

CRECIMIENTO LARVARIO DE SARDINA, *SARDINA PILCHARDUS* (WALB.), EN LABORATORIO BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE ALIMENTACIÓN

A. Miranda¹
J. Sánchez¹
J. Iglesias¹
F. Álvarez²
y F. Alemany²

INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFÍA

¹Centro Oceanográfico de Vigo
Apartado 1552
36280 Vigo

²Centro Oceanográfico de Baleares
Apartado 291
07080 Palma de Mallorca

Original entregado en junio de 1992

INFORMES TÉCNICOS
INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFÍA
Número 132 • Madrid 1992

RESUMEN

Se han realizado pruebas de alimentación con larvas de sardina (Sardina pilchardus Walb.) durante sus dos primeras semanas de vida. Las larvas fueron obtenidas a partir de huevos fecundados capturados en el mar. Se utilizaron dos tipos de presas: zooplancton del medio natural (nauplius de copépodos y copepoditos) y rotífero (Brachionus plicatilis Müller) cultivado, comparándose su crecimiento con el de otras larvas sometidas a inanición. Las larvas alimentadas mostraron un período de ralentización o de paralización en su crecimiento entre los días 4 y 8 de edad, que correspondió al paso de la alimentación endógena a exógena. A partir del día 10 se observó un claro incremento en las tasas de crecimiento diario, registrándose los valores más altos en longitud (6.6 ± 0.5 mm) y peso (54.5 ± 15.9 μ g) en las larvas de 14 días de edad que fueron alimentadas con zooplancton natural.

Examinando los otolitos de las larvas cultivadas (hasta el día 12 de vida), se observó la formación de microincrementos diarios hasta el día 4. A partir de esa edad no se observaron nuevos microincrementos.

SUMMARY

Trials on feeding of sardine (Sardina pilchardus Walb.) larvae were made during their two first weeks of life. Larvae were obtained from fertilized eggs collected in the sea. Two different types of prey were used: zooplankton from the wild (copepod nauplii and juveniles) and cultured rotifers (Brachionus plicatilis Müller). Growth rates between larvae on different food regimes and those in starvation were compared. Fed larvae showed a delayed growth period between days (of age) 4 to 8, coinciding with the transition from endogenous to exogenous nutrition. From day 10 a clear increment in the daily growth rate was observed. Larvae of 14 days fed wild zooplankton were larger (6.6 ± 0.5 mm) and of higher dry weight (54.5 ± 15.9 μ g).

Formation of daily microincrements was observed in the otoliths of cultured larvae until 4 days old. Further daily microincrements were not seen in older larvae.

1. INTRODUCCION

La importancia de la pesquería de sardina (Sardina pilchardus Walb.) ha llevado al planteamiento a nivel internacional de diversos proyectos SARP (Sardine Anchovy Recruitment Project), con el objetivo global de estudiar las causas que provocan fluctuaciones en el reclutamiento de dicha especie. Concretamente en el área europea existe el proyecto SARP-CEE (Cooperative studies on the processes controlling recruitment of clupeiform fish in different regions) en el que esta implicada España y otros países comunitarios.

Dentro de este proyecto, el interés en conseguir puestas en cautividad y larvas eclosionadas con su día exacto de nacimiento (día 0), ha llevado a la realización durante estos últimos años de diversas experiencias de cultivo de larvas de sardina ibérica, con el fin de validar los datos que se obtienen en las campañas realizadas en el mar (Olmedo et al., 1990; Miranda et al., 1990; Silva y Miranda, 1992).

El primer objetivo planteado en este trabajo fue el de observar el crecimiento de las larvas de sardina en diferentes condiciones experimentales de alimentación.

Un segundo objetivo consistió en analizar la formación de microincrementos de naturaleza diaria en los otolitos de las larvas cultivadas, durante los primeros estados de su vida larvaria.

