



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Cultivo larvario de dentón (*Dentex dentex* L.): contribución al establecimiento de las necesidades nutricionales en ácidos grasos poliinsaturados.

Carlos Emilio Suárez Ramírez



Tesis

**Doctorales**

[www.eltallerdigital.com](http://www.eltallerdigital.com)

UNIVERSIDAD de ALICANTE



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Centro Oceanográfico de Murcia  
Instituto Español de Oceanografía

**Cultivo larvario de dentón (*Dentex dentex* L.):  
contribución al establecimiento de las necesidades  
nutricionales en ácidos grasos poliinsaturados.**

**Carlos E. Suárez Ramírez**

Programa de Doctorado:  
Ciencias Ambientales y Recursos Naturales

Tesis presentada para aspirar al grado de  
DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE ALICANTE

Dirigida por:

Emilia Abellán Martínez. Investigadora Titular del Instituto Español  
de Oceanografía

Alicia García Alcázar. Investigadora Titular del Instituto Español de  
Oceanografía

Carlos E. Suárez Ramírez ha sido beneficiario de una beca de la Agencia  
Española de Cooperación Internacional (AECI) durante los años 1999-2002.

EMILIA ABELLÁN MARTÍNEZ Y ALICIA GARCÍA ALCÁZAR,  
Científicas Titulares del Instituto Español de Oceanografía

CERTIFICAN:

Que CARLOS E. SUÁREZ RAMÍREZ ha realizado bajo su dirección, en la Planta de Cultivos Marinos del Centro Oceanográfico de Murcia, el trabajo que con el título “Cultivo larvario de dentón (*Dentex dentex* L.): contribución al establecimiento de las necesidades nutricionales en ácidos grasos poliinsaturados”, constituye su memoria para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Alicante.

Y para que conste a los efectos oportunos firman el presente certificado en Puerto de Mazarrón (Murcia), a 3 de diciembre de 2015.

Fdo. Emilia Abellán Martínez

Fdo. Alicia García Alcázar



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

La vida es un camino, buscamos nuestro sitio,  
buscamos resolver muchas preguntas,  
algunas veces encontramos las respuestas,  
otras veces no  
pero nuestro destino no está aquí.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

A mi madre Teresa (q.e.p.d.) y a mi padre Luis,  
por haberlo dado todo por su familia.

A mis hermanos por su amor incondicional  
y por haber compartido penas y alegrías.

A mis abuelos y tíos por inculcarme el amor  
por el campo y el respeto por la naturaleza.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis directoras, Emilia Abellán y Alicia García Alcázar por la oportunidad de trabajar con ellas, por su paciencia, por sus consejos, colaboración y ayuda sin las cuales no habría sido posible realizar este trabajo.

A los directores del IEO – Murcia: Julio Más, José María Bellido y Fernando de la Gándara por su amistad y apoyo incondicional.

A los investigadores del IEO – Murcia Marta Arizcun y Fernando de la Gándara por sus consejos y colaboración en el trabajo.

Al Instituto Español de Oceanografía – Planta de Cultivos Marinos de Murcia por las facilidades técnicas, logísticas y personales para realizar y culminar este trabajo. A todo el personal del Instituto por su colaboración: Francisca Esteban, Nicolás Pérez, Manolo Pérez, Santiago García, Juan Antonio Ramos, Elena Chaves, Aurelio Ortega, María del Mar Raja, Tomas Raja, Antonia Casanova, Eva Vidal, Ricardo y Pepe Rodríguez, María José Arenas, Fernando Méndez, María José y María Dolores Nortes, Javier Delgado y Domingo Hernández.

A mis compañeros becarios: Isaac Abdel y Pablo Valdés por su contribución en este trabajo y por su amistad. A mi amiga Paqui Esteban por su inestimable ayuda. A Paco Raja por su colaboración. A Freddy Ramírez Medrano por su amistad y colaboración en la resolución de problemas informáticos.

A mi tutor, Eduardo Galante Patiño por su amistad, la ayuda invaluable que siempre me ha brindado y el ánimo para seguir adelante. Al director del Departamento de Ciencias ambientales y Recursos Naturales, Santos Rojo y a la secretaria del Departamento, Celeste Baños por su valiosa ayuda. A todo el personal del Departamento de Ciencias Ambientales y del CIBIO de la Universidad de Alicante por su colaboración; especialmente a los profesores María Ángeles Marcos, Vicente Urios, José Luis Casas y Santos Rojo. A mis compañeros del Departamento: Anabel Martínez, Celeste Pérez, Estefanía Micó, José Ramón Verdú, Carmina, María e Isabel. Al personal administrativo especialmente a Yolanda Tari y Jesús Ordóñez.

Al Gobierno de España a través de la AECI por la concesión de la beca para realizar los Cursos y la Tesis Doctoral. A la Universidad de Alicante por acogerme en su seno y por las facilidades que me ha brindado en todo momento. Y a la gente de este gran país por haberme acogido como uno más de los suyos.

Al Gobierno de España a través del CICYT (Programa Nacional de Alimentación) por la financiación del proyecto de investigación.

A mis padres (Teresa y Luis) y a mis hermanos (Ruth, Luis, Luz Ángela, Claudia y Diego) por ser mi fortaleza, por su amor y apoyo. A mis primas (Dorita, Graciela, Margarita y María Isabel) por darme siempre ánimo para continuar y a todos mis familiares por estar siempre a mi lado. A Isabel Rodríguez, María A. Ramírez, Edelmira Ramírez, Rebeca Torres, Manuel Ramírez, Rosa Ramírez y Francisco Ramírez (q.e.p.d.), por todo el cariño que me dieron en vida. A mis amig@s: Luz Nelly López, Cristina Toledo, Marta Peñaranda, Antoñita Martínez, Maricarmen y Maribel Tallón, Ramón Pareja, Isidoro María-Dolores, Hermógenes Fuentes, José Manuel Martín, Toñín y Salva Andreú y sus familias por haberme apoyado siempre



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento de las necesidades nutricionales en ácidos grasos poliinsaturados del pez marino dentón (*Dentex dentex*, L.). Para ello se realizaron cuatro experimentos en los cuales se suministraron a larvas de dentón dietas con diferentes contenidos de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) utilizando como vehículo de introducción presas vivas (rotífero y *Artemia*). Posteriormente se evaluó el efecto de dichas dietas sobre la calidad y supervivencia final de las larvas.

En el Experimento I, se alimentaron larvas de corta edad hasta los 22 días posteclosión (dph) con el rotífero (*Brachionus plicatilis*). Dichos rotíferos fueron sometidos a una serie de tratamientos de enriquecimiento con varias especies de microalgas (*Chlorella sp.*, *Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana*) y un enriquecedor comercial (Protein - Selco®), con diferentes contenidos en PUFA. En el tratamiento con Protein – Selco se alcanzaron valores significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) de talla y peso de las larvas, mientras que en el tratamiento con la microalga *Isochrysis galbana*, las larvas alcanzaron mayores valores de biomasa y supervivencia final con respecto a las larvas de los otros tratamientos.

En los Experimentos II y III se partió de larvas de mayor edad (desde 22 hasta 48 dph) que fueron alimentadas con el crustáceo *Artemia sp.* La *Artemia*, se enriqueció con una serie de emulsiones experimentales (ICES®) con diferentes contenidos de PUFA. En el Experimento II, se encontró que las larvas a las que se les suministró mayores contenidos de PUFA, presentaron valores significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) en supervivencia y biomasa final. En el Experimento III, se observó que en las larvas a las que se les suministró el menor nivel de PUFA, se obtuvieron resultados significativamente menores ( $p < 0.05$ ) en peso, talla, biomasa y supervivencia final. No se encontraron grandes diferencias en peso y talla entre las larvas a las que se les suministraron los PUFA en forma de triglicéridos o de etilésteres.

En el Experimento IV se estudió la variación de contenidos de ácidos grasos a lo largo de un periodo de puestas (abril, mayo y junio) y durante cuatro fases de desarrollo endotrófico: huevo, huevo embrionado, larvas recién eclosionadas y larvas con apertura de la boca. Se evaluó la repercusión de estas variaciones de contenidos de ácidos grasos sobre los parámetros de calidad de huevos y larvas. También se compararon los contenidos de ácidos grasos de estas fases endotróficas con los contenidos encontrados durante las fases de alimentación con rotífero y *Artemia*. No se observaron grandes diferencias a lo largo del periodo de puesta en cuanto a contenidos de ácidos grasos y a las proporciones entre ellos, aunque si se observaron cambios en los parámetros que indicaban calidad de las puestas. Por el contrario, se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el grado de saturación de ácidos grasos, contenido de PUFA y ácidos grasos de 18 carbonos entre las larvas en fase de apertura de la boca con respecto a las otras fases de desarrollo endotrófico.



## SUMMARY

The aim of this paper is to contribute to the knowledge of the polyunsaturated fatty acids requirements of marine fish dentex (*Dentex dentex*, L.). Four experiments were carried out feeding dentex larvae with diets containing different polyunsaturated fatty acids (PUFAs) profiles, using as vehicle live preys (rotifers and *Artemia*). Subsequently the effect of these diets on the quality and final survival of the larvae was assessed.

In Experiment I, larvae were fed until 22 days posthatching (DPH) with rotifers (*Brachionus plicatilis*) enriched with different species of microalgae (*Chlorella* sp, *Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis suecica*, and *Isochrysis galbana*) and a commercial enrichment diet (Protein-Selco®), with different content in PUFA. The treatment with Protein-Selco resulted in significantly ( $p < 0.05$ ) higher values of larvae length and weight of larvae, while with the treatment with *Isochrysis galbana*, larvae reached higher final biomass and survival comparing with larvae of other treatments.

In Experiments II and III larvae from 22-48 dph were fed the crustacean *Artemia* sp. enriched with a series of experimental emulsions (ICES®) with different PUFA content. In Experiment II, the larvae fed with higher PUFA content presented significantly ( $p < 0.05$ ) better values for final survival and biomass. In Experiment III, it was observed that the larvae which were given the lower level of PUFA presented worse results ( $p < 0.05$ ) for weight, height, and final biomass and survival. No major differences in height and weight were found in larvae which were provided with PUFAs as triglycerides or ethyl esters.

In Experiment IV variation in fatty acid content throughout the spawning season (April, May, June) and during four phases of endotrophic development: egg, embryonated egg, newly hatched larvae and mouth opening larvae was studied. The effect of the variation in fatty acid content on the quality parameters of eggs and larvae was evaluated. Fatty acid content of these endotrophic phases were also compared with those found during the periods of larval feeding with rotifer and *Artemia*. No major differences along the spawning period in content of fatty acids and their proportions were observed, although some differences in the egg quality parameters were observed. In contrast, significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed in the degree of saturation of fatty acids, PUFA and 18 carbon fatty acids content, in opening mouth larvae with respect to the other phases of endotrophic development.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. OBJETIVOS</b> .....	5
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	6
<b>2.1. EL DENTÓN</b> .....	6
<b>2.2. TÉCNICAS DE CULTIVO</b> .....	8
2.2.1. Mantenimiento de reproductores.....	8
2.2.2. Obtención de puestas.....	8
2.2.3. Incubación y desarrollo embrionario.....	10
2.2.4. Cultivo y desarrollo larvario.....	12
Desarrollo larvario.....	12
Condiciones de cultivo larvario.....	14
2.2.5. Preengorde y engorde.....	14
<b>2.3. ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN DE LARVAS Y JUVENILES</b> .....	15
2.3.1. Fisiología y alimentación en larvas.....	15
2.3.2. Desarrollo del sistema digestivo.....	15
2.3.3. Caracterización del sistema digestivo en peces.....	17
<b>2.4. NUTRICIÓN LARVARIA</b> .....	18
2.4.1. Requerimientos energéticos.....	18
2.4.2. Requerimientos nutricionales generales.....	18
2.4.3. Requerimientos de lípidos.....	21
2.4.3.1. Influencia de los lípidos en la alimentación de los reproductores y la calidad de huevos y larvas.....	21
2.4.3.2. Requerimientos de ácidos grasos en la dieta.....	21
2.4.3.2.1. Biosíntesis y conversión de ácidos grasos.....	21
2.4.3.2.2. Necesidades de ácidos grasos en la dieta.....	24
2.4.3.2.3. Función de los ácidos grasos en el cultivo larvario.....	25
2.4.3.2.4. Digestión de lípidos en larvas.....	25
2.4.3.2.5. Absorción y transporte de lípidos.....	27
2.4.3.3. Metabolismo y utilización de ácidos grasos.....	30
2.4.3.3.1. Requerimientos cuantitativos de AGE.....	30
2.4.3.3.2. Proporciones entre los AGE e interacciones competitivas.....	30
2.4.3.3.4. Diseño de dietas larvarias.....	32
2.4.3.5. Requerimientos de HUFA en larvas de dentón.....	34

<b>2.5. TÉCNICAS DE ALIMENTACIÓN EN LARVAS Y ALEVINES</b> .....	<b>34</b>
2.5.1. Cultivos auxiliares.....	34
2.5.1.1. Fitoplancton.....	35
2.5.1.1.1. Efectos nutricionales de las algas sobre los cultivos.....	35
2.5.1.1.2. Métodos de producción de microalgas marinas.....	36
2.5.2. Zooplancton.....	37
2.5.2.1. Alimentación de larvas con presas vivas.....	37
2.5.2.2. Composición del alimento vivo.....	38
2.5.3. Dietas con alimento inerte.....	39
2.5.4. Método de coalimentación (coffeding).....	40
2.5.4. Tasas y ritmos de alimentación.....	40
2.5.5. Secuencias y estrategias de alimentación.....	41
2.5.5.1. Secuencias de alimentación.....	41
2.5.5.2. Estrategias de alimentación.....	42
2.5.6. Crecimiento y supervivencia larvaria.....	44
2.5.6.1. Causas de la mortalidad de larvas y alevines.....	44
2.5.6.2. Problemas actuales del cultivo.....	45
2.5.6.2.1. Técnicas de cultivo.....	46
2.5.6.2.2. Comportamiento agresivo.....	46
2.5.6.2.3. Estrés.....	46
2.5.6.2.4. Patologías.....	47
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
<b>3.1. CULTIVO DE MICROALGAS</b> .....	<b>49</b>
3.1.1. Procesos de crecimiento de la población.....	50
3.1.2. Técnicas de producción masiva.....	51
3.1.3. Instalaciones para cultivo masivo de microalgas.....	53
3.1.4. Filtración y esterilización del agua de mar.....	53
3.1.5. Esterilización del equipo de cultivo.....	54
3.1.6. Enriquecimiento del medio de cultivo.....	54
<b>3.2. CULTIVO DE ROTÍFERO</b> .....	<b>55</b>
3.2.1. Técnicas generales de cultivo.....	55
3.2.2. Siembra y mantenimiento.....	56
3.2.3. Cosecha y cambio de tanque.....	56
3.2.4. Alimentación y enriquecimiento.....	57
<b>3.3. CULTIVO DE ARTEMIA</b> .....	<b>57</b>
3.3.1. Obtención de nauplios y enriquecimiento de <i>Artemia</i> .....	57
3.3.2. Tratamiento de la cepa EG de <i>Artemia</i> .....	58
3.3.2.1. Desinfección.....	58
3.3.2.2. Descapsulación.....	58
3.3.2.3. Incubación.....	59
3.3.2.4. Cosecha.....	60
3.3.2.5. Enriquecimiento.....	60
3.3.2.6. Cosecha, almacenamiento y suministro.....	60
<b>3.4. REPRODUCTORES</b> .....	<b>61</b>
<b>3.5. CULTIVO LARVARIO</b> .....	<b>62</b>

<b>3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>63</b>
3.6.1. Experimento I: Determinación de perfiles de ácidos grasos en larvas en fase rotífero.....	63
3.6.1.1. Determinación del perfil de ácidos grasos en microalgas.....	64
3.6.1.2. Determinación de ácidos grasos en rotífero y larvas en fase rotífero.....	65
3.6.2. Experimento II: Determinación de contenidos de ácidos grasos en larvas en fase <i>Artemia</i> del primer año .....	67
3.6.2.1. Contenido de ácidos grasos en emulsiones, <i>Artemia</i> y larvas .....	67
3.6.3. Experimento III: Determinación de ácidos grasos en larvas en fase <i>Artemia</i> del segundo año .....	69
3.6.4. Experimento IV: Determinación de contenidos de ácidos grasos en huevos y larvas en estadios endotróficos.....	71
<b>3.7. MUESTREOS</b> .....	<b>73</b>
3.7.1. Recolección de muestras de algas.....	73
3.7.2. Recolección de muestras de rotífero.....	73
3.7.3. Recolección de muestras de <i>Artemia</i> .....	73
3.7.4. Recolección de muestras de larvas.....	73
<b>3.8. TÉCNICAS ANALÍTICAS</b> .....	<b>74</b>
3.8.1. Determinación de humedad y cenizas.....	74
3.8.2. Determinación en proteínas.....	74
3.8.3. Determinación en lípidos totales.....	75
3.8.4. Determinación de ácidos grasos.....	76
3.8.4.1. Extracción.....	76
3.8.4.2. Metilación, análisis e identificación de muestras.....	76
<b>3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS</b> .....	<b>78</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>79</b>
<b>4.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>79</b>
<b>4.2. EXPERIMENTO I: LARVAS EN FASE ROTÍFERO</b> .....	<b>79</b>
4.2.1. Tabla del perfil de ácidos grasos de microalgas y P-S.....	80
Diagramas de perfiles de ácidos grasos de microalgas y P-S.....	81
4.2.2. Curvas de crecimiento de microalgas.....	82
4.2.3. Tabla del perfil de ácidos grasos en rotífero enriquecido.....	92
Diagramas de los perfiles de ácidos grasos de rotífero enriquecido.....	93
4.2.4. Tabla del perfil de ácidos grasos en larvas en fase rotífero.....	95
Diagramas de perfiles de ácidos grasos de larvas en fase rotífero.....	96
4.2.5. Evaluación del crecimiento de larvas en fase rotífero.....	98
Parámetros de crecimiento de larvas en fase rotífero.....	98
Curvas de crecimiento de larvas en fase rotífero.....	101

<b>4.3. EXPERIMENTO II: LARVAS EN FASE ARTEMIA – PRIMER AÑO</b> .....	<b>102</b>
4.3.1. Tabla del perfil de ácidos grasos en emulsiones del primer año.....	103
Diagrama del perfil de ácidos grasos en emulsiones del primer año.....	104
4.3.2. Tabla del perfil de ácidos grasos en <i>Artemia</i> del primer año.....	105
Diagrama del perfil de ácidos grasos de <i>Artemia</i> del primer año.....	107
4.3.3. Tabla del perfil de ácidos grasos en larvas en fase <i>Artemia</i> – 1º año.....	108
Diagramas del perfil de ácidos grasos en larvas fase <i>Artemia</i> – 1º año.....	110
4.3.4. Evaluación del crecimiento de larvas en fase <i>Artemia</i> del primer año.....	112
Relaciones Talla-Peso en larvas en fase del primer año.....	113
Figura 35. Parámetros biométricos de larvas en fase <i>Artemia</i> del primer año.....	114
<b>4.4. EXPERIMENTO III: LARVAS EN FASE ARTEMIA–SEGUNDO AÑO</b> .....	<b>115</b>
4.4.1. Tabla del perfil de ácidos grasos en emulsiones del segundo año.....	116
Diagramas del perfil de ácidos grasos en emulsiones del segundo año.....	117
4.4.2. Tabla del perfil de ácidos grasos en <i>Artemia</i> del segundo año.....	118
Diagramas del perfil de ácidos grasos en <i>Artemia</i> del segundo año.....	120
4.4.3. Tabla del perfil de ácidos grasos en larvas en fase <i>Artemia</i> – 2º año.....	121
Diagramas del perfil de ácidos grasos de larvas en fase <i>Artemia</i> del segundo año.....	123
4.4.4. Evaluación del crecimiento de larvas en fase <i>Artemia</i> del segundo año.....	124
Parámetros de crecimiento de larvas en fase <i>Artemia</i> del segundo año.....	124
Relaciones Talla-Peso en larvas en fase <i>Artemia</i> del segundo año.....	127
<b>4.5. EXPERIMENTO IV: EVOLUCIÓN DE LOS PERFILES DE ÁCIDOS GRASOS EN HUEVOS Y LARVAS EN FASES ENDOTRÓFICAS</b> .....	<b>129</b>
4.5.1. Tabla del perfil de ácidos grasos de huevos y larvas en fases endotróficas sumando los valores de los meses de abril, mayo y junio.....	129
Diagramas del perfil de ácidos grasos de huevos y larvas endotróficas sumando los valores de los meses de abril, mayo y junio.....	131
Diagramas del perfil de ácidos grasos de huevos y larvas endotróficas comparando los valores de los meses de abril, mayo y junio.....	132
4.5.2. Evaluación de los cambios en los parámetros de huevos y larvas endotróficas a través del tiempo .....	133
Figura 44. Parámetros de calidad de huevos.....	134
Figura 45. Parámetros de calidad de larvas en fases endotróficas.....	135
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>136</b>
<b>5.1. EXPERIMENTO I: LARVAS EN FASE ROTÍFERO ENRIQUECIDO CON MICROALGA Y P-S</b> .....	<b>136</b>
5.1.1. Ventajas de la utilización de microalgas.....	136
5.1.2. Utilización de diferentes métodos de cultivo y curvas de crecimiento.....	136
5.1.3. Contenido de lípidos totales y ácidos grasos en microalgas.....	138
5.1.4. Análisis de ácidos grasos en microalgas.....	138
5.1.4.1. Análisis de la cepa <i>Chlorella sp.</i> .....	139
5.1.4.2. Análisis de la cepa <i>Nannochloropsis gaditana</i> .....	140
5.1.4.3. Análisis de la cepa <i>Tetraselmis suecica</i> .....	140
5.1.4.4. Análisis de la cepa <i>Isochrysis galbana</i> .....	141
Tabla 32. Contenido de ácidos grasos en <i>Chlorella sp.</i> y <i>T. suecica</i> .....	142

Tabla 33. Contenido de ácidos grasos en <i>N. gaditana</i> e <i>I. galbana</i> .....	143
5.1.2. Rotífero.....	144
5.1.2.1. Utilización de rotífero como alimento vivo.....	144
5.1.2.2. Contenido de ácidos grasos en el rotífero.....	144
5.1.2.2.1. Rotífero enriquecido con <i>Chlorella sp</i> .....	145
5.1.2.2.2. Rotífero enriquecido con <i>Nannochloropsis gaditana</i> .....	145
5.1.2.2.3. Rotífero enriquecido con <i>Tetraselmis suecica</i> .....	146
5.1.2.2.4. Rotífero enriquecido con <i>Isochrysis galbana</i> .....	147
5.1.2.2.5. Rotífero enriquecido con Protein – Selco.....	147
Tabla 34. Contenido de ácidos grasos en rotífero con <i>Chlorella sp.</i> y <i>T. suecica</i> .....	149
Tabla 35. Contenido de ácidos grasos en rotífero con <i>N. gaditana</i> e <i>I. galbana</i> .....	150
Tabla 36. Contenido de ácidos grasos en P-S y rotífero enriquecido con P-S.....	151
5.1.3. Larvas alimentadas con rotífero enriquecido con microalgas y P-S.....	152
5.1.3.1. Larvas alimentadas con rotífero enriquecido con <i>Chlorella sp</i> .....	152
5.1.3.2. Larvas alimentadas con rotífero enriquecido con <i>Nannochloropsis gaditana</i> .....	153
5.1.3.3. Larvas alimentadas con rotífero enriquecido con <i>Tetraselmis suecica</i> .....	154
5.1.3.4. Larvas alimentadas con rotífero enriquecido con <i>Isochrysis galbana</i> .....	155
5.1.3.5. Larvas alimentadas con rotífero enriquecido con Protein – Selco.....	156
Tabla 37. Resumen de contenido de ácidos grasos de algas, rotífero y larvas.....	158
Tabla 38. Comparación de los contenidos de ácidos grasos de las larvas de los cinco tratamientos según por varios autores.....	159
Resumen del Experimento I.....	160
<b>5.2. EXPERIMENTO II: LARVAS EN FASE ARTEMIA DEL 1º AÑO.....</b>	<b>162</b>
5.2.1. Emulsiones utilizadas.....	162
5.2.1.1. Emulsiones utilizadas en el primer año.....	162
5.2.2. <i>Artemia</i> .....	164
5.2.2.1. <i>Artemia</i> del primer año.....	165
5.2.3. Larvas en fase <i>Artemia</i> del primer año.....	167
Tabla 41. Resumen de datos de los tratamientos con <i>Artemia</i> del primer año.....	170
<b>5.3. EXPERIMENTO III: LARVAS EN FASE ARTEMIA DEL SEGUNDO AÑO.....</b>	<b>171</b>
5.3.1. Emulsiones del segundo año.....	171
5.3.2. <i>Artemia</i> del segundo año.....	172
5.3.3. Larvas en fase <i>Artemia</i> del segundo año.....	174
Tabla 43. Resumen de datos de los tratamientos del segundo año.....	178
<b>5.4. EXPERIMENTO IV: PERFILES DE ÁCIDOS GRASOS EN HUEVOS EN DIFERENTES FASES Y LARVAS EN FASES ENDOTRÓFICAS.....</b>	<b>179</b>
5.4.1. Huevos, huevos embrionados y larvas endotróficas.....	179
5.4.2. Comparación entre los contenidos de ácidos grasos de las fases endotróficas y los de las larvas en fase rotífero.....	181
Tabla 39. Perfiles de ácidos grasos de las fases endotróficas Comparados con los de las larvas en fase rotífero.....	182
5.4.3. Comparación entre los perfiles de ácidos grasos de las fases endotróficas y los de las larvas en fase <i>Artemia</i> .....	182
5.4.3.1. Procesos metabólicos antagónicos de <i>Artemia</i> frente a larvas.....	182

5.4.3.2. Comparación entre los perfiles de ácidos grasos de las fases endotróficas con los de larvas en fase <i>Artemia</i> del primer año.....	183
Tabla 44. Comparación entre los perfiles de ácidos grasos de huevos y larvas endotróficas con larvas en fase <i>Artemia</i> del primer año.....	184
5.4.3.3. Comparación entre los contenidos de ácidos grasos de las fases endotróficas con los de larvas en fase <i>Artemia</i> del segundo año.....	186
Tabla 45. Comparación entre los perfiles de ácidos grasos de huevos y larvas endotróficas con larvas en fase <i>Artemia</i> del segundo año.....	187
<b>Resumen</b> .....	<b>188</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>189</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>191</b>



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad la pesca cubre con dificultad la creciente demanda mundial para consumo humano debido al estancamiento de la pesca tradicional o extractiva, ya que cerca del 70% de las especies comercializadas en el mundo están sobreexplotadas o en proceso de agotamiento (González-Serrano 2000). La acuicultura podría suplir parcialmente este déficit puesto que es uno de los sectores con mayor potencial de crecimiento, hasta el punto de que la FAO estima que en el año 2030 el 50% del pescado consumido será producido en cultivos (FAO 2000). La acuicultura mundial suministró 90.4 millones de toneladas (TM) en 2012 frente a 92.5 millones de TM capturadas por la pesca, y puesto que 24 millones de TM de esta última no se destinan a consumo humano, la acuicultura ya provee más alimento a las personas que la pesca. A pesar de que en el futuro se pronostica este crecimiento del sector a nivel mundial; sin embargo, en los últimos años se produjo un ligero decaimiento en el ritmo de crecimiento que afortunadamente logró repuntar en un 8.9% en 2012 (APROMAR 2014).

En la Unión Europea, la acuicultura produjo 1.27 millones de TM en 2012. Lo que supone una reducción del 1.3% con respecto a lo producido en 2011, y un descenso acumulado del 12% desde el pico de producción de 1999 (APROMAR 2014). La acuicultura de peces marinos en la Unión Europea está consolidada pero presenta el inconveniente de estar centrada en dos únicas especies, la dorada (*Sparus aurata* L.) y la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) con una producción conjunta que se han incrementado desde las 140.821 TM en 2002 hasta las 175.422 TM en 2012 (<http://www.feap.org>; FAO 2012); en España, la producción de dorada fue de 16.795 TM mientras que la de lubina fue de 14.707 TM en 2013 (APROMAR 2014). El aumento de la oferta de estas especies ha ocasionado una saturación en el mercado europeo y una caída brusca de los precios. Además, sus costos de producción son muy fluctuantes dada la diversidad de tecnologías de producción y tallas de comercialización existentes en los diferentes países del área.

En las últimas dos décadas se ha buscado diversificar las especies cultivadas con el fin de ampliar la oferta del mercado, estabilizar los precios y contribuir al desarrollo de la acuicultura (Stephanis y Divanach 1993, Abellán y Basurco 1999, Planas y Cunha 1999, Abellán 2000 b, Abellán y Arnal-Atarés 2013).

Dentro del conjunto de las familias de peces explotadas en acuicultura, la de los Espáridos es la más importante en la acuicultura mediterránea (23 especies). Incluye peces de gran interés comercial como la dorada, los sargos (*Diplodus* sp.) y los dentones (*Dentex* spp.) (García-Gómez *et al.* 1992). Dentro de este grupo, el dentón (*Dentex dentex* L.) es una de las especies con mejores posibilidades de ser explotada por la acuicultura intensiva (Abellán 2000 b, Abellán y Arnal-Atarés 2013). Es un carnívoro demersal que vive sobre fondos duros a profundidades entre 15 y 20 m, aunque puede llegar a los 150 m. Alcanza una talla máxima de 100 cm y un peso de hasta 12 kg, aunque los ejemplares capturados, normalmente, no sobrepasan los 50 cm. Su área de distribución comprende el Mediterráneo y el Atlántico desde el golfo de Vizcaya hasta Senegal (Bauchot 1987).



El dentón presenta un gran potencial por ser muy valorado en toda la región, donde se comercializa fresco y alcanza un elevado precio en el mercado. Por otra parte, el continuo incremento en las capturas sugiere la existencia de una alta demanda del mismo (Pavlidis 1999).

Esta especie muestra una importante velocidad de crecimiento si la comparamos con otras próximas como la dorada y cumple con casi todos los demás requisitos para ser cultivada con éxito: se adapta bien a la cautividad y al alimento inerte, los índices de conversión del alimento son altos y se reproduce sin problemas en cautividad (Francicevic 1991, Riera *et al.* 1993, Pastor *et al.* 1997, Abellán 2000 a y b).

El cultivo del dentón es relativamente reciente, si lo comparamos con el de especies tradicionalmente cultivadas como son la dorada y la lubina, por lo que aún hay muchos aspectos por investigar sobre su biología, ecología y cultivo en cautividad (Pavlidis 1999, Abellán 2000 b, Skalli 2001, Abellán y Arnal-Atarés 2013). Actualmente, debido a las dificultades técnicas que conlleva, aún no se cultiva comercialmente tanto a nivel de alevines como de peces de engorde (JACUMAR 2013).

Existen diversos trabajos relacionados con la **reproducción** (Glamuzina *et al.* 1989, Riera *et al.* 1993, Méndez *et al.* 1995, Abellán *et al.* 2007 y 1997, Pavlidis 1999, Pastor *et al.* 2000, Pavlidis *et al.* 2000, Basurco *et al.* 1999, Pavlidis y Milonas 2011, Abellán y Arnal-Atarés 2013), el **desarrollo embrionario y larvario** (Glamuzina *et al.* 1989, Jug-Dujakovic *et al.* 1995, Pastor *et al.* 1997; Koumoundouros *et al.* 1999 y 2004), el **cultivo larvario** (Francicevic 1991, Riera *et al.* 1993, Pastor *et al.* 1995 y 1997, Abellán *et al.* 1997 y 2007, Ibeaset *et al.* 2000, Koumoundouros *et al.* 2004, Morais *et al.* 2004, Giménez *et al.* 2006 y 2007 a y b, JACUMAR 2008, Pavlidis y Milonas 2011, Abellán y Arnal-Atarés 2013), **engorde** (Bibiloni *et al.* 1993, Riera *et al.* 1993 y 1995; Efthimiou *et al.* 1994, Cardenete *et al.* 1997, Jover *et al.* 1999, Giménez 2008, Pavlidis y Milonas 2011), **alimentación y nutrición** (Efthimiou *et al.* 1994, Tibaldi *et al.* 1996, Cardenete *et al.* 1997, Jover *et al.* 1999, Renobell *et al.* 1999, Ibeas *et al.* 2000, Skalli 2001, Koumoundouros *et al.* 2004, Giménez *et al.* 2006, Abellán y Arnal-Atarés 2013), y la **fisiología digestiva** (Ueberschär 1993, Moyano *et al.* 1996, Martínez *et al.* 1997, Díaz-López *et al.* 1997, Alarcón y Martínez 1998).

En el cultivo del dentón no existe dificultad en la obtención de huevos ya que se producen puestas espontáneas en cautividad. Sin embargo, el cultivo larvario y el preengorde presentan serias dificultades, especialmente en cultivos intensivos, puesto que son frecuentes los altos índices de mortalidad y los signos externos de deficiencias atribuibles a carencias nutricionales y/o a procesos patológicos y también a canibalismo (Abellán 2000 a y b, Giménez 2008, Pavlidis y Milonas 2011, Abellán y Arnal-Atarés 2013). Por lo tanto, para alcanzar el éxito en el cultivo intensivo es necesario controlar los procesos patológicos y la nutrición larvaria, la cual pasa por el establecimiento de una dieta adecuada que satisfaga todos los requerimientos nutricionales y permita obtener larvas y alevines de alta calidad, con buen crecimiento, elevadas tasas de supervivencia, y

resistencia a agentes patógenos y al estrés (Abellán, 2000 b). También es necesario controlar todos los parámetros en las diferentes etapas del cultivo en larvas y alevines (Abellán y Arnal-Atarés 2013).

Gran parte del éxito de la acuicultura actual se basa en el control de la larvicultura de las especies ya establecidas. La supervivencia, tasas de crecimiento, resistencia a los agentes patógenos y la calidad de larvas y alevines ha mejorado considerablemente en los últimos años, y en buena medida estos avances se han debido a una adecuada utilización de alimento vivo durante los primeros estadios del crecimiento larvario. Esta dependencia es debida al reducido tamaño de las larvas (al inicio de su alimentación activa) y a su gran selectividad trófica, ya que tienen preferencia por las presas vivas zooplanctónicas (Amat-Domènech 1993, Watanabe and Kiron 1994, Planas y Cunha 1999, Abellán 2000 b, Abellán y Arnal-Atarés 2013).

Dada la importancia del suministro de presas vivas durante los estadios iniciales del crecimiento larvario, es necesario prestar atención tanto a su composición bioquímica como al valor nutritivo de las mismas, y de manera especial valorar su contenido en elementos esenciales tales como los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), los cuales han demostrado ser de gran importancia en la alimentación de larvas y alevines. Dentro de estos HUFA debe existir, además, un adecuado balance entre las series n-3 y n-6, especialmente entre el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3), el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20: 5n-3) y el ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6), así como el efecto beneficioso de algunas sustancias como las vitaminas C y E (que actúan como antioxidantes) y también el uso de probióticos (Navas-Antón 1997, Planas y Cunha 1999, Sargent *et al.* 1999, Abellán 2000 b, Skalli 2001).

Las primeras evidencias sobre la importancia de los ácidos grasos esenciales fueron dadas por Watanabe *et al.* (1978 a y b, 1983) quienes observaron que el cultivo larvario de peces marinos mejoraba sensiblemente, desapareciendo los síntomas de malnutrición y altas mortalidades, cuando el rotífero (*Brachionus plicatilis*) se alimentaba con una microalga marina rica en HUFA (*Chlorella* sp.) en lugar de sólo levadura de panificación. Estas observaciones se hicieron extensivas al caso de los nauplios de *Artemia*. Algunos autores (Léger *et al.* 1985, 1986 y 1987) también pusieron de manifiesto la escasez de ciertos ácidos grasos poliinsaturados, esenciales para animales marinos, en la composición lipídica de algunos nauplios de *Artemia* dependiendo de su origen geográfico. Todos estos estudios confirmaron que los peces para su normal crecimiento y desarrollo, necesitan tres clases de HUFA: ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido araquidónico (ARA).

Las funciones bioquímicas, celulares y fisiológicas de los HUFA (DHA, EPA y ARA) son de dos categorías: **1)** de mantenimiento de la integridad estructural y funcional de las membranas celulares; **2)** de precursores del grupo de las hormonas paracrinas, conocidas colectivamente como eicosanoides.

En general los peces, al igual que los mamíferos, son incapaces de sintetizar ácidos grasos de las series 3 y 6, por lo que éstos deben ser suministrados en la dieta (Sargent *et al.* 1997, 1999 a y b). Su importancia en peces marinos ha sido ampliamente estudiada, y se han determinado sus requerimientos para varias especies: dorada, rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) entre otros (Sargent *et al.* 1997, Watanabe *et al.* 1987 y 1994). En dentón existen algunos estudios sobre la fase de alimentación con *Artemia* (Mourente and Tocher 1999, Abellán 2000 a y b), pero es necesario mejorar la calidad nutritiva de las presas vivas por diferentes métodos de enriquecimiento y determinar las necesidades en HUFA y las proporciones óptimas DHA/EPA/ARA para larvas de dentón.

Esta tesis doctoral se ha realizado en los laboratorios de la Planta de Cultivos Marinos del Centro Oceanográfico de Murcia – Puerto de Mazarrón (Instituto Español de Oceanografía) y ha sido financiada por la CICYT mediante el proyecto de investigación ACU00-011-C4-1 (Programa Nacional de Alimentación).



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 1. OBJETIVOS

Dadas las dificultades técnicas y la, relativamente, poca información existente sobre el cultivo larvario del dentón, este trabajo pretende contribuir al mejor conocimiento de esta especie, enfocando los esfuerzos hacia el campo de la alimentación y nutrición larvaria. El **objetivo general** es contribuir al conocimiento de las necesidades nutritivas en HUFA en larvas y alevines de dentón en la etapa de alimentación con presas vivas, determinando los efectos de suministrar diferentes proporciones DHA/EPA/ARA sobre el crecimiento, supervivencia y la composición bioquímica de larvas y alevines de dentón. Se utilizarán como medios para alcanzar estos objetivos las microalgas y las emulsiones artificiales (que servirán como enriquecedores) y como vehículo de introducción el rotífero (*Brachionus plicatilis*) y *Artemia sp.*

Este objetivo general incluye los siguientes **objetivos parciales**:

Determinación del perfil de ácidos grasos en cuatro especies de microalgas (*Chlorella sp.*, *Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana* var. *Tahitiense*) y en el enriquecedor Protein-Selco®.

Determinación del perfil de ácidos grasos del rotífero enriquecido con microalgas y con el enriquecedor Protein-Selco.

1. Determinación del perfil de ácidos grasos de *Artemia* enriquecida con emulsiones ICES durante el primer y segundo año.
2. Determinación del perfil de ácidos grasos de larvas en fase de alimentación con rotífero y su efecto sobre los parámetros de crecimiento y supervivencia de estas larvas.
3. Determinación del perfil de ácidos grasos de larvas en fase de alimentación con *Artemia* durante el primer y segundo año y su efecto sobre los parámetros de crecimiento y supervivencia de estas larvas.
4. Evolución del perfil de ácidos grasos durante los estadios endotróficos (huevo, huevo embrionado, larva en eclosión y larva con apertura de la boca) a lo largo del periodo de puestas y su efecto sobre la calidad de huevos y sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. EL DENTÓN

#### 2.1.1. BIOLOGÍA

El dentón (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758) es una especie de la familia de los Espáridos. En su **morfología (Figura 1)**, presenta un cuerpo ovalado, elevado y comprimido lateralmente. El perfil de la cabeza es casi recto en jóvenes y redondeado en adultos, presentando los ejemplares más grandes una ligera giba frontal, ojos pequeños y espacio suborbital grande, mejillas y preopérculo escamosos. También se caracteriza por poseer una boca baja y poco inclinada, provista de poderosos dientes caniniformes en las mandíbulas, en la parte frontal aparecen entre 4-6 dientes, en cada mandíbula, mucho más desarrollados que los laterales; presenta 9-10 branquiespinas inferiores y 8-9 superiores sobre el primer arco branquial. La aleta dorsal tiene 11 espinas de longitud creciente y 11-12 radios blandos, la anal 3 espinas y 7-9 radios blandos. La línea lateral presenta 62-68 escamas.

Los individuos jóvenes presentan coloración grisácea con manchas negras en el dorso, adoptan una tonalidad rosácea cuando alcanzan la madurez sexual y los adultos de mayor edad se tornan gris-azulados (**Figura 1**). Ciertos individuos presentan una mancha amarilla detrás de la boca y sobre el opérculo. Los ejemplares pueden alcanzar una talla de 100 cm, sin embargo el rango más común suele estar entre 20-50 cm; el peso máximo registrado es de 12 kg (Bauchot 1987, Skalli 2001).



Figura 1. Ejemplar de dentón cultivado en el IEO.

Son peces **demersales** que viven sobre fondos rocosos o conglomerados, normalmente a profundidades de 15-50 m, aunque pueden alcanzar los 150 m. Es un carnívoro estricto como la mayoría de espáridos, y en libertad suele alimentarse de peces y cefalópodos. Los adultos son solitarios y los jóvenes gregarios.

En estado natural, la **reproducción** tiene lugar desde marzo hasta julio (Lo Bianco 1909, Grubisic 1962, Bini 1968, Pastor *et al.* 1997, Abellán *et al.* 2000 a). Se considera como una especie gonocórica con sexos separados (Riera *et al.* 1993, Morales-Nin y Moranta 1997, Abellán *et al.* 2000 a y b, Pavlidis *et al.* 2000, Loir *et al.* 2001) aunque algunos estudios sugieren que presenta bisexualidad juvenil (Grau *et al.* 2001). Estos hechos se han logrado establecer después de varios estudios realizados tanto con ejemplares salvajes como cultivados.

Presenta una extensa área de **distribución** que comprende toda la cuenca del mediterráneo y Mar Negro, y el Océano Atlántico desde el Golfo de Vizcaya, las Islas Madeira, y la costa Africana hasta Senegal (**Figura 2**). Habitan en aguas costeras y sobre la plataforma continental (Bauchot y Hureau 1986, Bauchot 1987, Pastor *et al.* 2000, Skalli2001).



**Figura 2.** En el mapa se representa la distribución del dentón. La intensidad de color rojo a amarillo indica un gradiente de mayor a menor presencia (Fuentes: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org) y [www.aquamaps.org](http://www.aquamaps.org)).

Se **pesca** semiindustrialmente, (en Sicilia y Chipre), también de forma artesanal o deportiva. Es frecuente en los mercados de España, Italia, Grecia, Turquía, Túnez y Marruecos, y más escaso en los de Francia, Sicilia e Israel. Se comercializa en fresco alcanzando un elevado valor en el mercado (Bauchot 1987, Basurco and Abellán 1999, Skalli 2001).

## 2.1.2. TECNOLOGÍA DE CULTIVO

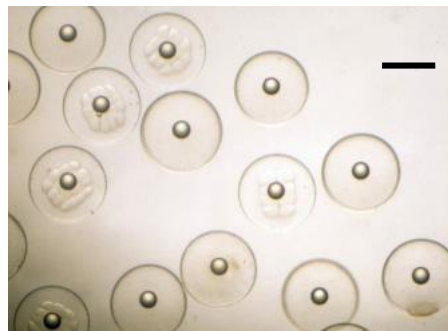
### 2.1.2.1. Mantenimiento de reproductores

Las condiciones de mantenimiento de los reproductores son diferentes en función del estudio consultado (Pastor *et al.* 1997, Abellán *et al.* 2000 a y b, Skalli 2001). Así, la **densidad de estabulación** tiene un amplio rango de variación, pero generalmente suele estar entre 1.3 y 7 kg/m<sup>3</sup>. Los **tanques** son de hormigón o cemento con unas dimensiones entre 1.6 y 100 m<sup>3</sup>, con circuito abierto y en la mayoría de los casos fotoperiodo, temperatura y salinidad en condiciones naturales. La **proporción de sexos** está en torno a 1:1. Aunque la maduración sexual se produce entre 0.5 y 2 años, los reproductores seleccionados suelen tener una edad comprendida entre 2 y 4 años. Los ejemplares se alimentan con una dieta a base de piensos secos y se les suministra un suplemento de pescado de descarte (sardina, caballa, boga, caramel, alacha, etc.) y cefalópodos, especialmente en los periodos de vitelogenésis y puesta (Glamuzina *et al.* 1989, Pastor *et al.* 1997, Abellán *et al.* 2000 a, Loir *et al.* 2001, Skalli 2001).

### 2.1.2.2. Obtención de puestas

Los huevos son pelágicos, flotantes y transparentes (Riera *et al.* 1993, Abellán *et al.* 2000 a). Las puestas son espontaneas, asincrónicas y secuenciales, tienen lugar diariamente al atardecer y a primeras horas de la mañana, en el período comprendido entre mediados de marzo y finales de junio (en la zona Mediterránea), a temperaturas comprendidas entre 15 y 25°C. La mayor intensidad tiene lugar en mayo (17.5 – 23.5°C) (Lo Bianco 1909, Bauchot y Hureau 1986, Glamuzina *et al.* 1989, Méndez *et al.* 1995, Abellán *et al.* 1997, Pastor *et al.* 1997, Loir *et al.* 2001). Pavlidis *et al.* (1999), mediante manipulación del fotoperiodo y temperatura, lograron producir huevos viables durante nueve meses (diciembre a agosto), sin encontrar diferencias en fecundidad, viabilidad o características del esperma.

En cautividad, los huevos son recogidos en el rebosadero a la salida de los tanques, se concentran en redes de 500  $\mu$ m, y luego son colocados en un incubador o directamente en los tanques de cultivo larvario. Tienen un diámetro medio comprendido entre  $958 \pm 7 \mu$ m y  $1089 \pm 19 \mu$ m (Abellán *et al.* 1997), una gota lipídica de  $217.86 \pm 12.20 \mu$ m (Pastor *et al.* 1997), observándose una disminución del tamaño al ir avanzando la estación de reproducción y al ir aumentando la temperatura (**Figura 3**). Las tasas de viabilidad son elevadas, en general, durante casi todo el período de puesta, siendo el porcentaje medio de huevo viable de 62 – 80 % (Abellán *et al.* 1997, Pastor *et al.* 1997). Las **Tablas 1 y 2** muestran variaciones en parámetros de hembras reproductoras, huevos y larvas de dentón.



**Figura 3.** Huevos de dentón fecundados en estado de 16 divisiones, a las 4 horas tras la fecundación. Barra: 500  $\mu$ m.

**Tabla 1.** Variaciones en los parámetros de huevos y hembras reproductoras.

Puestas (huevos/kg hembra)	Densidad de incubación (huevos/l)	Peso medio (g)/ hembra	Diámetro huevo ( $m\mu$ )	Referencias
600000 - 700000	---	---	950 – 1050	Loir <i>et al.</i> 2001
760000-1500000	10000 (incubador) 30 – 50 (tanques)	807 $\pm$ 45 (año 1) 1600 $\pm$ 69 (año 2)	1089 $\pm$ 19	Abellán <i>et al.</i> 2000a
317000-923000	120 (tanques)	2000 $\pm$ 500	1005 $\pm$ 0.02	Pastor <i>et al.</i> 1997, 1995
---	---	---	983 $\pm$ 18	Tulli y Tibaldi 1997
<1000000 1000000	---	---	1000 $\pm$ 40 ---	Méndez <i>et al.</i> 1995 Efthimiou <i>et al.</i> 1994
97000	---	700 $\pm$ 100	958 $\pm$ 7	Glamuzina <i>et al.</i> 1989
---	---	---	1010 $\pm$ 20	Lo Bianco 1909



**Tabla 2.** Parámetros relacionados con la calidad de huevos y larvas

Periodo de Cultivo (días)	Tasa de Viabilidad (%)	Tasa de eclosión (%)	Tasa de Supervivencia larvas (%)	Tasa de Fertilidad (%)	Referencia
15	---	---	8	---	Abellan <i>et al.</i> 2000 a
15	80	91.3	70.8	81	Pastor <i>et al.</i> 1997
90	---	---	2	---	Bibiloni <i>et al.</i> 1993
12	---	---	72*	40 - 84	Glamuzina <i>et al.</i> 1989

Nota\*: Hasta reabsorción del saco vitelino.

### 2.1.2.3. Incubación y desarrollo embrionario.

Después de la recolección de los huevos fecundados, mediante redes 500  $\mu$ m colocadas en el rebosadero de los tanques, comienza el proceso de **incubación** que se lleva a cabo en tanques cilíndricos o bien se transfieren directamente a tanques de cultivo larvario con renovación de agua y aireación conveniente. Esta última modalidad es más adecuada ya que elimina el traslado de las larvas recién eclosionadas de los incubadores a los tanques de cultivo. La densidad en incubadores es de hasta 10000 huevos/l. Por el contrario cuando la incubación se lleva a cabo en tanques circulares de cultivo larvario, la densidad puede variar desde 30-50 huevos/l hasta 120 huevos/l (Pastor *et al.* 1997 y 1995, Abellán 2000 a). La duración del periodo de desarrollo embrionario varía con la temperatura del agua. Así, Glamuzina *et al.* (1989) y Jug-Dujakovic *et al.* (1995) incubaron a una temperatura de 17°C obteniendo una duración entre 79 h:10 minutos y 81 h: 5 minutos, mientras que Pastor *et al.* (1997) incubaron a una temperatura de 17.6°C obteniendo una duración del desarrollo embrionario de 56 h: 10 minutos, con tasas de eclosión superiores al 90%. La **Tabla 3** condensa la información sobre el desarrollo embrionario.

**Tabla 3.** Desarrollo embrionario del dentón (Pastor *et al.*, 1997).

TIEMPO		ESTADIO	DESCRIPCIÓN
HORAS	MINUTOS		
0	00	Fecundación	
0	50		Aparición del disco germinal
1	10	Primera división	2 células
2	20	Mórula inicial	16 células
3	20	Mórula tardía	32 células; huevo en forma oval
4	00	Blastodisco	Forma una cápsula, 1/3 del volumen del huevo, gran espacio perivitelino
5	30	Blástula tardía	Gran multiplicación celular, tamaño de las células muy reducido
17	50	Gástrula	Ocupa 1/4 del volumen del huevo
22	55	Gástrula	Canal neural
26	30	Embrión	Formación de vesículas ópticas
42	15	Embrión	Ocupa $\frac{3}{4}$ del volumen del huevo. Cromatóforos diseminados por el cuerpo. Formación de lentes y cristalino
44	40	Embrión	Contracción del corazón Sacos óticos con otolitos Tubo neural definido
47	30	Embrión	Movimientos rítmicos
52	30	Embrión	Cuerpo bien desarrollado. Cola separada del vitelo. Melanóforos marcados Movimientos muy frecuentes
55	15	Larva	Comienza la eclosión del huevo

#### 2.1.2.4. Cultivo y desarrollo larvario

El cultivo larvario se extiende desde la eclosión hasta la metamorfosis que se inicia el día 21-22 y se completa el día 35 (Francicevic 1991). Comprende el paso de las larvas a los tanques de cultivo, el uso de alimento vivo y la adaptación a la alimentación inerte.

##### 2.1.2.4.1. Desarrollo larvario

Inmediatamente después de la eclosión la larva, todavía encorvada, sigue moviéndose rítmicamente. Pasadas dos horas, se ha extendido a lo largo del eje cefalo-caudal y se mantiene flotando en la superficie con la parte ventral hacia arriba (Pastor *et al.*, 1997).

En el desarrollo larvario se pueden distinguir dos periodos: **la fase lecitotrófica** en la cual la larva se alimenta de las reservas del saco vitelino, y **la fase exotrófica** que se inicia con la apertura de la boca y en la cual la larva comienza la alimentación externa. Este proceso termina con **la metamorfosis** a través de la cual los peces van adquiriendo las características morfológicas de los adultos (Pastor *et al.* 1997, Koumoundouros *et al.* 1999). La **Tabla 4**, describe en detalle los diferentes eventos del desarrollo larvario, y la **Tabla 5** señala variaciones en algunos parámetros según diversos autores.

La mayoría de los cambios ontogénicos se expresan durante el estadio de metamorfosis, mientras que el estado juvenil se caracteriza por la estabilidad en el desarrollo. Finalmente, el desarrollo normal de los dentones seriamente afectado por las condiciones de cultivo aplicadas durante la primera fase exotrófica. (Koumoundouros *et al.* 1999).

**Tabla 4.** Principales eventos del desarrollo larvario  
(Pastor *et al.* 1997, Koumoundouros *et al.* 1999).

<b>PERIODO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
Larva recién eclosionada	Orientación a lo largo del eje cefalocaudal Flota en superficie con el vientre hacia arriba
<b>Fase Lecitotrófica</b> (Estadio 1)	Boca cerrada Las larvas se alimentan a expensas de las reservas internas del Saco vitelino y gota de lípidos
Subestadio 1 a (día 0 ó de la eclosión)	Cabeza encorvada hacia delante. Saco vitelino extendido y unido posteriormente con la gota lipídica. Ojos no pigmentados. Intestino no funcional y cerrado Corazón funcional, sacos óticos
Subestadio 1b (días 1-3)	Cabeza alargada, saco vitelino reducido. Engrosamiento del tubo digestivo en la zona media, vesícula urinaria posterior. Formación de la aleta dorsal. Melanóforos en estrella extendidos hacia aleta primordial, pigmentación zona dorsal del digestivo.
<b>Fase Exotrófica</b>	Comprende dos etapas: Larva exotrófica (hasta 10 mm de longitud total) Metamorfosis (desde 10 hasta 24 mm de longitud total) Se inicia con la apertura de la boca y pigmentación de los ojos
<b>Larva exotrófica</b> Estadio 2 (días 4 - 5)	Apertura de la boca; disminución del vitelo. Ojos pigmentados, cristalino negro. Tubo digestivo en dos partes (separadas por una válvula), anterior con engrosamiento ventral y posterior más gruesa conectada al exterior. Aleta pectoral bien desarrollada. La pigmentación disminuye ligeramente con respecto a 1b.
Estadio 2 (días 6-9)	Reabsorción total del vitelo. Restos del glóbulo lipídico. Ojos azul metálico; pérdida de melanóforos en estrella. Desarrollo del corazón (atrio y ventrículo).
<b>Larva exotrófica</b> Estadio 3 (días 10 – 13)	Desarrollo de espinas operculares y vejiga natatoria. Vejiga natatoria pequeña pero visible sobre el estómago. Corazón dividido en: seno venoso, atrio y ventrículo. Pigmentación de la musculatura dorsal en forma de puntos y/o estrellas. Aleta primordial con pigmentación y melanóforos en estrella.
Estadio 3 (días 14 – 15)	Estrechamiento aleta marginal a nivel del pedúnculo caudal. Incremento de la musculatura. Pigmentación anaranjada en zona anterior.
<b>Metamorfosis</b>	Se inicia con el comienzo de la escamación También se denomina periodo postlarvario
<b>Juveniles</b>	Se adquieren las características morfológicas de los adultos. Termina el desarrollo larvario y postlarvario

**Tabla 5.** Variaciones en los parámetros del desarrollo larvario según diversos autores.

PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
Metamorfosis larvaria	Inicia días 21-22 hasta día 35	Franicevic, 1991
Saco vitelino	Reabsorción día 4 (22°C) 217 $\mu$ m (en la eclosión) Reabsorción día 5 (17°C)	Abellán <i>et al.</i> 1997 Jug-Dujakovic, 1995
Inflación de vejiga	8 días (19°C) 11 días (23°C)	Abellán <i>et al.</i> , 2000 a
Talla larvaria (mm) (recién eclosionada)	2.60 $\pm$ 0.10 2.61 $\pm$ 0.04 2.28 $\pm$ 0.08 2.17 $\pm$ 0.2	Abellán <i>et al.</i> 1997 Pastor <i>et al.</i> 1997 y 1995 Jug-Dujakovic 1995 Glamuzina <i>et al.</i> 1989
Descripción del desarrollo larvario	Hasta los 15 Días (17.6°C) Hasta los 7 días (17°C)	Pastor <i>et al.</i> 1997 y 1995 Jug-Dojakovic 1995
Diámetro de huevos y talla de larvas	Estos parámetros están relacionados con diferencias de temperatura y edad de las hembras	Arizcun <i>et al.</i> 2003 Skalli 2001 Koumoundouros <i>et al.</i> 1999 Glamuzina <i>et al.</i> 1989

#### 2.1.2.4.2. Condiciones de cultivo larvario

El cultivo larvario se realiza en tanques de 1-10 m<sup>3</sup> y la densidad inicial de huevos/tanque suele ser de 30-120 huevos/l (Abellán *et al.* 1997, Pastor *et al.* 1997). El fotoperiodo es de 18 horas luz/6 horas oscuridad y la intensidad luminosa de 500 lux. La temperatura del agua es la natural durante el periodo de puesta (15°C en febrero – 25°C en junio) y la salinidad es la del mar (37-40 ppt). El oxígeno disuelto (OD) es de 5 -7 mg/l y la renovación del agua esta en función de la edad, inicialmente es de 30% del volumen total del tanque/día y posteriormente es de 20% del volumen total del tanque/hora (Abellán 2000 a).

#### 2.1.2.5. Preengorde y engorde

El **preengorde** comienza cuando los alevines alcanzan 1 g de peso. Suele tener lugar en tanques, preferiblemente en cargas bajas de 2.5 kg/m<sup>3</sup>. El flujo del agua se mantiene, aproximadamente, entre 2-2.5 l/minuto y el oxígeno disuelto normalmente supera los 6 mg/l. A los alevines se les suministran piensos comerciales que contienen,

altos niveles de proteínas. En esta fase es fundamental clasificar frecuentemente los peces para obtener un crecimiento homogéneo y con el propósito de reducir o evitar el canibalismo (Riera *et al.* 1993, Efthimiou 1996). Cultivando alevines hasta los 90 días se han logrado aumentos en peso desde los 3 hasta los 5-7 g (Bibiloniet *al.* 1993, Efthimiou *et al.* 1994, Abellán *et al.* 2000 a y b).

Existen pocas referencias sobre el **engorde** del dentón. Bini (1968) realizó el engorde en acuarios a partir de juveniles de 13-14 cm procedentes del medio natural. Al cabo de 14 meses los ejemplares alcanzaron una talla de 27 cm y un peso de 300 g. Riera *et al.* (1993), realizaron el engorde en jaulas flotantes, utilizando dentones con 150 días de edad y 15 g de peso medio inicial. A los 20 meses de edad, dichos ejemplares alcanzaron un peso medio de 830 g. Posteriormente, Riera *et al.* (1995) realizaron también el engorde en jaulas flotantes de juveniles de dentón, esta vez, con peces de menor tamaño (2 g de peso medio inicial). A estos animales se les suministraron diferentes dietas, obteniéndolos mejores rendimientos en los lotes alimentados con pescado (274 g) y pienso semihúmedo (272.1 g). A los diez meses de edad, los ejemplares alcanzaron una talla de 24 cm y un peso medio de 230 g.

### 2.1.3. ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN DE LARVAS A JUVENILES

#### 2.1.3.1. Fisiología de alimentación en larvas

Una parte de los recientes estudios que buscan incrementar la supervivencia y la viabilidad de las larvas se basan en el conocimiento detallado de la fisiología digestiva en las distintas etapas de la vida larvaria y postlarvaria mediante la determinación de la actividad de las enzimas digestivas. Dicha actividad actúa como buen indicador del estado nutricional de la larva, de manera que los datos obtenidos pueden ser relevantes para establecer el momento más óptimo para realizar el destete (Ueberschär 1993). Otra utilidad es que la información obtenida permite realizar comparaciones con otras especies de interés en acuicultura, evaluando de esta forma el grado de desarrollo e incluso la posibilidad de utilización de dietas artificiales para reducir los costes de producción en las hatcheries.

##### 2.1.3.1.1. Desarrollo del sistema digestivo

Las larvas de peces marinos, a pesar de ser las formas libres más pequeñas de los vertebrados, poseen tasas de crecimiento muy elevadas y una progresiva diferenciación durante la etapa larvaria hasta completar el desarrollo de sus órganos y funciones en las fases juvenil y adulta (Blaxter 1988). Para llevar a cabo estos cambios, la larva debe estar capacitada para ingerir y procesar el alimento. No obstante, el sistema digestivo de las larvas de peces es morfológica, histológica y fisiológicamente menos desarrollado que el de los peces adultos. En la mayoría de los peces marinos el estómago aparece después de iniciar la alimentación exógena y en algunos casos hay desfase entre su aparición y su funcionalidad (Dabrowski 1982, Lauff y Hoffer 1984, Govoni *et al.* 1986).

El periodo embrionario comprende desde la eclosión hasta el inicio de la alimentación exógena. Algunos autores lo consideran hasta la eclosión y denominan fase de prelarva al intervalo comprendido entre ésta y el inicio de la primera alimentación exógena (Balon 1975, Il'Ina y Turetskiy 1988). En las larvas de peces marinos recién eclosionadas el digestivo es un tubo recto y sin diferencias histológicas que descansa dorsalmente sobre la vesícula vitelina y está cerrado por ambos extremos (boca y ano). Tan sólo después de la absorción de las reservas vitelinas se pueden observar varias regiones con diferencias histológicas y funcionales (Govoni *et al.* 1986). La metamorfosis de la larva a juvenil supone el desarrollo del estómago, así como de los ciegos pilóricos intestinales.

En el tubo digestivo de la larva se diferencian tres segmentos: **1)** intestino anterior que comprende entre 60-75% de la longitud, interviene en la degradación de lípidos, **2)** intestino medio en el cual se realiza la absorción de las proteínas y **3)** intestino posterior que representa un 5% de la longitud (sus enterocitos intervienen en procesos de recuperación de agua e iones) Govoni *et al.* (1986).

**Etapas de desarrollo del sistema digestivo:** la caracterización y ontogenia del sistema digestivo en larvas de peces puede describirse en varios estadios (Mourente, 1989).

**1)** Estadio prelarvario (eclosión-apertura de la boca): inicialmente el tracto digestivo es incompleto o embrionario (conexión sólo con el ano), posteriormente se produce una diferenciación de intestino anterior y posterior (formación del esófago que comunica con la boca, inicio de la actividad de pepsina, proteasa alcalina, tripsina y quimiotripsina).

**2)** Inicio de la alimentación exógena: comienza con la absorción del saco vitelino. Además se inicia la diferenciación del estómago (actividad pepsina, proteasa alcalina, tripsina, quimiotripsina y aumento de la amilasa).

**3)** Estadio incipiente de la metamorfosis: se caracteriza por varios eventos como formación de ciegos pilóricos, diferenciación del estómago-intestino (aumento de la actividad pepsina, tripsina, quimiotripsina y descenso de la amilasa).

**4)** Estadio de metamorfosis completa del sistema digestivo: se produce entre las 7-8 semanas. El sistema digestivo está completo y aumenta su actividad péptica.

**Evaluación del desarrollo de la capacidad enzimática digestiva:** el desarrollo de la capacidad enzimática de larvas y alevines puede establecerse mediante el análisis de su actividad (*caracterización bioquímica y electroforética de enzimas*). Esta técnica permite realizar un seguimiento de la evolución ontogénica de las enzimas digestivas a lo largo del desarrollo larvario de cualquier especie cultivada. Los niveles de actividad enzimática están relacionados con la viabilidad de las larvas y con su capacidad de crecimiento, y permiten determinar cuando se deben realizar los cambios alimentación y el momento más adecuado para el destete en distintas especies; además permiten evaluar la capacidad que tienen distintas especies para aprovechar diferentes dietas artificiales (Alarcón y Martínez 1998).

### 2.1.3.1.2. Caracterización del sistema digestivo en peces

El sistema digestivo de los peces puede ser abordado desde diferentes puntos de vista, de tal forma que en conjunto podemos obtener una imagen bastante completa de sus características, funcionamiento y evolución. Desde el punto de vista del desarrollo cronológico encontramos varios periodos de desarrollo en los peces: 1) embrionario, 2) larval, 3) juvenil, 4) adulto y 5) senescente (Balon 1975).

Los tipos de evolución y desarrollo del sistema digestivo tienen que ver mucho con los hábitos de alimentación y la cantidad de reservas acumulada en el huevo:

- 1) Salmónidos y Cíclidos, inician la alimentación exógena con el estómago bien desarrollado y funcional.
- 2) Peces marinos, el estómago aparece después del inicio de la alimentación (en algunos hay desfase entre la aparición y su funcionalidad).
- 3) Ciprínidos y herbívoros, no forman estómago pero presentan un intestino muy largo (Dabrowsky 1982).

Según la estructura y función del sistema digestivo, encontramos varios segmentos: **1)** la boca, captura y tritura el alimento; **2)** el esófago, permite el paso del alimento hacia el estómago; **3)** el estómago, permite la degradación parcial del alimento; **4)** intestino anterior, produce la degradación y absorción de lípidos, constituye el 60-75% de la longitud del intestino; **5)** intestino medio, en el se completa la degradación y absorción de proteínas, representa entre el 25-35% de la longitud del intestino; **6)** intestino posterior, permite la recuperación de agua e iones, su longitud constituye el 5% de la longitud del intestino; y **7)** el ano, expulsa las excreciones del tubo digestivo (Alarcón y Martínez 1998).

Desde el punto de vista de las fases de la asimilación del alimento tenemos: **ingestión** que comprende la búsqueda y captura del alimento y **procesamiento** que incluye la digestión, absorción, metabolismo y excreción del alimento (Alarcón y Martínez 1998).

Existen varios tipos de factores que afectan la duración de los periodos del desarrollo: **ambientales** (temperatura del agua, fotoperíodo) y **nutricionales** (cantidad y calidad del alimento) (Alarcón y Martínez 1998).

El tamaño y la densidad de los huevos influyen ampliamente sobre los procesos ontogénicos de la larva, así: los huevos **demersales**, grandes y pesados, producen un desarrollo acelerado del sistema digestivo larvario. Por el contrario los huevos **pelágicos**, pequeños y flotantes, originan larvas con sistema digestivo poco desarrollado (Alarcón y Martínez 1998).



#### 2.1.4. NUTRICIÓN LARVARIA

Se puede considerar que el ideal de la dieta larvaria es aquella que más se ajuste a la composición del vitelo. El contenido en lípidos y la composición de los huevos de diferentes especies de peces marinos es muy similar, y se parece también a la composición de los copépodos que son la dieta natural de las larvas. La mayoría de los huevos de peces marinos tiene en los fosfolípidos uno de sus principales componentes (10% del peso seco total) seguidos de los triglicéridos (5% del peso seco total). Por tanto una dieta que contenga estas proporciones suministrará las cantidades requeridas de HUFA, fosfolípidos, inositol y colina (Sargent *et al.* 1999 a).

##### 2.1.4.1. Requerimientos energéticos

En la fase previa a la eclosión (nutrición endógena), tanto los nutrientes requeridos para el desarrollo del embrión como la energía necesaria para los procesos metabólicos es suministrada por el vitelo. Aunque la composición del vitelo puede variar, su dinámica de absorción es similar entre las diferentes especies. El vitelo es digerido por el sincitio o un tejido análogo, y luego los nutrientes son transportados hacia los tejidos en desarrollo para la organización somática y las demandas energéticas del metabolismo basal (Heming y Buddington 1988, Watanabe y Kiron 1994). Los carbohidratos son los nutrientes más utilizados como fuente de energía entre la fertilización y la eclosión, aunque también son empleados en menor medida los lípidos y proteínas. Estos dos últimos son los principales componentes catabolizados para obtener energía después de la eclosión (Heming y Buddington 1988, Watanabe y Kiron 1994). Los patrones precisos de utilización de estos componentes del vitelo dependen de la composición particular de cada especie (Heming y Buddington 1988). Cuando las reservas del vitelo han sido completamente agotadas, la capacidad de alimentación exógena ya está desarrollada (estructura bucal y tubo digestivo), y la supervivencia larvaria dependerá entonces de la disponibilidad y calidad del alimento en cantidad suficiente (Rosenthal y Alderdice 1976, Watanabe y Kiron 1994).

##### 2.1.4.2. Requerimientos nutricionales generales

**De Proteínas:** entre los nutrientes contenidos en el huevo, la proteína es el componente más abundante. Se encuentra en el vitelo y provee aminoácidos para el crecimiento tisular y energía para todos los procesos catabólicos (Watanabe y Kiron 1994).

La disminución de la proporción de proteínas (56 a 34 %) suministrada a los reproductores ocasiona reducción del peso, talla, factor de condición y fecundidad absoluta y relativa, así como alteraciones hormonales. También tiene repercusión en la viabilidad de huevos y larvas, al disminuir significativamente la tasa de flotabilidad y eclosión, y la calidad de las reservas (Carrillo 1998).

Los requerimientos de proteína en la dieta suelen ir disminuyendo con la edad/tamaño hasta estabilizarse en los adultos. Este efecto se relaciona con la disminución de la capacidad de síntesis proteica corporal a lo largo del desarrollo, y supone una gradual disminución de la velocidad de crecimiento (Fauconneau and Arnal 1985, Houlihan *et al.* 1986). Por ejemplo, los requerimientos de proteína en dorada varían desde un 50-55% en larvas y alevines, un 45-48% en juveniles hasta un 42% en peces de 80 g (Kissil 1981, Vergara *et al.* 1996, Skalli 2001).

**De Aminoácidos libres (AL):** la importancia de estos componentes en las dietas de las larvas de peces se deduce del hecho de que constituyan el 50% del total de aminoácidos presentes en las larvas y de su alta concentración en el alimento natural (copépodos). Los AL son importantes en el metabolismo aeróbico y en la síntesis de la proteína muscular durante la fase embrionaria y vitelina en especies marinas con huevos pelágicos. La provisión de estas sustancias se establece durante la maduración final del oocito y procede de la hidrólisis de la proteína del vitelo. Posteriormente cuando la larva eclosiona y se produce la reabsorción del vitelo, el nivel de AL desciende drásticamente y debe ser aportado por la dieta exógena (García-Alcazar 2001).

**De Carbohidratos:** los carbohidratos del vitelo (de huevos y larvas) están disponibles en forma libre o como glucoproteínas pero en cantidades relativamente pequeñas. El glucógeno es el carbohidrato primario empleado como fuente de energía en todos los huevos y en los primeros estadios embrionarios de los peces estudiados (Nakagawa 1970, Turner 1979, Cetta y Capuzzo 1982, Vetter *et al.* 1983).

Los carbohidratos son los nutrientes más utilizados entre la fertilización y la eclosión y por tanto se les ha atribuido un papel importante como nutriente en la división celular inicial (Moroz y Luzhin 1976).

Después de la eclosión, disminuye la capacidad de utilizar los carbohidratos como fuente de energía (especialmente en las especies carnívoras como el dentón) en comparación con los lípidos y proteínas (Furuichi y Yone 1980, Murai *et al.* 1980, Hilton y Slinger 1981, Tacon y Cowey 1985). Varios autores (Cowey y Luquet 1983, Kaushik y Gomes 1988) han puesto de manifiesto que la capacidad de los peces para utilizar los carbohidratos es menor que en animales terrestres y que su utilización difiere entre las distintas especies.

En cuanto a los espáridos, los datos disponibles parecen señalar que las especies de esta familia están poco capacitadas para utilizar los carbohidratos de la dieta. Numerosos trabajos realizados en varias especies pusieron de manifiesto la disminución de los coeficientes de digestibilidad aparente de la materia orgánica y de la energía. Esto ocurre, por ejemplo, en dorada al aumentar la concentración de carbohidratos en las dietas (Santinha *et al.* 1996), sin embargo en la lubina (familia Moronidae) parece haber una mejor capacidad digestiva para los carbohidratos (Morales y Oliva-Teles 1995).

**De Vitaminas:** los peces en general no pueden sintetizar vitaminas, por lo que han de suministrarse en la ración, salvo en el caso de la carpa y la tilapia cuya flora intestinal es capaz de sintetizar la vitamina B12 (Lovell 1980).

Los peces normalmente no exhiben síntomas de deficiencia en condiciones naturales. Esto se debe a que los alimentos naturales, que pueden ser limitados en cantidad, generalmente están bien equilibrados con respecto a las vitaminas y otros factores esenciales de crecimiento. Cuando están confinados en condiciones artificiales y se les da de comer dietas suplementarias para obtener un crecimiento rápido, entonces aparecen los problemas nutricionales.

A la hora de formular dietas para peces marinos, es importante tener en cuenta los requerimientos vitamínicos con el objetivo de evitar problemas carenciales como son las afecciones de la visión y el sistema nervioso, reducción de la velocidad de crecimiento, anemia, hemorragias, hígado graso, trastornos del sistema digestivo y aumento de la susceptibilidad a enfermedades patogénicas (García-Alcazar 2001, Skalli 2001).

Se ha encontrado que las **Vitaminas** (especialmente la C y E) poseen propiedades inmunoestimulantes. Deficiencias combinadas de ácido ascórbico y  $\alpha$ -tocoferol, afectan varias funciones del suero y del complemento (capacidad hemolítica y opsónica) y la función fagocítica de los macrófagos del exudado peritoneal (Skalli 2001).

Las **Vitaminas C y E** son particularmente importantes en larvas de peces porque sus reservas experimentan grandes reducciones (hasta del 50% en salmón) en los primeros días de vida. La **Vitamina C** tiene una función antiestrés y su carencia produce malformaciones y la aparición de enfermedades bacterianas. En lubina y rodaballo se ha determinado que 20 mg de ácido ascórbico/kg de dieta son suficientes para obtener larvas con crecimiento y supervivencia normales. La **Vitamina E** actúa principalmente como antioxidante metabólica y evita la oxidación de los fosfolípidos insaturados en las membranas celulares. En larvas de peces marinos, las cuales tienen altos requerimientos de HUFA, necesitan también altos niveles de  $\alpha$ -tocoferol que eviten su peroxidación. Las cantidades suministradas en las dietas larvarias están alrededor de 700 mg/kg (García-Alcazar 2001). Respecto a la **Vitamina A** (en forma de pigmentos carotinoides) presente en diversas presas vivas (*Copepoda*, *Artemia*) ha sido recientemente relacionada con la función visual y la pigmentación de larvas de algunas especies como el lenguado (Ronnestad *et al.* 1998 a y b, Shields *et al.* 1999).

**De minerales:** debido a la interacción activa que existe entre los peces y su entorno (el agua), éstos pueden absorber los minerales disueltos en el agua a través de las membranas branquiales y, en el caso de los peces marinos que beben agua, absorbiéndolos del intestino. Según el NCR (1981), la mayor parte de las necesidades de calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) y algunas de las de hierro ( $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ), magnesio ( $\text{Mg}^{+2}$ ), cobalto ( $\text{Co}^{+2}$ ), potasio ( $\text{K}^{+}$ ), sodio ( $\text{Na}^{+}$ ) y cinc ( $\text{Zn}^{+2}$ ) podrían ser cubiertas a partir del agua.

### 2.1.4.3. Requerimientos de lípidos.

Los tipos de lípidos más importantes en la nutrición animal son los triacilglicéridos (**TAG**) y fosfolípidos (**PL**). Los TAG son triésteres de glicerol con tres ácidos grasos y los PL son ésteres con dos ácidos grasos y un ácido fosfórico, el cual está unido por un enlace diéster con otro alcohol (usualmente etanolamina, colina, serina o inositol). En el ambiente marino, otros tipos de lípidos, las ceras, pueden ser encontrados en grandes cantidades. Estas son ésteres de un ácido graso y un alcohol graso. Los esteroides libres o esterificados también están presentes y juegan un papel particular en la nutrición de crustáceos (Guillaume *et al.* 2001).

Los lípidos suministrados en el alimento de los peces, al igual que en los mamíferos, son vitales para satisfacer los requerimientos de ácidos grasos esenciales (**AGE**), estos son ácidos grasos que no son sintetizados por los organismos y son necesarios tanto para el metabolismo celular (síntesis de prostaglandinas y compuestos similares) como para mantener la integridad y fluidez de las membranas celulares. Los lípidos también sirven como vectores para la absorción intestinal de vitaminas liposolubles y pigmentos carotenoides. Finalmente, los lípidos juegan el principal papel en el aporte de energía, papel que alcanza la mayor importancia en los peces, puesto que la mayoría de ellos digieren mal los carbohidratos complejos (Guillaume *et al.* 2001).

Actualmente se conocen las principales etapas del metabolismo de los lípidos en los peces y muestra similitudes con el de los mamíferos. Sin embargo, la nutrición lipídica en los peces difiere de la de otros vertebrados superiores en algunos aspectos. El ambiente acuático se caracteriza por una gran riqueza en ácidos grasos poliinsaturados (**PUFA**) y en particular en los de cadena larga (con 20 carbonos o más) o **HUFA** (ácidos grasos altamente insaturados). Los HUFA de la serie n-3 (HUFA n-3) son aquellos por los cuales los peces tienen los mayores requerimientos, en contraste con los vertebrados terrestres. Los requerimientos cuantitativos de lípidos en la alimentación de los peces han sido ampliamente estudiados para mejorar tanto la rentabilidad de la producción como la protección del medio ambiente (Guillaume *et al.* 2001).

2.1.4.3.1. Influencia de los lípidos en la alimentación de los reproductores y la calidad de huevos y larvas.

2.1.4.3.2. Requerimientos de ácidos grasos en la dieta

2.1.4.3.2.1. Biosíntesis y conversión de ácidos grasos.

El valor nutritivo de los lípidos se halla determinado por su contenido en ácidos grasos. Algunos ácidos grasos se obtienen por biosíntesis a partir de los productos carbonados más simples del metabolismo energético: anhídrido carbónico en forma de bicarbonato, y ácido acético en forma de acetil-coenzima A (**A-CoA**). Esta biosíntesis tienen lugar en el citosol y conlleva el encadenamiento de átomos de carbono de dos en

dos; los principales ácidos grasos que se obtienen de este modo son los ácidos mirístico (14:0) y palmítico (16:0) (Mellinger 1995).

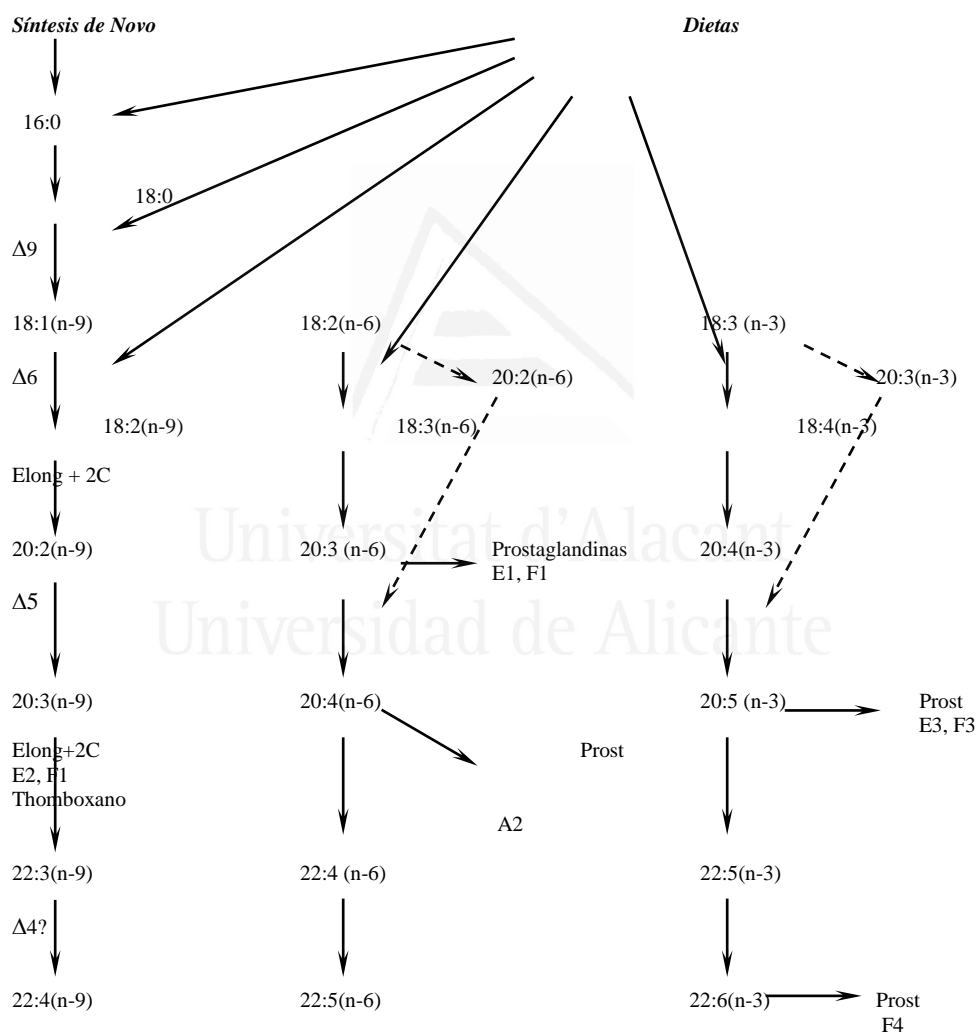
Para producir toda la gama de ácidos grasos necesarios para las células de los diferentes tejidos, otros sistemas enzimáticos proceden al alargamiento de las cadenas hidrocarbonadas hasta llegar a C18, C20 y C22, e incluso a unidades más largas, así como a la inserción de dobles enlaces en las cadenas, proceso denominado desaturación. Estos dos tipos de reacciones tienen una localización preferencial: las reacciones de elongación se producen en las mitocondrias y las reacciones de desaturación en las membranas del retículo endoplasmático. Los ácidos grasos obtenidos se incorporan a los fosfolípidos (**PL**) de membrana y, bajo esta forma, son redistribuidos a todo el sistema de membranas de la célula (Mellinger 1995).

En el sistema de elongación mitocondrial, los grupos acilo son transportados por el grupo **CoA**, mientras que en el citoplasma es una proteína especial, la **ACP** (“AcilCarrier Protein”) la que los transporta. El alargamiento de la cadena se realiza por el extremo –COOH terminal, que contiene el primer átomo de carbono. Las desaturaciones tienen lugar en puntos precisos de la cadena y normalmente dan lugar a una isomería *cis*, que desvía la cadena 30° en cada doble enlace. Las enzimas que provocan estas desaturaciones se llaman desaturasas y son denominadas con la letra griega  $\Delta$  (delta) seguida de una cifra que indica el número de orden del átomo de carbono, contado a partir del extremo –COOH terminal, en el que se produce el doble enlace (Navas-Antón 1997).

Las desaturasas vegetales pueden operar entre el primer doble enlace y los grupos metilo o carboxilo terminal. El primer doble enlace aparece entre los átomos de carbono 9° y 10°; la enzima responsable es una desaturasa  $\Delta 9$  y el principal producto de esta reacción es el ácido oleico (18:1 n-9), aunque también se puede producir el ácido palmitoleico (16:1 n-7). Los dobles enlaces siguientes aparecen por la acción de otras desaturasas. A diferencia de los vegetales, en los tejidos animales sólo se producen desaturaciones a partir del extremo de la cadena correspondiente al grupo carboxilo terminal. Debido a ello sus ácidos grasos forman series distintas (n-9, n-6 y n-3) entre las cuales no hay ninguna conversión posible. En la **Figura4** se muestran los ácidos grasos obtenidos tras las diferentes reacciones de alargamiento y desaturación (Navas-Antón 1997).

