

**Metodología del cultivo de rotífero (*Brachionus spp.*) en un criadero de rodaballo y ensayo de eficiencia de un biocida sobre cultivos experimentales de rotífero**

**Metodoloxía do cultivo de rotífero (*Brachionus spp.*) nun criadeiro de rodaballo e ensaio de eficiencia dun biocida sobre cultivos experimentais de rotífero**

**Methodology of rotifer culture (*Brachionus spp.*) in a turbot hatchery and efficiency assay of a biocide in experimental rotifer cultures**



**Stolt Sea Farm** 

Rafael García Hernández

Trabajo de Fin de Máster

Fecha de Defensa: 15 de Febrero de 2019

# ÍNDICE

1. Introducción .....	1
1.1. Stolt Sea Farm .....	1
1.2. Granja de Quilmas.....	1
1.3. El cultivo de rodaballo .....	2
1.4. El cultivo de alimento vivo .....	3
1.4.1. Rotífero .....	4
1.4.2. El cultivo de rotífero en la acuicultura .....	5
2. Tareas realizadas durante el período de prácticas .....	7
2.1. Alimento vivo.....	7
2.2. Pre-nursery .....	13
2.3. Producción de algas.....	15
3. Ensayo de eficiencia de un biocida sobre el cultivo de rotíferos .....	17
3.1. Introducción .....	17
3.2. Objetivos .....	18
3.3. Material y métodos.....	19
3.4. Discusión y resultados.....	21
3.4.1. Carga bacteriana.....	21
3.4.2. Movilidad, mortalidad y enriquecimiento .....	24
3.5. Conclusiones .....	27
4. Bibliografía .....	27

## **Resumen**

En este trabajo se resume la metodología y los procedimientos del cultivo de rotífero (*Brachionus spp.*) llevados a cabo durante el período de prácticas en el criadero de rodaballo de la granja de Quilmas (Carnota).

Durante esta estancia, se realizó el ensayo de eficiencia de un biocida comercial sobre cultivos de rotífero experimentales. El objetivo era comprobar si el tratamiento nuevo, mejoraba la calidad microbiológica con respecto al actual y comprobar si afectaba al rendimiento de los cultivos de producción intensiva.

Como resultado, obtuvimos que el nuevo tratamiento no afectaba apenas al rendimiento ni al estado del rotífero. También mostraba una mayor efectividad disminuyendo la carga bacteriana que el control durante los primeros pases del experimento. No obstante, tras esto se invierte la tendencia y el biocida sufre una bajada drástica de su efectividad.

## **Abstract**

In this work, it's summarized the methodology and procedures of rotifer culture (*Brachionus spp.*) carried out during the internship period in the turbot hatchery of Quilmas farm (Carnota).

During this internship, an efficiency assay of a commercial biocide on experimental rotifer cultures was carried out. The objective was to test if the new treatment improved the microbiological quality with respect to the current one and to check if it affected the yield of the intensive production cultures.

As a result, we obtained that the new treatment barely affected the yield or the state of the rotifer. It also showed greater effectiveness by decreasing the bacterial load than the control during the first passes of the experiment. However, after this the trend is reversed and the biocide suffers a drastic drop in its effectiveness.

**Palabras clave:** Cultivo de rotífero, alimento vivo, rodaballo, Stolt Sea Farm, criadero, biocida, bronopol.

**Keywords:** Rotifer culture, live feeds, turbot, Stolt Sea Farm, hatchery, biocide, bronopol.

# 1. Introducción

## 1.1. Stolt Sea Farm

Stolt Sea Farm es una de las compañías acuícolas de alta tecnología más avanzadas del mundo. Fundada en 1972, se especializa en la producción de rodaballo, lenguado, esturión y caviar de alta calidad (Stolt-Nielsen.com, 2019). En la actualidad es el mayor productor mundial de rodaballo, siendo Prodemar la marca principal del mismo y de lenguado de la multinacional.

Las granjas tienen una capacidad de producción anual de 5.400 toneladas de rodaballo, 850 toneladas de lenguado, 500 toneladas de esturión y 10 toneladas de caviar (Stolt-Nielsen.com, 2019).



Figura 1: Granja de Quilmas (Fuente: <http://maps.google.com>)

En Galicia, el grupo noruego tiene siete granjas de rodaballo y lenguado, repartidas entre Merexo (Muxía), Lira (Carnota), Couso y Palmeira (Riveira), Quilmas (Figura 1), Cabo Vilán (Camariñas) y Cervo (Lugo).

En 2017, la filial española, con sede social en Lira, presentó un beneficio neto de 5,4 millones de euros, muy por encima del alcanzado un año antes, cuando había firmado unas ganancias netas de 3,9 millones (ED Galicia, 2018).

## 1.2. Granja de Quilmas

Esta granja especializada en el cultivo de rodaballo está ubicada en pueblo de Quilmas perteneciente al ayuntamiento de Carnota. Es en el criadero de la misma y en su departamento de I+D donde tiene lugar la memoria de prácticas incluida en este trabajo,

aunque cabe destacar que también posee un departamento de engorde y uno de reproductores.

El criadero de la misma está dividido en diferentes secciones: pre-nursery, cultivo larvario, producción de microalgas y alimento vivo. En esta última se cultiva el alimento de las larvas, concretamente artemia y rotífero.

### 1.3. El cultivo de rodaballo

El rodaballo (*Scophthalmus maximus*) es un pez plano de la familia *Scophthalmidae*. Es una especie marina bentónica, casi circular y asimétrica. Sus ojos están situados en el lado izquierdo del cuerpo y posee una piel sin escamas, pero provista de protuberancias óseas repartidas irregularmente. Sus aletas dorsal y anal se extienden respectivamente a lo largo de los flancos dorsal y ventral (Rodríguez & Fernández, 2005).

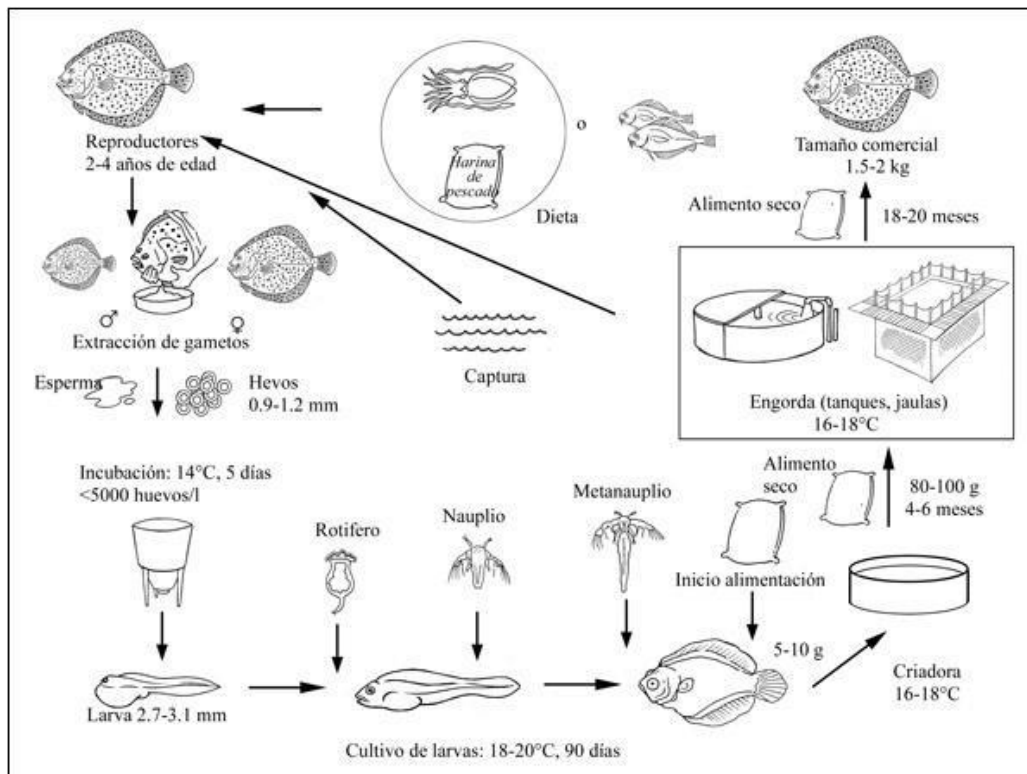


Figura 2: Ciclo de producción de *Scophthalmus maximus* (Fuente: Rodríguez & Fernández, 2005)

La sobreexplotación de la especie y las dificultades que presenta su captura, dadas sus costumbres imprevisibles y comportamiento poco gregario, hacen del rodaballo salvaje un pescado difícil de encontrar en el mercado (Prodemar.com, 2019). Por esto, en la actualidad la mayor parte del cultivo de rodaballo se desarrolla en tanques situados en tierra, donde en todo momento se tiene un férreo control de los parámetros físico-químicos y de la alimentación, siendo, la renovación continua de agua, uno de los

elementos sustanciales en el desarrollo del cultivo (Mapa.gob.es, 2019). El cultivo larvario y de alevines se realiza en los criaderos de las granjas en sistemas intensivos o semi-intensivos (Figura 2), donde se cuidan todos los aspectos de su salud y alimentación.

