cercanos a los controles con alimento vivo en larvas de dorada (*Sparus aurata*). Similar efecto tuvo la utilización de uno de los piensos larvarios comerciales mas reciente y avanzado en lo que a diseño nutricional para larvas de peces marinos se refiere.

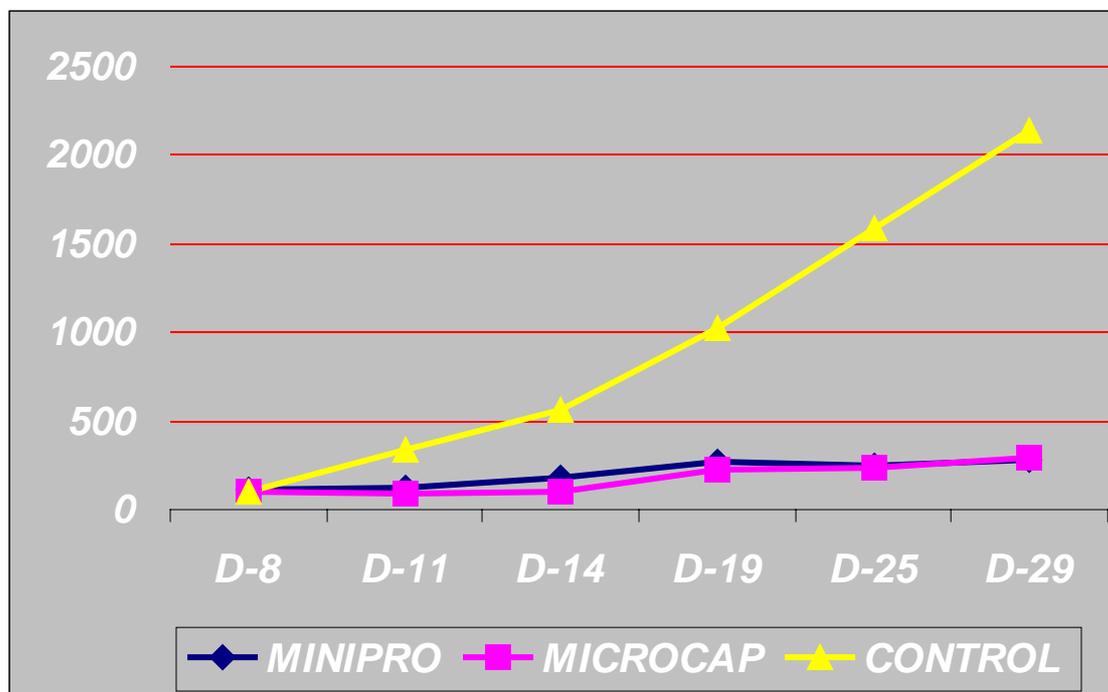


Figura 2.12. Crecimiento (μg peso seco) de larvas de lenguado alimentadas desde los 8 días de edad sólo con dietas inertes experimentales (microcap), pienso comercial (minipro), o Artemia viva (control).

Los dos tipos de alimento microparticulado fueron empleados de acuerdo a los mejores sistemas de dosificación ya conocidos para otras especies. Se comprobó además la total aceptación e ingestión de estas partículas inertes por parte de las larvas. El hecho de que dos dietas larvarias inertes, capaces de sustentar crecimiento en larvas de otras especies de peces marinos, cuya ontogenia del tubo digestivo se presuponía similar a la de las larvas de lenguado, induce a pensar en la posible existencia de notables diferencias en esta última. Estas diferencias podrían estar relacionadas con un mayor requerimiento nutricional para algún componente de la dieta, o bien con una mayor incapacidad enzimática para digerir este tipo de alimento en fases tan tempranas y poco desarrolladas.

Experimentos de cultivo larvario. Efecto de los ácidos grasos y determinación de la “ventana de pigmentación” durante el desarrollo larvario

Los grupos experimentales, utilizados por triplicado, fueron los siguientes: (1) *Control*, alimentado con nauplios de *Artemia* enriquecidos con la emulsión de composición: 88% aceite Incromega TG0525 de Croda Ibérica S.A., con un 25% de DHA, 12% yema de huevo usada como emulsionante y 10 mg/Kg de vitaminas C y E; (2) *DHA*, alimentado con rotíferos enriquecidos desde el día 5 al 10 y *Artemia* enriquecida desde el día 7 al 40, usando el mismo enriquecedor que en el grupo *Control*; (3) *EPA*, alimentado de igual manera que el grupo *DHA* pero usando una emulsión de enriquecimiento en la que el aceite Incromega TG0525 se sustituía por el EPA500TG con un 50% de EPA; (4) *ARA*, alimentado siguiendo la misma pauta que los grupos *DHA* y *EPA* usando una emulsión en la que se utilizaba una mezcla del 65% de Incromega TG0525 y un 35% de aceite Vevodar (40% de ac. Araquidónico).

A día 40, un ANOVA detectó diferencias significativas ($p < 0,016$) entre los grupos experimentales, siendo la talla de los grupos *control* y *DHA* iguales, la del grupo *ARA* significativamente mayor ($p < 0,05$), y la del grupo *EPA* intermedia entre estos grupos. La migración del ojo izquierdo al lado derecho (% de larvas con el ojo migrando, %OM) comenzó entre los días 12 y 15 tras la eclosión (larvas de 5 y 6.5 mm) y terminó entre los días 20 y 26 (larvas de 9.2 y 12.6 mm). Los porcentajes de supervivencia, pigmentación (% Alb.) y migración del ojo (% ojo sin migrar, OSM) a día 40 no fueron significativamente diferentes entre los grupos (Tabla 2.5). No parece por tanto que haya efecto de la dieta sobre estos parámetros, a pesar de que usando la dieta rica en araquidónico (*ARA*) se obtiene un número relativamente mayor de individuos con deficiencias en la pigmentación. El albinismo observado en el lenguado es mayoritariamente parcial, es decir zonas del cuerpo (alrededor de la boca, en la zona del digestivo o en la zona dorsal) que aparecen despigmentadas; en pocas ocasiones se ha observado albinismo total.

Tabla 2.5. Supervivencia (%), migración del ojo (% OSM), y pigmentación (%Alb).

Grupo	% Superv.	Media	% OSM	Media	% Alb.	Media
CTL1	87.20		0.00		0.23	
CTL2	82.00		0.24		0.24	
CTL3	87.20	85.46+3.00	0.00	0.08+0.14	0.00	0.16+0.14
DHA1	87.20		0.00		0.00	
DHA2	90.80		0.00		0.44	
DHA3	78.20	85.40+6.49	1.02	0.34+0.59	0.26	0.23+0.22
EPA1	91.80		0.22		0.22	
EPA2	78.00		0.56		0.00	
EPA3	85.80	85.20+6.92	0.70	0.49+0.25	0.23	0.15+0.13
ARA1	79.40		0.00		0.76	
ARA2	86.60		0.69		1.16	
ARA3	70.80	78.93+7.91	0.57	0.42+0.37	2.26	1.39+0.78

Las muestras para un estudio histopatológico sobre los efectos de las dietas experimentales en los lenguados fueron procesadas en la UAB y los resultados se muestran en la tabla 2.6.

Tabla 2.6. Resultados del estudio histopatológico durante el desarrollo larvario.

Grupo	Observaciones
CTL	10-20% de hepatocitos hinchados con citoplasma turbio y múltiples microvesículas sin adoptar un claro aspecto de depósito lipídico. Presencia de glucógeno en uno de los individuos examinados.
DHA	10% de hepatocitos hinchados. En la porción posterior del tubo digestivo se observa una clara alteración de la mucosa intestinal, con descamación celular y un gran número de organismos de aspecto como cianobacterias.
EPA	Hepatocitos con aspecto normal aunque no se detecta presencia de glucógeno. En el tubo digestivo aparecen organismos tipo cianobacterias.
ARA	40% de hepatocitos hinchados, con distinto grado de degeneración y un gran número de ellos con núcleos picnóticos y totalmente degenerados. Se detecta escasa presencia de glucógeno.

Experimentos de cultivo larvario. Ensayos en ausencia de rotífero

Estos experimentos se llevaron a cabo en el CA-IRTA y en el IEO de Santander. En el primer Centro, se establecieron cuatro regímenes alimentarios (por triplicado), en función del peso del rotífero usado convencionalmente en el cultivo larvario, así el grupo R siguió la pauta de alimentación con 20 rotíferos ml^{-1} ($4 \mu\text{g l}^{-1}$), seguido de 4 nauplios ml^{-1} de *Artemia*; el grupo A se alimentó exclusivamente de nauplios de *Artemia* (INVE cepa EG) en la misma proporción que su equivalente de rotíferos ($4 \mu\text{g l}^{-1}$, equivalente a $1.4 \text{ nauplios ml}^{-1}$); el grupo A2 se alimentó con el doble de nauplios ($8 \mu\text{g l}^{-1}$, $2.8 \text{ nauplios ml}^{-1}$) y el grupo A3 con el triple de nauplios ($12 \mu\text{g l}^{-1}$, $4.2 \text{ nauplios ml}^{-1}$). El aumento del número de nauplios distribuido fue gradual, siguiendo las pautas de alimentación empleadas por Fernández-Díaz et al. (2001) (Tabla 2.7).

 Tabla 2.7. Cantidades diarias de presas vivas distribuidas en cada tanque¹

Edad (días)	Grupo								
	R			A		A2		A3	
	Rotíferos/ ml	NA/m l	Mg/ l	NA/m l	mg/l	NA/m l	mg/l	NA/m l	mg/l
2-5	20	-	4	1.4	3.9	2.8	8.0	4.2	11.9
6-10	20	-	4	2.8	7.8	5.8	16.1	8.7	24.1
11-15	-	4	11.1	4.8	13.3	7.8	21.6	10.7	29.6
16-30	-	5	13.9	5.8	16.1	8.8	24.4	11.7	32.4

¹El peso de las presas vivas se ha calculado considerando que el rotífero S-1 pesa $0.2 \mu\text{g}$ y los nauplios de *Artemia* $2.77 \mu\text{g}$. NA, nauplios de *Artemia*.

Se tomaron muestras de 20 larvas de cada uno de los tanques de malla los días 4, 6, 10, 12, 15, 20 y 30 después de la eclosión a fin de cuantificar la longitud total y observar el estadio de desarrollo siguiendo las pautas indicadas en cuanto a la migración del ojo por Fernández-Díaz et al. (2001). Se establecieron 5 posiciones del ojo, considerando 3b como estadio 4. Ese mismo grupo de larvas fue utilizado posteriormente para estimar el peso seco. Al final del periodo se calculó el porcentaje de supervivencia, anotando además el grado de pigmentación y/o deformación. En este caso el muestreo final para la estimación de talla, peso

seco y estadio de migración del ojo se llevó a cabo sobre el 5% del total de supervivientes. Se ha calculado además el índice de migración del ojo (I_{EM}) según Solbakken et al. (2002) con los datos medios de posición del ojo (0 a 5) obtenidos en cada muestreo. Los resultados de crecimiento en talla y peso se muestran en la Figura 2.13. El crecimiento fue similar en todos los grupos durante los primeros días de vida encontrándose diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$) en cuanto a la talla a partir de día 20, siendo los grupos R y A2 los que experimentaron un menor y mayor crecimiento, respectivamente. La misma tendencia se observa en los pesos secos, aunque en este caso las diferencias observadas no fueron significativas debido a la dispersión de tallas en los distintos grupos y el valor elevado de la desviación standard.

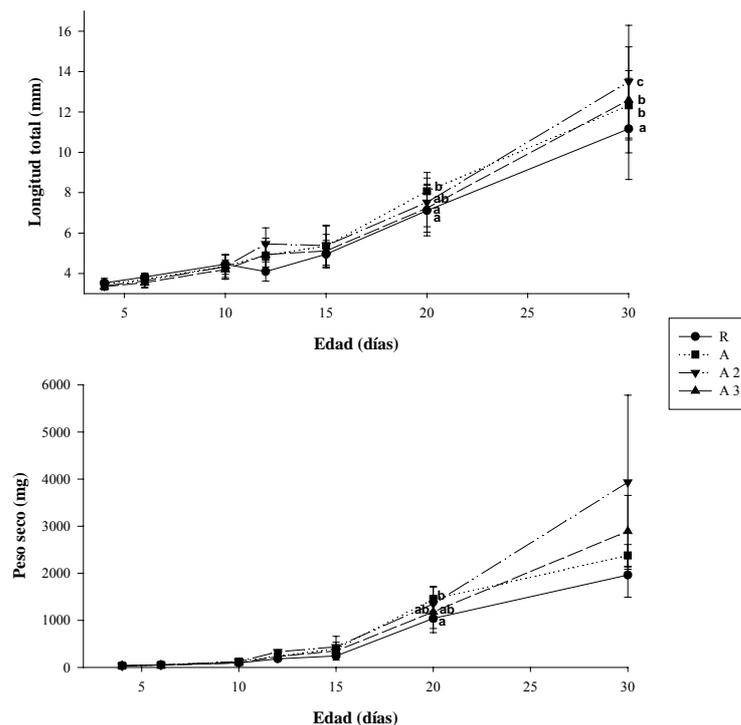


Fig. 2.10. Crecimiento en talla y peso de las larvas de cada grupo de alimento, en el CA-IRTA. Las letras denotan diferencias significativas entre los grupos (ANOVA $p \leq 0,05$)

En la Tabla 2.7 se muestra un resumen de los resultados obtenidos de talla, peso seco, SGR y supervivencia larvaria al final de la experiencia. No hubo diferencias significativas en la supervivencia, manteniéndose en todos los grupos torno al 30%.

Tabla 2.7. Longitud total, peso seco, supervivencia y tasa de crecimiento global (SGR), durante la premetamorfosis (días 4 a 10) y en la metamorfosis (días 12 a 30)¹

	Talla (mm)	Peso seco (mg)	Supervivencia (%)	SGR 4-10	SGR 12-30	SGR 4-30
R	11.16±2.51 ^a	1961.85±470.21	29.05±10.50	15.54	17.57	15.12
A	12.33±1.72 ^b	2380.55±229.01	35.82±0.65	17.51	12.76	16.06
A2	13.50±3.68 ^c	3933.91±1849.9	32.44±20.35	20.02	13.77	17.98
A3	12.60±2.63 ^b	2893.91±760.52	44.14±9.94	16.77	14.00	16.98

¹Las letras denotan diferencias significativas (ANOVA, $p \leq 0.05$)

Los resultados del ANOVA de 2 vías para el crecimiento en talla y peso y el índice de migración del ojo frente a la edad y el tipo de alimentación se muestran en la Tabla 2.8, en todos los casos se observaron diferencias altamente significativas.

Tabla 2.8. ANOVA de dos vías entre la edad y el tipo de alimentación llevada a cabo en el CA-IRTA, sobre la longitud, peso seco y migración del ojo de las larvas¹

	Df	Talla		Peso seco		I _{EM}	
		F	P	F	P	F	P
Edad (días)	6	1461,36	0,000	98,34	0,000	585,23	0,0000
Tipo de alimentación	3	9,23	0,000	3,56	0,017	6,57	0,0012
Interacción	18	5,23	0,000	2,18	0,008	1,60	0,115 ns

¹ns, no significativo

Un test de Tukey posthoc permitió observar que el grupo R creció significativamente menos tanto en talla como en peso que los restantes grupos, mostrando el A2 los mejores resultados de crecimiento (Figura 2.14). Resultados similares se observan en lo relacionado al estadio de migración del ojo (Tabla 2.5, Figura 2.15), el 98% de los individuos alimentados exclusivamente con nauplios de *Artemia* presentaban los 2 ojos sobre el lado derecho frente a los alimentados primero con rotífero y luego con *Artemia* en los que el 15% de los individuos presentaban estadios tempranos de migración (estadios 2 y 3, Figura 2.15). Se encontró, además, una relación bastante clara ($R=0.89$, $R^2=0.79$, $n=1483$ larvas) entre la talla de las larvas y la posición del ojo que se ajusta a la recta de regresión:

$$I_{EM} = 0.517 \text{ length (mm)} - 1.595$$

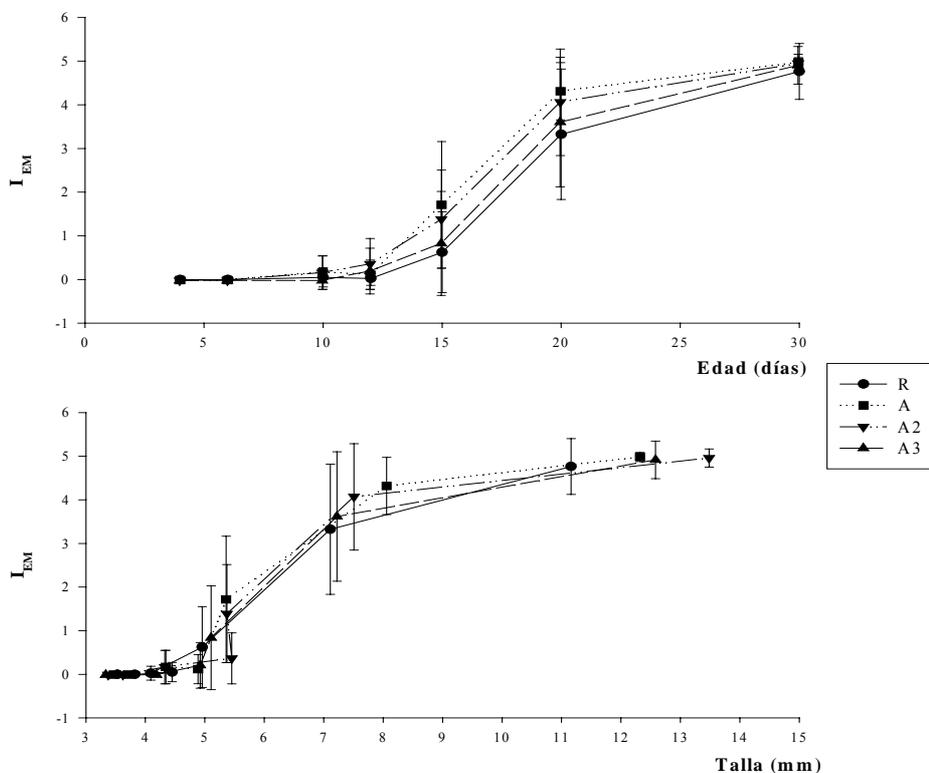


Figura 2.14. Relación entre la edad y la talla de las larvas con el índice de migración del ojo (media \pm SD de 3 réplicas).

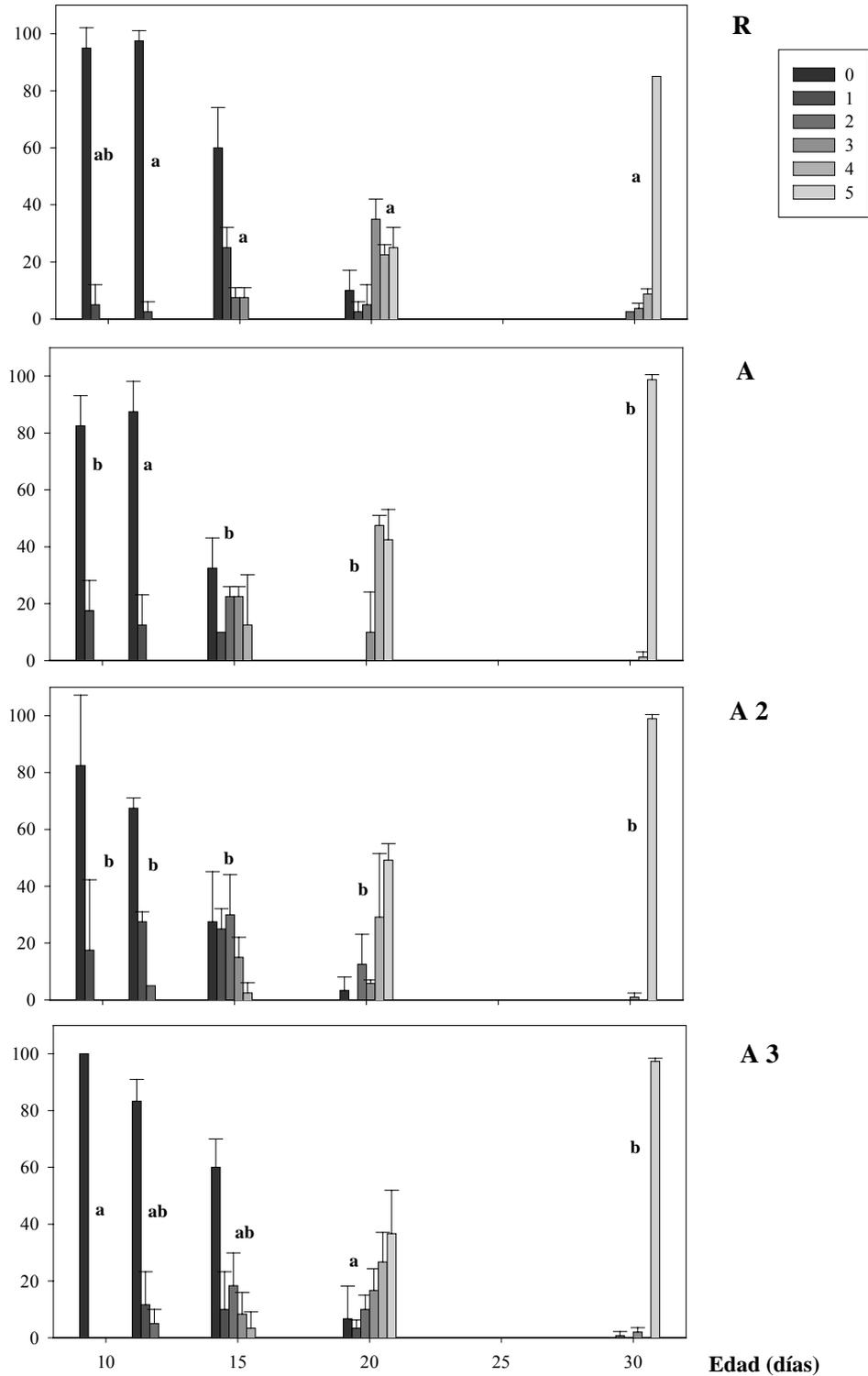
Estado de migración del ojo (% larvas)


Figura 2.15. Porcentaje (\pm desviación estándar) de larvas en cada estado de migración del ojo según los distintos tipos de alimentación llevados a cabo en el CA-IRTA. Las letras las diferencias significativas entre los grupos (ANOVA, $p \leq 0,05$).