Las desaturasas  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$  y  $\Delta 4$  están directamente relacionadas con la formación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, ácidos grasos con tres o más dobles enlaces) de 20 y 22 átomos de carbono a partir de los ácidos grasos 18:3 n-3 (linolénico) y 18:2 n-6 (linoleico). Los ácidos grasos de la serie n-3 tienen una mayor afinidad por la desaturasa  $\Delta 6$  y, probablemente también, por la desaturasa  $\Delta 5$  que sus homólogos de la serie n-6. Debido a la competencia que se establece entre los ácidos grasos de las series n-3 y n-6 por las mismas enzimas es necesario que exista un adecuado balance entre los ácidos 18:2 n-6 y 18:3 n-3, puesto que un exceso de 18:2 n-6 puede ralentizar la desaturación y alargamiento que origina el 18:3 n-3 y viceversa (Sargent *et al.* 1995).

Por otra parte, no hay una evidencia directa de la existencia de una  $\Delta 4$  desaturasa que lleve a cabo los últimos pasos representados en la **Figura 4** (Sargent *et al.* 1995). Se ha demostrado que, en realidad, la reacción que debería llevar a cabo la desaturasa  $\Delta 4$  consiste en una serie de reacciones en las que se halla envuelta la desaturasa  $\Delta 6$  (Voss *et al.* 1991, Sprecher *et al.* 1995). Así, el ácido 20:5 n-3 se alarga primero hasta 22:5 n-3 y, después, hasta 24:5 n-3. Luego la  $\Delta 6$  desaturasa convierte el 24:5 n-3 en 24:6 n-3 que es entonces acortado hasta 22:6 n-3. Todas estas reacciones tienen lugar en los microsomas, excepto la conversión de 24:6 n-3 hasta 22:6 n-3 que tiene lugar en los peroxisomas (Navas-Antón 1997).



**Figura 4.** Diagrama de las principales rutas de bioconversión de los ácidos grasos y prostaglandinas (Bell *et al.* 1986).

Rutas principales:  $\longrightarrow$  , Rutas secundarias  $\dashrightarrow$

#### 2.1.4.3.2.2. Necesidades de ácidos grasos en la dieta

Los peces, al igual que el resto de los animales no poseen las desaturasas  $\Delta 12$  y  $\Delta 13$  necesarias para la formación de los ácidos linoleico (18:2 n-6) y linolénico (18:3 n-3) a partir del ácido oleico 18:1 n-9. Como consecuencia, todos los PUFA de las series n-3 y n-6 presentes en los lípidos de los peces provienen de los PUFA de las series n-3 y n-6 que se han formado en las plantas (Sargent *et al.* 1989). A partir de los ácidos linoleico y linolénico se pueden producir reacciones de elongación y desaturación que permiten la formación de los ácidos grasos de las series n-3 y n-6 con mayor número de átomos de carbono (Sargent *et al.* 1989). Ahora bien, la capacidad para llevar a cabo estas reacciones varía de unas especies a otras. Así, las especies marinas, en general, carecen de las enzimas necesarias para alargar (elongasas) y desaturar (desaturasas  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$  y  $\Delta 4$ ) los ácidos linoleico y linolénico y, como consecuencia, han de poseer en la dieta una fuente de ácidos grasos de 20 y 22 átomos de carbono de las series n-3 y n-6 (Bell *et al.* 1985, 1986). Para confirmar estas cuestiones se realizaron experimentos en rodaballo (Linares y Henderson 1991), dorada (Mourente y Tocher 1993 a) y *Liza aurata* (Mourente y Tocher 1993 b) consistentes en la inyección intraperitoneal de ácidos grasos  $C_{18}$  y  $C_{20}$  de las series n-3 y n-6 marcados radiactivamente con  $^{14}C$  y en el estudio posterior de los ácidos grasos que aparecían marcados radiactivamente en diversos tejidos. Estos estudios han confirmado la limitada capacidad de las especies marinas para sintetizar los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) de  $C_{20}$  y  $C_{22}$  de la serie n-3, ácidos eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) y docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3) y el ácido graso  $C_{20}$  de la serie n-6, ácido araquidónico (ARA, 20:4 n-6). Como resultado estos ácidos grasos han de ser administrados a través de la dieta y resultan ser ácidos grasos esenciales (AGE) para el normal desarrollo de los individuos (Watanabe 1993).

Watanabe and Kiron (1995) recomienda incluir en la dieta niveles de 3% o más de HUFA n-3 sobre el peso seco de la dieta. Sargent y colaboradores recomiendan incluir fosfolípidos marinos (huevos de peces) ricos en HUFA n-3 a niveles del 10% del peso seco de la dieta (Sargent *et al.* 1999b). De todas formas, es importante mencionar que en términos energéticos, la inclusión de altos niveles de HUFA en las dietas puede resultar en una limitante energética para las larvas, ya que estos son sustratos relativamente pobres para los sistemas generadores de energía por vía de oxidación de ácidos grasos. Por lo cual, es necesario un balance adecuado entre ácidos grasos poliinsaturados, monoinsaturados y saturados, y este puede ser obtenido mediante la inclusión de fosfolípidos en las dietas (Sargent *et al.* 1999a y b).

En cuanto a las proporciones requeridas de ácidos grasos esenciales, el requerimiento de DHA es mayor al de EPA debido a su importancia en diversas funciones fisiológicas. Sin embargo, el DHA y el EPA deber ser incluidos en las dietas artificiales en una proporción adecuada para evitar un efecto negativo en los sistemas neurológicos y visuales. Como norma general, la proporción utilizada en la formulación de dietas es de 2:1 (DHA/EPA). Además, puesto que las prostaglandinas y los leucotrienos producidos a

partir de 20:4 n-6 (ARA) tienen mayor actividad biológica que los derivados de 20:5 n-3 (EPA) (Sargent *et al.* 1999 b) es indispensable incluir una proporción adecuada de estos dos AGE. Hasta ahora, esta proporción no ha sido plenamente definida, pero se recomienda la de 1.5:1 (ARA/EPA) (Sargent *et al.* 1997). El aceite de pescado contiene aproximadamente 1% de ARA con respecto a los ácidos grasos totales, lo cual generalmente es considerado suficiente (Sargent *et al.* 1999 b).

#### 2.1.4.3.3. Función de los ácidos grasos en el cultivo larvario

##### 2.1.4.3.3.1. Digestión de lípidos en larvas

Puesto que las larvas tienen un sistema digestivo menos complejo, se puede esperar que tengan una menor eficiencia digestiva que los peces adultos. No obstante, las enzimas digestivas están presentes desde el comienzo de la alimentación externa en muchas especies de peces. Existen investigaciones sobre la digestión de proteínas y carbohidratos pero pocos estudios centrados en las enzimas que digieren las grasas. La actividad lipasa/esterasa fue registrada primeramente en larvas de especies de peces marinos tales como rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Cousin *et al.* 1987) y lubina (Alliot *et al.* 1977).

Varios tipos de lipasas han sido reconocidos en el tracto digestivo de peces juveniles y adultos. Entre ellas, la actividad de las “lipasa activada por sales biliares no específicas” (**BAL**) de las cuales se ha sugerido que juegan un importante papel en la digestión de los lípidos neutros en algunas especies de peces tales como la anchoa (*Engraulis encrasicolus*), salmón rosado (*Onchorhynchus gorbuscha*), tiburón leopardo (*Triakis semifasciata*), trucha arcoiris (*Onchorhynchus mykiss*), bacalao (*Gadus morhua*) y dorada japonesa (*Pagrus major*). Actúan a un pH neutro, en dorada japonesa tiene un rango de 7.7 a 8.3 y su actividad se incrementa con la adición de colato y taurocolato de sodio (Iijima *et al.* 1998). Este tipo de enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces de ester carboxílico, no solamente de los acilglicérols, sino también de las grasas dietarias minoritarias incluyendo ésteres de colesterol (**CE**) y ésteres de vitaminas (Wang y Hartsuck 1993).

Existe también evidencia de la presencia de **MPL** (Lipasa Pancreática de Mamíferos), aislada en trucha arcoiris (Léger *et al.* 1977). También se ha encontrado actividad de la Fosfolipasa A2 (**PLA2**) en varias especies de peces (Izquierdo y Henderson 1998). La PLA2 cataliza la hidrólisis de los enlaces ester de los ácidos grasos en la 2<sup>a</sup> posición de los fosfoacilglicéridos (**PL**) y producen ácidos grasos libres y lisofosfolípidos. Esta enzima cataliza tanto los PL de la dieta como los biliares y es Ca<sup>+2</sup> dependiente (Izquierdo *et al.* 2000). La PLA2 purificada de hepatopáncreas y ciegos pilóricos de dorada japonesa, muestra varias isoformas, se activa en presencia de sales biliares y tiene un rango de pH óptimo de 8 a 9 (Iijima *et al.* 1990 y 1997).

A pesar de los grandes avances en el entendimiento de la digestión de lípidos en peces adultos y juveniles, el conocimiento de las enzimas lipolíticas en las larvas, particularmente el de las enzimas de la digestión luminal de los lípidos de la dietas es



escaso. En larvas de rodaballo se ha encontrado actividad esterasa (a un pH de alrededor de 6.0) (Munilla *et al.* 1993), aumento de actividad lipasa durante el desarrollo inicial (Cousinet *et al.* 1987) y también incremento de actividad lipasa neutra y fosfolipasa con el aumento en peso en los peces muy jóvenes (Izquierdo y Henderson 1998). En larvas de dorada que inician la alimentación no se ha podido demostrar actividad de la PLA2 pero si se ha detectado actividad de lipasa neutra (día 4), también se ha encontrado un aumento significativo de la actividad lipolítica (BAL) con un incremento entre 5 y 8 veces del nivel inicial entre los días 9 y 15 respectivamente (Izquierdo *et al.* 2000). Aunque algunos autores afirman que no existe una carencia generalizada de capacidad digestiva en las larvas que inician la alimentación externa (Segner *et al.* 1993) otros sugieren que las larvas cuentan principalmente con las enzimas digestivas de las presas y consideran que esto es uno de los efectos beneficiosos de la alimentación de larvas con presas vivas en lugar de dietas artificiales (Munilla *et al.* 1993). Varios autores han incluido enzimas en las microdietas con éxito variable en cuanto a crecimiento y supervivencia larvaria. Por ejemplo añadieron enzimas pancreáticas porcinas (incluida la MPL) a lubinas de 20-34 días y lograron mejorar la deposición de lípidos en las larvas, especialmente cuando fueron alimentadas con *Artemia*, aunque no afectó el crecimiento larvario (Kolkovski *et al.* 1997). Suplementando las microdietas de larvas de dorada (21-45 días) con MPL bovino lograron incrementar la absorción pero sólo en peces mayores (32-45 días) (Koven *et al.* 1993). Estos autores sugieren que los niveles de lecitina dietaria fueron insuficientes o que la longitud intestinal es demasiado corta como para incrementar la absorción en los primeros estadios larvarios.

A pesar de que la MPL ha sido detectada en algunas especies, este tipo de enzima no parece ser la principal responsable de la digestión de los lípidos neutros en los peces marinos (Izquierdo *et al.* 2000). Además, los PUFA predominantes en los lípidos marinos y esenciales para los peces marinos son más resistentes a la hidrólisis por MPL. Por otra parte se ha demostrado la especificidad de la BAL de bacalao por los PUFA (Gjellesvik *et al.* 1992). La BAL de peces hidroliza preferencialmente al 20:4n-6 y al 20:5n-3, seguido por el 18:2n-6 y luego por el 18:1n-9 y 22:6n-3 (Iijima *et al.* 1998). Las larvas de dorada muestran un incremento de la actividad lipasa neutra cuando son alimentadas con rotíferos que contenían TG ricos en EPA o DHA en lugar de ácidos grasos monoinsaturados, estos resultados sugieren que el BAL está presente en el sistema digestivo de estas larvas desde el inicio de la alimentación exógena y su activación es regulada por los lípidos dietarios (Iijima *et al.* 1998, Izquierdo *et al.* 2000).

Se han estudiado los patrones de distribución de actividad lipasa a lo largo de varios segmentos del tracto digestivo de peces juveniles y adultos y parecen diferir entre las especies (Koven *et al.* 1994 a, b, Chakrabarti *et al.* 1995, Izquierdo y Henderson 1998). La actividad lipasa neutra está extensamente distribuida a lo largo del tracto digestivo (Chakrabarti *et al.* 1995, Izquierdo *et al.* 1997 c, Izquierdo y Henderson 1998), con una muy baja proporción de la actividad total intestinal en el estómago (Borlongan 1990, Koven *et al.* 1994 b). En bacalao, dorada y pargo se ha encontrado la más alta actividad lipolítica en el intestino anterior (Izquierdo *et al.* 1997 c), mientras que en especies como

el rodaballo la mayor proporción de la actividad lipasa neutra total y fosfolipasa ocurre en la región posterior (Koven *et al.* 1994 b, Izquierdo y Henderson 1998). Estos autores sostienen que el tracto digestivo generalmente corto del rodaballo, con un muy extenso plegamiento de la mucosa, tienen una absorción intestinal significativamente mayor que los peces con intestino más largo, y podría ser responsable de las mayores actividades de la lipasa neutra y fosfolipasa encontradas en el intestino posterior de esta especie. Es interesante que este patrón de distribución de las actividades lipolíticas encontrada en el rodaballo adulto, casi desaparece en los juveniles, sugiriendo una muy baja diferenciación funcional de los diferentes tractos digestivos en los peces jóvenes (Izquierdo y Henderson 1998).

#### 2.1.4.3.3.2. Absorción y transporte de lípidos

La absorción de lípidos en los peces es similar a la de los mamíferos. Después de la hidrólisis intraluminal, las grasas de la dieta es captada en las células epiteliales del intestino mediante difusión de las formas micelares de monoglicéridos y de ácidos grasos. La posterior reasimilación ocurre por dos vías: 1) la ruta de los monoglicéridos en el retículo endoplasmático liso en el cual se sintetizan triglicéridos y 2) la ruta del L- $\alpha$ -glicerofosfato tanto en el retículo rugoso como en el liso en la cual se sintetiza tanto TAG como PL (Sire *et al.* 1981). Los lípidos absorbidos son finalmente descargados en la submucosa como VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad) o partículas semejantes a quilomicrones. La importancia relativa tanto de las vías de reasimilación como de síntesis de lipoproteínas ha sido discutida por muchos autores (Sire *et al.* 1981, Léger *et al.* 1988) y parecen ser afectadas por los lípidos dietarios (Sire y Vernier 1981).

Desde el comienzo de la alimentación exógena las larvas de varias especies parecen ser capaces de absorber lípidos por el epitelio intestinal. Sin embargo la localización específica de los diferentes segmentos del tracto digestivo, en donde ocurre, parece diferir entre las especies. En Coregónidos la absorción está localizada en la parte anterior (Segner *et al.* 1989). En larvas de dorada la absorción se observa a lo largo de todo el intestino prealvular (Izquierdo *et al.* 2000), en lubina la absorción también se produce en el segmento prealvular pero es particularmente marcada en la porción distal (Deplano *et al.* 1991). Esta localización distal permanece a lo largo de todo el desarrollo larvario y ha sido relacionada con la diferenciación incompleta del tracto digestivo, especialmente por la ausencia de un estómago funcional (Deplano *et al.* 1991).

Deplano *et al.* (1991) encontraron que a pesar de la habilidad precoz de las larvas de lubina para absorber lípidos y debido a que al final de la fase lecitotrófica los enterocitos son funcionales pero pobremente desarrollados, sólo una pequeña proporción de los lípidos absorbidos es incorporada dentro de las partículas de lipoproteína, sugiriendo una reducida capacidad de transporte de lípidos: La eficiencia de transporte de lípidos en las larvas parece mejorar desde el día 9 en adelante, cuando hay una clara intensificación de la síntesis de lipoproteínas junto con un incremento de la deposición de glucógeno en el hígado. Deplano *et al.* (1989) sugieren que desde el día 18 hay un mejoramiento de las capacidades

de síntesis y transporte de lipoproteínas semejante al de los adultos, basado en un desarrollo extremo del retículo endoplasmático rugoso y del sistema de Golgi.

Sin embargo, en larvas de lubina alimentadas con dieta artificial, el transporte de lípidos parece reducirse debido al pobre desarrollo del retículo endoplasmático y el sistema de Golgi de los enterocitos (Deplano *et al.* 1991). Se ha sugerido que en algunos peces marinos, el transporte de lípidos de los enterocitos a los hepatocitos en larvas alimentadas con dietas artificiales se incrementa por la suplementación de la dieta con *PL* (Kanazawa 1993 a).

**Efecto de los fosfolípidos dietarios:** en términos generales, la adición de fosfolípidos (*PL*) a las microdietas produce un efecto benéfico sobre el crecimiento y la supervivencia larvaria de varias especies de peces tales como el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceous*) (Kanazawa *et al.* 1983), el ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Kanazawa *et al.* 1985), dorada japonesa (Kanazawa 1993 a) y carpa (Radünz-Neto *et al.* 1994). La *PC* (fosfatidilcolina) y el *PI* (fosfatidilinositol) han sido señalados como los principales componentes de los *PL* responsables de tales efectos, aunque la acción particular de cada tipo de lípido parece ser diferentes: la *PC* parece más efectiva en promover el crecimiento que el *PI* en larvas de lenguado japonés (Kanazawa 1993 b) y carpa mientras que el *PI* parece más efectivo en mejorar la supervivencia y prevención de las deformidades esqueléticas en larvas de carpa (Guerden *et al.* 1995 a y b).

Los *PL* de la dieta también parecen tener un marcado efecto sobre el transporte de lípidos. La alimentación de larvas de dorada con dietas sin la suplementación de lecitina produce acumulación de vacuolas lipídicas en la zona basal de los enterocitos y esteatosis en el tejido hepático. Ambas respuestas son marcadamente reducidas por la adición de 2% de lecitina de soya, denotando un mejoramiento en la actividad de transporte de lípidos en intestino e hígado (Izquierdo *et al.* 2000), lo cual sugiere que los *PL* tienen un papel específico en la síntesis de *VLDL* como en los mamíferos (Fontagné 1996). El mejoramiento de esta síntesis de lipoproteínas es debido principalmente a la *PC* y puede estar relacionado con su predominancia en las lipoproteínas de los peces en comparación con otros *PL* (95% del total de *PL* en las lipoproteínas) y una posible estimulación de la secreción de apoproteínas como ocurre en los mamíferos (Field y Mathur 1995).

A su vez, el mejoramiento del transporte de lípidos por los *PL* puede ser responsable del mejoramiento de la retención encontrada en varias especies. Así, el incremento de los *PL* dietarios mejora la retención de lípidos, particularmente la *PC* y el colesterol (*CHO*), en larvas de quisquilla (Teshima *et al.* 1986), incrementó la incorporación de ácido oleico marcado en la dorada (Koven *et al.* 1993) y mejoró la retención de *PL* y *TG* así como la incorporación del *DHA* en los lípidos polares de las larvas de dorada (Salhi *et al.* 1995 y 1999).

La composición de ácidos grasos de los PL también parece determinar los efectos beneficiosos de esta clase de lípidos. Cuando la PC y el PI contienen PUFA mejora el crecimiento y supervivencia del ayu, mientras que no mejora con la PC de huevos de pollo o dipalmitato (Kanazawa *et al.* 1985). En larvas de lenguado japonés también se ha encontrado que la lecitina de soja es más efectiva en promover el crecimiento que la lecitina de huevos de pollo (Kanazawa 1993 a). En larvas de dorada, disminuye la acumulación de vacuolas lipídicas en la zona basal de los enterocitos cuando la dieta se suplementa con 0.1% de PC (sea esta de calamar o soja). Sin embargo, la PC de calamar fue más eficiente en reducir la esteatosis hepática que la de soja, lo cual sugiere un efecto combinado de la PC y los HUFA n-3 dietarios en promover la utilización hepática de los lípidos. En realidad se ha encontrado que ambos tipos de moléculas promueven la síntesis de lipoproteínas (Izquierdo *et al.* 2000).

**Eficiencia de los PL vs. Los TG dietarios:** los HUFAn-3 dietarios de los PL o de los TG parecen ser más eficientes en prevenir la deficiencia de ácidos grasos esenciales que los ácidos grasos libres (FFA) (Izquierdo 1988, Izquierdo *et al.* 1989 a y b). Estos autores sugieren que además del contenido de ácidos grasos también es importante la forma molecular en la cual son presentados en la dieta para obtener un buen crecimiento y supervivencia de las larvas de peces marinos. Estos hechos han sido corroborados en estudios realizados con larvas de dorada (Izquierdo 1988, Salhi *et al.* 1995). La incorporación entre diferentes ácidos grasos libres también parece diferir, después de alimentar larvas de dorada con PL marinos, se ha observado una mayor incorporación de EPA marcado que de ácido oleico marcado en los PL de las larvas (Salhi *et al.* 1995 y 1999). Esto parece reflejar una mayor afinidad de las enzimas implicadas en la síntesis y transporte de PL por el EPA.

Algunos autores también han sugerido una más rápida digestión y una más efectiva incorporación de los PL con HUFA n-3 en comparación con los TG con HUFA n-3 (Ackman y Ratnayake 1989). Alimentando larvas de dorada con TG y PL marinos (con niveles similares de HUFA n-3) se observó, que las alimentadas con TG marinos mostraban acumulación de vacuolas lipídicas en la zona basal de los enterocitos y esteatosis hepática, denotando una buena absorción de los TG dietarios pero sólo un reducido transporte de lípidos hacia los tejidos periféricos, mientras que en las larvas alimentadas con PL marinos las proporciones relativas de PC y PE (fosfatidiletalonamina) fueron mayores y más ricas en HUFA n-3 (Salhi *et al.* 1999).

Las evidencias enzimáticas, histológicas y bioquímicas sugieren que las larvas de peces marinos son capaces de digerir y absorber efectivamente los TG ricos en HUFAn-3, pero alimentándolas con PL, particularmente si ellos son ricos en HUFA n-3, puede mejorar la digestión PL y especialmente el transporte de lípidos permitiendo una mejor incorporación de HUFA n-3 dentro de los lípidos de membrana de las larvas y promoviendo el crecimiento de los peces (Izquierdo *et al.* 2000).

### 3.1.4.3.3. Metabolismo y utilización de ácidos grasos

#### 2.1.4.3.3.3.1. Requerimientos cuantitativos de AGE

Los huevos de los peces marinos se caracterizan por altos contenidos en DHA y EPA entre los otros ácidos grasos, los cuales son retenidos a lo largo del desarrollo embrionario, particularmente el DHA, sugiriendo la importancia de estos HUFA en el desarrollo embrionario (Lie 1993, Rainuzzo *et al.* 1993). El ARA, el EPA y, especialmente el DHA son también preferencialmente retenidos en los lípidos larvarios a expensas de otros ácidos grasos durante los periodos de ayuno (Tandler *et al.* 1989), permitiendo la preservación de valiosos componentes esenciales de las membranas biológicas durante tales periodos críticos. En juveniles, la deficiencia en los HUFA n-3 retrasa el crecimiento de los peces, induce mortalidad y reduce la resistencia al estrés (Izquierdo 1996, Montero *et al.* 1998). Adicionalmente, estas deficiencias han sido asociadas con algunas alteraciones anatómicas tales como hipomelanosis del lado ocular de los peces planos (Kanazawa 1993 b), disgregación del epitelio branquial y edema. Estos signos también parecen estar conjuntamente asociados a deficiencias de vitaminas liposolubles o contenidos de PL en las dietas (Izquierdo 1996). Basándose en estos efectos, se han determinado los niveles dietarios óptimos de HUFA n-3 para las larvas de varias especies, y difieren en un rango entre 0.3 y 39 g/kg. El DHA parece tener una mayor eficiencia como ácido graso esencial que el EPA (Watanabe *et al.* 1989, Watanabe 1993), y es particularmente acumulado en los nervios olfatorios, retina y sistema nervioso central (Sargent *et al.* 1993).

Recientes estudios han demostrado la importancia del ARA dietario en las larvas de algunas especies de peces marinos. El mayor crecimiento encontrado en juveniles de rodaballo, alimentados con vitelo de huevos de pollo, se ha relacionado con su mayor contenido de ARA (Castell *et al.* 1994). En larvas de dorada, el ARA dietario parece ser importante en el aumento de la supervivencia (elevando el nivel de ARA de 0.1 a 1.0%), pero no es tan eficiente en mejorar el crecimiento como el DHA o el EPA (Bessonart *et al.* 1999). El aumento de los niveles dietarios de ARA incrementa el total de lípidos y los lípidos polares de las larvas, particularmente la PC, así como la incorporación del ARA en los lípidos neutros y PL. El ARA parece también jugar un importante papel en la pigmentación de peces planos (Estévez *et al.* 1997).

#### 2.1.4.3.3.3.2. Proporciones entre los AGE e interacciones competitivas

Además de un requerimiento mínimo dietario para cada ácido graso esencial, las proporciones relativas entre los diferentes PUFA en los tejidos de las larvas parecen estar relacionadas con la mejora en las tasas de crecimiento. Y la existencia de diferentes tipos de interacciones competitivas entre los ácidos grasos implica la necesidad de controlar tanto las proporciones dietarias como las cantidades absolutas.

**Competencia en la digestión de los AGE:** en adultos de dorada japonesa la competencia entre ARA, EPA y DHA se establece ya desde el proceso de digestión, puesto que la BAL ha mostrado tener una mayor afinidad por la EPA o por el ARA que por el DHA esterificados de los lípidos neutros dietarios (Iijima *et al.* 1998).

**Competencia en la síntesis de fosfolípidos:** puesto que las acilasas y transacilasas que esterifican los ácidos grasos dentro de los diferentes fosfoacilglicéridos (PL) tienen preferencias por algunos ácidos grasos, es obvio que se establezca competencia entre ellos. Por ejemplo, la afinidad de la PC y, especialmente, la PE sintetizadas por el DHA, particularmente en la 2ª posición de los PL parece ser muy fuerte. Por una parte, la elevación del DHA en las dietas de la dorada de 0.7 a 2.6% con un nivel constante de EPA (0.7%), incrementó el contenido de DHA en la 2ª posición de la PC y la PE larvarios, mientras que sólo inhibió la incorporación del EPA dentro de la 2ª posición de la PE y no en otros lípidos, siendo mejorado significativamente el crecimiento larvario. De otra parte, la elevación de los niveles dietarios de EPA de 0.3 a 1.1%, con niveles constantes de DHA y ARA (0.7 y 0.06% respectivamente), no es capaz de desplazar el DHA de estas clases de lípidos en las larvas de dorada. Por el contrario, mejora la incorporación de DHA en la 2ª posición de la PC y el PE, mientras que el EPA se incremento en la PC pero decreció igualmente en la PE, el crecimiento larvario fue sólo ligeramente mejorado. Una elevación adicional del EPA dietario a 1.7% con niveles constantes de DHA y ARA de 1.1 y 0.7% respectivamente (1 - 0.5 DHA/EPA) tiene un efecto deletéreo, desplaza el DHA de la 2ª posición de la PC e incrementa el EPA en la 2ª posición de la PE, y reduce el crecimiento. También se han encontrado efectos deletéreos del EPA en el stripedjack, al incrementar el EPA dietario de 0.8 a 1.7 % (sin DHA) se produce una reducción significativa del crecimiento aunque la supervivencia fue muy similar entre las larvas alimentadas con cualquiera de los dos niveles (Takeuchi *et al.* 1992). Lo anterior sugiere la importancia de una proporción balanceada entre los ácidos grasos de 20 y 22 C.

La elevación del ARA dietario de 0.1 a 1.5% (DHA: 1.2%; EPA: 0.7%) no desplazó el DHA y el EPA de los PL larvarios, sino que por el contrario incrementó la incorporación de los tres ácidos grasos dentro de la 2ª posición de la PC y la PE. Hay que notar que los niveles de EPA en estos lípidos fueron siempre mayores que los del ARA, a pesar de los bajos niveles dietarios de EPA, demostrando la incorporación preferencial del EPA en la PC y la PE (Izquierdo *et al.* 2000). En larvas de lenguado japonés también se ha encontrado incremento en la incorporación del EPA al incrementar el nivel de ARA dietario (Estévez *et al.* 1997).

**Competencia en la Síntesis de eicosanoides:** ocurre entre el ARA y el EPA, ya que tanto el ARA como el EPA son sustratos adecuados para las lipoxigenasas en la producción de leucotrienos de las series 4 y 5 respectivamente, y para las cicloxigenasas en la producción de prostanoïdes de las series 2 y 3 respectivamente. Las lipoxigenasas parecen tener una alta afinidad por el EPA mientras que el ARA es el sustrato preferido para las cicloxigenasas, los niveles relativos de ambos ácidos grasos en el PI de los diferentes tejidos regulan la síntesis proporcional de cada serie (Hwang 1989). Los productos de cada ácido

graso tienen diferentes actividades fisiológicas y a su turno compiten entre ellos por los receptores celulares.

**Competencia en la biosíntesis de ácidos grasos:** este tipo de competencia ocurre básicamente en los peces de agua dulce y tiene poca importancia en los peces marinos ya que estos requieren HUFA preformados que son adquiridos en la dieta (Sargent *et al.* 1999 a y b). Finalmente, la competencia entre los HUFA por la incorporación dentro de diferentes tipos de lípidos probablemente puede mostrar diferencias entre cada tejido puesto que la composición de ácidos grasos de cada clase de lípido difiere marcadamente entre los tipos celulares (Lie *et al.* 1992).

#### 2.1.4.3.4. Diseño de dietas larvarias

Sargent *et al.* (1999 a y b) proponen una dieta compatible con las diferentes investigaciones efectuada sobre nutrición de lípidos (**Tabla 6**), abarca los hallazgos sobre niveles y proporciones de DHA, EPA y ARA, y requerimientos de inositol y colina (la dieta no considera la energía contenida y está basada en huevos de bacalao). Representa la dieta natural de los embriones en desarrollo, de las larvas con saco vitelino, y también es semejante a la dieta natural de las larvas y postlarvas de vida libre.

**Tabla 6.** Dieta para larvas que suple los requerimientos de lípidos.

<b>CANTIDADES DE AGE, INOSITOL Y COLINA EN UNA DIETA QUE CONTIENE 10% DE SU PESO SECO COMO FOSFOLÍPIDOS MARINOS <sup>a</sup> (PL)</b>
100 g de peso seco de la dieta contienen 10.0 g de fosfolípidos totales (PL)
10.0 g de fosfolípidos contienen 0.42 g Fosfatidilinositol
0.42 g de fosfatidilinositol contienen 72 mg de inositol <sup>b</sup>
10.0 g de fosfolípidos totales contienen 6.34 g Fosfatidilcolina
6.34 g fosfatidilcolina contienen 624 mg de colina <sup>c</sup>
10.0 g de fosfolípidos totales contienen 1740 mg DHA y 949 mg EPA (2699) mg de HUFA n-3 y 118 mg de ARA <sup>d</sup>
Proporción de DHA/EPA/ARA en la dieta es de 183:100:12 <sup>e</sup>
Proporción de HUFA n-3/HUFA n-6 es de 24:1

a. Los fosfolípidos marinos son los PL de huevos de bacalao (Tocher y Sargent 1984); b. El valor para salmón es de 30- 40 mg/100 g de dieta (Halver 1989); c. El valor para salmón es de 60-80 mg/100 g de dieta (Halver 1989); d. El valor para rodaballo es de 800-1300 mg/100 g de dieta (Gatesoupe *et al.* 1977, Le Milenaire *et al.* 1983); e. El ARA puede ser incrementado hasta el doble en larvas de rodaballo, sin efectos deletéreos (Sargent 1999 a y b).



Sargent *et al.* (1999 a y b) plantean que la suplementación actual de los nauplios con aceites de pescado comerciales no es satisfactoria puesto que sólo alcanzan niveles moderados de HUFA n-3 (tal vez con la excepción del uso de aceite de globos oculares de atún), y por lo tanto el énfasis en futuras investigaciones debería ponerse en la utilización de preparaciones purificadas de DHA, EPA y ARA preferiblemente en forma de triacilglicéridos. Con tal fin, ahora están disponibles cultivos de células especializadas en la producción de aceites de triglicéridos: a) el dinoflagelado heterotrófico *Cryptocodinium cohnii* contiene fosfolípidos con DHA como único HUFA, b) ciertas algas verdes contienen sólo EPA, y c) el hongo *Mortierella* sp. contiene sólo ARA. Además también es posible sintetizar bioquímica o químicamente los fosfolípidos ricos en HUFA n-3 mediante reacciones de trans e inter-esterificación, y estos procesos pueden hacerse crecientemente competitivos en la medida en que sean demandados.

#### 2.1.4.3.5. Requerimientos de HUFA en larvas de dentón

En el dentón, al igual que en otros peces marinos, se ha encontrado una fuerte correlación entre el contenido de HUFA suministrado en la dieta, y el crecimiento y la supervivencia entre las fases larvaria y juvenil. Por ejemplo, se puede señalar que la composición en ácidos grasos de las larvas de dentón está fuertemente influenciada por el contenido en ácidos grasos de la *Artemia* enriquecida suministrada en la dieta. Con respecto a la tasa de crecimiento, el enriquecimiento de *Artemia* con HUFA n-3 está positivamente interrelacionado con el crecimiento en talla y peso de las larvas de dentón (Mourente *et al.* 1999).

**Niveles óptimos de HUFA:** las larvas de dentón alimentadas con *Artemia* enriquecida con niveles supraóptimos de n-3 HUFA mostraron niveles significativamente bajos de contenidos de Vitamina E y altos niveles de *MDA* (Malondialdehído; un producto de la peroxidación de los HUFA n-3) indicando un incremento en el estrés oxidativo y bajo desempeño en crecimiento y supervivencia. Lo anterior indicaría, tanto en el dentón como en otras especies de peces marinos, que existe la necesidad de un balance entre las cualidades como promotores del crecimiento de los ácidos grasos esenciales (AGE) y sus cualidades potenciales como inhibidores del crecimiento (de sus formas pro-oxidantes), lo cual podría ser prevenido o compensado con un uso adecuado de antioxidantes en la dieta (p.e. Vitaminas E y C) (Mourente *et al.* 1999).

### 2.1.5. TECNOLOGÍA DE ALIMENTACIÓN EN LARVAS Y ALEVINES

#### 2.1.5.1. Cultivos auxiliares

La cría y el mantenimiento de las larvas de los peces en cautividad conllevan la necesidad de suministrarles su alimento natural el fito y zooplancton. Dado que se requiere una disponibilidad constante y en cantidades suficientes de alimento vivo es necesario producirlo en el laboratorio. Lamentablemente, las especies de las cuales suelen

alimentarse las larvas y alevines en el medio natural presentan gran diversidad y muchas dificultades para ser cultivadas en forma masiva, como es el caso de los *Copépodos*, por lo cual son reemplazadas con especies de plancton fácilmente cultivables y manipulables en el laboratorio o en condiciones de confinamiento. Estos cultivos auxiliares son básicamente monocultivos de fitoplancton (varias especies de microalgas), del rotífero *Brachionus plicatilis* y estadíos larvarios del crustáceo branquiópodo anóstraceo *Artemia sp.* (Mourente 1989, Navarro-Tárrega 1999).

Para el cultivo de nuevas especies es conveniente utilizar el método de producción semi-extensiva (Mesocosmos) que podría describirse como un híbrido entre los ecosistemas naturales complejos y los artificiales simplificados, utiliza grandes volúmenes (30-100 m<sup>3</sup>) de agua de mar filtrada a través de una simple red de plancton (250-350 µm). El método está basado en la proliferación de una cadena pelágica de alimentos de origen silvestre la cual está asociada con tres características: 1) una ligera tonalidad verdosa del medio con diversidad de poblaciones sucesivas de fitoplancton (principalmente diatomeas, picoplancton, flagelados y dinoflagelados, 2) una sucesión característica de poblaciones zooplanctónicas asociadas, y 3) además una población béntica inducida por la fijación de larvas meroplanctónicas transportadas por el agua. Además, una baja tasa de renovación de agua (1-3%/día) que permite reponer nutrientes en el tanque. Esta metodología es considerada como la mejor para la larvicultura de todas las especies nuevas y las dificultosas. Las condiciones que brinda este medio permite obtener larvas y juveniles de mejor calidad (ausencia de deformaciones óseas, mejores índices de supervivencia, baja tasa de mortalidad, resistencia al estrés) (Divanach *et al.* 1996, Divanach y Kentouri 2000).

#### 2.1.5.1.1. Fitoplancton

El primer eslabón de la cadena trófica es el fitoplancton. Se suele emplear para alimentar al resto de componentes de la cadena artificial, incluyendo las larvas que precisen presas de un tamaño comprendido entre 20-80 µm (peces herbívoros, moluscos y crustáceos). Existen pruebas de que la utilización de fitoplancton en los tanques de cultivo larvario (técnica del agua verde) permiten obtener mayores tasas de supervivencia y crecimiento en larvas de peces marinos, además de que se producen interacciones simbióticas entre algas y bacterias que podrían incrementar o mantener su valor nutritivo, funcionando como probióticos y/o previniendo la proliferación de agentes patógenos (Esteban *et al.* 1999, Planas y Cunha 1999). Reitan *et al.* (1993) encontraron que los rotíferos que permanecían por un tiempo de 2-6 días en tanques con aguas verdes mantuvieron los niveles iniciales de lípidos, sin embargo los rotíferos de los tanques con aguas claras (enriquecidos con emulsiones) pierden alrededor del 20% de los lípidos cada día (Planas y Cunha 1999).

#### 2.1.5.1.1.1. Efectos nutricionales de las algas sobre los cultivos

Las microalgas administradas a los tanques de cultivo larvario actúan como alimento tanto para las presas vivas suministradas como para las propias larvas de los peces. Sus efectos positivos en los tanques pueden ser sintetizados de la siguiente manera: a) modifican y estabilizan las cualidades nutricionales de los rotíferos, b) probablemente, modifican favorablemente la flora bacteriana del agua y la flora intestinal del rotífero. También producen efectos positivos sobre los propios estadios juveniles de los peces: a) activan los procesos digestivos de las larvas, b) contribuyen al establecimiento de la primera flora intestinal, c) incrementan el apetito de las larvas y, d) modifican la luminosidad del medio (tanques). Estos efectos se traducen en un incremento de la supervivencia y crecimiento larvarios y la calidad de los alevines (Reitan *et al.* 1997).

#### 2.1.5.1.1.2. Métodos de producción de microalgas marinas

El uso de diferentes técnicas de cultivo de microalgas, induce importantes variaciones en la composición final y la calidad de los cultivos, y por tanto estos presentarán diferencias importantes en la calidad nutritiva del alimento ofrecido a rotíferos, *Artemia* o larvas. Además, cuando se cultivan masivamente las microalgas, se suelen presentar diferencias en la composición bioquímica (carbohidratos, proteínas y lípidos) entre las especies, así como entre las diferentes fases de cultivo. Se debe tener en cuenta que las especies seleccionadas suelen ser aquellas que tengan un equilibrio entre la composición de ácidos grasos y proteínas, y deben ser cosechadas cada una en el estado apropiado de crecimiento (Fernández-Reiriz 1989). La composición bioquímica de las microalgas puede ser alterada fácilmente cambiando las condiciones de cultivo aunque los efectos varían de una especie a otra. Por lo tanto es posible optimizar los niveles de nutrientes específicos mediante la alteración de las condiciones ambientales del cultivo (Brown *et al.* 1997).

Los cambios en la composición bioquímica de un cultivo durante las diferentes fases de crecimiento pueden ser condicionados por el agotamiento simultaneo de los nutrientes, (Antia 1963, Myklestand – Hung 1972), y por una progresiva acumulación de metabolitos en el medio. Se pueden observar variaciones en la relación carbohidratos/Proteínas con respecto a la edad del cultivo, y estas pueden ser evaluadas mediante la relación C/N, la cual es una expresión de la variación del contenido relativo de carbohidratos/proteínas en los cultivos de microalgas a través del tiempo. El incremento en la relación C/N indica que el agotamiento de nitratos puede ser la principal causa del decrecimiento relativo en la síntesis de proteínas y el incremento en la síntesis de productos de almacenamiento (Moal *et al.* 1978, Yul-Rhee 1978, Piorreck *et al.* 1984, Wikfors *et al.* 1984, Gang *et al.* 1986, Whyte 1987).

La eficiencia total de un cultivo puede ser también notablemente diferente en relación con las técnicas de cultivo utilizadas: la producción diaria de células en un cultivo continuo o semicontinuo es generalmente mayor que la producción obtenida en cultivo por

ciclos (lotes). El incremento en la producción de células no está siempre relacionado con el incremento en cada uno de los componentes bioquímicos, y por esto las técnicas de cultivo son un factor importante en la obtención de una fuente adecuada de alimentos (Fernández-Reiriz 1989).

El valor nutricional de las microalgas depende, en una buena proporción, de su composición en ácidos grasos. En las microalgas, los ácidos grasos saturados y monoinsaturados representan entre el 70 y 100% del total, siendo los ácidos grasos saturados los más abundantes. En cuanto a los ácidos grasos poliinsaturados, están presentes en muy pequeñas cantidades excepto en el caso de las *Diatomeas* y las *Rhodomonas* en las cuales se alcanzan niveles entre 6 – 30% sobre el total de ácidos grasos.

Los ácidos grasos poliinsaturados y especialmente de los HUFA n-3 son de gran importancia para los organismos marinos, y por tanto es necesario incorporarlos en su dieta (Langdon 1980, Langdon y Waldock 1981, Webb y Chu 1982). Por tal razón se deben utilizar especies de microalgas que contengan niveles adecuados de ácidos grasos poliinsaturados, tales como *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis suecica* y *Rhodomonas sp.* También son importantes las proporciones existentes entre los diferentes grupos de ácidos grasos, la relación n-3/n-6 es óptima alrededor de 2/1 a 3/1 (Webb y Chu 1982) y de igual forma especies como *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* y *Rhodomonas sp.* rondan dichas proporciones. Las *Rhodomonas* no suelen ser usadas como alimento para organismos marinos, sin embargo tienen altos porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados (especialmente durante su fase exponencial, 10-12%) y pueden ser consideradas como especies potencialmente aprovechables. (Fernández-Reiriz 1989).

Algunos autores (Brown *et al.* 1997) señalan que dado que las microalgas suelen tener limitaciones en uno o más nutrientes esenciales, deberían establecerse dietas con mezclas de algas para proveer un mejor balance de nutrientes.

#### 2.1.5.1.2. Zooplancton

##### 2.1.5.1.2.1. Alimentación de larvas con presas vivas

Durante las etapas iniciales de vida, las larvas de los peces marinos cultivados dependen casi exclusivamente del aporte de alimento vivo. El primer alimento que se les suministre debe tener una proporción adecuada al tamaño de la boca, a su gran selectividad trófica y a la capacidad de captura de las larvas (talla inferior a 400  $\mu\text{m}$ , flotabilidad, movilidad y color adecuados, y facilidad de cultivo masivo).

Bajo los anteriores criterios se han seleccionado algunos invertebrados acuáticos, el más utilizado en la actualidad es el rotífero *Brachionus plicatilis* (*B. plicatilis*). Fue introducido por Okanamoto (1969) en el cultivo de dorada japonesa. En los primeros días de alimentación de las larvas suelen utilizarse sucesivamente las cepas S(100-210  $\mu\text{m}$ ) y L (130-340  $\mu\text{m}$ ) del rotífero *B. plicatilis* (Dhert 1996, Van Stappen 1996).

A partir de las 2-3 semanas de edad, se utilizan los nauplios de *Artemia sp.* (400-600  $\mu\text{m}$ ). La *Artemia* (tercer eslabón de los cultivos auxiliares) es un crustáceo branquiópodo anostráceo que nada activamente. Debido a que este organismo presenta muchas dificultades para su reproducción masiva en el laboratorio, suele adquirirse en forma de cistes (huevos enquistados de 200-300  $\mu\text{m}$ ) lo cual hace elevar en mucho el costo de producción de las hatcheries.

El factor determinante del valor nutritivo de los nauplios de *Artemia* y de los rotíferos como alimento para las larvas de peces y crustáceos, es la presencia de ácidos grasos esenciales (AGE), especialmente del linoleico (18:2 n-6), linolénico (18:3 n-3), eicosapentaenoico (20:5 n-3) y docosahexaenoico (22:6 n-3), y de las proporciones relativas de ácidos grasos n-3/n-6. No obstante, se suelen presentar muchas variaciones en la calidad nutritiva y costo de los nauplios de *Artemia* según el lugar de procedencia de los mismos, los de origen marino suelen tener mayor valor nutritivo que los de origen continental (Amat-Domènec 1993, Dhert 1996, Van Stappen 1996). Además, ni *B. plicatilis* ni *Artemia* tienen origen evolutivo en el medio marino, pues proceden, por ecología y filogenia, de medios dulceacuícolas y mixohalinos, debido a esto carecen de los HUFA de cadena larga esenciales para los organismos marinos, especialmente del 22:6 n-3. Sin embargo, actualmente se realiza el enriquecimiento de los rotíferos y de los nauplios de *Artemia* y con las sustancias de las que carecen (principalmente AGE), las cuales son necesarias para la correcta nutrición de las larvas cultivadas. Este ha resultado ser un método eficaz de superar los cuadros patológicos producidos por las carencias nutritivas de las presas vivas utilizadas y ha permitido un avance en la larvicultura actual (Navarro-Tárrega *et al.* 1999).

## 2.1.5.1.2.2. Composición del alimento vivo

En la Tabla 7, se describe la composición general del rotífero (*B. plicatilis*) y de *Artemia* que se usan normalmente como alimento vivo para la mayoría de las especies de larvas de peces.

**Tabla 7.** Composición general de Rotífero y Artemia

Composición	Rotífero	<i>Artemia</i> (cistes)	<i>Artemia</i> (nauplios)
<b>Aminoácidos</b>			
Isoleucina	4.1	---	3.8
Leucina	7.8	---	8.9
Metionina	1.2	---	1.3
Cisteina	1.6	---	0.6
Fenilalanina	5.0	---	4.7
Tirosina	4.4	---	5.4
Treonina	4.6	---	2.5
Triptofano	1.8	---	1.5
Valina	5.2	---	4.7
Lisina	8.5	---	8.9
Arginina	6.6	---	7.3
Histidina	2.1	---	1.9
Alanina	4.7	---	6.0
Ácido Aspártico	11.0	---	11.0
Ácido Glutámico	13.0	---	12.9
Glicina	4.3	---	5.0
Prolina	8.7	---	6.9
Serina	5.5	---	6.7
<b>Lípidos totales</b>	24.1±	7.2±2.4	19.4±3.0
18:2n-6	3.4 – 19.3	2.5 – 11.8	5.1 – 8.2
18:3n-3	0.1 – 10.2	2.3 – 28.1	2.8 – 17.9
20:4n-6 (ARA)	Trazas	---	0.86
20:5n-3 (EPA)	1.0 – 27.7	0.6 – 13.2	2.3 – 15.2
22:6n-3 (DHA)	0 – 1.0	Trazas	0.7 – 3.6
<b>Proteínas totales</b>	66.7±4.3	51.1±2.8	61.6±4.6
<b>Carbohidratos</b>	Trazas	---	11
<b>Cenizas</b>	4.3±0.8	11.5±3.8	10.1±2.3

Esta tabla que señala perfiles de aminoácidos, perfiles de AGE y composición general (en peso seco), fue adaptada de Amat-Domènech (1993), Watanabe y Kiron (1994) y Van Stappen (1996).

#### 2.1.5.2. Dietas con alimento inerte

Al final del periodo larvario – postlarvario (comienzo del alevinaje) se inicia el “destete” que es el proceso mediante el cual se van sustituyendo presas vivas por piensos (0.2-1 mm). Este alimento debe adecuarse a los requerimientos nutricionales y fisiológicos de los peces que inician su alimentación exógena. Las dietas artificiales ofrecen varias ventajas frente al alimento vivo: fácil disponibilidad, más bajos costos de producción, mayor flexibilidad en las fórmulas y la posibilidad de adelantar el destete. Sin embargo, esta sustitución ha tenido un éxito parcial, tanto en el número de especies a las que se aplica como en la supervivencia obtenida. (Amat-Domènec 1993, Dhert 1996, Van Stappen 1996).

Se pueden diferenciar dos tipos de alimentos artificiales: **microdietas** (preparados con un tamaño de partícula heterogéneo, no se pueden suministrar durante las primeras fases larvarias, su uso se limita a las fases intermedias del cultivo, especialmente al destete), y **dietas microencapsuladas** (tamaño adecuado de partícula para las larvas, composición homogénea, sustitutos potenciales de los cultivos auxiliares). No obstante las microcápsulas presenta algunas limitaciones que deben ser solucionadas o atenuadas: equilibrio nutritivo de la fórmula para una especie determinada, homogeneidad y tamaño de partícula adecuada, densidad de partículas en los tanques, estabilidad en el agua, solubilidad y digestibilidad, palatabilidad, y estabilidad en el envasado y almacenado (Alarcón y Martínez 1998)

#### 2.1.5.3. Método de coalimentación (cofeeding)

La alimentación simultánea (“co-feeding”) con dietas artificiales y con presas vivas, hace aumentar la ingestión y asimilación de las primeras. La explicación de este fenómeno estudiado en dorada de 22 días (“coalimentadas” con *Artemia* o sus extractos y dietas artificiales) puede atribuirse a: 1) la estimulación de la actividad alimentaria por estímulos visuales o químicos, 2) la influencia de la composición bioquímica de los nauplios en la digestión y asimilación y 3) la acción de factores tanto sobre la actividad como sobre la digestión y asimilación (García-Alcázar 2001).

#### 2.1.5.4. Tasas y ritmos de alimentación

Uno de los objetivos primordiales de la alimentación y nutrición de los peces es el establecimiento de raciones equilibradas que cumplan con las funciones biológicas y fisiológicas, relacionadas principalmente con la reproducción, crecimiento, osmoregulación, natación, etc.

Es primordial saber que las diferencias fisiológicas entre los vertebrados terrestres y los acuáticos condicionan sus requerimientos energéticos y sus ritmos alimentarios: 1) los peces por ser heterotermos tienen menores requerimientos energéticos; 2) requieren

menor cantidad de energía para mantener su cuerpo en contra de la gravedad y 3) excretan el nitrógeno en forma de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y no como moléculas complejas (urea) lo cual les permite ahorro de energía.

La energía es el producto final de los nutrientes absorbidos por el animal, cuando se metabolizan y se oxidan. Los componentes orgánicos de una dieta para peces son considerados fuentes potenciales de energía. Desde el punto de vista fisiológico, los lípidos y las proteínas constituyen un componente importante de la estructura de un pez, si bien, la necesidad de energía calorífica puede evitar su incorporación a los tejidos y obligar a su catabolismo, siendo usadas como fuente energética. Por tanto, el nivel de ingesta de la dieta, junto con la composición de la misma, condiciona la utilización de la energía y los nutrientes de cada dieta (Madrid y Zamora 1995).

La existencia de ritmos biológicos en la ingesta y metabolismo de los peces justifica el que se les considere como un sistema funcional distinto en diferentes momentos del día, del mes o del año. De tal manera que los peces responderán ante el mismo alimento de diferente manera dependiendo de la fase del ciclo en la que se administre. Así, la cantidad de alimento ingerido, el aprovechamiento nutritivo de la dieta e incluso la composición corporal van a depender en gran medida del momento del día en el que tiene lugar la alimentación. Los ritmos biológicos naturales imponen un condicionante a la hora de elegir la estrategia de alimentación más adecuada para la obtención de los mejores rendimientos del alimento. La utilización de alimentadores a demanda permite una correcta regulación de la ingesta por parte del pez. Sin embargo, para evitar los problemas que genera la alimentación a demanda indiscriminada, es necesario incorporar un control informatizado que evite la sobrealimentación y mejoren la utilización del alimento (Madrid y Zamora 1995).

Los ritmos de alimentación de los peces parecen ser el resultado de un efecto directo inducido por la alternancia luz-oscuridad (control exógeno) junto con una aportación endógena generada por relojes biológicos internos que periódicamente activan el comportamiento trófico. La importancia del primer componente ha sido ampliamente demostrada, sin embargo, la existencia de componentes endógenos, circadianos, en el patrón de alimentación de los peces cuenta con muy pocos resultados que lo avalen. Hasta el momento, sólo la trucha (Cuenca y De La Higuera 1994), la lubina (Sánchez-Vázquez *et al.* 1994) y *Ictalurus nebulosus* (Eriksson y Van Veen 1980) han mostrado poseer un ritmo endógeno de actividad alimentaria (Madrid y Zamora 1995).

#### 2.1.5.5. Secuencias y estrategias de alimentación

##### 2.1.5.5.1. Secuencia de alimentación

En términos generales, la alimentación larvaria en acuicultura suele comenzar con el suministro secuencial de varios tipos de alimento vivo, posteriormente van siendo remplazados paulatinamente por alimento inerte un proceso denominado destete. Sin



embargo la secuencia que se debe utilizar en cada caso en particular depende de factores tales como la especie, método y temperatura de incubación, y tecnología de cultivo larvario empleada (Watanabe y Kiron 1994).

A medida que las larvas crecen, también lo hace la abertura bucal, por lo que el tamaño de las presas debe incrementarse paulatinamente con la edad, con el fin de adecuar ambos parámetros. Se debe tener en cuenta que las presas suministradas deben tener un tamaño similar al 40% de la abertura bucal de las larvas para que puedan ser ingeridas.

La primera presa que se suele suministrar es el rotífero *Brachionus sp.*, se empieza a introducir en los tanques de cría uno o dos días antes de la apertura de la boca de la larva. Es conveniente suministra inicialmente la cepa enana (S ó *B. rotundiformis*; <100 m $\mu$ ), posteriormente se pasa a una cepa mayor (L ó *B. plicatilis*). Los rotíferos se suministran vivos, la concentración de rotífero en los tanques de cultivo larvario oscila entre 5 y 10 rotíferos/ml.

Entre la segunda o tercera semana de vida de la larva comienza la sustitución de los rotíferos por nauplios de *Artemia sp.*, con una talla entre 200 y 400 micrómetros, en función de la cepa empleada, y con una concentración entorno a 2 individuos/ml. Dado que la dispersión de tallas entre las larvas suele ser grande, no todas están en condiciones de capturar nauplios a la misma edad. Por lo cual los nauplios se comienzan a suministrar antes de que sean realmente necesarios y los rotíferos se continúan suministrando hasta diez días después de iniciar la alimentación con *Artemia* (aunque reduciendo su concentración a la mitad).

Hacia los 20 días de edad, la mayoría de las especies pueden alimentarse con la siguiente forma larvaria de *Artemia sp.*, los metanauplios, cuya longitud se aproxima al milímetro y que se combina con los nauplios en proporciones muy variables en función de la especie y la técnica de cultivo. La concentración total de presas se mantiene en este periodo entorno a las 2 presas/ml (Watanabe y Kiron 1994).

Finalmente, en torno a los 30 – 40 días de edad se inicia la alimentación con pienso (alimento inerte), se deben seguir suministrando metanauplios de *Artemia* aunque reduciendo paulatinamente la cantidad. Un resumen de todo el proceso puede observarse en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Secuencia de alimentación en larvas de peces marinos

Tipo Alimento	1º Semana (Días 1a 7)	2º- 3º Semanas (Días 8a21)	Días 20 a 30	Días 30 a 40
Rotífero	Cepa S; 5-10 Rtf/ml	Cepa L; 5-10 Rtf/ml		
Nauplios ( <i>Artemia</i> )		200-400 m $\mu$ → 2/ml	200-400 m $\mu$ → 2/ml	
Metanauplios ( <i>Artemia</i> )			2 presas/ml	2 presas/ml
Alimento Inerte				Destete

#### 2.1.5.5.2. Estrategia de alimentación.

Se refiere al protocolo de alimentación que se sigue para unas determinadas especies y edades, e incluyen el horario y la forma como se suministra el alimento a los animales. Tanto los ritmos biológicos como los sistemas de alimentación empleados tienen gran influencia sobre las estrategias de alimentación utilizadas en la nutrición de los peces:

La existencia de **Ritmos Biológicos (RB)** en los peces, permite considerar que en ellos se producen variaciones en la ingesta de alimento, en el metabolismo y probablemente en la eficacia de los procesos digestivo y absorbivo a lo largo del día, de las estaciones y del año. Se ha podido comprobar que el horario de alimentación puede afectar, tanto el crecimiento del animal, como su composición corporal (Noeskeet *al.* 1983, Carrillo *et al.* 1986 y Madrid y Zamora 1995).

El **sistema de alimentación** también tiene incidencia sobre el aprovechamiento del alimento suministrado, los peces alimentados con sistemas que no se adecuen a sus *RB* naturales es posible que no alcancen el máximo rendimiento de la dieta (Madrid y Zamora 1995).

**Estrategia de alimentación en dentón:** cuando se produce la apertura de la boca (3-4 días desde la eclosión), comienza a aplicarse la estrategia de alimentación larvaria que previamente se ha diseñado. Inicialmente estaba basada en la empleada en dorada y se ha ido adaptando. Generalmente se inicia con el suministro de rotífero enriquecido con fitoplancton (24 h) o emulsiones (8-12 h), desde la apertura de la boca hasta los 18-20 días, se suele añadir simultáneamente con fitoplancton a los tanques de cultivo larvario. Los primeros días debe seleccionarse el rotífero (> 100 m $\mu$ ) debido al pequeño tamaño de la boca de las larvas (Glamuzina 1989, Franicevic 1991). Se suministra a los tanques en dos tomas diarias (mañana y tarde) durante un tiempo aproximado de tres semanas, la concentración varía con la edad de las larvas y normalmente se mantiene entre 10 y 20 rotíferos/ml, se debe cerrar el circuito de agua durante un periodo de 2-3 horas en cada toma con el objeto de que las larvas aprovechen mejor el alimento. Entre la segunda y tercera semana se produce un periodo de solapamiento, de 5-7 días, en el cual se continúa dando rotífero y se comienza a suministrar *Artemia*. Una vez que se suspende el uso de rotífero se mantiene el circuito abierto y con renovación lenta.

La alimentación con nauplios de *Artemia* se inicia a partir del día 13-14 y hasta el día 18-20. Primero se suministran nauplios de la cepa AF (variedad de alta calidad, menor tamaño y buen perfil de AGE) por espacio de 3-5 días, y a continuación nauplios de la cepa EG, la cual requiere ser enriquecida con emulsiones (24 h) antes de suministrarse a las larvas. Seguidamente y hasta los 30-35 días se les distribuye metanauplios de *Artemia* enriquecida. La *Artemia* (nauplios y metanauplios) se añade en concentración de 1.5-5 individuos/ml en dos tomas diarias (mañana y tarde) vertiéndola en un cubo surtidor de donde van saliendo lentamente por goteo a los tanques.

El cambio de presas vivas se hace remplazándolas paulatinamente por alimento inerte. En dentón podría iniciarse una vez que ha comenzado la metamorfosis, a partir de los 21-22 días. Sin embargo, Martínez *et al.* (1997) al estudiar una serie de actividades enzimáticas relacionadas con el proceso digestivo a lo largo de su desarrollo larvario comprobaron la activación de las proteasas en respuesta al suministro de alimento inerte. Como resultado de esta investigación, ellos sugieren que se debe iniciar el destete entre los días 25 y 35 con el suministro de microdietas (pequeñas escamas de tamaño heterogéneo) diseñadas para dorada u otras especies cultivadas.

**Tabla 9.** Estrategias de alimentación en larvas de peces marinos

PARÁMETROS	VALORES	REFERENCIA
Apertura de la boca	Día 4 (18 °C) Día 6 (17 °C)	Pastor <i>et al.</i> 1995 Jug-Dujakovic 1995
Diámetro de la boca	Máximo (246-319 $\mu$ ) Funcional (98-124 $\mu$ )	Abellán 2000 a y b
Suministro de rotífero	Desde día 3-4 (apertura boca) Hasta día 18-20	
Tamaño de rotífero	Inicialmente < 100 $\mu$	
Concentración de rotífero	10-20 rotífero/ml	
Concentración de nauplios de <i>Artemia</i>	1.5-5 nauplios/ml (desde día 13-14 hasta 18-20)	
Concentración de metanauplios de <i>Artemia</i>	3-5 metanauplios/ml (desde día 18 hasta 30-35)	
Inicio de alimentación Inerte (destete)	Días 21-22 Días 25-35	Abellán 2000 a Martínez <i>et al.</i> 1997

## 2.1.6. CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA LARVARIA

### 2.1.6.1. Causas de la mortalidad de larvas y alevines

**Efectos de la abundancia y la talla de las presas en el crecimiento y supervivencia larvaria:** en peces cultivados se ha demostrado con frecuencia la fuerte relación entre la calidad y cantidad del alimento suministrado y la supervivencia de las larvas (May 1974, Leggett 1986). También se ha podido demostrar en verificaciones de campo (en capellán, *Mallotus villosus*) que el crecimiento y supervivencia de los individuos del capellán está fuertemente correlacionado con la concentración de presas de un rango de tallas adecuado para el consumo de las larvas (Frank y Legget 1986).

**Efecto de la Temperatura y salinidad:** Glamuzina *et al.* (1989), estudiaron el efecto de la temperatura y la salinidad en la supervivencia de las larvas, encontrando que en condiciones naturales, con una temperatura de 19°C y una salinidad normal (38 ‰), los índices de supervivencia de las larvas fueron altos. El incremento de la temperatura por encima de la temperatura ambiente (21 y 23°C) no tuvo un efecto significativo sobre la

supervivencia de las larvas, sin embargo el cambio en la salinidad del medio, sí tuvo una repercusión negativa, incrementando la mortalidad de las larvas. La mortalidad fue significativamente alta en los medios hipohalinos e hiperhalinos (20 y 50 ‰, respectivamente).

**Indicadores Específicos de Condición (IEC):** evalúan y controlan las variaciones introducidas en las condiciones de cultivo, especialmente en las fases larvaria y de alevinaje. Pueden basarse en indicadores fisiológicos internos (niveles de enzimas u hormonas, proporción ADN/ARN, composición química de las muestras) o en parámetros externos (peso, talla, medidas anatómicas, Índice gonadosomático, Índice hepatosomático y consumo de alimento) Alarcón-Martínez (1998).

**Crecimiento y Supervivencia Larvaria en dentón:** Durante la fase larvaria las tasas de crecimiento son elevadas pero las de supervivencia suelen ser bajas (ver Tabla 10). Se ha observado que no existen grandes diferencias respecto al crecimiento larvario en talla (hasta los 30 días) con respecto a la densidad de incubación (30, 50 y 65 huevos/l). Sin embargo, la evolución del crecimiento en peso y la supervivencia larvaria si que dependen de la densidad inicial de incubación, obteniendo los mejores resultados cuando se parte de una densidad de 30 huevos/l. Por ejemplo para dicha densidad se obtiene un peso de  $5.72 \pm 1.28$  g a los 90 días, y respecto a la supervivencia larvaria se tiene una proporción de 3.5% a los 60 días (Bibiloni *et al.* 1993, Efthimiou *et al.* 1994, Pastor *et al.* 1995, Abellán *et al.* 1997).

**Tabla 10.** Crecimiento y supervivencia larvaria en dentón

PARÁMETRO	VALORES	REFERENCIA
<b>Supervivencia larvaria (a densidad de 30 huevos/l)</b>	3.5% (60 días) 2.5% (50-55 días) 2% (90 días)	Abellán <i>et al.</i> 2000 a Pastor <i>et al.</i> 1995 Bibiloni <i>et al.</i> 1993
<b>Crecimiento en longitud (talla)</b>	No existen diferencias significativas a diferentes densidades (hasta los 30 días)	Abellán <i>et al.</i> 2000 a
<b>Crecimiento en peso (g) (a los 90 días y 30 huevos/l)</b>	$5.72 \pm 1.28$ 5.17 3	Abellán <i>et al.</i> 2000 a Pastor <i>et al.</i> 1995 Bibiloni <i>et al.</i> 1993

#### 2.1.6.2. Problemas actuales del cultivo

El cultivo del dentón es relativamente reciente y son numerosos los problemas técnicos que se presentan, aunque parte de ellos están en vías de solución. Entre los principales destacan la carencia de una técnica adecuada de cultivo, el comportamiento agresivo, el estrés y determinadas patologías.

#### 2.1.6.2.1. Técnicas de cultivo

El cultivo de larvas y alevines presenta elevadas tasas de mortalidad ocasionadas por múltiples factores, pero en general se considera que son debidas a la ausencia de una **técnica adecuada de cultivo** (Pastor *et al.* 1995, Abellán 2000 a). Por lo tanto, para obtener larvas y alevines de calidad y con elevadas tasas de supervivencia es necesario determinar las necesidades nutricionales de esta especie y conocer los parámetros óptimos de cultivo: densidad, secuencia de alimentación, tipos de tanques, etc., en las diferentes fases del proceso (Abellán 2000 a y b).

#### 2.1.6.2.2. Comportamiento agresivo

Es común en postlarvas y juveniles de muchas especies de peces cultivados. Los ataques son realizados por los individuos dominantes, los más grandes, y tienen como objetivo los individuos más pequeños, cuyo peso medio individual suele estar por debajo del peso medio de su grupo (Efthimiou *et al.* 1994). Al parecer, está fuertemente relacionado con la nutrición y puede ocasionar no sólo retraso en el crecimiento sino también altas tasas de mortalidad (Knights 1987, Hecht y Pienaar 1991, Smith y Reay 1991, Ruzzante 1994). También está relacionado con la presencia de ciertos factores estresantes como detallaremos en el siguiente apartado. Con referencia al dentón, se ha encontrado que en postlarvas y juveniles existe una fuerte correlación entre la nutrición, la dispersión de tallas y el comportamiento agresivo, y que este último es la principal causa de elevadas tasas de mortalidad (entre un 65 y 78%) (Efthimiou *et al.* 1994).

#### 2.1.6.2.3. Estrés

Los estadios larvario y juvenil, presenta una alta sensibilidad a la exposición a factores estresantes tales como las practicas de manejo, el efecto de tanque, la existencia de dispersión de tallas en el mismo grupo, el tipo de dieta utilizada (piensos secos), la ausencia de vejiga natatoria y la presencia de malformaciones, la sobreproducción de radicales libres (estrés oxidativo), las deficiencias nutricionales, y exposición a factores ambientales adversos (Chatain y Dewavrin 1989, Glamuzina *et al.* 1989, Franicevic 1991, Sweetman 1992, Pastor *et al.*, 1995, Efthimiou *et al.* 1994 y 1996, Tibaldi *et al.* 1996, Lavens *et al.* 1998, Rigoset *et al.* 1998). El estrés ocasiona aumento de las patologías (por bacterias y parásitos), elevación de las tasas de mortalidad y disminución de las tasas de alimentación y crecimiento (Riera *et al.* 1993, Pickering 1993, Efthimiou *et al.* 1994, Company *et al.* 1999).

El uso de las vitaminas antioxidantes C y E en las dietas de larvas y juveniles pueden reducir el efecto de algunos factores estresantes. La **vitamina C** disminuye los niveles de estrés y previene la aparición de malformaciones y enfermedades bacterianas. La **vitamina E** actúa principalmente como antioxidante metabólico, previniendo la peroxidación de los HUFA y otros fosfolípidos insaturados (Abellán 2000 a, García-Alcázar 2001).

#### 2.1.6.2.4. Patologías

Como hemos comentado anteriormente, el cultivo del dentón es reciente y son numerosos los problemas patológicos que se presentan (**Tabla 11**). La mortalidad en la fase inicial del cultivo podría deberse (en buena parte) al tamaño inadecuado de las presas vivas (Glamuzina *et al.* 1989) ó a las condiciones generales de cultivo y problemas nutricionales (Pastor *et al.* 1995).

Estas condiciones inadecuadas y la sensibilidad de esta especie a las enfermedades traen consigo problemas patológicos tales como la parasitosis provocada por el protozoo *Uronema marinum* que causa elevadas mortalidades a la edad de 35 días (Pastor *et al.* 1995). La presencia de factores estresantes conlleva un debilitamiento general del sistema inmunitario, un desvío de reservas energéticas en la búsqueda de la adaptación a dichas condiciones, y finalmente una menor resistencia a las enfermedades y menores tasas de supervivencia.

Riera (1993), observó otra enfermedad la **granulomatosis sistémica** que aparece alrededor del día 70 causando elevadas mortalidades, pero logró disminuir marcadamente la mortalidad a los 90 días con un tratamiento a base de Vitamina C y E.

Otros problemas son la **hiperinflación de vejiga, lordosis y canibalismo** (este último favorecido por la falta de homogeneidad en el crecimiento). También la **ausencia de vejiga natatoria** que induce la aparición de malformaciones esqueléticas y operculares que deprimen el crecimiento (en talla y peso) y provocan una mortalidad elevada en situaciones estresantes en las fases larvaria, postlarvaria y juvenil (Divanach and Kentouri 1982, Chatain y Dewavrín 1989, Divanach *et al.* 1997).

Company *et al.* (1999), elaboraron el primer registro amplio de la fauna bacteriana y parasitaria del dentón, y han reflejado las principales patologías en el cultivo de esta especie. Consideran que las condiciones de enfermedad en dentón tienen un origen multifactorial, y además han puesto de manifiesto una correlación directa entre la temperatura del agua y la mortalidad. También señalan que las patogénesis relacionadas con el estrés son muy importantes en el cultivo de esta especie. Adicionalmente, una dieta o régimen de alimentación inadecuados durante el desarrollo larvario puede ser la causa inicial de una condición debilitada que origina animales susceptibles a organismos patógenos.

**Tabla 11.** Las Patologías en larvas y alevines de dentón

Patologías/Problemas	Descripción	Referencia
Etapas de mayor mortalidad (días)	9-15 y 25 6-15 y 25-30 9-15 1-12 y 21-45	Franicevic 1991 Riera <i>et al.</i> 1993 Pastor <i>et al.</i> 1995 Abellán <i>et al.</i> 1997
<i>Uronema marinum</i>	Elevada mortalidad (a los 35 días)	Pastor <i>et al.</i> 1995
Granulomatosis sistémica	Elevada mortalidad a partir día 70 (Tratamiento con vitaminas C y E)	Riera <i>et al.</i> 1993
Hiperinflación de vejiga y lordosis	Debido a problemas de manejo	Abellán 2000 a
Canibalismo	Falta de homogeneidad en tamaño	
Factores estresantes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Debilitamiento general del sistema inmunológico.</li> <li>• Menor resistencia a enfermedades</li> <li>• Menores tasas de crecimiento y supervivencia</li> </ul>	Sánchez-Muros 1999
Morbilidad y mortalidad en animales cultivados	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiene un origen multifactorial</li> <li>• Las patogénesis relacionadas con el estrés son importantes en la especie</li> <li>• Existe una interrelación entre la temperatura del agua y la mortalidad.</li> </ul>	Company <i>et al.</i> 1999
Primer registro amplio de patógenos y parásitos en dentón	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Provee evidencia sobre las amenazas patológicas en el cultivo</li> </ul>	
<i>Vibrio harvery</i>	Asociado con alta mortalidad	
Parásitos multicelulares	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atacan órganos vitales especialmente el tronco renal y las branquias.</li> <li>• Debilitan física e inmunológicamente, inducen a la anorexia y aumentan la susceptibilidad a bacterias patógenas.</li> </ul>	

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del IEO de Murcia (Planta de Cultivos Marinos – Puerto de Mazarrón).

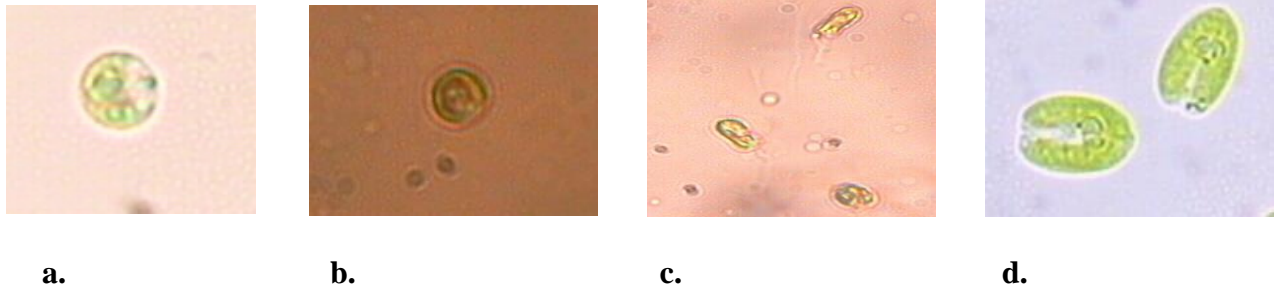


**Figura 5.** Vista aérea del IEO – Puerto de Mazarrón (Murcia).

#### 3.1. CULTIVO DE MICROALGAS

La producción de microalgas se utilizó no sólo para el enriquecimiento de rotífero sino para suministrarla a las fases iniciales del cultivo larvario, lo cual mejoró la calidad del agua en los tanques (“técnica del agua verde”). Se emplearon varias especies de microalgas utilizadas normalmente en acuicultura marina: *Chlorella sp.*, *Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana* variedad T-Iso (**Figura 6**). Estas especies se seleccionaron con base en su talla, valor nutritivo, facilidad de cultivo y ausencia de toxicidad.



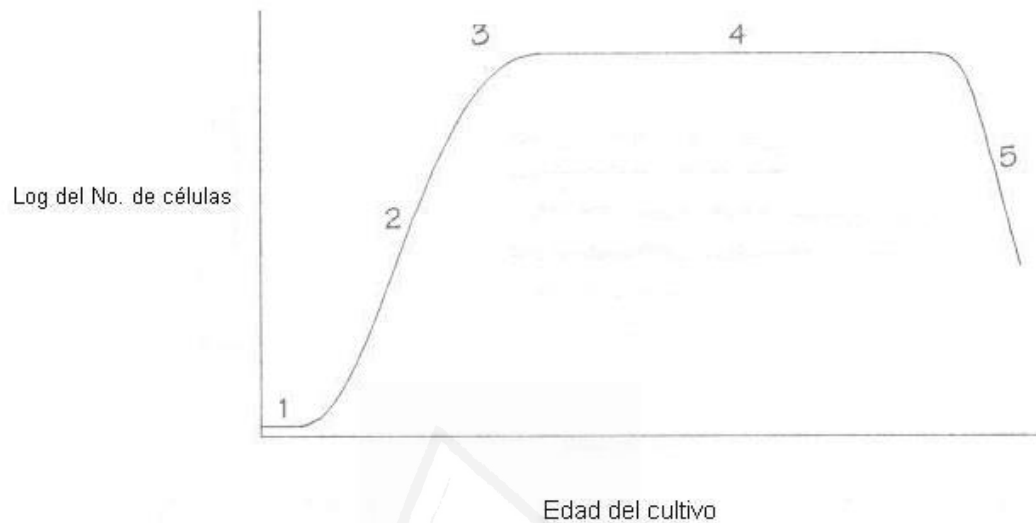


**Figura 6.** **a.** *Chlorella sp.* **b.** *Nannochloropsis gaditana*, **c.** *I. galbana*, **d.** *Tetraselmis suecica*.

### 3.1.1. PROCESO DE CRECIMIENTO DE LA POBLACIÓN

El crecimiento de la población presentó varias fases: 1) la fase inicial (o de reposo), en la que se inoculó la cepa y hay incremento de la talla de las células debido a la absorción de nutrientes del medio de cultivo, en ésta no hubo multiplicación celular, 2) la fase logarítmica o exponencial, donde las células se reprodujeron aceleradamente y el crecimiento de la población fue muy rápido, 3) la fase de disminución del ritmo de crecimiento, 4) fase de transición o meseta, donde la tasa de crecimiento se estabilizó, y 5) La fase de declive o senescencia, donde el número de células decreció y la tasa de mortalidad excede al crecimiento (**Figura 7**). Se cosechó el fitoplancton durante la fase exponencial, ya que en este periodo de expansión las células se multiplican rápidamente y producen una población más viable.

Universidad de Alicante



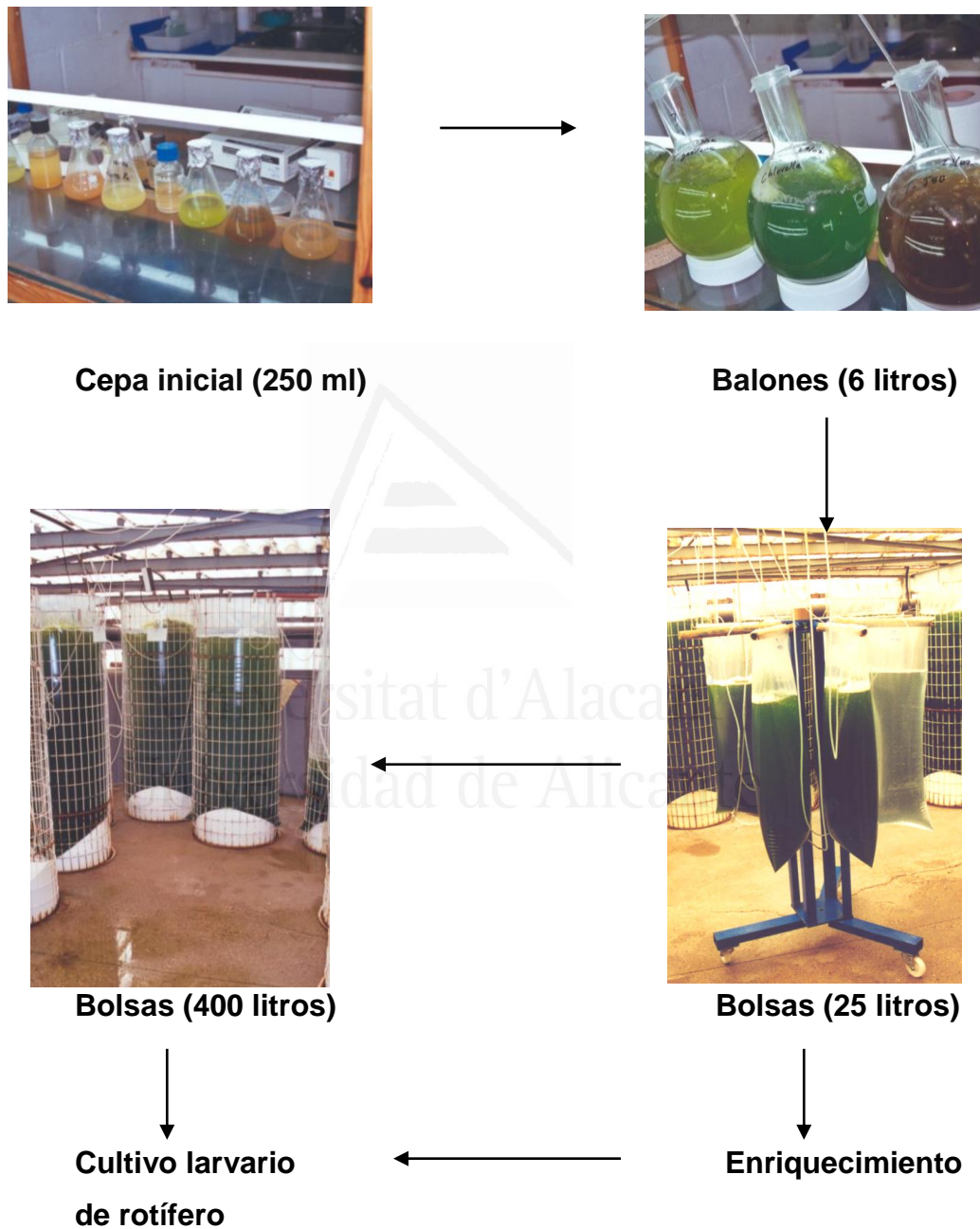
**Figura 7.** Ciclo de crecimiento de un cultivo de algas. 1. Fase de inducción, 2. Fase exponencial, 3. Fase de reducción del crecimiento, 4. Fase estacionaria (meseta), 5. Fase senescente.

### 3.1.2. TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN MASIVA

En acuicultura se cultivan las microalgas de tres formas: 1) sistema en ciclos (también llamado en serie, lotes, discontinuo o de retorno), 2) cultivo semi-continuo, y 3) cultivo continuo.

En nuestro caso se utilizó el método de cultivo en ciclos, en el cual se inicia con unas cepas axénicas (250 ml) a partir de las cuales se produce una serie de cultivos a los que se les va aumentando progresivamente el volumen (6, 25, 200 y 400 litros). Estas poblaciones de algas se cosecharon enteramente cuando alcanzaron su pico de densidad y conservaban un buen potencial de crecimiento. Cada serie se utilizó para enriquecer a los rotíferos y para suministrarse a los tanques de larvas, aunque ocasionalmente alguna serie se utilizó como inóculo para nuevos ciclos de cultivo (**Figura 8**). Varios autores (Fernández-Reiriz *et al.* 1989, Brown *et al.* 1997) consideran que éste es el método más fácil y fiable ya que permite mantener una producción estable y de calidad de las microalgas, además es la técnica más utilizada por las hatcherys del Mediterráneo.

## CULTIVO DE MICROALGAS POR CICLOS



**Figura 8.** Esquema del cultivo de microalgas por ciclos.

### 3.1.3. INSTALACIONES PARA EL CULTIVO MASIVO DE MICROALGAS

La producción se realizó en el área destinada al fitoplancton, compuesta por dos salas: una cámara de cultivo isotérmica en donde se realizó la renovación y conservación de las cepas puras y se mantuvieron pequeños volúmenes (**Figura 9a**), y un invernadero para el cultivo de grandes volúmenes en bolsas de plástico (200 y 400 litros) y tanques (**Figura 9b**). El área de fitoplancton cuenta con sistemas de tratamiento del agua de mar: filtros de arena y de cartucho, y esterilización con UV.



**Figura 9. a.** Cámara isotérmica para cultivo de microalgas, **b.** Invernadero

En el cultivo se utilizaron varios tipos de recipientes y materiales: para las cepas puras matraces de 250 ml y para pequeños volúmenes balones de 6 litros (ambos de vidrio pírrex), estos recipientes se colocaron dentro de la cámara isotérmica (20-22°C) en estanterías de vidrio equipadas con luz fluorescente y suministro de aire; para volúmenes mayores (25, 200 y 400 l) se usaron bolsas de plástico transparentes (de un grosor de 0.25 mm), también equipadas con suministro de aire y localizadas tanto en la cámara como en el invernadero.

### 3.1.4. FILTRACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DEL AGUA DE MAR

En la producción masiva de fitoplancton, el agua de mar es el medio básico de cultivo, por lo tanto debe ser tratada para eliminar sólidos en suspensión, contaminantes y patógenos, mejorando así su calidad estándar y facilitando un crecimiento adecuado de las algas.

