



Universidad de León
Departamento de Producción Animal

**Técnicas de alimentación
para la cría la tenca (*Tinca tinca* L.)
durante las etapas larvaria-postlarvaria
y juvenil en condiciones controladas**

**Memoria de Tesis Doctoral presentada por Vanesa García Moreno
dirigida por los Dres. D. Jesús Domingo Celada Valladares y D.
José Manuel Carral Llamazares para acceder al grado de doctor**

León, enero de 2015

Agradecimientos

La realización de esta Tesis no habría sido posible sin la valiosa ayuda de mis Directores, los Dres. **Jesús D. Celada Valladares** y **José M. Carral Llamazares** así como de la Dra. **María Sáez-Royuela Gonzalo**, a todos ellos mi más sincero agradecimiento, no sólo por la formación académica sino también por la confianza depositada en mí y por su ejemplo de trabajo y dedicación. El camino ha sido largo pero gracias a vuestra compañía se ha llevado mejor. Un pedazo de mi vida y de mi corazón se queda para siempre con vosotros. Os voy a echar mucho de menos.

A mi compañera de fatigas y amiga la Dra. **Rocío González López**. A pesar de los años transcurridos las horas compartidas siguen estando muy presentes. Añoro su compañía y las largas jornadas de trabajo juntas. Su responsabilidad, meticulosidad, capacidad de trabajo y esfuerzo son un ejemplo a seguir. Sin duda es una de las mejores personas que esta experiencia ha puesto en mi camino. Mi admiración es total y absoluta.

Al **Ministerio de Educación y Ciencia**, por el soporte económico prestado a través del Proyecto del Plan Nacional de I+D+i AGL2010-16554 “Alimentación de la tenca (*Tinca tinca* L.) durante las etapas larvaria, postlarvaria y juvenil en condiciones controladas”.

A la **Universidad de León** por el soporte económico prestado a través de la concesión de una Beca de Investigación.

A la piscifactoría **Tencas de Casaseca S.L** (Zamora) por su colaboración y abastecimiento de reproductores.

A los **técnicos y oficiales de laboratorio** del Departamento de Producción Animal por los buenos momentos y su ayuda en las labores de mantenimiento de los animales.

A **María García Fernández**, secretaria del Departamento de Producción Animal por su amabilidad y profesionalidad.

A mi compañero y futuro doctor **Álvaro González Rodríguez** por su ayuda y apoyo durante la última temporada.

Al Dipl-Ing. **Pavel Kozák**, Profesor Asociado en “Research Institute of Fish and Hydrobiology”, University of South Bohemia v České Budějovice, Vodňany (República Checa) y al Dr. **Jacek Wolnicki** investigador principal en “Inland Fisheries Institute”, Piaseczno (Polonia) por haberme permitido formar parte de sus equipos de investigación y participar activamente en sus investigaciones. Ambas experiencias fueron sumamente gratificantes y enriquecedoras a nivel profesional pero más aún a nivel personal. Quiero extender estos agradecimientos a todas las personas con las que compartí trabajo y buenos momentos: **Michał Kamiński**, Dr. **Rafał Kamiński**, Dra. **Ewa Kamler**, Dr. **Michał Korwin-Kossakowski** y Dra. **Justyna Sikorska**. Todos ellos me hicieron sentir como en casa, especialmente la secretaria del centro de Polonia y su marido que se desvivieron en atenciones. Para ellos mi más sincero agradecimiento.

A mi mejor amiga, **Leticia Collado** que aún estando a miles de kilómetros siempre tuvo una palabra de aliento, unas risas o un cotilleo que me hiciese desconectar. Porque la distancia no hace siempre el olvido y nuestro destino es ser amigas para siempre.

A **Doma** por sus ánimos, preocupación y apoyo tanto personal como técnico, gracias a él esta Tesis tiene portada y contraportada. Ha sido una pieza fundamental en todo este proceso y aunque la vida nos ha llevado por diferentes caminos espero que al menos se mantengan paralelos. Gracias por los años compartidos, la paciencia y por estar ahí para ayudarme y poner la calma que tan frecuentemente me falta. Siempre ocuparás un pedazo mi corazón.

A **David Sánchez Escalonilla** por haber puesto las risas y la alegría a este último tramo del camino. Sus ocurrencias y apoyo (incluso a altas horas de la noche) le han hecho merecedor de un especial agradecimiento. “Puchu”, no pierdas tu “flow”.

A mis padres **José y María de los Ángeles** y a mi hermano **Abraham**, que son mi mayor riqueza y orgullo, los cimientos y pilares sobre los que se construye mi vida. Sin ellos nada de lo que soy ni lo que he hecho habría sido posible y mucho menos tendría sentido. Son un ejemplo a seguir en todos los aspectos. Gracias por vuestro apoyo, consejos, ánimos, paciencia infinita, por estar ahí para levantarme y empujarme las veces que haga falta. No tengo palabras para agradecer todo lo que hacéis por mí. Os quiero.

A mi tío **Marce**, que me abrió de par en par las puertas de su vida y de su casa. Que me acompaña y cuida sin condición, y siempre está a mi lado aunque no se le vea. Es otro pilar más en mi vida y un orgullo ser su sobrina. Te quiero.

A mis abuelos, los que están (**Natividad y Antonio**) y los que me esperan en un lugar mejor (**Celia y Marcelino**), que les quiero con todo el corazón. A mis tías, tíos, primos y primas... En definitiva, gracias a todas las personas que forman parte de mi vida, por las risas, la alegría, el apoyo, los ánimos, los abrazos, la cercanía, por intentar comprenderme y sobre todo por quererme.

Y por último, quiero agradecer a mi perro **Óliver** su compañía, su lealtad y las mil y una razones que me da cada día para seguir hacia delante.

1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA DE LAS PUBLICACIONES

Durante las últimas décadas, el consumo mundial de productos acuáticos de origen animal ha experimentado un gran aumento, llegando a 19,2 kg per cápita en 2012 (FAO 2014). Ante el previsible incremento de la demanda y el estancamiento del volumen procedente de la pesca (en torno a 60 millones de toneladas desde mediados de los años 80), la acuicultura constituye la única opción viable para solventar el desabastecimiento a largo plazo. Así, la cría de especies acuáticas, excluyendo plantas y productos no alimentarios, ha crecido espectacularmente pasando de cantidades inferiores al millón de toneladas en la década de los 50 del siglo pasado a 66,6 millones en 2012 (FAO 2014). Además, las previsiones de desarrollo del sector sitúan la producción para 2022 en 85 millones de toneladas (FAO 2014).

La producción generada por la acuicultura en aguas continentales constituye más del 60% del total, siendo los ciprínidos, con 25 millones de toneladas, el grupo más relevante (FAO 2014). Entre las numerosas especies que engloba esta familia, la tenca (*Tinca tinca* L. 1758) es especialmente apreciada en gran parte del territorio nacional, principalmente en las comunidades de Castilla y León, Extremadura, Castilla-La Mancha y Andalucía. Además, es considerada “un candidato excelente para la acuicultura española” (IPAC 2006) con grandes posibilidades cara al desarrollo y la diversificación de la acuicultura continental.

Tradicionalmente, la cría de la tenca en nuestro país se realiza en sistemas extensivos o semiextensivos, caracterizados por un escaso control sobre las condiciones ambientales, con rendimientos impredecibles y generalmente insuficientes para satisfacer una demanda creciente. Esto ha conducido al desarrollo de líneas de investigación para la intensificación de las distintas etapas del proceso productivo durante los últimos años.

En investigaciones previas, nuestro grupo ha desarrollado técnicas en la fase reproductiva, transferidas con éxito a centros de producción, que abarcan la maduración, inducción de la ovulación (Carral y cols. 2003, Rodríguez 2003, Rodríguez y cols. 2004), fecundación e

incubación artificial (Rodríguez 2003, Aguilera y cols. 2005, Rodríguez y cols. 2005, 2008, Carral y cols. 2006) permitiendo la obtención de alevines vesiculados, comúnmente llamados larvas, bajo condiciones controladas.

Una vez lograda una aceptable eficiencia en la producción de alevines vesiculados mediante el control de la reproducción, el siguiente paso ha de abordar la mejora de las tasas de supervivencia y de crecimiento hasta ser comercializados bien con fines de repoblación o posterior engorde para consumo humano. Dentro de ello, la alimentación es uno de los factores clave. El alimento proporcionado no sólo debe cubrir los requerimientos nutritivos de la especie, además debe adecuarse a las diferentes fases de su desarrollo. Con la eclosión, se inicia la etapa conocida como larvaria. La ingestión de alimento comienza pasados aproximadamente 5 días, cuando empieza el proceso de cría, que se ha llegado a extender hasta dos meses en condiciones de experimentación (Celada y cols. 2008), incluyendo por tanto el estado postlarvario. En consecuencia, este periodo podría denominarse etapa larvaria-postlarvaria, a la que seguiría la cría de juveniles.

En hábitats naturales, la tenca es carnívora, con una alimentación propia de un depredador (Kennedy y Fitzmaurice 1970). Así lo revelan estudios del contenido del tracto digestivo con la presencia de crustáceos planctónicos y otros invertebrados (Steffens 1995, Pyka 1996, 1997), lo que significa una dieta rica en proteína animal. La falta de conocimientos de nutrición de estos animales, así como la inexistencia de dietas compuestas específicas para la tenca, hace necesaria la búsqueda de soluciones aplicables a corto plazo a los problemas prácticos de la cría, orientadas a una adecuada utilización de alimentos disponibles en el mercado.

Durante la etapa larvaria-postlarvaria, el alimento vivo se considera esencial para obtener unas tasas de supervivencia y de crecimiento aceptables. En este sentido, se han utilizado diferentes especies de zooplancton recolectadas de su hábitat natural (Šestáková y cols. 1989, Hamáčková y cols. 1995, 1998,

Kamler y cols. 1995). No obstante, la dificultad para cultivar zooplancton de agua dulce ha conducido a la búsqueda de alternativas más sencillas. Así, hasta el momento, los mejores resultados se han obtenido con nauplios de *Artemia* vivos, alcanzándose tasas de supervivencia superiores al 80% y un crecimiento aceptable (Wolnicki y Korwin-Kossakowski 1993, Wolnicki y Górný 1995, Wolnicki y cols. 2003a, Celada y cols. 2008).

En la etapa juvenil, los resultados con piensos formulados para otras especies de peces no han sido satisfactorios, habiéndose observado reducido crecimiento (Quirós y Alvaríño 1998, Wolnicki y Myszkowski 1998a, Quirós y cols. 2003, Mareš y cols. 2007), alta mortalidad (Quirós y Alvaríño 1998, Quirós y cols. 2003, Rennert y cols. 2003, Celada y cols. 2009) y un incremento de las deformidades corporales externamente visibles (Rennert y cols. 2003, Kamler y cols. 2006, Wolnicki y cols. 2006, Myszkowski y cols. 2010). Así, estos piensos han de ser combinados con alimento vivo o natural (Quirós y Alvaríño 1998, Wolnicki y cols. 2003b), habiéndose alcanzado los mejores resultados mediante la suplementación con nauplios vivos de *Artemia* (Celada y cols. 2007a, 2009).

La utilización de nauplios de *Artemia* en la cría de peces es una práctica habitual. Sin embargo, la necesidad de instalaciones accesorias y la mano de obra que conlleva su obtención y administración hace interesante la búsqueda de alimentos alternativos capaces de producir similares resultados reduciendo trabajo y costes. En este sentido, los quistes decapsulados de *Artemia* pueden manejarse como una dieta inerte y han sido probados con éxito en larvas y/o juveniles de diferentes especies como la carpa (*Cyprinus carpio*, Vanhaecke y cols. 1990), el pez gato americano (*Ictalurus punctatus*, Weirich y cols. 2000), el guppy

(*Poecilia reticulata*, Lim y cols. 2002) o el goldfish (*Carassius auratus*, Kaiser y cols. 2003). Además de eliminar el coste derivado de las infraestructuras y mano de obra asociado a la obtención de nauplios, los quistes pueden conservarse durante periodos de tiempo cortos (refrigeración) o largos (deseccación, salmuera).

Sobre esta base, las investigaciones para la mejora de la cría de la tenca deben orientarse, por una parte, al estudio de una adecuada utilización de los alimentos disponibles en el mercado y, por otra, a la obtención de información sobre sus requerimientos nutritivos que permita determinar los niveles de nutrientes e ingredientes adecuados para la elaboración de una dieta compuesta específica. La Universidad de León concedió una Beca de Investigación a fin de desarrollar los mencionados objetivos en el marco del proyecto del Plan Nacional de I+D+i ref. AGL2010-16554 "Alimentación de la tenca (*Tinca tinca* L.) durante las etapas larvaria, postlarvaria y juvenil en condiciones controladas". Esta Tesis Doctoral incluye parte de los resultados obtenidos y se presenta en la modalidad de Compendio de Publicaciones. Su contenido es el siguiente:

- Evaluación de posibilidades de uso directo de quistes decapsulados de *Artemia* durante la etapa larvaria-postlarvaria (publicaciones I y II).

- Evaluación de posibilidades de uso directo de quistes decapsulados de *Artemia* durante la etapa juvenil (publicaciones III y IV).

- Formulación y fabricación de una dieta práctica para alimentación durante la etapa juvenil y evaluación de posibilidades de sustitución de harina de pescado por harina de soja (publicación V).

Las cinco publicaciones que sustentan esta Tesis se relacionan en el apartado 2.

2. LISTA DE PUBLICACIONES

- I. **Autores:** Jesús D. Celada, Vanesa García, José M. Carral, María Sáez-Royuela, Rocío González, Álvaro González (2013).
Título: Decapsulated *Artemia* cysts of different quality (high or low hatch-rate) as direct food for tench (*Tinca tinca* L.) larvae.
Revista: Aquaculture Research 44, 167-175.
Factor de impacto (JCR 2013): 1,320

- II. **Autores:** Vanesa García, Jesús D. Celada, José M. Carral, Rocío González, Álvaro González, María Sáez-Royuela (2011).
Título: A comparative study of different preparations of decapsulated *Artemia* cysts as food for tench (*Tinca tinca* L.) larvae.
Revista: Animal Feed Science and Technology 170, 72-77.
Factor de impacto (JCR 2013): 2,086

- III. **Autores:** Vanesa García, Jesús D. Celada, José M. Carral, María Sáez-Royuela, Rocío González, Álvaro González (2010).
Título: Decapsulated *Artemia* cysts: A suitable dietary supplement for juvenile tench (*Tinca tinca* L.).
Revista: Journal of Applied Aquaculture 22, 57-65.

- IV. **Autores:** Vanesa García, Jesús D. Celada, Álvaro González-Rodríguez, José M. Carral, María Sáez-Royuela, Rocío González, Álvaro González (2014).
Título: Evaluation of different qualities and preparations of decapsulated *Artemia* cysts as dietary supplement for juvenile tench (*Tinca tinca* L.).
Revista: Journal of Applied Ichthyology 30, 40-43.
Factor de impacto (JCR 2013): 0,903

- V. **Autores:** Vanesa García, Jesús D. Celada, Rocío González, José M. Carral, María Sáez-Royuela, Álvaro González (2013).
Título: Response of juvenile tench (*Tinca tinca* L.) fed practical diets with different protein contents and substitution levels of fish meal by soybean meal.
Revista: Aquaculture Research DOI: 10.1111/are.12154.
Factor de impacto (JCR 2013): 1,320

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. PRODUCCIÓN DE CIPRÍNIDOS

En el cultivo de especies acuáticas destacan los ciprínidos, primer grupo de peces criados en el mundo, con un aporte de 25,4 millones de toneladas en 2012 lo que supone cerca del 40% del total mundial (FAO 2014).

Entre las numerosas especies que incluye la familia Cyprinidae, las carpas son el grupo con mayor producción, concentrada fundamentalmente en el continente asiático. En 2012 las principales especies criadas fueron carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) con 4.995.219 t, carpa plateada, *Hypophthalmichthys molitrix* (4.139.690 t), carpa común (*Cyprinus carpio*) con 3.563.746 t, carpa cabezona, *Hypophthalmichthys nobilis* (2.895.648 t), carpa india, *Catla catla* (2.761.022 t) y carpín, *Carassius carassius* (2.451.118 t) (FAO 2014).

En Europa, la producción de ciprínidos comprende menor número de especies, principalmente carpa común, plateada y herbívora, y supuso en 2012 el 52,6% de la producción acuícola total del continente, con 242.547 t. Según datos de la FAO (2014), los países productores más destacados son Polonia (19.529 t), República Checa (19.135 t), Hungría (12.255 t), Rumanía (7.445 t estimadas) y Francia (6.700 t estimadas). Aunque otras especies como la tenca aportan volúmenes menores, los principales productores de las 1.100 t obtenidas en el mundo en 2012 se encuentran en el continente europeo, destacando Francia (500 t estimadas), Polonia (200 t estimadas) y República Checa (166 t).

Dentro de los ciprínidos, en España la tenca es, en términos productivos, la especie más relevante. Se cría principalmente en Extremadura y provincias de Castilla y León como Segovia, Zamora y Salamanca, generando una producción de 4 t en 2012 (FAO 2014), probablemente subestimada debido a que, tanto el sistema de cultivo como de comercialización, impiden que una gran parte se incluya en las estadísticas oficiales. Así, en 2002 Alonso y cols. estimaron una producción real en torno a 300 t, que aún resultaba insuficiente para satisfacer la demanda de esta especie, muy apreciada en todo el centro-oeste nacional. La creciente demanda, la necesidad de

diversificación en acuicultura continental y el elevado precio que alcanza en el mercado acrecientan el interés por su cría.

3.2. LA TENCA

La tenca (*Tinca tinca* L. 1758) es un pez de agua dulce que pertenece a la familia de los ciprínidos. Es una especie autóctona de Europa y Siberia, pero en la actualidad está presente en todos los continentes (Freyhof y Kottelat 2008). En la Península Ibérica, se cría principalmente, aunque no de forma exclusiva, en las comunidades de Extremadura y Castilla y León. Su distribución en España está más asociada a las repoblaciones realizadas en cuerpos de agua cerrados del oeste peninsular que a su desarrollo natural en ríos, donde su presencia es más bien escasa.



Tinca tinca (Linnaeus 1758).

3.2.1. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE INTERÉS PRODUCTIVO

El hábitat característico de la tenca son los fondos fangosos de aguas poco profundas, como charcas, estanques, embalses, lagos o ríos de curso lento. Es una especie euriterma capaz de tolerar altas temperaturas, al menos hasta 34°C (Weatherley 1959) y resistir concentraciones de oxígeno relativamente bajas (Coad 1999). El rango óptimo de pH del agua oscila entre 6,5 y 8,0, siendo letales valores por debajo de 4,5-5,0 y por encima de 10,8 (Lukowicz y cols. 1986).

Se considera que alcanza la madurez sexual a los 2-3 años (Kennedy y Fitzmaurice 1970, Lukowicz y cols. 1986, Vetlugina 1992, Steffens 1995, Yilmaz 2002), aunque se ha comprobado que animales de 1 año pueden reproducirse con éxito (Fernández San Juan 1995, Rodríguez y cols. 2004). Presenta un ciclo reproductivo estacional, siendo la temperatura un factor decisivo para el desarrollo gonadal y la puesta, ya que afecta a la secreción de hormonas hipota-

lámicas que regulan la actividad reproductiva (Breton y cols. 1980). En hábitats naturales, la freza puede extenderse desde mayo hasta principios de agosto con temperaturas superiores a 19-20°C. Según Linhart y Billard (1995), entre 22°C y 25°C este proceso tiene una duración entre 6 y 9 semanas, cuando pueden tener lugar de 3 a 4 oviposiciones (Morawska 1984). La producción de huevos por kg de hembra alcanza valores entre 140.000 y 230.000 (Kubů y Kouřil 1985, Pérez-Regadera 1987, Linhart y Billard 1995). Debido a la adhesividad de su cápsula, quedan pegados a la vegetación, donde son fecundados con el semen que los machos vierten simultáneamente. La duración del desarrollo embrionario es de 100-120 grados-día (Schäperclaus 1961, Kennedy y Fitzmaurice 1970, Pérez-Regadera 1987, Rodríguez 2003, Rodríguez y cols. 2005). Tras la eclosión, las larvas transparentes y de unos 5 mm de longitud, permanecen adheridas unos días a la vegetación, alimentándose de las reservas nutritivas almacenadas en su saco vitelino.

La ingestión de alimento exógeno comienza, dependiendo de la temperatura del agua, entre el tercer y el sexto día post-eclosión. Su alimentación se basa en zooplancton, invertebrados, organismos bentónicos, pequeños peces y, ocasionalmente, diversos vegetales. Algunos autores como Blasco y cols. (1992), Sukop y Adámek (1995) y Grozev y cols. (2000) señalan a cladóceros, seguidos de dípteros y copépodos como sus presas preferidas. Por tanto, se puede considerar que es una especie carnívora.

3.3. SITUACIÓN ACTUAL DE LA CRÍA DE LA TENCA

Su cría bajo un sistema tradicional se realiza desde la Edad Media en Europa Central donde, en la actualidad, se cultiva extensivamente asociada a otros ciprínidos como la carpa común o la carpa herbívora. También se ha experimentado su cultivo con siluro europeo, *Silurus glanis* (Duda 1994).

El origen de la tenca en la Península Ibérica ha sido un tema controvertido, existiendo diversas hipótesis sobre su posible introducción. El hallazgo de restos fósiles en yacimientos arqueológicos datados en la Edad del Bronce confirma su presencia en la Península y, por tanto, su origen autóctono. Existen referencias sobre su cría en España desde el siglo XVI asociadas a la afición del Emperador Carlos V

por su pesca y consumo, que motivaron la construcción en el Monasterio de Yuste de un estanque para su reproducción y engorde. En Extremadura, la cría en charcas, como las de El Casar y Brozas (Cáceres), se realiza sin apenas cambios desde su construcción hace tres siglos.

Actualmente, dependiendo del grado de intensificación, los sistemas de cría, se pueden clasificar en: extensivos, semiextensivos, semi-intensivos e intensivos.

Extensivo. Basado exclusivamente en la repoblación periódica con juveniles en cuerpos de agua cerrados y en la recolección de los animales cuando han alcanzado la talla comercial. Se caracteriza por una producción muy variable y de bajo rendimiento. La cosecha normalmente se realiza a finales de verano-principios de otoño, cuando el volumen de agua es menor y los peces están más concentrados, lo que facilita su captura. Esta práctica productiva tradicional no requiere importantes inversiones económicas, pero presenta numerosos inconvenientes derivados de la dependencia de las condiciones meteorológicas y la imposibilidad de control de enfermedades y depredadores.

Semiextensivo. La reproducción y el posterior engorde de los alevines se realizan en el mismo lugar, pero existe un aporte suplementario de alimento. Este tipo de cría está muy extendido en Extremadura y se realiza en la mayor parte de las explotaciones de tenca registradas.

Semiintensivo. A diferencia del anterior, la fase reproductiva y de engorde se separan, utilizándose dos tipos de estanques en el proceso. Para la reproducción se utilizan estanques con macrovegetación sumergida (*Myriophyllum* sp, *Potamogeton* sp, *Ceratophyllum* sp, etc.) sobre la que los reproductores realizan la freza. Cuando los alevines alcanzan entre 3 y 5 cm, se trasladan a estanques de engorde, caracterizados por una alta producción de fito y zooplancton, donde se mantienen hasta su extracción para la venta. En ocasiones, se realiza un aporte de alimento suplementario a la alimentación natural (Fotografía 1).

Intensivo. Su objetivo es lograr una elevada producción en el menor espacio y tiempo posibles, mediante el control de los factores con influencia en la reproducción y posterior engorde.



Fotografía 1. Cultivo semiintensivo, Casaseca de las Chanas (Zamora).

Respecto a la reproducción, se han desarrollado técnicas eficientes que garantizan la obtención de larvas de tenca bajo condiciones controladas. Sin embargo, la cría posterior de estos animales se encuentra limitada por la escasa información de los requerimientos nutritivos y sobre una alimentación adecuada. Por ello, su cultivo en condiciones intensivas no es factible en la actualidad y únicamente la investigación podría aportar conocimientos que lo hagan posible.

3.4. ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN EN LA CRÍA DE LA TENCA

La cría de tenca se realiza desde hace siglos en sistemas extensivos que han evolucionado, en el mejor de los casos, hacia una mayor intervención en las condiciones y manejo de los estanques de tierra. Los bajos y, frecuentemente, impredecibles rendimientos en estas circunstancias han impulsado el desarrollo de investigaciones para su intensificación.

A continuación, se expone un breve resumen de los niveles actuales de conocimiento en los principales aspectos estudiados.

3.4.1. Fase Reproductiva

Su objetivo es la obtención de alevines vesiculados (larvas) tras la eclosión de los huevos.

Los avances conseguidos en esta etapa han permitido la puesta a punto de técnicas de reproducción artificial, que comprenden el control del desarrollo gonadal de los reproductores, la inducción de la ovulación, la obtención de gametos, la fecundación e incubación artificial y la recogida de larvas.

• Desarrollo gonadal de los reproductores e inducción de la ovulación

El desarrollo gonadal de la tenca suele tener lugar en estanques de tierra donde el control y manejo de los reproductores está fuertemente limitado. Los estudios realizados por Carral y cols. (2003) y Rodríguez y cols (2008) demostraron la posibilidad de conseguir un adecuado desarrollo ovárico y testicular manteniendo los reproductores en tanques de cemento o de fibra de vidrio, donde es posible ejercer un mayor control y estimar mediante los grados por día acumulados el momento adecuado para la inducción de la ovulación.

En los primeros ensayos de inducción de la ovulación se utilizó extracto deshidratado de pituitaria de carpa (Pokorný 1974, Brylinski y Pyka 1976, Kouřil y Chábera 1976, Horváth 1977), a dosis entre 3 y 15 mg/kg peso vivo. Posteriormente, se comprobó la eficacia de los análogos sintéticos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH_a) de mamíferos y salmó-

nidos que, administrados a dosis entre 5 y 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, permitieron obtener porcentajes de ovulación por encima del 80% (Kouřil y Barth 1981, Kouřil y cols. 1983, 1986, 1989, 1994, Kouřil y Hamáčková 1996, Barth y cols. 1997, Kouřil 1998). Aunque los machos son capaces de producir semen sin necesidad de tratamiento hormonal, es posible inducir y prolongar el periodo de espermiación administrando análogos de GnRH de mamíferos (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) o de salmónidos (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Linhart y cols. 1991, 1995, Linhart y Billard 1995).

El momento idóneo para extraer los gametos depende, además del producto hormonal utilizado, de la temperatura del agua y, por ello, de los grados-hora transcurridos desde su administración (Barth y cols. 1997, Kouřil 1998). Nuestro equipo de investigación definió la duración de este periodo para diferentes temperaturas tras la administración de LH-RH α vía intramuscular a dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

• Obtención de gametos y fecundación

La extracción de ovocitos se realiza mediante masaje abdominal previa anestesia y secado de las hembras. Debe evitarse su contacto con el agua, ya que se hidratan y, transcurridos 2 minutos, desaparece la comunicación entre el micropilo y el ooplasma, impidiendo la penetración del espermatozoide y la fecundación (Geldhauser 1992). El semen de los machos, que puede obtenerse mediante masaje abdominal o por succión con un catéter introducido a través del poro genital, se vierte sobre los ovocitos en relación 0,4 ml/100g de huevo (Kouřil y cols. 1976, Linhart y Kvasnička 1992, Linhart y Billard 1995). Tras la mezcla de los gametos, se dejan reposar 3 minutos para que tenga lugar la fecundación. Posteriormente, es necesario eliminar la sustancia adherente presente en la superficie de los huevos, con objeto de evitar la formación de agregados que dificulten una adecuada oxigenación durante el proceso de incubación (Kouřil y cols. 1976, Linhart y Kvasnička 1992, Linhart y Billard 1995). Entre las diferentes sustancias empleadas, como la solución Woynarovich (Woynarovich y Woynarovich 1980), taninos (Billard y Marcel 1980, Lukowicz y cols. 1986, Carral y cols. 2006), talco (Kouřil y cols. 1976, Peñaz y cols. 1981), leche y arcilla (Kouřil y cols. 1976, Peñaz y cols. 1989, Linhart y Kvasnička 1992, Hamáčková y cols. 1995, Kamler 1995, Linhart y Billard 1995), resulta recomendable el uso de la enzima alcalasa (Linhart y cols. 2000, Linhart y cols. 2003, Gela y cols. 2003), tanto por redu-

cir el tiempo de tratamiento como por su eficacia. En este sentido, Carral y cols. (2006) definieron la dosis y tiempo de actuación que permite la eliminación de adhesividad sin afectar al desarrollo embrionario ni al posterior desarrollo larvario.

• Incubación artificial y recogida de alevines vesiculados

En la incubación artificial se emplea el sistema de botellas tipo Zug-Weis (Fotografía 2) diseñadas para carpa (Kouřil y cols. 1976, Linhart y Kvasnička 1992, Linhart y Billard 1995). Se provoca un flujo ascendente que imprime un ligero movimiento rotacional a los huevos, cuya densidad en las botellas puede oscilar en torno a 20.000-30.000/litro (Horváth y cols. 1992). La embriogénesis es relativamente rápida y depende principalmente de la temperatura. Así, a 22,5°C las eclosiones tienen lugar a los 45 grados-día y a 24,5°C a los 37 grados-día (Rodríguez y cols. 2004).



Fotografía 2. Sistema de botellas tipo Zug-Weis.

Para Aguilera y cols. (2005), tasas de eclosión entre 25% y 50% son normales tanto en condiciones de laboratorio como de cultivo. En este sentido, Carral y cols. (2006) alcanzaron una tasa de eclosión de 46,8% con huevos previamente sometidos a un tratamiento de eliminación de adhesividad con alcalasa.

Las larvas recién eclosionadas se recogen por rebosamiento o sifonado y se mantienen en depósitos hasta el inicio de la alimentación exógena (5º día post-eclosión).

3.4.2. Etapas larvaria-postlarvaria y juvenil

• Temperatura

Se han establecido diferentes rangos de temperatura óptima según las etapas de desarrollo de la tenca. Así, a partir del inicio de la alimentación exógena y hasta 8 semanas de vida se encuentra entre 22°C y 28°C (Peñáz y cols. 1989, Korwin-Kossakowski y Jezierska 1984, Aguilera 2004) y en la etapa juvenil entre 24°C y 30°C (Backiel 1986).

Puesto que temperaturas elevadas pueden afectar negativamente a la calidad del agua, se considera adecuado en ambas etapas un rango térmico de 22-26°C que coincide, aproximadamente, con el de la época de crecimiento en condiciones naturales.

• Densidad

En estudios realizados en condiciones controladas durante la etapa larvaria-postlarvaria y enfocados principalmente a la alimentación, se han utilizado densidades de 200 (Hamáčková y cols. 1995), 66 (Hamáčková y cols. 1998), 60 (Wolnicki y Korwin-Kossakowski 1993, Wolnicki y Górný 1995) y 45 larvas/litro (Wolnicki y cols. 2003a). En ensayos específicos sobre los efectos de la densidad en la cría larvaria-postlarvaria, se han probado concentraciones iniciales entre 20 y 320 animales/litro (Celada y cols. 2007b). Con densidades entre 20 y 100 animales/litro no se han evidenciado diferencias significativas de supervivencia ni de crecimiento.

En la etapa juvenil, Celada y cols. (2007a) no registraron efectos perjudiciales para los animales cuando se mantuvieron a densidades iniciales entre 0,18 y 16,5 gramos de peso vivo/litro.

En general, el crecimiento individual ha sido mayor con bajas densidades mientras que la biomasa obtenida por unidad de volumen ha sido muy superior con las densidades más altas. Ambos factores han de combinarse en función de las circunstancias y bajo la premisa de que densidades altas implican un mayor trabajo de limpieza y riesgo frente a cualquier eventualidad.

• Abastecimiento de agua

Es creencia generalizada que la tenca puede soportar circunstancialmente bajos nive-

les de oxígeno e incluso es capaz de tolerar concentraciones relativamente altas de algunos compuestos tóxicos (Freyhof y Kottelat 2008). Por ello, no es necesario aportar grandes volúmenes de agua comparado con otras formas de acuicultura. Sin embargo, es aconsejable aportar agua de buena calidad en cantidad suficiente para mantener los parámetros físico-químicos dentro de rangos tolerables por los animales.

• Fotoperiodo

Existe una gran variabilidad interespecífica en la receptividad de los peces a los cambios de la luz. Así, la mayoría de las especies muestran diferente actividad de alimentación en relación con el ciclo diario de alternancia de luz/oscuridad (Boujard 2004). En la tenca, la escasa información disponible sugiere la existencia de diferencias en la actividad de alimentación dependiendo de la edad (Pyka 1997). Mientras los adultos de tenca se considera que tienen hábitos estrictamente nocturnos (Siegmund 1969, Herrero y cols. 2003), durante las primeras etapas de vida (menos de 100 días) muestran una intensa actividad en horas diurnas (Pyka 1997). Los estudios realizados por Carral y cols. (2014) aportan la primera información acerca de los efectos del fotoperiodo en la etapa juvenil. Las altas tasas de supervivencia obtenidas con los fotoperiodos probados apoyan la idea de que los juveniles de tenca son capaces de adaptarse a condiciones extremas de luz (oscuridad o luz continua); sin embargo, el crecimiento fue afectado negativamente en estas condiciones. El mayor crecimiento y el índice de conversión del alimento más bajo se observaron con el fotoperiodo natural extendido (16 h luz/8 h oscuridad), que coincide con el fotoperiodo natural en la estación de crecimiento de la tenca.

• Alimentación

La tenca es carnívora (Kennedy y Fitzmaurice 1970). Los estudios del contenido del tracto digestivo revelan una ingestión de crustáceos planctónicos y otros invertebrados (Steffens 1995, Pyka 1996, 1997), lo que significa una dieta rica en proteína animal.

Respecto a la mejora de las técnicas de cultivo, cabe destacar que los conocimientos de nutrición son muy escasos, por lo que no existen dietas compuestas específicas para la tenca y aquellas formuladas para otras especies de peces son inadecuadas como único alimento tanto para la cría larvaria como para juveni-

les. Otro ciprínido, la carpa común (*C. carpio*), es la especie zoológicamente más próxima con un cierto nivel de conocimientos (Guillaume y cols. 2004), que ha permitido la formulación de dietas compuestas específicas. Sin embargo, los piensos comerciales para la carpa no son apropiados para la tenca, ni en la cría larvaria (Wolnicki y Korwin-Kossakowski 1993, Wolnicki y Górný 1995) ni en la etapa juvenil (Wolnicki y Myszkowski 1998a, Wolnicki y cols. 2003b, Kamler y cols. 2006).

Bajo condiciones controladas, Šestáková y cols. (1989), Hamáčková y cols. (1995, 1998) y Kamler y cols. (1995) comprobaron que el zooplancton de pequeño tamaño tipo *Brachionus* spp., *Asplanchna* spp., *Bosmina* spp. y *Chydorus* spp. capturado en estanques era adecuado para la etapa larvaria. Sin embargo, la estacionalidad en la producción y las dificultades que su cultivo y recolección conllevan han hecho aconsejable la búsqueda de otras opciones. En este sentido, se han utilizado con éxito nauplios de *Artemia* vivos como único alimento (Wolnicki y Myszkowski 1998b, Fleig y cols. 2001, Wolnicki y cols. 2003a, Carral y cols. 2006, Celada y cols. 2007b) abarcando un periodo máximo de 30 días. Posteriormente, Celada y cols. (2008), en un estudio de 60 días, evidenciaron la posibilidad de combinar nauplios con dietas compuestas de arranque para otras especies.

En la etapa juvenil, la utilización de dietas compuestas formuladas para otras especies, generalmente salmónidos o carpa, presenta serios inconvenientes, tales como altas mortalidades (Quirós y Alvaríño 1998, Quirós y cols. 2003, Rennert y cols. 2003, Celada y cols. 2009), crecimiento excepcionalmente lento (Quirós y Alvaríño 1998, Wolnicki y Myszkowski 1998a, Quirós y cols. 2003, Celada y cols. 2009) y alta incidencia de deformaciones corporales (Rennert y cols. 2003, Kamler y cols. 2006, Wolnicki y cols. 2006), que han sido relacionadas con un excesivo aporte de alimento inadecuado (Kamler y cols. 2006). Se ha demostrado que la adición de alimento natural, como *Daphnia* sp. (Quirós y Alvaríño 1998) o larvas de insectos (Wolnicki y cols. 2003b) a dietas secas mejora los resultados, que han alcanzado máximos mediante la suplementación con nauplios vivos de *Artemia* (Celada y cols. 2007a, 2009).

Sin embargo, la necesidad de instalaciones accesorias y la mano de obra derivada de la obtención de nauplios y su posterior administración en los tanques de cría han conducido a la búsqueda de alternativas. En este sentido,

Aguilera (2004) probó 3 reemplazantes de *Artemia*: ArteMac (100-200 μ m), INVE LANSY's (150-300 μ m) y Salt Creek (100-200 μ m) durante la etapa larvaria-postlarvaria, obteniendo tasas de supervivencia (32-56%) y crecimientos inferiores a los alcanzados en animales alimentados con nauplios. En la etapa juvenil, los reemplazantes tampoco han proporcionado resultados satisfactorios, observándose una disminución del porcentaje de supervivencia y del crecimiento cuando se utilizaron como único suplemento de una dieta seca (Aguilera 2004) o combinados con alimento vivo (Sáez-Royuela y cols. 2008).

Respecto a la incidencia de deformidades corporales en juveniles, Kamler y cols. (2006), y Myszkowski y cols. (2010) han sugerido una posible relación entre el uso de dietas comerciales para otras especies y altos valores del factor de condición (1,3-1,4). De este modo, los juveniles con rápido crecimiento tendrían mayor probabilidad de presentar deformidades corporales (Rennert y cols. 2003, Kamler y cols. 2006, Myszkowski y cols. 2010). Para evitar este problema, Kamler y cols. (2006) recomiendan dosis diarias por debajo de la saciedad (hasta el 2,5% de la biomasa).

En los estudios realizados tanto en la etapa larvaria-postlarvaria como en la juvenil, únicamente Celada y cols. (2007a, 2007b, 2008, 2009) han cuantificado los aportes de alimento vivo.

Generalmente, el alimento se ha administrado manualmente y en horas de luz, coincidiendo con su mayor actividad ingestiva (Carral y cols. 2014), con frecuencias que, habitualmente, han sido establecidas a priori, con tendencia a un elevado número de aportes diarios. Con objeto de reducir el trabajo de alimentación, Celada y cols. (2007b, 2008) con un solo aporte al día obtuvieron, en la cría larvaria-postlarvaria, tasas de crecimiento comparables o superiores a las registradas por otros autores (Wolnicki y Myszkowski 1998b, Fleig y cols. 2001, Wolnicki y cols. 2003a) con frecuencias de 6 veces en 12 horas o continuamente durante 14 horas al día. De igual modo, con un solo aporte al día en la etapa juvenil, Celada y cols. (2007a, 2009) han igualado, e incluso superado, las tasas de crecimiento obtenidas por otros autores (Quirós y Alvaríño 1998, Quirós y cols. 2003, Wolnicki y cols. 2003b) con aportes de 5 veces diarias y superiores. No obstante, nuestro equipo de investigación ha comprobado que una frecuencia de alimentación de 4 veces/día es adecuada tanto en la etapa larvaria-postlarvaria (Celada y cols. 2013) como en la etapa juvenil.

3.4.3. Perspectivas de futuro

Considerando el nivel actual de conocimientos, la cría en condiciones controladas desde el inicio de la ingestión de alimento hasta la talla comercial con fines de repoblación o engorde para consumo humano presenta problemas que lastran el desarrollo de la producción intensiva de la tenca. Por ello, es prioritario

establecer condiciones que garanticen una alta supervivencia y aceptable crecimiento, incidiendo especialmente sobre la alimentación. En este sentido, los estudios deben orientarse hacia el establecimiento de programas de alimentación que permitan el uso de alimento natural, fundamentalmente *Artemia*, solo o combinado con piensos disponibles en el mercado como paso previo a la formulación de dietas específicas para la tenca.

4. OBJETIVOS

La finalidad de esta Tesis Doctoral es la mejora de las técnicas de cría de la tenca durante las etapas larvaria-postlarvaria y juvenil, principalmente orientada al estudio de condiciones óptimas de alimentación y la evaluación de diferentes alimentos tanto comerciales como de elaboración propia, cara a la progresiva intensificación de su cría. Concretamente, los objetivos son:

- Evaluación de posibilidades de uso directo de quistes decapsulados de *Artemia* durante la etapa larvaria-postlarvaria (estudios I y II).
- Evaluación de posibilidades de uso directo de quistes decapsulados de *Artemia* durante la etapa juvenil (estudios III y IV).
- Formulación y fabricación de una dieta práctica para la etapa juvenil y evaluación de posibilidades de sustitución de harina de pescado por harina de soja (estudio V).

Estos objetivos se encuentran en el marco del proyecto del Plan Nacional de I+D+i “Alimentación de la tenca (*Tinca tinca* L.) durante las etapas larvaria, postlarvaria y juvenil en condiciones controladas” referencia AGL2010-16554. Además, están perfectamente adecuados a las prioridades del VI Plan Nacional de I+D+i, Área de Ciencias y Tecnologías Agroalimentarias y Medioambientales. Para su desarrollo, la Universidad de León concedió una Beca de Investigación.

5. MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES

5.1. ANIMALES, INSTALACIONES Y PROCEDIMIENTO BÁSICO DE EXPERIMENTACIÓN

Los estudios que componen esta Tesis se realizaron en las instalaciones y laboratorios de acuicultura del Departamento de Producción Animal de la Universidad de León, radicado en la Facultad de Veterinaria. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de León.

La especie objeto de estudio fue el ciprínido *Tinca tinca* (Linneo, 1758). Los animales utilizados se obtuvieron en las mencionadas instalaciones mediante técnicas de reproducción artificial aplicadas a reproductores procedentes de piscifactoría. Cada año, machos y hembras se trasladaban desde la piscifactoría y se mantenían en condiciones controladas de luz y temperatura hasta completar el desarrollo gonadal. Entonces, se sometía a las hembras a un proceso de inducción hormonal inyectando intramuscularmente una dosis de 20 µm/Kg de LH-RHa (Gly10, [D-Ala6] LH-RH-Ethylamida, Sigma. Chemical Co.). La obtención de gametos se realizaba mediante masaje abdominal. Los ovocitos procedentes de varias hembras se fecundaban con semen de varios machos, empleando agua como medio de activación. Tras 5 minutos de reposo, los huevos se trataban con una solución de enzima alcalasa para reducir su adherencia. Posteriormente, se incubaban en botellas invertidas de 3,5 litros de capacidad (Fotografía 3) a una temperatura de 25°C. Aproximadamente 36 horas después de la fecundación, tenía lugar la eclosión (Fotografía 4). Los animales recién eclosionados se recogían en recipientes cilíndricos de 20 cm de diámetro y fondo de malla planctónica de 250 µm donde permanecían hasta el 4º día post-eclosión.



Fotografía 3. Sistema de incubación artificial.

Los ensayos se realizaron durante 4 años consecutivos. En total, se llevaron a cabo 8 experimentos:

- Etapa larvaria-postlarvaria: 5 pruebas de 30 días de duración iniciadas con animales de 5 días de edad (comienzo de la alimentación exógena).
- Etapa juvenil: 2 pruebas de 120 días y 1 de 90 días de duración iniciadas con juveniles de 5 meses de edad.

En los experimentos realizados durante la etapa larvaria-postlarvaria, los animales se contaron uno a uno el 4º día post-eclosión y se distribuyeron a razón de 500 larvas/tanque.



Fotografía 4. Larvas recién eclosionadas.

En los experimentos de la etapa juvenil, los animales se mantuvieron desde el 5º día post-eclosión en tanques circulares de 2.500 litros situados en un patio exterior, cubiertos parcialmente con planchas de poliestireno extruido WALLMATE CW para procurar condiciones de tranquilidad. La alimentación consistió en nauplios de *Artemia* y pienso formulado para otras especies piscícolas. Transcurridos 5 meses, se distribuyeron a una densidad de 1g/l (25 g en cada tanque) para comenzar el correspondiente ensayo.

Las instalaciones de experimentación se encuentran distribuidas en tres recintos. En cada uno, se dispone de depósitos de fibrocemento para la recepción y el tratamiento del agua, así como de tanques de fibra de vidrio aglomerada con resina poliéster de diferentes dimensiones para el mantenimiento de los animales (Fotografía 5). Para la realización de las pruebas se utilizaron 24 tanques de 60x32x30 cm, provistos de una salida de agua equipada



Fotografía 5. Instalaciones donde se realizaron los experimentos.

con un filtro de malla planctónica de 200 o 250 μm , para evitar tanto la pérdida de animales como de alimento.

Las instalaciones se abastecían con agua de un pozo artesiano, cuyos parámetros de calidad se analizaron periódicamente en el laboratorio de la Oficina Municipal del Consumidor del Ayuntamiento de León, complementados por mediciones efectuadas en nuestro laboratorio. Los valores medios de las características físico-químicas más relevantes del agua a la entrada de las instalaciones de experimentación fueron:

- pH = 8,1
- Dureza total = 5,2° dH (calcio = 32,3 mg/l)
- Sólidos totales en suspensión = 39,7 mg/l
- Sólidos disueltos totales = 108,5 mg/l
- Conductividad = 145 $\mu\text{s/cm}$

Semanalmente se efectuaban mediciones de oxígeno disuelto, de amonio y de nitritos del agua donde se encontraban los animales. Las medidas de oxígeno se realizaron con un oxímetro Hach Sension6 (valores en torno a 7 mg/l, mínimo 5,8 mg/l; máximo 8 mg/l). Amonio y nitritos fueron medidos con un fotómetro Pocket Lasa Aqua (amonio < 0,02 mg/l y nitritos < 0,05 mg/l).

El régimen de circulación del agua fue, en todos los casos, en sistema abierto con un aporte independiente en cada tanque.

Las temperaturas del agua en los diferentes ensayos estuvieron entre 23°C y 26,5°C. Para ello, se usaron resistencias de 3.200 W, blindadas y conectadas a sus correspondientes termostatos. La temperatura se registró diariamente con termómetros de máxima-mínima en los tanques que contenían los animales.

Durante las pruebas, los tanques se limpiaron manualmente mediante sifonado 3-4 veces por semana. Tras la finalización de cada experimento, se desinfectaban y se dejaban en seco.

5.2. ALIMENTACIÓN

Los aportes de alimento se hacían manualmente con diferentes productos según la edad y el tipo de prueba.

5.2.1. Alimentación durante la etapa larvaria-postlarvaria

Se suministraron diferentes formas y calidades del crustáceo *Artemia*:

- Nauplios Instar I.
- Quistes decapsulados con alto porcentaje de eclosión frescos o conservados (en salmuera o mediante desecación).

- Quistes decapsulados frescos con bajo porcentaje de eclosión.

La decapsulación de quistes y la obtención de nauplios se realizaron de acuerdo con el método descrito por Van Stappen (1996). En todos los casos, los nauplios se obtuvieron de quistes decapsulados de alta calidad (alto porcentaje de eclosión: 86%).

Se cuantificaron las cantidades de nauplios o de quistes aportados por larva y día, que se incrementaban semanalmente, comenzando con 60/larva/día y finalizando el día 30 con 900/larva/día.

5.2.2. Alimentación durante la etapa juvenil

Se utilizaron dos piensos comerciales formulados y fabricados para otras especies piscícolas:

- Pienso para alevines de trucha (Nutra AminoBalance™, Skretting, Trouw España S.A., Cojobar, E-09620, Burgos, España). Composición analítica según el fabricante: proteína bruta 54%, grasa bruta 18%, cenizas brutas 12%, celulosa bruta 0,08%, fósforo total 1,8%, vitamina A 10.000 UI/kg, vitamina D3 1.500 UI/kg, vitamina E 150 mg/kg.
- Pienso para alevines de carpa (Aller Futura Starter feed, Aller Aqua, Allervej 130 - DK-6070, Christiansfeld, Dinamarca). Composición analítica proporcionada por el fabricante: proteína bruta 64%, grasa bruta 12%, NFE 5%, fibra 0,5%, cenizas 11%, fósforo total 1,8% vitamina A 10.000 UI/kg, vitamina D3 800 UI/kg, vitamina E o α -tocoferol acetato 300 mg/kg.

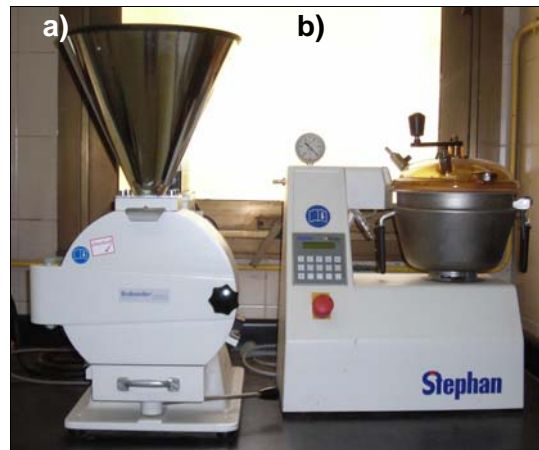
Como suplemento de las dietas secas comerciales se utilizaron diferentes formas y calidades del crustáceo *Artemia* (Fotografía 6).



Fotografía 6. Nauplios Instar I de *Artemia*.

Posteriormente, tomando como base los resultados obtenidos y con referencias de requerimientos nutricionales de otras especies carnívoras, se formularon 9 dietas prácticas con tres contenidos de proteína (50%, 40% y 30%) y tres niveles de sustitución de proteína

de origen animal por proteína de origen vegetal (0%, 25% y 45%). Los ingredientes de las dietas se pesaron, se molieron con un molino rotatorio Brabender (Fotografía 7a), se mezclaron en una mezcladora Stephan UMC5 (Fotografía 7b) y se extruyeron con una máquina extrusora Brabender E19/25D (Fotografía 8) en un rango de temperaturas entre 75°C y 90°C. Los pellets se secaron durante 24 horas a 30°C y, antes de ser almacenados a 4°C, recibieron un baño de aceite de hígado de bacalao.



Fotografía 7. a) Molino Brabender b) Mezcladora Stephan UMC5.



Fotografía 8. Equipo de extrusión Brabender E19/25D.

5.3. ANÁLISIS QUÍMICO DE QUISTES, NAUPLIOS Y DIETAS SECAS

Durante el desarrollo de los experimentos, se tomaron muestras de quistes y de nauplios de *Artemia*, así como de las dietas prácticas y del pienso comercial de carpa para analizar su composición.

Las muestras se almacenaban a -30°C hasta su análisis que, en todos los casos, se realizó por duplicado. El contenido de macronutrientes de dietas y animales fue analizado según las normas de la Organización Internacional de Normalización:

- Humedad: ISO R-1442 (ISO 1979).
- Proteína: ISO R-937 (ISO 1978).
- Lípidos: ISO R-1443 (ISO 1973).
- Cenizas: ISO R-936 (ISO 1998a).
- Energía: ISO 9831 (ISO 1998b).

El contenido de hidratos de carbono se obtuvo por diferencia, restando el contenido de humedad, proteína, lípidos y cenizas del peso total.

En el estudio V, se analizaron aminoácidos no esenciales y los diez aminoácidos esenciales para peces (Takeuchi y Murakami 2007) presentes en las dietas prácticas. Para ello, se realizó una cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) usando el método de AccQ-Tag de Waters. Los aminoácidos fueron derivatizados con el reactivo 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) por el método de Cohen y Michaud (1993) y Cohen y De Antonis (1994), y fueron detectados por el detector de absorbancia dual Waters 2487 a 254 nm. La cuantificación se llevó a cabo con el software Empower Pro 2.0 de Waters.

5.4. RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS

Al final de cada experimento, se cuantificaron los resultados mediante el registro de los siguientes parámetros:

- Número de supervivientes.
- Longitud total.
- Peso individual.
- Número de animales con deformidades externamente visibles. Para detectarlos, se observaban uno por uno todos los peces usando una lupa.

Con los resultados obtenidos de los experimentos, se calcularon los siguientes índices:

- Porcentaje de supervivencia.
- Tasa de crecimiento específico (TCE), expresa el crecimiento diario en forma de porcentaje según la fórmula: $(\text{LnPeso final (g)} - \text{LnPeso inicial (g)})100/\text{días}$.

- Índice de conversión del alimento (IC) = $\frac{\text{Alimento suministrado (g)}}{(\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)})}$.
- Factor de condición (K) = $\frac{\text{Peso (mg)}}{\text{Longitud total (mm)}^3}$.
- Porcentaje de peces deformes.

La longitud total de cada individuo se midió con un calibre digital Mitutoyo ($\pm 0,01$ mm) y el registro del peso se realizó según la precisión requerida con las balanzas Cobos M-150-SX ($\pm 0,001$ g) y Mettler Toledo Classic AB104-S ($\pm 0,0001$ g), previa eliminación del agua retenida con papel absorbente (Fotografía 9). A fin de facilitar las mediciones, los animales se anestesiaron con metasulfato de tricafina (MS-222) a la dosis de 0,1 g/l. Una vez finalizado el registro de datos se devolvieron a sus correspondientes tanques. No se observaron muertes derivadas de este manejo.

Diariamente, se inspeccionaban cuidadosamente los tanques para verificar el correcto mantenimiento de las condiciones de experimentación, así como para retirar y anotar los animales muertos.

En los distintos ensayos, se establecieron 3 réplicas por tratamiento (un tanque por cada réplica). Para la realización de los estudios estadísticos, se utilizó el programa SPSS (SPSS Inc. Chicago, Ill., USA). Las comparaciones entre los tratamientos de los diferentes experimentos se realizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA). En su caso, la comparación de medias se llevó a cabo por el método Newman-Keuls con unos niveles de significación de $P < 0,01$ o $P < 0,05$ según los casos. Los porcentajes fueron transformados al arcoseno previamente a los análisis estadísticos. El cálculo de las medias en cada tratamiento se acompaña de \pm E.E.M. (error estándar de la media).



Fotografía 9. Registro de la longitud y el peso.

6. SECUENCIA DE EXPERIMENTACIÓN

ETAPA LARVARIA-POSTLARVARIA

6.1. ESTUDIO I: EVALUACIÓN DE QUISTES DECAPSULADOS DE *Artemia* DE DIFERENTE CALIDAD COMO ALIMENTO DURANTE LA ETAPA LARVARIA-POSTLARVARIA DE LA TENCA

Decapsulated *Artemia* cysts of different quality (high or low hatch-rate) as direct food for tench (*Tinca tinca* L.) larvae

Jesús D. Celada, Vanesa García, José M. Carral, María Sáez-Royuela, Rocío González, Álvaro González

2013

Aquaculture Research 44, 167-175

6.1.1. Planteamiento experimental

La cría de la tenca se encuentra condicionada por la falta de conocimientos para el desarrollo de la etapa inicial de cría larvaria-postlarvaria, que comienza con el inicio de la alimentación exógena. En este sentido, es fundamental proporcionar un alimento capaz de cubrir las necesidades nutricionales de las larvas y de un tamaño adecuado a su boca. Hasta el momento, los mejores resultados bajo condiciones experimentales se han obtenido con una alimentación basada en nauplios de *Artemia* (Wolnicki y Myszkowski 1998b, Fleig y cols. 2001, Wolnicki y cols. 2003a, Celada y cols. 2007b, Celada y cols. 2008). Sin embargo, presenta inconvenientes como la necesidad de instalaciones específicas y un laborioso trabajo diario.

Los quistes decapsulados de *Artemia* (Fotografías 10 y 11) pueden ser una alternativa interesante, ya que tienen pequeño tamaño (200-250 μm), pueden conservarse refrigerados durante 3-4 días, están desinfectados, no pierden nutrientes en el agua y pueden ser manejados como una dieta inerte (Vanhecke y cols. 1990). Además, en el mercado existen partidas de quistes con baja eclosionabilidad inadecuados para la obtención de nauplios y, por ello, con un coste ostensiblemente inferior, suscep-

tibles de ser utilizados directamente como alimento.



Fotografía 10. Quistes decapsulados de *Artemia*.

Así, el objetivo del presente estudio es evaluar quistes decapsulados de *Artemia* de dos calidades diferentes (alto y bajo porcentaje de eclosión) como alimento para larvas desde el inicio de la alimentación exógena. Para ello, se diseñaron tres experimentos de 30 días de duración.

Experimento I.1. Se distribuyeron 4.680 larvas en 9 tanques. En función de la alimentación, los tratamientos fueron los siguientes:

- Nauplios durante 30 días.

- Nauplios los primeros 7 días y posteriormente quistes decapsulados de *Artemia* de alta calidad (alto porcentaje de eclosión: 86%).
- Quistes decapsulados de *Artemia* de alta calidad durante 30 días.

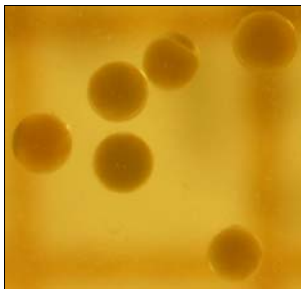
Experimento I.2. Se distribuyeron 4.680 larvas en 9 tanques. Los tratamientos fueron los siguientes:

- Nauplios durante 30 días.
- Nauplios los primeros 7 días y posteriormente quistes decapsulados de *Artemia* de baja calidad (bajo porcentaje de eclosión: 10%).
- Quistes decapsulados de *Artemia* de baja calidad durante 30 días.

Experimento I.3. Se distribuyeron 7.800 larvas en 15 tanques. Los tratamientos fueron los siguientes:

- Nauplios durante 30 días.
- Quistes decapsulados de *Artemia* de baja calidad (bajo coste) durante 30 días.
- Nauplios los primeros 7 días y después quistes decapsulados de *Artemia* de baja calidad.
- Nauplios los primeros 4 días y posteriormente quistes decapsulados de *Artemia* de baja calidad.
- Nauplios los primeros 2 días y a continuación quistes decapsulados de *Artemia* de baja calidad.

El fotoperiodo fue natural (15L:9O) y la temperatura del agua $24,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en los experimentos I.1. y I.2. y $26,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en el experimento I.3.



Fotografía 11. Quistes decapsulados de *Artemia*.

El alimento se repartió en 4 tomas a intervalos regulares (cada 4 horas) durante las horas de luz. En los tratamientos con cambio de nauplios a quistes, la transición de un alimento a otro se hizo progresivamente, reemplazando las cantidades de nauplios en un 25%, 50% y 75% el primer, el segundo y el tercer día, respectivamente, de forma que al cuarto día los quistes eran el único alimento.

Tras siete días de ensayo (inicio de la transición del alimento en los experimentos I.1 y I.2) se tomó una muestra de 20 larvas/tanque (60 por tratamiento) para registrar la longitud y el peso. Al final de los ensayos (30 días), se tomó una muestra de 40 animales/tanque (120 por tratamiento) que fueron medidos y pesados individualmente. Se contaron todos los animales sobrevivientes y la tasa de supervivencia se calculó sin considerar las 20 larvas retiradas en el primer muestreo.

Antes de finalizar los ensayos, se tomaron muestras de los diferentes alimentos para analizar su contenido de humedad, proteína, lípidos, cenizas, carbohidratos y energía bruta. Las muestras se mantuvieron a -30°C hasta su análisis.

6.1.2. Resultados

Desde el inicio de los ensayos, las larvas (Fotografía 12) consumieron tanto los nauplios como los quistes decapsulados de ambas calidades.



Fotografía 12. Larva con quistes en su tracto intestinal.

La composición analítica de nauplios y quistes de alta y baja calidad se presenta en la Tabla 1. Los nauplios mostraron mayor contenido de humedad (84,8%) y menor contenido energético, proteico, lipídico y de cenizas que los quistes decapsulados. Los quistes de baja calidad presentaron un contenido energético significativamente superior (5,17 kJ/g).

Tabla 1. Composición analítica en materia húmeda de quistes decapsulados (de alta y baja calidad) y nauplios de *Artemia*.

	Quistes alta calidad	Quistes baja calidad	Nauplios
Humedad (%)	76,09 ± 0,05 ^a	71,20 ± 0,01 ^b	84,80 ± 0,21 ^c
Proteína (%)	14,04 ± 0,14 ^a	16,50 ± 0,09 ^b	8,05 ± 0,15 ^c
Lípidos (%)	3,84 ± 0,05 ^a	4,01 ± 0,02 ^a	2,35 ± 0,25 ^b
Cenizas (%)	0,98 ± 0,01 ^a	1,01 ± 0,03 ^a	0,88 ± 0,02 ^b
Carbohidratos (%)	5,06 ± 0,15 ^a	7,39 ± 0,15 ^b	3,93 ± 0,59 ^a
Energía bruta (kJ/g)	4,41 ± 0,01 ^a	5,17 ± 0,01 ^b	3,04 ± 0,01 ^c

Valores en la misma fila con distinto superíndice presentan diferencias significativas (P<0,05).

Experimento I.1. Tras 7 días de ensayo, no existieron diferencias significativas entre el crecimiento de las larvas alimentadas con nauplios y el de las que recibieron quistes de alta calidad (Tabla 2).

Los valores finales de supervivencia, crecimiento e índice de conversión del alimento se recogen en la Tabla 3. Las tasas de supervivencia fueron altas en todos los tratamientos, sin diferencias significativas.

Las larvas alimentadas los primeros 7 días con nauplios y posteriormente con quistes de alta calidad tuvieron el mayor peso y tasa de crecimiento específico (TCE), sin diferencias

significativas con las larvas alimentadas únicamente con quistes. El aporte de quistes permitió la obtención de pesos y tasas de crecimiento específico significativamente más altos que la dieta exclusiva de nauplios.

El índice de conversión del alimento fue significativamente más bajo en las larvas que recibieron quistes, tanto desde el inicio como después de una alimentación con nauplios.

El factor de condición fue significativamente más alto en las larvas alimentadas con quistes después de los primeros 7 días con nauplios.

Tabla 2. Valores de crecimiento de larvas de tenca alimentadas con nauplios y/o quistes decapsulados de *Artemia* de alta calidad a los 7 días de comenzar el experimento I.1.

	Nauplios	7 días nauplios - Quistes alta calidad	Quistes baja calidad
Longitud (mm)	7,01 ± 0,06	7,00 ± 0,07	6,83 ± 0,10
Peso (mg)	1,59 ± 0,06	1,55 ± 0,06	1,48 ± 0,06
TCE (%/día)	20,68 ± 0,58	20,15 ± 0,60	19,70 ± 0,59

Las medias no son significativamente diferentes (P>0,05).

Tabla 3. Valores finales de supervivencia y de crecimiento (30 días) de larvas de tenca alimentadas con nauplios y/o quistes decapsulados de *Artemia* de alta calidad (experimento I.1).

	Nauplios	7 días nauplios - Quistes alta calidad	Quistes alta calidad
Supervivencia (%)	95,3 ± 0,7	89,5 ± 1,5	91,2 ± 2,9
Longitud (mm)	17,71 ± 0,11 ^a	16,56 ± 0,08 ^b	17,26 ± 0,12 ^c
Peso (mg)	50,04 ± 1,29 ^a	61,08 ± 1,18 ^b	59,57 ± 1,42 ^b
TCE (%/día)	16,32 ± 0,09 ^a	17,03 ± 0,07 ^b	16,91 ± 0,09 ^b
K	0,88 ± 0,01 ^a	1,32 ± 0,01 ^b	1,13 ± 0,01 ^c
IC	1,06 ± 0,03 ^a	0,84 ± 0,02 ^b	0,89 ± 0,03 ^b

Valores en las filas con distinto superíndice presentan diferencias significativas ($P < 0,05$).

Experimento I.2. A los 7 días, las larvas alimentadas con nauplios tuvieron un crecimiento significativamente mayor que el de las alimentadas con quistes de baja calidad (Tabla 4).

Los valores de supervivencia, crecimiento e índice de conversión del alimento al final de la prueba se recogen en la Tabla 5. No se encontraron diferencias significativas entre la tasa de supervivencia de las larvas alimentadas con nauplios durante todo el ensayo y la de las alimentadas los primeros 7 días con nauplios y con quistes de baja calidad posteriormente. La supervivencia de las larvas alimentadas únicamente con quistes de baja calidad fue significativamente más baja (54,5%).

En cuanto al crecimiento, no existieron di-

ferencias significativas entre las larvas alimentadas con quistes de baja calidad tras una semana de suministro de nauplios y las que recibieron quistes desde el inicio. El aporte de quistes permitió la obtención de pesos y tasas de crecimiento específico significativamente más altos que la dieta exclusiva de nauplios.

El índice de conversión del alimento fue significativamente más bajo en las larvas que recibieron quistes, tanto desde el inicio como después de una alimentación con nauplios.

El factor de condición de las larvas alimentadas con quistes de baja calidad (media 1,06) fue significativamente superior al de las larvas alimentadas únicamente con nauplios (0,91).

Tabla 4. Valores de crecimiento de larvas de tenca alimentadas con nauplios y/o quistes decapsulados de *Artemia* de baja calidad a los 7 días de comenzar el experimento I.2.

	Nauplios	7 días nauplios - Quistes baja calidad	Quistes baja calidad
Longitud (mm)	7,04 ± 0,06 ^a	7,02 ± 0,07 ^a	6,19 ± 0,05 ^b
Peso (mg)	1,61 ± 0,05 ^a	1,58 ± 0,06 ^a	1,00 ± 0,04 ^b
TCE (%/día)	21,35 ± 0,51 ^a	21,11 ± 0,60 ^a	14,10 ± 0,58 ^b

Valores en las filas con distinto superíndice presentan diferencias significativas ($P < 0,05$).

Tabla 5. Valores finales de supervivencia y de crecimiento (30 días) de larvas de tenca alimentadas con nauplios y/o quistes decapsulados de *Artemia* de baja calidad (experimento I.2).

	Nauplios	7 días nauplios - Quistes baja calidad	Quistes baja calidad
Supervivencia (%)	94,5 ± 2,3 ^a	86,8 ± 1,1 ^a	54,5 ± 6,5 ^b
Longitud (mm)	17,66 ± 0,10 ^a	17,35 ± 0,12 ^a	17,63 ± 0,13 ^a
Peso (mg)	51,17 ± 1,17 ^a	56,30 ± 1,10 ^b	58,87 ± 1,39 ^b
TCE (%/día)	16,52 ± 0,07 ^a	16,85 ± 0,07 ^b	16,97 ± 0,08 ^b
K	0,91 ± 0,01 ^a	1,07 ± 0,01 ^b	1,05 ± 0,01 ^b
IC	1,01 ± 0,02 ^a	0,91 ± 0,02 ^b	0,89 ± 0,02 ^b

Valores en las filas con distinto superíndice presentan diferencias significativas (P<0,05).

Experimento I.3. A los 7 días, las larvas alimentadas con nauplios durante este periodo y las alimentadas con nauplios 4 días y posteriormente quistes de baja calidad crecieron significativamente más rápido. El menor crecimiento se obtuvo en las larvas alimentadas con quistes de baja calidad desde el primer día (Tabla 6).

Los valores de supervivencia, crecimiento e índice de conversión del alimento al final del experimento se recogen en la Tabla 7. La supervivencia fue elevada en todos los tratamientos, excepto en las larvas alimentadas exclusivamente con quistes de baja calidad (43,4%).

Las larvas que recibieron nauplios los primeros 7 días y posteriormente quistes de

baja calidad presentaron un crecimiento significativamente más alto. No se encontraron diferencias significativas de longitud ni de peso entre las larvas alimentadas los primeros 4 o 2 días con nauplios y luego con quistes de baja calidad y las larvas alimentadas desde el primer día con quistes (de ambas calidades).

El índice de conversión del alimento de las larvas alimentadas 7 días con nauplios y luego con quistes de baja calidad fue significativamente inferior (0,81). No hubo diferencias significativas entre las larvas alimentadas los primeros 4 o 2 días con nauplios y con quistes de baja calidad posteriormente y las larvas que recibieron quistes de alta calidad desde el primer día.

Tabla 6. Valores de crecimiento de larvas de tenca alimentadas con 3 periodos iniciales de nauplios y quistes decapsulados de *Artemia* de baja calidad después y con quistes de baja y alta calidad durante todo el ensayo a los 7 días de comenzar el experimento I.3.

	7 días nauplios - Quistes baja calidad	4 días nauplios - Quistes baja calidad	2 días nauplios - Quistes baja calidad	Quistes baja calidad	Quistes alta calidad
Longitud (mm)	8,69 ± 0,05 ^a	8,72 ± 0,05 ^a	8,45 ± 0,06 ^b	7,45 ± 0,08 ^c	7,96 ± 0,06 ^d
Peso (mg)	3,47 ± 0,07 ^a	3,68 ± 0,05 ^b	3,18 ± 0,07 ^c	2,13 ± 0,06 ^d	2,91 ± 0,08 ^e
TCE (%/día)	32,17 ± 0,3 ^a	33,11 ± 0,21 ^a	30,91 ± 0,33 ^b	25,01 ± 0,46 ^c	29,56 ± 0,38 ^d

Valores en las filas con distinto superíndice presentan diferencias significativas (P<0,05).

Tabla 7. Valores finales de supervivencia y de crecimiento (30 días) de larvas de tenca alimentadas con 3 periodos iniciales de nauplios y quistes decapsulados de *Artemia* de baja calidad después o con quistes de baja y alta calidad durante todo el ensayo (experimento I.3).

	7 días nauplios - Quistes baja calidad	4 días nauplios - Quistes baja calidad	2 días nauplios - Quistes baja calidad	Quistes baja calidad	Quistes alta calidad
Superv. (%)	97,9 ± 0,2 ^a	95,0 ± 2,5 ^a	91,7 ± 2,7 ^a	43,4 ± 3,8 ^b	91,9 ± 2,3 ^a
Longitud (mm)	20,45 ± 0,17 ^a	18,57 ± 0,16 ^b	18,95 ± 0,16 ^b	18,58 ± 0,15 ^b	18,91 ± 0,19 ^b
Peso (mg)	80,78 ± 2,29 ^a	65,35 ± 1,83 ^b	70,25 ± 2,00 ^b	72,19 ± 1,89 ^b	66,96 ± 2,42 ^b
TCE (%/día)	17,89 ± 0,09 ^a	17,20 ± 0,09 ^b	17,42 ± 0,09 ^{bc}	17,55 ± 0,08 ^c	17,19 ± 0,11 ^b
K	0,92 ± 0,01 ^a	1,00 ± 0,01 ^b	1,01 ± 0,02 ^b	1,10 ± 0,01 ^c	0,95 ± 0,01 ^d
IC	0,81 ± 0,02 ^a	0,99 ± 0,03 ^b	0,94 ± 0,03 ^{bc}	0,89 ± 0,02 ^c	1,03 ± 0,04 ^b

Valores en la misma fila con distinto superíndice presentan diferencias significativas ($P < 0,05$).

6.1.3. Discusión

La ingestión de alimento puede estar condicionada por el diferente comportamiento de los nauplios y los quistes decapsulados en el agua. Mientras los primeros son móviles y pueden permanecer vivos en agua dulce alrededor de 12 horas (Celada y cols. 2008), los quistes son inertes y sedimentan rápidamente. En el presente estudio no se evidenció una mayor predilección por un alimento u otro y las larvas de tenca ingirieron ambos desde el primer día. Considerando que, una vez introducidos en los tanques de cría, los nauplios van perdiendo progresivamente calidad nutricional, los quistes decapsulados ofrecen la ventaja de hundirse hasta el fondo donde conservan su valor nutricional (Vanhaecke y cols. 1990) y siguen estando disponibles para las larvas.

Algunos autores (Dabrowski y Glogowski 1977, Lauff y Hoffer 1984, Munilla-Moran y cols. 1990, Kolkovski y cols. 1993, Walford y Lam 1993) han sugerido que la escasa producción de enzimas digestivas en larvas de peces durante el periodo inicial de alimentación exógena es complementada por el aporte enzimático que proporciona la ingestión de zooplankton vivo, permitiendo mejorar su digestibilidad. En nuestros experimentos, las altas tasas de supervivencia y de crecimiento obtenidas con quistes con alto porcentaje de eclosión como único alimento sugieren que la hipotética contribución de enzimas exógenas sería similar en nauplios y quistes. Por tanto, el periodo inicial de alimentación con presas vivas sería innecesario

cuando se proporcionan quistes decapsulados de alta calidad.

Por el contrario, las larvas alimentadas con quistes de baja calidad desde el inicio de la alimentación exógena presentaron una supervivencia significativamente inferior respecto a las que recibieron quistes de alta calidad (Tabla 7). Teniendo en cuenta que la importante reducción de la supervivencia no podría explicarse por las diferencias de composición entre ambos tipos de quistes (Tabla 1) y que la mortalidad se produjo, principalmente, durante los primeros días del experimento, se podría suponer que la reducción del porcentaje de eclosión implicase una pérdida de calidad nutricional. El porcentaje de eclosión de los quistes de *Artemia* disminuye con el tiempo cuando permanecen almacenados sin envasar a temperatura ambiente (Vanhaecke y Sorgeloos 1982) y bajo esas condiciones la calidad nutricional puede deteriorarse (Jackson y cols. 1990). Una posible consecuencia de ese deterioro podría estar relacionada con una reducción de la digestibilidad. Esta hipótesis puede apoyarse en el incremento de la supervivencia registrado cuando las larvas se alimentaron inicialmente con nauplios y posteriormente con quistes con bajo porcentaje de eclosión. Otra posible explicación derivaría de los cambios bioquímicos asociados a las inadecuadas condiciones de mantenimiento descritas, que incidirían en una reducción de algunos nutrientes esenciales. En este sentido, Jackson y cols. (1990) observaron una significativa disminución de la cantidad de ácido linolénico (18:3 n-3) en quistes de *Artemia* almacenados durante 15

semanas al aire libre a 20°C y sugirieron que unas condiciones cálidas y aeróbicas acelerarían la oxidación natural de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los quistes. Puesto que el ácido linolénico es esencial para los peces de agua dulce, especialmente en sus primeras etapas del desarrollo (Tocher 2010), una posible deficiencia en los quistes con bajo porcentaje de eclosión habría determinado el notable incremento de la mortalidad en las larvas que los recibieron desde el inicio de la alimentación exógena. Consecuentemente, los altos valores de crecimiento obtenidos podrían haber sido debidos a que la reducción de la densidad de larvas por tanque propició un ambiente más adecuado para su desarrollo (más espacio, menos competencia y estrés). En contraposición, cuando los quistes con bajo porcentaje de eclosión fueron suministrados después de 2, 4 o 7 días con nauplios, la supervivencia fue alta (en torno al 93%), así como el peso y la tasa de crecimiento específico.

Considerando en conjunto todos los resultados, los quistes decapsulados permitieron obtener mayor crecimiento que los nauplios. Esto fue observado con anterioridad en un ex-

perimento de 28 días con larvas de guppy, *Poecilia reticulata* (Lim y cols. 2002) y atribuido en parte al mayor contenido lipídico de los quistes. La composición de los quistes y nauplios usados en el presente estudio (Tabla 1) muestra que los quistes hidratados contienen más materia seca, proteína, lípidos y energía que los nauplios recién eclosionados. Así, el mejor crecimiento de las larvas alimentadas con quistes decapsulados puede estar relacionado con una mayor cantidad de alimento (materia seca) consumido y, por tanto, mayor cantidad de proteína, lípidos y energía, permitiendo así mismo mejorar los índices de conversión.

6.2. ESTUDIO II: EVALUACIÓN DE DIFERENTES PREPARACIONES DE QUISTES DECAPSULADOS DE *Artemia* COMO ALIMENTO DURANTE LA ETAPA LARVARIA-POSTLARVARIA DE LA TENCA

A comparative study of different preparations of decapsulated *Artemia* cysts as food for tench (*Tinca tinca* L.) larvae

Vanesa García, Jesús D. Celada, José M. Carral, Rocío González, Álvaro González, María Sáez-Royuela

2011

Animal Feed Science and Technology 170, 72-77

6.2.1. Planteamiento experimental

Como muestran los resultados del estudio I, una alimentación con quistes decapsulados durante la etapa larvaria-postlarvaria de la tenca facilita el manejo y mejora significativamente el crecimiento respecto a una alimentación con nauplios vivos. Sin embargo, para garantizar su valor nutricional, el periodo de almacenamiento de quistes frescos no debe superar 3-4 días. La necesidad de decapsular quistes tan frecuentemente durante la etapa de cría larvaria supone un incremento de las necesidades de mano de obra. Con objeto de simplificar las tareas de preparación del alimento, sería interesante prolongar el periodo de almacenamiento tras su decapsulación mediante técnicas de conservación como la deshidratación con aire caliente o el mantenimiento en una solución de salmuera saturada. Este tipo de quistes conservados han sido probados satisfactoriamente durante la etapa larvaria en otras especies de ciprínidos como la carpa, *Cyprinus carpio* (Vanhaecke y cols. 1990) o el cacho, *Leuciscus cephalus* (Shiri Harzevili y cols. 2003).

Con la finalidad de evaluar posibilidades de uso de diferentes formas de conservación de quistes decapsulados de *Artemia* en la cría larvaria de tenca, se diseñaron dos experimentos de 30 días de duración:

Experimento II.1. Se distribuyeron un total de 6.000 larvas en 12 tanques. Los tratamientos fueron:

- Nauplios de *Artemia* durante 30 días.

- Nauplios los primeros 7 días y posteriormente quistes frescos de *Artemia*.
- Nauplios los primeros 7 días y después quistes de *Artemia* conservados en salmuera.
- Nauplios los primeros 7 días y a continuación quistes de *Artemia* desecados.

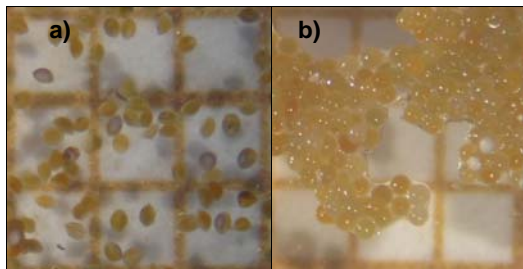
Experimento II.2. Se distribuyeron 6.000 larvas entre 12 tanques para probar las mismas preparaciones de quistes del experimento anterior pero desde el inicio de la alimentación exógena, de forma que los tratamientos fueron:

- Nauplios de *Artemia* durante 30 días.
- Quistes frescos de *Artemia* durante 30 días.
- Quistes de *Artemia* conservados en salmuera durante 30 días.
- Quistes de *Artemia* desecados durante 30 días.

En ambos experimentos se utilizaron quistes de alta calidad (alto porcentaje de eclosión: 86%), decapsulados de acuerdo con el método descrito por Van Stappen (1996). Las dietas se prepararon de la siguiente forma:

- Los nauplios se eclosionaron diariamente en volúmenes conocidos de agua (Van Stappen 1996).
- Los quistes frescos se prepararon cada 3-4 días y se mantuvieron refrigerados a 4°C.
- Quistes en salmuera. Los quistes frescos se deshidrataron en una solución saturada de

NaCl como describe Van Stappen (1996) (Fotografía 13a). Antes de ser utilizados se lavaron con agua dulce para permitir su rehidratación y la eliminación de los restos de sal (Fotografía 13b).



Fotografía 13. a) Quistes deshidratados en salmuera b) Quistes decapsulados hidratados.

- Quistes desecados. Los quistes recién decapsulados se extendieron en una fina capa sobre una malla de 150 μm y se secaron en una campana de flujo laminar a 30°C durante 24 horas (Fotografía 14). Para reducir su alta flotabilidad, se rehidrataron en agua dulce antes de ser administrados en los tanques de cría. Esto permitió que las diferentes preparaciones de quistes tuvieran el mismo comportamiento en el agua, hundiéndose hacia el fondo.



Fotografía 14. Sistema de desecación de quistes.

La temperatura del agua fue $24,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y el fotoperiodo natural (15L:9O). El alimento se repartió en 4 tomas administradas manualmente a intervalos regulares (cada 4 horas) durante las horas de luz. En los tratamientos con cambio de nauplios a quistes, la transición se hizo progresivamente, reemplazando las cantidades de nauplios en un 25%, 50% y 75% el primer, el segundo y el tercer día, respectivamente, de forma que al cuarto día los quistes eran el único alimento.

Al final del experimento (30 días), se contaron los animales sobrevivientes y se tomó una muestra de 40 animales/tanque (120 por tratamiento) para pesarlos y medirlos individualmente.



Fotografía 15. Larvas en tanque cría al finalizar la prueba.

Se tomaron muestras de nauplios y de las diferentes preparaciones de quistes para analizar su contenido de humedad, proteína, lípidos, cenizas, carbohidratos y energía bruta.

6.2.2. Resultados

La composición de nauplios y de diferentes formas de quistes decapsulados se recoge en la Tabla 8. La humedad de los nauplios (84,8%) fue significativamente superior a la de los quistes (aprox. 76%), mientras que los contenidos de proteína, lípidos y carbohidratos fueron significativamente más altos en los quistes. El contenido energético de los nauplios fue significativamente más bajo (3,04 kJ/g) que el de los quistes decapsulados (media: 4,44 kJ/g).

Experimento II.1. Los valores finales de supervivencia, crecimiento e índice de conversión del alimento se presentan en la Tabla 9. Los porcentajes de supervivencia no fueron significativamente diferentes, estando comprendidos entre 85,8% y 94,1%.

Las larvas alimentadas con quistes desecados después de los primeros 7 días con nauplios tuvieron un crecimiento significativamente superior. La administración de quistes, en cualquiera de las formas ensayadas, tras 7 días de alimentación con nauplios, permitió obtener pesos, tasas de crecimiento específico y factores de condición significativamente mayores que el suministro exclusivo de nauplios.

Todas las dietas con quistes permitieron obtener índices de conversión del alimento significativamente más bajos que la dieta de nauplios.

Tabla 8. Composición analítica de nauplios y de diferentes preparaciones de quistes decapsulados de *Artemia*.