#### **1.4. El cultivo de alimento vivo**

El alimento vivo es usado como un componente esencial durante los estadios larvarios de la mayoría de las especies de peces de agua salada en acuicultura (Mzimba, 2014). Estadísticas globales muestran como el cultivo intensivo de determinadas especies de alimento vivo en criaderos es uno de los principales retos a los que se enfrenta la acuicultura.

En cultivo, las larvas de los peces son alimentadas con dos o tres organismos durante los primeros de 10 a 30 días de alimentación exógena. Éstos incluyen rotíferos del género *Brachionus* y nauplios de *Artemia salina* (Størrup & McEvoy, 2003).

En el caso del rodaballo, el alimento vivo juega un papel esencial debido al carácter altricial de sus larvas. Al eclosionar, se encuentran en estado poco desarrollado, son ciegas y todavía se alimentan de las reservas de su saco vitelino. Durante los dos siguientes días, ocurren una serie de cambios anatómicos y morfológicos (apertura de la boca y el ano, las mandíbulas se vuelven progresivamente funcionales, etc.) que posibilitan la ingesta de alimento (Le Ruyet, 1989).

Hay una serie de características propuestas por Størrup & McEvoy (2003) al margen de la digestibilidad, que hacen del alimento vivo algo imprescindible para el cultivo larvario:

- **Disponibilidad:** este tipo de alimento es capaz de flotar en la columna de agua y está constantemente disponible para las larvas, a diferencia de las dietas formuladas que tienden a formar agregados en la superficie o bien a precipitar al fondo del tanque.
- **Movilidad:** el alimento vivo parece estimular las respuestas alimenticias de las larvas ya que su historia evolutiva las ha adaptado para atacar a la presa en movimiento en su hábitat natural.

- **Palatabilidad:** una presa viva, con un delgado exoesqueleto y un alto contenido en agua puede resultar más sabrosa para la larva en comparación a las duras y secas dietas formuladas.
- **Enriquecimiento:** es importante que el alimento que se proporciona a las larvas sea adecuado nutricionalmente. Tanto a los rotíferos como a la artemia se les debe alimentar con emulsiones lipídicas comerciales, ricas en ácidos grasos altamente poliinsaturados de la serie n-3. El alimento vivo por tanto actúa como una microcápsula de nutrientes, con la capacidad de ser enriquecida incluso con antibióticos o bacterias probióticas (Civera et al., 2004).

#### 1.4.1. Rotífero

El filo *Rotifera* consiste en un pequeño grupo de invertebrados acuáticos de pequeño tamaño, no segmentados, pseudocelomados y con simetría bilateral (Figura 3). A pesar de que los rotíferos conforman un filo pequeño, contribuyen a un 30% de la biomasa planctónica total (Størrup & McEvoy, 2003).

Están caracterizados por la presencia de una corona apical anterior de cilios, que habilita la natación y la alimentación. El patrón de “latidos” de estos cilios crea la ilusión de que la corona gira como una rueda, lo que da nombre al grupo (Henry, 2016). No posee sistema respiratorio ni circulatorio y el fluido interno del pseudoceloma que baña los órganos internos, es el equivalente al sistema circulatorio (Størrup & McEvoy, 2003).



Figura 3: Rotífero *Brachionus plicatilis* (Fuente: Wikipedia user Sofdrakou)



Figura 4: Mástax de un rotífero (Fuente: Henry, 2016)

La comida es capturada por la corona, entra en la boca y pasa a través de un tubo bucal a la faringe. La faringe aloja el mástax (Figura 4), un órgano único de masticación que les permite romper mecánicamente las partículas de alimentos, tales como células de algas con cubierta dura (Henry, 2016), probablemente con la ayuda de enzimas producidas por las glándulas salivales (Størrup & McEvoy, 2003).

Los rotíferos son organismos dioicos que se reproducen sexual y asexualmente. Durante condiciones favorables, la población incrementa a través de partenogénesis, generando huevos diploides (amícticos) que darán lugar a hembras diploides (Størrup & McEvoy, 2003).

En condiciones poco favorables, puede ocurrir la reproducción sexual, en la que hembras míticas producen huevos haploides meióticamente. Estos huevos dan lugar a los machos de la especie, siempre haploides y de tamaño muy reducido, los cuales pueden fecundar estos huevos para generar nuevos huevos latentes que se abrirán en condiciones favorables y darán lugar a hembras genéticamente diferentes a las originales (Figura 5).

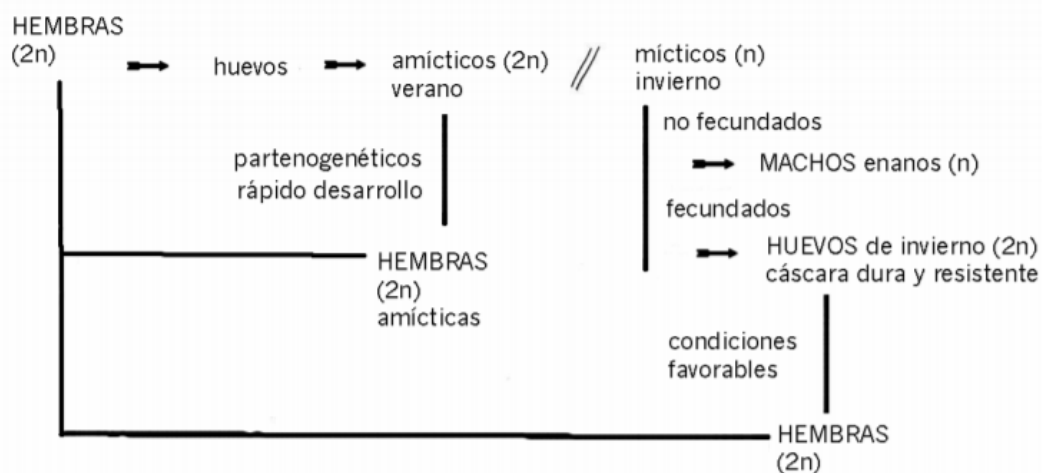


Figura 5: Ciclo reproductivo del rotífero (Fuente: Ana G. Moreno, UCM, 2013)

#### 1.4.2. El cultivo de rotífero en la acuicultura

Los rotíferos están firmemente establecidos como el alimento preferido para las larvas de muchos peces y crustáceos de la acuicultura, ya que son el único zooplancton vivo que puede ser criado de forma fiable en cantidades masivas, gracias a la aplicación de los protocolos de cultivo desarrollados por la industria acuícola en los últimos años (Henry, 2016).



Los rotíferos utilizados en la acuicultura son casi invariablemente cepas de agua salada del género *Brachionus*, más a menudo llamado *B. plicatilis* (Figura 3) (el más grande, “tipo L”) o *B. rotundiformis* (el más pequeño, “tipo S”) (Henry, 2016).

Estas cepas de *Brachionus spp.* poseen ciertos atributos que los hacen especialmente adecuados como alimento vivo en la acuicultura:

- Toleran rangos amplios de temperatura y salinidad, así, los mismos rotíferos se pueden utilizar para larvicultura de agua dulce o marina (Henry, 2016).
- Existen diferentes alternativas prácticas para su cultivo masivo: cultivo por lotes, cultivos semi-continuos y cultivos continuos (Støttrup & McEvoy, 2003).
- Su pequeño tamaño (100–300 $\mu$ ) y forma redondeada, permite a las larvas de peces y crustáceos ingerirlos cuando todavía no pueden ingerir nauplios de artemia (Torretera & Tacon, 1989).
- Su alimentación es relativamente fácil y barata ya que es posible alimentarlos con fitoplancton, levaduras y dietas artificiales.
- Un enorme número de rotíferos puede ser requerido cada día para criar larvas en criaderos comerciales (Støttrup & McEvoy, 2003). La alta tasa de reproducción bajo condiciones óptimas de cultivo, duplica la población en menos de 24 horas, permitiendo obtener altas densidades (Torretera & Tacon, 1989).
- Los rotíferos pueden ser cultivados intensivamente en densidades de hasta 3-10 millones/L y por esto, requieren volúmenes de cultivo más pequeños y ocupan menos espacio en los criaderos. Se encierran más fácilmente, lo que permite un mejor control de las condiciones de cultivo y la exclusión de contaminantes (Henry, 2016).
- Los rotíferos actúan como una “cápsula viva” que provee los nutrientes requeridos por el cultivo larvario de peces para un adecuado desarrollo (Støttrup & McEvoy, 2003). Los cultivos de rotíferos se pueden alimentar de manera efectiva con una gran variedad de alimentos, incluyendo dietas que contienen componentes de “enriquecimiento” (ácidos grasos omega-3 y omega-6, vitaminas, etc.), que son absorbidos por los rotíferos para proporcionar una nutrición óptima a los peces (Henry, 2016).