La primera etapa consistió en eliminar sólidos en suspensión. El agua de mar se hizo pasar inicialmente por tanque de sedimentación que decantan la materia en suspensión, a continuación se filtró mediante filtros de polietileno que retiene pequeñas partículas de entre 50 y 10  $\mu$ m. Puesto que el cultivo de fitoplancton, rotífero y *Artemia* requiere un alto grado de filtración, el agua se hizo pasar luego por cartuchos de espuma que filtran hasta 5  $\mu$ m, finalmente el agua utilizada para replicar las cepas puras se hizo pasar por un sistema de kitasatos a presión reducida con filtros Millipore® de 0.45  $\mu$ m y

filtro de porcelana. Sin embargo, esta filtración no puede garantizar totalmente la eliminación de microorganismos por lo que el agua destinada al cultivo de fitoplancton, rotífero y *Artemia* se sometió previamente a esterilización con hipoclorito (40 g/l).

El agua de mar destinada a cultivar el alimento vivo se esterilizó con radiaciones UV. Los rayos UV de onda corta (265 nm) tienen un fuerte efecto germicida, basado en su capacidad de romper las moléculas de ADN y las membranas celulares. El agua se esterilizó a través de cámaras que se irradian con una o más lámparas de mercurio puestas en tubos de cuarzo (transparentes a los UV). El grosor de la capa de agua en la cámara de irradiación utilizada, su potencia y diseño permitieron el máximo efecto de esterilización en unos pocos segundos (con una intensidad de 40 mJ/cm<sup>2</sup> se eliminaron el 99% de los microorganismos del volumen de agua tratada).

### 3.1.5. ESTERILIZACIÓN DEL EQUIPO DE CULTIVO

Para prevenir la contaminación del equipo de trabajo, éste se limpió y desinfectó utilizando varios métodos: el autoclave para pequeños recipientes como pipetas volumétricas, placas de Petri, pipetas Pasteur, tubos de ensayo, etc.; la estufa (calor seco) para matraces, balones, varillas, equipo de filtración, vasos de precipitado; hipoclorito o HCl para los materiales plásticos como mangueras, tuberías, tanques.

### 3.1.6. ENRIQUECIMIENTO DEL MEDIO DE CULTIVO

Para que un cultivo de algas crezca adecuadamente deben tenerse en cuenta cuatro parámetros: luz, pH, turbulencia y nutrientes. Los tres primeros pueden regularse, pero los nutrientes deben añadirse específicamente al medio de cultivo en proporciones adecuadas. Los principales nutrientes requeridos son nitrógeno y fósforo (macronutrientes), seguidos por minerales trazas (micronutrientes), vitaminas y agentes quelantes. Las soluciones de nutrientes se prepararon con antelación, teniendo la precaución de no esterilizar las vitaminas con calor.

Para replicar las cepas y cultivar pequeños volúmenes (placas de Petri, tubos de 30 ml, matraces de 250 ml, y balones de 6 litros) se utilizó el medio de cultivo Walne que consta de dos soluciones A y B, más una solución de vitaminas. Al medio utilizado para los cultivos se añadió 1 ml de solución A y 0.1 ml de solución de vitaminas por cada litro de agua de mar. Para volúmenes mayores (25, 200 y 400 litros) se utilizó un abono comercial agrícola (8N:4P:10K) en una proporción de 1 ml de abono/litro de agua de mar.

#### **Solución A (Macronutrientes)**

FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.30 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.36 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	33.6 g

EDTA (sal sódica)	45.0 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	20.0 g
NaNO <sub>3</sub>	100.0 g
Solución B	1.0 ml
Agua destilada hasta completar	1 litro de solución

**Solución B** (trazas de metales)

ZnCl <sub>2</sub>	2.1 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.9 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	2.0 g
Agua destilada hasta completar	100 ml de solución
Acidificar con HCl hasta obtener un líquido transparente	

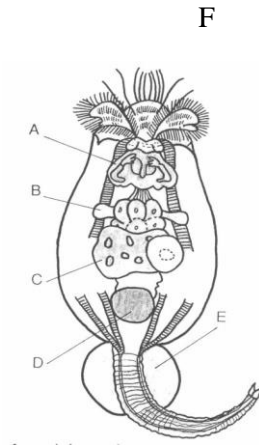
**Solución de vitaminas**

B <sub>12</sub>	10 mg
B <sub>1</sub> (Tiamina)	200 mg
Agua destilada hasta completar	200 ml

### 3.2. CULTIVO DE ROTÍFERO

#### 3.2.1. TÉCNICAS GENERALES DE CULTIVO

Como primer alimento de las larvas se utilizó el rotífero *Brachionus plicatilis* de la variedad L (large) con una talla media de 240 μm (**Figura 10**). El **medio de cultivo** utilizado fue una mezcla de agua de mar filtrada a 5 μm, agua dulce y fitoplancton (normalmente *Tetraselmis suecica*) en una proporción de 1/3:1/3:1/3, mezcla a la cual se añadió levadura de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*). Para realizar el cultivo se utilizaron **tanques cilíndricos** de 1000 litros provistos de un sifón para purgar diariamente los restos de levadura y rotíferos, previniendo su descomposición (**Figura 11**). El tanque se mantuvo a una **temperatura** homogénea de alrededor de 28°C mediante una resistencia, con **iluminación** constante y suave mediante un fluorescente, y con **aireación constante** en varios puntos para mantener la mezcla de rotífero, levadura y fitoplancton en suspensión. La **Densidad** inicial en los tanques de cultivo fue de 200 rotíferos/ml.



**Figura 10.** Hembra amictica de Rotífero

**Figura 11.** Tanques de cultivo de rotífero.

(A. Mástax; B. Estómago; C. Vitelario; D. Vejiga; E. Huevo; F. Boca).

### 3.2.2. SIEMBRA Y MANTENIMIENTO

El protocolo de cultivo de rotífero fue el siguiente: volumen total inicial: 400 l, del cual 1/3 fue agua de mar (133 l), otro 1/3 de agua dulce y 1/3 de fitoplancton. Luego se fue aumentando paulatinamente el volumen, el día 1 se añadieron 100 l, con la misma proporción volumétrica de agua de mar, agua dulce y fitoplancton. El día 2 se agregaron 150 l y el día 3 se añadieron otros 150 litros, siempre con la misma proporción de 1/3:1/3:1/3. Diariamente se añadieron 0.3 g de levadura seca por millón de rotífero. Finalmente se cosecha el tanque el día 4.

A pesar del aumento de volumen se procuró mantener las características de temperatura, aireación e iluminación. Diariamente se realizaron varias tareas: determinación de parámetros fisicoquímicos, recuento de rotífero y hembra ovada, alimentación y limpieza. Esta última consistente en retirar los residuos de la superficie y purgar el tanque, abriendo la válvula inferior para extraer del fondo los restos de levadura y rotíferos muertos.

### 3.2.3. COSECHA Y CAMBIO DE TANQUE

Al cuarto día y una vez que el rotífero ha alcanzado la fase exponencial de crecimiento, se empieza a **cosechar** diariamente, entre un 15 y 20% del volumen, para extraer parcialmente la producción. La extracción se realiza con salabre de 60 mμ, evitando

que el rotífero quede en seco. A continuación se rellena el tanque de cultivo hasta su volumen inicial con agua de mar, agua dulce y fitoplancton, en la proporción señalada 1/3:1/3:1/3.

Frecuentemente se realizó la **renovación** del medio de cultivo, cambiando el rotífero a un nuevo tanque, para prevenir un deterioro del medio de cultivo (elevación de la concentración de NH<sub>3</sub>, disminución del oxígeno, acumulación de desechos) o variaciones bruscas de los parámetros ambientales, los cuales podrían haber ocasionado inestabilidad en el cultivo y disminución de la tasa de reproducción y la densidad de población. La técnica de renovación fue idéntica a la utilizada para la cosecha del rotífero, preparando previamente el nuevo tanque con las condiciones de agua, temperatura, iluminación y aireación que se describieron, y sembrando el rotífero a la densidad indicada.

### 3.2.4. ALIMENTACIÓN Y ENRIQUECEDORES

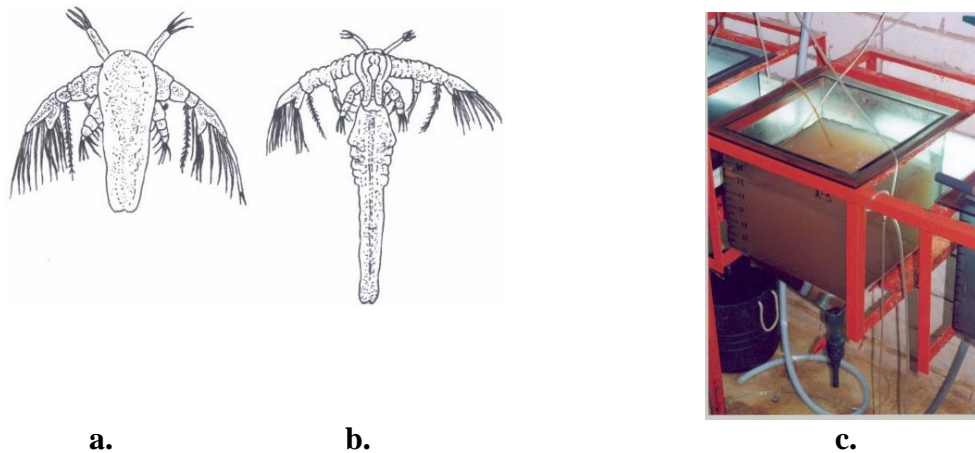
*B. plicatilis*, es un rotífero filtrador que se puede cultivar con microalgas unicelulares. Sin embargo, en grandes volúmenes no se puede alimentar exclusivamente con fitoplancton y debe agregársele levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). En nuestro caso, se agregó levadura en proporción de 0.3-1 g por millón de rotíferos/día, disolviéndola en agua dulce y homogeneizándola mediante agitación magnética, luego se añadió al cultivo de rotífero en varias tomas diarias. Esta dieta permitió producir grandes cantidades de rotífero pero de baja calidad nutritiva, por lo que fue sometido a **enriquecimiento** antes de suministrarlo a las larvas. Los enriquecedores que utilizamos fueron 4 especies de fitoplancton concentrado (en fase de crecimiento exponencial) o una formulación especial (Protein-Selco) con emulsiones lipídicas, que contenían HUFA y otros componentes como vitaminas y minerales, adecuadas a las necesidades reales de las larvas. La técnica de enriquecimiento consistió en alimentar el rotífero con las formulaciones, señaladas anteriormente, durante 12-24 horas antes de su uso en la alimentación larvaria. El rotífero enriquecido de esta forma se suministró a las larvas de los peces en el menor tiempo posible (dos tomas diarias, mañana y tarde) con el objetivo de que no se produjera pérdida de su valor nutritivo.

## 3.3. CULTIVO DE ARTEMIA

### 3.3.1. OBTENCIÓN DE NAUPLIOS Y ENRIQUECIMIENTO DE ARTEMIA

Usualmente se emplean dos cepas de *Artemia* con diferente composición y calidad nutritiva. Inicialmente se suelen utilizar nauplios de la cepa *AF* (**Figura 12a**), que tiene un alto valor nutritivo y no requiere enriquecimiento y Posteriormente metanauplios de la cepa *EG* (**Figura 12b**). Nosotros utilizamos la cepa *EG* que tiene un bajo perfil de ácidos grasos HUFA n-3 lo cual permitió enriquecerla con las diferentes emulsiones experimentales *ICES* y modular hasta cierto punto el contenido en éstos ácidos grasos del alimento que se suministró a las larvas de dentón (**Figura 12c**).





**Figura12.** a. Nauplio, b. Metanauplio, c. Tanque de cultivo de *Artemia*

### 3.3.2. TRATAMIENTO DE LA CEPA EG DE ARTEMIA

#### 3.3.2.1. Desinfección

Se efectuó para eliminar la contaminación por microorganismos y mejorar la tasa de eclosión. Se llevó a cabo en recipientes de 10 litros, utilizando una concentración de 5-10 g de cistes/litro de solución de hipoclorito que contenía una concentración de 200 ppm de cloro activo, dejándola actuar durante 20 - 30 minutos con fuerte aireación. Seguidamente se vació el contenido del cubo en un salobre de 100 mμ y se enjuagó abundantemente con agua dulce hasta eliminar los restos de lejía.

#### 3.3.2.2. Descapsulación

Se realizó para eliminar la capa externa de los cistes (el corion) por oxidación química y mejorar el valor nutricional de los nauplios y las tasas de eclosión, ya que disminuye la energía requerida para eclosionar. Se realizó en un tanque troncocónico de 100 litros (**Figura 12c**), llenándolo con agua de mar hasta el volumen requerido según la cantidad de cistes a descapsular (máximo 80 l). El proceso de descapsulación se efectuó en tres etapas.

\***Hidratación** del quiste de *Artemia* para que adquiera una forma esférica y el agente descapsulador pueda destruir completamente el corion. Se utilizan tanques troncocónicos en los cuales se introducen los cistes durante 1-2 horas en un volumen de agua determinado y con aireación intensa.

**\*Descapsulación.** Se prepara la solución descapsuladora con hipoclorito (concentración 100 g/l), NaOH (40%) y agua de acuerdo con la siguiente fórmula (**Figura 13**). A continuación se introducen los cistes durante varios minutos (dependiendo de las cepas, entre 5 y 15 min), produciéndose un aumento de temperatura, generación de espuma y que los cistes se tornen de color naranja por eliminación del corion. La temperatura de la solución se debe controlar para que no sobrepase los 40°C porque inactivaría los embriones.

$$\text{Volumen de agua} = V_{sd} - V_{sh} - V_{sosa} = 893 \text{ ml}$$

**Figura 13.** Para 100 g de cistes tenemos:  $V_{sd}$  = Volumen solución descapsuladora = 1400 ml,  $V_{sh}$  = Volumen solución de hipoclorito = 474 ml (50 g producto activo/100 g cistes),  $V_{sosa}$  = Volumen solución NaOH 40% = 33 ml.

**\*Lavado y eliminación de residuos,** se recolectan los quistes en un salabre de 125  $\mu$ m y se lavaron con agua dulce hasta eliminar el olor a lejía. Los cistes descapsulados se escurrieron y se sometieron a incubación o se guardaron en la malla en refrigeración. Cuando no se van a utilizar inmediatamente, se conservan en salmuera (400 ‰ de salinidad) y refrigeración.

### 3.3.2.3. Incubación

**Preparación del tanque,** se utilizó un tanque de 100 litros de volumen, el cual se preparó con un día de antelación a la incubación. Se limpiaron las paredes con detergente y abundante agua, se llenó con una solución de hipoclorito de sodio (que contenga 200 mg de cloro activo/litro de solución) dejándolo actuar por 1-2 horas, seguidamente se aclaró con abundante agua. Finalmente se llenó el tanque con agua de mar filtrada y esterilizada, y se mantuvo con aireación intensa (con una concentración de oxígeno disuelto mayor a 2 mg/litro) durante todo el periodo de incubación.

**Incubación,** se añaden los cistes de *Artemia* en un tanque troncocónico de 100 litros (a una concentración 2-3 g de cistes/litro) llenando el tanque sólo hasta 80 litros (**Figura 12c**). Manteniendo condiciones ambientales adecuadas para la eclosión: una temperatura de alrededor de 28°C (para lo cual se colocó una resistencia con termostato), aireación fuerte para mantener oxigenados los cistes, iluminación suave (2000 lux), el pH entre 7-8, y salinidad de 28 a 35 ppt. Este proceso duró entre 24-48 horas según la cepa utilizada.

#### 3.3.2.4. Cosecha

Una vez que los nauplios han eclosionado se procede a extraerlos de los incubadores, evitando el paso de cistes no eclosionados o restos de corion que puedan ocasionar infecciones u obstrucción intestinal en las larvas. Para separarlos se aprovecha el fototropismo positivo de los nauplios y la flotabilidad de los restos de corion y cistes no hidratados. Para la extracción se cubre el tanque y la superficie, y se cierra el aire, el tanque debe disponer de una ventana en su cono inferior en donde se colocó una fuente de luz para que se concentren los nauplios. Se procede a extraerlos por la válvula inferior con sumo cuidado para que no pasen los restos de cistes, recolectándolos en un salabre de 100 m $\mu$  y lavándolos intensamente. Seguidamente se echó la *Artemia* en un cubo de 10 litros, efectuando el recuento a ojo o en lupa (por triplicado) y añadiendo agua suficiente para dejar la *Artemia* a una concentración de 1 o 2 millones por litro, se dejó el cubo en refrigeración y con aireación hasta su utilización. Puesto que los metanauplios de la cepa EG requieren enriquecimiento se les añadió emulsiones antes de suministrarlos a las larvas.

#### 3.3.2.5. Enriquecimiento

Las emulsiones ICES utilizadas para enriquecer los metanauplios de *Artemia* fueron elaboradas en el Laboratorio de Acuicultura del “Artemia Reference Center” de la Universidad de Gante – Bélgica, y contienen emulsiones experimentales obtenidas a partir de aceite de pescado.

Una vez establecida la cantidad de nauplios de EG obtenida en la incubación, se corrigió el volumen de agua que existente en el tanque preparado para realizar el enriquecimiento de forma que los metanauplios quedaron a una concentración de 200.000/litro (5 litros de agua/millón de EG). Se suministró aireación fuerte, oxígeno sobre 2 - 4 mg/l y la resistencia conectada para mantener la temperatura entorno 28°C. La duración del proceso y el tipo de producto a usar dependen del contenido en HUFA requerido, aunque normalmente dura 24 horas, en este caso la cantidad de enriquecedor fue de 0.6 g/l para cada tipo de mezcla (se preparó disolviendo la emulsión necesaria en 100 ml de agua destilada), y se suministró a la *Artemia* en dos tomas (mañana y tarde).

#### 3.3.2.6. Cosecha, almacenamiento y suministro

Los metanauplios de *Artemia* (**Figura 12b**) se recolectaron con un salabre de 150 m $\mu$  lavando con agua de mar, abriendo cuidadosamente la llave del tanque para prevenir la colmatación de la malla, cuando el agua filtrada salió clara se transfirió la *Artemia* a un cubo de 10 l. El recuento de metanauplios se realizó en una lupa por triplicado y se añadió el agua necesaria para dejar la *Artemia* a una concentración de 1 o 2 millones por litro. Se deja el cubo en refrigeración (4°C) y con aireación hasta su utilización en el cultivo larvario.

### 3.4. REPRODUCTORES

Los huevos se obtuvieron del stock de reproductores de la Planta de Cultivos Marinos del IEO de Murcia, constituido por un grupo integrado por 76 ejemplares distribuidos en dos tanques, uno de 45 m<sup>3</sup> (46 estabulados y 4 salvajes), este tanque es rectangular de hormigón con una profundidad de 1.5 m (**Figura14**). El otro tanque de 20 m<sup>3</sup> (26 salvajes), rectangular de fibra de vidrio con una profundidad de 1 m.

La proporción de macho/hembra fue de 1/1 y la edad media de los individuos fue de 5 años (1997-2002). El fotoperiodo utilizado fue de 12h luz: 12h oscuridad y la temperatura del agua fue la natural para la época 20-25°C. La densidad media fue de 1.2 animales/ m<sup>3</sup> (2.8 kg/ m<sup>3</sup>). Se mantuvo abierto el circuito de agua, el oxígeno disuelto en torno a 5-7 mg/litro, la salinidad de 37 ‰ y pH entre 7.5-8.5.

A los reproductores estabulados se les suministró pienso seco, complementado con pescado congelado (alacha, sardina, caballa) y cefalópodos, especialmente en periodos de vitelogénesis y puestas.

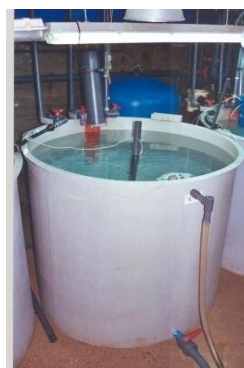
El período de freza fue de abril-mayo-junio y las puestas fueron espontaneas y secuenciales. Se colectaron diariamente mediante un sistema automático que recolectó y retuvo los huevos viables que flotaban en los tanques de los reproductores, el colector era una cubeta recubierta de malla (de 300 mμ) que se colocó justo en el rebosadero del tanque, los huevos se mantuvieron en buenas condiciones gracias al flujo constante de agua. Para retirar los huevos se extrajo la cubeta, se lavaron y se vertieron suavemente en un vaso de cristal. Los huevos viables flotaron en la superficie, los huevos muertos se precipitaron y se extrajeron mediante sifonado, a continuación se transfirieron los viables a los tanques de cultivo.

**Figura 14.** Tanque de Reproductores con cubeta y salobre para recolección de huevos en el rebosadero

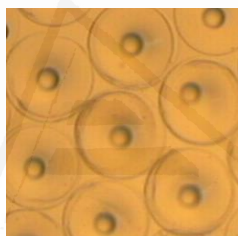


### 3.5. CULTIVO LARVARIO

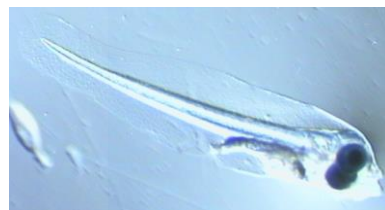
Se realizó dentro de una nave con ambiente controlado, la incubación y el cultivo larvario (en la fase de alimentación con rotífero, **Figura 15**) se efectuaron en los mismos tanques: cilíndricos, de fibra de vidrio, de color gris oscuro, capacidad de 1300 litros, en circuito abierto (durante un periodo determinado del día) (**Figura 15a**). Para facilitar la inflación de la vejiga natatoria, los tanques fueron provistos de limpiadores de superficie. La densidad inicial fue de 52 huevos/litro (media de 62000 huevos/tanque, **Figura 15b**). Se utilizó agua de mar filtrada, a temperatura y salinidad ambiente, y con aireación débil mediante difusores. El tiempo de cultivo fue desde la eclosión hasta los 22 días. El fotoperiodo fue de 12h: 12h y una intensidad de 500 lux, la temperatura entre 16 - 20 °C, salinidad de 37 ‰ y pH entre 7.5 - 8.5 y el oxígeno disuelto se mantuvo entre 5 -7 mg/litro. Diariamente se limpiaron los tanques mediante sifonado y se efectuó recuento de huevos y larvas (**Figura 15c**) para establecer mortalidad.



a.



b.



c.

**Figura 15.** Cultivo larvario de dentón. **a.** Tanque de cultivo, **b.** huevos, **c.** larva (con apertura de la boca).

El cultivo de larvas (en la fase de alimentación con *Artemia*) se llevó a cabo en tanques rectangulares de 180 litros, a una densidad de 54 larvas/tanque, en circuito abierto (desde las 20 horas hasta las 8 horas), aireación suave y fotoperiodo de 12h: 12h. Se controló diariamente temperatura y oxígeno disuelto, también se sifonaron diariamente los tanques para controlar acumulación de desechos y contabilizar bajas. En *Artemia* el periodo de cultivo fue desde los 22 días hasta el final de la prueba.

### 3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 3.6.1. EXPERIMENTO I: DETERMINACIÓN DE PERFILES DE ÁCIDOS GRASOS EN LARVAS EN FASE DE ALIMENTACIÓN CON ROTÍFERO

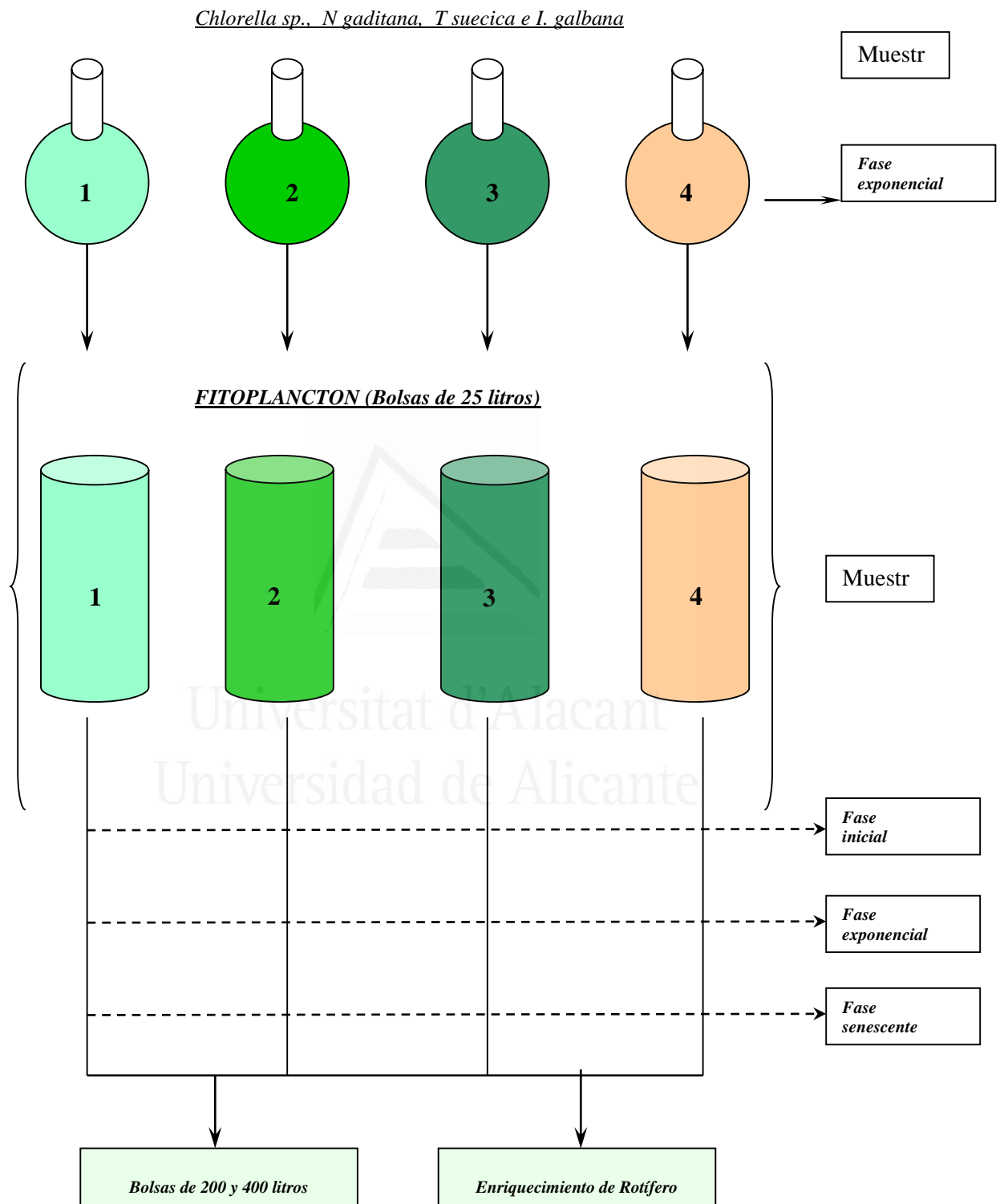
Se diseñó un experimento con larvas de dentón de 1 a 22 dph sometidas a un bloque de ensayos con cinco tratamientos de alimentación con rotífero enriquecido con cuatro especies de microalgas (*Chlorella sp*, *N. gaditana*, *T. suecica* e *I. galbana*) y el enriquecedor Protein-Selco. Se determinaron los contenidos de ácidos grasos en las microalgas y el enriquecedor P-S, en el rotífero de los diferentes tratamientos y en las larvas alimentadas con dichos rotíferos. Se evaluó el efecto de los diferentes tratamientos sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas.

##### 3.6.1.1. Determinación del perfil de ácidos grasos en microalgas

Las algas se cultivaron con múltiples propósitos, en primera instancia la determinación del contenido de lípidos totales y perfil de ácidos grasos, pero también para el enriquecimiento de rotífero y el suministro a los tanques de cultivo larvario. Se utilizaron cuatro especies de microalgas: *Chlorella sp.* y *Tetraselmis suecica* (IEO de Murcia), *Isochrysis galbana* (variedad Tahitiense) y *Nannochloropsis gaditana* (IGAFSA, Vigo). Estas especies se seleccionaron por presentar diferente valor nutritivo y su facilidad de cultivo. A partir de las cepas puras se cultivaron volúmenes crecientes de 6, 25, 200 y 400 litros. Se determinaron las curvas de crecimiento, se analizaron los contenidos de lípidos totales y los perfiles de ácidos grasos para cada una de las especies. Un esquema del proceso se presenta en la **Figura 16**.

Las curvas de crecimiento de las especies cultivadas se determinaron para los diferentes volúmenes utilizados 6, 25 y 400 litros, esto con el fin de establecer las concentraciones máximas alcanzadas, la duración del ciclo de crecimiento y planificar el suministro de algas a los diferentes tratamientos de enriquecimientos del rotífero y a los tanques de cultivo larvario. Las curvas de crecimiento se establecieron mediante recuento diario de la concentración de células para los diferentes volúmenes cultivados, para ello se utilizaron las cámaras de recuento de eritrocitos Neubauer mejorada (cuadrícula de recuento de 25 cuadros con lados de 5 cuadros, área de 0.0025 mm<sup>2</sup> y profundidad de 0.1 mm). La fórmula empleada para calcular la concentración fue la siguiente:

$$\text{Concentración de células} = \frac{\text{Número células}}{\text{Número cuadros} \times 4} \times 10^6 \text{ células/ml}$$



**Figura 16.** Determinación del perfil de ácidos grasos de microalgas.

### 3.6.1.2. Determinación de contenidos en ácidos grasos de rotíferos y larvas en fase rotífero

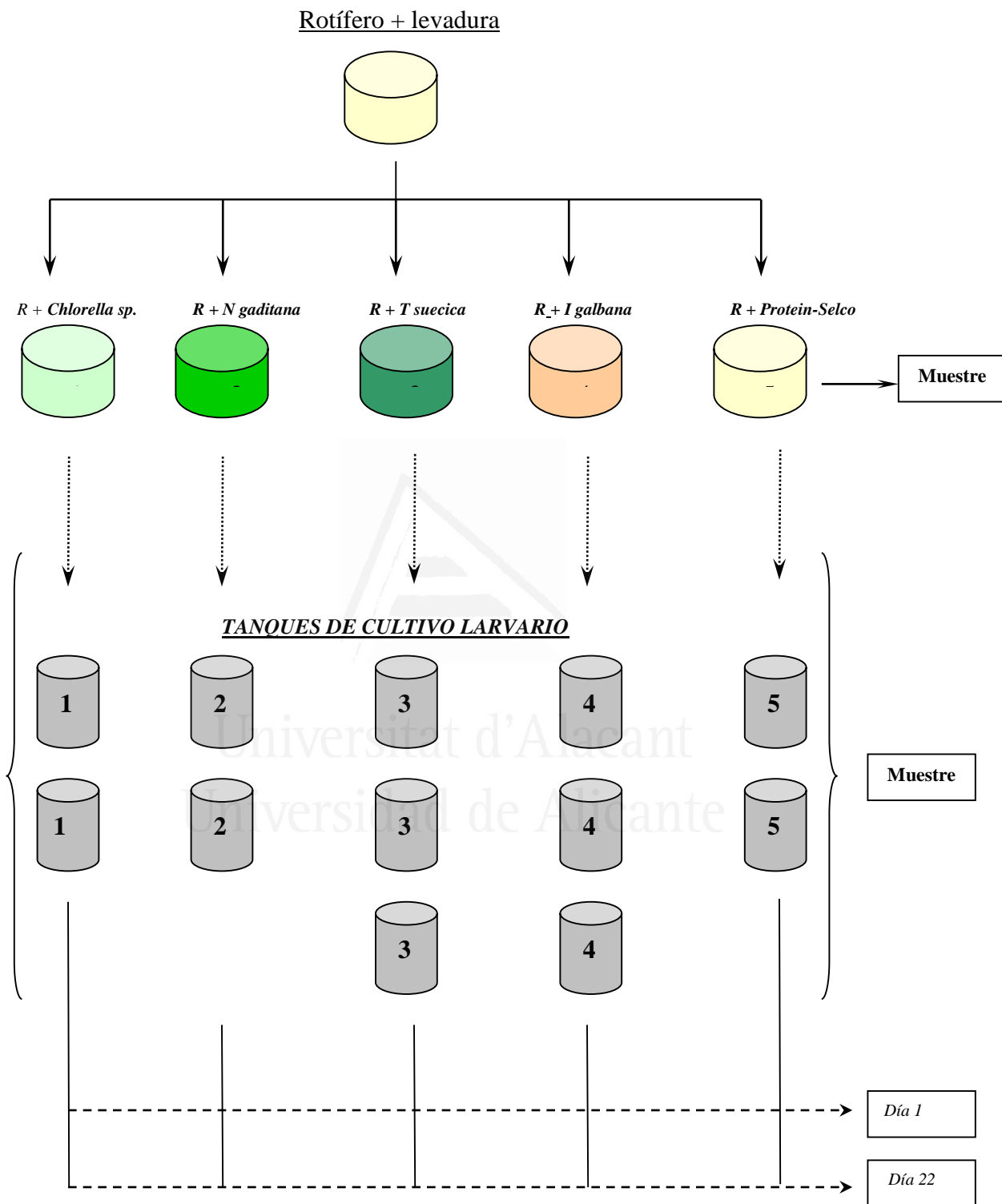
En este experimento de cultivo larvario de dentón se suministró como primer alimento rotífero enriquecido con las cuatro especies de fitoplancton estudiadas y con un enriquecedor comercial (Protein Selco). Se utilizó el rotífero *Brachionus plicatilis* por ser un organismo de relativo fácil manejo y reproducción, y adecuado tamaño para ser suministrado como primer alimento a las larvas. Sin embargo, tiene la característica de tener baja calidad nutricional (Lavens y Sorgeloos 1996) lo cual lo hace ideal para utilizarlo como vehículo de introducción de microalgas y enriquecedores comerciales cuyo valor nutritivo se pretenda evaluar. Se determinaron las concentraciones de lípidos totales y los perfiles de ácidos grasos tanto en los 5 tratamientos de rotífero enriquecido como en las larvas alimentadas con los mismos con el fin establecer la influencia de los ácidos grasos sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas.

El rotífero se obtuvo de un cultivo mantenido en una mezcla de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y la microalga *Tetraselmis suecica*. Para eliminar el efecto enriquecedor de *T. suecica*, se transfirió el rotífero a bolsas de 400 litros, alimentándolo exclusivamente con levadura (durante un mínimo de 24 h) y posteriormente se cosechó y colocó en los recipientes de enriquecimiento.

Se realizaron cinco tratamientos de enriquecimiento por duplicado/triplicado con cuatro cepas de microalgas: *Chlorella sp*, *Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana (T-Iso)*, y el enriquecedor *Protein Selco*. El rotífero se inoculó en el cultivo de microalgas en cubos de 30 litros, con un tiempo de enriquecimiento de 24 horas, en una concentración de 5 millones de rotíferos/cubo, y con aireación constante por inyección de aire desde el fondo. El enriquecimiento se llevó a cabo en cámara isotérmica (20 - 22°C), con una intensidad luminosa de 200 - 500 lux y luz fluorescente permanente. Se utilizó agua de mar filtrada y esterilizada con una salinidad de 37 ‰. Un esquema del experimento se observa en la **Figura 17**.

El rotífero enriquecido, por los diferentes tratamientos, se suministró en una cantidad de 5 millones de rotíferos/día (en dos tomas, mañana y tarde) a los tanques de cultivo larvario los cuales tenían una densidad inicial de 50 - 70 larvas/l. Se controló la renovación diaria del agua, entre 20 - 30% tanque/día (manteniendo abierto el circuito entre 9:00 - 12:00 y 17:00 - 19:00 horas). Con el objeto de facilitar la inflación de vejiga, todos los tanques fueron provistos de un limpiador de superficie. Diariamente se limpiaron los tanques mediante sifonado y se efectuó recuento de larvas para establecer mortalidad.





**Figura 17.** Esquema del proceso de cultivo larvario en fase rotífero (1 – 22 dph)

### 3.6.2. EXPERIMENTO II: DETERMINACIÓN DE CONTENIDOS DE ÁCIDOS GRASOS DE LARVAS EN FASE DE ALIMENTACIÓN CON ARTEMIA – PRIMER AÑO

Se diseñó un experimento con larvas de dentón de 22 a 48 dph a las cuales se les suministró alimento vivo como metanauplios de *Artemia* enriquecidos con cuatro tipos de emulsiones experimentales ICES (International Council for the Exploration of the Sea). Los metanauplios de *Artemia* se utilizaron como vehículo de introducción de una serie de emulsiones enriquecedoras (elaboradas a partir de aceites de pescado) a las larvas de dentón. Finalmente se evaluó el contenido de lípidos y el perfil de ácidos grasos de la *Artemia*, su efecto sobre el contenido en lípidos y el perfil de ácidos grasos de las larvas de dentón, y también sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas.

**Enriquecimiento de *Artemia* EG**, los metanauplios recién eclosionados se colocaron en un cubo con agua de mar esterilizada a una densidad de 200 nauplios/ml. La dosis de enriquecedor fue de 0.6 g/l (se preparó disolviendo la cantidad requerida en 100 ml de aguas destilada) añadiéndola en dos tomas (cada 12 horas). Se mantuvo una temperatura de 28 °C, una aireación fuerte y una concentración de oxígeno disuelto superior a 4 mg/l. Los metanauplios enriquecidos se cosecharon a las 24 h, se lavaron bien y se añadieron en dos tomas (mañana y tarde) al tanque de cultivo larvario.

Los tratamientos se realizaron en tanques de 180 litros, con una densidad inicial de 54 larvas/tanque, la edad inicial media de 22 días y final de 48 días en el primer año (hasta 41 días en el segundo año). El circuito se mantuvo abierto de las 20 horas hasta las 8 horas y con aireación suave. Se le suministró alimento en una densidad de 3-5 *Artemia*/ml. Fotoperiodo de 12 horas luz: 12 horas oscuridad (apagado 20 h y encendido a las 8 h).

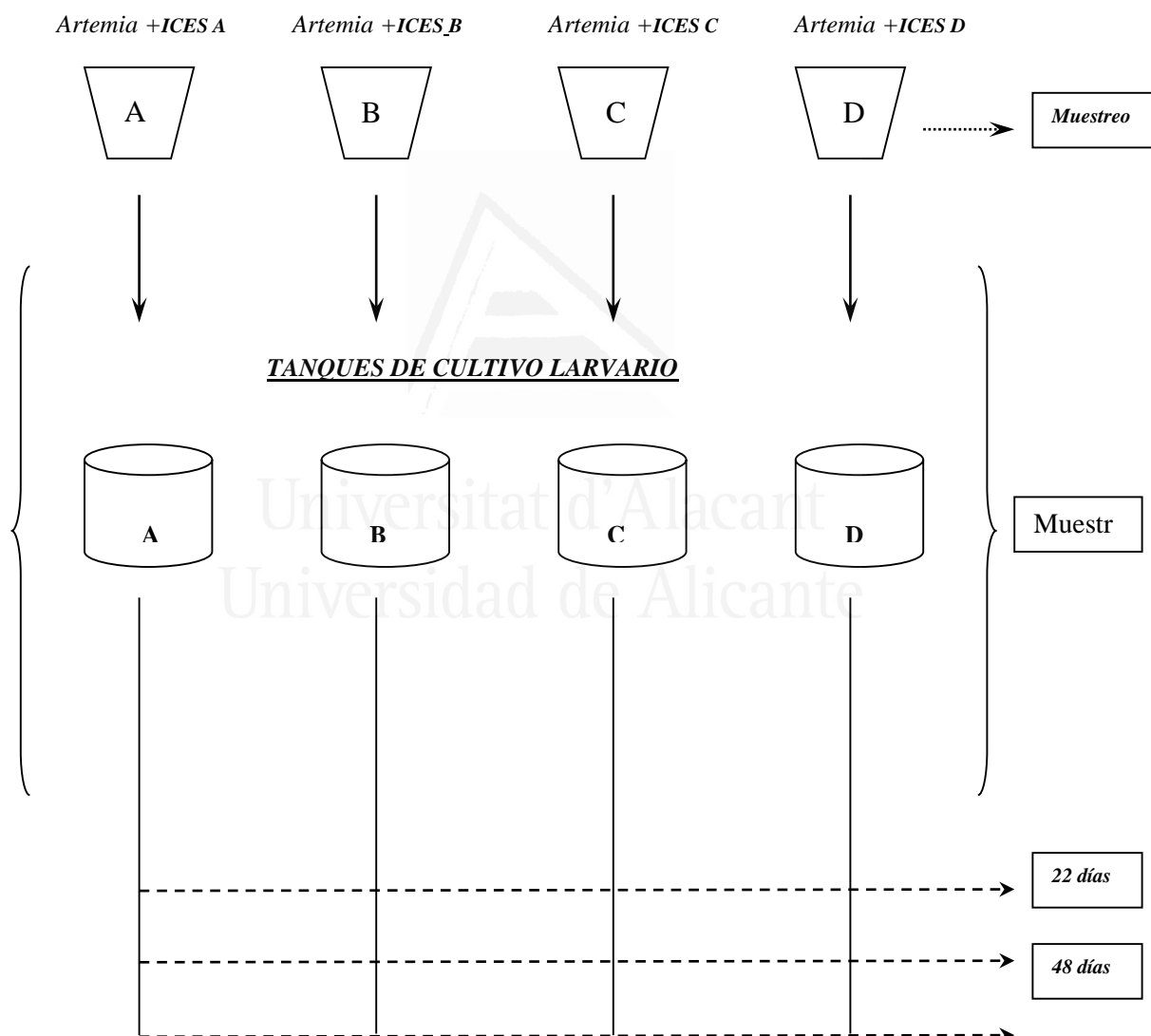
#### 3.6.2.1. Contenido en ácidos grasos de emulsiones, *Artemia* y larvas del primer año

En el primer año se realizó un bloque de pruebas con 4 emulsiones experimentales (ICES STD a la cual denominamos A, ICES 30/0.6/C denominada B, ICES 30/4/C denominada C e ICES 50/0.6/C denominada D) usadas como enriquecedores de *Artemia*. Se determinaron los contenidos de lípidos y los perfiles de ácidos grasos en las emulsiones ICES, en la *Artemia* enriquecida con dichas emulsiones, así como en las larvas alimentadas con los diferentes tratamientos de *Artemia*. Se evaluó también la influencia de los ácidos grasos sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas.

Estas emulsiones disponen de distintas relaciones DHA/EPA (**Tabla 12**), además contienen vitaminas, antioxidantes, preservantes, emulgentes y agua. En la **Figura 18** se esquematiza el experimento.

**Tabla 12.** Composición de las emulsiones ICES utilizadas en el experimento I.

	HUFA n-3 (como % del total de HUFA)	Proporción DHA/EPA	Clase de lípidos más abundantes
<b>STD (A)</b>	0	---	Triglicéridos
<b>30/0.6/C (B)</b>	30	0.6	Triglicéridos
<b>30/4/C (C)</b>	30	4	Triglicéridos
<b>50/0.6/C (D)</b>	60	0.6	Etilésteres

**Figura18.** Esquema del cultivo larvario en fase Artemia del primer año (22 – 48 dph).

### 3.6.3. EXPERIMENTO III: DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS EN LARVAS EN FASE DE ALIMENTACIÓN CON ARTEMIA – SEGUNDO AÑO

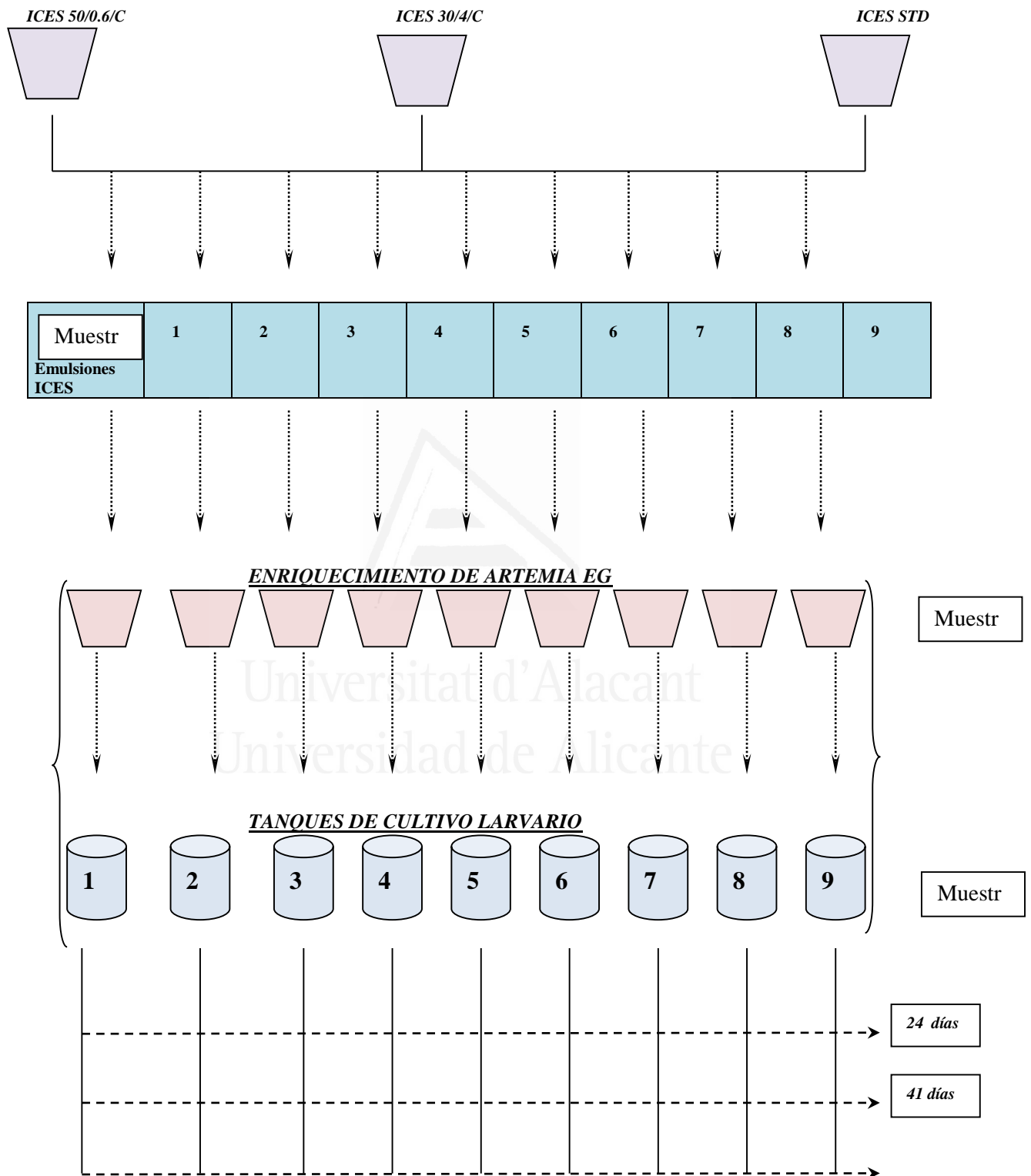
En el segundo año se realizó un experimento con larvas de dentón entre 24 y 41 dph sometidas a un bloque de ensayos con 9 tratamientos de enriquecimiento de *Artemia*, éstos fueron elaborados a partir de mezclas de 3 emulsiones base (ICES STD, ICES 30/4/C e ICES 50/0.6/C) incorporadas en diferentes proporciones. Las proporciones de los ácidos grasos DHA/EPA/ARA en las emulsiones base se muestran en la **Tabla 14**, y las proporciones de cada una de las emulsiones base en las 9 mezclas se indican en la **Tabla 15**. Se determinaron los contenidos de lípidos y los perfiles de ácidos grasos en cada una de las mezclas, en la *Artemia* enriquecida con dichas mezclas, así como en las larvas alimentadas con los diferentes tratamientos. Se evaluó también la influencia de los perfiles de ácidos grasos sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas. Un esquema del experimento se muestra en la **Figura 19**.

**Tabla 14.** Proporciones de ácidos grasos DHA, EPA y ARA en las emulsiones base

Emulsión	EPA (%)	DHA (%)	ARA (%)
30/4/C	7.2	23.6	1.3
50/0.6/C	31.3	28	0.3
STD/C	0.3	0.05	---

**Tabla 15.** Proporciones de emulsiones ICES en los tratamientos del Experimento III.

Emulsiones ICES	1	2	3	4	5	6	7	8	9
50/0.6/C (%)	100	80	60	40	20	0	60	30	0
30/4/C (%)	0	20	40	60	80	100	0	0	0
STD (%)	0	0	0	0	0	0	40	60	100

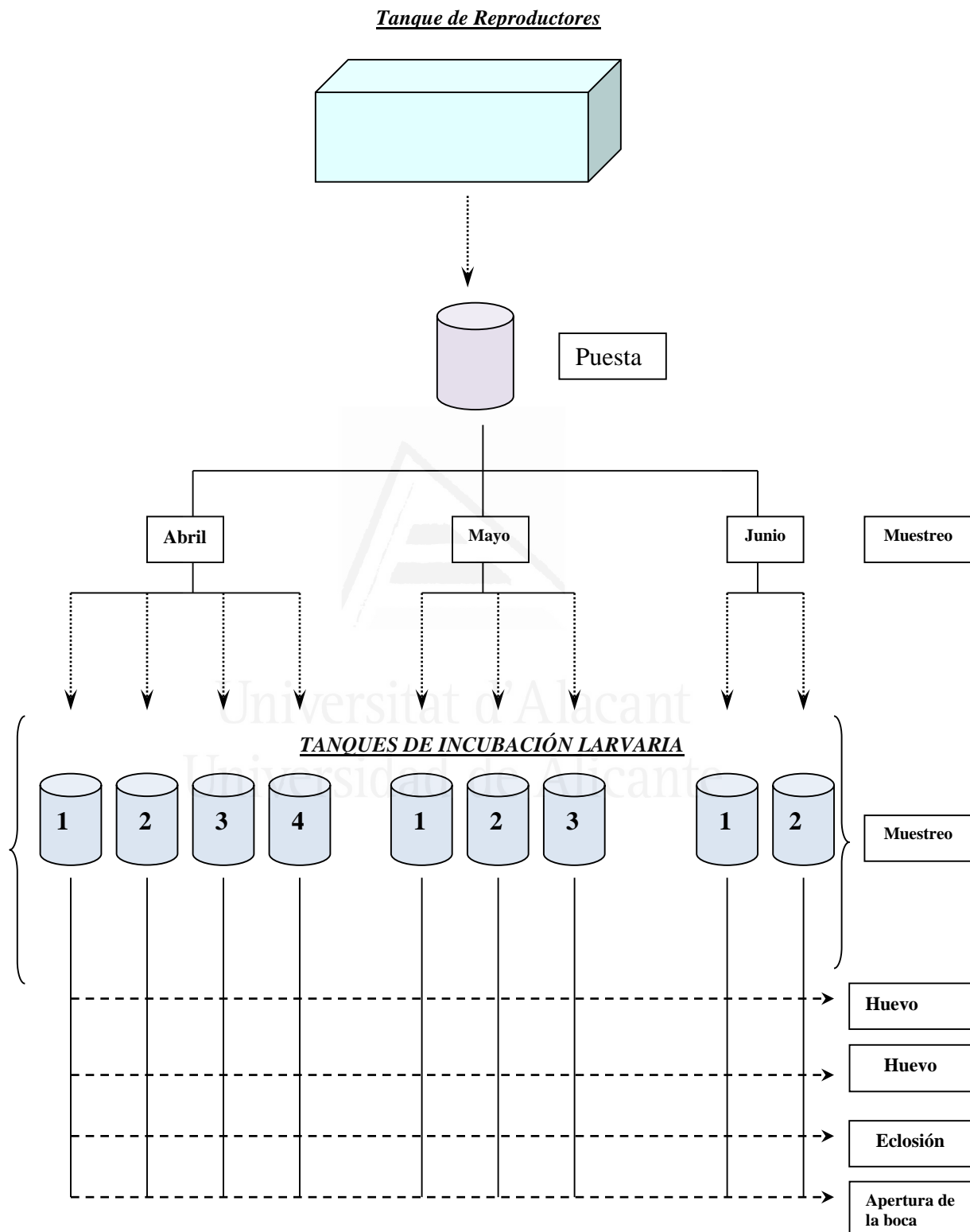


**Figura 19.** Esquema del cultivo larvario en fase Artemia del segundo año (24 – 41 dph).

#### 3.6.4. EXPERIMENTO IV: DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES DE ÁCIDOS GRASOS EN LOS ESTADIOS ENDOTRÓFICOS (DESDE HUEVO HASTA LARVAS CON APERTURA DE LA BOCA).

En el Experimento IV se utilizaron puestas provenientes de un lote de 50 reproductores del IEO – Planta de cultivos marinos de Murcia para estudiar la evolución del contenido de lípidos a través de las fases endotróficas (incluyendo los estadios de huevo, huevo embrionado, larva en eclosión y larva con apertura de la boca). Se determinaron los contenidos de ácidos grasos desde el huevo y durante el desarrollo embrionario y larvario hasta la apertura de la boca. Se recolectaron tres series de puestas consecutivas de los meses de abril, mayo y junio para evaluar su efecto sobre la calidad de huevos y sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas endotróficas.

Los huevos de estas series se incubaron llevando el cultivo larvario hasta la apertura de la boca (7 dph). Se colectaron varias series de muestras que incluían: huevo, huevo en fase de desarrollo embrionario, larvas en fase de eclosión y larvas en fase de apertura de la boca. La incubación se realizó en tanques de fibra de vidrio cilíndricos de 300 litros de capacidad y de color gris, a temperatura ambiente (14-20 °C), circuito de agua abierto, aireación suave, fotoperiodo de 12:12 horas con iluminación suave (500 lux) y salinidad de 37 ‰. Se controló diariamente temperatura y oxígeno disuelto, también se realizó sifonado diario de los tanques para prevenir acumulación de desechos y recolectar huevos y larvas muertos. En cada una de las series se tomaron muestras de huevo, huevo embrionado, larvas recién eclosionadas, y larvas con apertura de la boca. Un esquema del experimento se puede observar en la **Figura 20**.



**Figura 20.** Evolución del perfil de ácidos grasos desde huevo hasta larva con apertura de la boca.

### 3.7. MUESTREOS

#### 3.7.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE MICROALGAS

Para elaborar las curvas de crecimiento se tomaron diariamente muestras de las diferentes cepas de algas y en los diferentes volúmenes cultivados (6, 25 y 400 litros). Las muestras de algas destinadas a los análisis químicos se colectaron en la fase de crecimiento exponencial, sometiéndolas a continuación a ciclos de centrifugación, lavado y centrifugación para concentrar la biomasa de algas y retirar el exceso de sal. Finalmente se liofilizaron por 24-48 horas y se congelaron (-30 °C) para conservar las muestras hasta su análisis. Para dichos análisis se tomaron dos muestras de cada especie de alga (n = 2).

#### 3.7.2. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE ROTÍFERO

Para los análisis químicos se tomaron varias series de muestras: rotífero cultivado en levadura (24 horas), rotífero enriquecido con las diferentes cepas de algas y con el enriquecedor Protein-Selco® (24 horas). Para recolectar el rotífero se tamizaron las muestras mediante un salabre con diámetro de malla de 60  $\mu\text{m}$ , sometiéndolas a continuación a lavado con agua destilada para extraer el exceso de sal. Posteriormente se liofilizaron (por 24 a 48 horas, según volumen de la muestra) y congelaron (a -30°C) hasta la realización de los análisis químicos. Para dichos análisis se tomaron 2 réplicas de rotífero de cada tipo de tratamiento (n = 2).

#### 3.7.3. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE ARTEMIA

Se colectaron muestras de *Artemia* de los diferentes tratamientos: metanauplios de *Artemia* de la cepa EG sin enriquecer, y muestras de metanauplios sometidos a los diferentes tratamientos de enriquecimiento de los dos bloques (primer y segundo año). Las muestras se colectaron mediante un salabre con diámetro de malla de 100  $\mu\text{m}$  y a continuación se lavaron intensamente con agua destilada para retirar el exceso de sal. Finalmente se liofilizaron las muestras (24 a 48 horas) y se congelaron (-30 °C) hasta su posterior análisis químico. En este caso, se tomaron dos réplicas de *Artemia* de cada tratamiento (n = 2).

#### 3.7.4. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE LARVAS

Las muestras de larvas sometidas a alimentación con rotífero enriquecido se colectaron al final del experimento I, se midieron y pesaron, a continuación se lavaron en un salabre con agua destilada, finalmente se liofilizaron (24 a 48 horas) y se congelaron (-30°C) para su posterior análisis químico. Generalmente, para cada tratamiento de larvas se tomaron dos réplicas (n = 2).

Las muestras de larvas sometidas a alimentación con *Artemia* enriquecida durante los dos bloques de experimentación (Primer año y Segundo año) se colectaron al principio y final de sus respectivos bloques, se determinó presencia de vejiga natatoria (al inicio de la



prueba), se pesaron y midieron, seguidamente se lavaron en un salabre con agua destilada, finalmente se liofilizaron (24 a 48 horas) y congelaron (-30°C) para realizar los análisis químicos correspondientes a los experimentos II y III. El primer año las larvas se extrajeron el día 48 después de la eclosión y el segundo año se extrajeron el día 41. Se seleccionaron dos réplicas de larvas de cada tratamiento (n = 2).

Para realizar el experimento IV, se colectaron varias series de muestras que incluían: huevo, huevo en fase de desarrollo embrionario, larvas en fase de eclosión y larvas en fase de apertura de la boca. Se determinó el diámetro de huevo y de su gota de lípidos, a las larvas se les determinó longitud total, longitud y anchura del saco vitelino, y diámetro de la gota de lípidos. Las muestras se lavaron en un salabre con agua destilada, seguidamente se liofilizaron (24 - 48 horas) y congelaron (-30 °C) para realizar los análisis químicos correspondientes. De cada tratamiento de larvas se seleccionaron dos réplicas (n = 2).

### 3.8. TÉCNICAS ANALÍTICAS

Se realizaron análisis químicos de proteínas, lípidos totales y ácidos grasos presentes en las muestras de microalgas (*Chlorella sp*, *Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis suecica e Isochrysis galbana*), rotífero (*B. plicatilis*, con y sin enriquecimiento), *Artemia* (con y sin enriquecimiento), emulsiones enriquecedoras, levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), huevos y larvas en diferentes fases de evolución.

#### 3.8.1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD Y CENIZAS

**Humedad**, para determinación de humedad y peso seco, las muestras fueron sometidas a calentamiento en estufa a 110°C por 24-48 horas hasta peso constante.

**Cenizas**, posteriormente las muestras secas se sometieron a incineración en mufla a 450°C durante 24-48 horas hasta peso constante.

#### 3.8.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Se realizaron análisis de proteínas totales presentes en las diferentes muestras recolectadas, mediante el siguiente proceso.

La determinación proteínica se realizó mediante el método modificado de Lowry *et al.* 1951. El análisis se efectuó mediante colorimetría y tomando como referencia una curva patrón previamente establecida.

Reactivos utilizados:

Reactivo A = 1.3 g de Tartrato tetrahidratado de sodio y potasio (250 ml de agua destilada) + 0.5 g de CuSO<sub>4</sub>.

Reactivo B = 20 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (en 1 litro NaOH 0.1 N)

Reactivo C = 2.5 ml de A a 50 ml de B

Patrón de Albumina 0.2 – 1.2 mg/ml (mantenido a temperatura ambiente)

*Procedimiento:*

- Colocar 100  $\mu$ l de cada una de las muestras (diluidas convenientemente)
- Añadir 5 ml de Reactivo C y agitar en vórtex. Dejar 40 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.
- Añadir 0.5 ml de Reactivo Folin (diluido x 2). Agitar y esperar 25 minutos.
- Medir en espectrofotómetro a 595 nm.

### 3.8.3. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES

Se determinaron los lípidos presentes mediante el método de *Soxhlet*. Cada una de las muestras (por separado) se sometió a extracción mediante una batería extractora o destilador *Soxhlet* (**Figura 21**), cartucho extractor, rotavapor, matraz recolector, baño de maría y estufa), utilizando como disolvente éter dietílico por un periodo de 20 horas (la primeras 4 horas con velocidad de destilación de 4-5 gotas/seg y luego 16 horas con velocidad de destilación de 2-3 gotas/seg). Seguidamente se recoge el disolvente en el matraz y se destila para recuperar los lípidos extraídos. Posteriormente se secó la muestra en estufa, se enfrió y pesó. Finalmente se determinó la proporción de lípidos contenidos mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Grasa} = \frac{[G \times 100]}{M}$$

En donde:  $P_1$  = Peso del matraz (g);  $P_2$  = Peso del matraz + grasa obtenida (g);  $M$  = Peso de la muestra (g);  
 $G$  = Grasa obtenida =  $(P_2 - P_1)$ .



**Figura 21.** Extractor Soxhlet universal

### 3.8.4. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.

#### 3.8.4.1. Extracción

Eliminando previamente la humedad remanente en las muestras mediante liofilización, se procedió a la extracción mediante la técnica de Folch *et al.* 1957 modificada, con una mezcla de cloroformo-metanol (en la primera extracción en proporción 1:1 y 2:1 en la segunda extracción).

Se toma 1 gramo de muestra triturada para obtener 100 mg de lípidos en un tubo con 8 ml de una mezcla solvente cloroformo-metanol (1:1) y *BHT* (hidroxitolueno butilato; 20 mg/l), manteniéndolo en agitación en un vórtex por 1 min. Se taponó el tubo herméticamente colocándolo a baño maría (60 °C) durante 20 minutos. Posteriormente se añadieron 4 ml de cloroformo para que la mezcla adquiera una relación 2:1 cloroformo-metanol (manteniendo nuevamente en agitación en vórtex antes de filtrar mediante papel Wathman con poro menor de 45  $\mu$ m, lavando posteriormente tubo y embudo con la mezcla cloroformo-metanol 2:1. Se separa la fase lipídica con una solución KCl (4 ml de 0.1 M), dejándola en reposo por 8 horas/4 °C (se forman 3 capas: la de KCl hidrosoluble, la de oligopéptidos y la de lípidos). Con una pipeta Pasteur se eliminaron las capas de KCl y oligopéptidos. A la capa de lípidos se le agregó 1-1.5 g de sulfato sódico anhidro pasándola por un embudo con papel de filtro, lavando el tubo 2-3 veces con una mezcla cloroformo-metanol (2:1). Se guardó en atmósfera de nitrógeno a -20 °C y oscuridad hasta someterla a metilación.

#### 3.8.4.2. Metilación, análisis e identificación de muestras

La muestra se secó en baño a 40-50 °C en atmósfera de nitrógeno y se le agregó la mezcla metilante [300-400 ml de metanol: HCl (3 N) de Supelco] agitando en el vórtex. Calentando los tubos en estufa a 70-85 °C durante 1 hora. Se lavaron los ésteres metílicos con una mezcla hexano-agua bidestilada (2:1), agitando en el vórtex recuperando la fase orgánica con el hexano y los ésteres metílicos. Se guardó a -20 °C hasta el análisis (Stoffel *et al.* 1959).

*Análisis de las muestras:* se analizaron los ésteres metílicos con un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 con detector FID, un integrador 3390 A, y una columna semicapilar empaquetada SP-2380. Se utilizó el nitrógeno como gas transportador con un flujo de 2,5-5 ml/minuto. La identificación de picos se realizó con un patrón conocido (Sigma Chemical Co. **Tabla 15**). La concentración de cada tipo de ácido graso fue expresada en porcentaje del total y en cantidad sobre el peso seco de la muestra (g).

**Tabla 15.** Patrón de comparación en el análisis de las muestras.

<b>Fórmula</b>	<b>Nombre</b>
1. C 10:0	Ácido cáprico
2. C 12:0	Ácido láurico
3. C 13:0	Ácido tridecanoico
4. C 14:0	Ácido mirístico
5. C 15:0	Ácido pentadecanoico
6. C 16:0	Ácido palmítico
7. C 16:1n7	Ácido palmitoleico
8. C 18:0	Ácido esteárico
9. C 18:1n9	Ácido oleico
10. C 18:2n6	Ácido linoleico
11. C 18:3n6	Ácido $\gamma$ -linolénico
12. C 18:3n3	Ácido $\alpha$ -linolénico
13. C 20:1n9	Ácido eicosaenoico
14. C 20:2n6	Ácido eicosadienoico
15. C 20:3n6	Ácido eicosatrienoico
16. C 20:4n6	Ácido araquidónico
17. C 20:5n3	Ácido eicosapentaenoico
18. C 22:1n9	Ácido erúcico
19. C 22:6n3	Ácido docosahexaenoico
20. C 24:1n9	Ácido nervónico

### Programa de rampas utilizado

Se han utilizado 2 programas de tiempo o rampas diferentes para obtener una buena separación y cuantificación de los diferentes ácidos grasos:

- a) El primer tipo se utilizó para todas las muestras de cultivos auxiliares. La temperatura del inyector 220 °C y la del detector = 240 °C, la temperatura inicial de 110 °C se mantiene durante 10 minutos, incrementándola a continuación a 3 °C/minuto hasta alcanzar 160 °C, luego se incrementa a 4°C/minuto hasta 210 °C, permanece a esta temperatura durante 20 minutos para a continuación disminuir a 15 °C/minuto hasta alcanzar los 110 °C.
- b) El segundo tipo se utilizó para huevos y larvas. La temperatura del inyector = 220 °C, la del detector = 240 °C, la temperatura inicial 110 °C hasta alcanzar los 160°C, posteriormente se incrementó a 4 °C/minuto hasta los 210 °C, permaneció a esa temperatura durante 10 minutos para a continuación disminuir a 15 °C/minuto hasta alcanzar los 110 °C.

### 3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para realizar los análisis estadísticos de los resultados se utilizó el programa “Statgraphics Plus Vol.5.”

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  SD, indicando el número de réplicas. Los datos fueron sometidos al análisis de la varianza de una vía (ANOVA) para comparar las medias de los diferentes tratamientos y con ajuste estadísticamente significativo de  $p < 0.05$ . Posteriormente se realizó el test Fisher para determinar la existencia de diferencias significativas entre las medias y test de rangos múltiples para establecer cuáles medias eran significativamente diferentes de otras, estas diferencias se señalaron en las tablas de resultados por medio de letras minúsculas (a, b, c, d ...) colocadas a la derecha de los valores numéricos.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 4. RESULTADOS

### 4.1. INTRODUCCIÓN.

Los resultados se han organizado en los siguientes apartados, de acuerdo con los objetivos y el diseño experimental.

- El apartado inicial presenta los resultados concernientes al **Experimento I** sobre el cultivo de larvas en fase rotífero. Incluye los perfiles de ácidos grasos de las 4 especies de microalgas y del enriquecedor P-S®, y las curvas de crecimiento de las diferentes especies de microalgas. También presenta los perfiles de ácidos grasos de los rotíferos enriquecidos con las especies de microalgas y P-S. Por último, incluye los perfiles de ácidos grasos de las larvas en fase de alimentación con rotífero y los parámetros biológicos que reflejan el crecimiento de dichas larvas.
- Los dos siguientes apartados presenta los resultados de los **Experimentos II y III** correspondientes al cultivo larvario en fase de alimentación con *Artemia*. En ellos se indican los perfiles de ácidos grasos de las emulsiones, *Artemia* enriquecida y larvas de todos los tratamientos. También incluye los parámetros biológicos que describen el crecimiento de las larvas de los diferentes tratamientos
- El último apartado presenta los resultados del **Experimento IV** que estudia la evolución de los perfiles de ácidos grasos durante los diferentes estadios de las fases endotróficas (huevo, huevo en embrión, larva eclosionada y larva con apertura de la boca). Incluye los perfiles de ácidos grasos y los parámetros biométricos que describen la evolución de los diferentes estadios endotróficos. También presenta las comparaciones entre los perfiles de ácidos grasos de los estadios endotróficos con los perfiles de las larvas en fase de alimentación con rotífero y fase de alimentación con *Artemia*.

### 4.2. EXPERIMENTO I – DETERMINACIÓN DE PERFILES DE ÁCIDOS GRASOS EN LARVAS EN FASE DE ALIMENTACIÓN CON ROTÍFERO

Para el experimento se emplearon larvas de dentón de 1-22 dph sometidas a cinco tratamientos de alimentación con rotífero enriquecido con cuatro microalgas y el enriquecedor Protein-Selco. En este apartado se incluyen los contenidos de ácidos grasos en microalgas y el enriquecedor P-S (**Tabla 16 y Figura 22**), las curvas de crecimiento de las cuatro especies de microalgas (**Figuras 23 a 26 y Tabla 17**) y los contenidos de ácidos grasos en el rotífero de los diferentes tratamientos (**Tabla 18 y Figura 27**), también incluye los contenidos de ácidos grasos en las larvas alimentadas con dichos rotíferos (**Tabla 19 y Figura 28**) y los parámetros biológicos que evalúan el efecto de los diferentes tratamientos sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas (**Tabla 20, Figuras 29 y 30**).

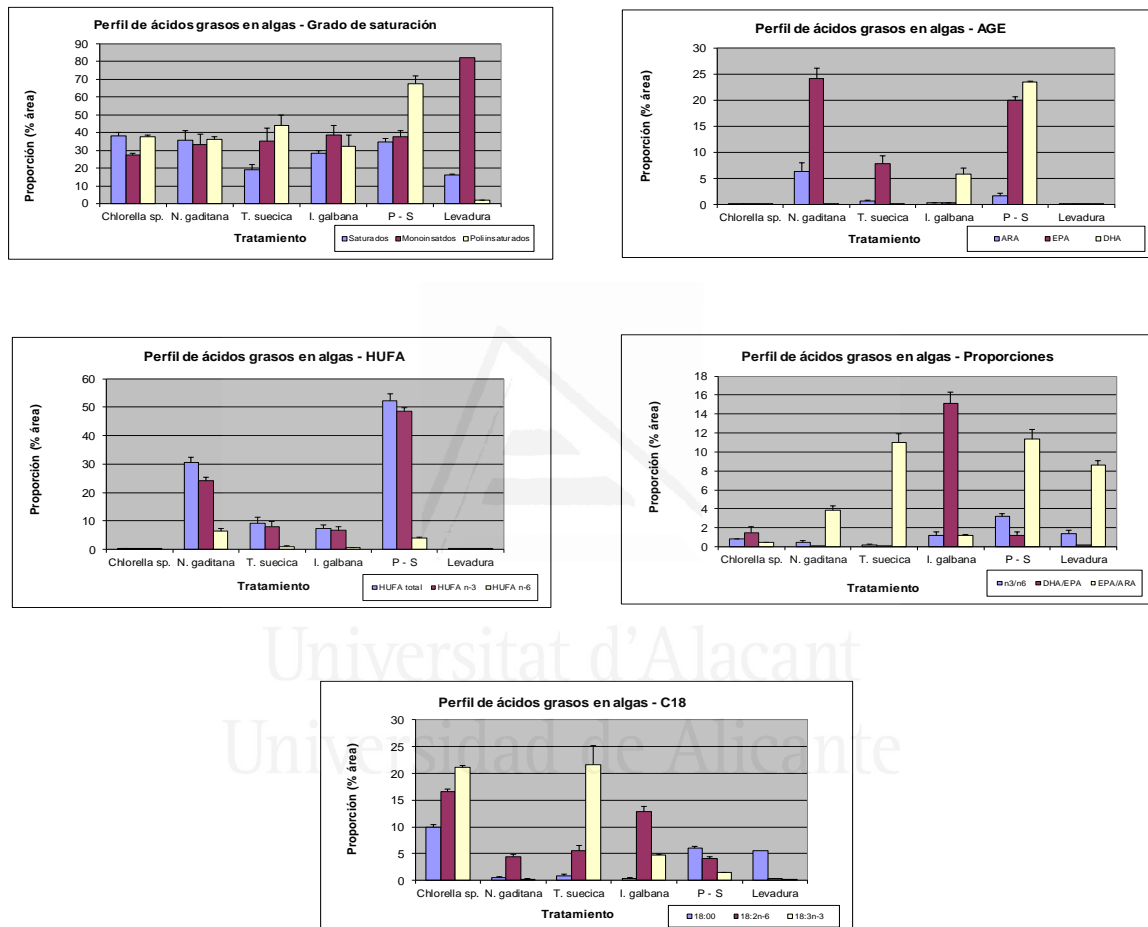
## 4.2.1. Tabla y diagramas de los perfiles de ácidos grasos de microalgas y Protein-Selco

**Tabla 16.** Perfiles de ácidos grasos de las cuatro especies de microalgas, del enriquecedor Protein – Selco y la levadura de panificación.

Ácido graso	<i>Chlorella sp.</i>	<i>N. gaditana</i>	<i>T. suecica</i>	<i>I. galbana</i>	P-S	Levadura
C14:0	0.54±0.10 <sup>c</sup>	4.83±1.71 <sup>b</sup>	0.88±0.48 <sup>c</sup>	15.78±1.37 <sup>a</sup>	3.8±0.3 <sup>b</sup>	
C14:1	0.03±0.02 <sup>a</sup>	0.41±0.25 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.08±0.03 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>
C15:0	0.035±0.01 <sup>b</sup>	0.12±0.1 <sup>b</sup>	0.14±0.16 <sup>b</sup>	0.41±0.03 <sup>a</sup>	1.0±0.02 <sup>b</sup>	0.01±0 <sup>b</sup>
C16:0	22.15±0.9 <sup>ab</sup>	24.5±7.4 <sup>a</sup>	17.3±3.32 <sup>b</sup>	11.76±0.9 <sup>c</sup>	22.8±1.8 <sup>ab</sup>	9.63±0.23 <sup>d</sup>
C16:1n-11	0.0	0.06±0.05	0.0	0.0	0.35±0.01	0.08
C16:1n-9	0.59±0.05 <sup>a</sup>	0.07±0.04 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.2±0.01 <sup>ab</sup>	0.38 <sup>ab</sup>
C16:1n-7	1.54±0.14 <sup>d</sup>	24.15±2.7 <sup>b</sup>	2.06±0.66 <sup>d</sup>	5.9±0.57 <sup>c</sup>	3.5±0.03 <sup>b</sup>	42.5±0.5 <sup>a</sup>
C16:2n-7	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>	1.31±0.27 <sup>a</sup>	0.81±0.18 <sup>b</sup>	0.5±0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>
C17:0	2.02±0.16 <sup>a</sup>	0.24±0.03 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>	1.2±0.04 <sup>c</sup>	0.56±0.03 <sup>b</sup>
C18:0	9.9±0.50 <sup>a</sup>	0.54±0.10 <sup>cd</sup>	0.81±0.29 <sup>cd</sup>	0.32±0.15 <sup>d</sup>	6.0±0.3 <sup>b</sup>	5.6±0.4 <sup>b</sup>
C18:1n-9	22.79±0.59 <sup>b</sup>	6.45±1.6 <sup>c</sup>	19.7±9.71 <sup>b</sup>	16.9±2.8 <sup>b</sup>	30.2±1.4 <sup>ab</sup>	38.4±0.4 <sup>a</sup>
C18:2n-6	16.59±0.42 <sup>a</sup>	4.4±0.53 <sup>c</sup>	5.6±0.94 <sup>c</sup>	12.8±1.02 <sup>b</sup>	4.1±0.3 <sup>c</sup>	0.28±0.06 <sup>d</sup>
C18:3n-6	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.73±0.09 <sup>b</sup>	2.93±0.70 <sup>a</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>
C18:3n-3	21.1±0.27 <sup>a</sup>	0.2±0.07 <sup>c</sup>	21.6±3.57 <sup>a</sup>	4.73±0.18 <sup>b</sup>	1.4±0.1 <sup>bc</sup>	0.1±0 <sup>c</sup>
C18:4n-3	0.0	0.03±0.01	5.01±2.9	3.31±4.85	2.7±0.5	0.01±0
C18:3n-9	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.54±0.4 <sup>a</sup>	0.16±0.14 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>
C19:0	3.44±0.41	5.5±1.7	0.0	0.0	3.8±0.3	1.26±0.1
C20:1n-9	0.0 <sup>d</sup>	0.16±0.03 <sup>c</sup>	13.0±6.1 <sup>a</sup>	12.59±4.92 <sup>a</sup>	1.8±0.5 <sup>b</sup>	0.17±0.06 <sup>c</sup>
C20:3n-6	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.06±0.02 <sup>ab</sup>	0.11±0.09 <sup>a</sup>	0.35±0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>
C20:4n-3	0.0	0.03±0.01	0.0	0.0	1.1±0.1	0.08
C22:1n-9	0.0 <sup>c</sup>	0.56±0.34 <sup>a</sup>	0.55±0.14 <sup>a</sup>	0.3±0.05 <sup>b</sup>	0.27±0.03 <sup>b</sup>	0.01±0 <sup>bc</sup>
C22:4n-3	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.16±0.2 <sup>b</sup>	0.36±0.07 <sup>a</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>
C22:5n-3	0.05±0.01 <sup>bc</sup>	0.11±0.03 <sup>b</sup>	0.09±0.08 <sup>bc</sup>	0.03±0.03 <sup>c</sup>	2.9±0.4 <sup>a</sup>	0.0 <sup>d</sup>
C20:4n-6 (ARA)	0.09±0.0 <sup>c</sup>	6.34±1.73 <sup>a</sup>	0.71±0.16 <sup>c</sup>	0.32±0.07 <sup>c</sup>	1.75±0.5 <sup>b</sup>	0.03±0 <sup>c</sup>
C20:5n-3 (EPA)	0.04±0.03 <sup>d</sup>	24.14±2.1 <sup>a</sup>	7.8±1.6 <sup>c</sup>	0.39±0.06 <sup>d</sup>	20±0.7 <sup>b</sup>	0.26±0.07 <sup>d</sup>
C22:6n-3 (DHA)	0.06±0.02 <sup>c</sup>	0.04±0.02 <sup>c</sup>	0.08±0.01 <sup>c</sup>	5.93±1.1 <sup>b</sup>	23.5±0.2 <sup>a</sup>	0.056±0 <sup>c</sup>
<b>Saturados</b>	38.1±1.83 <sup>a</sup>	35.79±5.29 <sup>a</sup>	19.0±2.96 <sup>c</sup>	28.3±1.74 <sup>b</sup>	34.8±1.8 <sup>a</sup>	16.1±0.56 <sup>c</sup>
<b>Monoinsaturados</b>	27.4±0.81 <sup>c</sup>	33.4±5.92 <sup>c</sup>	35.3±14.72 <sup>b</sup>	38.7±5.43 <sup>b</sup>	37.9±3.2 <sup>b</sup>	82.1±0.35 <sup>a</sup>
<b>Poliinsaturados</b>	37.9±0.62 <sup>c</sup>	36.3±1.28 <sup>c</sup>	43.96±12.17 <sup>b</sup>	32.3±6.06 <sup>c</sup>	67.3±4.7 <sup>a</sup>	1.82±0.2 <sup>d</sup>
<b>HUFA total</b>	0.23±0.07 <sup>d</sup>	30.6±1.98 <sup>b</sup>	9.2±2.17 <sup>c</sup>	7.45±1.13 <sup>c</sup>	52.4±2.3 <sup>a</sup>	0.2±0.03 <sup>d</sup>
<b>HUFA n-3</b>	0.15±0.06 <sup>d</sup>	24.3±1.26 <sup>b</sup>	8.1±1.82 <sup>c</sup>	6.7±1.24 <sup>cd</sup>	48.5±1.2 <sup>a</sup>	0.17±0.04 <sup>d</sup>
<b>HUFA n-6</b>	0.08±0.03	6.35±1	1.09±0.2	0.74±0.05	3.9±0.3	0.03±0
<b>Total n-9</b>	23.4±0.54 <sup>ab</sup>	7.24±2.9 <sup>b</sup>	33.8±15.65 <sup>a</sup>	32.9±5.70 <sup>a</sup>	15.75±0.8 <sup>b</sup>	39±0.1 <sup>a</sup>
<b>Total n-7</b>	3.58±0.3 <sup>d</sup>	24.25±2.59 <sup>b</sup>	3.36±0.9 <sup>d</sup>	6.7±0.40 <sup>c</sup>	5.8±0.6 <sup>c</sup>	42.5±0.5 <sup>a</sup>
<b>Total n-6</b>	16.68±0.41 <sup>a</sup>	10.77±2.2 <sup>b</sup>	7.4±1.37 <sup>c</sup>	16.5±0.98 <sup>a</sup>	9.3±1.2 <sup>b</sup>	0.3±0 <sup>d</sup>
<b>Total n-3</b>	21.2±0.21 <sup>c</sup>	24.54±5.1 <sup>c</sup>	34.69±10.93 <sup>b</sup>	14.75±5.59 <sup>d</sup>	30.14±6.7 <sup>a</sup>	0.99±0.03 <sup>e</sup>
<b>n3/n6</b>	0.79±0.01 <sup>b</sup>	0.48±0.14 <sup>bc</sup>	0.22±0.03 <sup>c</sup>	1.23±0.34 <sup>b</sup>	3.25±0.2 <sup>a</sup>	1.4±0.36 <sup>b</sup>
<b>n3/n9</b>	0.91±0.01 <sup>b</sup>	5.47±3.91 <sup>a</sup>	1.47±1.21 <sup>b</sup>	0.49±0.30 <sup>b</sup>	1.9±0.6 <sup>b</sup>	0.01±0.0 <sup>d</sup>
<b>DHA/EPA</b>	1.5±0.6 <sup>b</sup>	0.002±0.0 <sup>c</sup>	0.01±0.0 <sup>c</sup>	15.13±1.16 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>b</sup>	0.22±0.04 <sup>c</sup>
<b>EPA/ARA</b>	0.44±0	3.81±0.5	10.98±0.9	1.2±0.1	11.4±1	8.6±0.01
<b>EPA/C18:3n-3</b>	0.002±0	120.7±2	0.36±0.01	0.08±0	14.3±0.5	3.3±0.3

Los resultados se expresan en % de área del total de ácidos grasos y representan la media ± SD de las muestras. Las letras a-e expresan diferencias significativas entre las medias (n=2, ANOVA, test de Fisher  $p < 0.05$  y test de rangos múltiples).

La **Figura 22** permite visualizar los principales tipos de ácidos grasos encontrados en microalgas y Protein-Selco, estos ácidos se discriminan por grupos según el grado de saturación, presencia de AGE, HUFA, C18 y las proporciones entre los ácidos grasos.



**Figura 22.** Diagramas de barras de los perfiles de ácidos grasos de microalgas y P – S. Las barras representan los valores de las medias + SD.