	Nauplios	Quistes frescos	Quistes en salmuera	Quistes desecados
Humedad (%)	84,80 ± 0,21 ^a	76,09 ± 0,05 ^b	76,01 ± 0,21 ^b	75,95 ± 0,13 ^b
Proteína (%)	8,05 ± 0,15 ^a	14,04 ± 0,14 ^b	14,14 ± 0,09 ^b	14,19 ± 0,12 ^b
Lípidos (%)	2,35 ± 0,25 ^a	3,84 ± 0,05 ^b	3,85 ± 0,05 ^b	3,88 ± 0,04 ^b
Cenizas (%)	0,88 ± 0,02 ^a	0,98 ± 0,01 ^a	0,95 ± 0,06 ^a	0,94 ± 0,06 ^a
Carbohidratos (%)	3,93 ± 0,59 ^a	5,06 ± 0,15 ^b	5,06 ± 0,40 ^b	5,05 ± 0,11 ^b
Energía bruta (kJ/g)	3,04 ± 0,01 ^a	4,41 ± 0,01 ^b	4,44 ± 0,03 ^b	4,46 ± 0,03 ^b

Valores en la misma fila con distinto superíndice presentan diferencias significativas (P<0,05).

Experimento II.2. Los valores finales de supervivencia, crecimiento e índice de conversión del alimento se presentan en la Tabla 10. No existieron diferencias significativas entre los porcentajes de supervivencia de las larvas alimentadas con nauplios, quistes frescos o conservados en salmuera (en torno a 90%). Sin embargo, la supervivencia de las tencas alimentadas con quistes desecados fue significativamente inferior (74,1%).

El mayor crecimiento fue el de las larvas alimentadas con quistes frescos. Con las diferentes preparaciones de quistes las larvas tuvieron pesos, factores de condición y tasas de

crecimiento específico significativamente mayores que los de las alimentadas con nauplios.

El índice de conversión del alimento varió significativamente entre 0,70 y 1,02 para las larvas alimentadas con quistes frescos y con nauplios, respectivamente. Las dietas con quistes permitieron obtener un índice de conversión del alimento significativamente menor que la dieta de nauplios.

Se evidenciaron diferencias significativas en el factor de condición, que osciló entre 0,90 y 1,22 para las dietas con nauplios y con quistes frescos, respectivamente.

Tabla 9. Valores finales de supervivencia y crecimiento de larvas de tenca alimentadas con cuatro dietas de nauplios y diferentes preparaciones de quistes decapsulados de *Artemia* (experimento II.1).

	Nauplios	7 días nauplios - Quistes frescos	7 días nauplios - Quistes en salmuera	7 días nauplios - Quistes desecados
Supervivencia (%)	92,5 ± 2,3 ^a	85,8 ± 2,5 ^a	94,1 ± 1,0 ^a	85,9 ± 1,3 ^a
Longitud (mm)	17,65 ± 0,10 ^a	17,29 ± 0,11 ^b	17,26 ± 0,13 ^b	18,25 ± 0,12 ^c
Peso (mg)	52,20 ± 0,99 ^a	58,91 ± 1,17 ^b	56,60 ± 1,21 ^b	64,16 ± 1,42 ^c
TCE (%/día)	16,61 ± 0,06 ^a	17,00 ± 0,07 ^b	16,95 ± 0,08 ^b	17,27 ± 0,07 ^c
K	0,94 ± 0,00 ^a	1,14 ± 0,02 ^b	1,10 ± 0,02 ^b	1,06 ± 0,02 ^b
IC	0,97 ± 0,02 ^a	0,87 ± 0,02 ^b	0,90 ± 0,02 ^b	0,80 ± 0,02 ^c

Valores en la misma fila con distinto superíndice presentan diferencias significativas (P<0,05).

Tabla 10. Valores finales de supervivencia y de crecimiento de larvas de tenca alimentadas con nauplios o diferentes preparaciones de quistes decapsulados durante 30 días (experimento II.2).

	Nauplios	Quistes frescos	Quistes en salmuera	Quistes desecados
Supervivencia (%)	93,9 ± 1,0 ^a	89,4 ± 2,6 ^a	86,7 ± 1,9 ^a	74,1 ± 1,8 ^b
Longitud (mm)	17,70 ± 0,10 ^a	19,22 ± 0,15 ^b	18,37 ± 0,15 ^c	17,78 ± 0,12 ^a
Peso (mg)	51,07 ± 1,13 ^a	88,68 ± 2,11 ^b	67,38 ± 1,69 ^c	55,81 ± 1,24 ^d
TCE (%/día)	16,51 ± 0,08 ^a	18,33 ± 0,08 ^b	17,39 ± 0,09 ^c	16,81 ± 0,07 ^d
K	0,90 ± 0,01 ^a	1,22 ± 0,01 ^b	1,06 ± 0,01 ^c	0,97 ± 0,00 ^d
IC	1,02 ± 0,03 ^a	0,70 ± 0,02 ^b	0,79 ± 0,03 ^c	0,92 ± 0,02 ^d

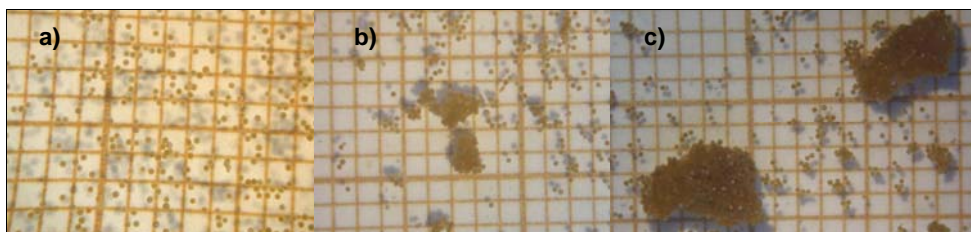
Valores en las filas con distinto superíndice presentan diferencias significativas (P<0,05).

6.2.3. Discusión

Considerando en conjunto los resultados de ambos experimentos, las larvas alimentadas con quistes decapsulados presentaron mayor crecimiento que aquellas que recibieron nauplios como único alimento. Al igual que en el estudio I, este hecho puede atribuirse al superior contenido de materia seca y energía de los quistes (Tabla 8). Así, el mayor crecimiento de los animales se debería a un mayor consumo de alimento (materia seca) y, por tanto, mayor aporte de proteína, lípidos, carbohidratos y energía. Además habría posibilitado la mejora de la eficiencia de conversión del alimento, ya que los valores de IC más bajos (Tablas 9 y 10) se obtuvieron en las larvas alimentadas con quistes decapsulados, tanto desde el inicio de la alimentación exógena como después de un periodo inicial con nauplios.

El menor crecimiento de las larvas alimentadas con quistes conservados junto a la baja supervivencia de aquellas que recibieron quistes desecados (Tabla 10) podría sugerir una merma del valor nutritivo provocado por los procesos de conservación. Sin embargo, esta posibilidad parece poco probable ya que, según el análisis de composición realizado, no existen diferencias significativas entre las diferentes formas de quistes probadas (Tabla 8). Una posible explicación podría estar relacionada con el diferente comportamiento que mostraron los quistes conservados respecto a los frescos unas horas después de haber sido suministrados en los tanques de cría. Mientras los frescos

mantuvieron su individualidad en el intervalo entre comidas, no ocurrió lo mismo con los conservados. Así, a las 2 horas de haber sido administrados, se observaron agregados de quistes con un tamaño comprendido entre 0,5-1 mm y 0,5-2 mm en las muestras tomadas de quistes en salmuera y desecados, respectivamente. Tras 4 horas, no se apreció una variación en el tamaño de los agregados de quistes en salmuera; sin embargo, el de los desecados se incrementó hasta aproximadamente 5 mm (Fotografía 16). Así, el considerable diámetro de algunos de esos agregados podría haber excedido el de la abertura bucal de las larvas, impidiendo su ingestión y, a la vez, disminuyendo el número de quistes disponibles por animal. Por otro lado, la alta supervivencia y crecimiento de las larvas alimentadas con quistes desecados después de 7 días con nauplios (Tabla 9) parece indicar que, tras una semana, las larvas tendrían el suficiente tamaño para ingerir algunos agregados.



Fotografía 16. a) Quistes frescos, b) en salmuera y c) desecados después de 4 horas en los tanques de cría.

ETAPA JUVENIL

6.3. ESTUDIO III: EVALUACIÓN DE QUISTES DECAPSULADOS DE *Artemia* COMO SUPLEMENTO EN LA ETAPA JUVENIL DE LA TENCA

Decapsulated *Artemia* cysts: A suitable dietary supplement for juvenile tench (*Tinca tinca* L.)

Vanessa García, Jesús D. Celada, José M. Carral, María Sáez-Royuela, Rocío González, Álvaro González

2010

Journal of Applied Aquaculture 22, 57-65

6.3.1. Planteamiento experimental

La escasez de conocimientos sobre nutrición de la tenca ha impedido formular piensos específicos para las diferentes etapas de cría. Así, habitualmente se utilizan dietas secas formuladas para otras especies, lo que provoca lento crecimiento (Quirós y Alvariño 1998, Wolnicki y Myszkowski 1998a, Quirós y cols. 2003), alta mortalidad (Quirós y Alvariño 1998, Quirós y cols. 2003, Rennert y cols. 2003, Celada y cols. 2009) y un aumento de deformidades corporales (Rennert y cols. 2003, Kamler y cols. 2006, Wolnicki y cols. 2006). Sin embargo, diferentes investigaciones han puesto de manifiesto que parte de esos inconvenientes pueden ser reducidos con suplementos de alimento vivo como *Daphnia* (Quirós y Alvariño 1998, Quirós y cols. 2003) o nauplios de *Artemia* (Celada y cols. 2007a, 2009) e incluso de alimento natural como moscas verdes o larvas de quironómidos congeladas (Wolnicki y cols. 2003b). Dado que los quistes decapsulados de *Artemia* han demostrado ser un buen alimento durante la etapa larvaria-postlarvaria (estudios I y II), cabría la posibilidad de que fuesen también un adecuado suplemento durante etapas más avanzadas del desarrollo. En este sentido, se planteó la siguiente prueba:

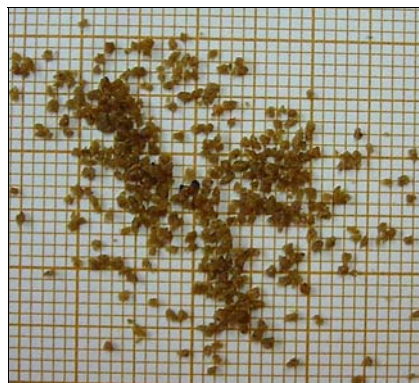
Experimento III.1. Se distribuyeron 594 juveniles de tenca de 5 meses de edad ($31,78 \pm 0,14$ mm, $0,388 \pm 0,005$ g, $n=90$) entre 9 tanques a una densidad de 1g/l. El número medio de animales por tanque fue $66 \pm 1,62$. La tem-

peratura del agua fue $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y el fotoperiodo natural (11L:13O).

Se probaron dos niveles de suplementación con quistes decapsulados o nauplios. Los tratamientos fueron los siguientes:

- 1.800 quistes/g biomasa/día.
- 1.800 nauplios/g biomasa/día.
- 300 quistes/g biomasa/día.

Como dieta seca se utilizó un pienso comercial formulado para alevines de salmónidos (Nutra AminoBalanceTM, Skretting, Trouw, Fotografía 17). El diámetro de los pellets se ajustó al tamaño de los juveniles (0,6-1 mm durante los primeros 60 días y 0,9-1,5 mm desde el día 61 hasta finalizar la prueba a los 120 días).



Fotografía 17. Pienso para alevines de trucha.

En todos los grupos la tasa de alimentación fue aproximadamente del 4% de la biomasa. Tanto la dieta seca como los suplementos fueron suministrados al mismo tiempo una vez al día. Las cantidades de ambos alimentos se ajustaron mensualmente de acuerdo con el incremento de biomasa registrado en los muestreos periódicos.

En los muestreos intermedios, se pesaron y midieron individualmente 10 animales por réplica (30 por tratamiento). Al final del experimento (120 días), se contaron los animales sobrevivientes y se tomó una muestra de 20 juveniles por réplica para medirlos y pesarlos individualmente.

6.3.2. Resultados

Los valores finales de supervivencia y de crecimiento se recogen en la Tabla 11. Los porcentajes de supervivencia se encontraron entre 95,3% y 97,9%, sin diferencias significativas entre tratamientos.

Los animales con deformidades corporales externamente visibles, situadas en el pedúnculo caudal (Fotografía 18), se observaron únicamente en los grupos que recibieron 300 quistes/g de biomasa (2 juveniles, 1,06%).

En las tencas que recibieron un suplemento de 1.800 quistes/g biomasa, el crecimiento fue significativamente más alto (52,30 mm, 1,83 g y 1,28%/día).

La menor cantidad de suplemento supuso un crecimiento significativamente menor y un factor de condición significativamente más alto que el resto.



Fotografía 18. Juvenil con deformidad en el pedúnculo caudal.

Las Figuras 1 y 2 muestran los cambios de longitud y de peso, respectivamente a lo largo de los 120 días de duración del experimento. Las primeras diferencias significativas se evidenciaron a los 60 días, con valores de longitud y de peso superiores en los animales que recibieron la mayor cantidad de suplemento (1.800 nauplios o quistes/g de biomasa). A los 90 días, los juveniles que recibieron como suplemento 1.800 quistes/g biomasa tuvieron valores de longitud y peso significativamente más altos que los animales que recibieron la misma cantidad de nauplios.

Tabla 11. Porcentajes de supervivencia y valores de crecimiento de juveniles de tenca alimentados con una dieta seca suplementada con quistes decapsulados o nauplios vivos de *Artemia* durante 120 días.

	Suplemento		
	1.800 quistes	1.800 nauplios	300 quistes
Supervivencia (%)	97,8 ± 0,7	97,9 ± 1,0	95,3 ± 0,2
Longitud total (mm)	52,30 ± 0,37 ^a	50,87 ± 0,32 ^b	43,99 ± 0,40 ^c
Peso (g)	1,83 ± 0,05 ^a	1,64 ± 0,04 ^b	1,21 ± 0,04 ^c
TCE (%/día)	1,28 ± 0,02 ^a	1,19 ± 0,02 ^b	0,92 ± 0,03 ^c
K	1,27 ± 0,01 ^a	1,23 ± 0,01 ^a	1,40 ± 0,03 ^b

Valores en las filas con distinto superíndice presentaron diferencias significativas (P<0,01).

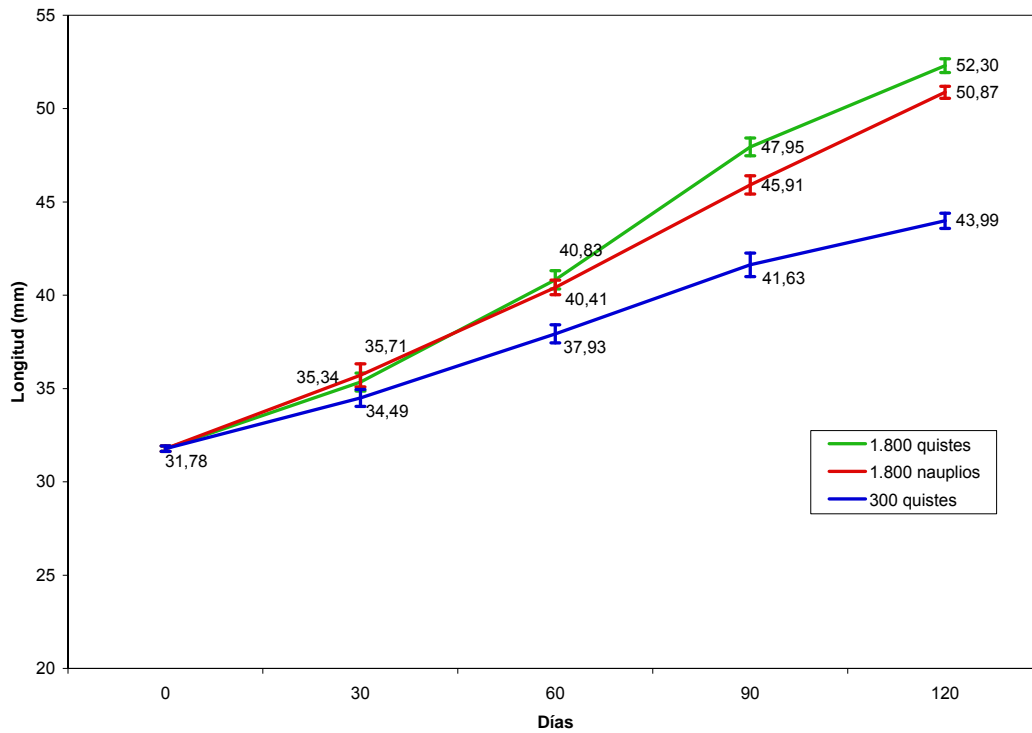


Figura 1. Longitud de juveniles de tenca alimentados con una dieta seca suplementada con nauplios o quistes decapsulados de *Artemia* en los controles realizados durante el periodo experimental (experimento III.1).

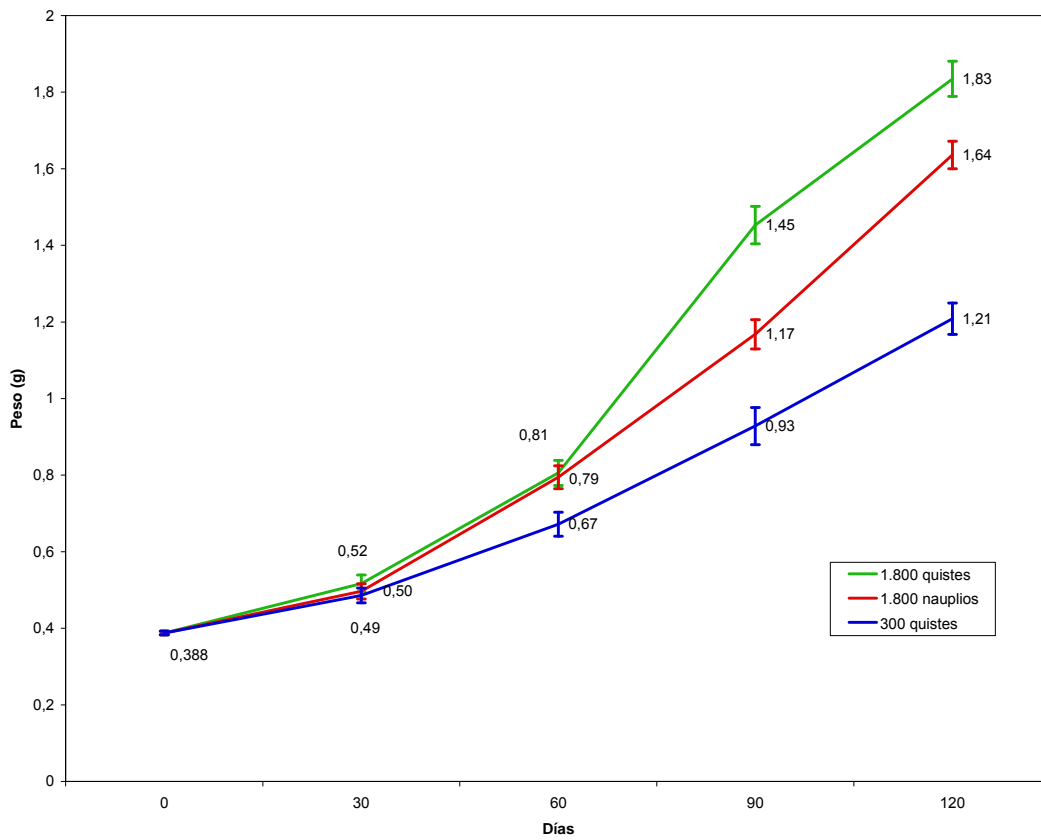


Figura 2. Peso de juveniles de tenca alimentados con una dieta seca suplementada con nauplios o quistes decapsulados de *Artemia* en los controles realizados durante el periodo experimental (experimento III.1).

6.3.3. Discusión

La posibilidad de utilizar quistes decapsulados de *Artemia* desde el inicio de la alimentación exógena, obteniendo incluso mejores resultados que con nauplios vivos (estudios I y II), ha supuesto un importante avance para la intensificación de la cría larvaria-postlarvaria de la tenca. Aunque por su tamaño (200-250 μm) son más adecuados para esta etapa, pueden ser utilizados con resultados satisfactorios en etapas posteriores. Así, juveniles de sabalote (*Chanos chanos*) alimentados exclusivamente con quistes decapsulados durante aproximadamente 3 meses incrementaron su peso de 0,024 g a 5 g, con una supervivencia del 80-95% (De los Santos y cols. 1980). Los resultados del presente estudio muestran la idoneidad de los quistes decapsulados de *Artemia* como suplemento de una dieta seca, superando, en términos de tasa de crecimiento, los obtenidos en juveniles de 5 a 9 meses de edad administrando suplemento de nauplios. Puesto que, según nuestros análisis (Tabla 1, estudio I), los quistes hidratados contienen más materia seca, proteína, lípidos y energía que los nauplios recién eclosionados, el mayor crecimiento de los juveniles que recibieron quistes como suplemento podría deberse a un mayor consumo de alimento (materia seca).

En las pruebas realizadas hasta el momento con piensos para salmónidos como único alimento se ha observado una alta mortalidad (Quirós y Alvaríño 1998, Quirós y cols. 2003, Rennert y cols. 2003, Celada y cols. 2009). Así, en un estudio de 120 días de duración llevado a cabo por Celada y cols. (2009) murieron casi la mitad de los juveniles. Sin embargo, cuando la misma dieta se suplementó con nauplios (Celada y cols. 2007a, 2009) la supervivencia aumentó significativamente y se obtuvieron unos valores de crecimiento aceptables, al igual que con los quistes decapsulados

en el presente estudio. Considerando los insatisfactorios resultados logrados con piensos para salmónidos o carpa (Wolnicki y Myszowski 1998a, Wolnicki y cols. 2003b, Kamler y cols. 2006) y ante la inexistencia de una dieta formulada específicamente para juveniles de tenca, la suplementación con nauplios o quistes decapsulados resultaría más importante que la calidad de los piensos disponibles.

Kamler y cols. (2006) y Wolnicki y cols. (2006) sugirieron una relación entre el uso de dietas secas, un elevado factor de condición (1,3-1,4) y la aparición de deformidades corporales. En el presente estudio, el mayor factor de condición correspondió a las tencas que recibieron la menor cantidad de suplemento (300 quistes), si bien sólo el 1,06% presentó deformidades externamente visibles. Esto permite inferir que un pequeño suplemento diario de quistes decapsulados parece prevenir la aparición de deformidades, al menos dentro del rango de las tasas de crecimiento alcanzadas en el presente estudio.

En condiciones controladas, las tasas de crecimiento de juveniles de tenca de 3-5 meses al inicio de los experimentos están comprendidas entre 0,74 y 1,51 (Quirós y Alvaríño 1998, Quirós y cols. 2003, Wolnicki y cols. 2003b Celada y cols. 2007a), rango en el que se encuentran los resultados de este estudio. Teniendo en cuenta que Celada y cols. (2009) incrementaron las tasas de crecimiento de 1,21 a 1,98 suministrando nauplios sin restricción de cantidad, el crecimiento podría mejorarse administrando a los animales un mayor número de quistes.

6.4. ESTUDIO IV: EVALUACIÓN DE DIFERENTES CALIDADES Y PREPARACIONES DE QUISTES DECAPSULADOS DE *Artemia* COMO SUPLEMENTO DURANTE LA ETAPA JUVENIL DE LA TENCA

Evaluation of different qualities and preparations of decapsulated *Artemia* cysts as dietary supplement for juvenile tench (*Tinca tinca* L.)

Vanesa García, Jesús D. Celada, Álvaro González-Rodríguez, José M. Carral, María Sáez-Royuela, Rocío González, Álvaro González

2014

Journal of Applied Ichthyology 30, 40-43

6.4.1. Planteamiento experimental

En el estudio III se comprobó la idoneidad de los quistes decapsulados de *Artemia* como suplemento de una dieta seca en juveniles de tenca. Siguiendo el mismo esquema de investigación desarrollado en la etapa larvaria-postlarvaria (estudios I y II), sería interesante comprobar las posibilidades de uso de quistes con diferente calidad o sometidos a procesos de conservación a fin de facilitar las operaciones de alimentación y reducir costes. Asimismo, sería interesante determinar el periodo mínimo de suplementación de alimento natural para que la supervivencia y/o el crecimiento de los animales no sean afectados negativamente.

Los objetivos del presente estudio son evaluar diferentes formas de conservación y calidades de quistes decapsulados de *Artemia* como suplemento de una dieta seca formulada para alevines de carpa, así como el efecto de la supresión del suplemento después de un periodo inicial.

Experimento IV.1. Se emplearon 1.261 juveniles de 5 meses de edad ($31,41 \pm 0,15$ mm, $0,303 \pm 0,004$ g, $n=120$). Según la calidad, la forma de conservación y el tiempo de administración del suplemento, los tratamientos fueron:

- Quistes decapsulados de *Artemia* frescos de alta calidad durante 120 días.
- Quistes decapsulados de *Artemia* frescos de baja calidad durante 120 días.

- Quistes decapsulados de *Artemia* conservados en salmuera durante 120 días.
- Quistes decapsulados de *Artemia* desecados durante 120 días.
- Quistes decapsulados de *Artemia* frescos durante los primeros 45 días.

El suplemento fue de 1.800 quistes/g peso vivo y día. Para la conservación en salmuera y la desecación se utilizaron quistes de alta calidad (alto porcentaje de eclosión: 86%) de acuerdo con lo descrito en el estudio II. El porcentaje de eclosión de los quistes de menor calidad fue 10% después de haber estado almacenados sin envasar durante 5 años a temperatura ambiente. Como dieta seca, se utilizó un pienso para alevines de carpa (Aller Futura Starter feed, Aller Aqua), aportado a razón de 3% del peso vivo por día (Fotografía 19). Ambos alimentos se incrementaron mensualmente de acuerdo con el aumento de biomasa registrado en los controles periódicos. La alimentación se realizó manualmente 4 veces al día a intervalos regulares, el fotoperiodo fue natural (aprox. 11L:13O) y la temperatura del agua $23 \pm 0,5$ °C.

Cuando el suplemento no se administró durante todo el experimento, la supresión se realizó progresivamente al mes de comenzar la prueba, reduciendo un 25% los 5 primeros días, un 50% los 5 siguientes y un 75% los 4 últimos. Así, al mes y medio los animales recibieron como único alimento la dieta seca.

Cada 30 días se efectuaron controles de peso y longitud total de una muestra de 10 animales tomada al azar de cada tanque (30/tratamiento). Al final de la prueba (120 días), se realizó el recuento de sobrevivientes y de animales con deformidades corporales externamente visibles, se registró el peso y la longitud de muestras de 30 animales por réplica y se tomó una muestra de animales de cada tratamiento para analizar su composición corporal.



Fotografía 19. Pienso para alevines de carpa.

6.4.2. Resultados

Los valores finales de supervivencia, crecimiento, índice de conversión del alimento y

porcentaje de deformes se recogen en la Tabla 12. Las tasas de supervivencia se encontraron entre 99,6% y 100%.

Los animales que recibieron como suplemento las diferentes preparaciones o calidades de quistes durante 120 días no presentaron diferencias significativas respecto al crecimiento, factor de condición, índice de conversión del alimento y porcentaje de deformes. Los grupos donde se inició la supresión de suplemento tras un mes de prueba no mostraron diferencias significativas de peso ni de TCE con el resto de tratamientos. Sin embargo, presentaron una longitud y un índice de conversión del alimento significativamente menores, y un factor de condición y porcentaje de deformes significativamente superiores.

Los análisis de composición corporal al finalizar el experimento se presentan en la Tabla 13. Cuando se suprimió completamente el suplemento de quistes a los 45 días del comienzo de la prueba, los juveniles tuvieron un contenido significativamente más alto de lípidos y más bajo de cenizas.

Tabla 12. Porcentajes de supervivencia y valores de crecimiento a los 120 días de juveniles de tenca alimentados con una dieta comercial seca suplementada con quistes decapsulados de *Artemia*.

	Quistes frescos de alta calidad	Quistes conservados en salmuera	Quistes desecados	Quistes frescos de baja calidad	Supresión de quistes a los 45 días
Superv. (%)	99,6 ± 0,4	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	99,6 ± 0,4	99,6 ± 0,4
Long. (mm)	53,16 ± 0,30 ^a	53,12 ± 0,30 ^a	53,94 ± 0,33 ^a	54,00 ± 0,33 ^a	52,50 ± 0,30 ^b
Peso (g)	1,803 ± 0,033	1,835 ± 0,034	1,914 ± 0,038	1,891 ± 0,037	1,852 ± 0,040
TCE (%/día)	1,47 ± 0,02	1,49 ± 0,02	1,52 ± 0,02	1,51 ± 0,02	1,49 ± 0,02
K	1,19 ± 0,01 ^a	1,22 ± 0,01 ^a	1,21 ± 0,01 ^a	1,19 ± 0,01 ^a	1,26 ± 0,01 ^b
IC	1,62 ± 0,03 ^a	1,66 ± 0,03 ^a	1,60 ± 0,03 ^a	1,60 ± 0,03 ^a	1,28 ± 0,03 ^b
% Deformes	12,86 ± 4,01 ^a	13,29 ± 3,09 ^a	14,47 ± 1,22 ^a	13,32 ± 1,38 ^a	43,12 ± 1,58 ^b

Valores en las filas con distinto superíndice presentan diferencias significativas (P<0,05).

Tabla 13. Análisis de composición corporal de juveniles de tenca alimentados con una dieta comercial seca suplementada con quistes decapsulados de *Artemia*.

	Quistes frescos de alta calidad	Quistes conservados en salmuera	Quistes desecados	Quistes frescos de baja calidad	Supresión de quistes a los 45 días
Humedad (%)	75,5 ± 0,1	75,8 ± 0,0	75,3 ± 0,0	75,6 ± 0,3	75,5 ± 0,1
Proteína (%)	16,82 ± 0,06	16,54 ± 0,01	16,79 ± 0,23	16,77 ± 0,07	16,35 ± 0,10
Lípidos (%)	5,63 ± 0,07 ^a	5,59 ± 0,06 ^a	5,90 ± 0,10 ^a	5,48 ± 0,11 ^a	6,62 ± 0,10 ^b
Cenizas (%)	2,06 ± 0,02 ^a	2,08 ± 0,05 ^a	2,02 ± 0,04 ^a	2,15 ± 0,05 ^a	1,58 ± 0,06 ^b

Valores en las filas con distinto superíndice presentan diferencias significativas (P<0,05).

6.4.3. Discusión

La mortalidad a lo largo del experimento fue muy reducida, con unos porcentajes finales de supervivencia prácticamente del 100%.

Respecto al crecimiento, en términos de TCE, no se observaron diferencias significativas entre la calidad, la forma de conservación y el periodo de administración del suplemento de quistes decapsulados, con valores dentro del rango (0,74-1,98) para juveniles de 3 a 7 meses de esta especie (Quirós y Alvarino 1998, Quirós y cols. 2003, Wolnicki y cols. 2006, Celada y cols. 2007a, 2009, Mareš y cols. 2007, García y cols. 2010). La ausencia de diferencias tanto de supervivencia como de crecimiento entre los diferentes suplementos probados podría atribuirse a la similar composición de macronutrientes de los quistes de alta y baja calidad (Celada y cols. 2013) y los quistes conservados en salmuera o desecados (García y cols. 2011).

Aunque la supresión del suplemento a los 45 días no comprometió la supervivencia ni el crecimiento, sí tuvo efectos negativos sobre el porcentaje de animales con deformidades corporales, aumentando significativamente su aparición respecto a aquellos que recibieron quistes durante todo el ensayo. Las causas de las deformidades corporales en peces alimentados con piensos secos aún no están claras y se consideran como una posible respuesta a una alimentación inadecuada (Myszkowski y cols. 2002, Rennert y cols. 2003, Kamler y cols. 2006, Wolnicki y cols. 2006). En juveniles de tenca, se ha sugerido que existe una relación entre el uso de piensos comerciales formulados

para juveniles de otras especies, altos factores de condición (1,3-1,4) y la aparición de deformidades corporales (Kamler y cols. 2006, Wolnicki y cols. 2006, Myszkowski y cols. 2010). En nuestro experimento, también observamos esta relación en los animales que no recibieron quistes desde el día 45 que, con un factor de condición cercano a 1,3 presentaron elevado porcentaje de deformes (43,1%). Un factor de condición anormalmente alto sólo significa que el crecimiento en longitud es proporcionalmente menor que el crecimiento en peso. Una probable causa de ese crecimiento alométrico podría ser una alimentación inadecuada, ya que este fenómeno ha sido observado tanto por investigadores como productores cuando han usado como alimento dietas comerciales para otras especies en tanques de hormigón donde la disponibilidad de alimento natural es escasa o nula (García y cols. 2010).

La aparición de anomalías en la espina dorsal se ha vinculado a una acumulación excesiva de lípidos y una pobre mineralización de los esqueletos (Lall 2002). En este sentido, Wolnicki y cols. (2006) asociaron la alta incidencia de deformidades con un incremento significativo del contenido de lípidos y una disminución del contenido de cenizas en la composición corporal de juveniles de tenca, atribuyéndolo al uso de dietas no equilibradas. Del mismo modo, los análisis corporales realizados en nuestro estudio revelaron un contenido lipídico significativamente mayor y un contenido de cenizas significativamente menor cuando el suplemento se suprimió a los 45 días del comienzo de la prueba, coincidiendo con la mayor tasa de juveniles deformes. Sin embargo, es destacable que este porcentaje (43%) fue no-

tablemente inferior a los registrados alimentando únicamente con dietas secas, superiores al 70% (Wolnicki y cols. 2006). Este hecho apoya la consideración de García y cols. (2011) sobre el papel del suplemento de quistes en la prevención de deformidades corporales en juveniles de tenca alimentados con dietas no específicas. De este modo, el incremento del porcentaje de animales deformes puede atribuirse a la reducción del periodo de suplementación.

6.5. ESTUDIO V: EVALUACIÓN DE DIFERENTES DIETAS PRÁCTICAS CON DISTINTO CONTENIDO DE PROTEÍNA Y POSIBILIDADES DE SUSTITUCIÓN DE PROTEÍNA DE HARINA DE PESCADO POR PROTEÍNA DE HARINA DE SOJA DURANTE LA ETAPA JUVENIL DE LA TENCA

Response of juvenile tench (*Tinca tinca* L.) fed practical diets with different protein contents and substitution levels of fish meal by soybean meal

Vanesa García, Jesús D. Celada, Rocío González, José M. Carral, María Sáez-Royuela, Álvaro González

2013

Aquaculture Research DOI: 10.1111/are.12154

6.5.1. Planteamiento experimental

La utilización de piensos comerciales fabricados para otras especies en la cría de juveniles de tenca presenta serios inconvenientes como crecimiento lento, alta mortalidad y/o aparición de deformidades corporales, probablemente como respuesta a una alimentación inadecuada. La suplementación con alimento vivo o quistes decapsulados de *Artemia* (estudios III y IV) ha mostrado su eficacia para solventar estos problemas, permitiendo establecer programas de alimentación para la etapa juvenil con piensos disponibles en el mercado. Según el estado actual de conocimientos, el siguiente paso en el proceso de investigación para la intensificación de la cría de juveniles de tenca habría de orientarse hacia la formulación y fabricación de dietas específicas.

En la formulación de una dieta práctica es especialmente importante establecer las necesidades de proteína, tanto por su incidencia sobre el coste final como por sus implicaciones medioambientales. En este sentido, la acuicultura es altamente dependiente de la pesca marina para obtener harina de pescado, el ingrediente proteico más utilizado en la elaboración de alimentos para animales acuáticos (Tacon y Metian 2008), hecho que ha conducido a una doble problemática. Por una parte, la presión de la pesca sobre las poblaciones salvajes resulta insostenible (Hannesson 2003, Naylor y cols. 2009) y, por otra, el aumento de los precios derivados de su creciente demanda hace

inviabile el mantenimiento de los niveles de inclusión actuales (Tacon y Metian 2008, FAO 2009). Por ello, en los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre las posibilidades de reemplazar la harina de pescado por fuentes proteicas alternativas (Naylor y cols. 2009, Hardy 2010). Entre las de origen vegetal, destaca la soja (Brown y cols. 2008) debido a su alto contenido en proteína, su disponibilidad en el mercado y su precio relativamente bajo en comparación con la harina de pescado.

Con el propósito de determinar el contenido proteico adecuado y las posibilidades de sustitución de harina de pescado por harina de soja se diseñó el siguiente experimento:

Experimento V.1. Dada la limitada información sobre los requerimientos nutricionales de la tenca, se formuló una dieta práctica base tomando como referencia los conocimientos actuales sobre nutrición de peces carnívoros y alimentación de juveniles de tenca. Siguiendo la recomendación de García y cols. (2010), se añadió como ingrediente una pequeña cantidad de quistes decapsulados de *Artemia* y los lípidos se ajustaron a niveles relativamente bajos (Wolnicki y cols. 2006). Además, se utilizó una premezcla vitamínico-mineral para trucha. Se formularon y fabricaron nueve dietas prácticas con un contenido de proteína del 50%, 40% o 30% y tres niveles de sustitución (0%, 25% o 45%) de proteína de harina de pescado por proteína de harina de soja para cada contenido proteico.

Tabla 14. Formulación, composición de macronutrientes y perfil de aminoácidos de las dietas prácticas (experimento V.1).

Ingredientes (g/kg)	Dietas prácticas									
	50P-0S	50P-25S	50P-45S	40P-0S	40P-25S	40P-45S	30P-0S	30P-25S	30P-45S	
Harina de pescado ¹	671,0	489,0	341,7	521,2	376,0	258,5	370,8	263,0	175,5	
Harina de soja ¹	0,00	271,0	489,1	0,00	216,0	390,0	0,00	160,0	290,0	
Harina de maíz ²	163,6	74,6	3,8	313,4	242,6	186,1	463,8	411,6	369,1	
Quiistes de <i>Artemia</i> desecados ³	80	80	80	80	80	80	80	80	80	
Carboximetilcelulosa ⁴	30	30	30	30	30	30	30	30	30	
Aceite de hígado de bacalao ⁵	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Monofosfato ascórbico ⁶	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
Fosfato dicálcico ⁶	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
Lecitina de soja ⁷	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
Premezcla vitamínico-mineral ¹	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
Inositol ⁶	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
Cloruro de colina ⁶	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Niacina ⁶	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	
Composición (g/kg)										
Humedad	74,6	76,0	81,6	76,4	86,3	94,7	79,9	83,2	93,2	
Proteína bruta	503,5	501,8	503,3	409,0	407,4	404,1	308,6	309,2	300,6	
Lípidos brutos	97,7	90,9	75,5	95,4	89,0	78,1	95,0	85,7	73,1	
NFE	177,7	194,7	215,6	299,8	305,7	319,0	416,3	429,7	447,6	
Cenizas	146,5	136,7	124,0	119,4	111,6	104,0	100,2	92,2	85,5	
Energía (MJ/kg)	19,8	20,0	19,9	20,0	20,0	19,9	19,6	19,6	19,4	
Aminoácidos esenciales (%/materia seca)										
Arginina	6,43	5,47	4,70	4,59	3,84	3,24	2,72	2,15	1,69	
Histidina	1,23	1,03	0,87	1,03	0,88	0,75	0,83	0,71	0,62	
Isoleucina	1,67	1,62	1,58	1,27	1,24	1,20	0,87	0,83	0,82	
Leucina	3,65	3,60	3,57	2,95	2,93	2,92	2,24	2,21	2,21	
Lisina	4,24	4,20	4,19	3,56	3,56	3,56	2,86	2,85	2,86	

Metionina	1,40	1,17	0,99	1,10	0,92	0,77	0,79	0,65	0,55
Fenilalanina	1,59	1,60	1,61	1,28	1,30	1,31	0,97	0,97	0,99
Treonina	2,42	2,18	1,99	1,86	1,66	1,52	1,27	1,12	1,01
Triptófano	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02
Valina	2,67	2,73	2,79	2,19	2,25	2,31	1,71	1,75	1,79
Aminoácidos no esenciales									
(%/materia seca)									
Alanina	3,34	3,23	3,15	2,76	2,68	2,63	2,15	2,09	2,05
Aspártico	4,29	5,36	6,25	3,49	4,37	5,09	2,65	3,29	3,85
Cisteína	0,12	0,14	0,16	0,1	0,12	0,13	0,09	0,1	0,11
Glutámico	6,71	7,88	8,86	5,42	6,4	7,21	4,1	4,8	5,41
Glicina	1,71	1,61	1,55	1,31	1,25	1,19	0,91	0,85	0,82
Prolina	1,73	1,8	1,86	1,35	1,41	1,47	0,96	1	1,05
Serina	2,56	2,59	2,6	1,98	2	2,03	1,38	1,4	1,41
Tirosina	1,07	1,05	1,03	0,85	0,83	0,83	0,62	0,6	0,6
AAE/AANE	1,18	1,00	0,88	1,15	0,98	0,86	1,11	0,94	0,82

¹ Biomar Iberia/Proaqua Nutrición, S.A., ES-34210 Dueñas, Palencia, España.

² Adpan Europa, S.L., ES-33186 El Berrón, Siero, Asturias, España.

³ Inve Aquaculture Nutrition, High HUFA 430μ, Hoogveld 91, Dendermonde, Bélgica.

⁴ Helm Ibérica, S.A., ES-28108 Alcobendas, Madrid, España.

⁵ Acofarma Distribución, S.A., ES-08223 Terrassa, Barcelona, España.

⁶ Nutral, S.A., ES-28720 Colmenar Viejo, Madrid, España.

⁷ Biover N.V., Monnikenwerve 109, B-8000 Brugge, Bélgica.

