



INIDEP

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN
Y DESARROLLO PESQUERO

INFORME DE ASESORAMIENTO Y TRANSFERENCIA

Número	Páginas	Fecha de aprobación
115	08	30 de Diciembre de 2020
Dirección		
DIRECCIÓN DE INFORMACIÓN, OPERACIÓN Y TECNOLOGÍA		
Programa / Gabinete		
Maricultura		
Actividad		
MARI. 8		

MICROALGAS UTILIZADAS EN LA LARVICULTURA DE LENGUADO *Paralichthys orbignyanus*. AÑO 2020

El uso de microalgas en el cultivo larval de peces marinos, también llamado “agua verde o green water” ha sido descrito en general como beneficioso y estabilizador del sistema, debido sus efectos nutricionales. El agregado de microalgas dentro del tanque de larvicultura otorga también nutrientes a los rotíferos, copépodos y artemias que se proveen como alimento para larvas. En el laboratorio de microalgas del Programa Maricultura (MARI) del INIDEP, se realiza el cultivo masivo de *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis sp*, las cuales poseen ácidos grasos poliinsaturados beneficiosos para las larvas de peces marinos, otorgando una fuente indirecta de nutrientes a través de presas vivas. El agua verde mejora el contraste visual y la dispersión de la luz, estabiliza la calidad de agua en sistemas estáticos, remueve metabolitos y produce O₂. Los volúmenes y concentración de las microalgas *Nannochloropsis sp* e *Isochrysis galbana* utilizadas durante la larvicultura de *Paralichthys orbignyanus* correspondiente al año 2020 fueron 1727 litros totales a concentraciones promedio de 27,7x10⁶ cel/ml para *N. gaditana* y 8,8x10⁶ cel/ml para *I. galbana*.

Citar Indicando la fuente. El contenido no debe ser reproducido total o parcialmente sin la expresa conformidad del INIDEP

SOLICITADO POR	Institución	Cargo

PREPARADO POR

Firma:

Nombre: GORRINI BÁRBARA

Firma:

Nombre: MENGUEZ, PEDRO

APROBADO POR

MARIELA RADONIC
Jefe de Programa / Gabinete

Director de área

Dra. CLAUDIA RAQUEL CAROZZA
DIRECTOR NACIONAL DE INVESTIGACIÓN
INIDEP

Director del INIDEP



MICROALGAS UTILIZADAS EN LA LARVICULTURA DE LENGUADO *Paralichthys orbignyanus*. Año 2020

Gorriti Goroso Bárbara y Menguez Pedro

Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero

Introducción

El uso de microalgas en el cultivo larval de peces marinos, también llamado “agua verde o green water” ha sido descrito en general como beneficioso y estabilizador del sistema, debido a sus efectos nutricionales (Howell, 1979; Nass *et al.*, 1992; Reitan *et al.*, 1993). El agregado de microalgas dentro del tanque de larvicultura otorga también nutrientes a los rotíferos, copépodos y artemias que se proveen como alimento para larvas. Los rotíferos son el primer alimento en cautiverio para las larvas de peces marinos, ya que son el “vehículo” para suministrar algas, antibióticos, probióticos, y ácidos grasos altamente insaturados esenciales para el normal desarrollo de los primeros estadios larvales (Radonic *et al.*, 2008). Los rotíferos retenidos en los tanques de cultivo con presencia de microalgas tienden a mantener o modificar su calidad nutricional y el perfil de ácidos grasos. Cabe aclarar que los rotíferos en tanques con agua clara bajan los niveles proteicos y pierden diariamente entre 9 y 20% de su contenido lipídico original, disminuyendo los niveles de (n-3) HUFA y los valores de la relación DHA/EPA a razón de 7% por día. (Reitan *et al.*, 1993; Oie *et al.*, 1997).

En el laboratorio de microalgas del Programa Maricultura (MARI) del INIDEP, se realiza el cultivo masivo de *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis sp.*, las cuales poseen ácidos grasos poliinsaturados beneficiosos para las larvas de peces marinos, otorgando una fuente indirecta de nutrientes a través de presas vivas como rotíferos, copépodos y artemias. Las algas aumentan la tasa de ingesta de las larvas de peces marinos, mejorando el contraste visual y la dispersión de la luz en el tanque de cultivo. Así mismo, el “agua verde” estabiliza la calidad del agua en sistemas estáticos, remueve metabolitos y produce O₂.