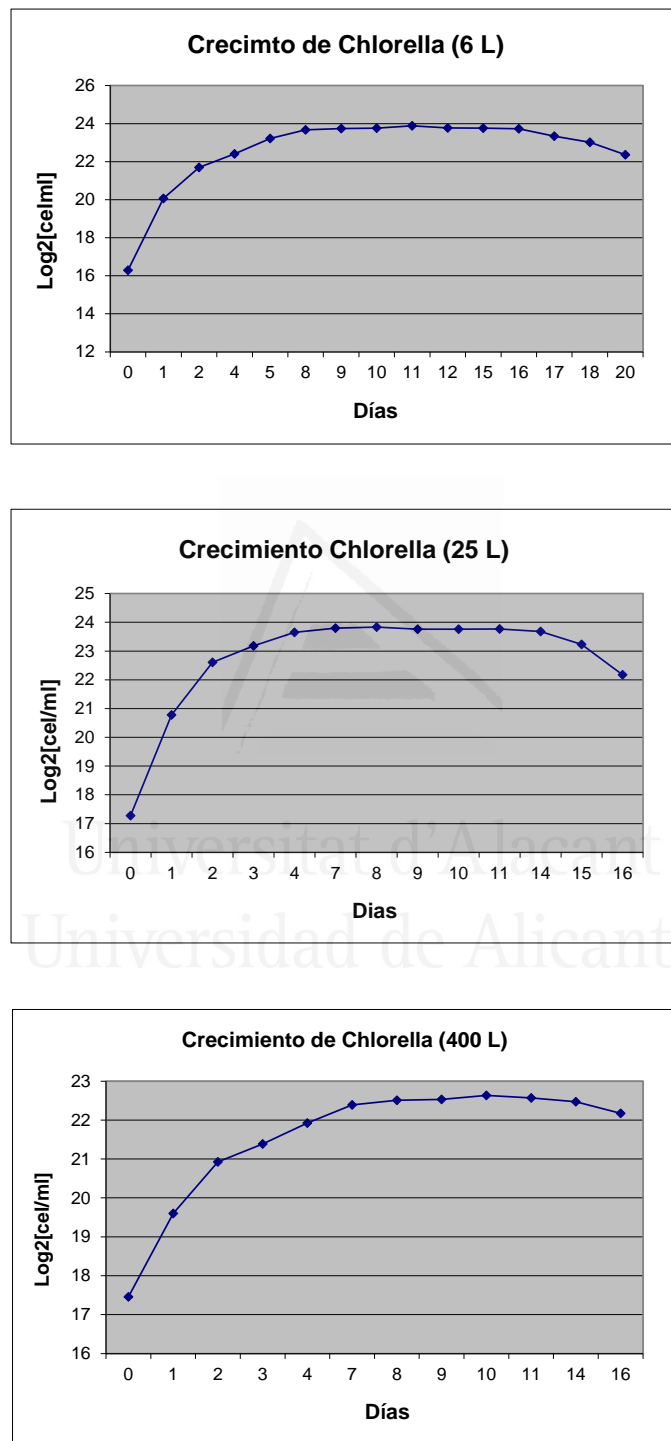
De acuerdo con la **Tabla 16** y la **Figura 22** encontramos que: En *Chlorella sp.* los principales ácidos grasos son 16:0, 18:0, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3 (que en conjunto representan el 92,4%) y carece de AGE. En *N. gaditana* encontramos altos contenidos de 16:0, 16:1n-7, ARA, y EPA, pero sólo en ARA, EPA, HUFA, HUFA n-3 y las proporción n3/n9 presenta niveles significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) con respecto a las otras microalgas. En *T. suecica* encontramos altos niveles de 16:0, 18:1n-9, 20:1n-9 y 18:3n-3; y entre los AGE destaca sólo el EPA que presenta contenidos significativamente superiores



( $p < 0.05$ ) a los de *I. galbana* y *Chlorella sp.*; mientras que ARA y DHA aparecen sólo a nivel de trazas. En *I. galbana* encontramos altos contenidos de 14:0, 16:0, 18:1n-9, 18:2n-6y 20:1n-9; entre los AGE destaca sólo el DHA y la proporción DHA/EPA que son significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) a los del resto de tratamientos con microalgas; el **enriquecedor P-S** presenta contenidos significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) de DHA, EPA, poliinsaturados, HUFA y HUFA n-3 con respecto a los niveles de las microalgas. Entre el conjunto de tratamientos con microalgas y P-S no se observaron grandes variaciones a nivel de saturados, monoinsaturados, poliinsaturados con la excepción de un mínimo de saturados en *T.suecica* y un máximo de poliinsaturados en P-S; sin embargo, a nivel HUFA, HUFA n-3, DHA y EPA el enriquecedor P-S tiene diferencias significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) con respecto a las microalgas.

Refiriéndonos solo a las microalgas encontramos que algunas de ellas presentan concentraciones similares en varios tipos de ácidos grasos. Así, entre *Chlorella sp.* y *T. suecica* hay similitudes en los contenidos de 16 tipos de ácidos grasos entre los cuales están ARA, DHA, poliinsaturados y total de n3; entre *Chlorella sp.* y *N. gaditana* encontramos similitudes en 13 tipos de ácidos grasos entre los que tenemos DHA, saturados, monoinsaturados, poliinsaturados, total de n-3 y proporción n3/n6; entre *N. gaditana* y *T. suecica* existen similitudes en 11 ácidos grasos incluyendo DHA, poliinsaturados, total de n3 y proporciones n3/n6 y DHA/EPA; y entre *T.suecica* e *I. galbana* hay similitudes en 11 ácidos grasos incluyendo ARA, monoinsaturados, HUFA y HUFA n-3.

4.2.2. Curvas de crecimiento de las microalgas utilizadas. *Chlorella sp.*, *N. ganitana*, *T. suecica* e *I. galbana*. Las curvas se representan mediante el log 2 del número de células/ml (y) frente a días de cultivo (x) para los tres volúmenes de cultivo 6, 25 y 400 litros.

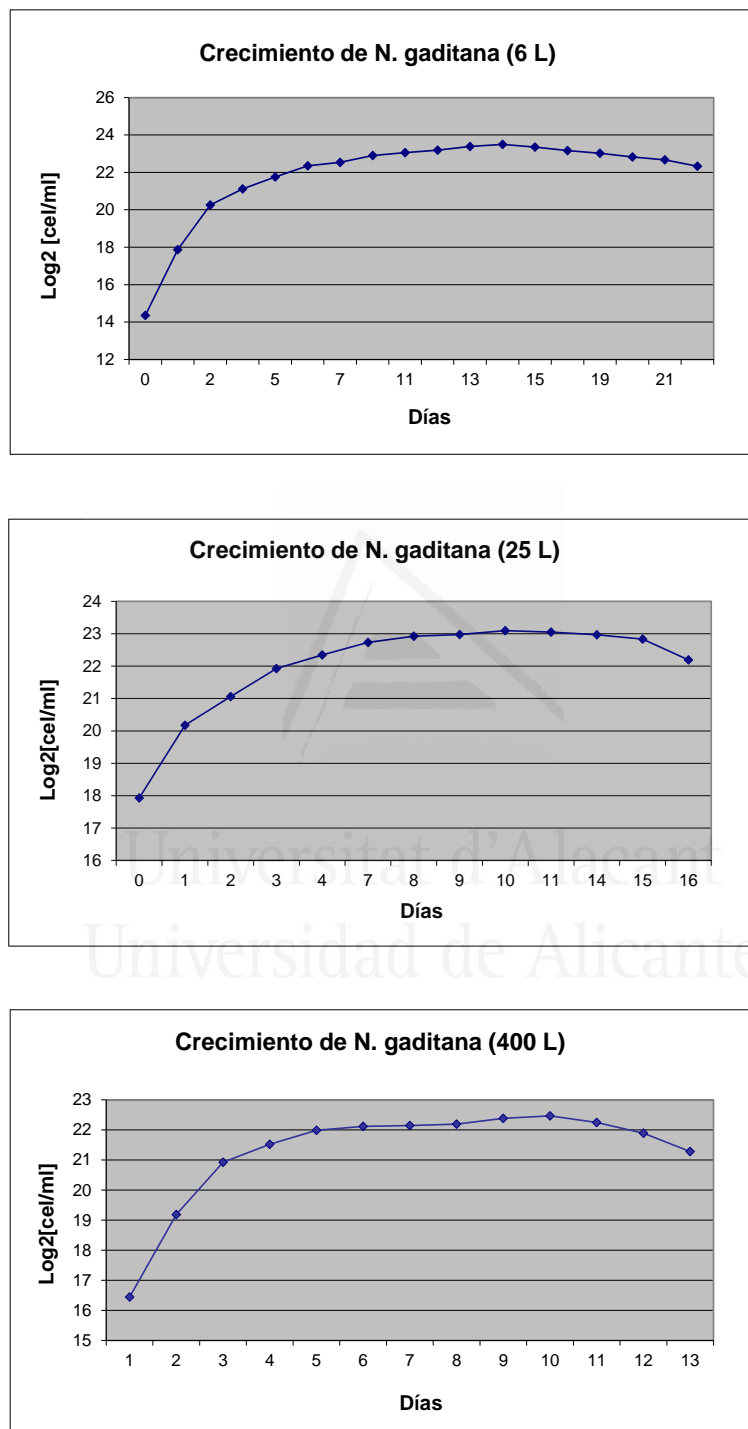


**Figura 23.** Curvas de crecimiento de *Chlorella* sp. Para volúmenes de 6, 25 y 400 litros.

Para *Chlorella sp.* se incluyen las curvas de crecimiento exponencial para los diferentes volúmenes cultivados (**Figura 23**). Así, para volúmenes de 6, 25 y 400 litros se obtuvieron ciclos de crecimiento entre 16 y 20 días. En *Chlorella sp.* se observó una relación inversa entre la concentración y el volumen de cultivo, es decir una tendencia a disminuir la concentración máxima alcanzada en la medida en que aumentó el volumen Cultivado. Así, para un volumen de 6 litros se alcanzó una concentración máxima de  $15,4 \times 10^6$  cel/ml, al aumentar el volumen a 25 litros la concentración máxima alcanzó  $14,9 \times 10^6$  cel/ml, y finalmente para un volumen de 400 litros la concentración máxima sólo alcanzó  $6,5 \times 10^6$  cel/ml.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

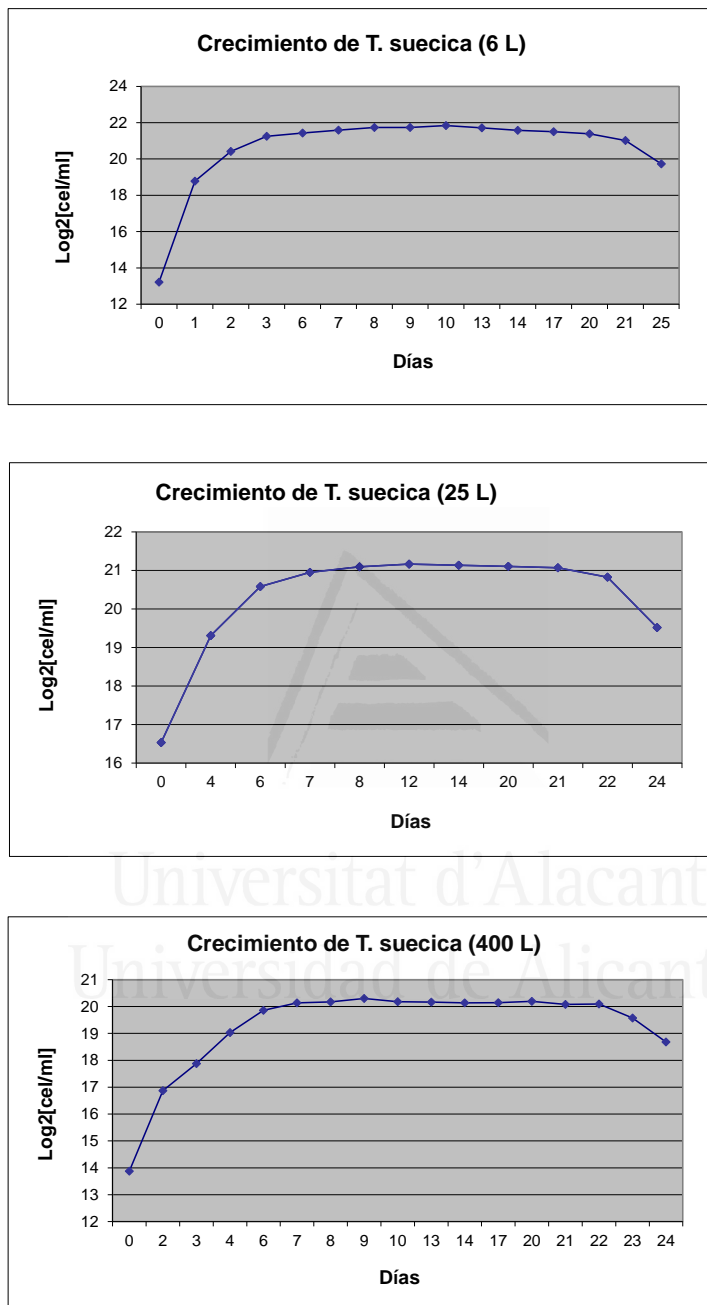


**Figura 24.** Curvas de crecimiento de *N. gaditana* para volúmenes de 6, 25 y 400 litros.

Para *N. gaditana* se incluyen las curvas de crecimiento exponencial para los diferentes volúmenes cultivados (**Figura 24**). Los ciclos de crecimiento para volúmenes de 6, 25 y 400 litros se completaron en periodos entre 16 y 25 días. Al igual que en *Chlorella*, en *N. gaditana* se observó una relación inversa entre la concentración y el volumen de cultivo. Así, para un volumen de 6 litros se alcanzó una concentración máxima de  $11,8 \times 10^6$  cel/ml, al aumentar el volumen a 25 litros la concentración máxima alcanzó  $8,9 \times 10^6$  cel/ml, y finalmente para un volumen de 400 litros la concentración máxima sólo alcanzó  $5,7 \times 10^6$  cel/ml.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

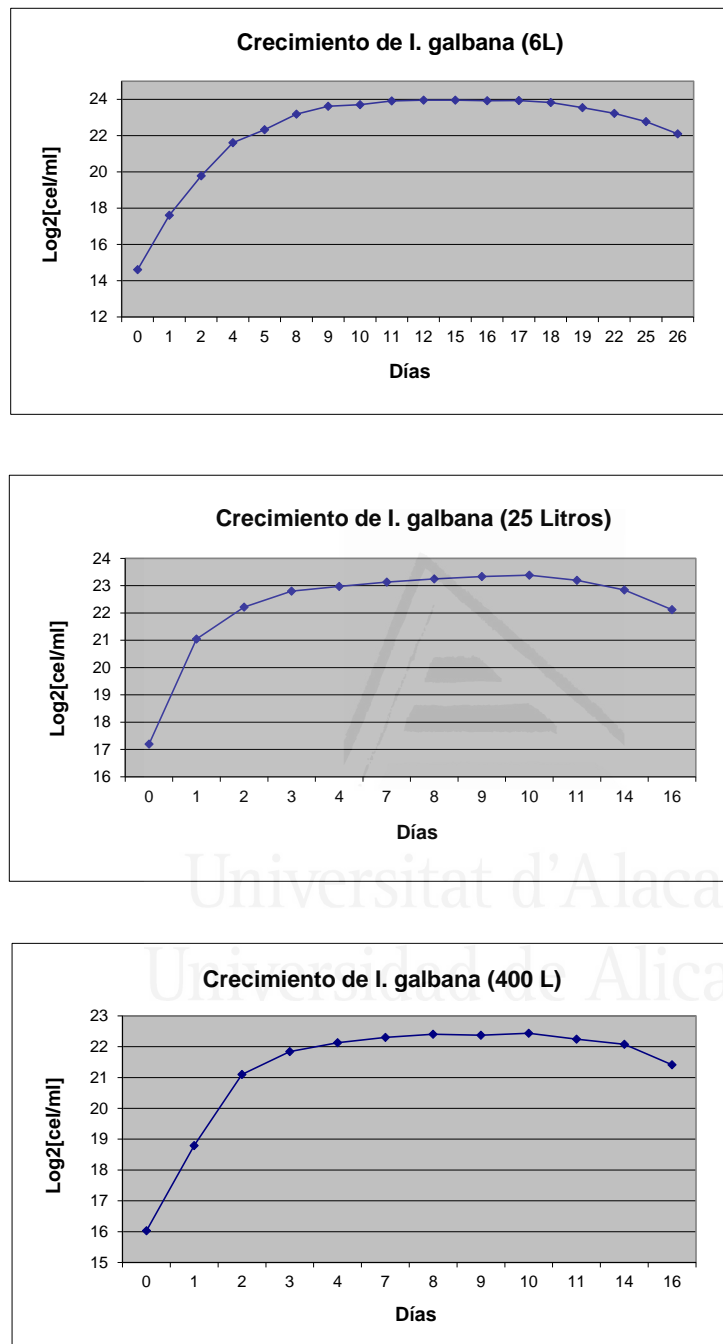


**Figura 25.** Curvas de crecimiento de *T. suecica* para volúmenes de 6, 25 y 400 litros.

Para *T. suecica* se obtuvieron curvas de crecimiento exponencial para los diferentes volúmenes cultivados (**Figura 25**). Los ciclos de crecimiento para volúmenes de 6, 25 y 400 litros se completaron en periodos entre 24 y 25 días. En *T. suecica* también se encontró una relación inversa entre la concentración y el volumen de cultivo. Así, para un volumen de 6 litros se alcanzó una concentración máxima de  $3,76 \times 10^6$  cel/ml. Al aumentar el volumen a 25 litros la concentración máxima alcanzó  $2,35 \times 10^6$  cel/ml, y finalmente para un volumen de 400 litros la concentración máxima sólo alcanzó  $1,29 \times 10^6$  cel/ml.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



**Figura 26.** Curvas de crecimiento de *I. galbana* para volúmenes de 6, 25 y 400 litros.



Se obtuvieron curvas de crecimiento exponencial de los diferentes volúmenes cultivados de *I. galbana* (Figura 26). Los ciclos de crecimiento para los volúmenes de 6, 25 y 400 litros se completaron entre 16 y 25 días. En *I. galbana* también se observó una relación inversa entre la concentración y el volumen de cultivo. Así, en *I. galbana* y para un volumen de 6 litros se alcanzó una concentración máxima de  $16,3 \times 10^6$  cel/ml, al aumentar el volumen a 25 litros la concentración máxima alcanzó  $10,9 \times 10^6$  cel/ml, y finalmente para un volumen de 400 litros la concentración máxima sólo alcanzó  $5,6 \times 10^6$  cel/ml.

**Tabla 17.** Rangos de concentraciones de células alcanzadas por las diferentes especies de microalgas para los tres volúmenes cultivados.

Tratamiento		6 litros (cel/ml)	25 litros (cel/ml)	400 litros (cel/ml)
<i>Chlorella sp.</i>	C. inicial	0.08x10 <sup>6</sup>	0.159x10 <sup>6</sup>	0.18x10 <sup>6</sup>
	C. máxima	15.46x10 <sup>6</sup>	14.9x10 <sup>6</sup>	6.5x10 <sup>6</sup>
	C. final	5.4x10 <sup>6</sup>	4.7x10 <sup>6</sup>	3.25x10 <sup>6</sup>
<i>N. gaditana</i>	C. inicial	0.021x10 <sup>6</sup>	0.25x10 <sup>6</sup>	0.089x10 <sup>6</sup>
	C. máxima	11.8x10 <sup>6</sup>	8.9x10 <sup>6</sup>	5.7x10 <sup>6</sup>
	C. final	5.27x10 <sup>6</sup>	4.8x10 <sup>6</sup>	2.55x10 <sup>6</sup>
<i>T. suecica</i>	C. inicial	0.009x10 <sup>6</sup>	0.095x10 <sup>6</sup>	0.015x10 <sup>6</sup>
	C. máxima	3.7x10 <sup>6</sup>	2.35x10 <sup>6</sup>	1.29x10 <sup>6</sup>
	C. final	0.87x10 <sup>6</sup>	0.75x10 <sup>6</sup>	0.42x10 <sup>6</sup>
<i>I. galbana</i>	C. inicial	0.025x10 <sup>6</sup>	0.15x10 <sup>6</sup>	0.067x10 <sup>6</sup>
	C. máxima	16.3x10 <sup>6</sup>	10.9x10 <sup>6</sup>	5.6x10 <sup>6</sup>
	C. final	4.5x10 <sup>6</sup>	3.48x10 <sup>6</sup>	2.8x10 <sup>6</sup>

En resumen se puede afirmar que en las cuatro especies de microalgas cultivadas se observó una relación inversa entre la concentración máxima de células y el volumen de cultivo, es decir una tendencia a disminuir la concentración máxima alcanzada por cada una de las especies en la medida en que aumentaron los volúmenes cultivados. Así, las especies de algas alcanzaron su mayor concentración cuando se cultivaron en balones de 6 litros, concentraciones intermedias para volúmenes de 25 litros y las concentraciones mínimas se encontraron en volúmenes de 400 litros; es decir, que la concentración de algas esta en función de la intensidad de luz recibida. Las muestras de *Chlorella sp.* e *I. galbana*

fueron las que mayores concentraciones alcanzaron, mientras que la muestra de *T. suecica* fue la que alcanzó las concentraciones mínimas (para los tres volúmenes de cultivo 6, 25 y 400 litros). Por último, se debe indicar que para hacer las curvas de crecimiento de los cultivos de microalgas se decidió tomar como parámetro el logaritmo en base dos ( $\log_2$ ) de la concentración en cel/ml contra días de cultivo para facilitar la posterior comparación con los resultados de otros autores consultados.



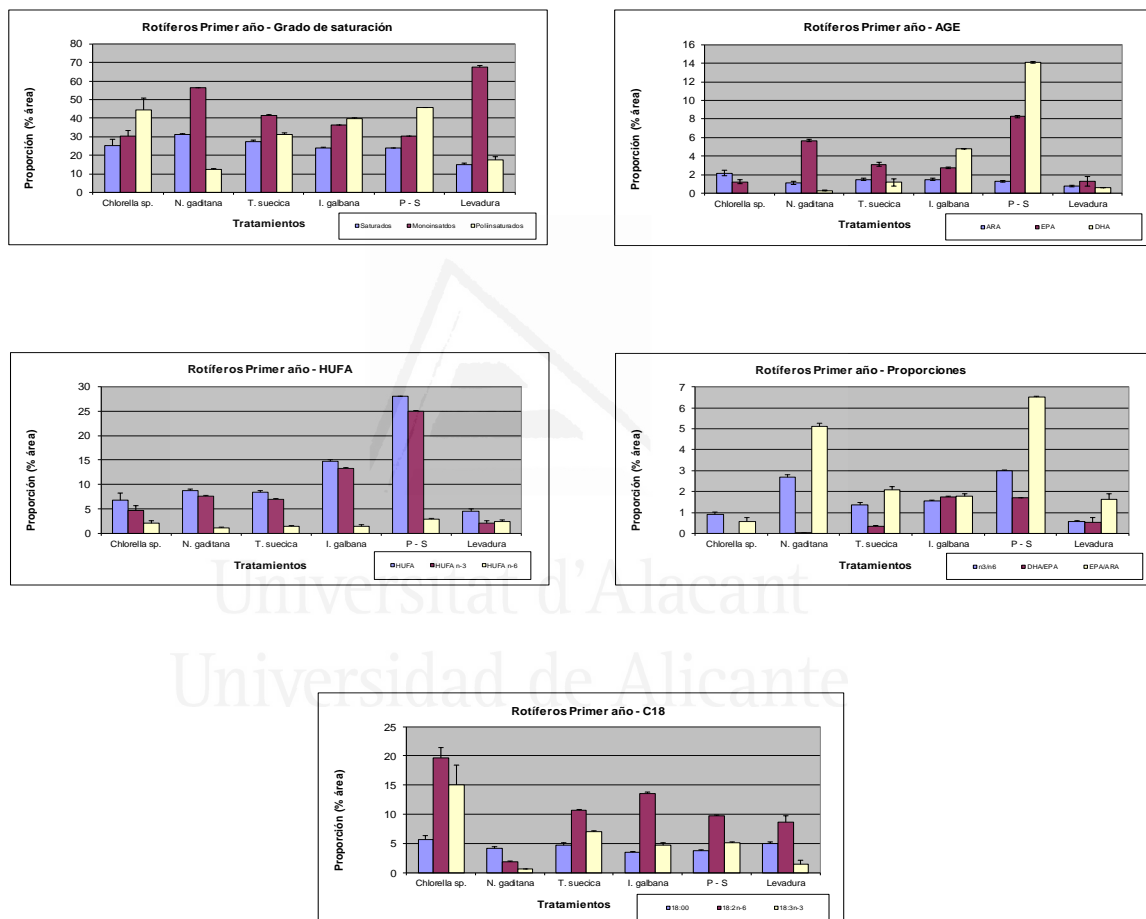
Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

4.2.3. Tabla y diagramas de los perfiles de ácidos grasos de rotífero enriquecido. La Tabla 18 presenta los perfiles de ácidos grasos de los rotíferos enriquecidos con microalgas, rotífero con P-S y rotífero con Levadura. Se incluyen los principales tipos ácidos grasos y las proporciones entre ellos.

Ácido graso	Rotífero - Chlorella sp.	Rotífero - N. gaditana	Rotífero - T. suecica	Rotífero - I. galbana	Rotífero - P – S	Rotífero - Levadura
C14:0	1.93±0.18 <sup>c</sup>	7.1±0.3 <sup>b</sup>	2.08±0.09 <sup>c</sup>	9.7±0.1 <sup>a</sup>	1.79±0.1 <sup>c</sup>	2.0±0.1 <sup>c</sup>
C15:0	0.03±0.003 <sup>d</sup>	0.22±0.05 <sup>c</sup>	0.15±0.05 <sup>c</sup>	0.22±0.03 <sup>c</sup>	0.46±0.01 <sup>b</sup>	0.56±0.03 <sup>a</sup>
C16:0	15.7±1.6 <sup>b</sup>	19.3±0.4 <sup>a</sup>	19.6±0.7 <sup>a</sup>	10.1±0.2 <sup>c</sup>	17.6±0.03 <sup>ab</sup>	7.1±0.4 <sup>d</sup>
C16:1n-7	7.5±0.5 <sup>d</sup>	32.3±1.3 <sup>a</sup>	6.6±0.1 <sup>d</sup>	10.1±0.1 <sup>c</sup>	7.4±0.12 <sup>d</sup>	24.2±0.3 <sup>b</sup>
C16:2n-7	5.2±0.1 <sup>b</sup>	6.1±0.4 <sup>a</sup>	1.6±0.3 <sup>c</sup>	1.5±0.04 <sup>c</sup>	0.9±0.01 <sup>d</sup>	0.9±0.1 <sup>d</sup>
C17:0	1.7±0.8 <sup>a</sup>	0.54±0.02 <sup>ab</sup>	0.6±0.01 <sup>ab</sup>	0.4±0.03 <sup>ab</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>
C18:0	5.69±0.6 <sup>a</sup>	4.1±0.3 <sup>bc</sup>	4.7±0.4 <sup>ab</sup>	3.5±0.1 <sup>bc</sup>	3.8±0.1 <sup>c</sup>	4.97±0.3 <sup>ab</sup>
C18:1n-9	10.17±1.1 <sup>e</sup>	11.79±0.4 <sup>de</sup>	17.1±0.2 <sup>b</sup>	14.2±0.1 <sup>cd</sup>	15.5±0.1 <sup>bc</sup>	34.2±1.5 <sup>a</sup>
C18:2n-6	19.6±1.8 <sup>a</sup>	1.9±0.1 <sup>d</sup>	10.7±0.1 <sup>bc</sup>	13.46±0.3 <sup>b</sup>	9.7±0.1 <sup>c</sup>	8.7±1.0 <sup>c</sup>
C18:3n-6	0.13±0.03 <sup>d</sup>	0.67±0.17 <sup>c</sup>	0.9±0.07 <sup>c</sup>	1.5±0.03 <sup>a</sup>	0.1±0.05 <sup>d</sup>	0.1±0.02 <sup>d</sup>
C18:3n-3	14.97±3.4 <sup>a</sup>	0.55±0.05 <sup>c</sup>	6.95±0.15 <sup>b</sup>	4.75±0.4 <sup>bc</sup>	5.1±0.1 <sup>bc</sup>	1.39±0.7 <sup>c</sup>
C18:4n-3	0.39±0.1 <sup>d</sup>	0.0 <sup>d</sup>	3.27±0.2 <sup>b</sup>	5.3±0.6 <sup>a</sup>	2.0±0.1 <sup>c</sup>	1.64±0.2 <sup>c</sup>
C19:0	7.1±0.4 <sup>b</sup>	7.6±0.1 <sup>ab</sup>	8.4±0.4 <sup>a</sup>	7.1±0.5 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>
C20:1n-7	1.6±1 <sup>a</sup>	0.48±0.05 <sup>ab</sup>	0.58±0.01 <sup>ab</sup>	0.4±0.03 <sup>ab</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>
C20:1n-9	2.1±1.1 <sup>c</sup>	1.96±0.2 <sup>c</sup>	4.1±0.1 <sup>ab</sup>	2.65±0.1 <sup>bc</sup>	1.97±0.15 <sup>c</sup>	5.65±0.6 <sup>a</sup>
C20:2n-6	1.3±0.2 <sup>a</sup>	1.27±0.1 <sup>a</sup>	0.56±0.25 <sup>b</sup>	0.36±0.01 <sup>b</sup>	0.25±0.08 <sup>b</sup>	0.4±0.1 <sup>b</sup>
C20:3n-6	0.36±0.06 <sup>c</sup>	0.7±0.1 <sup>ab</sup>	0.4±0.18 <sup>c</sup>	0.5±0.08 <sup>bc</sup>	0.36±0.04 <sup>c</sup>	0.8±0.16 <sup>a</sup>
C20:4n-3	3.1±0.6 <sup>b</sup>	0.36±0.02 <sup>c</sup>	2.6±0.2 <sup>b</sup>	4.8±0.01 <sup>a</sup>	1.1±0.03 <sup>c</sup>	0.5±0.1 <sup>c</sup>
C22:1n-9	1.16±0.2 <sup>b</sup>	0.79±0.06 <sup>b</sup>	1.4±0.05 <sup>ab</sup>	1.0±0.05 <sup>b</sup>	3.6±0.2 <sup>a</sup>	2.5±1.5 <sup>ab</sup>
C22:4n-3	0.8±0.5 <sup>ab</sup>	0.7±0.2 <sup>ab</sup>	0.8±0.2 <sup>ab</sup>	0.9±0.2 <sup>ab</sup>	1.0±0.04 <sup>a</sup>	0.48±0.08 <sup>b</sup>
C22:5n-3	0.36±0.2 <sup>d</sup>	1.28±0.08 <sup>b</sup>	0.7±0.07 <sup>c</sup>	0.87±0.03 <sup>c</sup>	2.7±0.05 <sup>a</sup>	0.2±0.07 <sup>d</sup>
C24:1n-9	0.56±0.3 <sup>d</sup>	0.7±0.4 <sup>cd</sup>	0.8±0.1 <sup>cd</sup>	2.8±0.2 <sup>a</sup>	1.69±0.07 <sup>b</sup>	1.19±0.09 <sup>c</sup>
C20:4n6 (ARA)	2.16±0.3 <sup>a</sup>	1.12±0.2 <sup>bc</sup>	1.51±0.1 <sup>b</sup>	1.51±0.1 <sup>b</sup>	1.27±0.1 <sup>bc</sup>	0.78±0.1 <sup>c</sup>
C20:5n3 (EPA)	1.24±0.2 <sup>d</sup>	5.68±0.1 <sup>b</sup>	3.13±0.2 <sup>c</sup>	2.75±0.1 <sup>c</sup>	8.25±0.1 <sup>a</sup>	1.28±0.5 <sup>d</sup>
C22:6n3 (DHA)	0.0 <sup>e</sup>	0.29±0.03 <sup>de</sup>	1.18±0.4 <sup>c</sup>	4.79±0.03 <sup>b</sup>	14.1±0.1 <sup>a</sup>	0.61±0.01 <sup>d</sup>
<b>Saturados</b>	25.07±3.5 <sup>b</sup>	31.3±0.4 <sup>a</sup>	27.3±0.8 <sup>ab</sup>	23.92±0.3 <sup>b</sup>	23.8±0.05 <sup>b</sup>	14.89±0.9 <sup>c</sup>
<b>Monoinsatdos</b>	30.35±3.0 <sup>e</sup>	56.4±0.2 <sup>b</sup>	41.6±0.2 <sup>c</sup>	36.3±0.1 <sup>d</sup>	30.2±0.03 <sup>e</sup>	67.6±0.9 <sup>a</sup>
<b>Poliinsatdos</b>	44.58±6.5 <sup>a</sup>	12.3±0.6 <sup>c</sup>	31.14±1 <sup>b</sup>	39.8±0.3 <sup>ab</sup>	45.9±0.02 <sup>a</sup>	17.4±1.9 <sup>c</sup>
<b>HUFA total</b>	6.85±1.4 <sup>c</sup>	8.74±0.4 <sup>c</sup>	8.55±0.2 <sup>c</sup>	14.8±0.2 <sup>b</sup>	28.0±0.1 <sup>a</sup>	4.6±0.5 <sup>d</sup>
<b>HUFA n-3</b>	4.69±1 <sup>d</sup>	7.6±0.2 <sup>c</sup>	7.0±0.2 <sup>c</sup>	13.3±0.1 <sup>b</sup>	25.0±0.1 <sup>a</sup>	2.1±0.5 <sup>e</sup>
<b>HUFA n-6</b>	2.16±0.4	1.12±0.2	1.5±0.1	1.5±0.3	3±0.1	2.5±0.3
<b>Total n-7</b>	12.9±0.19 <sup>d</sup>	38.7±0.9 <sup>a</sup>	12.8±0.03 <sup>d</sup>	15.2±0.1 <sup>c</sup>	8.6±0.2 <sup>e</sup>	25.7±0.2 <sup>b</sup>
<b>Total n-9</b>	14.5±2.4 <sup>d</sup>	15.1±0.6 <sup>d</sup>	25.7±0.1 <sup>b</sup>	18.9±0.1 <sup>c</sup>	21.1±0.1 <sup>c</sup>	42.4±0.5 <sup>a</sup>
<b>Total n-6</b>	21.7±2.1 <sup>a</sup>	3.02±0.2 <sup>d</sup>	12.3±0.1 <sup>bc</sup>	14.9±0.3 <sup>b</sup>	11.0±0.1 <sup>c</sup>	9.5±0.9 <sup>c</sup>
<b>Total n-3</b>	20.0±4.5 <sup>b</sup>	8.18±0.2 <sup>c</sup>	17.9±1.1 <sup>b</sup>	23.3±0.1 <sup>b</sup>	33.1±0.1 <sup>a</sup>	5.6±0.9 <sup>c</sup>
<b>n3/n6</b>	0.91±0.1 <sup>d</sup>	2.7±0.1 <sup>b</sup>	1.38±0.1 <sup>c</sup>	1.56±0.04 <sup>c</sup>	3.0±0.03 <sup>a</sup>	0.58±0.04 <sup>e</sup>
<b>n3/n9</b>	1.4±0.5 <sup>ab</sup>	0.54±0.01 <sup>cd</sup>	0.7±0.05 <sup>bcd</sup>	1.2±0.01 <sup>abc</sup>	1.57±0.01 <sup>a</sup>	0.13±0.02 <sup>d</sup>
<b>DHA/EPA</b>	0.0 <sup>d</sup>	0.05±0.01 <sup>cd</sup>	0.36±0.01 <sup>bc</sup>	1.74±0.05 <sup>a</sup>	1.71±0.01 <sup>a</sup>	0.55±0.2 <sup>b</sup>
<b>EPA/ARA</b>	0.57±0.2	5.1±0.1	2.1±0.1	1.81±0.1	6.5±0.06	1.64±0.3
<b>EPA/C18:3n-3</b>	0.08±0.06	10.3±0.2	0.45±0.1	0.58±0.3	1.6±0.1	0.9±0.1

Los resultados se expresan en % de área del total de ácidos grasos y representan la media ± SD de las muestras. Las letras a-e expresan diferencias significativas entre las medias (n=2, ANOVA, test de Fisher  $p < 0.05$  y test de rangos múltiples).

La **Figura 27** permite visualizar las diferencias en contenidos de ácidos grasos de los rotíferos enriquecidos de los tratamientos utilizados. Los ácidos grasos se discriminaron por grupos según el grado de saturación, presencia de AGE, HUFA, C18 y proporciones entre los ácidos grasos.



**Figura 27.** Diagramas de barras que representan los perfiles de ácidos grasos en rotífero enriquecido con microalgas y Protein – Selco. Las barras representan los valores de las medias + SD

De la **Tabla 18** y la **Figura 27** hemos deducido las siguientes consideraciones. En **rotífero – *Chlorella*** encontramos altas concentraciones de saturados, monoinsaturados y poliinsaturados pero no tienen diferencias significativas con el respecto a los rotíferos de los otros tratamientos; además, disminuyen los contenidos de 16:0, 18:1n-9 y 18:3n-3 del rotífero con respecto a la microalga pero aumentan las concentraciones de 16:1n-7, 18:2n-6, 20:1n-9, ARA y EPA. En **rotífero – *N. gaditana*** encontramos altos contenidos de 16:0, 16:1n-7, 18:1n-9, saturados y monoinsaturados, y contenidos significativamente superiores de EPA y de la proporción EPA/ARA ( $\rho < 0.05$ ) con respecto a los otros tipos de rotíferos. En **rotífero – *T. suecica*** hay altos contenidos de 18:1n-9, 18:2n-6 y 18:3n-3, y contenidos significativamente mayores ( $\rho < 0.05$ ) de 16:0 y 19:0 con relación al resto de rotíferos con microalgas. En **rotífero – *I. galbana*** encontramos contenidos significativamente superiores ( $\rho < 0.05$ ) de saturados, DHA y de la proporción DHA/EPA con respecto al resto de rotíferos; además, este rotífero presenta un aumento en los contenidos de ARA y EPA con respecto a la microalga. El **rotífero – P-S** presentó contenidos significativamente mayores ( $\rho < 0.05$ ) de EPA, DHA, poliinsaturados, HUFA, total n-3 y de las proporciones n3/n6 y n3/n9 con respecto a los rotíferos del resto de tratamientos. El Rotífero enriquecido con levadura de panificación presentó niveles significativamente menores ( $\rho < 0.05$ ) de ARA, EPA, DHA, saturados, poliinsaturados, HUFA, total n6, total n3, n3/n6 y DHA/EPA con respecto a los rotíferos alimentados con microalgas y P-S. En general, entre los rotíferos de los diferentes tratamientos se observaron grandes variaciones tanto a nivel de los C18, saturados, monoinsaturados y poliinsaturados como de AGE, HUFA, y proporciones DHA/EPA y EPA/ARA.

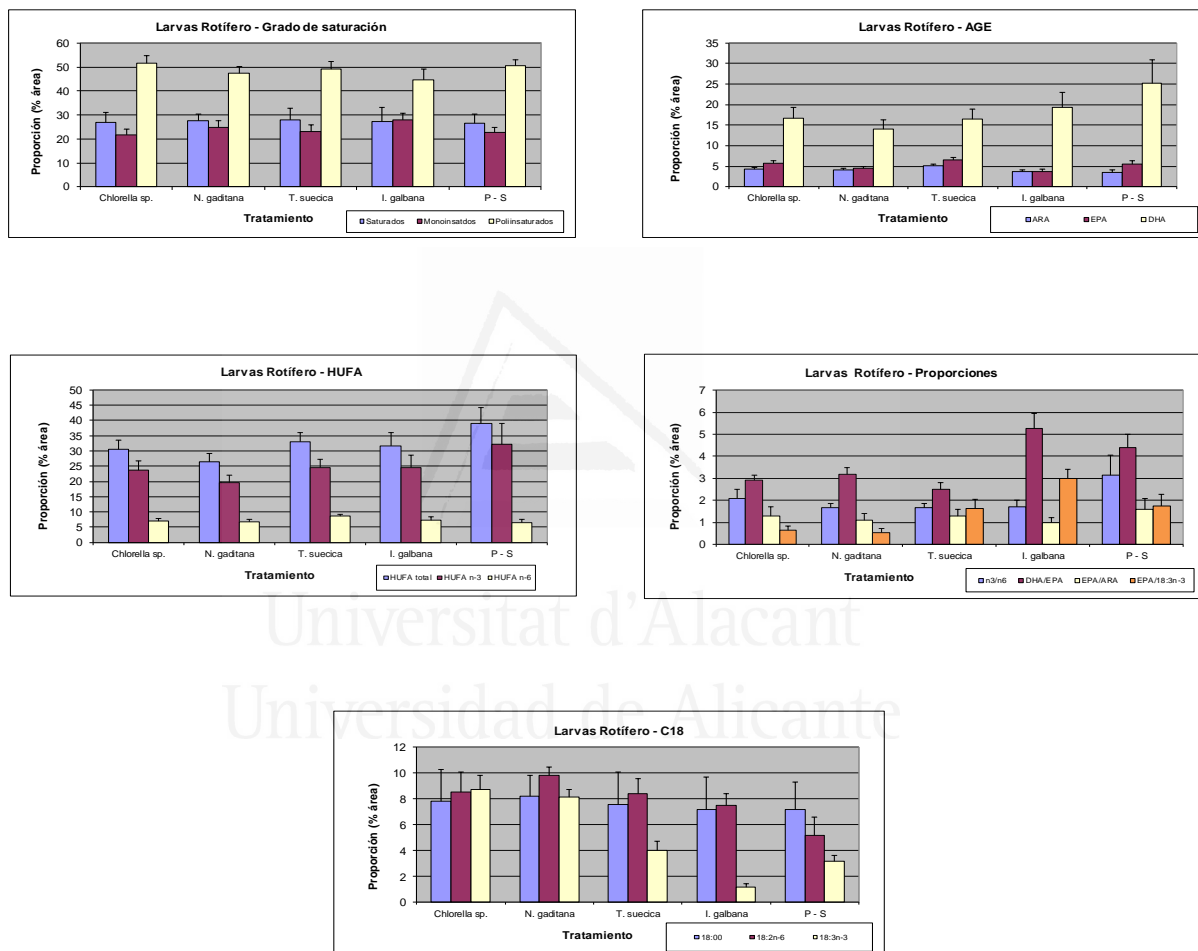
Entre algunos tipos de rotíferos observamos concentraciones similares en varios tipos de ácidos grasos. Así, entre rotífero – *I. galbana* y rotífero – P-S encontramos niveles semejantes en 21 tipos de ácidos grasos incluyendo 16:0, 17:0, 18:0, 18:3n-3, ARA, saturados, monoinsaturados, HUFA n-6 y la proporción DHA/EPA; entre rotífero – *N. gaditana* y rotífero – *T. suecica* encontramos contenidos semejantes en 19 tipos de ácidos grasos incluyendo 16:0, 17:0, 18:0, ARA, saturados, HUFA total, HUFA n-3, HUFA n-6 y la proporción n3/n9; y entre rotífero – *Chlorella* sp. y rotífero – *N. gaditana* observamos contenidos semejantes en 15 tipos de ácidos grasos incluyendo 16:0, 18:0, ARA, saturados y HUFA n-6.

4.2.4. Tabla y diagramas de los perfiles de ácidos grasos de larvas en fase de alimentación con rotífero. La tabla 19 muestra los perfiles de ácidos grasos de las larvas en fase rotífero enriquecido con microalgas y P-S. Se incluyen los principales grupos de ácidos grasos y las proporciones entre ellos.

Ácido graso	Larvas <i>Chlorella</i> sp.	Larvas <i>N. gaditana</i>	Larvas <i>T. suecica</i>	Larvas <i>I. galbana</i>	Larvas P - S
C12:0	0.28± 0.2 <sup>bc</sup>	0.2± 0.05 <sup>c</sup>	0.7±1.1 <sup>ab</sup>	0.2 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.98± 0.28 <sup>a</sup>
C14:0	1.22± 0.38 <sup>a</sup>	1.27± 0.2 <sup>a</sup>	1.36±0.5 <sup>a</sup>	2.43 ± 0.5 <sup>b</sup>	1.29± 0.48 <sup>a</sup>
C15:0	0.81± 0.06 <sup>a</sup>	0.78± 0.07 <sup>a</sup>	0.7±0.1 <sup>a</sup>	0.98 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.72± 0.05 <sup>a</sup>
C16:0	16.8± 1.7 <sup>a</sup>	17.08± 1.3 <sup>a</sup>	17.3± 3.0 <sup>a</sup>	16.38 ± 3.7 <sup>a</sup>	16.45± 2.8 <sup>a</sup>
C16:1n-7	5.17± 0.96 <sup>a</sup>	4.97± 0.7 <sup>a</sup>	4.75± 1.2 <sup>a</sup>	5.39 ± 1.1 <sup>a</sup>	5.19± 0.6 <sup>a</sup>
C16:2n-7	2.56± 0.4 <sup>a</sup>	2.23± 0.3 <sup>ab</sup>	2.3± 0.4 <sup>ab</sup>	2.0 ± 0.2 <sup>c</sup>	2.57± 0.4 <sup>a</sup>
C18:0	7.85± 2.5 <sup>a</sup>	8.2± 1.6 <sup>a</sup>	7.6± 2.5 <sup>a</sup>	7.2± 2.5 <sup>a</sup>	7.17± 2.1 <sup>a</sup>
C18:1n-9	12.78± 1.6 <sup>c</sup>	14.67± 1.6 <sup>ab</sup>	13.92± 1.9 <sup>bc</sup>	15.68 ± 1.7 <sup>a</sup>	13.99± 1.6 <sup>bc</sup>
C18:2n-6	8.57± 1.5 <sup>b</sup>	9.88± 0.7 <sup>a</sup>	8.43± 1.2 <sup>b</sup>	7.57± 0.9 <sup>c</sup>	5.2± 1.4 <sup>d</sup>
C18:3n-6	0.42± 0.19 <sup>c</sup>	0.3± 0.1 <sup>c</sup>	0.63± 0.1 <sup>b</sup>	0.8± 0.1 <sup>a</sup>	0.3± 0.15 <sup>c</sup>
C18:3n-3	8.77± 1.1 <sup>a</sup>	8.16± 0.6 <sup>a</sup>	4.0± 0.7 <sup>b</sup>	1.22± 0.2 <sup>c</sup>	3.2± 0.4 <sup>b</sup>
C18:4n-3	0.59± 0.16 <sup>b</sup>	0.6± 0.1 <sup>b</sup>	0.68± 0.15 <sup>b</sup>	1.3± 0.2 <sup>a</sup>	0.5± 0.1 <sup>b</sup>
C20:1n-9	0.7± 0.19 <sup>b</sup>	1.78± 0.9 <sup>a</sup>	0.92± 0.1 <sup>ab</sup>	1.14± 0.2 <sup>a</sup>	0.85± 0.3 <sup>ab</sup>
C20:2n-6	0.65± 0.17 <sup>a</sup>	0.68± 0.1 <sup>a</sup>	0.6± 0.1 <sup>a</sup>	0.5± 0.1 <sup>b</sup>	0.38± 0.08 <sup>c</sup>
C20:3n-6	0.46± 0.17 <sup>b</sup>	0.68± 0.18 <sup>ab</sup>	0.7± 0.16 <sup>ab</sup>	0.91± 0.1 <sup>a</sup>	0.85± 0.49 <sup>ab</sup>
C22:1n-9	1.09± 0.2 <sup>b</sup>	1.3± 0.4 <sup>b</sup>	1.4± 1.0 <sup>b</sup>	2.09± 0.36 <sup>a</sup>	0.4± 0.1 <sup>c</sup>
C22:4n-3	1.48± 0.56 <sup>b</sup>	1.3± 0.5 <sup>b</sup>	2.0± 0.5 <sup>a</sup>	2.19± 0.8 <sup>a</sup>	1.86± 0.5 <sup>ab</sup>
C22:5n-3	1.18± 0.1 <sup>b</sup>	1.0± 0.1 <sup>c</sup>	1.4± 0.16 <sup>a</sup>	1.4± 0.3 <sup>a</sup>	1.4± 0.3 <sup>a</sup>
C24:1n-9	1.82± 0.2 <sup>c</sup>	2.1± 0.2 <sup>b</sup>	2.0± 0.2 <sup>bc</sup>	3.7± 0.4 <sup>a</sup>	2.1± 0.1 <sup>b</sup>
C20:4n6 (ARA)	4.34± 0.3 <sup>b</sup>	4.14± 0.4 <sup>b</sup>	5.18± 0.3 <sup>a</sup>	3.7± 0.3 <sup>c</sup>	3.56± 0.6 <sup>c</sup>
C20:5n3 (EPA)	5.69± 0.6 <sup>b</sup>	4.42± 0.5 <sup>c</sup>	6.58± 0.6 <sup>a</sup>	3.7± 0.7 <sup>d</sup>	5.65± 0.8 <sup>b</sup>
C22:6n3 (DHA)	16.7± 2.6 <sup>c</sup>	14.06± 2.2 <sup>d</sup>	16.5± 2.4 <sup>c</sup>	19.26± 3.6 <sup>b</sup>	25.24± 5.6 <sup>a</sup>
<b>Saturados</b>	26.98± 4.2 <sup>a</sup>	27.56± 2.8 <sup>a</sup>	27.84± 5.1 <sup>a</sup>	27.2± 5.9 <sup>a</sup>	26.6± 3.9 <sup>a</sup>
<b>Monoinsaturados</b>	21.57± 2.6 <sup>c</sup>	24.85± 2.9 <sup>b</sup>	23.0± 2.8 <sup>bc</sup>	28.06± 2.9 <sup>a</sup>	22.6± 2.1 <sup>bc</sup>
<b>Poliinsaturados</b>	51.45± 3.4 <sup>a</sup>	47.59± 2.6 <sup>b</sup>	49.14± 3.2 <sup>ab</sup>	44.7± 4.6 <sup>c</sup>	50.76± 2.2 <sup>ab</sup>
<b>HUFA total</b>	30.5± 2.9 <sup>b</sup>	26.39± 2.7 <sup>c</sup>	33.06± 2.9 <sup>b</sup>	31.76± 4.4 <sup>b</sup>	38.95± 5.2 <sup>a</sup>
<b>HUFA n-3</b>	23.58± 3.2 <sup>b</sup>	19.56± 2.6 <sup>c</sup>	24.55± 2.8 <sup>b</sup>	24.4± 4.3 <sup>b</sup>	32.29± 6.7 <sup>a</sup>
<b>HUFA n-6</b>	6.95± 0.5	6.83± 0.3	8.51± 0.4	7.36± 0.3	6.6± 0.6
<b>Total n-7</b>	7.7± 0.8 <sup>a</sup>	7.2± 0.58 <sup>a</sup>	7.1± 1.3 <sup>a</sup>	7.43± 1.0 <sup>a</sup>	7.76± 0.28 <sup>a</sup>
<b>Total n-9</b>	16.39± 1.8 <sup>d</sup>	19.8± 2.5 <sup>b</sup>	18.2± 1.9 <sup>c</sup>	22.6± 2.1 <sup>a</sup>	17.4± 1.58 <sup>cd</sup>
<b>Total n-6</b>	15.9± 1.6 <sup>b</sup>	17.0± 1.2 <sup>a</sup>	17.58± 1.2 <sup>a</sup>	15.7± 1.4 <sup>b</sup>	12.18± 3.0 <sup>c</sup>
<b>Total n-3</b>	32.9± 4.2 <sup>b</sup>	28.3± 2.5 <sup>c</sup>	29.23± 2.9 <sup>c</sup>	26.9± 4.2 <sup>d</sup>	36.0± 3.2 <sup>a</sup>
<b>n3/n6</b>	2.1± 0.4 <sup>b</sup>	1.67± 0.2 <sup>c</sup>	1.67± 0.179 <sup>c</sup>	1.72± 0.3 <sup>c</sup>	3.14± 0.9 <sup>a</sup>
<b>n3/n9</b>	2.0± 0.4 <sup>a</sup>	1.4± 0.2 <sup>b</sup>	1.6± 0.176 <sup>b</sup>	1.19± 0.2 <sup>c</sup>	2.07± 0.1 <sup>a</sup>
<b>DHA/EPA</b>	2.93± 0.2 <sup>c</sup>	3.18± 0.3 <sup>c</sup>	2.52± 0.3 <sup>d</sup>	5.25± 0.7 <sup>a</sup>	4.4± 0.6 <sup>b</sup>
<b>EPA/ARA</b>	1.3± 0.4	1.1± 0.3	1.27± 0.3	1.0± 0.2	1.6± 0.45
<b>EPA/18:3n-3</b>	0.65± 0.21	0.54± 0.18	1.64± 0.4	3.0± 0.4	1.76± 0.5

Los resultados se expresan en % de área del total de ácidos grasos y representan la media ± SD de las muestras. Las letras a-d expresan diferencias significativas entre las medias (n=2, ANOVA, test de Fisher  $p < 0.05$  y test de rangos múltiples).

La **Figura 28** permite visualizar las diferencias en contenidos de ácidos grasos entre las larvas de los tratamientos con rotífero enriquecido. Los ácidos grasos se discriminaron por grupos según el grado de saturación, presencia de AGE, HUFA, C18 y proporciones entre los ácidos grasos.



**Figura 28.** Diagramas de los perfiles de las larvas en fase rotífero enriquecido con microalgas y P - S. Las barras representan los valores de las medias + SD.

De acuerdo con la **Tabla 19** y la **Figura 28** indicamos los contenidos de ácidos grasos encontrados en las larvas de los diferentes tratamientos: **Las larvas – *Chlorella*** presentaron valores intermedios de DHA, EPA, ARA, poliinsaturados, total n-3 y en las proporciones DHA/EPA y EPA/ARA con respecto a las larvas de los otros tratamientos. **Las larvas – *N. gaditana*** contenían niveles significativamente menores ( $\rho < 0.05$ ) de DHA, EPA, una baja proporción EPA/18:3n-3 y una alta concentración de 18:3n-3 con respecto a las otras larvas. **Las larvas – *T. suecica*** presentaron contenidos de EPA y ARA significativamente mayores ( $\rho < 0.05$ ) a los del resto de larvas; también altos contenidos de DHA, EPA, ARA, poliinsaturados y en las proporciones DHA/EPA y EPA/ARA aunque estos no son significativamente diferentes a los del resto de larvas. **Las larvas – *I. galbana*** presentaron contenidos significativamente mayores ( $\rho < 0.05$ ) de DHA y en la proporción DHA/EPA, y niveles significativamente menores ( $\rho < 0.05$ ) de EPA y poliinsaturados con relación a las larvas de los otros tratamientos. **En las larvas – P-S** observamos contenidos significativamente mayores ( $\rho < 0.05$ ) de DHA, HUFA y HUFA n-3 pero también una concentración significativamente más baja ( $\rho < 0.05$ ) de ARA con respecto a lo encontrado en las larvas de los otros tratamientos; alto contenido de EPA y un alto valor en las proporciones n3/n6, DHA/EPA y EPA/ARA.

Comparando los contenidos de ácidos grasos de larvas con respecto a los de rotífero encontramos que disminuye la cantidad de monoinsaturados, mientras que aumenta la concentración de poliinsaturados. Además, los contenidos de saturados y monoinsaturados de las larvas de todos los tratamientos se hacen homogéneos entre sí. Los contenidos de HUFA y HUFA n-3 aumentan especialmente en larvas alimentadas con rotífero enriquecido con microalgas aunque los valores de HUFA y HUFA n-3 de las larvas – P-S son significativamente mayores ( $\rho < 0.05$ ). Respecto a los AGE, los contenidos de ARA y EPA de las larvas de los diferentes tratamientos también se hacen homogéneos, mientras que el contenido de DHA aumenta con un gradiente desde larvas – *Chlorella* hasta larvas – P-S.

Entre las larvas de los diferentes tratamientos se observaron concentraciones similares en varios tipos de ácidos grasos. Las larvas *N. gaditana* y *T. suecica* presentaron contenidos similares en 21 parámetros entre los cuales están saturados, monoinsaturados, poliinsaturados, total n-7, total de n6, total de n3, n3/n6 y n3/n9. Entre larvas *Chlorella sp.* y P – S encontramos contenidos semejantes en 21 parámetros incluyendo EPA, saturados, monoinsaturados, poliinsaturados, total n-7, total n-9, total n-3 y n3/n9. En larvas *Chlorella sp.* y *T. suecica* encontramos contenidos similares en 22 parámetros incluyendo DHA, saturados, monoinsaturados, poliinsaturados, HUFA y HUFA n-3.

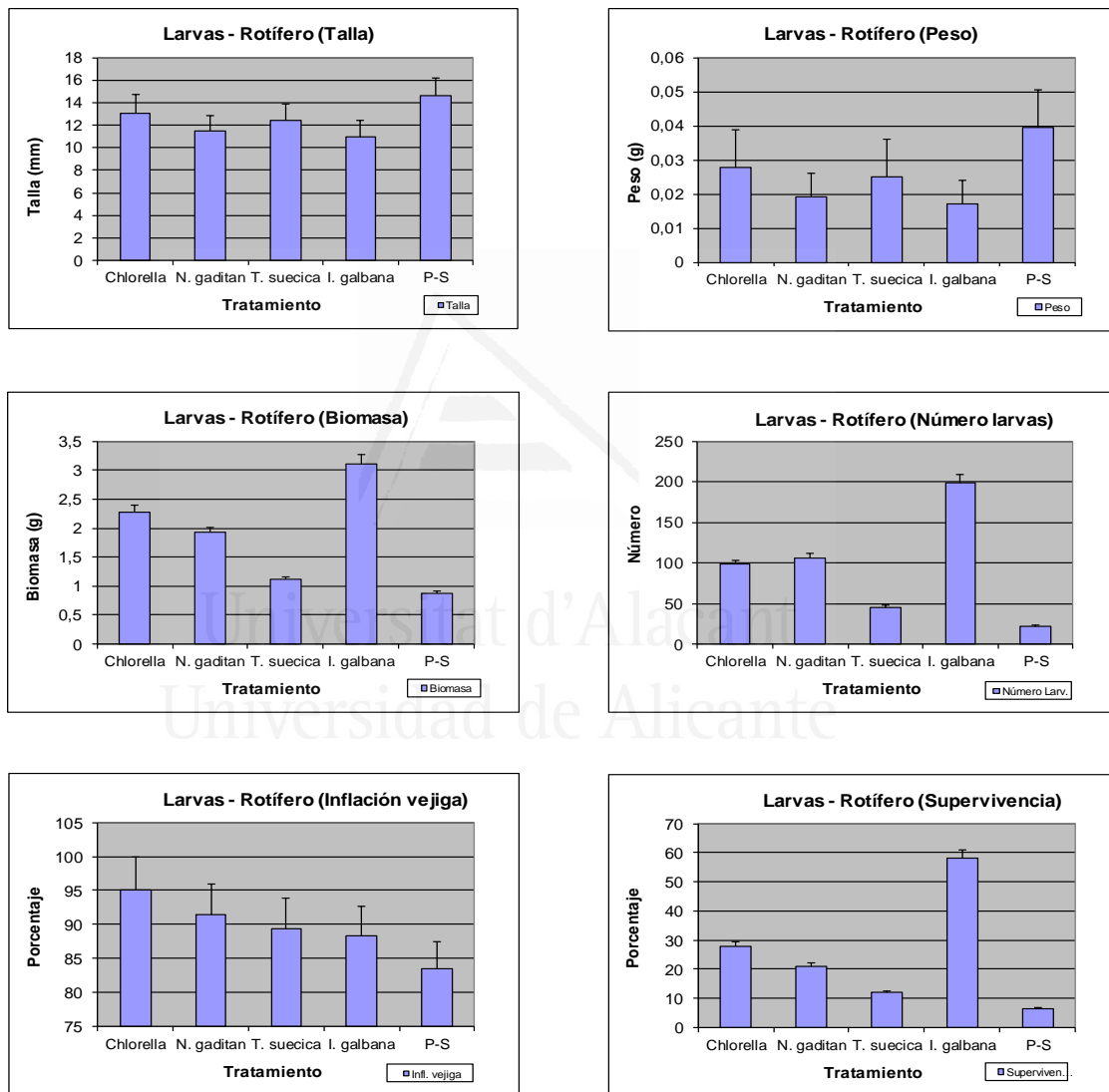


4.2.5. Evaluación del crecimiento de larvas en fase de alimentación con rotífero. En la **Tabla 20** se muestran los parámetros biométricos de las larvas en fase de alimentación con rotífero. Observando el Peso medio y la Talla media, encontramos que las larvas del tratamiento con P-S obtuvieron valores significativamente mayores ( $\rho < 0.05$ ) con respecto al resto de larvas. Mientras que las larvas del tratamiento con *I. galbana* presentan mayores valores de biomasa, supervivencia y número final de larvas con respecto al resto de larvas. En cuanto a inflación de vejiga, aunque no encontramos grandes diferencias, las larvas del tratamiento con *Chlorella sp.* alcanzaron el mayor valor con respecto al resto de larvas.

Tratamiento	Peso medio (g)	Talla media (mm)	Inflación de vejiga (%)	Nº final Larvas	Supervivencia (%)	Biomasa final (g)
<i>Chlorella sp.</i>	0.0276±0.01 b	13.1±1.59 b	95±5	98±4.9	28±1.4	2.28±0.6
<i>N. gaditana</i>	0.0193±0.007 c	11.51±1.3 c	91.5±4.5	106±5.3	21±1	1.93±0.2
<i>T. suecica</i>	0.0251±0.01 b	12.41±1.4 bc	89.3±4.4	45.3±2.2	12.3±0.6	1.11±0.4
<i>I. galbana</i>	0.017±0.007 c	10.98±1.49 c	88.3±4.4	199.3±9.9	58±2.9	3.11±0.8
<b>P – S</b>	0.0397±0.01 a	14.62±1.5 a	83.5±4	22±1.1	6.5±0.3	0.72±0.3

Los resultados se expresan como la media de las muestras  $\pm$  SD. Las letras a-c expresan diferencias significativas entre las medias (n=2, ANOVA, test de Fisher  $\rho < 0.05$  y test de rangos múltiples).

La **Figura 29** muestra los diagramas de barras permiten comparar el crecimiento de las larvas de los diferentes tratamientos con rotífero enriquecido. Se incluyen los parámetros de Talla media, Peso medio, Biomasa, Número final, inflación de vejiga y supervivencia de las larvas de los cinco tratamientos.



**Figura 29.** Parámetros de crecimiento de larvas en fase rotífero enriquecido con microalgas y P-S. Las barras representan los valores de las medias + SD.

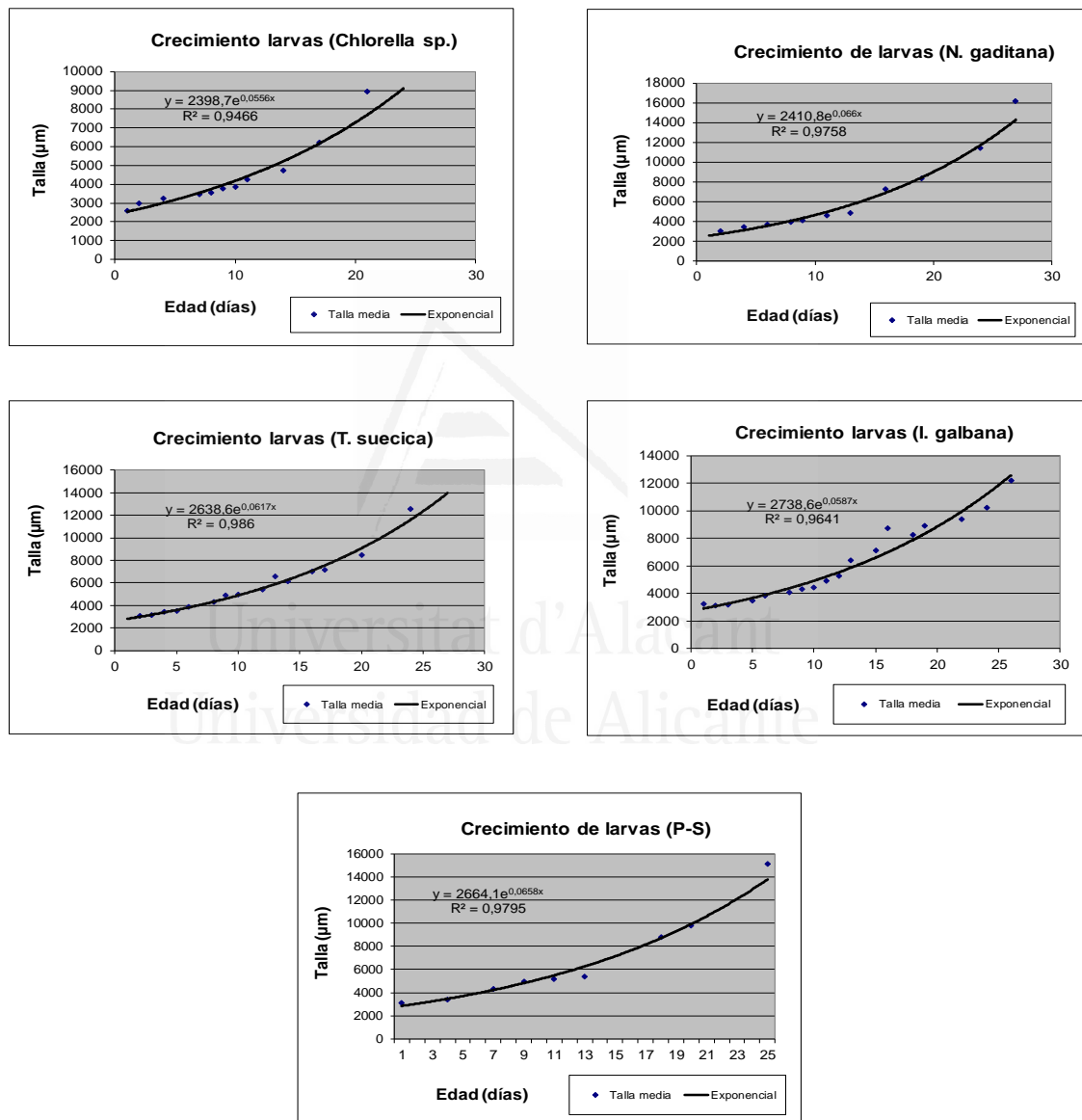
Analizando la **Tabla 20** y la **Figura 29** encontramos que las larvas del tratamiento con rotífero – P-S alcanzaron valores significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) en talla y peso con respecto a las larvas del resto de tratamientos. Sin embargo, entre las larvas de los tratamientos con microalgas no existen grandes diferencias en los valores de estos dos parámetros.

En cuanto a biomasa final, número final y supervivencia las larvas del tratamiento con *I. galbana* alcanzaron valores mayores a los de las larvas del resto de tratamientos. Además, las larvas con microalgas lograron mayores valores en biomasa final, número final, inflación de vejiga y supervivencia respecto a las larvas con P-S.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

En la **Figura 30** se representa la relación talla y edad de las larvas de los tratamientos con rotífero enriquecido con microalgas y P-S. La curva de regresión que mejor se ajusta a los datos es la exponencial. Esta curva se describe por la ecuación  $y = ae^{bx}$ , en donde:  $y$  es la talla,  $a$  es la constante,  $x$  corresponde a la edad y  $b$  representa la pendiente de la curva.  $R^2$  indica el nivel de ajuste de la línea de tendencia a los datos.



**Figura 30.** Curvas de crecimiento de larvas en fase rotífero enriquecido con microalgas y P-S.

Analizando el crecimiento de las larvas alimentadas con rotífero enriquecidas desde el punto de vista de la relación talla/días (**Figura 30**), observamos una semejanza en el comportamiento de las curvas de crecimiento de los diferentes tratamientos aunque hay variaciones en los valores de los máximos alcanzados. Así, encontramos que los mayores aumentos en talla se observaron en las larvas de los tratamientos con rotífero – *N. gaditana*, rotífero – *T. suecica* y rotífero – P-S. Las larvas alimentadas con rotífero – *I. galbana* crecieron un poco menos, pero fueron las larvas con rotífero – *Chlorella* las que alcanzaron el menor valor de crecimiento.

#### 4.3. EXPERIMENTO II – LARVAS EN FASE DE ALIMENTACIÓN CON ARTEMIA DEL PRIMER AÑO.

En este experimento se utilizaron larvas de dentón de 22 a 48 dph las cuales fueron sometidas a tratamientos de alimentación con *Artemia* enriquecida con cuatro tipos de emulsiones ICES (**A, B, C y D**). En este apartado se incluyen los contenidos de ácidos grasos de las emulsiones ICES (**Tabla 21 y Figura 31**), los contenidos de ácidos grasos de la *Artemia* de los cuatro tratamientos (**Tabla 22 y Figura 32**), también incluye los contenidos de ácidos grasos de las larvas alimentadas con esta *Artemia* (**Tabla 23 y Figura 33**) y los parámetros biológicos que evalúan el efecto de los diferentes tratamiento de *Artemia* sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas (**Figuras 34 y 35 y Tabla 24**).

4.3.1. Tabla y diagramas de los perfiles de ácidos grasos de las emulsiones del primer año. La Tabla 21 presenta los perfiles de ácidos grasos de las emulsiones de los cuatro tratamientos del primer año. Incluye los ácidos grasos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados, los AGE, los HUFA y las proporciones entre los principales ácidos grasos.

Ácido graso	A(STD)	B(30/0.6)	C(30/4)	D(50/0.6)
C15:0	0.0	0.52±0.01 <sup>b</sup>	0.85±0.0 <sup>a</sup>	0.03±0.02 <sup>c</sup>
C15:1 n-5	---	0.11±0.01 <sup>a</sup>	0.10±0.0 <sup>a</sup>	0.01±0.0 <sup>b</sup>
C16:0	22.7±0.2 <sup>a</sup>	16.1±0.2 <sup>c</sup>	19.7±0.1 <sup>b</sup>	2.56±0.7 <sup>d</sup>
C16:1 n-7	0.1±0.0 <sup>d</sup>	7.7±0.1 <sup>a</sup>	3.38±0.0 <sup>b</sup>	0.7±0.2 <sup>c</sup>
C18:0	7.1±0.04 <sup>a</sup>	3.3±0.02 <sup>c</sup>	5.7±0.02 <sup>b</sup>	2.6±0.07 <sup>d</sup>
C18:1 n-9	16.5±0.1 <sup>a</sup>	11.48±0.1 <sup>b</sup>	16.6±0.4 <sup>a</sup>	7.78±0.4 <sup>d</sup>
C18:1 n-7	0.5±0.0 <sup>d</sup>	3.4±0.1 <sup>a</sup>	2.69±0.1 <sup>b</sup>	1.6±0.1 <sup>c</sup>
C18:2 n-6	11.3±0.03 <sup>a</sup>	4.2±0.02 <sup>d</sup>	6.2±0.01 <sup>b</sup>	4.74±0.09 <sup>c</sup>
C18:3 n-6	---	0.22±0.0 <sup>a</sup>	0.16±0.0 <sup>b</sup>	0.11±0.01 <sup>c</sup>
C18:3 n-3	0.92±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	0.96±0.0 <sup>a</sup>	0.9±0.12 <sup>a</sup>
C18:4 n-3	0.0	2.14±0.0 <sup>a</sup>	0.58±0.0 <sup>c</sup>	1.1±0.06 <sup>b</sup>
C20:0	0.18±0.01 <sup>a</sup>	0.38±0.0 <sup>a</sup>	0.25±0.0 <sup>a</sup>	0.58±0.03 <sup>a</sup>
C20:1 n-9	0.11±0.0 <sup>a</sup>	0.8±0.24 <sup>a</sup>	0.59±0.01 <sup>a</sup>	2.26±0.02 <sup>a</sup>
C20:1 n-7	---	0.2±0.11 <sup>a</sup>	0.14±0.08 <sup>a</sup>	0.54±0.09 <sup>a</sup>
C20:2 n-6	0.12±0.04 <sup>a</sup>	0.18±0.02 <sup>a</sup>	0.18±0.01 <sup>a</sup>	0.36±0.01 <sup>a</sup>
C20:3 n-6	0.0	0.07±0.03	0.05±0.03	0.24±0.02
C20:3 n-3	---	0.05±0.0	0.08±0.0	0.17±0.03
C20:4 n-3	---	0.75±0.0	0.25±0.0	1.52±0.14
C22:1 n-9	0.0	0.41±0.01	0.08±0.0	1.2±0.03
C22:4 n-6	---	0.07±0.0	0.15±0.01	0.18±0.01
C22:5 n-6	0.0	0.36±0.0	1.5±0.01	0.6±0.04
C22:4 n-3	---	0.05±0.0	0.01±0.0	0.21±0.01
C22:5 n-3	0.0	2.1±0.0	0.9±0.03	4.5±0.31
C20:4 n-6 (ARA)	0.0 <sup>c</sup>	0.93±0.01 <sup>b</sup>	1.4±0.01 <sup>a</sup>	1.48±0.18 <sup>a</sup>
C20:5 n-3 (EPA)	0.23±0.06 <sup>d</sup>	16.2±0.12 <sup>b</sup>	4.2±0.02 <sup>c</sup>	29.8±2.42 <sup>a</sup>
C22:6 n-3 (DHA)	0.28±0.05 <sup>d</sup>	11.0±0.1 <sup>c</sup>	19.8±0.3 <sup>b</sup>	27.3±1.1 <sup>a</sup>
<b>Saturados</b>	69.7±0.08 <sup>a</sup>	28.0±0.27 <sup>c</sup>	35.2±0.19 <sup>b</sup>	6.6±0.2 <sup>d</sup>
<b>Monoinsaturados</b>	17.2±0.07 <sup>b</sup>	25.2±0.28 <sup>a</sup>	24.9±0.01 <sup>a</sup>	15.4±1 <sup>c</sup>
<b>Poliinsaturados</b>	12.9±0.01 <sup>c</sup>	40.0±0.06 <sup>b</sup>	36.8±0.18 <sup>b</sup>	75.1±3.27 <sup>a</sup>
<b>HUFA total</b>	0.63±0.03 <sup>c</sup>	32.4±0.09 <sup>b</sup>	28.8±0.20 <sup>b</sup>	68.3±3.63 <sup>a</sup>
<b>HUFA n-3</b>	0.51±0.01 <sup>c</sup>	30.8±0.05 <sup>b</sup>	25.5±0.21 <sup>b</sup>	65.3±3.48 <sup>a</sup>
<b>HUFA n-6</b>	0.12±0.01	1.6±0.4	3.3±0.3	3±0.2
<b>Total n-7</b>	0.58±0.0 <sup>d</sup>	11.73±0.06 <sup>a</sup>	6.88±0.08 <sup>b</sup>	3.12±0.29 <sup>c</sup>
<b>Total n-9</b>	16.67±0.06 <sup>a</sup>	13.06±0.23 <sup>b</sup>	17.73±0.07 <sup>a</sup>	12.3±0.71 <sup>b</sup>
<b>Total n-6</b>	11.44±0.01 <sup>a</sup>	6.03±0.0 <sup>d</sup>	9.72±0.03 <sup>b</sup>	7.76±0.03 <sup>c</sup>
<b>Total n-3</b>	1.44±0.01 <sup>d</sup>	34.01±0.06 <sup>b</sup>	27.07±0.2 <sup>c</sup>	67.38±3.3 <sup>a</sup>
<b>n3/n6</b>	0.13±0.0 <sup>d</sup>	5.6±0.1 <sup>b</sup>	2.78±0.3 <sup>c</sup>	8.7±0.5 <sup>a</sup>
<b>n3/n9</b>	0.09±0.0 <sup>d</sup>	2.6±0.05 <sup>b</sup>	1.53±0.02 <sup>c</sup>	5.5±0.57 <sup>a</sup>
<b>DHA/EPA</b>	1.25±0.51 <sup>b</sup>	0.68±0.01 <sup>b</sup>	4.7±0.09 <sup>a</sup>	0.9±0.04 <sup>b</sup>
<b>EPA/ARA</b>	0.0	17.4±0.6	3±0.01	20.1±0.2
<b>EPA/C18:3n-3</b>	0.25±0.0	15.5±0.1	4.4±0.04	32±0.4

Los resultados se expresan en % de área del total de ácidos grasos y representan la media ± SD de las muestras. Las letras a-d expresan diferencias significativas entre las medias (n=2, ANOVA, test de Fisher  $p < 0.05$  y test de rangos múltiples).

Los diagramas de la **Figura 31** permiten visualizar las diferencias en contenidos de ácidos grasos de las emulsiones del primer año. Estos ácidos grasos se discriminan por grupos según el grado de saturación, presencia de AGE, HUFA, C18 y proporciones de ácidos grasos.



**Figura 31.** Diagramas de barras de los perfiles de ácidos grasos de las emulsiones del primer año. Las barras representan los valores de las medias + SD.

Analizando la **Tabla 21** y la **Figura 31** encontramos que: **la emulsión A** presenta contenidos significativamente superiores ( $\rho < 0.05$ ) de 16:0, 18:0, 18:1n-9, 18:2n-6 y saturados pero contenidos significativamente menores ( $\rho < 0.05$ ) de DHA, EPA, ARA, poliinsaturados, HUFA y HUFA n-3 con respecto al resto de emulsiones. **Las emulsiones B y C** presentaron niveles intermedios de 16:0, 18:0, 20:0, ARA, EPA, DHA, saturados, poliinsaturados, HUFA y HUFA n-3 con respecto a las emulsiones A y D. **La emulsión D** presentó contenidos significativamente mayores ( $\rho < 0.05$ ) de DHA, EPA, poliinsaturados, HUFA, HUFA n-3 y total n3 con respecto a las otras emulsiones. En conjunto como principales rasgos de estas emulsiones tenemos que en la emulsión A predominaron los saturados, en la emulsión D los poliinsaturados y en las B y C niveles intermedios de saturados y poliinsaturados.

Entre las emulsiones analizadas encontramos contenidos similares de varios tipos de ácidos grasos. Así, las emulsiones B y C tenían concentraciones similares en 12 tipos de ácidos grasos incluyendo monoinsaturados, poliinsaturados, HUFA y HUFA n-3; mientras que las emulsiones B y D tenían contenidos similares en 8 tipos de ácidos grasos entre los que encontramos 16:0, 18:0, 20:0, 18:2n-6, 18:3n-3 y ARA y proporción DHA/EPA.

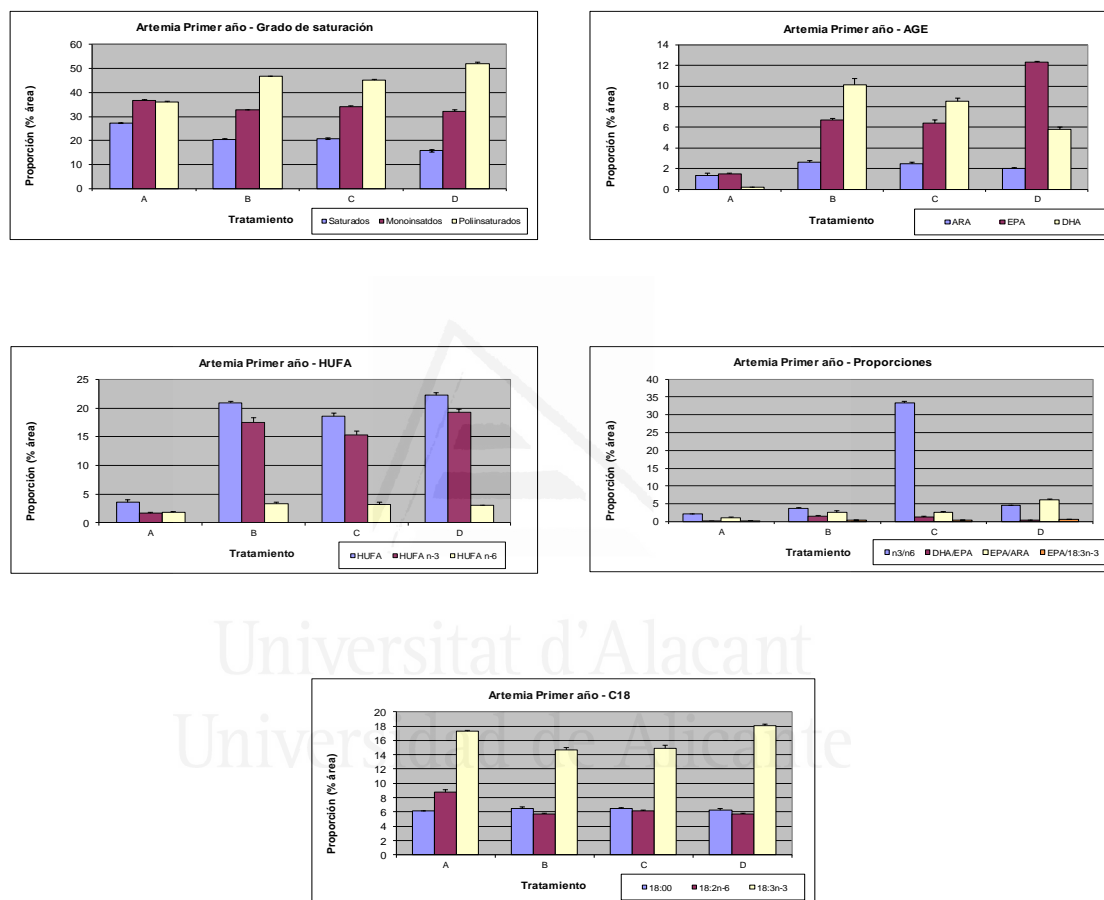
4.3.2. Tabla y diagramas de los perfiles de ácidos grasos de la *Artemia* enriquecida del primer año. La Tabla 22 representa los perfiles de ácidos grasos de la *Artemia* enriquecida con emulsiones ICES del Primer año. Incluye los principales grupos de ácidos grasos y las proporciones entre ellos.