## 2. Tareas realizadas durante el período de prácticas

Las tareas se repartieron entre las diferentes secciones del criadero de Quilmas, teniendo un mayor peso la de alimento vivo frente a las otras, ya que es parte integral del ensayo de eficiencia del biocida sobre los cultivos de rotífero.

### 2.1. Alimento vivo

El primer mes de prácticas consistió en la familiarización con la metodología del cultivo de rotíferos y el desempeño de las tareas y procesos llevados a cabo en la sección de alimento vivo del criadero. Todas las técnicas y métodos serían posteriormente utilizados en el ensayo con el biocida.

- **Purga de tanques:**

El rotífero es cultivado en tanques troncocónicos de diferentes volúmenes (Figura 6). Debido a la naturaleza del organismo y a su alimentación, se genera una gran cantidad de materia orgánica que puede provocar la aparición de bacterias y ciliados en el cultivo. Es necesario, por tanto, hacer una purga de los tanques abriendo durante unos segundos la válvula inferior de los mismos, para eliminar la suciedad que ha decantado al fondo.



Figura 6: Diferentes tipos de tanque troncocónico (Fuente: <http://www.innovaqua.com>)

- **Control de parámetros:**

A la hora de cultivar rotífero, es imprescindible que este crezca sano y que tenga una tasa de crecimiento elevada para generar altas densidades que nos permitan el mantenimiento de la producción y la alimentación del cultivo larvario.

La estabilidad promueve la salud de los rotíferos y una alta productividad. Todas las fluctuaciones en las condiciones del cultivo (temperatura, pH, dosificación de alimento, tasa de cosecha, etc.) deben ser minimizadas (Henry, 2016).

La luz, la temperatura, la aireación, y el oxígeno disuelto son parámetros esenciales para el crecimiento óptimo de los cultivos y es necesario establecer un control adecuado y rutinario de los mismos.

❖ **Luz:** Los operarios deben asegurarse de que las lámparas de los tanques se mantengan encendidas y en caso de fundirse alguna, deben avisar al responsable de mantenimiento para su sustitución inmediata.

❖ **Temperatura:** Según Mzimba (2014), los cultivos de *Brachionus spp.* requieren una temperatura de entre 22 y 28 °C. Por tanto, ésta debe mantenerse dentro del tanque mediante una serie de resistencias internas o externas. La temperatura de los tanques se mide varias veces al día con un termómetro para comprobar que se mantiene dentro del rango óptimo. Es importante anotar estos parámetros en un estadillo para su seguimiento.

❖ **Aireación:** la aireación de los tanques debe ser suave para favorecer la suspensión y homogeneización del rotífero y evitar la resuspensión de la materia orgánica precipitada. Es necesario, por tanto, mantener esta aireación homogénea y suave abriendo o cerrando las válvulas de aireación del tanque.

❖ **Oxígeno disuelto:** los rotíferos del género *Brachionus* requieren concentraciones de oxígeno superiores a 4 ppm para su crecimiento (Støttrup & McEvoy, 2003) a pesar de que pueden tolerar condiciones anaeróbicas o casi anaeróbicas durante un breve periodo de tiempo (Mzimba, 2014). El oxígeno debe ser proporcionado a los cultivos para superar la falta del mismo, derivada de la alimentación con grandes cantidades de comida y el consiguiente aumento de la población (Støttrup & McEvoy, 2003).

Este es inyectado al tanque a través de un difusor y es controlado mediante un flujómetro. La comprobación se realiza mediante un oxímetro y el objetivo es mantener el oxígeno estable dentro del rango óptimo para el rotífero. Este parámetro es crucial y muy variable por lo que debe ser comprobado y anotado regularmente para evitar bajadas drásticas que pongan en peligro el cultivo y el rendimiento de los tanques.

- **Contaje y estima de densidades:**

Es necesario mantener un estricto control sobre la densidad, pues este es el mayor indicador del estado del cultivo. Por esto, diariamente se hace una estima de la cantidad de rotífero que hay dentro de los tanques. El objetivo es controlar el crecimiento del cultivo, calcular la cantidad de alimento que necesita y comprobar el estado del rotífero.

Este conteo se realiza en una cámara de contaje con ayuda de una lupa. Es necesario tomar una alícuota de los tanques en vasos de precipitados y aplicarles una aireación suave para evitar la sedimentación. Con una micropipeta tomamos un volumen conocido que se deposita dentro de las líneas de conteo de la cámara y en esta se cuenta el número de rotíferos y la cantidad de ovadas que hay en cada línea. En base a los resultados, se hace una media y en función del volumen del tanque se estima la cantidad de rotíferos que existe dentro del mismo.

El número de ovadas predice el estado del cultivo para las próximas 24 horas. Por lo tanto, el porcentaje de ovada es determinado por el número de huevos dividido entre el número total de hembras de la muestra y es indicativo del estado de nuestro cultivo (Størrup & McEvoy, 2003).

- **Preparación del alimento:**

El valor nutricional de los rotíferos depende de lo que se alimentan. En la práctica convencional, un cultivo discontinuo se puede hacer crecer a la densidad de cosecha utilizando un alimento de bajo coste y valor nutritivo (Henry, 2016) basado en algas liofilizadas, harinas y aceites de pescado. No obstante, si su destino es la alimentación de las larvas, es necesario enriquecerlo con otro tipo de alimento rico vitaminas, nutrientes y ácidos grasos poliinsaturados del grupo n-3.

Debe mantenerse un cuidadoso balance entre la densidad, número de rotíferos y la ración de comida aportada, para evitar la acumulación de un exceso de materia orgánica en los tanques de cultivo (Størrup & McEvoy, 2003).

Es necesario, por tanto, calcular la cantidad de alimento en base a los contajes realizados, prepararlo, y depositarlo en un sistema de alimentación automatizado que debe ser previamente ajustado.

- **Comprobación del estado del rotífero:**

A partir de la muestra que se toma para los contajes, se extrae una pequeña cantidad para su observación a microscopía óptica. Durante esta, se evalúa el estado del rotífero, la presencia o ausencia de ciliados, el enriquecimiento y la cantidad de materia orgánica presentes en la muestra. Toda esta información es anotada en un estadillo para su comprobación y archivado.

❖ **Estado del rotífero:** Evaluar el estado fisiológico del cultivo de rotífero es extremadamente importante en los criaderos ya que la producción larvaria depende de un suplemento predecible y confiable de rotíferos (Størrup & McEvoy, 2003).

Para esto es preciso evaluar parámetros como la movilidad, la suciedad o la presencia de incrustaciones en el organismo.

❖ **Materia orgánica:** como ya se ha mencionado con anterioridad en este trabajo, el exceso de materia orgánica puede generar severos problemas en los tanques de cultivo relacionados con la proliferación de bacterias y protozoos y con la pérdida de motilidad del rotífero. Tomando una pequeña muestra, puede estimarse visualmente la cantidad de materia orgánica presente en el tanque.

En caso de ser elevada, es preciso hacer un decantado del mismo, quitándole la aireación y el oxígeno durante un breve período de tiempo. Durante este, el rotífero se mantiene en suspensión y la materia orgánica precipita permitiendo que se haga una purga de la misma y liberando al tanque de ese exceso de materia que puede generar incrustaciones en el rotífero y fomentar aparición de bacterias y protozoos.

❖ **Presencia de ciliados:** En los cultivos de rotíferos sanos y bien manejados, los protozoos por lo general se mantienen en niveles bajos. Su proliferación es generalmente un signo de que los rotíferos están bajo estrés, o, especialmente, que la alimentación no está siendo asimilada de manera eficiente por los rotíferos (Henry, 2016). Durante el examen microscópico de la muestra se buscan ciliados como *Vorticella* o *Euplotes* (Figura 7). La aparición de estos suele ir ligada a un incremento

de la materia orgánica en el tanque y suelen generar problemas por competencia, ya que se alimentan de lo mismo que come el rotífero.



Figura 7: *Euplotes* spp. (A) y *Vorticella* spp. (B) (Fuente: <https://slideplayer.es/slide/13914984/release/woothee>)

❖ **Enriquecimiento:** A través de la pared y de los órganos del rotífero podemos apreciar la cantidad de alimento que ha ingerido y establecer si el enriquecimiento es bueno, malo o regular. Este parámetro es importante sobre todo en el rotífero enriquecido ya que es el primer alimento de las larvas de rodaballo.

- **Cosechado del rotífero:**

La cosecha consiste en pasar al rotífero del tanque a un recipiente circular de menor volumen llamado cosechador. Este posee una malla circular en su interior que permite el paso del agua, pero no del rotífero lo que habilita la limpieza y desinfección del volumen cosechado.

Este es un paso fundamental ya que el contenido extremo de lípidos de los alimentos convencionales de enriquecimiento es estresante para los rotíferos y perjudica su salud y motilidad (Henry, 2016).

Esta cosecha puede luego enviarse para su enriquecimiento, para el inicio de nuevos tanques de producción o si estuviéramos cosechando rotíferos ya enriquecidos, para la alimentación del cultivo larvario.

El rotífero concentrado en el cosechador es desinfectado exponiéndose durante un breve período de tiempo a un producto basado en bronopol, un compuesto bactericida muy agresivo que eliminará o mermará la población bacteriana y los ciliados que puedan aparecer en el cultivo. El tiempo de aclarado con agua y de desinfección son generalmente fijos, aunque pueden variar ligeramente en función del estado del cultivo.

Tras la desinfección y el aclarado de la cosecha se toma una muestra del cosechador y se estima de la densidad que hay en ese volumen para determinar si es la misma que en el tanque o ha variado debido al proceso de bajada, limpieza y desinfección.

La cosecha se realiza cada tres días normalmente, pudiendo alargarse hasta cuatro días en el calendario de bajada de los tanques.

- **Iniciación de tanques de cultivo:**

Para el inicio de los tanques hay que hacer un inóculo inicial que se bombea del cosechador. Se calcula en función del volumen y de los millones de rotíferos que hay en el mismo.

Es preciso que la calidad del agua sea óptima para el cultivo por lo que es previamente desinfectada con hipoclorito para evitar el afloramiento bacteriano y posteriormente neutralizada con tiosulfato. Antes de inocular debe comprobarse siempre, mediante reactivos comerciales, que no queda cloro en el tanque ya que es letal para el rotífero y puede causar la muerte del inóculo.

- **Limpieza de tanques y del sistema de alimentación:**

Las emulsiones de aceite del alimento son propensas a adherirse a las superficies, logrando que no estén disponibles para los rotíferos, mientras que alimentan a las bacterias y los protozoos (Henry, 2016). Por esto, cuando se baja un tanque este debe ser limpiado rigurosamente con lejía para evitar que proliferen comunidades bacterianas que pongan en riesgo la salud y la estabilidad del cultivo.

Esta limpieza debe también realizarse en las mangueras a través de las cuales se bombea el alimento y en los BACs de alimentación.

- **Ensayo con el biocida:**

Durante el segundo mes de prácticas es cuando tomó lugar el ensayo de eficiencia del biocida sobre los cultivos de rotífero. Su objetivo era observar cómo mejoraba la calidad microbiológica y ver como afectaba el uso del producto al rendimiento de los cultivos de producción intensiva.

## 2.2. Pre-nursery

Antes de entrar en la pre-nursery las larvas de rodaballo pasan por un proceso de adaptación/transición de alimento vivo al alimento inerte llamado destete (Mapa.gob.es, 2019) que se realiza en los tanques de cultivo larvario.

La crianza de los rodaballos se realiza en tanques cuadrados (Figura 9) con bombeo de agua de mar filtrada en circuito abierto. Se usan sistemas de aireación para mantener el agua saturada de oxígeno (Rodríguez & Fernández, 2005).

- **Elaboración de pesos medios:**

Esta tarea se realiza para estimar la talla media de los peces que tenemos en el tanque y así poder llevar un seguimiento de su crecimiento y darles la alimentación adecuada. Cuando tratamos con alevines (Figura 8) es esencial darles comida en función de su talla por lo que, según el peso medio del tanque se puede saber qué tamaño de pienso hay que administrar.

Para realizar el cálculo, se pescan 100 alevines y se pesan en una balanza de precisión para hacer una estima del peso medio de los peces de cada tanque.



Figura 8 (izquierda): Alevines de rodaballo (Fuente: <http://www.ipacuicultura.com>)

Figura 9 (derecha): Tanques de cultivo de alevines (Fuente: <https://seavirtual.org/instalaciones/>)

- **Eliminación de flotantes:**

A medida que el rodaballo crece tiene una tendencia natural a depositarse en el fondo del tanque. Aquellos alevines que están nadando o en la parte superficial de este no alcanzan la talla deseada y deben ser removidos del tanque y sacrificados.



- **Sacrificio de alevines:**

El sacrificio de los rodaballos que no son aptos o no alcanzan una talla determinada es una de las tareas comunes en los criaderos de las granjas y se hace respetando los estándares de bienestar animal.

Los peces son colocados en cestas y sacrificados mediante electroshock. Generalmente hay un proceso de aturdimiento previo al sacrificio del animal, pero según la UNE 173300, los peces pueden ser sacrificados directamente mediante electricidad regulando la intensidad, frecuencia y duración del shock.

- **Limpieza de los tanques:**

Debido a la alimentación con pienso de los peces y a la generación de desechos, se debe mantener la higiene de los tanques haciendo una limpieza diaria de todos ellos. Se usa una escoba para cada tanque evitando así la transferencia de enfermedades y microorganismos patógenos entre ellos. Es importante la desinfección de los FOMITES con hipoclorito diluido al terminar la limpieza.

El proceso consiste en bajar el nivel de los tanques y arrastrar los restos de alimento y materia orgánica al centro de los mismos donde son absorbidos a través de un filtro.

Tras la limpieza, se retiran los muertos de los tanques que son contados y anotados en un estadillo.

- **Transporte:**

Los alevines están en la pre-nursery hasta alcanzar determinada talla. Pasado ese tiempo son pescados y llevados a la nursery en un camión de transporte de peces vivos.

- **Limpieza y desinfección la pre-nursery:**

Tras el transporte, los tanques quedan vacíos y es preciso limpiarlos a fondo con lejía y aplicarles tratamientos desinfectantes para evitar la proliferación de microorganismos patógenos.

- **Alimentación de peces:**

Los alevines son alimentados con dietas secas peletizadas, introducidas manual y automáticamente (Rodríguez & Fernández, 2005). En función de la talla calculada en los pesos medios se le administra pienso de diferentes tamaños.

### **2.3. Producción de algas**

En el invernadero de la granja de Quilmas es donde se producen las microalgas necesarias para el inicio del cultivo larvario y el lanzamiento de nuevas cepas de rotífero. Se trabaja con dos especies, *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis suecica*, ya que tienen gran potencial para formar cultivos con abundante biomasa, tamaño celular, digestibilidad y valor nutricional (Civera et al., 2004).

En esta sección se sigue un calendario que indica el número de bolsas, matraces y botellones se deben preparar cada día.



Figura 10: Bolsas de cultivo de microalgas (Fuente: <http://www.ipacuicultura.com>)

- **Realización de los pases:**

Estos se hacen cada tres días dentro de la sala de cepas, en la que se conserva y mantiene todo el escalado. Dentro de esta sala tenemos las cepas originales, la cepa de rotífero, las algas de producción y las de post producción. Es preciso trabajar en condiciones de asepsia y de la manera más ordenada posible, para evitar contaminaciones que puedan destruir el cultivo, inhibir el crecimiento o degradar el valor nutricional de la microalga (Størrup, J. & McEvoy, L., 2003). Por este motivo es también importante autoclavar todo el material que vayamos a utilizar y esterilizar las superficies de trabajo.

Para crear un nuevo matraz se deben echar nutrientes previamente preparados en uno con agua autoclavada e inocular una determinada cantidad del matraz de tres días en el nuevo. Tras esto, se rotula con la fecha y el nombre de la cepa y se conecta a aireación en estantes con lámparas de luz. En el caso de los botellones usaremos un matraz para cada botellón.

- **Preparación de bolsas:**

Antes de realizar el inóculo se llenan las bolsas de 500 L con agua que se bombea a través de un sistema de mangueras. Una vez llenas, se les practican unas pequeñas incisiones con un punzón que nos permite acoplar los tubos de aireación a través de los cuales se va a realizar el aporte de aire y CO<sub>2</sub>. También se colocan unos pequeños tubos en la parte central para la toma de muestras, comprobación de parámetros e inyección de los productos de desinfección.

La desinfección se realiza previa al inóculo y consiste en la inyección de hipoclorito a la bolsa que después es neutralizada con tiosulfato y comprobada mediante reactivos comerciales.

- **Inoculación de bolsas:**

Las microalgas cultivadas en las bolsas son inoculadas a partir de los botellones. Para cada bolsa se usa un botellón y además se le hace un suplemento de macronutrientes o factores limitantes del crecimiento (C, N, P, Si, K ...) y micronutrientes (Fe, Mn, Cu, Zn, Na ...) esenciales para el crecimiento microalgal (Torrentera & Tacon, 1989). Este inóculo se hace por una abertura que se practica en la parte superior de la bolsa y que es sellada con cinta aislante al terminar, dándole forma a la bolsa e impidiendo que se contamine.

- **Comprobación de parámetros:**

- ❖ **Temperatura:** es importante mantener la temperatura alrededor del óptimo para el crecimiento de la microalga, en el caso de *Isochrysis galbana* son 20°C (Torrentera & Tacon, 1989). Diariamente se comprueba y anota la temperatura de las bolsas. También se hace un seguimiento de la temperatura interior y exterior del invernadero y de la sala de cepas.