Tabla 15. Supervivencia, resultados de crecimiento y porcentaje de deformes de juveniles de tenca alimentados con 9 dietas prácticas y un pienso comercial para alevines de carpa tras 90 días (experimento V.1).

	Dietas prácticas									Pienso de carpa
	50P-0S	50P-25S	50P-45S	40P-0S	40P-25S	40P-45S	30P-0S	30P-25S	30P-45S	
Superv. (%)	99,4 ± 0,3 ^a	99,3 ± 0,3 ^a	99,0 ± 0,6 ^a	98,4 ± 0,8 ^a	99,4 ± 0,3 ^a	99,1 ± 0,9 ^a	99,4 ± 0,6 ^a	99,0 ± 0,0 ^a	97,2 ± 1,0 ^a	98,2 ± 1,8 ^a
Long. (mm)	52,16 ± 0,24 ^a	52,23 ± 0,25 ^a	51,59 ± 0,23 ^a	48,46 ± 0,23 ^b	51,49 ± 0,26 ^a	47,09 ± 0,25 ^c	45,87 ± 0,22 ^d	49,66 ± 0,22 ^e	47,14 ± 0,22 ^c	50,32 ± 0,26 ^f
Peso (g)	1,758 ± 0,025 ^{ab}	1,727 ± 0,026 ^{ab}	1,606 ± 0,023 ^c	1,388 ± 0,023 ^d	1,702 ± 0,024 ^a	1,285 ± 0,022 ^e	1,165 ± 0,018 ^f	1,471 ± 0,021 ^g	1,219 ± 0,021 ^f	1,797 ± 0,030 ^b
TCE (%/día)	1,95 ± 0,02 ^a	1,93 ± 0,02 ^a	1,85 ± 0,01 ^b	1,68 ± 0,02 ^c	1,91 ± 0,02 ^a	1,59 ± 0,02 ^d	1,49 ± 0,02 ^e	1,75 ± 0,02 ^f	1,53 ± 0,02 ^e	1,97 ± 0,02 ^a
K	1,23 ± 0,01 ^{ab}	1,20 ± 0,01 ^a	1,16 ± 0,01 ^c	1,20 ± 0,01 ^a	1,24 ± 0,01 ^b	1,21 ± 0,01 ^a	1,20 ± 0,01 ^a	1,20 ± 0,01 ^a	1,15 ± 0,01 ^c	1,40 ± 0,01 ^d
IC	1,22 ± 0,02 ^{ab}	1,23 ± 0,02 ^{ab}	1,28 ± 0,02 ^b	1,42 ± 0,02 ^c	1,24 ± 0,02 ^{ab}	1,49 ± 0,03 ^d	1,58 ± 0,02 ^e	1,37 ± 0,02 ^c	1,51 ± 0,03 ^d	1,18 ± 0,02 ^a
% Deformes	0,34 ± 0,34 ^a	0,31 ± 0,31 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	3,21 ± 0,66 ^a	1,93 ± 0,57 ^a	2,22 ± 2,22 ^a	0,32 ± 0,32 ^a	0,64 ± 0,32 ^a	0,31 ± 0,31 ^a	87,6 ± 1,86 ^b

Valores en las filas con distinto superíndice presentan diferencias significativas (P<0,05).

Las dietas administradas a los juveniles fueron:

- 50% proteína-0% sustitución (50P-0S).
- 50% proteína-25% sustitución (50P-25S).
- 50% proteína-45% sustitución (50P-45S).
- 40% proteína-0% sustitución (40P-0S).
- 40% proteína-25% sustitución (40P-25S).
- 40% proteína-45% sustitución (40P-45S).
- 30% proteína-0% sustitución (30P-0S).
- 30% proteína-25% sustitución (30P-25S).
- 30% proteína-45% sustitución (30P-45S).

El contenido proteico de la harina de pescado y de la harina de soja fue 67,7% y 46%, respectivamente. La formulación y composición de macronutrientes de las diferentes dietas se muestran en la Tabla 14.

Los ingredientes se molieron con un molino rotatorio Brabender y se mezclaron con una mezcladora Stephan UMC5. Posteriormente, la mezcla se introdujo en una extrusora Brabender E19/25D manteniendo un rango de temperatura entre 75°C y 90°C. Los pellets, después de secarse durante 24 horas a 30°C, recibieron una capa de aceite de hígado de bacalao. El diámetro de la partícula se ajustó al tamaño de los alevines: 1 mm durante los primeros 60 días y 1,5 mm desde el día 61 hasta el 90 (Fotografía 20).



Fotografía 20. Dieta práctica.

Como referencia, otro grupo de juveniles se alimentó con un pienso comercial para alevines de carpa (Aller Futura) con un contenido proteico de 63,8%.

Se utilizaron 2.520 juveniles de tenca de 5 meses de edad ($30,54 \pm 0,12$ mm y $0,300 \pm 0,003$ g, $n=120$).

La tasa de alimentación fue de 3,5% del peso vivo por día. Las cantidades se ajustaron según una estimación semanal de la biomasa de cada tanque y los incrementos de biomasa calculados mensualmente en los muestreos. La alimentación se realizó manualmente 4 veces al día a intervalos regulares durante las horas de luz. El fotoperiodo fue 16L:8O y la temperatura $23 \pm 1^\circ\text{C}$. El experimento tuvo una duración de 90 días.

Cada 30 días se tomó una muestra de 20 animales por tanque (60 por tratamiento, 24% del número inicial) para registrar la longitud y el peso. Al final de la prueba (90 días) se contaron los animales sobrevivientes y el número de animales con deformidades corporales. Además, se pesaron y midieron individualmente 50 animales por tanque (150 por tratamiento, 59% del número inicial).

6.5.2. Resultados

Experimento V.1. Los valores finales de supervivencia, crecimiento, índice de conversión del alimento y porcentaje de animales con deformidades corporales visibles se recogen en la Tabla 15. Las tasas de supervivencia estuvieron comprendidas entre 98,2% y 99,4%, sin diferencias significativas entre tratamientos.

Los animales alimentados con la dieta práctica 50P-0S presentaron el crecimiento más alto (52,16 mm, 1,76 g y 1,95%/día), sin diferencias significativas con los que recibieron las dietas 50P-25S y 40P-25S.

Respecto a la sustitución de proteína animal por proteína vegetal, un 25% no afectó al crecimiento cuando la dieta tenía el 50% de proteína y lo mejoró significativamente en los niveles del 40% y del 30%. Sin embargo, el mayor porcentaje de sustitución (45%) afectó negativamente al crecimiento en todos los casos.

Los juveniles alimentados con el pienso comercial de carpa tuvieron el factor de condición (1,40) más alto, mientras que en aquellos que recibieron las diferentes dietas prácticas estuvo comprendido entre 1,15 y 1,24.

Los animales alimentados con las dietas 50P-0S y 50P-25S tuvieron una longitud significativamente más alta y un peso y TCE similares a los alimentados con el pienso comercial para alevines de carpa (63,8% proteína).

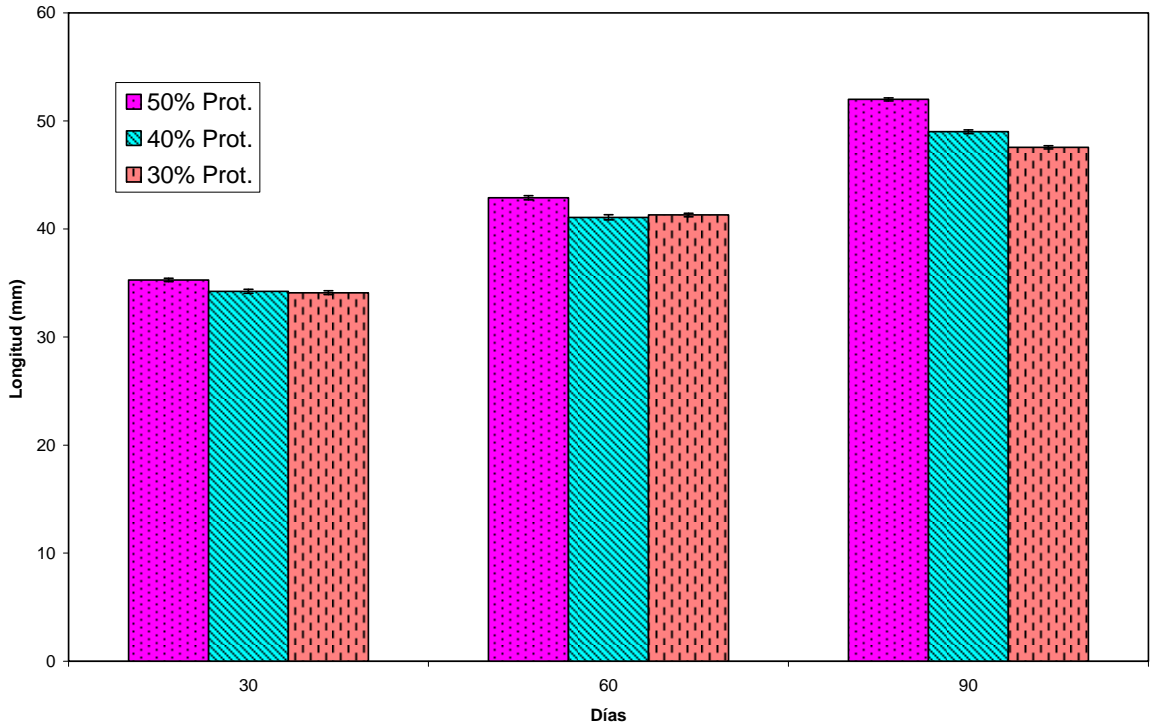


Figura 3. Evolución de la longitud a lo largo del experimento según el contenido proteico de la dieta.

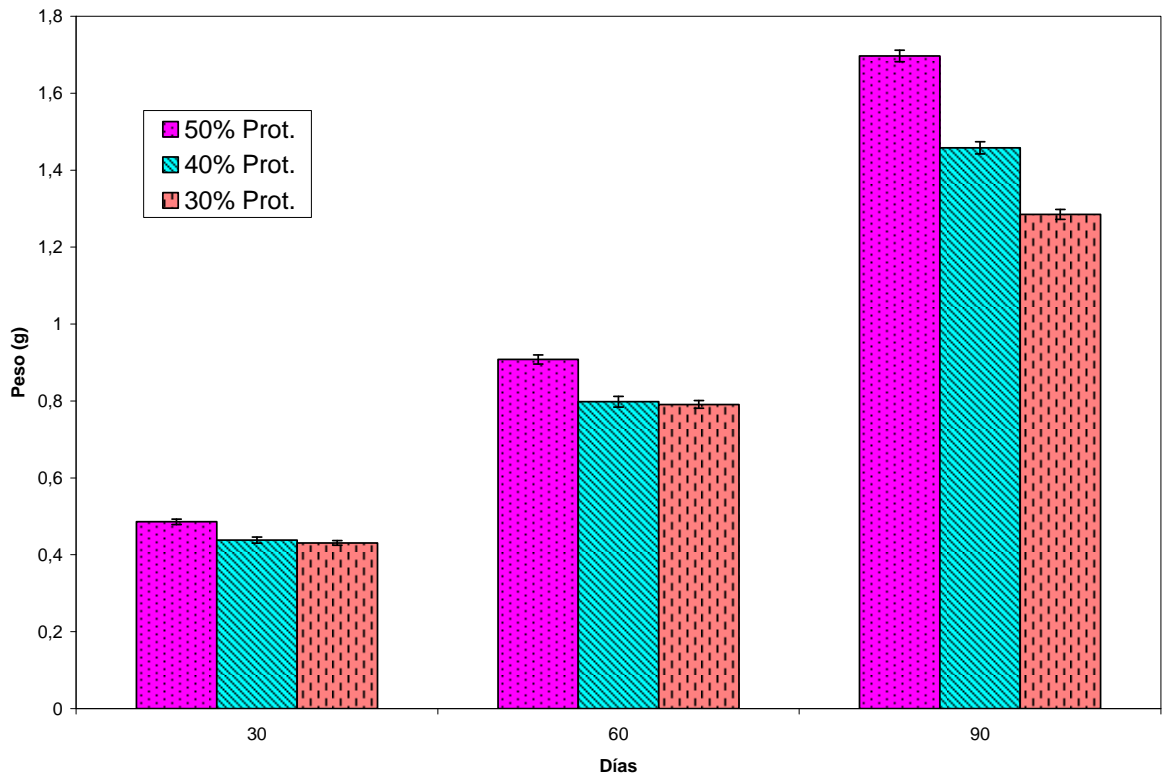


Figura 4. Evolución del peso a lo largo del experimento según el contenido proteico de la dieta.

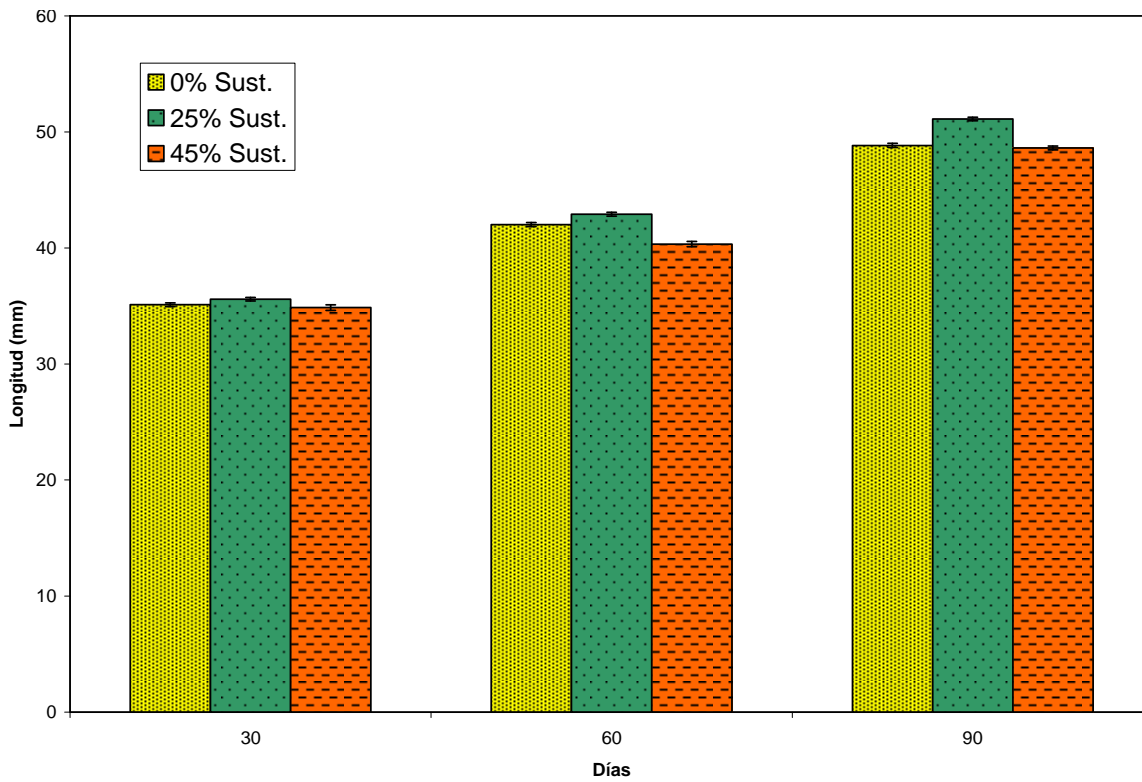


Figura 5. Evolución de la longitud a lo largo del experimento según el nivel de sustitución de proteína de la dieta.

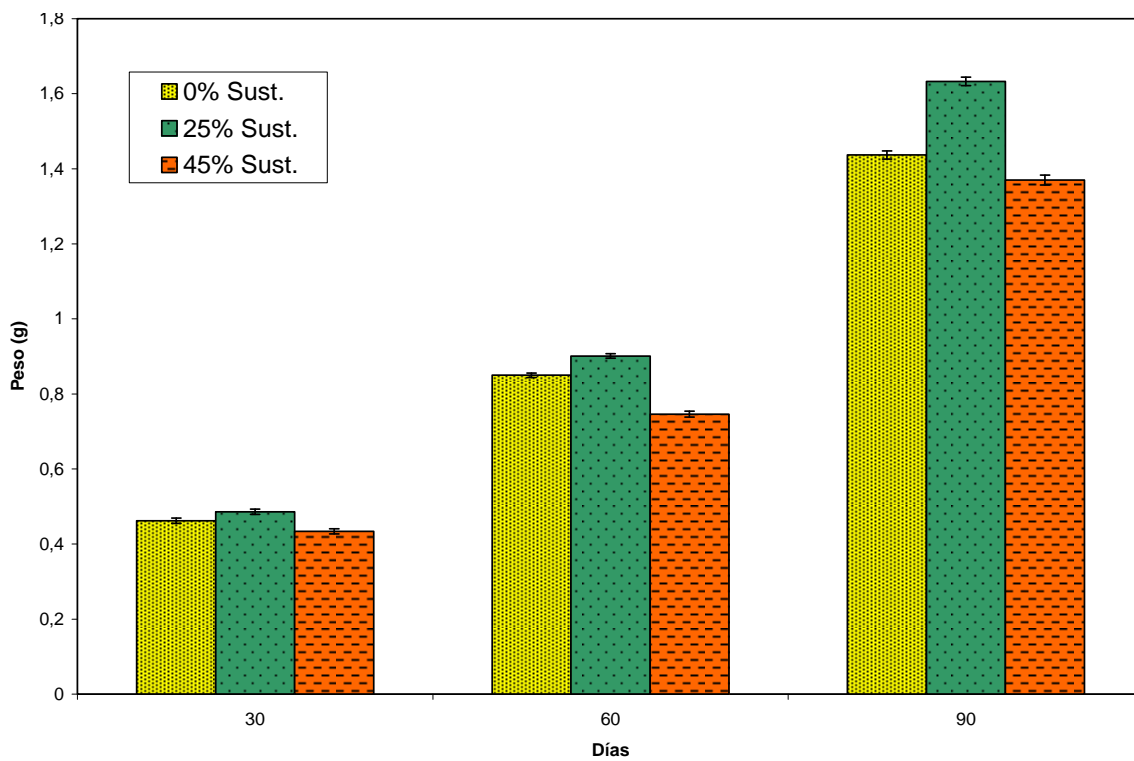


Figura 6. Evolución del peso a lo largo del experimento según el nivel de sustitución de proteína de la dieta.

Los índices de conversión del alimento para las dietas prácticas estuvieron entre 1,22 y 1,58. Los valores más bajos correspondieron a las dietas 50P-0S, 50P-25S y 40P-25S (media: 1,23) sin diferencias significativas entre ellas ni con el pienso de carpa. Considerando sólo el contenido proteico de la dieta, el índice de conversión se incrementó significativamente a medida que se redujo el contenido de proteína en la dieta del 50% (media: 1,25) al 30% (media: 1,49). Teniendo en cuenta únicamente la fuente proteica, el 25% de sustitución de proteína animal (harina de pescado) por proteína vegetal (harina de soja) mejoró significativamente el índice de conversión del alimento en las dietas con un 40% y un 30% de proteína.

Después de 90 días de experimento, el porcentaje de animales con deformidad externamente visible fue bajo (entre 0% y 3,2%) en los que recibieron las dietas prácticas, sin diferencias significativas entre ellas. Sin embargo, los alimentados con el pienso comercial de carpa presentaron un porcentaje significativamente mayor (87,6%). La principal deformidad registrada afectó al pedúnculo caudal.

Las Figuras 3 y 4 muestran la evolución de la longitud y del peso, respectivamente, a lo largo del experimento según el contenido proteico de la dieta. A los 30 y 60 días, el crecimiento fue significativamente más alto con un 50% de proteína. Al final del experimento (90 días), la longitud y el peso se redujeron significativamente a medida que disminuyó el contenido proteico del 50% al 30%.

Las Figuras 5 y 6 muestran la evolución de la longitud y del peso, respectivamente, a lo largo del experimento según el nivel de sustitución de proteína de harina de pescado por proteína de harina de soja. Una sustitución del 25% mejoró el crecimiento, encontrándose diferencias significativas de longitud y peso a partir de los 60 días.

6.5.3. Discusión

La mayoría de los experimentos realizados hasta el presente con juveniles de tenca han comenzado con animales de 3 a 7 meses de edad (Quirós y Alvaríño 1998, Quirós y cols. 2003, Wolnicki y cols. 2003b, Celada y cols. 2007a, Mareš y cols. 2007, Celada y cols. 2009, García y cols. 2010) registrándose las mejores tasas de crecimiento (entre 1,21 y 1,98) cuando recibieron dietas secas suplementadas con alimento vivo o natural. En nues-

tro estudio, los juveniles de 5 meses de edad se alimentaron únicamente con dietas prácticas extruidas y las tasas de crecimiento (entre 1,49 y 1,95) fueron similares a las obtenidas con suplementación de alimento vivo o quistes de *Artemia*.

La reducción del nivel proteico de las dietas prácticas afectó negativamente a las tasas de crecimiento, que disminuyeron significativamente desde 1,91, cuando el contenido de proteína fue 50%, a 1,59, cuando se redujo a 30%. Es importante destacar que las tasas de crecimiento de los juveniles alimentados con las dietas prácticas con un 50% de proteína (50P-0S o 50P-25S) y la de los alimentados con el pienso comercial de carpa (63,8% proteína) no mostraron diferencias significativas. Según estos resultados, podría sugerirse que contenidos proteicos superiores al 50% serían innecesarios en la cría de juveniles de tenca a partir de los 5 meses de edad.

Respecto a las posibilidades de sustitución de harina de pescado, otros peces carnívoros mostraron diferente tolerancia a la inclusión de harina de soja en la dieta. Así, en la cobia (*Rachycentrum canadum*) se logró sustituir hasta un 40% de la proteína de la dieta sin comprometer el crecimiento o la eficiencia de la alimentación (Chou y cols. 2004). Sin embargo, en otras especies como la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) o el jurel japonés (*Seriola quinqueradiata*) una sustitución del 25% (Kaushik y cols. 1995) o superior al 20% (Shimeno y cols. 1993), respectivamente, afectó negativamente al crecimiento y a la eficiencia alimentaria. En nuestro estudio, los resultados muestran que al menos el 25% de la proteína aportada por la harina de pescado podría ser reemplazada por proteína de harina de soja. Cabe destacar que, respecto a las dietas sin sustitución, la inclusión del 25% de proteína de harina de soja no afectó al crecimiento cuando el nivel de proteína fue 50% y lo mejoró significativamente en los niveles de 40% (40P25S) y de 30% (30P25S), a pesar de que el contenido de la mayor parte de aminoácidos esenciales (con excepción de la valina que incrementó y de la lisina y el triptófano que mantuvieron sus valores) en estas dietas fue menor que en aquellas donde no se realizó sustitución (40P0S y 30P0S). Considerando la ausencia de referencias sobre las necesidades de aminoácidos esenciales, podría plantearse la hipótesis de que el adecuado balance de las dietas formuladas para juveniles de tenca habría permitido compensar la mencionada reducción de aminoácidos.

Por el contrario, en dietas con el mismo contenido proteico, el mayor nivel de sustitución (45%) afectó negativamente el crecimiento. Es bien conocido que el menor contenido de aminoácidos esenciales en la harina de soja, especialmente lisina, metionina y treonina, respecto a la harina de pescado ha limitado su uso en la alimentación de animales acuáticos (Brown y cols. 2008). En nuestro estudio, los contenidos de aminoácidos esenciales se redujeron a medida que incrementaron los niveles de sustitución. Así, con el 45% de sustitución en la dieta con 40% de proteína (40P45S) los contenidos de arginina, histidina y treonina fueron 3,24%, 0,75% y 1,52% de materia seca respectivamente y el crecimiento se redujo significativamente. Sin embargo, estos valores fueron más altos que los determinados para otros peces de agua dulce como la trucha arcoiris o el pez gato (NCR 2011). Sólo la metionina (0,77% de materia seca) estuvo por debajo de los requerimientos de las especies anteriormente mencionadas.

Además de un menor contenido de aminoácidos esenciales, la soja contiene factores antinutricionales que interfieren en los procesos de absorción de nutrientes. Aunque la transformación de la soja en grano a harina y su posterior extrusión disminuyen su concentración (Brown y cols. 2008), la presencia de estos compuestos constituye otro factor limitante para la inclusión de harina de soja en alimentos para animales acuáticos. No obstante, a pesar de las limitaciones nutricionales expuestas, los resultados obtenidos apuntan a la posibilidad del uso de harina de soja en el desarrollo de dietas específicas para juveniles de tenca.

En esta etapa existe escasa información sobre el índice de conversión del alimento y los datos disponibles se han calculado considerando la cantidad total de alimento suministrado a los peces. En la cría intensiva de juveniles de 3 meses de edad (aproximadamente 0,45 g peso inicial) alimentados con un pienso comercial de trucha (50% proteína) durante 450 días, Rennert y cols. (2003) obtuvieron valores entre 1,75 y 3,56. Mareš y cols. (2007) probaron tres dietas secas (35-42% proteína) con juveniles de 7 meses de edad (0,8-1,2 g peso inicial) durante 63 días, y obtuvieron unos valores entre 1,84-4,15. En el presente experimento de 90 días con juveniles de 5 meses de edad (0,3 g peso inicial), los índices de conversión del alimento para las dietas prácticas (proteína 30-50%) variaron desde 1,22 hasta 1,58. Estos valores son más favorables que los conseguidos anteriormente y

están dentro del rango (entre 0,8-1,5) establecido en otras especies piscícolas con sistemas de cría intensiva consolidados (Hardy y Barrows 2002).

Aunque en condiciones naturales el porcentaje de peces deformes es mínimo, las malformaciones son un problema indeseable pero inherente en la acuicultura intensiva, que conlleva graves pérdidas para el sector productivo. Los peces con deformidades esqueléticas pueden experimentar un menor crecimiento y una mayor mortalidad y tienen precios inferiores en el mercado (Cahu y cols. 2003). Por otra parte, las deformidades en los peces contribuyen a distorsionar la imagen que los consumidores tienen de la acuicultura (Zambonino-Infante y cols. 2009). Por estas razones, las piscifactorías realizan importantes esfuerzos para clasificar y rechazar los juveniles deformes. Una alimentación inadecuada, especialmente durante las etapas tempranas del desarrollo, se ha señalado como agente causal de malformaciones (Fontagné 2009). En juveniles de tenca, se han registrado porcentajes de peces deformes entre el 78% y el 96% (Wolnicki y cols. 2006) sugiriendo la existencia de una relación entre el uso de dietas comerciales secas, elevados factores de condición (1,3-1,4) y la aparición de deformidades (Kamler y cols. 2006, Wolnicki y cols. 2006, Myszkowski y cols. 2010). Algunos piscicultores han observado esta relación cuando la cría se realiza en estanques de hormigón donde es escasa la disponibilidad de alimento natural. En nuestro estudio, las deformidades corporales podrían haber tenido un origen óseo, probablemente debido a un acortamiento del cuerpo causado por una compresión o fusión de vértebras, tal y como Baeverfjord y cols. (2009) describieron en la trucha arcoiris. Esto explicaría la relación anteriormente mencionada, ya que un alto factor de condición conlleva un crecimiento en longitud proporcionalmente menor que en peso.

Algunos autores han relacionado el ritmo de crecimiento de juveniles de tenca alimentados con piensos formulados para otras especies con el incremento de la aparición de deformidades corporales (Rennert y cols. 2003, Myszkowski y cols. 2010). Por ello, Kamler y cols. (2006) propusieron como medida preventiva mantener la tasa de alimentación por debajo de la saciedad, sin exceder el 2,5% de la biomasa. Sin embargo, con tasas de alimentación superiores a las recomendadas (3% de la biomasa) no se ha registrado una mayor incidencia de malformaciones cuando la dieta co-

mercial se suplementó con nauplios de *Artemia* vivos (Celada y cols. 2009) o quistes de *Artemia* decapsulados (García y cols. 2010). En nuestro estudio, ninguna de las dietas prácticas extruidas fueron suplementadas con alimento vivo o natural y tan sólo el 1% (media) de los animales presentaron deformidades. Por el contrario, los juveniles alimentados con el pienso de carpa tuvieron el factor de condición más alto (1,4) y el 87,6% de ellos presentaron deformidades. La gran diferencia en el número de animales deformes sugiere que la dieta práctica es más equilibrada que el pienso de carpa, y garantiza la obtención de resultados aceptables sin suplementación de alimento natural.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera A (2004). Mejora de la fase de alevinaje de la tenca (*Tinca tinca* L.) en condiciones controladas. **Tesis Doctoral**, Universidad de León, España.
- Aguilera A, Celada JD, Carral JM, Sáez Royuela M, Rodríguez R, Melendre P (2005). Eficiencia de la incubación artificial de huevos de tenca (*Tinca tinca* L.) en tres sistemas diferentes. **Actas del IX Congreso Nacional de Acuicultura**. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, España.
- Alonso M, Bartolomé M, Écija JL (2002). Tenca, una producción piscícola desconocida. **Mundo Ganadero** **46**, 64-66.
- Backiel T (1986). Masking effects of variability of growth on its estimation in juvenile tench (*Tinca tinca* L.) reared at different temperatures. **Polish Archives of Hydrobiology** **33(1)**, 69-95.
- Baeverfjord G, Lein I, Fontagné S (2009). Recommendations on prevention of malformations in rainbow trout. En: Baeverfjord G, Helland S, Hough C (Eds.), **Control of Malformations in Fish Aquaculture: Science and Practice**. RapidPress, Luxemburgo.
- Barth T, Kouřil J, Hamáčková J, Velek J, Barthova J, Hulova I, Jezek J, Pospisek J (1997). Induced ovulation and artificial stripping in tench (*Tinca tinca* L.) and other fresh water fish species by means of GnRH analogues. Czech experiences 1989-1996 A minireview **Polish Archives of Hydrobiology** **44**, 183-190.
- Benijts, F, Van Voorden E, Sorgeloos P (1976). Changes in the biochemical composition of the early larval stages of the brine shrimp, *Artemia salina* L.. En: Persoone G, Jaspers E (Eds.), **Proceedings of the 10th European Symposium on Marine Biology**, Ostend, Bélgica.
- Billard R, Marcel J (1980). Quelques techniques de production de poissons d'étangs. **La pisciculture française** **59**, 9-49.
- Bircan R, Sakai K, Takashima F (1989). Effect of food amount on growth of tench larvae, *Tinca tinca*. **La Mer** **27**, 15-18.
- Blasco M, Pérez-Bote JI, Da Silva E (1992). Características de la dieta de *Tinca tinca* L. 1758 en Extremadura. **Jornadas Internacionales de Acuicultura Continental y I Salón Monográfico Internacional sobre Maquinaria y Equipos para Acuicultura**. Salamanca, España.
- Boujard T (2004). Comportamiento alimentario y regulación de la ingesta. En: Guillaume J, Kaushik S, Bergot P, Métalier R (Eds.), **Nutrición y alimentación de peces y crustáceos**. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Breton B, Horoszewicz L, Bieniarz K, Epler P (1980). Temperature and reproduction in tench. Effect of a rise in the annual temperature regime on gonadotropin level, gametogenesis and spawning. II. The female. **Reproduction, Nutrition, Development** **20(4A)**, 1011-1024.
- Brown PB, Kaushik SJ, Peres H (2008). Protein feed- stuffs originating from soybeans. En: Lim C, Webster CD, Lee C (Eds.), **Alternative Protein Sources in Aquaculture Diets**. The Haworth Press, Nueva York, EE.UU.
- Brylinski E, Pyka J (1976). Rozród lina w warunkach sztucznych [Artificial reproduction of tench]. **Gosp. Rybna** **28(8)**, 6-8.
- Cahu C, Zambonino-Infante JL, Takeuchi T (2003). Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. **Aquaculture** **227**, 1-4.
- Carral JM, Rodríguez R, Celada JD, Sáez-Royuela M, Aguilera A, Melendre P (2003). Successful gonadal development and maturation of tench (*Tinca tinca* L.) in a small concrete ponds. **Journal of Applied Ichthyology** **19(3)**, 130-131.
- Carral JM, Celada JD, Sáez-Royuela M, Rodríguez R, Aguilera A, Melendre PM (2006). Effects of four desticking procedures on hatching rate and further survival and growth of larvae in the tench (*Tinca tinca* L.). **Aquaculture Research** **37**, 632-636.
- Carral JM, García V, Celada JD, González R, Sáez-Royuela M, González Á (2014). Effects of different photoperiod conditions on juvenile tench (*Tinca tinca* L.) under intensive rearing. **Journal of Applied Ichthyology** **30**, 44-49.

- Celada JD, Aguilera A, Carral JM, Sáez-Royuela M, Melendre P, Pérez JR (2007a). Effects of stocking density on survival and growth of juvenile tench (*Tinca tinca* L.). **Aquaculture International** **15**, 461-465.
- Celada JD, Carral JM, Rodríguez R, Sáez-Royuela M, Aguilera A, Melendre P, Martín J (2007b). Tench (*Tinca tinca* L.) larvae rearing under controlled conditions: density and basic supply of *Artemia* nauplii as the sole food. **Aquaculture International** **15**, 489-495.
- Celada JD, Aguilera A, Carral JM, Sáez-Royuela M, Melendre P (2008). Rearing tench (*Tinca tinca* L.) larvae on live feed (*Artemia*) and on two transition schedules from live to dry diets **Journal of Applied Ichthyology** **24**, 595-600.
- Celada JD, Aguilera A, García V, Carral JM, Sáez-Royuela M, González R, González A (2009). Rearing juvenile tench (*Tinca tinca* L.) under controlled conditions using *Artemia* nauplii as supplement to a dry diet. **Aquaculture International** **17**, 565-570.
- Celada JD, García V, Carral JM, Sáez-Royuela M, González R, González Á (2013). Decapsulated *Artemia* cysts of different quality (high or low hatch rate) as direct food for tench (*Tinca tinca* L.) larvae. **Aquaculture Research** **44**, 167-175.
- Chou RL, Her BY, Su MS, Hwang G, Wu YH, Chen HY (2004). Substituting fish meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. **Aquaculture** **229**, 325-333.
- Coad B (1999). Freshwater fishes. En: Yarshater E (Ed.), **Encyclopædia Iranica (Daneshnameh-ye Iranika)**. Vol. IX, Fascicule 6. **Festivals VIII - Fish**. Bibliotheca Persica Press, Nueva York, EE.UU.
- Cohen SA, Michaud DP (1993). Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry** **211(2)**, 279-87.
- Cohen SA, De Antonis KM (1994). Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. Analysis of feed grains, intravenous solutions and glycoproteins. **Journal of Chromatography A** **661(1-2)**, 25-34.
- Dabrowski K, Glogowski J (1977). Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion processes in fish. **Hydrobiology** **54**, 129-134.
- De los Santos C, Zorruelos P, Laviña E, Bernardino A (1980). Successful inoculation of *Artemia* and production of cysts in man-made salterns in the Philippines. En: Persoone G, Sorgeloos P, Roels O, Jaspers E (Eds.), **The brine shrimp *Artemia* Vol. 3: Ecology, culturing, use in aquaculture**. Universa Press, Wetteren, Bélgica.
- Duda P (1994). Rearing of sheatfish (*Silurus glanis*) fry in polyculture with tench (*Tinca tinca*) and common carp (*Cyprinus carpio*). **Bulletin VÚRH Vodňany** **1**, 21-26.
- FAO (2009). **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia.
- FAO (2010). **El estado mundial de la pesca y la acuicultura**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia.
- FAO (2014). **El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Oportunidades y desafíos**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia.
- Fernández San Juan J (1995). Tench (*Tinca tinca* L.) propagation in Spain. Induced spawning and larval development. **Polish Archives of Hydrobiology** **42(1-2)**, 63-67.
- Fleig R, Gottschalk T, Hubenova T (2001). Raising larvae of the tench (*Tinca tinca* L.). **Bulgarian Journal of Agricultural Science** **7**, 479-488.
- Fontagné S. (2009) The impact of nutritional components on rainbow trout. En: Baeverfjord G, Helland S, Hough C (Eds.), **Control of Malformations in Fish Aquaculture: Science and Practice**. RapidPress, Luxemburgo.
- Freyhof J, Kottelat M (2008). *Tinca tinca*. En: IUCN 2013. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2013.2. (www.iucnredlist.org). Descargado el 20 de mayo de 2014.
- García V, Celada JD, Carral JM, Sáez-Royuela M, González R, González Á (2010). Decapsulated *Artemia* cysts: A suitable dietary supplement for juvenile tench (*Tinca tinca* L.). **Journal of Applied Ichthyology** **22**, 57-65.

- García V, Celada JD, Carral JM, González R, González Á, Sáez-Royuela M (2011). A comparative study of different preparations of decapsulated *Artemia* cysts as food for tench (*Tinca tinca* L.) larvae. **Animal Feed Science and Technology** **170**, 72-77.
- Gatlin DM III, Barrows FT, Brown P, Dabrowski K, Gaylord TG, Hardy RW, Herman E, Hu G, Krogdahl Å, Nelson R, Overturf K, Rust M, Sealey W, Skonberg D, Souza EJ, Stone D, Wilson R, Wurtele E (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. **Aquaculture Research** **38**, 551-579.
- Gela D, Linhart O, Flajšhans M, Rodina M (2003). Egg incubation time and hatching success in tench *Tinca tinca* (L.) related to the procedure of egg stickiness elimination. **Journal of Applied Ichthyology** **19**(3), 132-133.
- Geldhauser F (1992). The interplay of egg swelling and sperm activity in the fertilization process of tench (*Tinca tinca* L.). En: Adámek Z, Flajšhans M (Eds.), **Proceedings of the Scientific Conference Fish Reproduction**. Vodňany, República Checa.
- Grozev GK, Hubenova-Siderova T, Paskaleva E (2000). Natural feeding of tench (*Tinca tinca* L.) at polyculture rearing in carp ponds. **Bulgarian Journal of Agricultural Science** **6**, 209-214.
- Guillaume J, Kaushik S, Bergot P, Métailler R (2004). **Nutrición y alimentación de peces y crustáceos**. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Hamáčková J, Kouřil J, Kamler E, Szalaminska M, Vachta R Stibranyiová I, Muñoz C (1995). Influence of short-term temperature decreases on survival, growth and metabolism of tench (*Tinca tinca* L.) larvae. **Polish Archives of Hydrobiology** **42**(1-2), 109-120.
- Hamáčková J, Kouřil J, Kozák, P (1998). The effects of pH upon survival and growth rates in tench (*Tinca tinca* (L.)) larvae. **Polish Archives of Hydrobiology** **45**(3), 399-405.
- Hannesson R (2003). Aquaculture and fisheries. **Marine Policy** **27**, 169-178.
- Hardy RW (2010). Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. **Aquaculture Research** **41**, 770-776.
- Hardy RW, Barrows FT (2002). Diet formulation and manufacture. En: Halver JE, Hardy RW (Eds.), **Fish Nutrition**. Academic Press, San Diego, EE.UU.
- Herrero MJ, Madrid JA, Sánchez-Vázquez FJ (2003). Entrainment to light of circadian activity rhythms in tench (*Tinca tinca*). **Chronobiology International** **20**(6), 1001-1017.
- Horváth L (1977). Compótenyésztés [The artificial spawning of tench]. **Halászat** **23**, 77-79.
- Horváth L, Lukowicz VM (1982). Tables with data of hatchery procedures and rearing process of some breed warmwater fishes. **Aquacultura Hungarica** **3**, 212-219.
- Ipac (2006). La tenca se presenta como un candidato excelente para la acuicultura española. Conclusiones de las I Jornadas Nacionales de Cultivo de la Tenca, Brozas, Cáceres. **Ipac. acuicultura** **15**, 8-11.
- ISO Norms (1973). Determination of Lipids Content (R-1443). **International Organization for Standardization**, Ginebra, Suiza.
- ISO Norms (1978). Determination of Nitrogen Content (R-937). **International Organization for Standardization**, Ginebra, Suiza.
- ISO Norms (1979). Determination of Moisture Content (R-1442). **International Organization for Standardization**, Ginebra, Suiza.
- ISO Norms (1998a). Determination of Ash Content (R-936). **International Organization for Standardization**, Ginebra, Suiza.
- ISO Norms (1998b). Determination of Gross Caloric Value: Bomb Calorimeter Method (ISO 9831). **International Organization for Standardization**, Ginebra, Suiza.
- Jackson DL, Castell JD, Harrison KE (1990). Effect of storage conditions on the fatty acid composition of *Artemia* cysts and nauplii. **Bulletin of Aquaculture Association of Canada** **90**(4), 50-53.
- Jähnichen H, Kohlmann K (1999). Decapsulated *Artemia* cysts - a good alternative to live zooplankton. **Fish Farmer** **3**, 30-31.
- Kaiser H, Endemann F, Paulet TG (2003). A comparison of artificial and natural foods and their combinations in the rearing of goldfish, *Carassius auratus* (L.). **Aquaculture Research** **34**, 943-950.

