INIDEP

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO PESQUERO

INFORME DE INVESTIGACIÓN

Número	Páginas	Fecha de aprobación
032	010	13 MAY 2014

Dirección: DIRECCIÓN DE INFORMACIÓN, OPERACIONES Y TECNOLOGÍA

Programa / Gabinete: Mariculture y Biología Experimental

Actividad: MARI 14. Estudio del ciclo de vida y aspectos productivos de copépodos

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DEL COPÉPODO HARPACTICOIDEO TISBE SP. Y SU UTILIZACIÓN EN LARVICULTURA DE PECES

Una de las ventajas que presentan los copépodos para ser utilizados como alimento vivo en el cultivo de peces, comparados con los rotíferos y *Artemia*, es que contienen los ácidos grasos esenciales que las larvas requieren, por lo que no necesitan ser enriquecidos. Un prerrequisito para el desarrollo de las técnicas de cultivo es un conocimiento básico de los procesos fisiológicos y de la dinámica de poblaciones de las especies a cultivar. En el presente trabajo, la temperatura de los acuarios de mantenimiento de copépodos se mantuvo en 22º ± 1º C, mientras que el pH fue de 8 ± 1 y la salinidad entre 34 al 35‰. El sustrato constituido por una malla de 200 µm de forma rectangular aportó una superficie total de 1200 cm^2. La densidad de copépodos se mantuvo en 2.4 ± 0.9 ind./ml. Tomando como variable la temperatura, se encontraron diferencias significativas en los valores medios del número de huevos por saco. El tiempo mínimo que transcurrió desde la eclosión de los nauplii hasta alcanzar la adultez fue de 5 días. En promedio, el 78,2 % de los nauplii eclosionados sobrevivió hasta alcanzar el estadio adulto.

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

	Iniciales	Cargo
SOLICITADO POR		

PREPARADO POR

Firma:
Nombre: ZZO, LUCIANO

Firma:
Nombre: BIANCA RODRIGUEZ, FEDERICO AGUSTIN

Firma:
Nombre: MATIOZZI, LUCIANA

Firma:
Nombre: ARISTIZABAL ABUD, EDDIE OSCAR

APROBADO POR

Dr. CARLOS A. [illegible]
A/C Dirección de Información, Operación y Tecnología

Director de área

Dr. OTTO C. WOHLER,
DIRECTOR
Dirección Nacional de Investigación
INIDEP

Director del INIDEP

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DEL COPÉPODO HARPACTICOIDEO *Tisbe sp.* Y SU UTILIZACIÓN EN LARVICULTURA DE PECES

Izzo, Luciano; Bianca, Federico; Mathos, Luciana y Aristizabal, Eddie.

INTRODUCCIÓN

Dentro de los crustáceos, la Subclase Copépoda es el grupo más diversificado. Dominan el zooplancton, comprendiendo usualmente el 80% de su biomasa (Verity y Smetacek, 1996). En particular los copépodos más pequeños (<1 mm de largo total) son los metazoos más abundantes en la Tierra. Éstos crustáceos desempeñan un papel primordial en el ecosistema marino, son una presa importante de larvas de peces y de otros planctívoros, es decir, son eslabones esenciales en las cadenas alimentarias marinas, sirviendo como principales depredadores de fitoplancton y como presa de otros carnívoros pelágicos, constituyendo el principal nexo entre los productores primarios y los consumidores secundarios (Turner, 2004).

La cría de larvas de la mayoría de las especies de peces marinos requiere la provisión de presas vivas por un periodo variable desde el comienzo de la alimentación exógena. En los sistemas de cría, la primera alimentación de las larvas incluye rotíferos del género *Brachionus*, para luego normalmente continuar con nauplios y adultos del braquiópodo *Artemia spp*. (Stottrup, 2000). Los rotíferos y *Artemia* son de forma natural deficientes en ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) de la serie ω-3, en especial del ácido docosahexaenóico (DHA). Las larvas marinas de los peces carnívoros poseen altos requerimientos de HUFAs (Evjemo *et al*., 2003), por lo tanto es indispensable asegurar un alimento vivo con productos ricos en HUFAs ω-3 antes de suministrarlo a las larvas.