❖ **Luz:** el aporte de luz en las microalgas es imprescindible para que realicen la fotosíntesis. Todas las lámparas que dan luz a las fases del escalado deben estar encendidas.

❖ **pH:** Cada día y varias veces al día se mide y anota el pH de las bolsas, que debe estar dentro de un rango óptimo de valores. Un pH elevado puede contrarrestarse mediante un mayor aporte de CO<sub>2</sub> a través de los tubos de aireación.

❖ **Aireación:** En cultivos masivos la aireación es un factor muy importante para la homogeneización de los nutrientes y para evitar la sedimentación de las microalgas. Se debe comprobar que no hay pérdidas en las bolsas y que la aireación está ajustada correctamente.

- **Recuento de microalgas:**

Para conocer la cantidad de microalgas que hay en las bolsas es necesario hacer un recuento de las mismas en una cámara Neubauer. El resultado es anotado y archivado.

### **3. Ensayo de eficiencia de un biocida sobre el cultivo de rotíferos**

Durante el segundo mes de prácticas en el criadero, realizamos el ensayo de eficiencia de un biocida sobre los cultivos de rotífero. Su objetivo era observar cómo mejoraba la calidad microbiológica de los tanques y ver como afectaba el uso del producto al rendimiento de los cultivos de producción intensiva.

#### **3.1. Introducción**

Desde hace décadas el cultivo de rotífero se ha establecido como uno de los pilares esenciales para alcanzar el éxito en la producción intensiva de peces planos en los criaderos de todo el mundo.

Por todo lo mencionado anteriormente, sabemos que es un cultivo complicado e inestable debido a la imprevisibilidad de la producción en masa de rotíferos, la dificultad para administrar y cosechar grandes densidades y sobre todo la producción de rotíferos limpios que estén libres de flóculos y que sean seguros desde un punto de vista microbiano (Mzimba, 2014).

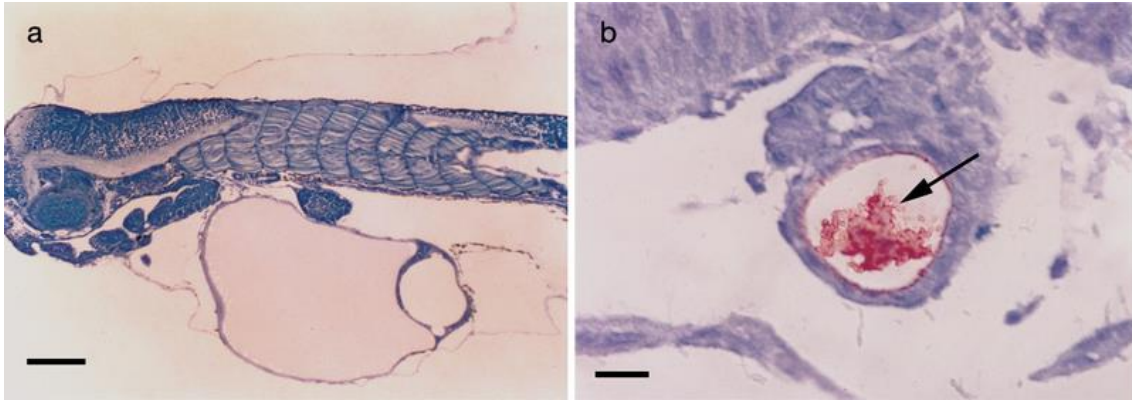


Figura 11: a) larva sana de rodaballo b) larva infectada con *V. anguillarum* (Fuente: Sandlund et al., 2010)

Este último punto ha sido una de las mayores ambiciones en los criaderos de las granjas ya que el uso de alimento vivo contribuye de manera significativa a la alta mortalidad de las larvas de peces. Las bacterias oportunistas que son patógenas para los peces pueden proliferar fácilmente en el agua salada de los cultivos de alimento vivo (Henry, 2016). En concreto, *Vibrio anguillarum* es uno de los patógenos más importantes, causando vibriosis en los cultivos larvarios, acarreando altas mortalidades e importantes pérdidas económicas (Rørbo et al., 2018).

Con esto en mente, en los criaderos se han probado una enorme cantidad de métodos y productos con el objetivo de minimizar el impacto bacteriano en cultivos larvarios y mejorar la calidad microbiológica de los rotíferos.

### 3.2. Objetivos

En este ensayo se han planteado dos objetivos:

- a) Comprobar la eficiencia del biocida para la mejora de la calidad microbiológica de los cultivos de rotífero.
- b) Determinación del impacto de este producto en el rendimiento de los cultivos de producción intensiva atendiendo a tres parámetros fundamentales: Nivel de enriquecimiento, movilidad y % de mortalidad.

### 3.3. Material y métodos

El ensayo se realizó en dos ámbitos:

#### *Instalaciones de producción*

Se habilitó una sala exclusiva para la prueba, se acondicionó para el cultivo de rotíferos y se equipó con el material y el equipo necesarios para el correcto desarrollo del ensayo. Para el cultivo, dispusimos de dos tanques troncocónicos de 800 L que servirían como los tanques prueba y control del experimento.

Para ambos tanques se siguió el mismo protocolo establecido en producción de cultivo de rotíferos explicado anteriormente, manteniendo las mismas condiciones para ambos.

En tanque control, se mantuvieron exactamente las mismas condiciones que en los tanques de producción, utilizando un tratamiento con bronopol en el cosechador durante un breve período de tiempo. Se tomaba una muestra del tanque en frascos de orina estériles para su control microbiológico antes de cosecharlo y añadir el biocida y otra muestra después del aclarado y desinfección de la cosecha (Figura 12).

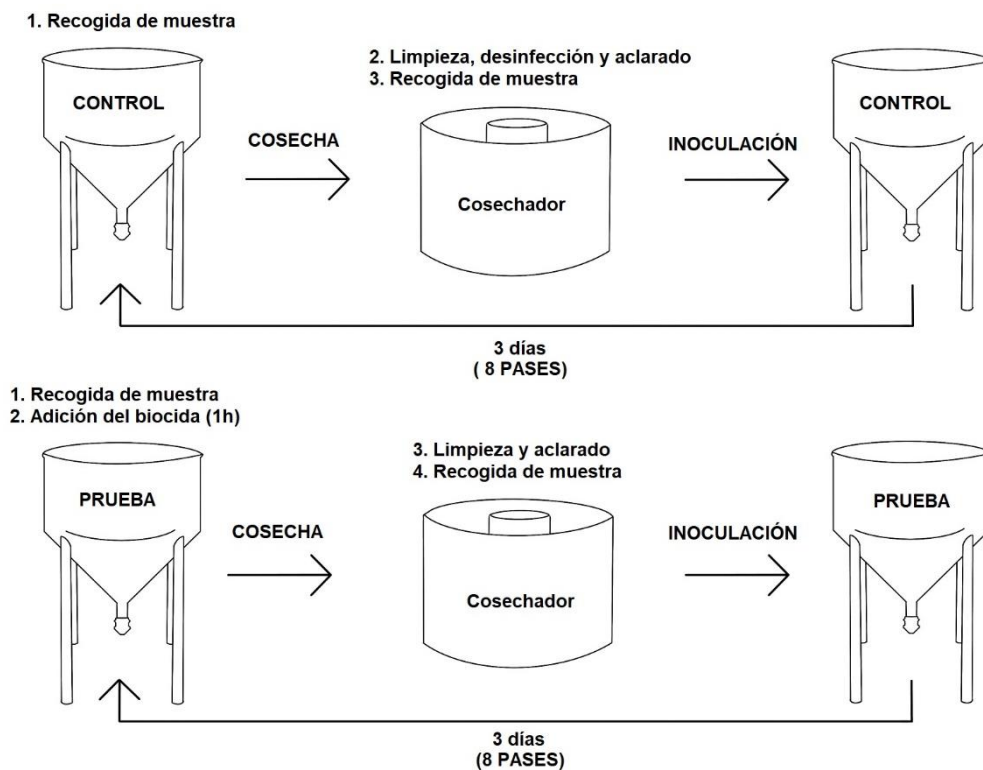


Figura 12: Esquema del proceso de cosechado y toma de muestras en los tanques control y prueba

En el tanque prueba es en el que se aplicó el nuevo tratamiento y la metodología difiere un poco de la de producción. La diferencia radica principalmente en el tiempo de

desinfección y en el recipiente. Mientras que en el control aplicábamos el biocida en el cosechador durante un breve periodo de tiempo debido a la agresividad del producto, en este se aplica directamente en el tanque y se deja actuar durante una hora. Tras esto se cosecha el cultivo y se limpia en el cosechador. Las muestras se toman en el tanque antes de añadir el biocida y después del aclarado en el cosechador (Figura 12).

Las cosechas se realizaron cada tres días con el objetivo de poder alcanzar una densidad de rotífero adecuada para inocular los tanques. En total se hicieron ocho pases y se tomaron cuatro muestras por cada uno.