- Kamler E, Szalamińska M, Hamáčková J, Kouřil J, Vachta R, Stibranyiova I, Muñoz C (1995). Growth and metabolism during development of tench (*Tinca tinca* L.) embryos and larvae at 22° C. **Polish Archives of Hydrobiology** **42(1-2)**, 97-108.
- Kamler E, Myszkowski L, Kamiński R, Korwin-Kossakowski M, Wolnicki J (2006) Does overfeeding affect tench *Tinca tinca* (L.) juveniles? **Aquaculture International** **14**, 99-111.
- Kaushik SJ, Cravedi JP, Lalles JP, Sumpter J, Fauconneau B, Laroche M (1995). Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture** **133**, 257-274.
- Kennedy M, Fitzmaurice D (1970). The biology of tench *Tinca tinca* (L.) in irish waters. **Proceedings of the Royal Irish Academy** **69(B)**, 31-88.
- Kolkovski S, Tandler A, Kissil GW, Gertler A (1993). The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry** **12**, 203-209.
- Korwin-Kossakowski M, Jezierska B (1984). The influence of thermal conditions on postembryonic development of some species of Coregonidae and Cyprinidae. **Zoologica Poloniae** **31(1-4)**, 43-56.
- Kouřil J (1998). Hormonally induced spawning of tench *Tinca tinca* (L.) females. (A review). **Polish Archives of Hydrobiology** **45(3)**, 415-433.
- Kouřil J, Chábera S (1976). Umělý výtěr lína obecného (*Tinca tinca* L.) [Artificial spawning of tench]. **Bulletin VÚRH Vodňany** **12**, 7-13.
- Kouřil J, Barth T (1981). Docílení ovulace jiker pomocí LH-RH při umělém výtěru lína obecného (*Tinca tinca* L.) [The achievement of egg ovulation in artificial spawning of tench (*Tinca tinca* L.) using LH-RH]. **Bulletin VÚRH Vodňany** **17**, 13-18.
- Kouřil J, Hamáčková J (1996). Hormonally induced artificial spawning of tench (*Tinca tinca* L.) females using synthetic GnRH analogues. **Proceedings of Scientific Papers the 75th Anniversary of Foundation of the Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology**. RIFCH USB, Vodňany, República Checa.
- Kouřil J, Chábera S, Holický J (1976). První zkušenosti s použitím nové sovětské metody odlepkování jiker kapra a lína pomocí talku. [First experiences with the utilization of the new Soviet method on unsticking carp and tench by means of talc]. **Čsl. Rybníkářství** **4**, 13-15.
- Kouřil J, Barth T, Hamáčková J, Slaninová J, Servítová L, Macháček J, Flegel M (1983). Pokusy s použitím LH-RH a jeho syntetického analogu k dosažení ovulace jikernaček lína, amura, kapra a sumce. [Application LH-RH and its analogue reaching ovulation in female tench, grass carp, carp and sheatfish]. **Bulletin VÚRH Vodňany** **19(2)**, 3-16.
- Kouřil J, Barth T, Hamáčková J, Flegel M (1986). Induced ovulation in tench (*Tinca tinca* L.) by various LH-RH synthetic analogues: effect of site of administration and temperature. **Aquaculture** **54**, 37-44.
- Kouřil J, Mikodina JV, Glubokov AI, Hamáčková J, Barth T, Flegel M, Charvátová J (1989). Using [D-Glu(NH-Ad)6, Trp7, Leu8] GnRH for ovulation induction in the females of tench (*Tinca tinca* L.). **Bulletin VÚRH Vodňany** **1**, 8-13.
- Kouřil J, Hamáčková J, Barth T (1994). Hormonální indukce ovulace jikernaček lína obecného (*Tinca tinca*) pomocí preparátů Ovaprim a Kobarelin a kapří hypofýzy. [Hormonal induction of tench (*Tinca tinca*) female ovulation using Ovaprim and Kobarelin preparations and carp pituitary]. En: Mikešová J, Adámek Z (Eds.), **Sborník referátů z ichtyologické konference**, Bulletin VÚRH Vodňany, República Checa.
- Kubů F, Kouřil J (1985) Lín obecný [Common tench]. **Czech Fisheries Society**, Praha.
- Lall SP (2002). The minerals. En: Halver JE, Hardy RW (Eds.), **Fish Nutrition**. Academic Press, San Diego, EE.UU.
- Lall SP, Lewis-McCrea L (2007). Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish, an overview. **Aquaculture** **267**, 3-19.
- Lauff M, Hoffer R (1984). Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. **Aquaculture** **37**, 335-346.

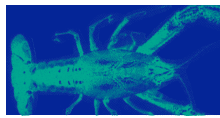
- Lim LC, Cho YL, Dhert P, Wong CC, Nelis H, Sorgeloos P (2002). Use of decapsulated *Artemia* cysts in ornamental fish culture. **Aquaculture Research** **33**, 575-589.
- Linhart O, Kvasnička P (1992). Artificial insemination in tench, *Tinca tinca* L. **Aquaculture and Fisheries Management** **23**, 183-188.
- Linhart O, Billard R (1995). Biology of gametes and artificial reproduction in common tench, *Tinca tinca* (L.). A review. **Polish Archives of Hydrobiology** **42**, 37-56.
- Linhart O, Barth T, Kouřil J, Hamáčková J (1991). Stimulation of spermiation in tench by analogues of Gn-RH and carp hypophysis. En: **Proceedings of 4th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish**. Norwich, Reino Unido.
- Linhart O, Peter RE, Rothbard S, Zohar Y, Kvasnička P (1995). Spermiation of common tench (*Tinca tinca* L.) stimulated with injection or implantation of GnRH analogues and injection of pituitary of carp extract. **Aquaculture** **129**, 119-121.
- Linhart O, Gela D, Flajšhans M, Duda P, Rodina M, Novak VVV (2000). Alcalase enzyme treatment for elimination of egg stickiness in tench, *Tinca tinca* L. **Aquaculture** **191**, 303-308.
- Linhart O, Gela D, Flajšhans M, Rodina M (2003). Proteolytic enzyme treatment: an improved method for elimination of egg stickiness in tench, *Tinca tinca* L., in aquaculture. **Journal of Applied Ichthyology** **19(3)**, 134-137.
- Lukowicz M, Tamas G, Horváth L (1986). Aquaculture of tench. En: Billard R, Marcel J (Eds.), **Aquaculture of Cyprinids**. INRA, Paris, Francia.
- Mamcarz A, Targońska K, Kucharczyk D, Kujawa R, Źarski D (2011). Effect of live and dry food on rearing of tench (*Tinca tinca* L.) larvae under controlled conditions. **Italian Journal of Animal Science** **10**, 42-46.
- Mareš J, Jirásek J, Baránek V, Fiala J, Kopp R (2007). Production effect of various feeds on two size classes of juvenile tench (*Tinca tinca*) under the conditions of intensive rearing. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis LV(1)**, 111-116.
- Morawska B (1984). The effect of water temperature elevation on incipient and cumulative fecundity of batch-spawning tench, *Tinca tinca* (L.). **Aquaculture** **42**, 273-288.
- Moyle BP, Cech JJ (2000). **Fishes: An introduction to Ichthyology**. 4th Edition. Prentice Hall. Nueva Jersey, EE.UU.
- Munilla-Moran R, Stark JR, Barbour A (1990). The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scolophthalmus maximus* L.). **Aquaculture** **88**, 337-350.
- Myszkowski L, Kamiński R, Quiros M, Stanny LA, Wolnicki J (2002). Dry diet-influenced growth, size variability, condition and body deformities in juvenile crucian carp *Carassius carassius* L. reared under controlled conditions. **Archives of Polish Fisheries** **10**, 51-61.
- Myszkowski L, Kamler E, Kwiatkowski S (2010). Weak compensatory growth makes short-term starvation an unsuitable technique to mitigate body deformities of *Tinca tinca* juveniles in intensive culture. **Reviews in Fish Biology and Fisheries** **20**, 381-388.
- Naylor RL, Hardy RW, Bureau DP, Chiu A, Elliott M, Farrell AP, Forster I, Gatlin DM, Goldberg RJ, Hua K, Nichols PD (2009). Feeding aquaculture in an era of finite resources. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **106**, 15103-15110.
- NRC (2011). **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. National Research Council. National Academies Press, Washington, EE.UU.
- Peňáz M, Wohlgemuth E, Hamáčková J, Kouřil J (1981). Early ontogeny of the tench (*Tinca tinca*). I. Embryonic period. **Folia Zoologica** **30(2)**, 165-176.
- Peňáz M, Prokes M, Kouřil J, Hamáčková J (1989). Influence of water temperature on the early development and growth of the tench, *Tinca tinca*. **Folia Zoologica** **38(3)**, 275-287.
- Pérez-Regadera JJ (1987). Producción de Ciprínidos. En: **Primeras Jornadas de Acuicultura de la Comunidad Autónoma de Cantabria**, España.
- Pokorný J (1974). Výtěr lína a adchov PL [Spawning of the tench and culture of the fry]. **Rybářství** **12**, 268-270.

- Pyka J (1996). Feeding of the tench, *Tinca tinca* (L.), larvae and fry under pond rearing conditions. **Archives of Polish Fisheries** **4(1)**, 69-84.
- Pyka J (1997). Daily feeding cycle tench, *Tinca tinca* (L.), in larval and fry stages in the conditions of pond culture. An attempt to determine daily food ration. **Archives of Polish Fisheries** **5(2)**, 279-290.
- Quirós M, Alvariño JMR (1998). Growth of tench (*Tinca tinca* (L.)) fed with and without the addition of the cladoceran *Daphnia*. **Polish Archives of Hydrobiology** **45(3)**, 447-451.
- Quirós M, Alvariño JMR (2000). Growth and survival of tench larvae fed under different feeding strategies. **Journal of Applied Ichthyology** **16**, 32-35,
- Quirós M, Nicodemus N, Alonso M, Bartolomé M, Écija JL, Alvariño JMR (2003). Survival and changes in growth of juvenile tench (*Tinca tinca* L.) fed defined diets commonly used to culture non-cyprinid species. **Journal of Applied Ichthyology** **19**, 149-151.
- Rennert B, Kohlmann K, Hack H (2003). A performance test with five different strains of tench (*Tinca tinca* L.) under controlled warm water conditions. **Journal of Applied Ichthyology** **19(3)**, 161-164.
- Rodríguez R (2003). Técnicas de control de la reproducción de la tenca (*Tinca tinca* L.) en condiciones de laboratorio y de cultivo. **Tesis Doctoral**, Universidad de León, España.
- Rodríguez R, Celada JD, Sáez-Royuela M, Carral JM, Aguilera A, Melendre PM (2004). Artificial reproduction in 1-year-old tench (*Tinca tinca* L.). **Journal of Applied Ichthyology** **20**, 542-544.
- Rodríguez R, Celada JD, Carral JM, Sáez-Royuela M, Aguilera A, Melendre PM (2005). Identificación y cronología de determinadas fases del desarrollo embrionario y larvario de la tenca (*Tinca tinca* L.). **Actas del IX Congreso Nacional de Acuicultura**. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, España.
- Rodríguez R, Celada JD, Sáez-Royuela M, Carral JM, Aguilera A, Pérez JR, Melendre PM (2008). Egg production of tench (*Tinca tinca* L.) kept in semi-intensive culture conditions. **Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems** **388**, 04.p1-04p8.
- Sáez-Royuela M, Carral JM, Aguilera A, García V, Celada JD, Melendre P (2008). Possibilities of partial substitution of *Artemia salina* nauplii supplement with different of microparticulated diets in tench juveniles (*Tinca tinca* L.). **Proceedings of the Vth International Workshop on Biology and Culture of the Tench (*Tinca tinca* L.)**. Ceresole d'Alba, Italia.
- Schäperclaus W (1961). **Lehrbuch der Teichwirtschaft**. Parey, Berlin, Alemania.
- Šestáková I, Kouřil J, Vachta R (1989). Age dependence of tench (*Tinca tinca* L.) larvae on food selectivity in experimental conditions. **Bulletin VÚRH Vodňany** **25(3)**, 3-11.
- Shimeno S, Kumon M, Ando H, Ukawa M (1993). The growth performance and body composition of young yellowtail fed with diets containing defatted soybean meals for a long period. **Nippon Suisan Gakkaishi** **59**, 821-825.
- Shiri Harzevili A, De Charleroy D, Auwerx J, Vught I, Van Slycken J (2003). Larval rearing of chub, *Leuciscus cephalus* (L.), using decapsulated *Artemia* as direct food. **Journal of Applied Ichthyology** **19**, 123-125.
- Siegmund R (1969). Lokomotorische Aktivität und Ruheverhalten bei einheimischen Süßwasserfischen (Pisces, Percidae, Cyprinidae). **Biologisches Zentralblatt** **88**, 295-312.
- Steffens W (1995). The tench (*Tinca tinca* L.), a neglected pond fish species. **Polish Archives of Hydrobiology** **42(1-2)**, 161-180.
- Storebakken T, Refstie S, Ruyter B (2000). Soy products as fat and protein sources in fish diets for intensive aquaculture. En: Drackey JK (Ed.), **Soy in Animal Nutrition**. Federation of Animal Science Societies, Champaign, EE.UU.
- Sukop I, Adámek Z (1995). Food biology of one-, two- and three-year-old tench in polycultures with carp and herbivorous fish. **Polish Archives of Hydrobiology** **42(1-2)**, 9-18.
- Tacon AGJ, Metian M (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. **Aquaculture** **285**, 146-158.

- Takeuchi T, Murakami K (2007). Crustacean nutrition and larval feed, with emphasis on Japanese spiny lobster, *Panilurus japonicus*. **Bulletin Fisheries Research Agency** **20**, 15-23.
- Tocher DR (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. **Aquaculture Research** **41**, 717-732.
- Vanhaecke P, Sorgeloos P (1982). International study on *Artemia* XVIII. The hatching rate of *Artemia* cysts a comparative study. **Aquacultural Engineering** **1**, 263-273.
- Vanhaecke P, Lavens P, Sorgeloos P (1983). International study on *Artemia*. XVII. Energy consumption in cysts and early larval stages of various geographical strains of *Artemia*. **Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique** **112**, 155-164.
- Vanhaecke P, De Vrieze L, Tackaert W, Sorgeloos P (1990). The use of decapsulated cysts of the brine shrimp *Artemia* as direct food for carp *Cyprinus carpio* L. larvae. **Journal of the World Aquaculture Society** **21(4)**, 257-262.
- Van Stappen G (1996). Use of cysts. En: Lavens P, Sorgeloos P (Eds.), **Manual on the production and use of live food for aquaculture**. FAO Fisheries Technical Paper 361, Roma, Italia.
- Vetlugina T (1992). The biology of tench, *Tinca tinca*, in the Volga Delta. **Voprosy Ikhtiologii** **32(1)**, 88-93.
- Walford J, Lam TJ (1993). Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. **Aquaculture** **109**, 187-205.
- Weatherley AH (1959). Some features of the biology of the tench, *Tinca tinca* (L.) in Tasmania. **Journal of Animal Ecology** **28**, 73-87.
- Weirich CR, Reigh RC, Glenn DW (2000). Evaluation of decapsulated *Artemia* cysts in hatchery diets for Channel Catfish *Ictalurus punctatus* fry and effects on subsequent fingerling production. **Journal of the World Aquaculture Society** **31**, 609-617.
- Wolnicki J, Korwin-Kossakowski M (1993). Survival and growth of larval and juvenile tench, *Tinca tinca* L., fed different diets under controlled conditions. **Aquaculture and Fisheries Management** **24**, 707-713.
- Wolnicki J, Górny W (1995). Suitability of two commercial dry diets for intensive rearing of larval tench (*Tinca tinca* L.) under controlled conditions. **Aquaculture** **129**, 256-258.
- Wolnicki J, Myszowski L (1998a). Evaluation of four commercial dry diets for intensive production of tench *Tinca tinca* (L.) juveniles under controlled conditions. **Polish Archives of Hydrobiology** **45(3)**, 453-458.
- Wolnicki J, Myszowski L (1998b). Quality evaluation of larval and juvenile tench *Tinca tinca* (L.) fed live or dry diet by means of a stress test. **Polish Archives of Hydrobiology** **45(3)**, 453-458.
- Wolnicki J, Kamiński R, Myszowski L (2003a). Survival, growth and condition of tench *Tinca tinca* (L.) larvae fed live food for 12, 18 or 24 h a day under controlled conditions. **Journal of Applied Ichthyology** **19**, 146-148.
- Wolnicki J, Myszowski L, Kamiński R (2003b). Effect of supplementation of a dry feed with natural food on growth, condition and size distribution of juvenile tench *Tinca tinca* (L.). **Journal of Applied Ichthyology** **19**, 157-160.
- Wolnicki J, Myszowski L, Korwin-Kossakowski M, Kamiński R, Stanny A (2006). Effects of different diets on juvenile tench, *Tinca tinca* (L.) reared under controlled conditions. **Aquaculture International** **14**, 89-98.
- Woynarovich E, Woynarovich A (1980). Modified technology for elimination of stickiness of common carp (*Cyprinus carpio*) eggs. **Aquacultura Hungarica** **2**, 19-21.
- Yilmaz F (2002). Reproductive biology of the tench *Tinca tinca* (L., 1758) inhabiting Porsuk Dam Lake (Kutahya, Turkey). **Fisheries Research** **55**, 313-317.
- Zambonino-Infante JL, Koumoundouros G, Tandler A (2009). The influence on nutrition at the larval stages in marine fish. En: Baevefjord J, Helland S, Hough C (Eds.), **Control of Malformations in Fish Aquaculture: Science and Practice**. RapidPress, Luxembourg.

Publicaciones

- I. Celada JD, García V, Carral JM, Sáez-Royuela M, González R, González Á (2013). Decapsulated *Artemia* cysts of different quality (high or low hatch-rate) as direct food for tench (*Tinca tinca* L.) larvae. **Aquaculture Research** **44**, 167-175.
- II. García V, Celada JD, Carral JM, González R, González Á, Sáez-Royuela M (2011). A comparative study of different preparations of decapsulated *Artemia* cysts as food for tench (*Tinca tinca* L.) larvae. **Animal Feed Science and Technology** **170**, 72-77.
- III. García V, Celada JD, Carral JM, Sáez-Royuela M, González R, González Á, (2010). Decapsulated *Artemia* cysts: A suitable dietary supplement for juvenile tench (*Tinca tinca* L.). **Journal of Applied Aquaculture** **22**, 57-65.
- IV. García V, Celada JD, González-Rodríguez Á, Carral JM, Sáez-Royuela M, González R, González Á, (2014). Evaluation of different qualities and preparations of decapsulated *Artemia* cysts as dietary supplement for juvenile tench (*Tinca tinca* L.). **Journal of Applied Ichthyology** **30**, 40-43.
- V. García V, Celada JD, González R, Carral JM, Sáez-Royuela M, González Á, (2013). Response of juvenile tench (*Tinca tinca* L.) fed practical diets with different protein contents and substitution levels of fish meal by soybean meal. **Aquaculture Research** DOI: 10.1111/are.12154.



Decapsulated *Artemia* cysts of different quality (high or low hatch-rate) as direct food for tench (*Tinca tinca* L.) larvae

Jesús D. Celada, Vanesa García, José M. Carral, María Sáez-Royuela, Rocío González & Álvaro González

Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, León, Spain

Correspondence: Jesús D. Celada, Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain. E-mail: jdcelv@unileon.es

Abstract

Three 30-day experiments were conducted to evaluate decapsulated *Artemia* cysts with different quality (high or low hatch-rate) as food for tench (*Tinca tinca* L.) larvae from the onset of exogenous feeding. In experiment 1, three diets were tested: *Artemia* nauplii-only or cysts-only for 30 days, and nauplii for the first 7 days and cysts thereafter. The cysts used had 86% hatching rate (high hatch-rate cysts). The same feeding treatments were replicated in experiment 2 but with low hatch-rate cysts (10% hatching rate). In experiment 3, five diets were tested: high hatch-rate cysts only or low hatch-rate cysts only for 30 days, and nauplii for the first 7, 4 or 2 days and low hatch-rate cysts thereafter. In overall, survival was high, except with the low hatch-rate cysts only diet. Feeding tench larvae with cysts resulted in higher growth and lower FCR compared to feeding with live nauplii only. High hatch-rate *Artemia* cysts are a suitable food from the onset of exogenous feeding and low hatch-rate cysts can be successfully used after 2–7 days feeding on nauplii.

Keywords: Cyprinid, *Tinca tinca*, tench, larval rearing, feeding, *Artemia* cysts

Introduction

Tench, *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758), a freshwater fish belonging to the family Cyprinidae, has great potential for aquaculture (Steffens 1995; Kamler, Myszkowsky, Kamiński, Korwin-Kossakowski &

Wolnicki 2006; Wang, Min, Guan, Gong, Ren, Huang, Zheng, Zhang, Liu & Han 2006; Wolnicki, Myszkowski, Korwin-Kossakowski, Kaminski & Stanny 2006). Originally occurring in the waters of Europe and Siberia, tench currently is widespread in the inland waters of all the continents (Freyhof & Kottelat 2008). In Europe, tench has a history of pond culture since the Middle Ages. However, the intensification of culture techniques has recently started, and has been mainly focused on controlled reproduction. At present, the major culture aim is to develop larval rearing systems to reach a size large enough for grow-out or restocking purposes. However, the optimal culture conditions from the onset of exogenous feeding are not well established for tench, and one of the main bottlenecks is in providing nutritionally adequate food appropriate for their small mouth gape. The best results to date under intensive conditions have been achieved by feeding tench larvae on *Artemia* nauplii as the sole food (Wolnicki & Myszkowski 1998; Fleig, Gottschalk & Hubenova 2001; Wolnicki, Kaminski & Myszkowski 2003; Celada, Carral, Rodríguez, Sáez-Royuela, Aguilera, Melendre & Martín 2007; Celada, Aguilera, Carral, Sáez-Royuela & Melendre 2008).

The daily production of *Artemia* nauplii is laborious, expensive and usually requires dedicated facilities. To overcome these operational drawbacks, the use of *Artemia* cysts may offer a viable alternative to live nauplii. The small particle size of cysts (200–250 µm) is suitable for small predator stages and, after the nondigestible shell has been chemically removed prior to feeding-out, decapsulated cysts can be handled as an inert diet.

they are disinfected and do not leach nutrients (Vanhaecke, De Vrieze, Tackaert & Sorgeloos 1990). In addition, cysts with low hatching rates, which are not usually used for nauplii production, might be an appropriate food for tench larvae. Considering that these cyst stocks can be purchased cheaply, it would be interesting to obtain information on their effects as direct food for tench larvae. Thus, this study evaluates *Artemia* cysts of different quality (high or low hatch-rate) as food for tench larvae from the onset of exogenous feeding compared with the current larval diet of live *Artemia* nauplii.

Materials and methods

Fish, facilities and experimental procedure

Three 30-day experiments were carried out with tench (*T. tinca*) larvae hatched under laboratory conditions. These larvae were obtained from controlled reproduction performed according to Rodríguez, Celada, Sáez-Royuela, Carral, Aguilera and Melendre (2004). Five days after hatching (when exogenous feeding starts), the larvae (mean of 0.36 mg wet weight and 5.06 mm total length) were counted and distributed at a density of 20 larvae L⁻¹ in fibreglass-tanks (0.50 × 0.25 × 0.25 m) containing 25 L of water. To avoid the escape of both larvae and food, each tank was provided with a 200 µm mesh filter outlet. Aerated artesian well water was supplied to each tank in an open system (inflow 300 mL min⁻¹). Quality parameters of the incoming water were: pH 8.1, hardness 5.2 °dH (calcium: 32.3 mg L⁻¹), total dissolved solids 108.5 mg L⁻¹ and total suspended solids 39.7 mg L⁻¹. Throughout the trial, oxygen content was measured in the tanks with a Sension6 dissolved Oxygen Meter of Hatch Company (Berlin, Germany) (values around 7 mg L⁻¹, minimum 5.7 mg L⁻¹, maximum 8 mg L⁻¹). Ammonia and nitrites were measured with a Pocket-Photometer Lasa Aqua (Dr Lange, Berlin, Germany) from water samples taken inside the tanks (values were always ammonia <0.02 mg L⁻¹ and nitrites <0.05 mg L⁻¹). Photoperiod was natural (ca. 15 h light:9 h dark) and water temperature (measured twice a day) was maintained at 24.5 ± 0.5°C in experiments 1 and 2, and at 26.5 ± 0.5°C in experiment 3. The water quality parameters were measured once a week. Tanks were cleaned every other day.

Diets and feeding

Concerning the direct use of decapsulated *Artemia* cysts (inert food) from the onset of exogenous feeding, it should be taken into account that several authors (Dabrowski & Glogowski 1977; Lauff & Hoffer 1984; Munilla-Moran, Stark & Barbour 1990; Kolkovski, Tandler, Kissil & Gertler 1993; Walford & Lam 1993) have suggested that the digestive enzymes from live feed play an important role in the initial period of digestion of nutrients by fish larvae. Considering this possibility, we compared cysts supplied from the onset of exogenous feeding with cysts supplied after various initial feeding periods on nauplii. Feeding with *Artemia* nauplii or decapsulated cysts started at the beginning of exogenous feeding (5 days after hatching).

Cysts were decapsulated according to the method described by Van Stappen (1996). Freshly hatched nauplii were obtained daily from cysts with 86% hatching rate (INVE Aquaculture Nutrition, EG *Artemia* Cysts, Hoogveld 91, B-9200 Dendermonde, Belgium). After verifying mean hatching rates, which corroborated the data provided by the supplier (250 000 nauplii g⁻¹ cysts), feeding ration assessment was performed using known amounts of nauplii hatched in determinate water volumes, and distributing them into the corresponding replicates. When decapsulated cysts were directly used as food, fresh stocks were prepared every 3 days and stored at 4°C. Feeding ration assessment was performed from the number of cysts per gram provided by the manufacturer. In all cases, feeding was made manually in excess, in such a way that a small remainder of uneaten food could always be seen in the tanks. According to this strategy, nauplii or cysts supply per larva per day was increased during the experiment, ranging from 60 at the start to 900 at the end. Assuming that tench larvae do not feed at night (Pyka 1997), food was supplied four times a day at regular intervals (ca. every 4 h) during daylight hours.

When *Artemia* nauplii were replaced by cysts after an initial period, the transition lasted 3 days and was performed by replacing 25%, 50% and 75% of nauplii by cysts the first, second and third day respectively. Thereafter, only cysts were supplied.

Proximate composition of cysts and nauplii was analysed according to the Norms of the International Standards Organization: moisture to ISO

R-1442 (ISO 1979), protein to ISO R-937 (ISO 1978), lipid to ISO R-1443 (ISO 1973), ash to ISO R-936 (ISO 1998a) and gross energy to ISO 9831 (ISO 1998b). Samples were stored at -30°C until analysis. All analyses were performed in duplicate. The content of carbohydrates was calculated by subtracting the content of moisture, protein, lipid and ash from the wet weight.

Experiment 1

A total of 4680 tench larvae were distributed among nine tanks to test three dietary treatments: nauplii-only for 30 days (control group), nauplii for the first 7 days and cysts thereafter, and cysts-only for the entire 30 days. The cysts used as direct food had an 86% hatching rate (high hatch-rate cysts). Water temperature was $24.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

Experiment 2

A total of 4680 tench larvae were distributed among nine tanks to test three dietary treatments: nauplii-only for 30 days (control group), nauplii for the first 7 days and cysts thereafter, and cysts-only for the entire 30 days. The cysts used as direct food (Argentine *Artemia*) had a 10% hatching rate (low hatch-rate cysts) after having been stored about 5 years at room temperature and no vacuum-packed. Water temperature was $24.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

Experiment 3

This trial was aimed to optimize the use of low hatch-rate cysts by reducing the initial period of nauplii feeding. In addition, it was hypothesized that the possible effects of the feeding treatments could be enhanced by increasing the temperature. Thus, the experiment was carried out at $26.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

A total of 7800 tench larvae were distributed among 15 tanks to test five dietary treatments: high hatch-rate cysts only for 30 days (control group), low hatch-rate cysts only for 30 days, nauplii for the first 7 days and low hatch-rate cysts thereafter, nauplii for the first 4 days and low hatch-rate cysts thereafter, and nauplii for the first 2 days and low hatch-rate cysts thereafter.

Data collection and analysis

After the first 7 days, a sample of 20 larvae per tank (60 per treatment) were removed, weighed and measured individually. At the end of the experiments (day 30), all surviving fish were counted and survival rates calculated (without considering the 20 larvae removed from each tank after 7 days). Weight and length of a sample of 40 fish per tank (120 per treatment) were determined. Total length (TL) was measured with digimatic calliper (to the nearest 0.01 mm) and individual wet weight (W) was determined by precision balance (to the nearest 0.1 mg) after removing excess water with tissue paper. Specific growth rate (SGR) was expressed as $\text{SGR} = 100 (\ln W_t - \ln W_0)/t$, where W_t is the mean final weight, W_0 is the mean initial weight, and t is the duration of the experiment (days). Fulton's coefficient (K) was used to determine fish condition with $K = 100 (W_t/\text{TL}^3)$. Food conversion ratio (FCR) was calculated as $D_t/W_t - W_0$, where D_t is the total amount of cysts used (mg of their commercial form) and $W_t - W_0$ is the weight gain (mg) during 30 days.

All experimental groups were in triplicate (three tanks per treatment). Results were examined using analysis of variance (ANOVA) using the computer programme SPSS 13.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Newman-Keuls test was applied to compare means at the $P < 0.05$ level of significance. Percentages were arcsine-transformed prior to statistical analysis.

Results

Both brine shrimp nauplii and decapsulated cysts (high and low hatch-rate) were consumed from the first day as indicated by the externally observable presence of each in the digestive tract of translucent larvae.

The proximate composition of high hatch-rate cysts, low hatch-rate cysts and nauplii is given in Table 1. Freshly hatched nauplii had significantly higher moisture content (84.8%) than decapsulated cysts (around 74%). Protein, lipid and ash contents for nauplii were significantly lower than those of cysts. Energy content ranged from 3.04 KJ g^{-1} (significantly lowest) for nauplii to 5.17 KJ g^{-1} (significantly highest) for low hatch-rate cysts.

Table 1 Proximate composition (wet basis) of high hatch-rate and low hatch-rate *Artemia* cysts (after 85 min of hydration time during the decapsulation process) and freshly hatched *Artemia* nauplii

	High hatch-rate cysts	Low hatch-rate cysts	Nauplii
Moisture (%)	76.09 ± 0.05 ^a	71.20 ± 0.01 ^b	84.80 ± 0.21 ^c
Protein (%)	14.04 ± 0.14 ^a	16.50 ± 0.09 ^b	8.05 ± 0.15 ^c
Lipid (%)	3.84 ± 0.05 ^a	4.01 ± 0.02 ^a	2.35 ± 0.25 ^b
Ash (%)	0.98 ± 0.01 ^a	1.01 ± 0.03 ^a	0.88 ± 0.02 ^b
Carbohydrates (%)	5.06 ± 0.15 ^a	7.39 ± 0.15 ^b	3.93 ± 0.59 ^a
Gross energy (KJ g ⁻¹)	4.41 ± 0.01 ^a	5.17 ± 0.01 ^b	3.04 ± 0.01 ^c

Values are mean ± SE.

Values in the same row having different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Experiment 1

After 7 days (the time of changing the diet in the group fed nauplii for 7 days and high hatch-rate cysts thereafter), growth values of larvae fed nauplii or high hatch-rate cysts showed no significant differences (Table 2), averaging 6.95 mm TL, 1.5 mg W and 20.18% day⁻¹ SGR.

Final survival, growth and food conversion values (30 days) are presented in Table 3. Survival rates did not differ significantly among groups, ranging from 89.5% to 95.3%. The percentage of animals with visible deformities was under 1%.

Total larval length ranged from 16.56 to 17.71 mm. Larvae fed nauplii for the first 7 days and high hatch-rate cysts thereafter had the highest weight (61.08 mg) and specific growth rate (17.03% day⁻¹), with no significant differences from the larvae fed high hatch-rate cysts for 30 days. Both diets using high hatch-rate cysts enabled weights and specific growth rates significantly higher than the nauplii-only diet.

Food conversion ratio of the larvae fed high hatch-rate cysts (average 0.86) was significantly lower than that of the larvae fed nauplii-only (1.06).

Condition coefficient ranged from 0.88 (significantly lowest) for the nauplii-only diet to 1.32 (significantly highest) for the nauplii the first 7 days and high hatch-rate cysts thereafter diet.

Experiment 2

After 7 days (the time of changing the diet in the group fed nauplii for 7 days and low hatch-rate cysts thereafter), larvae fed nauplii-only had significantly higher growth (average: 7.03 mm TL, 1.6 mg W, 21.23% day⁻¹ SGR) than the larvae fed low hatch-rate cysts (Table 4).

Final survival, growth and food conversion values (30 days) are presented in Table 5. Survival of the larvae fed nauplii-only or nauplii for the first 7 days and low hatch-rate cysts thereafter did not differ significantly (average 90.6%). Survival of the larvae fed low hatch-rate cysts for 30 days was significantly lower (54.5%). The percentage of larvae with visible deformities was under 1%.

Total larval length ranged from 17.35 to 17.66 mm. There were no significant differences in growth between the larvae fed nauplii for the first 7 days and low hatch-rate cysts thereafter

Table 2 Growth values of *Tinca tinca* larvae fed three diets of *Artemia* nauplii and decapsulated high hatch-rate cysts after 7 days of the experiment 1 (the time of changing the diet in the group fed nauplii 7 days and high hatch-rate cysts thereafter)

	Nauplii	Nauplii 7 days and high hatch-rate cysts	High hatch-rate cysts
Total length (mm)	7.01 ± 0.06	7.00 ± 0.07	6.83 ± 0.10
Weight (mg)	1.59 ± 0.06	1.55 ± 0.06	1.48 ± 0.06
SGR (% day ⁻¹)	20.68 ± 0.58	20.15 ± 0.60	19.70 ± 0.59

Values are mean ± SE. Growth data derived from 20 fish sampled per replicate ($n = 60$).

Means are not significantly different ($P < 0.05$).

SGR, specific growth rate.

Table 3 Survival, growth and food conversion of *Tinca tinca* larvae fed three diets of *Artemia* nauplii and decapsulated high hatch-rate cysts for 30 days (experiment 1)

	Nauplii	Nauplii 7 days and high hatch-rate cysts	High hatch-rate cysts
Survival (%)	95.3 ± 0.7 ^a	89.5 ± 1.5 ^a	91.2 ± 2.9 ^a
Total length (mm)	17.71 ± 0.11 ^a	16.56 ± 0.08 ^b	17.26 ± 0.12 ^c
Weight (mg)	50.04 ± 1.29 ^a	61.08 ± 1.18 ^b	59.57 ± 1.42 ^b
SGR (% day ⁻¹)	16.32 ± 0.09 ^a	17.03 ± 0.07 ^b	16.91 ± 0.09 ^b
K	0.88 ± 0.01 ^a	1.32 ± 0.01 ^b	1.13 ± 0.01 ^c
FCR	1.06 ± 0.03 ^a	0.84 ± 0.02 ^b	0.89 ± 0.03 ^b

Values are mean ± SE. Growth data derived from 40 fish sampled per replicate ($n = 120$).

Values in the same row having different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

FCR, food conversion ratio; K, Fulton's coefficient; SGR, specific growth rate.

Table 4 Growth values of *Tinca tinca* larvae fed three diets of *Artemia* nauplii and decapsulated low hatch-rate cysts after 7 days of the experiment 2 (the time of changing the diet in the group fed nauplii 7 days and low hatch-rate cysts thereafter)

	Nauplii	Nauplii 7 days and low hatch-rate cysts	Low hatch-rate cysts
Total length (mm)	7.04 ± 0.06 ^a	7.02 ± 0.07 ^a	6.19 ± 0.05 ^b
Weight (mg)	1.61 ± 0.05 ^a	1.58 ± 0.06 ^a	1.00 ± 0.04 ^b
SGR (% day ⁻¹)	21.35 ± 0.51 ^a	21.11 ± 0.60 ^a	14.10 ± 0.58 ^b

Values are mean ± SE. Growth data derived from 20 fish sampled per replicate ($n = 60$).

Values in the same row having different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

SGR, specific growth rate.

Table 5 Survival, growth and food conversion of *Tinca tinca* larvae fed three diets of *Artemia* nauplii and decapsulated low hatch-rate cysts for 30 days (experiment 2)

	Nauplii	Nauplii 7 days and low hatch-rate cysts	Low hatch-rate cysts
Survival (%)	94.5 ± 2.3 ^a	86.8 ± 1.1 ^a	54.5 ± 6.5 ^b
Total length (mm)	17.66 ± 0.10 ^a	17.35 ± 0.12 ^a	17.63 ± 0.13 ^a
Weight (mg)	51.17 ± 1.17 ^a	56.30 ± 1.10 ^b	58.87 ± 1.39 ^b
SGR (% day ⁻¹)	16.52 ± 0.07 ^a	16.85 ± 0.07 ^b	16.97 ± 0.08 ^b
K	0.91 ± 0.01 ^a	1.07 ± 0.01 ^b	1.05 ± 0.01 ^b
FCR	1.01 ± 0.02 ^a	0.91 ± 0.02 ^b	0.89 ± 0.02 ^b

Values are mean ± SE. Growth data derived from 40 fish sampled per replicate ($n = 120$).

Values in the same row having different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

FCR, food conversion ratio; K, Fulton's coefficient; SGR, specific growth rate.

and the larvae fed low hatch-rate cysts for 30 days (average: 57.6 mg W, 16.9% day⁻¹ SGR). Both diets using low hatch-rate cysts enabled weights and specific growth rates significantly higher than the nauplii-only diet.

Food conversion ratio of the larvae fed low hatch-rate cysts (average 0.90) was significantly lower than that of the larvae fed nauplii-only (1.01).

Condition coefficient of the larvae fed low hatch-rate cysts (average 1.06) was significantly higher than that of the larvae fed nauplii-only (0.91).

Experiment 3

After 7 days, larvae fed nauplii for this period and larvae fed nauplii for the first 4 days and low hatch-rate cysts thereafter grew significantly faster

Table 6 Growth values of *Tinca tinca* larvae fed *Artemia* nauplii for three initial periods and decapsulated low hatch-rate cysts thereafter compared with low hatch-rate cysts only or high hatch-rate cysts only after 7 days of the experiment 3

	Nauplii 7 days and low hatch-rate cysts	Nauplii 4 days and low hatch-rate cysts	Nauplii 2 days and low hatch-rate cysts	Low hatch-rate cysts	High hatch-rate cysts
Total length (mm)	8.69 ± 0.05 ^a	8.72 ± 0.05 ^a	8.45 ± 0.06 ^b	7.45 ± 0.08 ^c	7.96 ± 0.06 ^d
Weight (mg)	3.47 ± 0.07 ^a	3.68 ± 0.05 ^b	3.18 ± 0.07 ^c	2.13 ± 0.06 ^d	2.91 ± 0.08 ^e
SGR (% day ⁻¹)	32.17 ± 0.31 ^a	33.11 ± 0.21 ^a	30.91 ± 0.33 ^b	25.01 ± 0.46 ^c	29.56 ± 0.38 ^d

Values are mean ± SE. Growth data derived from 20 fish sampled per replicate ($n = 60$).

Values in the same row having different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

SGR, specific growth rate.

Table 7 Survival, growth and food conversion of *Tinca tinca* larvae fed *Artemia* nauplii for three initial periods and decapsulated low hatch-rate cysts thereafter compared with low hatch-rate cysts only or high hatch-rate cysts only for 30 days (experiment 3)

	Nauplii 7 days and low hatch-rate cysts	Nauplii 4 days and low hatch-rate cysts	Nauplii 2 days and low hatch-rate cysts	Low hatch-rate cysts	High hatch-rate cysts
Survival (%)	97.9 ± 0.2 ^a	95.0 ± 2.5 ^a	91.7 ± 2.7 ^a	43.4 ± 3.8 ^b	91.9 ± 2.3 ^a
Total length (mm)	20.45 ± 0.17 ^a	18.57 ± 0.16 ^b	18.95 ± 0.16 ^b	18.58 ± 0.15 ^b	18.91 ± 0.19 ^b
Weight (mg)	80.78 ± 2.29 ^a	65.35 ± 1.83 ^b	70.25 ± 2.00 ^b	72.19 ± 1.89 ^b	66.96 ± 2.42 ^b
SGR (% day ⁻¹)	17.89 ± 0.09 ^a	17.20 ± 0.09 ^b	17.42 ± 0.09 ^{bc}	17.55 ± 0.08 ^c	17.19 ± 0.11 ^b
K	0.92 ± 0.01 ^a	1.00 ± 0.01 ^b	1.01 ± 0.02 ^b	1.10 ± 0.01 ^c	0.95 ± 0.01 ^d
FCR	0.81 ± 0.02 ^a	0.99 ± 0.03 ^b	0.94 ± 0.03 ^{bc}	0.89 ± 0.02 ^c	1.03 ± 0.04 ^b

Values are mean ± SE. Growth data derived from 40 fish sampled per replicate ($n = 120$).

Values in the same row having different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

FCR, food conversion ratio; K, Fulton's coefficient; SGR, specific growth rate.

(average: 8.7 mm TL, 3.6 mg W, 32.6% day⁻¹ SGR) than the rest (Table 6). Larvae fed low hatch-rate cysts from the onset of exogenous feeding had the lowest growth.

Final survival, growth and food conversion values (30 days) are presented in Table 7. Survival was high in all feeding treatments (average 94%) except with low hatch-rate cysts only for 30 days (43.4%). The percentage of larvae with visible deformities was under 1%.