Una de las ventajas que presentan los copépodos para ser utilizados en el cultivo de peces, comparados con los rotíferos y *Artemia*, es que contienen los nutrientes esenciales que las larvas requieren, por lo que no necesitan ser enriquecidos (Civera-Cerecedo *et al*., 2004). Al nacer, los nauplii tienen un tamaño cercano a 50 µm y constituyen, junto a los rotíferos y *Daphnias* pequeñas, el alimento más importante en la primera fase de vida de las larvas de peces. A medida que crecen, los copépodos presentan un amplio espectro en tamaño, muy ventajoso para la alimentación de animales de cultivo en diferentes etapas de desarrollo. Por otra parte, su típico movimiento en zig- zag es un importante estímulo visual para muchos peces que los prefieren sobre los rotíferos (Prieto *et al*., 2006).

Varios estudios han demostrado que los copépodos pueden tener mayor valor nutricional que *Artemia,* porque su perfil nutricional es mejor para los requerimientos de larvas de peces marinos. La calidad nutricional de los copépodos se caracteriza por altos niveles de proteínas (42-52%) y un buen perfil de aminoácidos y de ácidos grasos de acuerdo con el alimento usado en su producción (Prieto *et al*., 2006). Varios copépodos costeros presentan altos niveles de DHA y de EPA (Evjemo *et al*., 2003). Diversos autores han demostrado que la inclusión de copépodos aun por un período corto de tiempo en el cultivo larvario de peces marinos asegura un desarrollo normal, con mejoras en el crecimiento y supervivencia reduciendo notoriamente la ocurrencia de enfermedades, malformaciones y pigmentación anormal de las larvas (Stottrup, 2000).

Un prerrequisito para el desarrollo de las técnicas de cultivo es un conocimiento básico de los procesos fisiológicos y de la dinámica de poblaciones de las especies a cultivar. Para la cría de copépodos con el fin de servir de alimento vivo para el cultivo de larvas de peces, se debe contar con ciertos conocimientos, uno de ellos es el tamaño de los adultos y de los nauplios, para poder ser utilizados de acuerdo al tamaño de la boca de las larvas de peces. Además es necesario conocer las condiciones básicas de cultivo, como la temperatura optima, la salinidad, la tasa de

COPIA DE PROMOCIÓN INIDEP

fecundidad, la tasa de crecimiento y la interacción entre los distintos factores (Stottrup, 2000).

En trabajos previos realizados en el Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), en el marco del programa de Maricultura y Biología Experimental, (Martínez *et al*., 2011) utilizaron dos especies de copépodos harpacticoideos: *Paramphiascella sp.* y otra especie en clasificación (posiblemente *Tisbe* sp.); donde se estableció la posibilidad de su producción y utilización como alimento vivo complementario en la larvicultura del lenguado (*Paralichthys orbignyanus*), analizando el grado de aceptación y el efecto sobre el desarrollo de las larvas de lenguado.

El objetivo de este informe fue realizar un estudio preliminar para establecer las características biológicas básicas, aplicables al cultivo de los copépodos locales del genero *Tisbe*, para su manejo, producción y utilización como alimento vivo complementario en la larvicultura de peces.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de copépodos

Los copépodos se colectaron del tanque de reproductores de lenguado (*P. orbignyanus*), situado en las instalaciones de la Estación Experimental de Maricultura (EEM) del INIDEP. Para ello, mediante sifonado se tomó agua con detritos proveniente del fondo del tanque. Para retener los copépodos y detritos se utilizó una malla de 65 µm. Luego del filtrado de agua, la malla se lavó en baldes con agua de los tanques. Una vez aislados los copépodos y el detrito, la muestra fue llevada a laboratorio y colocada en recipientes acrílicos de 15 l (Fig. 1).

Aislamiento de copépodos

Debido a que esta especie de copépodos presenta una fototaxia negativa, se utilizó una luz ubicada en la base del recipiente para aislarlos. Los copépodos adultos se trasvasaron usando una pipeta. Para asegurarse de mantener líneas monoespecíficas, se observaron individuos adultos colocados en una placa de petri bajo una lupa binocular Nikon SMZ1000 y se aislaron individualmente con pipeta de Pasteur aquellos copépodos que correspondían al género *Tisbe* (Figura 1). La confirmación de las líneas monoespecíficas de los copépodos bajo estudio se realizó mediante la utilización de claves taxonómicas (Boxshall y Halsey, 2004) y la colaboración del Dr. Ramirez del Laboratorio de Zooplancton del INIDEP.