Antes de realizar la cosecha y después de la limpieza en el cosechador, se realizaron los conteos para conocer la cantidad de rotíferos presentes en el cultivo. Este dato es relevante a la hora de conocer la carga bacteriana que existe por rotífero en los tanques.

Además, de las muestras tomadas para los conteos, se toma una alícuota para el examen microscópico del rotífero. Durante este comprobaremos el estado del rotífero (movilidad), el nivel de enriquecimiento y el porcentaje estimado de mortalidad.

Para el cálculo de la mortalidad se estimó un porcentaje en función de la cantidad de rotífero muerto en las muestras. La movilidad y el enriquecimiento del rotífero se calculaba visualmente y se le otorgaba un valor del 1 al 3 en función de si eran malos, regulares o buenos respectivamente.

### ***Laboratorio de I+D***

En esta sección se analizó la carga bacteriana existente en las muestras extraídas durante la cosecha. El proceso se iniciaba con una homogeneización de las muestras para la rotura del rotífero y la liberación de su carga bacteriana. Tomábamos 5 ml de cada muestra en tubos de homogenado estériles y mediante un aparato de dispersión de alta velocidad las triturábamos. De este homogenado se hacen las diluciones seriadas a partir de las cuales se sembrarán las placas.

La siembra se hizo en placas de cultivo con medio rico de uso general para el crecimiento heterótrofos totales (TSA-1%). Tras crecer durante 48 horas se realizaba un calcado de las placas cuyo contaje estuviera entre 30 y 300 ufc en un medio selectivo diferencial para especies del género *Vibrio* (TCBS).

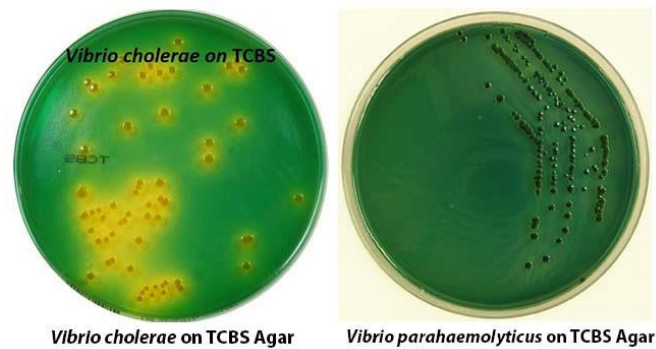


Figura 11: Colonias de *Vibrio* positivas (izquierda) y negativas (derecha)  
(Fuente: <https://microbiologyinfo.com/thiosulfate-citrate-bile-salts-sucrose-tcbs-agar-composition-principle-uses-preparation-and-colony-morphology/>)

A raíz de los contajes en las placas de TSA-1 podemos calcular el número de ufc/ml que tenemos en la muestra. Conociendo esto y la cantidad de rotíferos presentes en el volumen del tanque o el cosechador, se calcula las ufc/rotífero del cultivo.

El calcado en TCBS se realiza para saber cuántas de las colonias de la población son del género *Vibrio*. Aunque no se observe una disminución relevante de la carga bacteriana en TSA-1, si existe una disminución significativa de las colonias en TCBS sería un resultado muy positivo ya que el *Vibrio* es la bacteria que genera más mortalidad en el cultivo larvario.

### 3.4. Discusión y resultados

#### 3.4.1. Carga bacteriana

Para el cálculo del promedio de la bacteriología total de nuestros tanques contamos con un total de cuatro muestras por pase. Dos de las ellas pertenecen al tanque de control, una tomada antes del tratamiento (Control PRE) y otra después (Control POST). Las otras dos pertenecen al tanque de la prueba, tomando una pre tratamiento (Prueba PRE) y otra, post tratamiento (Prueba POST).

Mediante el cálculo del promedio de la bacteriología de heterótrofos totales (TSA-1) y vibrios (TCBS) de los tanques control y prueba, obtenemos los datos de la Tabla 1. En ésta, vemos que para ambos tratamientos hay una disminución muy similar de la carga bacteriana.



Tabla 1: Promedios de la bacteriología de heterótrofos totales en TSA-1 y vibrios en TCBS, para las muestras de los tanques control y prueba del ensayo junto con sus desviaciones estándar (SD: "Standard deviation")

Muestra	TSA-1 (ufc/individ.)	SD (TSA-1)	TCBS (ufc/individ.)	SD (TCBS)
Control PRE	5,20E+03	1327	1,47E+03	425
Control POST	1,00E+03	5696	3,62E+02	1700
Prueba PRE	4,35E+03	1321	1,75E+03	193
Prueba POST	1,15E+03	3731	2,12E+02	1645

Como cabría esperar, los calcados en TCBS dan menor cantidad de ufc/individ. que las placas de TSA-1 ya que las bacterias del género *Vibrio* son sólo una parte de la población de heterótrofos totales de la muestra.

En la Figura 12 podemos ver estos mismos los resultados para TSA-1 y TCBS expresados en forma logarítmica:

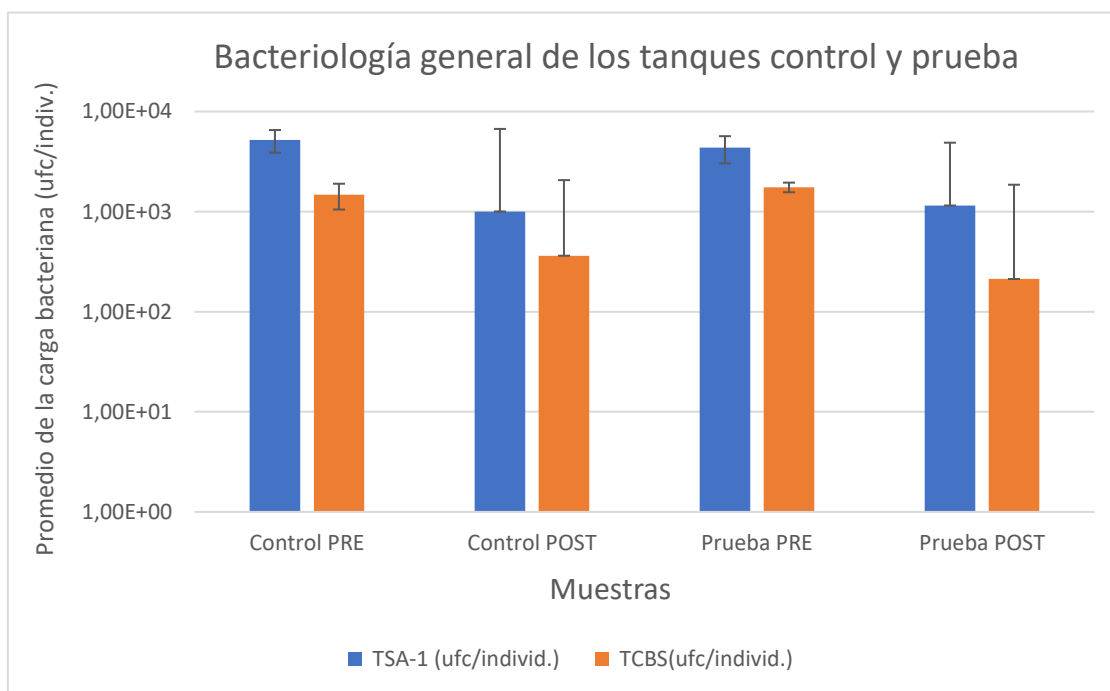


Figura 12: Gráfica del promedio de la carga bacteriana en TSA-1 y TCBS de las muestras de los tanques control y prueba del ensayo

A pesar de que a nivel general es un resultado positivo y de que apenas se observa diferencia entre ambos tratamientos, el promedio de los datos enmascara el resultado real de la prueba ya que a nosotros lo que nos interesa es ver la evolución del cultivo a lo largo de los tratamientos.

Lo que pudimos observar durante el transcurso de la prueba, tal y como se refleja en la Figura 13, es una mejoría inicial de la carga bacteriana del tratamiento prueba frente al control. Esta mejora se mantiene hasta que a partir del tercer pase se empieza a invertir la

tendencia. Además, la efectividad del nuevo biocida durante los primeros pases no solo se observó en placa, sino que los tanques de cultivo también presentaban una menor cantidad de ciliados.