2. MATERIAL Y METODOS

Un número aproximado de diez mil huevos de sardina fueron capturados frente a la ría de Muros (NO de España) durante los meses de marzo y abril de 1991, realizando arrastres oblicuos con una red tipo BONGO provista de mallas de 500 μm . Una vez diluidas las muestras en el barco, fueron trasladadas inmediatamente en recipientes a baja temperatura a las instalaciones de la Planta de Cultivos del Instituto Español de Oceanografía de Vigo.

Los huevos fecundados fueron separados de las muestras con una pipeta de tamaño adecuado a su diámetro con el fin de no dañarlos. Para minimizar la manipulación de los mismos fueron directamente transferidos a tanques de incubación con circuito abierto a 14°C, sin realizarse una separación previa según sus estados de desarrollo embrionario.

Cada 12 horas las larvas recién eclosionadas fueron retiradas del incubador, adjudicándose a cada grupo extraído en ese momento la edad 0, que definía el inicio de la vida larvaria de ese experimento. Las larvas fueron transferidas a un sistema de

cultivo experimental utilizando 6 tanques cilíndricos con paredes oscuras de 100 litros de capacidad. Se utilizó agua de mar filtrada por 1 μm y circuito cerrado, realizándose una renovación parcial del agua cada vez que se procedía a la limpieza del fondo de los tanques. La densidad larvaria inicial fue de 15 larvas por litro, el fotoperíodo fue de 14 h de luz y 10 h de oscuridad, la salinidad varió de 34 a 35 por mil y el rango de temperatura durante los 14 días de las experiencias, fue de 13 a 19°C.

Se realizaron tres experimentos de cultivo larvario: 1) larvas alimentadas con zooplancton del medio natural 2) larvas alimentadas con rotífero (*Brachionus plicatilis*) y 3) larvas sometidas a inanición. En cada una de estas experiencias se hizo su réplica correspondiente.

El zooplancton del medio natural fue capturado en la ría de Vigo por medio de arrastres oblicuos con una red tipo Juday-Bogorov provista de malla de 60 μm y trasladado al laboratorio en recipientes refrigerados, donde se hizo una selección por rangos de tamaño de acuerdo con las diferentes etapas de cultivo larvario. Para ello, se filtró por mallas de 60, 100 y 200 μm . La densidad suministrada a los tanques de cultivo se mantuvo en 1 presa/ml, contando como presa a los nauplius de copépodos y copepoditos. El rotífero añadido fue enriquecido previamente durante 24 horas con *Isochrysis galbana*, y la densidad de presa se mantuvo en 3 rot/ml. En ambos casos tanto en las larvas alimentadas con zooplancton natural como con rotífero se añadió inicialmente a los tanques de cultivo 200 000 cel./ml de la microalga *I. galbana*.

Cada dos días se realizó en cada una de las experiencias citadas un muestreo de 10 larvas para la determinación en vivo de su longitud estándar por medio de una lupa binocular (± 0.1 mm) provista de ocular micrométrico. Cada larva fue lavada dos veces en agua destilada y depositada en un pequeño cestillo de aluminio que había sido previamente secado y pesado. Posteriormente se introdujo en una estufa donde permaneció 24 h a 60°C. Por último se pesó en una microbalanza de ± 0.1 μg .

Para la determinación de anillos diarios en otolitos se muestrearon, cada dos días, 10 larvas de cada una de las experiencias. Las larvas fueron fijadas en alcohol etílico al 80 % tamponado con TRIS al 40 %, midiéndose su longitud estándar y extrayéndose a continuación los otolitos sagitta y lapilli de cada ejemplar, los cuales fueron montados en portaobjetos incluyéndolos en resina sintética "eukitt".

Los microincrementos de uno de los otolitos sagitta de cada ejemplar fueron leídos bajo microscopio óptico a 1 000 aumentos, siguiendo el método de Methot y Kramer (1979). Se montó una cámara de video de alta resolución sobre un microscopio compuesto

y las imágenes se proyectaron sobre una pantalla conectada a un digitalizador, lo que permitió medir con gran precisión tanto el radio del otolito como la anchura de cada uno de los microincrementos.