Agua de mar para el cultivo de copépodos

Antes de su utilización en el cultivo de copépodos, el agua de mar tratada se vierte en tanques de 200 l y se hace recircular por un tren de filtración de 20, 10 y 5 µm de diámetro de poro y luz ultravioleta (UV) durante 1 h.

Mantenimiento de copépodos

Los copépodos previamente identificados fueron trasvasados a acuarios de 15 l con agua de mar, aireador y sustrato artificial (Fig. 1) durante 30 días. El sustrato artificial constituido por una red de 200 µm de forma rectangular (30 x 20 cm) aportó una superficie total de 1200 cm^2. Se calculó la densidad en ind/ml a tiempo cero y se repitió el conteo cada 48hs. Se recambió el 10% de agua/día.

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

Monitoreo de los parámetros físicos

Durante el transcurso de la experiencia se registraron diariamente el pH y temperatura con un medidor TOA HM-20P. La salinidad se registró con un refractómetro manual Tanasaka New S-100. Paralelamente, se realizó limpieza y recambio diario de agua en los tanques de 15 l. Los tanques se mantuvieron con fotoperiodo de 12 h.

Alimentación de los copépodos

Los copépodos se alimentaron en exceso cada 48 h con un mix de microalgas provenientes del cepario de microalgas marinas de la EEM. Las cepas utilizadas fueron *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis* sp. e *Isochrysis galbana* a razón de 100ml totales a una concentración de $30x10^6$, $5x10^6$ y $7x10^6$ cels/ml respectivamente (Fig. 2).

Paralelamente, se alimentó con alimento balanceado Otohime A2 a razón de 0,5g/10 l cada 3 días (Martínez *et al*., 2011).