Gracias a los diferentes ensayos y experiencias que se han realizado con el correr de los años en la Estación Experimental de Maricultura (EEM) perteneciente al programa MARI, las microalgas previamente mencionadas se utilizan como alimento iniciador en las larviculturas de especies marinas cultivadas en el INIDEP, como son *Paralichthys orbignyanus*, *Polyprion americanus*, *Pragus pragus*, *Seriola lalandi* (Radonic *et al.*, 2018; Aristizabal, 2006; López *et al.*, 2013). En este informe se detalla el volumen y concentración de microalgas utilizadas en la larvicultura de lenguado, *Paralichthys orbignyanus*, realizada en el mes de febrero del 2020.

Materiales y Métodos

Durante los meses de enero y febrero se realizaron cultivos masivos de *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis gaditana*, *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis sp.* provenientes de cultivo en el cepario de microalgas, (Gorriti *et al.*, 2020) para su utilización en la larvicultura de lenguado en la EEM.

Los pasos de producción por escalonamiento del cultivo de microalgas se efectuaron siguiendo los protocolos establecidos por (Gorriti *et al.*, 2019), desde fase iniciadora a fase masiva. Durante las primeras etapas de crecimiento, la desinfección del laboratorio fue constante para disminuir cualquier agente externo a los mismos. Los parámetros fueron estrictamente controlados: fotoperiodo continuo de 24 horas de luz; temperatura dentro del laboratorio seteada a 19°C, aireación artificial en los cultivos, pH de algas a 8,5 y salinidad a 28. Las microalgas *N. oculata* y

Tetraselmis sp. fueron inoculadas tanto en bolsas de polipropileno (50 litros) como en tanques de policarbonato (30 – 50 litros), siguiendo el protocolo de cultivo de microalgas en bolsas de polipropileno y protocolo diario para el cultivo masivo de microalgas dentro del laboratorio (Gorriti, *et al.*, 2019). En el caso de *Nannochloropsis gaditana*, una vez que los cultivos en bolsas alcanzaron la fase exponencial con concentraciones de 30×10^6 células/ml, se cosecharon y se utilizaron como inóculos de cultivo masivo en cilindros de policarbonato ubicados en la terraza exterior de la EEM.

Cultivo exterior de *Nannochloropsis gaditana*

Los cilindros transparentes se ubicaron en la terraza de la EEM (Figura 1), teniendo en cuenta las horas de mayor incidencia de luz solar y aprovechando la luz de la mañana y sombra por la tarde. El fotoperíodo fue de 8 horas de luz y 16 horas de sombra aproximadamente. El rango de temperatura registrado para los cultivos osciló entre 25-28 °C. La boca de los cilindros estuvo tapada para disminuir la contaminación por otras especies de microalgas, protozoos y biofilm no deseados. La aireación de los cultivos permitió que las células obtuvieran el oxígeno necesario, ayudó a la movilidad celular, y aseguró la absorción homogénea de los rayos lumínicos por las células microalgales, realizando exitosamente la fotosíntesis. Los cilindros a utilizar fueron previamente desinfectados con agua e hipoclorito de sodio 5 ppm. Previamente, fueron enjuagados con abundante agua dulce y secados durante 24 horas para eliminar cualquier residuo de cloro. Una vez limpios, se procedió al llenado con agua de mar desinfectada a un volumen de 60 litros (Gorriti *et al.*, 2019); luego, se añadió 1ml/l de medio de cultivo Conway.