3. RESULTADOS

3.1 Crecimiento larvario

En el momento de la eclosión a 15°C, las larvas mostraron una longitud estándar media de 4.2 ± 0.1 mm. y un peso seco de 39.2 ± 4.1 μ g.

		Edad (días)							
		0	2	4	6	8	10	12	14
INANICION	MEDIA	4.1	4.9	5.7	5.6	5.6	5.4	5.4	-
	D.S.	0.1	0.3	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	-
ROTIFERO	MEDIA	3.8	5.1	5.7	5.8	5.7	5.6	5.9	-
	D.S.	0.2	0.3	0.1	0.3	0.3	0.2	0.4	-
ZOOPLANCTON	MEDIA	4.3	5.0	5.5	5.6	5.7	5.8	6.3	6.6
	D.S.	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.3	0.5	0.5

TABLA I. Media y desviaciones estándar de la longitud estándar en mm., para las diferentes experiencias.

En la Tabla I se dan las longitudes medias y las desviaciones estándar observadas en los tres experimentos realizados. Al representar estos datos gráficamente, (Fig. 1), se observa que tanto en las larvas alimentadas como en las sometidas a inanición, existe un incremento en la longitud desde la eclosión (día 0) hasta el día 4, en el que prácticamente se halla reabsorbido el saco vitelino, completándose este hecho a los 5-6 días a la temperatura de 15°C.

A partir del día 4 de vida, que se corresponde con el paso de alimentación endógena a exógena, las larvas alimentadas con

zooplancton natural experimentan un crecimiento moderado pero constante. A los 7-8 días ya aparecen nauplius y copepoditos en el tubo digestivo de las larvas (Fig. 4), siendo a partir del día 10 cuando se observa un crecimiento más acelerado, alcanzando el día 14 una longitud media de 6.6 mm. Las larvas alimentadas con rotífero no experimentan crecimiento entre el día 4 y 10 de vida, observándose a partir de ese día un crecimiento más moderado que en las alimentadas con zooplancton natural. Por el contrario, las longitudes medias de las larvas en inanición fueron progresivamente disminuyendo desde el día 4 hasta el 12 en el que se produce su muerte por inanición alcanzando una longitud media de 5.4 mm. (Tabla I).

Examinando las tasas diarias de crecimiento para los tres grupos de larvas (Tabla II), se observa que a partir del día 10 existe una clara diferenciación en cuanto a los valores de las larvas alimentadas y no alimentadas. Así, mientras que las larvas sometidas a inanición no presentan crecimiento, las larvas alimentadas muestran tasas de crecimiento de 2.6 % con rotífero y de 4.1 % con zooplancton natural.

DIAS	INANICION		ROTIFERO		ZOOPLANCTON	
	L.S.	P.S.	L.S.	P.S.	L.S.	P.S.
0-2	8.9	-2.8	14.7	-	7.5	-2.0
2-4	7.6	-4.3	5.6	-	4.8	-0.5
4-6	-0.9	0.2	0.9	-	0.9	-8.5
6-8	0.0	-7.4	-0.9	-	0.9	-1.5
8-10	-1.8	-14.2	-0.9	-	0.9	6.1
10-12	0.0	-0.8	2.6	-	4.1	14.4
12-14	-	-	-	-	2.3	8.1

TABLA II. Tasas de crecimiento diario, en porcentajes, de longitud estándar (L.S.) y peso seco (P.S.) en las experiencias realizadas.

Para ajustar estadísticamente los datos de crecimiento en longitud observados con zooplancton natural (mejores valores obtenidos), se calcularon las ecuaciones lineal, potencial, exponencial y de Laird-Gompertz; la que resultó con un mejor

ajuste fue la ecuación lineal, definida como:

$$y = 4.57 + 0.15 x \quad r = 0.96$$

donde: y = longitud estándar en mm.
 x = edad en días desde la eclosión.