Ácido graso	A (STD)	B (30/0.6)	C (30/4)	D (50/0.6)
<b>C14:0</b>	4.19± 0.03 <sup>a</sup>	0.93± 0.001 <sup>c</sup>	1.45± 0.02 <sup>b</sup>	0.56± 0.002 <sup>d</sup>
<b>C15:0</b>	0.17± 0.02 <sup>c</sup>	0.46± 0.01 <sup>a</sup>	0.39± 0.01 <sup>b</sup>	0.2± 0.01 <sup>c</sup>
<b>C16:0</b>	10.56 ± 0.015 <sup>c</sup>	12.5± 0.002 <sup>a</sup>	11.7± 0.08 <sup>b</sup>	8.7± 0.0 <sup>d</sup>
<b>C16:1n-7</b>	3.5± 0.5 <sup>b</sup>	5.04± 0.01 <sup>a</sup>	4.55± 0.5 <sup>ab</sup>	4.0± 0.7 <sup>ab</sup>
<b>C16:2n-7</b>	0.98± 0.02 <sup>d</sup>	1.8± 0.01 <sup>a</sup>	1.6± 0.05 <sup>b</sup>	1.25± 0.01 <sup>c</sup>
<b>C18:0</b>	6.1± 0.1 <sup>c</sup>	6.5± 0.2 <sup>a</sup>	6.5± 0.1 <sup>a</sup>	6.3± 0.2 <sup>b</sup>
<b>C18:1n-9</b>	32.1± 0.2 <sup>a</sup>	25.5± 0.02 <sup>c</sup>	27.5± 0.1 <sup>b</sup>	25.7± 0.1 <sup>c</sup>
<b>C18:2n-6</b>	8.8± 0.03 <sup>a</sup>	5.7± 0.08 <sup>c</sup>	6.2± 0.07 <sup>b</sup>	5.7± 0.01 <sup>c</sup>
<b>C18:3n-3</b>	17.3± 0.11 <sup>b</sup>	14.7± 0.03 <sup>d</sup>	14.9± 0.04 <sup>c</sup>	18.1± 0.02 <sup>a</sup>
<b>C18:4n-3</b>	4.7± 0.1 <sup>a</sup>	3.2± 0.3 <sup>b</sup>	3.3± 0.3 <sup>b</sup>	4.1± 0.7 <sup>ab</sup>
<b>C20:1n-9</b>	0.32± 0.05 <sup>c</sup>	0.55± 0.1 <sup>b</sup>	0.5± 0.1 <sup>bc</sup>	0.95± 0.1 <sup>a</sup>
<b>C20:2n-6</b>	0,29± 0,002 <sup>b</sup>	0,35± 0,01 <sup>ab</sup>	0,38± 0,12 <sup>ab</sup>	0,47± 0,03 <sup>a</sup>
<b>C20:3n-6</b>	0,13± 0,003	0,12± 0,03	0,1± 0,002	0,2± 0,06
<b>C22:1n-9</b>	0,86± 0,004 <sup>b</sup>	0,73± 0,006 <sup>c</sup>	0,71± 0,02 <sup>c</sup>	1,1± 0,016 <sup>a</sup>
<b>C22:4n-3</b>	0,18± 0,05 <sup>b</sup>	0,29± 0,03 <sup>ab</sup>	0,24± 0,05 <sup>ab</sup>	0,36± 0,08 <sup>a</sup>
<b>C22:5n-3</b>	0,04± 0,034 <sup>d</sup>	0,65± 0,003 <sup>b</sup>	0,5± 0,008 <sup>c</sup>	1,1± 0,012 <sup>a</sup>
<b>C24:1n-9</b>	0,001 ± 0,0 <sup>d</sup>	1,0± 0,02 <sup>a</sup>	0,8± 0,03 <sup>b</sup>	0,45± 0,014 <sup>c</sup>
<b>C20:4n-6 (ARA)</b>	1.3± 0.3 <sup>c</sup>	2.6± 0.2 <sup>a</sup>	2.5± 0.1 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.1 <sup>b</sup>
<b>C20:5n-3 (EPA)</b>	1.5± 0.01 <sup>d</sup>	6.7± 0.2 <sup>b</sup>	6.4± 0.3 <sup>c</sup>	12.3± 0.1 <sup>a</sup>
<b>C22:6n-3 (DHA)</b>	0.2± 0.02 <sup>d</sup>	10.1± 0.06 <sup>a</sup>	8.5± 0.03 <sup>b</sup>	5.8± 0.2 <sup>c</sup>
<b>Saturados</b>	27.3± 0.1 <sup>a</sup>	20.5± 0.2 <sup>c</sup>	20.8± 0.4 <sup>b</sup>	15.8± 0.4 <sup>d</sup>
<b>Monoinsaturados</b>	36.8± 0.3 <sup>a</sup>	32.8± 0.1 <sup>c</sup>	34.0± 0.3 <sup>b</sup>	32.2± 0.7 <sup>c</sup>
<b>Poliinsaturados</b>	35.9± 0.3 <sup>d</sup>	46.7± 0.1 <sup>b</sup>	45.1± 0.3 <sup>c</sup>	51.9± 0.6 <sup>a</sup>
<b>HUFA total</b>	3.6± 0.4 <sup>d</sup>	20.9± 0.3 <sup>b</sup>	18.6± 0.5 <sup>c</sup>	22.3± 0.4 <sup>a</sup>
<b>HUFA n-3</b>	1.7± 0.2 <sup>d</sup>	17.5± 0.1 <sup>b</sup>	15.4± 0.1 <sup>c</sup>	19.3± 0.1 <sup>a</sup>
<b>HUFA n-6</b>	1.9± 0.1	3.4± 0.2	3.2± 0.4	3 ± 0.1
<b>Total n-7</b>	4,53± 0,5 <sup>c</sup>	6,86± 0,01 <sup>a</sup>	6,18± 0,55 <sup>ab</sup>	5,26± 0,7 <sup>bc</sup>
<b>Total n-9</b>	33,25± 0,17 <sup>a</sup>	27,77± 0,1 <sup>d</sup>	29,5± 0,18 <sup>b</sup>	28,2± 0,07 <sup>c</sup>
<b>Total n-6</b>	11,14± 0,06 <sup>a</sup>	9,47± 0,3 <sup>bc</sup>	9,84± 0,15 <sup>b</sup>	9,138 ± 0,04 <sup>c</sup>
<b>Total n-3</b>	23,82± 0,21 <sup>d</sup>	35,38± 0,22 <sup>b</sup>	33,64± 0,17 <sup>c</sup>	41,55± 0,7 <sup>a</sup>
<b>n3/n6</b>	2.14± 0.01 <sup>d</sup>	3.7± 0.1 <sup>b</sup>	3.4± 0.04 <sup>c</sup>	4.5± 0.09 <sup>a</sup>
<b>n3/n9</b>	0.716 ± 0.003 <sup>d</sup>	1.27± 0.003 <sup>b</sup>	1.14± 0.001 <sup>c</sup>	1.47± 0.02 <sup>a</sup>
<b>DHA/EPA</b>	0.2± 0.0 <sup>d</sup>	1.5± 0.3 <sup>a</sup>	1.3± 0.2 <sup>b</sup>	0.5± 0.01 <sup>c</sup>
<b>EPA/ARA</b>	1.1± 0.1	2.6± 0.5	2.6± 0.3	6.1± 0.2
<b>EPA/C18:3n-3</b>	0.08± 0.0	0.45± 0.0	0.43± 0.0	0.67± 0.0

Los resultados se expresan en % de área del total de ácidos grasos y representan la media ± SD de las muestras. Las letras a-d expresan diferencias significativas entre las medias (n=2, ANOVA, test de Fisher  $\rho < 0.05$  y test de rangos múltiples).

La **Figura 32** permite visualizar las diferencias en contenidos de ácidos grasos entre los tratamientos de *Artemia* enriquecida del primer año. Estos ácidos grasos se discriminan por grupos según el grado de saturación, presencia de AGE, HUFA, C18 y proporciones entre ácidos grasos.



**Figura 32.** Diagramas de barras de los perfiles de ácidos grasos de *Artemia* enriquecida del Primer año. Las barras representan los valores de las medias + SD.

De acuerdo con la **Tabla 22** y la **Figura 32** presentamos las siguientes consideraciones. En **Artemia del tratamiento A** encontramos contenidos significativamente superiores ( $\rho < 0.05$ ) de 18:1n-9, 18:2n-6, saturados y monoinsaturados, mientras que presenta niveles significativamente menores ( $\rho < 0.05$ ) de ARA, EPA, DHA, poliinsaturados, HUFA, HUFA n-3 y de las proporciones n3/n6 y DHA/EPA con respecto al resto de tratamientos de *Artemia*. En **Artemia B** encontramos niveles significativamente superiores ( $\rho < 0.05$ ) de 16:0, 18:0, ARA, DHA y de la proporción DHA/EPA con relación a la *Artemia* de los otros tratamientos. En **Artemia C** observamos contenidos significativamente superiores de 18:0 y ARA en comparación con la *Artemia* del resto de tratamientos. Además, la *Artemia* de los tratamientos B y C presenta contenidos intermedios de EPA, saturados, monoinsaturados, poliinsaturados, HUFA y HUFA n-3. Y en **Artemia D** observamos contenidos significativamente superiores ( $\rho < 0.05$ ) de EPA, poliinsaturados, HUFA, HUFA n-3, total de n3 y de las proporciones n3/n6 y n3/n9 con relación a la *Artemia* del resto de tratamientos.

El principal rasgo que permite diferenciar la *Artemia* de los diferentes tratamientos es el grado de saturación y el contenido de HUFA y HUFA n-3, así: en *Artemia A* predominan los saturados y monoinsaturados, en *Artemia D* predominan los poliinsaturados, HUFA y HUFA n-3, mientras que la *Artemia B* y C presenta contenidos intermedios de saturados, monoinsaturados, poliinsaturados, HUFA y HUFA n-3.

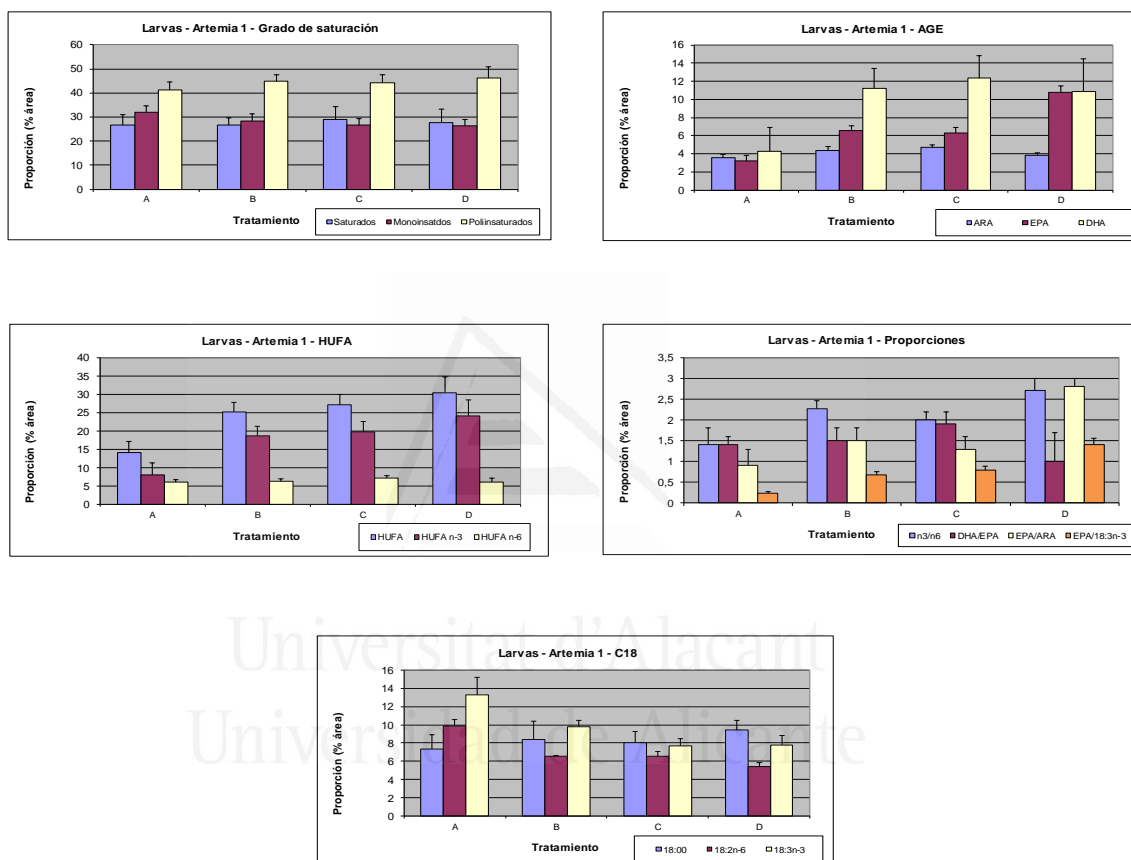
Entre los cuatro tratamientos de *Artemia* encontramos niveles similares de varios tipos de ácidos grasos. Así, entre *Artemia B* y C hay semejanza en las concentraciones de 11 parámetros incluyendo ARA, total n7 y total n6. Entre *Artemia B* y D encontramos contenidos semejantes en 10 parámetros incluyendo, 18:2n-6, monoinsaturados y total n6.

4.3.3. Tabla y diagramas de los perfiles de ácidos grasos de larvas en fase de alimentación con *Artemia* enriquecida con emulsiones ICES del primer año. La Tabla 23 presenta los perfiles de los principales ácidos grasos de larvas en fase *Artemia* del primer año. Incluye los ácidos grasos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados, AGE, HUFA y las proporciones entre ellos.

Ácido graso	A(STD)	B(30/0.6)	C(30/4)	D(50/0.6)
<b>C14</b>	1,48± 0,07	0,95± 0,20	1,6± 1,33	0,86± 0,08
<b>C15</b>	0,6± 0,1	0,5± 0,06	0,5± 0,10	0,47± 0,09
<b>C16</b>	17,14± 0,81	16,6± 1,43	17,1± 1,17	16,5± 0,41
<b>C16:1n-7</b>	4,89± 0,80 <sup>a</sup>	4,2± 0,31 <sup>ab</sup>	3,5± 0,61 <sup>b</sup>	3,46± 0,09 <sup>b</sup>
<b>C16:2n-7</b>	1,88± 0,64	1,84± 0,02	1,9± 0,44	1,5± 0,02
<b>C18</b>	7,3± 1,6	8,36± 2	8± 1,3	9,4± 1,1
<b>C18:1n-9</b>	23,4± 3,2 <sup>a</sup>	20,7± 1,8 <sup>ab</sup>	18,9± 0,5 <sup>b</sup>	19,3± 0,3 <sup>b</sup>
<b>C18:2n-6</b>	9,87± 0,7 <sup>a</sup>	6,57± 0,1 <sup>b</sup>	6,56± 0,5 <sup>b</sup>	5,45± 0,4 <sup>c</sup>
<b>C18:3n-3</b>	13,3± 1,9 <sup>a</sup>	9,87± 0,7 <sup>b</sup>	7,7± 0,8 <sup>b</sup>	7,8± 1,1 <sup>b</sup>
<b>C18:4n-3</b>	1,4± 0,4 <sup>a</sup>	1,1± 0,1 <sup>ab</sup>	0,73 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,88 ± 0,15 <sup>b</sup>
<b>C20:1n-9</b>	0,7± 0,27	0,5± 0,1	0,5± 0,03	0,6± 0,05
<b>C20:2n-6</b>	0,58± 0,07	0,55± 0,09	0,5± 0,08	0,5± 0,05
<b>C20:3n-6</b>	0,5± 0,13 <sup>a</sup>	0,3± 0,06 <sup>b</sup>	0,4± 0,02 <sup>ab</sup>	0,3± 0,04 <sup>b</sup>
<b>C22:1n-9</b>	1,48± 0,1 <sup>a</sup>	0,8± 0,06 <sup>c</sup>	1,1± 0,1 <sup>b</sup>	0,78± 0,08 <sup>c</sup>
<b>C22:4n-3</b>	1,3± 0,6	1,1± 0,1	1,5± 0,1	1,54± 0,3
<b>C22:5n-3</b>	0,65± 0,28 <sup>a</sup>	1,13± 0,1 <sup>b</sup>	1,24± 0,1 <sup>b</sup>	2,54± 0,3 <sup>c</sup>
<b>C24:1n-9</b>	1,5± 0,4 <sup>b</sup>	2,1± 0,2 <sup>ab</sup>	2,6± 0,2 <sup>a</sup>	2,0± 0,3 <sup>b</sup>
<b>C20:4n-6 (ARA)</b>	3,64 ± 0,77 <sup>b</sup>	4,4± 0,21 <sup>ab</sup>	4,76 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,8± 0,1 <sup>b</sup>
<b>C20:5n-3 (EPA)</b>	3,2± 0,27 <sup>c</sup>	6,6± 0,64 <sup>b</sup>	6,3± 0,51 <sup>b</sup>	10,8 ± 0,42 <sup>a</sup>
<b>C22:6n-3 (DHA)</b>	4,3± 0,93 <sup>b</sup>	11,2± 1,37 <sup>a</sup>	12,4± 0,82 <sup>a</sup>	10,86± 0,91 <sup>a</sup>
<b>Saturados</b>	26,8± 2,4 <sup>c</sup>	26,7± 3,7 <sup>c</sup>	29,1± 2,1 <sup>a</sup>	27,5± 0,97 <sup>b</sup>
<b>Monoinsaturados</b>	32,0± 3,5 <sup>a</sup>	28,3± 2,1 <sup>ab</sup>	26,6± 1 <sup>b</sup>	26,2± 1 <sup>b</sup>
<b>Poliinsaturados</b>	41,1± 1,2 <sup>b</sup>	44,9± 1,6 <sup>a</sup>	44,3± 2,1 <sup>a</sup>	46,3± 1 <sup>a</sup>
<b>HUFA total</b>	14,2± 2,9 <sup>c</sup>	25,2± 1,3 <sup>b</sup>	27,2± 1,2 <sup>ab</sup>	30,4± 1,6 <sup>a</sup>
<b>HUFA n-3</b>	8,14± 1,4 <sup>c</sup>	18,8± 1,6 <sup>b</sup>	19,9± 1,3 <sup>b</sup>	24,2± 1,4 <sup>a</sup>
<b>HUFA n-6</b>	6.1± 1	6.4± 0.5	7.2 ± 0.5	6,2± 0,4
<b>Total n-7</b>	6,77± 0,41 <sup>a</sup>	6,02± 0,30 <sup>ab</sup>	5,43± 1,06 <sup>b</sup>	4,97± 0,08 <sup>b</sup>
<b>Total n-9</b>	27,17± 2,78 <sup>a</sup>	24,12± 2,01 <sup>ab</sup>	23,09± 0,58 <sup>b</sup>	22,73± 0,6 <sup>b</sup>
<b>Total n-6</b>	16,38± 1,15 <sup>a</sup>	13,25± 0,62 <sup>bc</sup>	13,93± 0,54 <sup>b</sup>	11,90± 0,58 <sup>c</sup>
<b>Total n-3</b>	22,85± 0,99 <sup>c</sup>	29,87± 2,2 <sup>b</sup>	28,40± 2,27 <sup>bc</sup>	32,92± 1,19 <sup>a</sup>
<b>n3/n6</b>	1,4± 0,15 <sup>c</sup>	2,26± 0,27 <sup>b</sup>	2,0± 0,14 <sup>b</sup>	2,7± 0,23 <sup>a</sup>
<b>n3/n9</b>	0,84± 0,09 <sup>c</sup>	1,24± 0,01 <sup>b</sup>	1,23± 0,06 <sup>b</sup>	1,45± 0,07 <sup>a</sup>
<b>DHA/EPA</b>	1,4± 0,22 <sup>ab</sup>	1,5± 0,61 <sup>ab</sup>	1,9± 0,1 <sup>a</sup>	1,0± 0,07 <sup>b</sup>
<b>EPA/ARA</b>	0,9 ± 0,2	1,5 ± 0,3	1,3 ± 0,1	2,8 ± 0,2
<b>EPA/C18:3n-3</b>	0,24 ± 0,03	0,67 ± 0,08	0,8± 0,09	1,4± 0,16

Los resultados se expresan en % de área del total de ácidos grasos y representan la media ± SD de las muestras. Las letras a-c expresan diferencias significativas entre las medias (n=2, ANOVA, test de Fisher  $p < 0.05$  y test de rangos múltiples).

La Figura 33 permite visualizar las diferencias en contenidos de ácidos grasos entre las larvas de los tratamientos con *Artemia* enriquecida del primer año. Estos ácidos grasos se discriminan por grupos según el grado de saturación, presencia de AGE, HUFA, C18 y proporciones entre los ácidos grasos.



**Figura 33.** Diagramas de barras de los perfiles ácidos grasos de larvas en fase *Artemia*. Las barras representan los valores de las medias + SD.

Analizando la Tabla 23 y la Figura 33 observamos que: En larvas del tratamiento hay niveles significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) de 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3 y monoinsaturados, mientras que tiene cantidades significativamente menores ( $p < 0.05$ ) de EPA, DHA, saturados, poliinsaturados, HUFA, HUFA n-3 y proporción n3/n6 con respecto a las larvas del resto de tratamientos. En larvas B y C encontramos contenidos intermedios de 18:0, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3, 20:1n-9, EPA, poliinsaturados, HUFA, HUFA n-3 y de las proporciones n3/n6 y EPA/ARA. En larvas D observamos contenidos significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) de EPA, poliinsaturados, HUFA, HUFA n-3, total n3 y de las proporciones n3/n6 y n3/n9 con respecto al resto de larvas. Los principales rasgos por los que podemos diferenciar las larvas de los diferentes tratamientos son: en las larvas A se consume parte de los saturados, se conservan los monoinsaturados y aumentan los poliinsaturados, HUFA y HUFA n-3; en larvas D disminuyen los contenidos de monoinsaturados, poliinsaturados pero aumentan los niveles de HUFA y HUFA n-3.

Las larvas de algunos tratamientos presentaron contenidos similares en varios tipos de ácidos grasos. Así, en las larvas A y B encontramos contenidos similares en 10 tipos de ácidos grasos entre los cuales están ARA, saturados, monoinsaturados y la proporción DHA/EPA. En las larvas B y C hay contenidos similares en 22 ácidos grasos entre los que encontramos ARA, EPA, DHA, monoinsaturados, poliinsaturados, HUFA, HUFA n-3, total n3, total de n6 y las proporciones n3/n6, n3/n9 y DHA/EPA. En las larvas C y D encontramos contenidos similares en 14 ácidos grasos, entre los cuales están ARA, DHA, monoinsaturados y poliinsaturados. Finalmente, entre larvas B, C y D encontramos contenidos similares en 10 tipos de ácidos grasos, entre los que tenemos DHA, monoinsaturados y poliinsaturados.

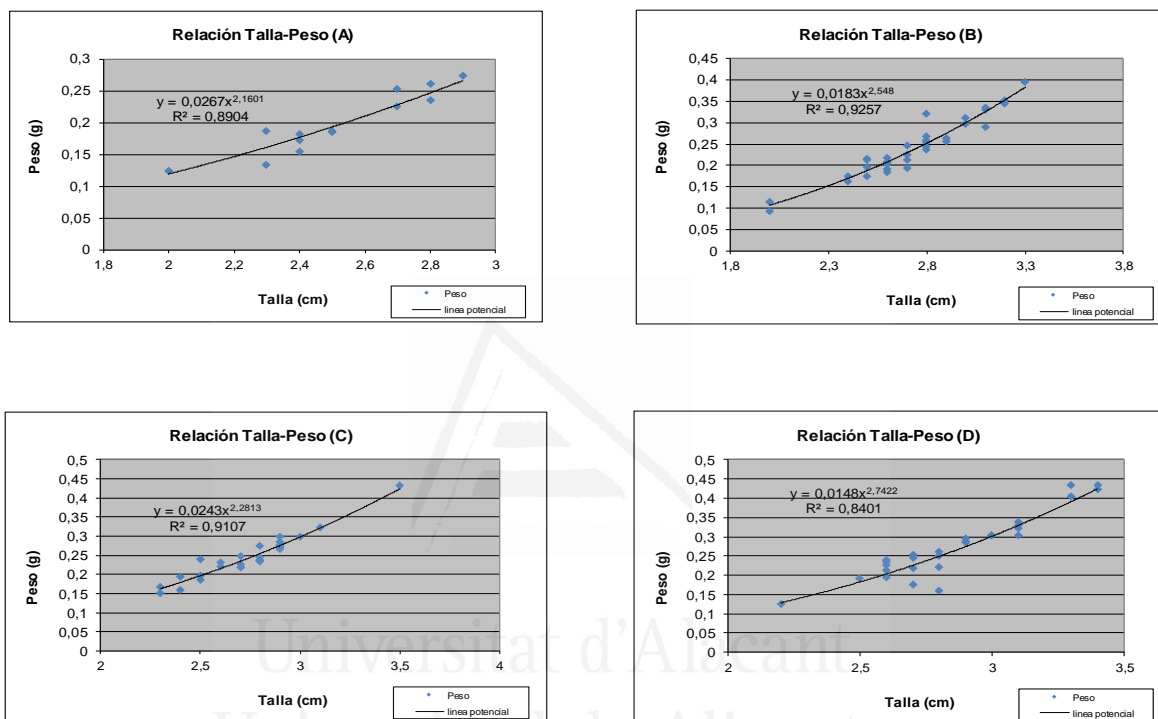
4.3.4. Evaluación del Crecimiento de las larvas en fase de alimentación con *Artemia* del Experimento II. En la Tabla 24 se resumen los datos de los parámetros de crecimiento de larvas en fase de alimentación con *Artemia* enriquecida con cuatro tratamientos de emulsiones ICES (A, B, C y D). Se incluyen los parámetros de Peso medio, Talla media, Número final, Supervivencia, Biomasa y Factor de Condición.

Tratamiento	Peso medio ±SD (g)	Talla media ± SD (cm)	Número final	Supervivencia (%)	Biomasa final (g)	Factor de condición
<b>A (STD)</b>	0,193±0,05 <sup>b</sup>	2,48±0,28 <sup>b</sup>	26±1.3	47±2.3	5,018±0.28	12,63±1,747 <sup>a</sup>
<b>B (30/0.6)</b>	0,243±0,07 <sup>a</sup>	2,73±0,31 <sup>a</sup>	41±2	73±3.6	9,963±0.3	11,73±1,24 <sup>b</sup>
<b>C (30/4)</b>	0,246±0,06 <sup>a</sup>	2,74±0,27 <sup>a</sup>	35±1.7	63±3.1	8,61±0.26	11,88±1.22 <sup>ab</sup>
<b>D (50/0.6)</b>	0,273±0,08 <sup>a</sup>	2,86±0,29 <sup>a</sup>	37±1.8	66±3.3	10,10±0.28	11,38±1,28 <sup>b</sup>

Los resultados se representan por la media de las muestras ± SD. Las letras a-b expresan diferencias significativas entre las medias (n=2, ANOVA, test de Fisher  $p < 0.05$  y test de rangos múltiples).

Según la **Tabla 24** las larvas B y D obtuvieron resultados significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) en número final, supervivencia y biomasa final, mientras que en peso y talla no hay diferencias entre larvas B, C y D. Por otra parte, analizando las **Figuras 34** y **35** encontramos que las larvas A obtuvieron los menores valores de crecimiento mientras que las larvas B y D obtienen los mayores valores de biomasa, supervivencia y número final.

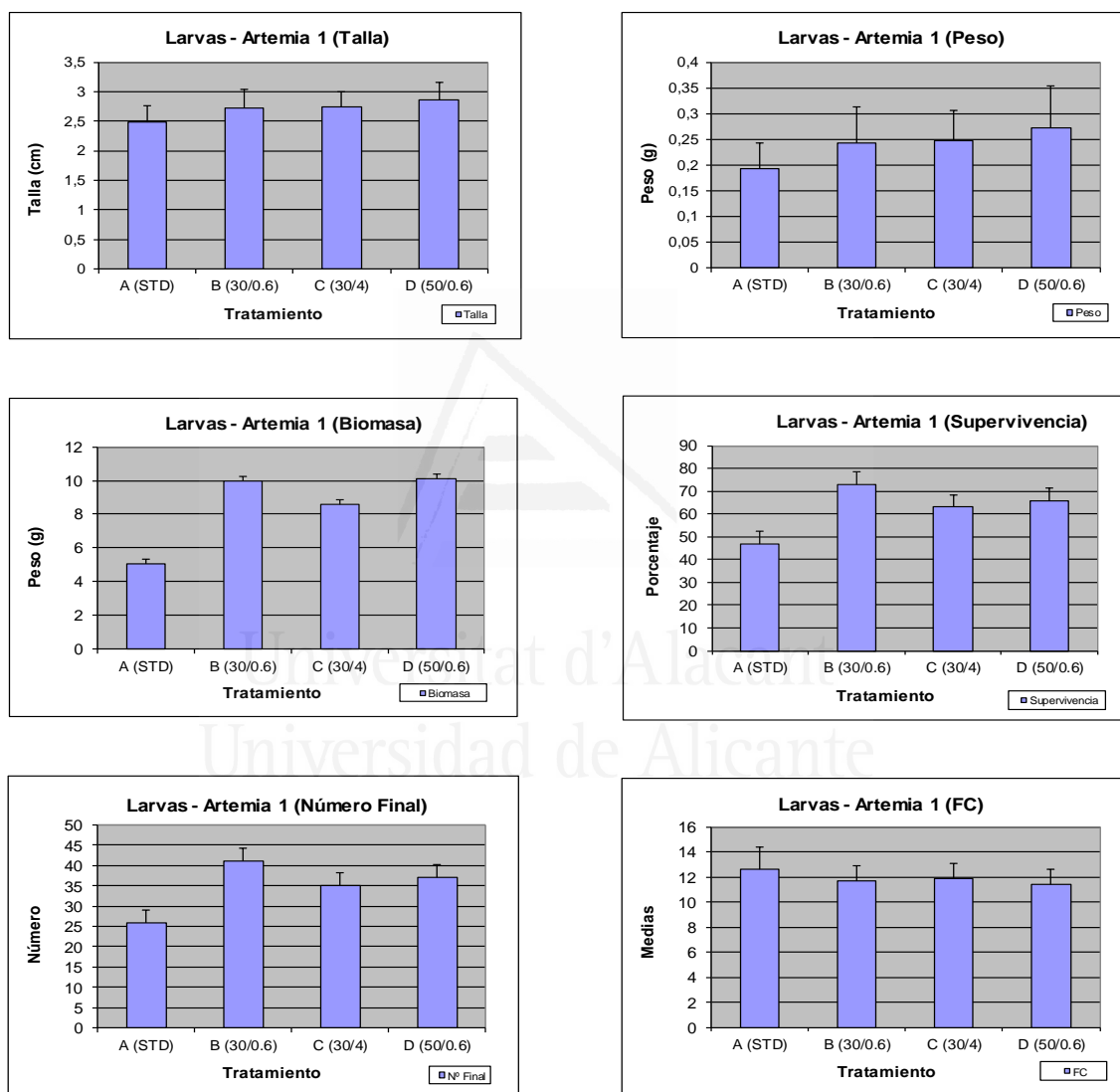
En la Figura 34 se representa la relación entre el peso y la talla de las larvas de los tratamientos A, B, C y D. La curva de regresión que mejor se ajusta a los datos es la potencial. Esta curva se describe por la ecuación  $y = ax^b$ , en donde: y es el peso, a es la constante, x corresponde a la talla y b es la pendiente de la curva.  $R^2$  indica el nivel de ajuste de la línea de tendencia a los datos.



**Figura 34.** Relación Talla – Peso de larvas en fase *Artemia* de los tratamientos A – D.



En la **Figura 35** se compara el crecimiento de las larvas de los diferentes tratamientos con *Artemia* enriquecida del primer año. Se incluyen los parámetros de Talla media, Peso medio, Biomasa, Número final, Inflación de vejiga y Supervivencia.



**Figura 35.** Diagrama de barras de parámetros biométricos de larvas en fase *Artemia* del primer año. Las barras representan los valores de las medias + SD.

#### 4.4. EXPERIMENTO III. DETERMINACIÓN DE CONTENIDOS DE ÁCIDOS GRASOS EN LARVAS EN FASE DE ALIMENTACIÓN CON ARTEMIA – SEGUNDO AÑO.

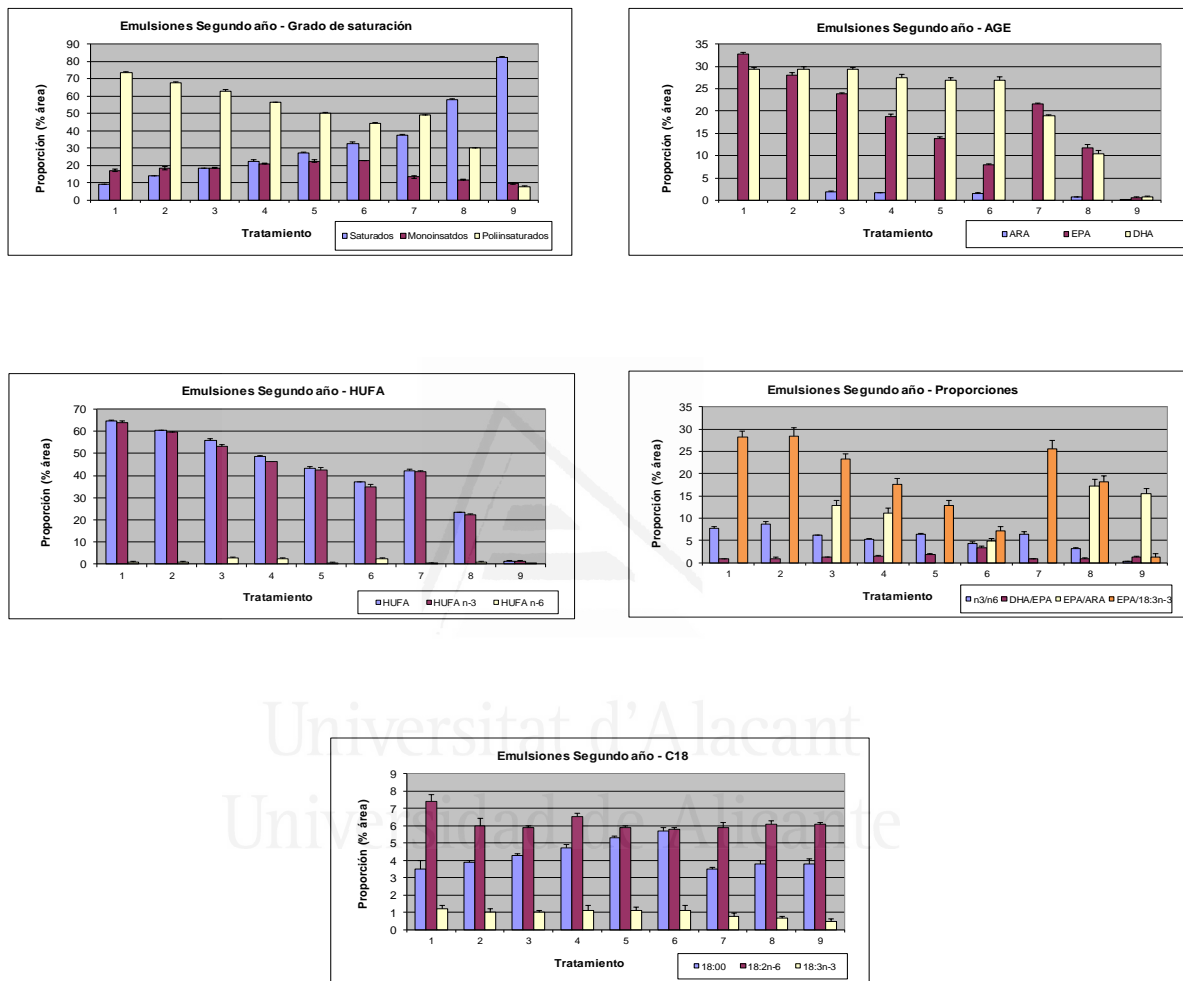
En este experimento se utilizaron larvas de dentón de 24 a 41 dph sometidas a alimentación con *Artemia* enriquecida con 9 tratamientos elaborados a partir de tres emulsiones base ICES (STD, 30/4/C y 50/0.6/C) mezcladas en diferentes proporciones. En este apartado se incluyen los contenidos de ácidos grasos de las 9 mezclas de emulsiones (**Tabla 25** y **Figura 36**), los contenidos de ácidos grasos de la *Artemia* de los 9 tratamientos (**Tabla 26** y **Figura 37**), también incluye los contenidos de ácidos grasos de las larvas alimentadas con dicha *Artemia* (**Tabla 27** y **Figura 38**) y los parámetros que evalúan el efecto de los diferentes tratamientos de *Artemia* sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas (**Figuras 39, 40 y 41** y la **Tabla 28**).

4.4.1. Tabla y Diagramas de los perfiles de ácidos grasos en las mezclas de emulsiones del segundo año. La **Figura 36** permite visualizar las diferencias en contenidos de ácidos grasos entre las emulsiones de los tratamientos emulsiones del segundo año. Los ácidos grasos se discriminan por grupos según el grado de saturación, presencia de AGE, HUFA, C18 y proporciones entre algunos ácidos grasos

**Tabla 25.** Perfil de ácidos grasos en mezclas de emulsiones ICES – Segundo año.

Ácidos grasos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>C15</b>	0.1±0 f	0.18±0 d	0.38±0 d	0.48±0.02 c	0.69±0.02 b	0.95±0.0 a	0.0 h	0.0 h	0.02±0 g
<b>C16</b>	3.7±0.06	6.4±0.01	9.58±0.12	12.3±0.04	15.9±0.04	20.1±0.06	6.8±0.08	9.4±0.01	11.9±0.01
<b>C16:1 n-7</b>	0.83±0.01	1.38±0.03	2.1±0.03	2.5±0.08	3.9±0.09	4.8±0.01	0.42±0.01	0.24±0	0.1±0
<b>C17</b>	0.24±0.02	0.47±0.01	0.42±0.01	0.72±0.02	0.97±0.02	1.26±0.04	0.13±0.03	0.06±0	0.03±0
<b>C17:1 n-7</b>	0.08±0	0.18±0	0.1±0	0.13±0	0.48±0.01	0.2±0.01	0.04±0	0.02±0	0.0
<b>C18</b>	3.5±0.5	3.9±0.1	4.3±0.1	4.7±0.2	5.3±0.1	5.7±0.2	3.5±0.1	3.8±0.2	3.8±0.3
<b>C18:1 n-9</b>	10.95±0.03	11.7±0.1	11.9±0.1	14.0±0.2	14.0±0.3	15.0±0.1	9.8±0.1	9.8±0.02	9.4±0.03
<b>C18:2 n-6</b>	7.4±0.4 a	6.0±0.4 cd	5.9±0.1 de	6.5±0.2 b	5.8±0.1 e	5.8±0.1 e	5.9±0.3 e	6.1±0.2 c	6.1±0.1 c
<b>C18:3 n-6</b>	0.09±0	0.08±0	0.12±0	0.11±0	0.14±0	0.16±0	0.06±0	0.03±0	0.0
<b>C18:3 n-3</b>	1.2±0.2 a	0.99±0.2 f	1.0±0.1 e	1.1±0.3 b	1.1±0.2 b	1.1±0.3 b	0.78±0.2 g	0.65±0 h	0.5±0 i
<b>C20</b>	0.3±0.01	0.6±0.02	0.54±0.01	0.47±0.03	0.44±0.02	0.43±0.02	0.12±0.03	0.27±0	0.12±0
<b>C20:1 n-9</b>	4.1±0.06	3.96±0.08	3.4±0.04	3.0±0.09	1.8±0.04	1.2±0.03	2.4±0.03	1.39±0.01	0.13±0
<b>C22</b>	0.35±0.01	0.35±0.01	0.35±0.01	0.35±0.01	0.32±0.01	0.34±0.02	0.16±0.04	0.1±0	0.06±0
<b>C22:1 n-9</b>	0.2±0.05	0.16±0.02	0.13±0.04	0.1±0.04	1.0±0.06	0.7±0.08	0.13±0.01	0.06±0	0.05±0
<b>C20:4 n-6 (ARA)</b>	0.0 f	0.0 f	1.86±0.02 a	1.69±0.1 b	0.0 f	1.6±0.04 c	0.0 f	0.68±0 d	0.04±0 e
<b>C20:5 n-3 (EPA)</b>	32.7±0.5 a	28.1±0.5 b	23.8±0.3 c	18.8±0.6 e	13.9±0.3 f	8.0±0.2 h	21.5±0.3 d	11.8±0.7 g	0.6±0.1 i
<b>C22:6 n-3 (DHA)</b>	29.3±0.4 a	29.4±0.6 a	29.3±0.4 a	27.5±0.9 c	26.9±0.6 d	26.9±0.7 d	19.0±0.2 e	10.5±0.6 f	0.78±0.1 g
<b>Saturados</b>	9.3±0.1 i	13.9±0.3 h	18.3±0.2 g	22.6±0.7 f	27.1±0.6 e	32.6±0.9 d	37.5±0.5 c	58±0.3 b	82.1±0.6 a
<b>Monoinsatdos</b>	17.12±0.7 e	18.58±0.9 d	18.6±0.1 d	20.8±0.3 c	22.5±0.7 b	22.9±0.1 a	13.4±0.6 f	11.8±0.2 g	9.8±0.5 h
<b>Poliinsatdos</b>	73.5±0.6 a	67.5±0.7 b	63.0±0.8 c	56.4±0.2 d	50.36±0.1 e	44.3±0.5 g	49.0±0.2 f	30.2±0.1 h	8.0±0.1 i
<b>HUFA total</b>	64.8±2.7 a	60.3±1.2 b	55.9±1.4 c	48.7±1 d	43.2±2 e	37.3±0.5 g	42.3±1.5 f	23.4±1 h	1.44±0.3 i
<b>HUFA n-3</b>	63.9±2 a	59.5±1 b	53.2±1 c	46.4±0.8 d	42.6±0.9 e	35.0±0.9 g	41.8±0.7 f	22.4±0.8 h	1.4±0.2 i
<b>HUFA n-6</b>	1±0.4	0.9±0.25	2.6±0.5	2.4±0.4	0.7±0.2	2.3±0.45	0.5±0.1	1±0.15	0.04
<b>n3/n6</b>	7.7±0.4	8.6±0.7	6.2±0	5.3±0	6.6±0.1	4.4±0.4	6.5±0.4	3.2±0.1	0.3±0.1
<b>n3/n9</b>	3.9±0.3	3.5±0.3	3.3±0.3	2.6±0.4	2.4±0.2	2.0±0.2	3.3±0.2	1.99±0.1	0.19±0.1
<b>DHA/EPA</b>	0.9±0.1 g	1.0±0.2 f	1.2±0.1 e	1.46±0.3 c	1.9±0.1 b	3.3±0.4 a	0.9±0.1 i	0.9±0.2 h	1.2±0.3 d
<b>EPA/ARA</b>	0.0	0.0	12.8±1.3	11.2±1.1	0.0	4.9±0.5	0.0	17.3±1.4	15.5±1.2
<b>EPA/18:3n-3</b>	28.2±1.4	28.4±2	23.3±1.2	17.6±1.3	12.8±1.2	7.25±0.9	25.6±1.9	18.2±1.3	1.2±0.9

Los resultados se expresan en % de área del total de ácidos grasos y representan la media de las muestras ± SD. Las letras minúsculas expresan diferencias significativas entre las medias (n=2, ANOVA, test de Fisher  $p < 0.05$  y test de rangos múltiples)



**Figura 36.** Diagramas de barras de los perfiles de ácidos grasos de las emulsiones del segundo año. Las barras representan los valores de las medias + SD.

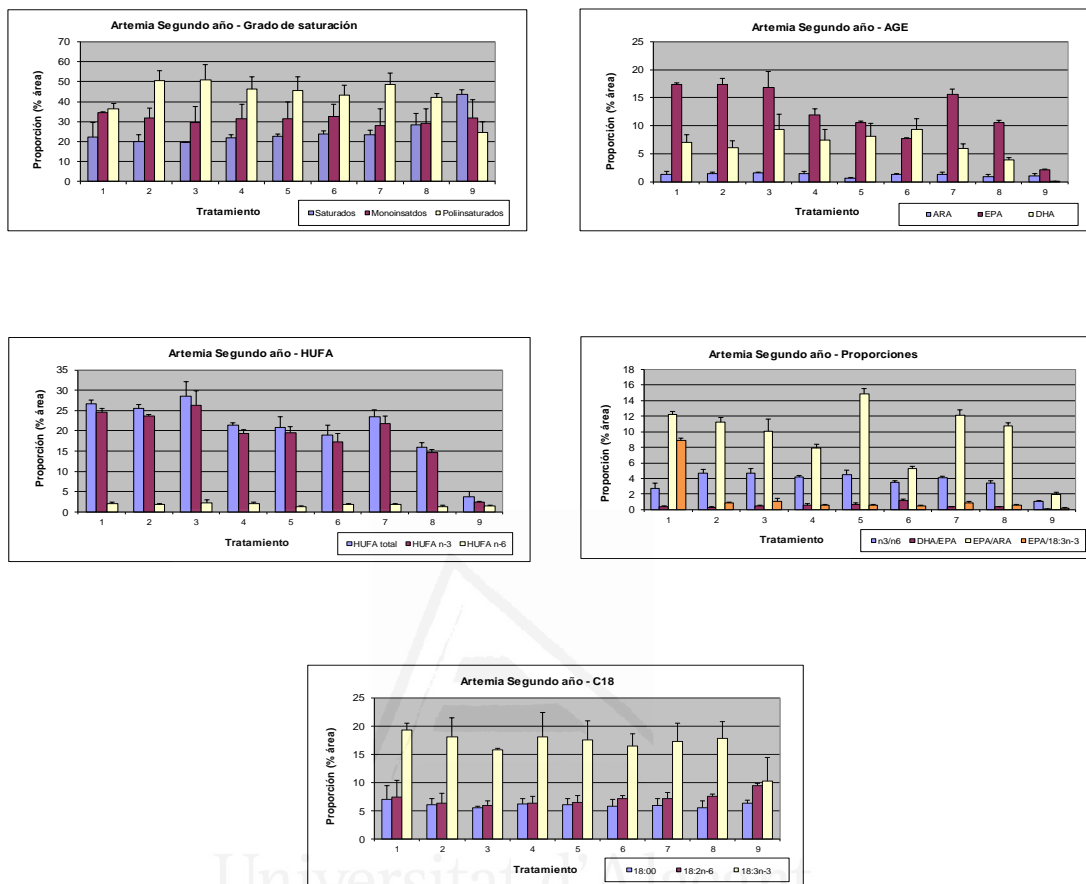
Analizando la Tabla 25 y la Figura 36 encontramos algunos hechos relevantes. En las emulsiones del segundo año encontramos un gradiente de concentración para los principales grupos de ácidos grasos. Así, entre las emulsiones 1 a 9 encontramos un gradiente decreciente de poliinsaturados, EPA, HUFA, HUFA n-3 y de las proporciones n3/n6 y EPA/18:3n-3, y un gradiente creciente de saturados. En cambio no encontramos grandes variaciones a nivel de 18:0, 18:2n-6, 18:3n-3, monoinsaturados, ARA y de la proporción DHA/EPA. Si observamos los extremos, la emulsión 1 tiene un contenido significativamente superior ( $p < 0.05$ ) de 18:3n-3, EPA, DHA, poliinsaturados, HUFA y HUFA n-3, mientras que la emulsión 9 presenta contenidos significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) de saturados y significativamente inferiores ( $p < 0.05$ ) de EPA, DHA, monoinsaturados, poliinsaturados, HUFA y HUFA n-3.

4.4.2. Tabla y Diagramas de los perfiles de ácidos grasos de Artemia enriquecida del segundo año. La Figura 37 permite visualizar las diferencias en contenidos de ácidos grasos entre los tratamientos de Artemia enriquecida del segundo año, se discriminan por grupos según el grado de saturación, presencia de AGE, HUFA, C18 y proporciones entre algunos ácidos grasos.

**Tabla 26.** Perfil de ácidos grasos en *Artemia* – Segundo año.

Ácidos grasos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>C15</b>	0.28±0.1	0.32±0	0.28±0.03	0.3±0.1	0.4±0.01	0.2±0.03	0.2±0.01	0.2±0.02	0.2±0.07
<b>C16</b>	12.1±2.8 bc	11.5±0.9 c	11.3±1.0 c	12.9±0.3 abc	13.6±0.3 abc	15.2±0.5 abc	12.6±0.7 abc	13.2±0.5 abc	16.1±2.3 a
<b>C16:1 n-7</b>	4.5±1.2 abc	4.0±0.2 abc	3.9±0.5 abc	4.5±0.1 abc	2.5±1.9 bcd	4.8±0.04 ab	1.8±0.2 cd	3.5±0.4 abcd	0.7±0.5 d
<b>C17</b>	1.3±0.9 ab	1.1±0.5 b	1.1±0.3 bc	0.7±0.2 bc	0.9±0.3 bc	0.9±0.3 bc	0.4±0.1 bc	0.9±0.3 bc	0.1±0.09 c
<b>C17:1 n-7</b>	1.2±0.6 ab	0.8±0.4 b	0.7±0.3 b	1.1±0.2 b	1.0±0.2 b	0.9±0.3 b	0.6±0.1 b	0.8±0.1 b	0.9±0.06 b
<b>C18</b>	7.0±2.4	6.1±1.1	5.6±0.2	6.2±1.0	6.1±1.1	5.8±1.2	5.9±1.3	5.6±1.1	6.4±0.5
<b>C18:1 n-9</b>	25.2±3.2	23.3±6.5	22.5±7.8	23.5±6.3	25.1±5.2	24.9±7.2	23.2±6.7	22.9±7.4	26.2±7.1
<b>C18:2 n-6</b>	7.4±3.0 ab	6.4±1.7 ab	5.9±0.8 b	6.3±1.3 ab	6.5±1.2 ab	7.2±0.5 ab	7.1±1.2 ab	7.6±0.4 ab	9.5±0.3 a
<b>C18:3 n-6</b>	0.7±0.06	0.5±0.1	0.5±0.3	0.6±0.2	0.6±0.2	0.6±0.3	0.6±0.3	0.6±0.3	0.8±0.5
<b>C18:3 n-3</b>	19.3±1.2 a	18.1±3.3 ab	15.8±0.2 ab	18.1±4.3 ab	17.5±3.4 ab	16.5±2.1 ab	17.3±3.2 ab	17.8±3.0 ab	10.2±4.2 b
<b>C20</b>	0.3±0.2 ab	0.1±0 ab	0.1±0.01 ab	0.3±0.1 ab	0.2±0.03 ab	0.3±0.04 ab	0.1±0.01 ab	0.08±0.01 b	0.1±0.03 ab
<b>C20:1 n-9</b>	1.1±0.05	0.6±0.06	0.6±0.05	0.5±0.03	0.5±0.05	0.4±0.09	0.5±0.06	0.4±0.02	2.5±0.3
<b>C22</b>	0.1±0.06	0.07±0.01	0.06±0.01	0.1±0.02	0.1±0.03	0.07±0.01	0.07±0.01	0.04±0.02	0.1±0.01
<b>C22:1 n-9</b>	1.5±0.5 ab	1.2±0.5 ab	1.0±0.4 ab	0.4±0.1 b	0.4±0.2 b	0.9±0.2 ab	0.4±0.1 b	0.8±0.4 ab	0.7±0.4 b
<b>C20:4 n-6 (ARA)</b>	1.4±0.5 a	1.5±0.3 a	1.6±0.2 a	1.5±0.4 a	0.7±0.1 a	1.4±0.1 a	1.2±0.4 a	0.9±0.5 a	1.1±0.4 a
<b>C20:5 n-3 (EPA)</b>	17.4±0.3 a	17.4±1.0 a	16.8±2.9 a	11.9±1.1 b	10.6±0.3 bc	7.7±0.1 c	15.6±1.0 a	10.6±0.4 bc	2.1±0.2 d
<b>C22:6 n-3 (DHA)</b>	7.1±1.3 ab	6.1±1.2 b	9.3±4.8 a	7.4±1.9 ab	8.1±2.3 ab	9.4±1.9 a	6.0±0.8 b	3.9±0.4 bc	0.1±0.01 c
<b>Saturados</b>	22.5±6.9 bc	19.9±3.7 bc	19.5±0.2 c	21.8±1.5 bc	22.7±1.2 bc	23.9±1.6 bc	23.3±2.5 bc	28.6±5.4 b	43.5±2.4 a
<b>Monoinsatdos</b>	34.7±0.3	31.9±5.0	29.5±7.9	31.5±7.4	31.6±8.3	32.6±6.3	28.1±8.4	29.3±7.3	31.9±9.1
<b>Poliinsatdos</b>	36.6±2.6 bc	50.7±4.9 a	50.8±7.9 a	46.5±5.9 ab	45.5±7.0 ab	43.4±4.7 ab	48.5±5.8 ab	42.0±1.9 ab	24.5±1.5 cd
<b>HUFA total</b>	26.6±0.9 ab	25.5±1 abc	28.5±7.6 a	21.4±0.5 bcd	20.9±2.6 bcd	19.0±2.4 cd	23.5±1.7 abc	15.9±1.2 d	3.8±1.2 e
<b>HUFA n-3</b>	24.6±1.0 ab	23.6±0.1 ab	26.1±7.7 a	19.4±0.8 bcd	19.6±1.4 bcd	17.2±2.1 cd	21.7±1.9 abc	14.6±0.8 d	2.4±0.2 e
<b>HUFA n-6</b>	2±0.4	1.9±0.1	2.3±0.6	2.0±0.5	1.3±0.1	1.8±0.2	1.8±0.3	1.3±0.4	1.4±0.3
<b>n3/n6</b>	2.7±0.7 c	4.7±0.5 a	4.7±0.6 a	4.1±0.2 ab	4.5±0.6 a	3.5±0.2 abc	4.1±0.2 ab	3.4±0.3 bc	1.1±0.1 d
<b>n3/n9</b>	0.9±0.06 abc	1.6±0.5 ab	1.8±0.9 a	1.6±0.7 ab	1.4±0.5 ab	1.3±0.5 abc	1.7±0.7 ab	1.4±0.5 ab	0.5±0.1 bc
<b>DHA/EPA</b>	0.4±0.08 dc	0.3±0.09 d	0.5±0.1 bc	0.6±0.2 bc	0.7±0.2 b	1.2±0.2 a	0.3±0.03 d	0.3±0.03 d	0.1±0.01 de
<b>EPA/ARA</b>	12.2±0.4	11.2±0.6	10.1±1.5	7.9±0.5	14.9±0.6	5.3±0.3	12.1±0.7	10.7±0.4	1.9±0.3
<b>EPA/18:3n-3</b>	8.9±0.3	0.9±0.1	1.1±0.4	0.6±0.1	0.6±0.1	0.5±0.1	0.9±0.2	0.6±0.1	0.2±0.05

Los resultados se expresan en % de área del total de ácidos grasos y representan la media de las muestras ± SD. Las letras minúsculas expresan diferencias significativas entre las medias (n=2, ANOVA, test de Fisher  $p < 0.05$  y test de rangos múltiples).



**Figura 37.** Diagramas de barras de los perfiles de ácidos grasos de *Artemia* enriquecida del segundo año. Las barras representan los valores de las medias + SD.

Analizando la **Tabla 26** y la **Figura 37** podemos resaltar varias cuestiones: con respecto al grado de saturación observamos que los contenidos de poliinsaturados mantienen la tendencia de disminución gradual desde *Artemia* 2 hasta *Artemia* 9; mientras que en saturados se mantiene una tendencia contraria, es decir un aumento gradual de la concentración desde *Artemia* 2 hasta *Artemia* 9, la excepción es la *Artemia* del tratamiento 1. Y con respecto a monoinsaturados se produce un ligero aumento de contenidos con respecto a las respectivas emulsiones. Por otra parte, respecto a EPA, HUFA y HUFA n-3 se mantiene la tendencia a una reducción gradual desde *Artemia* 1 a 9, mientras que en DHA se observa una reducción drástica en los contenidos con respecto a las emulsiones, en ARA se presentó un ligero aumento de contenidos respecto a las respectivas emulsiones. Y en los C18 se observó una disminución en los contenidos de 18:0 y 18:2n-6 mientras que se encontró un aumento general en los contenidos de 18:3n-3 con respecto a las emulsiones. La *Artemia* del tratamiento 9 se diferencia ampliamente del resto porque presenta contenidos significativamente menores ( $p < 0.05$ ) de EPA, DHA, poliinsaturados, HUFA total, HUFA n-3 y un contenido significativamente superior ( $p < 0.05$ ) de saturados.

A grandes rasgos encontramos que en *Artemia* ya no existe el gradiente de concentración en algunos ácidos grasos como saturados, poliinsaturados y DHA observado en las emulsiones, mientras que se mantiene el gradiente en EPA, HUFA y HUFA n-3. Por otra parte, disminuyen las concentraciones de 18:0, 18: 2n-6 y aumentan las concentraciones de 18:3n-3.

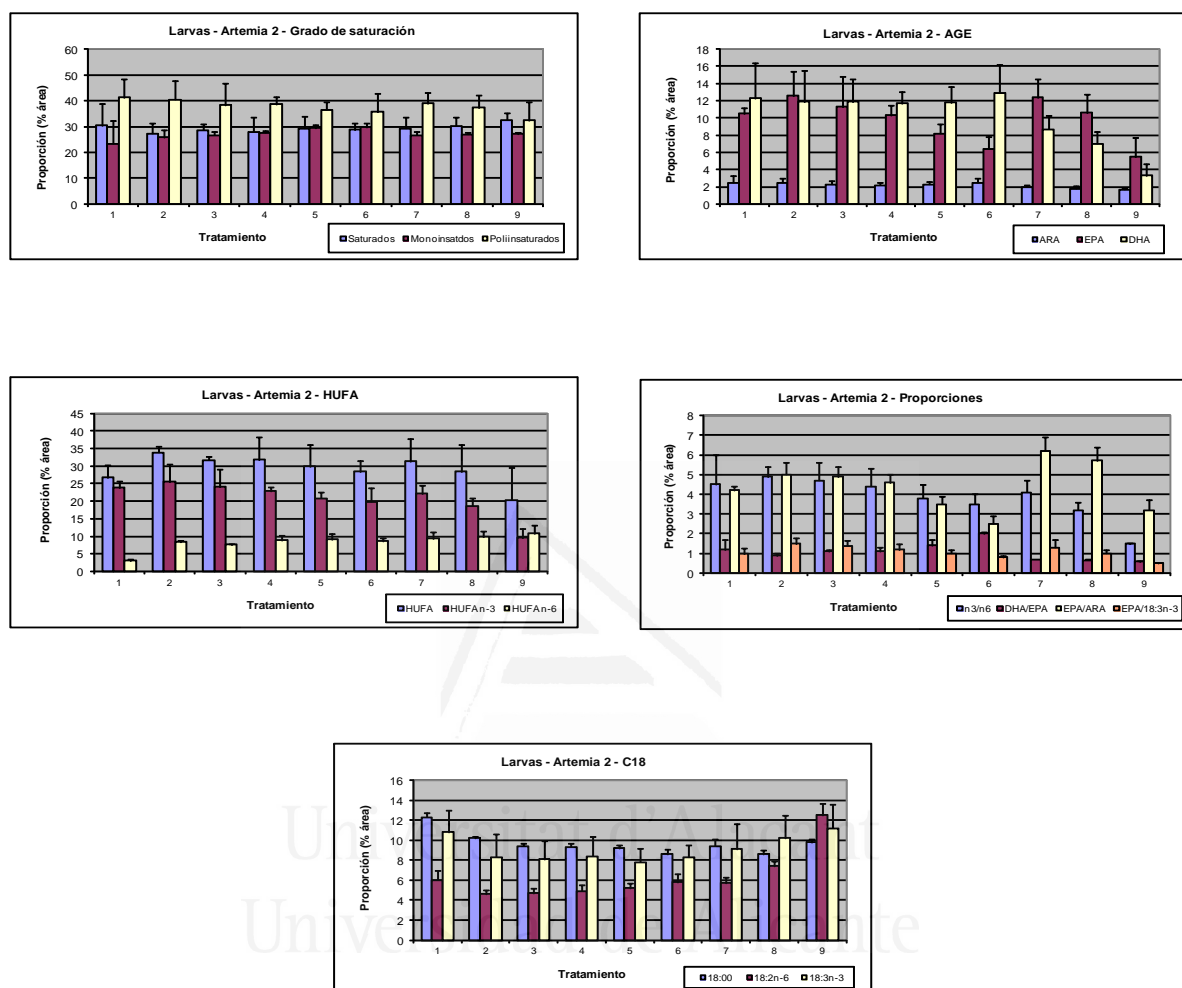
4.4.3. Tablas y Diagramas de los perfiles de ácidos grasos de las larvas alimentadas con *Artemia* enriquecida del segundo año. La Figura 38 permite visualizar las diferencias en contenidos de los ácidos grasos de las larvas en fase *Artemia* del segundo año. Los ácidos grasos se discriminan por grupos según el grado de saturación, presencia de AGE, HUFA, C18 y proporciones entre algunos ácidos grasos.



**Tabla 27.** Perfil de ácidos grasos en Larvas fase Artemia – Segundo año.

Ácidos grasos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>C15</b>	0.28±0.06	0.25±0.05	0.36±0.07	0.4±0.08	0.4±0.05	0.4±0.06	0.2±0.04	0.0	0.0
<b>C16</b>	19.9±2.2	16.6±1.8	17.2±2.1	18.6±2.3	19.2±2.3	18.4±2.0	17.8±1.9	17.4±1.6	19.4±2.2
<b>C16:1 n-7</b>	1.76±0.2	2.6±0.3	2.9±0.4	3.5±0.34	3.5±0.4	3.7±0.5	2.8±0.35	2.5±0.3	2.2±0.2
<b>C17</b>	1.6±0.2	1.3±0.1	1.5±0.18	1.6±0.1	1.6±0.2	1.5±0.3	1.2±0.1	1.0±0.12	1.0±0.1
<b>C17:1 n-7</b>	1.1±0.2	0.9±0.1	0.9±0	1.0±0.1	1.1±0.3	1.1±0.1	0.8±0.1	0.7±0	0.9±0.2
<b>C18</b>	12.3±0.4	10.2±0.2	9.4±0.3	9.3±0.4	9.2±0.3	8.6±0.5	9.4±0.7	8.6±0.4	9.8±0.3
<b>C18:1 n-9</b>	10.8±1.1	17.3±1.9	18.3±2.0	19.4±1.8	20.7±2.3	20.7±1.2	19.2±1.4	19.4±2.1	18.8±1.7
<b>C18:2 n-6</b>	6.0±1.0	4.6±0.4	4.7±0.5	4.9±0.6	5.2±0.5	5.8±0.8	5.7±0.6	7.4±0.5	12.5±1.2
<b>C18:3 n-6</b>	0.3±0.04	0.2±0.01	0.2±0.02	0.2±0	0.2±0.01	0.2±0	0.3±0.03	0.3±0.04	0.3±0.02
<b>C18:3 n-3</b>	10.8±2.2	8.3±2.3	8.1±1.8	8.4±2.0	7.8±1.4	8.3±1.2	9.1±2.5	10.2±2.3	11.2±2.4
<b>C20</b>	0.4±0.03	0.28±0.01	0.27±0.02	0.26±0.01	0.25±0.04	0.24±0.01	0.27±0.03	0.25±0	0.0
<b>C20:1 n-9</b>	1.1±0.2	0.8±0.05	1.0±0	0.9±0.01	0.9±0	1.1±0.1	1.1±0.2	1.4±0	1.8±0.4
<b>C22</b>	0.36±0.03	0.25±0	0.27±0	0.3±0.01	0.3±0	0.28±0	0.28±0.02	0.25±0.01	0.0
<b>C22:1 n-9</b>	0.1±0	0.6±0.01	0.6±0.03	0.6±0	0.5±0.04	0.4±0	0.1±0	0.7±0.1	1.1±0.3
<b>C20:4 n-6 (ARA)</b>	2.5±0.8 a	2.5±0.5 a	2.3±0.4 a	2.2±0.3 a	2.3±0.3 a	2.5±0.5 a	2.0±0.2 a	1.8±0.3 a	1.7±0.2 a
<b>C20:5 n-3 (EPA)</b>	10.5±0.7 ab	12.6±2.8 a	11.3±3.5 a	10.3±1.2 ab	8.2±1.1 bc	6.4±1.4 bc	12.4±2.1 ab	10.6±2.1 ab	5.5±2.2 c
<b>C22:6 n-3 (DHA)</b>	12.3±4.1 ab	11.9±3.6 ab	11.9±2.6 ab	11.7±1.3 ab	11.8±1.8 ab	12.9±3.3 a	8.7±1.6 abc	7.0±1.4 bc	3.3±1.4 c
<b>Saturados</b>	30.5±8.5	27.3±3.9	28.7±2.3	27.9±5.7	29.3±4.8	28.8±2.6	29.3±4.4	30.3±3.2	32.5±2.7
<b>Monoinsatdos</b>	23.4±8.9	25.9±2.7	26.6±1.6	27.7±0.7	29.4±1.4	29.7±1.5	26.7±1.4	27.0±0.8	27.1±0.6
<b>Poliinsatdos</b>	41.2±7.3	40.5±7.4	38.3±8.3	38.6±3.0	36.5±3.2	35.7±7.0	38.9±4.2	37.4±4.8	32.4±7.7
<b>HUFA total</b>	26.8±3.4 a	33.9±1.8 a	31.7±0.9 a	31.8±6.6 a	29.9±6.1 a	28.5±3.1 a	31.4±6.4 a	28.4±7.8 a	20.4±9.3 b
<b>HUFA n-3</b>	23.8±1.9 a	25.5±5.1 a	24.1±4.9 a	22.9±1.2 a	20.8±1.8 a	19.9±3.9 a	22.1±2.3 a	18.6±2.3 a	9.6±2.6 b
<b>HUFA n-6</b>	3.1±0.4	8.4±0.5	7.6±0.35	8.9±1.4	9.1±1.7	8.6±0.9	9.3±1.8	9.8±1.7	10.8±2.4
<b>n3/n6</b>	4.5±1.5 a	4.9±0.5 a	4.7±0.9 a	4.4±0.9 a	3.8±0.7 a	3.5±0.5 a	4.1±0.6 a	3.2±0.4 ab	1.5±0.02 b
<b>n3/n9</b>	2.4±0.8 a	1.9±0.1 ab	1.7±0.06 ab	1.6±0.2 b	1.5±0.2 bc	1.4±0.02 bc	1.6±0.1 b	1.4±0.1 bc	0.9±0.03 c
<b>DHA/EPA</b>	1.2±0.5 bc	0.9±0.1 cd	1.1±0.1 bc	1.1±0.02 bc	1.4±0.03 b	2.0±0.1 a	0.69±0.01 d	0.65±0.04 d	0.59±0.02 d
<b>EPA/ARA</b>	4.2±0.2	5.0±0.6	4.9±0.5	4.6±0.4	3.5±0.4	2.5±0.4	6.2±0.7	5.7±0.7	3.2±0.5
<b>EPA/18:3n-3</b>	0.97±0.3	1.5±0.3	1.39±0.28	1.2±0.3	1.0±0.2	0.8±0.1	1.3±0.4	1.0±0.2	0.5±0.05

Los resultados se expresan en % de área del total de ácidos grasos y representan la media de las muestras ± SD. Las letras minúsculas expresan diferencias significativas entre las medias (n = 2, ANOVA, test de Fisher  $p < 0.05$  y test de rangos múltiples).



**Figura 38.** Diagramas de barras de los perfiles de ácidos grasos de las larvas en fase *Artemia* del segundo año. Las barras representan los valores de las medias + SD.

Analizando la Tabla 27 y la Figura 38 encontramos algunos datos relevantes. A nivel general se observa que en las larvas hay una homogenización de contenidos de 18:3n-3, saturados, monoinsaturados y poliinsaturados con respecto a emulsiones y *Artemia*. ARA se homogeniza con respecto a emulsiones y aumenta ligeramente con respecto a *Artemia*. En larvas se conserva el gradiente de concentración de EPA, DHA, HUFA y HUFA n-3 observado en emulsiones y *Artemia*, con la excepción de las larvas del tratamiento 1, mientras que el contenido de ARA es homogéneo en las larvas de todos los tratamientos. En los C18 de larvas, observamos un aumento en los contenidos de 18:0 y 18:2n-6 con respecto a *Artemia*, mientras que las concentraciones de 18:3n-3 aumentan con respecto a las respectivas emulsiones y se hacen casi homogéneos con respecto a lo observado en *Artemia*.

Es importante destacar que las larvas del tratamiento 9 presentan contenidos significativamente menores ( $p < 0.05$ ) de EPA, DHA, HUFA total, HUFA n-3 y de la proporción n3/n6 con respecto al resto de larvas.

4.4.4. Evaluación del crecimiento de larvas en fase de alimentación con *Artemia* del segundo año. En la Tabla 28 se resumen los datos de los parámetros biométricos de larvas en fase *Artemia* del segundo año. Se incluyen Peso medio, Talla media, Número final, Supervivencia, Biomasa y Factor de condición.

Tratamiento	Peso medio ±SD (g)	Talla media ± SD (cm)	Número final	Supervivencia (%)	Biomasa final (g)	Factor de condición
1	0,253±0,06 <sup>b</sup>	2,79±0,24 <sup>b</sup>	22±1.1	40,7±2	5,6±0.25	11,48±0,8 <sup>c</sup>
2	0,286±0,08 <sup>ab</sup>	2,83±0,29 <sup>b</sup>	23±1.1	42,6±2.1	6,58±0.28	12,11±1,1 <sup>a</sup>
3	0,285±0,06 <sup>ab</sup>	2,90±0,2 <sup>ab</sup>	24±1.2	44,4±2.2	6,8±0.28	11,48±0,7 <sup>c</sup>
4	0,299±0,09 <sup>a</sup>	2,9±0,33 <sup>ab</sup>	23±1.1	42,6±2.1	6,8±0.29	12,1±1,3 <sup>a</sup>
5	0,292±0,07 <sup>ab</sup>	2,91±0,23 <sup>ab</sup>	25±1.25	46,3±2.3	7,3±0.29	11,6±0,7 <sup>abc</sup>
6	0,279±0,07 <sup>ab</sup>	2,90±0,26 <sup>ab</sup>	19±0.9	35,2±1.7	5,3±0.27	11,6±1 <sup>abc</sup>
7	0,315±0,07 <sup>a</sup>	3,0±0,21 <sup>a</sup>	24±1.2	44,4±2.2	7,56±0.3	11,5±0,9 <sup>bc</sup>
8	0,302±0,01 <sup>a</sup>	2,95±0,3 <sup>ab</sup>	18±0.9	33,3±1.6	5,4±0.3	11,49±0,8 <sup>bc</sup>
9	0,162±0,04 <sup>c</sup>	2,37±0,2 <sup>c</sup>	10±0.5	1,5±0.1	1,6±0.2	12±0,6 <sup>a</sup>

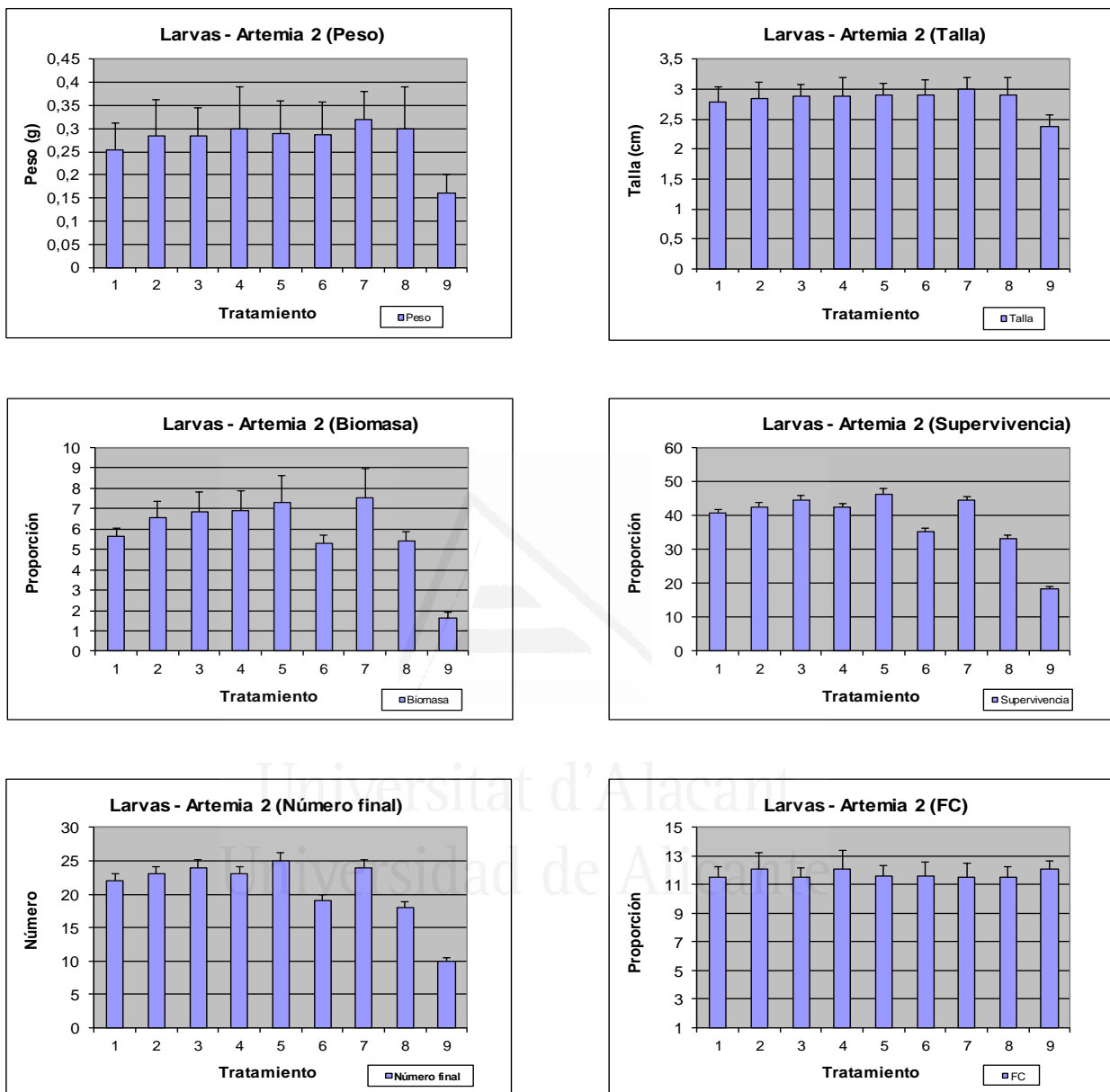
Los resultados se expresan como la media de las muestras ± SD. Las letras a-c expresan diferencias significativas entre las medias (n = 2, ANOVA, test de Fisher  $p < 0.05$  y test de rangos múltiples).

Analizando la **Tabla 28** y las **Figuras 38 y 39** encontramos que las larvas del tratamiento 9 presentan valores significativamente menores ( $p < 0.05$ ) en peso, talla, biomasa, supervivencia y número final con respecto a las larvas del resto de tratamientos; por otra parte, no existen grandes diferencias a nivel de peso y talla entre las larvas de los otros tratamientos (1 a 8); mientras que las larvas de los tratamientos 3, 5 y 7 presentaron resultados significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) a los del resto de larvas para los parámetros de número final, supervivencia y biomasa final. Según las **Figuras 40 y 41** que relacionan peso medio y talla media, las larvas de los tratamientos 4, 7 y 8 fueron las que alcanzaron mayor crecimiento.

En la **Figura 39** se compara el crecimiento de las larvas de los diferentes tratamientos con *Artemia* enriquecida del segundo año. Se incluyen los parámetros de Talla media, Peso medio, Biomasa, Número final, Inflación de vejiga y Supervivencia.

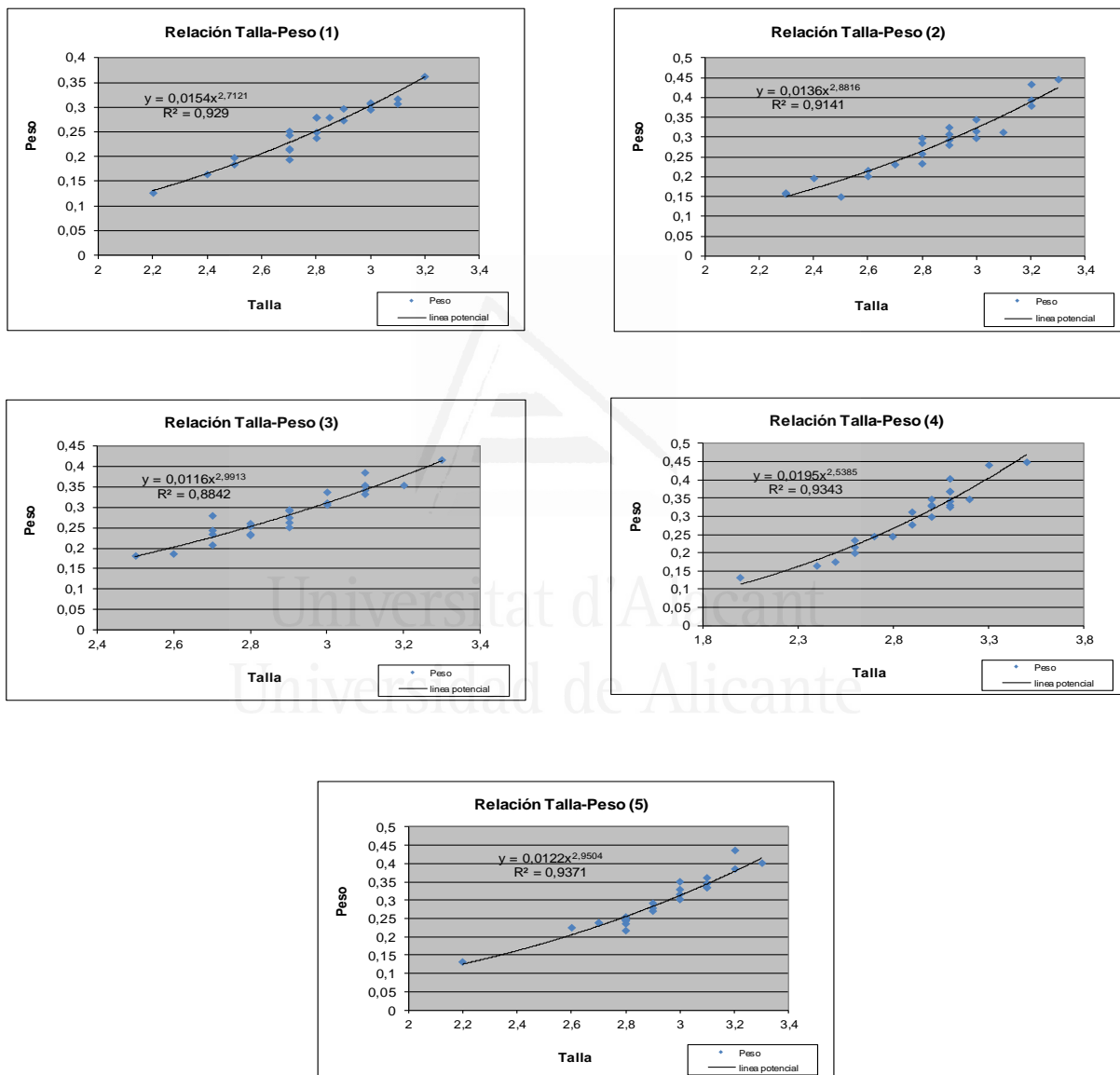


Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



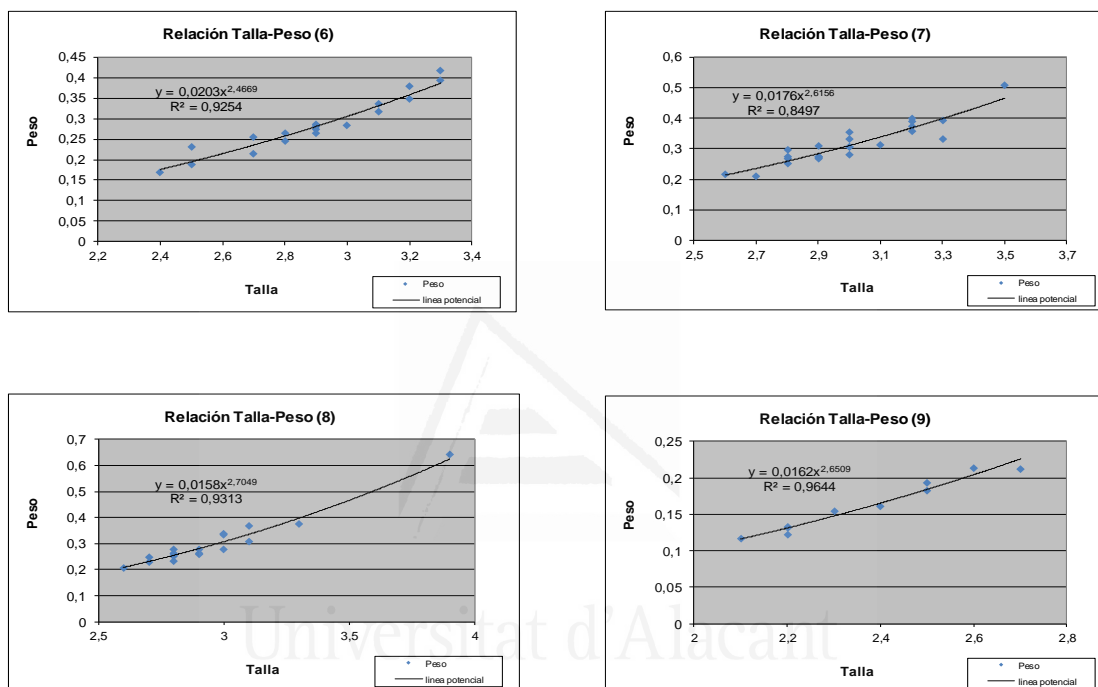
**Figura 39.** Parámetros de crecimiento de larvas en fase *Artemia* del segundo año. Las barras representan los valores de las medias + SD.

En la Figura 40 se representa la relación entre peso y talla de las larvas de los tratamientos 1 a 5. La curva de regresión que mejor se ajusta a los datos es la potencial. Esta curva se describe por la ecuación  $y = ax^b$ , en donde:  $y$  es el peso,  $a$  es la constante,  $x$  corresponde a la talla y  $b$  es la pendiente de la curva.  $R^2$  indica el nivel de ajuste de la línea de tendencia a los datos.



**Figura 40.** Relación Talla – Peso de larvas en fase *Artemia* de los tratamientos 1- 5 del segundo año.

En la Figura 41 se representa la relación peso y talla de las larvas de los tratamientos 6 a 9. La curva de regresión que mejor se ajusta a los datos es la potencial. Esta curva se describe por la ecuación  $y = ax^b$ , en donde: y es el peso, a es la constante, x corresponde a la talla y b es la pendiente de la curva.  $R^2$  indica el nivel de ajuste de la línea de tendencia a los datos.



**Figura 41.** Relación Talla – Peso de larvas en fase *Artemia* de los tratamientos 6 – 9 del segundo año.

#### 4.5. EXPERIMENTO IV: EVOLUCIÓN DE LOS PERFILES DE ÁCIDOS GRASOS EN LOS ESTADIOS ENDOTRÓFICOS (HUEVO, HUEVO EN EMBRIÓN, LARVAS EN ECLOSIÓN Y CON APERTURA DE LA BOCA).

En el **Experimento IV** se emplearon las puestas de un lote de reproductores del IEO – Planta de cultivos marinos de Murcia. Se recolectaron tres series de puestas consecutivas de los meses de abril, mayo y junio. Se distinguieron cuatro estadios en la evolución endotrófica (huevo, huevo con embrión, larva en eclosión y larva con apertura de la boca). En este apartado se incluyen los contenidos de ácidos grasos de la suma de las series de las puestas de abril, mayo y junio (**Tabla 29** y **Figura 42**), los contenidos de los principales grupos de ácidos grasos para cada una de las series de puestas de abril, mayo y junio (**Figura 43**), también se incluyen los parámetros que evalúan el efecto de cada una de esas series sobre la calidad del huevo a través del tiempo (**Figura 44**) y los parámetros que evalúan el efecto de cada una de las series de puestas sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas a lo largo del tiempo (**Figura 45**).