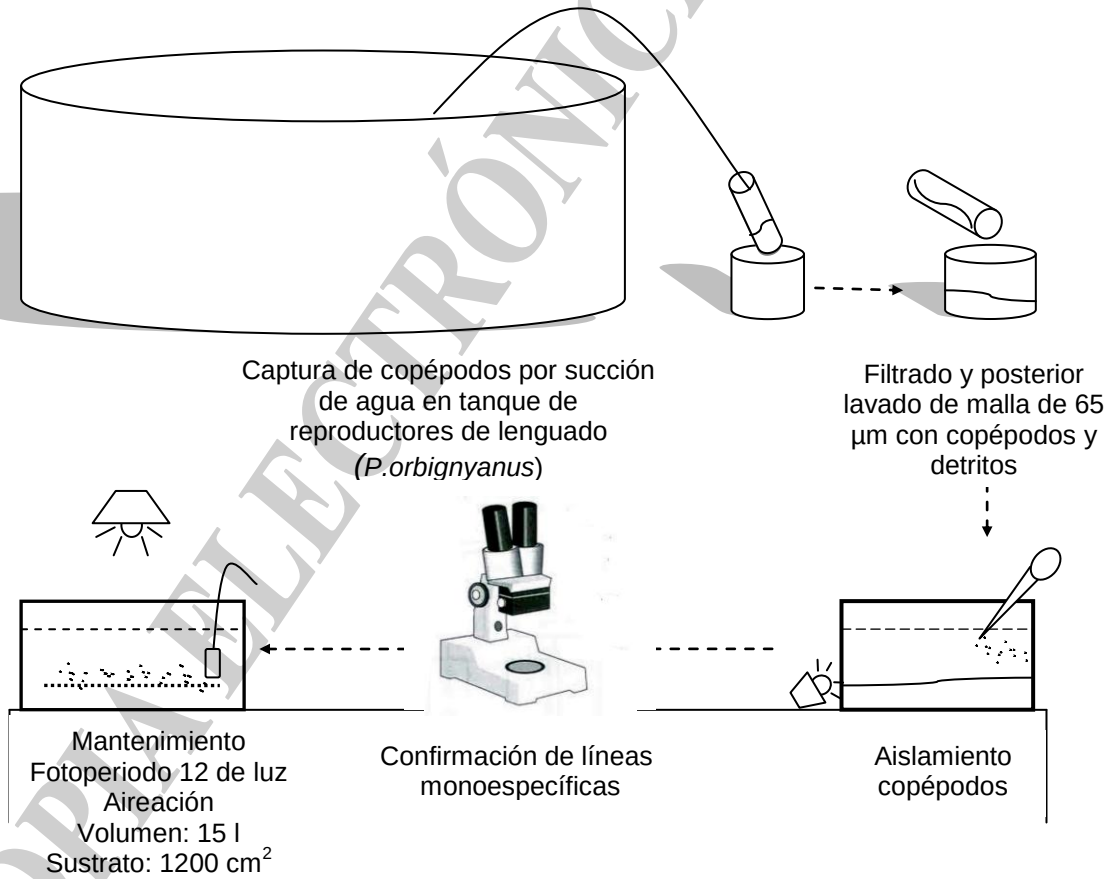


Figura 1. Proceso de obtención, aislamiento y mantenimiento de copépodos del género *Tisbe* sp llevado a cabo en la Estación Experimental de Maricultura (EEM).

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

Documentación de los distintos estadios de vida

Basándose en las descripciones de Vilela (1969) sobre *Tisbe* sp y las de Johnson y Olson (1948) sobre *T. furcata*, se determinaron los diferentes estadios de los copépodos y se tomaron fotografías bajo microscopio estereoscópico Nikon Eclipse E600, lo que permitió observar el comportamiento reproductivo del copépodo local *Tisbe* sp.

Determinación de la cantidad de huevos

Se aislaron 30 hembras con bolsa de huevos en agosto (temperatura del agua 15 °C) y 30 hembras con bolsa de huevos en noviembre (temperatura del agua 20°C). Estas se fijaron en formol al 5% para luego contar bajo microscopio óptico el número de huevos por individuo. Se realizó una prueba de Mann-Whitney para determinar si existieron diferencias significativas en el número de huevos según temperatura (Krebs, 1989).

Supervivencia y duración total de las fases de desarrollo de Tisbe sp.

Se aislaron individualmente 10 hembras ovígeras desarrolladas a una temperatura de 20° C y se colocaron en frascos de 40 ml con agua de mar estéril con suministro de algas como fuente de alimento. Una vez eclosionados los nauplii, fueron separados de la hembra, se contaron y se calculó el porcentaje de nauplius que sobrevivió hasta alcanzar la adultez. Paralelamente, se tomó el tiempo en días que transcurre desde la eclosión del nauplius hasta alcanzar la adultez.