En el centro costero del IEO de Santander se ensayaron otros tres tipos de alimentación, frente a la convencional con rotíferos al inicio. Así, se procedió a una alimentación directa desde inicio de alimentación exógena con diferentes cantidades de nauplios de Artemia de 48 h enriquecidos con Super Selco DHA (INVE): 0.2 N /mL, 0.4 N /mL y 0.6 N /mL iniciales; estas cantidades fueron incrementadas proporcionalmente cada dos o tres días. El crecimiento de las larvas, en longitud y peso seco, hasta día 17 fue algo superior con la alimentación tradicional frente a la alimentación sólo con Artemia, observándose en las larvas un incremento del 58% en peso seco a día 40. A partir de ese día las tasas de crecimiento fueron similares. La supervivencia obtenida con la alimentación de referencia fue menor que las registradas en el año anterior donde se realizó coalimentación presa viva-inerte. Respecto a la alimentación con diferentes cantidades de Artemia se observó una alta mortalidad en la primera semana de cultivo, por lo que las tasas de supervivencia a día 40 fueron muy inferiores; aunque dichas tasas eran proporcionales, se incrementaron según la cantidad de Artemia suministrada. En la Tabla 2.9 se muestran las tasas de crecimiento y supervivencia a diferentes intervalos de tiempo.

Tabla 2.9. Tasas de crecimiento en distintos intervalos de tiempo y de supervivencia a diferentes días de cultivo.

Día	TASA DE CRECIMIENTO(%)			SUPERVIVENCIA(%)	
	0-17	17-40	40-70	40	60
Fito-Rot	17.78	14.00	2.91	60.43	34.86
0.2 N/mL	13.43	14.53	6.28	3.52	3.33
0.4 N/mL	12.41	14.53	4.09	5.92	5.81
0.6 N/mL	15.19	15.14	4.73	15.37	12.48

Mediante un T-test de comparación de pendientes, se comprobó que las tasas de crecimiento (peso y longitud), fueron similares en los tanques con diferente cantidad de Artemia. Sin embargo, en los tanques con Rotífero-Artemia se encontró que la tasa de crecimiento fue significativamente mayor en longitud ($P < 0.05$) pero no en peso, como se muestra en las Figuras 2.16 y 2.17.

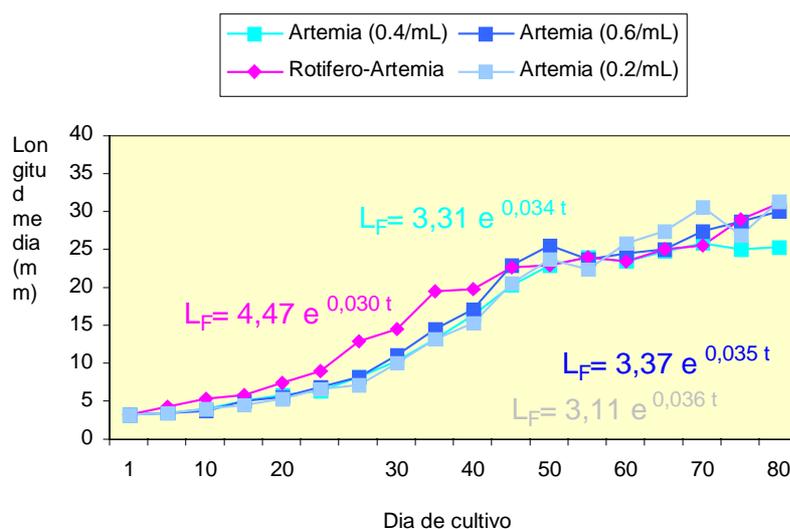


Figura 2.16. Longitud media de las larvas con diferente régimen alimentario (Rotífero-Artemia, 0.2, 0.4 ó 0.6 Nauplios de Artemia) durante el cultivo larvario hasta el día 80.

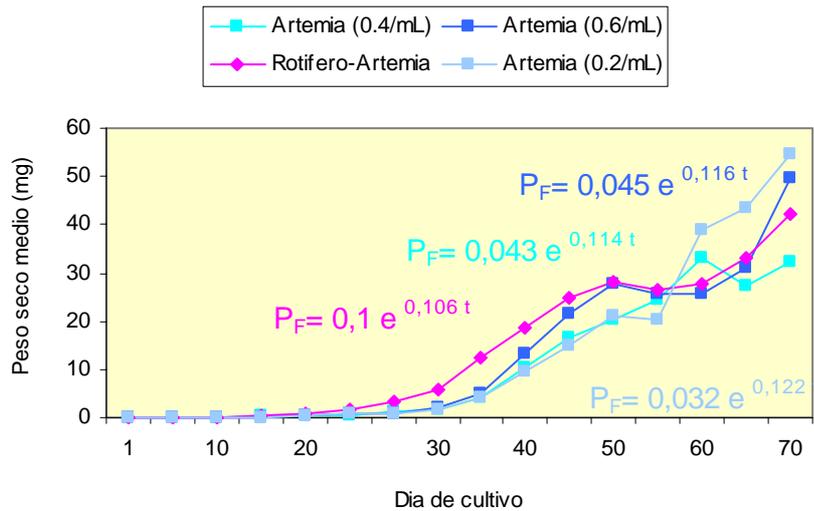


Figura 2.17. Peso seco medio de las larvas con diferente régimen alimentario (Rotífero-Artemia, 0.2, 0.4 ó 0.6 Nauplios de Artemia) durante el cultivo larvario hasta el día 70.

La repetición de estos experimentos durante el último año de ejecución del proyecto produjo resultados algo diferentes. Así, se observó una mayor supervivencia larvaria (47%) con el tipo A (F-R) frente a B, C y D (1,4; 2,9 y 4,3 N mL⁻¹, respectivamente) a día 36, como se muestra en la Tabla 2.10.

Tabla 2.10. Tasas de crecimiento parciales y supervivencia final para los cuatro regímenes de alimentación ensayados en el IEO de Santander

	SGR			
	A (F-R)	B (1.4 N)	C (2.9 N)	D (4.3 N)
0-8	20,206	21,678	19,171	20,636
0-13	22,020	23,311	21,799	21,730
8--13	24,921	25,923	26,004	23,479
13-27	14,209	9,879	11,549	12,176
27-36	7,940	15,051	18,198	13,169
Survival (%)	47,01	27,75	21,88	19,95

Al comparar las tasas de crecimiento hasta el día 36, no se encontraron diferencias en longitud entre los diferentes regímenes (Figura 2.18), sin embargo si se encontró una mayor tasa de crecimiento en peso seco con el régimen B (Figura 2.19). Los análisis bioquímicos realizados en el CIMA de Corón determinaron para este experimento la composición en proteínas, lípidos y ácidos grasos de las larvas a días 8 y 39 de vida. (Figuras 2.20 y 2.21, y Tablas 2.11 y 2.12). Los resultados nos indican que el mejor crecimiento en peso se obtuvo con el régimen B. La más alta supervivencia se obtuvo con el régimen A (47%) frente a 28, 22 y 20% con los regímenes B,C y D a día 36 de vida. El contenido en proteínas a día 39 de vida de las larvas varió entre el 42-45% del peso seco y no se obtuvieron diferencias significativas entre las larvas alimentadas con los diferentes regímenes alimenticios. El contenido en lípidos totales a día 39 de vida presenta diferencias significativas entre las larvas alimentadas con el régimen A respecto a las alimentadas con B,C y D y está relacionado con el nivel de Artemia suministrado. La tasa (n-3)/(n-6) fue más alta para el

régimen A, a día 8 de vida, pero similar en todos los regímenes al final del experimento. El contenido en ácido docosahexaenoico, 22:6 (n-3), es más alto en las larvas con 8 días de vida alimentadas con el régimen A suponiendo el 10% del total de ácidos grasos frente al 4-5% en las larvas alimentadas con los otros regímenes alimenticios. La tasa 22:6(n-3)/20:5(n-3) fue también más alta para el régimen A en las larvas de 8 y 39 días de vida.

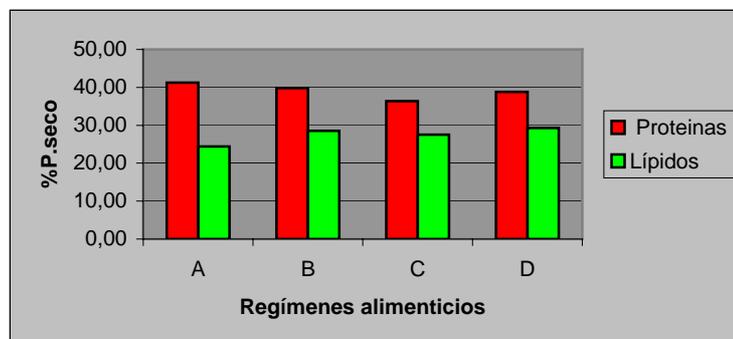


Figura 2.20. Composición media en proteínas y lípidos en larvas de lenguado con 8 días de vida alimentadas con diferentes regímenes alimenticios iniciales

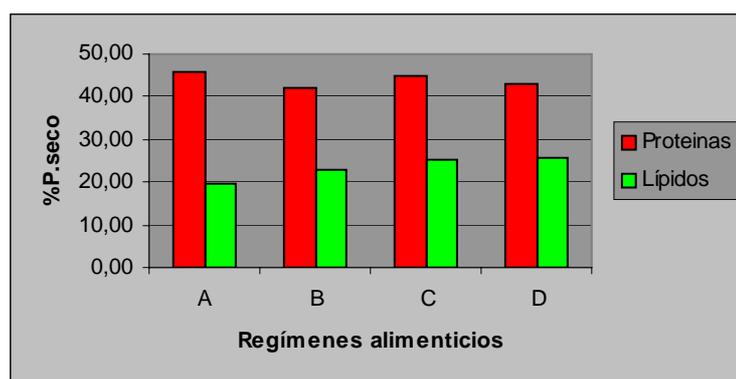


Figura 2.21. Composición media en proteínas y lípidos en larvas de lenguado con 39 días de vida alimentadas con diferentes regímenes alimenticios iniciales.

Tabla 2.11. Composición en ácidos grasos (%total) en larvas de lenguado de día 8 de vida alimentadas con los regímenes alimenticios A,B,C,D

	A	A	B	B	C	C	D	D
PUFA	33,87	28,67	39,41	40,90	40,70	28,37	26,26	26,24
Saturados	20,33	20,79	22,03	20,43	21,38	20,90	22,92	22,73
Monoinsaturados	45,80	50,54	38,57	38,67	37,92	50,73	50,82	51,03
Sum (n-3)	24,83	20,72	17,64	19,14	18,83	19,24	17,51	17,50
Sum (n-6)	8,05	7,03	7,90	8,51	8,40	8,49	7,94	8,05
(n-3)/(n-6)	3,08	2,95	2,23	2,25	2,24	2,27	2,21	2,17
20:5 (n-3)	9,07	7,52	9,03	9,74	9,19	9,89	9,40	9,03
22:6 (n-3)	10,53	8,82	4,27	4,89	5,17	4,95	4,28	4,36
22:6(n-3)/20:5(n-3)	1,16	1,17	0,47	0,50	0,56	0,50	0,46	0,48

Tabla 2.12. Composición en ácidos grasos (%total) en larvas de lenguado de día 39 de vida alimentadas con los regímenes alimenticios A,B,C,D

	A	A	B	B	C	C	D	D
PUFA	39,14	38,99	39,37	39,25	40,80	39,61	39,70	40,39
Saturados	26,42	25,95	23,91	23,66	23,21	24,76	24,08	23,61
Monoinsaturados	34,45	35,06	36,72	37,09	35,99	35,63	36,22	35,99
Sum (n-3)	30,63	30,54	31,12	31,00	31,92	30,92	31,01	31,80
Sum (n-6)	7,94	7,99	7,91	7,90	8,51	8,30	8,20	8,25
(n-3)/(n-6)	3,86	3,82	3,94	3,93	3,75	3,72	3,78	3,85
20:5 (n-3)	3,28	3,34	3,35	3,34	3,75	3,34	3,44	3,40
22:6 (n-3)	7,09	6,21	5,10	4,68	5,84	5,46	5,10	5,07
22:6(n-3)/20:5(n-3)	2,16	1,86	1,52	1,40	1,56	1,63	1,48	1,49

Los resultados obtenidos en este experimento sugieren la ventaja de usar rotífero enriquecido con *Isochrysis galbana* durante los primeros 8 días de vida respecto a supervivencia larvaria y calidad de las larvas y también es necesario un deseable nivel de Artemia para optimizar las tasas de crecimiento.

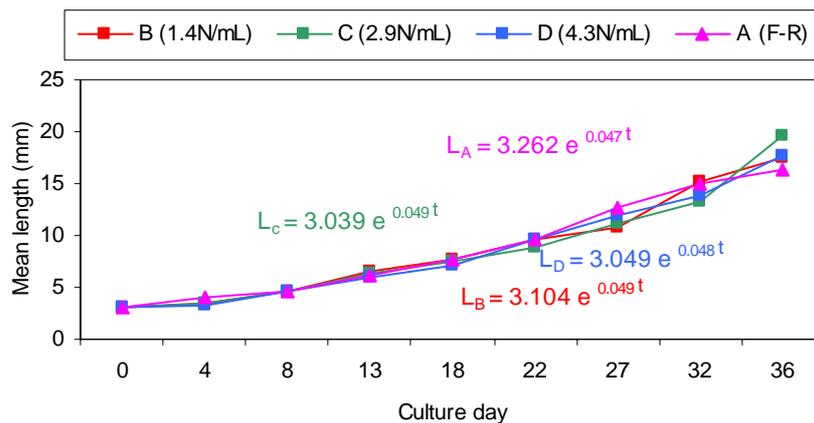


Figura 2.18. Crecimiento larvario en longitud (mm) de larvas de lenguado alimentadas con cuatro regímenes diferentes.

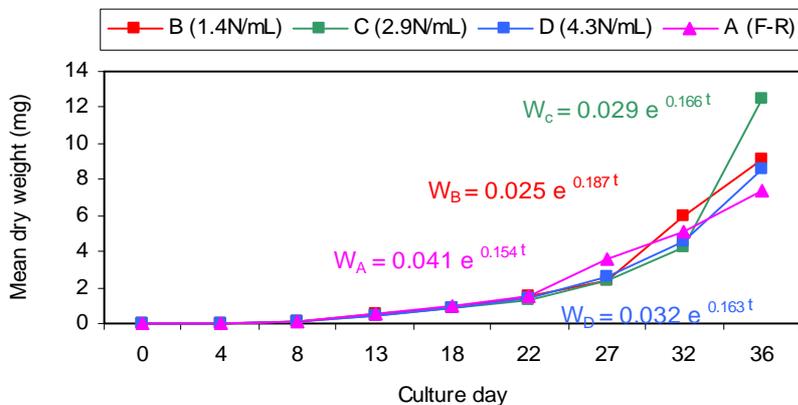


Figura 2.19. Crecimiento larvario en peso seco (mg) de larvas de lenguado alimentadas con cuatro regímenes diferentes.

El crecimiento en longitud y peso seco de las larvas de las cuatro puestas naturales PN de marzo, PN junio, PN agosto y PN septiembre con protocolos de alimentación diferentes se muestran en las Figuras 2.22 y 2.23.

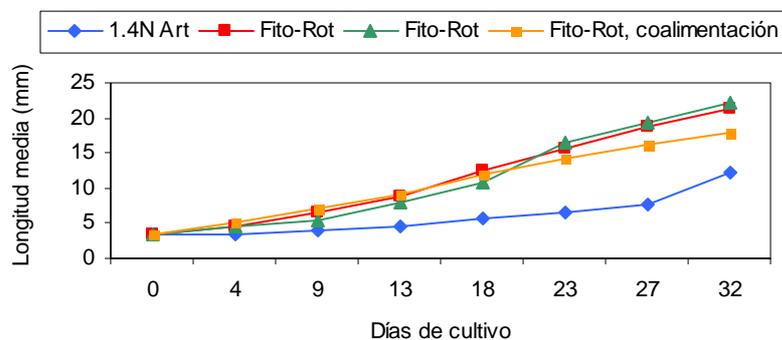


Figura 2.22. Crecimiento larvario de lenguado en longitud (mm) alimentado con cuatro protocolos de alimentación diferentes.

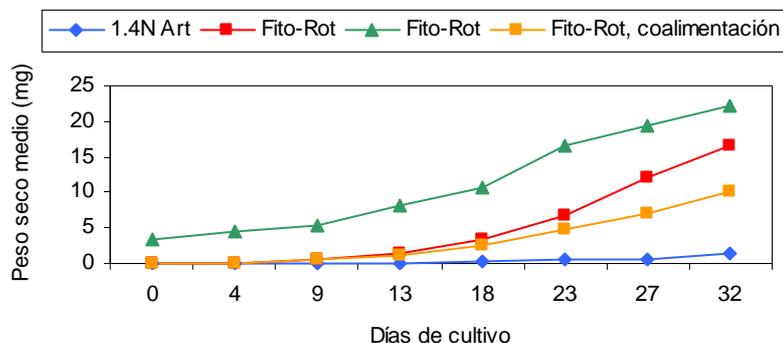


Figura 2.23. Crecimiento larvario de lenguado en peso seco (mg) alimentado con cuatro protocolos de alimentación diferentes.

Las tasas de crecimiento parciales se muestran en la Tabla 2.13, observándose unas tasas de crecimiento en peso seco mayores con el protocolo tradicional hasta el día 23. A partir de este momento la tasa de crecimiento depende de la cantidad de Artemia suministrada.

Tabla 2.13. Tasas de crecimiento parciales obtenidas con cuatro protocolos de alimentación

Talla	SGR			
	1.4N Art	Fito-Rot	Fito-Rot	Fito-Rot, coalim(OIC)
0-23	2,9	6,4	7,2	6,3
23-32	7,2	3,5	4,2	2,6
P.seco				
0-23	12,4	23,1	21,6	24,8
23-32	10,2	9,9	16,1	8,6

Experimentos con larvas. Efecto de 4 niveles de ácido docosahexanoico sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas de lenguado.

Las larvas se alimentaron desde el día 3 al 9 con rotíferos (10 rot/ml) y desde el día 5 hasta el 35 con nauplios de *Artemia* enriquecidos con unas mezclas de aceites a fin de conseguir distintos niveles de DHA, según la tabla 2.14.