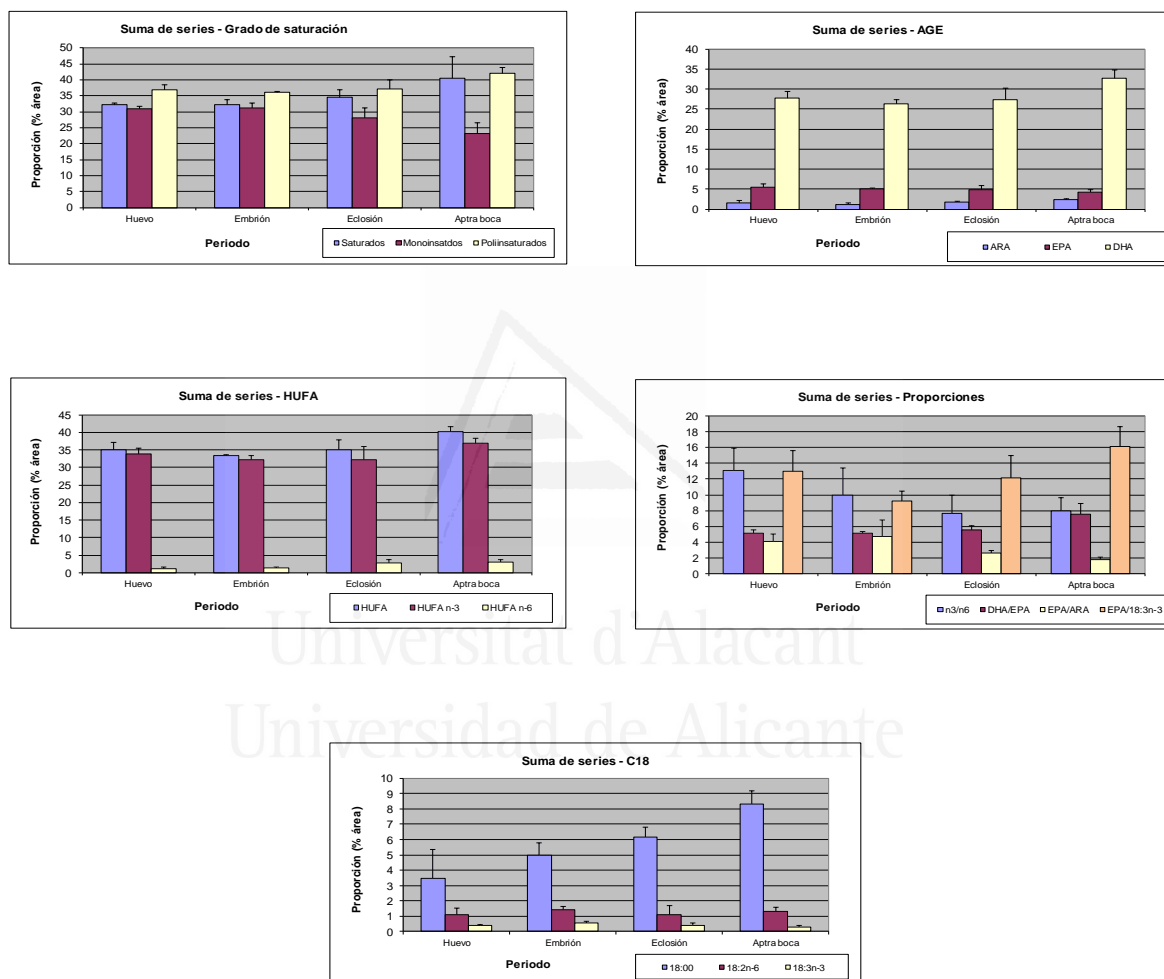
4.5.1. Tabla y Diagramas de los perfiles de ácidos grasos de la suma de las puestas de abril, mayo y junio. La Tabla 29 resume los perfiles de ácidos grasos la suma de las puestas de abril, mayo y junio para los estadios endotróficos (huevo, huevo embrionado, larva eclosionada y larvas con apertura de la boca).



Ácido graso	Suma de series de las puestas			
	Huevo	H. en embrión	Eclosión	Apertura boca
C16:0	23.8±1.4 b	22.89±0.5 b	23.3±0.7 b	26.14±1.6 a
C16:1n-7	6.08±1.2	7.8±1.1	4.94±1.0	3.67±1.2
C17:0	0.72±0.2	0.64±0.0	0.73±0.0	0.68±0.0
C17:1n-7	0.67±0.0 b	2.08±0.0 a	2.13±0.0 a	0.58±0.0 b
C18:0	3.47±1.9 c	4.99±0.8 bc	6.14±0.64 b	8.33±0.86 a
C18:1n-9	22.19±3.4 a	19.26±0.5 b	18.74±1.5 b	16.07±1.8 c
C18:2n-6	1.1±0.45	1.43±0.2	1.1±0.6	1.29±0.3
C18:3n-3	0.42±0.04 a	0.56±0.1 a	0.4±0.15 a	0.27±0.1 b
C20:0	0.59±0.1 b	0.49±0.0 b	0.6±0.0 b	1.06±0.2 a
C20:1n-9	0.62±0.0	0.76±0.1	0.66±0.1	0.98±0.2
C20:2n-6	0.18±0.0	0.19±0.0	0.4±0.0	0.49±0.1
C20:3n-3	0.9±0.1 a	0.68±0.1 a	0.004±0.0 b	0.04±0.0 b
C20:4n-6 (ARA)	1.5±0.6 b	1.1±0.4 b	1.89±0.2 ab	2.48±0.2 a
C20:5n-3 (EPA)	5.46±0.79 a	5.15±0.16 a	4.97±0.88 a	4.35±0.46 b
C22:6n-3 (DHA)	27.8±1.7 b	26.38±1.0 b	27.3±2.84 b	32.65±2.1 a
<b>Saturados</b>	32.13±0.53 b	32.24±1.64 b	34.6±2.18 b	40.48±6.69 a
<b>Monoinsaturados</b>	30.85±0.96 a	31.1±1.68 a	28.1±3.1 b	23.29±3.18 c
<b>Poliinsaturados</b>	37±1.45 b	36.16±0.2 b	37.22±2.84 b	42.18±1.58 a
<b>HUFA total</b>	35.1±2.1 b	33.47±0.2 b	35.1±2.8 b	40.1±1.6 a
<b>HUFA n-3</b>	33.88±1.6 b	32.18±1.2 b	32.27±3.6 b	37±1.4 a
<b>HUFA n-6</b>	1.2±0.5 b	1.29±0.35 b	2.8±0.9 a	3.1±0.7 a
<b>n3/n6</b>	13.1±2.8 a	9.94±3.5 b	7.65±2.3 c	7.98±1.7 c
<b>DHA/EPA</b>	5.14±0.4 b	5.15±0.2 b	5.55±0.5 b	7.58±1.3 a
<b>EPA/ARA</b>	4.1±0.9 a	4.68±2.1 a	2.6±0.3 b	1.75±0.4 c
<b>EPA/18:3n-3</b>	13±2.6 b	9.19±1.3 c	12.12±2.9 b	16.1±2.5 a

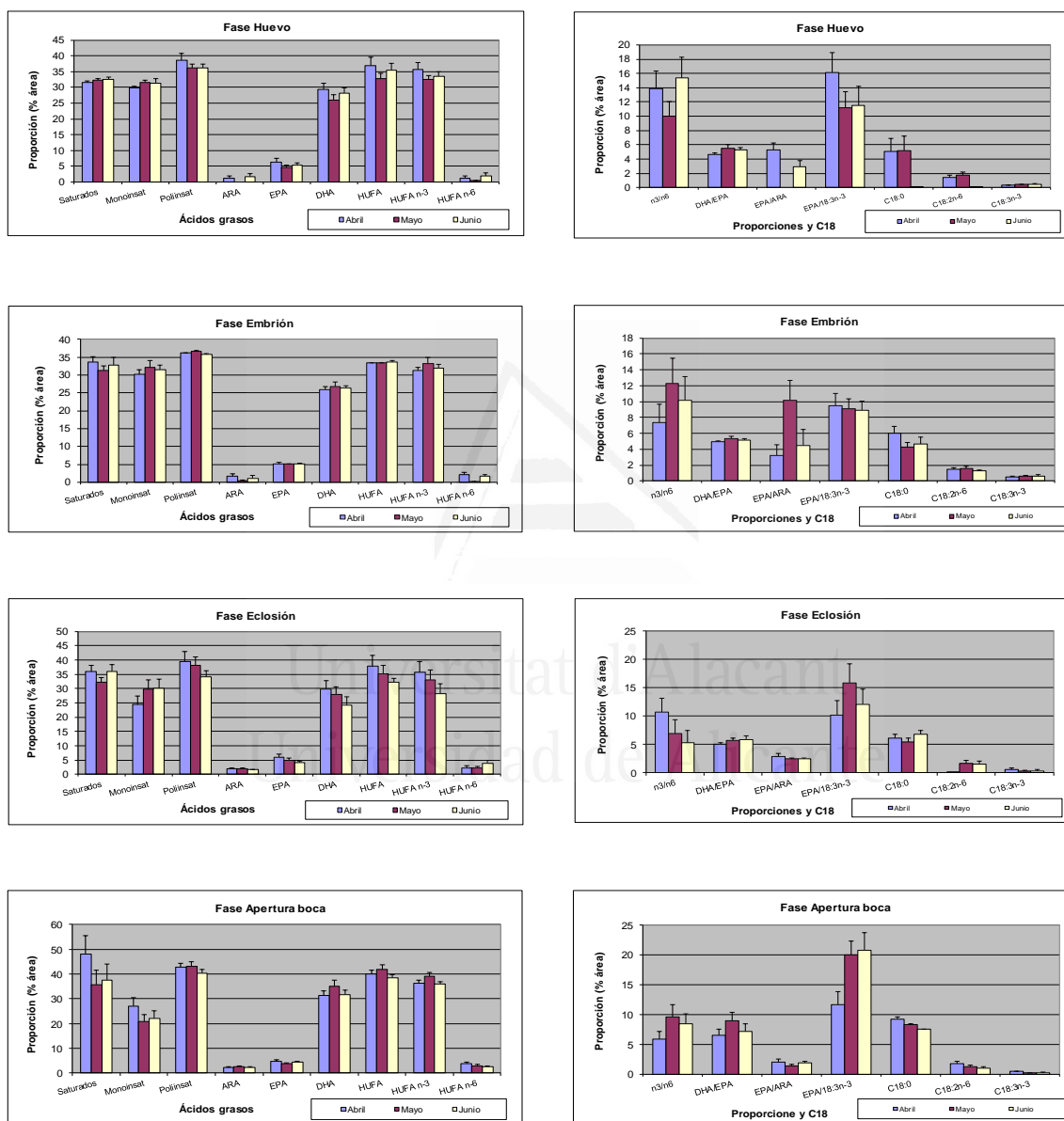
Los resultados se expresan en % de área del total de ácidos grasos y representan la media de las muestras ± SD. Las letras a-c expresan diferencias significativas entre las medias (n = 2, ANOVA, test de Fisher  $p < 0.05$  y test de rangos múltiples).

La **Figura 42** muestra los principales ácidos grasos de los cuatro estadios endotróficos (para cada uno de los cuales se sumaron los valores de las series de las puestas de abril, mayo y junio). Los ácidos grasos se discriminan por grupos según el grado de saturación, presencia de AGE, HUFA, C18 y proporciones de ácidos grasos.



**Figura 42.** Diagramas de barras de los principales ácidos grasos de los cuatro estadios endotróficos (para cada uno de ellos se sumaron los valores de abril, mayo y junio): Las barras representan los valores de las medias + SD.

La **Figura 43** muestra los contenidos de ácidos grasos de los cuatro estadios endotróficos (huevo, huevo en embrión, larva en eclosión y larva en apertura de la boca) para los meses de abril, mayo y junio. En cada estadio los ácidos grasos se discriminaron en dos grupos: el primer grupo incluye los principales tipos de ácidos grasos y el segundo grupo incluye las proporciones y los C18.



**Figura 43.** Diagrama de barras de los perfiles de ácidos grasos de los estadios endotróficos para cada una de las series de puestas (abril, mayo y junio). Las barras indican los valores de las medias + SD.

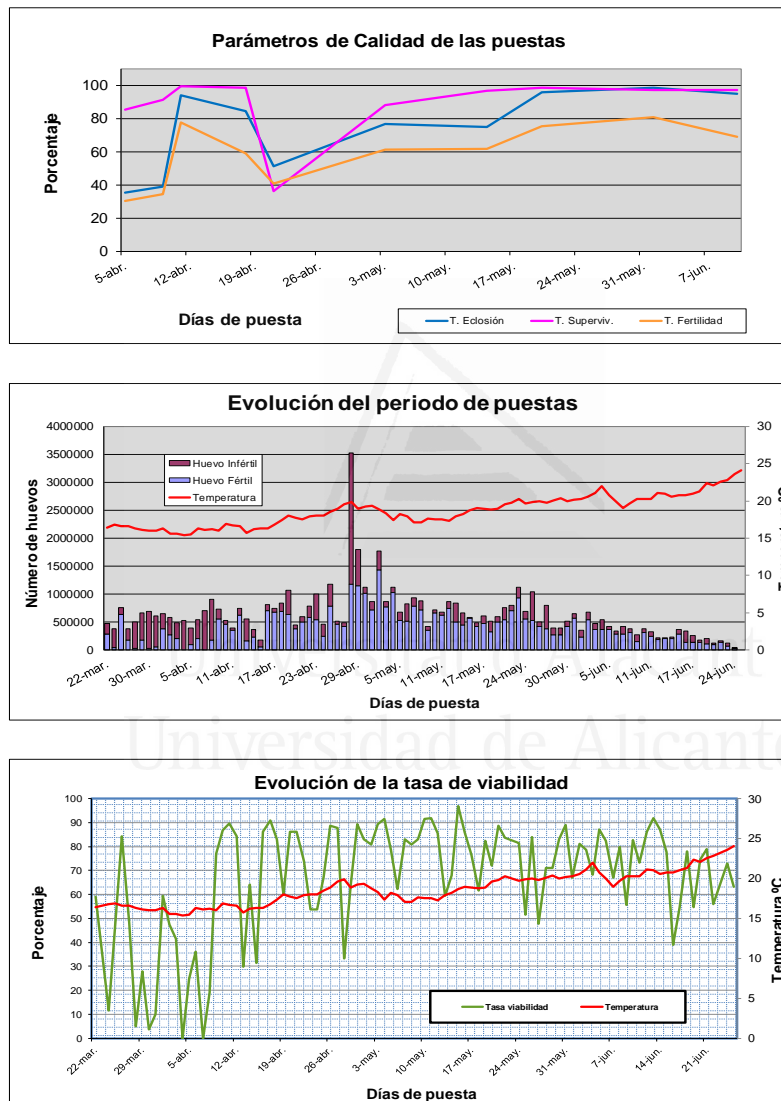
Analizando la **Tabla 29** y las **Figuras 42 y 43** destacamos algunos hechos. Cuando observamos los datos de la suma de las series de las puestas (**Figura 42**) encontramos que las principales diferencias en contenidos de ácidos grasos, se dan entre el estadio de apertura de la boca con respecto al resto de estadios endotróficos. Así, en este periodo encontramos contenidos significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) de ARA, DHA, saturados, poliinsaturados, HUFA total, HUFA n-3 y en las proporciones DHA/EPA y EPA/18:3n-3, mientras que observamos contenidos significativamente menores ( $p < 0.05$ ) de EPA, monoinsaturados y en las proporciones n3/n6 y EPA/ARA con respecto al resto de estadios. Por el contrario, entre los periodos de huevo, huevo en embrión y eclosión no encontramos diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) a nivel AGE, HUFA, saturados, poliinsaturados y en la proporción DHA/EPA. Tampoco se encontraron diferencias significativas en contenidos de ácidos grasos y sus proporciones, cuando comparamos las tres series de puestas de abril, mayo y junio (**Figura 43**), y esto es válido para los cuatro estadios endotróficos (huevo, huevo en embrión, larvas en eclosión y larvas en apertura de la boca).

#### 4.5.2. EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LOS PARÁMETROS DE LAS PUESTAS Y EN LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DE LAS LARVAS A TRAVÉS DEL TIEMPO.

A pesar de que en los cuatro estadios endotróficos (huevo, huevo en embrión, larvas en eclosión y larvas en apertura de la boca) no se observaron grandes diferencias entre las tres series (abril, mayo y junio) tanto a nivel de ácidos grasos como de las proporciones entre ellos. Sí que se observamos cambios en los parámetros que evalúan la calidad del huevo (**Figura 44**): así, hay reducción en el porcentaje de eclosión, en la tasa de supervivencia y en la tasa de fertilidad durante la serie de abril, mientras que durante las series de mayo y junio estos parámetros presentan pocas variaciones y alcanzan mayores porcentajes. También al comienzo de la serie de abril observamos mayor cantidad de huevo infértil y menor porcentaje en la tasa de viabilidad.

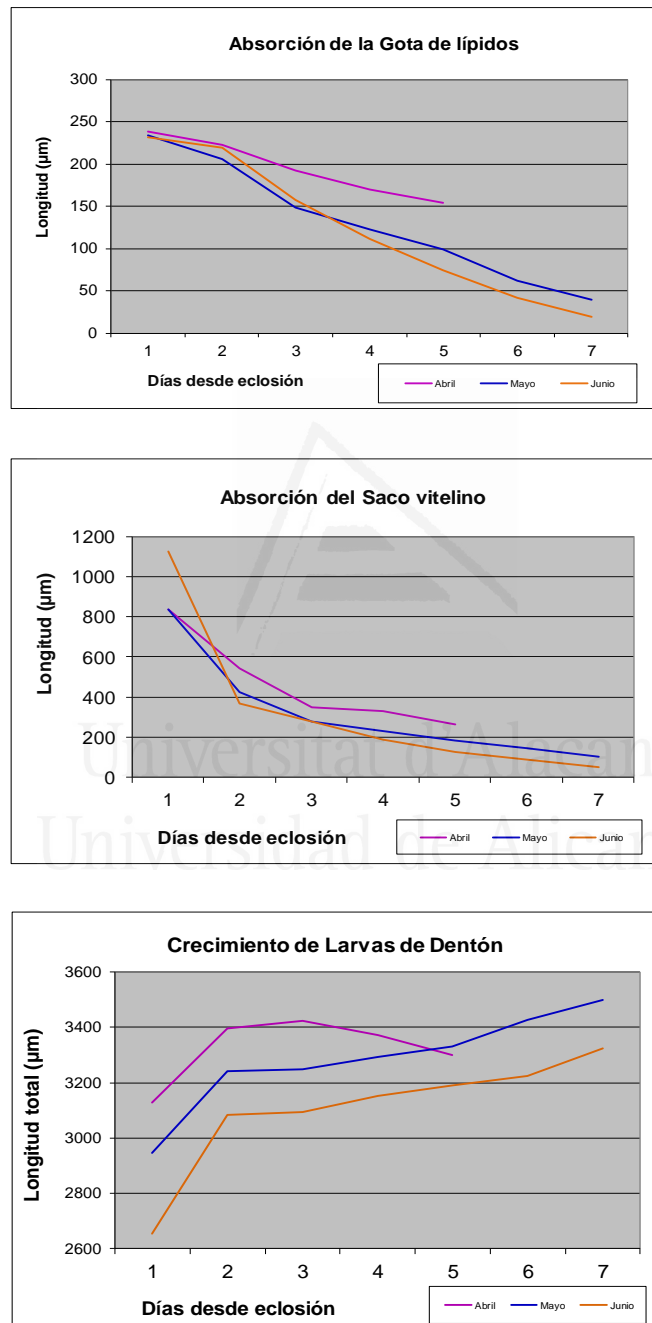
A nivel de larvas (**Figura 45**) se observó que en las muestras de la serie de abril hay mayor rapidez en la absorción de la gota de lípidos y del saco vitelino, y como consecuencia el crecimiento de las larvas de la serie abril disminuye con respecto al encontrado en las larvas de las otras dos series (mayo y junio).

En la **Figura 44** se describe la evolución de las puestas a lo largo del tiempo. En el primer diagrama se indica la variación de las tasas de eclosión, supervivencia y fertilidad a lo largo del periodo de freza. En el segundo diagrama se indica la variación de la cantidad de huevos/día a lo largo del periodo de puesta. Y el último diagrama presenta la tasa de viabilidad del huevo a lo largo del tiempo.



**Figura 44.** Evolución de los parámetros de las puestas a lo largo del tiempo.

En la **Figura 45** se describe la variación de algunos parámetros de calidad de larvas a lo largo del tiempo, incluyendo absorción de la gota de lípidos, absorción del saco vitelino y crecimiento en longitud de larvas endotróficas hasta la apertura de la boca.



**Figura 45.** Parámetros de calidad de las larvas en fase endotrófica (durante los meses de abril, mayo y junio).

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. DISCUSIÓN EXPERIMENTO I: LARVAS EN FASE ROTÍFERO ENRIQUECIDO CON MICROALGAS Y P-S.

#### 5.1.1. Ventajas de la utilización de Microalgas.

La tendencia actual en el cultivo larvario de muchas especies es sustituir, en la medida de lo posible, la utilización de microalgas vivas tanto en el crecimiento y enriquecimiento de rotífero como en los mismos tanques de cultivo larvario, por otros productos como microalgas desecadas, concentrados de microalgas congelados o refrigerados, emulsiones especiales, microcápsulas y alimento inerte (Fernández-Reiriz *et al.* 1989, Volkman *et al.* 1989, Rainuzzo, 1993, Brown *et al.* 1997, Reitan *et al.* 1997, Dhert *et al.* 2001, Muller-Feuga *et al.* 2003 a y b). Sin embargo, para algunas especies de peces marinas como el dentón y la dorada siguen siendo mucho mayores las ventajas de utilizar microalgas vivas procedentes de cultivos, que los beneficios de sustituirlos por otros productos más novedosos. Las consideraciones de los autores citados, fueron algunas de las razones que se tuvieron en cuenta en favor de utilizar los cultivos de algas para los experimentos de cultivo y enriquecimiento de rotífero, y para introducirlos dentro de los tanques de cultivo de las primeras fases larvarias del dentón (técnica del agua verde).

#### 5.1.2. Utilización de diferentes métodos de cultivo y curvas de crecimiento.

Ante todo debe tenerse en cuenta que en los resultados obtenidos por distintos autores sobre el crecimiento de las microalgas utilizadas se suelen encontrar diferencias en los métodos y condiciones de cultivo, duración de las fases de crecimiento e incluso en los métodos de análisis de las muestras de una determinada especie de microalga (Fernández-Reiriz *et al.* 1989). Por estas razones es difícil homologar los resultados obtenidos por diferentes fuentes con los resultados obtenidos en nuestros experimentos, no obstante teniendo en cuenta estas limitaciones es posible realizar comparaciones y extraer conclusiones válidas.

Según Fernández-Reiriz *et al.* (1989), comparando el método de **cultivo por lotes** (que utilizamos en este experimento) con el de cultivo semicontinuo en *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis suecica*, se obtiene una producción diaria de biomasa más baja y también un incremento en el contenido de lípidos durante el desarrollo del cultivo, posiblemente esto ocurre como consecuencia del agotamiento de algunos nutrientes especialmente del nitrógeno y la acumulación de productos de almacenamiento. Similarmente, Reitan *et al.* (1994) señalaron que el agotamiento de fósforo en el medio de cultivo (en la fase senescente) determina un decrecimiento en el contenido de lípidos en *Nannochloropsis sp.* y *Tetraselmis sp.*

Las curvas de crecimiento de las microalgas se describieron de acuerdo con Fernández-Reiriz *et al.* (1989), en ellas se representó el log 2 del número de células por mililitro (Y) frente a días de cultivo (X). En estos experimentos obtuvimos curvas de crecimiento similares a las descritas por dichos autores, en cuanto a tiempo de desarrollo y concentración alcanzada. La concentración celular máxima se registró en *Isochrysis galbana*, en esto coincidimos con Fernández-Reiriz *et al.* (1989) y fue de  $16 \times 10^6$  cel/ml hacia el día 20. De igual forma se encontraron coincidencias con estos autores en cuanto a la concentración máxima alcanzada por *Tetraselmis suecica* ( $3.7 \times 10^6$  cel/ml) entre los días 20 a 25 de cultivo. En general, podemos decir que el comportamiento de las curvas de crecimiento de las cuatro especies estudiadas estuvo en concordancia con los datos encontrados por Fernández-Reiriz *et al.* (1989) en sus experimentos, con un crecimiento exponencial muy rápido y un periodo estacionario muy largo; sin embargo, se observaron diferencias entre las cuatro especies a nivel de concentraciones máximas alcanzadas y días totales del ciclo de crecimiento.

En los experimentos sometimos a las cuatro especies de microalgas a las mismas condiciones ambientales, gracias a esto pudimos establecer algunas tendencias generales. Así tenemos que entre las cuatro especies de microalgas utilizadas (y para volúmenes de 200-400 litros), *Tetraselmis suecica* alcanzó la menor concentración celular ( $3.7 \times 10^6$  células/ml) en la fase de crecimiento exponencial, aunque se debe tener en cuenta que es la especie con mayor volumen celular. Por otra parte *Tetraselmis suecica* tiene a su favor el ser la especie más resistente entre las cuatro estudiadas, es decir la menos sensible a problemas de contaminación y colapso, aun cuando es sensible a altas temperaturas (Muller-Feuga *et al.* 2003 a y b). Con respecto a *Nannochloropsis gaditana* y *Chlorella sp.* encontramos que alcanzan más altas concentraciones celulares ( $11.8 \times 10^6$  y  $15.5 \times 10^6$  cel/ml, respectivamente), pero en cambio son muy sensibles a la contaminación con otras especies y a las altas temperaturas, y colapsan fácilmente. Por otra parte, *Isochrysis galbana* (variedad *T-Iso*) también es una especie que alcanza altas concentraciones celulares ( $16.3 \times 10^6$  cel/ml) pero soporta mayores temperaturas que *Chlorella sp* y *Nannochloropsis gaditana*, tal vez debido al origen tropical de la variedad **Tahitiense** que hemos utilizado (Ewart and Pruder, 1981).

Respecto al efecto del volumen de cultivo sobre la concentración celular encontramos que las mayores concentraciones celulares se alcanzaron en los menores volúmenes utilizados (6 y 25 litros) para las cuatro especies, pero a mayores volúmenes (200 y 400 litros) las concentraciones celulares máximas disminuyen, de tal forma que la concentración celular alcanzada es inversa al volumen del cultivo. Esto evidencia la interrelación existente entre volumen del cultivo de microalgas, concentración celular alcanzada e intensidad luminosa disponible. Al parecer, para grandes volúmenes de cultivo (200 a 400 litros) el factor que tuvo mayor incidencia en la disminución de la concentración celular fue la disminución de la intensidad luminosa dentro de la masa celular de la columna de cultivo. En esencia en este caso tenemos un problema de disminución de la intensidad luminosa; es decir, debido al espesor de la columna de cultivo, la radiación luminosa se va absorbiendo en la medida que penetra hacia el interior del volumen de la columna



(Margalef 1983 y 1989), de tal forma que (en cualquier instante) las células que están en el interior de la masa de cultivo dispondrán de menos luz con respecto a la luz de la que dispondrían las células en los pequeños volúmenes (6 y 25 litros).

#### 5.1.3. Contenido de Lípidos totales y ácidos grasos en microalgas.

Los lípidos totales varían ampliamente entre las especies de microalgas. Así, mientras en *Chlorella sp.* encontramos un 13.92% (Maruyama *et al.* 1997 alcanzaron 10.2%), en *Isochrysis galbana* var. T-Iso (*I. galbana*) se alcanzó un 28.82% de lípidos totales. Autores como Fernández-Reiriz *et al.* (1989), también observaron grandes variaciones desde un mínimo en *Tetraselmis suecica* (*T. suecica*) que contenía 14.8% (18.33% según nuestros datos) hasta un máximo en *I. galbana* que contenía 36.16% (28.82% en este trabajo); Mourente (1989) también encontró variaciones entre los lípidos totales de las microalgas: desde 8.2% en *T. suecica* y 9.2% en *I. galbana* hasta *Nannochloropsis gaditana* (*N. gaditana*) que alcanzó 16,1% (23.36% en nuestros datos). Dentro de cada especie, también suelen variar las proporciones de ácidos grasos saturados e insaturados de los lípidos totales durante las diferentes fases de crecimiento, así en *I. galbana* y *T. suecica* se sintetiza mayor proporción de ácidos poliinsaturados en las últimas fases del crecimiento mientras que en otras algas como las diatomeas los máximos niveles de ácidos poliinsaturados se alcanzan en la fase estacionaria (Fernández-Reiriz *et al.* 1989).

Para el análisis de ácidos grasos se tomaron las muestras de algas entre finales de la fase exponencial y comienzo de la fase estacionaria, por lo tanto los perfiles de ácidos grasos obtenidos, corresponden a dichas fases de crecimiento de las cuatro especies de algas analizadas. Para enriquecer los rotíferos, se les suministraron los cuatro tipos de algas en estas fases de crecimiento para no introducir un factor de alteración y poder establecer comparaciones válidas entre los perfiles de algas, rotíferos y larvas.

#### 5.1.4. Análisis de ácidos grasos en microalgas.

Antes de entrar en detalle debemos señalar que en algunos casos hemos comparado las cepas que usamos con variedades distintas utilizadas por otros autores (diferentes especies a las que usamos pero del mismo género, como en *Chlorella sp.* y *N. gaditana*) (Tablas 32 y 33). Estas comparaciones fueron realizadas teniendo en cuenta que aunque pueden variar las cantidades entre las especies, se mantienen las proporciones de los diferentes ácidos grasos analizados, puesto que de acuerdo con varios autores (Mourente 1989, Brown *et al.* 1997, Maruyama *et al.* 1997 y Muller-Feuga *et al.* 2003 a y b): el perfil de ácidos grasos suele ser característico de un determinado grupo taxonómico, aunque puedan existir diferencias entre las especies de una misma clase de alga. En términos generales se encontró que **16:0** fue el ácido graso saturado más abundante en todas las algas estudiadas, y que los monoinsaturados más abundantes fueron **16:1n7** y **18:1n9**; observamos concordancia en las cantidades relativas de estos tres ácidos grasos con

Fernández-Reiriz *et al.* (1989), Volkman *et al.* (1989), Mourente *et al.* (1993), Reitan *et al.* (1993), Maruyama *et al.* (1997), Muller-Feuga *et al.* (2003 a y b) y Patil *et al.* (2007) (**Tablas 32 y 33**). En cuanto a la concentración de **HUFA**, hallamos una pronunciada variación entre las cuatro especies de algas estudiadas, aspecto en el cual coincidimos con la mayoría de autores citados (**Tablas 32 y 33**); sin embargo, si observamos con mayor detalle y especie por especie, encontramos tanto concordancias como diferencias entre nuestros resultados y los datos de los autores consultados a nivel de los contenidos de monoinsaturados (18:1n-9 y 20:1n-9), poliinsaturados (18:3n-3), EPA y DHA (**Tablas 32 y 33**). Respecto a los datos de este trabajo, la mayor concentración de **EPA** (20:5n-3) se encontró en *N. gaditana* (24.14%) seguida por *T. suecica* (7.8%); varios autores consultados, también encontraron las mayores concentraciones de EPA en *N. gaditana* y *T. suecica*, pero observamos diferencias en las cantidades registradas; en *Chlorella sp.* e *I. galbana* el EPA sólo se encontró a nivel de trazas (**Tablas 32 y 33**). El **DHA** (22:6n-3) fue abundante sólo en *I. galbana* (5.93%) y este resultado es similar al obtenido por Mourente *et al.* 1993 (6.9%) y difiere del obtenido por otros autores (**Tabla 33**); y en cuanto al **ARA** (20:4n-6), sólo lo encontramos en cantidad considerable en *N. gaditana* (6.34%), Reitan *et al.* 1997 obtuvo un valor similar (7.9%) en esta microalga, pero Mourente *et al.* 1993 (1.9%) y Patil *et al.* 2007 (3.7%) encontraron valores diferentes (**Tabla 32**).

#### 5.1.4.1. Análisis de la cepa *Chlorella sp.*

Esta cepa la comparamos con las variedades utilizadas por otros autores: *Chlorella sp.* (James *et al.* 1989, Brown *et al.* 1997 y Muller-Feuga *et al.* 2003 a y b) *Chlorella minutissima* (Lourenço *et al.* 2002), *Chlorella vulgaris* (Maruyama *et al.* 1997) *Chlorella regularis* (Watanabe *et al.* 1983), (**Tabla 32**). La microalga de agua dulce *Chlorella sp.*, presentó como principales ácidos grasos 16:0, 18:0, 18:1n-9, 18:2n-6 y 18:3n-3, lo que en conjunto fue 92.4% del total; entre estos, 16:0 y 18:1n-9 representaron el 45% del total de ácidos grasos, para Watanabe *et al.* (1983) estos dos ácidos grasos representaron el 20.4% y para Lourenço *et al.* (2002) sumaron 28.2%. Entre los ácidos grasos saturados sólo el 18:0 presentó diferencias significativas con los otros tratamientos de microalgas ( $p < 0.05$ ); entre los monoinsaturados, el 18:1n-9 tiene una alta concentración (22.8%) pero no tiene diferencias significativas con *T. suecica* e *I. galbana*. Según Volkman *et al.* (1989), Brown *et al.* (1997), Maruyama *et al.* (1997) y Patil *et al.* (2007), es característico de las especies de algas verdes (**Chlorophyceae**) presentar como principales ácidos grasos a los de 16 C y 18 C, y no contener AGE.

Entre los ácidos grasos insaturados de *Chlorella sp.*, sólo el 18:2n-6 (16.59%) presentó diferencias significativas con los otros tratamientos de microalgas ( $p < 0.05$ ), aunque también tiene un alto contenido de 18:3n-3 (21%) (**Tabla 32**). Maruyama *et al.* (1997) encontraron un nivel semejante de 18:3n-3 (24.2%), no detectaron AGE, y sus niveles de saturados y monoinsaturados difieren de los que encontramos (**Tabla 32**). Respecto a los AGE, hemos encontrado que *Chlorella sp.* carece casi completamente de DHA (0.06%), EPA (0.04%) y ARA (0.09%). Watanabe *et al.* (1983), James *et al.* (1989),

Brown *et al.* (1997), Maruyama *et al.* (1997) y Muller-Feuga *et al.* (2003 a y b) también encontraron sólo trazas de DHA, EPA y ARA (**Tabla 32**). Debido a esta carencia de ácidos grasos esenciales (AGE) en *Chlorella sp.*, no es conveniente utilizarla para el enriquecimiento de rotífero destinado a larvas de peces marinos, aunque es frecuentemente utilizada para la multiplicación previa del rotífero (Watanabe *et al.* 1983 y Maruyama *et al.* 1997). También es importante resaltar que *Chlorella sp.* alcanzó la mayor proporción de saturados/poliinsaturados (1.0) entre las algas analizadas, Lourenço *et al.* 2002 (1.05) y Muller-Feuga *et al.* 2003 a y b (0.89) encontraron proporciones de saturados/insaturados similares (**Tabla 32**).

#### 5.1.4.2. Análisis de la cepa *Nannochloropsis gaditana*.

Esta cepa *N. gaditana* la comparamos con las variedades usadas por otros autores: *N. gaditana* (Mourente *et al.* 1993), *N. oculata* (Maruyama *et al.* 1997), *N. sp.* (James y Abu-Rezeq 1989 y Muller-Feuga *et al.* 2003 a y b) y *N. oceanica* (Patil *et al.* 2007) (**Tabla 33**). *N. gaditana* presenta como principales ácidos grasos 16:0, 16:1n-7, ARA (20:4n-6) y EPA (20:5n-3), en conjunto representan 80.9% del total; para Mourente *et al.* (1993) estos ácidos grasos representaron 63.2% y para Patil *et al.* (2007) el conjunto alcanzó 62.5%. En *N. gaditana* encontramos los mayores niveles de ARA (6.34%) y EPA (24.14%) siendo sus diferencias significativas con los niveles de las otras especies de algas estudiadas ( $p < 0.05$ ), mientras que el DHA sólo se encontró a nivel de trazas; otros autores (**Tabla 33**) encontraron diferentes niveles de ARA y EPA pero el contenido de DHA sólo a nivel de trazas. Finalmente, *N. gaditana* presenta la media más alta de contenido de HUFA totales (30.7%) y HUFA n-3 (24.31%) con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto a las otras 3 especies de algas estudiadas. Patil *et al.* (2007) encontraron contenidos similares de HUFA (27%) y de HUFA n-3 (23.4%); mientras que Mourente *et al.* (1993) encontraron contenidos más bajos de HUFA (19.1%) y de HUFA n-3 (17.2%) de los que obtuvimos (**Tabla 33**).

#### 5.1.4.3. Análisis de la cepa *Tetraselmis suecica* (*T. suecica*).

Esta cepa *T. suecica* la comparamos con las variedades usadas por otros autores: Mourente *et al.* 1989, Fernández-Reiriz *et al.* 1989, Volkman *et al.* 1989, Muller-Feuga *et al.* 2003 a y b y Patil *et al.* 2007 (usaron *T. suecica*), mientras que Reitan *et al.* 1997 (usaron *Tetraselmis sp.*) (**Tabla 32**). *Tetraselmis suecica* contiene como principales ácidos grasos 16:0, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3, 20:1n-9 y 20:5n-3 (lo que en conjunto representa el 85% del total). El principal ácido graso saturado fue el 16:0 (17.3%), entre los monoinsaturados el 18:1n-9 (19.7%) y entre los poliinsaturados 18:2n-6, 18:3n-3, 18:4n-3 y 20:5n-3 que en conjunto suponen 40% del total. Este perfil de ácidos grasos de *T. suecica* es similar al determinado por otros autores, aunque podemos observar variaciones en los contenidos de algunos ácidos grasos, así, para Fernández-Reiriz *et al.* (1989) el 16:0 representó 43% del total, para Mourente (1989) el 12.5%, para Reitan *et al.* (1997) un 15.2% y para Patil *et al.* (2007) 6.3% del total; entre los monoinsaturados, el 18:1n-9 represento sólo 4.7% para

Mourente 1989, 25% para Reitan *et al.* (1997) y Fernández-Reiriz *et al.* (1989) y 10.7% para Patil *et al.* (2007). Entre los AGE de esta microalga, destaca el EPA (7.8%) cuyo contenido es significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) sólo con respecto a *Chlorella sp.* e *I. galbana*, mientras que el DHA aparece sólo a nivel de trazas; estos contenidos de AGE de *T. suecica* guardan semejanza con los encontrados por otros autores, así el EPA representó 5.9% para Fernández-Reiriz *et al.* (1989), 3.9% para Mourente 1989, 10.8% para Reitan *et al.* (1997), 4% para Muller-Feuga *et al.* (2003 a y b) y 4.8% para Patil *et al.* (2007); para estos autores el ARA y DHA sólo aparece en pequeñas cantidades o trazas (**Tabla 32**).

#### 5.1.4.4. Análisis de la cepa *Isochrysis galbana* (*I. galbana*).

La cepa que utilizamos (*I. galbana* var. T-Iso), en este caso es la misma variedad usada por otros autores citados (**Tabla 33**). *I. galbana* presenta altos contenidos de 14:0, 18:1n-9, 18:2n-6 y 20:1n-9; sus contenidos de saturados, monoinsaturados y poliinsaturados son similares a los encontrados en estudios previos (Fernández-Reiriz *et al.* 1989, Mourente *et al.* 1989, Brown *et al.* 1997, Reitan *et al.* 1997, Muller-Feuga *et al.* 2003 a y b, Patil *et al.* 2007 y Ferreira *et al.* 2008; **Tabla 33**). Respecto a los AGE encontramos que *I. galbana* presentó la mayor concentración de DHA (5.9%) y la mayor proporción de DHA/EPA (15.1) con diferencias significativas respecto a los niveles de las otras tres especies de algas ( $p < 0.05$ ). Otros autores como Mourente *et al.* (1989) encontraron un resultado similar (6.9 %), mientras que Fernández-Reiriz *et al.* (1989) obtuvieron 1.3%, Reitan *et al.* (1997) 19.4%, Muller-Feuga *et al.* (2003 a y b) 9.5%, Patil *et al.* (2007) 15.8% y Ferreira *et al.* (2008) 9.52%. Y respecto a la concentración de EPA (0.39%) es semejante a la encontrada por Mourente *et al.* (1989) y Patil *et al.* (2007) 0.8%, Reitan *et al.* (1997) 0.9% y por Ferreira *et al.* (2008) 0.52% pero difiere de los datos obtenidos por Fernández-Reiriz *et al.* (1989) 3.7% y Muller-Feuga *et al.* (2003 a y b) 1.5% (**Tabla 33**).

**Tabla 32.** Contenido de ácidos grasos (% de área total) en *Chlorella sp.* y *T. suecica*.

Ácidos grasos	Datos del Experimento	Watanabe et al. 1983 ( <i>Chlorella regularis</i> )	James et al. 1989 ( <i>Chlorella sp.</i> )	Brown et al. 1997 ( <i>Chlorella sp.</i> )	Maruyama et al. 1997 ( <i>Chlorella vulgaris</i> )	Lourenço et al. 2002 ( <i>Chlorella minutissima</i> )	Muller-Feuga et al. 2003 a y b ( <i>Chlorella sp.</i> )
<i>Chlorella sp.</i>							
16:0	22.15	16.9	23.3	---	13.9	19.2	27.2
16:1n-7	1.54	2.7	---	---	5.7	5.3	3.6
18:0	9.90	2.3	0.5	---	4.3	5.2	0.8
18:1n-9	22.79	3.5	3.7	---	2.2	9.0	7.6
18:2n-6	16.59	37.3	27.9	---	25.3	5.0	11.0
18:3n-3	21	9.1	21.6	---	24.2	16.0	16.6
18:4n-3	0	0.1	---	---	---	---	0
20:1n-9	0	0.1	0.3	---	---	---	---
ARA (20:4n-6)	0.06 (Tr)	Tr	---	Tr	0	---	0.4
EPA (20:5n-3)	0.04 (Tr)	0.2	---	Tr	0	3.4	0
DHA (22:6n-3)	0.09 (Tr)	---	0.15	0	0	---	0
Saturados	38.0	21.6	24.15	---	17	39.9	31
Monoinsaturados	27.4	6.3	4.5	---	7.9	17.9	11.2
Poliinsaturados	37.9	53.4	50.3	---	49.5	38	34.5
HUFA n-3	0.15	0.2	0.15	---	0	7.15	---
HUFA Total	0.23	---	0.8	---	0	7.15	0.4
DHA/ EPA	1.5	---	---	---	---	---	---
EPA/ARA	0.44	---	---	---	---	---	---
EPA/18:3n-3	1.9	0.02	---	---	---	0.21	---
<i>T. suecica</i>	Datos del Experimento	Fernández-Reiriz et al. 1989 ( <i>T. suecica</i> )	Mourente et al. 1989 ( <i>T. suecica</i> )	Volkman et al. 1989 ( <i>T. suecica</i> )	Reitan et al. 1997 ( <i>T. sp.</i> )	Muller-Feuga et al. 2003 a y b ( <i>T. suecica</i> )	Patil et al. 2007 ( <i>T. suecica</i> )
16:0	17.3	43.4	12.5	22.15	15.2	36.5	6.3
16:1n-7	2.06	3.84	1.0	0.3	2.8	0.5	1.3
18:1n-9	19.7	24.73	4.7	13.25	25.4	25	10.7
18:2n-6	5.6	1.83	2.5	13.85	6.4	3	2.5
18:3n-3	21.6	5.75	11.4	7.85	14.6	5.5	6.4
18:4n-3	5.01	---	8.5	6.6	9.0	3.5	4.1
20:1n-9	13.03	2.75	0.8	2.1	1.7	---	0.9
ARA (20:4n-6)	0.71	---	0.2	1.8	1.5	0.5	0.6
EPA (20:5n-3)	7.8	5.9	3.9	4.8	10.8	4.0	4.8
DHA (22:6n-3)	0.08	0	---	Tr	0.5	Tr	0.2
Saturados	19.0	49.75	16.2	24.6	18.6	38.1	8.0
Monoinsaturados	35.3	33.14	28.5	18.6	30.3	34	12.9
Poliinsaturados	43.96	10.52	46.9	54.6	50.9	26.1	18.6
HUFA n-3	8.0	5.9	4.4	5.0	11.3	4.0	5.0
HUFA Total	9.2	5.9	5.1	6.8	12.8	4.5	5.6
DHA/ EPA	0.01	---	---	---	0.046	---	0.04
EPA/ARA	10.98	---	19.5	2.7	7.2	---	8
EPA/18:3n-3	0.36	1.0	0.34	0.61	0.74	0.73	1.17

En la Tabla 32 se comparan los contenidos de ácidos grasos encontrados en *Chlorella sp.* y *T. suecica* en el experimento con los contenidos de ácidos grasos encontrados, en las mismas especies (o en especies del mismo género), por otros autores.

**Tabla 33.** Contenido de ácidos grasos en *N. gaditana* e *I. galbana*.

Ácidos grasos	Datos del Experimento	James & Abu-Rezeq 1989 ( <i>N. sp.</i> )	Mourente et al. 1993 ( <i>N. gaditana</i> )	Maruyama et al. 1997 ( <i>N. oculata</i> )	Muller-Feuga et al. 2003 a y b ( <i>N. sp.</i> )	Patil et al. 2007 ( <i>N. oceanica</i> )
<i>N. gaditana</i>						
16 : 0	24.52	22.6	13.0	14.0	28.8	17.2
16:1n-7	24.15	---	14.3	26	26.5	18.2
18:1n-9	6.45	3.0	1.5	2.6	5.5	4.1
18:2n-6	4.42	3.7	1.1	4.5	3.5	9.7
18:3n-3	0.20	0.33	0.1	0	0	0.5
18:4n-3	0.03	---	0.1	---	0	---
20:1n-9	0.163	---	---	---	0	0.5
ARA (20:4n-6)	6.34	---	3.2	6.6	6.2	3.7
EPA (20:5n-3)	24.14	31.2	23.5	40	19.5	23.4
DHA (22:6n-3)	0.04	---	0.1	0	0	Tr
Saturados	35.79	24.2	17.9	14.0	38.7	37.1
Monoinsaturados	33.42	21.75	16.9	28.6	32	22.8
Poliinsaturados	36.34	39.47	30.9	51.1	29.2	37.8
HUFA n-3	24.31	31.2	24	40	25.7	23.4
HUFA Total	30.66	35.4	28.1	46.6	25.7	27.6
DHA/ EPA	0.0016	---	0.017	---	---	---
EPA/ARA	3.81	---	7.34	6.1	3.15	6.3
EPA/18:3n-3	120.7	94.5	235	---	---	46.8

Ácidos grasos	Datos del Experimento	Fernández-Reiriz et al. 1989 ( <i>I. galbana</i> )	Mourente et al. 1989 ( <i>I. galbana</i> )	Volkman et al. 1989 ( <i>I. galbana</i> )	Lie et al. 1997 ( <i>I. galbana</i> )	Reitan et al. 1997 ( <i>I. galbana</i> , T-iso)	Muller-Feuga et al. 2003 a y b ( <i>I. galbana</i> , T-iso)	Patil et al. 2007 ( <i>I. galbana</i> )	Ferreira et al. 2008 ( <i>I. galbana</i> , T-iso)
<i>I. galbana</i> (T-Iso)									
16 : 0	11.76	38.2	8.8	14.5	9.6	14.5	12	11.5	12.54
16:1n-7	5.9	32.2	4.3	4.2	3.3	4.2	4.5	3.3	5.19
18:1n-9	16.9	2.6	10.9	20.1	13.3	16.1	12.5	13.1	12.86
18:2n-6	12.8	2.6	9.6	2.5	9.9	8.6	14	7.0	5.37
18:3n-3	4.73	0.22	7.1	3.6	5.7	4.5	12	3.8	7.66
18:4n-3	3.31	---	9.8	17.4	18.1	15.4	14.8	12.5	20.16
20:1n-9	12.59	0.34	0.2	0.2	0.4	---	---	---	---
ARA (20:4n-6)	0.32	---	0.2	---	0.4	---	0.3	---	0.12
EPA (20:5n-3)	0.39	3.7	0.8	0.2	1.3	0.9	1.5	0.8	0.52
DHA (22:6n-3)	5.93	1.31	6.9	8.3	13.8	19.4	9.5	15.8	9.52
Saturados	28.3	59.3	31.9	32.2	16.3	25.9	32.8	20.4	30.27
Monoinsaturados	38.7	34.88	26.9	26.1	20.0	23	19.2	17.0	22.86
Poliinsaturados	32.3	5.79	40.2	41.3	50.6	48.8	44.6	39.9	46.36
HUFA n-3	6.7	5.0	7.7	8.5	15.7	20.3	11	16.6	10.0
HUFA Total	7.45	5.0	9.6	10.3	16.1	20.3	17.6	16.6	10.12
DHA/ EPA	15.20	0.35	8.63	41.5	10.6	21.6	6.3	19.75	18.3
EPA/ARA	1.2	---	4	---	3.3	---	5	---	4.3
EPA/18:3n-3	0.08	16.82	0.11	0.06	0.23	0.2	0.13	0.21	0.07

En la Tabla 33 se comparan los contenidos de ácidos grasos encontrados en *N. gaditana* e *I. galbana* del experimento con los contenidos encontrados, en las mismas especies (o especies del mismo género), por otros autores.

## 5.1.2. Rotífero

### 5.1.2.1. Utilización de rotíferos como alimento vivo.

No nos extenderemos en justificar nuevamente la utilización de presas vivas en general y de rotíferos en particular para alimentar las larvas de dentón, pero es conveniente recordar lo que señala Muller-Feuga *et al.* (2003 a y b) respecto a la nutrición de larvas **atriciales** (como lo son las de dentón): “una vez que agotan las reservas del saco vitelino son incapaces de procesar **dietas formuladas**, de manera que larvas sometida a estas dietas presentan tasas de supervivencia y crecimiento muy bajas comparándolas con larvas (de las mismas características) a las que se les suministró en cambio **alimento vivo**”.

### 5.1.2.2. Contenido de ácidos grasos en el rotífero.

Para evaluar adecuadamente el efecto del uso de microalgas marinas en el contenido de ácidos grasos en los rotíferos, se debe tener en cuenta que la utilización de microalgas en la alimentación de rotífero se realiza básicamente porque permite enriquecer su contenido en HUFA ya que estos son AGE para los peces marinos. Kitajima *et al.* (1980 a y b) y Watanabe *et al.* (1987) establecieron que: “el contenido de HUFA n-3 en los rotíferos es el principal factor en la calidad nutricional de los rotíferos como alimento vivo para la larvicultura de peces marinos”. Además, Sargent *et al.* (1993, 1995 y 1997) y Bell and Sargent (2003) encontraron que: “el ARA (20:4n-6) también es un AGE para los peces marinos al igual el DHA y el EPA”. Adicionalmente, se ha demostrado que no sólo las cantidades absolutas, sino también las proporciones entre estos tres AGE son cruciales para un óptimo desarrollo y calidad de las larvas de peces marinos (Sargent *et al.* 1999 a y b, Bell and Sargent 2003). También es necesario tener en cuenta lo que dice Cejas (2005): “comparando el efecto de diferentes microalgas sobre el cultivo de rotíferos, se observa que el crecimiento de la población parece ser independiente del contenido en HUFA n-3 del alga, mientras que el contenido de ácidos grasos del rotífero refleja el de la microalga usada como alimento”. Además, de acuerdo con Rainuzzo *et al.* (1994): “En los rotíferos se observa alguna elongación de los ácidos grasos dietarios, pero no sintetizan cantidades sustanciales de productos de desaturación. Además, los rotíferos parecen catabolizar más DHA que EPA, de modo que la proporción DHA/EPA es menor que la de su dieta”; y por lo tanto, este efecto debemos tenerlo en cuenta no sólo en los rotíferos enriquecidos con microalgas sino también en el rotífero Protein-Selco. Por último, hay que tener en cuenta lo que señalan Rodríguez *et al.* (1998): que los rotíferos son capaces de acumular el EPA mejor que el DHA porque poseen una tasa más elevada de catabolismo de DHA que de EPA pero principalmente porque los rotíferos como organismos filtradores de agua dulce tienen a EPA como HUFA n-3 dominante, y por lo tanto los sistemas enzimáticos de los rotíferos estarían adaptados para incorporar EPA más fácilmente que DHA.

#### 5.1.2.2.1. Rotífero enriquecido con *Chlorella sp.*

En la **Tabla 34** comparamos los datos del experimento con los resultados obtenidos por varios autores que han trabajado con rotífero enriquecido con *Chlorella sp.* En esta tabla se observa un amplio rango de variación en los contenidos de ácidos grasos dados por los autores, aunque los contenidos de los AGE (DHA, EPA y ARA) son semejantes. Según el perfil de ácidos grasos de nuestro experimento, los rotíferos – *Chlorella sp.* presentan altas concentraciones de saturados, monoinsaturados y poliinsaturados pero los valores de estos no presentan diferencias significativas ( $< 0.05$ ) con respecto a los valores de los rotíferos de otros tratamientos. De acuerdo con Muller-Feuga *et al.* (2003 a y b), la *Chlorella* de agua dulce no contiene ácidos grasos de más de 18 carbonos, pero permite una buena producción de rotífero que contenga este tipo de ácidos grasos. Comparando los perfiles de ácidos grasos de este rotífero con los de la microalga (*Chlorella sp.*) encontramos una disminución en las concentraciones de 16:0 (de 22.2% en microalga a 15.7% en rotífero), de 18:1n-9 (de 22.8% a 10.2%) y 18:3n-3 (de 21% a 4.9%) y un aumento en las concentraciones de 16:1n-7 (de 1.5% a 7.5%), de 18:2n-6 (de 16.6% a 19.6%) y 20:1n-9 (de 0% a 2.1%). Respecto a los ácidos grasos esenciales (AGE) del rotífero – *Chlorella* encontramos un aumento en las concentraciones de ARA (de 0.09 % en microalga a 2.2% en rotífero) y de EPA (de 0.04% a 1.2%). Este aumento en los AGE no pudo ser producido por el rotífero, ya que estos no sintetizan ácidos grasos C20 y C22 a partir de sus precursores 18:2n-6 y 18:3n-3 como señalaron Watanabe *et al.* (1983), Mourente (1989), Rainuzzo *et al.* (1994) y Maruyama *et al.* (1997). Como el enriquecimiento de rotífero con *Chlorella* fue de corta duración (24 h), es posible que estas reservas de AGE hayan provenido de cultivos previos del rotífero con levadura y *N. gaditana* o *T. suecica*. Esta hipótesis puede apoyarse en el hecho de que al cultivar rotífero sólo con levadura en las mismas circunstancias logramos elevar los contenidos de AGE: en DHA (de 0.06% en levadura a 0.6% en rotífero), EPA (de 0.26% a 1.3%) y ARA (de 0.03% a 0.8%). También se apoya en los experimentos de Rainuzzo *et al.* (1989), ellos encontraron que sometiendo al rotífero a ayuno (49 h) mantenían sus contenidos relativos de HUFA n-3, señalaron entonces que para determinar el contenido final de HUFA n-3 del rotífero no sólo es importante tener en cuenta el contenido en HUFA n-3 de las dietas de enriquecimiento sino también el contenido en HUFA n-3 del alimento suministrado al rotífero previo al enriquecimiento.

#### 5.1.2.2.2. Rotífero enriquecido con *Nannochloropsis gaditana*.

En la **Tabla 35** comparamos los datos de nuestro experimento de enriquecimiento de rotífero con *N. gaditana* con los resultados obtenidos por varios autores que trabajaron también con rotífero enriquecido con *Nannochloropsis sp.* En este rotífero encontramos altos contenidos de 16:0, 16:1n-7, 18:1n-9, saturados y monoinsaturados, y contenidos significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) de EPA (5.7%) y una alta proporción EPA/ARA (5.1%) con respecto al resto de tratamientos con microalgas. Otros autores como James & Abu-Rezeq (1989), Mourente *et al.* (1993), Sakamoto *et al.* (1998) y Muller-Feuga *et al.* (2003 a y b) también encontraron altos contenidos de EPA y la mayoría de ellos encontraron



muy bajos contenidos de DHA (**Tabla 35**). Si comparamos los perfiles de ácidos grasos de microalgas y rotífero encontramos que, en estos últimos, aumentó la concentración de 16:1n-7 (de 23.7% a 32.3%) y disminuyeron los contenidos de 18:2n-6 (de 4.7% a 1.9%), EPA (de 29.7% a 5.7%) y ARA (de 7.2% a 1.1%). Mourente *et al.* (1993) también encontraron disminución en EPA (de 23.5% en microalga a 16.4% en rotífero) y ARA (de 3.2% a 3.0%). Y respecto a la proporción EPA/ARA, en el experimento aumentó de 3.8% en algas a 5.1% en rotífero, algunos autores (Koven *et al.* 2001, Sargent 2002 y Cejas 2005) encontraron que un alto valor en esta proporción en los rotíferos ocasiona efectos negativos en larvas de dorada. Sin embargo, según los criterios de Léger *et al.* (1986) y Mourente (1989) sobre el valor nutricional del alimento para las larvas, este tratamiento de enriquecimiento de rotífero con *N. gaditana* debería considerarse como óptimo ya que presentó una alta proporción EPA/18:n-3 (10.32) y un valor de EPA superior a 4 (5.7%).

#### 5.1.2.2.3. Rotífero enriquecido con *Tetraselmis suecica*.

En la **Tabla 34** comparamos los perfiles de ácidos grasos encontrados en rotífero – *T. suecica* del experimento con los perfiles de ácidos grasos obtenidos por varios autores. En el perfil de ácidos grasos del rotífero – *T. suecica* encontramos contenidos significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) sólo en 16:0 y 19:0, altos contenidos de 18:1n-9, 18:2n-6, saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, y entre los AGE encontramos contenidos de DHA (1.18%), EPA (de 3%) y ARA (1.5%). Otros autores como Mourente (1989) encontraron que el rotífero enriquecido con *T. suecica* posee niveles muy altos de monoinsaturados (64.6%) y bajos de HUFA n-3 (3%) por lo cual su perfil sería similar al de levadura de cerveza. Además, según Mourente (1989) el contenido de EPA (3%) de rotífero del experimento es inferior a 4% y la proporción EPA/18:3n-3 (0.45) es muy baja por lo cual no sería óptimo para suministrarlo a las larvas.

Comparando los contenidos de ácidos grasos de rotífero con los de la microalga, encontramos en monoinsaturados un aumento en 16:0 (de 17.3% en microalgas a 19.6% en rotífero), en monoinsaturados un aumento en 16:1n-7 (de 2% a 6.6%), en poliinsaturados un aumento en 18:2n-6 (de 5.6% a 10.8%), y respecto a los AGE encontramos un aumento en ARA (de 0.7% a 1.5%) y en DHA (de trazas a 1.2%), mientras que disminuye el EPA (de 7.8% a 3%) por lo cual la proporción DHA/EPA aumentó. Mientras que Mourente *et al.* (1989) observaron un aumento en las concentraciones de 16:1n-7 (de 2.8% en microalga a 20.4% en rotífero), disminución en 16:0 (de 15.2% a 7.6%) y bajos niveles de HUFA n-3 (3%). Para Rainuzzo (1993) y Rodríguez *et al.* (1997), los rotíferos enriquecidos con *Tetraselmis sp.* retienen gran parte del contenido inicial de EPA de la microalga por lo cual se produce un decrecimiento en la proporción DHA/EPA. Reitan *et al.* (1997) por el contrario, encontraron un aumento en la concentración de DHA (de 0.5% a 1.7%), disminución de EPA (de 10.8% a 9.9%), mientras que el ARA se mantuvo estable en 1.5%.

#### 5.1.2.2.4. Rotífero enriquecido con *Isochrysis galbana*.

En la **Tabla 35** comparamos los perfiles de ácidos grasos de rotífero – *I. galbana* del experimento con los perfiles de ácidos grasos obtenidos por varios autores consultados. En el perfil de ácidos grasos de *I. galbana* encontramos altos contenidos de 16:0, 16:1n-7, 18:1n-9 y 18:2n-6 y un contenido significativamente superior ( $p < 0.05$ ) de DHA (4.8%) y de la proporción DHA/EPA (1.7) con respecto a los rotíferos de los otros tratamientos con microalgas. Mourente *et al.* (1989) encontraron contenidos similares en 16:1n-7, 18:1n-9 y DHA, Reitan *et al.* (1997) obtuvieron contenidos similares de 16:0, 18:1n-9, 18:2n-6 y 18:3n-3, mientras que Ferreira *et al.* (2008) encontraron contenidos similares de 16:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:3n-3 y DHA.

Al comparar los contenidos de ácidos grasos del rotífero con los de la microalga encontramos un aumento en las concentraciones de EPA (de 0.39% en microalga a 2.75% en el rotífero) y de ARA (de 0.3% a 1.5%), una ligera reducción en el contenido de DHA (de 5.9% a 4.8%) y una drástica reducción de la proporción DHA/EPA (de 15.1 a 1.7). Rainuzzo *et al.* (1994) encontraron que los rotíferos catabolizan rápidamente el DHA mientras que retienen el EPA y esto tiene como consecuencia que el valor de la proporción DHA/EPA de rotífero sea menor que el de su dieta. Otros autores como Muller-Feuga *et al.* (2003 a y b) señalaron que aunque *I. galbana* permite producir rotífero con una mayor concentración de DHA y una buena proporción DHA/EPA con respecto otras microalgas como *Chlorella sp.*, *N. gaditana* y *T. suecica*, sin embargo, *I. galbana* sólo permite una producción bastante baja e inestable de rotífero, por lo que es recomendable primero utilizar otras especies de microalgas que permitan producir rotífero masivamente y luego sí transferirlos a un cultivo con *I. galbana* (que permita elevar el nivel de DHA) pocas horas antes de suministrarlos a las larvas.

#### 5.1.2.2.5. Rotífero enriquecido con Protein-Selco®.

En la **Tabla 36** comparamos los perfiles de ácidos grasos de rotífero – P-S del experimento con los perfiles de ácidos grasos obtenidos por otros autores. En el perfil de ácidos grasos de rotífero – P-S del experimento encontramos como ácidos grasos más abundantes el 16:0 (con 17.6%), el 18:1n-9 (con 15.5%) y el 18:2n-6 (con 9.7%). Mientras que Fernández-Reiriz *et al.* (1993) encontraron 16:0 (6.2%), 18:1n-9 (12.5%) y 18:2n-6 (6.5%), y Mourente *et al.* (1993) hallaron 16:0 (7.2%), 18:1n-9 (20.9%) y 18:2n-6 (4.2%). Entre los AGE, los rotíferos – P-S alcanzaron los mayores contenidos de DHA (14%), EPA (8.25%) con diferencias significativas con los rotíferos enriquecidos con microalgas ( $p < 0.05$ ) y una alta proporción DHA/EPA (1.7); ese aumento en la proporción DHA/EPA (de 1.2 en P-S a 1.7 en rotífero), obedeció en gran medida a la fuerte reducción en el contenido de EPA (de 20% en P-S a 8.2% en rotífero). Mientras que en Fernández-Reiriz *et al.* 1993 y Mourente *et al.* 1993 se produjo una reducción en la proporción DHA/EPA debido a que la cantidad de DHA es menor a la de EPA (**Tabla 36**). Respecto al contenido de ARA en el rotífero – P-S (1.27%), su valor fue inferior a casi todos los alcanzados por los rotíferos enriquecidos con microalgas, la existencia de una gran diferencia entre las concentraciones

de EPA frente a ARA trajo como consecuencia que la relación EPA/ARA fuera alta (6.5). Fernández-Reiriz *et al.* 1993 (0.93%) y Mourente *et al.* 1993 (1.2%) también encontraron bajos contenidos de ARA en rotífero y altos valores de la proporción EPA/ARA. Según Koven *et al.* (2001), Sargent (2002) y Cejas (2005), la existencia de un alto valor de la proporción EPA/ARA en los rotíferos, ocasiona efectos negativos en el desarrollo de las larvas que los ingieren (tal como ya señalamos en rotífero – *N. gaditana*). Sin embargo, según los criterios de Léger *et al.* (1986) y Mourente (1989) sobre el valor nutricional del alimento para las larvas, el rotífero enriquecido con P-S podría considerarse como óptimo ya que presentó una proporción EPA/18:3n-3 de 1.6 y un valor de EPA superior a 4 (8.3%) (**Tabla 36**).

Más adelante, en el apartado correspondiente a larvas alimentadas con rotíferos enriquecidos con P-S, veremos cuál de estos dos criterios se adecua más a los resultados obtenidos, pues a final de cuentas lo que se pretende es mejorar la calidad de las larvas. Comparando los AGE entre enriquecedor P-S y rotífero – P-S encontramos un descenso de DHA pero especialmente de EPA en rotífero con respecto al enriquecedor y como consecuencia aumentó la proporción DHA/EPA (de 1.2 en P-S a 1.7 en rotífero).

**Resumen:** encontramos que entre los diferentes tratamientos de rotífero ocurrían considerables variaciones en las concentraciones alcanzadas de saturados, monoinsaturados, poliinsaturados y HUFA (Tablas 34, 35 y 36). Reitan *et al.* (1993) también encontraron que podrían ocurrir amplios cambios en la composición de ácidos grasos en los rotíferos procedentes de los diferentes tratamientos con microalgas y que estas variaciones dependían del tipo de microalga utilizada y del propio metabolismo de los rotíferos que puede modificar dichos perfiles, mientras que Rodríguez *et al.* (1997) encontraron que la actividad metabólica de los rotíferos tiende a mantener constantes los niveles de saturados y monoinsaturados compensando las variaciones en los niveles de estos dos grupos de ácidos grasos provenientes de las diferentes dietas suministradas. Si comparamos los perfiles de ácidos grasos de los rotíferos frente a los perfiles encontrados en las microalgas y P-S observamos varios cambios: una disminución de 16:0, excepto en rotífero – *T. suecica*, a pesar de lo cual éste ácido graso sigue siendo el saturado más abundante en rotíferos; entre los monoinsaturados encontramos un aumento en 18:1n-9 y 18:2n-6, algunos autores (Watanabe *et al.* 1983, Mourente *et al.* 1993, Reitan *et al.* 1997 y Ferreira *et al.* 2008) han encontrado un aumento de monoinsaturados en rotífero con respecto al contenido observado en las algas utilizadas como alimento; con respecto a los HUFA en rotífero, observamos un aumento en ARA y variaciones en contenido de EPA, DHA y en la proporción DHA/EPA dependiendo del tipo de microalga utilizada, Rainuzzo *et al.* (1994) señalaron que los rotíferos parecen catabolizar más DHA que EPA, de modo que la proporción DHA/EPA es menor que la de su dieta, mientras que Reitan *et al.* (1993) encontraron que se producían amplios cambios en la composición de ácidos grasos incluyendo contenidos de DHA, EPA, ARA y la proporción DHA/EPA.

**Tabla 34.** Contenido de ácidos grasos en rotífero alimentados con *Chlorella sp.* y *T. suecica*.

Ácidos grasos <i>Rotífero + Chlorella sp.</i>	Datos del Experimento	Watanabe et al. 1983 ( <i>Chlorella regularis</i> )	Yoshimatsu et al. 1997 ( <i>Chlorella vulgaris</i> )	Maruyama et al. 1997 ( <i>Chlorella vulgaris</i> )	Lourenço et al. 2002 ( <i>Chlorella minutissima</i> )	Muller-Feuga et al. 2003 a y b ( <i>Chlorella sp.</i> )
		16 : 0	15.69	9.37	17.79	13.9
16:1n-7	7.46	15.77	---	5.7	5.3	3.6
18:1n-9	10.17	18.6	1.58	2.2	9.0	7.6
18:2n-6	19.63	17.83	30.43	25.3	5.0	11.0
18:3n-3	14.97	7.2	13.41	24.2	16.0	16.6
18:4n-3	---	---	---	---	---	0
20:1n-9	2.11	2.2	1.86	---	---	---
ARA (20:4n-6)	2.16	1	1.09	0	---	0.4
EPA (20:5n-3)	1.24	1.67	0.89	0	3.4	0
DHA (22:6n-3)	0	---	---	0	---	0
Saturados	25.0	13	31.48	13.9	19.2	27.2
Monoinsaturados	30.35	36.57	4.37	7.9	14.3	11.2
Poliinsaturados	44.58	27.7	8.31	49.5	24.4	28
HUFA n-3	4.7	1.67	3.37	---	3.4	---
HUFA Total	6.85	4.84	4.46	---	3.4	0.4
DHA/ EPA	---	---	---	---	---	---
EPA/ARA	0.57	1.67	0.82	---	---	---
EPA/18:3n-3	0.08	0.23	0.07	---	0.21	---
<i>Rotífero + T. suecica</i>	Datos del Experimento	Mourente et al. 1989 ( <i>T. suecica</i> )	Reitan et al. 1997 ( <i>T. sp.</i> )	Baker et al. 1998 ( <i>T. suecica</i> )	Muller-Feuga et al. 2003 a y b ( <i>T. suecica</i> )	<i>Rotífero + Levadura</i>
16 : 0	19,64	7.59	19.2	---	36.5	7.1
16:1n-7	6.61	20.42	2.2	---	0.5	24.2
18:1n-9	17.13	28.52	11.4	---	25	34.4
18:2n-6	10.77	6.37	6.6	11.6	3	8.45
18:3n-3	6.95	0.94	17.8	18.3	5.5	1.4
18:4n-3	---	0.57	6.3	---	3.5	---
20:1n-9	4.0	2.79	4.9	---	---	5.6
ARA (20:4n-6)	1.52	0.57	1.5	3.2	0.5	0.7
EPA (20:5n-3)	3.13	2.48	9.9	11.9	4.0	1.29
DHA (22:6n-3)	1.18	0.47	1.7	0.3	Tr	0.6
Saturados	27.3	16.65	25.1	---	36.5	14.9
Monoinsaturados	41.6	64.68	28.9	---	25.5	67.9
Poliinsaturados	31.14	17.18	45.4	---	16.5	17.1
HUFA n-3	7.0	2.95	13.2	12.2	4	2.13
HUFA Total	8.55	3.52	14.7	15.4	4.5	4.59
DHA/ EPA	0.36	0.19	0.17	0.03	---	0.54
EPA/ARA	2.1	4.35	6.6	3.72	8	1.69
EPA/18:3n-3	0.45	2.64	0.56	0.65	0.73	0.91

En la **Tabla 34** se comparan los contenidos de ácidos grasos encontrados en rotíferos – *Chlorella sp.* y rotífero – *T. suecica* con los contenidos de ácidos grasos obtenidos por varios autores en rotíferos enriquecidos con las mismas microalgas (o especies del mismo género). \*: Los contenidos de ácidos grasos se expresa como porcentajes.

**Tabla 35.** Contenido de ácidos grasos\* en rotífero alimentados con *N. gaditana* e *I. galbana*.

Ácidos grasos	Datos del experimento	James & Abu-Rezeq 1989 ( <i>N. sp.</i> )	Mourente et al. 1993 ( <i>N. gaditana</i> )	Sakamoto et al. 1998 ( <i>N. oculata</i> )	Pousão-Ferreira et al. 1999 ( <i>N. sp.</i> )	Muller-Feuga et al. 2003 a y b ( <i>N. sp.</i> )
<i>Rotífero + N. gaditana</i>						
16:0	19.31	13.45	10.2	8.0	---	28.8
16:1n-7	32.32	---	18.7	3.7	---	26.5
18:1n-9	11.79	14.13	12.1	5.4	---	5.5
18:2n-6	1.91	6.25	2.4	7.0	4.4	3.5
18:3n-3	0.55	1.1	0.2	3.4	2.8	0
18:4n-3	---	---	0.2	4.6	---	0
20:1n-9	1.96	1.5	2.2	10.5	---	0
ARA (20:4n-6)	1.12	---	3.0	5.8	0.57	6.2
EPA (20:5n-3)	5.68	18.7	16.4	16.4	1.2	19.5
DHA (22:6n-3)	0.29	4.2	0.4	Tr	0.97	0
Saturados	31.3	22.81	17.9	18.5	---	28.8
Monoinsaturados	56.4	33.44	40.7	19.6	---	32
Poliinsaturados	12.3	35.52	31.3	59.5	---	29.2
HUFA n-3	7.6	27.94	19.4	20.8	2.2	19.5
HUFA Total	8.74	29.0	23.8	28.8	4.73	25.7
DHA/ EPA	0.05	0.22	0.064	---	0.81	---
EPA/ARA	5.1	---	5.47	2.83	2.1	3.15
EPA/18:3n-3	10.32	17	82	4.8	0.43	---
<i>Rotífero + I. galbana</i> (T-Iso)	Datos del experimento	Mourente et al. 1989 ( <i>I. galbana</i> )	Lie et al. 1997 ( <i>I. galbana</i> )	Reitan et al. 1997 ( <i>I. galbana</i> )	Ferreira et al. 2008 (T- <i>I. galbana</i> )	<i>Rotífero + Levadura</i>
16:0	10.05	5.65	5.9	11.7	13.47	7.1
16:1n-7	10.09	14.0	7.7	4.7	7.97	24.2
18:1n-9	14.22	15.31	12.0	11.0	12.54	34.4
18:2n-6	13.46	8.82	4.5	10.9	6.65	8.45
18:3n-3	4.75	3.86	2.3	5.8	5.94	1.4
18:4n-3	---	2.82	6.0	7.9	14.35	---
20:1n-9	2.65	2.21	3.4	3.7	---	5.6
ARA (20:4n-6)	1.51	0.53	1.2	1.0	0.80	0.7
EPA (20:5n-3)	2.75	1.30	10.4	4.4	1.72	1.29
DHA (22:6n-3)	4.79	3.64	21.3	13.5	5.06	0.6
Saturados	23.92	18.47	13.2	27.4	33.1	14.9
Monoinsaturados	36.3	44.54	30.0	27.9	28.09	67.9
Poliinsaturados	39.8	32.1	51.8	44.2	35.9	17.1
HUFA n-3	13.3	5.86	37	18.6	6.78	2.13
HUFA Total	14.8	7.22	38.4	19.6	7.58	4.59
DHA/ EPA	1.74	2.8	2.0	3.1	2.94	0.54
EPA/ARA	1.81	2.45	8.7	4.4	2.15	1.69
EPA/18:3n-3	0.58	0.34	4.5	0.76	0.29	0.91

En la **Tabla 35** se comparan los contenidos de ácidos grasos encontrados en rotífero – *N. gaditana* y rotífero – *I. galbana* del experimento con los contenidos de ácidos grasos obtenidos por varios autores en rotíferos enriquecidos con las mismas microalgas (o especies del mismo género). \*: el contenido de ácidos grasos se expresó como porcentajes.

**Tabla 36.** Contenido de ácidos grasos\* en enriquecedor P-S y rotíferos alimentados con P-S.

Ácido graso	Datos del experimento	Mourente et al. 1993	Fernández-Reiriz et al. 1993	Datos del experimento	Fernández-Reiriz et al. 1993	Mourente et al. 1993	Dhert, P. & Sorgeloos, P. 1993	Tocher et al. 1997
	<i>Protein-Selco</i>			<i>Rotífero + Protein-Selco</i>				
16:0	22.8	17.8	15.5	17.59	6.22	7.2	---	---
16:1n-7	3.5	11.3	7.5	7.42	8.26	16.8	---	---
18:1n-9	30.2	22.1	14.2	15.53	12.49	20.9	---	---
18:2n-6	4.1	8.0	10.6	9.74	6.55	4.2	---	---
18:3n-3	1.4	1.8	1.6	5.1	0.52	0.6	---	---
18:4n-3	2.7	4.3	---	2.0	---	0.7	---	---
20:1n-9	1.8	---	5.2	1.97	2.16	2.9	---	---
ARA (20:4n-6)	1.75	2.1	2.7	1.27	0.93	1.2	---	---
EPA (20:5n-3)	20	31.3	35.1	8.25	8.20	9.8	4.4	14.2
DHA (22:6n-3)	23.5	30.0	34.7	14.1	6.52	4.6	12.9	6.6
Saturados	34.8	33.4	28.3	23.84	11.83	14.6	---	---
Monoinsaturados	37.9	48.4	31.9	30.23	27.45	50.1	---	---
Poliinsaturados	67.3	86.8	89.8	45.9	26.3	29.8	---	---
HUFA n-3	48.5	68.9	74.9	25.1	16.7	16.9	17.3	25.1
HUFA Total	52.4	74.2	77.6	28.0	21.2	19.8	19.9	---
DHA/EPA	1.2	0.96	0.98	1.7	0.79	0.47	2.9	0.46
EPA/ARA	11.4	14.9	13	6.5	8.82	8.17	---	---
EPA/18:3n-3	14.3	17.39	21.9	1.63	15.8	16.3	---	---

En la **Tabla 36** se comparan los contenidos de ácidos grasos encontrados en el enriquecedor P-S y rotífero – P-S del experimento con los contenidos de ácidos grasos obtenidos por varios autores en el mismo enriquecedor P-S y el rotífero – P-S. \*: el contenido de ácidos grasos se expresó como porcentajes.

### 5.1.3. Larvas alimentadas con rotífero enriquecido con microalgas y P – S.

Entre los tratamientos de enriquecimiento con microalgas, encontramos una gran diversidad de resultados. Sin embargo, las larvas alimentadas con rotíferos enriquecidos con microalgas presentaron mayores contenidos de dos de los ácidos grasos esenciales, específicamente EPA y ARA, con respecto a las larvas alimentadas con rotífero enriquecido con P-S. En la **Tabla 37** se resume los contenidos de ácidos grasos de microalgas, rotífero y larvas, lo cual permite comparar los resultados obtenidos por los 5 tratamientos del Experimento I.

Como se señaló previamente (metodología y resultados) las microalgas vivas se utilizaron tanto para enriquecer los rotíferos (24 h, método de corta duración) como para suministrarlos directamente a los tanques de larvas (cultivo en agua verde). Podemos señalar que con la utilización simultánea de microalgas con estos dos fines en los tanques de cultivo larvario, logramos mantener disponibles para los rotíferos, los AGE de las microalgas. Esto se vio reflejado en el mejoramiento de la calidad de larvas de los tratamientos con microalgas frente a las larvas con P-S, lo cual se determinó mediante parámetros de cultivo que evaluaban calidad de las larvas (supervivencia, biomasa total final, % de inflación de vejiga, talla media final y peso medio final). Si hacemos un balance de la utilización de microalgas en el cultivo de larvas basándonos en estos parámetros señalados, podemos decir que en conjunto, su utilización resulta favorable para las larvas.

#### 5.1.3.1. Larvas alimentadas con rotífero enriquecido con *Chlorella sp.*

En la **Tabla 37** encontramos el perfil de ácidos grasos de las larvas alimentadas con rotífero – *Chlorella*. Observamos que estas larvas presentan valores intermedios en los principales ácidos grasos con respecto a los obtenidos por las larvas de los otros tratamientos. Así, encontramos en DHA (16.7%), EPA (5.7%), ARA (4.3%), poliinsaturados ((51.4%), total n-3 (23.6%) y en las proporciones DHA/EPA (2.9) y EPA/ARA (1.3). Es probable que los contenidos de EPA y ARA de estas larvas no sólo provinieran del rotífero suministrado sino también de las propias reservas de las larvas.

Respecto al DHA, no se encontró en *Chlorella sp.* ni en rotífero enriquecido por lo que debió provenir de las reservas de AGE del saco vitelino de las propias larvas, tal como encontraron varios autores para otras especies (Sargent *et al.* 1989, 1990 y 1993, Rainuzzo *et al.* 1993 y García-Alcázar 1998); podría pensarse que las larvas de dentón tuvieran cierta capacidad de sintetizar DHA a partir de 18:3n-3, sin embargo, la velocidad de síntesis de DHA en larvas de peces marinos parece ser muy lenta para ser significativa (Kanazawa *et al.* 1977, Bell *et al.* 1986, Mourente *et al.* 1993, Mourente and Tocher 1993, Tulli y Tibaldi 1997).

Por otra parte, las larvas alimentadas con rotífero – *Chlorella sp.* mostraron la capacidad de modificar sus proporciones de DHA/ EPA/ARA (16.7/5.7/4.3) con respecto a las proporciones encontradas en rotífero – *Chlorella sp.* (0/1.2/2.2) (**Tabla 37**); esta capacidad de las larvas de modificar la proporción DHA/ EPA/ARA de los rotíferos ha sido registrada en varias especies: en dorada japonesa (Watanabe *et al.* 1983), en dorada (Mourete *et al.* 1993, Koven *et al.* 1989 y 2001), en platija y rodaballo (Rainuzzo *et al.* 1993), en dentón (Tulli y Tibaldi 1997) y en rodaballo (Sargent *et al.* 1999).

Respecto a los parámetros biométricos, las larvas alimentadas con rotífero – *Chlorella* lograron alcanzar valores intermedios. Así, encontramos el segundo mejor resultado en supervivencia (28%) y biomasa total final (2.28 g), el mayor porcentaje en inflación de vejiga (95%). En cuanto al Peso medio (Pm = 0.028 g) y Talla media (Tm = 13.1 mm), son valores relativamente altos y significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) que los obtenidos con los tratamientos con *N. gaditana*, *I. galbana* y P-S. Se deben destacar los buenos resultados obtenidos por las larvas de este tratamiento pero como hemos visto en la sección de rotífero estos podrían obedecer en gran medida a que los rotíferos mantuvieron parte de las reservas de AGE de su alimentación previa (método de enriquecimiento de corta duración, 24 h) y también a que las larvas conservaron sus reservas de AGE provenientes del saco vitelino. Sin embargo, también es evidente el efecto beneficioso del suministro de *Chlorella sp.* a los tanques de cultivo larvario que permite reducir la carga bacteriana y conservar buena parte de la reserva de ácidos grasos de los rotíferos (Reitan *et al.* 1993, Esteban *et al.* 1999, Planas y Cunha 1999 y Divanach y Kenturi 2000).

#### 5.1.3.2. Larvas alimentadas con rotífero enriquecido con *N. gaditana*.

En la **Tabla 38** se comparan los contenidos de ácidos grasos de las larvas – *N. gaditana* con los resultados obtenidos por otros autores. Respecto al perfil de ácidos grasos de las larvas – *N. gaditana* encontramos altos contenidos de 16:0, 18:1n-9, pero sólo el contenido de 18:2n-6 es significativamente superior ( $p < 0.05$ ) con relación a los contenidos del resto de larvas. Y en cuanto a los AGE, encontramos contenidos significativamente inferiores ( $p < 0.05$ ) de DHA y EPA con respecto a los contenidos del resto de larvas; el contenido de ARA es significativamente menor ( $p < 0.05$ ) a los encontrados en las larvas de los tratamientos con *I. galbana* y P-S. Comparando los contenidos de AGE de microalgas, rotífero y larvas encontramos que *N. gaditana* presentaba altas concentraciones de EPA y ARA, y una proporción EPA/ARA de 4.1, en los rotíferos se redujo drásticamente los contenidos de EPA de ARA y la proporción EPA/ARA aumentó hasta 5.1, mientras que en larvas los contenidos de EPA y ARA son semejantes y la proporción EPA/ARA se redujo a 1.1 (**Tabla 37**).

Al evaluar el efecto de este tratamiento sobre el crecimiento y supervivencia larvaria, encontramos que estas no destacaron sobre las larvas de otros tratamientos, más bien obtuvieron valores intermedios: supervivencia (21%), biomasa total final (1.42 g) e



inflación de vejiga (83%); sin embargo, estas larvas alcanzaron el menor valor de Pm (0.0193 g) entre las larvas alimentadas con rotífero enriquecido con microalgas y también un mínimo valor de Tm (11.51 mm) con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con los tratamientos con *Chlorella sp.* y P-S. Las larvas de este tratamiento no destacaron en sus parámetros biológicos pero al menos lograron una mayor supervivencia que las larvas – P-S. Dado el alto contenido en EPA y ARA de *N. gaditana* era de esperar que repercutiera positivamente en la calidad de las larvas sometidas a tratamiento con esta microalga; sin embargo, parece que el fuerte descenso en los contenidos de EPA y ARA, y la alta proporción de EPA/ARA (5.1) del rotífero podrían haber tenido efectos negativos en las larvas. Koven (2001), Sargent (2002) y Cejas (2005) encontraron que un alto valor de la proporción EPA/ARA en rotíferos ocasionaba baja calidad en larvas de dorada, esto podría ayudar a explicar los relativamente bajos valores de algunos parámetros como Pm y Tm en las larvas de este tratamiento. Por otra parte, encontramos que las larvas – *N. gaditana* retuvieron activamente el ARA, puesto que en larvas su valor logró cuadruplicarse (4.1%) con respecto al de rotífero (1.1%), esto a su vez se reflejó en una disminución de la proporción EPA/ARA (de 5.1 en rotífero a 1.1 en larvas). Mourente *et al.* (1993), Koven (2001), Sargent (2002) y Cejas (2005) también señalaron que el efecto de un alto valor en la proporción EPA/ARA de rotíferos sobre las larvas de dorada fue que estas tendían a conservar activamente el ARA frente al EPA durante el desarrollo larvario.

#### 5.1.3.3. Larvas alimentadas con rotífero enriquecido con *T. suecica*.

Las larvas alimentadas con rotífero enriquecido con *T. suecica* presentaron alto contenido de DHA (16.5%), los mayores contenido de EPA (6.6% ), ARA (5.2%), poliinsaturados (49%), total de n-3 (29%), altas proporciones de DHA/EPA (2.5), EPA/ARA (1.27) y EPA/18:3n-3 (1.6); sin embargo, sólo los contenidos de EPA y ARA presentan diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos de larvas ( $p < 0.05$ ) (**Tabla 37**). Estos resultados los podemos comparar con los obtenidos por otros autores (**Tabla 38**), así, Reitan *et al.* (1993), trabajando con larvas de rodaballo, encontraron bajos contenidos de DHA (3.4 %) y ARA (3.3%), un contenido más alto de EPA (8.7%) y unos valores muy bajos en las proporciones DHA/EPA (0.39) y EPA/18:3n-3 (0.4%).

Sí observamos la evolución de los contenidos de ácidos grasos a través de algas, rotíferos y larvas de este tratamiento (**Tabla 37**), encontramos que el rotífero enriquecido con *T. suecica* retiene parte del DHA y EPA procedente de la microalga aunque presenta una proporción DHA/EPA muy baja, mientras que la larvas tienden a retener activamente el DHA (proveniente del rotífero y de sus propias reservas) y consumen parte del EPA por lo que las larvas finalmente tendrán una proporción más alta de DHA/EPA (2.5). Según Rainuzzo (1993) y Rodríguez *et al.* (1997) los rotíferos enriquecidos con *Tetraselmis sp.* tienden a retener gran parte del EPA y a consumir el DHA proveniente de esta alga, por lo que la proporción DHA/EPA de rotífero suele ser baja. Respecto al ARA de las larvas de todos los tratamientos, encontramos que su contenido siempre fue mayor que el encontrado

en rotífero por lo que la proporción EPA/ARA de las larvas también tiende a disminuir respecto a este.

Respecto a los parámetros biométricos, las larvas de este tratamiento con *T. suecica* no serían de alta calidad pues presentan bajos valores de supervivencia (12%), biomasa total final (1.11 g), Pm (0.025 g) y Tm (12.41 mm), aunque tienen un alto porcentaje de inflación de vejiga (89%). Según Léger *et al.* (1986) y Mourente (1989), el tratamiento con rotífero – *T. suecica* no sería óptimo ya que la proporción EPA/18:3n3 (0.45) es muy baja y el valor de EPA (3.1%) es inferior a 4 por lo cual no sería adecuado para las larvas. Este tratamiento con rotífero – *T. suecica* tampoco sería adecuado para las larvas según los criterio de Koven *et al.* (2001), Sargent (2002) (quienes trabajaron con dorada) y según Cejas (2005) (quienes trabajaron con sargo, *Diplodus sargo*), ya que la proporción EPA/ARA de este rotífero (2.1) sería relativamente alta y esto iría en detrimento de la calidad de las larvas.

#### 5.1.3.4. Larvas alimentadas con rotífero enriquecido con *I. galbana*.

En la **Tabla 37** resumimos los resultados obtenidos por algas, rotíferos y larvas de este tratamiento y los comparamos con los resultados obtenidos en las larvas de los otros tratamientos del Experimento I. Las larvas alimentadas con rotífero – *I. galbana* presentaron un contenido significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) de DHA (19.3%) respecto a las larvas de los otros tratamientos con microalgas, y alto valor en las proporciones DHA/EPA (5.3) y EPA/18:3n-3 (3.0), pero en cambio tenían los menores niveles de EPA (3.7%) y poliinsaturados (44.7%) con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a las larvas de los otros tratamientos, y los menores contenidos de ARA (3.7%) con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a las larvas de los tratamientos con *Chlorella sp.*, *N. gaditana* y *T. suecica*. Mourente *et al.* (1993) y Reitan *et al.* (1993) también trabajaron con esta microalga y encontraron (Tabla 38) más bajos contenidos, mayor concentración de EPA y una menor proporción de DHA/EPA.

Ahora, si observamos cómo evolucionó el contenido de ácidos grasos a través de algas, rotífero y larvas de este tratamiento (**Tabla 37**), encontramos que en este caso el alto contenido de DHA en larvas es reflejo de los altos contenidos de este ácido graso en rotífero y algas; mientras que el contenido de ARA aumentó de 1.5% en rotífero hasta un 3.7% en larvas. Por el contrario encontramos un bajo contenido de EPA (2.7%) y en la proporción EPA/18:3n-3 (0.58) en rotífero, lo cual podría ocasionar una pobre calidad en las larvas de este tratamiento de acuerdo con lo encontrado con Léger *et al.* (1986) y Mourente (1989); mientras que según Koven *et al.* (2001), Sargent (2002) y Cejas (2005), el bajo valor en la proporción EPA/ARA (1.8) de rotífero pudo haber repercutido favorablemente en la calidad de las larvas de este tratamiento.

Respecto a los parámetros biométricos, las larvas alimentadas con rotífero enriquecido con *I. galbana* alcanzaron altos valores en supervivencia (58%), biomasa total final (3.11g) y un alto porcentaje de inflación de vejiga (88%). Sin embargo, su Pm (0.0169

g) fue significativamente menor ( $\rho < 0.05$ ) al valor alcanzado por las larvas de los tratamientos *T. suecica*, *Chlorella sp.* y P-S; y su Tm (10.989 mm) también fue significativamente menor ( $\rho < 0.05$ ) al de las larvas de los tratamientos *Chlorella sp.* y P-S. Sí analizamos el resultado de estos parámetros, a primera vista podría parecer que hemos obtenido larvas de baja calidad puesto que tienen los más bajos índices Pm y Tm, pero sí valoramos todo el conjunto de parámetros obtenidos, vemos que el resultado es claramente positivo, además, estos datos nos indicarían que tenemos el caso contrario al de las larvas – P-S, es decir, que utilizando rotífero – *I. galbana* sobrevivieron más larvas con mayor porcentaje de inflación de vejiga y tuvieron más biomasa total final, pero en cambio cada larva obtuvo menos masa ya que una misma cantidad de alimento debió repartirse entre más individuos.

#### 5.1.3.5. Larvas alimentadas con rotífero enriquecido con Protein-Selco®.

En la **Tabla 37** podemos comparar los resultados obtenidos por el enriquecedor P-S, el rotífero y las larvas de este tratamiento con los resultados obtenidos mediante los tratamientos con microalgas. Las larvas alimentadas con rotífero enriquecido con P-S presentaron contenidos significativamente mayores ( $\rho < 0.05$ ) de DHA, HUFA y HUFA n-3 con respecto a las larvas del resto de tratamientos, altos contenidos de EPA y poliinsaturados, y una concentración significativamente menor ( $\rho < 0.05$ ) de ARA con respecto a las larvas alimentadas con rotífero enriquecido con microalgas; también tienen las más altas proporciones n3/n6, DHA/EPA, EPA/ARA y una relativamente alta proporción EPA/18:3n-3. Mourente et al. (1993) también encontraron mayores niveles de DHA (12.4%) y en el valor de la proporción DHA/EPA (1.67) cuando trabajaron con larvas alimentadas con rotífero enriquecido con P-S frente a larvas alimentadas con rotífero enriquecido con microalgas. Respecto al ARA, encontramos que las larvas de este tratamiento, al igual que las larvas del resto de tratamiento, tienden a retener activamente el ARA (pasando de 1.3% en rotífero a 3.6% en larvas) y la proporción EPA/ARA disminuyó de 6.5 en rotífero a 1.6 en larvas. Por otra parte, como ya observamos en las larvas del resto de tratamientos, la importancia del ARA para las larvas – P-S se evidenció en la tendencia de éstas a retener activamente el ARA (este pasó de 1.3% en rotífero a 3.6% en larvas y la proporción EPA/ARA disminuyó desde 6.5 en rotífero hasta 1.6 en larvas).

De acuerdo con los resultados de los parámetros biométricos encontramos que las larvas alimentadas con rotífero enriquecido con P-S obtuvieron los menores valores de supervivencia (6.5%) y biomasa total final (0.87 g) entre todos los tratamientos de larvas ( $\rho < 0.05$ ); sin embargo, alcanzaron un alto porcentaje inflación de vejiga = 83% y valores significativamente superiores ( $\rho < 0.05$ ) de peso medio final (Pm = 0.0398 g) y talla media final (Tm = 14.62 mm). Al parecer estos mayores valores de Pm y Tm obedecen a que las pocas larvas supervivientes dispusieron de más cantidad de alimento por individuo lo que redundó en aumento de talla y peso, aunque, este hecho aislado no significó necesariamente mejor calidad de estas larvas. Así, Tulli y Tibaldi (1997) han relacionado la rápida tasa de

crecimiento larvas de dentón (peso húmedo, larvas 12 días post-eclosión) con una baja tasa de supervivencia final.

Posiblemente la baja calidad de estas larvas – P-S pudo obedecer, en parte, a la notoria desproporción de EPA frente a ARA en rotífero y en consecuencia un alto valor de la proporción EPA/ARA (6.5). Koven 2001, Sargent 2002 y Cejas 2005 han señalado que un alto valor de esta proporción en rotífero tiene repercusiones negativas en las larvas. Otra posible causa de esta baja calidad de larvas parece ser la ausencia de microalgas en los tanques de cultivo larvario. Su ausencia, privó a rotíferos y larvas de los efectos beneficiosos que producen las microalgas y también influyó negativamente en la calidad del medio (Mourente *et al.* 1993, Tulli y Tibaldi 1997, Navarro *et al.* 1999 y Koven *et al.* 2001).



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**Tabla 37.** Resumen de contenido de ácidos grasos\* en algas, rotífero y larvas con *Chlorella sp.*, *N. gaditana*, *T. suecica*, *I. galbana* y *P-S*.

Ácido graso	Tratamiento <i>Chlorella sp.</i>			Tratamiento <i>N. gaditana</i>			Tratamiento <i>T. suecica</i>		
	Chlorella	Rotífero Chlorella	Larvas Chlorella	N. gaditana	Rotífero N. gaditana	Larvas N. gaditana	T. suecica	Rotífero T. suecica	Larvas T. suecica
16:0	22.15	15.69	16.8	20.24	19.31	17.08	17.26	19.64	17.33
16:1n-7	1.54	7.46	5.17	23.73	32.32	4.97	2.0	6.6	4.75
18:1n-9	22.79	10.17	12.78	2.89	11.79	14.67	19.7	17.13	13.92
18:2n-6	16.59	19.63	8.57	4.7	1.91	9.88	5.6	10.77	8.44
18:3n-3	21	14.97	8.77	0.24	0.55	8.16	21.6	6.95	4.0
20:1n-9	---	2.1	0.7	0.17	1.96	1.78	13.0	4.0	0.92
ARA (20:4n-6)	0.09	2.16	4.34	7.2	1.12	4.14	0.71	1.52	5.18
EPA (20:5n-3)	0.04	1.24	5.69	29.68	5.68	4.42	7.8	3.13	6.58
DHA (22:6n-3)	0.09	---	16.7	---	0.29	14.06	0.08	1.18	16.53
Saturados	38	25	26.98	32.8	31.3	27.56	19.0	27.26	27.84
Monoinsaturados	27.4	30.35	21.57	30.3	56.4	24.85	35.3	41.59	23.12
Poliinsaturados	37.9	44.58	51.45	43.23	12.29	47.59	43.96	31.14	49.14
HUFA n-3	0.13	4.69	23.58	29.88	7.6	19.57	8.0	7.0	24.55
HUFA Total	0.22	6.85	30.53	37.1	8.74	26.39	9.17	8.55	33.06
DHA/ EPA	2.2	---	2.93	---	0.05	3.18	0.01	0.36	2.52
EPA/ARA	0.44	0.57	1.31	4.1	5.07	1.06	11.98	2.06	1.27
EPA/18:3n-3	0.001	0.08	0.65	123.7	10.3	0.54	0.36	0.45	1.64
Ácido graso	Tratamiento <i>I. galbana</i>			Tratamiento P-S			Levadura		
	I. galbana	Rotífero I. galbana	Larvas I. galbana	P-S	Rotífero P-S	Larvas P-S	Levadura	Rotífero Levadura	
16:0	11.76	10.1	16.38	15.5	17.59	16.45	---	7.17	
16:1n-7	5.9	10.1	5.39	7.5	7.42	5.19	---	24.2	
18:1n-9	16.99	14.2	15.68	14.2	15.53	13.99	---	34.47	
18:2n-6	12.88	13.46	7.57	10.6	9.74	5.2	---	8.45	
18:3n-3	4.73	4.75	1.22	1.6	5.1	3.2	---	1.41	
20:1n-9	12.59	2.65	1.14	5.2	1.97	0.85	---	5.67	
ARA (20:4n-6)	0.3	1.51	3.73	2.7	1.27	3.56	0.03	0.77	
EPA (20:5n-3)	0.39	2.75	3.7	35.1	8.25	5.65	0.26	1.29	
DHA (22:6n-3)	5.9	4.79	19.26	34.7	14.07	25.24	0.05	0.61	
Saturados	28.3	23.9	27.23	28.3	23.84	26.6	16.1	14.98	
Monoinsaturados	38.68	36.26	28.06	31.9	30.23	22.63	82.07	67.9	
Poliinsaturados	32.27	39.8	44.7	89.8	45.93	50.76	1.82	17.12	
HUFA n-3	6.7	13.26	24.4	74.9	25.05	32.29	0.17	2.13	
HUFA Total	7.45	14.77	31.76	77.6	28.02	38.95	0.2	4.59	
DHA/ EPA	15.12	1.74	5.25	0.99	1.7	4.4	0.2	0.54	
EPA/ARA	1.2	1.81	1.0	13	6.49	1.59	8.63	1.69	
EPA/18:3n-3	0.08	0.58	3.03	21.9	1.62	1.78	---	0.91	

En la **Tabla 37** se comparan los contenidos de ácidos grasos de microalgas, rotífero enriquecido y larvas para cada uno de los cinco tratamientos. \*: el contenido de ácidos grasos se expresó como porcentaje de área total.

**Tabla 38.** Comparación de los contenidos de ácidos grasos de las larvas de los tratamientos con microalgas y P-S con los resultados obtenidos por otros autores.

Ácidos grasos	Tratamiento <i>Chlorella sp.</i>	Tratamiento <i>N. gaditana</i>		Tratamiento <i>T. suecica</i>	
	Datos del experimento	Datos del experimento	Larvas dorada Mourente et al. 1993 <sup>1</sup>	Datos del experimento	Reitan et al. 1993 <sup>2</sup> (Larvas rodaballo)
16:0	16.8	17.08	0.4	17.33	14.1
16:1n-7	5.17	4.97	7.0	4.75	2.8
18:1n-9	12.78	14.67	9.4	13.92	25.9
18:2n-6	8.57	9.88	1.9	8.44	7.2
18:3n-3	8.77	8.16	0.1	4.0	21.0
20:1n-9	0.7	1.78	1.2	0.92	3.9
ARA (20:4n-6)	4.34	4.14	4.7	5.18	3.3
EPA (20:5n-3)	5.69	4.42	10.5	6.58	8.7
DHA (22:6n-3)	16.7	14.06	8.5	16.53	3.4
Saturados	26.98	27.56	29.4	27.84	21.5
Monoinsaturados	21.57	24.85	24.4	23.12	33.7
Poliinsaturados	51.45	47.59	37.4	49.14	44.8
HUFA n-3	23.58	19.57	25.1	24.55	13.4
HUFA Total	30.53	26.39	31.2	33.06	16.7
DHA/ EPA	2.93	3.18	0.81	2.52	0.39
EPA/ARA	1.31	1.06	2.23	1.27	2.6
EPA/18:3n-3	0.65	0.54	105	1.64	0.41

Ácido graso	Tratamiento <i>I. galbana</i>			Tratamiento P-S		
	Datos del experimento	Larvas dorada Mourente et al. 1993 <sup>1</sup>	Larvas rodaballo Reitan et al. 1993 <sup>2</sup>	Datos del experimento	Larvas dorada Mourente et al. 1993 <sup>1</sup>	Larvas dorada Rodríguez et al. 1998 <sup>3</sup>
16:0	16.38	12.5	14.3	16.45	12.5	19.9
16:1n-7	5.39	7.8	2.9	5.19	5.9	6.85
18:1n-9	15.68	13.3	25.7	13.99	12.3	15.8
18:2n-6	7.57	2.8	7.1	5.2	2.7	5.5
18:3n-3	1.22	0.4	20.4	3.2	0.2	1.5
20:1n-9	1.14	1.6	4.0	0.85	1.4	0.8
ARA (20:4n-6)	3.73	3.2	3.2	3.56	3.1	1.5
EPA (20:5n-3)	3.7	6.6	8.5	5.65	7.4	4.4
DHA (22:6n-3)	19.26	10	4.5	25.24	12.4	11.25
Saturados	27.23	27.6	21.4	26.6	27.3	33.1
Monoinsaturados	28.06	30.3	33.8	22.63	27.8	29.6
Poliinsaturados	44.7	32.4	44.8	50.76	35.7	28.5
HUFA n-3	24.4	25.1	14.2	32.29	24.3	17.2
HUFA Total	31.76	31.2	21.9	38.95	28.7	19.1
DHA/ EPA	5.25	1.5	0.53	4.4	1.68	2.5
EPA/ARA	1.0	2.0	2.65	1.59	2.39	2.9
EPA/18:3n-3	3.03	16.5	0.42	1.78	37	2.9

\*: el contenido de ácidos grasos se expresa como porcentajes. 1: Mourente *et al.* 1993 (larvas de dorada de 15 días post-eclosión). 2: Reitan *et al.* 1993 (larvas de rodaballo de 23 días post-eclosión). 3: Rodríguez *et al.* 1998 (larvas de dorada de 17 días post-eclosión; emulsión mezcla de aceites vegetales y de pescado).

**Resumen:** en visión de conjunto, los resultados de los parámetros biométricos fueron más favorables para las larvas de los tratamientos con microalgas; así, las larvas de los tratamientos con microalgas lograron mejores valores de supervivencia, biomasa total final y porcentaje de inflación de vejiga; mientras que las del tratamiento Protein-Selco (P-S) alcanzaron mejores valores de Tm y Pm. Watanabe *et al.* (1983), Mourente *et al.* (1993), Rainuzzo (1993), Reitan *et al.* (1993 y 1997), Lubzens & Zmora (2003) y Muller-Feuga *et al.* (2003 a y b) indicaron el efecto positivo, sobre la calidad de las larvas, de la utilización de microalgas con un doble propósito: como alimento de rotífero y para adicionarlo a los tanques de cultivo larvario.

La conservación de las reservas de DHA provenientes del vitelo, sumadas al DHA adquirido de las microalgas o emulsiones a través del rotífero nos indican la gran importancia que tiene el DHA para el desarrollo de las larvas del dentón, tal y como han encontrado antes muchos autores en varias especies de peces marinos (Mourente *et al.* 1993 y 1999, Tulli y Tibaldi 1997, Basurco y Abellán 1999, Abellán 2000 a y b, Rueda y Martínez 2001 y Giménez *et al.* 2006). El ARA también parece tener gran importancia para las larvas, puesto que en todos los tratamientos se encontró que las larvas tenían siempre mayor contenido de ARA que sus respectivos rotíferos, como consecuencia de ello, la proporción EPA/ARA disminuyó de rotíferos a larvas (excepto en el tratamiento con *Chlorella sp.*); al parecer, las larvas de dentón tienden a retener e incrementar activamente sus reservas de ARA tal y como ya encontró Cejas (2005) en larvas de sargo (*Diplodus sargo*).

Si confrontamos los tratamientos de larvas con *I. galbana* y con P-S, encontramos que en ambos casos hay altos contenidos de DHA y las mayores proporciones de DHA/EPA, pero difieren en que las larvas – *I. galbana* tienen una menor proporción EPA/ARA (lo cual parece ser beneficioso para las larvas) y en que la microalga se utilizó no sólo para el enriquecimiento del rotífero sino para adicionarlo al tanque de cultivo de larvas, lo cual al parecer fue determinante para mantener los contenidos de AGE en rotíferos e incrementar la viabilidad y la biomasa de larvas. Algunos autores (Watanabe *et al.* 1983, Mourente *et al.* 1993, Rainuzzo 1993, Reitan *et al.* 1993 y 1997 y Muller-Feuga *et al.* 2003 a y b) señalan que el uso de microalgas en los tanques de cultivo larvario permiten mantener los contenidos de AGE en rotífero y reducir la mortalidad en larvas, debido a que facilitan el desarrollo del sistema digestivo de las larvas y controlan la proliferación de bacterias patógenas en rotífero, en larvas y en el tanque del cultivo.

Se ha encontrado que una proporción dietaria de DHA/EPA de 2/1 sería óptima para varias especies de peces marinos (Sargent *et al.* 1999 en lubina, rodaballo y platija, y Rueda & Martínez 2001 en dentón). Aplicando este criterio a nuestros resultados encontramos que sólo en los rotíferos enriquecidos con *I. galbana* (1.74) y con P-S (1.7) obtuvimos una proporción DHA/EPA cercana a 2. Ahora, sí evaluamos que efecto tuvo este hecho en los parámetros biológicos de las larvas, encontramos que sólo las del tratamiento con la dieta

de rotífero – *I. galbana* alcanzaron unos índices de calidad aceptables, mientras que las larvas con la dieta con P-S sólo destacaron en dos parámetros Pm y Tm.

Finalmente, hemos encontrado que el perfil de ácidos grasos de las larvas en fase de alimentación con rotífero viene determinado por varios factores que intervienen simultáneamente: **primero**, el perfil de AGE de las microalgas usadas (Reitan *et al.* 1993); **segundo**, el metabolismo de los rotíferos que modifican activamente el perfil de AGE de las algas asimiladas en favor del EPA (Mourente *et al.* 1989, Rainuzzo 1993 y 1994, Reitan *et al.* 1993, Rodríguez *et al.* 1997 y 1998, Muller-Feuga *et al.* 2003 a y b); **tercero**, las propias reservas de AGE de las larvas, que estas tienden a conservar (Mourente 1989, Tandler *et al.* 1989, Rainuzzo *et al.* 1993, Watanabe y Kiron 1994, García-Alcázar 1998 y Sargent *et al.* 1997, 1999 a y b); y **cuarto**, que las larvas tienden a modificar prontamente las proporciones de los AGE asimilados para adaptarlos a sus requerimientos (Watanabe *et al.* 1983, Koven *et al.* 1989, Mourente *et al.* 1993, Rainuzzo *et al.* 1993, Tulli y Tibaldi 1997, Sargent *et al.* 1997 y 1999 a y b). A pesar de los múltiples factores que interactúan en la determinación del perfil de ácidos grasos (incluyendo los AGE) de las larvas de dentón en fase de alimentación con rotífero, es evidente que la composición de AGE y las proporciones DHA/EPA/ARA de microalgas y P-S fue determinante en la composición y proporciones de AGE del rotífero, y a su vez, la composición y proporciones de AGE del rotífero son claves para establecer no sólo el perfil y las proporciones de ácidos grasos sino también la calidad de las larvas. En las larvas de dentón también resultaron determinantes las reservas de AGE del saco vitelino, ya que mediante ellas, las larvas logran compensar parcialmente las carencias en AGE procedentes de la dieta. Finalmente, sigue siendo recomendable la utilización de microalgas tanto para el enriquecimiento de rotífero como para el suministro a los tanques de cultivo larvario frente al uso de dietas artificiales; porque como vimos en el caso de las larvas – P-S, este enriquecedor provee unas altas concentraciones de AGE en rotífero y larvas pero al parecer esta ventaja no es suficiente para garantizar la obtención de larvas de alta calidad.



## 5.2. DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO II: LARVAS EN FASE ARTEMIA DEL PRIMER AÑO.

### 5.2.1. Emulsiones utilizadas.

Para realizar el análisis de los resultados es conveniente tener en cuenta algunas especificaciones dadas por el fabricante de las emulsiones “Artemia Reference Center (ARC – Ghent University, Belgium)”. En ellas se detallan las concentraciones aproximadas del total de n-3 HUFA y relación DHA/EPA en las emulsiones base **ICES** (International Council for the Exploration of the Sea, Grupo de trabajo del ARC) e informan sobre las diferentes concentraciones de los ácidos grasos esenciales (AGE: DHA, EPA y ARA). También se señala que los AGE vienen en dos presentaciones químicas: triglicéridos (TG) y etilésteres (EE) pero no como fosfolípidos (PL); este aspecto es clave, ya que los AGE tienen diferente velocidad de asimilación e integración en los tejidos de las larvas, dependiendo de la complejidad de la estructura molecular con la que se suministran en la dieta, es decir si vienen en forma de TG, PL o ésteres de ácidos grasos como el EE (Izquierdo y Fernández-Palacios 1997, Rodríguez *et al.* 1998, Støttrup y McEvoy 2003). Muestras de estas emulsiones fueron sometidas a análisis para poder comparar nuestros resultados con la información dada por ARC sobre estos productos.

#### 5.2.1.1 Emulsiones utilizadas en el primer año de experimentación:

Al comparar los datos de muestras de emulsiones con los datos del *Artemia* Reference Center (ARC), es necesario tener en cuenta que el ARC indica que son valores aproximados, por lo tanto estos pueden variar ligeramente de un lote a otro (**Tabla 40**).

**Tabla 40.** Emulsiones ICES HUFA n-3 (Primer año de experimentación).

Tratamientos	Total de HUFA n-3		Proporción DHA/EPA		Lípidos Más abundantes
	ARC	Experimento	ARC	Experimento	
<b>A</b> (ICES STD)	<b>0</b>	<b>0.51</b>	<b>---</b>	<b>1.25</b>	Triglicéridos Satdos. <b>(TG)</b>
<b>B</b> (ICES 30/0.6/C)	<b>30</b>	<b>30.8</b>	<b>0.6</b>	<b>0.7</b>	Triglicéridos Poliinsat. <b>(TG)</b>
<b>C</b> (ICES 30/4/C)	<b>30</b>	<b>26</b>	<b>4</b>	<b>4.7</b>	Triglicéridos Poliinsat. <b>(TG)</b>
<b>D</b> (ICES 50/0.6/C)	<b>60</b>	<b>65</b>	<b>0.6</b>	<b>0.9</b>	Etilésteres Poliinsat. <b>(EE)</b>

Las concentraciones están dadas en porcentajes. ICES (International Council for the Exploration of the Sea).

Para denominar los diferentes tratamientos de emulsiones, les hemos atribuido letras para facilitar su utilización: A (ICES STD), B (ICES 30/0.6/C), C (ICES 30/4/C) y D (ICES 50/0.6/C). Los resultados del total de HUFA n-3 de nuestros datos y de los valores dados por el ARC (Artemia Reference Center) están muy próximos aunque no son exactamente iguales; encontramos diferencias por exceso en D (de 65 frente a 60 del ARC), y por defecto en C (de 26 frente a 30 del ARC). Con respecto a la proporción DHA/EPA, en la emulsión A encontramos alguna diferencia entre el resultado del ARC y el valor encontrado en el experimento, pero se debe tener en cuenta que en nuestros datos las concentraciones de DHA y EPA se encontraron sólo a nivel de trazas por lo que el valor 1.25 es poco significativo, y respecto al resto de emulsiones encontramos sólo ligeras variaciones (**Tabla 40**). Es posible que estas discrepancias pudieran deberse a ligeras variaciones entre los lotes del ARC (como ya advierte este fabricante en la información suministrada) y las muestras del experimento y/o también a diferencias en los procedimientos de análisis.

Sí analizamos los perfiles de ácidos grasos de las emulsiones ICES de los distintos tratamientos, encontramos grandes diferencias tanto en contenidos de tipos de lípidos (poliinsaturados, monoinsaturados y saturados) como en las proporciones existentes entre ellos (**Tabla 42**). Hemos encontrado experimentos similares realizados por otros autores con series de emulsiones ICES o emulsiones semejantes hechas con mezclas de aceites de

pescado para enriquecer *Artemia* (Léger *et al.* 1986, Mourente 1989, Izquierdo *et al.* 1992, Dhert y Sorgeloos 1993, Rainuzzo 1993, Takeuchi *et al.* 1992 a y b, Takeuchi 1997, Støttrup y McEvoy 2003). Las emulsiones que utilizamos también varían en contenido de clases de lípidos, es decir TG o EE aunque no contienen PL; así a nivel de HUFA totales, HUFA n-3, DHA y el EPA encontramos que la emulsión del tratamiento D (con EE) tiene valores significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) a los de las emulsiones de los otros tres tratamientos (con TG); los autores antes citados, también utilizaron emulsiones en forma de TG y ésteres simples (EE o ME) pero además usaron emulsiones con PL. Por otra parte, como veremos en los siguientes apartados, las marcadas diferencias en contenido de AGE encontradas en las emulsiones suelen tener consecuencias importantes en los contenidos de AGE de la *Artemia* enriquecida y de las larvas de los diferentes tratamientos.

### 5.2.2 Artemia.

La cepa EG que utilizamos durante el periodo de experimentación se considera de origen dulceacuícola (Watanabe *et al.* 1978, Navarro 1999), caracterizada por presentar elevados contenidos de 18:3n-3 (15.8% del total de ácidos grasos, en nuestros análisis) y escasa cantidad de EPA (0.8% del total de ácidos grasos). De acuerdo con nuestros datos y los suministrados por el productor ARC, esta cepa no posee DHA (22:6n-3), lo cual coincide con los resultados de otros autores (Léger *et al.* 1986, Watanabe 1987, Mourente 1989, Navarro 1991, Navarro *et al.* 1999) que trabajaron con diferentes cepas de *Artemia*, tanto de agua dulce como marina, y sólo encontraron DHA a nivel de trazas en algunas cepas; pero al enriquecer esta cepa EG con las emulsiones ICES, logramos elevar sus contenidos de DHA, EPA y ARA en diferentes proporciones según la emulsión utilizada. Actualmente, se ha generalizado la metodología de enriquecer cepas de *Artemia* de escaso valor nutricional, como la EG, con emulsiones ricas en AGE con el fin de disminuir costes y mejorar la calidad de las larvas en acuicultura marina (Watanabe 1987, Mourente 1989, Dhert *et al.* 1993, Navarro 1999 y McEvoy *et al.* 1995).

Por otra parte, dado que en este caso pretendemos evaluar el efecto de una serie de tratamientos de enriquecimiento sobre los perfiles de ácidos grasos de nauplios de *Artemia* y de larvas, y sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas de dentón, debemos tener en cuenta que hay dos procesos metabólicos de efectos antagónicos que pueden modificar las concentraciones y proporciones de AGE (especialmente del DHA EPA y ARA). **El primer** proceso ocurre a nivel de nauplios y adultos de *Artemia*, en estos organismos la composición final de ácidos grasos suele ser similar a la composición de su dieta (Rainuzzo 1993). Sin embargo, *Artemia* tiende a modificar esta composición en función del consumo metabólico y del tiempo transcurrido desde el enriquecimiento (Hinchcliffe & Riley 1972); de manera que es particularmente frecuente que, en el metabolismo normal de *Artemia*, se absorba y almacene el EPA mientras que el DHA asimilado es catabolizado como energía o transformado en EPA (Dhert *et al.* 1993, McEvoy *et al.* 1995, Navarro *et al.* 1999); por lo tanto *Artemia* es un organismo que modifica activamente las concentraciones de DHA y EPA, y la proporción DHA/EPA de la dieta destinada a las larvas de dentón. **El segundo**

**proceso** ocurre directamente en las primeras etapas larvarias de peces marinos, incluida la especie estudiada (el dentón), estas tienden a conservar sus reservas de HUFA y a acumular los nuevos HUFA introducidos en la dieta, especialmente el DHA, ya que estos ácidos grasos son esenciales para el crecimiento, formación del sistema de membranas, y desarrollo del sistema nervioso (tejido nervioso y retina) (Rainuzzo 1993, Sargent *et al.* 1993 y Watanabe 1993). Además, en dentón se producen cambios cuantitativos en DHA, EPA y ARA a lo largo de todo el desarrollo larvario; Tulli y Tibaldi (1997) encontraron que el contenido de DHA en larvas de dentón de 1 día eran posteriormente reducido entre las larvas de 12 y 30 días, mientras que los niveles de EPA y ARA no mostraban variaciones significativas después de la eclosión.

Hay otras dos cuestiones que es necesario especificar respecto a *Artemia*. **La primera** es que las concentraciones de los dos ácidos grasos más abundantes de la serie n-3 en su perfil: ácido linolénico (18:3n-3) y EPA (20:5n-3) deberían ser consideradas conjuntamente, ya que sus niveles de concentración están inversamente relacionados (Léger *et al.* 1986). Es decir que en los perfiles de ácidos grasos analizados, cuanto más alta es la concentración de 18:3n-3 más baja es la de EPA y viceversa. **La segunda** es que una cepa de *Artemia* se puede considerar como nutricionalmente apta para el cultivo de organismos marinos cuando la concentración de EPA es mínimo del 4% del total de ácidos grasos en los nauplios recién eclosionados y la proporción EPA/18:3n-3 es cercana a 4 (Watanabe *et al.* 1978, Léger *et al.* 1986 y Mourente 1989).

#### 5.2.2.1 *Artemia* del primer año de experimentación.

Para hacer el análisis de los siguientes resultados es necesario tener en cuenta los planteamientos señalados inicialmente en este apartado, especialmente en lo referente al metabolismo de *Artemia* y a la utilización de emulsiones en forma de TG o de EE.

Analizando el contenido de DHA en *Artemia* (**Tabla 42**), encontramos que descendió con respecto al de sus respectivas emulsiones (especialmente en *Artemia* de los tratamientos C y D), probablemente esta disminución fue debida en gran parte a la tendencia natural de *Artemia* a metabolizar más rápidamente el DHA que el EPA; pero adicionalmente también habría que tener en cuenta el efecto de utilizar EE como enriquecedor de *Artemia*, ya que la emulsión del tratamiento D contenía HUFA en forma de EE. Ahora, si comparamos el contenido en DHA de la *Artemia* de los diferentes tratamientos, observamos que *Artemia* del tratamiento D (con HUFA en forma de EE) tenía una concentración de DHA (5.8) significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que la de *Artemia* del tratamiento A (0.2, con TG saturados) pero significativamente menor ( $p < 0.05$ ) a las concentraciones de DHA de *Artemia* de los tratamientos B (10.1) y C (8.5) (con HUFA en forma de TG). Izquierdo *et al.* (1992) obtuvieron resultados similares a los nuestros (2.9% de DHA) utilizando emulsiones similares con HUFA n-3 en forma de EE (85%); mientras que Rainuzzo (1993), encontró que podía elevar el contenido de DHA

(29.9%) en *Artemia* utilizando también emulsiones con HUFA n-3 en forma de EE (80.7%).

La concentración EPA en *Artemia* del tratamiento D (**Tabla 42**) fue significativamente superior ( $p < 0.05$ ) a las concentraciones de EPA de la *Artemia* del resto de tratamientos. En general, los contenidos de EPA descendieron menos que los de DHA en *Artemia*, es posible que esto obedezca a que parte del DHA de las emulsiones fueron transformados en EPA dentro de los nauplios de *Artemia*, tal y como encontraron Dhert *et al.* (1993) y McEvoy *et al.* (1995). Algunos autores (Léger *et al.* 1986) señalan que para considerar una *Artemia* enriquecida como de buena calidad para larvas, debe tener un contenido mínimo del 4% de EPA sobre el total de ácidos grasos. Según esto, la mayor parte de los tratamientos (B, C y D) producen metanauplios de buena calidad nutricional para las larvas a excepción del tratamiento A (**Tabla 42**). Por el contrario, existe otro criterio que tiene en cuenta la proporción EPA/18:3n-3 y considera que un valor adecuado de esta proporción debe estar en torno a 4 (Mourente 1989); si analizamos nuestros resultados de acuerdo con este criterio, observamos que obtuvimos valores muy bajos de esta proporción (entre 0.08 y 0.67), por lo tanto, este criterio no nos es útil porque no nos permite diferenciar entre tratamientos.

Respecto a ARA, encontramos que en *Artemia* de todos los tratamientos se produjo un aumento de su concentración con respecto al contenido en ARA de sus respectivas emulsiones, el aumento más notable se observó en *Artemia* del tratamiento A. Posiblemente este incremento en el contenido de ARA en *Artemia* fue debido al aumento de su intermediario metabólico, el DPA (ácido docosapentaenoico, 22:5n-6) que partiendo de precursores como el 18:2n-6 se transforma finalmente en ARA, tal como encontraron, también en *Artemia*, Navarro *et al.* 1999 y Koven *et al.* 2001; es conveniente aclarar que en nuestro experimento no fue detectado el DPA en los perfiles de ácidos grasos obtenidos de los metanauplios de *Artemia* enriquecidos, pero sí detectamos un aumento de su precursor el 18:2n-6 y desde luego del ARA en *Artemia*.

Respecto a la proporción DHA/EPA, sólo la *Artemia* de los tratamientos B y C tendría valores aceptables para larvas (**Tabla 42**); mientras que la *Artemia* del tratamiento D presenta altos contenidos de EPA y DHA pero no tiene una óptima proporción DHA/EPA para las larvas. Léger *et al.* (1986), Watanabe (1987), Mourente *et al.* (1989) y Navarro-Tárrega (1999) estudiaron cepas de diverso origen geográfico (San Francisco, Great Salt Lake, China y Cádiz) y encontraron que se caracterizaban por tener DHA sólo a nivel de trazas y una proporción muy baja de DHA/EPA.

Los contenidos de HUFA n-3 en *Artemia* descendieron drásticamente con respecto a las concentraciones de en sus respectivas emulsiones enriquecidas, independientemente de si provenían de TG o EE (Tabla 42). Probablemente la reducción de DHA y HUFA n-3 de *Artemia* con respecto a los contenidos en las emulsiones se deba al metabolismo de *Artemia* que cataliza el DHA como energía o lo convierte en EPA (Dhert *et al.* 1993, McEvoy *et al.* 1995, Navarro *et al.* 1999). Entre los tratamientos de *Artemia*, la del tratamiento D (con EE) alcanzó la mayor concentración de HUFA n-3 (19.3%) con

respecto a la *Artemia* de los tratamientos enriquecidos con TG (A, B y C). Si comparamos estos datos con los de otros autores, observamos resultados variados: Izquierdo *et al.* (1992) se aproximaron bastante a nuestros resultados: utilizando emulsiones con HUFA n-3 en forma de EE (85%) obtuvieron *Artemia* con una concentración de HUFA n-3 del 17.8%, también obtuvieron alta concentración HUFA n-3 (23.7%) utilizando otro tipo de ésteres simples (metilésteres) e incluso al enriquecer *Artemia* con TG (19.7% HUFA n-3); Takeuchi *et al.* (1992) lograron resultados similares, incrementaron la concentración de HUFA n-3 en *Artemia* (10%) utilizando emulsiones con alto contenido de EE (85%); por otra parte Rainuzzo (1993) encontró que utilizando emulsiones con alto contenido de HUFA n-3 en forma de EE (80.7%) podía incrementar significativamente la concentración de HUFA n-3 en forma de TG en *Artemia* (8.9%) frente al uso de emulsiones con TG; finalmente, Izquierdo *et al.* (1992) y Rainuzzo (1993) sugieren que estas variaciones observadas en los resultados obtenidos en el enriquecimiento de *Artemia*, serían debidas a diferencias en los métodos de enriquecimiento y/o en las condiciones experimentales.

### 5.2.3. Larvas en fase *Artemia* del primer año.

En la **Tabla 41** comparamos los contenidos de ácidos grasos de emulsiones, *Artemia* y larvas de los diferentes tratamientos del Experimento II. Respecto al DHA, encontramos que en *Artemia* no se presentó la misma tendencia creciente en la concentración de DHA desde el tratamiento A hasta el D. Posiblemente, la menor concentración de DHA en *Artemia* del tratamiento D tuvo algo que ver con el suministro de HUFA n-3 en forma de EE como dieta porque al parecer aceleró la transformación metabólica de DHA en EPA frente a la velocidad de metabolización al suministrar HUFA n-3 como TG; esta afirmación la apoyamos en el hecho de que los contenidos de DHA disminuyen menos en los tratamientos en los que se utilizaron TG (B y C) mientras que en D (donde se utilizó HUFA n-3 en forma de EE) la disminución de la concentración de DHA de la emulsión a *Artemia* fue más marcada (**Tabla 41**). A su vez, este hecho repercutió en un menor contenido de DHA alcanzado por las larvas del tratamiento D con respecto a los contenidos alcanzados por las larvas tratadas con TG (B y C). Por último, el tratamiento A refleja claramente la tendencia de las larvas a conservar el DHA, pues si observamos la concentración de DHA en emulsiones es baja (0.28%), igualmente es baja en *Artemia* (0.2%) y finalmente es mucho más alta en larvas (4.3%) debido a la tendencia de las larvas de peces marinos, incluidas las de dentón, a conservar sus reservas de HUFA y retener los HUFA que se le suministran en la dieta (Rainuzzo, 1993, Sargent *et al.* 1993, Watanabe 1993).

Tulli y Tibaldi (1997) y Rueda y Martínez (2001) recomiendan un valor óptimo de la proporción DHA/EPA en torno a 2/1 en la dieta para larvas de peces marinos. Si analizamos nuestros resultados según este criterio, observamos que los cuatro tratamientos de *Artemia* presentaron valores de la proporción DHA/EPA más bajos que los recomendados (**Tabla 41**). Además, las diferencias entre los valores de esta proporción no se vieron reflejadas en grandes variaciones en los parámetros biométricos de las larvas, a

excepción de las del tratamiento A (alimentadas con *Artemia* enriquecida con TG saturados, de las que hablaremos más adelante).

Respecto a los HUFA, encontramos que las larvas de todos los tratamientos presentaron mayores concentraciones de HUFA n-3 que en su respectiva *Artemia*. Esto obedece a la tendencia de las larvas de peces marinos a conservar sus reservas de HUFA y acumular los adquiridos en la dieta (Rainuzzo 1993, Sargent *et al.* 1993, Watanabe 1993); mientras que las concentraciones de saturados y principalmente monoinsaturados de las larvas disminuyeron, puesto que estos son utilizados preferencialmente como fuente de energía para preservar los HUFA (Watanabe y Kiron 1994, Tulli y Tibaldi 1997). Esta tendencia la hemos constatado en nuestro experimento, puesto que las larvas de los diferentes tratamientos presentaron mayores contenidos de DHA y HUFA n-3 que los encontrados en su respectiva *Artemia*; mientras que los contenidos de saturados y principalmente monoinsaturados de las larvas disminuyen con respecto a los de *Artemia* (**Tabla 41**). Comparando los cuatro tratamientos, encontramos que en las larvas del tratamiento D, con HUFA n-3 como EE, se observó el mayor aumento de HUFA n-3 con respecto a *Artemia* y esto a su vez repercutió en que las larvas de este tratamiento D alcanzaran la mayor concentración de HUFA n-3 (existiendo diferencias significativas entre estas larvas y las de los otros tres tratamientos,  $\rho < 0.05$ ) (**Tabla 41**). Rainuzzo 1993 y Takeuchi *et al.* 1992 encontraron que al utilizar emulsiones con EE como enriquecedor lograban que *Artemia* acumulara más HUFA n-3 como TG que cuando se utilizaban emulsiones con TG para enriquecer *Artemia* lo cual repercutía en los contenidos de HUFA n-3 de las larvas. Respecto a los contenidos de ARA de todos los tratamientos, se observó un aumento en la concentración de ARA desde las emulsiones hasta sus respectivas larvas (**Tabla 41**), este hecho indica la importancia del ARA como AGE para las larvas de peces marinos tal como han encontrado algunos autores (Navarro *et al.* 1999, Koven *et al.* 2001, Cejas 2005).

Es interesante tener en cuenta que, en este primer año, la utilización de ésteres simples (etilésteres o EE) en el enriquecimiento de *Artemia* no implicó una disminución clara de la supervivencia de las larvas; así, las larvas del tratamiento D que contenían HUFA n-3 en forma de EE alcanzaron una supervivencia similar a la de las larvas que contenían HUFA en forma de TG poliinsaturados (C y B). Por el contrario, las larvas alimentadas con TG saturados (A) obtuvieron el menor índice de supervivencia (47%); otros autores (Izquierdo 1988 y Rodríguez 1994), que utilizaron un éster simple (ME en lugar de EE), han encontrado por el contrario altas tasas de mortalidad en larvas de peces marinos relacionadas con el uso de ME como fuente de enriquecimiento de presas vivas. Tampoco se observaron grandes diferencias en cuanto a los parámetros de crecimiento (Pm y Tm) entre las larvas D y las larvas a las que se les suministró HUFA n-3 como TG (B y C). Es posible que el hecho de que no se hayan presentado altas tasas de mortalidad en las larvas D se deba a la utilización de EE (que no produce metabolitos tóxicos) en lugar de ME, que produce metanol y sus derivados (Ibeas *et al.* 2000).

Las larvas del tratamiento A, alimentadas con *Artemia* enriquecida con TG saturados, presentaron valores significativamente menores ( $p < 0.05$ ) de Pm y Tm con respecto a las larvas de los otros tres tratamientos. Al parecer, la baja calidad de las larvas de este tratamiento es debida principalmente a las bajas concentraciones de AGE presentes en el alimento (*Artemia* con TG saturados). Varios autores han señalado los efectos negativos sobre larvas de peces marinos, de utilizar como alimento dietas carentes de AGE (Kanazawa *et al.* 1979 a, Watanabe 1982, 1983, 1987, 1993 y 1994, Bell *et al.* 1985, Léger *et al.* 1987, Sargent *et al.* 1993 y 1999 a y b).



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



**Tabla 41.** Resumen de los datos de los tratamientos del Primer año.

Ácido graso	Cepa EG	Tratamiento A			Tratamiento B		
		Emulsión	Artemia	Larvas	Emulsión	Artemia	Larvas
18:2n-6	9.5	11.33 <sup>a</sup>	8.81 <sup>a</sup>	9.87 <sup>a</sup>	4.21 <sup>d</sup>	5.72 <sup>c</sup>	6.58 <sup>b</sup>
18:3n-3	2.19	0.92 <sup>a</sup>	17.3 <sup>b</sup>	13.3 <sup>a</sup>	1.0 <sup>a</sup>	14.7 <sup>d</sup>	9.8 <sup>b</sup>
ARA	0.86	0 <sup>c</sup>	1.3 <sup>c</sup>	3.6 <sup>b</sup>	0.93 <sup>b</sup>	2.6 <sup>a</sup>	4.4 <sup>ab</sup>
EPA	0.83	0.23 <sup>d</sup>	1.5 <sup>d</sup>	3.2 <sup>c</sup>	16.2 <sup>b</sup>	6.7 <sup>b</sup>	6.6 <sup>b</sup>
DHA	0	0.28 <sup>d</sup>	0.2 <sup>d</sup>	4.3 <sup>a</sup>	11.0 <sup>c</sup>	10.1 <sup>a</sup>	11.2 <sup>b</sup>
Saturados	28.5	69.7 <sup>a</sup>	27.3 <sup>a</sup>	26.8 <sup>a</sup>	28.0 <sup>c</sup>	20.5 <sup>c</sup>	26.7 <sup>a</sup>
Monoinsat.	43.0	17.2 <sup>b</sup>	36.8 <sup>a</sup>	32.0 <sup>a</sup>	25.2 <sup>a</sup>	32.8 <sup>c</sup>	28.3 <sup>ab</sup>
Poliinsaturados	14.8	12.9 <sup>c</sup>	35.9 <sup>d</sup>	41.1 <sup>b</sup>	40.0 <sup>b</sup>	46.7 <sup>b</sup>	44.9 <sup>a</sup>
HUFA n-3	0.83	0.51 <sup>c</sup>	1.7 <sup>d</sup>	8.1 <sup>c</sup>	30.8 <sup>b</sup>	17.5 <sup>b</sup>	18.8 <sup>b</sup>
HUFA totales	2.28	0.63 <sup>c</sup>	3.6 <sup>d</sup>	14.2 <sup>c</sup>	32.4 <sup>b</sup>	20.9 <sup>b</sup>	25.2 <sup>b</sup>
DHA/EPA	0	1.25 <sup>b</sup>	0.2 <sup>d</sup>	1.4 <sup>ab</sup>	0.68 <sup>b</sup>	1.5 <sup>a</sup>	1.5 <sup>ab</sup>
EPA/ARA	0.97	---	1.1	0.89	17.4	2.6	1.5
EPA/18:3n-3	0.38	0.25	0.08	0.24	15.5	0.45	0.67
Ácido graso	Cepa EG	Tratamiento C			Tratamiento D		
		Emulsión	Artemia	Larvas	Emulsión	Artemia	Larvas
18:2n-6	9.5	6.19 <sup>b</sup>	6.22 <sup>b</sup>	6.56 <sup>b</sup>	4.74 <sup>c</sup>	5.74 <sup>c</sup>	5.45 <sup>c</sup>
18:3n-3	2.19	0.96 <sup>a</sup>	14.9 <sup>c</sup>	7.7 <sup>b</sup>	0.93 <sup>a</sup>	18.1 <sup>a</sup>	7.8 <sup>b</sup>
ARA	0.86	1.4 <sup>a</sup>	2.5 <sup>a</sup>	4.7 <sup>a</sup>	1.48 <sup>a</sup>	2.0 <sup>b</sup>	3.8 <sup>b</sup>
EPA	0.83	4.2 <sup>c</sup>	6.4 <sup>c</sup>	6.3 <sup>b</sup>	29.8 <sup>a</sup>	12.3 <sup>a</sup>	10.8 <sup>a</sup>
DHA	0	19.8 <sup>b</sup>	8.5 <sup>b</sup>	12.4 <sup>b</sup>	27.3 <sup>a</sup>	5.8 <sup>c</sup>	10.87 <sup>b</sup>
Saturados	28.5	35.2 <sup>b</sup>	20.8 <sup>b</sup>	29.1 <sup>c</sup>	6.6 <sup>d</sup>	15.8 <sup>d</sup>	27.5 <sup>b</sup>
Monoinsatdos.	43.0	24.9 <sup>a</sup>	34.0 <sup>b</sup>	26.6 <sup>b</sup>	15.4 <sup>c</sup>	32.2 <sup>c</sup>	26.2 <sup>b</sup>
Poliinsaturados	14.8	36.8 <sup>b</sup>	45.1 <sup>c</sup>	44.3 <sup>a</sup>	75.1 <sup>a</sup>	51.9 <sup>a</sup>	46.3 <sup>a</sup>
HUFA n-3	0.83	25.5 <sup>b</sup>	15.4 <sup>c</sup>	19.9 <sup>b</sup>	65.3 <sup>a</sup>	19.3 <sup>a</sup>	24.2 <sup>a</sup>
HUFA totales	2.28	28.8 <sup>b</sup>	18.6 <sup>c</sup>	27.2 <sup>ab</sup>	68.3 <sup>a</sup>	22.3 <sup>a</sup>	30.4 <sup>a</sup>
DHA/EPA	0	4.7 <sup>a</sup>	1.3 <sup>b</sup>	1.9 <sup>a</sup>	0.92 <sup>b</sup>	0.5 <sup>c</sup>	1.0 <sup>b</sup>
EPA/ARA	0.97	3	2.6	1.3	20.1	6.1	2.8
EPA/18:3n-3	0.38	4.4	0.43	0.82	32.0	0.67	1.4

Las concentraciones indican porcentaje de área total. Las letras superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos.

### 5.3. DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO III: LARVAS EN FASE DE ALIMENTACIÓN CON ARTEMIA DEL SEGUNDO AÑO.

#### 5.3.1. Emulsiones del segundo año.

En esta segunda fase de experimentos también analizamos primero las diferencias en contenidos de ácidos grasos entre las mezclas de emulsiones de los tratamientos, y luego comparamos nuestros datos con los resultados obtenidos por otros autores.

**Tabla 42.** Emulsiones ICES HUFA n-3 del Experimentación III.

Tratamientos	Serie 1						Serie 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Emulsiones	%	%	%	%	%	%	%	%	%
50/0.6/C (EE)	100	80	60	40	20	0	60	40	0
30/4/C (TG)	0	20	40	60	80	100	0	0	0
STD (TG)	0	0	0	0	0	0	40	60	100

%%: indica porcentajes de las emulsiones base (50/0.6/C, 30/4/C y STD) en cada tratamiento.

Las mezclas utilizadas en este segundo año contienen las mismas clases de lípidos (TG y EE) del primer año, pero en este segundo año encontramos mayor variedad tanto en contenido como en proporciones de estas dos clases de lípidos (**Tabla 42**). Estos tratamientos se obtuvieron realizando mezclas de las emulsiones base 50/0.6/C, 30/4/C y STD, dando como resultado dos series: una primera serie de concentración decreciente de EE, con ácidos grasos poliinsaturados, y de concentración creciente de TG, con alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, incluye los tratamiento 1 hasta el 6; y otra serie de concentración decreciente de EE, con poliinsaturados, y concentración creciente de TG, con alto contenido de ácidos grasos saturados, incluye los tratamiento 7 hasta el 9. Además, estos dos bloques de tratamientos difieren por la presencia o no de las emulsiones 30/4/C y STD; la primera serie no contiene STD y la segunda serie no presenta 30/4/C.

Al igual que en el primer año, los ácidos grasos se suministraron en forma de TG y EE pero no se discriminaron los contenidos y proporciones de estas dos formas en los perfiles de lípidos obtenidos; sin embargo, es posible determinar indirectamente el efecto de utilizar TG o EE sobre *Artemia* y larvas ya que hay un tratamiento que tiene sólo TG poliinsaturados (6), otro que tiene TG saturados (9) y uno que tiene sólo EE poliinsaturados (1). De tal manera que podemos señalar las tendencias observadas en nuestros experimentos y relacionarlas con los resultados obtenidos por otros autores que han trabajado con HUFA en forma de TG o EE. Hemos encontrado experimentos similares realizados por otros autores con series de emulsiones ICES o emulsiones mezclas de aceites de pescado para enriquecer *Artemia* (Léger *et al.* 1986, Mourente 1989, Izquierdo *et al.* 1992, Dhert y Sorgeloos 1993, Rainuzzo 1993, Watanabe 1993, Takeuchi 1997,

Takeuchi *et al.* 1992 a y b, Støttrup y McEvoy 2003); la mayoría de los autores citados usaron emulsiones homogéneas en forma de TG, EE o PL, mientras que nosotros utilizamos mezclas de emulsiones base con diferentes proporciones de TG y EE.

Sí analizamos los perfiles de ácidos grasos de las 9 mezclas (**Tabla 43**), encontramos que a nivel de HUFA n-3, DHA y EPA existen diferencias significativas entre la mezcla 1 (con HUFA n-3 en forma de EE) y la mayoría de las otras 8 mezclas. Respecto a ARA, sólo se encontró en las emulsiones 3, 4, 6 y 8, existiendo diferencias significativas entre todas las mezclas ( $p < 0.05$ ). Otros autores han realizado experimentos similares utilizando series de emulsiones ICES o emulsiones mezclas de aceites de pescado para enriquecer *Artemia*, en la mayoría de los casos son emulsiones homogéneas en forma de TG, ME, EE o PL (Léger *et al.* 1986, Mourente 1989, Izquierdo *et al.* 1992, Dhert y Sorgeloos 1993, Rainuzzo 1993, Watanabe 1993, Takeuchi 1997, Takeuchi *et al.* 1992 a y b, Støttrup y McEvoy 2003).

### 5.3.2. *Artemia* del segundo año de experimentación.

Al igual que ocurrió en el primer año, encontramos un descenso generalizado en el contenido de DHA con respecto al de sus respectivas emulsiones enriquecidas (**Tabla 43**). Es posible que gran parte de la reducción en el DHA se deba a que fue transformado en EPA por *Artemia*, mientras que los niveles de EPA sólo se redujeron como máximo a la mitad; esta reducción de DHA frente a EPA, ha sido observada por varios autores Mourente 1989, Dhert *et al.* 1993, Watanabe 1993, McEvoy *et al.* 1995 y Navarro *et al.* 1999, que han estudiado el metabolismo de los lípidos en *Artemia*.

En nuestros resultados encontramos que inicialmente la cepa EG no presentó niveles detectables de DHA, pero tras el enriquecimiento, se elevaron los contenidos de DHA de *Artemia* de casi todos los tratamientos, sólo *Artemia* del tratamiento 9 presentó muy bajos niveles de DHA (trazas). Léger *et al.* (1986) y Mourente (1989) encontraron que la mayoría de las cepas de metanauplios de *Artemia* de diverso origen geográfico presentaban diferencias en su valor nutricional pero se caracterizaban por tener muy bajos niveles de DHA (trazas). En este segundo año no observamos diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el contenido de DHA de *Artemia* enriquecida con HUFA n-3 en forma de EE y *Artemia* enriquecida con HUFA n-3 como TG (**Tabla 43**). Izquierdo *et al.* (1992), utilizando emulsiones con HUFA n-3 en forma de EE (85%) obtuvieron concentraciones de DHA (2.9%) cercanas a las que hemos encontramos en *Artemia* enriquecida con EE (tratamiento1); mientras que Rainuzzo *et al.* (1993) incrementaron los niveles de DHA en *Artemia* utilizando emulsiones con HUFA n-3 en forma de EE (29.9%).

En cuanto al EPA (**Tabla 43**), sus concentraciones en *Artemia* también disminuyeron con respecto a los niveles en las emulsiones, pero en menor medida que en el caso del DHA. De acuerdo con el criterio de Léger *et al.* (1986) sobre calidad nutricional de *Artemia* enriquecida, la mayor parte de los tratamientos del presente experimento (1 a

8) produjeron metanauplios de *Artemia* de buena calidad, pues presentan un contenido mínimo del EPA del 4%. En este segundo año, tampoco sería conveniente utilizar el criterio de Mourente (1989) sobre el valor óptimo de la proporción EPA/18:3n-3 en torno a 4, porque al igual que en el primer año obtuvimos valores de esta proporción homogéneamente bajos y esto no nos permite discriminar entre los distintos tratamientos de *Artemia*.

Al analizar la proporción DHA/EPA en *Artemia* de nuestro experimento, observamos valores muy bajos en casi todos los tratamientos (**Tabla 43**). Léger *et al.* (1986) y Mourente (1989) también obtuvieron bajos valores de esta proporción alimentando larvas de dorada con *Artemia* enriquecida con una serie de emulsiones experimentales que contenían HUFA como TG o PL. En vista de esto, y considerando los resultados de Muller-Feuga *et al.* 2003 a y b que indican que es característico de todas las cepas de *Artemia* obtener bajas proporciones de DHA/EPA tras el enriquecimiento debido al metabolismo de *Artemia*; entonces, se debería tener en cuenta la recomendación de estos autores que sugieren que una dieta óptima para metanauplios de *Artemia* debería tener altos niveles de DHA y bajos de EPA. De esta forma, se contrarrestaría la tendencia de *Artemia* a convertir DHA en EPA y se mejoraría la calidad nutricional de *Artemia* para las larvas de dentón. Respecto al ARA, observamos un aumento en las concentraciones en casi todos los tratamientos (aunque desciende ligeramente en los tratamientos 3, 4 y 6); es posible que, al igual que en el primer año, este aumento fuera debido a la acción del **DPA** (22:5n-6) que finalmente se transforma en ARA, como encontraron Navarro *et al.* (1999) y Koven *et al.* (2001) también en *Artemia*.

A nivel de HUFA n-3, encontramos que la *Artemia* enriquecida con HUFA n-3 en forma de EE (tratamiento 1), alcanzó un valor significativamente superior ( $p < 0.05$ ) de estos ácidos grasos con respecto a *Artemia* enriquecida con HUFA n-3 en forma de TG (Tabla 43). Izquierdo *et al.* (1992) utilizando emulsiones con EE (85%) como enriquecedor, obtuvieron un valor similar de HUFA n-3 en *Artemia* aunque enriqueciendo *Artemia* con TG poliinsaturados alcanzaron mayor contenido de HUFA n-3 que en nuestro caso. Rainuzzo (1993) también logró incrementar los niveles de HUFA n-3 en *Artemia*, utilizando emulsiones con EE (81%) frente a *Artemia* enriquecida con emulsiones con TG. Es paradójico que suministrando emulsiones en forma de ésteres simples (como los EE con HUFA n-3) en lugar de emulsiones con TG (también con HUFA n-3), logramos alcanzar mayores concentraciones de TG (HUFA n-3) en *Artemia* (en los dos años de experimentación). Para explicar esto, Navarro *et al.* (1999) y Rainuzzo (1993) han sugerido que cuando *Artemia* es enriquecida con emulsiones de EE puede alcanzar los mayores niveles relativos de TG (con HUFA n-3) porque *Artemia* es capaz de asimilar e incorporar preferencialmente estos ésteres simples en su fracción de TG que cuando es alimentada con emulsiones de TG (también con HUFA n-3).

**En resumen:** *Artemia* del tratamiento 1 (con HUFA n-3 como EE) presenta contenidos significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) de EPA, HUFA n-3 y HUFA total con respecto a la *Artemia* del tratamiento 6 (con HUFA n-3 como TG) y del tratamiento 9 (con TG saturados). Además, observamos un gradiente de concentración de HUFA n-3 en la *Artemia* de los tratamientos  $1 > 6 > 9$ ; esto al parecer obedeció a que las emulsiones con HUFA n-3 en forma de EE permitieron alcanzar mayores contenidos de estos ácidos grasos en *Artemia* que cuando se usan emulsiones con HUFA n-3 en forma de TG (Rainuzzo 1993, Navarro *et al.* 1999), mientras que *Artemia* enriquecida con emulsiones con TG saturados producen una *Artemia* con los más bajos contenidos de EPA y HUFA n-3.

### 5.3.3. Larvas en fase *Artemia* del segundo año.

En la **Tabla 43** resumimos los contenidos de ácidos grasos para emulsiones, *Artemia* y larvas de todos los tratamientos del Experimento III. Respecto a las concentraciones de DHA, en *Artemia* no se encontró la tendencia decreciente en la concentración de DHA de los tratamientos 1 a 9 que se observó antes en las emulsiones, y entre las larvas esta tendencia decreciente en el contenido de DHA sólo se observó en los tratamientos 7 a 9. Además, en las larvas del tratamiento 9 se evidencia claramente su tendencia a conservar el DHA y los HUFA (Rainuzzo 1993, Sargent *et al.* 1993 y Watanabe 1993), pues partiendo de una emulsión con bajo contenido de DHA (0.71%) y también con bajo contenido en *Artemia* (0.19%), finalmente obtenemos larvas con mayor contenido de DHA (3.3%, proveniente principalmente de las reservas de la propia larva) (**Tabla 43**).

Respecto al EPA, Léger *et al.* (1986), observó una relación entre mala calidad de las larvas y bajas concentraciones de EPA ( $< 3\%$ ) en la dieta de metanauplios de *Artemia*. En nuestro experimento encontramos que la *Artemia* del tratamiento 9 presentó un bajo contenido de EPA (2.1%), lo cual se correspondió con una baja calidad de las larvas; así, el peso medio final (0.16 g), la talla media final (2.37 cm), la biomasa total final (1.62 g) y la supervivencia (18.5 %) de las larvas fueron significativamente inferiores ( $p < 0.05$ ) con respecto a las larvas del resto de tratamientos.

Se debe tener en cuenta que la baja calidad de las larvas de este tratamiento (9) no sólo obedece al EPA sino también a las bajas concentraciones de todos los HUFA en el alimento suministrado (*Artemia* enriquecida con TG saturados). Respecto a los contenidos de EPA propios de las larvas, encontramos que estos disminuyeron en todos los tratamientos, salvo en 8 y 9, con relación a los contenidos observados en la *Artemia* de sus respectivos tratamientos. Esto podría obedecer a la tendencia de las larvas a retener más activamente el DHA a expensas del EPA, y parece evidenciarse en que las concentraciones de DHA aumentan en las larvas de todos los tratamientos y en que la proporción DHA/EPA también aumenta con respecto a lo encontrado en *Artemia*. Esta tendencia de las larvas a retener preferencialmente el DHA (Rainuzzo 1993, Sargent *et al.* 1993 y

Watanabe 1993) es contraria a la de *Artemia*, en cuyo metabolismo se retiene el EPA y se transforma activamente el DHA en EPA (Dhert *et al.* 1993, McEvoy *et al.* 1995).

Actualmente existe controversia sobre la conveniencia de utilizar HUFA n-3 de ésteres simples (ME o EE), frente al uso de HUFA n-3 de TG o PL. Al igual que sucedió en el primer año, la utilización de ésteres simples (etilésteres o EE) en el enriquecimiento de *Artemia*, no implicó una disminución clara en la supervivencia o crecimiento de las larvas; así, las larvas del tratamiento 1 que contenían HUFA n-3 en forma de EE alcanzaron una supervivencia (40.1%) similar a la de las larvas que contenían HUFA en forma de TG poliinsaturados en el tratamiento 6 (35.2%). Comparando estos resultados con los obtenidos por otros autores encontramos que: larvas de dorada japonesa (Izquierdo *et al.* 1989 a) y larvas de dorada (Rodríguez *et al.* 1993,1994) alimentadas con rotíferos enriquecidos con ME de HUFA n-3 mostraron alta mortalidad y pobre crecimiento comparados con larvas alimentadas con rotíferos enriquecidos con TG de HUFA n-3; Takeuchi *et al.* (1992 b) también obtuvieron bajo crecimiento y alta mortalidad en larvas de dorada japonesa alimentadas con *Artemia* enriquecida con ME de HUFA n-3. Una reducción del crecimiento también fue observada en trucha arco iris alimentada con una dieta que contenía altos niveles de EE de ácidos grasos n-3 (Castell *et al.* 1972, Yu & Sinnhuber 1976); mientras que, las truchas alimentadas con dieta que contenía más de 5% de TG con ácidos grasos n-3 mostraron un crecimiento óptimo (Yu & Sinnhuber 1976); en cambio, Izquierdo *et al.* (1992) no encontraron grandes diferencias en crecimiento o supervivencia entre larvas de lenguado japonés alimentadas con *Artemia* enriquecida con ME o EE de HUFA n-3 frente a las alimentadas con *Artemia* TG de HUFA n-3; Ibeas *et al.* (2000) trabajando con juveniles de dorada (62 g peso inicial) tampoco encontraron diferencias en términos de crecimiento, mortalidad o en signos externos de anormalidad, entre el grupo de peces alimentado con ME de HUFA n-3 y el grupo alimentado con TG de HUFA n-3 (luego de 8 semanas de alimentación con estas dietas). Ibeas *et al.* (2000) plantean que no están claras las razones por las que se presenten efectos negativos al alimentar larvas de dorada o dorada japonesa con rotífero/*Artemia*, enriquecidos con ME de ácidos grasos, pero que esto ya no suceda en juveniles de dorada; esto podría ser debido a que las larvas son más vulnerables al metanol que los juveniles, este tóxico es producido en rotífero y *Artemia* durante la digestión de los metilésteres; aunque también podría deberse a que estos organismos intermediarios (rotífero/*Artemia*) alteran por medio del metabolismo la forma química de los lípidos que llegan finalmente a las larvas, por ejemplo, Izquierdo (1998) encontró que los rotíferos alimentados con ME de HUFA n-3 acumulan los HUFA n-3 principalmente como ácidos grasos libres, mientras que cuando éstos fueron alimentados con HUFA n-3 en forma de TG, los ácidos grasos fueron esterificados rápidamente dentro de triglicéridos y fosfolípidos: A su vez, los fosfolípidos también son ventajosos porque está demostrado que incrementan la eficiencia de los procesos digestivos en las larvas de los peces (Kanazawa 1993 a, Geurden *et al.* 1995 a y b, Fontagne 1996 y Sargent *et al.* 1999 a y b).

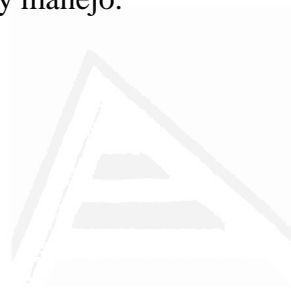
Respecto a DHA/EPA, Tulli y Tibaldi (1997) y Rueda y Martínez (2001) sugirieron que para que las larvas de dentón se desarrollaran adecuadamente durante sus primeras

fases, debía garantizarse en su dieta de ácidos grasos esenciales (AGE) una proporción DHA/EPA mínima de 2/1; Sargent *et al.* (1999 a y b) también encontraron una proporción dietaria óptima semejante para tres especies -lubina, rodaballo y platija- y señalaron que las diferencias en los requerimientos de los AGE entre las especies de peces son reflejo de diferentes adaptaciones dietarias y metabólicas a los hábitats que ocupan, y que su conocimiento permitiría desarrollar mejoras dietéticas para los peces. Sin embargo, en nuestros tratamientos de *Artemia* encontramos que las proporciones DHA/EPA fueron realmente bajas (en un rango entre 1.21 en tratamiento 6 y 0.16 en tratamiento 9) comparándolo con el valor óptimo señalado (**Tabla 43**). Estos bajos valores de DHA/EPA en *Artemia* podrían explicar, en parte, porque no se encontraron grandes variaciones de supervivencia y crecimiento en las larvas de la mayoría de los tratamientos. Sin embargo, las larvas del tratamiento 9, con el mínimo de DHA/EPA (0.16) mostraron también los menores valores de supervivencia y crecimiento, significativamente menores ( $p < 0.05$ ) a los valores encontrados en las larvas del resto de tratamientos.

**Resumen:** Rainuzzo (1993), Sargent *et al.* (1993) y Watanabe (1993) encontraron que las larvas de peces marinos tienden a conservar sus reservas de HUFA y acumular las procedentes de la dieta. Durante los dos años de experimentación, nosotros también observamos la misma tendencia en dentón, es decir las larvas conservan sus reservas de HUFA y retienen las de la dieta mientras que usan los ácidos grasos saturados y monoinsaturados como fuente de energía (Watanabe y Kiron 1994, Tulli y Tibaldi 1997). El ejemplo más claro de conservación de los contenidos de HUFA por las larvas del experimento, lo encontramos en las del tratamiento 9; así, a *Artemia* del tratamiento 9 se le suministró una emulsión carente de DHA, EPA y ARA y niveles muy bajos de HUFA, por lo cual esta *Artemia* presentó niveles muy bajos de DHA, EPA, ARA y HUFA; pero luego observamos mayores contenidos de DHA, EPA, ARA y HUFA en las larvas producto de la conservación de sus reservas (**Tabla 43**). También es conveniente resaltar que se observó un aumento en la concentración de ARA desde las emulsiones hasta sus respectivas larvas (**Tabla 43**), esto es debido a que el ARA es conservado por ser un AGE para las larvas de peces marinos (Navarro *et al.* 1999, Koven *et al.* 2001, Cejas-JR 2005).

Aunque no pretendemos establecer una comparación estricta entre las larvas en fase de alimentación con rotífero y las de la fase de alimentación con *Artemia*, ya que son dos experimentos independientes. Sin embargo podemos observar algunos contrastes: en la fase rotífero, las larvas disponen no sólo de los AGE adquiridos de la dieta sino además de las reservas de AGE del saco y la gota de lípidos que pueden complementar la dieta; mientras que en la fase de alimentación con *Artemia*, las larvas sólo disponen de los AGE suministrados en la dieta ya que las reservas del saco y la gota se han agotado, por lo cual, si la dieta carece de AGE (como en el caso de los tratamientos A y 9) tendrá efectos muy negativos sobre la calidad de las larvas. Otros autores han reconocido el efecto negativo de suministrar alimento vivo (*Artemia*) carente de AGE a las larvas de peces marinos (Sargent *et al.* 1993, 1999 a y b, Watanabe 1982, 1983, 1987 y 1993, Bell *et al.* 1985, Léger *et al.* 1987 y Kanazawa *et al.* 1979).

Con este trabajo, esperamos haber hecho una pequeña contribución al conocimiento del cultivo larvario de dentón. En la actualidad, aún quedan mucho por conocer y muchos problemas por resolver acerca de este y otros aspectos de esta especie: dificultades técnicas en el cultivo larvario especialmente durante el destete y transferencia de tanques, estos problemas son particularmente visibles en los sistemas de cultivo intensivo donde se produce alta mortalidad en hatcheries debidas a alta variabilidad de tallas lo que conlleva canibalismo (JACUMAR 2008, Pavlidis y Milonas 2011); también alta mortalidad en el preengorde, vinculadas con patologías y deficiencias nutricionales (Giménez 2008, Pavlidis y Milonas 2011); y no menos importante, lograr mejorar el ciclo biológico ya que, hasta ahora, los peces nacidos en cautividad tienen dificultades para producir puestas de calidad, por lo que para mantener reproductores fértiles se prefiere recurrir a individuos juveniles o maduros salvajes (Basurco *et al.* 2011). La suma de estas dificultades no han permitido llevar el cultivo a nivel industrial, solucionar estos problemas plantea retos interesantes que a la larga podrían resolverse con investigaciones más profundas sobre su biología y manejo.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Tabla 43. Resumen de datos de los tratamientos del segundo año.

Ácido graso	Cepa EG	Tratamiento 1			Tratamiento 2			Tratamiento 3		
		Emulsión	Artemia	Larvas	Emulsión	Artemia	Larvas	Emulsión	Artemia	Larvas
18:3n-3	2.19	1.16 <sup>a</sup>	1.94 <sup>b</sup>	10.82	0.99 <sup>f</sup>	18.2 <sup>a</sup>	8.31	1.02 <sup>e</sup>	15.8 <sup>a</sup>	8.11
ARA	0.86	0 <sup>f</sup>	1.43 <sup>a</sup>	2.51 <sup>a</sup>	0 <sup>f</sup>	1.56 <sup>a</sup>	2.51 <sup>a</sup>	1.86 <sup>a</sup>	1.66 <sup>a</sup>	2.27 <sup>a</sup>
EPA	0.83	32.7 <sup>a</sup>	17.43 <sup>a</sup>	10.54 <sup>ab</sup>	28.1 <sup>b</sup>	17.48 <sup>a</sup>	12.65 <sup>a</sup>	23.8 <sup>c</sup>	16.86 <sup>a</sup>	11.25 <sup>a</sup>
DHA	0	29.3 <sup>b</sup>	7.18 <sup>ab</sup>	12.27 <sup>ab</sup>	29.5 <sup>a</sup>	6.10 <sup>ab</sup>	11.95 <sup>ab</sup>	29.4 <sup>ab</sup>	9.28 <sup>a</sup>	11.96 <sup>ab</sup>
Saturados	28.5	9.34 <sup>i</sup>	22.5 <sup>bc</sup>	30.52	13.9 <sup>h</sup>	19.9 <sup>bc</sup>	27.33	18.3 <sup>g</sup>	19.5 <sup>c</sup>	28.71
Poliinsaturads	14.8	73.5 <sup>a</sup>	36.7 <sup>bc</sup>	41.25	67.5 <sup>b</sup>	50.7 <sup>a</sup>	40.55	63.0 <sup>c</sup>	50.9 <sup>a</sup>	38.26
HUFA n-3	0.83	63.9 <sup>a</sup>	24.6 <sup>ab</sup>	23.85 <sup>a</sup>	59.5 <sup>b</sup>	23.6 <sup>ab</sup>	25.55 <sup>a</sup>	53.3 <sup>c</sup>	26.2 <sup>a</sup>	24.08 <sup>a</sup>
HUFA totales	2.28	64.9 <sup>a</sup>	26.6 <sup>ab</sup>	26.87 <sup>a</sup>	60.4 <sup>b</sup>	25.6 <sup>abc</sup>	33.96 <sup>a</sup>	55.9 <sup>c</sup>	28.5 <sup>a</sup>	31.71 <sup>a</sup>
DHA/EPA	0	0.90 <sup>g</sup>	0.41 <sup>cd</sup>	1.18 <sup>bc</sup>	1.05 <sup>f</sup>	0.35 <sup>cd</sup>	0.94 <sup>cd</sup>	1.23 <sup>e</sup>	0.53 <sup>bc</sup>	1.08 <sup>bc</sup>
EPA/ARA	0.97	---	12.2	4.19	---	11.2	5.04	12.8	10.2	4.98
EPA/18:3n-3	0.38	28.2	8.98	0.97	28.4	0.96	1.52	23.3	1.07	1.39
Ácido graso	Cepa EG	Tratamiento 4			Tratamiento 5			Tratamiento 6		
		Emulsión	Artemia	Larvas	Emulsión	Artemia	Larvas	Emulsión	Artemia	Larvas
18:3n-3	2.19	1.07 <sup>d</sup>	18.1 <sup>a</sup>	8.45	1.09 <sup>c</sup>	17.5 <sup>a</sup>	7.84	1.11 <sup>b</sup>	16.5 <sup>a</sup>	8.26
ARA	0.86	1.69 <sup>b</sup>	1.51 <sup>a</sup>	2.24 <sup>a</sup>	0 <sup>f</sup>	0.71 <sup>a</sup>	2.33 <sup>a</sup>	1.61 <sup>c</sup>	1.46 <sup>a</sup>	2.57 <sup>a</sup>
EPA	0.83	18.8 <sup>e</sup>	11.99 <sup>b</sup>	10.31 <sup>ab</sup>	13.9 <sup>f</sup>	10.6 <sup>bc</sup>	8.23 <sup>abc</sup>	8.04 <sup>h</sup>	7.78 <sup>c</sup>	6.40 <sup>bc</sup>
DHA	0	27.5 <sup>c</sup>	7.43 <sup>ab</sup>	11.71 <sup>ab</sup>	26.9 <sup>d</sup>	8.15 <sup>ab</sup>	11.82 <sup>ab</sup>	26.9 <sup>d</sup>	9.47 <sup>a</sup>	12.95 <sup>a</sup>
Saturados	28.5	22.7 <sup>f</sup>	21.9 <sup>bc</sup>	27.93	27.2 <sup>e</sup>	22.7 <sup>bc</sup>	29.30	32.6 <sup>d</sup>	23.9 <sup>bc</sup>	28.85
Poliinsaturds	14.8	56.5 <sup>d</sup>	46.5 <sup>ab</sup>	38.67	50.3 <sup>e</sup>	45.6 <sup>ab</sup>	36.54	44.4 <sup>g</sup>	43.4 <sup>ab</sup>	35.72
HUFA n-3	0.83	46.4 <sup>d</sup>	19.4 <sup>bcd</sup>	22.93 <sup>a</sup>	42.6 <sup>e</sup>	19.7 <sup>bcd</sup>	20.80 <sup>a</sup>	35.0 <sup>g</sup>	17.3 <sup>cd</sup>	19.93 <sup>a</sup>
DHA/EPA	0	1.46 <sup>c</sup>	0.63 <sup>bc</sup>	1.14 <sup>bc</sup>	1.92 <sup>b</sup>	0.76 <sup>b</sup>	1.43 <sup>b</sup>	3.35 <sup>a</sup>	1.21 <sup>a</sup>	2.02 <sup>a</sup>
EPA/ARA	0.97	11.2	7.94	4.6	---	14.9	3.53	4.99	5.33	2.5
EPA/18:3n-3	0.38	17.6	0.66	1.22	12.8	0.61	1.05	7.25	0.47	0.77
Ácido graso	Cepa EG	Tratamiento 7			Tratamiento 8			Tratamiento 9		
		Emulsión	Artemia	Larvas	Emulsión	Artemia	Larvas	Emulsión	Artemia	Larvas
18:3n-3	2.19	0.78 <sup>g</sup>	17.3 <sup>a</sup>	9.09	0.65 <sup>h</sup>	17.8 <sup>a</sup>	10.24	0.49 <sup>i</sup>	10.2 <sup>ab</sup>	11.23
ARA	0.86	0 <sup>f</sup>	1.29 <sup>a</sup>	2.03 <sup>a</sup>	0.68 <sup>d</sup>	0.99 <sup>a</sup>	1.86 <sup>a</sup>	0.04 <sup>e</sup>	1.10 <sup>a</sup>	1.71 <sup>a</sup>
EPA	0.83	21.5 <sup>d</sup>	15.67 <sup>a</sup>	12.44 <sup>a</sup>	11.82 <sup>g</sup>	10.62 <sup>bc</sup>	10.68 <sup>ab</sup>	0.62 <sup>i</sup>	2.19 <sup>d</sup>	5.53 <sup>a</sup>
DHA	0	19.0 <sup>e</sup>	6.04 <sup>ab</sup>	8.71 <sup>abc</sup>	10.5 <sup>f</sup>	3.99 <sup>bc</sup>	7.01 <sup>bc</sup>	0.78 <sup>g</sup>	0.19 <sup>c</sup>	3.31 <sup>c</sup>
Saturados	28.5	37.5 <sup>c</sup>	23.3 <sup>bc</sup>	29.27	58.0 <sup>b</sup>	28.6 <sup>b</sup>	30.36	82.2 <sup>a</sup>	43.6 <sup>a</sup>	32.49
Poliinsaturds	14.8	49.1 <sup>f</sup>	48.5 <sup>ab</sup>	38.94	30.1 <sup>h</sup>	42.0 <sup>ab</sup>	37.45	8.0 <sup>i</sup>	24.5 <sup>cd</sup>	32.43
HUFA n-3	0.83	41.8 <sup>f</sup>	21.7 <sup>abc</sup>	22.11 <sup>a</sup>	22.4 <sup>h</sup>	14.6 <sup>d</sup>	18.59 <sup>a</sup>	1.4 <sup>i</sup>	2.38 <sup>e</sup>	9.58 <sup>b</sup>
DHA/EPA	0	0.88 <sup>i</sup>	0.38 <sup>cd</sup>	0.69 <sup>d</sup>	0.89 <sup>h</sup>	0.37 <sup>cd</sup>	0.66 <sup>d</sup>	1.26 <sup>d</sup>	0.16 <sup>de</sup>	0.59 <sup>d</sup>
EPA/ARA	0.97	---	12.1	6.15	17.4	10.7	5.77	15.1	1.99	3.23
EPA/18:3n-3	0.38	25.6	0.91	1.37	18.2	0.59	1.04	1.27	0.21	0.49

Los contenidos de ácidos grasos están dados en porcentaje de área total. Las letras superíndices indican diferencias significativas en los tratamientos.