Mediante una cámara de Neubauer se procedió a observar la concentración, presencia y/o ausencia de protozoos en los inóculos de las distintas especies de microalgas del Laboratorio de Microalgas de la EEM. La microalga *N. gaditana* se cultivó primero en el laboratorio y luego se sembró en recipientes de 60 litros. Al encontrarse el cultivo en fase exponencial, a concentraciones de $30\text{-}35 \times 10^6$ cél/ml, las microalgas fueron inoculadas en los cilindros exteriores mediante una bomba sumergible Iwaki 100 v de 270 watts con manguera cristal de ½ pulgada. Se tomó el recaudo de verter lentamente el cultivo por el borde del cilindro y así disminuir el riesgo de ruptura celular. Estas maniobras se realizaron en horas de la tarde para evitar tanto el shock lumínico como el térmico. Las concentraciones iniciales de los mismos oscilaron entre $15\text{-}17 \times 10^6$ células/ml. Cada cilindro se rotuló con el nombre de la especie cultivada (*N. gaditana*) y el día en el que se agregó medio de cultivo. Cada tres días se agregaron 20 litros de agua de mar desinfectada, hasta alcanzar volúmenes de 180 litros y concentraciones de $25\text{-}30 \times 10^6$ células/ml. Una vez alcanzada la fase exponencial se procedió a cosechar el volumen necesario de algas tanto para rotíferos como para agregar al tanque de larvas de lenguado de acuerdo al método “green water”.



Figura 1. Cultivo exterior de *N. gaditana* en cilindros en la Estación Experimental de Maricultura del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero.

Cosecha de microalgas



A primera hora de la mañana se realizó el conteo y registro de parámetros del cilindro de microalgas que se debía cosechar para luego utilizar como alimento vivo. En el caso de que las microalgas no se encontrasen en perfecto estado de crecimiento, es decir, que hubiera exceso de protozoos, contaminación por biofilm, o baja concentración por muerte celular, el cultivo fue desechado, y solo las microalgas en perfectas condiciones de cultivo fueron las seleccionadas para utilizar en la larvicultura de lenguado.

Diariamente se cosecharon las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis sp.* (Figura 2 y 3) mediante mangueras desinfectadas en caso de cultivo en bolsas, o mediante la canilla de los tanques y cilindros. La cosecha fue filtrada por mallas de 20 micrones para disminuir el riesgo de contaminación posterior en tanques de larvas y rotíferos por presencia de protozoos o suciedad. Las algas fueron cosechadas en baldes de 10 litros para facilitar su manipulación. La concentración, estado de las microalgas y volumen cosechado se anotó en una planilla diaria para llevar el seguimiento de la cantidad de microalgas destinadas a la larvicultura de lenguado y a la producción masiva de rotíferos.

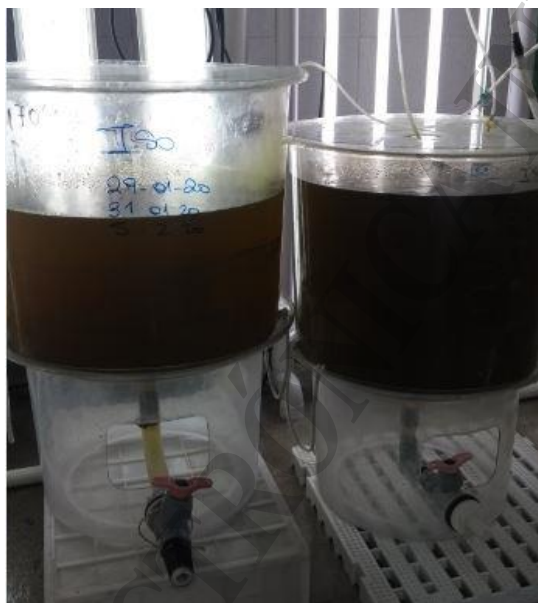


Figura 2. Tanques de 50 litros para cultivo y cosecha de *I. galbana* en el Laboratorio de Microalgas de la Estación Experimental de Maricultura, Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero.



Figura 3. Bolsas para cultivo y cosecha de *Nannochloropsis sp.* en el Laboratorio de Microalgas de la Estación Experimental de Maricultura, Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero.

Diariamente se cosechó en fase exponencial el volumen de algas necesario tanto para la alimentación de rotíferos, como para “agua verde” de la larvicultura de lenguado *P. orbignyanus*.