Dado que las mayores diferencias en longitud se observaron entre las larvas alimentadas con zooplancton natural y las sometidas a inanición, se analizó con más detalle la evolución de su crecimiento en peso en el mismo período (de 0 a 14 días de edad).

Las larvas alimentadas con zooplancton natural (Fig. 2) mostraron un peso medio inicial de $39.2 \mu\text{g} \pm 4.1$ en el momento de la eclosión (día 0), observándose una ligera disminución hasta el consumo del saco vitelino ($31.7 \mu\text{g} \pm 3.8$), hecho ya comprobado en otros trabajos referidos a sardina ibérica (Blaxter, 1969), y sardina del Pacífico (Lasker, 1962). Posteriormente se produjo un período de estabilización del peso durante el paso a la alimentación exógena (día 6 al 8). A partir del día 8 se observaron tasas de crecimiento cada vez mayores (Tabla II), alcanzando el día 14 un peso seco de $54.5 \mu\text{g}$ (Fig. 2). Por el contrario, las larvas en inanición continuaron perdiendo peso de una forma continuada desde el momento de la eclosión, hasta que se produjo su muerte por inanición el día 12 de vida, en el que mostraron un peso final de $22.7 \mu\text{g}$.

3.2 Formación de microincrementos diarios

La primera observación de microincrementos diarios en larvas cultivadas de sardina nos muestra claramente la formación de un primer microincremento después de la eclosión, dato de máximo interés desde el punto de vista del cálculo de la edad de las larvas procedentes del medio natural. Esta formación del primer microincremento tiene lugar a una distancia media de $6.7 \mu\text{m}$ del núcleo. Una descripción detallada de su morfología será realizada más detenidamente en una publicación específica sobre este punto (Alvarez y Alemany, en preparación).

En las larvas analizadas en este trabajo se pudo observar claramente la formación de microincrementos diarios de 0 a 4 días (Fig. 5), siendo este último día el que se corresponde con la casi total reabsorción del saco vitelino.

Sin embargo, posteriormente no se observaron microincrementos en ninguna de las series de larvas en inanición o alimentadas, bien con zooplancton del medio natural (principalmente nauplius de copépodos) o cultivado (rotífero). Este hecho es coherente con la estabilización en el crecimiento del radio de los otolitos a partir del día 4 reflejado en la Fig. 3.

Desafortunadamente no se han podido observar suficiente número de larvas durante los días 12 y 14 de vida, cuando las larvas alimentadas experimentan un nuevo incremento en sus tasas de crecimiento diario, lo cual debería originar la formación de nuevos microincrementos en sus otolitos. Methot y Kramer (1979), trabajando con larvas de anchoa (Engraulis mordax) comprobaron que, después de observar una detención en la formación de microincrementos debida a severas condiciones de cultivo, una vez repuestas las condiciones óptimas vuelven a incrementar las tasas de crecimiento y a formar microincrementos diarios.

4. DISCUSION

Los datos de crecimiento en longitud aportados en este trabajo son comparables con citas previas de esta especie, si tenemos en cuenta el efecto de encogimiento que se produce en las larvas preservadas con fijadores (Blaxter 1962, Yoneda 1987). Trabajando con ejemplares fijados, Blaxter (1969) y Silva y Miranda (1992) dan una longitud media de eclosión para temperaturas entre 14 y 17°C de 3.5 y 3.39 mm respectivamente, mientras que nuestros datos, referidos a longitudes de larvas en vivo, dan un valor medio de 4.2 mm.

Respecto al peso seco, Blaxter (1969) da un valor medio de 18 μg a día 6 pesando un conjunto de 50 larvas, valor claramente inferior al nuestro de 31.7 μg para la misma edad (referido a larvas pesadas individualmente), diferencia probablemente explicable debido a la metodología utilizada en cada caso.

En cuanto al consumo del saco vitelino, Miranda et al. (1990) en experiencias de desarrollo embrionario y larvario de esta especie a diferentes temperaturas (entre 13 y 20°C) observaron que a 15°C se tardaban 6 días desde el momento de su eclosión, lo cual coincide con los 5-6 días observados en este trabajo a la misma temperatura.