Tabla 2.14. Composición de aceites utilizados para estudiar efecto del DHA

Ingredientes (mg/g)	DHA-N	DHA-L	DHA-M	DHA-H
Aceite Neuromins	0	252	504	757
Aceite Vevodar	50	50	50	50
Aceite vegetal	0	35	69	103
Aceite de oliva	860	573	287	0
Suplementos	90	90	90	90

Los nauplios de *Artemia* enriquecidos con las emulsiones mostraron una composición en ácidos grasos semejante a la de los enriquecedores y con niveles significativamente diferentes de DHA de 0, 4.4, 7.7 y 14.7% en los grupos DHA-N, -L, -M y -H, respectivamente, manteniéndose los niveles de EPA y ARA muy similares en los 4 grupos (1.6 y 1.5 %, respectivamente) y sin diferencias significativas. El crecimiento y la supervivencia no se vieron afectados por las dietas, tal como se muestra en la tabla 2.15, aunque los peces del grupo DHA-M tuvieron una talla significativamente mayor y los del DHA-H significativamente menor.

Tabla 2.15. Talla, peso y supervivencia de larvas de lenguado, alimentadas con cuatro composiciones diferentes de ácidos grasos.

	DHA-N	DHA-L	DHA-M	DHA-H
Talla final (mm)	10.6±1.3 bc	10.2±1.2 ab	10.9±0.8 c	9.8±1.0 a
Peso final (mm)	3.0±0.4	2.7±0.9	3.1±0.3	2.4±0.4
Supervivencia (%)	77.0±8.4	85.2±15.6	72.2±2.0	89.8±8.0

Las curvas de crecimiento en longitud y peso a lo largo del desarrollo de la larva muestran diferencias significativas especialmente en los días 20 y 30 (Figura 2.24) y, como consecuencia, diferencias significativas en cuanto al estado de migración del ojo y el índice de migración (I_{EM}), tal y como muestra la Figura 2.25.

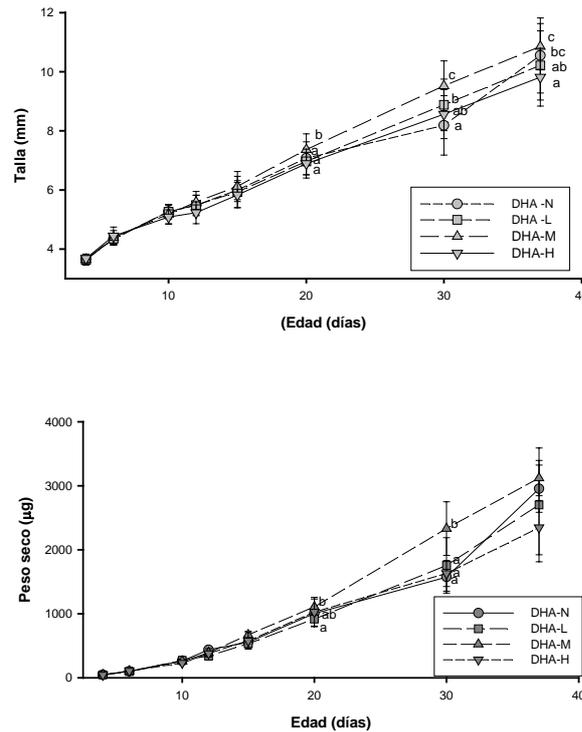


Figura 2.24. Crecimiento de larvas de lenguado, alimentadas con cuatro composiciones diferentes de ácidos grasos.

La composición en ácidos grasos de los tejidos de los peces reflejaba la composición de la dieta, de manera que los que habían sido alimentados con una elevada cantidad de DHA mostraban alto contenido de este ácido graso en los tejidos y los que habían sido alimentados con las dietas DHA-N y DHA-L mostraban bajo contenido. Lo más sorprendente es que los peces que no habían recibido ningún aporte de DHA en la dieta tenían DHA en sus tejidos probablemente porque la larva es capaz de conservar el DHA que tiene en el vitelo y en la larva inicial. Es también bastante curioso que los peces que crecieron mejor no fueron los que recibieron la dieta DHA-H, como sería de esperar, sino los que recibieron la dosis media de este ácido graso. Una posible explicación es que la dieta DHA-H era muy rica en ácidos grasos poliinsaturados, estructurales, pero deficiente en los insaturados, energéticos y es probable que la larva no dispusiera de una fuente de energía adecuada como “combustible” para el metabolismo basal y el movimiento. El que el lenguado senegalés no tenga un requerimiento definido de DHA y sea capaz de crecer y sobrevivir usando dietas que carecen de él no es sorprendente ya que otros autores ya han publicado que otros peces planos (lenguado común y platija, entre otros) no requieren DHA. Es más, la dieta natural de los lenguados son los poliquetos del género *Hediste sp.*, cuya composición en ácidos grasos se basa principalmente en el EPA y contiene muy poco DHA.

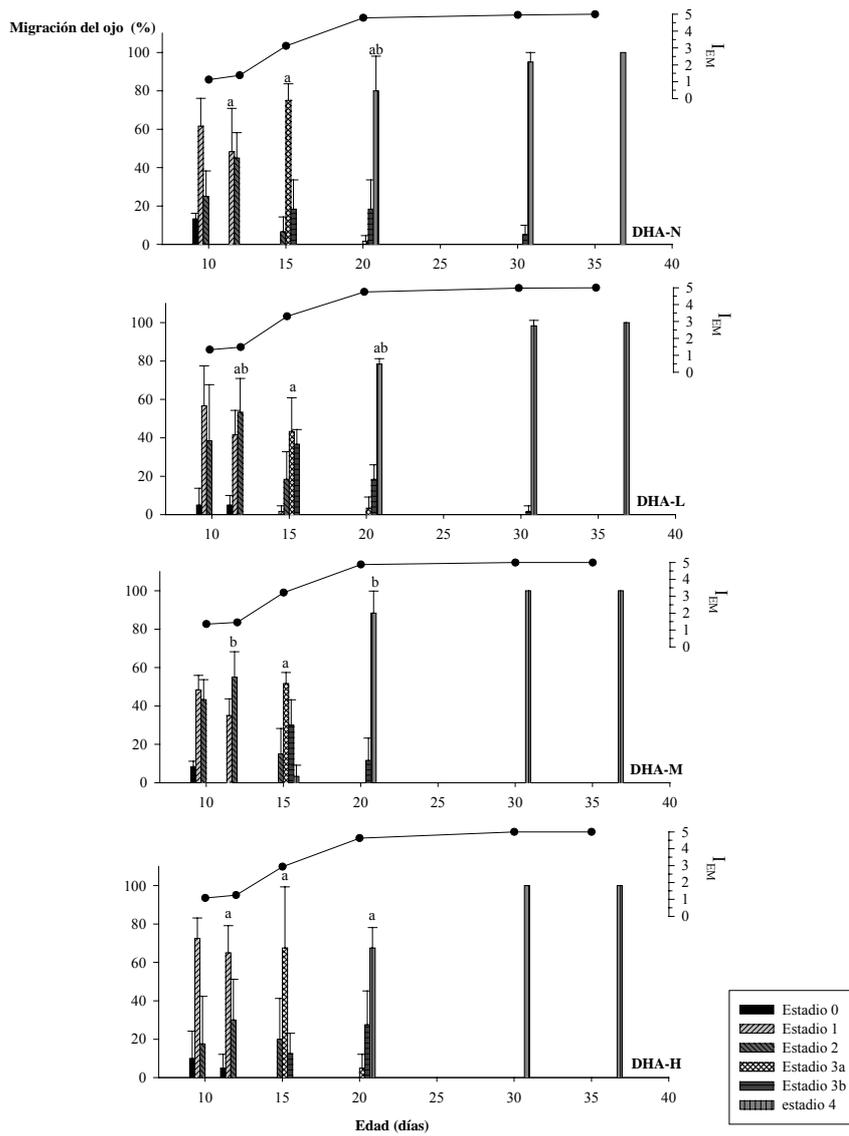


Figura 2.25. Diferencias en el estado de migración ocular durante la metamorfosis del lenguado, en función de la composición en ácidos grasos de la dieta.

Línea 3. Desarrollo de métodos para el tránsito de alimento vivo a inerte, e influencia de factores de cultivo sobre el crecimiento de alevines durante y después del destete.

Desarrollo y valoración de una metodología general para realizar el destete en el lenguado.

Para la valoración general del protocolo de cultivo en destete propuesto desde “El Toruño”, se analizaron los resultados zootécnicos obtenidos, tanto en el propio Centro, como en diversos criaderos comerciales, a los que se suministraron larvas y fichas de seguimiento. En El Toruño se utilizaron los tanques diseñados y construidos específicamente para el cultivo durante esta fase del lenguado. Estos tanques, de 3 m², fueron fabricados en poliéster, con forma rectangular, las esquinas redondeadas, y una altura del agua no superior a los 30 cm.

Los resultados de crecimiento y supervivencia tras el destete fueron muy variables, dependiendo de la instalación. A partir de la valoración de los resultados obtenidos en este tipo de colaboración, se han detectado diferencias muy importantes en el crecimiento y la supervivencia de alevines de lenguado procedentes de puestas comunes, pero sometidos a las diferentes condiciones de manejo existentes en los distintos criaderos. Estas diferencias abarcan desde el fracaso absoluto en el proceso del destete, hasta la consecución de resultados superiores a los previstos en el modelo de crecimiento. Aunque es necesario un mayor número de repeticiones, los mejores resultados en cultivos masivos de destete de lenguado, indican que hasta un 75% de la población es capaz de superar el destete con pienso, alcanzando un peso medio de 1,5 g a los 90 días de edad.

En los cultivos masivos, se han asociado dos factores principales con la realización con éxito del destete del lenguado. Una de las condiciones que determinan llevar a cabo correctamente este proceso es el inicio del destete cuando los peces pesan entre 0.1 y 0.2 g de peso húmedo. La utilización de un pienso comercial de alta calidad, caracterizado entre otras cosas por la inclusión de hidrolizados proteicos, es también determinante. Otro factor que ha condicionado la viabilidad de un buen destete, y también de la etapa inmediatamente posterior, ha sido la temperatura. De su correcto control, evitando valores superiores a 22° C, ha dependido evitar grandes mortalidades ocasionadas por la incidencia de enfermedades de carácter oportunista que afectan especialmente al lenguado cuando la temperatura excede el valor anterior.

Influencia de factores de cultivo en el destete del lenguado

Los primeros trabajos sobre la influencia de factores de cultivo en el destete del lenguado se llevaron a cabo en el IEO de Santander y en el CA-IRTA. Por un lado, se realizó en el primer Centro un estudio del efecto de la densidad de lenguados y la iluminación durante el destete. Una primera experiencia se llevó a cabo por triplicado en tanques del mismo tipo que los empleados en el cultivo larvario, con baja densidad de larvas (200 larvas/m²) y sometidas a dos niveles de iluminación: en oscuridad e iluminación de 200 lux. Al final del destete se observó un crecimiento mayor, tanto en peso húmedo como en longitud, de las larvas cultivadas bajo condiciones de oscuridad (Figuras 3.1 y 3.2) tal como se esperaba al ser una especie bentónica acostumbrada a esas condiciones en su medio natural. Por otra parte, también se vio que la supervivencia era mayor en oscuridad.

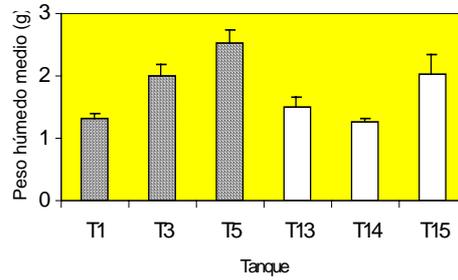


Figura 3.1 Peso húmedo medio de los lenguados en los tanques bajo condición de luz (barras lisas) y de oscuridad (barras punteadas).

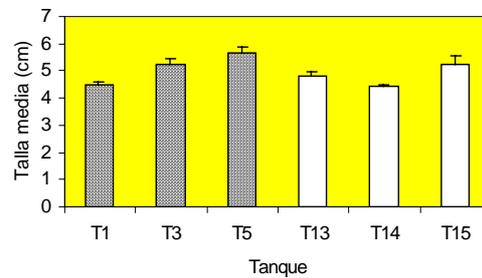


Figura 3.2. Talla media de los lenguados en tanques bajo condiciones de luz (barras lisas) y de oscuridad (barras punteadas).

Los experimentos de destete realizados con densidades altas, entre 1000-1500 individuos/m² en dos tipos de tanques, unos alargados de 3 m² y 450 l de capacidad (S), y otros circulares de 1,54 m² y 430 l (LE), mostraron resultados diferentes. Finalizado el destete, se observó que los individuos de los tanques S presentaban un menor crecimiento en peso ($X_S = 0,97 \pm 0,56$ g) pero mayor supervivencia, mientras que el peso de los individuos de los tanques LE era mayor ($X_{LE} = 2,93 \pm 1,66$ g), pero la supervivencia menor (Figura 3.3).

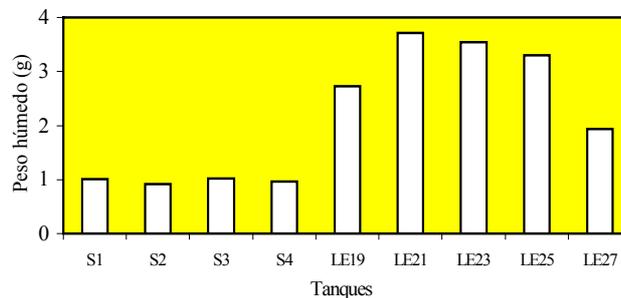


Figura 3.3. Peso húmedo medio de larvas destetadas en dos tipos diferentes de tanques, S y LE.

Los experimentos para investigar los efectos de la densidad de cultivo se llevaron a cabo también en el CA-IRTA. En este caso, los resultados de crecimiento en función de la densidad de alevines de lenguados se presentan en la Figura 3.4. Hasta el mes de Julio el grupo de peces mantenido a baja densidad (300 ind/tq) presentó significativamente mejores crecimientos tanto en talla como en peso que los otros grupos. A partir del mes de agosto no existen diferencias significativas con respecto al peso y todos los grupos crecieron por igual. Los resultados de los análisis de varianza de dos vías efectuados considerando la densidad y día de muestreo como variables dependientes y la talla y el peso como variables independientes se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Análisis estadístico de talla y peso durante el cultivo.

	Talla			Peso		
	g.l.	F	P	g.l.	F	P
Densidad	3	10.76	0.00001	3	2.86	0.360
Muestreo	3	30.71	0.00001	5	101.68	0.0001
Interacción	9	2.34	0.0135	15	1.37	0.158 ns

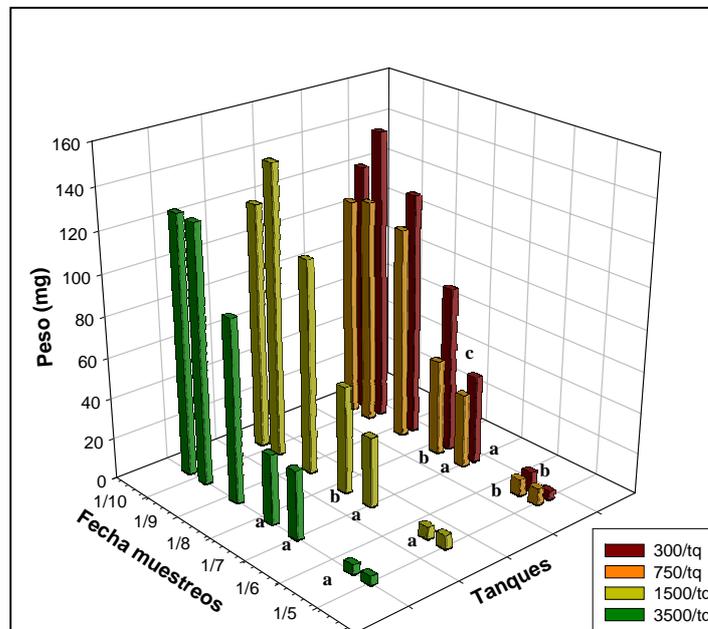


Figura 3.4. Crecimiento de alevines de lenguado en el CA-IRTA, en función de la densidad de cultivo.

El 15 de octubre se procedió a contar el número final de peces a fin de estimar la supervivencia en el destete, así como a reagrupar los peces en función de las densidades. Además se contaron el número de peces grandes (peso > 700 mg) y pequeños (peso < 200 mg) y se calculó la proporción de los mismos en cada tanque. El recuento se hizo mediante fotografías y el empleo de un sistema de análisis de imagen con el fin de no perturbar a los peces. Los resultados se presentan en las Tablas 3.3 (por tanques) y 3.4 (por densidades).

Tabla 3.3. Supervivencia larvaria por tanques experimentales.

Tanque	N° Inicial	N° Final	% Superv.	N° Grandes	% del Total	N° Pequeños	% del Total
T-1	300	96	32.00	8	8.33	30	31.25
T-2	700	24	3.43	4	16.67	13	54.17
T-3	1500	145	9.67	6	4.14	45	31.03
T-4	3700	394	10.65	3	0.76	111	28.17
T-5	300	85	28.33	10	11.76	16	18.82
T-6	700	70	10.00	9	12.86	20	28.57
T-7	1500	186	12.40	5	2.69	30	16.13
T-8	3595	319	8.87	11	3.45	31	9.72

Tabla 3.4. Supervivencia por densidades experimentales.

Tanques	% Supervivencia	% Ind. grandes	% Ind. pequeños
T-1 y T-5	30.17±2.59	10.05±2.43	25.04±8.79
T-2 y T-6	6.71±4.65	14.76±2.69	41.37±18.10
T-3 y T-7	11.03±1.93	3.41±1.03	23.58±10.54
T-4 y T-8	9.76±1.26	2.10±1.90	18.95±13.05

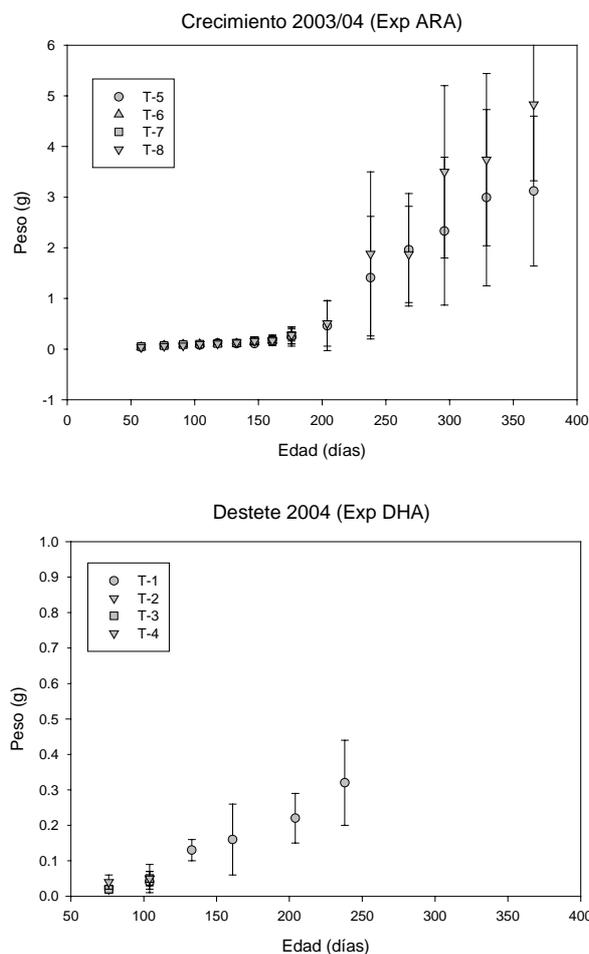
En lo que se refiere a la supervivencia, esta fue significativamente mayor en los tanques con la menor densidad de peces (300 ind/tq) frente al resto que no presentaron diferencias significativas entre ellos. Hay que destacar que en los tanques con 700 individuos se produjo una mortalidad repentina (especialmente en el tanque T-6) que achacamos a la mala circulación del agua en el tanque y la acumulación de pienso y heces en el agua. De cualquier modo la supervivencia en todos los grupos ha sido inferior a la esperada. En lo que se refiere a la distribución de tallas, se observa que en los tanques con menor densidad la presencia de individuos muy grandes es mayor que en los tanques con mayor densidad en los que la distribución de tallas fue mucho más homogénea. La enorme dispersión de tallas observada en los tanques con baja densidad de peces podemos atribuirla a que la cantidad de pienso y nauplios de *Artemia* distribuida por pez fue mayor, con lo que la disponibilidad de pienso y por lo tanto la ingestión del mismo por parte de los peces que se habían adaptado bien al consumo de pienso fue mayor. En el muestreo final los peces se reagruparon en 3 tanques, manteniendo las densidades en las que habían sido destetados con el fin de continuar la investigación durante el engorde. La distribución final se presenta en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Distribución de tallas al final del experimento.