Larvae fed nauplii for the first 7 days and low hatch-rate cysts thereafter had significantly higher growth (20.45 mm TL, 80.78 mg W, 17.89% day⁻¹ SGR) than the rest. There were no significant differences in length and weight among the larvae fed nauplii for the first 4 or 2 days and low hatch-rate cysts thereafter and the larvae fed cysts-only (low or high hatch-rate) for the entire 30 days (average: 18.7 mm TL, 68.7 mg W).

Food conversion ratio of the larvae fed nauplii for the first 7 days and low hatch-rate cysts thereafter (0.81) was significantly lower than the rest. There were no significant differences in food conversion among the feeding treatments of nauplii

for the first 4 or 2 days and low hatch-rate cysts thereafter and high hatch-rate cysts for the 30 days of experiment (average 0.99).

Condition coefficient ranged from 0.92 (significantly lowest) for the nauplii for the first 7 days and low hatch-rate cysts thereafter diet to 1.10 (significantly highest) for the low hatch-rate cysts only diet.

Discussion

In previous studies on tench larvae rearing, live *Artemia* nauplii have been supplied for 20–26 days from the onset of exogenous feeding (Wolnicki & Myszowski 1998; Fleig *et al.* 2001; Wolnicki *et al.* 2003; Celada *et al.* 2007). Usually, high survival rates and final weights between 32 and 47 mg have been reported. In the present 30-day experiments, high survival rates were also obtained (except with low hatch-rate cysts only), and final weights were between 50 and 80.8 mg. It is remarkable that, for first time, information on food conversion ratios of tench larvae is provided.

When decapsulated *Artemia* cysts are used as direct food instead of live nauplii, it is important to consider the different behaviour of nauplii and cysts in water. Freshly hatched nauplii are mobile and can remain living and swimming for some 12 h in well water (Celada *et al.* 2008) while cysts are inert. This could give rise to differences in food ingestion linked to a higher predator preference for the movements of the live nauplii compared to the inert sedimentation of decapsulated cysts. In this study, preference for cysts or nauplii was not evidenced, with tench larvae ingesting both high and low hatch-rate cysts from the time of their supply, when they were sinking, and later on the tank bottoms. Another important factor to consider is that nauplii are progressively losing their nutritional quality after their introduction into larval culture tanks, whereas fresh decapsulated cysts quickly sink to the bottom, where they conserve their nutritional quality (Vanhaecke *et al.* 1990), and remain available for tench larvae, which search for food on the tank bottom (Fleig *et al.* 2001).

Some authors (Dabrowski & Glogowski 1977; Lauff & Hoffer 1984; Munilla-Moran *et al.* 1990; Kolkovski *et al.* 1993; Walford & Lam 1993) have suggested that fish larvae initially have a low endogenous digestive enzyme production, and that live zooplankton provides an exogenous source of enzymes, which may increase the digestion of food. For this reason, we compared cysts supplied after different periods feeding on nauplii with cysts supplied from the onset of exogenous feeding. With high hatch-rate cysts only, good survival and growth rates were obtained, suggesting that tench larvae can digest decapsulated high hatch-rate *Artemia* cysts from the first day of exogenous feeding, and can be fed these cysts without the need of an initial period feeding on live nauplii.

On the contrary, tench larvae fed low hatch-rate cysts from the onset of exogenous feeding grew less during the first 7 days and had significantly lower survival after 30 days compared with the larvae fed high hatch-rate cysts. From the assumption that the differences in the proximate composition of high hatch-rate cysts and low hatch-rate cysts (Table 1) do not explain the different survival, and the observation that mortality took place mainly during the first days of experiment, it could be hypothesized that the decrease of hatchability also involved a loss of nutritional quality. The hatchability of *Artemia* cysts decreases over

time when they are stored in air at room temperature (Vanhaecke & Sorgeloos 1982) and the nutritional quality of the cysts may also deteriorate under these conditions (Jackson, Castell & Harrison 1990). A possible cause of this deterioration could be related to a reduction in digestibility, which could be insufficient to stimulate exogenous feeding. This hypothesis may be supported by the fact that survival greatly increased when larvae were fed live nauplii firstly and low hatch rate cysts thereafter. Another hypothesis may be that long-term storage of cysts under inadequate conditions (e.g. exposure to air and ambient temperatures) may have induced biochemical changes leading to a reduction in some essential nutrients. In this way, Jackson *et al.* (1990) reported a significant decrease in the amount of linolenic acid (18:3 $n - 3$) in *Artemia* cysts stored in open air at 20°C after only 15 weeks, and suggested that warm, aerobic conditions accelerate the natural oxidation of PUFA in the cysts. Linolenic acid is essential for freshwater fish, with early developmental stages being a critical period (Tocher 2010), and their deficiency may have increased the mortality when tench larvae were fed low hatch-rate cysts from the onset of exogenous feeding. Subsequent to this mortality, the high final growth values obtained could be because density became lower, and this created a more suitable environment (e.g. more space, less competition, less stress). However, when the low hatch-rate cysts were supplied after initial periods of 2, 4 or 7 days feeding on nauplii, survival was high (around 93%), as well weight and specific growth rate.

Considering the overall results of the present 30-day experiments, feeding tench larvae with decapsulated *Artemia* cysts resulted in higher growth compared to feeding larvae with live nauplii only. This has also been reported in a 28-day experiment with larvae of the guppy, *Poecilia reticulata* (Lim, Cho, Dhert, Wong, Nelis & Sorgeloos 2002), and this result was partly attributed to the superior lipid content of the cysts. The proximate composition of cysts and nauplii used in this study (Table 1) shows that hydrated cysts contain much more dry matter, protein, lipid and energy than freshly hatched nauplii. Thus, the better growth obtained in tench larvae fed decapsulated cysts may be related to a higher amount of food (dry matter) consumed and, therefore, higher amount of protein, lipid and energy. In addition, this

makes feasible to improve food conversion ratios by feeding on cysts.

To summarize, results showed that tench larvae can be fed decapsulated high hatch-rate *Artemia* cysts from the first day of exogenous feeding, and low hatch-rate cysts can be successfully used after 2–7 days feeding on nauplii, resulting in a cost reduction compared to using nauplii-only or even high hatch-rate cysts, which are more expensive in the market than low hatch-rate cysts.

Acknowledgments

This study was funded by the Plan Nacional de I+D+i, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, Research Project AGL2010-16554. We thank the financing of a grant from University of León, Spain.

References

- Celada J.D., Carral J.M., Rodríguez R., Sáez-Royuela M., Aguilera A., Melendre P.M. & Martín J. (2007) Tench (*Tinca tinca* L.) larvae rearing under controlled conditions: density and basic supply of *Artemia* nauplii as the sole food. *Aquaculture International* **15**, 489–495.
- Celada J.D., Aguilera A., Carral J.M., Sáez-Royuela M. & Melendre P.M. (2008) Rearing tench (*Tinca tinca* L.) larvae on live feed (*Artemia*) and on two transition schedules from live to dry diets. *Journal of Applied Ichthyology* **24**, 595–600.
- Dabrowski K. & Glogowski J. (1977) Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion processes in fish. *Hydrobiologia* **54**, 129–134.
- Fleig R., Gottschalk T. & Hubenova T. (2001) Raising larvae of the tench (*Tinca tinca* L.). *Bulgarian Journal of Agricultural Science* **7**, 479–488.
- Freyhof J. & Kottelat M. (2008) *Tinca tinca*. In: IUCN 2011. *IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2011.1. <http://www.iucnredlist.org>.
- ISO Norms (1973) *Determination of Lipids Content (R-1443)*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO Norms (1978) *Determination of Nitrogen Content (R-937)*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO Norms (1979) *Determination of Moisture Content (R-1442)*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO Norms (1998a) *Determination of Ash Content (R-936)*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO Norms (1998b) *Determination of Gross Caloric Value: Bomb Calorimeter Method (ISO 9831)*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Jackson D.L., Castell J.D. & Harrison K.E. (1990) Effect of storage conditions on the fatty acid composition of *Artemia* cysts and nauplii. *Bulletin of Aquaculture Association of Canada* **90-4**, 50–53.
- Kamler E., Myszkowsky L., Kamiński R., Korwin-Kossakowski M. & Wolnicki J. (2006) Does overfeeding affect tench *Tinca tinca* (L.) juveniles? *Aquaculture International* **14**, 99–111.
- Kolkovski S., Tandler A., Kissil G.W. & Gertler A. (1993) The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* **12**, 203–209.
- Lauff M. & Hoffer R. (1984) Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture* **37**, 335–346.
- Lim L.C., Cho Y.L., Dhert P., Wong C.C., Nelis H. & Sorgeloos P. (2002) Use of decapsulated *Artemia* cysts in ornamental fish culture. *Aquaculture Research* **33**, 575–589.
- Munilla-Moran R., Stark J.R. & Barbour A. (1990) The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scolophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* **88**, 337–350.
- Pyka J. (1997) Daily feeding cycle tench, *Tinca tinca* (L.), in larval and fry stages in the conditions of pond culture. An attempt to determine daily food ration. *Archives of Polish Fisheries* **5**, 279–290.
- Rodríguez R., Celada J.D., Sáez-Royuela M., Carral J.M., Aguilera A. & Melendre P.M. (2004) Artificial reproduction in 1-year-old tench (*Tinca tinca* L.). *Journal of Applied Ichthyology* **20**, 542–544.
- Steffens W. (1995) The tench (*Tinca tinca* L.), a neglected pond fish species. *Polish Archives of Hydrobiology* **42**, 161–180.
- Tocher D.R. (2010) Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research* **41**, 717–732.
- Van Stappen G. (1996) Use of cysts. In: *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*, FAO Fisheries Technical Paper 361 (ed. by P. Lavens & P. Sorgeloos), pp. 107–136. FAO, Rome, Italy.
- Vanhaecke P. & Sorgeloos P. (1982) International study on *Artemia* XVIII. The hatching rate of *Artemia* cysts—a comparative study. *Aquacultural Engineering* **1**, 263–273.
- Vanhaecke P., De Vrieze L., Tackaert W. & Sorgeloos P. (1990) The use of decapsulated cysts of the brine shrimp *Artemia* as direct food for carp *Cyprinus carpio* L. larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* **21**, 257–262.
- Walford J. & Lam T.J. (1993) Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture* **109**, 187–205.

- Wang J., Min W., Guan M., Gong L., Ren J., Huang Z., Zheng H., Zhang J., Liu H. & Han Y. (2006) Tench farming in China: present status and future prospects. *Aquaculture International* **14**, 205–208.
- Wolnicki J. & Myszkowski L. (1998) Quality evaluation of larval and juvenile tench *Tinca tinca* L. fed live or dry diet by means of a stress test. *Polish Archives of Hydrobiology* **45**, 459–464.
- Wolnicki J., Kaminski R. & Myszkowski L. (2003) Survival, growth and condition of tench (*Tinca tinca* L.) larvae fed live food for 12, 18 or 24 h a day under controlled conditions. *Journal of Applied Ichthyology* **19**, 146–148.
- Wolnicki J., Myszkowski L., Korwin-Kossakowski M., Kaminski R. & Stanny L.A. (2006) Effects of different diets on juvenile tench *Tinca tinca* (L.) reared under controlled conditions. *Aquaculture International* **14**, 89–98.



Contents lists available at ScienceDirect

Animal Feed Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anifeedsci

A comparative study of different preparations of decapsulated *Artemia* cysts as food for tench (*Tinca tinca* L.) larvae

V. García*, J.D. Celada, J.M. Carral, R. González, Á. González, M. Sáez-Royuela

Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 May 2011

Received in revised form 1 August 2011

Accepted 10 August 2011

Keywords:

Tinca tinca

Tench

Larval rearing

Feeding

Artemia cysts

ABSTRACT

Two 30-day experiments were conducted to evaluate different preparations of decapsulated *Artemia* cysts as food for tench larvae from the onset of exogenous feeding or after an initial period feeding on live nauplii. In the experiment 1, four dietary treatments were tested: *Artemia* nauplii-only (control group), nauplii for the first 7 days and fresh cysts thereafter, nauplii for the first 7 days and brine cysts thereafter or nauplii for the first 7 days and dried cysts thereafter. The same feeding treatments were replicated in experiment 2, but fresh, brine or dried cysts were supplied from the first day of exogenous feeding. In overall, survival was high. Tench larvae fed decapsulated cysts had higher growth ($P < 0.001$) and lower food conversion ratio ($P < 0.001$) than larvae fed live nauplii only. The highest growth (19.2 mm TL, 88.7 mg W, 18.33%/day SGR) was achieved with fresh cysts from the onset of exogenous feeding. The relation between the behaviour of the different preparations of cysts in the rearing tanks and their suitability for tench larvae is discussed. Both fresh and brine cysts are a suitable food from the onset of exogenous feeding and dried cysts can be successfully used after 7 days feeding on nauplii.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Tench, *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758), a freshwater fish belonging to the family Cyprinidae, has a great potential for aquaculture (Steffens, 1995; Kamler et al., 2006; Wang et al., 2006; Wolnicki et al., 2006). Originally occurring in the waters of Europe and Siberia, today tench occurs in the inland waters of all the continents (Freyhof and Kottelat, 2008). In Europe, tench has a history of pond culture since the Middle Ages. However, the intensification of culture techniques has recently started and has been mainly focused on controlled reproduction. At present, the major aim is the development of rearing larvae systems until these animals reach size large enough for grow-out or restocking purposes. The optimal conditions from the onset of exogenous feeding are not well established, and one of the main bottlenecks is in providing food appropriate for their small mouth gape and nutritionally adequate. Acceptable results have been achieved by feeding tench larvae on *Artemia* nauplii as the sole food (Wolnicki and Myszkowski, 1998; Fleig et al., 2001; Wolnicki et al., 2003; Celada et al., 2007, 2008).

The daily production of *Artemia* nauplii is laborious, expensive and usually requires dedicated facilities. To overcome these operational drawbacks, the use of *Artemia* cysts may offer a viable alternative to live nauplii. The small particle size of cysts (200–250 μm) is suitable for small predator stages and, after the nondigestible shell has been chemically removed prior to feeding-out, decapsulated cysts can be handled as an inert diet, they are disinfected and do not leach nutrients

* Corresponding author. Tel.: +34 987 291110; fax: +34 987 291187.
E-mail address: vgarm@unileon.es (V. García).

(Vanhaecke et al., 1990). After the decapsulation process, the cysts can be used readily (fresh cysts) or dehydrated in brine solution for storage (brine cysts), or subjected to a drying process for longer term storage (dried cysts).

Considering that the use of fresh cysts requires a frequent preparation of new stocks, an interesting option may be process fresh decapsulated cysts for storage by dehydration in a saturated Na–Cl brine solution or by air-drying, allowing their preparation and storage before the beginning of rearing period and thereby reducing the heavy frequently labour. However, the use of cysts both fresh and subjected to preservation methods could involve negative effects on the performance of tench larvae. If this were the case, although cysts may not be adequate to start the first feeding, probably could be successfully used after a first period feeding on nauplii. The present study evaluates possibilities of the use of different forms of preparation of decapsulated *Artemia* cysts for rearing tench larvae compared with the current larval diet of live *Artemia* nauplii.

2. Materials and methods

2.1. Fish, facilities and experimental procedure

Two 30-day experiments were conducted with tench (*T. tinca*) larvae hatched under laboratory conditions. These larvae were obtained from controlled reproduction performed according to Rodríguez et al. (2004). Five days after hatching (when exogenous feeding starts), the larvae (mean of 0.35 mg weight and 5.01 mm total length) were counted and distributed at a density of 20/L in fibreglass-tanks (0.50 m × 0.25 m × 0.25 m) containing 25 L of water. To avoid the escape of both larvae and food, each tank was equipped with a 200 µm mesh filter outlet. Aerated artesian well water was supplied to each tank in an open system (inflow 300 mL/min). Quality parameters of the incoming water were pH 7.9, hardness 5.2 °dH (German degrees, calcium 32.3 mg/L), total dissolved solids 108.5 mg/L and total suspended solids 39.7 mg/L. Throughout the trial, the dissolved oxygen content was measured in the tanks with a Sension6 dissolved Oxygen Meter (Dr Lange, Berlin, Germany) and ranged between 6 and 8 mg/L. Ammonia and nitrites were measured with a Pocket-Photometer Lasa Aqua (Dr Lange, Berlin, Germany) from water samples taken inside the tanks (values were always ammonia <0.02 mg/L and nitrites <0.05 mg/L). Water temperature (measured twice a day) was 24.5 ± 0.5 °C and photoperiod was kept natural (ca. 15 h light:9 h dark). The water quality parameters were measured once a week. Uneaten food and faeces were siphoned from the bottom of each tank every other day.

2.2. Diets and feeding

Concerning the direct use of decapsulated *Artemia* cysts (inert food) from the onset of exogenous feeding, it should be taken into account that several authors (Dabrowski and Glogowski, 1977; Lauff and Hoffer, 1984; Munilla-Moran et al., 1990; Kolkovski et al., 1993; Walford and Lam, 1993) have suggested that the digestive enzymes from live feed play an important role in the initial period of digestion of nutrients by fish larvae. Considering this possibility, we compared cysts supplied from the onset of exogenous feeding with cysts supplied after an initial feeding period on nauplii. Feeding with *Artemia* nauplii or cysts started at the beginning of exogenous feeding (five days after hatching).

Artemia cysts (INVE Aquaculture Nutrition, EG *Artemia* Cysts, Dendermonde, Belgium, 86% hatching rate) were decapsulated according to the method described by Van Stappen (1996). The different foods were prepared as follows:

- Freshly hatched nauplii were obtained daily according to Van Stappen (1996).
- Fresh cysts (without preservation process). New stocks were prepared every 3–4 days and stored at 4 °C.
- Brine cysts. Fresh decapsulated cysts were dehydrated in saturated NaCl-brine solution according to Van Stappen (1996). Prior to feeding-out, brine cysts were thoroughly washed in fresh water to allow for cysts hydration and to rinse the brine.
- Dried cysts. Decapsulated cysts were placed on a frame with a 150 µm mesh and dried in a laminar flow cabinet at 30 °C during 24 h. In order to reduce the high buoyancy of dried cysts, before being offered to the larvae, they were hydrated in fresh water. This enabled that the different preparations of cysts had the same behaviour in water, sinking to the bottom from the moment of their supply to the culture tanks.

After verifying mean hatching rates, which corroborated the data provided by the manufacturer (250,000 nauplii g/cysts), nauplii ration assessment was performed using known amounts of nauplii hatched in determinate water volumes, and distributing them into the corresponding replicates. When decapsulated cysts were directly used as food, feeding ration assessment of the different preparations of cysts was performed from the number of cysts/g provided by the manufacturer. In all cases, feeding was made by hand in excess, in such a way that a small remainder of uneaten food could always be seen in the tanks. According to this strategy, nauplii or cysts supply per larva per day were increased during the experiment, ranging from 60 at the start to 900 at the end. Assuming that tench larvae do not feed at night (Pyka, 1997), food was supplied four times a day at regular intervals (ca. every 4 h) during daylight hours.

Proximate composition of nauplii and the different preparations of cysts was analyzed according to the Norms of the International Standards Organization: moisture to ISO R-1442 (ISO, 1979), protein to ISO R-937 (ISO, 1978), lipid to ISO R-1443 (ISO, 1973), ash to ISO R-936 (ISO, 1998a) and gross energy to ISO 9831 (ISO, 1998b). Samples were stored at –30 °C

Table 1

Proximate composition (wet basis) of freshly hatched nauplii and the different preparations of cysts after 85 min of hydration during the decapsulation time (fresh cysts) or rehydration before to being offered to the larvae (brine and dried cysts).

	Nauplii	Fresh cysts	Brine cysts	Dried cysts	SEM ^a	P-value
Moisture (g/kg)	848 ^A	760.9 ^B	760.1 ^B	759.5 ^B	14.4	<0.001
Protein (g/kg)	80.5 ^A	140.4 ^B	141.4 ^B	141.9 ^B	9.9	<0.001
Lipid (g/kg)	23.5 ^A	38.4 ^B	38.5 ^B	38.8 ^B	2.5	0.003
Ash (g/kg)	8.8	9.8	9.5	9.4	0.2	0.432
Carbohydrates (g/kg)	39.3 ^A	50.6 ^B	50.6 ^B	50.5 ^B	1.9	0.013
Gross energy (kJ/g)	3.04 ^A	4.41 ^B	4.44 ^B	4.46 ^B	0.2	<0.001

^{A,B}Means in the same row with different superscripts differ.

^a Pooled standard error of the mean.

until analysis. All analyses were performed in duplicate. The content of carbohydrates was calculated by subtracting the content of moisture, protein, lipid and ash from the wet weight.

2.2.1. Experiment 1

A total of 6000 tench larvae were distributed among 12 tanks to test four feeding treatments: nauplii-only for 30 days (control group), nauplii for the first 7 days and fresh cysts thereafter, nauplii for the first 7 days and brine cysts thereafter or nauplii for the first 7 days and dried cysts thereafter.

After the first 7 days, transitions from nauplii to cysts were performed by replacing 25%, 50% and 75% of nauplii by cysts the first, second and third day, respectively. Thereafter, only cysts were supplied.

2.2.2. Experiment 2

A total of 6000 tench larvae were distributed among 12 tanks to test the same cysts preparations of the previous experiment, but supplying the cysts from the first day of exogenous feeding. So that, the four dietary treatments were nauplii, fresh cysts, brine cysts or dried cysts for the entire 30 days.

2.3. Data collection and statistical analysis

After 30 days, all surviving fish were counted and final survival rates calculated. Weight and length of a sample of 40 fish per tank (120 per treatment) were determined. Total length (TL) was measured with digital calliper (to the nearest 0.01 mm) and individual wet weight (W) was determined by precision balance (to the nearest 0.1 mg) after removing excess water with tissue paper. Specific growth rate (SGR) was expressed as $SGR = 100 (\ln W_t - \ln W_0) / t$, where W_t is the mean final weight, W_0 is the mean initial weight, and t is the duration of the experiment (days). Fulton's coefficient (K) was used to determine the fish condition with $K = 100(W_t/TL^3)$. Food conversion ratio (FCR) was calculated as $FCR = D_t / (W_t - W_0)$, where D_t is the total amount of cysts used (mg of their commercial form) and $W_t - W_0$ is the weight gain (mg) during 30 days.

All experimental groups were run in triplicate (three tanks per feeding treatment). Data were examined by analysis of variance (one-way ANOVA) using the computer programme SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago, III, USA). Newman-Keuls test was applied to compare means at the $P < 0.05$ level of significance. Percentages were arcsine-transformed prior to statistical analysis.

3. Results

Nauplii and the different preparations of decapsulated cysts were consumed from the first day as indicated by the externally observable presence in the digestive tract of translucent larvae. The percentage of animals with visible deformities was below 1%.

The proximate composition (wet basis before feeding-out) of nauplii and the different forms of decapsulated cysts is given in Table 1. Freshly hatched nauplii had higher ($P < 0.001$) moisture content than decapsulated cysts (848 vs. 760 g/kg). Nauplii had lower content of protein ($P < 0.001$), lipid ($P = 0.003$) and carbohydrates ($P = 0.013$) than cysts. Energy content of nauplii (3.04 kJ/g) was lower ($P < 0.001$) than that of decapsulated cysts (average: 4.44 kJ/g).

3.1. Experiment 1

Final survival, growth and food conversion values (30 days) are presented in Table 2. Survival rates did not differ significantly among treatments, ranging from 85.8% to 94.1%.

Larvae fed nauplii for the first 7 days and dried cysts thereafter had higher growth (18.3 mm TL, 64.2 mg W, 17.27%/day SGR) than the rest ($P < 0.001$; Table 2). Larvae fed nauplii for the first 7 days and cysts thereafter had higher weight, growth rate and condition factor than the larvae fed only nauplii ($P < 0.001$).

Table 2

Survival, growth and food conversion values of *T. tinca* larvae fed four diets of *Artemia* nauplii and different preparations of decapsulated cysts for 30 days (experiment 1).

	Feeding treatments				SEM ^a	P-value
	Nauplii	Nauplii 7 d				
		Fresh cysts	Brine cysts	Dried cysts		
Survival (%)	92.5	85.8	94.1	85.9	1.52	0.071
Total length (mm)	17.6 ^A	17.3 ^B	17.3 ^B	18.3 ^C	0.06	<0.001
Weight (mg)	52.2 ^A	58.9 ^B	56.6 ^B	64.2 ^C	0.63	<0.001
SGR (%/day) ^b	16.61 ^A	17.00 ^B	16.95 ^B	17.27 ^C	0.04	<0.001
K ^c	0.94 ^A	1.14 ^B	1.10 ^B	1.06 ^B	0.01	<0.001
FCR ^d	0.97 ^A	0.87 ^B	0.90 ^B	0.80 ^C	0.01	<0.001

^{A–C} Means in the same row with different superscripts differ.

^a Pooled standard error of the mean.

^b Specific growth rate (SGR) = [(ln final mean body weight – ln initial mean body weight)/days] × 100.

^c Condition factor (K) = (body weight/body length³) × 100.

^d Food conversion ratio (FCR) = total amount of cysts/wet weight gain.

Food conversion ratio ranged from 0.80 (lowest) for the nauplii for the first 7 days and dried cysts thereafter diet to 0.97 (highest) for the nauplii-only diet (P<0.001; Table 2). All cysts diets enabled lower food conversion ratio than the nauplii-only diet (P<0.001).

Condition coefficient ranged from 0.94 for the nauplii-only diet to 1.14 for the nauplii supplied the first 7 days and fresh cysts thereafter diet.

3.2. Experiment 2

Final survival, growth and food conversion values (30 days) are presented in Table 3. There were no differences in survival among the larvae fed nauplii, fresh or brine cysts (average: 90%). Survival of the larvae fed dried cysts was lower (P=0.001).

Larvae fed fresh cysts had higher growth (19.2 mm TL, 88.7 mg W, 18.33%/day SGR) than the rest (P<0.001; Table 3). Larvae fed the different preparations of cysts had higher weight, condition coefficient and specific growth rate than the larvae fed nauplii (P<0.001).

Food conversion ratio ranged from 0.70 (lowest) for the larvae fed fresh cysts to 1.02 (highest) for the larvae fed nauplii (P<0.001; Table 3). All diets of cysts enabled lower food conversion ratio than the nauplii diet (P<0.001).

Condition coefficient ranged from 0.90 (lowest) for the nauplii diet to 1.22 (highest) for the fresh cysts diet (P<0.001).

4. Discussion

In previous studies on tench larvae rearing, live *Artemia* nauplii have been supplied for 20–26 days from the onset of exogenous feeding (Wolnicki and Myszkowski, 1998; Fleig et al., 2001; Wolnicki et al., 2003; Celada et al., 2007). Usually, high survival rates and final weights between 32 and 47 mg have been reported. In the present 30-day experiments, survival rates between 74 and 94% were obtained, and final weights were between 51.1 and 88.7 mg. It is remarkable that, for first time, information on food conversion ratios of tench larvae is provided.

When decapsulated *Artemia* cysts are used as direct food instead of live nauplii, it is important to consider the different behaviour of nauplii and cysts in water. Freshly hatched nauplii are mobile and can remain living and swimming for some 12 h in well water (Celada et al., 2008) while cysts are inert. This could give rise to differences in food ingestion linked to a

Table 3

Survival, growth and food conversion values of *T. tinca* larvae fed four diets of *Artemia* nauplii and different preparations of decapsulated cysts for 30 days (experiment 2).

	Feeding treatments				SEM ^a	P-value
	Nauplii	Fresh cysts	Brine cysts	Dried cysts		
Survival (%)	93.9 ^A	89.4 ^A	86.7 ^A	74.1 ^B	2.36	0.001
Total length (mm)	17.7 ^A	19.2 ^B	18.4 ^C	17.8 ^A	0.07	<0.001
Weight (mg)	51.1 ^A	88.7 ^B	67.4 ^C	55.8 ^D	1.03	<0.001
SGR (%/day) ^b	16.51 ^A	18.33 ^B	17.39 ^C	16.81 ^D	0.05	<0.001
K ^c	0.90 ^A	1.22 ^B	1.06 ^C	0.97 ^D	0.01	<0.001
FCR ^d	1.02 ^A	0.70 ^B	0.79 ^C	0.92 ^D	0.01	<0.001

^{A–D} Means in the same row with different superscripts differ.

^a Pooled standard error of the mean.

^b Specific growth rate (SGR) = [(ln final mean body weight – ln initial mean body weight)/days] × 100.

^c Condition factor (K) = (body weight/body length³) × 100.

^d Food conversion ratio (FCR) = total amount of cysts/wet weight gain.

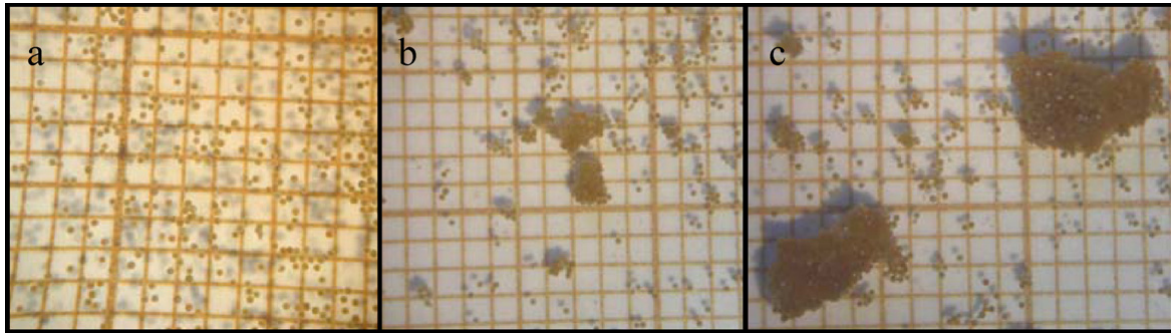


Fig. 1. (a) Fresh cysts, (b) brine cysts and (c) dried cysts after 4 h in the rearing tanks.

higher predator preference for the movements of the live nauplii compared to the inert sedimentation of decapsulated cysts. In the present study, preference for cysts or nauplii was not evidenced, with tench larvae ingesting cysts from the time of their supply, when they were sinking, and later on the tank bottoms. Another important factor to consider is that nauplii are progressively losing their nutritional quality after their introduction into larval culture tanks (Benijts et al., 1976), whereas decapsulated cysts sink to the bottom, where they conserve their nutritional quality (Vanhaecke et al., 1990), and remain available for tench larvae, which search for food on the tank bottom (Fleig et al., 2001).

The contribution of digestive enzymes from the live feed in the initial period of digestion of nutrients by fish larvae has been considered to explain the need of supply live organisms as first food in many fish species (Dabrowski and Glogowski, 1977; Lauff and Hoffer, 1984; Munilla-Moran et al., 1990; Kolkovski et al., 1993; Walford and Lam, 1993). In tench larvae, good survival and growth were reached when decapsulated *Artemia* cysts were provided from the onset of exogenous feeding (Table 3). This supports the findings of García-Ortega et al. (1998) who did not report differences between enzyme contribution of newly hatched *Artemia* nauplii and decapsulated cysts.

Considering the overall results of the present 30-day experiments, feeding tench larvae with decapsulated *Artemia* cysts resulted in higher growth compared to feeding larvae with live nauplii only. This has also been reported in a 28-day experiment with larvae of the guppy, *Poecilia reticulata* (Lim et al., 2002), and this result was partly attributed to the superior lipid content of the cysts. The proximate composition of cysts and nauplii used in the present study (Table 1) shows that hydrated cysts contain more dry matter, protein, lipid, carbohydrates and energy than freshly hatched nauplii. Thus, the better growth obtained in tench larvae fed decapsulated cysts may be related to a higher amount of food (dry matter) consumed and, therefore, higher amount of protein, lipid, carbohydrates and energy. Moreover, this could make feasible to improve food conversion efficiency. In fact, our FCR data (Tables 2 and 3) support this, since the lowest values were recorded when larvae received decapsulated cysts (from the onset of exogenous feeding or after the first 7 days with nauplii).

The decrease in growth recorded when larvae were fed preserved cysts instead of fresh cysts (Table 3), together with the lower survival of the larvae fed dried cysts, might suggest changes on the nutritional composition of the cysts due to the conservation process. However, this is unlikely, since no significant differences were found in the proximate composition among fresh, brine or dried cysts (Table 1). A possible explanation may be supported by the behaviour of preserved cysts in the rearing tanks. From samples of uneaten food taken after 2 h of feeding larvae, aggregations with a size of 0.5–1 mm and 0.5–2 mm of brine and dried cysts respectively were observed, whereas fresh cysts remained individually. After 4 h in water, the aggregates of brine cysts maintained their size but dried cysts aggregates increased up to 5 mm (Fig. 1). These aggregates could not be ingested by tench larvae since their size exceeded the mouth gape. Therefore, the number of available cysts per larva was lower than the supplied. This may explain the lower growth of the larvae fed brine cysts compared to the larvae fed fresh cysts (Table 3) as well as the reduction in survival recorded when larvae were fed dried cysts from the first day of exogenous feeding. Otherwise, the high survival and growth of the larvae fed dried cysts after 7 days with nauplii (Table 2) indicate that, after one week, larvae reached enough mouth gape to ingest some aggregates from eighth day onwards.

In conclusion, decapsulated *Artemia* cysts showed to be a suitable starter food for tench larvae, allowing higher growth rates than live nauplii and reducing operational costs during the rearing period. Both fresh and brine cysts can be supplied from the first day of exogenous feeding, while dried cysts can be successfully used after 7 days feeding on nauplii.

Acknowledgements

This study was funded by the Plan Nacional de I+D+i, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, Research Project AGL2010-16554. We thank the financing of a grant from University of León, Spain.

References

- Benijts, F., Vanvoorden, E., Sorgeloos, P., 1976. Changes in the biochemical composition of the early larval stages of the brine shrimp, *Artemia salina* L. In: Persoone, G., Jaspers, E. (Eds.), Proceedings of the 10th European Symposium on Marine Biology, vol. 1. Research in Mariculture at Laboratory and Pilot Scale. Universia Press, Wetteren, pp. 1–9.

- Celada, J.D., Carral, J.M., Rodríguez, R., Sáez-Royuela, M., Aguilera, A., Melendre, P.M., Martín, J., 2007. Tench (*Tinca tinca* L.) larvae rearing under controlled conditions: density and basic supply of *Artemia* nauplii as the sole food. *Aquacult. Int.* 15, 489–495.
- Celada, J.D., Aguilera, A., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., Melendre, P.M., 2008. Rearing tench (*Tinca tinca* L.) larvae on live feed (*Artemia*) and on two transition schedules from live to dry diets. *J. Appl. Ichthyol.* 24, 595–600.
- Dabrowski, K., Glogowski, J., 1977. Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion processes in fish. *Hydrobiologia* 54, 129–134.
- Fleig, R., Gottschalk, T., Hubenova, T., 2001. Raising larvae of the tench (*Tinca tinca* L.). *Bulg. J. Agric. Sci.* 7, 479–488.
- Freyhof, J., Kottelat, M., 2008. *Tinca tinca*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1. www.iucnredlist.org.
- García-Ortega, A., Verreth, J.A.J., Coutteau, P., Segner, H., Huisman, E.A., Sorgeloos, P., 1998. Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. *Aquaculture* 161, 501–514.
- ISO Norms, International Standards Organisation, 1973. Determination of lipids content (R-1443). Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organisation, 1978. Determination of nitrogen content (R-937). Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organisation, 1979. Determination of moisture content (R-1442). Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organisation, 1998a. Determination of ash content (R-936). Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organization, 1998b. Determination of gross caloric value: bomb calorimeter method (ISO 9831). Geneva, Switzerland.
- Kamler, E., Myszkowski, L., Kamiński, R., Korwin-Kossakowski, M., Wolnicki, J., 2006. Does overfeeding affect tench *Tinca tinca* (L.) juveniles? *Aquacult. Int.* 14, 99–111.
- Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G.W., Gertler, A., 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, *Sparidae*, *Linnaeus*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 12, 203–209.
- Lauff, M., Hoffer, R., 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture* 37, 335–346.
- Lim, L.C., Cho, Y.L., Dhert, P., Wong, C.C., Nelis, H., Sorgeloos, P., 2002. Use of decapsulated *Artemia* cysts in ornamental fish culture. *Aquacult. Res.* 33, 575–589.
- Munilla-Moran, R., Stark, J.R., Barbour, A., 1990. The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 88, 337–350.
- Pyka, J., 1997. Daily feeding cycle tench. *Tinca tinca* (L.), in larval and fry stages in the conditions of pond culture. An attempt to determine daily food ration. *Arch. Pol. Fish.* 5, 279–290.
- Rodríguez, R., Celada, J.D., Sáez-Royuela, M., Carral, J.M., Aguilera, A., Melendre, P.M., 2004. Artificial reproduction in 1-year-old tench (*Tinca tinca* L.). *J. Appl. Ichthyol.* 20, 542–544.
- Steffens, W., 1995. The tench (*Tinca tinca* L.), a neglected pond fish species. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 42, 161–180.
- Van Stappen, G., 1996. Use of cysts. In: Lavens, P., Sorgeloos, P. (Eds.), *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper 361, Rome, pp. 107–136.
- Vanhaecke, P., De Vrieze, L., Tackaert, W., Sorgeloos, P., 1990. The use of decapsulated cysts of the brine shrimp *Artemia* as direct food for carp *Cyprinus carpio* L. larvae. *J. World Aquacult. Soc.* 21 (4), 257–262.
- Walford, J., Lam, T.J., 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture* 109, 187–205.
- Wang, J., Min, W., Guan, M., Gong, L., Ren, J., Huang, Z., Zheng, H., Zhang, J., Liu, H., Han, Y., 2006. Tench farming in China: present status and future prospects. *Aquacult. Int.* 14, 205–208.
- Wolnicki, J., Myszkowski, L., 1998. Quality evaluation of larval and juvenile tench *Tinca tinca* L. fed live or dry diet by means of a stress test. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 45, 459–464.
- Wolnicki, J., Kamiński, R., Myszkowski, L., 2003. Survival, growth and condition of tench (*Tinca tinca* L.) larvae fed live food for 12, 18 or 24 h a day under controlled conditions. *J. Appl. Ichthyol.* 19, 146–148.
- Wolnicki, J., Myszkowski, L., Korwin-Kossakowski, M., Kamiński, R., Stanny, L.A., 2006. Effects of different diets on juvenile tench *Tinca tinca* (L.) reared under controlled conditions. *Aquacult. Int.* 14, 89–98.

Decapsulated *Artemia* Cysts: A Suitable Dietary Supplement for Juvenile Tench (*Tinca tinca* L.)

VANESA GARCÍA, JESÚS D. CELADA, JOSÉ M. CARRAL,
MARÍA SÁEZ-ROYUELA, ROCÍO GONZÁLEZ,
and ÁLVARO GONZÁLEZ

*Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León,
Campus de Vegazana, León, Spain*

*There are no specifically formulated dry foods for tench (*Tinca tinca* L.), which forces farmers to use diets formulated for other fish species. This has major drawbacks, such as high mortality, slow growth, and body deformities. A 120 day experiment was performed with five-month-old juvenile tench (initial mean weight: 0.388 g; total length: 31.78 mm) to evaluate decapsulated *Artemia* cysts as a supplement to a dry diet for other fish species. Three treatments, differing in the daily supplement, were tested: 1,800 freshly hatched nauplii, 1,800 cysts, and 300 cysts per g of tench biomass. Final survival ranged between 95.3% and 97.9%. Juvenile tench that received the supplement of 1,800 decapsulated *Artemia* cysts had a specific growth rate (1.28), weight (1.83 g), and total length (52.30 mm) significantly higher than those with the same amount of nauplii. The lowest supplement (300 cysts/g of fish biomass) allowed significantly lower growth and higher condition coefficient (1.40) than the rest. Animals with body deformities (1.06%) were only recorded in the groups that received the lowest cyst supplement. Results showed *Artemia* cysts are a suitable dietary supplement for juvenile tench, being an advantageous alternative to live nauplii.*

KEYWORDS *Tench, Tinca tinca, feeding, intensive culture, juvenile rearing, Artemia cysts*

We thank the University of León, Spain, for financing a grant.

Address correspondence to Jesús D. Celada, Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain.
E-mail: jdcelv@unileon.es

INTRODUCTION

The tench, *Tinca tinca* (Linnaeus 1758), a freshwater fish belonging to the family Cyprinidae, has a great potential for aquaculture (Steffens 1995; Kamler et al. 2006; Wang et al. 2006; Wolnicki et al. 2006). Originally occurring in the waters of Europe and Siberia, today tench occur in the inland waters of all the continents (Skrzypczak & Mamcarz 2006). In Europe, tench have a history of pond culture since the Middle Ages. However, the intensification of culture techniques has recently started, and it has been mainly focused on controlled reproduction. At present, juveniles are usually cultured in extensive or semi-extensive systems in earthen ponds, where control and management are difficult and production unpredictable, with often high mortality or slow growth. As a consequence, the major obstacle for the increase of tench production is a deficit of young fish for stocking outdoor ponds or open waters, as Wolnicki and colleagues (2006) have pointed out. For these reasons, special attention is being paid to find effective techniques for rearing juvenile tench under controlled conditions, focusing mainly on feeding as an essential factor.

There is currently not enough knowledge on the nutrition of tench, forcing producers to use dry foods formulated for other species, which results in slow growth (Quirós & Alvariño 1998; Wolnicki & Myszkowski 1998; Quirós et al. 2003), high mortality (Quirós & Alvariño 1998; Quirós et al. 2003; Rennert, Kohlmann, & Hack 2003; Celada et al. 2008a), and increased incidence of external body deformities (Rennert, Kohlmann, & Hack 2003; Wolnicki et al. 2006; Kamler et al. 2006). According to Quirós and Alvariño (1998) and Quirós and colleagues (2003), survival and growth can be improved by adding a supplement of live feed (*Daphnia* sp.), and Wolnicki, Myszkowski, and Kaminski (2003a) showed that supplementation of dry food with frozen insect larvae positively influenced the growth of juvenile tench. Recently, Celada and colleagues (2007a, 2008a) proved that live *Artemia* nauplii, which have been successful as the sole food for tench larvae (Fleig, Gottschalk, & Hubenova 2001; Wolnicki, Kamiński, & Myszkowski 2003b; Carral et al. 2006; Celada et al. 2007b, 2008b), are also a good supplementary food in the juvenile stage.

Whereas the daily production of nauplii is laborious and expensive, the direct use of *Artemia* cysts may offer an interesting alternative. After the nondigestible shell has been chemically removed, decapsulated cysts can be handled as an inert diet; they are disinfected and do not leach nutrients (Vanhaecke et al. 1990). Owing to these advantages, decapsulated *Artemia* cysts have been successfully tested as a starter food for tench larvae (Celada et al. 2008c), and it is possible that they could also serve as a supplementary food for juveniles. The present study aims to find a solution to the practical problems in tench culture by testing decapsulated *Artemia* cysts as a supplement to a dry diet.

MATERIALS AND METHODS

Fish, Facilities and Experimental Procedure

Mature breeders coming from a tench farm were transferred to the laboratory, where the experimental fish were obtained by means of controlled reproduction performed according to Rodríguez and colleagues (2004). From five days after hatching (when first feeding starts), the larvae were maintained in outdoor fibreglass tanks (2,500 L) and fed a combination of a dry diet developed for marine fish supplemented with *Artemia* nauplii until the beginning of the experiment. Then, 594 five-month-old juvenile tench (*T. tinca*) with a mean initial weight of 0.388 ± 0.005 g and total length of 31.78 ± 0.14 mm (mean \pm standard error, $n = 90$) were transferred to indoor facilities and stocked in nine fibreglass tanks ($0.50 \times 0.25 \times 0.25$ m) containing 25 L of water. Tench were randomly grouped to obtain the replicates corresponding to the different feeding treatments. Fish were anesthetized with MS-222 (Ortoquímica S.L., Barcelona, Spain). Bulk weighing for each tank was carried out (to the nearest 0.01 g), and the number of animals was counted. The stocking density was 1 g/L, and the mean number of animals in each tank was 66 ± 1.62 (mean \pm standard error).

Each tank had its own water inlet (inflow 0.35 L/min) and outlet (provided with 200 μ m mesh filter) and light aeration. Artesian well water was supplied in an open system. Quality parameters of the incoming water were pH 7.9, hardness 18°f (French grades, calcium 72 mg/L), total dissolved solids, 207.6 mg/L, and total suspended solids, 14.2 mg/L. Throughout the trial, the dissolved oxygen content ranged between 5.8 and 7.7 mg/L, ammonia < 0.02 mg/L and nitrites < 0.05 mg/L. Water temperature (measured twice a day) was $23 \pm 1^\circ\text{C}$, and photoperiod was natural. Dead animals were immediately removed from the tanks. Every other day, the tanks were cleaned of feces and uneaten food. The experiment lasted for 120 days.

Diets and Feeding

Juvenile tench were fed a dry commercial food for salmonids (Nutra, Skretting Trouw España S.A., Cojobar, E-09620 Burgos, Spain, with the composition data provided by the manufacturer being: crude protein 54%, crude fat 18%, ash 12%, total P 1.8 %, vit. A 10000 UI/Kg, D₃ 1500 UI/Kg, E 150 mg/Kg). Diameter of pellets was adjusted to the fingerling size, 0.6–1.0 mm (Nutra 2.0, 0.08% cellulose) during the first 60 days and 0.9–1.5 mm (Nutra 0, 1% cellulose) from day 61 to 120.

Live freshly hatched *Artemia* nauplii (cysts of INVE Aquaculture Nutrition, High HUFA 430 μ m, Hoogveld 91, B-9200 Dendermonde, Belgium) were used to supplement the dry diet. Cysts were decapsulated according to the method described by Van Stappen (1996). After verifying mean hatching rates (250,000 nauplii/g of cysts), supplement assessment

was performed using known amounts of nauplii hatched in determinate water volumes and distributing them into the corresponding replicates. When decapsulated cysts were directly used as food, fresh stocks were prepared every three days and stored at 4°C. Supplement assessment was performed from the number of cysts/g provided by the manufacturer.

In all groups, a dry diet ration was fed at approximately 4% (usually a bit over) of fish biomass. According to the daily supplement, three treatments were maintained: 1,800 nauplii, 1,800 cysts, and 300 cysts per g of fish biomass. Monthly, these amounts were adjusted according to the biomass in each tank calculated from samples (see below). Both dry diet and supplements were supplied manually once a day.

Data Collection and Analysis

Every 30 days, a sample of 10 fishes per tank (30 per treatment) was taken. After being anesthetized, excess water was removed with tissue paper and fish were weighed and measured individually. Total length (TL) was measured with calipers (to the nearest 0.01 mm), and individual wet weight (BW) was determined by precision balance (to the nearest 0.001 g). At the end of the experiment (day 120), surviving fish were anesthetized, counted, and animals with visible deformities were recorded. Survival rates were calculated, and individual weight and length of a sample of 20 fish per tank (60 per treatment) were determined. Specific growth rate (SGR) was expressed as $SGR = 100 (\ln W_t - \ln W_0) / t$, where W_t is the mean final weight, W_0 is the mean initial weight, and t is the duration of experiment (days). Fulton's coefficient (K) was used to determine fish condition with $K = 100 (W_t / TL^3)$.

All experimental groups were in triplicate (three tanks per treatment). Results were examined by analysis of variance (ANOVA) using SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Newman-Keuls test was applied to compare means at the $P < 0.01$ level of significance. Percentages were arcsine-transformed prior to statistical analysis.

RESULTS

Final survival and growth values (120 days) are presented in Table 1. Survival rates did not differ significantly among treatments, ranging from 95.3% to 97.9%. Animals with visible deformities (caudal peduncle) were only recorded in the groups that received 300 cysts/g of fish biomass (2 juveniles, 1.06%).

Tench that received the supplement of 1,800 decapsulated *Artemia* cysts/g of fish biomass had a growth rate (1.28), weight (1.83 g), and length (52.30 mm) significantly higher than those with the same amount of nauplii.

TABLE 1 Survival Rates and Growth Values of Juvenile Tench Reared with Supplements of Decapsulated *Artemia* Cysts or Live Nauplii During 120 Days (Mean \pm Standard Error)

	Supplement		
	1,800 cysts	1,800 nauplii	300 cysts
Survival (%)	97.8 \pm 0.7 ^a	97.9 \pm 1.0 ^a	95.3 \pm 0.2 ^a
TL (mm)	52.30 \pm 0.37 ^a	50.87 \pm 0.32 ^b	43.99 \pm 0.40 ^c
BW (g)	1.83 \pm 0.05 ^a	1.64 \pm 0.04 ^b	1.21 \pm 0.04 ^c
SGR (%/day)	1.28 \pm 0.02 ^a	1.19 \pm 0.02 ^b	0.92 \pm 0.03 ^c
K	1.27 \pm 0.01 ^a	1.23 \pm 0.01 ^a	1.40 \pm 0.03 ^b

Values in the same row having the same superscript are not significantly different ($P < 0.01$).

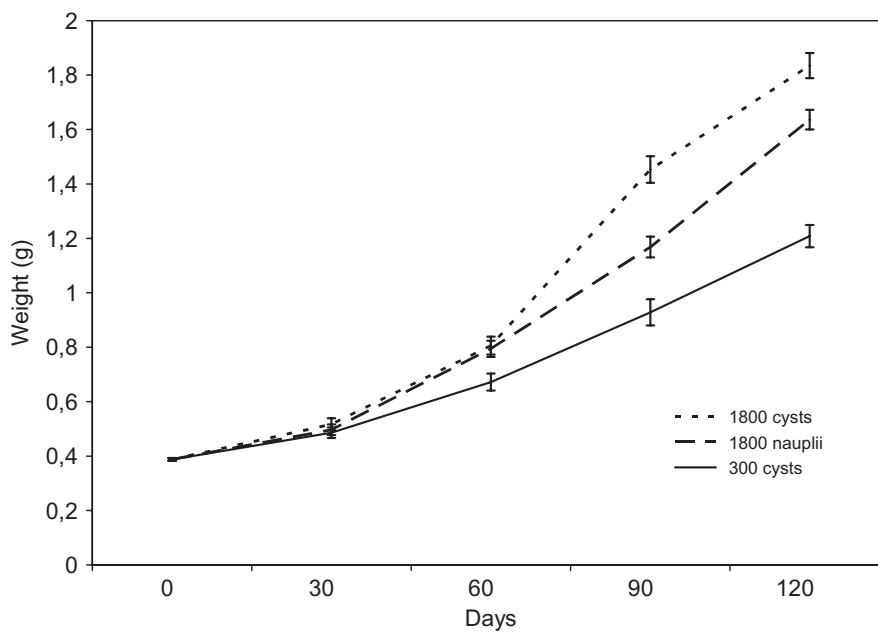


FIGURE 1 Average weight at various periods of juvenile tench fed with supplements of decapsulated *Artemia* cysts or live nauplii during 120 days.

The lowest supplement (300 cysts/g of fish biomass) supported significantly lower growth and higher condition coefficient (1.40) than the rest.

Figures 1 and 2 show changes in weight and total length, respectively, throughout the 120 days. Significant differences were found after 60 days, when the highest supplements (1,800 cysts or nauplii per g of fish biomass) supported higher weight and length than the lowest supplement. At day 90, weight and length of the tench that received 1,800 cysts/g of fish biomass were already significantly higher than those of the fish that received the same amount of nauplii.

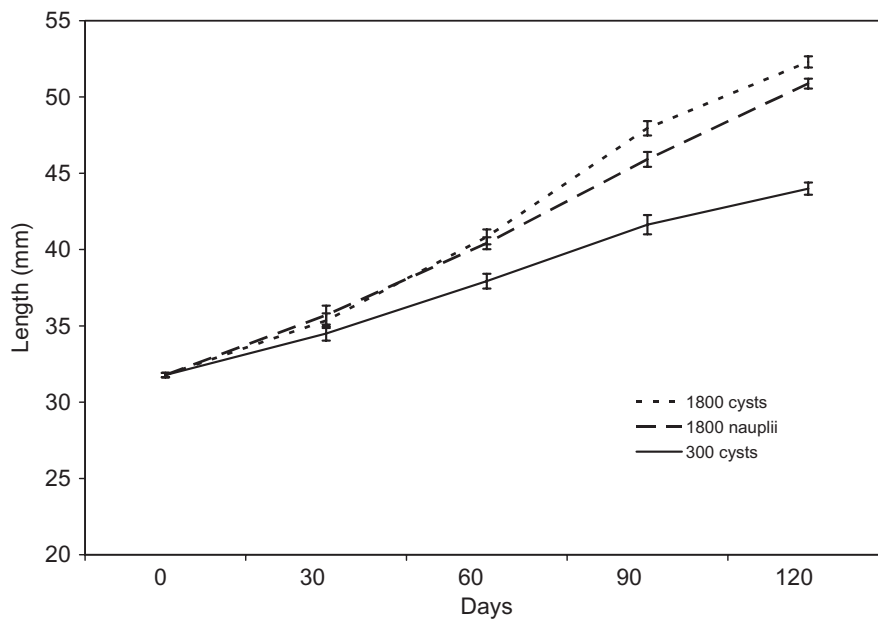


FIGURE 2 Average length at various periods of juvenile tench fed with supplements of decapsulated *Artemia* cysts or live nauplii during 120 days.

DISCUSSION

In rearing tench larvae, a major advance was the finding that decapsulated *Artemia* cysts supplied as the sole food can be better than nauplii (Celada et al. 2008c). Although the cysts' small size (200–250 μ) is suitable as starter feed for fish larvae (Verreth, Storch, & Segner 1987), cysts may be also used at later stages. For instance, fed a diet of only decapsulated cysts, milkfish (*Chanos chanos*) grew from 0.024 g to 5 g with 80%–95% survival (De los Santos et al. 1980). Our present results in tench confirm that decapsulated *Artemia* cysts can serve as a supplementary tench food in the juvenile stage. In terms of growth rate, cysts were shown to be a better supplement than nauplii for juveniles aged 5–9 months. From the assertions that, on an individual basis, there is no significant difference in the proximate composition between decapsulated *Artemia* cysts and freshly hatched nauplii (García-Ortega et al. 1998) and they have similar digestibility (García-Ortega et al. 2000), this faster growth could be related to the energy content and dry weight of decapsulated cysts, which are 30%–40% higher than for instar I nauplii (Van Stappen 1996). This means that cysts do contain more dry matter than nauplii. Thus, the better growth obtained in fish fed decapsulated cysts may be related to a higher amount of food (dry matter) consumed.

In the intensification of the rearing of juvenile tench, the main problems occur early, when natural food availability can be critical (Celada et al.

2008a). High mortality has been reported in tests with exclusively dry diets for salmonids (Quirós & Alvaríño 1998; Quirós et al. 2003; Rennert, Kohlmann, & Hack 2003; Celada et al. 2008a). In the study carried out by Celada and colleagues (2008a), about half of the juveniles died after 120 days. However, when the same diet for salmonids was supplemented with live nauplii (Celada et al. 2007a, 2008a) or decapsulated cysts (the present experiment), high survival rates were obtained with even acceptable growth. Considering the results reported so far using dry diets for salmonids or the carp (Wolnicki & Myszowski 1998; Wolnicki, Myszowski, & Kaminski 2003a; Kamler et al. 2006), it can be suggested that, lacking a diet formulated precisely for juvenile tench, supplementation with live nauplii or cysts can be more important than the quality of the available dry diets.

Wolnicki and colleagues (2006) and Kamler and colleagues (2006) suggested a relationship between the use of dry diets and juvenile tench with an elevated condition coefficient (1.3–1.4) and body deformities. Farmers have also observed this relationship when they attempted growout in concrete tanks, where little or no natural food is available. In the present experiment, tench that received the lowest supplement (300 cysts/g biomass) had the highest condition coefficient (1.4), showing significant differences from the others. However, only 1.06% of the fish showed deformities. Thus, a small daily supplement of decapsulated cysts seems to prevent the appearance of body deformities, at least within the range of the growth rates achieved in this study.

Under controlled conditions, growth rates (%/day) from 0.74 to 1.51 have been reported in juvenile tench aged 3–5 months at the beginning of the experiments (Quirós & Alvaríño 1998; Wolnicki, Myszowski, & Kaminski 2003a; Quirós et al. 2003; Celada et al. 2007a), the range in which the results of the present study with five-month-old juveniles lie. In a previous work (Celada et al. 2008a), growth rates increased with increasing nauplii supplement from 1.21 to 1.98. In the present experiment, cysts were used instead of nauplii, and growth rate also improved when cyst supplement level increased. This suggests that growth could be improved by increasing the number of cysts, which have proved to be an advantageous alternative to live nauplii. The direct use of decapsulated *Artemia* cysts as dietary supplement for juvenile tench not only allows faster growth than nauplii, but also saves labour and costs.

REFERENCES

- Carral, J.M., J.D. Celada, M. Sáez-Royuela, R. Rodríguez, A. Aguilera, and P.M. Melendre. 2006. Effects of four desticking procedures on hatching rate and further survival and growth of larvae in the tench (*Tinca tinca* L.). *Aquacult. Res.* 37:632–636.

- Celada, J.D., A. Aguilera, J.M. Carral, M. Sáez-Royuela, P.M. Melendre, and J.R. Pérez. 2007a. Effects of stocking density on survival and growth of juvenile tench (*Tinca tinca* L.). *Aquacult. Int.* 15:461–465.
- Celada, J.D., J.M. Carral, R. Rodríguez, M. Sáez-Royuela, A. Aguilera, P.M. Melendre, and J. Martín. 2007b. Tench (*Tinca tinca* L.) larvae rearing under controlled conditions: Density and basic supply of *Artemia* nauplii as the sole food. *Aquacult. Int.* 15:489–495.
- Celada, J.D., A. Aguilera, V. García, J.M. Carral, M. Sáez-Royuela, R. González, and A. González. 2008a. Rearing juvenile tench (*Tinca tinca* L.) under controlled conditions using *Artemia* nauplii as supplement to a dry diet. *Aquacult. Int.* DOI: 10.1007/s1049900892253.
- Celada, J.D., A. Aguilera, J.M. Carral, M. Sáez-Royuela, and P.M. Melendre. 2008b. Rearing tench (*Tinca tinca* L.) larvae on live feed (*Artemia*) and on two transition schedules from live to dry diets. *J. App. Ichthyol.* 24:595–600.
- Celada, J.D., V. García, J.M. Carral, M. Sáez-Royuela, R. González, and A. González. 2008c. Larval rearing of tench (*Tinca tinca* L.) using decapsulated *Artemia* cysts as direct food. Proceedings of the 5th International Workshop on Biology and Culture of the Tench (*Tinca tinca* L.).
- De los Santos, C., P. Zorruelos, E. Laviña, and A. Bernardino. 1980. Successful inoculation of *Artemia* and production of cysts in man-made salterns in the Philippines. In *The brine shrimp Artemia Vol. 3: Ecology, culturing, use in aquaculture*, eds. G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels, and E. Jaspers, 159–163. Wetteren, Belgium: Universa Press.
- Fleig, R., T. Gottschalk, and T. Hubenova. 2001. Raising larvae of the tench (*Tinca tinca* L.). *Bulgarian J. Agri. Sci.* 7:479–488.
- García-Ortega, A., J. Verreth, P. Coutteau, H. Segner, E.A. Huisman, and P. Sorgeloos. 1998. Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. *Aquaculture* 161:501–514.
- García-Ortega, A., A. Koussoulaki, H. Boer, and J. Verreth. 2000. In vitro protein digestibility of *Artemia* decapsulated cysts and nauplii, and microbound diets for larval fish. *Aquacult. Res.* 31:475–477.
- Kamler, E., L. Myszkowsky, R. Kamiński, M. Korwin-Kossakowski, and J. Wolnicki. 2006. Does overfeeding affect tench *Tinca tinca* (L.) juveniles? *Aquacult. Int.* 14:99–111.
- Quirós, M., and J.M.R. Alvarino. 1998. Growth of tench (*Tinca tinca* (L.)) fed with and without the addition of the cladoceran *Daphnia*. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 45(3): 447–451.
- Quirós, M., N. Nicodemus, M. Alonso, M. Bartolomé, J.L. Écija, and J.M.R. Alvarino. 2003. Survival and changes in growth of juvenile tench (*Tinca tinca* L.) fed on defined diets commonly used to culture non-cyprinid species. *J. App. Ichthyol.* 19(3):149–151.
- Rennert, B., K. Kohlmann, and H. Hack. 2003. A performance test with five different strains of tench (*Tinca tinca* L.) under controlled warm water conditions. *J. App. Ichthyol.* 19(3):161–164.
- Rodríguez, R., J.D. Celada, M. Sáez-Royuela, J.M. Carral, A. Aguilera, and P.M. Melendre. 2004. Artificial reproduction in 1-year-old tench (*Tinca tinca* L.). *J. App. Ichthyol.* 20:542–544.

- Skrzypczak, A., and A. Mamcarz. 2006. Changes in commercially exploited populations of tench, *Tinca tinca* (L.) in lakes of Northeastern Poland. *Aquacult. Int.* 14:179–193.
- Steffens, W. 1995. The tench (*Tinca tinca* L.), a neglected pond fish species. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 42(1–2):161–180.
- Van Stappen, G. 1996. Use of cysts. In *Manual on the production and use of live food for aquaculture*, eds. P. Lavens, and P. Sorgeloos, 107–136. FAO Fisheries Technical Paper 361, Rome: FAO.
- Vanhaecke, P., L. De Vrieze, W. Tackaert, and P. Sorgeloos. 1990. The use of decapsulated cysts of the brine shrimp *Artemia* as direct food for carp *Cyprinus carpio* L. larvae. *J. World Aquacult. Soc.* 21(4):257–262.
- Verreth, J., V. Storch, and H. Segner. 1987. A comparative study on the nutritional quality of decapsulated *Artemia* cysts, micro-encapsulated egg diets and enriched dry feeds for *Clarias gariepinus* (Burchell) larvae. *Aquaculture* 63:269–282.
- Wang, J., W. Min, M. Guan, L. Gong, J. Ren, Z. Huang, H. Zheng, J. Zhang, H. Liu, and Y. Han. 2006. Tench farming in China: present status and future prospects. *Aquacult. Int.* 14:205–208.
- Wolnicki, J., and L. Myszkowski. 1998. Evaluation of four commercial dry diets for intensive production of tench *Tinca tinca* (L.) juveniles under controlled conditions. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 45(3):453–458.
- Wolnicki, J., L. Myszkowski, and R. Kamiński. 2003a. Effect of supplementation of a dry feed with natural food on growth, condition and size distribution of juvenile tench *Tinca tinca* (L.). *J. App. Ichthyol.* 19:157–160.
- Wolnicki, J., R. Kamiński, and L. Myszkowski. 2003b. Survival, growth and condition of tench (*Tinca tinca* L.) larvae fed live food for 12, 18 or 24 h a day under controlled conditions. *J. App. Ichthyol.* 19:146–148.
- Wolnicki, J., L. Myszkowski, M. Korwin-Kossakowski, R. Kamiński, and L.A. Stanny. 2006. Effects of different diets on juvenile tench *Tinca tinca* (L.) reared under controlled conditions. *Aquacult. Int.* 14:89–98.

Short communication

Evaluation of different qualities and preparations of decapsulated *Artemia* cysts as dietary supplement for juvenile tench (*Tinca tinca* L.)

By V. García, J. D. Celada, Á. González-Rodríguez, J. M. Carral, M. Sáez-Royuela, R. González and Á. González

Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana León, León, Spain

Introduction

The tench, *Tinca tinca*, is a cyprinid with a great potential for aquaculture because of its hardy nature and market demand. Traditionally, juveniles are cultured in extensive or semi-extensive systems, where control and management are difficult and production unpredictable, often with a high mortality or slow growth. The rearing of juveniles under controlled conditions may thus be a valuable alternative to this traditional production.

At present, there are no specifically formulated diets for tench; commercial aquafeeds as the sole food are shown to be unsuitable (Celada et al., 2009; García et al., 2010; Myszkowski et al., 2010). Several recent studies have shown an improvement by adding live or natural food supplements such as *Daphnia* (Quirós and Alvarino, 1998; Quirós et al., 2003), frozen chironomids (Wolnicki et al., 2003), *Artemia* nauplii (Celada et al., 2009), or decapsulated *Artemia* cysts (García et al., 2010).

There are some current options to improve cyst supplementation profitability. As *Artemia* cysts (high hatch-rate) are expensive, optimal is to reduce the supplementation period or to provide cheaper alternative food, such as the low hatch-rate cysts. Moreover, processing methods for long-term cyst storage, such as dehydration in saturated Na-Cl brine solution or by air-drying, could permit their preparation and storage before their rearing period begins and thereby reduce the frequently laborious renewal of fresh stocks.

The objectives of this study were therefore to investigate the effects of early suppression of cyst supplementation and different preparations and qualities of decapsulated *Artemia* cysts as a dietary supplement for the survival, growth performance and reduction of the incidence of body deformities in tench juveniles.

Materials and methods

Fish, facilities and experimental procedure

Experimental fish were obtained by controlled reproduction performed according to Rodríguez et al. (2004) and reared in outdoor fibreglass tanks (2500-L; n = 5000) until the begin of the experiments. After 5 months, 1261 juvenile tench (initial

weight = 0.303 ± 0.004 g; total length: 31.41 ± 0.15 mm, n = 120) were transferred to indoor facilities and randomly distributed in 15 fibreglass tanks (25-L; $0.50 \times 0.25 \times 0.25$ m). Stocking density was 1 g l^{-1} and the number of fish per tank counted (84 ± 1 ; mean \pm standard error). All experimental groups were run in triplicate (three tanks per treatment).

Tanks received flow-through (inflow 0.25 l min^{-1}) non-recirculating artesian well water aerated with an LP-60 air pump. Quality parameters of the water inflow were pH 7.9, hardness $5.2 \text{ }^\circ\text{dH}$ (German degrees, calcium 32.3 mg l^{-1}), total dissolved solids 115.7 mg l^{-1} and total suspended solids 35.2 mg l^{-1} . Throughout the trial, the dissolved oxygen content ranged between 5.9 and 7.8 mg l^{-1} , $\text{NH}_4 < 0.02 \text{ mg l}^{-1}$ and nitrites $< 0.05 \text{ mg l}^{-1}$. Water temperature was $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ and the photoperiod was natural light (ca. 11 h light: 13 h dark).

All procedures in this study were approved by the León University Ethics Committee (Spain).

Diets and feeding

Juveniles were fed a commercial carp starter (ALLER AQUA, Starter feed, Aller Futura, Christiansfeld, Denmark). The feed contained 640 g kg^{-1} crude protein, 120 g kg^{-1} crude fat, 40 g kg^{-1} nitrogen-free extract, 110 g kg^{-1} ash, and 20.9 MJ kg^{-1} gross energy (according to the producer). Pellet diameter was adjusted to the fingerling size: $0.2\text{--}0.6$ mm during the first 60 days, and $0.9\text{--}1.6$ mm from days 61 to 120.

Different qualities (high or low hatch-rate) and preparations (fresh, brine, or dried) of decapsulated *Artemia* cysts were used as supplements to the dry diet. Cysts were decapsulated according to Van Stappen (1996). High hatch-rate cysts (INVE Aquaculture Nutrition, EG *Artemia* Cysts, Dendermonde, Belgium; 86% hatching rate) were used as follows:

- Fresh cysts (no preservation process). Stocks were renewed every 3–4 days and stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Brine-preserved cysts. Fresh decapsulated cysts were dehydrated in saturated Na-Cl brine solution according to Van Stappen (1996). Prior to feeding-out, cysts were

thoroughly washed in fresh water to allow for cyst hydration and to rinse off the brine.

- Dried cysts. Decapsulated cysts were placed on a frame with a 150 μm mesh and dried in a laminar flow cabinet at 30°C for 24 hours. In order to reduce their high buoyancy before being offered to the fish the cysts were hydrated in fresh water. Thus, the different cyst preparations had the same behaviour in water, sinking to the bottom from the moment of their supply.

Low hatch-rate fresh cysts (Argentine *Artemia*) were used after having been stored for about 5 years at room temperature without being vacuum-packed (10% hatching rate).

All groups of juveniles were fed commercial feed at 3% body weight supplemented daily with 1,800 cysts per gram of biomass. These amounts were adjusted monthly according to the increase of biomass calculated from the samples taken. The fish were fed manually with four equal portions at regular intervals (ca. every 4 h) daily for 120 days.

The experimental design comprised 5 feeding groups according to the quality, preparation and supplementation period of *Artemia* cysts: low hatch-rate fresh, high hatch-rate fresh, brine preserved and dried decapsulated cysts for 120 days, and high hatch-rate fresh decapsulated cysts for 45 days.

The suppression of supplements lasted 14 days and was performed progressively by reducing 25%, 50% and 75% of the cysts on days 31, 36 and 41, respectively.

Data collection and analysis

Every 30 days, a sample of 15 fish per tank (45 per treatment) was taken. After being anesthetized with MS-222 (0.1 g l⁻¹, 23°C), fish were weighed (W, in grams) and measured individually (TL, in cm). At the end of the experiment, surviving fish were anesthetized, counted, and animals with externally visible deformities recorded. Survival rates were calculated, and individual lengths and weights of a sample of 30 fish per tank (90 per treatment) were determined. Specific growth rate (SGR) was expressed as $SGR = 100 (\ln \text{ final weight} - \ln \text{ initial weight}) / \text{rearing period (days)}$. Fulton's coefficient (K) was determined by $K = 100 (W/TL^3)$. According to Fornshell and Hinshaw (2009), feed conversion ratio (FCR) was calculated as $FCR = D_t / \text{weight gain}$, where D_t is the total amount of feed provided (g).

At the end of the experiment, proximate composition of samples of 6 fish per replicate (18 fish per every feed treatment) was analysed according to the Norms of the International Standards Organization: lipid to ISO R-1443 (ISO

Table 1

Final values (120 days) of survival, growth, feed conversion and percentage of fish with externally visible deformities of juvenile tench fed a commercial dry diet supplemented with different qualities and preparations of decapsulated *Artemia* cysts

Supplementation period	120 days				45 days High hatch-rate fresh cysts
	High hatch-rate fresh cysts	Brine cysts	Dried cysts	Low hatch-rate fresh cysts	
Survival (%)	99.6 ± 0.4	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	99.6 ± 0.4	99.6 ± 0.4
Length (mm)	53.2 ± 0.3	53.1 ± 0.3	53.9 ± 0.3	54.0 ± 0.3	52.5 ± 0.3
Weight (g)	1.80 ± 0.03	1.84 ± 0.03	1.91 ± 0.04	1.89 ± 0.04	1.85 ± 0.04
SGR (% day ⁻¹)	1.47 ± 0.02	1.49 ± 0.02	1.52 ± 0.02	1.51 ± 0.02	1.49 ± 0.02
K	1.19 ± 0.01 ^a	1.22 ± 0.01 ^a	1.21 ± 0.01 ^a	1.19 ± 0.01 ^a	1.26 ± 0.01 ^b
FCR	1.30 ± 0.03	1.36 ± 0.03	1.30 ± 0.03	1.32 ± 0.03	1.28 ± 0.03
Deformed fish (%)	12.9 ± 4.0 ^a	13.3 ± 3.1 ^a	14.5 ± 1.2 ^a	13.3 ± 1.4 ^a	43.1 ± 1.6 ^b

SGR, specific growth rate, K, condition factor, FCR, feed conversion ratio.

Values are mean ± standard error. Growth data derived from 30 fish sampled per replicate (n = 90).

Values in the same row with different superscripts are significantly different (P < 0.05).

Table 2

Proximate composition of the whole-body of juvenile tench fed a commercial dry diet supplemented with different qualities and preparations of decapsulated *Artemia* cysts

Supplementation period	120 days				45 days High hatch-rate fresh cysts
	High hatch-rate fresh cysts	Brine cysts	Dried cysts	Low hatch-rate fresh cysts	
Moisture (%)	75.5 ± 0.1	75.8 ± 0.0	75.3 ± 0.0	75.6 ± 0.3	75.5 ± 0.1
Protein (%)	16.8 ± 0.1	16.5 ± 0.0	16.8 ± 0.2	16.8 ± 0.1	16.4 ± 0.1
Lipid (%)	5.6 ± 0.1 ^a	5.6 ± 0.1 ^a	5.9 ± 0.1 ^a	5.5 ± 0.1 ^a	6.6 ± 0.1 ^b
Ash (%)	2.1 ± 0.0 ^a	2.1 ± 0.1 ^a	2.0 ± 0.0 ^a	2.2 ± 0.1 ^a	1.6 ± 0.1 ^b

Values are mean ± standard error.

Values in the same row with different superscripts are significantly different (P < 0.05).

Norms, 1973), protein to ISO R-937 (ISO Norms, 1978), moisture to ISO R-1442 (ISO Norms, 1979), and ash to ISO R-936 (ISO Norms, 1998).

Results were analysed statistically (one-way ANOVA, Newman–Keuls test) at the $P < 0.05$ level of significance using SPSS vers. 15.0 software.

Results

Final values of survival, growth, feed conversion and percentage of fish with externally visible deformities after 120 days are presented in Table 1. Survival rates were 99.6–100%.

No significant differences were found in TL (53.6 ± 0.2 mm), W (1.86 ± 0.02 g), SGR ($1.50 \pm 0.01\%$ day⁻¹), K (1.20 ± 0.01), FCR (1.32 ± 0.01) or percentage of deformed fish ($13.5 \pm 0.35\%$) among juveniles fed different qualities or preparations of cysts as supplements over 120 days. Juvenile tench fed fresh cysts during the first 45 days showed no significant differences in TL, W, SGR or FCR from the other treatments. However, they showed a condition coefficient (1.26) and percentage of deformities (43.1%) significantly higher than those of the remaining fish. Body deformities affected the caudal peduncle (a break in the tail axis).

Proximate composition of the whole body of juvenile tench is given in Table 2. Juveniles that received fresh cysts during the first 45 days had significantly higher lipid content (6.6%) and significantly lower ash content (1.6%) than the remaining tench (average: 5.65% lipid and 2.1% ash). No significant differences were found in moisture or protein content.

Discussion

When different cyst supplements were provided throughout all experimental period, there were no significant differences in survival (close to 100%), growth (1.47 – 1.52% day⁻¹) or percentage of deformed fishes (12.9–14.5%). This could be due to the similar proximate composition of fresh high hatch-rate and low hatch-rate cysts (Celada et al., 2013) and preserved (brine or dried) cysts (García et al., 2011). When the cyst supplement was suppressed earlier, the percentage of fish with externally visible deformities increased dramatically (43.1%). The causes of visible deformities in juvenile tench fed dry diets as the sole food are considered to be a possible response to inadequate feed (Rennert et al., 2003; Kamler et al., 2006; García et al., 2010). Moreover, a relationship between the use of commercial diets and the presence of body deformities accompanied by elevated K (1.3–1.4), low mineral content in the body, and high lipids have been suggested (Kamler et al., 2006; Wolnicki et al., 2006; Myszkowski et al., 2010). In agreement with this, the highest condition coefficient (1.26) in our study coincided with the highest percentage of deformed fish, and the body analysis (Table 2) revealed a higher lipid and lower ash content in juvenile tench not fed cyst supplements after day 45. In contrast, this response was not observed in juvenile tench fed a cyst supplement over 120 days. According to García et al. (2010), the *Artemia* cyst supplement may play an important role in preventing deformities in tench fed dry diets. Thus, a reduction in the

supplementation period resulted in an increased rate of deformed fish.

To summarize, the results show that low hatch-rate or preserved (brine or dried) *Artemia* cysts can be used successfully as supplements to dry diets in the rearing of juvenile tench, and are advantageous in comparison to the fresh high hatch-rate cysts. Until a diet specific for tench juveniles is available, the cyst supplement to commercial dry diets formulated for other fish species could mitigate the incidence of body deformities.

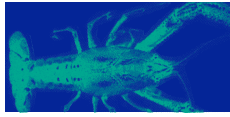
Acknowledgements

This study was funded by the Plan Nacional de I+D+i, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, Research Project AGL2010-16554. We thank the University of León, Spain for the financing of the grant.

References

- Celada, J. D.; Aguilera, A.; García, V.; Carral, J. M.; Sáez-Royuela, M.; González, R.; González, A., 2009: Rearing juvenile tench (*Tinca tinca* L.) under controlled conditions using *Artemia* nauplii as supplement to a dry diet. *Aquac. Int.* **17**, 565–570.
- Celada, J. D.; García, V.; Carral, J. M.; Sáez-Royuela, M.; González, R.; González, Á., 2013: Decapsulated *Artemia* cysts of different quality (high or low hatch rate) as direct food for tench (*Tinca tinca* L.) larvae. *Aquac. Res.* **44**, 167–175.
- Fornshell, G.; Hinshaw, J. M., 2009: Better management practices for flow-through aquaculture systems. In: Environmental best management practices for aquaculture. C. S. Tucker and J. A. Hargreaves (Eds.). Wiley-Blackwell, Oxford. pp. 331–388.
- García, V.; Celada, J. D.; Carral, J. M.; Sáez-Royuela, M.; González, R.; González, Á., 2010: Decapsulated *Artemia* cysts: a suitable dietary supplement for juvenile tench (*Tinca tinca* L.). *J. Appl. Aquacult.* **22**, 57–65.
- García, V.; Celada, J. D.; Carral, J. M.; González, R.; González, Á.; Sáez-Royuela, M., 2011: A comparative study of different preparations of decapsulated *Artemia* cysts as food for tench (*Tinca tinca* L.) larvae. *Anim. Feed. Sci. Tech.* **170**, 72–77.
- ISO Norms, International Standards Organisation, 1973: Determination of lipids content (R-1443). International Standards Organisation, Geneva.
- ISO Norms, International Standards Organisation, 1978: Determination of nitrogen content (R-937). International Standards Organisation, Geneva.
- ISO Norms, International Standards Organisation, 1979: Determination of moisture content (R-1442). International Standards Organisation, Geneva.
- ISO Norms, International Standards Organisation, 1998: Determination of ash content (R-936). International Standards Organisation, Geneva.
- Kamler, E.; Myszkowski, L.; Kamiński, R.; Korwin-Kossakowski, M.; Wolnicki, J., 2006: Does overfeeding affect tench *Tinca tinca* (L.) juveniles? *Aquac. Int.* **14**, 99–111.
- Myszkowski, L.; Kamler, E.; Kwiatkowski, S., 2010: Weak compensatory growth makes short-term starvation an unsuitable technique to mitigate body deformities of *Tinca tinca* juveniles in intensive culture. *Rev. Fish Biol. Fish.* **20**, 381–388.
- Quirós, M.; Alvaríño, J. M. R., 1998: Growth of tench (*Tinca tinca* L.) fed with and without the addition of the cladoceran *Daphnia*. *Pol. Arch. Hydrobiol.* **45**, 447–451.
- Quirós, M.; Nicodemus, N.; Alonso, M.; Bartolomé, M.; Écija, J. L.; Alvaríño, J. M. R., 2003: Survival and changes in growth of juvenile tench (*Tinca tinca* L.) fed on defined diets commonly used to culture non-cyprinid species. *J. Appl. Ichthyol.* **19**, 149–151.

- Rennert, B.; Kohlmann, K.; Hack, H., 2003: A performance test with five different strains of tench (*Tinca tinca* L.) under controlled warm water conditions. *J. Appl. Ichthyol.* **19**, 161–164.
- Rodríguez, R.; Celada, J. D.; Sáez-Royuela, M.; Carral, J. M.; Aguilera, A.; Melendre, P. M., 2004: Artificial reproduction in 1-year-old tench (*Tinca tinca* L.). *J. Appl. Ichthyol.* **20**, 542–544.
- Van Stappen, G., 1996: Use of cysts. In: Manual on the production and use of live food for aquaculture. P. Lavens and P. Sorgeloos (Eds.). FAO Fisheries Technical Paper 361, Rome. pp. 107–136.
- Wolnicki, J.; Myszkowski, L.; Kamiński, R., 2003: Effect of supplementation of a dry feed with natural food on growth, condition and size distribution of juvenile tench *Tinca tinca* (L.). *J. Appl. Ichthyol.* **19**, 157–160.
- Wolnicki, J.; Myszkowski, L.; Korwin-Kossakowski, M.; Kamiński, R.; Stanny, L. A., 2006: Effects of different diets on juvenile tench *Tinca tinca* (L.) reared under controlled conditions. *Aquac. Int.* **14**, 89–98.
- Author's address:** Vanesa García, Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, E-24071 León, Spain.
E-mail: vgarm@unileon.es



Response of juvenile tench (*Tinca tinca* L.) fed practical diets with different protein contents and substitution levels of fish meal by soybean meal

Vanesa García, Jesús Domingo Celada, Rocío González, José Manuel Carral, María Sáez-Royuela & Álvaro González

Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, León 24071, Spain

Correspondence: V García, Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain. E-mail: vgarm@unileon.es

Abstract

A basal practical diet for juvenile tench (*Tinca tinca*) was formulated and elaborated to test several protein contents and substitution possibilities of fish meal (FM) by soybean meal (SBM) in a 90-day trial with 5-month-old juveniles (30.54 mm TL, 0.30 g W). A factorial design included nine feeding treatments: three protein contents (50%, 40% or 30%) and three levels of replacement (0%, 25% or 45%) of FM protein by SBM protein. In addition, a commercial carp feed was used as reference. Final survival ranged from 98.2% to 99.4%. The 50% dietary protein with 0% or 25% replacement and 40% dietary protein with 25% replacement diets enabled higher growth ($P < 0.05$) and lower FCR ($P < 0.05$) than the rest of practical diets. Fish fed 50% dietary protein had similar growth than those fed carp feed (63.8% protein). Deformed fish averaged 1% for the practical diets and 87.6% for the carp feed. The basal practical diet has showed to be feasible and levels of 40–50% dietary protein with 25% replacement of FM protein by SBM protein can be recommended for juvenile tench aged 5–8 months.

Keywords: *Tinca tinca*, juveniles, practical diet, dietary protein, fish meal, soybean meal

Introduction

Tench (*Tinca tinca* L. 1758), a freshwater fish belonging to the family Cyprinidae, has a great potential for aquaculture (Steffens 1995; Kamler,

Myszkowsky, Kamiński, Korwin-Kossakowski & Wolnicki 2006; Wang, Min, Guan, Gong, Ren, Huang, Zheng, Zhang, Liu & Han 2006; Wolnicki, Myszkowski, Korwin-Kossakowski, Kamiński & Stanny 2006). Originally occurring in the waters of Europe and Siberia, today tench occurs in the inland waters of all the continents (Freyhof & Kottelat 2008). In Europe, tench has a history of pond culture since the Middle Ages. However, the intensification of culture techniques has recently started. At present, tench is considered a promising new species for intensive culture, which has drawn much attention from researchers and farmers.

In natural habitats, tench are carnivorous, and very small amounts of plant material found in the alimentary tract have been swallowed incidentally along with live preys (Kennedy & Fitzmaurice 1970). Gut content analyses show that juveniles fed zooplankton and other small invertebrates (Pyka 1996, 1997). At present, juveniles are usually cultured in extensive or semi-extensive systems in earthen ponds, where control and management of fish are difficult. Moreover, productions are unpredictable, recording frequently high mortality or slow growth. As consequence, the major obstacle for the increase of tench production is a deficit of young fish for stocking outdoor ponds or open waters (Wolnicki *et al.* 2006; Celada, Aguilera, García, Carral, Sáez-Royuela, González & González 2009; García, Celada, Carral, Sáez-Royuela, González & González 2010). For these reasons, special attention is being paid to find effective techniques for rearing juvenile tench

under controlled conditions, focusing mainly on feeding as an essential factor.

There is currently not enough knowledge on the nutrition of tench, forcing to use dry foods formulated for other species. However, feeding juvenile tench on commercial dry diets as the sole feed has been shown to reduce their growth exceptionally (Quirós & Alvares 1998; Wolnicki & Myszkowski 1998; Quirós, Nicodemus, Alonso, Bartolomé, Écija & Alvares 2003; Mareš, Jirásek, Baránek, Fiala & Copp 2007), high mortality (Quirós & Alvares 1998; Quirós *et al.* 2003; Rennert, Kohlmann & Hack 2003; Celada *et al.* 2009) and increase the incidence of body deformities (Rennert *et al.* 2003; Kamler *et al.* 2006; Wolnicki *et al.* 2006; Myszkowski, Kamler & Kwiatkowski 2010), probably a response to unsuitable feed. From the practical point of view, research should be conducted to solve these pressing problems by studying specifically prepared feeds for juvenile tench.

Regarding this aim, it should be taken in mind the current availability and price of different feed-stuffs, and that the cost of a dry diet generally increases with its protein content. Finfish and crustacean aquaculture is highly dependent on marine capture fisheries to supply fishmeal (FM), the most important protein ingredient used for aquafeeds (Tacon & Metian 2008). This fact has led to a double concern; on the one hand, the non-sustainability of the fisheries pressure on wild stocks to cover the increasing demand of FM (Hannesson 2003; Naylor, Hardy, Bureau, Chiu, Elliott, Farrell, Forster, Gatlin, Goldburg, Hua & Nichols 2009). On the other hand, the rising prices derived from the growing demand of FM make it not feasible the current inclusion levels (Tacon & Metian 2008; FAO (Food & Agricultural Organization of the United Nations) 2009). Thus, the aquafeed industry had to search for alternative protein sources to reduce their dependence in FM (Naylor *et al.* 2009; Hardy 2010). Despite the possibility of including terrestrial animal by-products in fish diets, there is much public concern in many countries due to BSE and prion risks associated to such ingredients arising within the animal and consumer food chain, so legislation severely restricts the use of these sources of protein. Consequently, the use of plant proteins to replace FM has become more acceptable in recent years. Considering the different possibilities, soybeans are a logical protein source for aquaculture diets (Brown, Kaushik & Peres 2008), mainly due to their high protein

content, global availability and relatively low price compared with FM.

In juvenile tench, crude protein content of dry diets used so far (formulated for other species) ranged from 35% to 64%, and effects of dietary protein have been no tested. As an initial approach, the aim of this study was the formulation and elaboration of a basal practical diet feasible to be used for studies with juvenile tench, and to test different protein contents and substitution possibilities of FM protein by soybean meal (SBM) protein.

Materials and methods

Fish, facilities and experimental procedure

Mature breeders coming from a tench farm were transferred to the laboratory, where the experimental fish were obtained by means of controlled reproduction performed according to Rodríguez, Celada, Sáez-Royuela, Carral, Aguilera and Melendre (2004). From day five after hatching (when first-feeding starts), the larvae were maintained in outdoor fibreglass tanks (2500 L) and fed decapsulated *Artemia* cysts according to Celada, García, Carral, Sáez-Royuela, González and González (2013) for 2 weeks. Thereafter, fish were fed a combination of a dry diet (carp starter) and decapsulated *Artemia* cysts. After 5 months of rearing, 2520 juvenile tench with a mean initial weight of 0.300 ± 0.003 g and total length of 30.54 ± 0.12 mm (mean \pm standard error, $n = 120$) were transferred to indoor facilities and stocked in 30 fibreglass tanks ($0.50 \times 0.25 \times 0.25$ m) containing 25 L of water. Juveniles were randomly distributed in all tanks to obtain the replicates corresponding to the different feeding treatments. Fish were anesthetized with MS-222 (Ortoquímica S.L., Barcelona, Spain). Bulk weighing for each tank was carried out (to the nearest 0.01 g) and the number of animals was counted. The stocking density was 1 g L^{-1} and the mean number of animals in each tank was 84 ± 0.6 (mean \pm standard error).

Each tank had its own water inlet (inflow 0.35 L min^{-1}) and outlet (provided with $200 \mu\text{m}$ mesh filter) and light aeration. Artesian well water was supplied in open system (flow-throughout). Quality parameters of the incoming water were pH 7.9, hardness $18 \text{ }^\circ\text{f}$ (French degrees, calcium 72 mg L^{-1}), total dissolved solids 197.5 mg L^{-1} and total suspended solids 38.4 mg L^{-1} . Throughout the trial, the dissolved oxygen content was

measured in the tanks with a Hach HQ30d Portable Meter (Hach Lange, Düsseldorf, Germany) and values ranged between 5.7 and 7.7 mg L⁻¹. Ammonia and nitrites were measured with a Hach DR 2800 Portable Spectrophotometer (Hach Lange GMBH, Düsseldorf, Germany) from water samples taken inside the tanks (values were always ammonia <0.02 mg L⁻¹ and nitrites <0.05 mg L⁻¹). The water quality parameters were measured once a week. Water temperature (measured twice a day) was 23 ± 1°C and photoperiod was maintained at intervals of 16 h light:8 h dark. Dead animals were immediately removed from the tanks. Every other day, the tanks were cleaned of faeces and uneaten food. The experiment lasted 90 days.

Diets and feeding

A basal practical diet was formulated and elaborated according to the current knowledge on carnivorous fish nutrition and juvenile tench feeding. Following the recommendation of García *et al.* (2010), a small amount of decapsulated *Artemia* cysts was included as ingredient. Dietary lipids were adjusted at relatively low levels, as Wolnicki *et al.* (2006) suggested.

Triplicate groups of juvenile tench were fed one of nine practical diets (nearly isoenergetic) to obtain an initial information on the effects of different dietary protein contents and substitution possibilities of fish meal (FM) protein by defatted soybean meal (SBM) protein. The FM and SBM used had 67.7% and 46% crude protein, respectively. A factorial design included nine feeding treatments: protein contents of 50%, 40% or 30% and three levels of replacement of FM protein by SBM protein at 0%, 25% or 45% for each protein content (diets designated as 50P-OS, 50P-25S, 50P-45S, 40P-OS, 40P-25S, 40P-45S, 30P-OS, 30P-25S or 30P-45S). The different protein levels were obtained by reducing the amount of FM and increasing the amount of cornmeal. Ingredients were finely ground with a Brabender Rotary Mill (Brabender® GmbH & Co. KG, Duisburg, Germany), mixed with a mixer Stephan UMC5 (Stephan Food Service Equipment; Hameln, Germany), extruded using a stand-alone extruder Brabender KE19/25D (Brabender® GmbH & Co. KG, Duisburg, Germany) at a temperature range between 75 and 90°C and dried for 24 h at 30°C. Later, pellets received a coating of cod liver oil.

Diameter of pellets was adjusted to the fingerling size: 1 mm for the first 60 days and 1.5 mm from day 61 to 90. As reference, another triplicate group was fed a commercial carp starter (Aller Futura, Aller Aqua A/S, Christiansfeld, Denmark, proximate composition: moisture 71.4 g kg⁻¹, crude protein 638 g kg⁻¹, crude fat 121.2 g kg⁻¹, nitrogen-free extract 44.9 g kg⁻¹, ashes 124.5 g kg⁻¹, gross energy 20.9 MJ kg⁻¹, pellet diameter 0.9–1.6 mm).

A ration level of 3.5% live body weight per day was adjusted based on a weekly estimation of biomass from each tank and the biomass monthly calculated from the samples. The ration was manually supplied four times a day at regular intervals during light hours, 7 days a week for 90 days.

Analysis of diets

Formulation, proximate composition and amino acid profiles of the practical diets are summarized in Table 1. Samples were stored at -30°C until analysis. All analyses were carried out in duplicate.

Proximate composition of practical diets and commercial carp starter were analysed according to the Norms of the International Standards Organization: moisture to ISO R-1442 (ISO Norms 1979), protein to ISO R-937 (ISO Norms 1978), lipid to ISO R-1443 (ISO Norms 1973), ash to ISO R-936 (ISO Norms 1998a) and gross energy to ISO 9831 (ISO Norms 1998b). The content of carbohydrates was calculated by subtracting the content of moisture, protein, lipid and ash from the wet weight.

Amino acids compositions in the diets were analysed by HPLC using AccQTag method from Waters (Milford, MA, USA). Amino acids were derivatized with 6-aminoquinolyl-N-hydrosysuccinimidyl carbamate reagent (AQC) by the method of Cohen and Michaud (1993) and Cohen and De Antonis (1994), and were detected by Dual λ Absorbance Detector Waters 2487 from Waters (Milford, MA, USA) at 254 nm. Quantification was carried out with EMPOWER PRO 2.0 software from Waters (Milford, MA, USA).

Data collection and statistical analysis

Every 30 days, a sample of 20 fish per tank (60 per treatment, 24% of the initial number) was

Table 1 Formulation, proximate composition and amino acid profiles of the practical diets

Ingredients (g kg ⁻¹)	Diets								
	50P-0S	50P-25S	50P-45S	40P-0S	40P-25S	40P-45S	30P-0S	30P-25S	30P-45S
Fish meal*	671.0	489.0	341.7	521.2	376.0	258.5	370.8	263.0	175.5
Soybean meal*	0.00	271.0	489.1	0.00	216.0	390.0	0.00	160.0	290.0
Commeal†	163.6	74.6	3.8	313.4	242.6	186.1	463.8	411.6	369.1
Dried <i>Artemia</i> cysts‡	80	80	80	80	80	80	80	80	80
Carboxymethyl cellulose§	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Cod liver oil¶	20	20	20	20	20	20	20	20	20
L-ascorbyl-2-monophosphate-Na**	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Dicalcium phosphate**	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Soy lecithin††	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Vit & Min premix*	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Inositol**	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Choline chloride**	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Niacin**	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Proximate composition (g kg ⁻¹)									
Moisture	74.6	76.0	81.6	76.4	86.3	94.7	79.9	83.2	93.2
Crude protein	503.5	501.8	503.3	409.0	407.4	404.1	308.6	309.2	300.6
Crude lipid	97.7	90.9	75.5	95.4	89.0	78.1	95.0	85.7	73.1
Nitrogen-free extract	177.7	194.7	215.6	299.8	305.7	319.0	416.3	429.7	447.6
Ash	146.5	136.7	124.0	119.4	111.6	104.0	100.2	92.2	85.5
Gross energy (MJ kg ⁻¹)	19.8	20.0	19.9	20.0	20.0	19.9	19.6	19.6	19.4
EAA (% dry matter ⁻¹)									
Arginine	6.43	5.47	4.70	4.59	3.84	3.24	2.72	2.15	1.69
Histidine	1.23	1.03	0.87	1.03	0.88	0.75	0.83	0.71	0.62
Isoleucine	1.67	1.62	1.58	1.27	1.24	1.20	0.87	0.83	0.82
Leucine	3.65	3.60	3.57	2.95	2.93	2.92	2.24	2.21	2.21
Lysine	4.24	4.20	4.19	3.56	3.56	3.56	2.86	2.85	2.86
Methionine	1.40	1.17	0.99	1.10	0.92	0.77	0.79	0.65	0.55
Phenylalanine	1.59	1.60	1.61	1.28	1.30	1.31	0.97	0.97	0.99
Threonine	2.42	2.18	1.99	1.86	1.66	1.52	1.27	1.12	1.01
Tryptophan	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02
Valine	2.67	2.73	2.79	2.19	2.25	2.31	1.71	1.75	1.79
NEAA (% dry matter ⁻¹)									
Alanine	3.34	3.23	3.15	2.76	2.68	2.63	2.15	2.09	2.05
Aspartic	4.29	5.36	6.25	3.49	4.37	5.09	2.65	3.29	3.85
Cysteine	0.12	0.14	0.16	0.1	0.12	0.13	0.09	0.1	0.11
Glutamic	6.71	7.88	8.86	5.42	6.4	7.21	4.1	4.8	5.41
Glycine	1.71	1.61	1.55	1.31	1.25	1.19	0.91	0.85	0.82
Proline	1.73	1.8	1.86	1.35	1.41	1.47	0.96	1	1.05
Serine	2.56	2.59	2.6	1.98	2	2.03	1.38	1.4	1.41
Tyrosine	1.07	1.05	1.03	0.85	0.83	0.83	0.62	0.6	0.6
EAA/NEAA	1.18	1.00	0.88	1.15	0.98	0.86	1.11	0.94	0.82

*Biomar Iberia/Proaqua Nutrición, S.A., ES-34210 Dueñas, Palencia, Spain.

†Adpan Europa, S.L., ES-33186 El Berrón, Siero, Asturias, Spain.

‡Inve Aquaculture Nutrition, High HUFA 430µ, Hoogveld 91, Dendermonde, Belgium.

§Helm Iberica, S.A., ES-28108 Alcobendas, Madrid, Spain.

¶Acofarma Distribución, S.A., ES-08223 Terrassa, Barcelona, Spain.

**Nutral, S.A., ES-28720 Colmenar Viejo, Madrid, Spain.

††Biover N.V., Monnikenwerve 109, B-8000 Brugge, Belgium.

taken. After being anesthetized, excess water was removed with tissue paper and fish were weighed and measured individually. Total length (TL) was measured with a digital calliper (to the nearest 0.01 mm) and individual wet weight (W) was

determined by precision balance (to the nearest 0.001 g). At the end of the experiment (day 90), surviving fish were anesthetized, counted, and number of animals with visible deformities was recorded. Survival rates were calculated, and

individual weight and length of a sample of 50 fish per tank (150 per treatment, 59% of the initial number) were determined. Specific growth rate (SGR) was expressed as $SGR = 100 (\ln W_t - \ln W_0)/t$ where W_t is the mean final weight, W_0 is the mean initial weight, and t is the duration of the experiment (days). Fulton's coefficient (K) was used to determine the fish condition with $K = 100 (W_t/TL^3)$. According to Fornshell and Hinshaw (2009), feed conversion ratio (FCR) was calculated as $FCR = D_t/(W_t - W_0)$, where D_t is the total amount of diet provided (g) and $W_t - W_0$ is the weight gain (g) over 90 days.

All experimental groups were run in triplicate (three tanks per treatment). Results were examined by analysis of variance (two-way ANOVA) using the computer program SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Newman-Keuls test was applied to compare means at the $P < 0.05$ level of significance. Percentages were arcsine-transformed prior to statistical analysis.

Results

Juvenile tench readily accepted all practical diets, as well as the commercial carp starter. Final values (90 days) of survival, growth, feed conversion and percentages of fish with visible deformities are presented in Table 2. Survival rates did not differ significantly among feeding treatments, ranging from 98.2% to 99.4%.

The 50P-0S diet supported the highest growth (52.16 mm TL, 1.76 g W and 1.95% day⁻¹ SGR) without differences from the 50P-25S or 40P-25S diets ($P > 0.05$; Table 2). The 25% substitution of FM protein by SBM protein did not affect growth at the level of 50% dietary protein ($P > 0.05$), and improved all growth values at the levels of 40% and 30% dietary protein ($P < 0.05$). The 45% substitution negatively affected growth at the three dietary protein contents tested. Fish fed 50% dietary protein (50P-0S or 50P-25S) had higher length ($P < 0.05$) and similar weight and SGR ($P > 0.05$) than the fish fed the carp starter (63.8% protein).

Figures 1 and 2 show the mean length and weight, respectively, for the three protein contents of the practical diets in the checks throughout 90 days. After 30 and 60 days, 50% dietary protein enabled higher growth ($P < 0.05$). At the end of the experiment (90 days), length and

Table 2 Survival, growth performances and percentages of deformed tench juveniles fed practical diets and the commercial carp starter for 90 days

	Practical diets										Carp starter	PSE	P-value
	50P-0S	50P-25S	50P-45S	40P-0S	40P-25S	40P-45S	30P-0S	30P-25S	30P-45S	30P-45S			
Survival (%)	99.4	99.3	99.0	98.4	99.4	99.1	99.4	99.0	97.2	98.2	0.3	0.837	
Total length (mm)	52.16 ^a	52.23 ^a	51.59 ^a	48.46 ^b	51.49 ^a	47.09 ^c	45.87 ^d	49.66 ^e	47.14 ^c	50.32 ^f	0.09	<0.001	
Weight (g)	1.758 ^{ab}	1.727 ^{ab}	1.606 ^c	1.388 ^d	1.702 ^a	1.285 ^e	1.165 ^f	1.471 ^g	1.219 ^f	1.797 ^b	0.009	<0.001	
SGR (% day ⁻¹)	1.95 ^a	1.93 ^a	1.85 ^b	1.66 ^c	1.91 ^a	1.59 ^d	1.49 ^e	1.75 ^f	1.53 ^e	1.97 ^a	0.01	<0.001	
K	1.23 ^{ab}	1.20 ^a	1.16 ^c	1.20 ^a	1.24 ^b	1.21 ^a	1.20 ^a	1.20 ^a	1.15 ^c	1.40 ^d	0.003	<0.001	
FCR	1.22 ^{ab}	1.23 ^{ab}	1.28 ^b	1.42 ^c	1.24 ^{ab}	1.49 ^d	1.58 ^e	1.37 ^c	1.51 ^d	1.18 ^a	0.01	<0.001	
Deformed fish (%)	0.34 ^a	0.31 ^a	0.00 ^a	3.21 ^a	1.93 ^a	2.22 ^a	0.32 ^a	0.64 ^a	0.31 ^a	87.6 ^b	4.83	<0.001	

Values with different superscripts in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$). Growth data derived from 50 fish sampled per replicate ($n = 150$).

PSE, pooled standard error.

SGR, specific growth rate (% day⁻¹) = $100 \times (\ln \text{final body weight} - \ln \text{initial body weight})/\text{days}$.

K, condition factor = $100 \times (\text{body weight}/\text{body length}^3)$.

FCR, feed conversion ratio = $\text{feed fed}/(\text{final body weight} - \text{initial body weight})$.

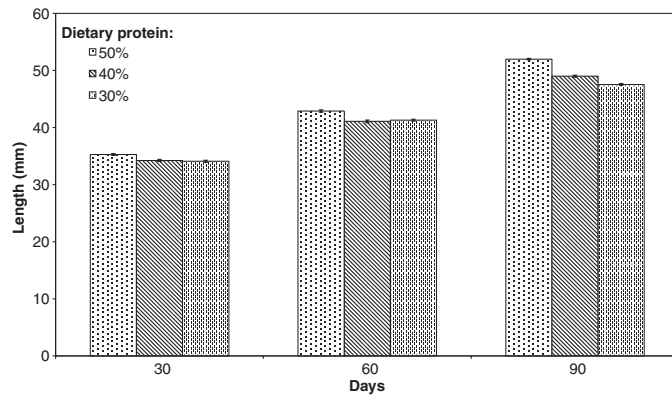


Figure 1 Mean length at various periods of juvenile tench fed practical diets with different dietary protein for 90 days. At day 30 and 60, data derived from 20 fish sampled per replicate ($n = 180$). At the end of the experiment (day 90), data derived from 50 fish sampled per replicate ($n = 450$). Error bars represent the standard error of the mean.

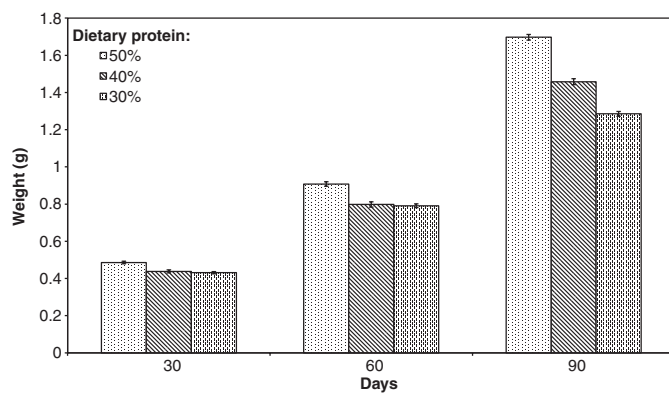


Figure 2 Mean weight at various periods of juvenile tench fed practical diets with different dietary protein for 90 days. At day 30 and 60, data derived from 20 fish sampled per replicate ($n = 180$). At the end of the experiment (day 90), data derived from 50 fish sampled per replicate ($n = 450$). Error bars represent the standard error of the mean.

weight were reduced the lower the dietary protein from 50% to 30% ($P < 0.05$).

Figures 3 and 4 show the mean length and weight, respectively, for the three substitution levels of FM protein by SBM protein in the checks throughout 90 days. The 25% substitution improved growth compared with 0% or 45% substitution, and differences in length and weight ($P < 0.05$) were found from day 60 onwards.

Juvenile tench that received practical diets had condition coefficients ranging from 1.15 to 1.24. Those fed carp starter had the highest condition coefficient (1.40).

FCRs for the practical diets ranged from 1.22 to 1.58 (Table 2). The 50P-0S, 50P-25S and 40P-25S diets enabled the lowest FCR values (average: 1.23) without differences ($P > 0.05$) among them neither the carp starter. Considering only the dietary protein, FCR increased ($P < 0.05$) the lower the protein content from 50% (average: 1.25) to 30% (average: 1.49). Considering only the protein source, the 25% substitution of FM protein by

SBM protein improved FCR for 40% and 30% dietary protein ($P < 0.05$).

After the 90 days of experiment (Table 2), the percentages of fish with visible deformities were low for all practical diets, ranging from 0% to 3.2% without differences ($P > 0.05$). In contrast, 87.6% deformed fish were recorded in the group fed carp starter ($P < 0.05$). Body deformities affected to the caudal peduncle (break in the tail axis).

Discussion

To consider the studies carried out so far for the intensification of juvenile tench rearing, it should be taken into account that results could have been influenced by the age of the juveniles used (between 1 and 11 months at the beginning of the trials), following a general rule in aquaculture: difficulties are bigger with younger animals. Thus, the main problems occur early, when natural food availability can be critical (Celada *et al.* 2009).

Figure 3 Mean length at various periods of juvenile tench fed practical diets with different levels of replacement of FM protein by SBM protein. At day 30 and 60, data derived from 20 fish sampled per replicate ($n = 180$). At the end of the experiment (day 90), data derived from 50 fish sampled per replicate ($n = 450$). Error bars represent the standard error of the mean.

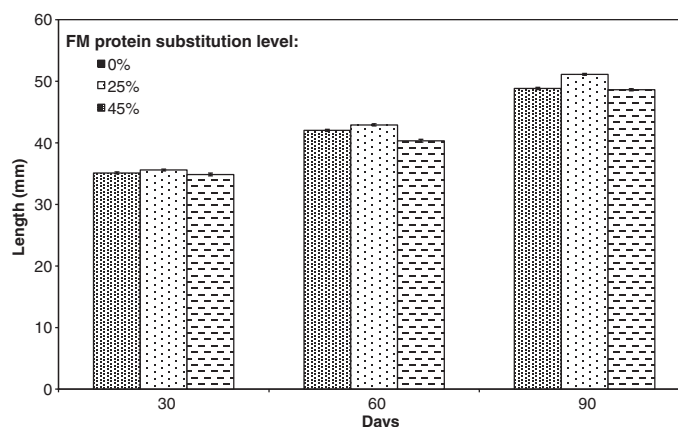
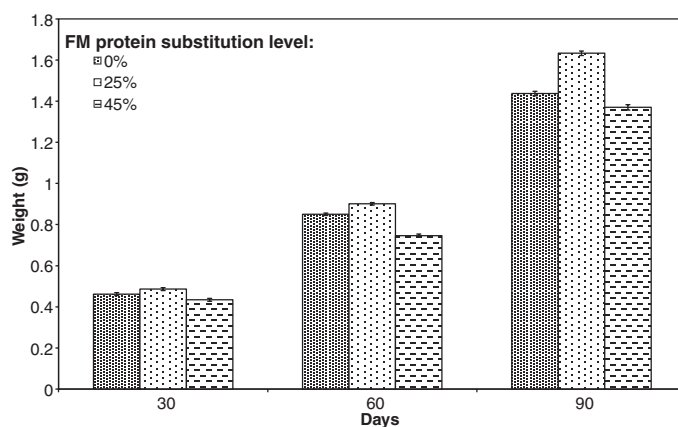


Figure 4 Mean weight at various periods of juvenile tench fed practical diets with different levels of replacement of FM protein by SBM protein. At day 30 and 60, data derived from 20 fish sampled per replicate ($n = 180$). At the end of the experiment (day 90), data derived from 50 fish sampled per replicate ($n = 450$). Error bars represent the standard error of the mean.



Most of the experiments have started with juveniles aged 3–7 months (Quirós & Alvaríño 1998; Quirós *et al.* 2003; Wolnicki, Myszowski & Kamiński 2003; Celada, Aguilera, Carral, Sáez-Royuela, Melendre & Pérez 2007; Mareš *et al.* 2007; Celada *et al.* 2009; García *et al.* 2010) and growth rates (SGR, % day⁻¹) from 0.70 to 1.98 have been reported, being higher when dry diets for other species were supplemented with natural feed. In this study, 5-month-old juveniles were fed extruded dry diets as the sole feed and SGR for the practical diets ranged from 1.49 to 1.95. This may support the feasibility of the basal practical diet, which could be proposed as a starting point for nutritional studies on juvenile tench. Further use of this basal diet will lead to a progressive improvement of the current formulation and elaboration process by including future findings on tench nutrition. In fact, this study provides the possibility of replacing 25% of FM protein by SBM

protein without harmful effects on the performance of juvenile tench.

Growth was affected by the different protein levels of the practical diets, and SGR significantly decreased the lower the dietary protein from 50% (average: 1.91) to 30% (average: 1.59). It is noticeable that there were no significant differences in growth among practical diets with 50% protein (50P-0S or 50P-25S) and the carp starter used as reference with 63.8% protein. This could suggest that dietary protein higher than 50% could be unnecessary for rearing juvenile tench from the age of 5 months onwards.

Regarding substitution possibilities of FM by SBM, carnivorous fish appear to have different tolerance for dietary defatted soybean meal. For instance, up to 40% of FM protein can be replaced by SBM protein in cobia, *Rachycentron canadum* L. diets without compromising fish growth and feed efficiency (Chou, Her, Su, Hwang, Wu & Chen

2004). However, results of Kaushik, Cravedi, Lalles, Sumpter, Fauconneau and Laroche (1995) indicate that a replacement of 25% may reduce growth and feed efficiency in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and Shimeno, Kumon, Ando and Ukawa (1993) reported a reduced growth and feed efficiency in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* (Temminck & Schlegel), when FM protein replacement by SBM protein was greater than 20%. Results of this study demonstrate that at least 25% of FM protein can be replaced by SBM protein in the development of dry diets for juvenile tench. It is interesting to note that this substitution level did not affect growth at 50% dietary protein and significantly improved growth at 40% (40P25S diet) and 30% (30P25S diet) dietary protein. Although in these diets the content of the most of essential amino acids was lower than in the diets without substitution (40POS and 30POS), others such as lysine and tryptophan did not vary and valine slightly increased. As there are no references on dietary amino acid composition for this species could be hypothesized that these diets could have been better balanced for juvenile tench. In contrast, 45% substitution of FM protein by SBM protein negatively affected growth in all protein levels tested. It is known that there are nutrient limitations for the use of SBM in aquaculture diets. All concentrations of essential amino acids (EAA) in SBM are lower than in FM, especially lysine, methionine and threonine, which tend to be limiting for the use of SBM in aquatic animals (Brown *et al.* 2008). In our study, the dietary contents of arginine, histidine, methionine and threonine were reduced when the substitution level was increased (Table 1). With 45% substitution in the 40% protein dietary level (40P45S diet), the contents of arginine, histidine and threonine were 3.24, 0.75 and 1.52% dry matter⁻¹, respectively, and the growth was significantly reduced. However, these amounts were higher than the requirements determined for other freshwater fish such as rainbow trout or channel catfish (National Research Council 2011). Within the EAA, only methionine (0.77% dry matter⁻¹) was below of the requirements of the above-mentioned species. Besides the lower EAA content, it should be taken into account that soybeans contain anti-nutritional factors (ANF), which disrupt various process of nutrient absorption. Although processing of soybeans to SBM and extrusion of fish feeds decrease concentrations of ANF (Brown *et al.* 2008), these

compounds can limit the amount of SBM in aquafeeds. Despite the nutrient limitations, results of this study show that SBM should be considered in the development of specific diets for juvenile tench, and further research should test adequate substitution levels of FM protein by SBM protein between 25% and 45%.

There is scarce information on FCR of juvenile tench, and all previous data have been calculated considering the total amount of diet supplied to the fish. In the intensive rearing of 3-month-old juveniles (around 0.45 g at the beginning of the experiment) fed a commercial trout feed (50% crude protein) for some 450 days, Rennert *et al.* (2003) reported FCR values ranging from 1.75 to 3.56. Mareš *et al.* (2007) tested three dry diets (35–42% crude protein) with 7-month-old juveniles (0.8–1.2 g) during 63 days, and FCR ranged from 1.84 to 4.15. In the present 90-day experiment with 5-month-old juveniles (0.3 g), FCRs for the practical diets (30–50% crude protein) ranged from 1.22 to 1.58. These values are more favourable than those previously reported and are within the range of the levels of the intensive culture of well-studied species, with FCR values typically ranging from 0.8 to 1.5 (Hardy & Barrows 2002).

Whereas only few deformed fish are found in the wild, malformations are an undesirable but inherent problem in intensive aquaculture, which entail severe losses to the production sector. Skeletal deformities cause malformed fish, which can suffer lower growth and higher mortality than normal animals, and have a low value in the market (Cahu, Zambonino-Infante & Takeuchi 2003). Moreover, fish deformities have the more detrimental effects on the consumers' image of aquaculture (Zambonino-Infante, Koumoundouros & Tandler 2009). For these reasons, many companies put a lot of effort into sorting and rejecting deformed juveniles. Inadequate feeding, especially during early development, has been reported to induce malformations in fish (Fontagné 2009). In juvenile tench, Wolnicki *et al.* (2006) recorded body deformities occurring in 78–96% of fish, and suggested a relationship among the use of commercial dry diets and juvenile tench with elevated condition coefficient (1.3–1.4) and body deformities (Kamler *et al.* 2006; Wolnicki *et al.* 2006; Myszkowski *et al.* 2010). Farmers have also observed this relationship when they attempted grow-out in concrete tanks, where scarce natural food is available, using dry diets for other species.

In our study, the externally visible deformities could have an osseous origin, probably due to a shortening of the body caused by compression or fusion of vertebrae, as Baeverfjord, Lein and Fontagné (2009) described in rainbow trout. This would explain the above-mentioned relationship because a high condition coefficient means a growth in length proportionally lesser than growth in weight.

It has been reported that fast growing juvenile tench fed dry diets were more endangered with body deformities (Rennert *et al.* 2003; Myszkowski *et al.* 2010), probably due to imbalanced feed composition for tench. Thus, daily doses of dry diet below satiation, not exceeding 2.5% fish biomass, have been recommended for juvenile tench under intensive conditions (Kamler *et al.* 2006). However, higher ration levels did not result in high incidence of malformations when a commercial diet for trout was supplemented with live *Artemia* nauplii (Celada *et al.* 2009) or decapsulated *Artemia* cysts (García *et al.* 2010), suggesting that these supplements combined with a dry diet non-specific for tench can prevent the appearance of body deformities. In this experiment, natural feed supplementing the practical extruded diets was not used. Juvenile tench that received carp starter had the highest condition coefficient (1.4) and 87.6% of them showed deformities. In contrast, very low percentages of deformed fish were recorded by feeding on the practical diets (average 1%). This enormous difference shows that the basal practical diet was better balanced for juvenile tench than the carp starter, and that it is possible use it without providing natural supplements to guarantee acceptable results with juvenile tench under controlled conditions.

To summarize, the basal practical diet prepared for this experiment enabled good performance of juvenile tench and did not cause body deformities, showing their feasibility to be used in further studies. As an initial approach, levels of 40–50% dietary protein with 25% replacement of FM protein by SBM protein can be recommended for juvenile tench aged 5–8 months.

Acknowledgments

This study was funded by the Plan Nacional de I+D+i, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, Research Project AGL2010-16554. We thank the financing of a grant for University of León (Spain).

We thank the companies Biomar Iberia/Proaqua Nutrición S.A. and Nutral S.A. for supplying the fish meal and the vitamin and mineral premix used in this research, respectively.

References

- Baeverfjord G., Lein I. & Fontagné S. (2009) Recommendations on prevention of malformations in rainbow trout. In: *Control of Malformations in Fish Aquaculture: Science and Practice* (ed. by G. Baeverfjord, S. Helland, & C. Hough), pp. 129–132. RapidPress, Luxembourg.
- Brown P.B., Kaushik S.J. & Peres H. (2008) Protein feed-stuffs originating from soybeans. In: *Alternative Protein Sources in Aquaculture Diets* (ed. by C. Lim, C.D. Webster, & C. Lee), pp. 205–223. The Haworth Press, New York, USA.
- Cahu C., Zambonino-Infante J. & Takeuchi T. (2003) Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* **227**, 245–258.
- Celada J.D., Aguilera A., Carral J.M., Sáez-Royuela M., Melendre P.M. & Pérez J.R. (2007) Effects of stocking density on survival and growth of juvenile tench (*Tinca tinca* L.). *Aquaculture International* **15**, 461–465.
- Celada J.D., Aguilera A., García V., Carral J.M., Sáez-Royuela M., González R. & González A. (2009) Rearing juvenile tench (*Tinca tinca* L.) under controlled conditions using *Artemia* nauplii as supplement to a dry diet. *Aquaculture International* **17**, 565–570.
- Celada J.D., García V., Carral J.M., Sáez-Royuela M., González R. & González Á. (2013) Decapsulated *Artemia* cysts of different quality (high or low hatch-rate) as direct food for tench (*Tinca tinca* L.) larvae. *Aquaculture Research* **44**, 167–175.
- Chou R.L., Her B.Y., Su M.S., Hwang G., Wu Y.H. & Chen H.Y. (2004) Substituting fish meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* **229**, 325–333.
- Cohen S.A. & De Antonis K.M. (1994) Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. Analysis of feed grains, intravenous solutions and glycoproteins. *Journal of Chromatography A* **661**, 25–34.
- Cohen S.A. & Michaud D.P. (1993) Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* **211**, 279–287.
- FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations) (2009) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2008 (SOFIA)*. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome, Italy.
- Fontagné S. (2009) The impact of nutritional components on rainbow trout. In: *Control of Malformations in*

- Fish Aquaculture: Science and Practice* (ed. by G. Baeverfjord, S. Helland, & C. Hough), pp. 73–83. RapidPress, Luxembourg.
- Fornshell G. & Hinshaw J.M. (2009) Better management practices for flow-through aquaculture systems. In: *Environmental Best Management Practices for Aquaculture* (ed. by C.S. Tucker & J.A. Hargreaves), pp. 331–388. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Freyhof J. & Kottelat M. (2008) *Tinca tinca*. In: *IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2011.2. www.iucnredlist.org.
- García V., Celada J.D., Carral J.M., Sáez-Royuela M., González R. & González Á. (2010) Decapsulated *Artemia* cysts: A suitable dietary supplement for juvenile tench (*Tinca tinca* L.). *Journal of Applied Ichthyology* **22**, 57–65.
- Hannesson R. (2003) Aquaculture and fisheries. *Marine Policy* **27**, 169–178.
- Hardy R.W. (2010) Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research* **41**, 770–776.
- Hardy B.W. & Barrows F.T. (2002) Diet formulation and manufacture. In: *Fish Nutrition* (ed. by J.E. Halver, & R.W. Hardy), pp. 505–600. Academic Press, San Diego, USA.
- ISO Norms (1973) *Determination of Lipids Content (R-1443)*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO Norms (1978) *Determination of Nitrogen Content (R-937)*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO Norms (1979) *Determination of Moisture Content (R-1442)*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO Norms (1998a) *Determination of Ash Content (R-936)*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO Norms (1998b) *Determination of Gross Caloric Value: Bomb Calorimeter Method (ISO 9831)*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Kamler E., Myszkowski L., Kamiński R., Korwin-Kossakowski M. & Wolnicki J. (2006) Does overfeeding affect tench *Tinca tinca* (L.) juveniles? *Aquaculture International* **14**, 99–111.
- Kaushik S.J., Cravedi J.P., Lalles J.P., Sumpter J., Fauconneau B. & Laroche M. (1995) Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **133**, 257–274.
- Kennedy M. & Fitzmaurice P. (1970) The biology of the tench *Tinca tinca* (L.) in Irish waters. *Proceedings of the Royal Irish Academy* **69B**, 31–82.
- Mareš J., Jirásek J., Baránek V., Fiala J. & Copp R. (2007) Production effect of various feeds on two size classes of juvenile tench (*Tinca tinca*) under the conditions of intensive rearing. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis* **55**, 111–116.
- Myszkowski L., Kamler E. & Kwiatkowski S. (2010) Weak compensatory growth makes short-term starvation an unsuitable technique to mitigate body deformities of *Tinca tinca* juveniles in intensive culture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **20**, 381–388.
- National Research Council (2011) *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. National Academies Press, Washington, USA.
- Naylor R.L., Hardy R.W., Bureau D.P., Chiu A., Elliott M., Farrell A.P., Forster I., Gatlin D.M., Goldburg R.J., Hua K. & Nichols P.D. (2009) Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 15103–15110.
- Pyka J. (1996) Feeding of the tench, *Tinca tinca* (L.), larvae and fry under pond rearing conditions. *Archives of Polish Fisheries* **4**, 69–84.
- Pyka J. (1997) Daily feeding cycle tench, *Tinca tinca* (L.), in larval and fry stages in the conditions of pond culture. An attempt to determine daily food ration. *Archives of Polish Fisheries* **5**, 279–290.
- Quirós M. & Alvarino J.M.R. (1998) Growth of tench (*Tinca tinca* L.) fed with and without the addition of the cladoceran *Daphnia*. *Polish Archives of Hydrobiology* **45**, 447–451.
- Quirós M., Nicodemus N., Alonso M., Bartolomé M., Écija J.L. & Alvarino J.M.R. (2003) Survival and changes in growth of juvenile tench (*Tinca tinca* L.) fed on defined diets commonly used to culture non-cyprinid species. *Journal of Applied Ichthyology* **19**, 149–151.
- Rennert B., Kohlmann K. & Hack H. (2003) A performance test with five different strains of tench (*Tinca tinca* L.) under controlled warm water conditions. *Journal of Applied Ichthyology* **19**, 161–164.
- Rodríguez R., Celada J.D., Sáez-Royuela M., Carral J.M., Aguilera A. & Melendre P.M. (2004) Artificial reproduction in 1-year-old tench (*Tinca tinca* L.). *Journal of Applied Ichthyology* **20**, 542–544.
- Shimeno S., Kumon M., Ando H. & Ukawa M. (1993) The growth performance and body composition of young yellowtail fed with diets containing defatted soybean meals for a long period. *Nippon Suisan Gakkaishi* **59**, 821–825.
- Steffens W. (1995) The tench (*Tinca tinca* L.), a neglected pond fish species. *Polish Archives of Hydrobiology* **42**, 161–180.
- Tacon A.G.J. & Metian M. (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* **285**, 146–158.
- Wang J., Min W., Guan M., Gong L., Ren J., Huang Z., Zheng H., Zhang J., Liu H. & Han Y. (2006) Tench

- farming in China: present status and future prospects. *Aquaculture International* **14**, 205–208.
- Wolnicki J. & Myszowski L. (1998) Evaluation of four commercial dry diets for intensive production of tench *Tinca tinca* (L.) juveniles under controlled conditions. *Polish Archives of Hydrobiology* **45**, 453–458.
- Wolnicki J., Myszowski L. & Kamiński R. (2003) Effect of supplementation of a dry feed with natural food on growth, condition and size distribution of juvenile tench *Tinca tinca* (L.). *Journal of Applied Ichthyology* **19**, 157–160.
- Wolnicki J., Myszowski L., Korwin-Kosakowski M., Kamiński R. & Stanny L.A. (2006) Effects of different diets on juvenile tench *Tinca tinca* (L.) reared under controlled conditions. *Aquaculture International* **14**, 89–98.
- Zambonino-Infante J.L., Koumoundouros G. & Tandler A. (2009) The influence on nutrition at the larval stages in marine fish. In: *Control of Malformations in Fish Aquaculture: Science and Practice* (ed. by G. Baeverfjord, S. Helland, & C. Hough), pp. 85–92. RapidPress, Luxembourg.