Los valores de crecimiento de las larvas de sardina cultivadas mostraron que, después de la fase de alimentación endógena, sufren un proceso de ralentización o paralización en su crecimiento desde el día 4 al 8, que coincide con el paso a alimentación exógena y por lo tanto a la aclimatación al tamaño y tipo de presa suministrada. Esta ralentización también ha sido observada en larvas capturadas en el mar (Alvarez y Alemany, en preparación), y que se manifiesta en la detección de microincrementos muy finos en los otolitos.

Esta detención del crecimiento no se cita en otros trabajos referidos a especies clupeiformes cultivadas (Hunter, 1976). Una explicación de este hecho podría ser que las condiciones de cultivo con respecto al tamaño y composición de presa no fueron

las más adecuadas, ya que Hunter (1976) ofrece como primera presa para larvas de anchoa (Engraulis mordax) dinoflagelados con un tamaño comprendido entre 40 - 80 μm , mientras que en nuestras experiencias la presa inicial estaba constituida principalmente por nauplius de copépodos o por rotíferos con un tamaño superior a las 80 μm .

A partir del día 10 las larvas alimentadas y en especial las de zooplancton del medio natural experimentan de nuevo un crecimiento progresivo. El hecho de que estas larvas crezcan más que las alimentadas con rotífero podría ser debido a que los copépodos, que constituían la fracción más importante de la presa suministrada, poseen una mejor composición bioquímica en cuanto a ácidos grasos poli-insaturados que la aportada por el rotífero cultivado (Witt et al., 1984).

Aunque las experiencias muestran una mejor respuesta de las larvas a la alimentación basada en zooplancton natural, la longitud media alcanzada a día 14 (6.6 mm) es un valor muy inferior al observado en larvas de la misma edad capturadas en el mar. Alvarez y Alemany (en preparación), dan valores de aproximadamente 15 mm para larvas fijadas de 15 días de edad (estimada a partir de lectura de anillos de crecimiento), capturadas a la altura de la Coruña (NO de España). Esta gran diferencia en longitud induce a pensar que las condiciones de cultivo y/o la alimentación suministrada no fueron las óptimas.

La observación de microincrementos diarios en otolitos de larvas de sardina ha sido validada por Ré (1984) capturando larvas en el mar. En el presente trabajo se confirma el carácter diario de la formación de microincrementos en los otolitos de larvas durante el período de saco vitelino.

La interrupción o ralentización en la formación de microincrementos de naturaleza diaria debida a diversas causas, entre ellas condiciones subóptimas de cultivo, es un hecho conocido en varias especies (McGurk, 1984; Jones y Brothers, 1987). De todos modos el límite de resolución de la técnica aplicada (Campana et al., 1987), no permite asegurar que no se formaran microincrementos anormalmente finos a partir del día 4. Para confirmar este punto se debería recurrir a técnicas de microscopía electrónica de barrido (Jones y Brothers, 1987).

Como conclusión, se estima muy conveniente la realización de nuevas experiencias de alimentación de larvas de sardina en cautividad, para poder llegar así a un mejor conocimiento de los requerimientos nutricionales de las mismas y validar de esta forma las características biológicas y biométricas de la especie.

5. AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a la tripulación del B/O José María Navaz así como al personal de la Planta de Cultivos del Centro Oceanográfico de Vigo por su colaboración en la realización de este trabajo.