Tanque	Densidad	Peso	N	% Grandes	% Pequeños	% Supervivencia
T-1	Baja	115.6	27	12.41±3.43	33.20±14.96	18.44±13.88
T-2	Media	120.4	33	3.41±1.03	23.58±10.54	11.03±1.95
T-3	Alta	126.8	71	2.10±1.90	18.95±13.05	9.76±1.26

Evaluación de nuevas dietas comerciales para el destete del lenguado

Dentro de los planes para evaluar los resultados sobre el destete de las diferentes dietas comerciales disponibles en el mercado, en el CA-IRTA se hicieron dos experimentos de consecutivos de co-alimentación usando distintos piensos. En el primer experimento se utilizó únicamente pienso Aglonorse, de importación, mientras que en el segundo se utilizaron piensos de distribución nacional. Se evaluaron crecimiento y supervivencia, sin observarse diferencias significativas en ninguno de los 2 parámetros. El segundo experimento se realizó de la misma manera que el primero pero esta vez se usaron los piensos Gemma micro (Skretting) y Proton 4 (INVE). No se observaron diferencias en cuanto al crecimiento de los individuos en los meses de junio y julio. No se encontraron diferencias de crecimiento debidas a la co-alimentación, y el crecimiento fue notoriamente mayor usando el pienso Aglonorse tal y como se observa en la Figura 3.5.



En el año 2003 usamos Aglonorse, en el 2004 Gemma micro. el crecimiento fue significativamente menor en el 2004

Figura 3.5. Crecimiento durante el destete del lenguado en el CA-IRTA, utilizando diferentes piensos comerciales.

En los ensayos de destete realizados en el IEO de Santander se utilizaron cuatro piensos comerciales. El destete se inició a los 43 días de edad y recurrió igualmente a la co-alimentación.. El crecimiento en longitud y peso húmedo de los alevines se muestra en las Figuras 3.6 y 3.7.

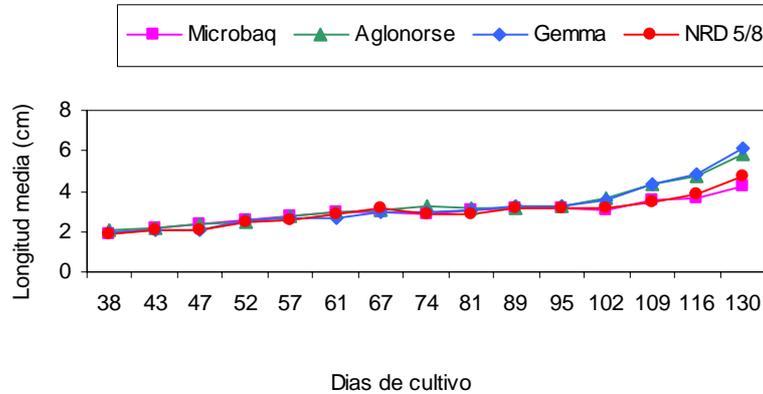


Figura 3.6. Crecimiento larvario de lenguado en longitud (cm) con cuatro piensos diferentes durante el destete.

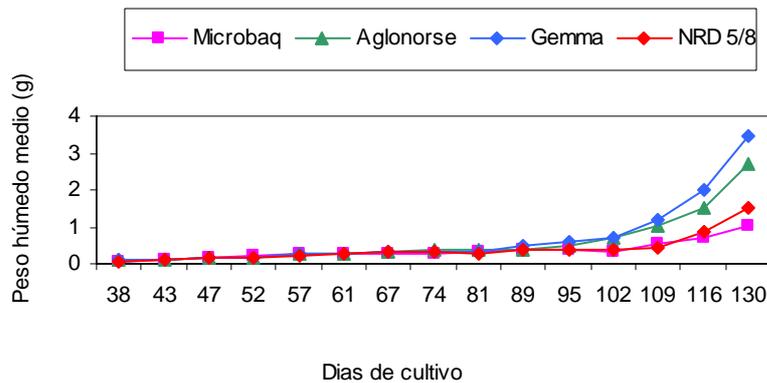


Figura 3.7. Crecimiento larvario de lenguado en peso húmedo (g) con cuatro piensos diferentes durante el destete.

Las tasas de crecimiento parciales durante el destete se muestran en la Tabla 3.5 y donde puede observarse que las mayores tasas se obtuvieron con los piensos Gemma y Aglonorse. La supervivencia registrada se muestra en la Tabla 3.6.

Tabla 3.5 Tasas de crecimiento parciales obtenidas con cuatro piensos diferentes durante el destete.

Talla	SGR			
	Microbaq	Aglonorse	Gemma	Proton/NRD
43-74	0,95	1,23	1,12	1,13
74-95	0,45	0,12	0,59	0,45
95-130	0,87	1,62	1,77	1,18
P.húmedo				
43-74	3,04	3,75	3,52	3,55
74-95	1,19	1,09	3,07	0,72
95-130	2,95	5,05	5,10	4,15

Tabla 3.6. Supervivencia registrada con cuatro piensos diferentes durante el destete

	Supervivencia		
	50	70	90
Microbaq	96,7	96,1	21,6
Aglonorse	99,0	97,7	90,6
Gemma	91,1	78,3	57,9
NRD 5/8	89,0	88,2	29,4

En el destete de alevines (PN marzo, junio y agosto) cultivados con tres protocolos diferentes, el crecimiento en longitud y peso húmedo se muestra en las Figuras 3.8 y 3.9.

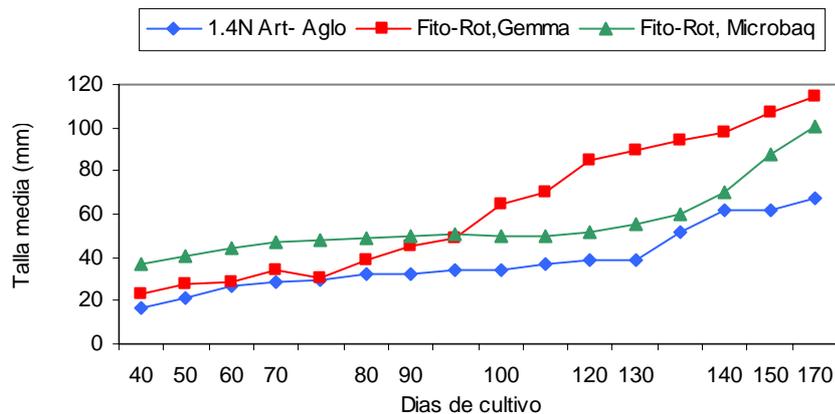


Figura 3.8. Crecimiento larvario de lenguado en longitud (mm) con tres piensos diferentes durante el destete.

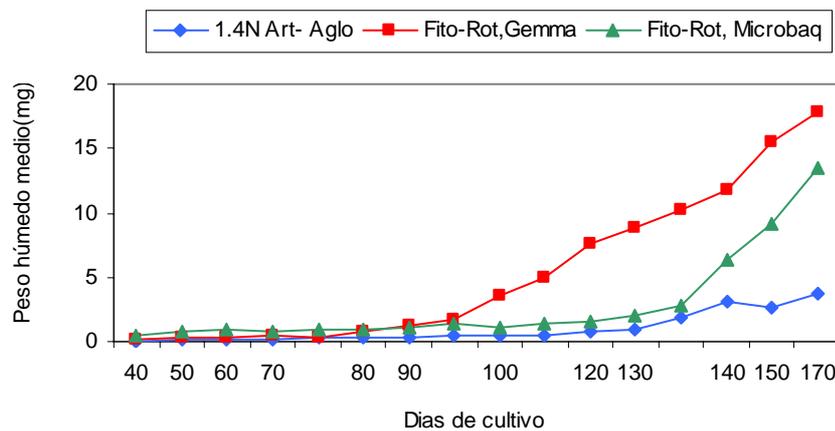


Figura 3.9. Crecimiento larvario de lenguado en peso húmedo (mg) con tres piensos diferentes durante el destete.

Las tasas de crecimiento parciales durante el destete se muestran en la Tabla 3.7, donde se encontraron las mayores tasas cuando los alevines se cultivaron con el protocolo tradicional y usando el pienso Gemma en el destete.

Tabla 3.7. Tasas de crecimiento parciales obtenidas con tres piensos diferentes durante el destete

Talla	SGR		
	1.4N Art- Aglo	Fito-Rot, Gemma	Fito-Rot, Microbac
47-95	1,46	1,55	0,67
95-170	0,90	1,13	0,92
P.húmedo			
47-95	3,92	5,23	2,04
95-170	2,77	6,43	3,05

Una parte de los estudios de destete se dedicó a investigar la composición bioquímica de los lenguados alimentados con diferentes piensos. Para ello, en el IEO de Vigo se realizaron experimentos con el fin de conocer la composición de alevines alimentados con pienso Aglonorse, pienso INVE, y zooplancton natural. En lotes de 1000 individuos de 40 días de edad se comprobó una composición inicial a los 42 días de un 43% de proteínas y un 17% de lípidos. A día 70 de vida (Figura 3.10), las proteínas de los individuos cuyo destete se realizó con zooplancton natural ó con el pienso noruego (Aglonorse) osciló entre el 55% y el 59%, mientras que las alimentadas con pienso INVE presentaron valores de proteínas inferiores (44%). El contenido lipídico a día 70 de vida fue superior en los peces destetados con el pienso noruego (24%) frente al 15% de los alimentados con el pienso INVE y el 9% en los lenguados de 70 días alimentados con zooplancton natural.

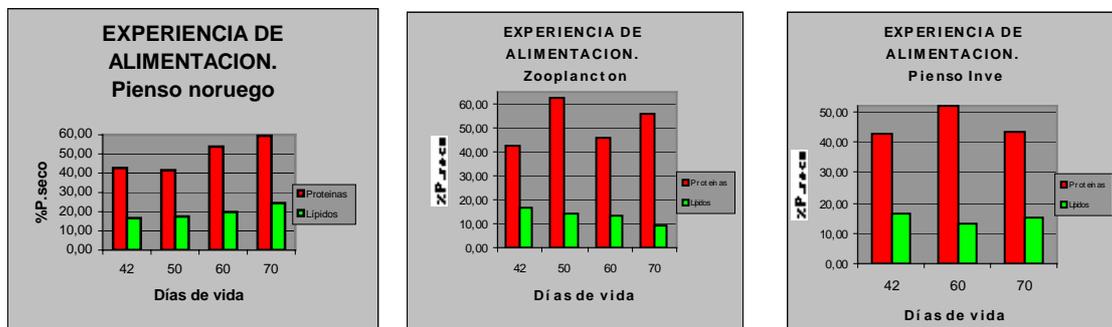


Figura 3.10. Composición de alevines de lenguado alimentados con diferentes piensos en la fase de destete

Línea 4. Cultivo de juveniles en estanques de tierra.

Los alevines de lenguado utilizados para todos los ensayos de cultivo extensivo en estanque de tierra, a lo largo de tres campañas anuales, tuvieron una edad, al inicio de los cultivos, entre 55 y 60 días. El peso húmedo de estos ejemplares osciló entre 60 y 80 mg. Todos los animales habían sido previamente alimentados con Artemia.

El número de individuos recuperados al finalizar los diferentes cultivos, se indica en la Tabla 4.1. En dicha tabla está representado el número final total de lenguados capturados en los estanques después de numerosos días de captura en nasa, y despesque final a mano de la población remanente. Ello implica que el resultado final de recuperación de individuos se obtuvo siempre para un plazo de tiempo muy superior al inicialmente establecido para estudiar el preengorde de los lenguados en estanques de tierra. La producción de juveniles entre 10 y 15 gramos podría haber sido por lo tanto ligeramente superior a la registrada en la Tabla 4.1, pero, ante la imposibilidad de estimar este parámetro en los estanques de tierra antes de la finalización completa de cada ciclo, no hay mas remedio que utilizar el valor de punto final. En este sentido, resulta prácticamente imposible conocer las posibles bajas de lenguado que se puedan producir en los estanques (bien por depredación, falta de alimento, o intolerancia a condiciones invernales), desde que estos alcanzan el peso fijado como objetivo (10-15 g), hasta que se vacía completamente el estanque.

Tabla 4.1. Número de juveniles de lenguado recapturados por metro cuadrado, en estanques extensivos. ^F denota aplicación de régimen de fertilización bentónica selectiva.

Año	Estanque	
	A	B
1	3,4	2,8 ^F
2	1,8	2,2 ^F
3	2,3	0,8

Los datos de la Tabla 4.1 reflejan una producción máxima de 3,4 juveniles por metro cuadrado para el primer año en un estanque sin fertilizar. Los sucesivos cultivos extensivos llevados a cabo en los mismos estanques mostraron una producción muy similar, aunque ligeramente inferior a la del primer año. Es posible que una inadecuada labor de regeneración del sedimento entre campañas, o una hipotética pérdida de productividad bentónica con el paso de los años, estén relacionadas con esta ligera disminución de la producción. Hay que destacar la ausencia de mejora alguna, tanto en el crecimiento como en la producción de lenguados, cuando se aplicó el régimen de fertilización selectiva del bentos. Aparte de este fracaso, dicha técnica produjo además la proliferación de una notablemente mayor cantidad de macrofitos en los estanques en los que se aplicó. Se desconoce por el momento si este fenómeno pudo afectar a los lenguados en cultivo.

El crecimiento de los alevines de lenguado en los estanques de tierra fue muy rápido en los tres o cuatro meses posteriores a la siembra. En la Figura 4.1 se han resumido todos los resultados de crecimiento para este periodo, apreciándose como en un plazo de 140 días

(correspondiente a una edad de los peces de 200 días), los lenguados alcanzan un peso medio de 15 gramos, valor muy superior al que llegan a alcanzar los alevines preengordados intensivamente. Este periodo de crecimiento está justificado por el desarrollo de los lenguados sobre un lecho natural de fango, enriquecido en sus presas naturales bentónicas, y durante la época estival con, teóricamente mejores condiciones ambientales y de productividad natural. El modelo de crecimiento determinado para esta etapa es el descrito por la ecuación:

$$P = -4,87 + 2,33e^{(0,0105D)}$$

En la que P es el peso (g), D es la edad en días, y e es la base de los logaritmos naturales

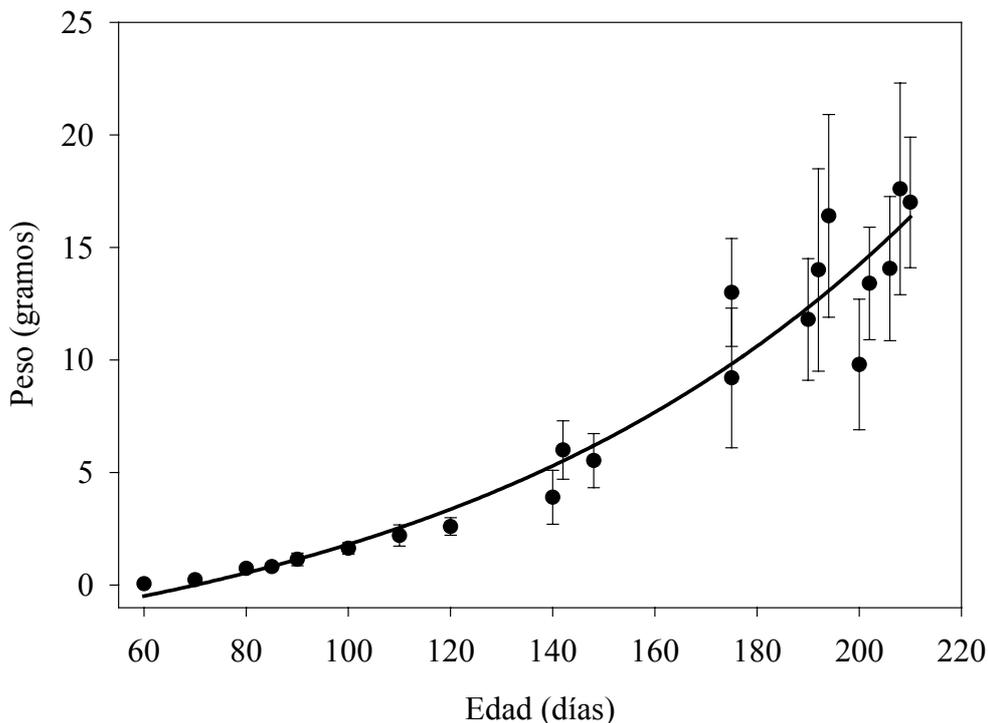


Figura 4.1. Crecimiento de alevines de lenguado hasta el momento de alcanzar el tamaño objetivo en estanques extensivos de preengorde.

Los muestreos realizados con posterioridad al periodo anterior, indicaron que el incremento de los pesos medios experimentó una drástica disminución, en relación a la tendencia previa (Figura 4.2). Este fenómeno está plenamente justificado por varias razones, a destacar la llegada de la época invernal, con peores condiciones para el crecimiento y la productividad natural, y el mas que posible agotamiento del alimento en los estanques. Después de un fase de crecimiento tan activo, parece evidente que la productividad natural de los estanques es incapaz de satisfacer la demanda de alimento de una población de lenguados que ha podido aumentar su biomasa en dos órdenes de magnitud. La dinámica estacional de crecimiento en peso queda recogida por una ecuación de naturaleza asintótica, como es la siguiente:

$$P=22,8/(1+e^{-(D-183)/32,5})$$

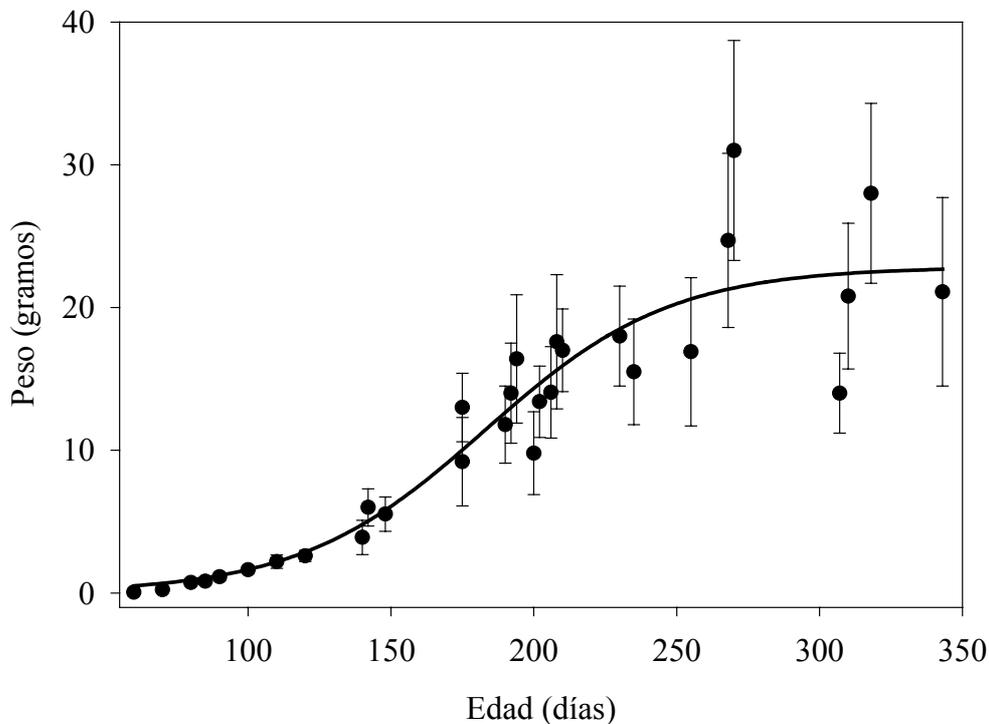


Figura 4.2. Crecimiento de alevines de lenguado en estanques extensivos de preengorde durante los meses de verano hasta invierno.

Si se asume que la población de lenguados estimada al final de los cultivos es la misma a lo largo de ellos, se podría establecer un modelo productivo extensivo para determinar el punto óptimo de cosecha de los lenguados. Este modelo sería conservador, ya que trabajaría con una biomasa muy probablemente inferior a la que realmente existiría en ese momento. Bajo estas premisas, en la Figura 4.3 puede apreciarse la evolución del rendimiento de la producción extensiva muestra un máximo justo al final de la estación climatológicamente favorable.

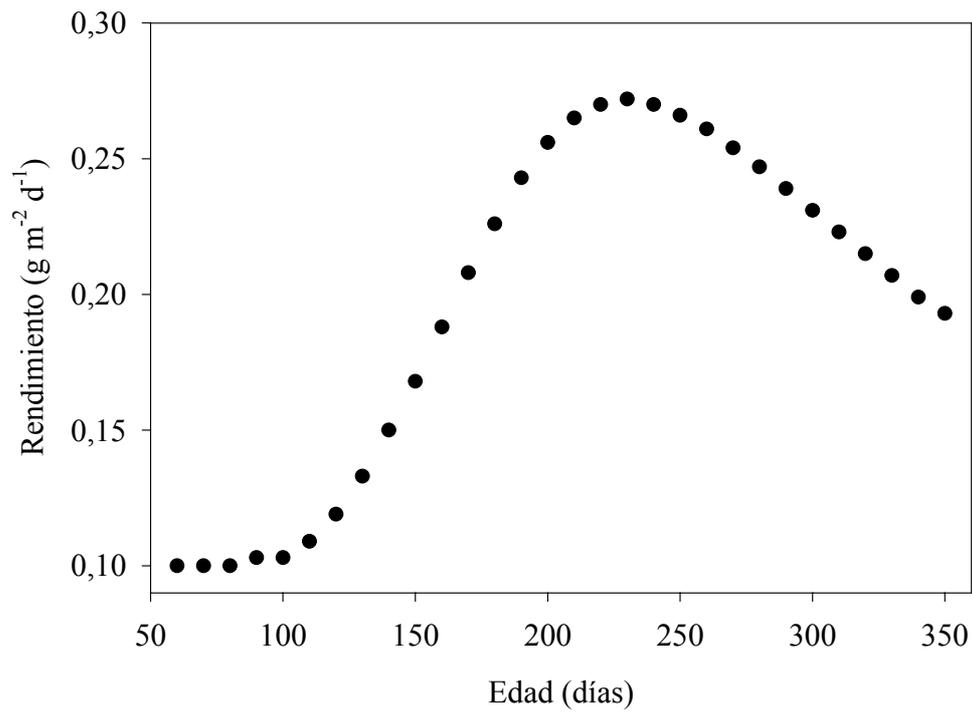


Figura 4.3. Evolución del rendimiento de la producción extensiva de juveniles de lenguado en estanques de tierra.

Línea 5. Cultivo intensivo de juveniles.

Esta última línea de actuación se compone de dos partes bien diferenciadas. La primera parte hace referencia a diferentes ensayos de engorde en los que se valoraron diferentes piensos comerciales, y fue llevada a cabo en los Centros de Santander y Vigo del IEO. La segunda parte consta fundamentalmente de un estudio bioeconómico sobre la explotación intensiva del engorde de lenguado, basado en datos obtenidos sobre su fisiología. Estos trabajos fueron desarrollados en el Centro de acuicultura del IMIDA de Murcia.

Efectos de piensos comerciales sobre el engorde del lenguado

Después de finalizar el preengorde y engorde, durante un año, de los alevines producidos en el 2002, con tres dietas comerciales, se obtuvieron pesos finales de 165,1g, 204,7g y 172,8g con los piensos Solea (Proaqua), Europa 22 y Europa 10 (Trouw) respectivamente. Al comparar las tasas de crecimiento en longitud y peso, se encontraron las mejores tasas para Europa 22 ($g=0,090$; $g=0,283$) frente a Europa 10 ($g=0,087$; $g=0,271$) y Solea ($g=0,080$; $g=0,251$) como se muestran en las Figuras 5.2 y 5.3.

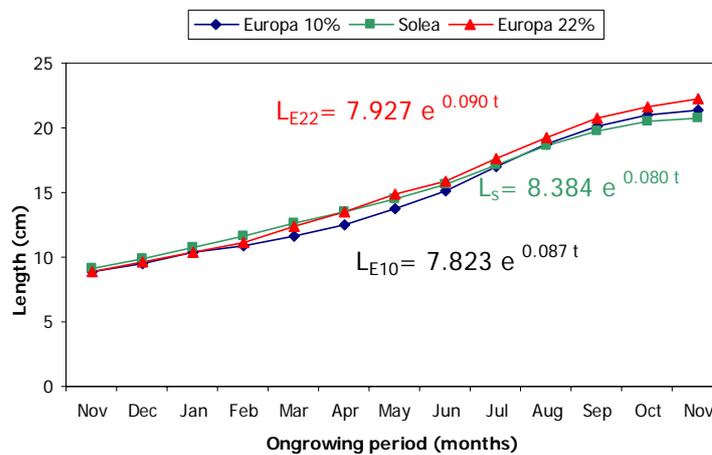


Figura 5.2. Crecimiento de alevines de lenguado en longitud (cm) con tres piensos comerciales durante un año.

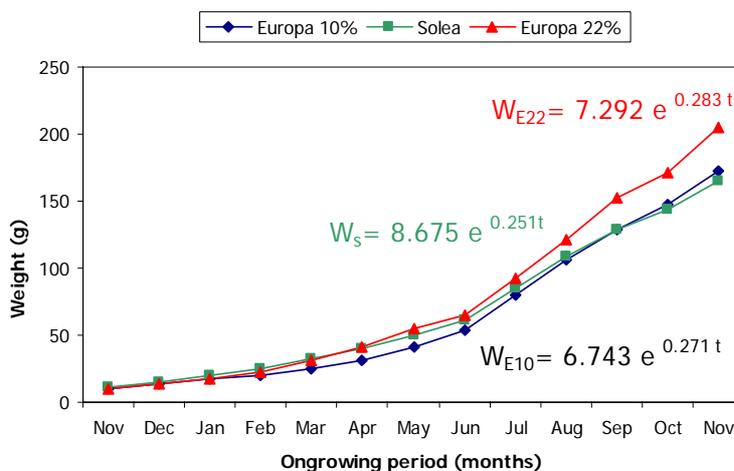


Figura 5.3. Crecimiento de alevines de lenguado en peso (g) con tres piensos comerciales durante un año

Los diferentes índices de crecimiento se muestran en la Tabla 5.12. Las tasas de supervivencia y la composición del músculo de los juveniles al final de este estudio se muestran en la Tabla 5.13. El análisis histológico mostró que los lípidos se almacenaban entre la piel y la fascia muscular.

Tabla 5.13. Índices de crecimiento parcial y total de juveniles de lenguado alimentados con tres dietas comerciales (M: mes, CF: factor de condición, SGR: tasa de crecimiento específico, GE: eficiencia de crecimiento, DGE: tasa de crecimiento diario)

M	Days	Solea							Europa 22							Europa 10						
		N	L (cm)	W (g)	CF	SGR	GE	DGE	N	L (cm)	W (g)	CF	SGR	GE	DGE	N	L (cm)	W (g)	CF	SGR	GE	DGE
1	24	73	9.9	15.2	1.58	1.06	28.93	1.21	81	9.6	13.9	1.56	1.24	34.52	1.44	101	9.6	13.3	1.52	0.94	25.46	1.06
2	63	73	10.7	19.9	1.61	0.70	31.15	0.80	80	10.4	18.0	1.60	0.65	28.93	0.74	97	10.3	17.0	1.54	0.64	28.57	0.73
3	92	73	11.6	24.8	1.58	0.78	24.46	0.84	80	11.1	22.2	1.60	0.75	23.47	0.81	93	10.9	20.0	1.53	0.57	17.30	0.60
4	120	72	12.6	31.9	1.59	0.91	28.91	1.03	80	12.4	31.7	1.67	1.28	43.00	1.54	84	11.7	24.8	1.56	0.77	24.07	0.86
5	150	72	13.5	40.1	1.63	0.76	25.59	0.85	80	13.5	41.7	1.69	0.92	31.62	1.05	80	12.5	31.0	1.63	0.74	25.02	0.83
6	183	72	14.5	50.2	1.65	0.68	25.19	0.76	78	14.9	54.5	1.65	0.81	30.63	0.93	79	13.7	41.7	1.62	0.90	34.59	1.05
7	212	70	15.7	61.7	1.61	0.71	22.91	0.79	77	15.9	65.2	1.62	0.62	19.60	0.68	78	15.2	53.9	1.55	0.88	29.19	1.01
8	243	70	17.1	85.1	1.69	1.04	38.05	1.23	76	17.6	93.0	1.71	1.15	42.63	1.38	78	17.0	79.8	1.64	1.27	48.05	1.55
9	274	70	18.6	108.6	1.68	0.91	27.61	1.23	75	19.2	120.8	1.69	0.99	29.89	1.38	77	18.7	105.7	1.60	1.09	32.46	1.55
10	309	70	19.7	129.2	1.69	0.50	18.98	0.54	75	20.8	152.0	1.69	0.66	25.90	0.74	76	20.2	129.3	1.58	0.58	22.30	0.64
11	337	70	20.5	143.9	1.66	0.38	11.32	0.40	75	21.7	171.4	1.69	0.43	12.77	0.46	76	20.9	147.7	1.61	0.48	14.27	0.51
12	372	70	20.7	165.1	1.86	0.39	14.74	0.42	75	22.3	204.7	1.85	0.51	19.38	0.55	76	21.4	172.8	1.77	0.44	16.98	0.47
Global						0.71	1,303.9	0.04					0.80	1,877.7	0.05				0.75	1,534.8	0.04	

Tabla 5.13. Tasas de supervivencia y composición muscular (Proteínas totales, lípidos, carbohidratos, humedad y cenizas) de juveniles de lenguado alimentados con tres dietas comerciales diferentes.

	EUROPA 22	SOLEA	EUROPA 10
Water content (%)	73. 61	72. 2	74. 22
Protein (%)	21. 82	22. 55	22. 36
Lipids (%)	2. 14	3. 32	2. 06
Ash (%)	1. 3	1. 46	1. 33
Carbohydrates (%)	1.03	0. 47	0. 01
Survival Rates (%)	92. 6	95. 9	75. 3

En el estudio de preengorde y engorde de alevines tras ocho meses de alimentación con dos dietas comerciales diferentes, los pesos finales obtenidos fueron $62,81 \pm 32,56$ g (Gemma) y $69,31 \pm 30,44$ g (Microbaq). La tasa de supervivencia final fue del 55,1% y 65,7% para el Gemma y Microbaq, respectivamente. Los crecimientos en longitud y peso se muestran en las Figuras 5.4 y 5.5. Las tasas de crecimiento diario, eficiencia de crecimiento, factor de condición e índice de conversión se muestran en la Tabla 5.14.

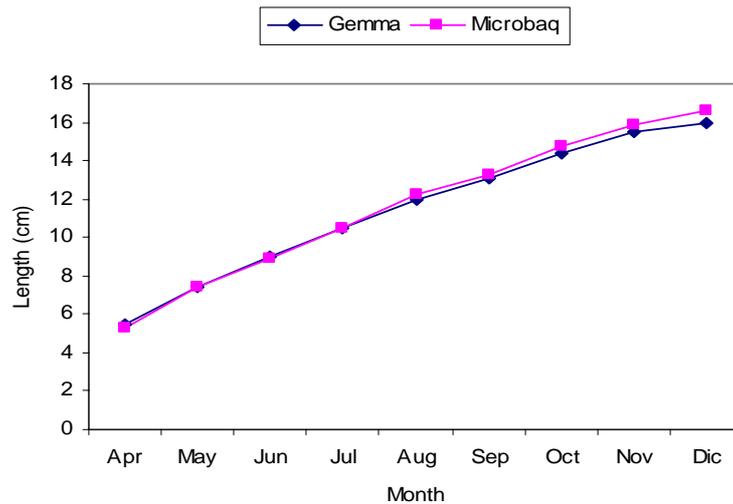


Figura 5.4. Crecimiento de alevines de lenguado en longitud (cm) con dos piensos comerciales durante ocho meses.

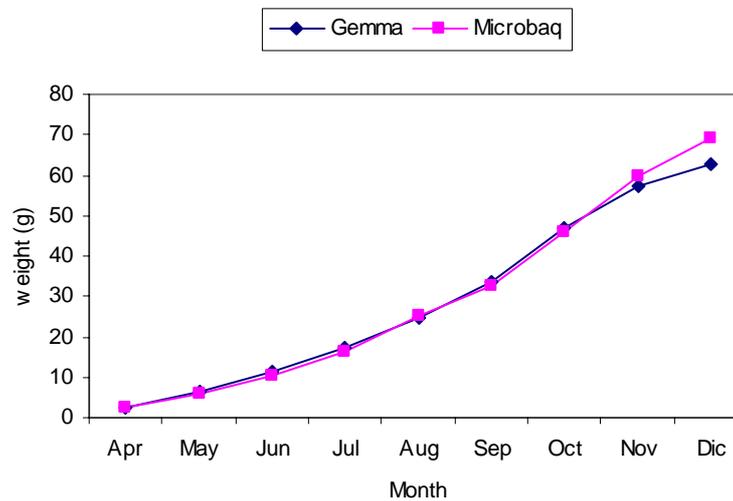


Figura 5.5. Crecimiento de alevines de lenguado en peso (g) con dos piensos comerciales durante ocho meses.

Tabla 5.14. Índices de crecimiento parcial de juveniles de lenguado alimentados con dos dietas comerciales (CF: factor de condición, GE: eficiencia de crecimiento, CI: índice de conversión, SGR: tasa de crecimiento específico)

	Gemma				Microbaq			
	C.F.	G. E	C. I.	SGR	C.F.	G.E	C. I.	SGR
May	1,53	158,54	0,42	2,32	1,50	147,78	0,53	2,16
Jun	1,55	75,27	0,40	1,94	1,44	67,91	0,43	1,79
Jul	1,52	56,30	0,25	1,44	1,40	59,89	0,34	1,51
Aug	1,45	41,38	0,17	1,08	1,38	53,99	0,31	1,31
Sep	1,48	35,93	0,28	1,06	1,40	29,41	0,22	0,92
Oct	1,56	40,16	0,38	0,99	1,41	40,58	0,32	1,00
Nov	1,56	22,19	0,21	0,69	1,48	30,19	0,33	0,91
Dic	1,55	9,44	0,08	0,33	1,51	16,43	0,20	0,56

No se encontraron diferencias en las proteínas y lípidos del músculo de los alevines alimentados con Gemma y Microbaq (61-65% y 18-15%, respectivamente). En el hígado no se encontraron diferencias en las proteínas (36-35%), sin embargo los lípidos eran significativamente superiores con Gemma (23%) frente a Microbaq (19%).

En el estudio de incorporación de probióticos en pienso de preengorde y engorde no se ha observado diferencias en supervivencia en las condiciones experimentales (13,7-21,5° C), aunque presentan mejor vitalidad los ejemplares alimentados con probiótico, siendo este hecho más significativo a temperaturas cercanas a 20°C, tanto en verano como al elevarse artificialmente la temperatura. Se observa una ventaja en las tasas de crecimiento de alevines alimentados con pienso con probiótico a temperaturas superiores a 17°C. Este efecto es mayor en el grupo de menor tamaño, cola de la población inicial, como se muestra en la Tabla 5.15. Sin embargo, no se encuentra influencia en el crecimiento a temperaturas inferiores. Datos preliminares sobre la composición química en músculo apuntan mejores porcentajes de proteínas (74,7 vs 68,5%) y lípidos (4,4 vs 21%) cuando se incorpora probiótico en la alimentación.

Tabla 5.15. Diferencias en tasas de crecimiento observadas en peces alimentados con y sin probiótico para el Grupo 1 (AM-20 PB y AM-34 control) y Grupo 2 (AM-08 PB y AM-09 control).

FECHA	Grupo 1		Grupo 2	
	AM-34 Control	AM-20 PB	AM-9 Control	AM-8 PB
4 - 18 /11/ 2004	1,07%	1,86%	1,07%	1,21%
30-13/01/ 2005	0,36%	0,43%	0,21%	0,29%

En el IEO de Vigo se realizaron trabajos para estudiar la adaptación de juveniles salvajes para la creación y mantenimiento de lotes de reproductores. Los dos lotes de 140 lenguados procedentes de Cádiz, uno de ellos de 44.70±13.66 g y el otro de 98.83±29.40 g, alcanzaron a los doce meses 288.18±104.43 y 512.26±122.37 g, respectivamente. Los datos de crecimiento en peso y talla de estos lotes, se muestran Figuras 5.6 y 5.7.

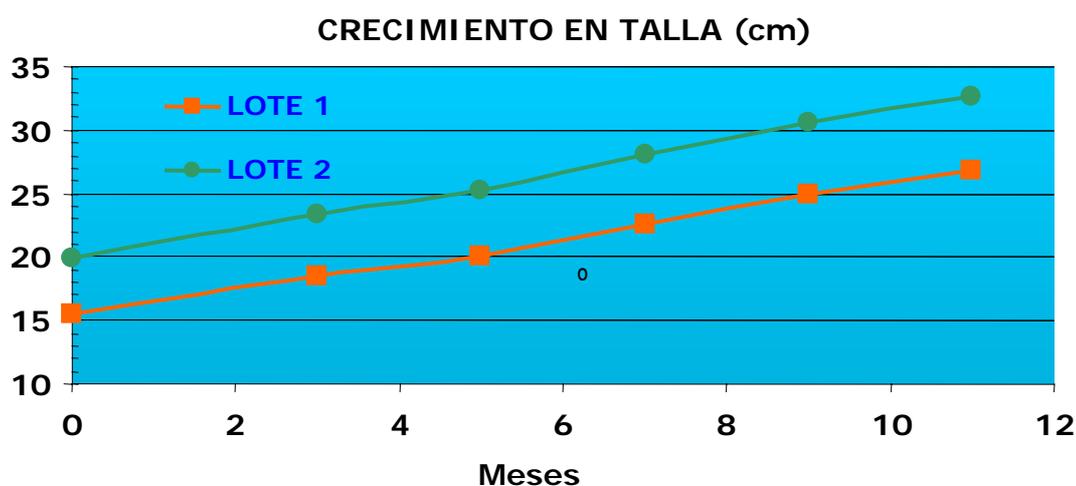


Figura 5.6: Crecimiento en talla del lote de lenguados salvajes.

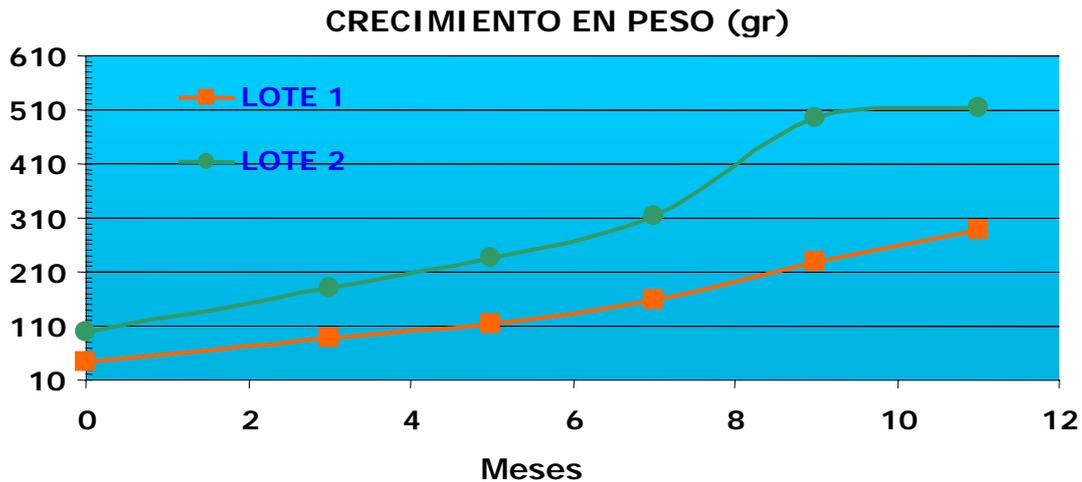


Figura 5.7: Crecimiento en peso del lote de lenguados salvajes.

Los primeros datos de engorde de ejemplares salvajes de este proyecto (año 2002) se obtuvieron con ejemplares de 44.7 g y 98.8 g de peso medio, que alcanzaban a los catorce meses 363 y 605 gramos y tasas de crecimiento de 0.47 y 0.40 respectivamente. La proporción de sexos fue del 60.3 % de machos y 56.0 % de hembras.

*Aproximación al establecimiento de modelos lineales de interés en el preengorde de lenguado (*Solea senegalensis*).*

El crecimiento de los dos lotes de alevines de lenguado en el CA-IMIDA de Murcia se muestra en la Figura 5.8. Al final del estudio, tras 109 días, el peso medio del L1 fue de $18,00 \pm 0,82$ g y el del L2 de $38,05 \pm 3,60$ g. A partir de todos los muestreos que se realizaron se obtuvieron un total de 644 datos de longitud total y peso corporal. La ecuación de la relación talla peso y talla índice de condición es:

- (1) $\ln L = -4.661(\pm 0.028) + 3.062 \ln(P_m)$; ESE=0.106; $R^2=0.990$; $P < 0.001$
- (2) $K = 0,938 + 0,067 \ln(L)$; $R^2=0,999$.

El valor del exponente de peso (3,051) es similar al encontrado a otras especies de peces, como dorada, sargo picudo o incluso atún. El índice de condición estimado para el rango de pesos estudiado varía en un rango muy estrecho, aumenta desde 1,00 a 1,13.

Se obtuvieron un total de 12 observaciones de crecimiento y peso corporal. Las ecuaciones de crecimiento obtenidas mediante el análisis de regresión son las siguientes:

- (3) $\ln TCA = -3,027(\pm 0,231) + 0,553(\pm 0,087) \ln(P_m)$; ESE=0.198; $R^2=0,783$; $P < 0.001$
- (4) $\ln TCR = 1.641(\pm 0.243) - 0.466(\pm 0.091) \ln(P_m)$; ESE=0.209; $R^2=0.695$; $P < 0.001$

Se obtiene un mejor ajuste con la ecuación 3, es decir cuando el crecimiento se expresa en valores absolutos (g/día). El exponente del peso (*b*) tiene un valor de 0,553, encontrándose dentro del rango observado para la mayoría de especies de peces. Al hacer estimaciones con el modelo y los datos observados se comprueba la bondad de la ecuación. Por otro lado, el modelo estima que el tiempo necesario para que se alcancen los 17 g de peso

medio, partiendo de ejemplares de 2 g, es de unos 90 días. Así pues, en principio se podría establecer que el preengorde de esta especie, trabajando a una temperatura de 18°C, es de aproximadamente unos tres meses.

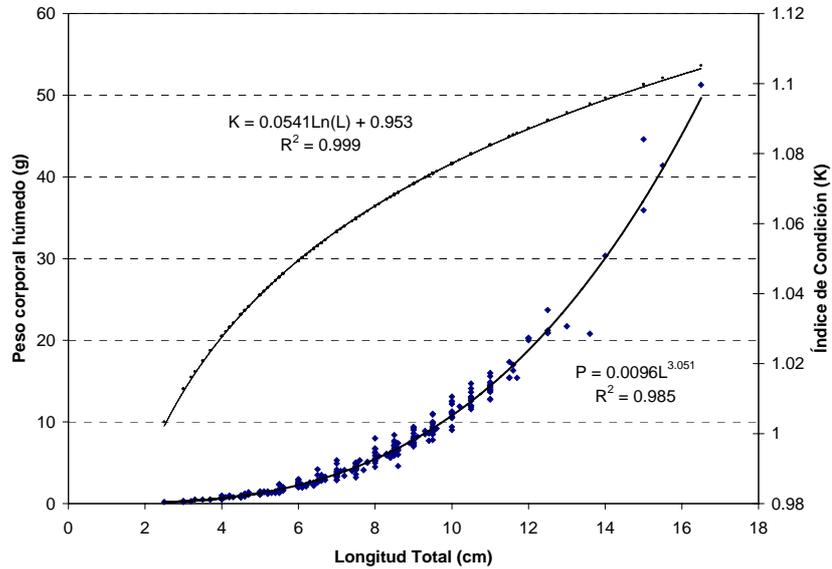


Figura 5.8. Relación talla peso y talla K para el lenguado en la fase de preengorde.

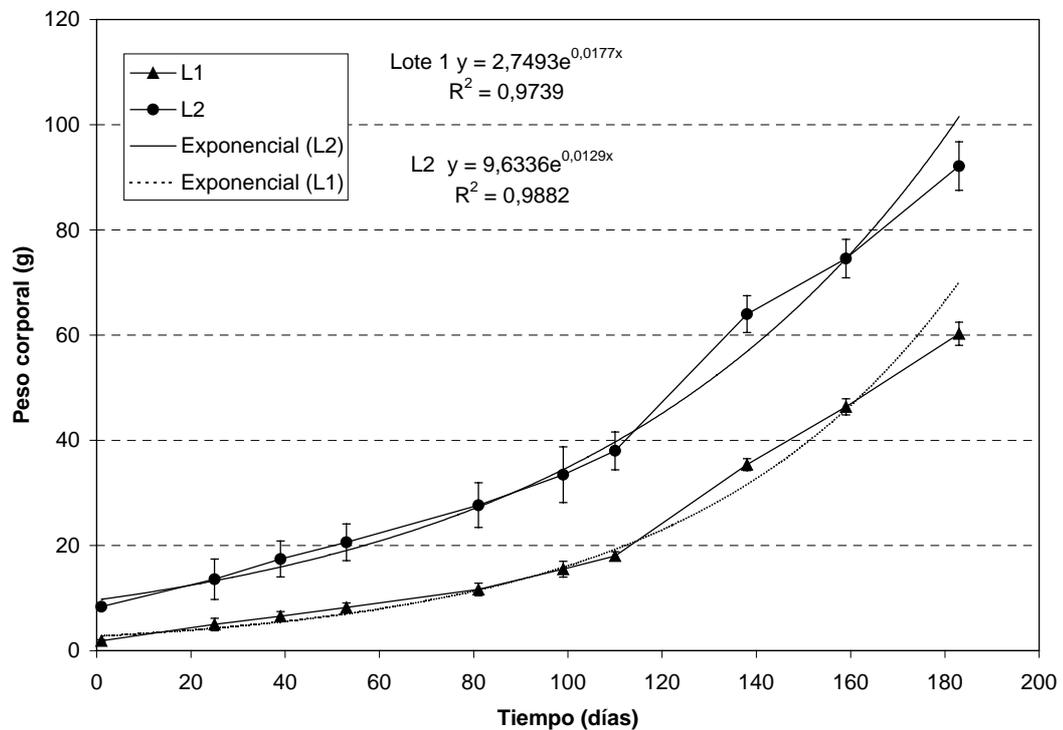


Figura 5.9. Crecimiento de los dos lotes en función del tiempo de cultivo.

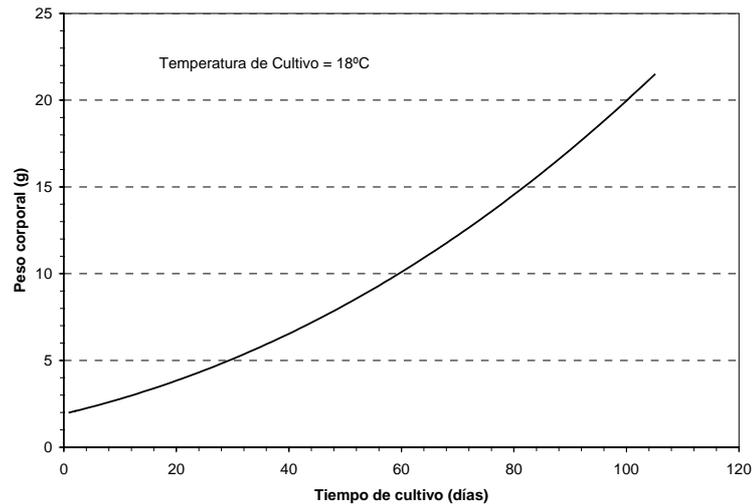


Figura 5.10. Crecimiento estimado del lenguado en la fase de preengorde a 18°C de temperatura.

Temperatura óptima de engorde del lenguado.

En los experimentos para estimar la temperatura óptima, D_{peak} varió entre 3 y 13 horas, con un valor medio de 9.36 ± 3.07 h, mientras que D_{sda} varió entre 10 y 23 horas, con un valor medio de 18.32 ± 3.56 h. Las cuatro ecuaciones obtenidas son significativas ($P < 0.001$) y explican más del 96% de la varianza. El coeficiente de peso “ b ” varía entre 0.67 y 0.76, situándose dentro del rango encontrado para la mayor parte de las especies de peces. El coeficiente del término cuadrático de temperatura “ d ” es en todos los casos significativo ($P < 0.001$), lo que indica que dentro del rango de temperaturas estudiado existe un valor de T para el cual Mo_2 es máximo (T_{max}). Las ecuaciones obtenidas son las siguientes:

- (1) $\ln Mo_{2,day} = -16.6788 + 0.7530 \ln W + 1.4591T - 0.0330T^2$; n: 12; R^2 -adj.: 0.979; $P < 0.001$
- (2) $\ln Mo_{2,routine} = -16.7227 + 0.6659 \ln W + 1.4344T - 0.0315T^2$; n: 12; R^2 -adj.: 0.966; $P < 0.001$
- (3) $\ln Mo_{2,sda} = -19.8563 + 0.7577 \ln W + 1.7636T - 0.04015T^2$; n: 12; R^2 -adj.: 0.975; $P < 0.001$
- (4) $\ln Mo_{2,peak} = -19.2065 + 0.7543 \ln W + 1.7155T - 0.0391T^2$; n: 12; R^2 -adj.: 0.973; $P < 0.001$

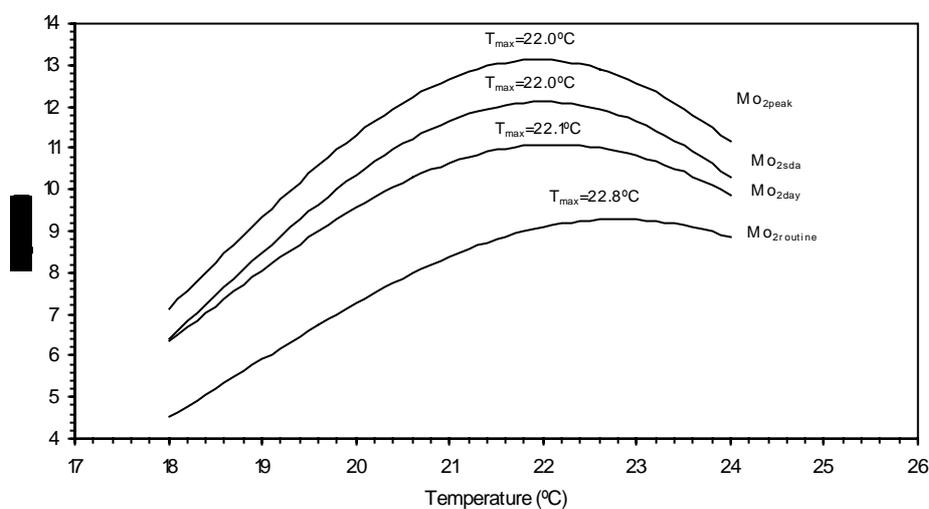


Figura 5.11. Estimación de T_{max} a partir de las ecuaciones obtenidas para los cuatro niveles de Mo_2 .

A partir de dichas ecuaciones se ha estimado la temperatura a la cual se obtiene el valor máximo de Mo_2 (T_{max}), que varía entre 22°C y 22.8°C (Figura 5.8). Consecuentemente la temperatura óptima fisiológica debe situarse próxima a esta temperatura, y la óptima de crecimiento probablemente se sitúe en torno a los 20°C. De hecho a temperaturas superiores a 24°C se ha producido la mortalidad de prácticamente todos los ejemplares en experimentación. Los síntomas reflejan fuertes infecciones por bacterias oportunistas, como consecuencia, probablemente, de una disminución del sistema inmunológico frente al estrés térmico

Composición en macronutrientes y perfil de ácidos grasos en el lenguado senegalés

Como es habitual, los peces cultivados presentaron un porcentaje mayor de grasa corporal (Tabla 5.16). En cuanto al perfil de ácidos grasos (Tabla 5.17), los peces cultivados presentaron un porcentaje menor de ácidos grasos saturados, principalmente debido al contenido en 18:0. La proporción de monoinsaturados fue mayor en el grupo cultivado, debido a los contenidos en 16:1n-7, 18:1n-9, 20:1n-9 y 22:1n-9. El porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados fue mayor en los lenguados salvajes, principalmente debido al contenido en 20:4n-6 y 18:2n-6, aunque las variaciones detectadas no fueron significativas.

Como ha sido descrito, el patrón de ácidos grasos del músculo del lenguado refleja el de los lípidos de la dieta. En peces, los requerimientos de ácidos grasos esenciales están influenciados por diversos factores ambientales y, varían, cualitativa y cuantitativamente dependiendo de la especie. Los peces no tienen enzimas para la biosíntesis del ácido linoleico (18:2n-6) y el linolénico (18:3n-3). Además, los peces marinos tienen una capacidad limitada o ausente para sintetizar ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 tales como el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) y el docosahexaenoico (22:6n-3, DHA). Hace tiempo que se conocen estos requerimientos y se incluyen en la dieta para un crecimiento y desarrollo normal del pez. Pero además, los peces marinos son incapaces de sintetizar el ácido araquidónico (20:4n-6) y debido a que los huevos, las larvas y los tejidos neurales de los peces marinos tienen altos niveles de EPA y DHA y relativamente bajos de ARA, la esencialidad de este ácido graso ha sido descuidada. Sin embargo es llamativo el bajo porcentaje de araquidónico en los lenguados alimentados con pienso con respecto a los salvajes, lo cual sugiere un requerimiento alto de ARA en esta especie. Cuestión que debe ser valorada teniendo en cuenta la importancia fisiológica del ácido araquidónico, ya que es un componente esencial de los fosfolípidos de membrana y un precursor de los eicosanoides bioactivos.

Tabla 5.16. Composición en macronutrientes del músculo del lenguado senegalés de distinta procedencia (en sustancia fresca).

	Salvajes- cultivados	Salvajes	Cultivados
Humedad	79.18±5.39	76,28±0.21	73.15±2.74
Proteína	18.11±3.04	20.93±0.26	20.20±0.72
Grasa	0.59±0.35 ^a	0.46±0.12 ^a	3.99±0.45 ^b
Minerales	1.60±0.14	1.55±0.12	1.42±0.03

Los datos representan la media±SD. Valores en la misma línea con diferente superíndice son significativamente diferentes ($P<0.05$).

Tabla 5.17. Composición en ácidos grasos del músculo blanco de la dieta comercial y el músculo blanco del lenguado senegalés salvaje, salvaje-cultivado y cultivado (g/100 g ácidos grasos totales)

Ácido graso	Dieta	Salvajes-cultivados	Salvajes	Cultivados
C12:0	0.16	0.20±0.23	-	0.05±0.01
C13:0	0.02	-	-	0.02±0.01
C14:0	6.75	2.16±0.00	-	3.34±0.47
C15:0	0.68	0.70±0.07 ^a	1.07±0.30 ^b	0.47±0.07 ^a
C16:0	22.27	24.21±1.98 ^a	20.24±1.11 ^b	20.21±0.71 ^b
C17:0	0.72	0.77±0.25 ^a	1.40±0.25 ^b	0.30±0.03 ^c
C18:0	4.94	8.00±2.25 ^a	10.54±0.81 ^a	3.34±0.84 ^b
C20:0	0.32	0.41±0.14 ^a	0.41±0.02 ^a	0.19±0.02 ^b
C21:0	0.11	0.08±0.02 ^a	0.14±0.01 ^b	0.04±0.01 ^c
C22:0	0.29	0.59±0.32 ^a	0.62±0.13 ^a	0.14±0.03 ^b
C23:0	0.06	0.12±0.09 ^{ab}	0.14±0.03 ^a	0.02±0.01 ^b
C24:0	0.26	0.57±0.35 ^a	0.60±0.17 ^a	0.11±0.06 ^b
Σ SFA	36.61	35.86±4.94 ^a	35.16±1.35 ^a	28.30±1.54 ^b
C14:1	0.04	0.14±0.07 ^a	0.07±0.01 ^b	0.06±0.01 ^b
C15:1	0.01	0.16±0.07 ^a	0.20±0.05 ^a	0.03±0.01 ^b
C16:1n-7	3.48	3.42±2.06 ^a	3.00±0.47 ^a	6.98±0.62 ^b
C17:1	0.20	0.51±0.26	0.55±0.18	0.28±0.11
C18:1n-9	9.83	11.27±0.90 ^a	9.00±2.31 ^a	17.38±1.48 ^b
C20:1n-9	0.06	0.13±0.07 ^a	0.75±0.19 ^a	2.86±0.93 ^b
C22:1n-9	0.37	0.16±0.07 ^a	0.36±0.09 ^a	2.25±0.61 ^b
C24:1n-9	0.85	0.59±0.14 ^a	0.30±0.13 ^b	0.69±0.12 ^a
Σ MUFA	14.85	16.26±2.72 ^a	12.42±4.68 ^a	26.18±7.28 ^b
C18:2n-6	6.25	4.12±1.51 ^a	15.28±2.70 ^b	13.51±1.17 ^b
C18:3n-6	0.21	0.13±0.04 ^a	0.08±0.01 ^b	0.13±0.02 ^a
C18:3n-3	2.64	1.12±0.86 ^a	0.32±0.16 ^a	3.15±0.53 ^b
C20:2n-6	0.22	0.24±0.06 ^a	0.88±0.23 ^b	0.49±0.06 ^a
C20:3n-6	0.17	0.35±0.18 ^{ab}	0.48±0.17 ^a	0.12±0.02 ^b
C20:3n-3	0.27	0.23±0.03 ^a	0.17±0.05 ^a	1.35±0.37 ^b
C20:4n-6	1.29	12.48±9.60 ^a	10.42±1.92 ^{ab}	1.01±0.12 ^b
C22:2	0.07	-	0.07±0.02	0.06±0.01
C20:5n-3	15.57	5.27±3.14	4.18±0.61	5.99±0.52
C22:6n-3	21.84	24.62±6.64	30.48±3.73	22.86±3.48
Σ PUFA	48.55	48.39±2.26 ^a	59.29±5.99 ^b	48.68±4.04 ^a
Σ n-3	40.33	31.15±10.62	33.96±3.66	33.35±3.53
Σ n-6	7.92	17.25±8.37 ^{ab}	26.70±2.27 ^a	14.78±1.23 ^b
Σ n-9	11.12	12.09±0.84 ^{ab}	10.47±2.09 ^a	18.83±7.38 ^b
n-3/n-6	5.09	2.38±1.51	1.28±0.20	2.27±0.28
n-3/n-9	3.63	2.54±0.75	3.34±0.78	2.23±1.58

SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados. Valores en la misma línea con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Modelo econométrico de viabilidad/rentabilidad para el engorde de lenguado en tanques de tierra con bombeo de agua de pozo.

En la tabla 5.18 se muestra un análisis de costes utilizando los valores medios de las variables consideradas. Los costes de producción relativos con los datos de partida (valores medios de los rangos establecidos para las variables), disminuyen desde 9,89 en la planta A hasta 8,24 euros/Kg en la planta D, por lo que con un precio de venta de 11,5 euros el índice B/K aumenta desde 7,50 a 38,84%.

Tabla 5.18. Análisis de costes calculado con los valores de partida (valores medios del rango).

Planta	Producción (Tn)	Inversión (Euros)	Costes Abs. (Euros)	Costes Rel. (Euro/Kg)	Ventas (Euros)	Beneficios (Euros)	B/K (%)
A	100	2.150.454	988.646	9,89	1.150.000	161.354	7,50
B	200	2.593.338	1.758.483	8,79	2.300.000	541.517	20,88
C	300	2.995.633	2.527.716	8,43	3.450.000	922.284	30,79
D	400	3.356.248	3.296.418	8,24	4.600.000	1.303.582	38,84

B/K: índice beneficio inversión.

Las ecuaciones obtenidas con el análisis de regresión múltiple en el análisis econométrico son las siguientes:

Planta A (Producción 100 Tn/año; Carga 10 Kg/m²).

$VAN = -5.967.716 - 0,71K - 1.672.882C_E - 1.635.143C_P - 1.635.143C_A + 1.635.143PV$
(Coeficientes $P < 0,001$; ANOVA, $P < 0,001$; Error de la estimación = 3.993,2; $R^2_{aj} = 0,999$).

$TIR = -0,122 - 4K \cdot 10^{-8} - 0,041C_E - 0,041C_P - 0,040C_A + 0,047PV$
(Coeficientes $P < 0,001$; ANOVA, $P < 0,001$; Error de la estimación = 0,204; $R^2_{aj} = 0,913$).

Planta B (Producción 200 Tn/año; Carga 20 Kg/m²).

$VAN = -8.444.977K - 3.311.735C_E - 3.242.948C_P - 3.260.484C_A + 3.264.819PV$
(Coeficientes $P < 0,001$; ANOVA, $P < 0,001$; Error de la estimación = 49581,0; $R^2_{aj} = 0,999$).

$TIR = -0,008 - 7K \cdot 10^{-8} - 0,066C_E - 0,065C_P - 0,070C_A + 0,069PV$
(Coeficientes $P < 0,001$; ANOVA, $P < 0,001$; Error de la estimación = 0,017; $R^2_{aj} = 0,972$).

Planta C (Producción 300 Tn/año; Carga 30 Kg/m²).

$VAN = -10.935.077 - 0,71K - 4.847.202C_E - 4.905.430C_P - 4.905.430C_A + 4905430PV$
(Coeficientes $P < 0,001$; ANOVA, $P < 0,001$; Error de la estimación = 11.570; $R^2_{aj} = 0,999$).

$TIR = 0,101 - 7K \cdot 10^{-8} - 0,079C_E - 0,080C_P - 0,079C_A + 0,077PV$
(Coeficientes $P < 0,001$; ANOVA, $P < 0,001$; Error de la estimación = 0,018 ; $R^2_{aj} = 0,972$).

Planta D (Producción 400 Tn/año; Carga 40 Kg/m²).

$VAN = -13.243.778 - 0,76K - 6.648.304C_E - 6.540.573C_P - 6.540.735C_A - 6.540.518PV$
(Coeficientes $P < 0,001$; ANOVA, $P < 0,001$; Error de la estimación = 354.500; $R^2_{aj} = 0,999$).

$TIR = 0,156 - 7K \cdot 10^{-8} - 0,085C_E - 0,086C_P - 0,084C_A + 0,082PV$
(Coeficientes $P < 0,001$; ANOVA, $P < 0,001$; Error de la estimación = 0,020; $R^2_{aj} = 0,976$).

Las ecuaciones son significativas ($P < 0,01$) y todos los coeficientes en ambas ecuaciones son significativamente distintos de 0 ($P < 0,01$). Desde un punto de vista económico las ecuaciones son también válidas en cuanto que el signo de los coeficientes es el correcto.

La superficie de ocupación varía entre 3,5 y 3,9 ha según sea la carga final de cultivo. Y al igual que en el engorde de rodaballo en tanques en tierra la superficie de ocupación es muy alta por tratarse de un cultivo en dos dimensiones. Esta alta ocupación del terreno es una dificultad importante en el litoral Mediterráneo, donde el suelo es un factor cada vez más escaso y esta actividad tendría que competir con otras actividades económicas, particularmente las urbanísticas. Por otro lado, la zona de ubicación de la explotación debe reunir la condición de poder obtener agua marina de pozo con una determinada calidad, lo que también reduce las posibilidades.

Según muestra el análisis de costes (valor medio de las variables) el punto muerto de este negocio, es decir donde costes de producción y beneficios se igualan coincide con el coste de producción absoluto o relativo. Para la planta A este valor es de 9,89 Euros/Kg que se sitúa próximo al precio de venta (11,5 Euros), y el índice beneficio-inversión (B/K) es de tan sólo un 7,50%, por lo que esta alternativa no es económicamente rentable, teniendo en cuenta el riesgo de esta actividad productiva, así como que existen productos alternativos bancarios de renta fija sin riesgo que tienen relaciones B/K similares. En la planta B, donde la carga de cultivo es de 20 Kg/m², los costes relativos son de 8,79 Euros/Kg, con un índice B/K del 20,88%, que ya sería una cifra atractiva para el inversor, aunque sería un negocio aún muy dependiente del precio de venta, por lo que a corto y medio plazo se tendría que optimizar los costes de producción para compensar una previsible bajada de los precios de venta según aumenta la producción. En los casos C y D se trataría de negocios de interés para los inversores.

A partir de las ecuaciones obtenidas se han simulado una serie de situaciones de interés que se muestran en las figuras 5.9 a 5.10, de las que se han extraído las conclusiones del presente trabajo. El valor mínimo de TIR que se ha estimado como económicamente rentable en el caso de esta actividad es de un 13 al 16%, debido a que la acuicultura en general se debe considerar como un negocio de riesgo.

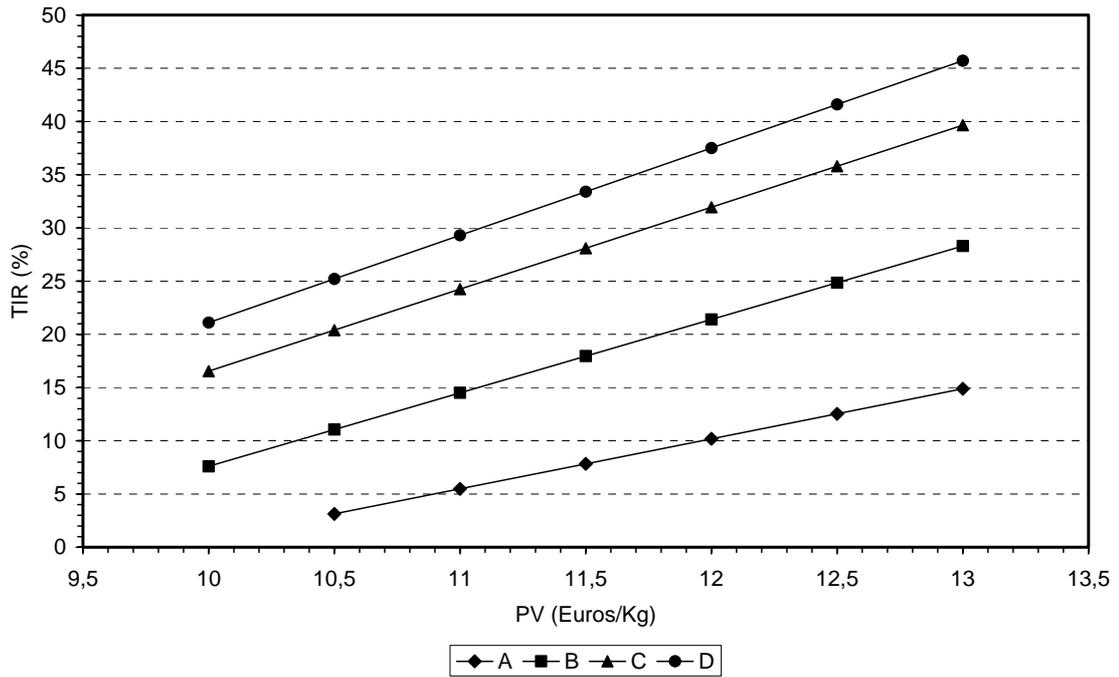


Figura 5.12. Variación de la TIR en función del tipo de explotación y el precio de venta.

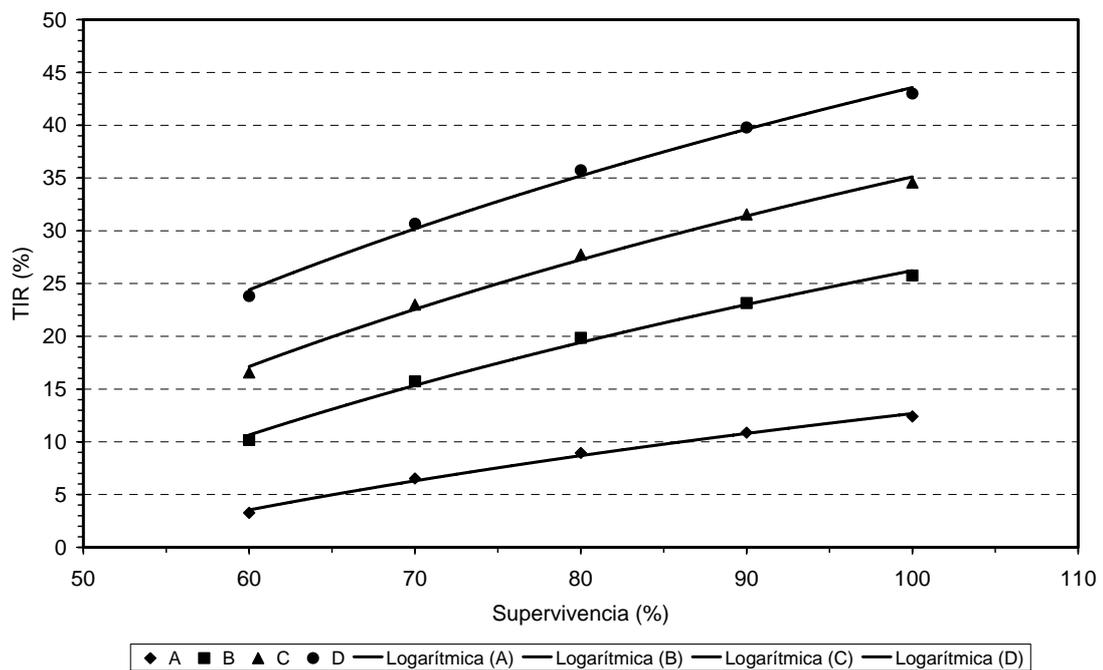


Figura 5.13. Variación de la TIR en función del tipo de explotación y la supervivencia.

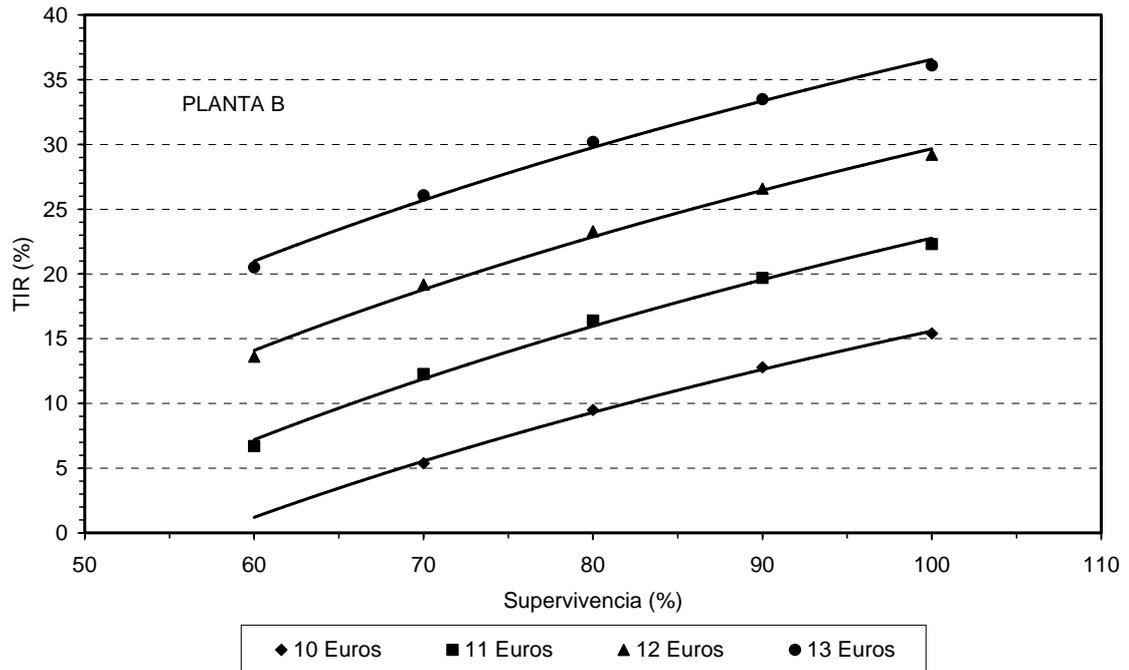


Figura 5.14. Influencia del precio de venta y la supervivencia sobre la TIR en la Planta-B (20 Kg/m²).

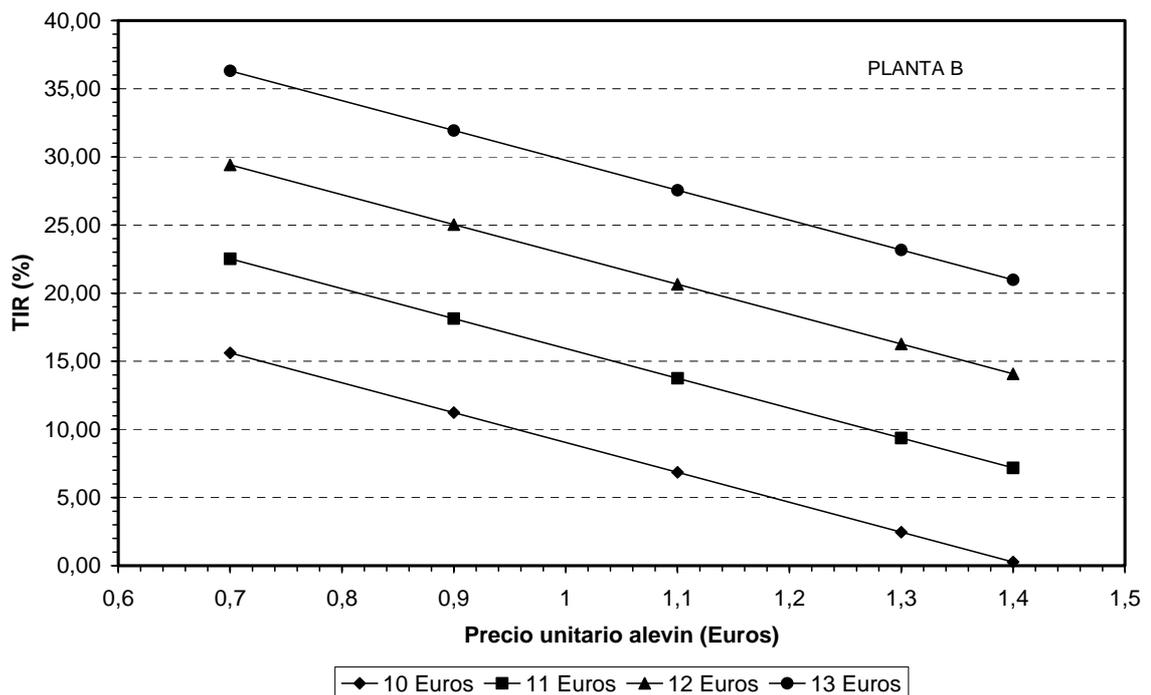


Figura 5.15. Influencia del precio de venta y el precio unitario del alevín sobre la TIR en la Planta-B (20 Kg/m²).

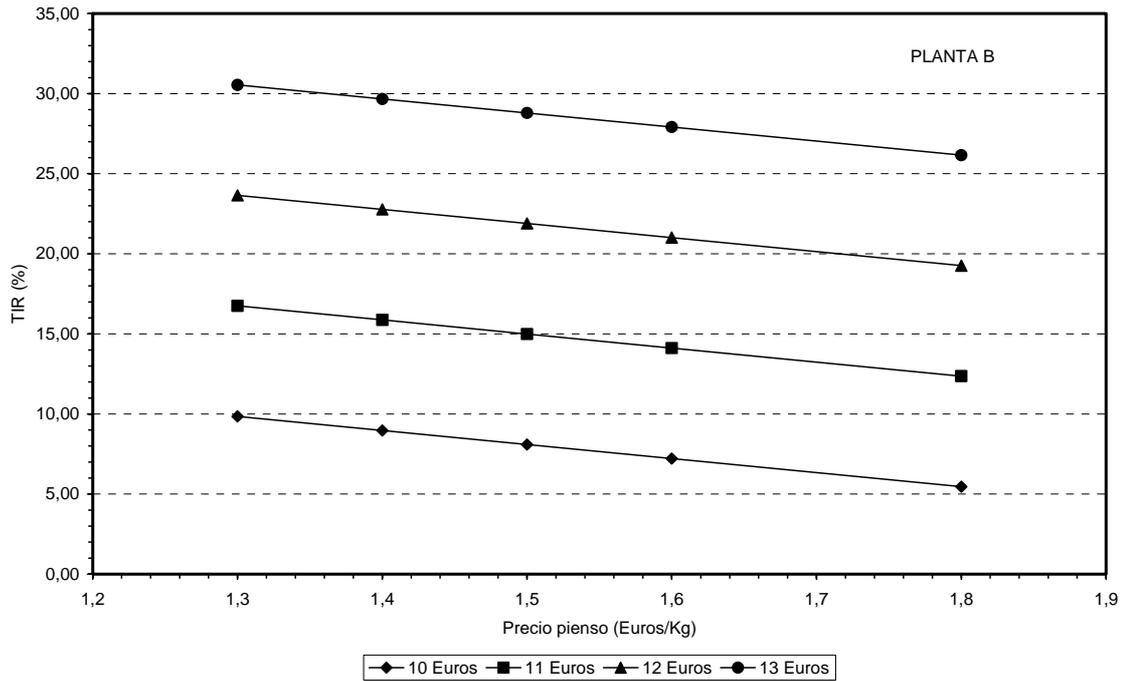


Figura 5.16. Influencia del precio de venta y el precio del Kg de pienso sobre la TIR en la Planta-B (20 Kg/m²).

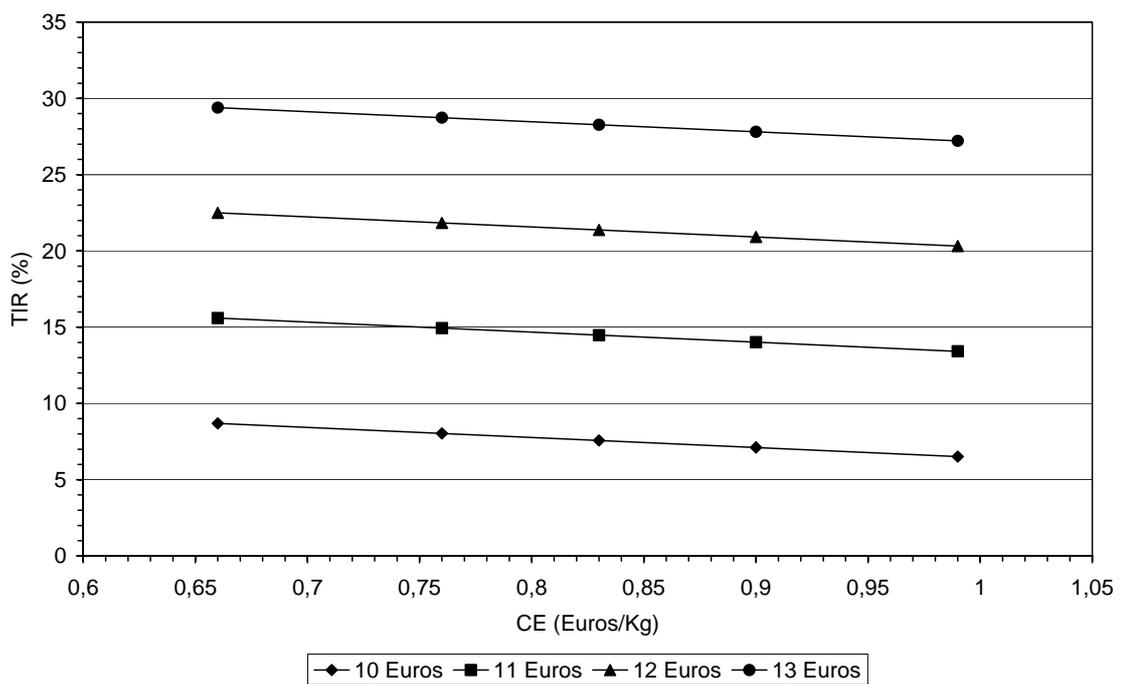


Figura 5.17. Influencia del Precio de venta y los costes energéticos y de suministro de oxígeno (CE: Euros/Kg) sobre la TIR en la Planta-B (20 Kg/m²).

CONCLUSIONES

Línea 1. Reproducción en cautividad de *Solea senegalensis*.

Los reproductores salvajes de *Solea senegalensis* se adaptaron bien a la cautividad, bajo las condiciones establecidas para los centros implicados. Solo puntualmente se encontraron casos de inadecuada adaptación en ejemplares procedentes de lugares diferentes. Las puestas bajo condiciones naturales de temperatura, se produjeron durante un amplio periodo de tiempo, de 60 a 160 días al año, normalmente coincidiendo con oscilaciones de este parámetro.

La mayoría de los resultados de fecundidad diaria del lenguado en el CIFPA “El Toruño” oscilaron entre 10000 y 60000 huevos por kg de hembra. La fecundidad anual bajo condiciones naturales de temperatura fue de $1,3^{06}$ a $1,6^{06}$ huevos por kg de hembra. Cuando la temperatura se mantuvo estable a lo largo del año, solo se detectaron 16 puestas en el ciclo anual, y la fecundidad descendió a $0,2^{06}$ huevos por kg. La simulación de un régimen térmico variable, similar al descrito para El Toruño, en las instalaciones del IEO de Santander, permitió conseguir frecuentes puestas de los reproductores. Ello demuestra la capacidad para reproducir esta especie en cualquier punto de la geografía española que tenga la posibilidad técnica de regular la temperatura, de acuerdo al patrón descrito en este informe.