RESULTADOS

Mantenimiento, monitoreo de parámetros físicos y alimentación de copépodos

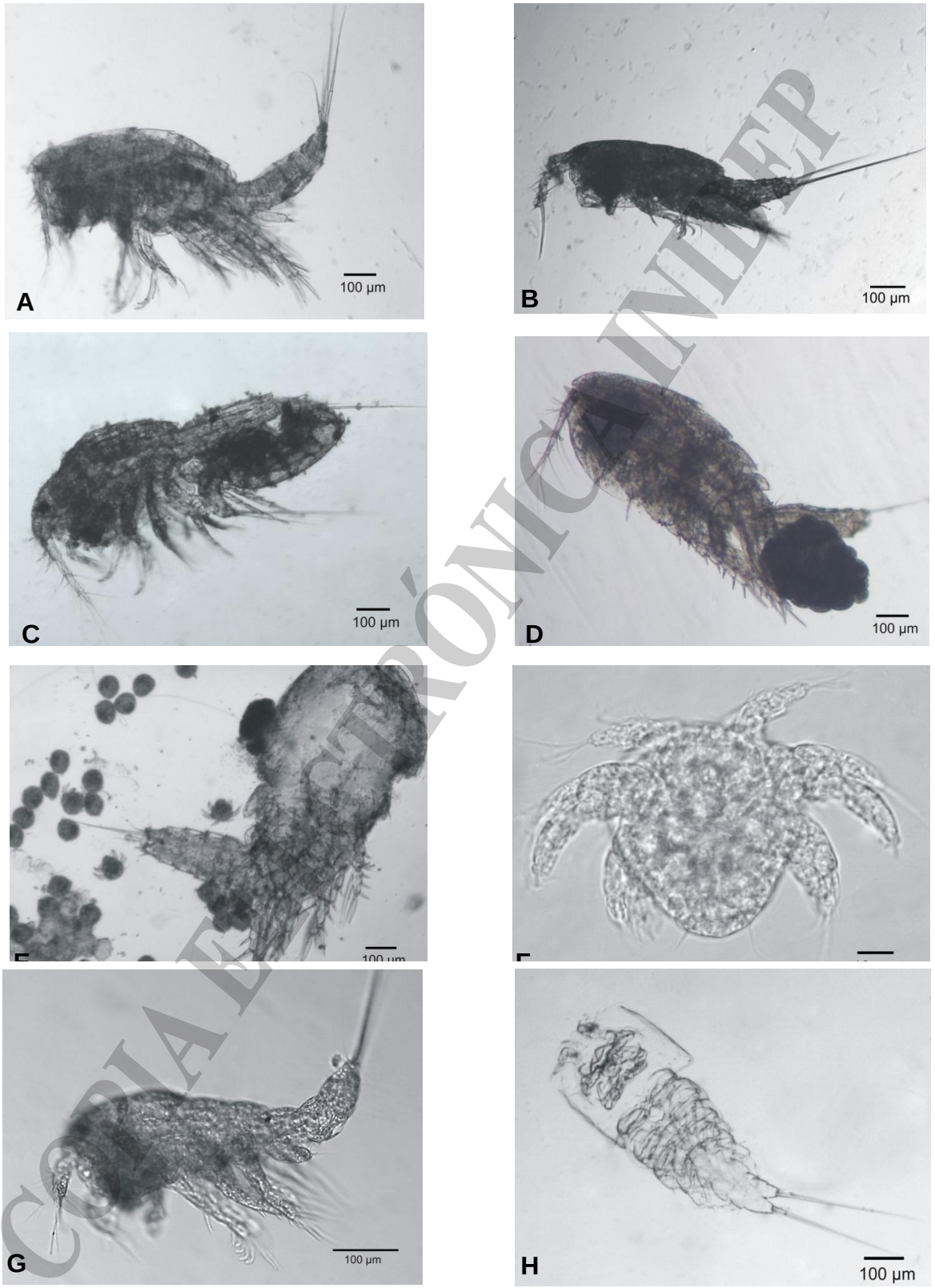
Durante la experiencia de 30 días, la temperatura de los acuarios de mantenimiento de copépodos se mantuvo en 22º ± 1º C, mientras que el pH fue de 8 ± 1y la salinidad entre 34 al 35‰.

Mediante observación periódica y cálulo de densidad de individuos cada 48hs; la alimentación, los valores registrados de los parámetros físicos y el sustrato proporcionado fueron positivos para el desarrollo y mantenimiento de los copépodos. La densidad de copépodos se mantuvo en 2,4 ± 0,9 ind./ml.

Figura 2. Copepodito de *Tisbe* sp con microalgas en su tracto digestivo.

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

Documentación de estadios de vida



COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

Figura 3. Etapas de la vida del copépodo *Tisbe* sp. A) Hembra adulta. B) Macho adulto. C) Cópula. D) Hembra con saco de huevos. E) Hembra adulta con huevos eclosionando. F) Nauplius. G) Copepodito. H) Muda.

El género *Tisbe* es dioico; el dimorfismo sexual es distinguible en el 5to y 6to par de patas y en el número de segmentos presentes en el urosoma. Las hembras en general son de mayor tamaño que los machos (Fig. 3A). La característica más distintiva en los machos es la presencia del sexto par de patas, representado por una fuerte espina; la cual está ausente en las hembras (Fig. 3B) (Boxshall y Halsey, 2004).

Durante la cópula, el macho asegura a la hembra inmovilizándola y transfiere el espermatóforo, flexionando su urosoma sobre el de la hembra (Figura 3 C). Los huevos quedan pegados formando un solo saco ovígero (Fig. 3D) (Bjornberg, 1981).

Durante el ciclo de vida, los copépodos atravesaron seis estadios naupliares, cinco estadios de copepoditos y finalmente el copépodo adulto. Los nauplii son de contorno circular, incoloros y poseen una pequeña mancha ocular roja (Fig. 3E y F). Los copepoditos son similares a adultos en su apariencia general, el primer estadios posee solo el primer y segundo par de patas, en estadios siguientes un adicional par de patas es adherido en cada muda, excepto en el quinto (Fig. 3G). Todos los estadios, naupliares y copepoditos, están separados por una muda (Fig. 3H) (Johnson y Olson, 1948).

