

**UNIVERSIDAD CATOLICA DE TEMUCO**  
**FACULTAD DE ACUICULTURA Y CIENCIAS VETERINARIAS**  
**ESCUELA DE ACUICULTURA**



**“EFECTO DE LA RELACION EPA/DHA EN LARVAS  
DE PUYE (*Galaxias maculatus*, Jenyns, 1842)  
CULTIVADAS EN DIFERENTES SALINIDADES”**

**NELLY MARIA DIAZ ASSIS**

**TEMUCO**

**2004**

**UNIVERSIDAD CATOLICA DE TEMUCO**  
**FACULTAD DE ACUICULTURA Y CIENCIAS VETERINARIAS**  
**ESCUELA DE ACUICULTURA**



**“EFECTO DE LA RELACION EPA/DHA EN LARVAS  
DE PUYE (*Galaxias maculatus*, Jenyns, 1842)  
CULTIVADAS EN DIFERENTES SALINIDADES”**

Tesis de Grado presentada como parte  
de los requisitos para optar al grado de  
Licenciado en Ciencias de la Acuicultura.

**Profesor Guía: Dr. Patricio Dantagnan**

**Realizado por : Nelly Díaz Assis**

**TEMUCO**

**2004**

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias querido Dios por no apartarte de mí y permitirme terminar el escrito con buen ánimo aún debido a las adversidades.

A mi Profesor Guía Dr. Herman Patricio Dantagnan, por hacerme partícipe de una parte de su tesis doctoral y agradecer la sólida formación que me brindó durante los años de permanencia en la Universidad y en el desarrollo de mi tesis.

A mi familia que ha estado siempre a mi lado, por su paciencia y apoyo incondicional.

A mi esposo Mauricio Valenzuela, por su apoyo y amor, lo que me hace salir adelante y ver las cosas con optimismo, además de darme fuerzas para terminar más rápidamente este escrito.

Al soporte técnico otorgado por la Escuela de Acuicultura de la Universidad Católica de Temuco.

*La vida... un zig – zag de altos y bajos que nos permiten progresar y crear nuestro camino, mientras más bajos tenga ese camino hay esperanzas de un mañana no muy lejano, si te das cuenta que en ti están las fortalezas para superar el presente.*

*-Nelly Díaz Assis-*

*Dedicado a mis padres; Pedro y Viviana  
y a mis hermanos; Felipe y Laura,  
Los pilares de mi formación.*

<b>INDICE</b>	<b>Página</b>
<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>1. Introducción</b> .....	3
<b>2. Revisión Bibliográfica</b> .....	9
<b>3. Hipótesis</b> .....	14
<b>4. Objetivos</b> .....	16
4.1. Objetivo General.....	16
4.2. Objetivo Específico.....	16
<b>5. Material y Métodos</b> .....	17
5.1. Cultivo de Rotíferos.....	17
5.2. Conteo y Preparación de Rotíferos.....	18
5.3. Enriquecimiento y Preparación de Dietas.....	19
5.4. Evaluación del Perfil de los Acidos grasos a los Rotíferos...20	
5.5. Diseño Experimental.....	22
5.6. Condiciones de Cultivo.....	22
5.7. Parámetros Evaluados.....	25
5.7.1. Supervivencia.....	25
5.7.2. Crecimiento.....	25
5.7.3. Supervivencia al estímulo del estrés.....	25
5.7.4. Análisis Estadístico.....	26
<b>6. Resultados</b> .....	27

6.1. Supervivencia Total.....	27
6.2. Crecimiento.....	32
6.3. Supervivencia al Estrés.....	37
<b>7. Discusión.....</b>	<b>42</b>
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>50</b>
<b>9. Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>52</b>

## ABREVIATURAS

AGE	: Acido graso esencial.
AGPI = PUFA	: Acido graso polinsaturado.
AGAI	: Acido graso altamente insaturado.
DHA	: Acido Docosahexaenoico (22:6 n-3).
EPA	: Acido Eicosapentaenoico (20:5 n-3).
HUFAs	: Acido graso insaturado.
UTM	: Unidades térmicas acumuladas.
I.C.E	: Indice de crecimiento específico.
AA	: Acido Araquidónico.
µm	: micras.

## RESUMEN

Se cultivaron larvas de *Galaxias maculatus* en condiciones de laboratorio durante 20 días, sometidas a diferentes salinidades y dietas con distintas relaciones EPA/DHA, con la finalidad de poder determinar en qué condiciones se puede obtener una mejor sobrevivencia, crecimiento y sobrevivencia al estímulo de estrés. Los resultados de este experimento, señalan que la relación EPA/DHA 2,02 logró las mejores sobrevivencias a la salinidad de 0<sup>0</sup>/<sub>00</sub>, conteniendo un 1,21% de EPA y un 0,60% de DHA, lo que indica que las larvas al ser cultivadas en agua dulce, sus requerimientos de una relación EPA/DHA son más favorables al EPA que al DHA. Las mejores tasas de crecimiento se obtuvieron en larvas mantenidas a 0<sup>0</sup>/<sub>00</sub> y 10<sup>0</sup>/<sub>00</sub> con las relaciones EPA/DHA 2,02 y 2,18, siendo significativamente mayor a las alcanzadas a 15<sup>0</sup>/<sub>00</sub>. La mayor sobrevivencia obtenida después de aplicar el estímulo del estrés fue a salinidad de 10<sup>0</sup>/<sub>00</sub> con la relación EPA/DHA 0,64; sin embargo también se encontraron mejores sobrevivencias a salinidad 0<sup>0</sup>/<sub>00</sub>, pero con la relación EPA/DHA 2,02 y 2,18.

**Palabras Claves:** *Galaxias maculatus*; salinidad; EPA (20-5 n-3); DHA (22-6 n-3); sobrevivencia; crecimiento; estrés.

## ABSTRACT

Larvae of *Galaxias maculatus* have been cultivated in laboratory conditions during 20 days, submitted to different salinities and diets with different EPA/DHA ratios, in order to determine in which conditions it can be obtained a better survival level, growth and survival under stress stimulus. The results of this experiment indicates that the EPA/DHA ratio reached the best survival level under a salinity of 0<sup>0</sup>/<sub>00</sub>, containing 1,21% of EPA and 0,60% of DHA. This indicates that when the larvae are cultivated in sweet water, their EPA/DHA requirements are more favorable to EPA than DHA. The best growth rates can be obtained with larvae maintained at 0<sup>0</sup>/<sub>00</sub> and 10<sup>0</sup>/<sub>00</sub> with a EPA/DHA ratio of 2,02 and 2,18. This is significantly greater than the rates that reached 15<sup>0</sup>/<sub>00</sub>. The greatest survival level obtained after the stress application was with a salinity of 10<sup>0</sup>/<sub>00</sub> and with EPA/DHA ratio of 0,64. Nevertheless, better survival levels was found with a salinity level of 0<sup>0</sup>/<sub>00</sub> and a EPA/DHA ratios of 2,02 and 2,18.

**Keywords** : *Galaxias maculatus*; salinity; EPA (20-5 n-3); DHA (22-6 n-3); survival; growth; stress.

## 1. INTRODUCCIÓN

La alimentación de larvas de peces marinos se ve a menudo afectada debido a que existen pocas presas vivas para su consumo, tal es el caso de rotíferos y artemias. Este reducido rango de alimento disponible para la larva puede provocar en primer lugar un desequilibrio nutricional o una deficiencia nutricional (Watanabe *et al.*, 1993). Por esta razón, una larga cantidad de investigaciones han sido dedicadas a estudiar los requerimientos nutricionales de larvas de peces marinos. La mayor parte de estas investigaciones están relacionadas con los requerimientos de ácidos grasos esenciales (AGE) en larvas de peces.

Diversos estudios han mostrado que uno de los principales factores que afectan el valor nutricional de la presa viva es su contenido en AGE para los peces marinos (Léger *et al.*, 1986).

En la actualidad se ha determinado que en la mayoría de los casos, los ácidos grasos de mayor importancia a considerar en un estudio de requerimiento nutricional en larvas de peces son: ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs n-3 y n-6), ácido Docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3), ácido Eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3), ácido linoleico (18:2 n-6), ácido linolénico (18:3 n-3), ácido araquidónico (20:4 n-6) (Izquierdo *et al.*, 1989; Koven *et al.*, 1989, 1992; Mourente *et al.*, 1993; Rodríguez *et al.*, 1993; Watanabe, 1993; Izquierdo, 1996; Furita *et al.*, 1996). Estos ácidos grasos son esenciales ya que no pueden ser sintetizados por el organismo y

cumplen un rol fundamental estructural, y también en los componentes de la membrana de fosfolípidos.

Los ácidos grasos son componentes que se encuentran en cantidades menores en peces marinos, excepto los de la serie n-3 (PUFAs) que son ácidos grasos predominantes en el ambiente marino. Por lo mismo, la biomembrana de los peces contiene principalmente ácidos grasos de cadena larga (mayor o igual a 20 carbonos). Tal es el caso de los ácidos grasos insaturados (HUFAs), principalmente el ácido Docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3) y ácido Eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3).

También los ácidos grasos cumplen importantes roles en la reproducción de peces teleósteos. El contenido plasmático en peces posee una gran cantidad de ácidos grasos que sirven como fuente de energía que son usados para el desarrollo gonadal (Henderson y Tocher, 1987; Ballantyne *et al.*, 1996). La mayor cantidad de ácidos grasos se encuentran en el huevo y son una importante fuente de energía una vez ocurrida la fertilización.

Los lípidos cumplen importantes funciones: son una fuente importante de energía (ATP). De hecho, de todos los nutrientes, los lípidos son los compuestos más energéticos, el nivel energético global comparativo es: lípidos 9.5 Kcal/g, proteínas 5,6 Kcal/g, carbohidratos 4,2 Kcal/g. De aquí que los lípidos se pueden utilizar como fuente de energía, de modo tal que las proteínas, nutrientes mucho más valiables, se destinen exclusivamente para crecimiento. En particular, los ácidos grasos libres, derivados de los

triglicéridos (grasas y aceites) representan la principal fuente de combustible aeróbico para el metabolismo energético del músculo del pez. Los lípidos son componentes esenciales de todas las membranas celulares, sirven como vehículo biológico en la absorción de vitaminas liposolubles A, E y K, son fuentes de ácidos grasos esenciales, y que son indispensables para el mantenimiento e integridad de las membranas celulares, son además precursores de la hormona prostaglandina. En definitiva, los lípidos son fuente de energía metabólica en la formación de las gónadas femeninas de peces, desarrollo embrionario y son material esencial para la formación de células y membrana de tejidos (Sargent, 1995).

Los ácidos grasos polinsaturados (AGPI) más abundante en los tejidos de los peces y crustáceos, tanto para especies dulceacuícolas como marinas, pertenecen a la serie (n-3), mientras que los de la serie n-6 generalmente se presentan a una concentración más baja; sin embargo en ambientes dulceacuícolas, se han reportado niveles mayores de las series n-6 que la de la serie n-3. Quizá esto no sea sorprendente si se considera que la dieta de los peces de agua dulce contiene elementos derivados a partir de fuentes terrestres, que consecuentemente son ricas en ácidos grasos de la serie n-6. De manera general se considera que los ácidos grasos de la serie n-3 permiten un grado mayor de insaturación (requisito indispensable para una mayor fluidez de membranas, flexibilidad y permeabilidad a temperaturas bajas). De hecho, se piensa que el requerimiento nutricional de los peces, para los ácidos las series n-3 de ácidos grasos esenciales, sobre las series

n-6, se debe fundamentalmente a la baja temperatura de su medio acuático (en comparación con los mamíferos), por lo que mientras más baja sea la temperatura, mayor será la incorporación de ácidos grasos polinsaturados (AGPI) de la serie n-3 en los tejidos. Además de las diferencias en el contenido de ácidos grasos polinsaturados n-6, en los tejidos de peces marinos y dulceacuícolas, los peces de agua dulce también muestran concentraciones mayores de ácidos grasos polinsaturados de cadena corta, de las series n-3 en los tejidos. (<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB492S/AB492S02.htm>).