La fertilización de los huevos presentó un valor medio de $54\% \pm 19$, mientras que la eclosión media fue de $64\% \pm 24$. La baja tasa de fertilización puede ser debida a la escasa cantidad de esperma producida por los machos. Los estudios realizados sobre caracterización del esperma sugieren la necesidad de una relación macho/hembra mayor a la habitual con otras especies, probablemente superior a 2:1. La movilidad del esperma tras su activación es alta y su duración (50% de espermatozoides móviles) es de 1 min.

Para la manipulación de los reproductores es beneficioso el uso de un anestésico como el aceite de clavo (40 ppm), que permite una excelente recuperación de los ejemplares. Son necesarios tratamientos profilácticos preventivos sobre todo en época estival cuando las temperaturas son elevadas y hay un riesgo de infecciones.

De los reproductores F1, procedentes de individuos criados en cautividad, disponibles en los diferentes Centros de Investigación, solo los mantenidos en El Toruño produjeron puestas naturales. La frecuencia de puestas, la fecundidad, fertilización y eclosión fueron inferiores en este caso. Sin embargo, el hecho de ser peces de menor talla, y realizando su primera puesta, recomienda esperar a resultados de próximos años en varias instalaciones para poder comparar con fiabilidad la eficiencia de la reproducción en cautividad de peces salvajes frente a peces F1.

El tratamiento hormonal con LH-RH en machos parece indicar un pequeño aumento del volumen de esperma, aunque no todos los resultados experimentales condujeron a ello. Es por tanto necesario aumentar el número de ejemplares y el tiempo de observación del este tratamiento. Este tratamiento hormonal favoreció el desove en hembras, pero no la respuesta de los machos en tanques comunitarios, llevando en todos los casos a la obtención de huevos sin fecundar.

La nula respuesta de los machos se produjo a pesar de detectar un aumento de los niveles de testosterona con posterioridad a la inyección. Se detectaron anomalías morfológicas en los espermatozoides procedentes de machos tratados con LH-RH. Similares resultados fueron obtenidos cuando la hormona fue dispensada mediante implantes de liberación lenta.

Se puso a punto una metodología para la crioconservación del esperma. Sin embargo, todavía es necesario crioconservar más muestras y realizar fecundaciones artificiales para comprobar la viabilidad del esperma descongelado.

Línea 2. Optimización y unificación de los métodos para el cultivo larvario. Producción de alevinaje para experimentación.

La cría larvaria del lenguado hasta completar la metamorfosis resultó un proceso fácil y asequible para todas las instalaciones, cumpliendo unos requisitos mínimos para este tipo de cultivo. Los resultados indicaron supervivencias del 90% para cultivos masivos en esta etapa con los protocolos basados en co-alimentación con dietas inertes y el alimento convencional con rotíferos y microalgas, y Artemia.

La co-alimentación vivo-inerte fue muy positiva incluso para el desarrollo posterior de los alevines. Sin embargo, niveles altos de sustitución del alimento vivo por alimento inerte durante la etapa larvaria, produjeron resultados de crecimiento y supervivencia inferiores a los conseguidos con otras larvas de peces marinos sometidas a regímenes similares de alimentación.

Las primeras fases larvarias presentan un ritmo diario de alimentación, en el que cesan de alimentarse durante algunas horas de la noche, incluso si la iluminación se mantiene permanentemente. Ante este hallazgo, el protocolo general de cultivo fue modificado, estableciendo una fotofase de 16 horas. En algunos casos, a partir de los días 12-16, la supresión de la iluminación no parece tener efecto sobre la supervivencia y crecimiento.

La ración diaria de alimento ingerido por las larvas en cultivo masivo, medida como porcentaje de alimento ingerido, en relación a la biomasa seca de las larvas, presenta un máximo, en torno al 100%, previamente a la metamorfosis, siendo el valor medio para este periodo del 75%. Durante la metamorfosis, la ración diaria desciende a una media del 36%.

Diferentes niveles de DHA, esencial para las especies marinas, produjeron similares resultados de crecimiento y supervivencia en larvas de lenguado. Se sugiere por lo tanto un bajo requerimiento para este ácido graso en larvas de lenguado.

Un exceso de ácido araquidónico en la dieta larvaria indujo una mayor incidencia de falta de pigmentación cutánea en los alevines de lenguado. En estos se observó además presencia de hepatocitos hinchados, con distinto grado de degeneración.

Línea 3. Desarrollo de métodos para el tránsito de alimento vivo a inerte, e influencia de factores de cultivo sobre el crecimiento de alevines durante y después del destete.

Trabajando en cultivo masivo, a densidades iniciales de hasta 5000 alevines de 21 días por m², se han conseguido supervivencias del 75% de juveniles destetados con alimento inerte, y pesos finales de 1,5 g a los 90 días de edad. No obstante, estos resultados

dependieron en su inmensa mayoría de la utilización de una única marca de pienso comercial, y presentaron una elevada variabilidad según la instalación donde se llevaron a cabo los cultivos. Ello fue debido probablemente a la influencia de factores de manejo y condiciones de cultivo, difícilmente unificables entre instalaciones (calidad del agua, el stress de las larvas etc). La experiencia apunta a la necesidad de aplicar tratamientos profilácticos preventivos periódicos durante el destete, a fin de reducir la mortalidad por infección en esta etapa.

Los estudios realizados sobre el efecto de la densidad e iluminación durante el destete indican que el crecimiento es mayor en oscuridad, y que con densidades altas e utilizando dos tipos de tanques con diferente superficie, el crecimiento era menor en tanques con mayor superficie, sin embargo la supervivencia fue mayor.

Los estudios realizados comparando diferentes piensos comerciales durante el destete apuntan a que el mayor crecimiento y supervivencia se obtiene con Gemma y Aglonorse, sin embargo la utilización de este último no mantiene una buena calidad del medio. El uso de Microbaq no ha sido concluyente, sin embargo con Proton/ NRD siempre el crecimiento ha sido inferior.

Línea 4. Cultivo de juveniles en estanques de tierra.

Los alevines de lenguado pre-engordados de manera extensiva en estanques de tierra presentan un crecimiento superior al de los peces criados intensivamente, alcanzando pesos de 15 gramos en 140 días de cultivo, para una edad de 200 días.

La productividad bentónica natural de los estanques puede llegar a sostener una producción de 3,5 juveniles por m² durante sin aporte alguno de alimento adicional, hasta un tamaño delimitado por la llegada de condiciones ambientales desfavorables en el invierno.

El rendimiento máximo para la producción extensiva de juveniles de lenguado se sitúa en torno a 0,27 g m² d⁻¹.

Línea 5. Cultivo intensivo de juveniles.

La dieta comercial Europa 22 ha resultado ventajosa en el crecimiento ($g=0,283$), supervivencia (92,6%) y en la composición del músculo (82,7% proteínas: 8,1% lípidos totales y 4,9 % carbohidratos sobre peso seco). En el análisis histológico de los ejemplares alimentados con esta dieta se ha observado que la grasa se almacena entre la piel y el músculo. En el engorde con los piensos Gemma y Microbaq, las tasas de crecimiento son similares, sin embargo los índices de conversión parecen ser mejores con Microbaq, así como la supervivencia.

La incorporación de probióticos en pienso de preengorde y engorde mejora el crecimiento y la vitalidad de los alevines a temperaturas superiores a 17°C.

Los resultados de engorde intensivo de lenguado registrados en Galicia, sugieren que esta actividad acuícola puede ser rentable bajo las condiciones existentes en esta Comunidad.

El engorde de lenguado en tierra utilizando agua de pozo con temperatura constante a lo largo de todo el año (19-20°C), podría ser una actividad rentable en el Mediterráneo, aunque obviamente estaría muy limitada por las extensiones de terrenos necesarias y en las

que, además, exista la posibilidad de bombeo de agua de mar de pozo con una calidad adecuada. No obstante, para que ello pudiera ser, la carga de cultivo final tiene que ser superior a 20 Kg/m², la supervivencia superior al 80%, y el precio de venta superior a los 11 euros/kg. Los costos de producción deben optimizarse para hacer frente a descensos del precio de venta.

Una explotación con carga final de 10Kg/m² no es económicamente rentable, ni con precios de venta de 13 Euros y supervivencia del 100%. Una explotación con carga final de 20 Kg/m² sería rentable económicamente pero tendría una gran dependencia de las variaciones del precio de venta. La supervivencia al final del proceso de preengorde y engorde debe ser superior al 80%, pero para que exista una rentabilidad el precio de venta no puede descender de los 11 euros. Si el precio de venta fuera superior a 12 euros se podrían asumir supervivencias del 70%. Si el precio de venta desciende a 10-11 Euros el precio del alevín tendría que optimizarse a precios unitarios (IVA incluido) de 0,7-0,9 euros y el del pienso a 1.3-1.4 euros/Kg, o también mejorar el IC.

Explotaciones con cargas finales de 30 y 40 Kg/m² son de alta rentabilidad y parecen situaciones demasiado optimistas. No se deberían considerar en tanto no existan trabajos muy sólidos que indiquen que se pueden alcanzar estas cargas finales sin disminuciones significativas del crecimiento y con una supervivencia en todo el ciclo superior al 70-80%.

VALORACION

Una de los resultados de este proyecto que se valora más positivamente ha sido el establecimiento de un nuevo grupo de trabajo, de nivel nacional en acuicultura marina. En este grupo existe una excelente comunicación e intercambio de conocimientos y medios entre los diferentes investigadores implicados en la ejecución del proyecto. Sería muy interesante fomentar la continuidad de este grupo, considerando incluso posibles nuevas incorporaciones al mismo.

La consecución de un procedimiento normalizado para la producción de alevines de lenguado en criadero, de acuerdo a la utilización de técnicas y alimentos convencionales, es un logro importante del proyecto. La mejora de este procedimiento deberá prioritariamente centrarse en conseguir un avance de la edad de destete, además de encontrar nuevas dietas inertes más económicas. Otras acciones relacionadas con el cultivo larvario y postlarvario del lenguado estarían relacionadas con la influencia de factores externos, el desarrollo y la nutrición, y representan un segundo nivel de mejora sobre el procedimiento ya establecido.

La reproducción en cautividad del lenguado se produjo mayoritariamente en el centro de “El Toruño”, en Cádiz. Sin embargo, el hecho de que los reproductores aclimatados en Santander comenzaran a efectuar puestas, resulta especialmente alentador de cara a una consecución generalizada de métodos para la puesta de esta especie en buena parte de la geografía nacional. El desarrollo de este proyecto ha permitido por ejemplo, establecer el cultivo del lenguado como alternativa al del rodaballo y besugo en el Cantábrico, zona geográfica con condiciones diferentes a las habituales para dicha especie.

Han sido muchos los esfuerzos dedicados para todos los componentes del grupo de trabajo para la captura, transporte y aclimatación de ejemplares salvajes de *Solea senegalensis* que pudieran ser empleados como reproductores. En algunos casos, estos esfuerzos no se han

visto acompañados de éxito debido a las pérdidas de individuos debidas a fenómenos patológicos, y se produjeron de manera selectiva, especialmente en aquellos peces cuya procedencia fue de un lugar distante, siendo la incidencia casi nula entre los ejemplares locales. En otros casos, la mortalidad de reproductores fue asociada con la contaminación por vertidos de hidrocarburos al agua (caso de Galicia). Ha sido necesario, en ocasiones, acudir en algunos lugares a la captura de ejemplares locales, los cuales parece ser se adaptan mejor a las condiciones de cautividad.

Los primeros resultados de crecimiento obtenidos en el engorde del lenguado son muy interesantes, ya que demuestran la buena aptitud de esta especie para este proceso. Ello, a pesar de no disponer todavía de un pienso específico en el mercado para esta especie. Es probable que, con el desarrollo de las líneas de investigación sobre alimentación y nutrición en el lenguado, se avance notablemente en esta dirección. Otros aspectos, relacionados con las condiciones de estabulación, permitirán definir el régimen de cultivo mas adecuado para la producción intensiva del lenguado. De especial importancia ha sido encontrar el óptimo de temperatura para *Solea senegalensis*. Este valor, situado entre 20 y 21°C, puede condicionar la aptitud para producir esta especie en aguas con temperaturas que sobrepasen en exceso dichos valores. Esta circunstancia viene corroborada por numerosos casos de mortalidad, tanto de juveniles como de reproductores, asociados con temperaturas superiores a 24°C. En todos los casos la mortalidad fue atribuida a fenómenos patológicos de carácter oportunista, cuya velocidad se dispara conforme lo hace la temperatura y los animales se debilitan. No obstante, han existido algunos casos, aunque pocos, en los que los lenguados pudieron ser cultivados con temperaturas elevadas sin que sufrieran patologías.

Dado que las enfermedades de carácter oportunista representan una seria amenaza, y se detecta una cierta variabilidad intrapoblacional en la respuesta a condiciones adversas de cultivo, es evidente que el desarrollo inmediato de nuevas líneas de investigación deberá encaminarse en las áreas de profilaxis, prevención y tratamiento de enfermedades, así como en el área de selección genética de estirpes resistentes. Esto, unido a la demora que se ha producido en los trabajos destinados a controlar la reproducción en cautividad del lenguado, son argumentos que justificarían la continuidad de los trabajos llevados a cabo hasta el presente, con nuevas actuaciones más específicas.

DIFUSION

miembros de la comisión técnica. Se valora también muy positivamente la difusión dada al proyecto por tres miembros de esta comisión (Cerdá, Peleteiro y Cañavate), quienes presentaron y discutieron sus trabajos relacionados con el cultivo del lenguado en el segundo “workshop” europeo sobre el cultivo de lenguados, celebrado en Octubre de 2003 en el CIFPA “El Toruño”. En esta reunión científico-técnica participaron un total de 30 especialistas de centros de investigación y centros de producción de siete países europeos.

Publicaciones resultado del proyecto (J. Cerdá)

Agulleiro M, Anguis V, Cañavate JP, Martínez G, Mylonas CC, Cerdà J. Spawning induction of Senegal sole (*Solea senegalensis*) through delivery of GnRH α and its effects on gamete quality (en preparación).

Agulleiro M, Andre M, Babin P, Cerdà J. Molecular characterization and expression pattern of the vitellogenin receptor in the flatfish, *Solea senegalensis* (en preparación).

Publicaciones resultado del proyecto (A. Estevez)

Villalta, M. y Estévez, A. Culture of Senegal sole larvae without the need for rotifers.

Aquaculture International (aceptada, en prensa)

Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P. (2005) Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. Aquaculture 245: 193-209

Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P., Bell, J.G. The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the Artemia feeding period. Aquaculture (en revisión)

Presentaciones a Congresos

Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P. (2004) Arachidonic acid enriched live prey induce albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*). 11th International Symposium on Nutrition and Feeding in Fish. Phuket (Tailandia) 2-7 Mayo 2004.

Estévez, A. (2004) Feeding with Arachidonic acid-enriched live prey induce albinism in flatfish larvae. Aquaculture Europe '04. Barcelona 20-23 Octubre 2004

Olmedo, M., J.B. Peleteiro, R.M. Cal & F. Linares. Crecimiento de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*, K.) en Galicia. IX Congreso Nacional de Acuicultura. Libro de resúmenes p.p.383-386, 2003.

DIFUSIÓN

Los datos obtenidos sobre el Plan Nacional de Cultivo del Lenguado se han difundido en diversos ámbitos:

1. Jornadas sobre transferencia de Tecnología en el cultivo de lenguado celebrada en CICEM El Toruño, 5-6 Noviembre 2002.

2. IX Congreso Nacional de Acuicultura celebrado en Cádiz del 12-16/05/2003 donde se han presentado dos posters:

-Experiencias de destete de *Solea senegalensis* en el Cantábrico. Chereguini O., Diez J. En: Resúmenes IX Congreso Nacional de Acuicultura, 423.

-Primeros resultados del Cultivo larvario de *Solea senegalensis* Kaup 1958 en el Cantábrico. Chereguini O., Diez J., De la Hera M. En: Resúmenes IX Congreso Nacional de Acuicultura, 433.

3. Aquaculture Europe 2004, celebrado en Barcelona 20-23 octubre donde se ha presentado un poster:

-Ongrowing of Senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup 1958) juveniles using different commercial diets in Cantabria (Northern Spain). Chereguini O., Diez J., García de la Banda I., Sola E. En: European Aquaculture Society special publication nº 34, 229.

4. Congreso Mundial de Acuicultura que se celebrará en Bali 9-13 mayo 2005 donde se han presentado dos posters:

-Effect of different feeding regimes on Senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup 1958) larval culture in Cantabria (Northern Spain). Chereguini O., García de la Banda I., Diez J., Lobo C., Linares F.

-Ongrowing of Senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup 1958) fries using two different commercial diets in Cantabria (Northern Spain). García de la Banda I., Chereguini O., Lobo C., Diez J., Linares F., Arce R.

5. Preparación de artículo “ First results of rearing *Solea senegalensis* (Kaup 1958) larvae in Cantabria (Northern Spain). Chereguini O., Diez J. & De la Hera M., para publicar como Informe Técnico del Instituto Español de Oceanografía

García García, B. Aproximación al establecimiento de modelos lineales de interés en el preengorde de lenguado (*Solea senegalensis*). IX CONGRESO NACIONAL DE ACUICULTURA. Cádiz 12 al 16 de Mayo de 2003.

García García, B., Gómez, E. and Hernández, M.D. Effect of temperature on metabolic rate in *Solea senegalensis*: estimate of optimum physiological temperature. AQUACULTURE EUROPE 2004. Barcelona, 20 al 23 de octubre de 2004.

Hernández, M.D. and García García, B. Differences in muscle fatty acid composition between reared and wild senegalensis sole (*Solea senegalensis*). Barcelona, 20 al 23 de octubre de 2004.

Al próximo Congreso Nacional de Acuicultura que se celebrará en Valencia se presentará la comunicación:

“Viabilidad del engorde del lenguado en el Mediterráneo: aspectos biológicos y económicos”.

BIBLIOGRAFIA

- Arias, A.M., Drake, P., 1990. Estados juveniles de la ictiofauna en los caños de las salinas de la Bahía de Cádiz. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Cádiz, Spain.
- Bromage, N., Porter, M., Randall, C., 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 197, 63-98.
- Anguis V, Cañavate JP. (2005). Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* 243:133– 145.
- Berlinsky DL, King WV, Smith TIJ, Hamilton RD, Holloway JJr, Sullivan CV. (1996). Induced ovulation of Southern flounder *Paralichthys lethostigma* using gonadotropin releasing hormone analogue implants. *J. World Aqua. Soc.* 27:143-152.
- Berlinsky DL, William K, Hodson RG, Sullivan CV. (1997). Hormone induced spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus*. *J. World Aqua. Soc.* 28:79-86.

- Cañavate, J.P., Fernández-Díaz, C., 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture* 174, 255-263.
- Chereguini, O., Diez, J., García de la Banda, I., Sola, E. 2004. Ongrowing of senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup 1958) juveniles using different commercial diets in Cantabria (Northern Spain). *Aquaculture Europe '04. EAS, Special Publication n° 34*, pp, 229-230.
- Dinis MT, Ribeiro L, Soares F, Sarasquete C. (1999). A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* 176,:27-38.
- García García, B., Gómez, E., Cerezo, J., Hernández, M.D., 2004. Effect of body weight and temperature on metabolic rate in *Solea senegalensis*: estimate of optimum physiological temperature. *Aquaculture Europe '04. EAS, Special Publication n° 34*, pp, 362-363.
- Imstrand AK, Foss A, Conceição LEC, Dinis MT, Delbare D, Schram E, Kamstra A, Rema P, White P. (2003). A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Rev. Fish Biol. Fish.* 13:379-407.
- Kobayashi M, Morita T, Ikeguchi K, Yoshizaki G, Suzuki T, Watabe S. (2003). Production of recombinant goldfish gonadotropins by baculovirus in silkworm larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 28:469-471.
- Mylonas CC, Zohar Y. (2001). Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 10:463-491.
- Rodríguez, J.L., Souto, B.F., 2003. Engorde del lenguado senegales (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) en Galicia con temperatura controlada. *Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura*, Mayo 2003. Junta de Andalucía, Cádiz, Spain, pp. 407-409.
- Schneider WJ. (1996). Vitellogenin receptors: oocyte-specific members of the low-density lipoprotein receptor supergene family. *Int Rev Cytol.* 166:103-37.
- Wallace RA, Opresko L, Wiley HS, Selman K. (1983). The oocyte as an endocytic cell. *Ciba Found Symp.* 98:228-48.
- Zohar Y, Mylonas CC. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197: 99-136.