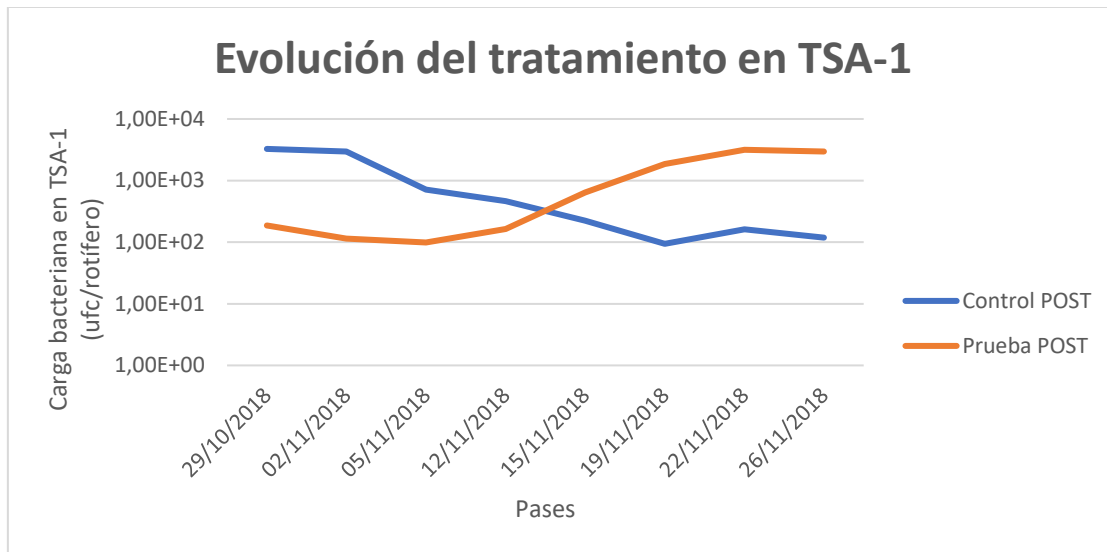


Figura 13: Gráfica de la evolución del tratamiento en TSA-1 a lo largo del experimento en los tanques control y prueba

Mientras que el tratamiento control, disminuye de forma lenta pero constante la población de heterótrofos totales del tanque, el tratamiento prueba presenta lo que parece ser un efecto bacteriostático inicial en el cultivo.

Podemos ver un resultado muy similar en los calcados de TCBS existiendo una menor carga bacteriana ya que los vibrios solo representan una parte de la población bacteriana de las muestras (Figura 14).

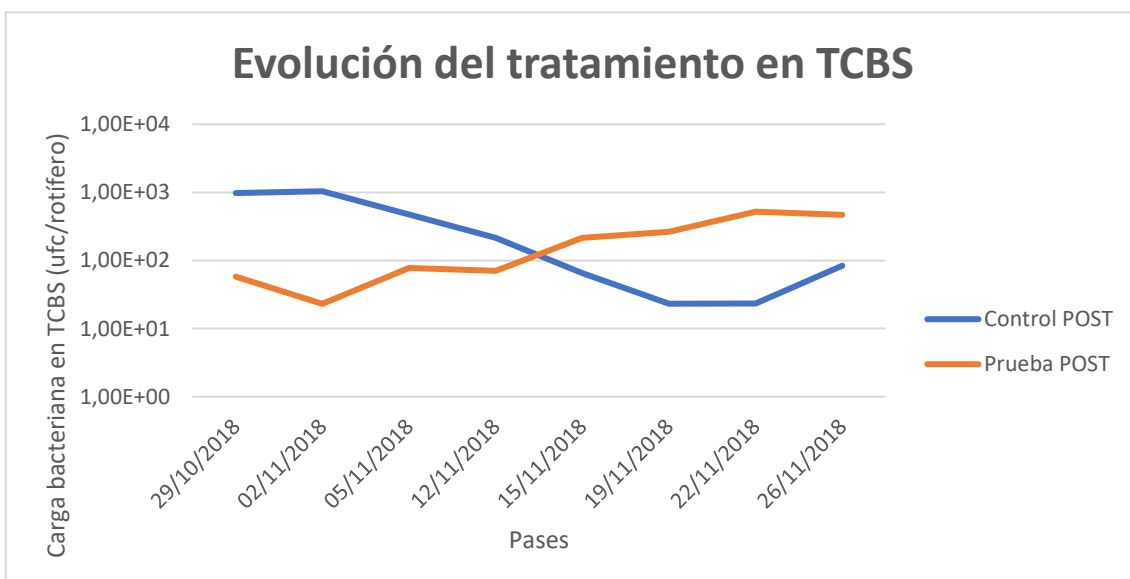


Figura 14: Gráfica de la evolución del tratamiento en TCBS a lo largo del experimento en los tanques control y prueba

A partir del cuarto pase, pudimos observar como las colonias de las placas del tanque prueba presentaban un retraso en el crecimiento y eran más pequeñas que las del tanque control. Esto sumado a la estabilidad inicial de la carga bacteriana durante la evolución del tratamiento con el nuevo biocida, hace pensar que el producto en vez de tener un efecto bactericida en el cultivo lo que genera es un aletargamiento y una inactivación de la población bacteriana.

El descenso en la efectividad del nuevo biocida puede ser debido a una generación de resistencia por parte de la población bacteriana del cultivo. Para comprobarlo habría que, en primer lugar, repetir el ensayo y prolongarlo en el tiempo aumentando el número de pases y de muestras para poder generar resultados sólidos. Por otra parte, se podría enfrentar a las bacterias obtenidas durante el primer pase (conservándolas en frío) con las del final del experimento en un ensayo de toxicidad (DL50). En este caso habría que someterlas a diferentes concentraciones del biocida para comprobar si realmente han adquirido una resistencia al producto.

### 3.4.2. Movilidad, mortalidad y enriquecimiento

Para estos tres parámetros obtuvimos resultados (Tabla 2) bastante similares entre los promedios los tanques control y prueba.

Tabla 2: Promedios de los parámetros de movilidad, mortalidad y enriquecimiento de las muestras de los tanques control y prueba del ensayo junto con sus desviaciones estándar (SD: "Standard deviation")

Muestra	Movilidad	SD	Mortalidad	SD	Nivel enriquecimiento	SD
Control PRE	3,00	0,00	2%	0%	2,00	0,53
Control POST	1,57	0,52	6%	1%	1,57	0,52
Prueba PRE	3,00	0,00	2%	0%	2,00	0,00
Prueba POST	2,14	0,46	5%	0%	1,86	0,35

Para estimar la movilidad otorgamos valores del 1 al 3 en función de la capacidad de natación del rotífero, siendo el 1 "mala o deficiente", el 2 "regular" y el 3 "buena movilidad".

En la Figura 15 podemos observar que la movilidad en ambos tanques antes del tratamiento es buena y que existe un descenso de la misma tras el tratamiento con los biocidas. El tratamiento control con bronopol es el que más afecta a este parámetro.

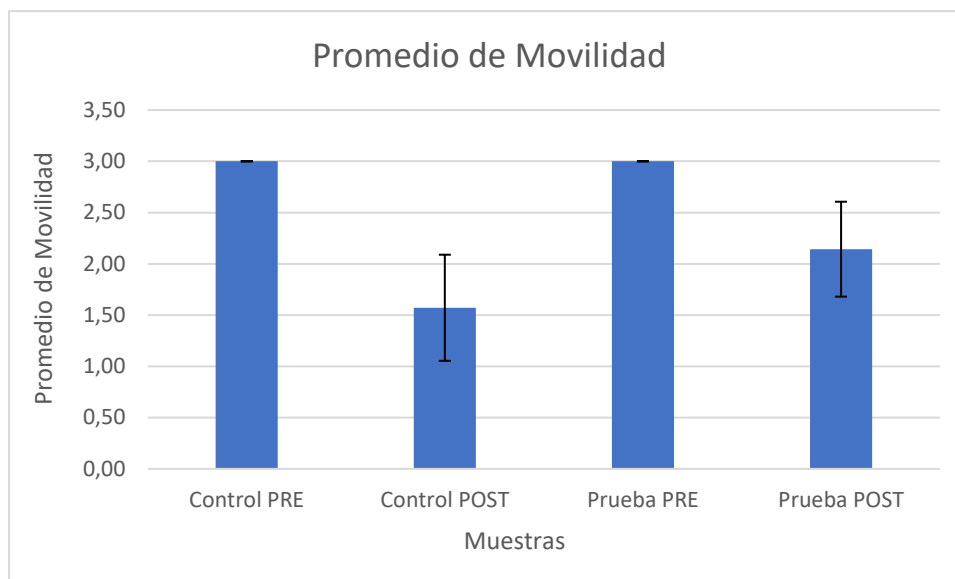


Figura 15: Gráfica del promedio de movilidad en las muestras obtenidas de los tanques control y prueba antes y después del tratamiento

Este descenso de la movilidad es común tras la bajada del rotífero al cosechador debido a la privación de oxígeno y al estrés mecánico que sufre el organismo durante su lavado, ya que es sometido a una potente aireación. Una vez en el tanque y transcurrido un breve período de tiempo tras la cosecha, el rotífero recupera el total de su movilidad.

La pequeña diferencia que podemos ver entre el tratamiento prueba y el control puede ser debido a la agresividad del tratamiento con bronopol y su uso en un volumen menor de agua. No obstante, es una diferencia mínima que no tiene una mayor relevancia pues en ambos tratamientos el rotífero se recupera sin problema.

El nivel de enriquecimiento es el parámetro que menos se ve afectado por los tratamientos. En este caso, usamos el mismo sistema numérico que en la movilidad para asignar un grado de enriquecimiento a los rotíferos.

El enriquecimiento se mantiene en un rango intermedio (Figura 16), no estando el rotífero totalmente enriquecido, pero tampoco vacío. El ligero descenso del enriquecimiento que podemos observar tras los tratamientos es seguramente causado por la presión del agua y las colisiones en el cosechador que pueden provocar la liberación de la carga intestinal del rotífero.

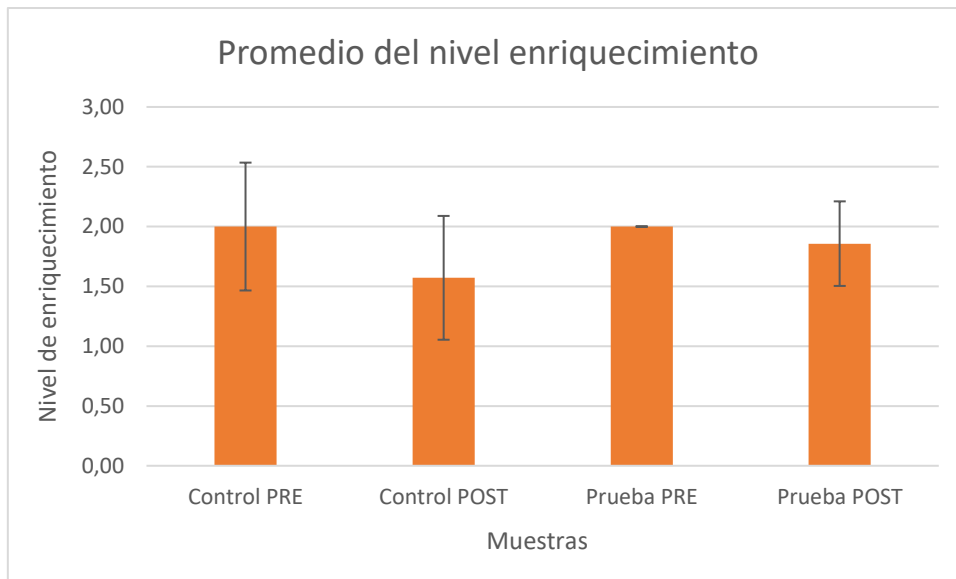


Figura 16: Gráfica del promedio del nivel de enriquecimiento en las muestras obtenidas de los tanques control y prueba antes y después del tratamiento

El porcentaje de mortalidad (Figura 17) se mantiene bajo durante todo el proceso siendo ligeramente más elevado en el tratamiento con el biocida. En este caso también vemos cómo se genera una mortalidad ligeramente más elevada en el tratamiento con bronopol que con el tratamiento prueba.

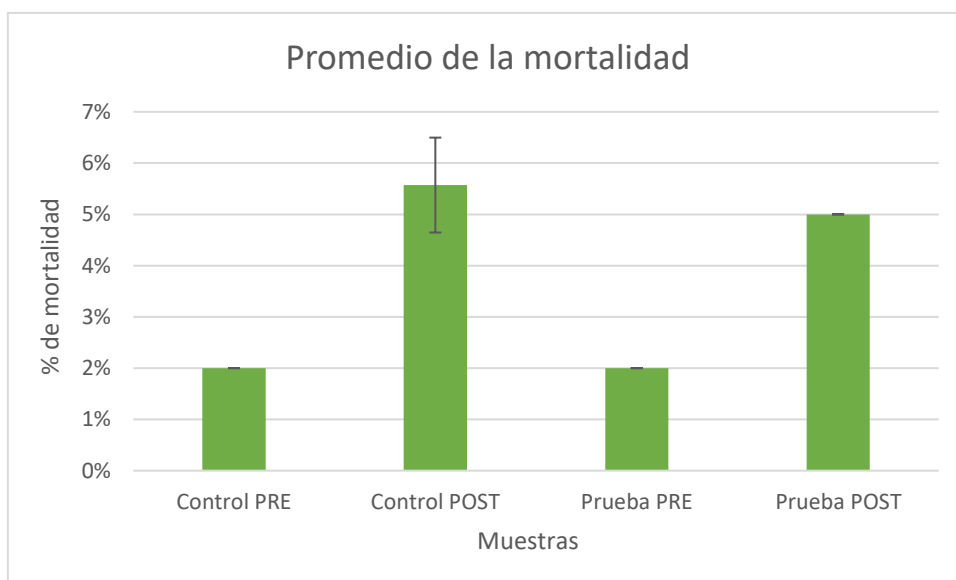


Figura 17: Gráfica del promedio de mortalidad en las muestras obtenidas de los tanques control y prueba antes y después del tratamiento

Una vez más, este ligero incremento en la mortalidad es debido, seguramente, al proceso de limpieza y desinfección del rotífero en el cosechador.

En lo que se refiere a estos tres parámetros, cabe destacar que están sujetos a multitud de variables (temperatura, nivel de oxígeno, aireación, alimentación) que dificultan la confirmación del efecto del biocida sobre el cultivo. No obstante, de los datos obtenidos durante este ensayo podemos suponer que el tratamiento prueba no afecta de forma negativa al rendimiento del rotífero en los cultivos de producción intensiva.

Sería recomendable repetir el ensayo varias veces y realizar un mayor número de pases para poder obtener más muestras que nos garanticen un resultado sólido y fiable.

### 3.5. Conclusiones

- El tratamiento con el nuevo biocida no parece afectar de forma negativa al estado ni al rendimiento del rotífero.
- El tratamiento con el nuevo biocida ha demostrado en última instancia, funcionar peor que el tratamiento control por lo que no se consideraría apto para sustituir al tratamiento actual.

## 4. Bibliografía

**Civera-Cerecedo, R., Álvarez-González, C.A. & Moyano-López, F.J.** (2004). Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. In: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. 2004. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.

**ED Galicia** (2018). Economía Digital Galicia [Acceso 25 de Enero de 2019]. Disponible en: [https://galicia.economiadigital.es/tecnologia-y-tendencias/agro-y-mar/stolt-sea-farm-gana-cinco-veces-mas-en-galicia-que-pescanova\\_583166\\_102.html](https://galicia.economiadigital.es/tecnologia-y-tendencias/agro-y-mar/stolt-sea-farm-gana-cinco-veces-mas-en-galicia-que-pescanova_583166_102.html)

**Henry, E.** (2016). *Rotíferos Fiables en acuicultura*. [Acceso 22 de Enero de 2019] Aquafeed. Disponible en: <http://www.aquafeed.co/rotiferos-fiables/>

**Le Ruyet, J.** (1989). The hatchery rearing of turbot larvae (*Scophthalmus maximus*). Cuadernos da área de Ciencias Mariñas, 3. Seminario sobre tecnoloxía do cultivo do rodaballo, O Castro, Sada (A Coruña).

**Mapa.gob.es.** (2019). Mapama. [Acceso 20 de Enero de 2019]. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/app/jacumar/especies/Documentos/Rodaballo.pdf>

**Mzimba, L.M.** (2014). The effect of disinfection on survival and feeding quality of rotifers (*Brachionus plicatilis*) and brine shrimp (*Artemia salina*). United Nations University Fisheries Training Programme, Iceland [final project]. Disponible en: <http://www.unuftp.is/static/fellows/document/lucia13prf.pdf>

**Prodemar.com** (2019). Prodemar. [Acceso 26 Enero de 2019]. Disponible en: <http://www.prodemar.com>

**Rodríguez Villanueva, J. L. & Fernández Souto, B.** (2015). Programa de información de especies acuáticas. *Psetta maxima*. Programa de información de especies acuáticas. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. [Acceso 25 de Enero de 2019].

**Rørbo, N.; Rønneseth, A.; Kalatzis, P.G.; Rasmussen, B.B.; Engell-Sørensen, K.; Kleppen, H.P.; Wergeland, H.I.; Gram, L.; Middelboe, M.** (2018). Exploring the Effect of Phage Therapy in Preventing *Vibrio anguillarum* Infections in Cod and Turbot Larvae. *Antibiotics* 2018, 7, 42.

**Sandlund, N., Rodseth, O., Knappskog, D., Fiksdal, I., Øivind, B.** (2010). Comparative susceptibility of turbot, halibut, and cod yolk-sac larvae to challenge with *Vibrio spp.* *Diseases of aquatic organisms*. 89. 29-37. 10.3354/dao02176.

**Stolt-nielsen.com** (2019). Stolt-Nielsen Limited: EN | Stolt-Nielsen [Acceso 25 de Enero de 2019]. Disponible en: <https://www.stolt-nielsen.com/en/>

**Støttrup, J. and McEvoy, L.** (2003). *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Oxford: Blackwell Science Ltd, pp.11-52.

**Torrentera, L., Tacon, A.** (1989) La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura, una diagnosis. Programa cooperativo gubernamental FAO- Italia.

**UNE 173300** (2016). Piscicultura. Guía de prácticas correctas para el sacrificio, AENOR, Noviembre de 2016.