6. BIBLIOGRAFIA

- BLAXTER, J.H.S. 1962. Herring rearing- IV. Rearing beyond the yolk-sac stage. Mar. Res. nº1,1-18.
- BLAXTER, J.H.S. 1969. Experimental rearing of pilchard larvae, Sardina pilchardus. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 49: 557-575.
- CAMPANA, S. E.; GAFNE, J. A. AND J. MUNRO. 1987. Otolith microestructure of larval herring (Clupea harengus): image or reality?. Can. J. Fish. Aquat. Sci.; Vol. 44: 1922-1929.
- HUNTER, J. R. 1976. Culture and growth of northern anchovy, Engraulis mordax, larvae. Fishery Bulletin, Vol. 74. nº 1.
- JONES, C. Y E. BROTHERS. 1987. Validation of the otolith increment ageing technique for striped bass, Morone saxatilis, larvae reared under suboptimal conditions. Fishery Bulletin, Vol. 85. nº 2.
- LASKER, R. 1962. Efficiency and rate of yolk utilization by developing embryos and larvae of the Pacific sardine Sardinops caerulea (Girard). J. Fish. Res. Bd. Canada, 19(5): 867-875.
- McGURK. 1984. Ring deposition in the otholits of larval pacific herring, Clupea harengus pallasii. Fishery Bulletin, Vol.82, nº1.
- METHOT Y KRAMER. 1979. Growth of northern anchovy, Engraulis mordax larvae in the sea. Fishery Bulletin, Vol. 77: 413-423.
- MIRANDA, A.; R. M. CAL & J. IGLESIAS. 1990. Effect of temperature on the development of eggs and larvae of sardine Sardina pilchardus Walbaum in captivity. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. Vol. 140: 69-77.
- OLMEDO, M.; J.IGLESIAS, J. B. PELETEIRO, R. FORÉS & A. MIRANDA. 1990. Acclimatization and induced spawning of sardine Sardina pilchardus Walbaum in captivity. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. Vol. 140: 61-67.

- SILVA, A. Y A. MIRANDA. 1992. Laboratory rearing of sardine larvae (Sardina pilchardus Walb.) and early effects of starvation: a preliminary experiment. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. Vol. 8(1).
- RE, P. 1984. Evidence of daily and hourly growth in pilchard larvae based on otolith growth increments, Sardina pilchardus (Walbaum 1792). Cybium 8 (1): 33-38.
- WITT, U.; G. QUANTZ AND D. KUHLMANN. 1984. Survival and growth of turbot larvae Scophthalmus maximus L. reared on different food organisms with special regard to long- chain polyunsaturated fatty acids. Aquacultural Engineering 3, 177-190.
- YONEDA, N. T. 1987. Criação em laboratório de larvas de sardinha-verdadeira Sardinella brasiliensis e estudo dos incrementos diários nos otólitos. Tese Mestrado, Universidade de São Paulo (no publicada) 92 pp.