Con excepción de los peces estrictamente carnívoros, los peces de agua dulce son capaces de alargar y posteriormente desaturar ácidos 18:2 n-6 ó 18:3 n-3 (dependiendo de la especie de pez) al ácido graso 20:4 n-6 y 22:6 n-3 respectivamente. Se piensa que estos ácidos grasos altamente insaturados (AGAI) son responsables de funciones metabólicas atribuidas a los AGE, de hecho, para la mayoría de los peces, los AGAI tienen una mayor actividad de AGE que sus unidades básicas (18:2 n-6 ó 18:3 n-3). En general, los peces dulceacuícolas de agua fría, muestran un requerimiento casi exclusivo para los AGPI de las series n-3 en su dieta, tal es el caso de los salmónidos, mientras que las especies dulceacuícolas de zonas cálidas, requieren ambas series de ácidos grasos polinsaturados (tanto de la n-3 como de la n-6) por ejemplo carpas y anguilas, o únicamente las series n-6 como es el caso de la Tilapia. En el caso de peces marinos carnívoros como es el caso de red seabream, platija, dorada y rodaballo, han perdido la

habilidad para alargar la cadena y desaturar el ácido 18:3 n-3, debido a que los organismos consumidos son ricos en ácidos 22:6 n-3 y 20:5 n-3. Consecuentemente a los peces marinos carnívoros se les deberán suministrar los ácidos grasos 22:6 n-3 ó 20:5 n-3 en una forma ya elaborada (Kanazawa *et al.*, 1985).

A través del el presente estudio se pretende aportar conocimiento en relación a los requerimientos nutricionales específicos del pez estuarino denominado “puye” (*Galaxias maculatus*).

*Galaxias maculatus* es conocido en Chile como “puye”, es un pequeño pez nativo perteneciente al orden osmeriformes y de la familia Galaxiidae, es diadrómico y posee una distribución circumantártica y habita en aguas frías del hemisferio sur (Dantagnan *et al.*, 2002). *Galaxias maculatus* es una especie carnívora, las larvas recién nacidas de aproximadamente 6 mm de longitud total, posee un vitelo bastante pequeño que se termina de absorber en la primera semana de vida y posee la capacidad inmediata de ingerir presas vivas o inertes después de la eclosión (Dantagnan *et al.*, 1995). A pocos días de nacidas, las larvas se muestran bastante voraces y tienden a presentar un fuerte canibalismo en donde las de mayor tamaño predan sobre las más pequeñas. La dieta natural de las poblaciones de puyes consiste básicamente en microcrustáceos (anfípodos, copépodos y cladóceros) y larvas de insectos. Estas especies pueden alcanzar su tamaño comercial entre los 4 a 6 cm, en aproximadamente 6 meses.

El “puye” por su condición de presentar un juvenil cristalino lo convierte en un símil comercial de la “angula” (larva cristalina de la anguila), un plato fino de mesa. En los mercados de México y España el puye alcanza precios elevados del orden de los US\$ 100 el kilo y no menos de US\$ 25 el kilo como producto congelado. (Bórquez *et al.*, 1996) lo que constituye un especie atractiva para su producción comercial.

Esta investigación pretender abordar el estudio de los requerimientos de ácidos grasos esenciales en larvas de *Galaxias maculatus*, a través de experimentos pilotos de cultivo en larvas alimentadas con rotíferos enriquecidos con diferentes relaciones de ácidos grasos y probados a diferentes salinidades lo que puedan permitir una mejor sobrevivencia, crecimiento, resistencia durante la primera etapa del cultivo larval de esta especie.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Recientes investigaciones en ácidos grasos esenciales (AGE), han demostrado que especies de peces marinos requieren una alta cantidad de ácidos grasos altamente insaturados (n-3-HUFA) tales como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) para su normal crecimiento. La cantidad de ácidos grasos requeridos difieren de especie a especie, especialmente entre peces de agua dulce y peces marinos.

Las larvas de peces marinos son incapaces de sintetizar AGPI, especialmente de la familia n-3. Estudios realizados en rodaballo han descrito que a los 11 – 15 días después de la eclosión, el sistema enzimático de esta especie no está desarrollado, y los niveles totales de enzimas endógenas son más bajos en comparación con la fase adulta (Sargent *et al.*, 1997), por lo tanto, las larvas a esta edad no pueden producir ácidos grasos de cadena larga de 20 carbonos a partir de ácidos grasos de 18 carbonos, debido a que les falta la enzima C20 - elongaza y 5 - Desaturaza (Sargent *et al.*, 1997). Los requerimientos mínimos de AGPI de la serie n-3 en larvas de rodaballo son aproximadamente del 1,3% del peso seco de la presa (Le Millinaire *et al.*, 1983). La sobrevivencia y pigmentación de esta especie también dependen significativamente de los niveles de dos ácidos grasos de la serie n-3: Eicosapentaenoico (EPA) y Docosahexaenoico (DHA) los cuales pueden ser consumidos a través del alimento vivo. Puesto que *Brachionus* y *Artemia* carecen naturalmente de estos dos ácidos grasos, deben

necesariamente ser enriquecidos con microalgas (o mezclas de microalgas) con contenido de AGPI, o por enriquecedores comerciales balanceados (Castell *et al.*, 1994). Las relaciones mínimas de dieta con contenido de DHA/EPA en los rotíferos y artemia para el crecimiento normal de las larvas de rodaballo son 0,4 y 0,7 respectivamente, y con contenido de DHA de 0,5 – 1,0% de peso seco. Otro punto importante a destacar en esta especie es el problema de albinismo (falta de pigmentación sobre el lado ocular del pez plano), los cuales están directamente relacionado con la dieta, es decir, cuando falta una proporción de los componentes nutricionales como DHA, así como de vitamina A y ciertos fosfolípidos.

Por otro lado diversos investigadores han usado la relación DHA/EPA como un indicador del nivel óptimo requerido de EPA y DHA para un normal crecimiento y desarrollo de la larva (Koven *et al.*, 1993; Rainuzzo *et al.*, 1994; Reitan *et al.*, 1994). Además, la deficiencia de la relación DHA/EPA produce anomalías en el opérculo, afectando la morfología del pez y su funcionamiento biológico (Bell *et al.*, 1996), lo cual han sido descritas como un signo de deficiencia nutricional (Halver *et al.*, 1975). Algunos autores han teorizado que las deformidades del opérculo son causados por mecanismos de stress especialmente durante los desoves, transporte o bien operaciones de rutina del hatcherie (Margor- Jensen, 1993), y se sabe que ciertos ácidos grasos, como el DHA, está asociada fuertemente a respuestas de estrés.

En especies de agua dulce el ácido linolénico (18:3 n-3) es convertido a DHA vía EPA, distinto es el caso de las especies marinas en que la

conversión de EPA a DHA es muy limitada (Kanazawa, 1985), esto se debe al hecho de que el DHA es usualmente alto en huevos de peces marinos y éste es rápidamente reducido durante el desarrollo larval ya que este ácido graso (DHA) es utilizado como fuente de energía durante el desarrollo o convertido en otras importantes sustancias como prostaglandinas (Watanabe *et al.*, 1978).

Recientes estudios en peces marinos han demostrado que el DHA es superior al EPA como ácido graso esencial para larvas y juveniles de red seabream y striped jack. En el caso de las larvas de red seabream, una alimentación baja en n-3 HUFA produce una baja tasa de crecimiento y sobrevivencia, en conjunto a enfermedades como la hidropesía. Estas condiciones pueden mejorar con la incorporación de EPA y DHA o una mejor mezcla de n-3 HUFA en los rotíferos. Sin embargo, la incidencia de la hidropesía no la previene completamente el EPA pero sí el DHA (Kanazawa., *et al* 1983b).

Varios trabajos han mostrado que el DHA es el ácido graso más eficiente que el EPA para red sea bream, rock bream, striped yack y flatfish (Watanabe *et al.*, 1989 a,b; Takeuchi *et al.*, 1990a,b; Kanazawa, 1993a,b, 1995). Por otra parte, una baja tasa de crecimiento y sobrevivencia se ha observado en juveniles de striped jack alimentados con una dieta deficiente en AGE, pero que sin embargo fueron mejorados por la adición de EPA y DHA en la dieta. Sin embargo, el suministro sólo de EPA puede generar altas mortalidades y una baja tasa de crecimiento en el pez. Por esta razón se

considera que es la relación EPA/DHA lo que mejora el funcionamiento fisiológico de esta especie (Watanabe *et al.*, 1985).

Varias técnicas de enriquecimiento han sido desarrolladas para incrementar el nivel de n-3 HUFA en presas vivas (Takeuchi *et al.*, 1992). Usando estas técnicas, varios estudios se han llevado a cabo para evaluar el efecto de la ingestión de presas enriquecidas por diferentes larvas de peces marinos (Furita *et al.*, 1996; Takeuchi *et al.*, 1996). Todos ellos han mostrado que el pez requiere para su desarrollo altos niveles de n-3 HUFA, y que la eficacia del DHA es superior que el EPA (Watanabe, 1993; Sargent, 1995; Takeuchi, 1996). En este sentido, las larvas alimentadas con una dieta baja en DHA muestra una baja vitalidad (Watanabe, 1993) y baja sobrevivencia al estrés (Furita *et al.*, 1998). Recientes estudios han mostrado que una deficiencia de DHA afecta también la visión (Bell *et al.*, 1995). El DHA es encontrado mayormente en tejidos neurales de peces con pigmentación normal que en aquellos peces no pigmentados (Estevez y Kanazawa, 1996). También se ha sugerido que el DHA puede jugar importantes roles en el desarrollo del sistema nervioso, y la pigmentación.

Varios estudios han sido conducidos para estudiar los requerimientos de ácidos grasos esenciales en larvas de peces marinos (Koven *et al.*, 1989; Izquierdo *et al.*, 1992) pero no sí en larvas de peces de agua dulce. Alguno de ellos han indicado que los requerimientos de AGE difieren no solamente entre especie sino que también entre los estados de crecimiento (Gatesoupe y Le Milinaire, 1985; Izquierdo *et al.*, 1989).

A la luz de los antecedentes descritos anteriormente, este trabajo estudiará el efecto de la relación EPA/DHA en la dieta en distintas condiciones de salinidad y se espera que la respuesta de crecimiento, sobrevivencia y sobrevivencia a un estímulo de estrés sean diferentes de acuerdo a la salinidad en que las larvas son cultivadas, considerando el efecto de la salinidad como un factor gatillante de modificaciones a los procesos metabólicos.

### **3. HIPOTESIS**

#### **3.1. Relacionado con la Dieta.**

$H_0$  = Relaciones distintas de EPA/DHA en la dieta no influyen directamente en el crecimiento, sobrevivencia y sobrevivencia frente a un estímulo de estrés en larvas de puye durante los primeros días de cultivo.

$H_1$  = Relaciones distintas de EPA/DHA en la dieta influyen directamente en el crecimiento, sobrevivencia y sobrevivencia frente a un estímulo de estrés en larvas de puye durante los primeros días de cultivo.

#### **3.2. Relacionado con la salinidad.**

$H_0$  = La salinidad no ejerce un efecto directo en el crecimiento, sobrevivencia y sobrevivencia al estrés en larvas de puye durante los primeros días de cultivo.

$H_1$  = La salinidad ejerce un efecto directo en el crecimiento, sobrevivencia y sobrevivencia al estrés en larvas de puye durante los primeros días de cultivo.

### **3.3. Interacción entre dieta y salinidad.**

$H_0$  = La dieta y salinidad no ejercen efectos interactivos positivos en el crecimiento, sobrevivencia y sobrevivencia frente a un estímulo de estrés en larvas de puye durante los primeros días cultivo.

$H_1$  = La dieta y salinidad ejercen efectos interactivos positivos en el crecimiento, sobrevivencia y sobrevivencia frente a un estímulo de estrés en larvas de puye durante los primeros días cultivo.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de tres relaciones EPA/DHA, en el cultivo larvario del puye (*Galaxias maculatus*) realizado a diferentes salinidades.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1.- Establecer la relación EPA/DHA, con la cual se logra la mejor sobrevivencia, crecimiento y sobrevivencia a un estímulo de estrés a diferentes salinidades.

2.- Establecer si la salinidad ejerce un efecto sobre los requerimientos de la relación EPA/DHA en larvas de *G. maculatus*.

## **5. MATERIAL Y METODOS**

El estudio se realizó en el Hatchery de la Escuela de Acuicultura de la Universidad Católica de Temuco. Cabe mencionar que las larvas fueron obtenidas a partir de huevos provenientes de reproductores silvestres de la piscicultura Faja Maisan, los cuales fueron puestos a incubar en un sistema húmedo, aspersando varias veces al día. Durante este tiempo se protegieron de la luz y se evitó en todo momento cualquier tipo de movimiento. Posteriormente, pasada las 250 UTM (unidades térmicas acumuladas) las ovas con ojo fueron colocadas en un acuario con agua a 10<sup>0</sup>/<sub>00</sub> el cual se acondicionó luz artificial para su eclosión.

### **5.1. Cultivo de Rotíferos**

Los rotíferos fueron cultivados en dos estanques cónicos de 60 litros a una densidad de 100 a 150 rotíferos/ml, mantenidos con agua a 20<sup>0</sup>/<sub>00</sub> aireada y preparada con agua de pozo y sal marina. Previo a esto, el agua de pozo fue filtrada a 10, 5 y 1  $\mu$ m., y mantenidos a una temperatura de cultivo de 25°C. Se llevó diariamente un registro de las densidades de rotíferos/ml, número de hembras ovígeras, cantidad de alimento a entregar, temperatura diaria y salinidad.

Los rotíferos diariamente fueron alimentados con levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*) y con renovación de agua cada 5 días y despiche diarios, para la eliminación de todos los desechos acumulados en el fondo del estanque durante el día.

## 5.2. Conteo y Preparación de Rotíferos

Diariamente se tomó una muestra de 4 ml de cultivo en cada estanque para proceder a su conteo individual, observándose bajo lupa la movilidad de los rotíferos y la presencia de protozoos. Este conteo se realizó diariamente para conocer la densidad total de rotíferos en cada estanque de cultivo. Para poder determinar la cantidad de organismos a cosechar fue necesario establecer la concentración de alimento diario para cada larva, por lo tanto se estableció el siguiente protocolo de alimentación durante el cultivo larvario:

Día 0-----5-----10-----15-----20  
5 rot/ml            10 rot/ml            15 rot/ml            20 rot/ml

Una vez obtenido el volumen a cosechar, los rotíferos fueron pasados suavemente por el tamiz cuya apertura de poro fue de 52  $\mu\text{m}$ . y finalmente depositados en un vaso precipitado de 500 ml a una salinidad de 20<sup>0</sup>/<sub>00</sub> para su posterior enriquecimiento.

### **5.3. Enriquecimiento y Preparación de Dietas.**

Para enriquecer a los rotíferos se trabajó con tres enriquecedores que poseían diferentes relaciones EPA/DHA (Tabla N° 1). Cada una de ellas contenía tres ingredientes: Mezcla de aceites ricos en ácidos grasos (90%), un pre mix vitamínico (6%) y un emulsionante que para este caso fue la lecitina de soya (4%).

Los aceites utilizados para las mezclas de cada una de las relaciones fueron:

- a.- ROPUFA 25n-6 Inf: Aceite rico en ésteres metílicos de la serie n-6 HUFA con un 59,3% de PUFA (obtenido de ROCHE Ltda., Santiago, Chile).
- b.- EPA 28: Mezcla comercial de triacilglicéridos con un 45% de n-3 HUFA (Nippai Co. Ltda. Tokio, Japón).
- c.- ROPUFA 30n-3Inf: Aceite refinado rico en ésteres metílicos con un 35% de PUFA, alto en n-3 (Obtenido en ROCHE Ltda., Santiago, Chile).

Los tres ingredientes fueron diluidos en 100 ml de agua destilada (para cada estanque) y homogeneizados con una batidora Modelo BRAUN MR 400C, y

se procedió a enriquecer a los rotíferos por un tiempo de 18 a 24 horas, utilizando el método directo descrito por Watanabe *et al.* (1982).

Relación EPA/DHA	ROPUFA 30n-3 (%)	ROPUFA 25 n-6 oil (%)	EPA 28 (%)
0,64	100	-----	-----
2,02	86,81	-----	13,93
2,18	70,79	7,92	21,29

**Tabla N°1:** Mezclas de aceites utilizados para la preparación de las dietas con diferentes relaciones EPA/DHA obtenidas en cada dieta.

#### 5.4. Evaluación del Perfil de los Ácidos grasos a los Rotíferos.

Se determinó el perfil de ácidos grasos en los rotíferos enriquecidos (Tabla N°2). En las tres dietas se identificó y se cuantificaron los ácidos grasos de mayor importancia en este estudio que son de la serie n-3 (EPA y DHA). Cabe mencionar que estas dietas fueron ricas en ácidos grasos monoinsaturados que correspondió entre los 11,56% y 11,85% de las mezclas totales, no obstante, presenta una cantidad considerable de ácidos grasos polinsaturados de la serie n-3 y n-6 entre 3,17% y 4,11%. Cabe mencionar que se obtuvo un nivel de n-3 HUFA relativamente constante en un rango de 2,44 y 2,96%. El EPA, DHA y ácido linoleico representaron la mayor cantidad de n-3 HUFA, para el caso de EPA comprendió entre 0,95 a

1,45%, para el DHA de un 0,60 a un 1,49% y para el linoleico (18:2n-6) de un 0,51 a un 0,92%.

Ácidos grasos		Relación 0,64		Relación 2,02		Relación 2,18	
Saturados		Promedio	D.S.	Promedio	D.S.	Promedio	D.S.
C12:0	Ac Dodecanoico	0,12	0,02	0,04	0,10	0,10	0,10
C14:0	Ac Tetradecanoico	0,60	0,13	0,60	0,82	0,78	0,91
C16:0	Ac Palmítico	4,34	0,40	2,50	2,69	3,18	3,55
C18:0	Ac Estéarico	3,30	0,20	1,36	1,30	1,64	1,76
C20:0	Ac Eicosanoico	0,11	0,01	0,34	0,69	0,62	0,47
C22:0	Ac Docosaenoico	0,23	0,04	0,09	0,25	0,23	0,12
C24:0	Ac Tetracosanoico	0,20	0,03	0,08	0,12	0,00	0,00
<b>Total Saturados</b>		<b>8,90</b>	<b>0,83</b>	<b>5,01</b>	<b>5,97</b>	<b>6,55</b>	<b>6,91</b>
Monoinsaturados							
C14:1	Ac Tetradecenoico	0,04	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
C16:1	Ac Palmitoleico	3,35	0,85	5,04	6,81	4,33	4,93
C18:1n-9	Ac Oleico	6,03	0,85	4,77	5,77	5,18	5,57
C18:1n-7	Ac Oleico	1,35	0,25	1,04	1,21	1,04	1,18
C20:1n-9	Ac Eicosaenoico	0,82	0,05	0,71	0,76	0,60	0,69
C22:1n-9	Ac Erúcido	0,18	0,02	0,18	0,19	0,11	0,09
C24:1	Ac Tetracosanoico	0,08	0,00	0,10	0,09	0,30	0,06
<b>Total Monoinsaturados</b>		<b>11,85</b>	<b>2,04</b>	<b>11,84</b>	<b>14,83</b>	<b>11,56</b>	<b>12,52</b>
Polinsaturados							
C18:2n-6	Ac Linoleico	0,92	0,15	0,51	0,61	0,68	0,76
C18:3n-6	Ac Linolénico	0,04	0,01	0,31	0,18	0,19	0,20
C18:3n-3	Ac Linoleico	0,29	0,05	0,05	0,10	0,11	0,12
C20:2n-6	Ac Eicosadienoico	0,07	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3n-3	Ac Eicosatrienoico	0,09	0,07	0,11	0,10	0,10	0,11
C20:3n-6	Ac Eicosatrienoico	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4n-6	Ac Eicosatetraenoico	0,07	0,01	0,17	0,39	0,37	0,26
C20:5n-3	Ac Eicosapentanoico	0,95	0,20	1,21	1,25	1,45	1,65
C22:2n-6	Ac Docosadienoico	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:4n-6	Ac Docosatetraenoico	0,05	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:5n-3	Ac Docosapentaenoico	0,13	0,08	0,21	0,20	0,26	0,29
C22:6n-3	Ac Docosahexaenoico	1,49	0,30	0,60	0,57	0,66	0,75
<b>Total Polinsaturados</b>		<b>4,11</b>	<b>0,97</b>	<b>3,17</b>	<b>3,40</b>	<b>3,82</b>	<b>4,14</b>
Sumatoria n-3		2,96	0,62	2,44	2,29	2,65	3,00
Sumatoria n-6		1,17	0,05	0,74	1,11	1,16	1,14
n-3 / n-6		2,54	0,43	3,31	2,07	2,29	2,64
EPA/DHA		0,64	0,01	2,02	2,21	2,18	2,19
% Lípidos Base Seca		24,92	2,94	22,11	2,09	22,74	0,84

**Tabla N° 2:** Resumen del perfil ácidos grasos de rotíferos enriquecidos utilizados como alimento en el experimento con tres relaciones distintas de EPA/DHA.

## 5.5. Diseño Experimental

Se prepararon tres relaciones EPA/DHA, los cuales se probaron en tres salinidades distintas. Las salinidades utilizadas en este experimento fueron 0, 10 y 15‰ y las tres relaciones EPA/DHA fueron 0,64; 2,02 y 2,18 los cuales se utilizaron durante 20 días desde el comienzo de la eclosión (Tabla N°3). En definitiva, se trabajó con tres dietas y tres salinidades distintas, por lo tanto se utilizaron 9 unidades experimentales.

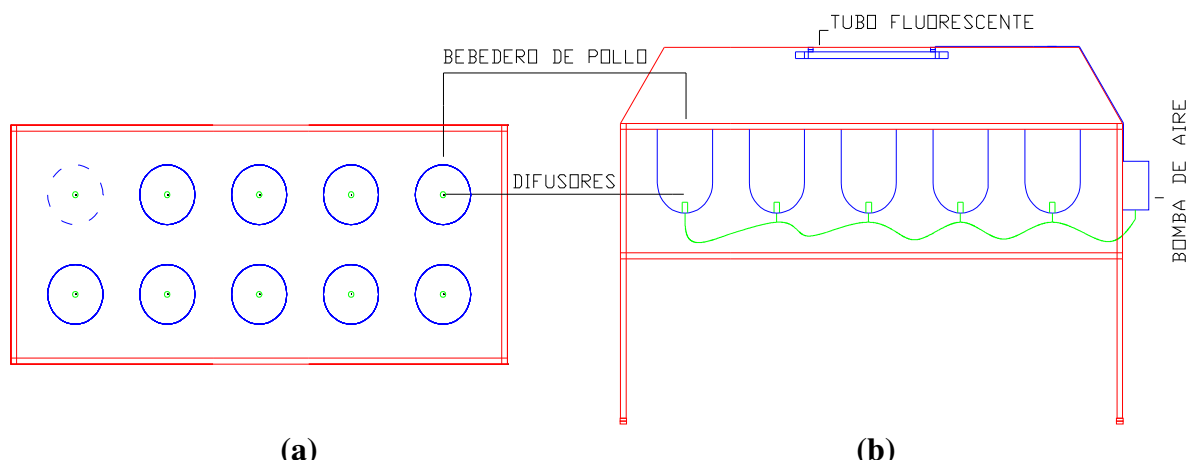
RELACIONES EPA/DHA	SALINIDAD 0‰	SALINIDAD 10‰	SALINIDAD 15‰
0,64	X	x	X
2,02	X	x	X
2,18	X	x	X

**Tabla N°3:** Combinaciones de salinidad y relaciones EPA/DHA probadas.

## 5.6. Condiciones de Cultivo

Una vez eclosionadas las larva provenientes de reproductores silvestres de origen estuarial, se les midió la longitud total (mm) con un pie de metro digital y fueron sembradas en estanques de 5 litros a una densidad larval de 60 larvas/lt., y mantenidas con aireación permanente por medio de

una bomba de aire, la temperatura fluctuó entre 14 a 17 °C. Los estanques fueron dispuestos en un “rack” de madera lo cual contenía los 9 estanques con larvas y su aireación respectiva (Figura N°1) Se realizaron cambios de agua cada tres días para mantener la limpieza de los estanques, eliminar mortalidad y evitar proliferación de enfermedades. El experimento duró 20 días. Cabe mencionar que el diseño experimental del cultivo larvario se realizó durante el mes de Abril del año 2002.



**Figura N° 1:** Esquema de infraestructura de cultivo larvario. Vista en planta (a) y vista frontal (b).

## 5.7. Parámetros Evaluados

### 5.7.1 Supervivencia

Este parámetro se evaluó contabilizando el número inicial de larvas a cada estanque (60 larvas por estanque), y al finalizar el experimento (día 20) se contabilizó el número de larvas que sobrevivieron al tratamiento, determinándose así el porcentaje de larvas vivas que quedaron en cada estanque en relación al número inicial.

### 5.7.2 Crecimiento

Se evaluó midiendo la longitud inicial (mm) de un grupo de veinte larvas escogidas al azar al inicio del experimento y la longitud final al término de éste. La tasa de crecimiento específico se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$ICE = \frac{\ln Lf - \ln Li}{\Delta t}$$

Lf : longitud final  
Li : longitud inicial

### 5.7.3 Supervivencia al estímulo del estrés

Al día 20 (término del experimento) se sometió a un Test de resistencia, que consistió en dejar las larvas expuestas al aire por treinta segundos y devolverlas al estanque (Kanazawa, 1977). Luego de una hora de estabilización de las larvas, se contabilizaron las que sobrevivieron y se

calculó el porcentaje en relación al número de larvas iniciales que sobrevivieron al test.

#### **5.7.4 Análisis Estadístico**

Los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente mediante análisis de varianza de dos factores (previa revisión de los supuestos teóricos) con la finalidad de poder comparar dos o más medias y determinar si existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con un nivel de confianza de un 95%. Se utilizó este método por que permite comparar varias medias en diversas situaciones; muy ligado, por tanto, al diseño de experimentos y, de alguna manera, es la base del análisis multi variante. Para detectar diferencias entre tratamientos, se procedió a utilizar la prueba de Tukey.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Supervivencia Total

De acuerdo a la supervivencia total, se realiz6 el test de ANOVA de dos vfas para ver si existen diferencias entre los tratamientos y por ende si afecta o no la dieta y la salinidad en la supervivencia total. El an6lisis arroj6 diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las dietas, entre las salinidades y tambi6n diferencias altamente significativas en la interacci6n de ambas variables (tabla N°3), lo que indica que la salinidad y la dieta tiene un efecto interactivo positivo, ya sea en conjunto o por separado, en la supervivencia total de las larvas.

Efectos	Df Efectos (n-1)	MS Efectos	Df Error	MS Error	F	Nivel-p
Dieta (1)	2	0.185163	15	0.009623	1.924.151	0.000072
Salinidad (2)	2	0.116507	15	0.009623	1.210.698	0.000741
Interacci6n (1-2)	4	0.336659	15	0.009623	3.498.450	0.000000

**Tabla N°3:** An6lisis de varianza de los efectos de la dieta, salinidad e interacci6n de ambas en el porcentaje de la supervivencia total.

El paso siguiente fue realizar la prueba de Tukey para determinar entre qu6 medias existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). En la tabla N° 4 muestra el porcentaje de supervivencia total de las tres dietas en las tres salinidades:

(‰)	% Sobrevivencia Tratamiento EPA/DHA (0,64)	% Sobrevivencia Tratamiento EPA/DHA (2,02)	% Sobrevivencia Tratamiento EPA/DHA (2,18)
0	3,13±2,65	87,36±8,56	82,22±5,28
10	66,46±6,79	66,88±2,65	45,14±2,78
15	44,72±6,17	35,00±1,67	33,33±6,25

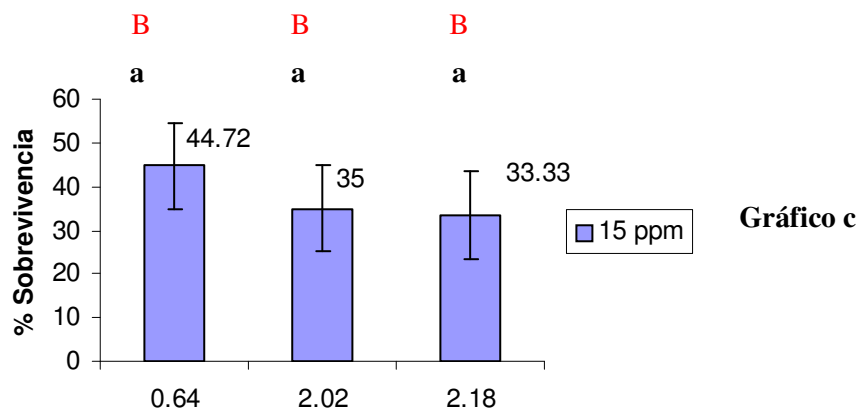
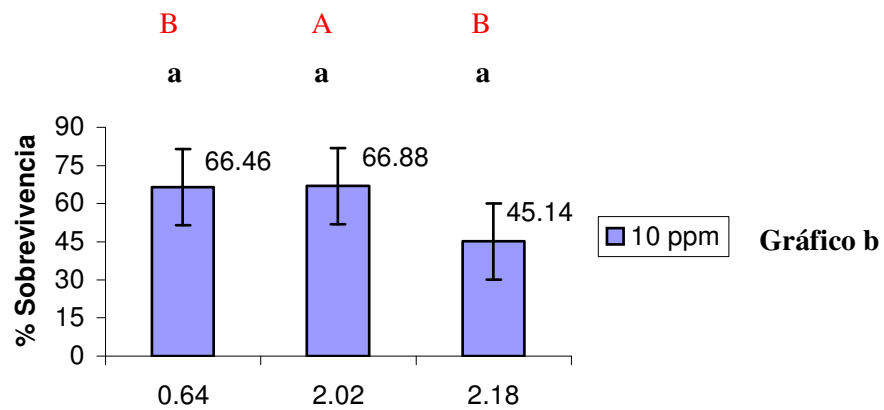
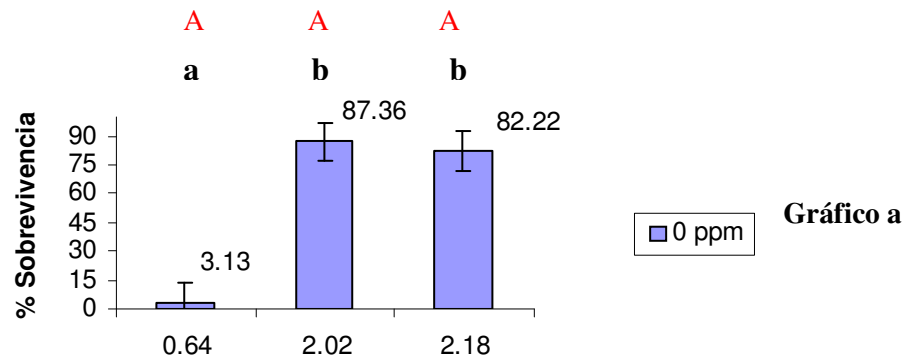
**Tabla Nº 4:** Porcentaje de sobrevivencia de larvas cultivadas a diferentes salinidades y alimentadas con tres dietas ricas en ácidos grasos (EPA/DHA).

Análisis Horizontal: Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en larvas mantenidas a una salinidad de 0‰ (Figura N°1, gráfico a) con la relación EPA/DHA 0,64 se encontró una baja sobrevivencia de solo 3,13±2,65%, siendo diferente significativamente ( $p < 0,05$ ) de las larvas alimentadas con relaciones EPA/DHA de 2,02 y 2,18 a esa misma salinidad. Esto indica que las larvas respondieron mejor a la relación EPA/DHA 2,02, con la cual se obtuvo un 87,36±8,56% de sobrevivencia y con la relación EPA/DHA 2,18 un 82,22±5,28% respectivamente. En definitiva, cuando las larvas son cultivadas a una salinidad de 0‰, la sobrevivencia se ve directamente afectada por la dieta. De hecho, las mejores sobrevivencias totales se obtuvieron cuando las larvas fueron alimentadas con un mayor nivel de EPA que de DHA. Por otro lado, las larvas cultivadas a salinidades de 10‰ (gráfico b) no se encontraron diferencias significativas mayores entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ), pero cabe mencionar el bajo porcentaje de sobrevivencia de la relación EPA/DHA 2,18 que arrojó un porcentaje menor

de sobrevivencia de un  $45,14 \pm 2,78\%$  con respecto a los otros tratamientos. Tampoco se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en larvas cultivadas a salinidades de  $15^0/00$  (gráfico c) pero es necesario mencionar sin embargo que la mayor sobrevivencia se encontró en la dieta cuya relación EPA/DHA fue 0,64 con un  $44,72 \pm 6,17\%$  lo que indica que en salinidades de 10 y  $15^0/00$  la sobrevivencia no se ve afectada por la dieta ya que no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), pero que aparentemente hay una tendencia a mejorar la sobrevivencia con la relación EPA/DHA baja.

Análisis Vertical: Ahora si evaluamos la sobrevivencia de una misma dieta a salinidades distintas (análisis vertical) se puede observar claramente que existen también diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Las distintas relaciones EPA/DHA tienen efectos diferentes en salinidades distintas., Las larvas alimentadas con la relación EPA/DHA 0,64 arrojó una baja sobrevivencia de un  $3,13 \pm 2,65\%$  a una salinidad de  $0^0/00$  con respecto a larvas cultivadas a salinidades de  $10^0/00$  cuya sobrevivencia fue de  $66,46 \pm 6,79\%$  y larvas cultivadas a salinidades de  $15^0/00$  el cual la sobrevivencia fue de  $44,72 \pm 6,17\%$ . Por otro lado, se encontraron en larvas alimentadas con una relación 2,02 diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) a salinidad de  $15^0/00$  respecto a larvas cultivadas a 0 y  $10^0/00$ . A  $15^0/00$  la sobrevivencia fue de  $35,00 \pm 1,67\%$  y fue menor a las larvas cultivadas a salinidades de 0 y  $10^0/00$ . En relación a las larvas alimentadas con la relación EPA/DHA 2,18 se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) con respecto a larvas mantenidas a  $0^0/00$

el cual su sobrevivencia fue mucho mayor al compararla con las larvas mantenidas a salinidades más altas de 10 y 15<sup>0</sup>/<sub>00</sub>.



**Figura N° 1:** Porcentaje de Supervivencia de larvas a los 20 días post eclosión, cultivadas en tres salinidades y tres relaciones de EPA/DHA distintas. Letras diferentes minúsculas de color negro indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en larvas mantenidas a una misma salinidad con tratamientos diferentes (análisis horizontal). Letras diferentes mayúsculas de color rojo indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de larvas mantenidas a diferentes salinidades con una misma dieta (análisis vertical).

## 6.2. Crecimiento

De acuerdo al índice de crecimiento de larvas de “puye”, el análisis de varianza a dos vías arrojó diferencias altamente significativas ( $p < 0,05$ ) con interacciones positivas entre el efecto de la dieta y salinidad, y que a su vez, estos factores ejercen efectos en forma separada sobre el crecimiento de las larvas de “puye” (Tabla N°5):

Efectos	Df Efectos (n-1)	MS Efectos	Df Error	MS Error	F	Nivel-p
Dieta (1)	2	1.441.556	425	0.205232	702.405	<b>0.000000</b>
Salinidad (2)	2	3.238.409	425	0.205232	1.577.929	<b>0.000000</b>
Interacción (1-2)	4	1.543.728	425	0.205232	752.188	<b>0.000000</b>

**Tabla N° 5:** Análisis de varianza de los efectos de la dieta, salinidad e interacción de ambas en el índice de crecimiento específico.

Con respecto al crecimiento larval del “puye” durante los 20 días de cultivo experimental y por medio de la prueba de Tukey se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto a la tasa de crecimiento de larvas mantenidas tres salinidades y con relaciones distintas de EPA/DHA (Tabla N°6):

(‰)	Tasa de crecimiento Tratamiento EPA/DHA (0,64)	Tasa de crecimiento Tratamiento EPA/DHA (2,02)	Tasa de crecimiento Tratamiento EPA/DHA (2,18)
0	1,42±0,42	2,81±0,51	2,70±0,55
10	1,52±0,49	2,44±0,41	2,63±0,47
15	1,84±0,30	1,24±0,42	1,32±0,43

**Tabla N° 6:** Tasa de crecimiento de larvas cultivadas a diferentes salinidades y alimentadas con tres dietas ricas en ácidos grasos (EPA/DHA).

Análisis Horizontal: En la Figura N°2 (gráfico d) se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en salinidad 0‰ lo que indica que la relación EPA/DHA 0,64 obtuvo una baja tasa de crecimiento específico que corresponde a un  $1,42 \pm 0,42$  a diferencia a las relaciones EPA/DHA 2,02 que en esa misma salinidad obtuvo una mayor tasa de crecimiento ( $2,81 \pm 0,51$ ) y que resultó ser en definitiva la mejor tasa de crecimiento específico. Para la relación EPA/DHA 2,18 fue de un  $2,7 \pm 0,55$  y no hubo diferencias significativas con la relación 2,02 ( $p > 0,05$ ). En la salinidad de 10‰ (gráfico e) también se encontraron diferencias significativas con la relación de EPA/DHA 0,64 se obtuvo tasas de crecimientos más bajas, a diferencia de la relación EPA/DHA 2,02 y 2,18 con las cuales las larvas respondieron de una mejor manera. En salinidad de 15‰ se encontraron diferencias significativas con la relación EPA/DHA 2,02 cuya tasa de crecimiento fue la más baja ( $1,24 \pm 0,42$ ). Sin embargo cabe mencionar que las mejores tasas de

crecimiento se obtuvieron en las salinidades 0 y 10<sup>0</sup>/<sub>00</sub> con cantidades mayores de EPA que de DHA (Tabla N°6).

Análisis Vertical: Si los gráficos se analizan en forma vertical, se puede apreciar que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto a larvas cultivadas con una misma dieta pero mantenidas a salinidades diferentes. Larvas mantenidas a salinidades de 15<sup>0</sup>/<sub>00</sub> con una relación EPA/DHA 0,64 presentó una tasa de crecimiento relativamente alta de  $1,84 \pm 0,30$  al compararlas con las salinidades de 0 y 10<sup>0</sup>/<sub>00</sub>, no encontrándose así diferencias significativas entre éstas últimas ( $p > 0,05$ ), esto indica que si se compara el efecto de cada una de las dietas en las diferentes salinidades, se observará que cuando las larvas son cultivadas con dietas en que el DHA es considerablemente mayor que el EPA, la tasa de crecimiento es significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) a 15<sup>0</sup>/<sub>00</sub>. Por otro lado, las larvas mantenidas con una dieta cuya relación es EPA/DHA 2,02 también arrojó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). En este caso, la mejor tasa de crecimiento se alcanzó a la salinidad 0<sup>0</sup>/<sub>00</sub>, con un  $2,81 \pm 0,51$  seguido de la salinidad de 10<sup>0</sup>/<sub>00</sub>, con un  $2,44 \pm 0,41$ , esto indica que cuando las larvas son cultivadas con una dieta en que el EPA es mayor al DHA, la mejor tasa de crecimiento se verá reflejada en estas salinidades, siendo significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que la alcanzada a 15<sup>0</sup>/<sub>00</sub>. No obstante al analizar la relación EPA/DHA 2,18 se encontraron diferencias significativas a los 15<sup>0</sup>/<sub>00</sub>, que obtuvo una tasa de crecimiento de un  $1,32 \pm 0,43$  y fue bajo al compararlas con las salinidades 0 y 10<sup>0</sup>/<sub>00</sub> ( $p < 0,05$ ) y por consiguiente entre éstas últimas

no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Al observar los tres gráficos (figura N°2) se puede apreciar que en las tres salinidades el crecimiento se ve directamente afectado por la dieta, es decir, cuando las larvas son cultivadas a 0 y 10<sup>0</sup>/<sub>00</sub>, las mejores tasas de crecimiento se obtienen con las relaciones EPA/DHA de 2,02 y 2,18, mientras que con la relación EPA/DHA 0,64 se obtuvieron las tasas de crecimiento más bajas en ambas salinidades.

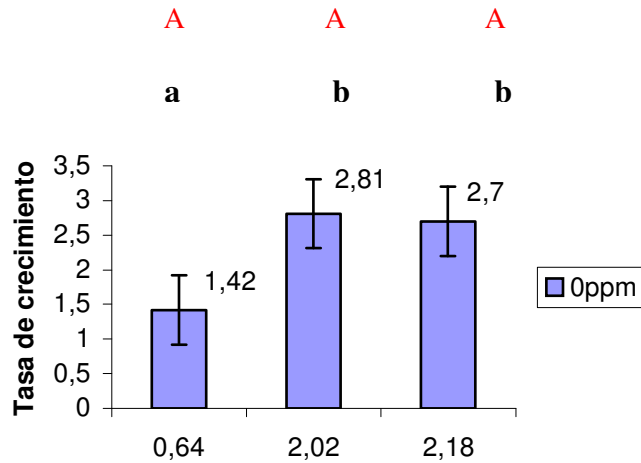


Gráfico d

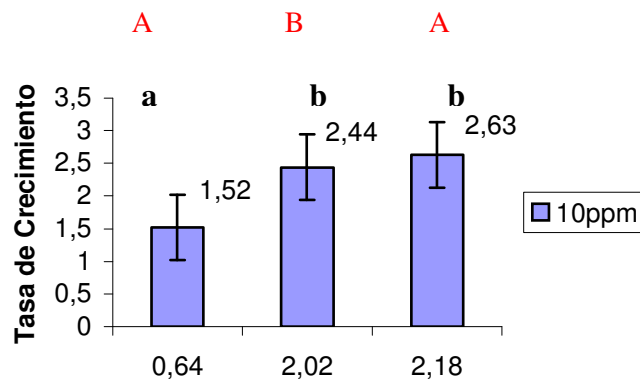


Gráfico e

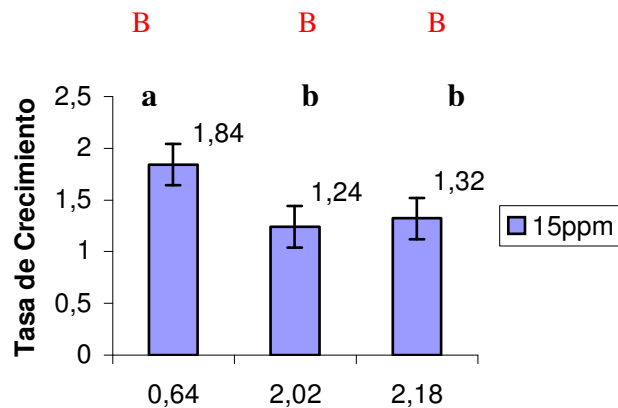


Gráfico f

**Figura Nº 2:** Tasa de crecimiento específico de larvas a los 20 días post eclosión, cultivadas en tres salinidades y tres relaciones de EPA/DHA distintas. Letras diferentes minúsculas de color negro indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en larvas mantenidas a una misma salinidad con tratamientos diferentes. Letras diferentes mayúsculas de color rojo indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) (análisis vertical) de larvas mantenidas a diferentes salinidades con una misma dieta.

### 6.3. Supervivencia al estrés

De acuerdo al análisis de varianza (Tabla N°7) se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con interacciones positivas lo que indica que la dieta y salinidad ejercen un efecto conjunto sobre la tolerancia al estímulo de estrés y al mismo tiempo éstos ejercen efectos por separado:

Efectos	Df Efectos (n-1)	MS Efectos	Df Error	MS Error	F	Nivel-p
Dieta (1)	2	0.026166	15	0.004125	634.372	<b>0.010082</b>
Salinidad (2)	2	0.129996	15	0.004125	3.151.608	<b>0.000004</b>
Interacción (1-2)	4	0.224997	15	0.004125	5.454.802	<b>0.000000</b>

**Tabla N° 7:** Análisis de varianza de los efectos de la dieta, salinidad e interacción de ambas en el porcentaje de supervivencia al test de resistencia.

Analizando el porcentaje de supervivencia mediante la prueba del test de resistencia y por medio de la prueba de Tukey se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto a las salinidades estudiadas y las dietas con diferentes relaciones EPA/DHA (Tabla N° 8):

(‰)	% Sobrevivencia al Test Tratamiento EPA/DHA (0,64)	% Sobrevivencia al Test Tratamiento EPA/DHA (2,02)	% Sobrevivencia al Test Tratamiento EPA/DHA (2,18)
0	25,00±11,74	87,86±3,61	85,26±2,10
10	93,68±3,19	87,87±3,61	81,24±3,80
15	90,37±3,99	70,10±5,24	56,39±8,12

**Tabla Nº 8:** Tasa de crecimiento de larvas cultivadas a diferentes salinidades y alimentadas con tres dietas ricas en ácidos grasos (EPA/DHA).

Análisis Horizontal: En la Figura 3 (gráfico g) se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) al analizar las larvas mantenidas a una salinidad de 0‰ con una relación de EPA/DHA 0,64 el cual el porcentaje de sobrevivencia al test fue de 25,00±11,74% (el cual alcanzó la menor sobrevivencia al estímulo de estrés) en comparación con las relaciones EPA/DHA 2,02 que obtuvo un porcentaje de un 87,86±3,61% y la relación EPA/DHA 2,18 un 85,26±2,10%. Las larvas mantenidas a salinidad de 10‰ (gráfico h) arrojó diferencias significativas menores ( $p < 0,05$ ) lo cual indica que a esta salinidad el porcentaje de sobrevivencia fue mejor para la relación EPA/DHA 0,64 con una sobrevivencia de un 93,68±3,19%; EPA/DHA 2,02 un 87,87±3,61% y la relación EPA/DHA 2,18 con un 81,24±3,80%. Al analizar la salinidad a 15‰ se puede establecer que existen también diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con la relación EPA/DHA 2,18 lo cual obtuvo un porcentaje de sobrevivencia de un 56,39±8,12 lo cual fue bajo si se compara

con las relaciones EPA/DHA 2,02 que obtuvo un  $70,10 \pm 5,24\%$  y EPA/DHA 2,18 con un  $90,37 \pm 3,99\%$ .

Análisis Vertical: Si se analiza en forma vertical una misma dieta pero a diferentes salinidades se puede encontrar que existen diferencias significativas bastante grandes ( $p < 0,05$ ) en cuanto a la salinidad de  $0^0/00$  obtuvo para la relación EPA/DHA 0,64 una sobrevivencia de  $25,00 \pm 11,74\%$  que difiere de las larvas mantenidas a salinidades de 10 y  $15^0/00$  que obtuvieron una sobrevivencia alta que corresponde a  $93,68 \pm 3,19$  para la relación EPA/DHA 2,02 y un  $90,37 \pm 3,99\%$  para la relación EPA/DHA 2,18. Las larvas mantenidas a salinidades de  $15^0/00$  arrojó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en relación a la dieta cuya relación EPA/DHA es 2,02 que obtuvo un porcentaje de sobrevivencia de  $70,10 \pm 5,24\%$  lo que fue menor si se compara con las otras salinidades, por lo tanto entre las salinidades 0 y  $10^0/00$  no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Finalmente se encontraron diferencias significativas en la dieta con la relación EPA/DHA 2,18 el cual el porcentaje de sobrevivencia más bajo se encontró a salinidades de  $15^0/00$  con un  $56,39 \pm 8,12\%$  a diferencia de las salinidades 0 y  $10^0/00$  que se obtuvieron  $85,26 \pm 2,10\%$  para el caso de la salinidad  $0^0/00$  y  $81,24 \pm 3,80\%$  para salinidad de  $10^0/00$ .

En consecuencia, cuando las larvas son cultivadas a 10 y  $15^0/00$ , la sobrevivencia al estrés es mayor cuando el DHA es más abundante que el EPA, es decir, con la relación 0,64, alcanzando un  $93,68 \pm 3,19$  y  $90,37 \pm 3,99\%$  respectivamente ( $p < 0,05$ ) a la sobrevivencia obtenida con la

relación 2,18, con la cual, en ambas salinidades se alcanza la menor sobrevivencia que fue de  $81,24 \pm 3,80$  y  $56,39 \pm 8,12\%$  respectivamente (Tabla N°8).

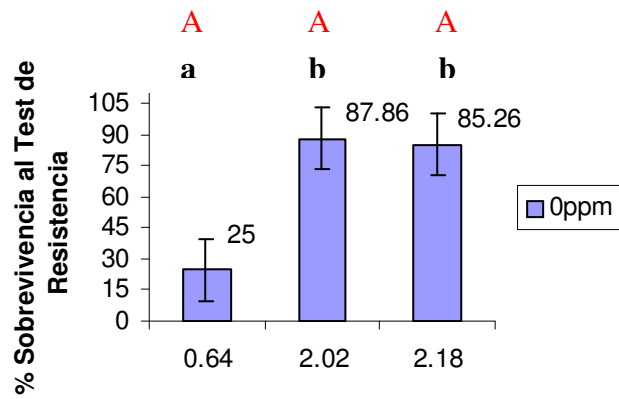


Gráfico g

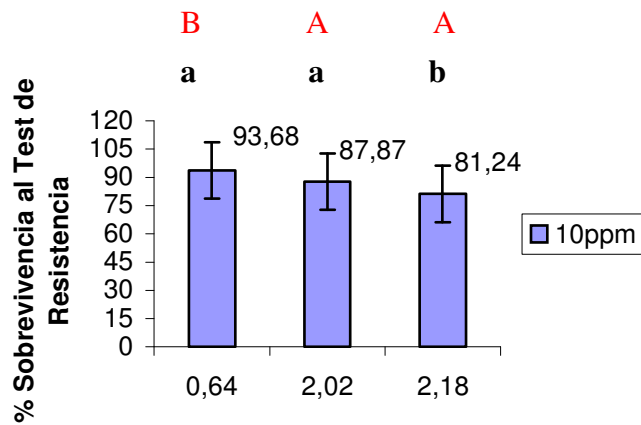


Gráfico h

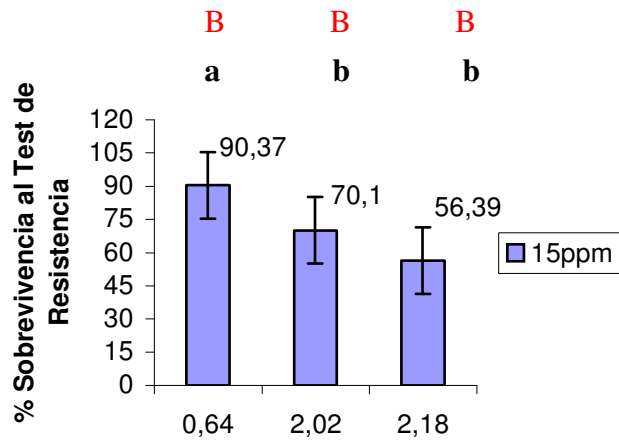


Gráfico i

**Figura Nº 3:** Porcentaje de Sobrevivencia al test de resistencia de larvas a los 20 días post eclosión, cultivadas en tres salinidades y tres relaciones de EPA/DHA distintas. Letras minúsculas de color negro indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en larvas mantenidas a una misma salinidad con tratamientos diferentes (análisis horizontal). Letras mayúsculas de color rojo indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de larvas mantenidas a diferentes salinidades con una misma dieta (análisis vertical).

## 7. DISCUSIÓN

La alimentación larvaria exógena de peces se considera desde el momento en que las larvas comienzan a alimentarse por sí mismas, aún cuando estén haciendo uso de sus reservas vitelínicas (alimentación endógena), el inicio de este momento es variable entre las diferentes especies y no dependen necesariamente del momento de la absorción del saco vitelínico, incluso puede comenzar en algunos casos cuando la larva recién eclosiona y su reserva vitelínica está 100%. La capacidad de la larva de aceptar el alimento vivo o inerte en los inicios de la alimentación desde el punto de vista de la especie depende de aspectos anatómicos- fisiológicos, tales como: apertura y funcionalidad de la boca, el desarrollo de órganos sensoriales (Segner *et al.*, 1993), el estado morfológico y funcional del intestino (Kanazawa, 1995), musculatura y capacidad de respiración, etc. En este sentido, larvas que pueden llegar a consumir un determinado alimento y si la funcionalidad digestiva es limitada, las larvas serán mal nutridas e incapaces de sobrevivir a estados de mayor desarrollo. De igual modo, factores externos a la larva juegan un rol fundamental de su capacidad de alimentación y por lo tanto, el éxito de su desarrollo, entre los cuales está la calidad del agua, tamaño y abundancia de las presas, calidad nutritiva de ellas (Watanabe y Kiron, 1994; Izquierdo, 1996), calidad de la puesta (la cual podría depender de múltiples factores), densidad larval, etc. (Espinoza *et al.*, 1987). Cabe hacer mención de estudios realizados en *Galaxias maculatus*, Dantagnan *et al.* (1995), demostró que la larva es capaz de consumir

alimento inerte, incluso desde el primer día después de la eclosión, aunque mortalidades de hasta 100% fueron encontradas a los 10 días después de la absorción del saco.

Estudios indican que la mayoría de las larvas de peces requieren el uso de alimento vivo, el rotífero *Brachionus plicatilis* y nauplio de artemia que son los organismos más usados para éstos propósitos. Varios estudios han indicado que el factor crítico desde el punto de vista del valor dietario de estos organismos es su bajo contenido de (n-3) HUFA que puede ser modificado por varias técnicas (Watanabe *et al.*, 1983a; Rainuzzo *et al.*, 1994, 1997; Frolov *et al.*, 1991), por lo tanto, ellos son capaces de incorporar y transmitir lípidos a las larvas (Kanazawa, 1997; Leger *et al.*, 1979). Además, el rotífero, puede llegar a acumular ciertos ácidos grasos altamente insaturados como el DHA, sin que se produzca modificaciones metabólicas importantes, a diferencia de los nauplio de artemia que normalmente sí son capaces de catabolizar y modificar este tipo de ácido graso (Evjemo *et al.*, 1997). En esta investigación se encontró en general, que las larvas obtuvieron una buena sobrevivencia en las tres salinidades, aunque con proporciones de EPA/DHA diferentes, lo que coincide con lo descrito por Reitan, (1994), los cuales indican que al incorporar nutrientes ricos en (n-3) HUFA a los rotíferos, pueden mostrar un mejoramiento en el crecimiento y sobrevivencia en larvas de saco. Por otro lado, Rodríguez *et al.* (1993) señala que los rotíferos son capaces de incorporar ácidos grasos

proporcionalmente a lo entregado por la dieta y éstos a su vez servir de nutrientes para las larvas.

Con respecto a los resultados de sobrevivencia específico obtenidos después de 20 días, se encontró que larvas mantenidas a 0<sup>0</sup>/<sub>00</sub> con una relación EPA/DHA 0,64 arrojó una baja sobrevivencia de un 3,13% esto se puede deber a que la dieta fue elaborada con un nivel de EPA más bajo que DHA (0,95% y 1,49% respectivamente). Estos resultados se pueden avalar con lo descrito por Sargent *et al.* (1993b, 1995) el cual menciona que los peces marinos no son capaces de convertir el ácido linolénico (18:3 n-3) al ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3) por lo que el EPA se considera un ácido graso esencial, esto se debe a que los peces carecen de las enzimas C20 - elongaza y 5 – desaturaza (Sargent *et al.*, 1997). Por consiguiente, el EPA debe ser incorporado en la dieta y en cantidad proporcionada, probablemente mayor a 1%. En definitiva, los peces marinos, en especial los carnívoros, han perdido la habilidad para alargar la cadena y desaturar aún más el ácido graso altamente insaturado correspondiente, lo contrario ocurre en peces de agua dulce, lo cual la sobrevivencia dependerá, de hecho, de altos niveles de EPA más que de DHA, los cuales deberán ser consumidos a través del alimento vivo.

En efecto, las larvas alimentadas con una dieta bajo en ácidos grasos polinsaturados, especialmente EPA da como resultado un nivel de sobrevivencia menor en larvas de “puye” cultivados en agua dulce, lo que coincide con lo establecido por Izquierdo (1996) y Kanazawa (1985), quienes

mencionan que las larvas alimentadas con bajo nivel de EPA y DHA generan altas mortalidades, bajas tasas de crecimiento y pigmentación negro/oscura (stress) en rodaballo. Inversamente con lo establecido anteriormente, las mejores sobrevivencias se obtuvieron en salinidades de 0‰ con una relación EPA/DHA 2,02 el cual tiene un 1,21% de EPA y 0,60% de DHA, lo que indica que las larvas mantenidas a esa salinidad requieren niveles mayores de EPA que DHA a diferencias de larvas mantenidas a salinidades de 10‰ y 15‰ que requieren mayores niveles de DHA que EPA. Esto indica que la sobrevivencia de las larvas de puye dependerá en mayor medida de los requerimientos nutricionales y una salinidad determinada. Es necesario mencionar que las larvas mantenidas a salinidades de 10 y 15‰ no mostraron grandes diferencias, eso indica que las larvas mantenidas en agua dulce son muchos más sensibles a cambios en proporciones de ácidos grasos y por ende se tomaría como ácido graso de mayor importancia tanto al EPA como el DHA.

Es importante destacar lo establecido por Izquierdo (1996), quien establece que existe bastante diferencia entre especies acerca del efecto de los ácidos grasos n-3 HUFA especialmente entre peces de agua dulce y peces marinos, en cuanto a la sobrevivencia larval, según este autor, el nivel de sobrevivencia también se reduce bastante al suministrar dietas con bajos niveles de n-3 HUFA a los peces. Otros estudios han encontrado bajos niveles de sobrevivencia larval en especies tales como: carpa (Takeuchi, 1977a), turbot (Gatesoupe, 1991), striped jack (Izquierdo *et al.*, 1989), red

seabream (Izquierdo *et al.*, 1989) y gilthead seabream (Rodríguez *et al.*, 1993; Salhi *et al.*, 1997) cuando ellos han sido alimentados con rotíferos con niveles bajos en DHA y EPA, esto coincide con los resultados obtenidos en la sobrevivencia en la salinidad 0‰, en el cual para este caso se encontró un bajo nivel de EPA en la relación 0,64. Watanabe (1982) por su parte, menciona que un desequilibrio especialmente niveles altos de EPA y bajos en DHA conduce a una pobre vitalidad y alta mortalidad en larvas de peces marinos, esto no coincide con los resultados obtenidos en esta experiencia ya que los mejores porcentajes de sobrevivencia se encontraron cuando los niveles de EPA son más altos (que fluctúan entre 1,21% y 1,45%) que los de DHA (0,60% y 0,66%).

La sobrevivencia al test de resistencia en las larvas de “puye” varió en las distintas salinidades. La mejor sobrevivencia al test se obtuvo en salinidades de 10‰ con una relación EPA/DHA de 0,64 con un 93,68% seguido de la salinidad 15‰ con una relación EPA/DHA 0,64 con un 90,37%, lo que indica que las larvas necesitan a salinidades altas, mayores niveles de DHA que EPA. Este resultado coincide con Delaunay *et al.* (1993) quienes en su investigación han fomentado el desarrollo de los estudios nutricionales en moluscos bivalvos, como es el caso de pectínidos, tanto para el acondicionamiento de reproductores, como para el cultivo larvario y el cultivo postlarvario, y menciona que estos pectínidos presentan una acumulación preferencial de 22:6n-3 (DHA) en los lípidos polares en relación a otros ácidos grasos como el 20:5n-3 (EPA) (Delaunay *et al.*, 1993). Las larvas de

pectínidos presentan los mayores crecimientos y sobrevivencias a las mayores relaciones de DHA/EPA, indicando que el EPA es menos importante probablemente porque las larvas pueden obtenerlos por desaturación a partir de 18:3n-3 (Sargent et al., 1997). Utilizando emulsiones lipídicas enriquecidas en EPA o DHA se ha observado que éstas pueden sustituir hasta en un 40% la dieta microalgal sin perjuicio de la sobrevivencia y crecimiento de las larvas de pectínidos (Uriarte et al., 2002a). Por otro lado, Caballero et al. (2002) hace mención en uno de sus trabajos que una alta dieta de EPA/DHA puede ser responsable de una baja sobrevivencia, crecimiento y de una alta susceptibilidad al stress en peces de agua dulce. Previos estudios han reportado que el DHA es un ácido graso esencial para Red sea bream (Takeuchi et al., 1990b; Watanabe et al., 1989 a,b; Kanazawa et al., 1993b) y Japanese flounder (platija) (Kanazawa et al., 1983a; Kanazawa et al., 1993b). En suma, estos nutrientes aumentan la tolerancia a varias condiciones de stress. Todo lo contrario ocurre con larvas cultivadas en agua dulce (0‰), en el que estas necesitan mayor cantidad de EPA que DHA (EPA 1,21% - 1,45% y DHA 0,60% - 0,66%) que corresponde a más del doble de EPA. Hubo una baja sobrevivencia al test con la relación EPA/DHA 0,64 con una sobrevivencia de un 25% a diferencia de las larvas alimentadas con relación 2,02 y 2,18 cuyo porcentaje de sobrevivencia fue significativamente alto y fluctúan entre los 87,86 y los 85,26%. Un estudio realizado por Ahmad et al. (2003), menciona la importancia que tiene el EPA y DHA en larvas de red seabream como función importante en el

metabolismo lipídico y vitalidad fisiológica, indica que los niveles de EPA fueron altos en el músculo, hígado, ojo y cerebro como también lo fue el DHA en hígado, ojos, cerebro y corazón lo que indicaría que la conversión EPA a DHA ocurre en esos órganos, por lo tanto las funciones fisiológicas y la resistencia al aire fueron mejoradas por el fortalecimiento de un adecuado balance de EPA y DHA.

Con respecto a la investigación realizada, las larvas de “puye” pueden ser cultivadas en agua dulce aumentando los niveles de EPA. Cabe mencionar que la mayoría de los estudios de requerimientos nutricionales están enfocados principalmente a la importancia del DHA como nutriente principal de larvas de peces tanto marinos como dulceacuícola, sin tomar tanto en consideración la importancia que tiene el EPA en larvas cultivadas en agua dulce.

Los mejores crecimientos se obtuvieron a salinidades de 0‰ y se alcanzaron con altos niveles de EPA en las relaciones EPA/DHA 2,02 con una tasa de crecimiento de un 2,81 y en la relación EPA/DHA 2,18 con un 2,7; estos resultados coinciden con lo estipulado por Ibeas *et al.* (1997) el cual menciona que una relación EPA/DHA de 2/1 en la dieta mejora la condición en juveniles de gilthead seabream y por lo tanto la dieta utilizada que dió buenos resultados en esta salinidad tiene una proporción similar a lo descrito por este autor. Se encontró además una tasa de crecimiento alto en salinidades de 15‰, pero el crecimiento se ve favorecido con un nivel más alto de DHA que de EPA, este resultado coincide con muchos estudios

realizados, el cual mencionan que el DHA ha mostrado ser el ácido graso más importante en el crecimiento normal y el desarrollo del sistema nervioso central, y en particular del cerebro, ojos y órganos reproductivos, mientras que los EPA son importantes para una salud cardiovascular y juegan un papel esencial en ciertas respuestas inmunológicas (Bell. 1995).

Sin embargo, investigaciones adicionales ha mostrado que no es suficiente adicionar sólo EPA y DHA a la dieta de peces marinos. El entendimiento en el rol de estos ácidos grasos en la dieta de peces marinos a evolucionado a tratar de determinar los niveles óptimos de EPA y DHA en la dieta considerando el valor relativo de EPA y DHA así como de AA (ácido araquidónico: 20:4 n-6) en la dieta de animales marinos (Sargent *et al.*, 1997). Agregando simplemente estos ácidos grasos sin considerar los niveles provistos para animales marinos puede ser más dañino que beneficioso. En una revisión realizada por Sargent (1997), concluye que se requiere de una dieta que incluya una relación EPA/DHA/AA para el sano mantenimiento de los peces marinos.

## 8. CONCLUSIONES

1. A 0<sup>0</sup>/<sub>00</sub> de salinidad se obtiene los mejores resultados de sobrevivencia total con un 87,36% y tasa de crecimiento específico de 2,81 para la dieta cuya relación EPA/DHA es de 2,02.

2. Larvas cultivados en agua dulce, requieren niveles mayores de EPA que DHA a diferencia de larvas cultivadas en aguas salobres, esto indica que *Galaxias maculatus* puede ser cultivado satisfactoriamente en agua dulce con una relación EPA/DHA de 2,02 (1,21 % de EPA y 0,60% de DHA).

3. El porcentaje de sobrevivencia al test de resistencia más alto se alcanzó a 10<sup>0</sup>/<sub>00</sub> con la dieta cuya relación EPA/DHA fue de 0,64 y correspondió a un 90,68% esto indica que las larvas mantenidas a salinidades 10 y 15<sup>0</sup>/<sub>00</sub> requieren mayores niveles de DHA que de EPA.

4. Los experimentos realizados mostraron claramente que el efecto de la dieta y la salinidad son importantes en determinar el crecimiento, ya que se encontraron importantes diferencias entre las diferentes salinidades y también entre las dietas a una misma salinidad.

5. La mejor tasa de crecimiento específico fue de 2,81 y se logró a 0<sup>0</sup>/<sub>00</sub> con la relación EPA/DHA 2,02 y la tasa de crecimiento más baja fue de 1,24

alcanzándose a los 15<sup>0</sup>/<sub>00</sub>, también con la dieta cuya relación EPA/DHA fue de 2,02.

6. La relación EPA/DHA necesaria para lograr las mejores sobrevivencias, crecimiento y resistencia al estrés, es de 2,02 en larvas cultivadas a 0<sup>0</sup>/<sub>00</sub>, lo cual implica un 1,21% de EPA y 0,60 de DHA, mientras que cuando las larvas son cultivadas en salinidades de 10 y 15<sup>0</sup>/<sub>00</sub>, aparentemente la relación EPA/DHA mínima necesaria es cercana o inferior a 1, lo cual implica 0,95% de EPA y 1,49% de DHA, lo que permite concluir que cuando las larvas son cultivadas en agua dulce, los requerimientos de una relación EPA/DHA son más favorables al EPA y que cuando son cultivadas a 15<sup>0</sup>/<sub>00</sub>, los requerimientos son más favorables al DHA.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD DAUD OM, MASASHI; JI, HONG; UMINO, TETSUYA; HEISUKE NAKAGAWA, TETSUYA; TOSHIYUKI SASAKI, TETSUYA; OKADA, KENJI; MASAYA ASANO, KENJI; ATSUSHI NAKAGAWA, KENJI. 2003. Dietary effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on lipid metabolism in black sea bream. *Fisheries Science*, Vol. 69 Issue 6, p1182, 12p.

BALLANTYNE, J.S., STEWARD, K.R. 1996. Membrane lipids of a Deep – Sea Elasmobranch. Department of Zoology. University of Guelph, Ontario. Canadá.

BELL, G., CASTELL, J., TOCHER, D., MCDONALD, F., SARGENT, J., 1995. Effects of different dietary arachidonic acid: docosahexaenoic acid ratios on phospholipid fatty acid composition and prostaglandin production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiol. Biochem.* 14 (2): 139 – 151.

BORQUEZ, A., VALDEBENITO, I., DANTAGNAN, H.P., BARILES, J. 1996. Producción y Alimentación de Salmónidos cultivados en América Latina y el Caribe. FAO, Circular de Pesca N° 918, Roma, 88 pp.

CABALLERO, M.J.; OBACH, A.; ROSENLUND, G.; MONTERO, D.; GISVOLD, M.; IZQUIERDO, M.S. 2002. Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, Vol. 214 Issue 1-4, p253, 19p.

CASTELL, J.D., BELL, J.G., TOCHER, D.R., SARGENT, J.R., 1994. Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival growth and fatty acid composition of juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 128, 315 – 333.

DANTAGNAN, H.P., BORQUEZ, A., BARILES, J., VALDEBENITO, I. y VEGA, R. 1995. Effects of different diets on the survival and growth of puye (*Galaxias maculatus*). *Proceedings fish and shellfish larviculture symposium (Larvi 1995)*. European Aquaculture Society, special Publication 20; 435 – 437.

DANTAGNAN, H.P., BORQUEZ, A., QUEVEDO, J. y VALDEBENITO, I. 2002. Cultivo larvario del Puye (*Galaxias maculatus*) en un sistema intensivo recirculado. *Información Tecnológica* 13 (2): 15 – 21.

DELAUNAY, F., MARTY, Y., MOAL, J., SAMAIN, J.F., 1993. The effects of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 173.

ESPINOZA DE LOS MONTEROS & U. LABARTA (EDS). 1987. Nutrición en Acuicultura. Edic. Mundi prensa. Madrid. 318 pp.

ESTEVEZ, A., KANAZAWA, A. 1996. Fatty acid composition of normally pigmented and unpigmented juveniles of Japanese Flounder using rotifer and *Artemia* enriched in n-3 HUFA. Fisheries Science 62(1): 88 – 93.

EVJEMO, J.O., COUTTEAU, P., OLSEN, Y., SOORGELOOS, P., 1997. The stability of docosahexaenoic acid in two *Artemia* species following enrichment and subsequent starvation. Aquaculture 155 : 135 – 148.

FIGUEROA, D. 1990. Antecedentes preliminares en la reproducción de *G. maculatus*. Seminario de Investigación biológica. P Universidad Católica de Chile. Temuco. 18pp.

FROLOV, A. V., PANKOV, S.L., GERADZE, K.N., PANKOVA, S.A. & L.V. SPEKTOROVA. 1991. Influence of the biochemical composition of food on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Aquaculture 97: 181 – 202.

FURITA, H., TAKEUCHI, T., WATANABE, T., FUJIMOTO, H., SEKIYA, S., IMAIZUMI, K. 1996. Requirement of larval yellowtail for eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid and n-3 highly unsaturated fatty acid. Fisheries Science. 62: 372 – 379.

FURUITA, H., TAKEUCHI, T., UEMASU, K., 1998. Effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on growth, survival and brain development of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceous*). Aquaculture. 161: 269 – 279.

GATESOUBE, F.J., LE MILLINAIRE, C. 1985. Adaptation de la qualité alimentaire des filtreurs – proies aux besoins nutritifs des larvæ de poissons marins. Coll. Fr. – Jpn Oceanogr., Marseille, 16 – 21. Sept. 1985, 8: 51 – 63.

GATESOUBE, J., 1991. Managing the dietary value of *Artemia* for larval turbot, *Scophthalmus maximus*; the effect of enrichment and distribution techniques. Aquaculture Engineering 10: 111 – 119.

HALVER, J.C. 1975. Utilization of ascorbic acid in fish. Am. N.Y. Acad. Sci. 258: 81 – 102.

HENDERSON, R.J., TOCHER, D.R. 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. Prog. Lipid Res. 26: 281 – 347.

IZQUIERDO, M.S., WATANABE, T., TAKEUCHI, T., ARAKAWA, T., KITAJIMA, C. 1989. Requirement of larval seabream *Pagrus major* for essential fatty acids. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 55: 859 – 867.

IZQUIERDO, M.S., WATANABE, T., TAKEUCHI, T., ARAKAWA, T., KITAJIMA, C. 1989B. Optimal levels in *Artemia* to meet the EFA requirements of red sea bream (*Pagrus major*) In: The current status of fish nutrition in Aquaculture, (Takeda, M., Watanabe, T. Eds.). Japan Translation Center LTD Japan. Pp 221 – 232.

IZQUIERDO, M.S., ARAKAWA, T., TAKEUCHI, T., HAROUN, R., WATANABE, T., 1992. Effect of n-3 HUFA levels in *Artemia* on growth of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 105: 73 – 82.

IZQUIERDO, M.S. 1996. Essential fatty acids requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutr.* 2: 183 – 191.

KANAZAWA, A., TESHIMA, S., KOBAYASHI, T., TAKAE, M., IWASHITA, T., UEHARA, R. 1983a. Necessity of dietary phospholipids for growth of the larval ayu. *Mem Fac. Fish. Kagoshima University*, 32: 115 – 120.

KANAZAWA, A., TESHIMA, S., INAMORI, S., MATSUBARA, H. 1983b. Effects of dietary phospholipids on growth of the larval red sea bream and Knife jaw. *Mem Fac. Fish. Kagoshima University*, 32: 109 – 114.

KANAZAWA, A., 1985. Essential fatty acid and lipid requirement of fish. In: Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, J.G. (Eds), *Nutrition and Feeding in Fish*. Academic Press, London, pp. 287 – 298.

KANAZAWA, A., 1993a. Importance of DHA in organisms. *Pros. Puslitbangkan*, 18: 62 – 70.

KANAZAWA, A., 1993b. Essential phospholipids of fish and crustaceans, In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), *Fish nutrition in practice, Les Colloques N° 61*. INRA, Paris, pp. 519 – 530.

KANAZAWA, A., 1995. Nutrition of larval in fish. In: Lim, C.E., Sessa, D.J (Eds.), *Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture*. AOAC Press, Champaign, Illinois, pp. 50 – 59.

KANAZAWA, A., 1997. Effects of Docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. *Aquaculture* 155: 129 – 134.

KOVEN, W. M., KISSIL, G.W., TANDLER, A. 1989. Lipid and (n-3) requirement of *Sparus aurata* larvae during starvation and feeding. *Aquaculture* 79: 185 – 189.

KOVEN, W. M., TANDLER, A., KISSIL, G.W., SKLAN, D. 1992. The importance of n-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. *Aquaculture* 104: 91 – 104.

KOVEN, W. M., TANDLER, A., SKLAN, D. & G.W. KISSIL. 1993. The association of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the main phospholipids of different – age *Sparus aurata* larvae with growth. *Aquaculture* 116: 71 – 82.

LEGER, C. 1979. Effect of dietary fatty acids differing by chain lengths and w series on the growth and lipid composition of turbot *Scophthalmus maximus*. *Comp.Biochem.Physiol.* B64:345–350.

LÉGER, P., BENGTSON, D.A., SIMPSON, K.L., SORGELOOS, P., 1986. The use and nutritional value *Artemia* as a food source. *Mar. Biol. Ann. Rev.* 24: 521 – 623.

LE MILINAIRE, C., GATESOUBE, F.J., STEPHAN, G. 1983. Approche du besoin quantitatif en gras longs polyinsaturés de la Série n-3 chez la larve de turbot *Scophthalmus maximus*. C.R. Acad. Sci. Paris. 296: 917 – 920.

MARGOR- JENSEN, A. 1993. Importance of Broodstock for optimal production in aquaculture. Fish Farming Technology. Dahle, Jorgensen, Tvinnereim (Eds) Bakelma Rotterdam. 35 – 40.

MOURENTE, G., TOCHER, D.R. 1993. The effects of weaning on to a pelleted diet on brain lipid and fatty acid composition in post-larval hilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Comp. Biochem. Physiol., 104A (3): 605 – 611.

RAINUZZO, J.R, REITAN, K.I., JORGENSEN, L. y OLSEN, Y. 1994. Lipid composition in turbot larvae fed live feed cultured by emulsions of different lipid classes. Comp. Biochem. Physiol., 107: 699 – 710.

RAINUZZO, J.R., REITAN, K.I., OLSEN, Y., 1997. The significance of lipids at early stage of marine fish: a review. Aquaculture 155: 103 – 115.

REITAN, K.I. 1994. Nutritional Effects of Algae in First – Feeding of Marine Fish larvae, Ph.D. Thesis, University of Trondheim, pp 125.

RODRÍGUEZ, C., PÉREZ, J. A., IZQUIERDO M. S., MORA, J., LORENZO, A., FERNÁNDEZ – PALACIOS, H., 1993. Essential fatty acid requirements of larval gilthead sea bream (*Sparus aurata*) Aquaculture. Fish Management. 155: 129 – 134.

SALHI M., IZQUIERDO M.S., HERNANDEZ-CRUZ C.M., SOCCORO J., FERNANDEZ-PALACIOS H. 1997. The improved incorporation of polyunsaturated fatty acids and changes in liver structure in gilthead sea bream fed on micro diets. Journal of Fish Biology. 51: 869 – 879.

SARGENT, J.R., BELL, M.V., TOCHER. 1993b. Docosahexaenoic acid and the development of brain and retina in marine fish. pp. 139 – 149. In C.A. Drevon, I. Baksaas and H.E. Krokan (Eds.), Omega 3 Fatty Acids: Metabolism and Biological Effects. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland.

SARGENT, J.R., BELL, J.G., BELL, M.V., HENDERSON, R.J., TOCHER, D.R. 1995. Origin and functions of n-3 polyun-saturated fatty acids in marine organisms. pp. 248 – 259. In G. Ceve and F.Paltauf (Eds.), Phospholipids: characterization, Metabolism and Novel Biological Applications Am. Oil Chem. Soc.Press, Champaign, USA.

SARGENT, J. 1995. Origins and functions of eggs lipids: nutritional application. In *Broodstocks Management and egg and larval quality*. Bromage, N.R., Roberts (eds.), Blackwell, Oxford, pp. 353 – 372.

SARGENT, J.R., MCCEVOY, L.A. & BELL, J.G. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155: 117 – 127.

SEGNER, H., ROSCH, R., VERRETH, J., WITT, U., 1993. Larval nutritional physiology: studies with *Clarias gariiepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. *J. World Aqua. Soc.* 24: 121 – 134.

TAKEUCHI, T. 1977a. Requirement of carp for essential fatty acids. *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.*, 43:541–551.

TAKEUCHI, T., M. TOYOTA, S. SATOH and T. WATANABE. 1990b. Requirement of juvenile red seabream *Pagrus major* for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 56: 1263 – 1269.

TAKEUCHI, T., ARAKAWA, T., SATOH, S., WATANABE, T. 1992. Supplemental effect of phospholipids and requirement of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid of juvenile *Striped jack*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 58: 707 – 713.

TAKEUCHI, T., MASUDA, R., ISHISAKI, Y. 1996. Determination of the requirement of larval striped jack for eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid using enriched *Artemia Nauplii*. *Fish. Sci.* 62: 760 – 765.

URIARTE, I., RUPP, G., ABARCA, A., 2002a. Capítulo 8: Producción de Juveniles de pectínidos iberoamericanos bajo condiciones controladas. En: *Los moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. A.N. Maeda – Martínez (Ed), Editorial Limusa. pp: 147 – 172.

WATANABE, T., ARAKAWA, T. KITAJIMA, C.F. FUKUSHO AND S. FUJITA 1978. Nutritional quality of living feed from the view – point of essential fatty acid for fish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 44: 1223 – 1227.

WATANABE, T., 1982. Lipids nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B* 73: 3 – 15.

WATANABE, T., KITAJIMA, C. 1983a. Nutritional value of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture* 34: 115 – 143.

WATANABE, T., 1985. Importances of the study of Broodstock nutrition for further development of aquaculture. In: Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, J.G. (Eds), Nutrition and Feeding in Fish. Academic Press, London, pp. 395 – 414.

WATANABE, T., M.S. IZQUIERDO, T. TAKEUCHI, SATOH., S., KITAJIMA, C. 1989a. Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficacy in larval red sea bream. Nippon Suisan Gakkaishi 55: 1635 – 1640.

WATANABE, S., ARAKAWA, T., TAKEUCHI, T., SATOH, S., 1989b. Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoico acids in terms of essential fatty acid efficacy in juvenile striped jack *Pseudocaranx dentex*. Nippon Suisan Gakkaishi 55: 1989 – 1995.

WATANABE, T., 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. J. World Aquaculture Soc. 24: 152 – 161.

WATANABE, T., KIRON, V. 1994. Prospects in larval fish dietetics. Aquaculture 124: 223 – 251.

**Página Web Consultada:**

<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB492S/AB492S02.htm>