Determinación de la cantidad de huevos

Se encontraron diferencias significativas en los valores medios del número de huevos por hembra entre ambas temperaturas. A 15° C el valor medio de la cantidad de huevos fue mayor que a 20° C (Tabla 1).

Tabla 1. Registro de los valores medios del número de huevos por saco en hembras de *Tisbe* sp.

Temperatura	N	N° medio de huevos	Mann-Whitney
15° C	30	77	U: 878,5 p<0,0001
20° C	30	33	

N
Nivel de significación (%): 5. p-valor: p-valor asintótico.

Supervivencia y duración total de las fases de desarrollo de Tisbe sp.

De un total de 10 hembras con huevos aisladas, el promedio de nauplii eclosionados por saco fue de 32 ± 3. El tiempo mínimo que transcurrió desde la eclosión de los nauplii hasta alcanzar la adultez fue de 5 días. En promedio, el 78,2 % de los nauplii eclosionados sobrevivió y llegó al estadio adulto.

DISCUSIÓN

La temperatura del acuario de mantenimiento fue de 22º ± 1º C. Un número de trabajos tiene documentado que la temperatura es el mayor factor que controla la actividad reproductiva (Zaleha y Farahiyah-Ilyana, 2010). En *T. battagliai*, Williams y Jones (1999) observaron que la temperatura óptima para la máxima reproducción fue de 20° C. Los autores atribuyen que la temperatura tiene relación directa sobre la reproducción de los copépodos, ya que dicho factor tiene un impacto en las tasas metabólicas de los individuos.

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

La salinidad se mantuvo entre 34 al 35‰. En ensayos realizados sobre *T.holothuriae*, Miliou y Moraitou-Apostolopoulou (1991), encontraron que la salinidad óptima para la producción de crías fue del 38‰. Salinidades sub o supra óptimas conducen a un crecimiento prolongado en los individuos, un decrecimiento en la producción de huevos y una baja consumición de oxígeno.

La densidad de copépodos se mantuvo en 2,4 ± 0,9 ind/ml. Si bien las densidades usuales de copépodos están en un rango de 0,5 a 3 ind/ml, el cálculo de la densidad es meramente teórico, ya que las presas tienden a agruparse en manchones en posiciones específicas dentro del acuario, lo que reduce considerablemente la densidad de algunas zonas y la aumenta en otras (Civera-Cerecedo *et al.*, 2004).

Mediante observación, el sustrato artificial aportado al acuario fue positivo para el desarrollo y mantenimiento de los copépodos. Disponer de sustrato en el acuario de mantenimiento es esencial para una buena productividad del cultivo. Ya que los harpaticoideos son de hábitos bentónicos, es importante que posean una gran superficie en relación al volumen (Cutts, 2001). Proveer una mayor superficie de sustrato influye positivamente en el crecimiento de la población, el desarrollo y la fecundidad de los individuos (Zhang y Uhlig, 1993).

La alimentación en exceso con un mix de microalgas brindó alimento natural para todos los estadios de vida de los copépodos cultivados. Según Lee *et al*. (1985), una combinación de diferentes microalgas es más beneficioso que una alimentación con un monocultivo, presumiblemente porque un mix de vitaminas, minerales y elementos traza son vitales para la supervivencia, crecimiento y reproducción de los copépodos.

El contenido de ácidos grasos en los alimentos influencian la productividad y supervivencia de copepoditos y la producción de huevos (Miliou y Moraitou-Apostolopoulou, 1991). Por esta razón se suministró alimento balanceado Otohime A2.

A 15° C el valor medio de la cantidad de huevos por saco fue mayor que a 20° C. Resultados similares fueron encontrados en *T. holothuriae* (Miliou y Moraitou-Apostolopoulou, 1991), donde bajas temperaturas causaron una lenta maduración y desarrollo, pero incrementaron el numero de crías por saco de huevo.

El tiempo mínimo que transcurrió desde la eclosión de los nauplii hasta alcanzar la adultez fue de 5 días. En promedio, el 78,2 % de los nauplii eclosionados sobrevivió y alcanzó el estadio adulto. Miliou & Moraitou-Apostolopoulou (1991) reportaron un tiempo de desarrollo larval de 6,14 días para *Tisbe*. Para *T. furcata*, Johnson y Olson (1948) indicaron un 80% de supervivencia en sus experiencias.