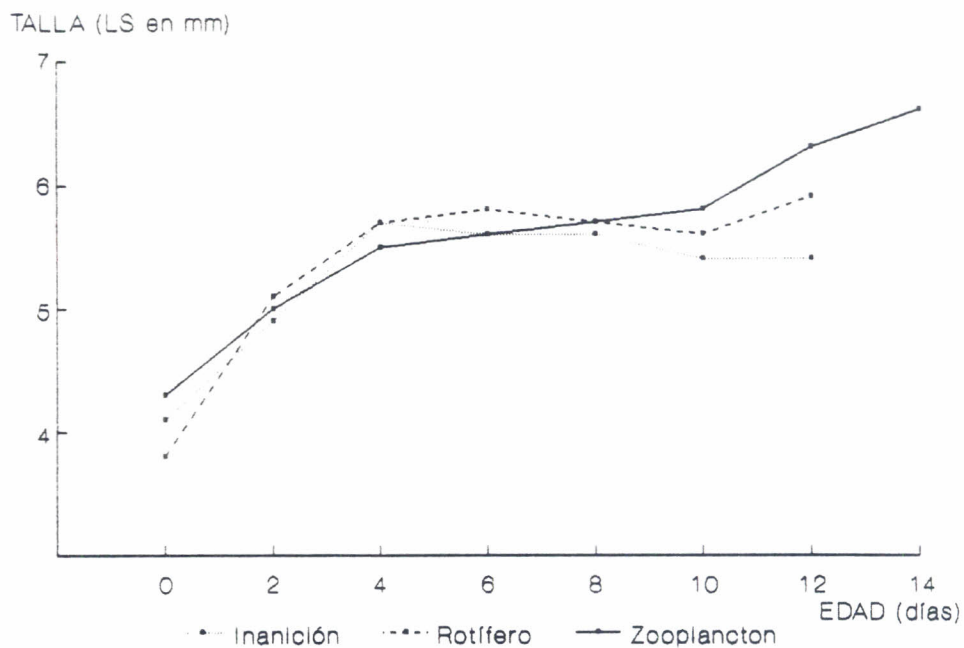


Fig. 1.- Crecimiento en longitud de las larvas de sardina sometidas a diferentes condiciones de alimentación.

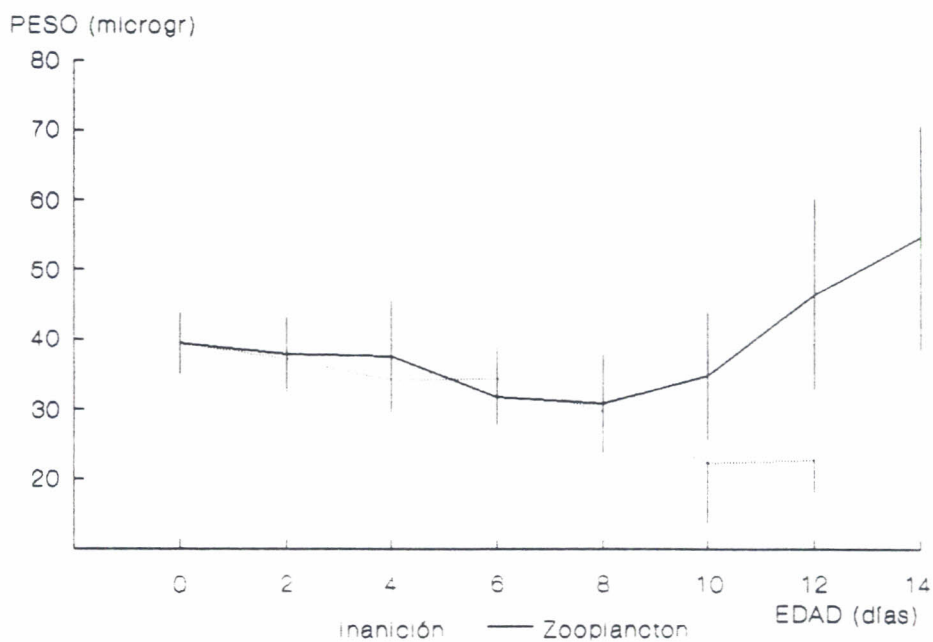


Fig. 2.- Crecimiento en peso seco de las larvas de sardina en inanición y alimentadas con zooplancton natural.