Se ha implementado con éxito para la producción masiva de rotíferos en el INIDEP (Müller, 2002; Müller *et al.*, 2003; Oka *et al.*, 2003), el método ideado por JASDA (Japan Sea Farming Association) (Kuwasa, 2000). El método consiste en agregar alimento (microalgas a 10×10^6 cel/ml) al tanque de cultivo de rotíferos en forma lenta y continua, lo cual permite mantener el cultivo madre en condiciones estables por períodos prolongados y disminuir el laboreo diario (Radonic *et al.*, 2018). En el caso de la adición de algas al sistema de rotíferos, se procedió a incorporar las mismas por goteo en el tanque de 100 litros (Figura 4). Se adicionaron luces *led* para mantener las microalgas vivas,

Las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis sp* fueron utilizadas como fuente de alimento para el mantenimiento de los rotíferos dentro del tanque de 1000 l donde se encontraban las larvas de lenguado. Las mismas se cosecharon en baldes de 10 litros e incorporadas lentamente por goteo al tanque de larvicultura (Figura 5).



Figura 4. Microalgas en sistema de rotíferos. Estación Experimental de Maricultura, Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero.



Figura 5. Microalgas en tanque de larvas de lenguado. Estación Experimental de Maricultura, Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero.

Resultados

En las Tabla 1, 2, 3 se indican los valores y parámetros de microalgas utilizadas para el sistema continuo de rotíferos y sistema de agua verde, destinadas a la larvicultura de *Paralichthys orbignyanus* 2020, las cuales provinieron de cultivos limpios, sin adición de medio de cultivo ni presencia de protozoos.

Cabe destacar que la utilización de microalgas como "agua verde" en el cultivo de larvas de peces marinos, mejora la calidad del agua mediante la remoción de productos metabólicos y produce oxígeno, la modificación lumínica del medio permitiría una mejor detección de la presa por



parte de las larvas, además de mejorar la calidad nutricional de las presas (Silva, 1999; Rocha *et al.*, 2008).

Tabla 1. Volúmenes totales de microalgas utilizadas entre los meses de enero a marzo del 2020 para sistema de cultivo de rotíferos. Estación Experimental de Maricultura, Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero.

Microalgas	Volumen (litros)	Promedio celular (cél/ml)	Promedio Temperatura(°C)	Promedio pH
<i>Isochrysis galbana</i>	104	8,5x10 ⁶	20,7	8,7
<i>Nannochloropsis sp.</i>	689	28,3x10 ⁶	24,5	8,2
<i>Tetraselmis sp.</i>	45	15x10 ⁶	20,3	8,7
Total	838			

Tabla 2. Volúmenes totales de microalgas utilizadas entre los días 7/02/2020 al 8/03/2020 para Agua verde. Estación Experimental de Maricultura, Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero.

Microalgas	Volumen (litros)	Promedio celular(cél/ml)	Promedio Temperatura(°C)	Promedio pH
<i>Isochrysis galbana</i>	394	9,2x10 ⁶	20,7	8,7
<i>Nannochloropsis sp.</i>	495	27,1x10 ⁶	24,5	8,2
Total	889			

Tabla 3. Volúmenes totales de microalgas utilizadas para la larvicultura de lenguado y alimento de rotíferos. Estación Experimental de Maricultura, Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero.

Microalgas	Volumen (litros)	Promedio celular(cél/ml)	Promedio Temperatura(°C)	Promedio pH
<i>Isochrysis galbana</i>	498	8,8 x10 ⁶	20,7	8,7
<i>Nannochloropsis sp.</i>	1184	27,7x10 ⁶	24,5	8,2
<i>Tetraselmis sp.</i>	45	15 x10 ⁶		
Total	1727			

En el presente informe se detalla la los conocimientos básicos de cultivo de microalgas con el fin de alimentar larvas de peces marinos y cultivos accesorios. Siempre es necesario cumplir con la rutina de protocolos y de esterilización de materiales para obtener un cultivo axénico.

Los volúmenes y concentración de las microalgas *Nannochloropsis sp* e *Isochrysis galbana* utilizadas durante la larvicultura de *Paralichthys orbignyanus* correspondiente al año 2020 fueron 1727 litros totales a concentraciones promedio de 27,7x10⁶ cel/ml para *N. gaditana* y 8,8x10⁶ cel/ml para *I. galbana*. Gracias a la desinfección del agua y del laboratorio siguiendo los protocolos para cultivo de microalgas, la contaminación fue muy baja reduciendo el descarte y sin la necesidad de utilizar agentes químicos para tratar contaminación de protozoos, lo cual da como resultado un alimento de excelente calidad para los primeros estadios larvales, cumpliendo con las necesidades de HUFA, lípidos y proteínas, tanto para larvas como para cultivo de rotíferos.



Bibliografía

- Aristizabal, E.O. 2006. Desove en cautiverio y calidad de los huevos y larvas de besugo, *Pragus pragus* (L.). INIDEP Inf. Téc.59.
- Gorriti, B., López A.V., Ricci, E. 2019. "Protocolos de trabajo en el laboratorio de microalgas de la Estación Experimental de Maricultura". Inf. Asc. y Transf. N: 155/2019, 8pp.
- Gorriti, B., Ricci E. Menguez, P. 2020. "Producción masiva laboratorio de microalgas 2019". Inf. Asc. y Transf. N: 68/2020, 7pp.
- Gorriti, B., López A.V. 2020. "Cepario de microalgas 2019". Inf. Asc y Transf. N: 69/2020, 6pp.
- Howell, B.R. 1979. "Experiments on the rearing of larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. aquaculture", 18: 215 – 255.
- López A. V & Boccanfuso, J.J, 2013. Cepario de microalgas marinas y producción inicial e intermedia de *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) en condiciones controladas de laboratorio. Inf Téc. 88.
- Müller, M. I. 2002. "Producción de alimento vivo: Rotíferos (*Brachionus plicatilis*) L- type. Proyecto de Desarrollo de la Tecnología de Producción Masiva de Semillas de Besugo y Lenguado en Argentina. 2^{da} Reunión de Comité del Proyecto OFCF- INIDEP, 6pp.
- Müller M.I, Cadaveira M.L & OKA, M. 2003. Producción masiva de Rotíferos (*Brachionus plicatilis*) Mediante el método de cultivo continuo. Inf Téc. Int DNI-INIDEP N: 78/2009, 11pp.
- Nass, K.E., Naess, T. & Harboe, T. 1992. Enhanced first feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in green water. Aquaculture, 105:143-156.
- Oie G., Makridis P. Reitan, K.I. & Olsen Y.1997. Protein and carbon utilization of rotifers *Brachionus plicatilis* in first feeding of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture, 153: 103-122.
- Oka, M., Müller M.I, Cadaveira, M, López A.V. 2003. Continuous extensive culture L- type rotifer. En: OKA, M.(Ed.). Technological development of seed production of besugo and lenguado in Argentine Republic. Internal report (Jan. 2000- Aug. 2003). Overseas Fishery Cooperation Foundation (OFCF) E Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP): 61-64.
- Radonic M, López A.V. & Müller M.I. 2008. Efecto de las microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana* en la supervivencia, crecimiento y calidad de larvas del leguando *Paralichthys orbignyanus*- Parte I. Inf. Invest. INIDEP Nº 61/2008, 8pp.
- Radonic M, López A.V, Bernatene F, Aristizabal E.O, 2018. Manual de producción de larvas y juveniles de lenguado negro *Paralichthys orbignyanus*. INIDEP Inf. Téc. 100.
- Reitan K.I., Rainuzzo J.R. Oie G & Olsen Y.1993 . Nutricional effects of algal addition in first feeding of turbot (*Scophthalmus maximus* L) larvar. Aquaculture, 118: 257-275.
- Rocha R.J., Ribeiro L., Costa R., & Dinis, M.T. 2008. Does the presense of microalgae influence fish larvae prey capture?. Aquicult. Res., 39:362-369.
- Silva A. 1999. Efecto de la microalga *Isochrysis galbana* en el cultivo temprano de larvas de *Paralichthys adspersus*. Cienc. Mar., 25(2): 267-276.