En el presente trabajo se logró generar un protocolo de captura y aislamiento de los copépodos locales presentes en los tanques de reproductores de la EEM. Mediante ensayos y observaciones se obtuvieron datos e información de las características biológicas de los copépodos del género *Tisbe*. Con éstas bases, se trabajará para desarrollar a futuro, el manejo, producción y utilización del copépodo harpacticoideo *Tisbe* sp, como alimento vivo complementario en la larvicultura de peces.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando Ramirez del Laboratorio de Zooplancton del INIDEP por su colaboración en la identificación de copépodos.

COPIA ELECTRONICA INIDEP

BIBLIOGRAFÍA

BJORNBERG, T.K.S. 1981. Copepoda. En BOLTORSKOY, D. (Ed.) Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero. Mar del Plata, Argentina, 587-667

BOXSHALL, G.A., HALSEY S.H. 2004. An Introduction to Copepod Diversity. The Ray Society, London: 996 pp.

CIVERA-CERECEDO, R., ALVAREZ-GONZÁLEZ, C.A. Y MOYANO-LÓPEZ, F.J. 2004. Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. VII memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo, Sonora, México.

CUTTS, C.J. 2001. Culture of Harpacticoid copepods: Potential as live feed for rearing marine fish. Advances en Marine Biology Vol 44, 295-316.

EVJEMO, J.O., REITAN, K. I. Y OLSEN, Y. 2003. Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. Aquaculture 227, 191-210.

JOHNSON, M.W. Y OLSON, J.B. 1948. The life history and biology of a marine harpacticoid copepod, *Tisbe furcata* (BAIRD). Biol. Bull., 95, p.320-332.

KREBS, C. J. 1989. Ecological methodology. Harper Collins, Nueva York, 654 pp.

LEE, W. H., ZHANG, X.K., VAN BAALEN, C. Y ARNOLD, C.R. 1985. Feeding and reproductive performance of the harpacticoid *Tisbe carolinensis* (Copepoda, Crustacea) in four algal cultures. Marine Ecology Progress Series 24, 273-279.

MARTÍNEZ, P., BOCCANFUSO, J.J., BIANCA, F., SPINEDI, M. Y BERNATENE, F. 2011. Nota sobre el potencial de dos copépodos harpacticoideos locales para su cultivo masivo y utilización en la larvicultura del lenguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). Inf. De Investigación, INIDEP.

MILIOU, H. Y MORAITOU-APOSTOLOPOULOU, M. 1991. Combined effects of temperature and salinity on the population dynamics of *Tisbe holothuriae* Humes (Copepoda: Harpacticoidea). Arch. Hydrobiol., 21 (4), 431-448.

PRIETO, M., CASTAÑO, F., SIERRA, J., LOGATO, P. Y BOTERO, J. 2006. Alimento vivo en la larvicultura de peces marinos: copépodos y mesocosmos. Rev.MVZ Córdoba 11 Supl (1), 30-36.

STOTTRUP, G.J. 2000. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. Aquaculture 31, 703-711.

TURNER, J.T. 2004. The importance of small planktonic copepods and their roles in pelagic marine food webs. Zoological Studies, 43 (2): 255-266.

WILLIAMS, T.D Y JONES, M.B. 1999. Effects of temperature an food quantity on the reproduction of *Tisbe battagliai* (Copepoda: Harpacticoida). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 236, 273-290.

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

VERITY, P. Y SMETACEK, V. 1996. Organism life cycles, predation, and the structure of marine pelagic ecosystems Mar Ecol Prog Ser Vol. 130: 277-293.

VILELA, M.H. 1969. The life cycle of *Tisbe* sp. (Copepoda: Harpacticoida) under laboratory conditions. Notas e Estudos do Inst. Biol. Marit. Lisboa No. 36, p.1-19.

ZALEHA, K. Y FARAHIYAH–ILYANA, J. 2010. Culture and growth of a marine harpacticoid, *Pararobertsonia* sp. in different salinity and temperature. Sains Malaysiana 39 (1) (2010), 135–140.

ZHANG, Q. Y UHLIN, G. 1993. Effect of density on larval development and female productivity of *Tisbe holothuriae* (Copepoda, Harpacticoida) under laboratory conditions. Helgolander Meeresuntersunchungen 47: 229-241.

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP