

**Mejora de dietas para caballito
de mar (*Hippocampus
hippocampus*). Efectos en su
producción y modulación del
color**

Ángel Segade Botella

Tesis Doctoral

2016



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

Anexo I

**D/D^a.....SECRETARIO/A DEL
DEPARTAMENTO DE.....
DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,**

CERTIFICA,

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha.....tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada “.....”
presentada por el/la doctorando/a D/D^a..... y dirigida por el/la Doctor/a.....

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 6 del Reglamento para la elaboración, defensa, tribunal y evaluación de tesis doctorales de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a...de.....de dos mil.....

Anexo II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento/Instituto/Facultad: Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

Programa de doctorado: Acuicultura: Producción controlada de animales acuáticos

Título de la Tesis

"Mejora de dietas para caballito de mar (*Hippocampus hippocampus*). Efectos en su producción y modulación del color"

Tesis Doctoral presentada por Ángel Segade Botella

Dirigida por la Doctora Lucía Molina Domínguez

Codirigida por la Doctora Lidia Esther Robaina Robaina.

La Directora

La Codirectora

El Doctorando

Las Palmas de Gran Canaria, a _____ de _____ de 20__

LUCÍA MOLINA DOMÍNGUEZ, PROFESORA Y JEFA DEL DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA DEL INSTITUTO DE EDUCACIÓN SECUNDARIA PROFESOR ANTONIO CABRERA PÉREZ E INVESTIGADORA DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

INFORMA:

Que **Don Ángel Segade Botella**, Licenciado en Ciencias del Mar, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado: "**Mejora de dietas para caballito de mar (*Hippocampus hippocampus*). Efectos en su producción y modulación del color**", el cual considero que reúne las condiciones y calidad científica para optar al Grado de Doctor.

Fdo: Lucía Molina Domínguez

LIDIA ESTHER ROBAINA ROBAINA, PROFESORA TITULAR EN EL ÁREA DE CONOCIMIENTO DE ZOOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA E INVESTIGADORA DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

INFORMA:

Que **Don Ángel Segade Botella**, Licenciado en Ciencias del Mar, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado: "**Mejora de dietas para caballito de mar (*Hippocampus hippocampus*). Efectos en su producción y modulación del color**", el cual considero que reúne las condiciones y calidad científica para optar al Grado de Doctor.

FDO: LIDIA ESTHER ROBAINA ROBAINA

Mejora de dietas para caballito de mar (*Hippocampus hippocampus*). Efectos en su producción y modulación del color

Ángel Segade Botella

Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA)
Instituto Universitario de Acuicultura Sostenible
y Ecosistemas Marinos (ECOQUA)



Tesis para optar al Grado de *Doctor en Ciencias del Mar*
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 2016

Directoras:

Dra. Lucía Molina Domínguez y Dra. Lidia Esther
Robaina Robaina

INDICE

Lista de tablas

Lista de Figuras

Abreviaciones

Agradecimientos

1.- Introducción	01
1.1.- Comercio mundial de organismos acuáticos ornamentales	03
1.2.- Impacto de de las pesquerías ornamentales	05
1.3.- Comercio de Singnátidos y su impacto en el medio	08
1.4.- Taxonomía y distribución de los Singnátidos	12
1.5.- Características generales de la subfamilia <i>Hippocampinae</i>	13
1.5.1.- Estatus del caballito de mar de hocico corto (<i>Hippocampus hippocampus</i>)	15
1.5.2.- Biología del caballito de mar de hocico corto (<i>Hippocampus hippocampus</i>)	16
1.6.- La acuicultura de especies ornamentales	17
1.6.1.- Alimentación de especies ornamentales	19
1.7.- Importancia del color	21
1.7.1.- Importancia del color en especies ornamentales	23
1.8.- El cultivo del caballito de mar	28
1.8.1.- Alimentación del caballito de mar en cautividad	31
1.8.2.- El color del caballito de mar en cautividad	32
1.9.- La <i>Artemia</i> en Acuicultura	35
2.- Objetivos	41
3.- Material y métodos	45
3.1.- Instalaciones	47
3.1.1.- Estación experimental de cultivo de caballitos de mar	47
3.1.2.- Área de presas vivas	48
3.2.- Estudio de los efectos dietéticos en el rendimiento productivo de caballito de mar (<i>H. hippocampus</i>)	49
3.2.1.- Animales experimentales	49
3.2.2.- Dietas	50
3.2.3.- Diseño experimental	51
3.3.- Estudio de los efectos dietéticos en la histología del hígado y del tracto digestivo de caballitos de mar (<i>H. hippocampus</i>)	55
3.4.- Estudio de los efectos dietéticos en la expresión y evolución del color de la piel en caballitos de mar (<i>H. hippocampus</i>)	56
3.4.1.- Expresión del color	56
3.4.2.- Evolución del color	57
3.5.- Determinación de la evolución de la composición bioquímica de <i>Artemia</i> adulta tras su enriquecimiento con diferentes productos	57
3.5.1.- Enriquecedores	58
3.5.2.- Diseño experimental	59
3.6.- Determinación del efecto sobre el color del caballito de mar (<i>H. hippocampus</i>) por el enriquecimiento de <i>Artemia</i> con aceites conteniendo diferente fuente de pigmentos	60
3.6.1.- Animales experimentales	60

INDICE

3.6.2.- Dietas.....	60
3.6.3.- Creación de software específico para la determinación del color en peces mediante análisis de imagen.....	61
3.6.4.- Diseño experimental.....	62
3.7.- Análisis bioquímicos.....	64
3.7.1.- Determinación de humedad y cenizas.....	64
3.7.2.- Determinación de proteínas.....	65
3.7.3.- Determinación de lípidos.....	66
3.7.4.- Determinación de pigmentos.....	67
3.8.- Análisis estadístico.....	67

4.- Study I. Effects of the diet on seahorse (*Hippocampus hippocampus*) growth, body colour and biochemical composition

	69
4.1.- Abstract.....	71
4.2.- Resumen.....	71
4.3.- Introduction.....	72
4.4.- Materials and methods.....	74
4.4.1.- Diets and feeding.....	75
4.4.2.- Sampling and colour measurement.....	75
4.4.3.- Biochemical analysis.....	77
4.4.4.- Statistical analysis.....	77
4.5.- Results.....	77
4.6.-Discussion.....	82

5.- Study II. Effect of the diet on liver histology of short snout seahorse *Hippocampus hippocampus*

	87
5.1.- Abstract.....	89
5.2.- Resumen.....	89
5.3.- Introduction.....	90
5.4.- Materials and methods.....	93
5.4.1.- Seahorses and culture conditions.....	93
5.4.2.- Diets and feeding.....	94
5.4.3.- Sampling.....	95
5.4.4.- Biochemical analysis.....	95
5.4.5.- Histological analysis.....	95
5.4.6.- Statistical analysis.....	96
5.5.- Results.....	96
5.6.-Discussion.....	103

INDICE

6.- Study III. Incorporation patterns of fatty acids and carotenoids in adult <i>Artemia franciscana</i> fed with 5 different enriching products	109
6.1.- Abstract.....	111
6.2.- Resumen.....	111
6.3.- Introduction.....	112
6.4.- Materials and methods.....	115
6.4.1.- Sampling.....	116
6.4.2.- Biochemical analysis.....	116
6.4.3.- Respiratory oxygen consumption.....	117
6.4.4.- ETS activity and potential respiration.....	117
6.4.5.- Statistical analysis.....	118
6.5.- Results.....	119
6.6.-Discussion.....	125
7.- Study IV. Effect of <i>Artemia</i> enrichment with oils containing different source of pigments on seahorse color	127
7.1.- Abstract.....	129
7.2.- Resumen.....	130
7.3.- Introduction.....	131
7.4.- Materials and methods.....	135
7.4.1.- Seahorses and culture conditions.....	135
7.4.2.- Diets and feeding.....	135
7.4.3.- Sampling and color measurement.....	136
7.4.4.- Biochemical analysis.....	138
7.4.5.- Statistical analysis.....	139
7.5.- Results.....	139
7.6.-Discussion.....	145
8.-Conclusiones	149
9.-Bibliografía	155

Lista de tablas

Tabla 1.1. Principales países comercializadores de caballitos de mar (modificado de Vincent <i>et al.</i> , 2011).....	11
Tabla 1.2. Resumen de artículos publicados sobre peces ornamentales referidos al color.....	27
Tabla 1.3. Listado de empresas que cultivan caballitos de mar y especies producidas.....	30
Tabla 1.4. Estudios publicados sobre aspectos de biología y acuicultura de los caballitos de mar.	34
Tabla 1.5. Resumen de experimentos realizados con diferentes especies para consumo humano alimentadas con <i>Artemia</i> en distintas fases de desarrollo.....	37
Tabla 1.6. Resumen de experimentos realizados con diferentes especies ornamentales alimentadas con <i>Artemia</i> en distintas fases de desarrollo.....	37
Tabla 3.1. Dietas experimentales y sus correspondientes nomenclaturas	51
Tabla 3.2. Documento de registro del comportamiento alimentario observado durante 5 minutos en todas las tomas administradas con las siguientes claves: 0, negativo; 1, positivo.....	55
Tabla 3.3. Dietas experimentales y sus correspondientes nomenclaturas.....	59
Tabla 3.4. Dietas experimentales y sus correspondientes nomenclaturas.....	61
Table 4.1. Proximate composition (g 100g ⁻¹ wet weight) and total carotenoid (µg g ⁻¹) content of five experimental diets.....	76
Table 4.2. Fish growth response parameters at the end of the experiment.....	78
Table 4.3. Proximate composition and total carotenoid body content (g 100g ⁻¹ wet weight) of whole fish at the end of the trial.....	78
Table 4.4. Fish color parameters at the end of the experiment.....	81
Table 5.1. Biochemical composition (g kg ⁻¹ wet weight, media ± standard deviation) of experimental diets.....	94
Table 5.2. Fatty acid composition (g kg ⁻¹ of fatty acid wet weight) and their main relation in the different diets.....	97
Table 5.3. Biochemical composition (g kg ⁻¹ wet weight; media ± standard deviation) of seahorses fed on the different experimental diets.....	98
Table 5.4. Analysis of variance (ANOVA) of the main fatty acids (% of total ± SD) and their relation in the whole body composition in seahorses fed on different diets, <i>p</i> <0.05.....	99
Table 6.1. Proximate composition (% wet weight) of <i>Artemia</i> enriched with five experimental products.....	120
Table 6.2. Total carotenoid concentration (µg g ⁻¹) in <i>Artemia</i> enriched with five experimental products along 24 h enrichment.....	120

Table 7.1. Proximate composition and total carotenoid content (mg kg ⁻¹ wet weight) of the experimental diets.....	136
Table 7.2. Seahorse body mass values (g ± SD) in each sampling, <i>p</i> <0.05.....	140
Table 7.3. Proximate composition (mg kg ⁻¹ wet weight ± SD), total carotenoid body content (µg g ⁻¹ ± SD) and weight (g) of whole fish at the end of the trial.....	140
Table 7.4. Analysis of variance (ANOVA) of the main fatty acids (g kg ⁻¹ ± SD) and their relation in the whole body composition in seahorses fed different diets, <i>p</i> <0.05.....	142
Table 7.5. Colorimeter fish color parameters at the beginning and the end of the experiment.....	143

Lista de figuras

Figura 1.1. Exportaciones (arriba) e importaciones (abajo) por continente en 2007 (modificado de Monticini, 2010).	4
Figura 1.2. Técnicas de pesca destructivas: pesca con dinamita (izquierda) y pesca con cianuro (derecha). Fuente: Internet (www.tacticalfanboy.com; http://envirohonper7.wikispaces.com)	7
Figura 1.3. Caballitos secos comercializados como medicina tradicional o souvenir. Fuente: www.eckerd.edu;www.smallworldbeauty.com	9
Figura 1.4. Diferentes especies pertenecientes a la familia syngnathidae. 1, <i>Histiogamphelus</i> ; 2, <i>Selenostomus paradoxus</i> ; 3, <i>Haliichthys taeniophorus</i> ; 5, <i>Hippocampus procerus</i> ; 6, <i>Phycodurus eques</i> . Fuente: www.fishesofaustralia.net.au	12
Figura 1.5. Distribución geográfica de los caballitos de mar (modificado de Lourie <i>et al.</i> , 1999)	13
Figura 1.6. Caballitos mimetizándose con el entorno. Fuente: Internet (www.uicnmed.org; www.blueworldfotos.com)	14
Figura 1.7. Morfología del caballito de mar (<i>Hippocampus hippocampus</i>) (adaptado de Lourie <i>et al.</i> , 2004)	17
Figura 1.8. Precios de dos caballitos de la misma especie pero de distinto color. Fuente: Internet (www.tiendadecaballitos.es)	24
Figura 1.9. Imágenes del pez payaso Picasso (<i>Amphiprion percula</i>) de ORA® Farm (izquierda), el <i>fire red</i> (centro) y <i>sunburst</i> ® (derecha) mustangs (<i>Hippocampus erectus</i>) de Ocean Rider. (Fuente: www.orafarm.com y www.seahorse.com)	24
Figura 1.10. Momentos clave en la evolución del comercio y la acuicultura del caballito de mar de 1960 a 2009 (Modificado de Koldewey y Martin-Smith, 2010).	29
Figura 1.11. Dos variedades de <i>H. reidi</i> del mismo criador (Brazilero, izquierda; Sunburst, derecha) Fuente: Ocean Rider.	33
Figura 1.12. Ciclo de vida de la <i>Artemia</i> (Fuente: adaptado de learn.genetics.utah.edu).	36
Figura 1.13. Imagen en la que se observa el digestivo de una <i>Artemia</i> adulta repleto de pequeñas micelas de enriquecedor lipídico.	39
Figura 2.1. Instalación general, detalle de un acuario y del sistema de filtración.	47
Figura 3.2. SEP-Art Separator (Fuente: www.primo.net.au)	49
Figura 3.3. Caballito marcado con VIFE color verde, emitiendo fluorescencia. Fuente: Ángel Segade	50
Figura 3.4. Esquema general de las medidas tomadas. Fuente: Modificado de www.projectseahorse.com	53
Figura 3.5. Medidas tomadas en los muestreos: A , cola; B , tronco ² ; C , tronco ¹ ; D , cabeza y E , hocico	53

Figura 3.6. Medición del color mediante un colorímetro (Minolta Chroma Meter CR-200, Minolta, Osaka, Japan).....	56
Figura 3.7. Recipientes de 1l en los que se realizó el enriquecimiento de la <i>Artemia</i> con distintos productos.....	59
Figura 3.8. Funcionamiento del colorímetro Minolta CR-400 (Fuente: manual Minolta CR-400).....	63
Figura 3.9. Se muestra un ejemplo de los datos de salida del software FISCEAPP con la imagen recortada y segmentada de un pez payaso, y la distribución del color en el cuerpo del pez.....	63
Figure 4.1. Relation between weight and % of lipids in seahorse whole body.....	79
Figure 4.2. Total carotenoids in diets (black) and seahorses (grey).....	80
Figure 4.3. Variation of the mean values of a* (red) and b* (yellow) over time in seahorses fed live enriched <i>Artemia</i> (LEA). End of main experiment (A), maximum accumulation reached (B) and end of experiment (C).....	81
Figure 5.1. Relation between lipid percentage in seahorses and their weight (p<0.05).....	97
Figure 5.2. Image of a seahorse liver.....	100
Figure 5.3. Image (4x, bar = 500µm) midgut with a whole <i>Artemia</i> (left) and detail (10x, bar = 200µm), revealing the eye, thoracopods and one antenna of <i>Artemia</i> (right). (H & E staining). A, <i>Artemia</i> ; E, Eye of <i>Artemia</i> ; T, Thoracopods.....	100
Figure 5.4. Seahorse liver at the end of the experiment: a) Diet LEA (Live enriched <i>Artemia</i> . x10, bar = 200µm and x40, bar = 50µm) shows many lipidic vacuoles;b) Diet FEA (Frozen enriched <i>Artemia</i> . x10 and x40) shows hepatic cells (H) surrounding pancreas (P) and many lipidic vacuoles; c) Diet M (Frozen mysisx10 and x 40), shows a liver with all the hepatocytes with centered nuclei (Staining: H&E).....	102
Figure 6.1. Variation in the mean values of DHA content in <i>Artemia</i> enriched with five different oil mixtures.....	121
Figure 6.2. Variation in the mean values of EPA content in <i>Artemia</i> enriched with five different oil mixtures.....	121
Figure 6.3. Variation in the mean values of AA content in <i>Artemia</i> enriched with five different oil mixtures.....	122
Figure 6.4. Variation in the mean values of total carotenoid content in <i>Artemia</i> enriched with five different oil mixtures.....	122
Figure 6.5. Variation in the mean values of EPA/DHA ratio in <i>Artemia</i> enriched with five different oil mixtures.....	123
Figure 6.6. Image of <i>Artemia</i> 's gut content at two hours of enrichment (left; x10, bar = 0.3mm) and eight hours of enrichment (right; x20, bar =0.1mm).....	123
Figure 6.7. Respiration and potential respiration time-courses during the six hours experiments. All measurements are normalized by mg proteins and expressed as percentages of their initial value (7.93 µl O ₂ ·h ⁻¹ ·mg prot ⁻¹ and 30.01 µl O ₂ ·h ⁻¹ ·mg prot ⁻¹ for respiration and potential respiration, respectively).....	124

Figure 7.1. Image of the Fisceapp interface, showing the different options for working with the images.....	138
Figure 7.2. Relation between seahorses carotenoid content and the enriched <i>Artemia</i> carotenoid content.....	141
Figure 7.3. Variation in the mean values of Hue over time in seahorses fed with the three different diets: S, Selco; SK06, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of krill oil; SM03, a mixture of 0.3g/l of Selco with 0.3 g/l of mussel oil.....	143
Figure 7.4. Plot of the PCA study of Hue comparing data between day 0 and day 90.....	144
Figure 7.5. Plot of the PCA study of HUE comparing data between samplings (D, day) and diets: S, Selco; SK06, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of krill oil; SM03, a mixture of 0.3g/l of Selco with 0.3 g/l of mussel oil.....	144
Figure 7.6. Seahorses carotenoid content and seahorses Hue color relationships.....	145

Abreviaturas

EPA Eicosapentaenoic Acid

DHA Docosaexaenoic Acid

ARA Araquidonic Acid

HPLC High Performance Liquid Cromatography

RGB Red, Green and Blue

LEA Live Enriched *Artemia*

FEA Frozen Enriched *Artemia*

M Mysis

SEM Selco Enriched Mysis

CEM Cyclops Enriched Mysis

VIFE Visible Implant Fluorescent Elastomer

S Selco

SK03 Mix of 0.6g/l of Selco and 0.3g/l of Kril Oil

SK06 Mix of 0.6g/l of Selco and 0.6g/l of Kril Oil

SM03 Mix of 0.6g/l of Selco and 0.3g/l of Mussel Oil

SM06 Mix of 0.6g/l of Selco and 0.6g/l of Mussel Oil

FISCEAPP Fish Skin Color Evaluation Application

PUFA Poly Unsaturated Fatty Acid

HUFA Highly Unsaturated Fatty Acid

ETS Electron Transport Chain

Agradecimientos

A lo largo de estos últimos años han pasado muchas cosas importantes en mi vida, siendo la culminación de este trabajo una de ellas. Es por ello que me gustaría agradecer la ayuda y apoyo ofrecido a las personas que han hecho posible todo esto.

En primer lugar debo agradecer a La Universidad de Las Palmas de Gran Canaria la beca que me otorgaron sin la cual no estaría aquí en estos momentos. En general al Grupo de Investigación en Acuicultura, por acogerme en su seno como uno más y darme la posibilidad de llevar a cabo mis experimentos en sus instalaciones. Especialmente agradecer a mis directoras Lucía Molina y Lidia Robaina, el esfuerzo y apoyo mostrado en todo momento así como la ayuda prestada en algunos momentos que fueron más difíciles.

Del mismo modo hay que agradecer la ayuda y transferencia de conocimientos aportados por los compañeros y técnicos que han pasado por las instalaciones de ornamentales: Fran Otero todo un "Doctor de caballitos"; Bruno Novelli, el de los huesos de larvas de caballito; y Yaiza y Ana (técnicos de caballitos). Ellos estuvieron al pie del cañón echando una mano en las instalaciones cuando hizo falta.

Por otra parte aunque no han estado literalmente en el ajo de esta tesis, quiero dedicársela a ellos, MI FAMILIA, a la que agradezco con todo mi corazón el apoyo y la ayuda ofrecida. A mis Padres, siempre pendientes y preocupados (¿cómo va lo tuyo?) mis hermanas que me dieron ánimos y mi "Esposa" Mariana, que me apoyó y me animó cuando más lo necesitaba y me "tiró" de las orejas cuando no me esforzaba lo suficiente (¡Primero la tesis y luego lo otro!) que debía.

Finalmente aunque no sabe de qué va todo esto ya se enterará y algún día podrá leer este documento. Y verá que el empujón final fue gracias a ella que me dio ánimos para acabar y buscar un futuro para ella: GARA, mi pequeña.



1. Introducción



1.1-Comercio mundial de organismos acuáticos ornamentales

El origen de la acuariofilia es muy antiguo y va ligado al de la acuicultura. En la antigua China cultivaban carpas para consumo en los mismos bancales de cultivo de arroz. En estos cultivos aparecieron peces coloreados que se seleccionaron por su colorido para mantenerlos en estanques y jardines. Entre los años 960 y 1279 se popularizó el mantenimiento de estos peces en recipientes cerámicos. Pero no fue hasta 1750 que se introdujeron en Europa los primeros peces de colores y hasta el siglo XX que se intentase la reproducción de especies tropicales.

Actualmente, la acuariofilia es una afición cada vez más extendida por todo el mundo y que cada día crece más, observándose del mismo modo mayor demanda de nuevos y mejores productos por parte de los acuariófilos. Debido a su antigüedad, la acuariofilia de agua dulce está mucho más extendida y desarrollada que la marina, si bien en ambos casos han desarrollado un gran incremento en el comercio de organismos de acuario. Este comercio involucra a millones de personas de todo el mundo, proporcionando puestos de trabajo en diferentes sectores, y moviendo millones de dólares.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, Food and Agriculture Organisation of United Nations) el comercio internacional de peces de acuario representa sólo un 0.5% del comercio internacional de peces (FAO, 2007). A pesar del escaso volumen, este porcentaje aumenta si se hace referencia al valor, debido a que el comercio de organismos ornamentales se realiza de forma unitaria incluyendo especies para las que un sólo ejemplar de 30g podría triplicar el precio de un kilo de pescado para el consumo.



Según la FAO (2010) el porcentaje del valor de este mercado con respecto al de consumo aún está por calcular. Además, este mercado ha aumentado progresivamente pasando de 21.5 millones de dólares en 1976 a 315 millones de dólares en 2007 (Monticini, 2010), lo que representa un incremento del 1400% en 31 años. Tras más de 30 años de incremento continuado en la demanda de peces ornamentales, la crisis que comenzó en 2008 golpeó duramente al sector disminuyendo el volumen de las exportaciones y las ferias internacionales, que se vieron afectadas por la bajada participación de empresas (Monticini, 2010). Los mayores exportadores de peces ornamentales son los países situados en el sureste asiático (51% de las exportaciones mundiales), en particular Singapur con un 20% del total; Europa cuenta con un 29%, Norteamérica un 4% y Suramérica un 6 % (Fig. 1.1). De otro lado, los mayores importadores son Estados Unidos, Japón y algunos países de la Unión Europea como Alemania, Holanda e Italia (Fig. 1.1).

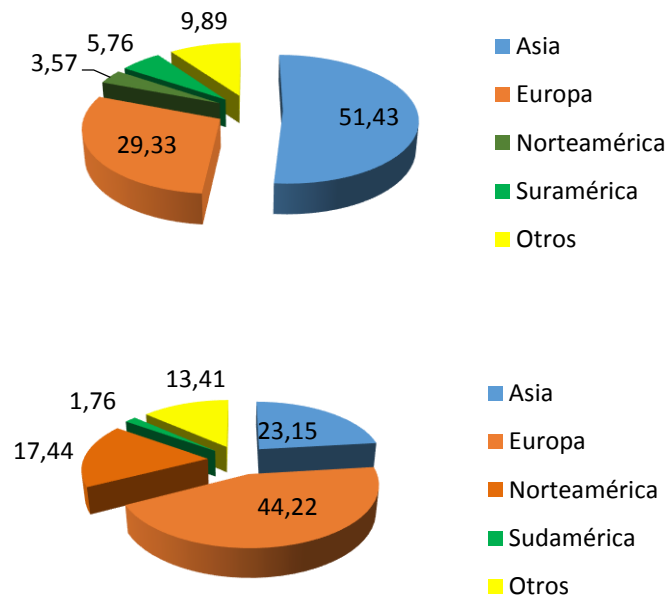


Figura 1.1 Exportaciones (arriba) e importaciones (abajo) por continente en 2007 (modificado de Monticini, 2010).



Si bien no se han encontrado datos más recientes, la mayoría de peces ornamentales marinos son capturados del medio, se estima que sólo entre un 1-10% son criados en cautividad (Wabnitz *et al.*, 2003), mientras que en el caso de los peces de agua dulce más de un 95% de las especies son criadas en cautividad.

Los datos existentes y referentes al comercio de peces ornamentales deben ser analizados cuidadosamente debido a sus diferentes orígenes, a la identificación errónea de especies o falta de información de importación/exportación. A pesar de estas limitaciones los datos existentes son la única forma de realizar estudios de las tendencias del mercado de peces ornamentales (Molina y Segade, 2011).

1.2.- Impacto de las pesquerías ornamentales

El hecho de que más del 90% de los organismos ornamentales marinos que se comercializan sean capturados del medio natural, hace plantearse el efecto que puede tener esta industria en el medio ambiente. La mayoría de los organismos comercializados provienen de arrecifes de coral y zonas adyacentes, donde habitan y se reproducen. Según Wilkinson (2004), el 20% de los arrecifes de coral del planeta han sido destruidos y no muestran signos de recuperación. Debemos tener en cuenta que los arrecifes de coral cubren únicamente un 0.25% de la superficie de los océanos, pero son conocidos como “las selvas de los mares” (Spalding *et al.*, 2001) debido a su biodiversidad, albergando más de 4000 especies de peces, unas 800 especies de coral (Paulay, 1997) y un gran número de invertebrados y esponjas.

Las amenazas a las que se enfrentan estos ecosistemas son muy diversas, como los desastres naturales, el calentamiento global, el incremento del turismo, la recogida de materiales para construcción, la sobrepesca para alimentación, de



organismos ornamentales o para joyería, souvenir o medicina tradicional china, entre otras (Liebermann y Field, 2001). Quizás de todas ellas podemos destacar la utilización de técnicas de pesca destructivas, como dinamita y productos químicos como cianuro sódico o quinaldina (Fig.1.2). Los explosivos se usan tanto para pesquerías de consumo como de ornamentales, aunque los químicos son utilizados demasiado frecuentemente para capturar especies ornamentales (Molina y Segade, 2011). Estas técnicas no solo ocasionan daños a las poblaciones de las especies objetivo, sino que también lo hacen con las demás especies y en el hábitat que les rodea, provocando la rotura y muerte de los corales. Específicamente el cianuro contribuye al proceso de blanqueamiento (“bleaching”) de los corales (Jones *et al.*, 1999) y crustáceos, provocando la destrucción grandes áreas de arrecife (Mak *et al.*, 2005).

Es difícil estimar el uso de estas técnicas debido a su naturaleza clandestina. Si bien en la mayoría de los países están prohibidas, es evidente que deben hacerse más esfuerzos en los países exportadores para promocionar políticas de control, establecer cuotas de pesca basadas en criterios científicos, y mejorar las prácticas de manejo para controlar el uso de estas técnicas que provocan daños en los habitantes de los arrecifes.



Figura 1.2. Técnicas de pesca destructivas: pesca con dinamita (izquierda) y pesca con cianuro (derecha). Fuente: Internet (www.tacticalfanboy.com; www.envirohonper7.wikispaces.com).

Por otro lado, el ecosistema puede verse afectado por la pesca extremadamente selectiva, focalizada en unas pocas especies, lo que puede dar lugar a desequilibrios. Por ejemplo, en Hawaii, uno de los lugares con más pesquerías de ornamentales, toda la captura se focaliza en el género *Centropyge*, endémico de las islas, y la especie *Zebrasoma flavescens* (Molina y Segade, 2011).

Además, en ciertos casos el objetivo es aún más específico como la pesca selectiva por sexo o edad (Wabnitz *et al.*, 2003). En muchas especies los ejemplares más jóvenes son más coloridos y más atractivos para el consumidor, como es el caso de las especies de la familia *Pomacanthidae*. En otras especies, como lábridos y góbidos, los machos suelen ser más coloridos que las hembras. Esta pesquería tan selectiva puede causar grandes desequilibrios poblacionales a nivel local, aunque no llegue a trascender a escala global.

Otro posible efecto negativo en los ecosistemas es la sobrepesca de especies limpiadoras como ciertas especies de góbidos (*Gobiosoma spp.*) y lábridos (*Labroides spp.*), que pueden afectar a las especies con la que se establecen relaciones de simbiosis. Además, estos organismos tienen un papel importante en



la salud del arrecife, eliminando parásitos y partículas de mucus o tejidos muertos en otros organismos. Por ejemplo, desde Sri Lanka se exportaban anualmente más de 20,000 lábridos limpiadores (Woods y Rajasuriya, 1999), desconociéndose realmente el impacto de su pesca en el arrecife.

Es difícil estimar globalmente los daños ocasionados por la extracción de organismos ornamentales. Algunas voces, especialmente las partes implicadas en el comercio, abogan por el escaso efecto global de estas prácticas en las poblaciones de los arrecifes, sin embargo, sus repercusiones deben ser valoradas a nivel local más que a nivel global y focalizándose en las especies objetivo. Por ejemplo, en el archipiélago Revillagigedo (México), se ha constatado que la población de *Holocanthus clarionensis* disminuyó un 95% debido a su sobreexplotación (Almenara-Roldan y Ketchum, 1994). Serían necesarios estudios concretos focalizados en las especies que se extraen en una zona determinada para evaluar el efecto de su explotación.

1.3.- Comercio de Singnátidos y su impacto en el medio

El comercio de singnátidos, especialmente de caballitos de mar en el planeta, alcanza volúmenes importantes, con Asia como el principal comercializador (Vincent *et al.*, 2011). Los países involucrados en el comercio exportan sobretodo caballitos secos a Asia para su uso en la medicina tradicional. Los individuos vivos son importados principalmente por los países europeos y los Estados Unidos de América para los acuarios. El mayor consumidor mundial de caballitos de mar es China que los utiliza como medicina tradicional y alimento tonificante (Fig 1.3), pero en el resto del mundo también son comercializados como souvenir (secos) (Fig. 1.3) o vivos para acuarios.



Figura 1.3. Caballitos secos comercializados como medicina tradicional o souvenir. Fuente: Internet (<http://www.eckerd.edu>; <http://www.smallworldbeauty.com>)

En la Tabla 1.1 se resumen los principales países comercializadores (excluyendo a China) y la forma de comercio del producto ya sea vivo o seco. Aún sabiendo que el principal consumidor de caballitos de mar es China no existen datos reales acerca del volumen total de importaciones de este país. Algunos estudios realizados advirtieron que en 2001 Japón importó desde países africanos 242 kg de caballitos secos. Por otra parte, Estados Unidos importó 622,619 caballitos de mar secos entre los años 1996-2000, principalmente provenientes de Filipinas, China y México. En Europa se importaron un total de 39,928 caballitos de mar vivos sólo en dos años, entre los años 1997-1999 (Vincent *et al.*, 2011).

Todo este comercio de caballitos de mar se centra únicamente en 15 especies, en concreto *Hippocampus abdominalis*, *H. barbouri*, *H. borboniensis*, *H. camelopardalis*, *H. comes*, *H. erectus*, *H. fuscus*, *H. histrix*, *H. ingens*, *H. kelloggi*, *H. kuda*, *H. reidi*, *H. spinosissimus*, *H. Subelongatus* y *H. Zosteræ*, de las 48 que se han descrito en este género.

La principal amenaza para las poblaciones naturales de caballitos es la sobrepesca ya sea accidental (“bycatch”) o como especie objetivo, mediante artes de pesca de arrastre principalmente para su comercialización como producto seco para el



mercado asiático. En 1995 en Asia se comercializaron 45 toneladas de caballitos secos. Sin embargo, en determinadas zonas de India, Filipinas y Vietnam (Vincent, 1995), los pescadores obtienen entre el 80 y el 100% de sus beneficios por la pesca de caballitos vivos para su exportación a los mercados europeos y estadounidenses. En los últimos años, aunque se ha aumentado el esfuerzo pesquero las capturas han seguido disminuyendo, estimándose una disminución entre un 15% y un 50% de las poblaciones naturales en las principales zonas de extracción en los últimos cinco años (Vincent *et al.*, 2011). Aun teniendo estos datos en cuenta, no se conoce el impacto global que puede tener la disminución de las poblaciones de caballitos de mar en el ecosistema, sin embargo es evidente que constituye una grave amenaza para la biodiversidad.



Tabla 1.1. Principales países comercializadores de caballitos de mar (modificado de Vincent *et al.*, 2011)

Región	País	Comercializado seco		comercializado vivo	
		Origen	Consumidor	Origen	Consumidor
África	Egipto			X	
	Gambia	X			
	Guinea	X			
	Kenia			X	
	Madagascar	X			
	Mozambique	X		X	
	Nigeria	X			
	Senegal	X			
	Seychelles	X			
	R. Sudafricana	X	X		X
	Tanzania	X	X		
Togo	X				
América del Norte	Canadá		X	x ³	X
	México	X	X	X	X
	USA	X	X	X	X
Centro América	Belize	X	x ¹	X	
	Costa Rica		x ¹	X	X
	Cuba			X	
	Guatemala	X	x ¹		
	Honduras	X	x ¹		
	Nicaragua	X	X		x ²
	Panamá		X		x ¹
América del Sur	Argentina		x ¹		X
	Bolivia		X		
	Brasil	X	x ¹		X
	Chile		X		
	Ecuador	X	X ¹	x ²	
	Perú	X	x ¹		
	Surinam	X			
	Uruguay				X
Europa	Austria				X
	Bélgica				X
	Dinamarca				X
	Francia				X
	Alemania		X		X
	Grecia		x ¹		
	Hungría				X
	Irlanda				X
	Italia		X		X
	Holanda		X		X
	Noruega				X
	Portugal		x ¹		X
	España	X	X		X
	Suecia				X
	Suiza				X
	Reino Unido		X		x ³
	Oceanía	Australia	X	X	X
Nueva Zelanda		X	X	X	X
Islas Fiji				X	
Islas Salomón				X	

¹ Comercio local principalmente. ² Tras la recogida de información la comercialización no se llevo a cabo. ³ Cría en cautividad (Modificado de Vincent *et al.*, 2011).



1.4.- Taxonomía y distribución de los Singnátidos

Los miembros de la familia *Syngnathidae* pertenecen a la clase Actinopterygii, al igual que el resto de peces óseos. El término *Syngnathidae* (Fig. 1.4) proviene del griego y significa de mandíbulas fusionadas. En la actualidad FishBase y el World Register of Marine Species (WoRMS) reconocen la existencia de dos subfamilias.

La familia Hippocampinae incluye los géneros:

-*Hippocampus*, que engloba todos los caballitos de mar

-*Histiogamphelus*, el cual solo posee dos especies similares a los peces pipa.

La familia Syngnathinae engloba un total de 56 géneros, incluyendo a dragones de mar y peces pipa. Teniendo entre todos los géneros un total de 298 especies.

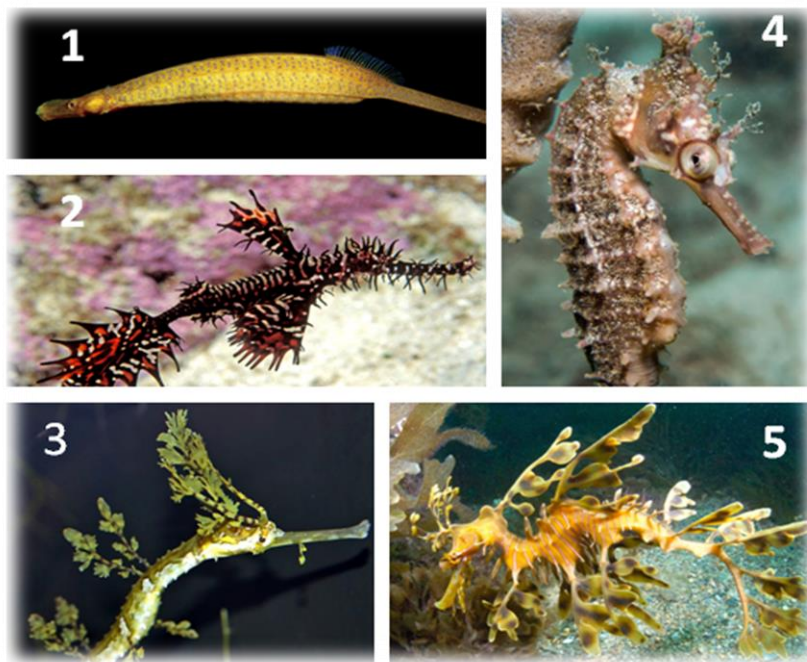


Figura 1.4. Diferentes especies pertenecientes a la familia syngnathidae. 1, *Histiogamphelus*; 2, *Selenostomus paradoxus*; 3, *Haliichthys taeniophorus*; 5, *Hippocampus procerus*; 6, *Phycodurus eques*. Fuente: www.fishesofaustralia.net.au

Todos los caballitos forman parte del género *Hippocampus*, término compuesto de las palabras griegas *hippos* (caballo) y *campus* (monstruo marino). La mayoría



de los integrantes de esta familia son marinos o de aguas salobres aunque con alguna excepción, como es el caso de algunos peces pipa. Se distribuyen en los océanos Atlántico, Pacífico e Indico y la mayoría en las aguas templadas y tropicales.

1.5.- Características generales de la subfamilia *Hippocampinae*

El número total de especies de caballito de mar no está del todo claro, debido a sus variaciones morfológicas dentro de una misma especie dependiendo del hábitat, geografía, etc... en la actualidad se reconocen 48 especies diferentes (Vincent *et al.*, 2011), aunque la IUCN solo reconoce 38 especies. Esta diferencia en el número de especies reconocidas es debida a las dificultades para su identificación basándose en características morfológicas, llegándose a demostrar que la misma especie había sido nombrada de formas distintas, dándose por tanto en la familia un alto grado de sinonimia. Por esta razón se han desarrollado técnicas de identificación genéticas que actualmente se utilizan para corroborar la identificación de las especies (Teske *et al.*, 2005; López *et al.*, 2010). Todas las especies de caballito de mar son especies marinas (aunque pueden encontrarse en estuarios de aguas salobres), y viven generalmente en aguas poco profundas de zonas templadas y cálidas de todo el planeta (Fig. 1.5).



Figura 1.5. Distribución geográfica de los caballitos de mar (modificado de Lourie *et al.*, 1999)



No se conoce exactamente la esperanza de vida de las poblaciones naturales de caballitos de mar, la mayoría de datos existentes provienen de experiencias en laboratorios o acuarios. Al parecer, la supervivencia varía entre el año para las especies más pequeñas, hasta los 5 ó 6 años para las especies más grandes (Foster y Vincent, 2004; Curtis y Vincent, 2006).

Se trata de especies que basan su supervivencia en el camuflaje, tratando de mimetizarse con su entorno, pudiendo cambiar de color o generar apéndices cutáneos (Foster y Vincent, 2004) (Fig. 1.6). Tiene pocos predadores naturales, aunque se han encontrado caballitos de mar en el estómago de peces como el atún o el dorado; sus principales predadores podrían ser sepias y cangrejos. La mayor amenaza para el caballito es el ser humano, ya que viven en aguas poco profundas por lo que la actividad antropogénica les afecta directamente.



Figura 1.6. Caballitos mimetizándose con el entorno. Fuente: Internet (www.uicnmed.org; www.blueworldfotos.com)

La principal característica que los diferencia del resto de peces es su cabeza situada en ángulo recto con el cuerpo. Tienen el cuerpo comprimido lateralmente y carecen de escamas, pero poseen un esqueleto formado por placas óseas formando anillos alrededor del cuerpo y recubierto por una fina capa de epitelio. Estos anillos



son útiles para realizar la diferenciación entre especies. Carecen de aleta caudal y ventral, y las dorsales son pequeñas y con forma de abanico. Sus ojos se mueven independientemente uno del otro y no tienen estómago ni dientes, por lo que para alimentarse succionan a sus presas a través de un hocico tubular. Existe un claro dimorfismo sexual (Fig. 1.7), y posiblemente sea la característica que más define a estos peces, puesto que el macho posee un tejido en forma de bolsa en el vientre, en el cual incuban la puesta. Durante la reproducción los progenitores producen los gametos, pero al contrario de la mayoría de seres vivos es el macho quién incuba los huevos que la hembra le introduce en la bolsa incubadora, tras un cortejo que ha sido descrito (Anónimo, 1999). En el interior de la bolsa paterna los huevos eclosionarán, aunque las larvas no saldrán hasta absorber totalmente el saco vitelino. Es esta característica de la reproducción, además de su aspecto, lo que los hace tan llamativos para los acuarios.

1.5.1.- Estatus del caballito de mar de hocico corto (*Hippocampus hippocampus*)

Esta especie está catalogada en la categoría de “Datos Insuficientes” (“Data Deficient”) por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (International Union for Conservation of Nature, IUCN) debido principalmente a la falta de datos sobre las tendencias de las poblaciones naturales, además hay una carencia de información acerca de las áreas ocupadas por esta especie y no existen análisis cuantitativos que evalúen la probabilidad de extinción de la especie. Está considerada como especie de “Interés para los ecosistemas canarios” en el Catálogo Canario de Especies Protegidas (Gobierno de las Islas Canarias, Ley 4/2010, de 4 de Junio). Del mismo modo que el resto de integrantes de la subfamilia *Hippocampinae* está incluida en el Apéndice II de CITES (Convention on



International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora), un acuerdo internacional entre gobiernos que asegura que el comercio de flora y fauna silvestres no amenace su existencia. El Apéndice II incluye especies que aunque no se encuentran en peligro de extinción, podrían llegar a estarlo si no se controla su comercio. El comercio con especies silvestres o nacidas en cautividad incluidas en este apéndice está permitido siempre que se cumplan ciertos requisitos.

1.5.2.- Biología del caballito de mar de hocico corto (*Hippocampus hippocampus*)

El estado de conservación tanto de esta especie como del resto de miembros de su familia es consecuencia de su distribución y forma de vida. La especie objeto de estudio posee las características generales descritas anteriormente para el resto de miembros de su familia. Se distribuye desde el Sur del Reino Unido hasta las aguas noroccidentales del continente africano, estando presente en las costas de las Islas Canarias. Se trata de una especie morfológicamente muy similar a *H. guttulatus* (Figura 6), que se alimenta principalmente de pequeños crustáceos como misidáceos, anfípodos y copépodos (Kitsos *et al.*, 2008). Al igual que la mayoría de sus parientes es una especie sedentaria que habita en aguas poco profundas con fondos arenosos o rocosos y con abundancia de algas, características que la hacen especialmente vulnerable debido a la proximidad de factores antropogénicos que afectan a su entorno (como la pesca de arrastre, vertidos y desagües urbanos, etc.)

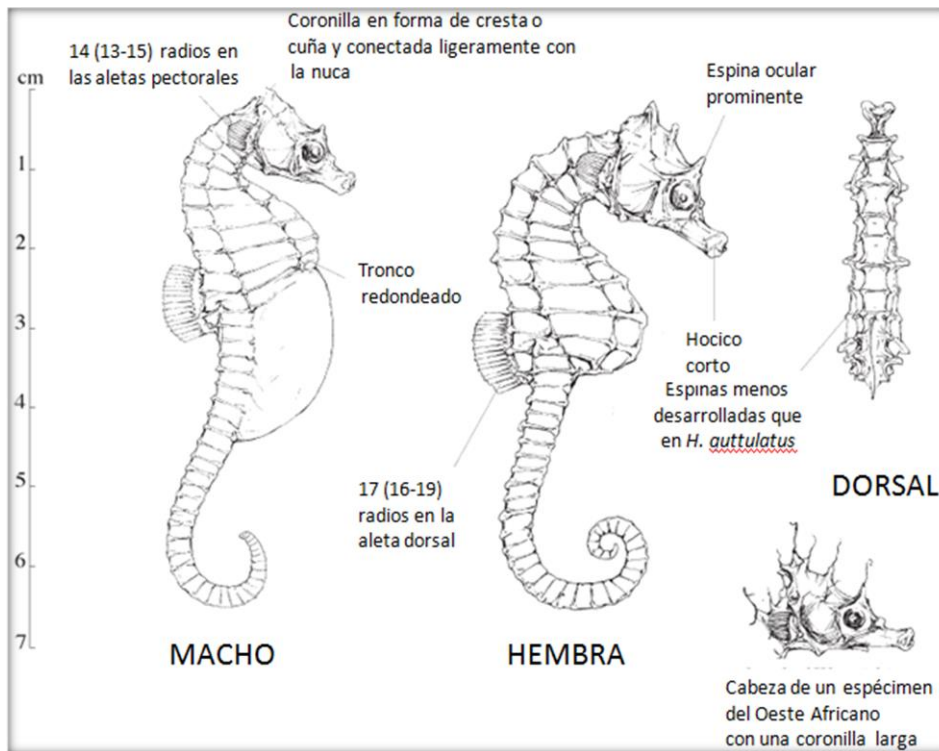


Figura 1.7. Morfología del caballito de mar (*Hippocampus hippocampus*) (adaptado de Lourie *et al.*, 2004)

1.6.- La acuicultura de especies ornamentales

La alta demanda de organismos ornamentales marinos y la preocupación creciente por la conservación del medio ambiente con una normativa cada vez más restrictiva para su captura, han llevado a distintos organismos e instituciones a promover la acuicultura de estas especies como una de las posibles soluciones para abastecer el mercado. Además, el desarrollo de la acuicultura de ornamentales proporcionar nuevos conocimientos acerca del comportamiento y la biología de muchas especies. Todos estos conocimientos resultan de interés para los estudios de ecología y pueden colaborar en la mejora de la gestión de las poblaciones naturales e incluso apoyar acciones de repoblación o reforzamiento de poblaciones con los ejemplares obtenidos en cautividad.



En los últimos años se han realizado muchos avances en las técnicas de cultivo, especialmente en la mejora de la alimentación que permitirán cultivar mayor cantidad de especies (Tlusty, 2002). Actualmente sólo un 1% de las especies ornamentales marinas comercializadas son producidas en cautividad (FAO, 2007). Uno de los elementos más importantes para la producción en cautividad de estas especies está ligado a su tipo de reproducción. La mayoría de especies producidas en cautividad a nivel comercial con fines ornamentales, son ponedores demersales o incubadores bucales, con pequeñas cantidades de huevos grandes que dan lugar a larvas bien desarrolladas (Molina y Segade, 2011), y por lo tanto, más fáciles de alimentar en condiciones de cultivo, pero se están realizando avances científicos con alguna especie de huevos pelágicos (como por ejemplo, *Z. flavescens*). El cultivo larvario, y en particular su alimentación, es el principal “cuello de botella” que dificulta la producción acuícola comercial de las especies ornamentales.

Está muy relacionado con el tamaño de las larvas en el momento de la eclosión y la talla y calidad nutritiva del alimento que se les proporciona. Las presas utilizadas tradicionalmente en acuicultura (rotíferos, *Brachionus plicatilis* y nauplios de *Artemia spp.*), en algunos casos no resultan adecuados por diferentes motivos, ya sea por su gran tamaño, que no permita a las larvas recién eclosionadas alimentarse, o por el estrecho abanico de opciones que puede provocar desequilibrios nutricionales (Izquierdo, 1996). Otras presas vivas han sido probadas en diferentes especies, como los copépodos, los misidáceos y otros organismos planctónicos capturados del medio o cultivados (Herrera *et al.*, 2009).

El principal motivo que dificulta el cultivo larvario de nuevas especies es el desconocimiento de los requerimientos nutricionales y la dificultad para realizar la primera alimentación de manera adecuada (Ogawa y Brown, 2001; Otero-Ferrer *et*



al., 2010). Por todo ello, está pendiente la optimización de los protocolos de larvicultura de especies marinas, especialmente para la producción a escala comercial, es importante producir organismos que puedan competir económicamente con especímenes capturados directamente del medio (Calado *et al.*, 2005; Olivotto *et al.*, 2006).

Por otra parte, algunas compañías han empezado a comercializar peces ornamentales de engorde, es decir, son capturados como post-larvas del medio natural y llevados hasta el tamaño comercial en cautividad (Dufour *et al.*, 1999). Este sistema se basa en el principio que la mayoría de peces de arrecife tienen una fase larvaria pelágica en su ciclo de vida, y que posteriormente retornan al arrecife. Durante el asentamiento, un 95 % de las post-larvas perecen por causas naturales, por lo que recolectar un pequeño porcentaje de estas post-larvas supone un nuevo recurso marino y una nueva vía para el desarrollo de nuevas técnicas sostenibles de acuicultura, ya sea para el comercio o la repoblación.

Definitivamente se debe trabajar más en este campo para seguir mejorando las técnicas de cultivo y la alimentación en fases críticas, como es el caso del periodo larvario.

1.6.1.- Alimentación de especies ornamentales

En la última década, debido al incremento de la demanda, se han realizado estudios para mejorar la producción de organismos ornamentales marinos, pero tanto los acuaristas como los acuariófilos demandan alimentos de calidad para sus peces y en realidad, poco se conoce acerca de los requerimientos nutricionales de la mayoría de peces ornamentales, y de los efectos fisiológicos adversos que se pueden derivar de la carencia o exceso de algún nutriente en el alimento. Estos



desequilibrios nutricionales pueden provocar inmunodepresión y convertir a los ejemplares en más proclives a sufrir patologías de otro tipo. Por ejemplo, la carencia de aminoácidos, ácidos grasos, sales minerales esenciales o vitaminas pueden provocar diversos efectos como por ejemplo, escoliosis, lordosis, afecciones branquiales, etc,... (Tacon, 1995). Del mismo modo, se ha observado en múltiples estudios en peces de consumo que un exceso de grasas en las dietas puede provocar anomalías hepáticas (Caballero *et al.*, 2004).

En los últimos años se han realizado algunos experimentos utilizando diferentes ingredientes para la formulación de dietas específicas para organismos ornamentales (James y Sampath, 2004; Vasudhevan *et al.*, 2009; Ezhil *et al.*, 2008;). Aun así, la información existente no tiene comparación con la disponible para los peces objeto de la acuicultura para consumo humano (Fraser y Davies, 2009). Ante esta falta de información específica, todos los avances realizados en la nutrición para peces de consumo podrían ser extrapolados a los peces ornamentales. En algunas especies, principalmente de agua dulce (*Xiphophorus helleri*, *Pterophyllum scalare*, *Paracheiroduon innesi* o *Dascyllus aruanus*) se han realizado experimentos muy concretos para evaluar el efecto de algún nutriente sobre determinados factores, como crecimiento, supervivencia larvaria y mejora del color. Haciendo una revisión por las referencias bibliográficas hay pocos estudios realizados en especies de agua salada, uno de ellos es el llevado a cabo por Vijayagopal *et al.* (2008) en el que probaban diferentes dietas formuladas con distintos niveles de proteínas para determinar el óptimo para el crecimiento de la damisela (*Dascyllus aruanus*), determinando que entre un 36 y un 47% era el óptimo para esta especie. Otros estudios para especies de agua dulce como el de Sealey *et al.* (2009) con el tetra neón (*Paracheiroduon innesi*) han probado diferentes



fuentes y niveles de proteína de origen marino y de vegetal terrestre, determinando que para ambas fuentes los niveles óptimos eran de 45 y 55% de proteína, pero la de origen marino resultaba mejor que la vegetal. Por otro lado, algún que otro estudio se ha realizado haciendo referencia a otro tipo de nutrientes, como en el realizado por Langroudi *et al.* (2009) quienes concluyeron que el enriquecimiento de la *Artemia* con ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) aumenta la puesta del escalar o pez ángel (*Pterophyllum scalare*) y además, la adición de vitamina C en forma de ascorbil-palmitato aumentaba aún más la supervivencia larvaria.

Debido a la falta de información general acerca de la nutrición de peces de acuario los acuariófilos más experimentados aún prefieren confiar en comidas caseras que intentan suplir todos los requerimientos de los peces o potenciar una cualidad determinada (color, crecimiento, reproducción...).

Del mismo modo, en acuarios públicos las dietas de los peces no sólo se basan en dietas secas formuladas sino que usualmente se aporta una cantidad de alimento fresco. Esto implica que no existe una confianza por parte de los consumidores finales de los productos existentes en el mercado. Es evidente que la investigación relativa a la nutrición en ornamentales está todavía por desarrollar.

1.7.- Importancia del color

El color es un parámetro presente en las vidas de la mayoría de organismos. Muchas especies de animales se guían por el color para elegir su pareja, algunos expresan su estado mediante cambios de color, otros se guían del color para alimentarse, etc. Para los humanos, el color se encuentra en todos los aspectos de la vida. Las personas están continuamente condicionadas por los colores que les



rodean y tendemos a tomar decisiones evaluando el color de las cosas; la calidad de la comida, elegir una mascota, seleccionar una prótesis dental... Ese es el motivo por el que existen tantos experimentos que conciernen al color.

Posiblemente los elementos más afectados por su propio color son los alimentos, la gente juzga la calidad y frescura por su color. Un hecho que ha dado lugar a estudios para cuantificar dichas relaciones (Wulf y Wise, 1999), mostrando que los alimentos con colores naturales más vivos normalmente indican una mayor frescura y calidad del producto. No sólo los alimentos se ven afectados por su color, múltiples estudios han demostrado que el color corporativo de una determinada marca o producto puede afectar a las ventas, incluso existen colores que obtienen más atención por los consumidores finales (Priluck Grossman y Wisenblit, 1999).

Pero la elección del color es subjetiva, aunque la evaluación del color por los humanos es muy buena incluso bajo diferentes tipos de luz, la determinación del color es muy variable de una persona a otra. Por lo que se suelen utilizar colores estándar como referencia (Erikson y Misimi, 2008), los cuales ralentizan los procesos de medición y necesitan observadores entrenados. Ese es el motivo por el cual existen diferentes pruebas para analizar el color. La metodología más utilizada es la colorimetría triestímulo, más concretamente la escala CIEALAB, dada por la Comisión Internationale de L'éclairage. Consiste en un espacio tridimensional, donde el color se establece en un punto determinado por tres parámetros. La luminosidad L^* tiene un rango de 0 (negro) a 100 (blanco), mientras que a^* y b^* determinan el color, siendo a^* verde-rojo y b^* azul-amarillo. Debido al alto coste de los colorímetros y la dificultad o imposibilidad de su uso sobre algunas superficies, se han desarrollado nuevas técnicas para la evaluación del color. La técnica con mayor potencial es el análisis de imagen, ya que se trata de una técnica



no destructiva y económica. Diferentes estudios han utilizado estas técnicas o la han comparado con la colorimetría. Pero no existen protocolos bien desarrollados, por lo que normalmente se utilizan programas de análisis de imagen como PhotoShop (Ho *et al.*, 2013) o la programación informática para casos concretos (León *et al.*, 2006).

1.7.1.- Importancia del color en especies ornamentales

El color es un factor muy importante en la acuicultura, en lo referente al color en la acuicultura de consumo, aporta una sensación de alimento saludable, por lo que su aceptación en el mercado aumenta. El color en los peces de acuario está directamente relacionado con la aceptación y su precio (Wabnitz *et al.* 2003) (Fig. 1.8). El color de un pez puede estar controlado por la genética (Gomelsky *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 2010; David *et al.*, 2004) y por la alimentación (Wallat *et al.*, 2005; Kop y Durmaz, 2008). Haciendo referencia a estos dos factores, los productores de peces ornamentales intentan conseguir mediante el cruce de peces de diferente fenotipo, nuevas variedades de color para encontrar nuevos nichos de mercado y satisfacer a los compradores más exigentes, como por ejemplo el pez payaso Picasso (*Amphiprion percula*) de ORA® Farm, o el fire red o sunburst® mustangs (*Hippocampus erectus*) de Ocean Rider (Fig. 1.9). Del mismo modo se comercializan alimentos o aditivos con pigmentos específicos que potencien determinados colores de los peces, como por ejemplo los pellets Discus Excel Color de Aquatic Nature® o el polvo de Cyclop eeze®. Existen algunos estudios referentes al color de los peces ornamentales y diferentes ingredientes como fuentes de pigmentos (carotenoides), pero casi exclusivamente en especies de agua dulce (Tabla 1.2) (Ezhil *et al.* 2008; Kop y Durmaz 2008; Yasir y Qin 2009a).



Figura 1.8. Precios de dos caballitos de la misma especie pero de distinto color. Fuente: Internet (www.tiendadecaballitos.es)



Figura 1.9. Imágenes del pez payaso Picasso (*Amphiprion percula*) de ORA® Farm (izquierda), el *fire red* (centro) y *sunburst*® (derecha) mustangs (*Hippocampus erectus*) de Ocean Rider. (Fuente: www.orafarm.com y www.seahorse.com)

Observando las referencias de la Tabla 1.2, los estudios realizados en los últimos años van por el mismo camino, la búsqueda de fuentes de pigmentos para peces ornamentales: algunos utilizan pigmentos sintéticos como el lucantin pink (astaxantina) o pigmentos purificados (cantaxantina o β -caroteno) y otros harinas de origen vegetal como la harina de pétalo de caléndula, la harina de cúrcuma o el polvo de *Porphyridium cruentum* (microalga roja). También se ha observado que efecto puede tener la intensidad lumínica sobre la coloración de los peces así como el efecto del tanque sobre el mismo.



En todos los estudios se pone de relieve la necesidad de unas técnicas válidas de medición del color, ya sea mediante extracción de pigmento para observar la acumulación o metodologías de análisis de imagen. A continuación se describirán algunas de las técnicas utilizadas en estos experimentos:

- Espectrofotometría: se extraen los pigmentos de las muestras mediante un disolvente orgánico, para su posterior análisis mediante un espectrofotómetro (Ezhil *et al.*, 2008; Kop y Durmaz, 2008; Mukherjee *et al.*, 2009; Wallat *et al.*, 2011).
- HPLC (High performance Liquid Cromatography): se trata de una técnica que permite determinar el pigmento existente en el animal previo sacrificio y extracción de los pigmentos (Yasir y Quin, 2009a y 2009b; Wallat *et al.*, 2011).
- Colorimetría: se trata de una técnica no invasiva en la cual con la ayuda de un colorímetro portátil se aplica un haz de luz sobre la muestra (pez) y una centralita recibe la señal dividiéndola en diferentes factores (a^* , rojo; b^* , amarillo y L^* , luminosidad), mediante las cuales a través de unas fórmulas es posible calcular la saturación y el color (Baron *et al.*, 2008).
- Análisis de imagen: existen diferentes formas de realizar el análisis de imagen, en todas ellas se sacan fotografías de forma estándar para todas las muestras y posteriormente se analizan con programas informáticos de tratamiento de imagen. Uno de esos métodos es el denominado RGB (Red, Green and Blue): se aísla la zona que se desea analizar y el programa realiza un recuento de píxeles de cada uno de los colores primarios (Novelo y Gomelsky, 2009; Yasir y Quin, 2009a y 2009b). Otro método más rudimentario pero válido para



patrones de coloración con parches como es el caso de las carpas es rodear el contorno con una línea, imprimir la imagen y recortarla comparando el peso de los parches o manchas con el peso total (Novelo y Gomelsky, 2009).



Tabla 1.2. Artículos publicados sobre peces ornamentales referidos al color

Referencia	Especie	Objetivo	Método de análisis
Wallaat <i>et al.</i> , 2011	<i>Carassius auratus</i>	Determinar el efecto de 7 dietas comerciales en el color	Espectrofotometría y HPLC
Yasir y Qin, 2010	<i>Amphiprion ocellaris</i>	Determinar el efecto de la astaxantina, β -caroteno y cantaxantina a diferentes concentraciones en el color del pez	Análisis de imagen y HPLC
Mukherjee <i>et al.</i> , 2009	<i>Poecilia reticulata</i>	Evaluar el efecto de diferentes porcentajes de cúrcuma en la dieta sobre el color	Espectrofotometría
Yasir y Qin 2009 a,	<i>Amphiprion ocellaris</i>	Analizar el efecto de 3 intensidades luminicas sobre el color	Análisis de imagen y HPLC
Yasir y Qin, 2009 b	<i>Amphiprion ocellaris</i>	Evaluar el color del tanque sobre la coloración del pez	Análisis de imagen y HPLC
Novelo y Gomelesky, 2009	Ciprinus carpio	Comparar dos técnicas de análisis de color	Análisis de imagen
Baron <i>et al.</i> , 2008	<i>Colisa lalia</i>	Comparar el efecto de una dieta enriquecida con un pigmento sintético y pigmentos naturales de remolacha y zanahoria negra sobre el color del pez	Colorimetría
Ezhil <i>et al.</i> , 2008	<i>Xiphophorus helleri</i>	Evaluar el efecto de la harina de caléndula en la coloración de los peces	Espectrofotometría
Kop y Durmaz, 2008	<i>Cichlasoma severum</i>	Determinar el efecto de la astaxantina, β -caroteno y <i>Porphiridium cruentum</i> sobre el color del pez	Espectrofotometría



1.8.- El cultivo del caballito de mar

Los primeros datos del cultivo de la subfamilia *Hippocampinae* son de 1957 en el Sur de China (Fan, 2005), aunque no se consiguió realizar una producción comercial. En otros países, durante los años 70-80, se comenzó a llevar a cabo de forma experimental la reproducción de diferentes especies de caballito de mar en centros de investigación y acuarios públicos (Correa *et al.*, 1989; Scarratt, 1996). Pero no fue hasta los años 90 cuando se llevó a cabo el primer cultivo comercial de *H. abdominalis* (Woods, 2000) para abastecer al mercado chino con caballitos secos para la medicina tradicional. El interés de China por cultivar otras especies de caballitos de mar creció (Fig. 1.10), pero surgieron múltiples dificultades como problemas con la alimentación y la aparición de enfermedades (Vincent y Clifton-Hadley, 1989). Fue a final de los 90 cuando comenzó la investigación con estos peces, y se publicaron los primeros datos al respecto.

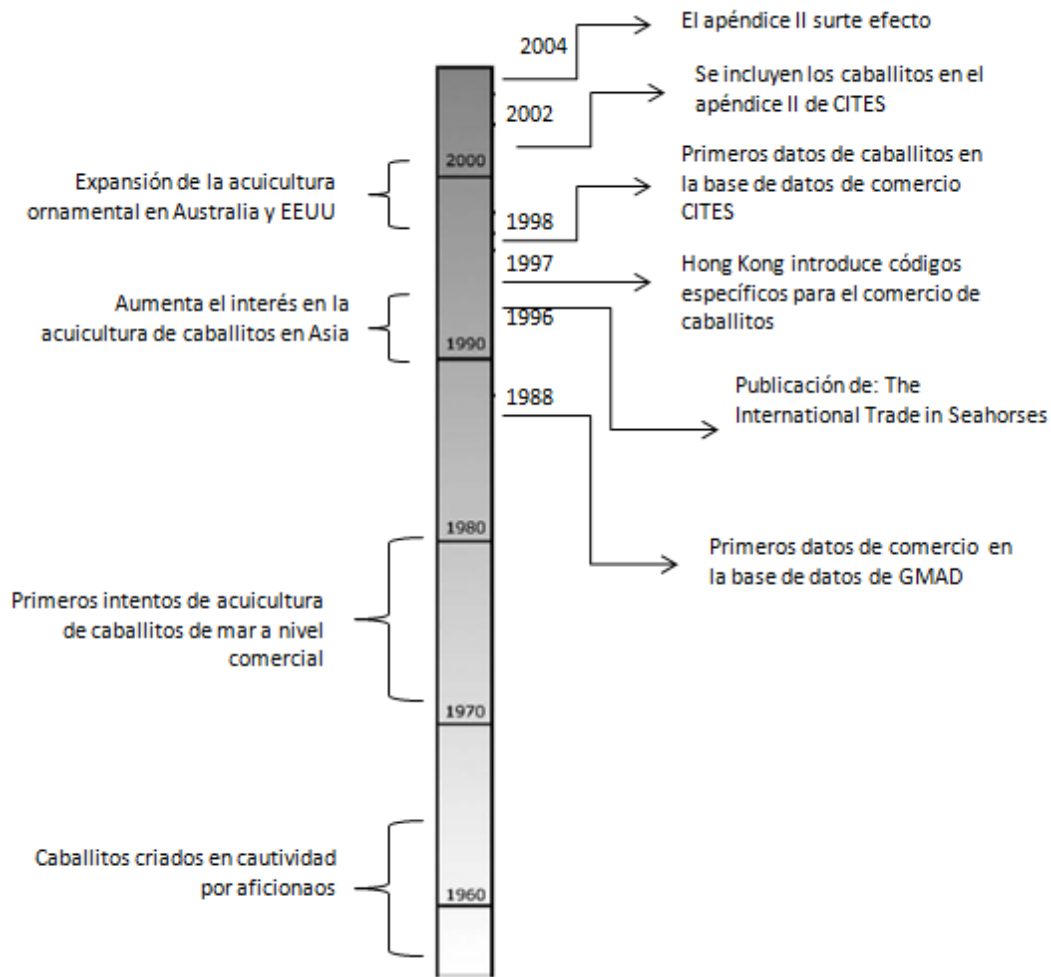


Figura 1.10. Momentos clave en la evolución del comercio y la acuicultura del caballito de mar de 1960 a 2009 (Modificado de Koldewey y Martin-Smith, 2010).

Fue en este momento cuando se crearon diferentes empresas que cultivaban caballitos de mar (Tabla 1.3) y los vendían principalmente vivos a acuarios públicos, pero alguna empresa los vendía secos o sacaba provecho mediante visitas organizadas de turistas. Actualmente existen varios centros donde se producen caballitos de mar ya sea para investigación o de forma comercial, se estimó que entre 2005 y 2006 existían al menos 28 centros que cultivaban caballitos, pero dos tercios de ellos operaban en instalaciones de menos de 200m² o con menos de 40.000 litros (Koldewey y Martin-Smith, 2010).



Tabla 1.3 Empresas que cultivan caballitos de mar y especies cultivadas

Empresa	Southwatch Seahorse Farm	Seahorse Source	Ocean rider	ORA Farm	Esir Bred denizati	Seahorse Canada	INGENS Cultivos	Seahorse Australia
País	USA	USA	USA	USA	Turquía	Canadá	México	Australia
Comercio	Detalle	Detalle y mayorista	Detalle y mayorista	Mayorista	Mayorista	Detalle y mayorista	Mayorista	Detalle y Mayorista
	<i>H. erectus</i>	<i>H. abdominalis</i>	<i>H. abdominalis</i>	<i>H. erectus</i>	<i>H. barboursi</i>			<i>H. abdominalis</i>
Especies Cultivadas	<i>H. reidi</i>	<i>H. barboursi</i>	<i>H. ingens</i>	<i>H. kuda</i>	<i>H. kuda</i>			<i>H. barboursi</i>
		<i>H. comes</i>	<i>H. erectus</i>					<i>H. breviceps</i>
		<i>H. erectus</i>	<i>H. reidi</i>					<i>H. whittei</i>
		<i>H. breviceps</i>						
		<i>H. ingens</i>		<i>H. reidi</i>			<i>H. ingens</i>	
		<i>H. kuda</i>	<i>H. taeneopeterus</i>			<i>H. erectus</i>		
		<i>H. reidi</i>						
	<i>H. zosterae</i>							



En la actualidad existen diversos grupos de investigación en todo el mundo que trabajan con caballitos de mar, estudiando su biología, su ecología, mejorando las técnicas de cultivo y refiriéndolas al cultivo de otras especies con el objetivo de mejorar los puntos críticos como son el cultivo larvario y la primera alimentación, que al igual que en otras especies suponen un obstáculo para su cultivo (Tabla 1.4).

1.8.1.- Alimentación del caballito de mar en cautividad

El caballito de mar además de las particularidades ya descritas en su anatomía y comportamiento presenta también otra característica peculiar referida a su alimentación en cautividad. Se trata de un depredador visual que no acepta alimento seco, por lo que se debe alimentar con presas vivas o congeladas (Job *et al.*, 2002; Woods, 2005) (Tabla 1.4). Dada la estrecha gama de alimentos disponibles en el mercado y el desconocimiento de sus requerimientos nutricionales y en previsión de posibles deficiencias, por lo general las presas vivas empleadas se suelen enriquecer con productos comerciales (González *et al.*, 2003; Olivotto *et al.*, 2006; Palma *et al.*, 2011), el problema de estos productos es que aportan nutrientes muy concretos (ácidos grasos, minerales, vitaminas...) y al carecer de estudios contrastados sobre sus requerimientos podrían estar generando interacciones o deficiencias de otros nutrientes.

En cautividad se suele alimentar a los caballitos con *Artemia sp.* enriquecida con productos comerciales (Job *et al.*, 2002). Se han realizado algunas experiencias en las que se utilizan otras presas vivas: misidáceos (Otero-Ferrer *et al.*, 2009), anfípodos (Murugan *et al.*, 2009), e incluso dietas inertes ya sean presas congeladas como los misidáceos (Woods, 2005) o alimento formulado (Thangaraj y Lipton, 2008), obteniendo diferentes resultados (Tabla 1.4).



En las experiencias en las cuales se utilizó una presa viva diferente a la *Artemia*, el crecimiento de los caballitos fue mayor o mejoró su reproducción (Murugan *et al.*, 2009; Otero-Ferrer *et al.*, 2009), a su vez Thangaraj y Lipton (2008) observaron que la mezcla de *Artemia* y misidáceos mejoraba el crecimiento frente a ambas presas por separado y que con la harina de pescado se obtenían resultados mucho más bajos; y por otra parte Woods (2005) determinó la ración diaria de misidáceos congelados para el *Hippocampus abdominalis*.

1.8.2- El color del caballito de mar en cautividad

Como se comentó con anterioridad el precio de un pez ornamental depende principalmente de su color. Pero no se conoce realmente como poder modificar o modular el color de los caballitos. Se sabe que el caballito puede cambiar de color para mimetizarse con el entorno, pero existen otros factores como el genotipo y la alimentación que pueden influir. Aunque se hayan llevado a cabo muchos experimentos sobre el cultivo de caballitos de mar (Woods y Valentino 2003; Woods, 2005; Palma *et al.*, 2011; Zhang *et al.* 2011), prácticamente no se ha realizado ninguno que haga referencia al color de los mismos (Lin *et al.*, 2009a; Lin *et al.*, 2011), y ninguno que aporte datos del efecto de la dieta en el color del cuerpo del caballito de mar adulto. A pesar de esto, diferentes empresas que cultivan estos organismos venden variedades de color diferentes y con precios que oscilan entre los 40 y los 400 € para una misma especie. Esta gran diferencia de precio se debe a las variaciones de color obtenidas respecto a la coloración estándar en cautividad de una especie. Es por ello por ejemplo que la empresa Ocean Rider (Hawai) vende al público los *H. reidi* (Fig. 1.11) variedad amarilla por 90 US\$ y una variedad llamada sunfire (Fig. 11) por 450 US\$.



Figura 1.11. Dos variedades de *H. reidi* del mismo criador (Brazilero, izquierda; Sunburst, derecha) Fuente Ocean Rider.



Tabla 1.4. Estudios publicados sobre aspectos de biología y acuicultura de los caballitos de mar.

Referencia	Especie	Tema de estudio
Molina <i>et al.</i> , 2007	<i>H. Hippocampus</i>	Estudios poblacionales
Palma <i>et al.</i> , 2008	<i>H. guttulatus</i>	Uso de dietas congeladas
Valladares <i>et al.</i> , 2011	<i>H. guttulatus</i>	Estudios poblacionales
Woods, 2005	<i>H. abdominalis</i>	Racion de la dieta
Lin <i>et al.</i> , 2008a	<i>H. erectus</i>	Reproducción y cultivo larvario
Zhang <i>et al.</i> , 2011	<i>H. erectus</i>	Criterios de evaluación
Lin <i>et al.</i> , 2009a	<i>H. erectus</i>	Supervivencia y color
Lin <i>et al.</i> -, 2011	<i>H. erectus</i> e <i>H. kuda</i>	Color
Thangaraj y Lipton 2008	<i>H. kuda</i>	Uso de alimento vivo y harina de pescado
Payne y Rippingale, 2000	<i>H. subelongatus</i>	Uso de copéodos en cultivo larvario
Deng <i>et al.</i> , 2005	<i>H. kuda</i>	Utilización de agua verde en cultivo larvario
Palma <i>et al.</i> , 2011	<i>H. guttulatus</i>	Enriquecimiento de <i>Artemia</i>
Otero <i>et al.</i> , 2010	<i>H. hippocampus</i>	Cultivo larvario



1.9.- La *Artemia* en acuicultura

La *Artemia* es un organismo muy utilizado en la actualidad en el campo de la acuicultura. Fue en 1930 cuando algunos investigadores comenzaron a utilizarla como alimento para larvas de peces (Sorgeloos, 1980), pero en los años 50 existía poco mercado y estaba principalmente enfocado al mercado de los acuarios a precios muy bajos (Stottrup y McEvoy, 2003). En la actualidad se utiliza en la alimentación de larvas de prácticamente todas las especies producidas tanto comercial como experimentalmente, sin embargo la tendencia es a ir sustituyéndola gradualmente por dietas formuladas. Toda esta gran cantidad se comercializa en forma de ciste en estado de diapausa (Fig. 1.12), pero existe un gran mercado que alcanza las 3000 Tm en su estado adulto que puede ser comercializada viva, congelada, deshidratada o incorporada en dietas en forma de harina.

Existen diferentes especies de este crustáceo, y habitualmente es conocida como *Artemia salina* (especie presente en todos los continentes excepto Antártida). Este término está mal utilizado puesto que la principal especie comercializada *Artemia franciscana*, y está presente en América, Australia y algunas islas del Pacífico.

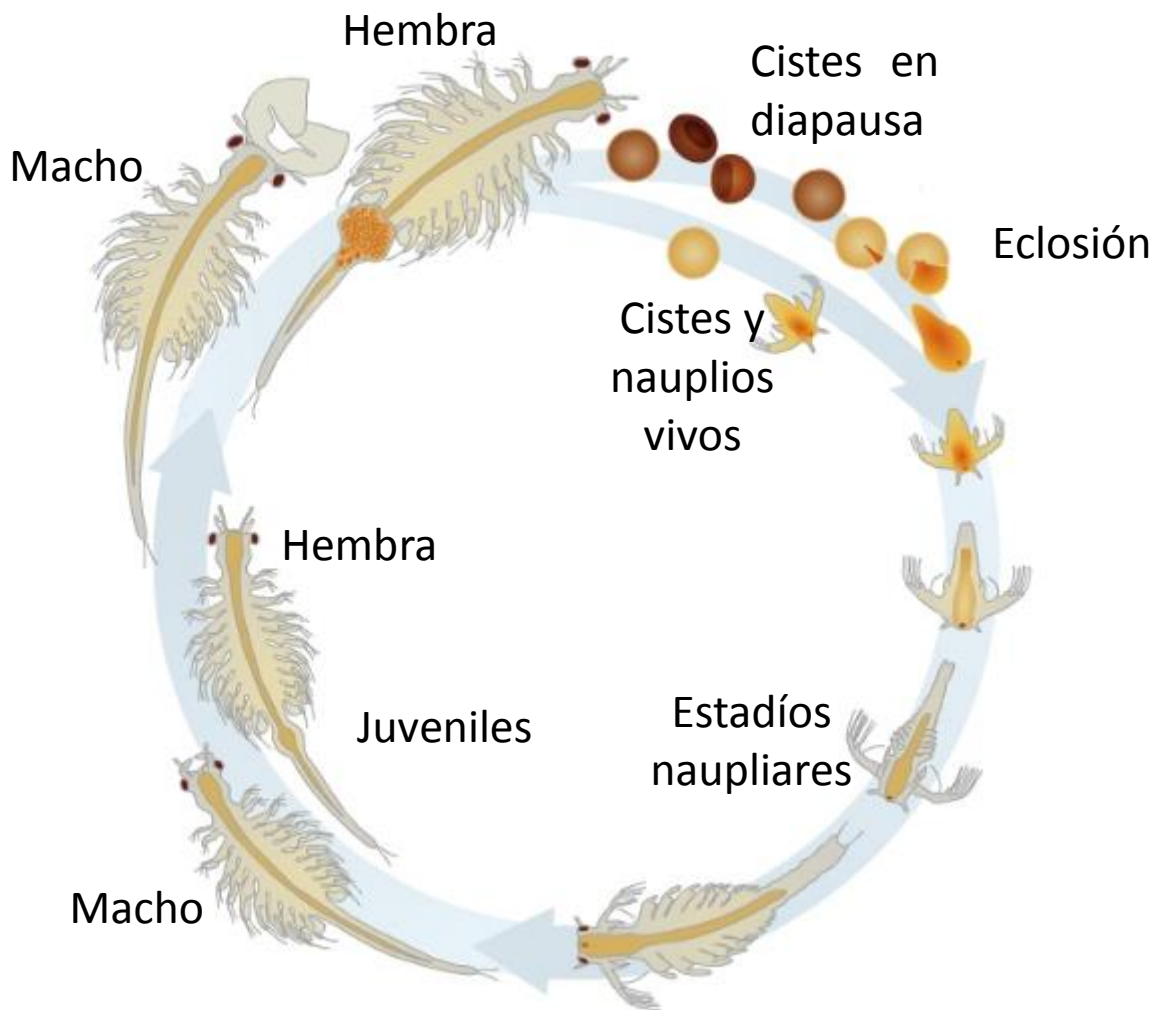


Figura 1.12. Ciclo de vida de la *Artemia* (Fuente: adaptado de learn.genetics.utah.edu).

En la actualidad se habla de "ongrown" *Artemia* refiriéndose a la fase adulta. Ésta puede ser cosechada del medio o producida en tanques. Esta última opción es, según Stottrup and McEvoy (2003), la mejor debido a que en primer lugar se dispone de una producción continua a lo largo de todo el año independientemente del clima; se puede disponer de todos los estadíos y cosechar el que más convenga, con una talla de presa uniforme, dependiendo del organismo que se vaya a alimentar (Tabla 1.5 y 1.6), y finalmente su calidad puede estar totalmente controlada evitando la introducción de patógenos en las instalaciones.



Tabla 1.5. Experimentos realizados con diferentes especies para consumo humano alimentadas con *Artemia* en distintas fases de desarrollo.





Estadío	Especies	Referencias
Nauplio y Metanauplio 	Abadejo (<i>Pollachius pollachius</i>) Pargo japonés (<i>Pagrus major</i>) Langostino (<i>Penaeus indicus</i>)	Gatesoupe, 2002 Furuita <i>et al.</i> , 1996 Emmerson, 1984
Juvenil y Adulta 	Pulpo (<i>Octopus vulgaris</i>) Halibut (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>) Langosta (<i>Jasus edwardsii</i>) Salmón (<i>Oncorhynchus kisutch</i>) Sepia (<i>Sepia officinalis</i>)	Seixas <i>et al.</i> , 2008 Olsen <i>et al.</i> , 1999 Smith <i>et al.</i> , 2004 Kim <i>et al.</i> , 1996 Domingues <i>et al.</i> , 2001

Tabla 1.6. Experimentos realizados con diferentes especies ornamentales alimentadas con *Artemia* en distintas fases de desarrollo.

Estadío	Especies	Referencias
Nauplio y Metanauplio 	Lysmata seticaudata Pez cebra (<i>Brachydanio rerio</i>) Guppy (<i>Poecilia reticulata</i>) Pez payaso (<i>Amphiprion sebae</i>)	Calado <i>et al.</i> , 2005 Sawant <i>et al.</i> , 2001 Parameswharan <i>et al.</i> 2001 Ignatius <i>et al.</i> , 2001
Juvenil y Adulta 	Escalar (<i>Pterophyllum scalare</i>) Caballito de mar (<i>Hippocampus hippocampus</i>) Tres colas (<i>Anthias anthias</i>)	Langroudi <i>et al.</i> , 2009 Otero-Ferrer <i>et al.</i> , 2012 Paglialonga <i>et al.</i> , 2001

La *Artemia* es un organismo filtrador continuo no selectivo, aunque existen algunos factores que afectan la tasa de filtración y asimilación: la cantidad y calidad de alimento proporcionado, el estado de desarrollo y las condiciones de cultivo. Controlar una dieta específica para este organismo es complicado y esto es debido a que en su cultivo siempre se desarrollan cepas de bacterias y protozoos que



utilizan el alimento proporcionado como sustrato. Puesto que la *Artemia* se alimenta de dichos microorganismos es muy difícil realizar pruebas bajo condiciones axénicas. Conociendo el mecanismo de alimentación de este organismo se utilizan alimentos que sean baratos, con partículas inferiores a 50µm, con buena digestibilidad, con solubilidad mínima y con determinada flotabilidad. Es por todo esto que los alimentos más utilizados son: microalgas vivas, microalgas liofilizadas, bacterias y levaduras y subproductos de otras industrias.

La fase adulta de este animal se utiliza mucho menos que el nauplio, debido a que éste se obtiene fácilmente de la eclosión de los cistes, mientras que para la producción de los adultos se necesita mayor mano de obra e infraestructura. De todos modos los valores nutricionales del organismo adulto en comparación con el nauplio recién eclosionado es superior, por lo menos haciendo referencia a la calidad de sus proteínas y al contenido energético (Stottrup y McEvoy, 2003). Del mismo modo que ocurre con el nauplio, el adulto refleja rápidamente el perfil lipídico de su dieta. Aunque no se conocen profundamente las vías metabólicas mediante las cuales unos ácidos grasos se convierten en otros, se sabe que este organismo transforma DHA en EPA (McEvoy *et al.*, 1995). Se han realizado múltiples pruebas para mejorar las técnicas y productos que puedan mejorar su composición bioquímica. Diferentes experimentos se han llevado a cabo para entender la fisiología de este organismo y sus técnicas de alimentación (Navarro *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2002; Gelabert, 2003), dando lugar a diferentes tipos de enriquecedores y concentraciones de uso. Un término muy utilizado que hace referencia al enriquecimiento de la *Artemia* es *bioencapsulación*. Esto se debe a que este organismo prácticamente no cambia su perfil bioquímico y es el contenido de su tracto digestivo el que lo hace atendiendo a su ingesta específica. El volumen



ocupado por sudigestivo es muy grande, por ello que muchos autores se refieren a ella como biocápsula, usándola como vehículo para proporcionar diferentes elementos a los organismos (González *et al.*, 2003; Palma *et al.*, 2011), desde ácidos grasos (Fig. 1.13) hasta antibióticos como eritromicina o enrofloxacino (Gomez-Gil *et al.*, 2001; Cook y Rust, 2002).

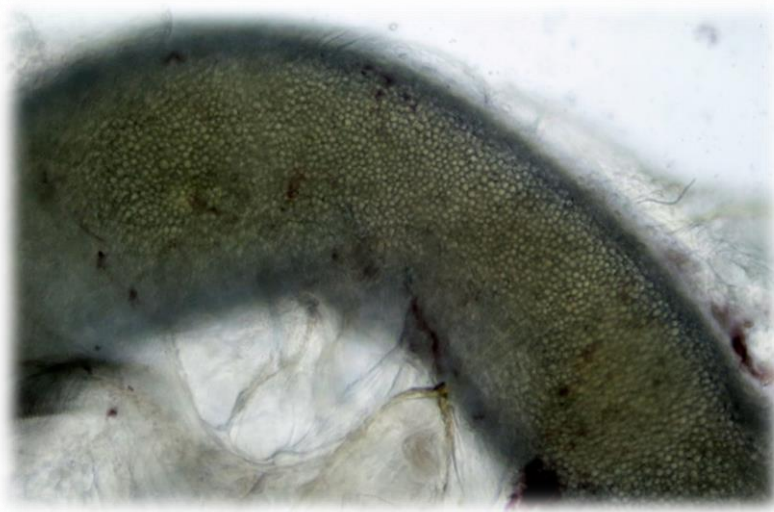


Figura 1.13. Imagen en la que se observa el digestivo de una *Artemia* adulta repleto de pequeñas micelas de enriquecedor lipídico.

Algunas especies de organismos acuáticos no toleran bien las dietas inertes en alguna etapa de su vida, por lo que se suele utilizar la *Artemia* adulta para su alimentación. Por ejemplo, el caballito de mar es alimentado frecuentemente con organismos planctónicos, misidáceos principalmente (Woods, 2005; Otero- Ferrer *et al.*, 2012). Si bien se han realizado pruebas con otros organismos como anfípodos (Murugan *et al.*, 2009), definitivamente la presa más utilizada es la *Artemia* (Job *et al.*, 2002), debido a su disponibilidad. Del mismo modo, existen problemas en el cultivo de otras especies como el pulpo (*Octopus vulgaris*), debido a que sus paralarvas deben ser alimentadas con presas vivas, es por eso, que se ha utilizado la fase adulta de *Maja zoeae* (Iglesias *et al.*, 2004; Viciano *et al.*, 2011). Muchas



especies de crustáceos son asimismo alimentadas con *Artemia* adulta en alguna etapa de sus vidas (Nair *et al.*, 1995; Tong *et al.*, 1997; Ruscoe *et al.*, 2004; Ut *et al.*, 2007). Debido al amplio abanico de especies en las que se utiliza este organismo no existen protocolos estándar de cultivo y enriquecimiento, por lo que se han desarrollado múltiples técnicas y productos enriquecedores para ser utilizados en los diversos experimentos realizados. Pero aun existiendo todo este conocimiento, a nivel comercial sólo existen unos pocos productos enriquecedores y elementos que facilitan su cultivo, siempre basándose en las principales especies comercializadas para consumo humano. Es por ello que se hace necesaria la investigación y comercialización de nuevos enriquecedores, para adaptarse a la variedad cada vez mayor de especies producidas en acuicultura, especies ornamentales incluidas.

2. Objetivos

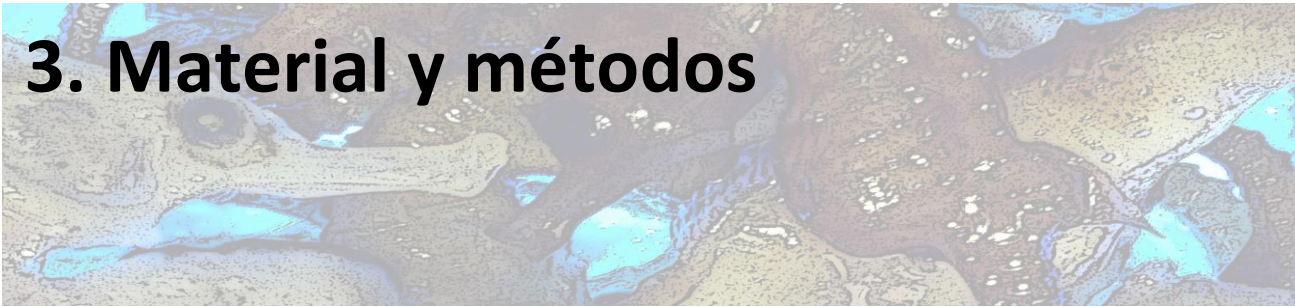


Objetivo general: Profundizar en el conocimiento de la nutrición del caballito de mar, prestando especial atención al efecto de la alimentación sobre el crecimiento y la supervivencia, así como la influencia sobre el color del animal y la acumulación de pigmentos.

Los objetivos específicos son los que se detallan a continuación:

- Mejorar la dieta para el caballito de mar, centrándose en el enriquecimiento de *Artemia* y su manejo, con la finalidad de proporcionar un alimento con valor nutritivo y un perfil optimizado para la especie objetivo.
- Evaluar el efecto de distintas dietas diferentes sobre el crecimiento, supervivencia y composición bioquímica del caballito de mar.
- Determinar la influencia de la alimentación en la expresión y variación del color.
- Determinar patrones de la evolución del color a lo largo del tiempo para evaluar el nivel de expresión máximo del mismo, así como la capacidad de reversión en su caso.
- Examinar histológicamente el sistema digestivo de los caballitos de mar y determinar las consecuencias de las distintas dietas sobre su estructura y funcionalidad.
- Formular y ensayar enriquecedores específicos, evaluando los patrones de incorporación de ácidos grasos y carotenoides en *Artemia* adulta y caballitos de mar.
- Comparar el análisis del color en la piel del caballito de mar, utilizando un método colorimétrico convencional frente al análisis de imagen.

3. Material y métodos





3.1.- Instalaciones

3.1.1.- Área experimental de cultivo de caballitos

Los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones experimentales de Acuariología del Parque Científico Tecnológico Marino (PCTM) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, en Taliarte, Telde. Los acuarios experimentales están dispuestos en dos módulos abastecidos con agua de mar prefiltrada y con sistemas de filtración (Fig. 2.1) físicos y biológicos (Aquamedic Riff 500, Alemania), y esterilización por radiación ultravioleta (UV) (Teco®, TR 10 series, Italia). El caudal de agua de entrada a los acuarios se mantuvo a 30l/h con una temperatura a lo largo de todo el experimento de 23.52 ± 1.31 °C y 8.05 ± 1.13 mg L⁻¹ de oxígeno disuelto. Durante las pruebas se estableció un fotoperiodo de 10 horas de luz / 14 horas de oscuridad (AquaMedic© of North America) T5, 24w y 10000K. La instalación dispone de 24 horas de monitorización mediante una serie de sensores conectados a una centralita AT-Control System, (Aquamedic© of North America) la cual conectada a un ordenador muestra los datos registrados de temperatura, pH, salinidad y nivel de agua de la instalación.



Figura 3.1. Instalación general, detalle de un acuario y del sistema de filtración.



Para la realización de las diferentes pruebas se utilizaron 15 acuarios de cristal de 34.96 litros (23 x 40 x 38 cm), cada uno de ellos provisto con material para la sujeción de los caballitos (Figura 2.1) consistente en una rejilla plástica de color negro. Semanalmente se limpiaban los acuarios con la ayuda de una esponja y cada dos semanas se realizaba la limpieza de los filtros.

3.1.2.- Área de presas vivas

El área de presas vivas cuenta con una serie de recipientes troncocónicos de fibra de vidrio de 50 litros, provistos cada uno con aireación fuerte. Por otra parte se contaba con un separador de cistes SEP-Art Technology SEPARATOR (Inve; Dendermonde, Bélgica). El procedimiento para la obtención de las presas vivas es el siguiente: En primer lugar se eclosionan los cistes (GSL *Artemia*; INVE Aquaculture, Inc., Salt Lake City, U.S.A.), poniéndolos en recipientes troncocónicos de 50 litros, provistos con aireación fuerte a una temperatura de $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h. Transcurrido este tiempo se filtraba el cultivo y se pasaba por el separador magnético (Fig. 2.2), para separar los cistes del nauplio recién eclosionado. Los nauplio se introducen nuevamente en tanques troncocónicos de 50 litros con aireación fuerte a en esta ocasión a una temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Diariamente se aportaba a cada uno de los tanques 2g de alimento consistente en una mezcla de Ori-Go (Skretting; Stavanger, Noruega), *Nannocloropsis* liofilizada (Clean Algae; Gran Canaria, España) y levadura (Bruggeman; Gante, Bélgica) (con una proporción 1:1:1); hasta alcanzar el tamaño deseado ($8.81 \pm 0.95\text{mm}$). Esta segunda fase llevaba 30 días aproximadamente. Finalmente la *Artemia* adulta se enriquecía, con el producto deseado.

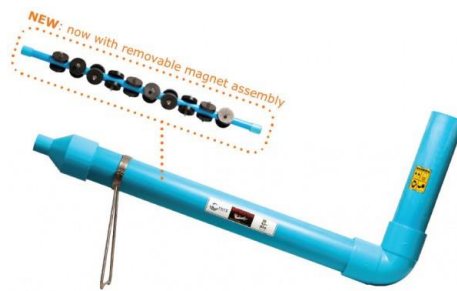


Figura 3.2. SEP-Art Separator (Fuente: www.primo.net.au)

3.2.- Estudios de los efectos dietéticos en el rendimiento productivo de caballito de mar (*H. hippocampus*).

3.2.1.-Animales experimentales

Los experimentos que se realizaron con caballitos de mar se llevaron a cabo con ejemplares de la especie *H. Hippocampus* nacidos en cautividad en las instalaciones del PCTM. Los ejemplares utilizados en el experimento tenían un peso medio de 1.35 ± 0.42 g y fueron marcados mediante elastómeros fluorescentes denominados VIFE (Visible Implant Fluorescent Elastomer; Northwest Marine Technology, Inc., Shaw Island, Washington), para identificarlos individualmente a lo largo de la prueba. Para realizar el marcaje se mezcla una resina coloreada con un catalizador que posteriormente se inyecta al caballito entre las placas óseas y la epidermis. Este producto solidifica rápidamente y emite fluorescencia bajo la luz ultravioleta (Fig.2.3). Mediante la inyección en diferentes puntos del pez se definen múltiples códigos que permiten la identificación simple de los ejemplares. Esta técnica se puso en práctica siguiendo la metodología descrita por Morgan y Martin-Smith (2004), y no presenta ningún efecto nocivo en la supervivencia de los animales (Curtis, 2006).



Figura 3.3. Caballito marcado con VIFE color verde, emitiendo fluorescencia. Fuente: Ángel Segade

3.2.2.- Dietas

Se utilizaron cinco dietas diferentes, basadas en aquellos alimentos de mayor uso en caballitos de mar, la *Artemia sp.* adulta y los misidáceos comerciales (Tabla 3.1).

Las dietas LEA y FEA (Tabla 3.1) se prepararon a partir de *Artemia* adulta cultivada en el área de presas vivas, con la técnica que previamente se ha descrito en el apartado 2.1.2. A partir de este momento se realizaron dos tratamientos distintos para la *Artemia* producida:

Dieta 1: (LEA) (Live Enriched Artemia): En este caso la *Artemia* se enriquecía con un producto comercial de rutina SELCO®. Para ello se recolectaba diariamente mediante un jamo una porción del cultivo (1.5g de peso escurrido aproximadamente), se lavaba con abundante agua y enriquecía en un recipiente troncocónico de 5L durante 24h con SELCO® (dosis: 0.5g l⁻¹).

-Dieta 2: (FEA) (Frozen Enriched Artemia). Tras la realización del enriquecimiento tal y como se ha descrito en el punto anterior se lava con



abundante agua usando una malla, posteriormente mediante papel de filtro se elimina el exceso de agua y se congela a -20°C .

Las dietas M, SEM y CEM (Tabla 3.1) se basaron en misidáceos comerciales de la marca Ocean Nutrition™, con los siguientes tratamientos:

-Dieta 3: (M). Misis sin ningún tipo de tratamiento.

-Dieta 4: (SEM) (SELCO® Enriched Mysis). En este caso, 250g de misis congelados de Ocean Nutrition™, se dejan descongelar con 20 g de SELCO®; prácticamente descongelado se homogeniza y se introduce rápidamente en una bolsa de plástico para envasarlo al vacío y congelarlo de nuevo a -20°C .

-Dieta 5: (CEM) (Cyclop-eeze® Enriched Mysis). En este caso se utiliza la misma metodología que el tratamiento anterior pero añadiendo a los misis durante la descongelación 5g de polvo de Cyclop-eeze®.

Tabla 3.1. Dietas experimentales y sus correspondientes nomenclaturas.

Dieta	Acrónimo
<i>Artemia</i> adulta enriquecida con Selco®	LEA (Life Enriched <i>Artemia</i>)
<i>Artemia</i> adulta enriquecida y congelada	FEA (Frozen Enriched <i>Artemia</i>)
Misidáceos congelados	M (Mysis)
Misidáceos congelados enriquecidos con Selco®	SEM (Selco® Enriched Mysis)
Misidáceos congelados enriquecidos con Cyclop-eeze®	CEM (Cyclop-eeze® Enriched Mysis)

3.2.3.- Diseño experimental

El experimento se llevó a cabo con grupos 5 animales por acuario y triplicados por cada dieta, marcados individualmente cada uno de los animales con VIFE. Durante el experimento se realizaron 5 muestreos entre los días 0 y 102, en que se



consideró la finalización del experimento en función de los resultados de crecimiento y coloración obtenidos hasta ese momento. En cada muestreo se controlaron los siguientes parámetros:

Talla: se tomaron distintas medidas de los caballitos: cola, tronco1, tronco2, cabeza y hocico (Fig. 2.4); con la ayuda de un pie de rey (Fig. 2.5). A continuación se describirán las medidas utilizadas según Lourie *et al.* (2004).

-Cola: distancia entre el punto medio lateral del último anillo del tronco hasta la punta de la cola sin doblar.

-Tronco: Distancia entre el punto medio del anillo cleitral hasta el punto medio lateral del último anillo del tronco.

-Altura: Distancia desde la punta de la coronilla hasta la punta de la cola sin enroscar.

-Cabeza: Distancia desde el punto medio del anillo cleitral hasta la punta del hocico

-Hocico: Distancia desde la hendidura inmediatamente delante del ojo hasta la punta del hocico.

1 Medida desde la aleta dorsal hasta el anillo cleitral

2 Medida desde la aleta dorsal hasta el extremo de la coronilla

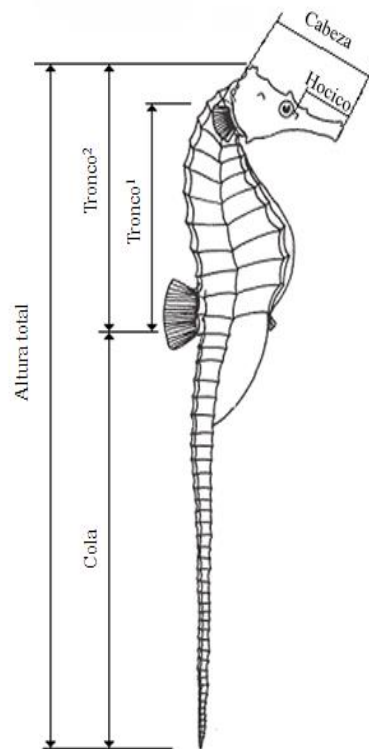


Figura 3.4. Esquema general de las medidas tomadas. Fuente: Modificado de www.projectseahorse.com

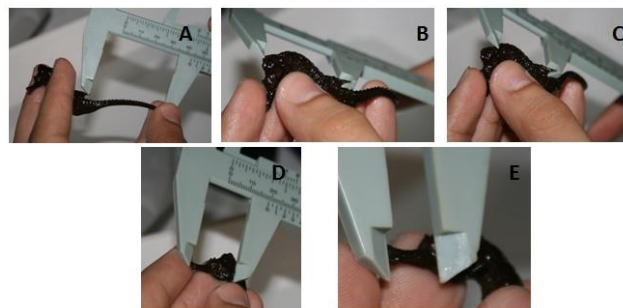


Figura 3.5. Medidas tomadas en los muestreos: A, cola; B, tronco²; C, tronco¹; D, cabeza y E, hocico

Peso: se tomó el peso húmedo de cada uno de los caballitos con una balanza de precisión (0.01g) (Mettler Toledo AG204, Suiza). Para ello los individuos se ponían en el interior de un vaso tarado previamente y una vez anotado el peso eran devueltos a la cubeta de muestreo.



Con los datos obtenidos de longitud y peso se calcularon los siguientes parámetros:

Índice de condición (IC):

$$IC = \frac{L}{P^3} \times 100$$

donde L es Longitud (cm) y P es el peso (g).

Tasa Específica de Crecimiento (TEC, peso/longitud):

$$TEC = \frac{\Delta C}{T},$$

donde ΔC es la variación del crecimiento ya sea en peso o en longitud y T el tiempo (en días) transcurrido.

Durante todo el experimento se preparaba diariamente la alimentación de todos los tratamientos que constaba de 1g de dieta (15% de la biomasa total aproximadamente) administrada en dos tomas: entre las 9:00 y 10:00 horas y las 13:30 y 14:00 horas. Previamente a la primera toma, se sifonaban los acuarios para eliminar heces, al igual que transcurridos 15 minutos de cada una de las tomas, se volvía a sifonar para eliminar los restos de alimento que pudiesen quedar en el fondo. A lo largo de todo el experimento y durante ambas tomas se observaba la alimentación y anotaba en una tabla (Tabla 3.2) el comportamiento de los ejemplares frente al tipo de alimento, (0 ó 1, no realizan o realizan todos la acción, respectivamente) con el fin de determinar la aceptación de la dieta.



Tabla 3.2. Documento de registro del comportamiento alimentario observado durante 5 minutos en todas las tomas administradas con las siguientes claves: 0, negativo; 1, positivo.

Acuario	11	12	13	14	15	21	22	23	24	25	27	28	29	210	211	Observaciones
Movimiento																
Comen																

3.3.- Estudio de los efectos dietéticos en la histología del hígado y del tracto digestivo del caballito de mar (*H. hippocampus*)

Al final del experimento se sacrificaron dos caballitos de las dietas LEA, FEA y M. para la extracción del hígado y el tubo digestivo, dividiéndose este último en digestivo anterior, medio y posterior. Las muestras obtenidas fueron fijadas en formol tamponado al 10%. Para su procesado las muestras fueron deshidratadas en un gradiente de alcoholes con un procesador de tejidos (Jung Histokinete 2000, Leica, Germany). Una vez deshidratados los tejidos, se procedió a su inclusión en parafina utilizando un dispensador automático (TES 99, Medite, Sweden) para la obtención de bloques que fueron posteriormente cortados con un micrótopo (Jung Autocut 2055, Leica, Germany) a 5 μ m. Los cortes obtenidos se tiñeron con hematoxilina-eosina (Martoja y Martoja-Pierson, 1970).

Los cortes fueron observados y comparados mediante un microscopio (Olympus CX41, Olympus, Japón) y fotografiados con un objetivo (Olympus CX30, Olympus, Japón). En las observaciones, se prestó especial atención a la estructura de los hepatocitos y la existencia de absorción lipídica en los enterocitos.



3.4.- Estudio de los efectos dietéticos en la expresión y evolución del color de la piel en caballitos de mar (*H. hippocampus*)

3.4.1.- Expresión del color

En cada uno de los muestreos se midió el color de la piel. En otras especies el color puede ser medido en diferentes zonas del cuerpo del pez, pero en este caso debido al reducido tamaño de los individuos la medición se realiza en todos los ejemplares en la zona abdominal mediante un colorímetro portátil Minolta Chroma Meter CR-200 (Minolta, Osaka, Japan) (Fig.2.6).

Los parámetros de color determinados directamente fueron la tonalidad rojiza de la piel (a^*), la tonalidad amarillenta de la piel (b^*) y la luminosidad (L^*) de acuerdo con las recomendaciones de *International Commission on Illumination*, CIE (1976), a partir de los cuales se obtuvo el color total (Hue) y la intensidad de color (Chroma).



Figura 3.6. Medición del color mediante un colorímetro (Minolta Chroma Meter CR-200, Minolta, Osaka, Japan)



3.4.2.- Evolución del color

Se consideró la puesta en marcha de una segunda prueba con la finalidad de estudiar la evolución del color de los animales y la aparición en su caso de un punto de saturación del color que pudiera dar mayor información sobre la fisiología del color en el caballito de mar objetivo. Para ello, al final del experimento anterior (día 102), se utilizaron los animales procedentes de uno de los tratamientos anteriores, el LEA, dado que la respuesta de crecimiento y color fue similar a la del resto de tratamientos, además que existía una mayor disponibilidad de alimento.

Para esta prueba se alimentó a los caballitos de forma similar a lo anteriormente descrito, considerándose como posible punto final de la prueba la obtención de una meseta o plató en los valores de coloración, que representaría la máxima capacidad de deposición del color en este animal. Una vez alcanzada la meseta en su caso, se pretendió la evaluación de la posibilidad de reversión del color en esta especie, para lo que se continuaría en su caso la alimentación con la dieta M.

3.5.- Determinación de la evolución de la composición bioquímica de *Artemia* tras su enriquecimiento con diferentes enriquecedores.

Considerada la importancia de la “ongrown” *Artemia* como vehículo para la incorporación de determinados nutrientes en los caballitos de mar, se puso en marcha una tercera prueba experimental orientada en este sentido, con el objetivo de colaborar al esclarecimiento de la dinámica digestiva de la *Artemia*. En este experimento se determinó la evolución de las concentraciones de determinados



nutrientes en *Artemia* adulta durante el proceso de enriquecimiento con distintos enriquecedores.

3.5.1.- Enriquecedores

Para esta prueba se utilizaron cinco tratamientos con enriquecedores diferentes (Tabla 3.3):

- (S): Tratamiento Control; DHA Easy Selco[®] (INVE, Belgica) (0.6g/l) como enriquecedor de rutina para caballitos de mar (Otero *et al.*, 2012)
- (SK03): Una mezcla de 0.6g/l de Selco[®] con 0.3 g/l de aceite de krill Superba[™] (Aker BioMarine AS, Noruega).
- (SK06): Una mezcla de 0.6g/l de Selco con 0.6g/l de aceite de krill.
- (SM03): Una mezcla de 0.6g/l de Selco con 0.3 g/l de aceite de mejillón.
- (SM06): Una mezcla de 0.6g/l de Selco con 0.6g/l de aceite de mejillón.

Tanto el Selco como el aceite de krill son productos comerciales, pero el aceite de mejillón fue extraído en el laboratorio a partir de mejillones congelados de la especie *Mytilus galloprovincialis*. Para ello se siguió el procedimiento siguiente: los mejillones fueron cortados en pedazos pequeños y secados en estufa ventilada a 38°C durante 48h. Una vez secos, se trituraron y extrajeron los lípidos con cloroformo (3/1g muestra/L por 3 veces consecutivas) mediante una bomba de vacío, para finalmente obtener el extracto graso y eliminación del disolvente con ayuda de un rotavapor en un baño termostático a 30°C.



Tabla 3.3. Dietas experimentales y sus correspondientes nomenclaturas

<i>Dieta</i>	Enriquecedor
<i>S</i>	0.6g/l de Selco
<i>SK06</i>	0.6g/l de Selco + 0.6g/l de aceite de krill
<i>SK03</i>	0.6g/l de Selco + 0.3g/l de aceite de krill
<i>SM06</i>	0.6g/l de Selco + 0.6g/l de aceite de mejillón
<i>SM03</i>	0.6g/l de Selco + 0.3g/l de aceite de mejillón

3.5.2.- Diseño experimental

Tras obtener la biomasa deseada de *Artemia* adulta, según lo descrito en el apartado 2.1.2, con un tamaño de 8.81 ± 0.95 mm, la *Artemia* se lavó y dividió en 45 contenedores (9 por tratamiento) de 1 litro de capacidad cada uno con aireación fuerte (Fig. 2.7). Se utilizaron cinco enriquecedores diferentes (citados en el apartado 2.3.2).



Figura 3.7. Recipientes de 1l en los que se realizó el enriquecimiento de la *Artemia* con distintos productos.

Se tomaron muestras de *Artemia* de cada uno de los tratamientos al inicio de la prueba y posteriormente cada hora hasta las 8 horas, y una última muestra tras 24



horas de enriquecimiento. Las muestras obtenidas se enjuagaron con agua destilada, eliminando previamente el exceso de agua con papel secante y finalmente se congelaron hasta -80°C para su posterior análisis bioquímico.

3.6.- Determinación del efecto sobre el color del caballito de mar (*H. hippocampus*) por el enriquecimiento de *Artemia* con aceites conteniendo diferente fuente de pigmentos.

3.6.1.- Animales experimentales

El experimento se realizó con caballitos de mar de la especie *H. Hippocampus* nacidos en cautividad en las instalaciones del PCTM. Los ejemplares utilizados en el experimento tenían un peso medio de $1.47 \pm 0.66\text{g}$.

3.6.2.- Dietas

En el experimento se utilizaron tres dietas diferentes, a base de *Artemia sp.* adulta, producida en las instalaciones de Taliarte según la metodología descrita anteriormente en el epígrafe 2.1.2 y enriquecida con diferentes productos que se detallan en la Tabla 3.4. Estos enriquecedores fueron preparados según la metodología descrita en el apartado 3.4.1.



Tabla 3.4. Dietas experimentales y sus correspondientes nomenclaturas.

<i>Dieta</i>	Enriquecedor
<i>S</i>	0.6g/l de Selco
<i>SK06</i>	0.6g/l de Selco + 0.6g/l de aceite de krill
<i>SM03</i>	0.6g/l de Selco + 0.3g/l de aceite de mejillón

3.6.3.- Creación de software específico para la determinación del color en peces mediante el análisis de imagen

El método no invasivo utilizando imágenes digitales del cuerpo del pez se desarrolló con la ayuda de un grupo de expertos en Biología Computacional de la universidad de South Bohemia. Esta aplicación maneja la carga de computación y el consumo de memoria de grandes archivos de entrada, optimizando el procesamiento y el análisis por tramos con la relación tiempo/memoria de cálculo. La aplicación permite la comparación de las distribuciones de color de varios experimentos y diferentes espacios de color (RGB, CIELab), pudiendo comparar la representación de múltiples variables. Para llevar a cabo esta aplicación era necesario conocer la función de calibración de color y la capacidad de respuesta de la cámara utilizada (CANON EOS 650D). Es por ello que se utilizó una guía de color Pantone, de la cual se sacaron múltiples fotos para conocer la calibración de la cámara y poder generar las fórmulas y códigos necesarios para el desarrollo de la aplicación que recibió el nombre FISCEApp (Fish Skin Color Evaluation Application) (Urban *et al.*, 2015). Software que tiene la ventaja de que puede ser utilizado con cualquier cámara convencional y actualmente se encuentra libre en la red (<http://auc.cz/software/index4.htm>).



3.6.4- Diseño experimental

El experimento se llevó a cabo por triplicado por tratamiento utilizando cuatro animales por acuario. Durante el experimento se realizaron 4 muestreos entre los días 0 y 90, día en que se consideró la finalización del experimento tal y como se había preestablecido en función de los resultados previos. En cada muestreo se controló el peso y el color tal y como se describe en el apartado 2.2.3, y además se tomaron imágenes de todos los individuos con una cámara Canon EOS 650D provista con un objetivo Sigma de 50mm (Sigma, Ronkonkoma, USA). La cámara fue calibrada en el área de muestreo realizando un balance de blancos manual con la ayuda de una tarjeta de balance de blancos (Novoflex Controlcard, Memmingen, Germany).

Para el análisis colorimétrico se utilizó un colorímetro Minolta Chroma Meter CR-400 (Minolta, Osaka, Japan). Se trata de un utensilio portátil diseñado con un ángulo geométrico de difusión de la iluminación de 0°. Este método ilumina la muestra desde todas las direcciones y recibe la luz reflejada verticalmente desde la superficie de la muestra. Para ello se utiliza una bombilla de xenón de pulso de descarga, la luz atraviesa una cámara de difusión, posteriormente pasa a través de un disco difusor y se refleja en el objetivo. Finalmente la luz reflejada verticalmente es detectada por unas fibras ópticas de medición. El hecho de que recoja la reflexión a 0° permite que el instrumento sea lo más cercano a la visión normal y puede ser utilizado sobre diferentes objetivos (Fig. 2.8).

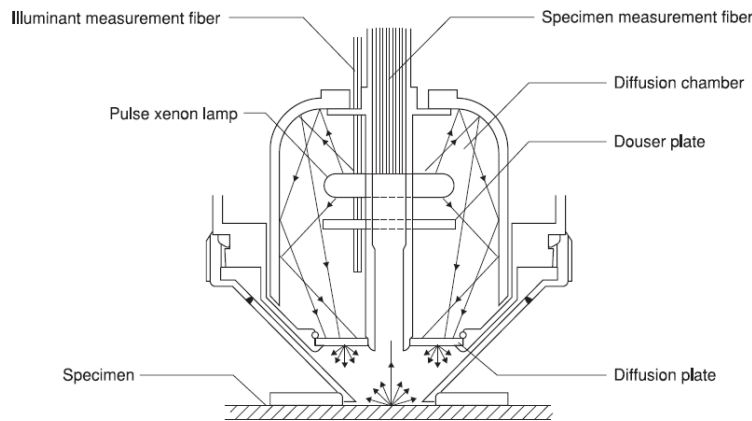


Figura 3.8. Funcionamiento del colorímetro Minolta CR-400 (Fuente: manual Minolta CR-400)

El colorímetro estaba provisto con un cabezal CR-A33d que posee un disco de vidrio de 22mm de diámetro. Antes de comenzar las medidas el aparato fue calibrado mediante una placa de calibración CR-A43 y los valores D65 ($\gamma=93.8$; $x=0.3156$; $y=0.3319$).

Para llevar a cabo el análisis de imagen, se utilizó la aplicación FISCEAPP (Fig. 3.9) (Urban *et al.*, 2015). Esta aplicación es capaz de eliminar el ruido de la imagen al ignorar los reflejos debidos a la iluminación y aportarnos los valores más relevantes como son el color en diferentes espacios (RGB y $L^*a^*b^*$).

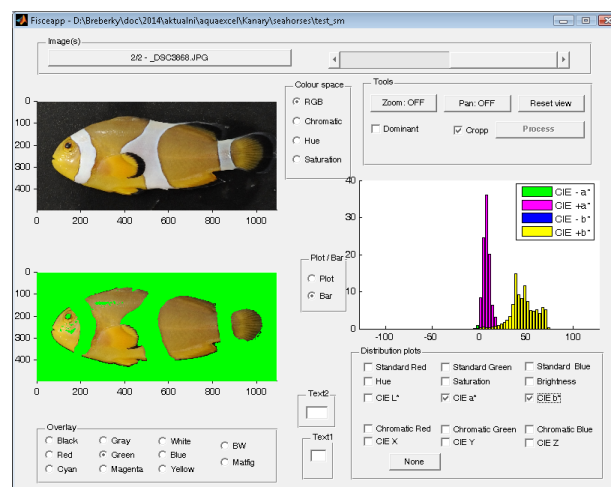


Figura 3.9: Se muestra un ejemplo de los datos de salida del software FISCEAPP con la imagen recortada y segmentada de un pez payaso, y la distribución del color en el cuerpo del pez.



3.7.- Análisis bioquímicos

Se realizaron análisis bioquímicos por triplicado de cada una de las presas, para lo que se recogieron dos muestras de cada una de ellas y se formó un “pool”. Además, dos caballitos al inicio de cada experimento y dos caballitos de cada acuario al final de los mismos, fueron sacrificados sumergiéndolos en agua y hielo durante cinco minutos, habiendo sido previamente anestesiados con aceite de clavo a una concentración de 0.04 ml/l. Este procedimiento de sacrificio ha sido considerado como adecuado por el Comité Ético de Bienestar Animal de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) en 2011. Tras el sacrificio los caballitos fueron clasificados en bolsas individuales, y junto con las dietas se almacenaron a -80°C, hasta el momento de realizar los análisis, momento en el que se formaron "pool" de muestras de cada acuario.

3.7.1.- Determinación de humedad y cenizas

Se siguió el Método Oficial de Análisis de la Asociación de Química Analítica Oficial de Estados Unidos (AOAC, 2010), pesándose cantidades conocidas de muestra en crisoles y se pusieron en una estufa a 100° hasta peso constante, 24 horas normalmente, calculando la humedad mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ humedad} = \frac{(P_i - P_f)}{P_i} \times 100,$$

siendo P_i el peso húmedo y P_f el peso seco de la muestra.

Para calcular el peso seco se utiliza la siguiente ecuación:

$$\% \text{ p. s.} = \frac{\% \text{ p. f.}}{100 - \%H} \times 100,$$



siendo % p.s. el porcentaje de peso seco del parámetro que queremos calcular, H la humedad calculada con anterioridad y p.f. el peso fresco del parámetro a transformar.

Para calcular el contenido en cenizas, una vez pesada la muestra y calculada la humedad se introducía en el horno MUFLA a 600° hasta peso constante, normalmente 24 h. Una vez enfriado el crisol se pesaba y calculaba el contenido en cenizas con la siguiente ecuación:

$$\%cenizas = \frac{(P_{cc}-P_c)}{P_m} \times 100,$$

En la que Pcc es el peso del crisol con las cenizas, Pc es el peso inicial del crisol y Pm es el peso fresco de la muestra

3.7.2.- Determinación de proteínas

Para realizar la determinación de la proteína bruta de nuestras muestras se utilizó el método Kjendahl (AOAC, 2010) que permite calcular la cantidad de nitrógeno total de la muestra.

En primer lugar se digiere la muestra a 400°C en ácido sulfúrico y en presencia de un catalizador en una manta calefactora (Tecator Digestor 20, Foss, Sweden). Tras la digestión se añade hidróxido sódico (NaOH) en exceso y se destila mediante un destilador (Kjeltec 2100 Destillation Unit, Foss, Sweden), el amoniaco liberado en ácido bórico, para ser posteriormente valorado con ácido clorhídrico HCl 0.1N. La ecuación para calcular el nitrógeno liberado es la siguiente:

$$\%proteínas = \frac{(V-P) \times N \times 14.007 \times 6.25}{M} \times 100,$$



En la que V es el volumen de HCl (ml) utilizado en la valoración, P es el volumen de HCl consumido por el patrón, N es la normalidad del HCl y M es el peso de la muestra en miligramos.

3.7.3.- Determinación de lípidos

Los lípidos totales se analizaron siguiendo el método de Folch *et al.*, (1957). El método consiste en la extracción de los lípidos en cloroformo-metanol (2:1), añadiendo una solución de cloruro potásico (KCl) para aumentar la polaridad de la fase acuosa. Una vez separados por decantación, se evapora la muestra y se seca para calcular el porcentaje de lípidos totales mediante la siguiente ecuación:

$$\% p. s. = \frac{\% p.f.}{100 - \%H} \times 100,$$

en la que L son los gramos de lípidos de la muestra y M los gramos de la muestra.

Los lípidos totales extraídos son transesterificados (Christie, 1982) para la identificación de ácidos grasos y cuantificación mediante cromatografía de gases (Izquierdo *et al.*, 1990). Para ello se les añade a los lípidos totales una vez llevados a sequedad 1ml de Tolueno con butilhidroxitolueno (BHT) y 2ml de Metanol:Sulfúrico (1%), se agita, se llena el tubo con N_2 , se sella y se deja incubando durante 16 horas a $50^\circ C$ en oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo se deja enfriar y se añaden 3.5ml de agua ultra pura y 4ml de Hexano:Dietileter 1:1 con BHT al 0.01% y se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos para extraer la fase superior que contiene los ésteres.

Posteriormente se añade bicarbonato potásico ($KHCO_3$), se agita, centrifuga y se vuelve a extraer la fase superior, para finalmente evaporar, rediluir en 1-2ml de hexano, se filtra con un Sep-pack, se evaporan a sequedad, se rediluye y se



identifican y cuantifican en un cromatógrafo de gases (Focus GC, Thermo Scientific, England)

3.7.4.- Determinación de pigmentos

La extracción de los pigmentos se llevó a cabo según la metodología descrita por Schiedt y Liaaen-Jensen. (1995). Se realiza la extracción de los carotenoides de las muestras mediante acetona. Con hexano y agua se realiza una separación por decantación y la fase obtenida es filtrada y evaporada para su posterior valoración en el espectrofotómetro (Evolution 300, Thermo scientific, England) a 470 nm, una vez rediluidos los pigmentos en un volumen de hexano conocido. Con los datos obtenidos se calcula la concentración de carotenoides expresados como equivalente de astaxantina:

$$\mu g/g = \frac{Abs \times V \times 10000}{2100},$$

donde Abs es la absorbancia y V el volumen con el que se rediluyeron los pigmentos extraídos.

3.8.- Análisis estadístico

Para analizar los datos de los distintos experimentos, en primer lugar se hizo una prueba para confirmar la normalidad y homogeneidad de los datos. Para analizar los resultados de bioquímica se utilizó un análisis de la varianza de un factor (ANOVA), utilizando el programa estadístico (SPSS para Windows 11.5; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Para observar posibles diferencias en el crecimiento de los caballitos de mar y en su coloración se realizaron análisis de la varianza con factores múltiples de medidas repetidas (MANOVAR) utilizando el programa estadístico (SPSS para Windows 11.5; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Y finalmente, en el



último experimento, además de un MAENOVAR se aplicó un análisis de componentes principales (PCA) a los datos obtenidos del software FISCEAPP. El PCA se llevó a cabo mediante el programa estadístico Unscrambler X (CAMO Software AS; OSLO, Noruega).

4. Study I.

Effects of the diet on seahorse (*Hippocampus hippocampus*) growth, body colour and biochemical composition

**A. Segade, L. Robaina, F. Otero-Ferrer, J. García Romero and
L. Molina Domínguez**

**Grupo de Investigación en Acuicultura, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,
Parque Científico Tecnológico, Las Palmas, Spain**

Aquaculture Nutrition 2014; doi: 10. 1111/anu. 12202



Aquaculture Nutrition



4.1.- Abstract

The short-snouted seahorse (*Hippocampus hippocampus*) is a benthic fish that bases its survival on camouflage with the environment; therefore, both in wild and in captivity specimens, differences in coloration have been observed. This study was conducted to study the effect of five different diets, based on *Artemia* and frozen mysis, on fish survival, growth, skin colour parameters and biochemical composition. After 102 days of feeding different diets, no effect was observed on fish survival, growth, protein, ash or humidity content, except for colour changes on yellow and red fish. Differences on seahorse lipid and total carotenoids content were obtained in the experiment because of experimental diets. Fish eating *Artemia* showed the highest colour pattern response during the trial, with a maximum yellowness attained of 21. Additionally, a plateau of the skin colour expression for *Artemia*-feeding fish was reached on day 180. A reversion of the yellowish skin colour was determined after a change of diet.

4.2.- Resumen

El caballito de mar de hocico corto (*Hippocampus hippocampus*) es un pez bentónico que basa su vida en el camuflaje con el entorno, por lo tanto, ya sean individuos silvestres o en cautividad, se han observado diferencias en su coloración. Este estudio se ha llevado a cabo para estudiar el efecto de 5 dietas diferentes, basadas en *Artemia* y mysis congelados, en la supervivencia, crecimiento, parámetros de coloración de la piel y composición bioquímica. Después de 102 días alimentados con las diferentes dietas, no se observó ningún efecto en la



supervivencia, crecimiento y contenido de proteína, ceniza, humedad, pero sí en el color rojo y amarillo de los peces. Se obtuvieron diferencias en el contenido de lípidos y carotenoides totales, por la alimentación con las diferentes dietas experimentales. Los peces alimentados con *Artemia* mostraron la mayor respuesta de patrón de color durante la prueba, alcanzando una coloración amarilla de 21. Además, los peces alimentados con *Artemia*, alcanzaron una meseta de la expresión del color en la piel en el día 180. Se determinó una reversión del color amarillo de la piel de los caballitos tras cambiar la dieta.

4.3.- Introduction

All seahorse species have been included in Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES 2002) (Gonzalez *et al.*, 2006), due to the status of natural populations. Between the 40 species spread over the world, short-snouted seahorse (*Hippocampus hippocampus*) has referred in Canary Islands (Molina *et al.*, 2007). Several field studies have pointed out the decrease in seahorse populations, in the Canary Islands (Bortone *et al.*, 1991; Otero-Ferrer *et al.*, 2012), Mexico (Baum *et al.*, 2003) and Brazil (Rosa *et al.*, 2005) mainly due to habitat loss. Reproduction in captivity is considered as one of the solutions to reduce the pressure on wild stocks by fishing bycatch and ornamental business operations (Otero-Ferrer *et al.*, 2010). Many experiences about seahorse culture have been done on culture conditions and reproduction success (Woods 2003; Woods and Valentino 2003; Zhang *et al.*, 2010; Palma *et al.*, 2011), most of them without considering nutrition as an important factor affecting fish development.



A special behaviour of these species in nature is their availability to change the colour of their skin to blend with the environment (Foster and Vincent 2004). Fish skin colour, on the other hand, is of great importance from the commercial point of view, being directly associated with fish acceptance and market value (Wabnitz *et al.*, 2003). Fish are not able to synthesize carotenoids *de novo* (Goodwin, 1984), so they must be supplemented in their feed to promote the characteristic fish skin colours. Specimens of *H. hippocampus* in the wild feed on mysis, amphipods and copepods (Kitsos *et al.*, 2008). In captivity, although mysis (Woods, 2005) and amphipods (Murugan *et al.*, 2009) are currently used, seahorses are mainly fed on enriched *Artemia* (Job *et al.*, 2002).

Regarding ornamental fish, colour can be mainly controlled by genetics (Gomelsky *et al.*, 1996; David *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2010) and food intake (Wallat *et al.*, 2005; Kop and Durmaz 2008; Ho *et al.*, 2013). Studies conducted in recent years search for different sources of pigments. Some of them use synthetic pigments such as astaxanthin, purified pigments (cantaxanthin or b-carotene) (Baron *et al.*, 2008; Kop and Durmaz, 2008; Yasir and Qin, 2010; Ho *et al.*, 2013) or other kind of flours, such as, marigold petal flour, turmeric flour or microalgae powder (Baron *et al.*, 2008; Ezhil *et al.*, 2008). Some other experiments have observed that light intensity and tank colour can affect the colour expression (Yasir and Qin 2009a, b). Recent studies have referred to seahorses, one of them focused on seahorse's skin colour blend towards substratum colour (Lin *et al.*, 2009a), and another one relating colour changing with the aquarium ambience (Qin *et al.*, 2012). To our knowledge, no one paper has reported data about the effect of the diet on adult seahorses' body coloration.



The aim of the present study was to determine the influence of different diets in *H. hippocampus* growth and fish body biochemical composition and to determine their capability to change colour depending on the diet.

4.4.- Materials and methods

Seahorses and culture conditions Seventy-five captive bred (in our facilities) seahorses with a mean weight of 1.22 ± 0.45 g were used. All of them came from the same broodstock and were individually identified by visible implant fluorescent elastomer (VIFE; Northwest Marine Technology, Inc., Shaw Island, WA, USA). Seahorses, five fish per aquarium, were randomly distributed in fifteen 34.96 L glass aquaria (23 x 40 x 38 cm). They were maintained with a 10 h light/14 h dark photoperiod (T5 tubes, 24 W and 10 000K; AquaMedic, Bissendorf, Germany). Throughout, the experiment tanks were provided with physical (Riff 500; Aquamedic, Bissendorf, Germany) and UV (TR 10 series, Teco, Ravenna, Italia) prefiltered natural seawater, with a daily renewal rate of 100 ml L^{-1} . Each aquarium had a 30 L h^{-1} flow rate, 23.52 ± 1.31 °C and $8.05 \pm 1.13 \text{ mg L}^{-1}$ of dissolved oxygen, and each tank had aeration.



4.4.1.- Diets and feeding

Five different diets were prepared and tested in triplicate groups of seahorses for 102 days:

1- LEA, control diet consisted of live *Artemia* enriched in Easy DHA Selco® (INVE, Dendermonde, Belgium) (24 h of enrichment, 0.6 g L⁻¹).

2- FEA, frozen *Artemia* previously enriched in Easy DHA Selco® (24 h of enrichment, 0.6 g L⁻¹).

3- M, frozen commercial mysis (Ocean Nutrition™, Essen, Belgium).

4- SEM, commercial Mysis supplemented with Easy DHA Selco® (80 mg g⁻¹).

5-CEM, commercial mysis supplemented with Cyclo-peeze® (Argent Laboratories, Redmond, WA, USA) (20 mg g⁻¹).

The proximate composition and total carotenoid content of the five diets are shown in Table 4.1. Seahorses were fed with 1 g day⁻¹ on the correspondent diet at two rations of 0.5 g each (09:00 and 14:00) and 6 days per week. Feeding ratio was maintained at approximately 150 mg g⁻¹ of the total biomass along the entire trial according to others authors' recommendations (Woods and Valentino, 2003; Woods, 2005; Palma *et al.*, 2008). Seahorse feeding behaviour was observed and recorded during feeding in order to determine any differences in diets acceptance.

4.4.2.- Sampling and colour measurement

Whole body mass (Job *et al.*, 2002), total length (Lourie *et al.*, 2004) and skin colour parameters were measured in all seahorses at the beginning of the experiment and after 20, 40, 60 and 102 days feeding to evaluate standard growth rate (SGR),



feed conversion (FC) and colour change during the trial. At the end of the experiment, seahorses fasted for 1 day. Two individuals (male and female) of each aquarium were sacrificed and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ prior to proximate analysis.

Colour measurement was taken from the left abdominal area using a portable colorimeter (Minolta Chroma Meter CR-200; Minolta, Osaka, Japan). The colour parameters directly determined were redness (a^*), yellowness (b^*) and lightness (L) in accordance with the recommendations of the International Commission on Illumination (CIE 1976), from where the overall colour [Hue; $H_{ab} = \arctan(b^*/a^*)$] and the intensity of the colour [chroma; $C_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})$] the intensity of the colour [chroma; $C_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})$] were calculated from a^* and b^* (Hunt 1977).

Table 4.1. Proximate composition ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ wet weight) and total carotenoid ($\mu\text{g } \text{g}^{-1}$) content of five experimental diets.

	LEA	FEA	M	SEM	CEM
Crude protein	4.74 \pm 0.12 ^c	5.61 \pm 0.33 ^c	9.55 \pm 0.65 ^a	7.59 \pm 0.89 ^b	10.23 \pm 0.2 ^a
Lipids	2.02 \pm 0.05 ^b	1.40 \pm 0.12 ^c	0.98 \pm 0.03 ^d	6.12 \pm 0.13 ^a	6.62 \pm 0.6 ^a
Ash	0.07 \pm 0.01	0.53 \pm 0.03	1.48 \pm 0.16	0.98 \pm 0.15	1.62 \pm 0.07
Moisture	93.18 \pm 0.02 ^a	91.48 \pm 0.04 ^b	90.13 \pm 1.47 ^c	87.10 \pm 0.17 ^d	86.30 \pm 0.12 ^d
Carotenoids ($\mu\text{g } \text{g}^{-1}$)	4.82 \pm 0.98 ^{ab}	3.17 \pm 0.37 ^c	3.98 \pm 0.24 ^{bc}	3.91 \pm 0.92 ^{bc}	6.26 \pm 1.06 ^a

Means with a common letter denote no significant differences.

LEA, Life Enriched *Artemia*; FEA, Frozen Enriched *Artemia*; M, Mysis; SEM, Selco Enriched Mysis; CEM, Cyclop-eeze Enriched Mysis.

At day 102, the launch of a second test was considered in order to study the evolution of animal colour and the possible appearance of a plateau for skin colour saturation, using the nine fish remaining from the LEA diet. For this test, seahorses were continuously fed with LEA diet according to the described methodology (0.5 g, twice a day) until an endpoint of the expected colour saturation was observed.



Once reached the expected colour saturation, diet was changed to M diet in order to know about possible skin colour reversion in this species.

4.4.3.- Biochemical analysis

Diet and whole seahorse body composition were analysed for protein, moisture and ash content according to AOAC (2010). For total lipid extraction Folch et al. (1957), procedure was used. Carotenoids were extracted from samples according to Barua *et al.* (1993). For carotenoid quantification in n-hexane, the absorbance was read at $k = 470$ nm using $E_{1\%, 1\text{ cm}} = 2100$ (Britton, 1995) and expressed as astaxanthin equivalent using the following equation:

$$\text{Mg g}^{-1} \text{ sample} = 10\,000 * V * A/W * E_{1\%;1\text{cm}}$$

Where V is the total volume of the extract (mL), W is the weight of the sample (g), A is the absorbance and $E_{1\%, 1\text{ cm}}$ is the extinction coefficient in n-hexane.

4.4.4.- Statistical analysis

All data were tested for normality and homogeneity of variance. To study the effect of the diets on growth, a multivariate method MANOVAR with two fixed factors, time and diet, was used. Differences in biochemical composition between groups were determined by one-way ANOVA, using Tukey's test for multiple comparisons. All statistical analyses were tested at 0.05 significance level using the SPSS statistical package (SPSS for Windows 11.5; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4.5.- Results

All diets were well accepted by seahorses since the start of the trial although those fed on LEA diet showed a greater voracity. After 102 days, no significant differences ($P > 0.05$) in length or weight between diets were found (Table 4.2).



The observed fish mortality for all treatments was 17%, being LEA the only diet without deaths. Biochemical analysis (Table 4.3) showed no difference between treatments in protein, ash or moisture content, but showed two different levels of body lipid content, higher for the diets containing mysis and lower for the diets based on *Artemia*. On the other hand, the body lipid content was directly related ($r^2 = 0.85$) with seahorse weight (Fig. 4.1) and not related with dietary lipid content ($r^2 = 0.017$; $P > 0.05$).

Table 4.2. Fish growth responses parameters at the end of the experiment.

	LEA	FEA	M	SEM	CEM
Weight (g)	1.27±0.2	1.28±0.28	1.34±0.5	1.14±0.35	1.32±0.3
Length (cm)	8.38±0.72	8.63±0.65	8.29±0.63	7.94±0.72	8.35±0.55
SGR	0.00±0.12	-0.19±0.13	0.07±0.12	-0.03±0.06	0.04±0.15
CF	0.66±0.14	0.68±0.11	0.58±0.10	0.73±0.17	0.65±0.14
Survival	100.00	73.33±11.55	66.67±23.09	53.33±30.55	73.33±11.55

Means without letter denote no significant differences.

LEA, Life Enriched *Artemia*; FEA, Frozen Enriched *Artemia*; M, Mysis; SEM, Selco Enriched Mysis; CEM, Cyclop-eeze Enriched Mysis.

Table 4.3. Proximate composition and total carotenoid body content ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ wet weight) of whole fish at the end of the trial.

	LEA	FEA	M	SEM	CEM
Crude protein	14.70±1.69	13.73±0.48	14.76±1.16	14.05±0.35	15.78±0.72
Lipids	0.46±0.09 ^b	0.43±0.06 ^b	0.75±0.16 ^a	0.54±0.04 ^{ab}	0.54±0.07 ^{ab}
Ash	14.71±0.19	13.55±1.06	11.52±1.36	12.69±0.89	13.78±2.45
Carotenoids ($\mu\text{g g}^{-1}$)	19.45±0.83 ^b	17.31±3.35 ^{bc}	14.81±3.21 ^c	14.99±1.79 ^{cb}	27.13±1.81 ^a
Moisture	72.53±5.81	70.91±1.23	71.17±2.28	72.13±1.02	67.48±1.02

Means with a common letter denote no significant differences.

LEA, Life Enriched *Artemia*; FEA, Frozen Enriched *Artemia*; M, Mysis; SEM, Selco Enriched Mysis; CEM, Cyclop-eeze Enriched Mysis.

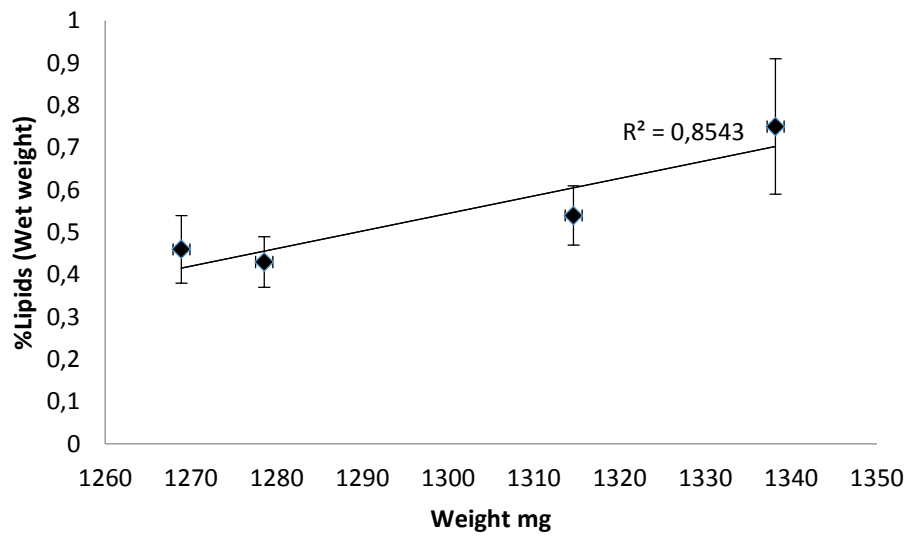


Figure 4.1. Relation between weight and % of lipids in seahorse whole body

Regarding colour change, yellow colour (b^*) deposition was observed at high extent, while the skin redness (a^*) was not detected along the trail (Table 4.4). Significant differences in total carotenoids whole body content were observed when animals fed on different diets ($P \geq 0.05$) (Table 4.3), showing a direct relation between carotenoids in diets and the respective whole body seahorse content. Moreover, no relationship was found for fish body lipid and carotenoid content ($r^2=0.082$) (Fig. 4.2).

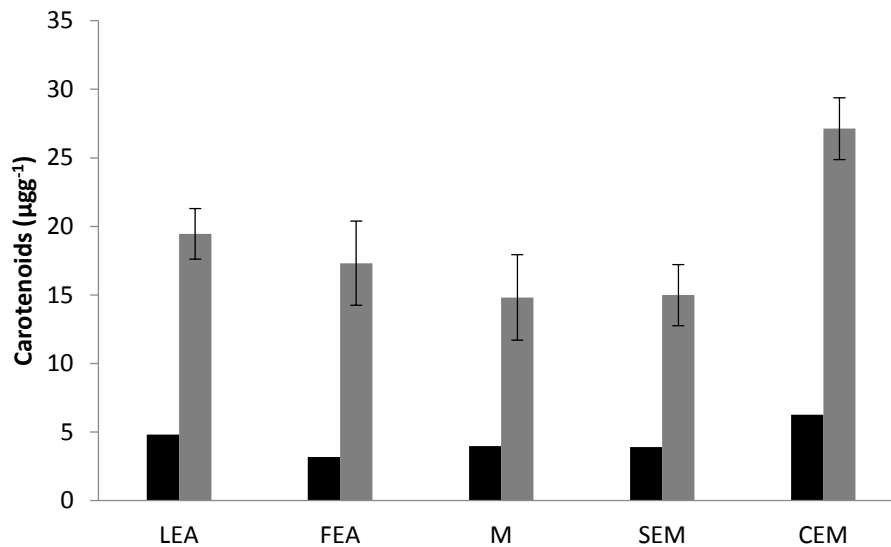


Figure 4.2. Total carotenoids in diets (black) and seahorses (grey).

The following chart (Fig. 4.3) shows the change of colour in seahorses fed on LEA along the entire experiment. In the beginning of the experiment (day 0), a turning point from which the yellowness (b^*) decreased down to a point, while redness (a^*) behaved opposite. During the first 30 days of the experiment, there was a period of adaptation to the new diet, where colour expression followed the above pattern and elapsed this time, only a reversal of the expression was observed. Until day 102, end of the main experiment (A), a clear increase in yellowness was observed, while the levels of redness decreased. To know the timing colour evolution, feeding was continued until a stable maximum, or plateau was observed at day 180 (B; 20.73 ± 3.85). When the maximum was reached, diet was changed again from LEA to M, showing again an inversion of red and yellow values in seahorses' skin until the last day of the experiment (C).



Table 4.4. Fish color parameters at the end of the experiment.

	I	LEA	FEA	M	SEM	CEM
a	5.28±1.54	4.55 ± 1.66	3.61 ± 1.35	4.64 ± 2.14	4.46 ± 1.35	5.34 ± 1.58
b	9.19±3.45	13.94±4.53	15.05±6.64	11.63 ± 5.17	10.48 ± 3.41	15.38 ± 5.1
L	30.37±2.52	32.97±3.00	34.18±6.46	30.73± 3.58	30.96 ± 2.65	33.20 ± 4.15
Hue	58.69±8.22	70.33±8.34 ^{ab}	75.23±5.8 ^a	66.73 ± 9.43 ^b	65.96 ± 6.21 ^b	70.29 ± 4.78 ^{ab}
Chroma	10.70±3.48	3.73±2.07	5.04±5.19	3.16 ± 2.27	3.32 ± 2.34	4.83 ± 3.83

Means with a common letter denote no significant differences.

I, Initial values; LEA, Life Enriched *Artemia*; FEA, Frozen Enriched *Artemia*; M, Mysis; SEM, Selco Enriched Mysis; CEM, Cyclop-eeze Enriched Mysis.

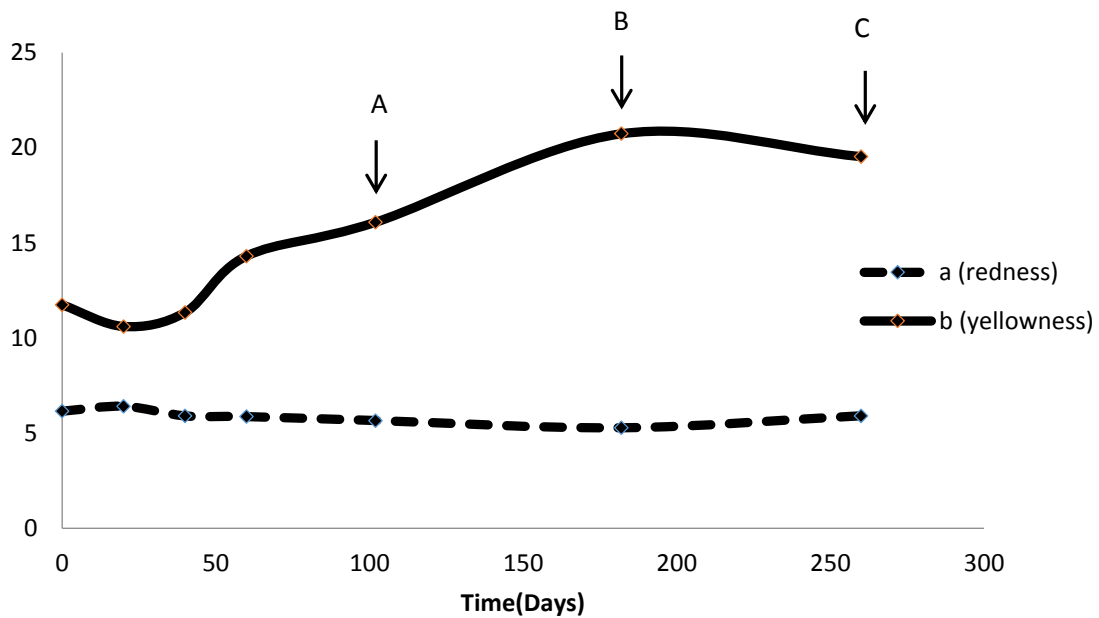


Figure 4.3. Variation of the mean values of a* (red) and b* (yellow) over time in seahorses fed live enriched *Artemia* (LEA). End of main experiment (A), maximum accumulation reached (B) and end of experiment (C).



4.6.- Discussion

Throughout the history of seahorse culture, different diets have been used to feed adult specimens, all based on different live or frozen preys such as amphipods (Murugan *et al.*, 2009), *Artemia* (Job *et al.*, 2002; Otero-Ferrer, 2012), live or frozen mysis (Woods, 2005; Otero-Ferrer *et al.*, 2012), and fish meal (Thangaraj and Lipton, 2008). In the present study, brine shrimp and mysis were chosen as they are the prey most commonly used for feeding seahorses species, although it is known that the nutritional *Artemia* profile both for adults and nauplii has nutritional deficiencies for marine species (Binh, 2012), particularly in essential n-3 highly unsaturated fatty acids (Conceição *et al.*, 2009). For this reason, these live feeds are normally enriched with highly unsaturated fatty acids and rich lipid emulsions, which in the digestive tract of the prey occupies a great volume of all of his own body (Stottrup and McEvoy, 2003).

All diets were well accepted since the start of the trial with no differences in fish growth responses. According to some other works done with same species, the lack of differences in growth observed in the present assay could be related to the low growth rate of seahorses as observed in other experiences with adult seahorses fed on wild mysis, enriched *Artemia* (Otero-Ferrer, 2012) or frozen mysis (Woods, 2005). Moreover, *H. hippocampus* is a temperate-cold water species has a metabolism slower than other seahorse species and with lower growth rate (with a SGR around 0.5), as observed in the period of larval development for *H. hippocampus* (Otero-Ferrer *et al.*, 2010) compared with that for *H. reidi* (Hora and Joyeux, 2009) and *H. guttulatus* (Palma *et al.*, 2011).



The body total lipid levels obtained in present study ranged between 1.23 and 3.10 g 100g⁻¹ wet weight, which are in agreement with those low values obtained by Lin *et al.* (2008b) in adult specimens of other species. Furthermore, it has been observed that the amount of lipids in adult seahorses (0.54±0.12%) is lower than in *H. hippocampus* newborn (2.95±0.22%) (Otero-Ferrer *et al.*, 2010), decreasing the total lipid content in larvae from birth as the individuals grow, as also observed in *H. guttulatus* by Faleiro and Narciso (2010). As other fish species, seahorses generally showed fish biochemical composition directly related to diet composition (Lee *et al.*, 2002; Orban *et al.*, 2007; Velu and Munuswamy, 2007), as seen with lipids in present experiment, showing a higher lipid content in those seahorses fed on diets with high lipid content. However, feeding diet M, with low lipid content (0.98±0.03%), seahorses got the higher fat content (0.75±0.16). This may be due to differences in quality of dietary lipids, better utilization of these lipids by this species or a better diet digestibility, leading to a decreased lipid content of *Artemia*-fed seahorses compared with those fed on mysis, in which content remains stable.

Regarding colour, it is well known according to other authors that there is a direct relationship between total carotenoid content of the diets and the fish body (Chebbaki 2001; Kalinowski *et al.*, 2005), normally up to a maximum (Mukherjee *et al.*, 2009), and not always directly related with an increase in colour expression, as observed in CEM (Fig. 4.2), as this character may vary between species and the nature of the pigments (Baron *et al.*, 2008). Additionally, not all fish species have the same metabolic pathways for carotenoids (Chatzifotis *et al.*, 2004). For example, adding astaxanthin and cantaxanthin to discus fish diets improves green and blue colours (Ako *et al.*, 2000). In present experiment, a slight visual colour



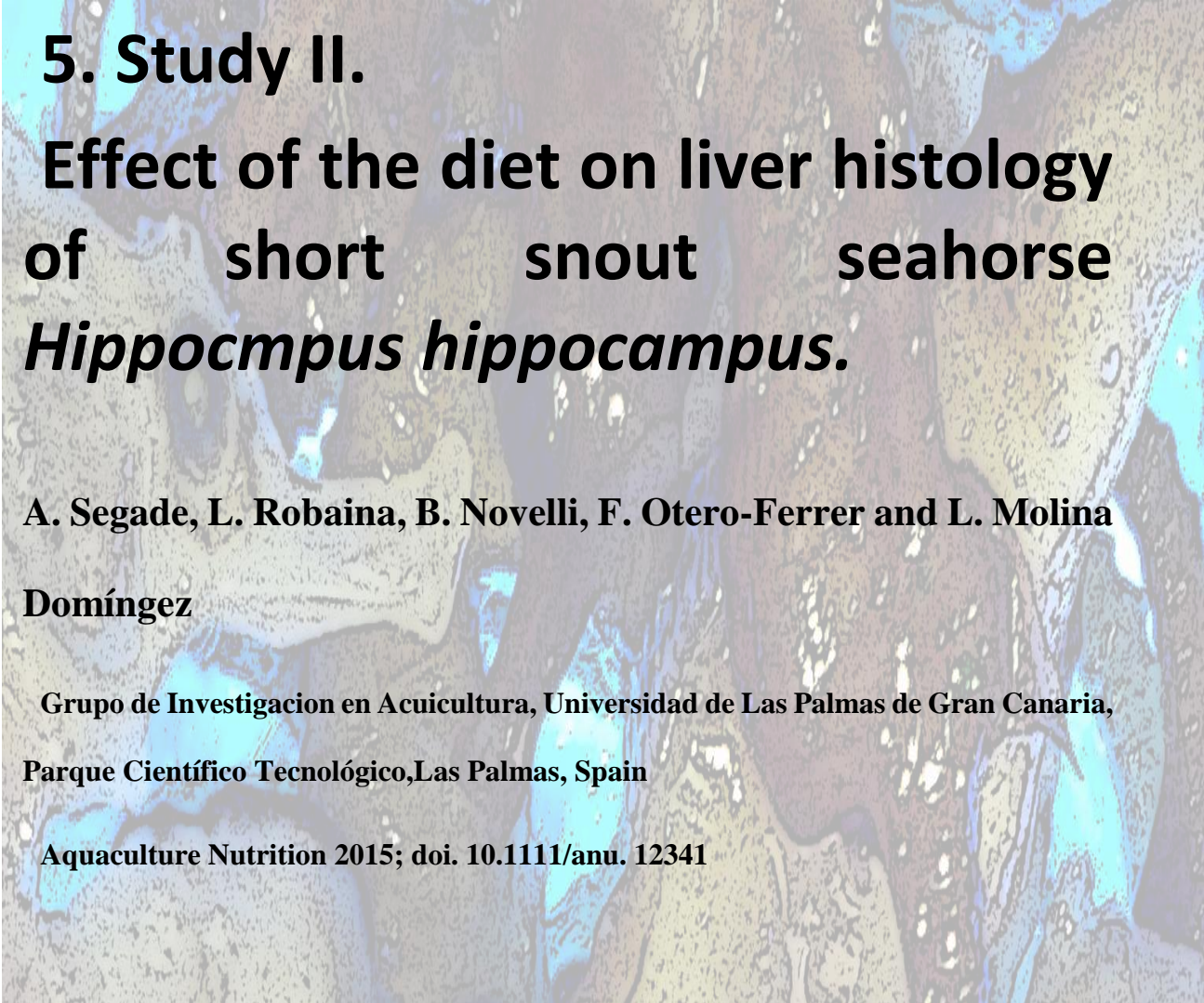
change could be observed, with an increasing of the yellowness in fish skin. According to this observation, seahorses seem to present greater ability to assimilate and express the yellow pigments respect to the red ones, although without significant differences between *Artemia* and mysis diets which supposed to content higher amount of red pigments. More specifically, in the case of seahorses fed on CEM, high levels of astaxanthin were observed (Fig. 4.2), but seahorses expressed yellow instead of red; which was also observed in yellowtail (Fujita *et al.*, 1983; Miki *et al.*, 1985). As seen in other experiments, due to mortality, similar number of fish per tank did not affect the observed differences in body colour (Van der Salm *et al.*, 2004).

Moreover, as it has been shown in other species, there is a feeding time to achieve a maximum colour expression, as it has been shown in *Pagrus pagrus* with 120–180 days (Kalinowski *et al.*, 2007), and similar in the case of *H. hippocampus* with proximately 180 days. Furthermore, it was observed that after a change of diet, seahorse metabolism goes through a period of approximately 30 days, during which they adapt to the new diet, as observed in the colour development. Likewise, as has been reported for other species, *H. hippocampus* showed a capacity of colour reversion that has been evident at 270 days, although from day 60, these changes were already observed de visu.

In conclusion, this work has shown that although seahorse accepts different enriched *Artemia* and mysis diets, no significant differences in growth were observed. The Selco enriched mysis diet did not improve mysis utilization. But adding Cyclop-eeze to mysis slightly improved growth and colour expression. Notable differences in fish biochemical composition and skin colour response should be expected. Seahorse body colour can be



visually modified by feeding different diets, as well as the whole body total carotenoids content. The maintenance of a stable adult brine shrimp culture is a tedious task. We must emphasize the importance of the good results obtained with frozen *Artemia*, therefore facilitates the storage of the prey once enriched. Further studies should be performed in order to better clarify the reported biochemical differences by feeding mysis or *Artemia* and to study the effects of different parameters concerning light, ambience or different type of carotenoids has on colour changes in seahorses.

The background of the page is a close-up photograph of a seahorse, showing its head, snout, and the beginning of its body. The seahorse is light-colored, possibly white or pale yellow, with some darker spots. The image is slightly blurred and has a soft, ethereal quality.

5. Study II.
**Effect of the diet on liver histology
of short snout seahorse
Hippocampus hippocampus.**

**A. Segade, L. Robaina, B. Novelli, F. Otero-Ferrer and L. Molina
Domínguez**

**Grupo de Investigación en Acuicultura, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,
Parque Científico Tecnológico, Las Palmas, Spain**

Aquaculture Nutrition 2015; doi. 10.1111/anu. 12341



Aquaculture Nutrition



5.1.- Abstract

Little is known about the nutritional requirements of ornamental fish and the effects, which they may have on fish histology. Because of this 45 young, captive-bred seahorses ($1.37g \pm 0.51$) were randomly divided and put into fifteen, 35-litre, glass aquariums. Three experimental diets were tested in triplicate: live enriched *Artemia* (LEA); frozen enriched *Artemia* (FEA), and commercial Mysis (M). Seahorses were fed twice daily, six days a week for 102 days throughout the experiment. The body weight and length of the seahorses were measured every 20 days, and at the end of the experiment fish liver samples were taken for histological studies. Biochemical analyses of the diets and the seahorses fed on the experimental diets were recorded and the differences in the total lipid content in each of the three diets were also observed, each reflecting their respective liver lipid content. Seahorses fed with LEA treatment showed lipid vacuoles in the hepatocytes with nuclei displaced to the periphery. Similar results were also observed in FEA fed seahorses, but to a lesser extent. In contrast, the M fed seahorses were characterized by having livers with lower size hepatocytes and centrally located nuclei.

5.2.- Resumen

Se sabe muy poco acerca de los requerimientos nutricionales de los peces ornamentales y los efectos que pueden tener en los peces a nivel histológico. Debido a esto 45 caballitos de mar jóvenes ($1.37g \pm 0.51$) fueron divididos aleatoriamente en 15 acuarios de vidrio de 35 litros. Tres dietas experimentales se probaron con triplicados: *Artemia* viva enriquecida (LEA), *Artemia* enriquecida y congelada



(FEA) y *Mysis* comerciales (M). Los caballitos se alimentaron dos veces al día, seis días a la semana durante 102 días de experimento. Cada 20 días se tomaban medidas de peso y longitud, y al final del experimento se tomaron muestras de hígado para su análisis histológico. Se llevaron a cabo análisis bioquímicos de las dietas y los caballitos y se observó el contenido lipídico de las dietas y los caballitos relacionándolo con el contenido de lípidos en el hígado. Los caballitos alimentados con LEA mostraron vacuolas lipídicas en los hepatocitos con el núcleo desplazado a la periferia. Resultados similares se obtuvieron en los caballitos alimentados con FEA, pero en menor medida. En contraposición, los caballitos alimentados con M se caracterizaron por tener un hígado con hepatocitos de menor tamaño y con el núcleo posicionado en el centro.

Key Words: seahorse, diet, liver, histology

5.3.- Introduction

The aquarium-related market makes millions of dollars around the world, not only through living organisms, but also through feeds, and technology associated, etc. Moreover, most live organisms involved in the marine aquarium trade, come from the wild. Over the last number of years, the ever-increasing demand has boosted the realization of research targeted at improving the production of ornamental marine organisms (Olivotto *et al.*, 2011). Although various studies have been carried out by both non-professionals and commercial companies, closing the biological cycle of some species has been achieved; however, their nutritional requirements still remain unknown. Consequently, commercial diets do not respond to the animals' needs; this having been pointed out by most experienced aquarists.



Besides, adverse physiological effects may result from the lack or excess of any nutrient in the diet.

Nutritional imbalances can cause immunosuppression and make specimens more likely to suffer other diseases. Thus, the lack of amino acids, fatty acids, essential minerals or vitamins can cause various effects such as scoliosis, lordosis, gill affections, etc. (Tacon, 1995). Similarly, it has been observed in several studies carried out on fish for human consumption that an excess of fat in diets can lead to liver abnormalities (Caballero *et al.*, 2004).

The liver is considered one of the first organs to identify histological biomarkers because of its central role in many metabolic functions, such as protein synthesis, accumulation of metabolites (Au, 2004), resulting from the widespread research which has been conducted concerning the effects of different types of oils on the morphology and fat deposition in the liver of many fish species (Bell *et al.*, 2001; Caballero *et al.*, 2004; Ruyter *et al.*, 2006). Lipid metabolism occurs mainly in the liver, and therefore imbalances of fatty acids in the diet could modify its morphology and may result in steatosis: an accumulation of lipids as vacuoles in the liver.

In recent years, some experiments have been conducted using various ingredients for the specific diet formulation for ornamental fish such as the Koi carp (*Cyprinus carpio*) (Vijayagopal *et al.*, 2008), the Striped Damsel (*Dascyllus aruanus*) (Vasudhevan *et al.*, 2009) or swordfish (*Xiphophorus helleri*) (James and Sampath, 2004). Moreover, the effect of a specific nutrient on certain factors such as growth, larval survival, and colour enhancement was tested on some species. For example, marigold petal meal was added to the swordfish diet to improve its pigmentation



(Ezhil *et al.*, 2008); Langroudi *et al.*, (2009) used enriched *Artemia* and vitamin C in order to improve the spawning in angelfish (*Pterophyllum scalare*); Sealey *et al.* (2009) tested different sources and amounts of protein in Neon Tetra (*Paracheirodon innesi*) diets. Nevertheless, knowledge of ornamental species is below that of fish for human consumption (Fraser *et al.*, 2009) and the requirements of most ornamental species remain unknown.

On the other hand, some fish species that are visual predators, such as seahorses (Job *et al.*, 2002; Woods, 2005) and do not accept dry food should be fed with live or frozen prey. Besides, all seahorse species have been included in Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES 2002) (González *et al.*, 2006), due to the status of populations in the wild. Therefore reproduction in captivity is considered as one of the potential solutions aimed at reducing the pressure on populations in the wild (Otero-Ferrer *et al.*, 2010) and respond to increasing demand in ornamental trade. If these fishes are provided with the necessary nutrients, the results become more complex and therefore their prey should be enriched in some way (Gonzalez *et al.*, 2003; Olivotto *et al.*, 2006; Palma *et al.*, 2011). Usually these enriched products provide very specific elements (fatty acids, minerals, vitamins, amongst others), and can cause deficiencies in other nutrients. Although the effects of different enriched prey concerning survival, growth and reproduction (Otero-Ferrer, 2012) have been studied within these species, the consequences the diet has on the digestive tract in these organisms are still unknown. The aim of this study is to observe the effects of different diets on the health of the seahorse (*Hippocampus hippocampus*), focusing



mainly on fatty acid analysis and histological analysis of the seahorse's digestive system.

5.4.- Materials and methods

5.4.1.- Seahorses and culture conditions

The experiment was conducted at the facilities belonging to the Parque Científico Tecnológico Marino (PCTM) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (Spain). Forty-five captive-bred seahorses (*H. hippocampus*) were used, with an average weight of $1.35 \pm 0.42\text{g}$. The seahorses were divided into 9 aquariums with a capacity of 34.96 l (23 x 40 x 38 cm), five animals per aquarium, each of them provided with holdfast elements. The aquariums were supplied with pre-filtered seawater, using physical and biological filtration (Riff 500, AquaMedic, Bissendorf, Germany) and sterilization by ultraviolet rays (UV) systems (TR 10 series, Teco, Ravenna, Italy). The inlet flow to the tanks was 30l/h and water was maintained throughout the experiment to $23.52 \pm 1.31^\circ\text{C}$ and $8.05 \pm 1.13 \text{ mg L}^{-1}$ of dissolved oxygen, with a photoperiod of 10 hours of light / 14 hours of darkness (T5 tubes, 24w and 10000K; AquaMedic, Bissendorf, Germany). Temperature, pH, salinity and aquaria water levels were monitored twenty-four hours a day and controlled by PC (AT-Control System, AquaMedic, Bissendorf, Germany © of North America)



5.4.2.- Diets and feeding

Three different diets were prepared and tested in triplicate groups of seahorses for 102 days. A control diet based on “Live 24 hours Selco® (INVE, Dendermonde, Belgium) Enriched *Artemia* (LEA)”, a second diet based on “Frozen 24 hours Selco® Enriched *Artemia* (FEA)”, and a third diet of “Frozen commercial mysids (Ocean Nutrition™, Essen, Belgium) (M)”. For the grown *Artemia*, *Artemia* cysts (INVE, Dendermonde, Belgium) were hatched in 5l tanks at a temperature of $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Subsequently nauplii were transferred to 50l fiberglass tanks with strong aeration and a temperature of $21 \pm 1^\circ\text{C}$. They were fed for 29 days with 2g daily of a mixture of Origo, yeast and *Nannochloropsis* sp. powder. The approximate composition is shown in table 1 and fatty acid profile is shown in Table 2, where high levels of monogenic fatty acids in both *Artemia* diets (LEA and FEA) can be observed. Seahorses were fed with 1g per day (around 15% of the overall biomass) in the corresponding diet; two equal meals (09:00 and 14:00) per day and 6 days per week. The feeding ratio was maintained around 15% of the overall biomass throughout the whole trial following the recommendations by other authors (Woods and Valentino, 2003; Woods, 2005; Palma *et al.*, 2008; Segade *et al.*, 2014).

Table 5.1. Biochemical composition (g kg^{-1} wet weight, media \pm standard deviation) of experimental diets

	LEA	FEA	M
Crude protein	47.4 \pm 1.2	56.1 \pm 3.3	95.5 \pm 6.5
Total lipid	20.2 \pm 0.5	14.0 \pm 1.2	9.8 \pm 0.3
Ash	0.7 \pm 0.1	5.3 \pm 0.3	14.8 \pm 1.6
Moisture	931.8 \pm 0.2	914.8 \pm 0.4	901.3 \pm 4.7

LEA, Live Enriched *Artemia*; FEA, Frozen Enriched *Artemia*; M, Mysids



5.4.3.- Sampling

During the experiment 5 sampling periods were performed between days 0 and 102. Thus, weight and length (Lourie *et al.*, 2004) measurements of all the seahorses were taken at the beginning of the experiment and on days 20, 40, 60 and 102. Besides, six individuals from each diet-group (two per aquarium) were randomly sacrificed on day 102 for ensuing analysis of the whole fish, and whose samples were stored at -80°C until a later corresponding date. Moreover, at the end of the experiment three seahorses from each diet-group were sacrificed for histological analysis.

5.4.4.- Biochemical analysis

Diets and entire seahorse body composition were analysed in triplicate for their total lipid content (Folch *et al.*, 1957) and fatty acid methyl esters according to the methodology described by (Christie, 1982; Izquierdo *et al.*, 1990).

5.4.5.- Histological analysis

Dissection was performed to extract the liver and gastrointestinal tract, which in turn, was divided into the anterior, middle and posterior intestine. The samples were conserved in 10% buffered formalin. For processing, the samples were dehydrated in alcohol gradients with a tissue processor (Jung Histokinete 2000, Leica, Germany), embedded in paraffin using an automatic dispenser (TES 99, Ponder, Sweden) and the blocks were cut with a microtome (Jung Autocut 2055, Leica, Germany) at 5 microns. The sections, which were obtained, were then stained with hematoxylin-eosin (Martoja and Martoja-Pierson, 1970).



The sections were examined and compared under a microscope (Olympus CX41, Olympus, Japan) and photographed with a lens (Olympus CX30, Olympus, Japan). During the observations, special attention was paid to the structure of hepatocytes and the presence of lipid absorption in enterocytes.

5.4.6.- Statistical analysis

Firstly, all data were tested for the normality and homogeneity of variance using the Kolmogorov-Smirnov and Levene test ($P < 0.05$), respectively (Zar, 2009). When necessary, data were processed to obtain a homogeneous variance. Differences between the seahorses fed on the three different diet groups were determined by one-way ANOVA, using the Tukey test for multiple comparisons. In all statistical analysis a significance level of 95% was tested by using a SPSS 15.0 statistical analysis pack.

5.5.- Results

After 102 days, no significant differences ($p \geq 0.05$) in length or weight between the diets were found as observed by Segade *et al.* (2014). The biochemical composition of the diets used is shown in Table 1 and 2. Referring to the composition of the seahorses as a whole, no significant differences were found amongst the animals fed on different diets in crude protein, ash and moisture contents at the end of the experiment ($p \geq 0.05$). However regarding the whole body lipid content, two groups were observed (Table 3): one of them showed significantly higher values for specimens fed on the mysid-based diet (Treatment 3) and a second group with lower values for *Artemia*-based diets (Treatments 1 and 2). Moreover, the lipid content of the seahorses was directly related ($r^2 = 0.96$) with their weight (Fig. 1), without any relationship with the lipid content of the diet.

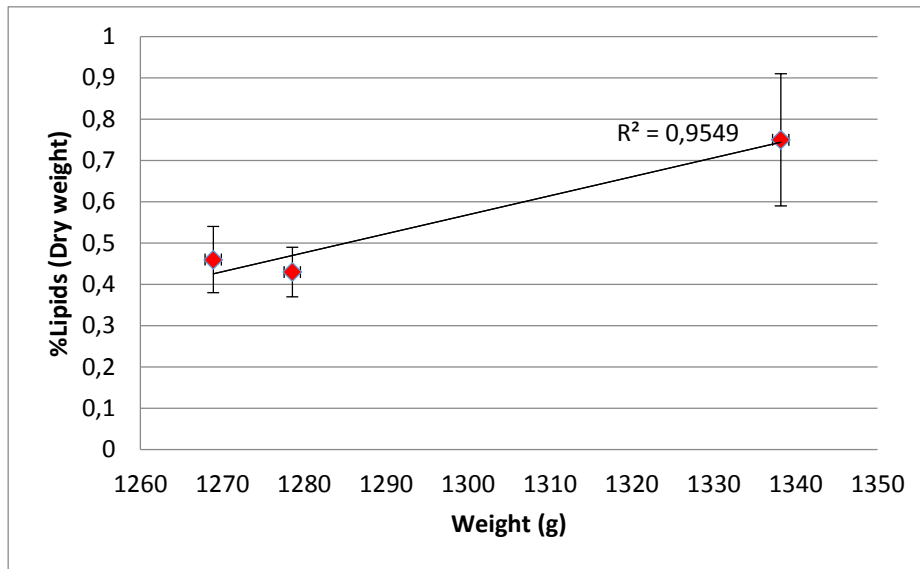


Figure 5.1. Relation between lipid percentage in seahorses and their weight ($p < 0.05$)

Table 5.2. Fatty acid composition (g kg^{-1} of wet weight) and their main relation in the three different diets.

	LEA	FEA	M
AA	20.6	20.9	26.2
DHA	60.4	83.5	63.3
EPA	103.7	102.2	114.7
Linolenic	60.7	50.4	31.9
Linoleic	118.3	114.4	30.6
Oleic	229.3	230.7	94.4
AA/EPA	0.20	0.20	0.23
EPA/DHA	1.72	1.22	1.81
Oleic/DHA	3.80	2.76	1.49
Oleic/n-3HUFA	0.92	0.88	0.39
n-3/n-6	1.62	1.74	2.71
PUFA n-3+ n-6	40.19	41.34	32.89

LEA, Life Enriched *Artemia*; FEA, Frozen Enriched *Artemia*; M, Mysis; AA, Araquidonic Acid; DHA, Docosahexaenoic Acid; EPA, Eicosapentaenoic Acid



Table 5.3. Biochemical composition (g kg⁻¹ of fatty acid wet weight; media \pm standard deviation) of seahorses fed on the different experimental diets.

	LEA	FEA	M
Crude protein	147.0 \pm 16.9	137.3 \pm 4.8	147.6 \pm 1.6
Total lipid	4.6 \pm 0.9 ^b	4.3 \pm 0.6 ^b	7.5 \pm 1.6 ^a
Ash	147.1 \pm 1.9	135.5 \pm 10.6	115.2 \pm 13.6
Moisture	725.3 \pm 58.1	709.1 \pm 12.3	711.7 \pm 22.8

Means with a common letter denote no significant differences ($p < 0.05$)

LEA, Life Enriched *Artemia*; FEA, Frozen Enriched *Artemia*; M, Mysis

Regarding the fatty acid profile of the seahorses, there were significant differences in the content of oleic and linolenic acids and DHA between seahorses fed on different diets (Table 4), being DHA the only fatty acid, which related to the diets they had been fed on. Levels were significantly higher ($p > 0.05$) for those seahorses fed on LEA.



Table 5.4. Analysis of variance (ANOVA) of the main fatty acids (% of total \pm SD) and their relation in the whole body composition in seahorses fed different diets, $p < 0.05$

Fatty acid	LEA	FEA	M
AA	33.1 \pm 0.0.1	42.5 \pm 01.7	34.2 \pm 13.1
DHA	185.2 \pm 1.1.9 ^a	119.1 \pm 15.9 ^b	106.8 \pm 8.5 ^b
EPA	53.7 \pm 7.0	38.3 \pm 1.9	37.5 \pm 1.5
Linolenic	28.7 \pm 0.2.3 ^a	21.5 \pm 02.2 ^{ab}	14.7 \pm 3.2 ^{ab}
Linoleic	48.5 \pm 7.3	101.6 \pm 2.8	66.6 \pm 41.9
Oleic	158.3 \pm 0.3.8 ^b	207.0 \pm 9.8 ^a	201.7 \pm 20.4 ^a
AA/EPA	0.62 \pm 0.08	1.11 \pm 0.10	9.1 \pm 3.9
EPA/DHA	0.29 \pm 0.02 ^{ab}	0.32 \pm 0.06 ^{ab}	3.5 \pm 0.4 ^{ab}
Oleic/DHA	0.85 \pm 0.08	1.74 \pm 0.32	18.9 \pm 0.4
Oleic/n-3HUFA	0.51 \pm 0.05 ^c	0.97 \pm 0.09 ^a	10.6 \pm 0.4 ^a
n-3/n-6	2.88 \pm 0.43	1.33 \pm 0.07	16.2 \pm 7.2
PUFA n-3+ n-6	418.3 \pm 1.5.7	372.9 \pm 9.5	308.6 \pm 65.4

Means with a common letter denote no significant differences ($p < 0.05$).

LEA, Life Enriched *Artemia*; FEA, Frozen Enriched *Artemia*; M, Mysis; DHA, Docosahexaenoic Acid; EPA, Eicosapentaenoic Acid; HUFA, High Unsaturated Fatty Acids; PUFA, Poly-Unsaturated Fatty Acids

Regarding the histological study, after sacrificing the seahorses, the liver and digestive tract were macroscopically identified and extracted. A long digestive system devoid of stomach was observed, in which the only difference between the three diets were their constituents. A lobed liver, bright orange in colour and slightly elongated in shape was observed, showing no appreciable macroscopic differences between the different diets (Fig.2).

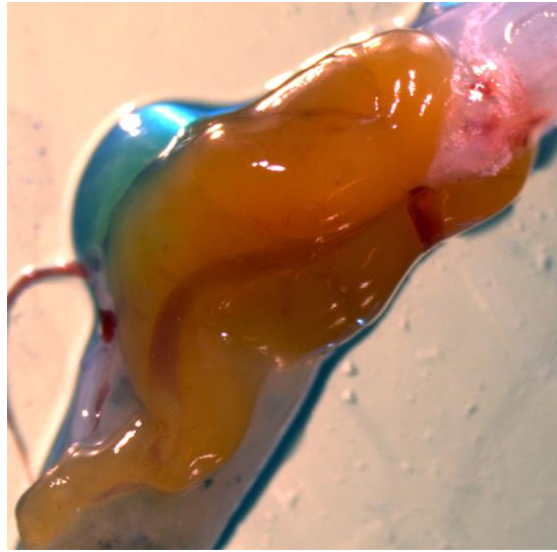


Figure 5.2.Image of a seahorse liver

In the intestine, lipid absorption by the enterocytes and many goblet cells were observed, but no differences between the seahorses fed on the different diets were detected. However, through and up till the midgut belonging to the seahorses fed on LEA, whole undigested *Artemia* was observed (Fig. 5.3), whereas, in the intestine of seahorses fed on M, no diet residues were found in the midgut.

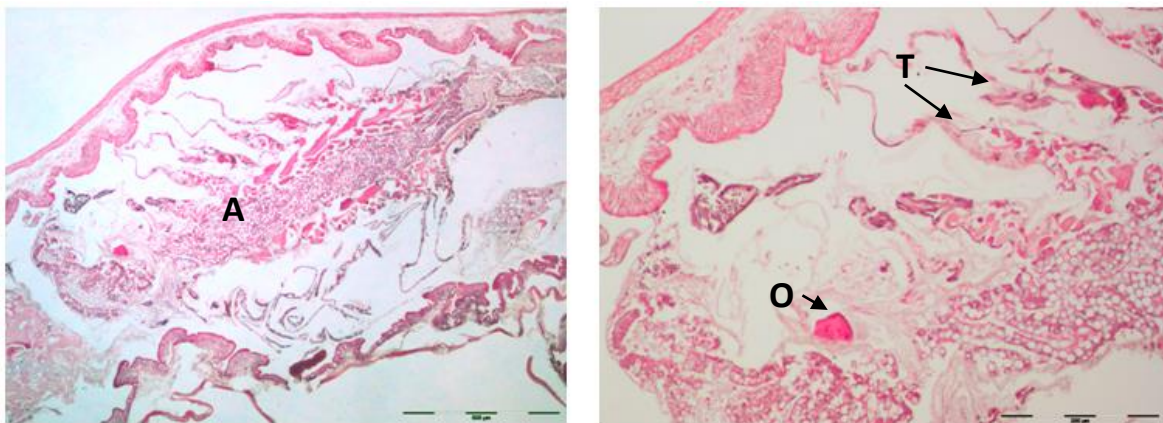


Figure 5.3. Image (4x, bar = 500 μ m) midgut with a whole *Artemia* (left) and detail (10x, bar = 200 μ m), revealing the eye, thoracopods and one antenna of *Artemia* (right). (H & E staining). A, *Artemia*; E, Eye of *Artemia*; T, Thoracopods.



The existence of a hepatopancreas was confirmed, with very dense liver tissue (Fig. 5.4). Although no macroscopic differences were discernible, there were clear differences between the livers of the seahorses fed on the 3 diets (LEA, FEA and M). The livers of the seahorses fed on FEA and LEA, showed lipid accumulation (this being slightly higher in LEA), subsequently, the hepatocytes exhibit lipid vacuoles and peripheral displacement of the core; whereas, in the livers from the seahorses fed on the M diet showed small circular hepatocytes with the core located in the centre of the cell (Fig. 5.4).

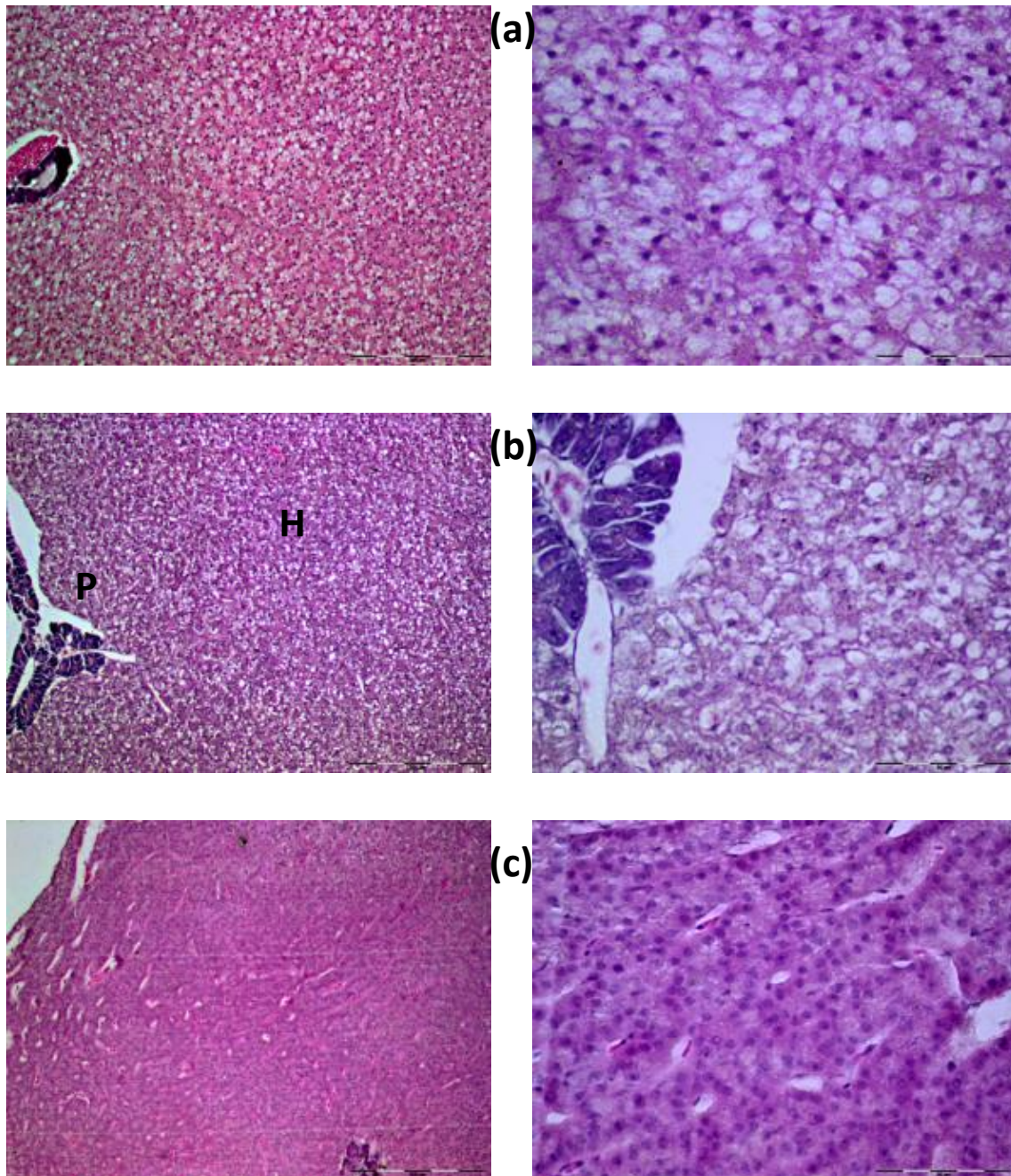


Figure 5.4. Seahorse liver at the end of the experiment: a) Diet LEA (Live enriched *Artemia*. x10, bar = 200 μ m and x40, bar = 50 μ m) shows many lipidic vacuoles; b) Diet FEA (Frozen enriched *Artemia*. x10 and x40) shows hepatic cells (H) surrounding pancreas (P) and many lipidic vacuoles; c) Diet M (Frozen mysis. x10 and x 40), shows a liver with all the hepatocytes with centered nuclei. (Staining: H&E)



5.6.- Discussion

Much progress has been made concerning aquaculture nutrition in fish for human consumption. There have been multiple species-specific experiences to discover their nutritional requirements (Tibaldi *et al.*, 1994; Schuchardt *et al.*, 2006) and both beneficial and harmful effects that may have been due to the different ingredients incorporated into the diets (Cahu *et al.*, 1999; Yigit *et al.*, 2012). However, in the case of aquaculture of ornamental species, little is known about their nutritional requirements and the effects of diets on the organism. In this experiment we wanted to evaluate the effect of three different diets on seahorse lipid composition and digestive system histology. Thanks to the tests carried out, we have confirmed the absence of any stomach and the benefits associated with the freezing of *Artemia*. But in turn, it was concluded that the enrichment used was not adequate for this organism.

Recent publications refer to the use of different diets for feeding seahorses. Job *et al.* (2002) used wild plankton during the larval development stage, which subsequently is eliminated from the diet for feeding seahorses with *Artemia nauplii* and wild mysids in later life stages (Otero-Ferrer *et al.*, 2010; 2012). Moreover, Woods in 2005 carried out an experiment to find the ideal ration for *Hippocampus abdominalis*, using frozen mysis. In this study we chose *Artemia* and *mysis* enriched with different commercial products. The choice of *Artemia* is due to the fact that in the recent history of aquaculture, live prey has been the most commonly used for the culture of different ornamental species (Naz and Türkmen, 2009; Gomez-Requeni *et al.*, 2010; Palma *et al.*, 2011; Jafari *et al.*, 2011; Tziouveli *et al.*, 2012; Segade *et al.*, 2014). *Artemia* is an organism which is easily grown, relatively cheap



and can be used by means of biocapsules that can be enriched and used as a vehicle for different substances, such as nutrients, pigments and even antibiotics (Gomez-Gil *et al.*, 2001; Gelabert, 2003). Furthermore, frozen mysids are commercially available and have been widely used as *Artemia* for growing ornamental species with more-than-satisfactory results (Olivotto *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2007; Roopin *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2009). Mysids are also an interesting foodstuff for commercial producers who want to sell seahorses capable of feeding on inert prey (Woods, 2005).

The absence of differences in growth was similar to that observed by Segade *et al.* (in press) The low levels of total lipids in seahorse body content obtained in this investigation correspond to those observed by Lin *et al.* (2008) in wild adult specimens from other species. Furthermore, it has been observed that the amounts of lipids in adults ($5.4 \pm 1.2\text{g kg}^{-1}$) were below those found in the larval and young *H. hippocampus* ($29.5 \pm 2.2\text{g/kg}^{-1}$) (Otero-Ferrer *et al.*, 2010), reducing the total lipid content in larvae from day zero as time progresses, as observed in *H. guttulatus* by Faleiro and Narciso (2010). Comparing the nutrient content of the diets and the seahorses fed on them, generally fish composition is directly related to the diet composition, as seen in lipid contents of this experiment, showing a higher lipid content in those seahorses fed on diets with a higher lipid content (Lee *et al.*, 2002; Orban *et al.*, 2007; Velu and Munuswamy, 2007). There was an exception: the mysids diet, characterized by having a low lipid content, gave rise to the higher fat content in animals. This could be due to the lipid quality, their assimilation by seahorses and the possibly higher digestibility of this kind of diet. Due to the fact that the seahorses were being fed on mysids before starting the experiment, didn't



result in those fed on mysids modifying their initial lipid content, unlike *Artemia*-based diets for which lipid values were significantly lower than the initial value, accompanied by accumulation of fat in the liver. On the other hand, as discerned by Segade *et al.* (in press) their body lipid content was directly related with the seahorses' weight ($r^2=0.96$) (Fig.1), but not related to dietary lipid content ($r^2=0.57$; $p < 0.05$).

The use of mysids, specifically, in relation to DHA showed a 66% increase of this fatty acid. In contrast, concerning the *Artemia*-based diets, there are differences between both, so in the Life Enriched *Artemia* diet, DHA levels rose by 200% over time, whereas in FEA, there was only a 37% increase compared to baseline values. These results may be due to the differences in digestibility of both treatments, as observed in the histological analysis. Whole *Artemia* appeared in the tract of seahorses fed on Life Enriched *Artemia* and not on Frozen Enriched *Artemia*, suggesting that there is low digestibility of the first as opposed to the latter. This fact could lead to an accumulation of DHA as a backup source as described by other authors (Izquierdo, 1996; Izquierdo *et al.*, 1990; Otero-Ferrer *et al.*, 2010; Van der Meeren *et al.*, 1993). It is likely that, by freezing the *Artemia* results in a rupture of the structures and tissues that would improve digestibility by means of this diet.

Furthermore, in reference to the EPA, a decrease between the diet content and the seahorse is obtained. It has already been widely documented that this fatty acid is used as an energy source, compared to DHA which tends to be preserved as demonstrated in subadults in the present study. Moreover, there are some major differences in the content of linoleic acid between *Artemia*-based diets and mysids, with a high content of this fatty acid in the former, possibly due to the presence of



terrestrial plant sources in the feed given to the *Artemia* to grow. Moreover, the observed differences for diets based on *Artemia*, could also related to the high levels of HUFA diets containing 200g kg⁻¹, in contrast to what was observed in wild prey such as mysids, with a 42g kg⁻¹ (Otero-Ferrer et al., 2010). These facts suggest that neither live *Artemia* nor commercial enriching is the ideal food for seahorses. As already illustrated, the seahorse has no stomach (Lourie et al., 2004); it is possible that because of this their digestive capacity is weaker so it was possible to find traces of undigested food in the digestive tract. In connection with lipid content of the diets, in both diets with greater lipid values (LEA and FEA), lipid deposition increased in the liver of the seahorses, which could be observed in the corresponding stains (Fig 3). This fact cannot be considered as pathological, since the accumulation may be an adaptive response to an excess of lipids, which accumulate and create an energy reservoir (Mosconi-Bac, 1987). To determine if their existence could be considered as a nutritional pathology, electronic microscopy analysis should be carried out to observe the hepatocyte cell structure (Strüssmann and Takashima, 1990). Seahorses fed on a diet of Mysids, had a liver without signs of fat accumulation. This could be affected by two factors, the first of which would be due to the low levels of lipids in the diet, leading to its immediate use as an energy source (Caballero *et al.*, 1999; Figueiredo-Silva *et al.*, 2005), and a second factor that relates the phosphorus content of the diet with fat deposition, since this element can cause a slight decrease in fat accumulation in the liver (Robaina *et al.*, 1998).

In conclusion, we have observed that seahorse lipid content is directly related to its weight, this being lower than for larvae of the same species. Histological analysis



showed that the seahorse has a hepatopancreas with a large number of small hepatocytes. We may say that the requirements of lipids in the diet of this species are low, because a high lipid content causes lipid accumulation in the liver, forming large number of vacuoles. In turn, the quality and availability of dietary lipids affect the animals' fat content, resulting in differences in the use and deposition of fatty acids. And finally, by freezing *Artemia* after enrichment improves the use of the diet compared to the Live Enriched *Artemia* due to the rupture of structures that facilitate their digestibility. Bearing in mind the above, similar studies with different enriching should be conducted, to thereby further improve the techniques of this culture and fight against overexploitation of these organisms.

6. Study III.

Incorporation patterns of fatty acids and carotenoids in adult *Artemia franciscana* fed with 5 different enriching products.

Segade A.¹, Robaina L.¹, Martinez I.², Packard T.T.², Gómez M.², Molina L.¹

(1) Grupo de Investigación en Acuicultura, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Parque Científico Tecnológico, Las Palmas, Spain

(2) Grupo de Ecofisiología de Organismos Marinos (EOMAR). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain



6.1.- Abstract

Artemia is the most used living organism as prey in aquaculture. Because of their poor nutritional profile there are different commercial and handmade enrichment products, which improve their biochemical composition depending on the final objective. In this experiment adult *Artemia* (8.81 ± 0.95 mm) was enriched with 5 different products and doses: S, DHA Easy Selco® (0.6g/l); SK06, a mix of 0.6g/l of Selco® with 0.6 g/l of Superba™; SK03, a mix of 0.6g/l of Selco® with 0.3 g/l of Superba™, SM06 a mix of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of mussel oil and SM03, a mix of 0.6g/l of Selco with 0.3g/l of mussel oil. *Artemia* initial samples were taken, and then every hour, until 8 hours from each treatment and finally one last sample at 24 hours. Total carotenoids and fatty acid methyl esters were extracted from samples.

In all five treatments both fatty acids and pigments increased in the first hour, and may be related to a rapid filling of the digestive tract of *Artemia*. In addition EPA / DHA ratios are higher in the SK06 and SM06 treatments, and correlation is higher in the first one ($r^2 = 0.977$) because it is more stable over time. In addition, breathing analysis techniques confirmed that the *Artemia* begins to assimilate the enriching around 5 hours of enrichment. After 24 hours the concentration of all elements decreases to approximately baseline values, which may be due to depletion in rich culture medium.

6.2.- Resumen

La *Artemia* es el organismo vivo más utilizado como presa en acuicultura. Debido a su pobre valor perfil nutricional existen diferentes productos enriquecedores comerciales y experimentales, que mejoran su composición bioquímica



dependiendo del objetivo final. En este experimento se enriqueció *Artemia* adulta (8.81 ± 0.95 mm) con 5 productos y dosis diferentes: S, DHA Easy Selco® (0.6g/l); SK06, una mezcla de 0.6g/l de Selco® con 0.6 g/l de Superba™; SK03 una mezcla de 0.6g/l de Selco® con 0.3 g/l of Superba™; SM06, una mezcla de 0.6g/l de Selco con 0.6g/l de aceite de mejillón y SM03, una mezcla de 0.6g/l de Selco con 0.3g/l de aceite de mejillón. Se tomaron muestras iniciales de *Artemia*, y cada hora, hasta las 8 horas de cada uno de los tratamientos, así como una muestra final a las 24 horas. De las muestras se extrajeron los carotenoides totales y metilésteres de ácidos grasos.

En los 5 tratamientos tanto los ácidos grasos como los pigmentos incrementaron en la primera hora, y puede ser debido a un llenado rápido del tracto digestivo de la *Artemia*. Además los ratios EPA/DHA son mayores los tratamientos SK06 y SM06, y la correlación es mayor en el primero ($r^2=0.977$) debido a que es más estable en el tiempo. Por otra parte las técnicas de análisis de la respiración confirmaron que la *Artemia* comienza a asimilar los enriquecedores alrededor de las 5 horas de enriquecimiento. Tras 24 horas la concentración de todos los elementos disminuye aproximadamente hasta los niveles basales, lo que puede deberse a su agotamiento en el medio de cultivo.

Key Words: *Artemia*, enrichment, carotenoid, fatty acid

6.3.- Introduction

Different types of live prey have been used throughout the history of aquaculture (copepods, rotifers, nematodes, amphipods, *Artemia*...). These organisms have been mainly used to feed larvae (Sorgeloos *et al.*, 2001) and juveniles of different fish species and crustaceans, such as halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) (Olsen *et*



al., 1999) or whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) (Sanudin *et al.*, 2014). Besides, some organisms do not accept dry food or prefer live or frozen prey at certain stages of development. For example seahorses are often fed on planktonic organisms, mainly mysis (Woods, 2005; Otero- Ferrer *et al.*, 2012), although other researchers have used amphipods (Murugan *et al.*, 2009) or rotifers (Fulks and Main, 1991). But the most commonly used prey is *Artemia* (Job *et al.*, 2002). It has been observed that coho salmon (*Oncorhynchus kisuth*) initially fed on adult *Artemia* grows significantly faster compared to those fed with commercial diets (Kim *et al.*, 1996). Similarly, there are problems in culturing the *Octopus vulgaris*, because their paralarvae must be fed on live prey; this problem has been solved by feeding them *Artemia* and *Maja zoeae* (Iglesias *et al.*, 2004; Viciano *et al.*, 2011). Also many crustacean species are often fed on adult *Artemia* at some stage in their life (Nair *et al.*, 1995; Tong *et al.*, 1997; Ruscoe *et al.*, 2004; Ut *et al.*, 2007). Having in mind all the above, it should be noted that *Artemia* is possibly the most widely used live prey in aquaculture; this is due to its availability, price, and ease of cultivation and enrichment.

However, it is known that *Artemia* has nutritional deficiencies, consequently research is on-going to improve its biochemical composition. Different experiments have been carried out to understand its physiology and its fate as a prey organism (Navarro *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2002; Gelabert, 2003), resulting in many different types of enrichment and concentrations used. A widely applied term that refers to the enrichment of *Artemia* is bioencapsulation. This is because *Artemia* may not change its biochemical profile by itself, although their gut content can be manipulated by the investigator. The volume occupied by the *Artemia* digestive tract is moreover very large. Thus, *Artemia* can be used as a vehicle to feed different



organic compounds to prey organisms (González *et al.*, 2003; Palma *et al.*, 2011). Different metabolites from fatty acids to antibiotics such as erythromycin or enrofloxacin have been used (Gomez-Gil *et al.*, 2001; Cook and Rust, 2002).

Artemia is widely used for feeding ornamental fish (Lim *et al.*, 2001 and 2003) whose color directly affects their price (Wabnitz *et al.*, 2003). For this reason, there is a strong interest in the ornamental-fish business to enhance fish coloration through nutrition. It would be economically beneficial if different pigments could be fed to fish via its prey. Unfortunately, *Artemia*, itself, is not highly pigmented and there are no enrichments, including pigments, that will improve *Artemia*'s coloration. However, an alternative solution would be to feed pigments to fish via encapsulation in *Artemia*.

In the interests of efficiency and economy, it is important to assess the transfer efficiency of organic enrichments, from their original strength or concentration, to the predator species (target). One question that arises is, "Are the enrichments being metabolized?" Are the *Artemia* converting them to CO₂, organic carbon, and energy? Do the enrichments stimulate respiration above background or control levels? To answer these questions measure both respiration and the respiratory potential in *Artemia* fed with a nutritional supplement are necessary. Respiration is a good index of physiological activity and energy production in all zooplankton (Gómez *et al.*, 1996) including *Artemia*. Its biochemical basis, as well as its potential, is the respiratory ETS (electron transport system) activity. It is life's universal foundation of energy production (Lane, 2005). In plankton it is used to calculate the "potential" respiration (Φ) (Packard and Gómez, 2008), respiration,



living biomass, and heterotrophic energy production (Packard *et al.*, 2015); thus could be used in present case to determine *Artemia* metabolism index.

The aim of present work was to investigate this approach. Two pigmented, lipid-rich, commercial enrichments were tested for their accumulation in, and metabolic impact on, *Artemia*, to better promote the efficiency of nutrient transport in this commonly used live prey.

6.4.- Materials and methods

In this experiment *Artemia* cysts were hatched in 5L tanks at a temperature of $27\pm 1^\circ\text{C}$. Subsequently nauplii were transferred to 50L fiberglass tanks with strong aeration and a temperature of $21\pm 1^\circ\text{C}$. They were fed for 29 days with 2 g daily of a mixture of ORIGO, yeast and *Nannochloropsis* sp. powder (1:1:1 ratio). When the *Artemia* reached an average size of 8.81 ± 0.95 mm, they were rinsed and divided into 45 tapered containers (9 per treatment) 1L capacity and provided with strong aeration and natural photoperiod of 11h of light.

For this test 5 different enrichment were used: (S) DHA Easy SELCO[®] (INVE, Dendermonde, Belgium) (0.6g/l) as control enrichment; (SK03) a mixture of 0.6g/l of SELCO[®] with 0.3 g/l of Superba[™] (Aker BioMarine AS, Fjordalleen, Norway); (SK06) a mixture of 0.6g/l of SELCO with 0.6g/l of krill oil ; (SM03) a mixture of 0.6g/l of SELCO with 0.3 g/l of mussel oil and (SM06) a last mixture of 0.6g/l of SELCO with 0.6g/l of mussel oil. SELCO and krill oil are commercial products, but mussel oil was extracted in our laboratory from frozen mussels (*Mytilus galloprovincialis*). To do this, mussels were cut into small pieces and dried at 30°C for 48 hours. After being dried, mussels were ground and lipids and pigments were



extracted, under vacuum, with chloroform (3/1 L/g; 3 consecutive times). Solvent was finally removed with a rotary evaporator in a thermostatic bath at 30°C to obtain the mussel oil.

6.4.1.- Sampling

Samples were taken at the beginning, every hour for the first 8 hours, and then at the end of each of the five 24 h experiments. Photos of the *Artemia*'s gut were taken from each sample in order to observe the filling process of the digestive system. A duplicate sample was rinsed with distilled water; dried with absorbent paper, quick frozen, and stored at -80°C.

For the respiration experiments, after 24 h of starvation, *Artemia* was incubated in SELCO. Respiratory oxygen consumption was monitored by oxygen electrodes for 6 hours. Parallel samples were taken from *Artemia* kept under identical conditions every half hour. They were frozen in liquid nitrogen for ETS and protein analysis.

6.4.2.- Biochemical analysis

Enrichment products and enriched *Artemia* were analyzed for protein, moisture and ash content according to AOAC (2010). For total lipid extraction the Folch *et al.* (1957) procedure was used and for fatty acid methyl esters the methodology described by Christie (1982) and Izquierdo *et al.* (1990) was used. Carotenoids were extracted according to Scheldt *et al.* (1995). For carotenoid quantification in n-hexane, the absorbance was read at $\lambda = 470\text{nm}$ using $E_{1\%, 1\text{cm}} = 2100$ (Britton, 1995). It was expressed as asthaxanthin equivalent using the following equation:

$$\text{Mg g}^{-1} \text{ sample} = 10\,000 * V * A/W * E_{1\%, 1\text{cm}}$$



where V is the total volume of the extract (mL), W is the weight of the sample (g), A is the absorbance and $E_{1\%, 1\text{ cm}}$ is the extinction coefficient.

6.4.3.- Respiratory oxygen consumption

Respiration values, in $\mu\text{LO}_2\cdot\text{h}^{-1}$, were obtained with a clark-type oxygen electrodes (Strathkelvin 928 6-Channels Oxygen System). The organisms were incubated in 60ml glass bottles, 6 individuals per bottle and monitored during 6h in the dark under controlled temperature ($\sim 22^\circ\text{C}$). The O_2 consumption rate was determined as the slope of the oxygen time-course by linear regression analysis. These values were corrected for the signal obtained in bottles with only SELCO solution (blank) and no *Artemia*. After incubation, *Artemia* were filtered out, frozen in liquid nitrogen (-196°C), and stored at -80°C for ETS and protein analyses.

6.4.4.- ETS activity and potential respiration

Potential respiration (Φ), in $\mu\text{LO}_2\cdot\text{h}^{-1}$, was determined by the Gómez *et al.* (1996) version of the original ETS assay (Packard *et al.*, 1971; Owens and King, 1975). Samples were homogenized for 2 min in a teflon-glass tissue grinder in 1-2 ml of Tris solution (100mM; pH8.5). After centrifugation (10min, 0°C , 4000rpm), a 200 μl subsample of the supernatant fluid was added to a reagent solution (600 μl ; pH8.5) composed of Na_2HPO_4 , 0.1M; KH_2PO_4 , 0.1M; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 75 μM ; PVP, 1.5mg/ml; Tritón X-100, 2ml/l with NADH (1.7mM; Sigma-N8129) and NADPH (0.25mM; Sigma-N1630) enzyme substrates. Finally, 200 μl of INT (p-Iodonitrotetrazolium Violet, Sigma-I8377) was added and the formazan production was kinetically monitored during 8 minutes at 490nm and controlled temperature (22°C). A blank, for each sample without substrates, was run. Φ was calculated from the expression:



$$\Phi = [(A \times V_R)/(V_{ext} \times E)] \times H$$

where A is the formazan production rate in a spectrophotometer cuvette (absorbance per minute per centimeter pathlength), V_R is the total volume of the reaction mixture (1 mL), V_{ext} is the subsample volume used in the reaction (0.2 mL), E is the value of the specific absorptivity of the INT formazan in absorbance units ($15.9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) and H is homogenate volume (mL).

6.4.5.- Statistical analysis

To study the accumulation of nutrients in *Artemia*, a two-way analysis of variance (Two way ANOVA) was performed. Time and enrichment were used as fixed factors. All statistical analysis were tested at 0.05 significance level using the SPSS statistical package (SPSS for Windows 11.5; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Respiration and potential respiration data were analyzed using oneway ANOVA analysis with R program (v3.0.2, 2013, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).



6.5.- Results

Biochemical analysis showed no significant differences in protein, ash, moisture and total lipid contents ($p>0.05$) between *Artemia* fed on different enriching products (Table 6.1). Likewise there were no variations in time of these contents during the experiments. After comparing the *Artemia* carotenoid content of the 5 treatments in each of the sampling points, it was observed that SM03 and SM06 carotenoid content was always significantly higher. The SELCO enriched *Artemia*, although not always with significant differences, had the lowest total carotenoid content (Table 6.2). The accumulation of the main fatty acids (docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA), and arachidonic acid (AA) (Figs. 6.1, 6.2 and 6.3), has a similar trend to that for total carotenoid content (Fig. 6.4). There is a rapid accumulation during the first 2 hours, followed by a decaying oscillation during the next 3 hours and a second accumulation peak lower than the first one around the 8 hours. Moreover, considering the EPA/DHA ratio, the lowest values were obtained with SELCO enriched *Artemia* while the highest values were obtained with mussel-oil based enrichment products. Finally *Artemia* enriched with SK03 and SK06 reached the most stable ratio over time (Fig. 6.5).



Table 6.1. Proximate composition (% wet weight) of *Artemia* enriched with five experimental products.

	S	SK03	SK06	SM03	SM06
Crude protein	5.54	5.45	5.62	5.50	5.48
Lipids	1.53	1.43	1.35	1.24	1.57
Ash	1.10	1.15	1.07	1.20	0.95
Moisture	91.22	91.24	91.02	90.95	91.12

Means without letter denote no significant differences.

S, Selco; SK03, mixture of 0.6g/l of Selco with 0.3g/l of krill oil; SK06, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of krill oil; SM03, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.3 g/l of mussel oil; SM06, mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of mussel oil.

Table 6.2. Total carotenoid concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$) in *Artemia* enriched with five experimental products along 24 h enrichment.

	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	24h
S	4.33±0.48 ^a	3.31±0.82 ^a	3.23±0.51 ^a	3.23±0.63 ^a	2.66±0.06 ^a	3.21±0.07 ^a	4.16±0.91 ^a	4.10±0.44 ^b	3.27±0.16 ^a
SK03	6.06±0.39 ^b	5.3±0.71 ^b	3.96±0.18 ^a	3.76±0.04 ^a	3.84±0.17 ^a	3.78±0.31 ^a	5.58±0.64 ^b	4.77±0.75 ^b	3.83±0.06 ^{ab}
SK06	5.28±0.24 ^{ab}	4.89±1.05 ^b	4.24±1.29 ^a	3.63±0.31 ^a	3.72±0.16 ^a	3.69±0.83 ^a	5.52±0.82 ^b	2.87±0.18 ^a	2.87±0.58 ^a
SM03	17.11±1.28 ^d	11.02±0.40 ^d	6.61±1.17 ^c	6.75±0.21 ^c	7.8±1.01 ^c	6.76±0.13 ^c	8.74±0.76 ^d	6.48±1.53 ^c	5.38±1.79 ^c
SM06	11.96±0.33 ^c	9.52±0.50 ^c	10.26±1.79 ^b	8.24±0.64 ^b	6.09±0.48 ^b	5.03±0.86 ^b	8.96±1.26 ^c	7.26±0.82 ^c	4.83±0.10 ^{bc}

Means with a common letter in the same enrichment time denote no significant differences ($p < 0.05$)

S, Selco; SK03, mixture of 0.6g/l of Selco with 0.3g/l of krill oil; SK06, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of krill oil; SM03, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.3 g/l of mussel oil; SM06, mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of mussel oil.

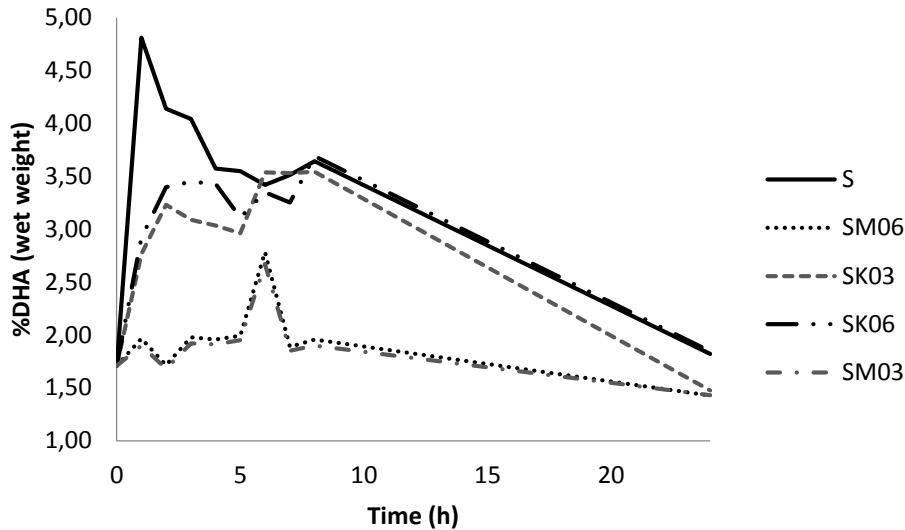


Figure 6.1. Variation in the mean values of DHA content in *Artemia* enriched with five different oil mixtures.

S, Selco; SK03, mixture of 0.6g/l of Selco with 0.3g/l of krill oil; SK06, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of krill oil; SM03, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.3 g/l of mussel oil; SM06, mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of mussel oil.

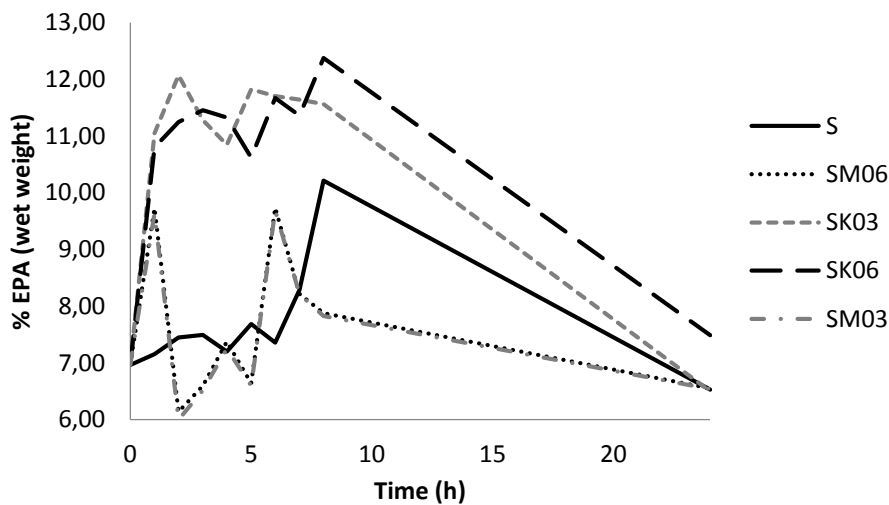


Figure 6.2. Variation in the mean values of EPA content in *Artemia* enriched with five different oil mixtures.

S, Selco; SK03, mixture of 0.6g/l of Selco with 0.3g/l of krill oil; SK06, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of krill oil; SM03, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.3 g/l of mussel oil; SM06, mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of mussel oil.

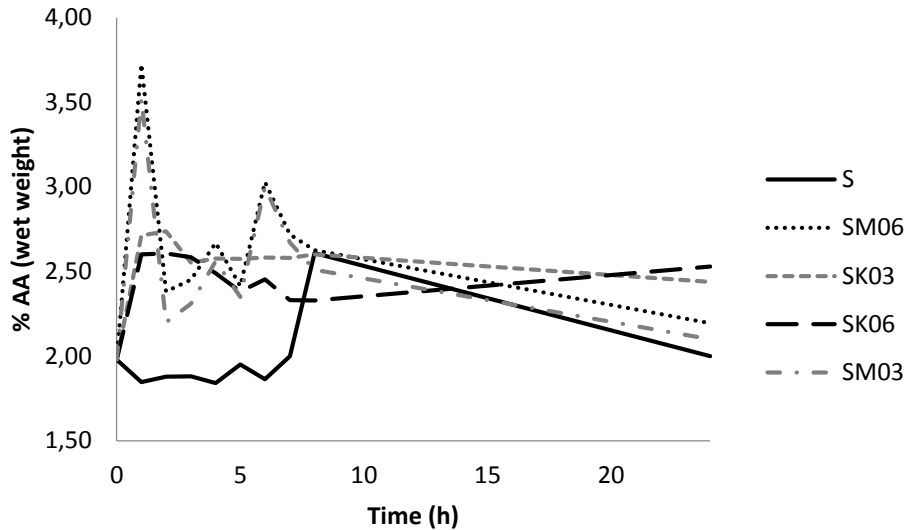


Figure 6.3. Variation in the mean values of AA content in *Artemia* enriched with five different oil mixtures.

S, Selco; SK03, mixture of 0.6g/l of Selco with 0.3g/l of krill oil; SK06, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of krill oil; SM03, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.3 g/l of mussel oil; SM06, mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of mussel oil.

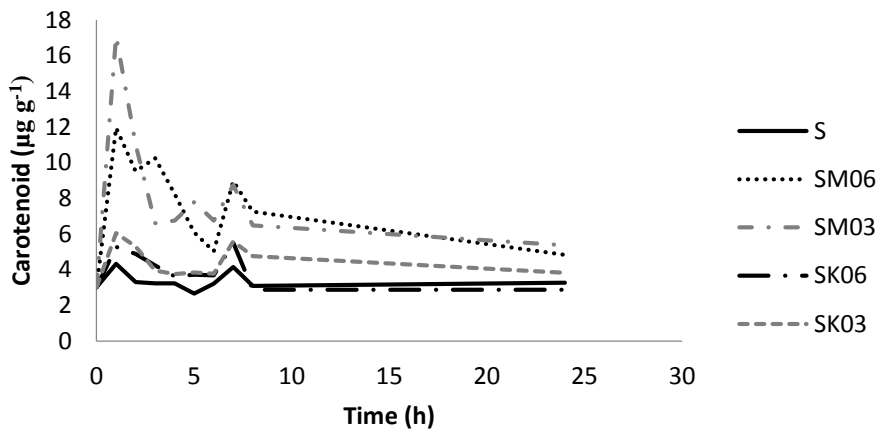


Figure 6.4. Variation in the mean values of total carotenoid content in *Artemia* enriched with five different oil mixtures.

S, Selco; SK03, mixture of 0.6g/l of Selco with 0.3g/l of krill oil; SK06, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of krill oil; SM03, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.3 g/l of mussel oil; SM06, mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of mussel oil.

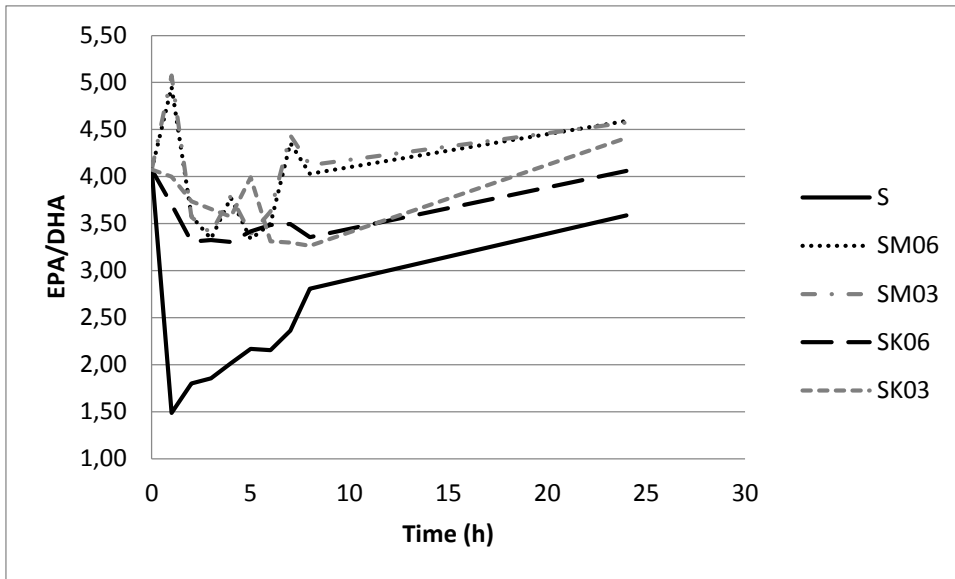


Figure 6.5. Variation in the mean values of EPA/DHA ratio in *Artemia* enriched with five different oil mixtures.

S, Selco; SK03, mixture of 0.6g/l of Selco with 0.3g/l of krill oil; SK06, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of krill oil; SM03, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.3 g/l of mussel oil; SM06, mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of mussel oil.

Looking at the most important sampling times, it can be observed that in the first two hours inside *Artemia*'s gut, big oil drops were seen (Fig.6.6). However, from 5-24 hours of enrichment time the big oil droplets had been reduced to small ones inside the *Artemia*'s intestine (Fig. 6.6).

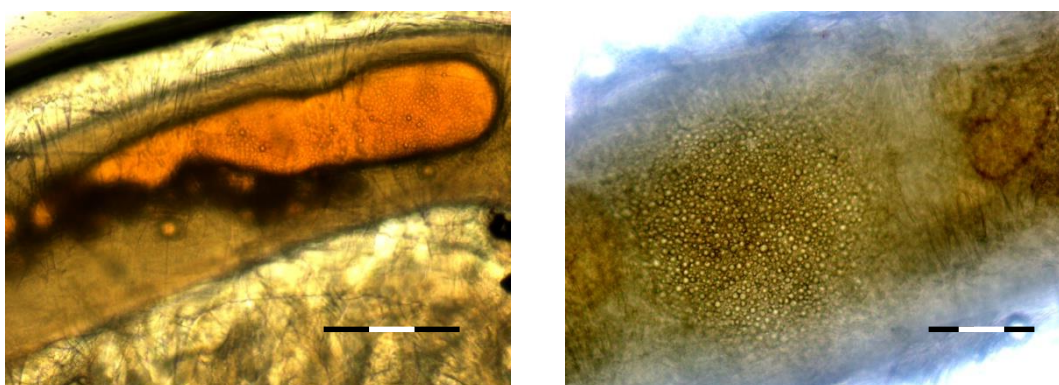


Figure 6.6. Image of *Artemia*'s gut content at two hours of enrichment (left; x10, bar = 0.3mm) and eight hours of enrichment (right; x20, bar = 0.1mm).



The specific respiration and potential respiration data are in the same range as Martínez *et al.* (2010) found. The respiration experiments shows that SELCO stimulates respiration for the first 4 hours (Fig. 7, $p < 0.05$). However, after the second hour the rate accelerates for 2 hours and then plateaus until the end of the experiment. During this time the potential respiration remains constant for the first 2 hours ($p > 0.05$). Then it increases and after the 4th hour, plateaus. The initial and the final plateaus are significantly different ($p < 0.05$). The ratio between the respiration and Φ changes from 0.34 ± 0.04 in the first 2 hours to 0.43 ± 0.06 in the last 4 hours of the experiment.

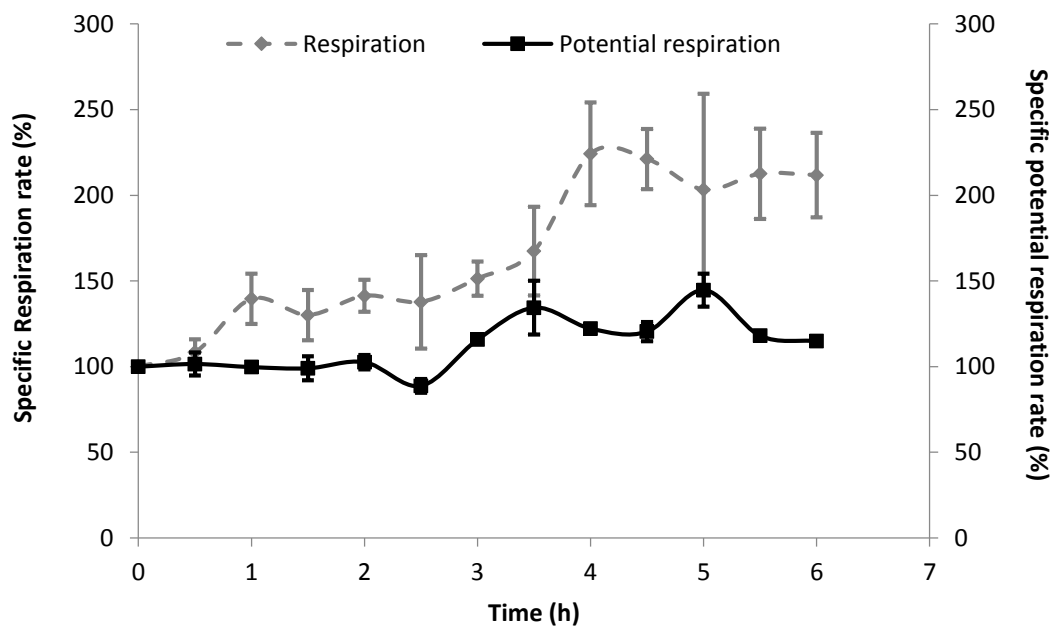


Figure 6.7. Respiration and potential respiration time-courses during the six hours experiments. Both measurements are normalized by mg proteins and expressed as percentages of their initial value. These initial values were: $7.93 \mu\text{l O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ for respiration and $30.01 \mu\text{l O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ for Φ .



6.6.- Discussion

Throughout the history of aquaculture, different living organisms have been used as live prey in cultures of various species, but the most commonly used organism is *Artemia*, because it is a commercial, affordable and easy to grow. However, because of its nutritional deficiencies it must be enriched.

In this experiment the biochemical analysis does not change over time, this fact may suggest that enrichment is not about quantity but quality. Regarding total carotenoid content: it is higher in *Artemia* enriched with mussel-oil based mixtures. This is because the concentration of pigments in this oil is high ($1445 \mu\text{g g}^{-1}$). However, SELCO lacks them and the pigments (echineone and canthaxanthin) are provided by *Artemia* (Hsu *et al.*, 1970) in a ratio of approximately 19: 1 (Krinski, 1965). The carotenoid and fatty acid accumulation are at their peak during the first two hours and may be related to the content found in the *Artemia*'s digestive tract, which initially has few large droplets (a fact that probably does not allow proper absorption of nutrients). However, after five hours elapsed, *Artemia*'s digestive tract contains many small drops of oil. This oil droplet accumulation could enhance absorption and transformation of lipids and carotenoids present in the oils to the same compounds found naturally in *Artemia*. First, the *Artemia* is capable of metabolizing carotenoids by transforming them into canthaxanthin (Davies *et al.* 1970). Moreover, *Artemia* is capable of converting the fatty acid, DHA, into EPA (Navarro *et al.* 1999).

The EPA/DHA ratios for *Artemia* exposed to SELCO are low which was expected since it is a DHA-based enrichment. SELCO was formulated to provide high quantities of DHA, which is both an energy source and a precursor of multiple



molecules necessary for larval growth in various species (Watanabe, 1993; Sargent *et al.*, 1999).

The respiration shows that even from the beginning of the experiment the SELCO stimulated oxygen consumption. However, a strong shift, or acceleration, in the respiration occurs between the second and the fourth hour. This occurs roughly when the large oil droplets in the *Artemia* gut begin to be transformed into small ones. The implication is that this size transformation of the oil droplets is accompanied by enhanced metabolism. Between 4 and 6 hours the respiration rate plateaus at a higher level than during the initial part of the experiment indicating 2-fold increase in metabolism. The shift in the plateau levels of the Φ from the first to the last two hours of the experiment supports this enhanced metabolism. Moreover, this transition is also observed in the increase in the R/Φ from the beginning to the end of the experiment. These biochemical and physiological measurements indicate a shift from standard to a more active metabolism (Hernández-León and Gómez, 1996).

Definitively, this experiment showed an evolution in the enrichment of *Artemia*, which can help to design further experiments. If the objective is to produce a biocapsule then a 2 h nutrient-enrichment exposure period is sufficient to guarantee nutrient delivery to the target species. This is supported by Tocher *et al.* (1997). If instead the objective is the enriching *Artemia* assimilation and transformation, the enrichment time must be increased to, at least 7 or 8 hours. In the case where the enrichment must be longer, the enriching product must be renovated after 8 h because a part is assimilated by the *Artemia* and remainder could suffer autoxidation (McEvoy *et al.*, 1995).

7. Study IV.

Effect of *Artemia* enrichment with oils containing different source of pigments on seahorse color.

Segade A.¹, Souček P.², Bárta A.², Robaina L.¹, Urban J.² and Molina L.¹

1) Grupo de Investigación en Acuicultura, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Parque Científico Tecnológico, Las Palmas, Spain.

2) University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Institute of Complex Systems, Laboratory of Signal and Image Processing, Zamek 136, Nove Hradky 37333, Czech Republic.



7.1.- Abstract

Color is a very important parameter in our daily life, from recognizing an electronic mark until the election of our pets, especially in ornamental fish where the color is directly related to the final price of the animal. That is why in this experiment 3 different feeds were tested to observe the effect on seahorse color expression. Three different experimental diets were tested in triplicate: SELCO enriched *Artemia* (S), *Artemia* enriched with krill oil (SK06) and *Artemia* enriched with mussel oil (SM03). The seahorses were fed twice a day, six days a week during the 90 days of experiment. At the beginning of the experiment and every 30 days until the end of the experiment weight measurement was taken and the color was analyzed using colorimeter and also image analysis software (FISCEApp). At the end of the experiment biochemical analysis of the seahorses were carried out. There was not effect of the diets on the sea horses growth along the trial. It was observed that the pigment content of the horses is directly related to the diet content, also was observed that seahorses fed on SK06 had higher amount of EPA and seahorses fed on SM03 showed a tendency to accumulate AA. No relationship between the amount of pigments and color expression was observed. But it was determined that although both color analysis techniques are valid, the colorimeter results are more accurate but less real and the data from the image analysis although more real are less accurate.



7.2.- Resumen

El color es un parámetro muy importante en nuestro día a día, desde ayudar a reconocer una marca de electrónica hasta la elección de nuestras mascotas, especialmente en peces, ya que este factor influye directamente en su precio de venta al público. En esta línea, el presente trabajo tiene como objetivo estudiar la variación de color en el caballito de mar (*Hippocampus hippocampus*) alimentado con dietas basadas en *Artemia*, la dieta más utilizada para estas especies. En el experimento se prueban por triplicado 3 enriquecedores diferentes para este crustáceo: *Artemia* enriquecida con SELCO (S), *Artemia* enriquecida con aceite de krill (SK06) y *Artemia* enriquecida con aceite de mejillón (SM03). Los caballitos fueron alimentados dos veces al día, seis días a la semana durante los 90 días de experimento. Al comienzo del experimento y cada 30 días hasta el final del mismo se tomaron medidas de peso y se analizó el color utilizando un colorímetro y un software de análisis de imagen (FISCEApp), este último desarrollado para tal fin. Al final del experimento se llevaron a cabo análisis bioquímicos de los caballitos. Se observó que el contenido de pigmentos de los caballitos está directamente relacionado con el contenido en la dieta, de la misma forma que los ácidos grasos; de esta manera, los caballitos alimentados con SK06 presentaban un alto contenido en EPA mientras que los caballitos alimentados con SM03 mostraban una tendencia a acumular AA. No se observó una relación entre la cantidad de pigmentos presente en los caballitos y la expresión del color. Atendiendo a los resultados de color se determinó que aunque ambas técnicas de análisis son válidas, el colorímetro es más preciso pero menos real y el software es más real y menos preciso.

Keywords: Seahorse, diets, enrichment, color analysis, image analysis



7.3.- Introduction

The color is an important characteristic present in the lives of most living organisms. It usually affects their lifestyle because many species use color to choose their partners, others express their mood through color changes and also can use it to camouflage itself from possible predators (Stuart-Fox *et al.*, 2006) or even to hunt their prey (Abbot, 2010). The color changes to blend with the environment have been widely studied as the example of seahorses (Segade *et al.*, 2014) or flatfishes (Ryer *et al.*, 2008) that are capable of changing color to blend with the substratum. Humans are affected in the same way; many of our decisions are affected by color, from choosing a drink or a television (Labreque and Milne, 2012) to buy fish for eat (García *et al.*, 2010) or for an aquarium (Molina and Segade, 2011).

However the perception of color is subjective; although our evaluation of color under different types of light is good, determination varies from person to person. This is why different methodologies to determine the color and pigments in fish have been used. For pigment analysis invasive techniques are used, in which the fish must be sacrificed. Some of these techniques are spectrophotometry and HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), which have been used in experiments with different species like seahorses (*Hippocampus hippocampus*) (Segade *et al.*, 2014), red porgy (*Pagrus pagrus*) (Kalinowski *et al.*, 2005; García-Romero *et al.*, 2014); goldfish (*Carassius auratus*) (Wallat *et al.*, 2005) or clownfish (*Amphiprion ocellaris*) (Yasir and Quin, 2009a and 2009b). Moreover there are non-invasive techniques, among them the use of colors as standard reference (Sandusky and Heath, 1998; Erikson and Misimi, 2008), which slows



down the process and requires more trained observers. That is why different tests are performed to analyze the color and thus try to connect color with its respective pigment content.

The most commonly used color equipment is a tristimulus colorimetry with CIELAB scale, given by the Commission Internationale de L'eclairage (CIE, 1976). It consists of a three-dimensional space, where the color is placed as a point. The luminosity L^* ranges from 0 (black) to 100 (white), while a^* and b^* determines the color, being a^* green-red and b^* blue-yellow ranges. Due to the high cost of colorimeters and the difficulty or impossibility of use on some surfaces, new techniques have been developed for color evaluation. The technique with the most potential for future is image analysis since it is a simple noninvasive and economical process (Urban *et al.*, 2013; Kouba *et al.*, 2013).

Multiple studies have used this technique or compared with colorimetry. But there are not well-established protocols, so it is often used in image analysis programs like Image Pro or Photoshop (Yam and Papadakis, 2004; Novelo and Gomelsky, 2009; Yasir and Quin, 2009a and 2009b; Ho *et al.*, 2013) even programming language (León *et al.*, 2006). Evaluation of the results in biological experiments highly depends on image interpretation. There are two major problems in this field: color interpretation and color representation. The root cause of color interpretation is the fact that due to physiological reasons there is a difference in color perception, which varies from one individual to another. It means that there is a need in objective properties using which one can describe color. Color representation problem comes from technical limitation of the digital devices: each device has its



own gamut, the color area that can be represented in this particular device. Therefore it is necessary to make sure the device provides adequate information.

Different color spaces can be used in order to provide more complete and objective information about color. Color space is a combination of color model (mathematical representation of color based on several values) and color mapping function.

Generally standard model of color representation in digital devices (photo and video cameras, displays, etc.) is RGB color space. In this space each pixel is represented by a three-dimensional vector (Red, Green and Blue) where values are intensities for each channel. Adding it together increases the overall intensity of light (additive color mixing). In case of 8-bit images, the value range is from 0 to 255. While RGB is very convenient for storing color values taken by digital devices, it is a difficult model from the human-eye perception point of view.

The color in ornamental fish is of great importance, since it determines their acceptance and market price (Wabnitz, 2003; Molina and Segade, 2011). Several experiments have conducted worldwide to determine factors affecting the color of the fish. These factor are genetics (David *et al.*, 2004), or caused by feeding (Kop and Durmaz, 2008) and the surrounding environment (Yasir and Quin, 2009a and 2009b), among others. Seahorses can change their color depending on the surrounding environment but also it has been observed that food can influence their color (Segade *et al.*, 2015). All seahorses have been included in Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) (González *et al.*, 2006). This is because of the decline of natural populations due to anthropogenic causes such as habitat degradation or trawls. That



is why there have been several studies with different species of seahorses to improve cultivation and decrease sales of wild specimens. These organisms in the environment usually feed on copepods, mysids and amphípods. But in captivity is usually fed on mysids or *Artemia*.

Artemia is a crustacean not present in the ocean but rather in saltworks and large lakes. This organism has been widely used in aquaculture (Ut *et al.*, 2007; Viciano *et al.*, 2011; Otero-Ferrer *et al.*, 2012), and is considered as biocapsule (Fernández, 2001), because their digestive tract represents a large volume of biomass, which can be fed with different products to change their biochemical composition or provide specific elements. Various experiments have been used to provide fatty acids for fish larvae, crustaceans, like lobsters, or provide antibiotics (Cook and Rust, 2002) to fish, which rejected medicated feed. Thus either the *Artemia* nauplii or adult *Artemia* both can be enriched with different elements.

In present experiment the growth and color changes in seahorses fed 3 *Artemia* enrichment diets with different carotenoid content was studied. Moreover image analysis software (RGB scale) for the color determinations was implemented and used to compare the results with the wider used tristimulus (CIE Scale) colorimeter.



7.4.- Materials and Methods

7.4.1.- Seahorses and culture conditions

Thirty-six captive bred seahorses with a mean weight of 1.47 ± 0.66 g were used, all of them came from the same broodstock, and were randomly distributed in nine 34.96 L (23 x 40 x 38 cm) glass aquaria (4 seahorses in each aquaria). They were maintained with a 10h light/14h dark photoperiod (T5 tubes, 24W and 10000K; AquaMedic, Bissendorf, Germany). Throughout the experiment, tanks were provided with physical (Riff 500; AquaMedic, Bissendorf, Germany) and UV (TR 10 series, Teco, Ravenna, Italia) pre filtered seawater, with a daily renewal rate of 100ml L⁻¹. Each aquarium had slow aeration, a 30 L h⁻¹ flow rate. Temperature ranges $23.52 \pm 1.31^\circ\text{C}$ and $8.03 \pm 0.97\text{mgL}^{-1}$ of dissolved oxygen during the experimental period.

7.4.2.- Diets and feeding

Artemia was enriched with three different products and tested in triplicate groups of seahorses for 90 days:

1 (SEA), control diet consisted of on-grown *Artemia* enriched with Easy DHA Selco® (INVE, Dendermonde, Belgium) (1 h of enrichment, 0.6g L⁻¹).

2 (SK06), on-grown *Artemia* enriched with a mixture of 0.6 g L⁻¹ of Selco with 0.6 g L⁻¹ of krill oil (Superba™; Aker BioMarine AS, Fjordalleen, Norway)(1 h of enrichment).

3 (SM03), on-grown *Artemia* enriched with a mixture of 0.6 g L⁻¹ of Selco with 0.3 g L⁻¹ of mussel oil.



Selco and krill oil are commercial products, but mussel oil was extracted from frozen mussels (*Mytilus galloprovincialis*). To do this, mussels were cut into small pieces and dried at 30°C for 48 hours. After being dried, mussels were grinded and lipids and pigments were extracted with chloroform by means of a vacuum pump, for finally removing the solvent by a rotary evaporator with a thermostatic bath at 30°C.

The proximate composition and total carotenoid content of the three diets are shown in table 7.1. Seahorses were fed on the correspondent diet at two rations (09:00 and 14:00), six days per week. Feeding was maintained at approximately 150 mg g⁻¹ (Segade *et al.*, 2015).

Table 7.1. Proximate composition and total carotenoid content (mg kg⁻¹ wet weight) of diets

	S	SK06	SM03
Crude protein	5.54	5.45	5.50
Lipids	1.36	1.55	1.50
Ash	1.10	1.07	1.20
Moisture	91.22	91.02	90.95
Carotenoids(µg g ⁻¹)	4.16	5.24	7.17

S, Selco; SK06, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of krill oil; SM03, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.3 g/l of mussel oil

7.4.3.- Sampling and color measurement

At the beginning of the experiment and each 30 days until day 90, whole body mass (Job *et al.*, 2002) and skin color parameters were measured in all seahorses, to evaluate the body mass gain and the color change during the trial. At the end of the experiment, seahorses were fasted for 1 day. Two individuals of each aquarium were sacrificed and stored as a pool at -80°C prior to proximate analysis.



Two different techniques were used for color measurement, colorimetry and image analysis. For colorimetry, measurements were taken from the left abdominal area, using a portable colorimeter (Minolta Chroma Meter CR-400; Minolta, Osaka, Japan). Color parameters directly determined were redness (a^*), yellowness (b^*) and lightness (L) in accordance with the recommendations of the International Commission on Illumination (CIE 1976), from where the overall color [Hue; $Hab = \arctan(b^*/a^*)$] and the intensity of the color [chroma; $Cab = (a^{*2} + b^{*2})$] were calculated from a^* and b^* .

For the image analysis, a Canon EOS 650D (Canon, Tokyo, Japan) was used. Camera was used in manual mode, and white balance was performed with a white/grey card. Seahorses were placed over a white uniform surface and one picture of the left side was taken from each seahorse. For image analysis and extraction of pixel values Fisceapp software (Fig. 7.1) was used (Urban *et al.*, 2015). This software performs image segmentation and image conversion from RGB to HSV, CIE $L^* a^* b^*$ and CIE $L^* c^* h^*$ color spaces. After that it calculates the basic statistics for each color space: mean, median, mode values and standard deviation of the pixels as well as dominant wavelength of the image. Results obtained from Fisceapp are used for further analysis.

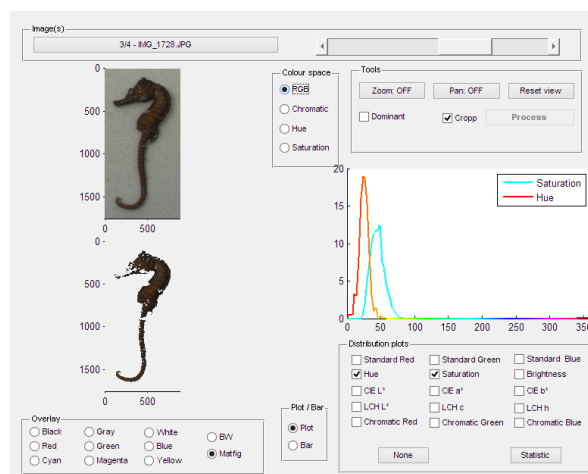


Figure 7.1. Image of the Fisceapp interface, showing the different options for working with the images.

Another color spaces, which can highlight different aspects and properties of the color, can be employed instead of RGB. HSV (Hue, Saturation, Value) color space uses cylindrical representation. The central vertical axis is brightness or lightness (in range from 0 which is black to 100 which is white). The angle around vertical axis corresponds to hue (0-360 degrees) and the distance from the axis corresponds to saturation.

7.4.4.- Biochemical analysis

Enrichment products and enriched *Artemia* were analyzed for protein, moisture and ash content according to AOAC (2010). For total lipid extraction the Folch *et al.* (1957) procedure was used and for fatty acid methyl esters the methodology described by Christie (1982) and Izquierdo *et al.* (1990) was used. Carotenoids were extracted according to Scheldt *et al.* (1995). For carotenoid quantification in n-hexane, the absorbance was read at $\lambda = 470\text{nm}$ using $E_{1\%, 1\text{cm}} = 2100$ (Britton, 1995). It was expressed as asthaxanthin equivalent using the following equation:



$$\text{Mg g}^{-1} \text{ sample} = 10\,000 * V * A/W * E_{1\%, 1\text{ cm}}$$

Where V is the total volume of the extract (mL), W is the weight of the sample (g), A is the absorbance and $E_{1\%, 1\text{ cm}}$ is the extinction coefficient.

7.4.5.- Statistical analysis

All data were tested for normality and homogeneity of variance. To study the effect of the diets on growth and color, a multivariate method MANOVAR with two fixed factors, time and diet, was used. Differences in biochemical composition between groups were determined by one-way ANOVA, using Tukey's test for multiple comparisons. All statistical analyses were tested at 0.05 significance level using the SPSS statistical package (SPSS for Windows 11.5; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Finally a PCA (Principal Component Analysis) with Fisceapp data was performed with Unscrambler X (CAMO AS; Oslo, Norway) statistical package.

7.5.- Results

Along the trial the observed diet acceptance was similar for all the diets. No differences in mortality were found between diets (8% on average in all treatments, 1 dead per triplicate). After 90 days of experiment the body mass gain was low and no significant differences ($P > 0.05$) between diets were found (Table 7.2). Biochemical analysis (Table 7.3) showed no differences between treatments in protein, lipids ash or moisture contents, but showed two different levels of carotenoid content, higher for the seahorses fed on *Artemia* enriched with mussel and lower for Selco enriched *Artemia*, but having between both levels *the Artemia*



enriched with krill oil. The total carotenoid content in seahorses was directly related ($r^2=0.94$) with carotenoid content of the diets (Fig. 7.2).

Table 7.2. Seahorse body mass values (g \pm SD) in each sampling from the beginning to the end of the experiment, $p < 0.05$

Day	S	SK06	SM03
0	1.16 \pm 0.16	1.46 \pm 0.20	1.34 \pm 0.28
30	1.17 \pm 0.12	1.44 \pm 0.19	1.30 \pm 0.23
60	1.20 \pm 0.13	1.45 \pm 0.19	1.36 \pm 0.27
90	1.18 \pm 0.16	1.50 \pm 0.20	1.38 \pm 0.27

Means without letter denote no significant differences.

S, Selco; SK06, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of krill oil; SM03, a mixture of 0.3g/l of Selco with 0.3 g/l of mussel oil.

Table 7.3. Proximate composition (mg kg⁻¹ wet weight \pm SD), total carotenoid body content (μ g g⁻¹ \pm SD) and weight (g) of whole fish at the end of the trial.

	S	SK06	SM03
Crude protein	14 \pm 1.12	13.05 \pm 0.97	14.3 \pm 1.03
Lipids	1.02 \pm 0.15	0.94 \pm 0.1	0.81 \pm 0.1
Ash	13.21 \pm 1.06	13.37 \pm 1.31	13.55 \pm 1.53
Moisture	72.3 \pm 1.21	73.06 \pm 1.63	72.19 \pm 1.09
Carotenoids	16.27 \pm 3.46 ^a	20.28 \pm 0.46 ^{ab}	23.24 \pm 0.48 ^b

Means without letter denote no significant differences.

S, Selco; SK06, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of krill oil; SM03, a mixture of 0.3g/l of Selco with 0.3 g/l of mussel oil.

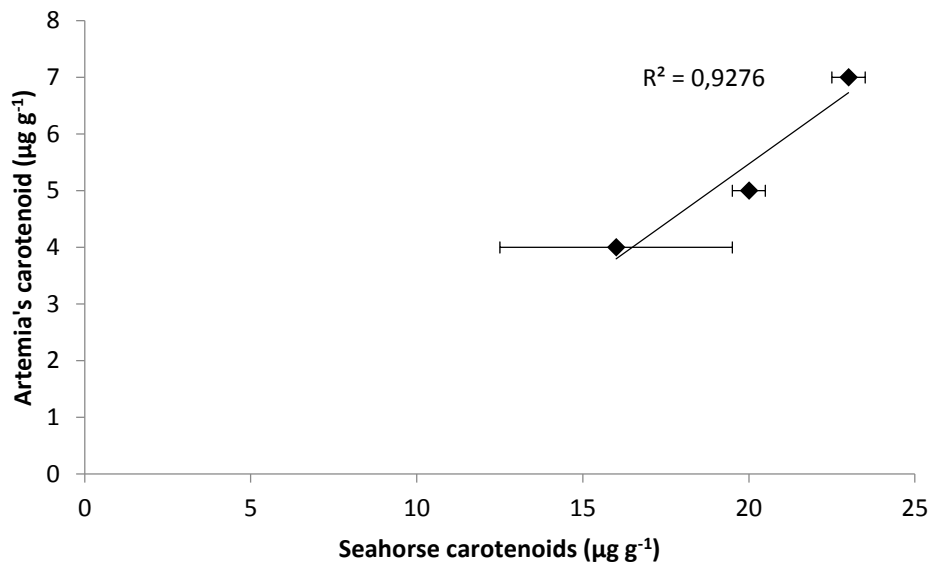


Figure 7.2. Relation between seahorses carotenoid content and enriched *Artemia* carotenoid content.

Regarding the fatty acid profile of the seahorses, there were significant differences in the content of eicosapentaenoic acid (EPA) between seahorses fed on different diets (Table 7.4). Taking a look to araquidonic acid (AA) and docosahexaenoic acid (DHA) a clear tendency can be observed, the highest levels were found on seahorses fed on SM03 and the lowest for the seahorses fed on S, but no differences were observed for the rest of main fatty acids. Seahorses fed on SK06 diet had significant higher ($P > 0.05$) values of EPA.



Table 7.4. Analysis of variance (ANOVA) of the main fatty acids (g kg⁻¹ of fatty acid± SD) in the whole body composition in seahorses fed different diets, $p < 0.05$

	S	SK06	SM03
AA	38.9±11.8	33.9±0.3	46.4±7
DHA	107.1±31.4	122.1±3.5	129.9±17.2
EPA	42±04.4 ^b	65.3±2.9 ^a	39±3.6 ^b
Linolenic	10.1±02.4	11.3±0.5	7.7±1.2
Linoleic	116.2±13.3	117.1±6.7	106.3±6
Oleic	199.5±17.8	192.4±4.8	191.3±75

Means without letter denote no significant differences.

S, Selco; SK06, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of krill oil; SM03, a mixture of 0.3g/l of Selco with 0.3 g/l of mussel oil

Regarding seahorses color, differences in b^* (yellowness), Hue and Chroma were found between diets (Table 7.5). There was observed an increment in the yellowness in seahorses fed on SELCO enrichment *Artemia*, while an increment in the redness with higher intensity of this color was obtained in those seahorses fed both SK60 and SM30, but even higher in the latter case. Thus, color differences were only significant ($P > 0.5$) between diets S and SM03, with seahorses color changing from yellowish to reddish color from S to SM03 diets. There was a general increasing of Hue and Chroma values between day 0 and the end of the experiment (Fig. 7.3), although no effect on the lightness was observed. From the camera dataset no significant differences were found but we could see the same tendency between the beginning and the end of the experiment in the PCA analysis (Figs. 7.4 and 7.5).

Finally an inversely proportional relationship ($r^2 = 0.9979$) was found between color expression measured from HUE and the total carotenoid content in the animals, telling us that the higher carotenoid content in seahorses, either red or yellow ones, may not be directly related with the color expression (Fig. 7.6) at the observed carotenoid content in the animals.



Table 7.5. Colorimeter fish color parameters at the beginning and the end of the experiment.

	I	S	SK06	SM03
L	32.32±2.9	30.09±3.01	29.84±1.69	31±2.35
a	6.94±1.1	5.49±1.14	6.1±0.85	5.67±1.07
b	-1.57±2.4	7.22±2.92 ^a	5.24±2.09 ^{ab}	3.87±2.11 ^b
Hue	-10.95±18.75	50±15.58 ^a	39.45±13 ^{ab}	32.54±17.80 ^b
Chroma	7.47±1.18	9.33±2.14 ^a	8.22±1.37 ^{ab}	7.14±1.19 ^b

Means without common letter denote significant differences.

I, Initial values. Final values of: S, Selco; SK06, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of krill oil; SM03, a mixture of 0.3g/l of Selco with 0.3 g/l of mussel oil.

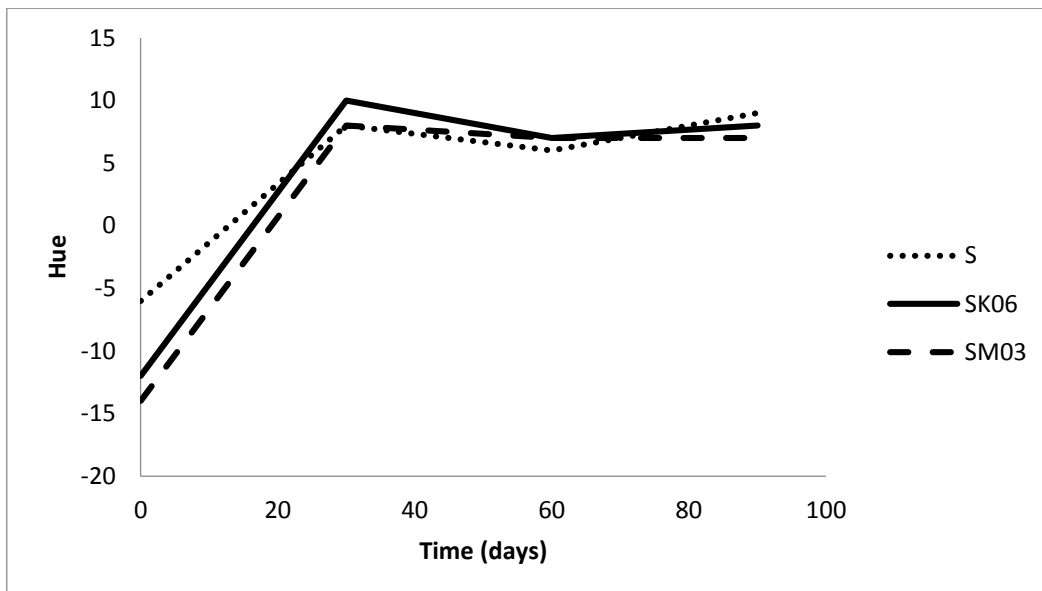


Figure 7.3. Variation in the mean values of Hue over time in seahorses fed with the three different diets.

S, Selco; SK06, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of krill oil; SM03, a mixture of 0.3g/l of Selco with 0.3 g/l of mussel oil.

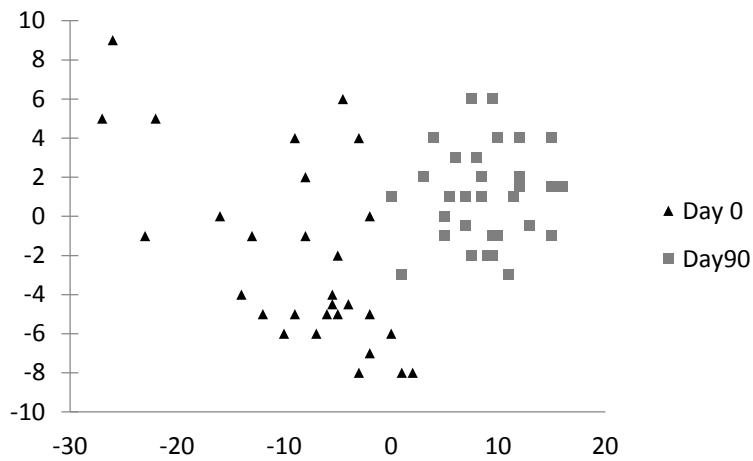


Figure 7.4. Plot of the PCA study of Hue comparing data between day 0 and day 90.

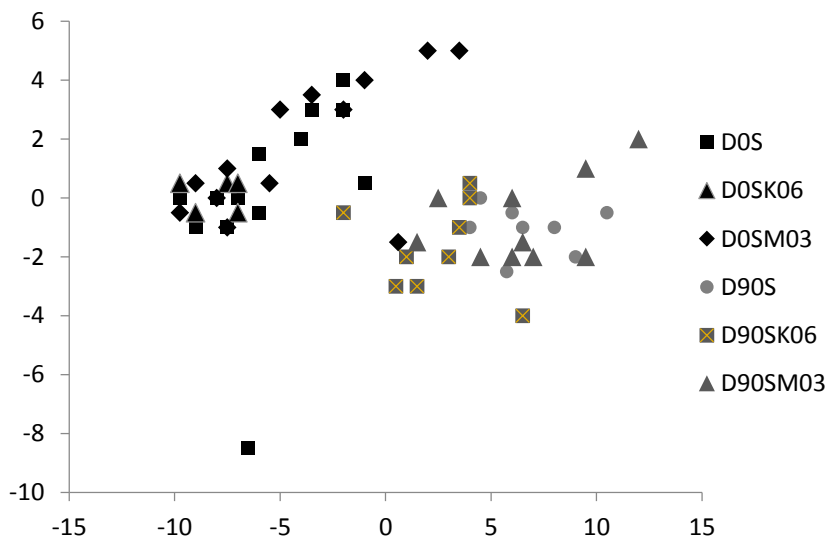


Figure 7.5. Plot of the PCA study of HUE comparing data between samplings (D, day) and diets. S, Selco; SK06, a mixture of 0.6g/l of Selco with 0.6g/l of krill oil; SM03, a mixture of 0.3g/l of Selco with 0.3 g/l of mussel oil.

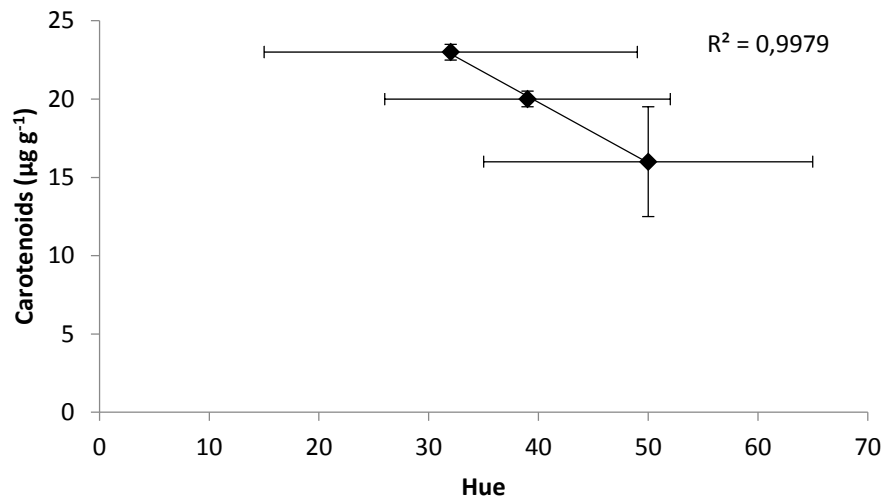


Figure 7.6. Relation between seahorses carotenoid content and and seahorses Hue.

7. 6.- Discussion

In recent years, several studies have been carried out about seahorse feeding, these studies have determined its feeding in the wild (Woods, 2002; Castro *et al.*, 2008; Kitsos *et al.*, 2008; Corse *et al.*, 2014), there have also been carried out biochemical analysis of wild individuals (Lin *et al.*, 2008b) and multiple culture tests have been performed, including all stages of development of this group of fish from larval culture and on growing to breeding (Hora and Joyeux 2009; Otero-Ferrer *et al.*, 2010 and 2012). In these experiments different feeds have been used, but they are always natural organisms either live or frozen, such as, copepods, mysids, *Artemia* or amphipods (Job *et al.*, 2002; Woods 2005; Murugan *et al.*, 2009). However, *Artemia* is the most often used prey to feed seahorses and should always be enriched due to their poor nutritional profile (Palma, 2011; Segade *et al.*, 2014), in this experiment three different enriching sources of different fatty acids and carotenoids



were selected to feed the seahorses in order to observe its effect in coloration and fish performance.

At the end of the 90 days of experiment an average value of 8% mortality, percentage within acceptable values for experimentation as similarly as obtained by Segade *et al.* (2014) with this species.

The lack of differences in growth in this experiment may be associated with two factors. First the biochemical profile of diets (proximate analysis) is similar except for the fatty acid profile, which mean that fatty acids have not clearly affect seahorses performance. Moreover, as already observed in other experiments, the growth rate of this species is low (Otero-Ferrer *et al.*, 2010, 2012; Segade *et al.*, 2014), issue that can lead to the absence of significant differences between treatments. Moreover, it can be observed that the total carotenoid content in seahorses is proportional to its diet content as observed for other nutrients in some other experiments (Lin *et al.*, 2008; Segade *et al.*, 2014).

In this experiment low lipid content was observed according to other seahorse body analysis (Lin *et al.*, 2008b; Segade *et al.*, 2014), which could be related to the low lipid requeriment of these fishes (Segade *et al.*, 2015). Referring to the main fatty acid levels obtained results are however consistent with those obtained for this and other species of seahorse (Lin *et al.*, 2008b; Segade *et al.*, 2015), being also related with the respective dietary levels. Thus, the differences obtained in EPA may be due to high content of this fatty acid in the diet as krill oil contains high levels of EPA (Tou *et al.*, 2007; Gigliotti *et al.*, 2011).

It was observed that reddish color remains stable over time with three different diets, while the yellowish of the fish increases from the beginning to the end of the



experiment in all diets, obtaining significant differences between them. The same fact was observed by Segade *et al.* (2014), where the ability of this species to express the yellowish of its skin was described. Color expression will vary depending on different factors such as the environment, the type of pigment and the target species as each species has different metabolic pathways of carotenoids (Chatzifotis *et al.*, 2004). In this experiment it has been achieved that seahorses accumulate high quantities of pigments in its body, but only showed a slight modification of the color of their skin. This could be due to environmental factors, which include the color of the elements surrounding the fish, walls, background, holdfast and lighting. It has been reported that seahorses can change color to blend with the surrounding environment.

In present trial was confirmed that the high content of carotenoids in the diet and consequently in fish not always will lead a greater color expression. Moreover, according to the present results it seems that the redness of this seahorses species appear to be saturated at a value between 5-6. Besides, it is also relevant that any increment in the carotenoid content in the fish around this a^* values promote a reduction in the b^* color expression thus increasing the final observed HUE in fish skin; so at the end skin redness in the seahorses are being promoted by lowering in the skin yellowness, both for red (krill) and yellow (mussel) increasing carotenoid levels in the diets. New trials are necessary to better elucidate this observations, which in turn will be of importance not only to go deeper in seahorses color physiology but also from the economic and marketing point of view for this species.

Regarding color measurement, taking into account the different techniques used to measure color, it could conclude that is statistically more potent the use of



colorimeter, although the color values move away from reality accuracy is much higher resulting in a decrease of the deviation between data. Unlike the data obtained by image analysis and FISCEApp software offer us colors closer to our eyes reality. This is mainly because the software while eliminating all those pixels that provide reflections to the image, scans all pixels that form the image of the fish leading to thousands of data per image, with a greater dispersion of the data which shows a true color, however the data deviation does not allow a favorable statistical analysis.

In conclusion, in this experiment a large amount of pigments (up to $3 \mu\text{g g}^{-1}$ more than the control enrichment) was supplied to seahorses through only one hour enriched *Artemia*. In this short time, the enrichment is not metabolized by the *Artemia*, so it saves time and effort. Even taking into account the large amount of pigments obtained in seahorses compared to the control diet (between 4 and $7 \mu\text{g g}^{-1}$), no improvement in color expression was observed with lower redness but also lower color intensity. Besides, it was confirmed the ability of this species to better express yellow color versus red color. First data for a redness saturation of around 5-6 for the a^* was observed although this needs future confirmation. Finally, the image analysis software does not provide or improve the subsequent analysis of the data regarding the colorimeter, but provides more real color data. To further enhance the culture of seahorses and their color expression new dietary studies should be carried out with lower quantity and mixed carotenids content and also observing the environmental effect (aquarium, background, lighting ...).



CONCLUSIONES



1.-El crecimiento del caballito de mar (*H. hippocampus*) y sus diferencias entre dietas es un parámetro poco determinante en estudios de 3 meses de duración, debido a la baja tasa de crecimiento de esta especie.

2.- Observaciones histológicas en tejido hepático como la acumulación de lípidos y aparición de gran número de vacuolas son indicativo de exceso de grasa en la dieta para esta especie. Esto quedó reflejado para 40g kg^{-1} de grasa en el alimento.

3.-El contenido graso en los animales no aparece relacionado con el mismo en las dietas, no así el perfil de los ácidos grasos que si se muestra directamente relacionado. Así, animales alimentados con *Artemia* enriquecida con SELCO presentan mayor cantidad de DHA, mientras que la alimentación con aceite de krill y de mejillón promueven mayor contenido en EPA y AA, respectivamente en los animales.

4.- Atendiendo a los resultados del presente trabajo, la utilización de misis comerciales con respecto a la *Artemia*, no mejora ni la coloración ni el crecimiento para los diferentes enriquecedores utilizados.

5.- Los resultados muestran la aplicabilidad del procesado y congelación de la *Artemia* adulta tras su enriquecimiento, mostrando además una mejora la digestibilidad de la dieta con respecto a la *Artemia* viva enriquecida. Este resultado es de gran interés desde el punto de vista comercial para la aplicación de dietas específicas con menor costo de producción y manejo.

6.- La *Artemia* adulta puede ser utilizada como biocápsula con un tiempo de enriquecimiento de aproximadamente 2 horas si lo que se pretende es hacer transferencia de un determinado nutriente que es añadido en el enriquecedor. Tiempos de enriquecimiento mayores de 3 h serían recomendables, si lo que se



pretende es hacer transferencia de microvacuolas, dado que la *Artemia* comienza la asimilación y metabolización del enriquecedor a partir de este momento.

7.- Los resultados de histología del hígado muestran que la alimentación de los caballitos con *Artemia* enriquecida con Selco, tanto viva como congelada, provocan una acumulación lipídica dando lugar a grandes vacuolas de grasa en los enterocitos.

8.- En los caballitos de mar existe un período de adaptación de 30 días cuando se realiza un cambio de dieta, que se ve reflejado en la expresión del color de los animales y que debe ser tenido en cuenta en sucesivas pruebas de color en esta especie.

9.- Se comprueba que el caballito de mar *H. hippocampus* tiene una gran facilidad para acumular y expresar el color amarillo, alcanzando un máximo de expresión a los 180 días cuando son alimentados con *Artemia*.

10.- Se observa una relación directa ($R^2=0.9276$) entre el incremento del contenido dietético en pigmentos y la concentración de los mismos en el cuerpo del caballito, si bien esto no pudo ser a su vez correlacionado con la modulación directa del color de la piel en los animales.

11.- Se muestra por vez primera la posible saturación de la tonalidad roja en el *H. Hippocampus* alrededor de valores de la a^* entre 5 y 6 unidades. Esta saturación del rojo puede ser indicativo de la poca relación encontrada entre los pigmentos dietéticos suministrados y la respuesta de coloración de los animales. Este resultado promueve la realización de nuevas pruebas orientadas al color mediante aplicación de mezclas de diferentes carotenoides, si bien a dosis más bajas en el alimento.

CONCLUSIONES



12.- Se comprueba que el método más fiable de medida de respuestas de color frente a modificaciones dietéticas en dietas para *H. Hippocampus* es el determinado por colorimetría CIELAb convencional. El análisis de imagen (escala RGB) no mejora el análisis estadístico de los datos del colorímetro, aunque proporciona valores de color más cercanos a la realidad visual del ojo humano. Ambos métodos son por tanto complementarios, recomend el análisis de imagen con objeto de estudios de mercado.



BIBLIOGRAFÍA



Bibliografía

Abbott, K. R., 2010. Background evolution in camouflage systems: A predator-prey/pollinator-flower game. *Journal of theoretical biology*, 262(4), 662-678.

Ako, H., Tamaru, C.S., Asano, L., Yuen, B. and Yamamoto, M., 2000. Achieving natural coloration in fish under culture. Spawning and maturation of aquatic species, UJNR Technical Report No 28. University of Hawaii Sea Grant College Program, Hawaii.

Almenara-Roldan, S. and Ketchum, J.T., 1994. Forgotten islands of the Mexican Pacific. *OFI Journal* 9. pp 12-14.

Anónimo, 1999. Dance at sea. *Nature*, vol. 398, no. 6730, pp. 773-773.

AOAC, 2010. Official Methods of Analysis of the Association of the Analytical Chemists. Washington, D.C.

Au, D. W. T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine pollution bulletin* 48(9), 817-834.

Barua A.B., Kostic D. and Olson J.A., 1993. New simplified procedures for the extraction and simultaneous high performance liquid chromatographic analysis of retinol, tocopherols, and carotenoids in human serum. *Journal of Chromatography* 617, 257-264.

Baron, M., Davies, S., Alexander, L., Snellgrove, D. and Sloman, K.A., 2008. "The effect of dietary pigments on the coloration and behaviour of flame-red dwarf gourami, *Colisa lalia*", *Animal Behaviour*, vol. 75, no. 3, pp. 1041-1051.

Baum J., Meeuwing, J. and Vincent, A., 2003. Bycatch of lined seahorses (*Hippocampus erectus*) in a Gulf of Mexico shrimp trawl fishery. *Fish.Bull.* 101, 721-731.

Bell, J. G., McEvoy, J., Tocher, D. R., McGhee, F., Campbell, P. J., and Sargent, J. R., 2001. Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *The Journal of nutrition* 131(5), 1535-1543

Binh, Mac Nhu, 2012. Optimum level of fish liver oil as enrichment for Artemia fed to the tiger tail seahorse *Hippocampus comes* for reproduction and juvenile survival. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 1844-8143, 5 (4), pp. 249.

Bortone, S.A., Van Tasell, J., Brito, A., Falcón, J.M. and Bundrick, C.M., 1991. A visual assessment of the inshore fishes and fishery resources off El Hierro, Canary Islands: A baseline survey. *Scientia Mar.* 55(3), 529-541.

Britton, G., 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.*, 9, 1551-1558.

Caballero, M.J., Lopez-Calero, G., Socorro, J., Roo, F.J., Izquierdo, M.S. and Fernandez, A.J., 1999. Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 179 (1-4), pp. 277-290.



- Caballero, M., Izquierdo, Kjorsvik, E., Fernandez, A.J. and Rosenlund, G., 2004. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *Journal of Fish Diseases* 27 (9), pp. 531-541.
- Cahu, C. L., Zambonino Infante, J. L., Quazuguel, P., and Le Gall, M. M., 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 171(1), 109-119.
- Calado, R., Figueiredo, J., Rosa, R., Nunes, M. L., and Narciso, L., 2005. Effects of temperature, density, and diet on development, survival, settlement synchronism, and fatty acid profile of the ornamental shrimp *Lysmata seticaudata*. *Aquaculture* 245(1), 221-237.
- Castro, A. L. D. C., Diniz, A. D. F., Martins, I. Z., Vendel, A. L., Oliveira, T. P. R. D., and Rosa, I. M. D. L., 2008. Assessing diet composition of seahorses in the wild using a non destructive method: *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae) as a study-case. *Neotropical Ichthyology* 6(4), 637-644.
- Chatzifotis S., Pavlidis M., Donate Jimeno C., Vardanis P. and Divanach P., 2004. The effect of carotenoid sources on skin coloration of red Porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture Europe Conference, Biotechnology for Quality, Barcelona, Spain*
- Chebbaki, K., 2001. Efecto de la nutrición sobre la coloración de la piel y la calidad del filete en bocinegro, *Pagrus pagrus*. Tesis de Máster. II International Master in Aquaculture, Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Spain, 93 pp.
- Christie W.W., 1982. *Lipid Analysis*. 2nd Revised Edition. Oxford. Pergamon Press.
- CIE 1976. Official recommendations on uniform colour space, colour difference equations and metric colour terms. In: *Colorimetry, Publication CIE No.15.2, 2nd edn.*, pp. 9–12. Commission International de l'Eclairage, Paris, France.
- CITES, 2002 Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. Twelfth Meeting of the Conference of the Parties, Santiago de Chile, Chile, 3-15 November.
- Conceição, E.C. Luis, Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S. and Dinis, M. T., 2009. Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture research* 41 (5), pp.1-28.
- Cook, M.A. and Rust, M.B., 2002. Bioencapsulation of five forms of erythromycin by adult *Artemia salina* (L.). *Journal of fish diseases* 25:165-170.
- Correa, M., Chung, K.S. and Manrique, R., 1989. Experimental culture of the sea horse, *Hippocampus erectus*. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela. Cumana* 28 (1-2), pp. 191-196.
- Corse, E., Valladares, S., Planas, M., Chamorro, A., and Pintado, J., 2014. Analysis of the diet of the long-snouted seahorse *Hippocampus guttulatus* by 18SrDNA amplification of prey in faeces. *Aquaculture Nutrition* 21(5), 528-540



Curtis, J.M.R., 2006. Visible Implant Elastomer Color Determination, Tag Visibility, and Tag Loss: Potential Sources of Error for Mark-Recapture Studies. *North American Journal of Fisheries Management* 26 (2), pp. 327-337.

Curtis, J.M.R. and Vincent, A., 2006. Life history of an unusual marine fish: survival, growth and movement patterns of *Hippocampus guttulatus* Cuvier 1829. *Journal of fish biology* 68 (3), pp. 707-733.

Davies, B. H., Hsu, W. J., and Chichester, C. O., 1970. The mechanism of the conversion of β -carotene into canthaxanthin by the brine shrimp, *Artemia salina* (Crustacea: Branchiopoda). *Comparative biochemistry and physiology* 33(3), 601-615.

David, L., Rothbard, S., Rubinstein, I., Katzman, H., Hulata, G., Hillel, J. y Lavi, U., 2004. Aspects of red and black color inheritance in the Japanese ornamental (Koi) carp (*Cyprinus carpio*), *Aquaculture* 233 (1-4), pp. 129-147.

Deng, G., Lu, J. and Lin, Q., 2005. Effects of water-bloom on environmental factors in breeding water for juvenile seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker. *Journal of Fishery Sciences of China/Zhongguo Shuichan Kexue* 12 (4), pp. 477-482.

Domingues, P. M., Sykes, A., and Andrade, J. P., 2001. The use of *Artemia* sp. or mysids as food source for hatchlings of the cuttlefish (*Sepia officinalis* L.); effects on growth and survival throughout the life cycle. *Aquaculture International* 9(4), 319-331.

Dufour V. J., Jouvenel J. and Lo, Y. 1999. Collecting marine fish and invertebrate larvae: a sustainable technology. In: *Abstracts of the First International Conference of Marine Ornamentals*. Hawaii. p.27.

Erikson, U., and Misimi, E., 2008. Atlantic salmon skin and fillet color changes affected by perimortem handling stress, rigor mortis, and ice storage. *Journal of food science* 73(2), C50-C59.

Emmerson, W. D. 1984. Predation and energetics of *Penaeus indicus* (Decapoda: Penaeidae) larvae feeding on *Brachionus plicatilis* and *Artemia nauplii*. *Aquaculture* 38(3), 201-209.

Ezhil, J., Jeyanthi, C. and Narayanan, M. 2008. Effect of Formulated Pigmented Feed on Colour Changes and Growth of Red Swordtail, *Xiphophorus helleri*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 8 (1), pp. 99-101.

Faleiro, F. and Narciso, L., 2010. Lipid dynamics during early development of *Hippocampus guttulatus* seahorses: Searching for clues on fatty acid requirements. *Aquaculture* 307 (1-2), pp. 56-64.

Fan, Z., 2005. National report — China. In: Bruckner, A.W., Field, J.D., Daves, N. *The Proceedings of the International Workshop on CITES Implementation for Seahorse Conservation and Trade*. NOAA Technical Memorandum NMFS-OPR-36. Silver Spring, MD, pp. 54–60.

FAO, 2007. *State of World Fisheries and Aquaculture 2006*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. FAO Newsletters. 162 pp.

FAO, 2010. *State of World Fisheries and Aquaculture 2010*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. FAO Newsletters. 197pp.



Fernández, R. G., 2001. *Artemia* bioencapsulation I. Effect of particle sizes on the filtering behavior of *Artemia franciscana*. *Journal of Crustacean Biology* 21(2), 435-442.

Figueiredo-Silva, A., Rocha, E., Dias, J., Silva, P., Rema, P., Gomes, E. and Valente, L. 2005. Partial replacement of fish oil by soybean oil on lipid distribution and liver histology in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture Nutrition* 11 (2), pp. 147-155.

Folch J., Lees M.S. and Stanley G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry* 226,479-509.

Foster S. and Vincent A., 2004. Live history and ecology of seahorses: Implications for conservation and management. *Journal of Fish Biology* 64:1-61

Fraser, T.W.K. and Davies, S.J., 2009. Nutritional requirements of cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus): a review. *Aquaculture Research* 40 (11), pp. 1219-1234.

Fujita, T., Satake, M., Hikichi, S., Takeda, M., Shimeno, S., Kuwabara, H, Miki, W., Yamaguchi, K. and Konosu, S., 1983. Pigmentation of cultured yellowtail with krill oil. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 49. pp. 1595-1600.

Fulks, W., Main, K.L., 1991. Rotifer and Microalgae Culture Systems. Argent Press, Redmond, WA, p. 364.

Furuita, H., Takeuchi, T., Toyota, M. and Watanabe, T., 1996. EPA and DHA Requirements in Early Juvenile Red Sea Bream Using HUFA Enriched *Artemia* Nauplii. *Fisheries science* 62(2), 246-251.

Garcia, J.R., Kalinowski, C.T.,H., Izquierdo, M.S.L. and Robaina, L.E.R., 2010. Marine and freshwater crab meals in diets for red porgy (*Pagrus pagrus*): effect on growth, fish composition and skin colour. *Aquaculture Research* 41 (12), pp. 1759-1769.

García-Romero, J., Ginés, R., Izquierdo, M. S., Haroun, R., Badilla, R., and Robaina, L., 2014. Effect of dietary substitution of fish meal for marine crab and echinoderm meals on growth performance, ammonia excretion, skin colour, and flesh quality and oxidation of red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture* 422, 239-248.

Gatesoupe, F. J., 2002. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia* nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture* 212(1), 347-360.

Gelabert, F., 2003. Bioencapsulation in *Artemia*: II. Influences of the particle concentration in the enrichment process. *Aquaculture* 216(1), 143-153.

Gigliotti, J. C., Davenport, M. P., Beamer, S. K., Tou, J. C. and Jaczynski, J., 2011. Extraction and characterization of lipids from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Food Chemistry* 125(3), 1028-1036.

Gomelsky, B., Cherfas, N.B., Ben-Dom, N. and Hulata, G., 1996, Color inheritance in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio* L.) inferred from color variability in



normal and gynogenetic progenies, *Israeli Journal of Aquaculture/Bamidgeh* 48 (4), pp. 219-230.

Gómez-Gil, B., Cabanillas-Ramos, J., Paez-Brambila, S., and Roque, A., 2001. Standardization of the bioencapsulation of enrofloxacin and oxytetracycline in *Artemia franciscana* Kellogg, 1906. *Aquaculture* 196(1), 1-12.

Gómez-Requeni, P., Conceição, L.E., C., Olderbakk Jordal, A. and Rønnestad, I., 2010. A reference growth curve for nutritional experiments in zebrafish (*Danio rerio*) and changes in whole body proteome during development. *Fish Physiology and Biochemistry* 36 (4), pp. 1199-215.

Gómez, M., Torres, S., Hernández-León, S., 1996. Modification of the electron transport system (ETS) method for routine measurements of respiratory rates of zooplankton. *S. Afri. J. Mar. Sci.* 17, 15–20.

González, H.E., Piloto, C.Y., Chevalier, M.P. and Rivero, N., 2006 Efectos de la *Artemia* enriquecida, sobre el crecimiento del Caballito de Mar (*Hippocampus erectus* Perry, 1810). CIVA, 006, 989–995. Available at: <http://www.civa2006.org>.

González, M., Rosas, J., Cabrera, T., Millan, J. and Velasquez, A., 2003. Larval survival of ornamental shrimp *Lysmata wurdemanni* Gibbes, 1850 (Crustacea: Decapoda) feeding on enriched *Artemia*. *Ciencia (Maracaibo)* 11 (2), pp. 107-112.

Goodwin, T.W., 1984. The biochemistry of carotenoids, vol. II. Animals, 2nd. Eds. Chapman and Hall, London, 224 pp.

Harpaz, S. and Padowicz, D., 2007. Color Enhancement in the Ornamental Dwarf Cichlid *Microgeophagus ramirezi* by Addition of Plant Carotenoids to the Fish Diet. *Israeli Journal of Aquaculture/Bamidgeh* 59 (4), pp. 195-200.

Hernández-León, S., Gómez, M., 1996. Factors affecting the respiration/ETS ratio in marine zooplankton. *J. Plankton Res.* 18 (2), 239–255.

Herrera A. Gómez M., Molina L., Otero F. and Packard T., 2009. Advances in rearing techniques and analysis of nutritional quality of two mysids species present in Gran Canaria In: Larvi '09 – Fish & Shellfish larviculture symposium. European Aquaculture Society, Special Publication No. 38, Oostende, Belgium. pp.171-174.

Ho, A.L.F.C., O'Shea, S.K. and Pomeroy, H.F., 2013, "Dietary esterified astaxanthin effects on color, carotenoid concentrations, and compositions of clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*, skin", *Aquaculture International* 21 (2), pp. 361-374.

Holt G.J., 2003. Research on culturing the early life history stages of marine ornamental species In: *Marine Ornamental species: Collection, Culture and Conservation*. Cato, J.C. and Brown, C.L. Eds. Iowa State Press. pp. 251-254.

Hora, M.C. and Joyeux, J.C., 2009. Closing the reproductive cycle: Growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions. *Aquaculture* 292 (1-2), pp. 37-41.

Hsu, W. J., Chichester, C. O., Davies, B. H., 1970. The metabolism of β -carotene and other carotenoids in the brine shrimp, *Artemia salina* (Crustacea: Branchiopoda). *Comparative biochemistry and physiology* 32(1), 69-79.



Hunt R.W.G., 1977. The specification of colour appearance: I. Concepts and terms. *Colour Research and Applications* 2, 55-68.

Iglesias, J., Otero, J. J., Moxica, C., Fuentes, L., and Sánchez, F. J. 2004. The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: paralarval rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International* 12(4-5), 481-487.

Ignatius, B., Rathore, G., Jagadis, I., Kandasamy, D., and Victor, A. C. C., 2001. Spawning and larval rearing technique for tropical clown fish *Amphiprion sebae* under captive condition. *Journal of Agriculture in Tropics* 16(3), 241-249.

IUCN, 2006. Red list of threatened species. www.redlist.org.

Izquierdo, M., 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 2, 183-191.

Izquierdo M.S., Watanabe T., Takeuchi.T., Arakawa T. and Kitajima C., 1990. Optimum EFA levels in *Artemia* to meet the EFA requirements of red seabream (*Pagrus major*). In: Status of Fish Nutrition in Aquaculture. Proceedings of the Third International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish (eds. M. Takeda y T.Watanabe). Japan Translation Center, Tokyo, Japan. pp.221-232

Izquierdo, M.S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J., Rosenlund, G. and Gines, R., 2005. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture* 250, 431-444.

Jafari, M., Kamarudin, M.S., Saad, C.R., Arshad, A., Oryan, S. and Guilani, M.H.T., 2011. Effects of Different Diets on Growth, Survival and Body Composition of *Rutilus frisii kutum* Larvae. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 6 (6), pp. 662-668.

James, R. and Sampath, K., 2004. Effect of feed type on growth and fertility in ornamental fish, *Xiphophorus helleri*. *Israeli Journal of Aquaculture/Bamidgeh*, 56 (4), pp. 264-273.

Job, S.D., Do, H.H., Meeuwig, J.J. and Hall, H.J., 2002. Culturing the oceanic seahorse, *Hippocampus kuda*. *Aquaculture* 214 (1-4), pp. 333-341.

Jones R., Kildea, T. and Hoegh-Guldberg, O., 1999. PAM chlorophyll fluorometry a new in situ technique for stress assessment in scleractinian corals, used to examine the effects of cyanide from cyanide fishing. *Marine Pollution Bulletin*, 38, 864-874.

Kalinowski, C.T., Robaina, L.E., Fernandez-Palacios, H., Schuchardt, D. and Izquierdo 2005. Effect of different carotenoid sources and their dietary levels on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour. *Aquaculture* 244 (1-4), pp. 223-231.

Kalinowski, C.T., Izquierdo, Schuchardt, D. and Robaina, L.E., 2007. Dietary supplementation time with shrimp shell meal on red porgy (*Pagrus pagrus*) skin colour and carotenoid concentration. *Aquaculture* 272 (1-4), pp. 451-457.

Kim, J., Masee, K. C., and Hardy, R. W., 1996. Adult *Artemia* as food for first feeding coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 144(1), 217-226.



Kitsos M.S., Tzomos T.H., Anagnostopoulou L. and Koukouras A., 2008. Diet composition of the seahorses, *Hippocampus guttulatus* (Cuvier, 1829) and *Hippocampus hippocampus* (L., 1758) (Teleostei, Syngnathidae) in the Aegean sea. *Journal of Fish Biology* 72,1259-1267.

Koldewey, H.J. and Martin-Smith, K., 2010. A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture* 302 (3-4), pp. 131-152.

Kop, A. and Durmaz, Y. 2008. The effect of synthetic and natural pigments on the colour of the cichlids (*Cichlasoma severum* sp., Heckel 1840). *Aquaculture International* 16 (2), pp. 117-122.

Kouba, A., Sales, J., Sergejevová, M., Kozák, P., and Masojídek, J., 2013. Colour intensity in angelfish (*Pterophyllum scalare*) as influenced by dietary microalgae addition. *Journal of Applied Ichthyology* 29(1), 193-199.

Krinsky, N. I. 1965. The carotenoids of the brine shrimp, *Artemia salina*. *Comparative biochemistry and physiology*, 16(2), 181-187.

Labrecque, L. I. and Milne, G. R., 2012. Exciting red and competent blue: the importance of color in marketing. *Journal of the Academy of Marketing Science* 40(5), 711-727.

Lane, N., 2005. *Power, sex, suicide: mitochondria and the meaning of life*. Oxford University Press, New York.

Langroudi, H.E., Mousavi, S.H., Falahatkar, B. and Moradkhani, Z., 2009. Effect of diets containing *Artemia* enriched with unsaturated fatty acids and vitamin C on angel fish *Pterophyllum scalare* propagation, *International Aquatic Research* 1 (1)

Lee, S.M., Jeon, I.G. and Lee, J.Y., 2002. Effects of digestible protein and lipid levels in practical diets on growth, protein utilization and body composition of juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture* 211 (1-4), pp. 227-239.

Leon, K., Mery, D., Pedreschi, F., and Leon, J., 2006. Color measurement in L* a* b* units from RGB digital images. *Food research international* 39(10), 1084-1091.

Liebermann S. and Field, J., 2001. Global Solutions to Global Trade Impacts? Global Trade and Consumers Choices: Coral reef in Crisis. In: *Proceedings of Annual meeting of the American Association for the Advancement of the Science*, San Francisco, California. pp: 19-54.

Lim, C.L., Dhert, P. and Sorgeloos, P., 2003. Recent developments in the application of live feeds in the freshwater ornamental fish culture. *Aquaculture* 227: 319-331.

Lim, L.C., Soh, A., Dhert, P. and Sorgeloos, P., 2001. Production and application of on-grown *Artemia* in freshwater ornamental fish farm. *Aquaculture Economics and Management* 5 (3-4), 211-228.

Lin, Q., Gao, Y., Sheng, J., Chen, Q., Zhang, B. and Lu, J., 2007. The effects of food and the sum of effective temperature on the embryonic development of the seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker. *Aquaculture* 262 (2-4), pp. 481-492.

Lin, Q., Lin, J. and Zhang, D., 2008a. Breeding and juvenile culture of the lined seahorse, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture* 277 (3-4), pp. 287-292.



- Lin, Q., Lin, J., Lu, J. and Li, B., 2008b. Biochemical Composition of Six Seahorse Species, *Hippocampus* sp., from the Chinese Coast. *Journal of the World Aquaculture Society* 39 (2), pp. 225-234.
- Lin, Q., Lin, J. and Huang, L., 2009a. Effects of substrate color, light intensity and temperature on survival and skin color change of juvenile seahorses, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture* 298 (1-2), pp. 157-161.
- Lin, Q., Lin, J., Zhang, D. and Wang, Y., 2009b. Weaning of juvenile seahorses *Hippocampus erectus* Perry, 1810 from live to frozen food. *Aquaculture* 291 (3-4), pp. 224-229.
- Lin, Q., Lin, J. and Huang, L., 2011. Ornamental Color of Seahorses *Hippocampus erectus* and *H. kuda*. *World Aquaculture 2011, Natal (Brasil)* 6-10, June
- López, A., Vera, M., Otero-Ferrer, F., Pardo, B. G., Martínez, P., Molina, L., and Bouza, C. 2010. Species identification and genetic structure of threatened seahorses in Gran Canaria Island (Spain) using mitochondrial and microsatellite markers. *Conservation genetics*, 11(6), 2431-2436.
- Lourie, S. A., Pritchard, J. C., Casey, S. P. Truong, S. K., Hall, H. J. and Vincent, A. C. J., 1999. The taxonomy of Vietnam's exploited seahorses. *Biological Journal of the Linnaean Society* 66(2), 231-256.
- Lourie S.A., Foster S.A., Cooper E.W.T. and Vincent A.C.J., 2004. A Guide to the Identification of Seahorses. Project Seahorse and Traffic North America. University of British Columbia and World Wildlife Fund, Washington, DC, USA.
- Majack, T.J., Rust, M.B., Masee, K.C., Kissil, G.W., Hardy, R.W. and Peterson, M.E., 2000. Bioencapsulation of erythromycin using adult brine shrimp, *Artemia franciscana* (Latreille). *Journal of Fish Diseases*. 23:71-76.
- Mak K.K.W., Yanase H. and Renneberg R., 2005. Cyanide fishing and cyanide detection in coral reef fish using chemical tests and biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 20: 2581-2593.
- Martínez, I., Gómez, M. and Packard, T., 2010. Potential respiration is a better respiratory predictor than biomass in young *Artemia salina*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 390, 78-83.
- Martoja, R and Martoja-Pierson, M., 1970. Técnicas de histología animal. Editorial Toray- Mason S.A., Barcelona, España, 350p.
- Miki, W., Yamaguchi, K., Konosu, Takane, T., Satake, M., Fujita., Kuwubara, H., Shimeno, S. and Takeda, M., 1985. Origin of tunaxantin in the integument of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Comp. Biochem, Physiol.* 80. pp. 195-201.
- McEvoy, L. A., Navarro, J. C., Bell, J. G. and Sargent, A. J., 1995. Autoxidation of oil emulsions during the *Artemia* enrichment process. *Aquaculture* 134(1), 101-112.
- Molina, L. and Segade, A. 2011. Aquaculture as a potential support of marine aquarium fish trade sustainability. In: *Transactions on Ecology and the environment*, Vol., 101. Ed. Witpress Southampton, United Kingdom. pp. 15-25.



Molina, L., A. López, B. Pardo, F. Otero, P. Martínez and C. Bouza., 2007. Species identification and population analysis of seahorses from Canary Islands (Spain). Aquaculture Europe 2007, Istanbul, 24-27 October 2007.

Monticini, P., 2010. The ornamental fish trade, production and commerce of ornamental fish: technical-managerial and legislative aspects. GLOBEFISH Research Programme. 102.Rome, FAO 2010.p. 132.

Mosconi-Bac, N., 1987. Hepatic disturbances induced by artificial feed in the sea bass *Dicentrarchus labrax*. during the first year of life. Aquaculture 153, 251–261.

Morgan S and Martin-Smith K., 2004. Selected Techniques for Tagging Seahorses. Project Seahorse Technical Report No.6, Version 1.0. Vancouver: Project Seahorse, Fisheries Centre, University of British Columbia.

Mosconi-Bac, N., 1987. Hepatic disturbances induced by artificial feed in the sea bass *Dicentrarchus labrax*. during the first year of life. Aquaculture 153, 251–261.

Mukherjee, A., Mandal, B. and Banerjee 2009. Turmeric as a carotenoid source on pigmentation and growth of fantail guppy, *Poecilia reticulata*. Proc. zool Soc. 62 (2), pp. 119-123.

Murugan, A., Dhanya, S., Sreepada, R.A., Rajagopal, S. and Balasubramanian, T., 2009. Breeding and mass-scale rearing of three spotted seahorse, *Hippocampus trimaculatus* leach under captive conditions. Aquaculture 290 (1-2), pp. 87-96.

Nair, S.R.S., Achuthankutty, C.T. and Royan, J.P. 1995. Comparison live adult *Artemia* and squid meat on the growth of Penaeid shrimp *Metapenaeus dobsoni* (Miers). Proceedings of the Indian National Science Academy 61, 419-422.

Navarro, J.C., Henderson, R.J., McEvoy, L.A., Bell, M.V. and Amat, F., 1999. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. Aquaculture. 174:155-166.

Naz, M. and Türkmen, M., 2009. Changes in the digestive enzymes and hormones of gilthead seabream larvae (*Sparus aurata*, L. 1758) fed on *Artemia* nauplii enriched with free lysine. Aquaculture International 17 (6), pp. 523-535.

Novelo, N.D. and Gomelsky, B., 2009. Comparison of two methods for measurement of red-area coverage in white-red fish for analysis of color variability and inheritance in ornamental (koi) carp *Cyprinus carpio*. Aquatic living resources/Ressources vivantes aquatiques 22 (1), pp. 113-116.

Ogawa T. and Brown C., 2001. Ornamental reef fish aquaculture and collection in hawaii. Aquarium Sci. Conserv. 3, 151-169.

Olivotto, I., Yasumasu, S., Gioacchini, G., Maradonna, F., Cionna, C. and Carnevalli, O., 2004. Cloning and expression of high choriolytic enzyme, a component of the hatching enzyme system, during embryonic development of the marine ornamental fish *Chrysiptera parasema*. Marine Biology 145 (6), pp. 1235-1241.

Olivotto, I., Rollo, A., Sulpizio, R., Avella, M., Tosti, L. and Carnevali, O., 2006. Breeding and rearing the Sunrise Dottyback (*Pseudochromis flavivertex*): the importance of live prey enrichment during larval development, Aquaculture 255 (1-4), pp. 480-487.



- Olivotto, I., Planas, M., Simões, N., Holt, G. J., Avella, M. A., and Calado, R., 2011. Advances in breeding and rearing marine ornamentals. *Journal of the World Aquaculture Society* 42(2), 135-166.
- Olsen, Y., Evjemo, J. O., and Olsen, A., 1999. Status of the cultivation technology for production of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) juveniles in Norway/Europe. *Aquaculture* 176(1), 3-13.
- Orban, E., T. Nevigato, M. Masci, G. Di Lena, I. Casini, R. Caproni, L. Gambelli, P. De Angelis, and M. Rampacci., 2007. Nutritional quality and safety of European perch (*Perca fluviatilis*) from three lakes of Central Italy. *Food Chemistry* 100:482–490.
- Otero-Ferrer, 2012. Seahorses in Gran Canaria Island (Spain) Ecology and Aquaculture – Combined Tools for Marine Conservation Issues. Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 279 pp.
- Otero-Ferrer F., Molina L., Socorro J., Herrera R., Fernández Palacios H. and Izquierdo M.S., 2009. Efecto de los misidáceos en la calidad de la puesta en el caballito de mar, *Hippocampus hippocampus* (Linnaeus, 1758). XII Congreso Nacional de Acuicultura, Madrid 24-26, Noviembre 2009
- Otero-Ferrer, F., Molina, L., Socorro, J., Herrera, R., Fernández-Palacios, H., and Soledad Izquierdo, M., 2010. Live prey first feeding regimes for short-snouted seahorse *Hippocampus hippocampus* (Linnaeus, 1758) juveniles. *Aquaculture research* 41(9), e8-e19.
- Otero-Ferrer, F., Molina, L., Socorro, J., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M., and Herrera, R., 2012. Effect of Different Live Prey on Spawning Quality of Short-Snouted Seahorse, *Hippocampus hippocampus* (Linnaeus, 1758). *Journal of the World Aquaculture Society* 43(2), 174-186.
- Owens, T.G. and King, F.D., 1975. The measurement of respiratory electron transport system activity in marine zooplankton. *Mar. Biol.* 30, 27–36.
- Packard, T.T., Healy, M.L. and Richards, F.A., 1971. The vertical distribution of the activity of the electron transport system in plankton. *Limnol.Oceanogr.* 16 (1), 60–70.
- Packard, T. and Gómez, M., 2008. Exploring a first-principles-based model for zooplankton respiration. *ICES J. Mar. Sci.* 65, 371–378.
- Packard, T. T., Osma, N., Fernández-Urruzola, I., Codispoti, L. A., Christensen, J. P., and Gómez, M., 2015. Peruvian upwelling plankton respiration: calculations of carbon flux, nutrient retention efficiency and heterotrophic energy production. 2014. *Biogeosciences* 21, 2641-2654, DOI: 10.5194/bg-12-2641-2015.
- Paglialonga, A., Escoubet, P., and Bentivegna, F., 2001. Husbandry of Anthias anthias under natural and artificial conditions. *BULLETIN-INSTITUT OCEANOGRAPHIQUE MONACO-NUMERO SPECIAL-*, (1), 209-212.
- Palma, J., Stockdale, J., Correia, M. and Andrade, J.P. 2008. Growth and survival of adult long snout seahorse (*Hippocampus guttulatus*) using frozen diets. *Aquaculture* 28 (1-4), pp. 55-59.



Palma, J., Bureau, D.P. and Andrade, J.,P. 2011. Effect of different *Artemia* enrichments and feeding protocol for rearing juvenile long snout seahorse, *Hippocampus guttulatus*. *Aquaculture* 318 (3-4), pp. 439-443.

Parameshwaran, K., Edirisinghe, U., Dematawewa, C. M. B., and Nandasena, K. G., 2001. Effect of live and formulated feeds on larval growth and survival of guppy (*Poecilia reticulata*) reared in indoor tanks.

Paulay G., 1997. *Diversity & Distribution of Reef Organisms*. Chapman and Hall, 115 Fifth Ave, NY 1003 (USA) pp: 303-304.

Payne, M.F. and Rippingale, R.J., 2000. Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched *Artemia*. *Aquaculture* 188 (3-4), pp. 353-361.

Priluck Grossman, R., and Wisenblit, J. Z. 1999. What we know about consumers' color choices. *Journal of marketing practice: Applied marketing science* 5(3), 78-88.

Qin, G., Lin, Q., Gu, N., Lin, J. and Huang, L. 2012. Effect of broodstock origin, background and substrate color on skin coloration of three-spotted seahorses *Hippocampus trimaculatus* Leach, 1814. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 416, 129-134.

Robaina, L., Izquierdo, M.S., Moyano, F.J., Socorro, J., Vergara, J.M. and Montero, D., 1998. Increase of the dietary n-3/n-6 fatty acid ratio and addition of phosphorus improves liver histological alterations induced by feeding diets containing soybean meal to gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 161 (1-4), pp. 281-293.

Roopin, M., Henry, R.P. and Chadwick, N.E., 2008. Nutrient transfer in a marine mutualism: patterns of ammonia excretion by anemonefish and uptake by giant sea anemones. *Marine Biology* 154 (3), pp. 547-556.

Rosa, I.M.I.M., Alves, R., Bonifácio, K., M.K.M., Mourão, J.,S.J.S., Osório, F.,M.F.M., Oliveira, T.P.T.P. and Nottingham, M.C.M.C., 2005. Fishers knowledge and seahorse conservation in Brazil. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine* 1, pp. 12-12.

Ruscoe, I.M., Shelley, C.C. and Williams, G.R., 2004. The combined effects of temperature and salinity on growth and survival of juvenile mud crabs (*Scylla serrata* Forskal). *Aquaculture* 238 (1-4) 239-247.

Ruyter, B., Moya-Falcón, C., Rosenlund, G., and Vegusdal, A., 2006. Fat content and morphology of liver and intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*): Effects of temperature and dietary soybean oil. *Aquaculture* 252 (2), 441-452.

Ryer, C. H., Lemke, J. L., Boersma, K., and Levas, S., 2008. Adaptive coloration, behavior and predation vulnerability in three juvenile north Pacific flatfishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 359(1), 62-66.

Sandusky, C. L., and Heath, J. L., 1998. Sensory and instrument-measured ground chicken meat color. *Poultry science* 77(3), 481-486.



- Sanudin, N., Tuzan, A. D., and Yong, A. S. K., 2014. Feeding activity and growth performance of shrimp post larvae *Litopenaeus vannamei* under light and dark condition. *Journal of Agricultural Science* 6 (11), p103.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., and Estevez, A., 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177(1), 191-199.
- Sawant, M. S., Zhang, S., and Li, L., 2001. Effect of salinity on development of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Current Science* 81(10), 1347-1349.
- Scarratt, A., 1996. Techniques for raising lined seahorses (*Hippocampus erectus*). *Aquarium Frontiers* 3, 24-29.
- Schiedt, K. and Liaaen-Jensen, K., 1995. Isolation and analysis. In: G. Britton, S. Liaaen-Jensen and H. Pfander, Editors, *Carotenoids, Isolation and Analysis*, Birkhäuser, Basel, 1 A: 81-108.
- Schuchardt, D., Fernandez-Palacios, H., Hernandez, C.M., Kalinowski, C.T., Izquierdo, M.S., Socorro, J., Vergara, J.M. and Robaina, L.E., 2006. Preliminary Studies on the Nutritional Requirements of Red Porgy (*Pagrus pagrus*). XII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding (XII ISFNF) 2006 May 28.
- Sealey, W.M., Barrows, F.T., Casten, M. and Hardy, R.W., 2009. Dietary Protein Source and Level Affects Growth in Neon Tetras. *North American Journal of Aquaculture* 71 (4), pp. 320-324.
- Segade, Á., Robaina, L., Otero-Ferrer, F., García Romero, J. and Molina Domínguez, L., 2014. Effects of the diet on seahorse (*Hippocampus hippocampus*) growth, body colour and biochemical composition. *Aquaculture Nutrition* 21(6), 807-813.
- Segade, Á., Robaina, L., Novelli, B., Otero-Ferrer, F., and Molina Domínguez, L. 2015. Effect of the diet on lipid composition and liver histology of short snout seahorse *Hippocampus hippocampus*. *Aquaculture Nutrition*.
- Seixas, P., Rey-Méndez, M., Valente, L. M., and Otero, A. 2008. Producing juvenile *Artemia* as prey for *Octopus vulgaris* paralarvae with different microalgal species of controlled biochemical composition. *Aquaculture* 283(1), 83-91.
- Shi, Z., Yang, G. and Chen, Y., 2010. Body color and fin shape in filial generation from several ornamental swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Fisheries Science/Shuichan Kexue* 29(4), 212-216.
- Smith, G. G., Ritar, A.J., Phleger, C.F., Nelson, M.M., Mooney, B., Nichols, P.D. and Hart, P.R., 2002. Changes in gut content and composition of juvenile *Artemia* after oil enrichment and during starvation. *Aquaculture* 208: 137-158.
- Smith, G. G., Brown, M. R., and Ritar, A. J., 2004. Feeding juvenile *Artemia* enriched with ascorbic acid improves larval survival in the spiny lobster *Jasus edwardsii*. *Aquaculture Nutrition* 10(2), 105-112.
- Sorgeloos, P. 1980. The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. *The brine shrimp Artemia*, 3, 25-46.



Sorgeloos, P., Dhert, P. and Candreva, P., 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia spp.*, in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200(1), 147-159.

Spalding M, Ravilious C. and Green E., 2001. World Atlas of Coral Reefs. University of California Press, Berkeley, USA. 404 pp.

Stottrup, J. and McEvoy Lesley., 2003. Live feeds in marine aquaculture. (0632054956)

Strüssmann, C.A. and Takashima, F., 1990. Hepatocyte nuclear size and nutritional condition of larval pejerrey, *Odontesthes bonariensis* Cuvier et Valenciennes. *J. Fish Biol.* 36, 59–65.

Stuart-Fox, D. E. V. I., Whiting, M. J., and Moussalli, A., 2006. Camouflage and colour change: antipredator responses to bird and snake predators across multiple populations in a dwarf chameleon. *Biological Journal of the Linnean Society*, 88(3), 437-446.

Tacon, A., 1995. Nutritional fish pathology. Morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish. FAO, ROME (ITALY). pp. 75.

Teske, P. R., Hamilton, H., Palsbøll, P. J., Choo, C. K., Gabr, H., Lourie, S. A. and Matthee, C. A. 2005. Molecular evidence for long-distance colonization in an Indo-Pacific seahorse lineage. *Marine Ecology Progress Series*, 286, 249-260.

Thangaraj, M. and Lipton, A.P., 2008. Survival and Growth of Captive Reared Juvenile Seahorse (*Hippocampus kuda*) Fed Live Feeds and Fishmeal, *Israeli Journal of Aquaculture/Bamidgeh* 60 (3), pp. 185-189.

Tibaldi, E., Tulli, F. and Lanari, D., 1994. Arginine requirement and effect of different dietary arginine and lysine levels for fingerling sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 127 (2-3), pp. 207-218.

Tlustý, M., 2002. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. *Aquaculture* 205(3), 203-203.

Tocher, D. R., Mourente, G., and Sargent, J. R., 1997. The use of silages prepared from fish neural tissues as enrichers for rotifers (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* in the nutrition of larval marine fish. *Aquaculture* 148(2), 213-231.

Tong, L.J., Moss, G.A., Paewai, M.M. and Pickering, T.D., 1997. Effect of brine-shrimp numbers on growth and survival of early-stage *phyllosoma* larvae of the rock lobster *Jasus edwardsii*. *Marine and Fresh Water Research*, 48, 8: 935-940.

Tou, J. C., Jaczynski, J., and Chen, Y. 2007. Krill for human consumption: nutritional value and potential health benefits. *Nutrition Reviews* – Washington, 65(2), 63.

Tziouveli, V., Hall, M. and Smith, G.G., 2012. Evaluation of lipid-enriched *Artemia* on the reproductive performance of the white-striped cleaner shrimp, *Lysmata amboinensis*. *Aquaculture International* 20 (2), pp. 201-211.

Urban, J., Štys, D., Sergejevová, M., and Masojídek, J., 2013. Expertomica Fishgui: comparison of fish skin colour. *Journal of Applied Ichthyology*, 29(1), 172-180.



Urban J., Botella Á. S., Robaina L. E., Bárta A., Soucek E., Cisar P and Papacek S., 2015. FISCEAPP: FISH Skin Color Evaluation APPLication. 17th ICDIP (International Conference on Digital Image Processing), Dubai, UAE.

Ut. V.N., Vay, L.L., Nghia, T.T. and Hanh, T.T.H., 2007. Development of nursery culture techniques for the mud crab *Scylla paramamosain* (Estampador). *Aquaculture Research* 38 (14) 1563-1568.

Valladares, S., P. Quintas, A. Blanco, A. Chamorro, T. Hermelo and M. Planas, 2011. Description of *Hippocampus guttulatus* in Punta Cabalo (Ría de Arousa, NE Spain). The First Syngnathid Biology International Symposium, Fiskebäckskil, Suecia, 25-29 April 2011.

Van der Meeren T., Klungsoyr J., Wilhelmsen S. and Kvenseseth P.G., 1993. Fatty acid composition of unfed and growing cod larvae, *Gadus morhua* L., feeding on natural plankton in large enclosures. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24, 167-185.

Van, d.S., Martinez, M., Flik, G. and Wendelaar Bonga, S. 2004, "Effects of husbandry conditions on the skin colour and stress response of red porgy, *Pagrus pagrus*", *Aquaculture* 241 (1-4), pp. 371-386.

Vasudhevan, I., James, R. and Sampath, K., 2009. Effect of Food Quality on Growth of the Ornamental Fish Koi carp, *Cyprinus carpio carpio* (var). *Fishery technology. Society of Fisheries Technologists (India)*, 46 (1), pp. 79-82.

Velu, C. S. and N. Munuswamy, 2007. Composition and nutritional efficacy of adult fairy shrimp *Streptocephalus dichotomus* as live feed. *Food Chemistry*. 100(4):1435–1442.

Vijayagopal, P., Gopakumar, G.N. and Vijayan, K.K., 2008. Empirical feed formulations for the marine ornamental fish, striped damselfish, *Dascyllus aruanus* (Linne 1758) and their physical, chemical and nutritional evaluation. *Aquaculture Research* 39 (15), pp. 1658-1665.

Viciano, E., Iglesias, J., Lago, M.J., Sánchez, F.J., Otero, J.J. and Navarro, J.C., 2011. Fatty acid composition of polar and neutral lipid fractions of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 paralarvae reared with enriched on-grown *Artemia*. *Aquaculture Research*, 42: 704-709.

Vincent, A.C.J., 1995. Trade in seahorses for traditional Chinese medicines, aquarium fishes and curios. *TRAFFIC Bull.* 15, 125–128.

Vincent, A.C.J. and Clifton-Hadley, R.S., 1989. Parasitic infection of the seahorse (*Hippocampus erectus*) — a case report. *J. Wildlife Dis.* 25, 404–406.

Vincent, ACJ, Brian G. Giles, Christina A. Czembor y Sarah J. Foster, 2011. Trade in seahorses and other syngnathids in countries outside Asia (1998-2001). UBC, Vancouver, BC (Canada). 181 pp.

Wabnitz C., Taylor M., Green E. and Razak T., 2003. From ocean to aquarium. Cambridge, UK. United Nations Environment Programme – World Conservation Monitoring Centre.

Wallat, G.K., Lazur, A.M. and Chapman, F.A., 2005. "Carotenoids of Different Types and Concentrations in Commercial Formulated Fish Diets Affect Color and



Its Development in the Skin of the Red Oranda Variety of Goldfish". North American Journal of Aquaculture 67 (1), pp. 42-51.

Wardley, T. 2001. Pot-bellied seahorses and their colours. Masters Thesis, University of Tasmania, pp. 98.

Watanabe, T., 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. Journal of the World Aquaculture Society, 24(2), 152-161.

Wilkinson C., 2004. Status of Coral Reefs of the World 2004. Townsville: Australian Institute of Marine Science. 264 pp.

Woods, C.M.C., 2000. Preliminary observations on breeding and rearing the seahorse *Hippocampus abdominalis* teleostei: Syngnathidae in captivity. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 34, 475-485.

Woods, C.M.C., 2005. Growth of cultured seahorses (*Hippocampus abdominalis*) in relation to feed ration. Aquaculture International 13 (4), pp. 305-314.

Woods, C.C. and Valentino. F., 2003. Frozen mysids as an alternative to live *Artemia* in culturing seahorses *Hippocampus abdominalis*. Aquaculture Research 34 (9), pp. 757-763.

Woods E. and Rajasuriya A., 1999. Sri Lanka Marine Aquarium Fishery Conservation and management issues. Marine Conservation Society and national Aquatic Resources Agency 47 pp.

Wulf, D. M. and Wise, J. W. 1999. Measuring muscle color on beef carcasses using the L* a* b* color space. Journal of Animal Science, 77(9), 2418-2427.

Yam, K. L. and Papadakis, S. E., 2004. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. Journal of Food Engineering, 61(1), 137-142.

Yasir, I. and Qin, J.G., 2009a. Impact of Background on Color Performance of False Clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. Journal of the World Aquaculture Society 40 (6), pp. 724-734.

Yasir, I. and Qin, J.G., 2009b. Effect of Light Intensity on Color Performance of False Clownfish, *Amphiprion ocellaris* Cuvier. Journal of the World Aquaculture Society 40 (3), pp. 337-350.

Yasir, I. and Qin, J.G., 2010. Effect of Dietary Carotenoids on Skin Color and pigments of False Clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. Journal of the World Aquaculture Society 41 (3), pp. 308-318.

Yigit, M., Bulut, M., Ergün, S., Güroy, D., Karga, M., Kesbiç, O.S., Yilmaz, S., Acar, Ü. and Güroy, B., 2012. Utilization of Corn Gluten Meal as a Protein Source in Diets for Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. Journal of Fisheries Sciences 6 (1), pp. 63-73.

Zambonino Infante, J.,L. and Cahu, C.L., 1999. High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. The Journal of nutrition 129 (6), pp. 1195-200.

Zar J.H., 2009. Biostatistical analysis, 5th Edition, Upper Saddle River, NJ: Prentice- Hall.

BIBLIOGRAFIA



Zhang, D., Zhang, Y., Lin, J. and Lin, Q. 2010. Growth and survival of juvenile lined seahorse, *Hippocampus erectus* (Perry), at different stocking densities. *Aquaculture Research* 42(1), 9-13.

Zhang, D., Yin, F. and Lin, J., 2011. Criteria for assessing juvenile quality of the lined seahorse, *Hippocampus erectus*. *Aquaculture* 322-323, pp. 255-258.