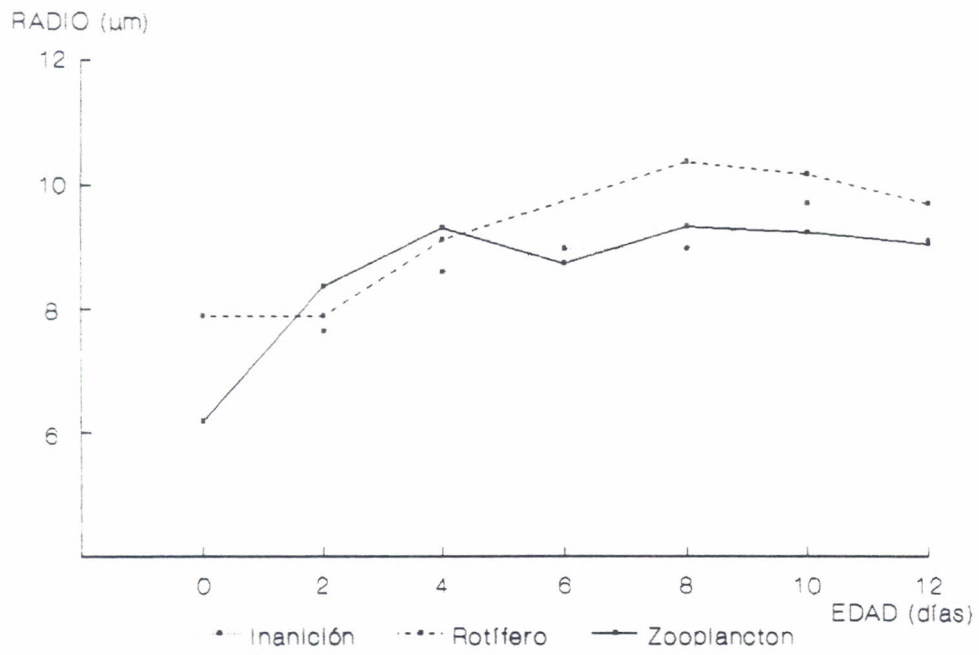


Fig. 3.- Evolución del radio de los otolitos de las larvas de sardina en las experiencias realizadas.

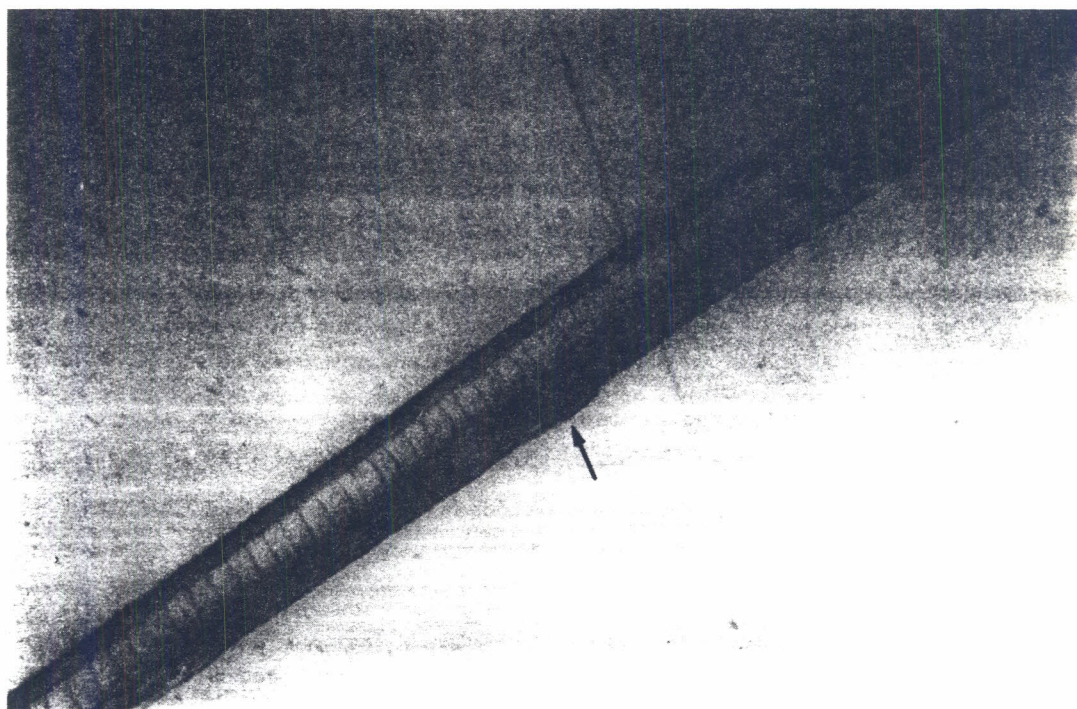


Fig. 4.- Contenido del tubo digestivo de una larva de sardina de 8 días de edad, alimentada con zooplancton natural.



Fig. 5.- Microincrementos diarios en el otolito de una larva de sardina cultivada de 5 días de edad. La flecha indica el primer anillo, que corresponde al día de eclosión.