#### 5.4. DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO IV: EVOLUCIÓN DE LOS PERFILES DE ÁCIDOS GRASOS EN HUEVOS, HUEVOS CON EMBRIÓN Y LARVAS EN FASE ENDOTRÓFICA.

**Argumento:** los huevos de los peces marinos suelen contener todos los nutrientes esenciales requeridos para el desarrollo del embrión y el crecimiento de las larvas hasta el estadio de absorción del saco vitelino, por lo tanto, el análisis de su composición química nos permite conocer los requerimientos nutricionales de las larvas de los peces durante las primeras fases de alimentación externa con presas vivas (Izquierdo y Fernández-Palacios 1997 a, b, Tulli y Tibaldi 1997, Rueda y Martínez 2001, Giménez *et al.* 2006 y Pavlidis y Mylonas 2011). También es útil comparar los perfiles de ácidos grasos de huevos y larvas en fases endotróficas con las larvas en fase de alimentación con rotífero y *Artemia* porque nos permite conocer cómo evolucionan los contenidos y proporciones de ácidos grasos a lo largo del desarrollo larvario; además, en nuestro caso contamos con la ventaja de que los huevos y larvas con las que realizamos todos los experimentos provenían de los mismos reproductores (alimentados con dieta de pescado fresco y calamares). Izquierdo y Fernández-Palacios (1997 a, b), Sargent *et al.* (1995 y 1997), Tulli y Tibaldi (1997), Navarro-Tárrega (1999), Robaina e Izquierdo (2000) y Giménez *et al.* (2006 y 2007) han realizado antes experimentos similares, y se fundamentan en el hecho de que los huevos de una especie determinada (provenientes de reproductores en óptimo estado) suelen tener los perfiles de ácidos grasos adecuados durante la embriogénesis y las primeras fases de su desarrollo larvario. Al final de cuentas, estas técnicas lo que buscan es mejorar la eficacia de las dietas de enriquecimiento vivo, y para evaluar su efectividad nosotros hemos recurrido a los siguientes métodos: a) Determinando parámetros biológicos como supervivencia y crecimiento de las larvas. b) Estudiando la evolución de los perfiles de ácidos grasos desde los enriquecedores (emulsiones), alimento enriquecido (rotífero y *Artemia*) y larvas; estos dos métodos de análisis han sido extensamente utilizados en nutrición de peces marinos por autores como Watanabe (1983, 1984 a, b, c y 1985), Léger *et al.* (1986), Riera *et al.* (1993), Watanabe y Kiron (1994), Izquierdo y Fernández-Palacios (1997 a, b), Rainuzzo (1993 y 1997), Takeuchi (1997), Tocher *et al.* (1997), Mourente (1989 y 1999), Navarro-Tárrega (1999), Sargent *et al.* (1995 y 1999 a, b), Abellán (2000 a y b), Guillaume *et al.* (2001), Sorgeloos *et al.* (1993, 1998 y 2001), Støttrup y McEvoy (2003), Giménez *et al.* (2006), JACUMAR (2008), Basurco *et al.* (2011), Pavlidis y Milonas (2011).

##### 5.4.1. Huevo, huevo embrionado y larvas endotróficas.

Los ácidos grasos más abundantes en los huevos de dentón fueron: 16:0 (23.8%), 18: 1n-9 (16.3%), 22:6n-3 (27.8%), 16:1n-7 (6.1%) y 20: 5n-3 (5.48%), datos similares a los encontrados en dorada por Mourente y Odriozola (1990 a) y García-Alcázar (1998), y en otras especies como dorada japonesa (Kimata 1983, Watanabe *et al.* 1984 a, b, c, d y 1985 a, b), rodaballo (Barton 1981), y platija (Falk-Petersen *et al.* 1986). Los niveles de HUFA totales y HUFA n-3 suelen ser muy altos en huevos de dentón (35.1% y 33.88%

respectivamente) y semejantes a los encontrados por García-Alcázar (1998) en huevos de dorada. En dentón la relación n3/n6 en los huevos fue de 13.1, es decir más del doble de la que se presentó en huevos de dorada (6.1) provenientes de reproductores alimentados con dieta fresca (García-Alcázar 1998). Según Rueda y Martínez (2001) durante las primeras fases del desarrollo larvario de dentón, la proporción DHA/EPA de la dieta debería estar en torno a 2/1 para garantizar un aporte adecuado de ácidos grasos para su rápido desarrollo; mientras que según Giménez *et al.* (2007) en esta primera fase de desarrollo de las larvas, el valor de la proporción DHA/EPA en el alimento vivo debería ser más alta ( $> 5$ ). Si tenemos en cuenta este criterio en nuestros experimentos encontramos que en todas las etapas endotróficas (huevos, huevos embrionados, larvas eclosionadas y larvas a la apertura de la boca; **Tabla 39**), las reservas internas superan la proporción DHA/EPA de 2/1 sugerida por Rueda y Martínez (2001), ubicándose en un rango entre 5 y 7.6%. La relación DHA/EPA en huevos de dentón fue de 5.14, es decir similar a la obtenida por Giménez *et al.* (2006) de 5.6 en dentón, y superior a la obtenida por Tulli y Tibaldi (1997) de 2.9 también en dentón y por García-Alcázar (1998) de 3.65 y Rodríguez *et al.* (1993) de 1.89 en huevos de dorada. Si observamos en conjunto los contenidos y proporciones de ácidos grasos de las cuatro periodos endotróficos (huevo, huevo embrionado, larvas eclosionadas y larvas en apertura de la boca) encontramos altos contenidos de DHA, saturados, monoinsaturados, poliinsaturados, HUFA n-3 y elevados valores de las proporciones DHA/EPA. Giménez *et al.* (2006 y 2007) también encontraron valores comparables en estos mismos tipos de ácidos grasos durante los periodos endotróficos del dentón.

#### 5.4.2. Comparación entre los perfiles de ácidos grasos de huevos y larvas endotróficas con los de las larvas en fase rotífero.

En la **tabla 39** comparamos los perfiles de ácidos grasos de huevos y larvas endotróficas con los de larvas alimentadas con rotífero enriquecido (con microalgas y P-S). Recordamos que el análisis de los perfiles de ácidos grasos de las fases endotróficas nos permiten aproximarnos a los requerimientos nutricionales en ácidos grasos de las larvas de dentón durante las primeras fases de alimentación externa con presas vivas (Izquierdo y Fernández-Palacios 1997 a, b, Tulli y Tibaldi 1997, Rueda y Martínez 2001, Giménez *et al.* 2006 y Pavlidis y Mylonas 2011); y en consecuencia, nos permitiría saber cuáles de los tratamientos de enriquecimiento de rotífero utilizados se aproxima más a los perfiles de ácidos grasos de huevos y larvas endotróficas, y en último término nos podría sugerir cómo mejorar la calidad del alimento suministrado a las larvas. Basándonos en estos criterios, encontramos que desde huevos a larvas en fase rotífero disminuyó drásticamente la concentración de DHA y la proporción EPA/ARA en todos los tratamientos; también disminuyeron (aunque en menor medida) las concentraciones de HUFA total, HUFA n-3 y la proporción DHA/EPA (excepto en larvas del tratamiento con P-S que mantuvieron valores semejantes a los de huevos en casi todos parámetros señalados). Sí observamos con más detalle, encontramos que en larvas de dentón el porcentaje de DHA descendió ampliamente desde el contenido inicial en los huevos (una media de 27.8%) hasta el conservado aun en larvas fase rotífero (con un contenido mínimo en el tratamiento larvas – *N. gaditana* de 14% y una cantidad máxima en el tratamiento larvas – P-S de 25.2%). Respecto a EPA encontramos un aumentó en las larvas de casi todos los tratamientos con respecto a los contenidos en los huevos y larvas endotróficas (menos en larvas – *N. gaditana* y larvas – *I. galbana*). Tulli y Tibaldi (1997) que trabajaron también con larvas de dentón alimentadas con rotífero – P-S encontraron reducción en contenido de DHA y en la proporción DHA/EPA (en larvas de dentón de 12 días), mientras que los niveles de EPA y ARA no mostraron cambios significativos después de la eclosión. Koven *et al.* (2001) trabajando con larvas de dorada, encontraron que el ARA era retenido activamente frente al DHA y EPA, lo cual revela la importancia de este AGE en el desarrollo larvario.

Las larvas alimentadas con rotífero enriquecido con *I. galbana* y P-S fueron las que presentaron los perfiles de ácidos grasos más cercano a los de los huevos y larvas endotróficas. Se observó como gran diferencia que en larvas – *I. galbana* descendió la concentración de DHA (a 19.3%, es decir, un poco más de la mitad de la concentración encontrada en huevos y larvas endotróficas) y no obstante la proporción DHA/EPA no descendió en larvas – *I. galbana* (5.3%) ya que la concentración de EPA también descendió (3.7%) con respecto a huevos y larvas endotróficas. Sin embargo, la mayor concentración de DHA en larvas – P-S sólo significó mejora en algunos parámetro de calidad de las larvas pero no en supervivencia. Esto nos permite resaltar nuevamente el efecto beneficioso que hemos obtenido al utilizar microalgas tanto para enriquecer rotífero como para los tanques de cultivo larvario (Mourente *et al.* 1993, Tulli y Tibaldi 1997, Navarro *et al.* 1999 y Koven *et al.* 2001).

**Tabla 39.** Comparación entre los perfiles\* de huevos y larvas endotróficas con los de larvas en fase Rotífero.

Ácido graso	Huevos	Huevos en Embrión	Larvas en Eclosión	Larvas en Apertura de boca	Larvas Chlorella	Larvas N. gaditana	Larvas T. suecica	Larvas I. galbana	Larvas P-S
18:2n-6	1.1	1.43	1.1	1.29	8.6	9.9	8.4	7.6	5.2
18:3n-3	0.42	0.56	0.41	0.27	8.8	8.2	4.0	1.2	3.2
ARA	1	1.1	1.9	2.48	4.3	4.1	5.2	3.7	3.5
EPA	5.46	5.15	4.97	4.35	5.7	4.4	6.6	3.7	5.6
DHA	27.8	26.38	27.2	32.6	16.7	14	16.5	19.3	25.2
Saturados	32.13	32.24	34.6	40.48	26.9	27.5	27.8	17.2	26.6
Monoinsaturds	30.85	31.12	28.13	23.3	21.6	24.8	23.1	28.0	22.6
Poliinsaturds	37	36.16	37.22	42.18	51.4	47.6	49.1	44.7	50.7
HUFA total	35.1	33.47	35.1	40.1	30.5	26.4	33.0	31.7	38.9
HUFA n-3	33.8	32.18	32.3	37	23.6	19.6	24.5	24.4	32.3
DHA/EPA	5.14	5.15	5.55	7.58	2.9	3.2	2.5	5.3	4.4
EPA/ARA	5.46	4.68	2.62	1.75	1.3	1.1	1.3	1.0	1.6
EPA/18:3n-3	1.3	9.19	12.1	16.1	0.65	0.54	1.6	3.0	1.8

\*: Los contenidos de ácidos grasos se expresaron como porcentaje de área total.

5.4.3. Comparación entre los perfiles de ácidos grasos de huevos y larvas endotróficas y los de las larvas en fase Artemia.

#### 5.4.3.1. Procesos metabólicos antagónicos de Artemia frente a larvas.

Puesto que en este apartado pretendemos comparar las larvas de una serie de tratamientos de *Artemia* enriquecida con las fases endotróficas de larvas debemos tener en cuenta estos procesos antagónicos que pueden modificar las concentraciones y proporciones de AGE (especialmente del DHA y EPA). El primer proceso ocurre en nauplios y adultos de *Artemia* y consiste en que este crustáceo tiende a modificar la composición de ácidos grasos de la dieta en función del consumo metabólico y del tiempo transcurrido desde el enriquecimiento (Hichcliffe y Riley 1972), especialmente la composición y proporción de DHA y EPA (Dhert *et al.* 1993, McEvoy *et al.* 1995, Navarro *et al.* 1999). El segundo proceso ocurre en las larvas de peces marinos, incluida la especie en estudio, estas tienden a conservar sus reservas de HUFA y a acumular los nuevos HUFA introducidos en la dieta, ya que estos ácidos grasos son esenciales para su crecimiento, mediante la formación del sistema de membranas, y desarrollo del sistema nervioso, tejido nervioso y retina (Rainuzzo 1993, Sargent *et al.* 1993 y Watanabe 1993). Además, en dentón como en otras especies de peces marinos, se producen cambios en cantidad y proporción de los AGE observados desde el huevo y a lo largo de todo el cultivo larvario. Así, el contenido de DHA presente en larvas de dentón 1 día de edad fue luego

marcadamente reducido entre las larvas de 12 y 30 días, mientras que los niveles de EPA y ARA no mostraron variaciones significativas después de la eclosión (Tulli y Tibaldi, 1997).

Por último, debemos tener en cuenta que algunos autores (Izquierdo 1988 y Rodríguez 1994) encontraron que la utilización de ME como fuente de enriquecimiento de presas vivas conlleva un aumento de la mortalidad en larvas de peces marinos, por tal razón también debemos evaluar el comportamiento de las larvas de dentón en este aspecto, puesto que en varios de los experimentos del primer y segundo año utilizamos la emulsión base ICES 50/0.6/C que contenía HUFA n-3 en forma de otro éster simple, el EE.

5.4.3.2. Comparación entre los perfiles de ácidos grasos de huevos y larvas en fases endotróficas con las larvas en fase *Artemia* del primer año.

Antes de realizar cualquier comparación entre las fases endotróficas y las larvas en fase de alimentación con *Artemia* (tanto para el primer como para el segundo año de experimentación con *Artemia*), debemos señalar que ambos bloques de datos (endotrófico y *Artemia*) han sido tratados como estadísticamente independientes; por lo tanto, al compararlos no podemos inferir diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los bloques, sólo podemos indicar la posibilidad de que existan diferencias o concordancias que deberán ser evaluadas en posteriores estudios.

En la **Tabla 44** confrontamos perfiles de ácidos grasos de huevos y larvas en fase endotrófica con los perfiles de larvas en fase de alimentación con *Artemia* de los diferentes tratamientos del primer año.

**Tabla 44.** Comparación entre los perfiles de ácidos graso\* de las fases endotróficas con los de las larvas en fase *Artemia* del primer año.

Ácido graso	Huevos		Larvas		Larvas A	Larvas B	Larvas C	Larvas D
	Inicio	En embrión	En eclosión	Apertura de boca				
<b>18:3n-3</b>	0.42	0.56	0.41	0.27	13.3	9.8	7.7	7.8
<b>ARA</b>	1	1.1	1.9	2.48	3.6	4.7	4.3	3.8
<b>EPA</b>	5.4	5.015	4.97	4.35	3.1	6.3	6.5	10.8
<b>DHA</b>	27.8	26.38	27.2	32.6	4.3	12.4	11.1	10.8
<b>Saturados</b>	32.13	32.24	34.6	40.48	26.8	26.7	29.1	27.5
<b>Monoinsat.</b>	30.85	31.12	28.13	23.29	32.0	28.3	26.6	26.2
<b>Poliinsat.</b>	37	36.16	37.22	42.18	41.1	44.9	44.3	46.3
<b>HUFA</b>	35.1	33.47	35.1	40.1	14.2	27.1	25.2	30.3
<b>HUFA n-3</b>	33.8	32.18	32.3	37	8.1	19.9	18.8	24.2
<b>n3/n6</b>	13.1	9.94	7.65	7.98	1.39	2.25	1.82	2.76
<b>DHA/EPA</b>	5.1	5.15	5.55	7.58	1.4	1.5	1.97	1.0
<b>EPA/ARA</b>	5.46	4.68	2.62	1.75	0.89	1.5	1.3	2.8
<b>EPA/18:3n-3</b>	13	9.19	12.1	16.1	0.24	0.67	0.82	1.4

\*: los contenidos de ácidos grasos representan porcentaje de área total.

Recordamos que la comparación entre los perfiles de ácidos de ácidos grasos de los huevos y larvas endotróficas con las larvas en fase de alimentación con rotífero y *Artemia* nos permite conocer la evolución de los perfiles de ácidos grasos a lo largo del desarrollo; y en este caso nos permitiría saber cuáles tratamientos de enriquecimiento de *Artemia* serían más adecuados para las larvas (Izquierdo y Fernández-Palacios 1997 a, b, Tulli y Tibaldi 1997, Rueda y Martínez 2001 y Giménez *et al.* 2007). De acuerdo con este criterio y en términos generales podemos decir que la concentración de DHA, HUFA total, HUFA n-3 y la proporción DHA/EPA disminuyó drásticamente desde los huevos hasta las larvas en fase de alimentación con *Artemia* en todos los tratamientos (**Tabla 44**).

Así, encontramos que en larvas de dentón, el porcentaje de DHA descendió ampliamente desde el contenido inicial en los huevos hasta el conservado aun en larvas en fase *Artemia*. Por el contrario, la concentración de EPA aumentó en las larvas de los tratamientos del primer año con respecto a los contenidos en huevos y larvas endotróficas, a excepción de las larvas del tratamiento A, con lo cual la proporción DHA/EPA también disminuyó drásticamente; Giménez *et al.* (2007) también encontraron drásticas reducciones en DHA y la proporción DHA/EPA durante la evolución de huevos a larvas de dentón (de hasta 40 dph). HUFA también disminuyó en las larvas de los tratamientos

de *Artemia* con respecto a los contenidos en huevos y larvas endotróficas. Al contrario que en DHA y HUFA, el porcentaje de ARA aumentó en larvas en fase *Artemia* con relación a las fases endotróficas; Koven *et al.* (2001), trabajando con larvas de dorada en fase *Artemia* obtuvieron una concentración máxima de ARA de 2.8%, y lograron mejorar la supervivencia y resistencia al estrés por manejo en las larvas de dorada de 35 dph al utilizar una dieta rica en ARA y con una proporción DHA/ARA de 2.7; este aumento en la concentración de ARA pudo ser debido, como encontraron Koven *et al.* (2001) a la conversión de un intermediario (DPA) en ARA a partir de un precursor (18:2n-6).

Mientras que en la fase endotrófica las concentraciones de los AGE (DHA, EPA y ARA) tienden a mantenerse estables, lo cual es similar a lo encontrado por Tulli y Tibaldi (1997) y Giménez *et al.* (2007) también en dentón; en la fase *Artemia*, las concentraciones de EPA y ARA aumentan pero el contenido de DHA y el valor de la proporción DHA/EPA disminuyeron en las larvas de todos los tratamientos (**Tabla 44**). La gradual reducción en estos dos últimos parámetros que sucede entre las fases de alimentación con rotífero y *Artemia*, parece ser debida a que las larvas consumen gran cantidad del DHA para sus procesos de activa organogénesis durante las primeras etapas de desarrollo de las larvas hasta el inicio de la metamorfosis (Giménez *et al.* 2007). Sin embargo, también debemos recordar que *Artemia* tiene la tendencia a catabolizar el DHA suministrado y/o convertirlo en EPA (Dhert *et al.* 1993, McEvoy *et al.* 1995, Navarro *et al.* 1999).

Las larvas del tratamiento C fueron las que presentaron un perfil de ácidos grasos más cercano a los perfiles de ácidos grasos de los huevos y larvas endotróficas (**Tabla 44**). Sin embargo, se observó como gran diferencia, el descenso en la concentración de DHA, hasta poco menos de la mitad de la concentración encontrada en huevos y larvas endotróficas; y como consecuencia, también la proporción DHA/EPA de estas larvas descendió con respecto a las de las fases endotróficas. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Tulli y Tibaldi (1997) en huevos y larvas endotróficas de dentón. Los resultados de este primer año eran de esperar y concuerdan con la información obtenida por Navarro *et al.* (1999) y Koven *et al.* (2001) en dorada, ellos encontraron que la concentración de DHA descendía pero que las de EPA y ARA se mantenían o incluso aumentaban. Finalmente podemos decir, según lo observado, que nuestros tratamientos requieren ajustes para acercarse a los perfiles de huevos y larvas endotróficas, pero de todas formas su análisis fue útil para evaluarlos y buscar mejorarlos en futuros ensayos.

En cuanto a la utilización de EE, encontramos que las larvas del tratamiento D tienen una concentración de HUFA totales comparable a los de huevos y larvas endotróficas, aunque una más alta concentración de EPA y una más baja proporción de DHA/EPA. Y con respecto a los parámetros biométricos, debemos recordar que en estas larvas D (a las que se les suministró EE) no se presentó disminución en supervivencia y crecimiento con respecto a las larvas de los tratamientos B y C (con TG); es posible que estos hechos se deban, al menos en parte, a la utilización de EE, un éster simple que no produce metabolitos tóxicos, en lugar de ME, que produce metanol y sus derivados (Ibeas *et al.* 2000).



5.4.3.3. Comparación entre los perfiles de ácidos grasos de los huevos y larvas en fases endotróficas con los perfiles de larvas en fase *Artemia* del segundo año.

En la **Tabla 45** confrontamos la información referente a los perfiles de ácidos grasos de las fases endotróficas con los perfiles de las larvas de los diferentes tratamientos de enriquecimiento de *Artemia* del segundo año (no se incluyeron los tratamientos 3,4 y 8 porque no presentan grandes variaciones con respecto a los tratamientos incluidos 1, 2, 5, 6, 7 y 9).

Al comparar los contenidos de ácidos grasos de los huevos y las larvas en fases endotróficas, encontramos que disminuyen las concentraciones de DHA, HUFA, HUFA n-3 y la proporción DHA/EPA en las larvas de los tratamientos de *Artemia* con respecto a los contenidos encontrados en las fases endotróficas, mientras que aumentaron las contenidos de EPA y ARA en estas mismas larvas alimentadas con *Artemia* (**Tabla 45**).

Es decir, que mientras en la fase endotrófica las concentraciones de los AGE (DHA, EPA y ARA) tienden a mantenerse estables, tal y como encontraron Tulli y Tibaldi (1997) y Giménez *et al.* (2007), en las larvas en fase de alimentación con *Artemia* de este segundo año, las concentraciones de EPA y ARA aumentaron pero el contenido de DHA disminuyó, siguiendo la misma tendencia observada en el primer año. Esta disminución drástica en los contenidos de DHA y en el valor de la proporción DHA/EPA parece obedecer, como ya se explicó durante el primer año, a que las larvas emplean activamente el DHA en sus procesos de organogénesis que ocurren principalmente antes de la metamorfosis (Giménez *et al.* 2007). También hay que tener en cuenta la tendencia de *Artemia* a catabolizar el DHA suministrado y/o convertirlo en EPA (Dher *et al.* 1993, McEvoy *et al.* 1995, Navarro *et al.* 1999). Por último, el aumento en la concentración de ARA en larvas pudo ser debido, tal como encontraron Koven *et al.* 2001, a la conversión de un intermediario (DPA) en ARA a partir de un precursor (18:2n-6), un fenómeno que ocurre en el metabolismo normal de *Artemia*.

En cuanto a los perfiles de ácidos grasos en larvas, observamos que cuando utilizamos EE en el alimento, tratamiento 1, encontramos más bajas concentraciones de HUFA total, HUFA n-3 y proporción DHA/EPA y más alta concentración de EPA con respecto a las fases endotróficas. Las larvas de este tratamiento también alcanzaron la mayor concentración de poliinsaturados no sólo con respecto al resto de larvas de los tratamientos de *Artemia* sino también con respecto a las fases endotróficas (Tabla 45).

Respecto a los parámetros biométricos de estas larvas a las que se les suministró HUFA n-3 en forma de EE, no se observó disminución en crecimiento y supervivencia con respecto a las larvas a las que se les dio HUFA n-3 en forma de TG (tratamientos 2 a 6). Es posible que en este caso no sea relevante la utilización de HUFA en forma de EE o TG en la dieta de las larvas de dentón debido, posiblemente, a que los HUFA de EE no

producen metabolitos tóxicos como si ocurre cuando se utiliza ME que produce metanol y sus derivados (Ibeas *et al.* 2000).

**Tabla 45.** Comparación entre los perfiles de ácidos grasos\* de huevos y larvas de las fases endotróficas con los de larvas en fase *Artemia* del segundo año.

	Huevos		Larvas		Larvas 1	Larvas 2	Larvas 5	Larvas 6	Larvas 7	Larvas 9
	Inicio	En Embrión	En eclosión	Apertura De boca						
18: 3n-3	0.42	0.56	0.41	0.27	10.82	8.31	7.84	8.26	9.09	11.23
ARA	1	1.1	1.9	2.48	2.51	2.51	2.33	2.57	2.02	1.71
EPA	5,4	5,15	4,97	4,35	10.54	12.65	8.23	6.4	12.44	5.53
DHA	27,8	26,38	27,3	32,65	12.27	11.95	11.82	12.95	8.71	3.31
Saturads	32.13	32.24	34.6	40.48	30.52	27.3	29.3	28.8	29.27	32.49
Monoinsat.	30.85	31.12	28.13	23.29	23.39	25.9	29.9	28.5	31.4	20.35
Poliinsat.	37	36.16	37.22	42.18	41.25	40.5	36.54	35.72	38.94	32.4
HUFA total	35.1	33,47	35.1	40.1	26.87	33.96	29.9	28.55	31.41	20.36
HUFA n-3	33,8	32,18	32,3	37	23,85	25,55	20,8	19,93	22,11	9,58
DHA/EPA	5,1	5,15	5,55	7,58	1.18	0.94	1,43	2,0	0,69	0,59
EPA/ARA	5.46	4.68	2,62	1,75	4.19	5.04	3.53	2.5	6.15	3.23
EPA/18: 3n-3	13	9.19	12,12	16,1	0.97	1.52	1.05	0.77	1.37	0.49

\*: los contenidos de ácidos grasos indican porcentajes de área total.

**Resumen:** Rainuzzo (1993), Sargent *et al.* (1993) y Watanabe (1993) encontraron que las larvas de peces marinos tienden a conservar sus reservas de HUFA y acumular las procedentes de la dieta. Durante los dos años de experimentación, nosotros también observamos la misma tendencia en dentón, es decir las larvas conservan sus reservas de HUFA y retienen las de la dieta mientras que usan los ácidos grasos saturados y monoinsaturados como fuente de energía (Watanabe y Kiron 1994, Tulli y Tibaldi 1997). El ejemplo más claro de conservación de los contenidos de HUFA por las larvas del experimento, lo encontramos en las larvas de los tratamiento A y 9; así, a la *Artemia* para estos dos tratamientos se les suministró una emulsión carente de DHA, EPA y ARA y niveles muy bajos de HUFA, por lo cual esta *Artemia* presentó niveles muy bajos de DHA, EPA, ARA y HUFA; sin embargo, las larvas de estos dos tratamientos presentaron mayores contenidos de DHA, EPA, ARA y HUFA producto de la conservación de sus reservas (**Tabla 43**). También es conveniente resaltar que se observó aumento en las concentraciones de ARA desde las emulsiones hasta sus respectivas larvas (**Tabla 43**), esto es debido a que el ARA es conservado por ser un AGE para las larvas de peces marinos (Navarro *et al.* 1999, Koven *et al.* 2001, Cejas-JR 2005).

Cuando comparamos los perfiles de ácidos grasos de las larvas en fase de alimentación con rotífero con los perfiles de las larvas en fase de alimentación con *Artemia*, aunque aclaramos que los consideramos como dos experimentos estadísticamente independientes, observamos algunos contrastes: en la fase rotífero, las larvas disponen no sólo de los AGE adquiridos de la dieta sino además de las reservas de AGE del saco y la gota de lípidos que pueden complementar la dieta; mientras que en la fase de alimentación con *Artemia*, las larvas sólo disponen de los AGE suministrados en la dieta ya que las reservas del saco y la gota se han agotado, por lo cual, si la dieta carece de AGE (como en el caso de los tratamientos A y 9) tendrá efectos muy negativos sobre la calidad de las larvas. Otros autores han reconocido el efecto negativo de suministrar alimento vivo (*Artemia*) carente de AGE a las larvas de peces marinos (Sargent *et al.* 1993, 1999 a y b, Watanabe 1982, 1983, 1987 y 1993, Bell *et al.* 1985, Léger *et al.* 1987 y Kanazawa *et al.* 1979).

Finalmente, es relevante tener en cuenta que en los huevos y larvas endotróficas encontramos altos contenidos de DHA y elevados valores en la proporción DHA/EPA, mientras que posteriormente cuando se inician las etapas de alimentación externa (con rotífero y *Artemia*) se produce un descenso gradual en los contenidos de DHA y en el valor de la proporción DHA/EPA en las larvas; por el contrario, los contenidos de EPA y ARA permanecen más estables.

Con este trabajo, esperamos haber hecho una pequeña contribución al conocimiento del cultivo larvario de dentón. En la actualidad, aún quedan mucho por conocer y muchos problemas por resolver acerca de este y otros aspectos de esta especie: dificultades técnicas en el cultivo larvario especialmente durante el destete y transferencia de tanques, estos problemas son particularmente visibles en los sistemas de cultivo intensivo donde se produce alta mortalidad en hatcheries debidas a alta variabilidad de tallas lo que conlleva canibalismo (Giménez *et al.* 2006 y 2007, JACUMAR 2008, Pavlidis y Milonas 2011, Abellán y Arnal 2013); también alta mortalidad en el preengorde, vinculadas con patologías y deficiencias nutricionales (Giménez 2008, Pavlidis y Milonas 2011, Abellán y Arnal 2013); y no menos importante, lograr mejorar el ciclo biológico ya que, hasta ahora, los peces nacidos en cautividad tienen dificultades para producir puestas de calidad, por lo que para mantener reproductores fértiles se prefiere recurrir a individuos juveniles o maduros salvajes (Basurco *et al.* 2011). La suma de estas dificultades no han permitido llevar el cultivo a nivel industrial, solucionar estos problemas plantea retos interesantes que a la larga podrían resolverse con investigaciones más profundas sobre su biología y manejo.

## 6. CONCLUSIONES

1. Entre las especies de microalgas utilizadas, *Isochrysis galbana* con alto contenido en DHA (5.9%) y un elevado valor de la proporción DHA/EPA (15) fue la opción más adecuadas para enriquecer el rotífero que servía como alimento a las larvas de dentón (hasta los 22 dph). El uso de *Isochrysis galbana* como enriquecedor de rotífero se vio reflejado en mayores tasas de biomasa y supervivencia final en las larvas de dentón.
2. Protein-Selco, utilizado como enriquecedor comercial de rotífero disponía de alto contenido de DHA (23.5) y una elevada proporción EPA/ARA (11.4), y esto promovió el mayor crecimiento en peso y talla de las larvas. Sin embargo, no produjo una mejora significativa en inflación de vejiga, biomasa y supervivencia final de las larvas de dentón.
3. Durante la primera fase de alimentación de las larvas de dentón con rotífero, es más conveniente la utilización de microalgas para enriquecer rotífero y para adicionarlo a los tanques de cultivo larvario, frente al uso de enriquecedores artificiales como el Protein-Selco, porque esto se refleja en mayores tasas de biomasa y supervivencia final en las larvas de dentón.
4. El rotífero y la *Artemia* reflejan en sus contenidos los perfiles de ácidos grasos de las dietas con las que son enriquecidos. Sin embargo, debido a que estos organismos son capaces de transformar activamente el DHA en EPA, a través de su metabolismo normal, es conveniente utilizar enriquecedores que dispongan de muy altos contenidos DHA y una elevada proporción DHA/EPA para compensar esta tendencia.
5. Las larvas de dentón reflejan en sus contenidos de ácidos grasos los perfiles de ácidos grasos del rotífero o la *Artemia* de los cuales se alimentaron. Sin embargo, las larvas de dentón son capaces de modificar las proporciones de ácidos grasos esenciales reteniendo activamente el DHA y el ARA.
6. El uso de dietas con bajos contenidos de DHA, EPA y un bajo valor de la proporción DHA/EPA en fase de alimentación con *Artemia*, produce efectos negativos sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas lo cual indica su valor como ácidos grasos esenciales.
7. La utilización de HUFA n-3 en forma de triglicéridos o de etilésteres no influyó sobre el crecimiento (en talla, peso y biomasa) de las larvas en fase de alimentación con *Artemia*, aunque si se observaron diferencias a nivel de supervivencia.

8. En las larvas de dentón en fase de alimentación con rotífero y *Artemia* se mantiene estables las reservas de ARA, lo cual indica su valor como ácido graso esencial. Mientras que durante el desarrollo endotrófico encontramos contenidos más bajos de ARA con respecto a estas dos fases de alimentación externa.
9. Los contenidos y proporciones de ácidos grasos de huevos y larvas endotróficas permanecen estables a lo largo de todo el periodo de puesta, lo cual indica que los reproductores mantuvieron homogeneidad en el suministro a huevos y larvas de dichos contenidos. Sin embargo, se observaron cambios en los parámetros biológicos de calidad del huevo a lo largo de este periodo.
10. Analizando las fases endotróficas, encontramos que las larvas en fase de apertura de la boca tiene contenidos significativamente mayores de DHA, ARA, saturados, poliinsaturados, HUFA n-3, HUFA n-6 y de la proporción DHA/EPA con respecto a las otras tres fases endotróficas (huevo, huevo embrionado y larvas en eclosión).
11. Durante el desarrollo de los estadios endotróficos (huevo, huevo embrionado, larvas eclosionadas y larvas con apertura de la boca) se mantienen altos contenidos de DHA (26 – 32%) y elevadas proporciones DHA/EPA (5 – 7). Mientras que estos contenidos de DHA y la proporción DHA/EPA van descendiendo gradualmente en las larvas en fase de alimentación con rotífero y *Artemia*.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ABELLÁN E. 2000 a.** Desarrollo de técnicas específicas y estrategias nutricionales para el cultivo integral del dentón (*Dentex dentex L.*). Memoria del Proyecto de Investigación y Desarrollo Tecnológico del IEO, 50 p.
- ABELLÁN E. 2000 b.** Cultivo del dentón (*Dentex dentex L.*). Situación actual, problemas y perspectivas. In: Recent advances in mediterranean aquaculture finfish species diversification. *Options Mediter. Serie Cahiers*. Vol. 47: 1022-1379. CIHEAM/FAO – Zaragoza.
- ABELLÁN E., GARCÍA-ALCÁZAR A., ARIZCUN M., DELGADO J. y MARTÍN P. 1997.** Experiencias preliminares sobre reproducción y cultivo de dentón (*Dentex dentex L.*). En: *Actas VI Congreso Nal. de Acuicult.* J. De Costa, E. Abellán E, B. García, A. Ortega, and S. Zamora (Eds.) Vol. 4: 477– 482, Cartagena.
- ABELLÁN E., ARIZCUN M. y GARCÍA-ALCÁZAR A. 2007.** Influencia de la alimentación de los reproductores sobre la calidad de la puesta de dentón (*Dentex dentex L.*). En: XI Congreso Nacional de Acuicultura. Cultivando el futuro. Cerviño-Eiroa A., Guerra-Díaz A. y Pérez-Acosta C. (Eds.). Libro de Actas – Tomo II: 1217-1220 pp.
- ABELLÁN E., ARNAL-ATARÉS I. (Coordinadores) 2013.** Diversificación de especies en la piscicultura marina española. Publicaciones científicas y técnicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid (Copia en PDF).
- ACKMAN R.G. and RATNAYAKE W.N. 1989.** Fish oils, sea oils, esters and acids are all forms of Omega-3 intake equal? In: Health effect of fish and fish oils, Chandra R.K. (Ed.), 373-393 pp. ARTS Biomedical, Newfoundland, Canada.
- ALARCÓN F.J. 1998.** Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids. Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex L.*), *Fish Physiol. And Biochem.* 19: 257-267.
- ALARCÓN F.J. y MARTÍNEZ M.I. 1998.** Fisiología de la digestión en larvas de peces marinos y su aplicación al Cultivo larvario en masa. En: *Revista AquaTic*. No 5: 12. Universidad de Zaragoza.
- ALLIOT E., PATOUREAUD A. and TRELLE J. 1977.** Evolution des activités enzymatiques dans le tractus digestif au cours de la vie larvaire du bar (*Dicentrarchus labrax*). Variations des protéinogrames et des zymogrammes. *Act. Colloques* 4: 85-91.

- AMAT-DOMÈNECH F. 1993.** Producción de Zooplancton. En *Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la reproducción*, Castelló-Orvay F. (Ed.), 331-356 pp. Universidad de Barcelona.
- ANDREWS J.W., MURRAY M.W. and DAVIS J.M. 1978.** Influence of dietary fat and environmental temperature on digestible energy and absorbability of animal fat in catfish diets. *J. Nutr.* 108: 749-752.
- ANTIA N.J., McALLISTER C.D., STEPHENS T.R. and STRICKLAND, J.D.H. 1963.** Further measurements of primary production using a large volume plastic sphere. *Limnol. Oceanogr.* 8: 166-183.
- ANDO K. 1962.** Change of the lipids during development of rainbow trout eggs. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 28: 73-76.
- ANDO K. 1968.** Biochemical Studies on the lipids of cultured fishes. *J. Tokkyo Univ. Fish.* 54: 61-98.
- APROMAR 2014.** La Acuicultura en España. 107 p. Disponible en: [www.apomar.es](http://www.apomar.es)
- AQUAMAPS.** En: [www.aquamaps.org](http://www.aquamaps.org)
- ARIZCÚN M. 2003.** Desarrollo y crecimiento de la musculatura axial del dentón (*Dentex dentex* L). Influencia de la temperatura de incubación y de cultivo larvario. Tesis doctoral, Universidad de Murcia, Facultad de Veterinaria – Departamento de Anatomía y Anatomía patológica comparada, 232 p.
- ASBJØN G., AUDNY J. and JARL B. 1995.** Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture* 138: 23-34.
- ASBJØN G. and MIKKELSEN H. 1998.** Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immunostimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture* 167: 103-113.
- BABARRO J.M., FERNÁNDEZ-REIRIZ M.J. and LABARTA U. 2001.** Influence of preservation techniques and freezing storage time on biochemical composition and spectrum of fatty acids of *Isochrysis galbana* clone T-Iso. *Aquaculture Research* 32: 565-572.

- BAKER E.P., ALVES D and BENGTON D.A. 1998.** Effects of rotifer and Artemia fatty acid enrichment on survival, growth and pigmentation of summer flounder (*Paralichthys dentatus*) larvae. *J. World Aquacult. Soc.* 29(4): 494-498.
- BALON E.K. 1975.** Terminology of intervals in fish development. *J. Fish Res. Board Can.* 32: 1663-1670.
- BARBATO F. and CORBARI L. 1995.** New species in Italy. In: *Options Mediter. Serie Cahiers.*, Vol. 14: 123-128. Proceedings of the Seminar of the SELAM Network of the CIHEAM. Montpellier – May/1995. CIHEAM/MEDRAP II. FAO/UNDP/IFREMER – Zaragoza.
- BARCLAY W. and ZELLER S. 1996.** Nutritional enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in rotifers and *Artemia* nauplii by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. *J. World Aquacult. Soc.* 27: 314-322.
- BARNABÉ G. 1974.** La reproduction du mérou (*Epinephelus gigas*): observations préliminaires de terrain. *Aquaculture*, 4: 363-267.
- BARTON A.L. 1981** Egg quality of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) keep in captive conditions. Ph. D. Thesis, University of Liverpool, Great Britain.
- BASURCO B. and ABELLÁN E. 1999.** Finfish species diversification in the context of mediterranean marine fish farming development. In: Marine finfish species diversification: Current situation and prospects in mediterranean aquaculture. *Options Mediterr., Serie B* Vol. 24: 9-25 pp.
- BAUCHOT M.L. 1987.** Poissons Osseaux. In: *Fiches FAO D'Identification des espèces pour les Besoins de la peche. Mediterranee et Mer Noire.* Fischer W., Scheneider M., and Bauchot M.L. (Eds.), Volume II (Vertebres): 891-1422. FAO-CEE (Division de Conservation, Direction Générale de la Pêche). Rome.
- BAUCHOT M.L. and HUREAU, J.C. 1986.** Sparidae. In: Fishes of the North-Eastern Atlantic and the Mediterranean 2. Whitehead P.J.P., Bauchot M.L., Hureau J.C., Nielsen J., and Tortonese E. (Eds.), UNESCO, Paris. *FAO, 1992. Yearbook of fishery statistics 70. Catches and landings*: 883-907.
- BAYNE B.L. 1985.** Responses to environmental stress: tolerance, resistance and adaptation. Marine biology of polar regions and effects of stress on marine organisms. Editorial Gray and Christiansen, Wiley, New York.
- BELL M.V., HENDERSON R.J. and SARGENT J.R. 1985.** Changes in the fatty acid composition of phospholipids from turbot (*Scophthalmus maximus*) in relation to dietary fatty acid deficiencies. *Comp. Biochem. Physiol.* 81B: 193-198.



- BELL M.V., HENDERSON J.R. and SARGENT J.R. 1986.** The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 83 B: 711-719.
- BELL J.G., FARNDALE B.M., BRUCE M.P., NAVAS J.M. and CARRILLO M. 1997.** Effects of broodstock dietary lipid on fatty acid compositions of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*), *Aquaculture* 149: 107-119.
- BELL J.G. 1998.** Current aspects of lipid nutrition in fish farming. In: *Biology of Farmed Fish*, Black K.D. and Pickering A.D. (Eds.): 114-145 pp. Sheffield Academic Press, England.
- BELL J.G. and SARGENT J.R. 2003.** Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* 218: 491 – 499.
- BERRGH O. 1995.** Effects of dietary protein, lipid and carbohydrate content on the growth, feed efficiency and carcass composition of striped bass (*Morone saxatilis*) fingerlings. *Aquaculture and Fisheries Management* 18: 345-356.
- BESSONART M., IZQUIERDO M.S., SALHI M., HERNÁNDEZ-CRUZ C.M., GONZÁLEZ M.M. and FERNÁNDEZ-PALACIOS H. 1999.** Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata L.*) larvae. *Aquaculture* 179: 265-275.
- BIBILONI G., CLADERA A., GOMILA M.A., MASSUTÍ S. and ZARATIEGUI, I. 1993.** Experiencia piloto de producción de alevines de *Dentex dentex*. In: From discovery to commercialization, Abstracts. *European Aquaculture Society*, Special Publication N° 19: 317.
- BINI G. 1968.** Atlante dei pesci delle coste italiane Vol. 4, Sparidae: 93-152. *Mondo Sommerso*, Milano.
- BLAXTER J.H.S. 1988.** In: *Fish physiology*. Hoar W.S. and Randall D.J. (Eds.), Vol XI (part A): 1-48. Academic Press, London.
- BORLONGAN I.G. 1990.** Studies on the digestive lipases of milkfish (*Chanos chanos*). *Aquaculture* 89: 315-325.
- BRETT J.R. and GROVES T.T.D. 1979.** Physiological energetics. In: *Fish Physiology*. Hoar W.S., Randall D.J. and Brett J.R. (Eds.), Vol. VIII: 279-352. Academic Press, New York.
- BROMAGE N. 1995.** Broodstock management and seed quality, general considerations. P. 1-24. In: Broodstock management and egg and larval quality. Bromage N.R. and Roberts R.J. (Eds.), University Press, Cambridge, 424 p.

- BROWN M.R., JEFFREY S.W., VOLKMAN J.K. and DUNSTAN, G.A. 1997.** Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151:315-331.
- BRUCE M., OYEN F., BELL G., ASTURIANO J.F., FARNDALE B., CARRILLO M., ZANUY S., RAMOS J. and BROMAGE N. 1999.** Development of broodstock diets for the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of *n-3* and *n-6* highly unsaturated fatty acid to reproductive performance. *Aquaculture* 177: 85-97.
- CARDENETE G., ABELLÁN E., SKALLI A. and MASSUT S. 1997.** Feeding *Dentex dentex* with dry diets: growth response and diet utilization. *Cahiers Options Medit.* 22: 141-151.
- CARRASCOSA, M.A. 1997.** Estrategia Productiva en la Gestión de Reproductores. VI Congreso Nacional de Acuicultura, Cartagena: 111-116.
- CARRILLO M. 1998.** El control ambiental del ciclo reproductor en la producción de huevos a lo largo del año. En: Acuicultura Mediterránea: nuevas técnicas para criaderos marinos. Mazarrón – España.
- CARRILLO M., PÉREZ J. y ZANUY S. 1986.** Efecto de la hora de la ingesta y de la naturaleza de la dieta sobre el crecimiento de la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.), *Inv. Pesq.* 50: 83-95.
- CARRILLO M., ZANUY S., PRAT F., CERDÁ J., MAÑANÁS E. and BROMAGE N. 1993.** Sea bass broodstock management and their effects on the eggs and larval quality. In: Broodstock management and egg and larval quality, N. Bromage (Ed.), Blackwell, Oxford, UK.
- CASTELLÓ-ORVAY F. 1993.** Acuicultura Marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Ciències Experimentals i Matemàtiques. Universitat de Barcelona. 740 p.
- CASTELL J.D., SINNHUBER R.O., WALES J.H. and LEE D.J. 1972.** Essential fatty acids in the diet of rainbow trout (*Salmo gairdneri*): Growth, feed conversion and some gross deficiency symptoms. *J. Nutr.* 102: 77-86.
- CASTELL J.D., ACKERFORS A., BOSTON L.D., PRÄTY B. and SVENSSON M. 1992.** Standard experimental diets for crustacean nutrition research II. Growth and survival of juvenile crayfish (*Astacus astacus* L.) fed diets containing various amounts of protein, carbohydrate and lipid. *Aquaculture* 104 (3-4): 341-356.
- CASTELL J.D., BELL J.G., TOCHER D.R. and 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.

**CATAUDELLA S. 1996.** Description of main Mediterranean aquaculture systems. Notes from the TECAM. Advanced course on Food and Feeding of Farmed Fish and Shrimp. Alexandria. CIHEAM/FAO/NIOF/University of Alexandria.

**CAVALIERE A., CRISAFI E., FARANDA F., GRECO S., LO PARGO G., MANGANARO A. and MAZZOLA A. 1989.** Collection of fingerling and rearing of *Seriola dumerilii* in tanks. In: *Aquaculture: A Biotechnology in Progress*. De Pauw N., Pers E., Ackefors H. and Wilkins N. (Eds.), Bredene. *EAS*. Vol. 1: 119-123.

**CEJAS-PULIDO J.R. 2005.** Valoración de las necesidades lipídicas del sargo (*Diplodus sargus*) mediante la comparación de la composición corporal de ejemplares salvajes y cultivados. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna, junio de 2005.

**CEJAS J., SAMPER M., JEREZ S., FORÉS E. y VILLAMANDOS J. 1993.** Perspectivas de cultivo de breca (*Pagellus erythrynus*) y sargo (*Diplodus sargus*); primeros resultados de crecimiento comparado con la dorada (*Sparus aurata*). *Actas Congreso Nal. Acuicult.* Vol. IV: 127-132.

**CEJAS J.R., ALMANSA E., JÉREZ S., BOLAÑOS A., SAMPER M. and LORENZO A. 2004 a.** Lipid and fatty acid composition of muscle and liver from wild and captive mature female broodstocks of white sea bream (*Diplodus sargus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 138: 91-102.

**CEJAS J.R., ALMANSA E., JEREZ S., BOLAÑOS A., FELIPE B. and LORENZO A. 2004 b.** Changes in lipid class and fatty acid composition during development in White sea bream (*Diplodus sargus*) eggs and larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology* 139 (part B): 209-216.

**CETTA C.M. y CAPUZZO J.M. 1982.** *Mar. Biol.* 71: 327-337. En: Mourente G. 1989. Estudio sobre la nutrición larvaria del pez teleósteo marino *Sparus aurata* L. en cultivo. Tesis doctoral.

**CHAKRABARTI I., GONI Md. A. CHAKI K.K., SUR R. and MISRA K.K. 1995.** Digestive enzymes in II freshwater teleosteous fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comp. Bioche. Physiol.* 112A: 167-177.

**CHATAIN B. and DEWAVRÍN G. 1989.** The effects of abnormalities in the development of the swimbladder on the mortality of *Dicentrarchus labrax* during weaning. *Aquaculture* 78: 55-61.

**CHATAIN B. 1982.** Contribution à l'étude de l'élevage larvaire de la dorade japonaise (*Pagrus major*). Thèse de 3<sup>o</sup> cycle, Univ. D'aix-Marseille II.

**CHEREGUINI O., FERNANDEZ-PATO C.A. and MARTINEZ-TAPIA, C. 1990.** Growth of wild black-spot sea bream (*Pagellus bogaraveo* B.) from Cantabrian Sea

under laboratory conditions. Some interesting parameters. Cantabrian Sea under laboratory conditions. Some interesting parameters. *ICES, C.M.* 1990/F: 32.

**CHEN H. and AINSWORTH C. 1992.** Glucan administration potentialities immune defense mechanisms of channel catfish, (*Ictalurus punctatus*). *R. J. Fish Diseases* 15: 295-304.

**CHO C.Y. and KAUSHIK S.J. 1985.** Effects of protein intake on metabolizable and net energy values of fish diets. In: *Nutrition and Feeding in Fish*. Cowey C.B., Mackie A.M. and Bell J.G. (Eds.): 95-117 pp, Academic Press, London,

**COLL J.M. 2001.** Actualidad y futuro de la Acuicultura Española. *Revista AquaTic* No 14: 1-10. Universidad de Zaragoza.

**COMPANY R., SITJA-BOBADILLA A., PUJALTE M.J., GARAY E., ALVAREZ-PELLITERO P. and PÉREZ-SÁNCHEZ J. 1999.** Bacterial and parasitic pathogens in cultured common dentex (*Dentex dentex* L.). *Journal of Fish Diseases* 22: 299-309.

**CORRAZE GENEVIÈ 2004.** Nutrición lipídica. In: *Nutrición y alimentación de peces y crustáceos*, Capítulo 7. Guillaume J., Kaushik S., Bergot P. and Métailler R. (Eds.), Editorial Mundi-Prensa, Madrid – España.

**COUSIN J.C.B., BAUDIN-LAURENCIN F. and GABAUDAN J. 1987.** Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot (*Scophthalmus maximus* L.) *J. fish. Biol.* 30: 15-33.

**COWEY C.B. 1993.** Protein metabolism in fish. In: *Coastal and Estuarine Studies*. Lahlou B. and Vitiello P. (Eds.), *American Geophysical Union* Vol. 43: 125-137. Washington.

**COWEY C.B. and SARGENT J.R. 1979.** Nutrition. In: *Bioenergetics and Growth*. Hoar W.S., Randall D.J. and Brett J.R. (Eds.), *Fish Physiology* Vol. VIII: 1-69. Academic Press. New York.

**COWEY C.B. and LUQUET, P. 1983.** *Protein metabolism and Nutrition*. Arnal M., Pion R. And Bonin D. (Eds.), Vol. I: 365-384 pp, INRA, Paris.

**CUENCA E.M. and De La HIGUERA M. 1994.** Evidence for an endogenous circadian rhythm of feeding in the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Rhythm Res.* 25 (2): 228-235.

**DABROWSKI K. 1982.** Proteolytic enzyme activity decline in starving fish alevins and larvae. *Env. Biol. Fish.* 7: 73-76.

**DABROWSKI K. 1996.** Ascorbic Acid Status as affected by dietary treatment in the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt): tissue concentration mobilization and L-

gulonolactone oxidase activity. Kugler Publicatin, Amsterdam. *Fish Physiol. Biochem.* Vol. 15 (15): 431-438.

**DABROWSKI K., HINTERLEITNER S., STURMBAUER F., EI FIKY N. and WISER'J W. 1988.** Do carp larvae requirement of vitamin C. *Aquaculture* 72: 295-306.

**DABROWSKI K. and HINTERLEITNER S. 1989.** Application of simultaneous assay of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and ascorbic sulfate in biological materials. *Analyst* Vol. 114: 83-87. London.

**D' ANCONA U. 1950.** Il Differenziamento delle gonade e l'inversione sessuale degli sparidi. *Arch. Ocean. Limnol.*, Fasc. II-III: 97-163.

**D' ANCONA U. 1956.** Inversion spontanées et expérimentales dans les gonades des Teleostéens. *Annee Biol.* 32(3): 89-99.

**DARVIL A.G. and ALBERSHEIM P. 1984.** Phytoalexins and their elicitors. A defense against microbial infection in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 243-275.

**De La HIGUERA M. 1987.** Requerimientos de proteínas y aminoácidos en peces. En: Nutrición en acuicultura II. J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta (Eds.): 53-98 pp. Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura, Madrid.

**De La HIGUERA M. y CARDENETE G. 1993.** La proteína en la nutrición de los peces. En: Acuicultura Marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción. F. Castelló-Orvay (Ed.): 1905-225 pp. Universitat de Barcelona, Barcelona.

**De La HIGUERA M., SIERRA M.A., GARZÓN A., PERAGÓN J., HIDALGO F. and LUPIÁÑEZ J.A. 1997.** Influence of supplementing a soy-protein diet, either with free or coated methionine on liver and muscle protein-turnover rates in *Sparus aurata*. *European society for comparative physiology and biochemistry, 18<sup>th</sup> Annual Conference.* University of Barcelona, Spain.

**DEPLANO M., CONNES R., DÍAZ J.P. and PARIS J. 1989.** Intestinal steatosis in the farm reared sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Dis. Aquat. Org.* 6: 121-130.

**DEPLANO M., DÍAZ J.P., CONNES R., KENTOURI-DIVANACH M. and CAVALIER F. 1991.** Appearance of lipid-absorption capacities in larvae of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during transition to the exotrophic phase. *Mar. Biol.* 108: 361-371.

**DESAIACH D. 1986.** In: Biology of benthic marine organism. Balkenc A.A. (Ed.)

- DHERT Ph. 1996.** Rotifers. In: Manual on the production and use of live food for aquaculture. Lavens P. and Sorgeloos P. (Eds.), *FAO Fisheries Technical Paper*. Vol. 361: 49-78. FAO – Rome.
- DHERT P., SORGELOOS P. and DEVRESSE B. 1993.** Contribution towards a specific DHA enrichment in the live food *Brachionus plicatilis* and *Artemia* sp. In: Fish Farming Technology. Reinertsen H., Dahle L.A., Jørgensen L. and Tvinnereim K. (Eds.), *Proceedings of the First International Conference on Fish Farming Technology*, 109-115 pp. Balkema, Rotterdam, Netherlands.
- DHERT Ph., ROMBAUT G., SUANTIKA G. and SORGELOOS P. 2001.** Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture* 200: 129-146.
- DÍAZ-LÓPEZ M., MOYANO F.J., ALARCÓN F.J., GARCÍA F.L. and NAVARRETE M.A. 1997.** Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electrophoresis. *Comparative Biochemistry and physiology*, Part B 121: 369-377.
- DI LUZIO 1985.** Update on the immunomodulating activities of glucans. *Springer Seminars in Immunopathology* 8: 387-400.
- DIVANACH P. and KENTOURI M. 1982.** Utilisation des techniques extensives pour la production a grade échelle d'alevins du sar (*Puntazzo puntazzo* // Poisson, Téléost. *Sparidae*). Paris. *Compt. Rend. Acad. Sci.* Vol. 294: 1017-1019.
- DIVANACH P. and KENTOURI M. 2000.** Hatchery techniques for specific diversification in Mediterranean finfish larviculture. In: *Cahiers Options Méditerran.* 47: 75-87. FAO-CIHEAM-IEO. IAM: Zaragoza.
- DIVANACH P., BOGLIONE C., MENU B., KOUMOUNDOUROS G., KENTOURI M. and CATAUDELLA S. 1996. Abnormalities in finfish mariculture: An overview of the problem, causes and solutions. In: *Seabass and sea bream culture. Problems and Prospects*: 45-66 pp. Verona.
- DIVANACH P., PAPANDROULAKIS N., KOUMOUNDOUROS G., ANASTASIADIS P. and KENTOURI M. 1997.** Effect of water currents on the development of skeletal deformities in seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) with functional swimbladder during postlarval and nursery phase. *Aquaculture* 1997: 145-155.
- DOMÉNECH J.L. y LEÓN S. 1997.** Consideraciones sobre el cultivo de diversas especies de peces con posible interés en Asturias (Sargo: *Diplodus sargus* // Mojarra: *D. vulgaris* // Lubina: *Dicentrarchus labrax* y Besugo: *Pagellus bogaraveo* B.). *Actas Congreso Nal. Acuicult.* Vol VI: 855-860. Cartagena.

- EFTHIMIOU S., DIVANACH P. and ROSENTHAL H. 1994.** Growth, food conversion and agonistic behaviour in common dentex (*Dentex dentex*) juveniles fed on pelleted moist and dry diets. *Aquatic Living Resour.* Vol 7: 267-275.
- EFTHIMIOU S. 1996.** Dietary intake of  $\beta$ 1.3/1.6 glucans in juvenile dentex (*D. dentex* L.). Sparidae: effects on growth performance, mortalities and non-specific defense mechanisms. *Jor. Appl. Ichthyol.* 12: 1-7.
- EINAR R. and GATESOUBE F.J. 1998.** Lactic acid bacteria in fish: A review. *Aquaculture* 160: 177-203.
- ERIKSSON L.O. and VAN VEEN T. 1980.** Circadian rhythms in the Brown bullhead (*Ictalurus nebulosus* - Teleostei). Evidence for an endogenous rhythm in feeding, locomotor and reaction time behaviour. *Can. J. Zool.* 58: 1899-1907.
- ESTEBAN M.A., BONILLA S. and MESEGUER J. 1999.** Modulación del sistema inmunitario de la dieta. *Aulas del Mar - Acuicultura I. Cultivo y Alimentación de Peces*: 121-138 pp. Universidad de Murcia Ediciones. Cartagena.
- ESTÉVEZ A., IZHIKAWA M. and KANAZAWA A. 1997.** Effects of arachidonic acid on pigmentation and fatty acid composition of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceous* Temmmink and Schlegel). *Aquacult. Res.* 28: 279-289.
- EWART J.W. and PRUDER G.D. 1981.** Comparative growth of *Isochrysis galbana* Parke and *Isochrysis aff. galbana*, clone T-Iso, at four temperatures and three light intensities. *Journal of the World Mariculture Society* Vol. 12 (1): 333 – 339.
- FAO 1992.** Yearbook of fishery statistics. *Catches and landings.* Vol. 70.
- FAO 1993.** *Statistical Bulletin for the General Fisheries Council for the Mediterranean (GFCM) 9: Nominal Catches 1979-1991*: 237 p.
- FAO 1997.** Review of the state of world aquaculture. *FAO Fisheries Circular* No 886. FIRI/c886, Rev. 1. FAO - Rome.
- FAO – Fishstat Plus 2008.** FAO's Fisheries and Aquaculture Department, Statistical Collections. Capture Production and Aquaculture Production datasets 1950-2006. Available at: <http://www.fao.org/fishery/statistics/en>.
- FALK-PETERSEN S., FALK-PETERSEN I.B., SANGENT J.R. and HAUG T. 1986.** Lipid class and fatty acid composition of egg from the Atlantic halibut (*Hipoglossus hipoglossus*). *Aquaculture* 52: 207-211.

**FAUCONNEAU B. and ARNAL M. 1985.** In vivo protein synthesis in different tissues and the whole body of rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.). Influence of environmental temperature. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 82 (1): 179-187.

**FEAP** (Federation of European Aquaculture Producers). Disponible en: [www.feap.org](http://www.feap.org)

**FERNÁNDEZ-REIRIZ M.J., PEREZ-CAMACHO A., FERREIRO M.J., BLANCO J., PLANAS M., CAMPOS M.J. and LABARTA U. 1989.** Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture* 83: 17-37.

**FERNÁNDEZ-REIRIZ M.J., LABARTA U. and FERREIRO M.J. 1993.** Effects of commercial enrichment diets on the nutritional value of the rotifer (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture* 112: 195-206.

**FERREIRA M., MASEDA A., FÁBREGAS J. and OTERO A. 2008.** Enriching rotifers with “Premium” microalgae. *Isochrysis* aff. *galbana* clone T-Iso. *Aquaculture* 279: 126-130.

**FERNÁNDEZ-PALACIOS H., MONTERO D., SOCORRO J., IZQUIERDO M.S. and VERGARA J.M. 1995** First studies on spawning, embryonic and larval development of *Dentex dentex* L. (Osteichthyes, Sparidae) under controlled conditions. *Aquaculture* 122: 63- 73.

**FERNÁNDEZ-PALACIOS H., IZQUIERDO M.S., ROBAINA L., VALENCIA A., SALHI M. and VERGARA J. 1995.** Effect on n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.), *Aquaculture* 132: 325-337.

**FERNÁNDEZ-PATO C.A., MARTÍNEZ-TAPIA C., CHEREGUINI O. and GARCÍA-BANDA I. 1990.** Spawn, hatching and larvae rearing of black spot sea bream (*Pagellus bogaraveo* B.). First experiences in the oceanographic center of Santander (Spain) in order to its culture. F: 30. *ICÉS, Mariculture Committee, Technical Publication, CM.* 1990: 5 p.

**FIELD D.G. and MATHUR S.N. 1995.** Intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *Progr. Lipid. Res.* 34: 185-198.

**FISHBASE.** In: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)

**FOLCH J., LEES M. and SLOANE-STANLEY G.H. 1957.** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal Biological Chemistry* 276: 497-509.



- FONTAGNÉ S. 1996.** Effect des phospholipides alimentaires sur la structure histologique du foie et de l'intestin de larves de carpe. Thesis Diss., Université de Bordeaux, France.
- FRANK K.T. y LEGGET W.C. 1986.** Efecto de la abundancia y la talla de las presas sobre el crecimiento y supervivencia larvaria de los peces: un estudio experimental empleando grandes volúmenes cerrados. *Marine Ecol. Progress Series* Vol 34: 11-22.
- FRANICEVIC V. 1991.** Preliminary results on the larval rearing of common dentex (*D. dentex L.*). In: *Aquaculture and Environment, Aquacult. Europ.* 91, de Pauw N. and Joyce J. (Compilers). *EAS Special Publication* 14: 106-107.
- FUJITA S. 1979.** Culture of Red Seabream (*Pagrus major*) and its food. In: Styczynska-Jurewicz E., Backiel T., Jaspers E. and Persoone G. (Eds.), *European Mariculture Society, Special Publication N° 4*. Bredene.
- FUJITA S., WATANABE T. and KITAJIMA C. 1980.** Nutritional quality of *Artemia salina* from different locations, as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for marine fish. In: *The Brine Shrimp Artemia. Ecology, Culturing, use in Aquaculture.* Persoone G., Sorgeloos P., Roels O. And Jaspers E. (Eds.), Universa Press, Wetteren.
- FULLER, R. 1989.** Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- FURUICHI M. and YONE Y. 1980.** Effect of insulin on blood sugar levels of fishes. *Bull. Japan Soc. Scient. Fish.* Vol. 48: 1289-1291.
- 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. *Fish Sci.* 62: 246-251.
- FURUITA H., TAKEUCHI T. and UEMATSU K. 1998.** Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on growth, survival and brain development of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 161: 269-279.
- FURUITA H., KONISHI K. and TAKEUCHI T. 1999.** Effect of different levels of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in *Artemia* nauplii on growth, survival and salinity tolerance of larvae of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 170: 59-71.
- FURUITA H., TANAKA H., YAMAMOTO T., SHIRAISHI M. and TAKEUCHI T. 2000.** Effects of n-3 HUFA levels in broodstock diet on the reproductive performance

and egg and larval quality of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 187: 387-398.

**GANG C., STONE G. and OLIVER L. 1986.** Use of protein to carbohydrate ratios to analyse for nutrient deficiency in phytoplankton. *Aust. J. Freshwater Res.* 37: 183-197.

**GARCÍA-ALCÁZAR A. 1998.** Influencia de la Alimentación de los Reproductores en la Calidad de la Puesta y el Cultivo Larvario de la Dorada (*Sparus aurata* L.), Universidad de Murcia. Tesis Doctoral. 145 p.

**GARCÍA-ALCÁZAR A. 2001.** Desarrollo larvario de peces: Alimentación de larvas. En: Aulas del Mar, Acuicultura I: Biología marina – Reproducción y Desarrollo. Universidad de Murcia. 234-245 pp.

**GARCÍA-ALCÁZAR A., ABELLAN E. and ORTEGA A. 1995.** Alimentación de dorada (*Sparus aurata* L.) y lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) con dietas de distinta relación proteína/grasa. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 10(2): 191-201.

**GARCÍA-GÓMEZ A. y ORTEGA-ROS A. 1993.** Revisión general del cultivo de nuevas especies piscícolas en el área mediterránea y experiencias realizadas en el Centro Oceanográfico de Murcia (Instituto Español de Oceanografía). *Inf. Tec. I.E.O.*, Vol. 141: 1-32. Madrid.

**GATESOUBE F.J. 1996.** Controle de l'environnement bacterien des larves de turbot: test de challenge et application a la mise en evidence de l'effect probiotique d'une bacterie lactique et d'un Vibrio. *Hidrobiologie*, 3 p.

**GATESOUBE F.K., LÉGER C., METAILLER R. and LUQUET P. 1977.** Alimentation lipidique du turbot (*Scophthalmus maximus* L.) I. Influence de la longueur de la chaine des acides gras de la serie W3. *Ann. Hidrobiol.* 8 (1): 89-97.

**GIMÉNEZ G., ESTÉVEZ A., LAHNSTEINER F., ZECEVIC B., BELL J.G., HENDERSON R.J., PIÑERA J.A. and SÁNCHEZ-PRADO J.A. 2006.** Egg quality criteria in common dentex (*Dentex dentex*). *Aquaculture* 260: 232-243.

**GIMÉNEZ G., ESTÉVEZ A., JAMES HENDERSON R. y GORDON BELL J. 2007**  
**a.** Composición en ácidos grasos de huevos y larvas de dentón (*Dentex dentex* L.) de hasta 40 días en condiciones de cultivo. XI Congreso Nacional de Acuicultura. Cultivando el futuro. Cerviño Eiroa A., Guerra Díaz A. y Pérez Acosta C. (Eds.). Libro de Actas – Tomo II: 1403-1406.

- GIMÉNEZ G. y ESTÉVEZ A. 2007 b.** Estudios en los requerimientos de ácidos grasos esenciales de la larva de dentón (*Dentex dentex* L.) en condiciones de cultivo intensivo. XI Congreso Nacional de Acuicultura. Cultivando el futuro. Cerviño Eiroa A., Guerra Díaz A. y Pérez Acosta C. (Eds.). Libro de Actas – Tomo II: 1407-1410.
- GIMÉNEZ G. 2008.** Optimización de la cría larvaria del dentón en condiciones intensivas de cultivo. Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona, 220 p.
- GIOVANARDI O., MATTIOLI G., PICCINETI C. and SANBUCCI G. 1984.** Prime esperienze vevamento della ricciola (*Serio/a dumerilii*, Risso 1810) in Italia. *Riv. Ital. Piscic* (4): 123-130.
- GJELLESVIK D.R., LOMBARDO D. and WALTHER B.T. 1992.** Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1124: 123-134.
- GLAMUZINA B., JUG-DUJACOVIC J. and KATAVIC I. 1989.** Preliminary studies on reproduction and larval rearing of common dentex (*Dentex dentex* L.). *Aquaculture* Vo177: 75-84.
- GONZÁLEZ-SERRANO, J.L. 2000.** La evolución histórica y la situación actual de la acuicultura en el mundo y en España. *Actas del Curso de Acuicultura*. Octubre de 2000. San Juan - Alicante.
- GOVONI J.J., BOEHLERT G.W. and WATANAKE Y. 1986.** The physiology of digestion in fish larvae. *Environ. Biol. Fishes* 16: 59-77.
- GRAU A., MORALES-NIM B., QUETGLAS A. and RIERA F. 2001.** El modelo reproductivo del dentón (*Dentex dentex* L.): bisexualidad juvenil y gonocorismo tardío. *Séptimo Congreso Nal. De Acuicultura*. Memorias del ICCM, Vol. 4: 555-560 pp.
- GRECO S., LO PARO G., CARIDI D., PERDICHIZZI F., CAMMAROTO S., MICALE V. and GENOVESE L. 1992.** Controlled spawning and larval development in the harpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*, Sparidae). In: Resumes du Colloque Scientifique sur la Pisciculture Intensive et Environment. *Aquaculture* P. 12. Bordeaux.
- GRUBISIC F. 1962.** Prilog poznavanju vremena mrijescenja nekih jadranskih riba. *Biljeske Inst. Oceanogr. Ribar. Split* 18: 4 pgs.
- GUERDEN I., CHARLON N., MARION D. and BERGOT P. 1995 a.** Dietary phospholipids and body deformities in carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. In: Lavens

R., Jaspers E. and Roelants I. (Eds.), Larvi 95'. EAS Special Publ. N° 24: 162-165 pp. Gent.

**GUERDEN I., RADÜNZ-NETO J. And BERGOT P. 1995 b.** Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* 131: 303-34.

**GUILLAUME J., KAUSHIK S. BERGOT P. and MÉTAILLER R. 2001.** Nutrition and feeding of fish and crustaceans. Cap. 7: Lipid nutrition. Springer-Praxis, U.K.

**HALVER J. 1989.** The vitamins. In: Fish Nutrition, Halver J. (Ed.), 31-109 pp. 2<sup>nd</sup> edn. Academic Press, New York.

**HAREL M., T ANDLER A. and KISSIL G. W. 1994.** The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) females and the subsequent effects on egg composition and egg quality. *Br. Jor. Nut.* 72: 45-58.

**HECHT T. and PIENAAR A.G. 1991.** Cannibalism: the hidden mortality factor in larviculture. Larvi 91.

**HEMING T.A. and BUDDINGTON R.K. 1988.** Yolk absorption in embryonic and larval fishes. In: *Fish Physiology* XI: 407-446 pp, Hoar W.S. and Randall D.J. (Eds.), Academic Press, London.

**HILTON J. W. and SLINGER S.J. 1981.** Nutrition and feeding of rainbow trout. *Can. Spec. Fish Acuatic. Sci.* Vol. 55: 15 pgs.

**HILTON J.W. and ATKINSON J.L. 1982.** Response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to increased levels of available carbohydrate in practical trout diets. *British Jour. Nutr.* 47: 597-607.

**HINCHCLIFFE P.R. and RILEY J.P. 1972.** The effect of diet on the component fatty acid composition of *Artemia salina*. *J. Marine Biological Association UK* 52 (1): 203-211.

**HOULIHAN D.F., MCMILLAN D.N. and LAURENT P. 1986.** Growth rates, protein synthesis and protein degradation rates in rainbow trout: effects of body size. *Physiol. Zool.* 59(4): 482-493.

**HWANG D. 1989.** Essential fatty acids and immune responses. *FASEB J.* 3: 2052-2061.

**IBEAS C., RODRÍGUEZ C., BADÍA P., CEJAS J.R., SANTAMARÍA F.J. and LORENZO A. 2000.** Efficacy of dietary methyl esters of n-3 HUFA vs. triacylglycerols of n-3 HUFA by gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Aquaculture* 190: 273-287.

- IJIMA N., NAKAMURA M., UEMATSU K. and KAYAMA M. 1990.** Partial purification and characterization of phospholipase A2 from the hepatopáncreas of red sea bream (*Pagrus major*). *Nippon Suisan Gakkaishi* 56: 1331-1339.
- IJIMA N., CHOSA S., UEMATSU K., GOTO T., TOSHITA T. and KAYAMA M. 1997.** Purification and characterization of phospholipase A2 from the pyloric caeca of red sea bream (*Pagrus major*). *Fish Physiol. Biochem.* 16: 487-498.
- IJIMA N., TANAKA S. and OTA Y. 1998.** Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream (*Pagrus major*). *Fish Physiol. Biochem.* 18: 59-69.
- IL'INA I.D. and TURETSKIY V.I. 1988.** Development of the digestive function in fishes. *J. Ichthyol.* 28: 74-82.
- IZQUIERDO M.S. 1988.** Estudio de los requerimientos de ácidos grasos esenciales en larvas de peces marinos. Modificación de la composición lipídica de las presas. Doctorate Diss., La Laguna University, Spain. 205 p.
- IZQUIERDO M.S., WATANABE T., TAKEUCHI T., ARAKAWA T. and KITAJIMA C. 1989 a.** Optima EFA levels in *Artemia* to meet the EFA requirements of red sea bream (*Pagrus major*). *Proc. Third Int. Symp. Feeding and Nutr.:* 221-232 pp. In Fish Toba (Japan).
- IZQUIERDO M.S., WATANABE T., TAKEUCHI T., ARAKAWA T. and KITAJIMA C. 1989 b.** Requirements of larval red sea bream (*Pagrus major*) for essential fatty acids. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55 (5): 859-867.
- IZQUIERDO M.S., ARAKAWA T., TAKEUCHI T., HAROUN. R. and WATANABE T. 1992.** Effect of n-3 HUFA levels in *Artemia* on growth of larval Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 195: 73-82.
- IZQUIERDO M. 1996.** Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquacult. Nutr.* 2: 183-191.
- IZQUIERDO M. S. and FERNÁNDEZ-PALACIOS H. 1997 a.** Efectos prácticos de la modificación dietética de algunos ingredientes y nutrientes esenciales. Consecuencias sobre la calidad de las puestas, supervivencia y desarrollo larvario. *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura:* 300 pp. Cartagena.
- IZQUIERDO M.S. and FERNÁNDEZ-PALACIOS H. 1997 b.** Nutritional requirements of marine fish larvae and broodstock. *Cahiers Options Méditerr.* Vol. 22: 243-264.
- IZQUIERDO M., ARANTZAMENDI L. and CABALLERO M.J. 1997 c.** Compared distribution of lipase and phospholipase activities along digestive tract in several

marine fish species. In: *3<sup>rd</sup> Int. Symp. Research for Aquaculture. Fundamental and Applied Aspects*. Universidad de Barcelona, Spain.

**IZQUIERDO M. and HENDERSON R.J. 1998.** The determination of lipase and phospholipase activities in gut contents of turbot (*Scophthalmus maximus*) by fluorescence-based assays. *Fish Physiol. Biochem.* 19: 153-162.

**IZQUIERDO M.S., SOCORRO J., ARANTZAMENDI L. and HERNÁNDEZ-CRUZ C.M. 2000.** Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiol. And Biochem* 22: 97-107.

**JACUMAR 2008.** Memoria Final del Proyecto Coordinado Promoción del Cultivo de las Nuevas Especies de Espáridos: Ensayo piloto y transferencia tecnológica (2004-2007). Disponible en: <http://www.mapa.es/app/jacumar/planes-nacionales/Ficha-planes.aspx?Id=es&IdPlan=87>.

**JAMES C.H. and ABU-REZEQ T.S. 1989.** An intensive chemostat culture system for the production of rotifers for aquaculture. *Aquaculture* 81: 291-301.

**JAMES C.M., AL-HINTY S. and SALMAN A.E. 1989.** Growth and W3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture* 77: 337-351.

**JOVER M., RIERA F., GRAU A. and PASTOR E. 1999.** Resultados preliminares de crecimiento del dentón (*Dentex dentex* L) en jaulas flotantes alimentados con piensos de diferente relación proteínas/lípidos. *Aquatic* Vol. 7: 1-10.

**JUG-DUJAKOVIC J., DULCIC J. and KATAVIC I. 1995.** Embryonic and yolk sac larval development of the sparid *Dentex (D. dentex L.)*. *Fish. Res.* 24: 91-97.

**KANAZAWA A. 1993 a.** Essential phospholipids of fish and crustaceans. In: *Fish Nutrition in Practice*: 519-530 pp. Kaushik S.J. and Luquet P. (Eds.), INRA, Paris.

**KANAZAWA A. 1993 b.** Nutritional mechanisms involve in the occurrence of abnormal pigmentation in hatchery reared flatfish. *J. World Aquaculture Soc.* 24: 162-166.

**KANAZAWA A., TESHIMA S. and ONO K. 1979.** Relationship between the essential fatty acid requirements of aquatic animals and their capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acid. *Comp. Biochem. Physiol.* 63B: 295-298.

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

- KANAZAWA A. TESHIMA S. and SAKAMOTO M. 1985.** Effects of dietary lipid fatty acids and phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae. *Aquaculture* 50: 39-49.
- KAUSHIK S.J. and GOMES E.F. 1988.** Effect of frequency of feeding on nitrogen and energy balance in rainbow trout under maintenance conditions. *Aquaculture* 73: 207-216.
- KENTOURI M., KOUMOUNDOUROS G., DIVANAC P. and STERIOTI A. 1992.** Développement embryonnaire du Pagre (*Pagrus pagrus*) et du Denté (*Dentex dentex*) en Crète. *Rapp. Commun. Int. Mer Médit.* Vol. 33:384 pgs.
- KENTOURI M., PAPANDROULAKIS N. and DIVANACH P. 1995.** Diversification in Greek finfish mariculture. In: *Options Méditerranéennes, Série Cahiers* Vol 14: 129-136. *Aquaculture Production Economics. Proceedings of the Seminar of the SELAMS Network of the CIHEAM, Montpellier (France). May 1995.*
- KIMATA M. 1983.** Changes of fatty acid composition during early development in red sea bream (*Chrysophys major*, Temminck et Schelegel) egg and larval. *Tokay Daigaku kayo gakubu* 16: 213-223.
- KISSIL G.W. 1979.** Pyridoxine requirements of the gilthead bream (*Sparus aurata*). Preliminary results. *Proc. World Symp. In: Finfish Nutrition and Fishfeed Technology* Vol 1: 275-289. Hamburg, 1978.
- KISSIL G.W. 1981.** Known nutritional requirements of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in culture. In: *Intensive Aquaculture Special Publication No. 6: 49-55 pp*, Rosenthal H. and Oren O.H. (Eds.), European Mariculture Society, Bredene – Belgium.
- KITAJIMA C. and KODA T. 1976.** Lethal effects of the rotifer cultured with baking yeast on the larval Red Seabream (*Pagrus major*), and the increase rate using the rotifer cultured with Chlorella sp. *Bull. Nagasaki Pref. Inst. Fish* 2: 113-116.
- KITAJIMA C., FUJITA S., OOWA F., YONE Y. and WATANABE T. 1979.** Improvement of dietary value for red sea bream larvae of rotifer (*Brachionus plicatillis*) cultured with baker's yeast (*Sacharomyces cerevisiae*). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 45 (4): 469-471.
- KITAJIMA C., ARAKAWA T., FUJITA S., IMADA O., WATANABE T. and YONE Y. 1980 a.** Dietary value for red sea bream larvae of rotifer *Brachionus plicatillis* cultured with a new type of yeast. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 46: 43-46.
- KITAJIMA C., YOSHIDA M. and WATANABE T. 1980 b.** Dietary value for ayu (*Plecoglossus altivelis*) of rotifer (*Brachionus plicatillis*) cultured with baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplemented with cuttlefish liver oil. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 46: 47-50.

- KOLKOVSKI S. ARIELI A. and TANDLER A. 1995.** Visual and olfactory stimuli as determining factors in the stimulation of microdiet ingestion in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). In: Larvi' 95, Fish and Shellfish Larviculture Symposium. Lavens P., Jaspers E. y Roelants I. (Eds.), *European Aquaculture Society Special Publication* No 24: 289-292 pp.
- KOLKOVSKI S., TANDLER A. and IZQUIERDO M.S. 1997.** Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 148: 313-322.
- KOUMOUNDOUROS G., DIVANACH P. and KENTOURI M. 1999.** Ontogeny and allometric plasticity of *Dentex dentex* L. (Osteichthyes: Sparidae) in rearing conditions. Berlin- Germany. *Marine biol.* Vol. 135: 561-572.
- KOUMOUNDOUROS G., CARRILLO J. and DIVANACH P. 2004.** The rearing of common dentex (*Dentex dentex* L) during the hatchery and on-growing phases. *Aquaculture* 240: 165-173.
- KOVEN W. 2002.** Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.). In: Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture. Webster C.D. And Lim C. (Eds.), 64-78 pp.
- KOVEN W.M., KISSIL G.W. and TANDLER A. 1989.** Lipid and n-3 requirement of *Sparus aurata* larvae during starvation and feeding. *Aquaculture* 79: 185-191.
- KOVEN W.M., KOLKOVSKY S., TANDLER A., KISSIL G.W. and SKLAN D. 1993.** The effect of dietary lecithin and lipase, as function of age, on n-9 fatty acid incorporation in the tissue lipids of *Sparus aurata* larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 10: 357-364.
- KOVEN W.M., HENDERSON R.J. and SARGENT J.R. 1994 a.** Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*) I: Lipid class and fatty acid composition of digesta from different segments of the digestive tract. *Fish Physiol. Biochem.* 13: 69-79.
- KOVEN W.M., HENDERSON R.J. and SARGENT J.R. 1994 b.** Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*) II: Lipolysis in vitro of <sup>14</sup>C-labelled triacylglycerol, cholesterol ester and phosphatidyl choline by digesta from different segments of digestive tract. *Fish Physiol. Bioche.* 13: 275-283.
- KOVEN W., BARR Y., LUTZKY S., BEN-ATIA I., WEISS R., MAREL M., BEHRENS P. and TANDLER A. 2001.** The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 193: 107-122.
- KOZASA M. 1986.** Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 4: 121-135.



- KNIGHTS B. 1987.** Agonistic behavior and growth in the European eel (*Anguilla anguilla* L.), in relation to warm-water aquaculture. *J. fish Biology* 31 (2): 265-276.
- LANGDON C.J. 1980.** The nutrition of *Crassostrea gigas* larvae and spat fed on artificial diets. Ph. D. Thesis. University of Wales, Great Britain. 209 p.
- LANGDON C.J. and WALDOCK M.J. 1981.** The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 61: 431-448.
- LASKER R. and THEILACKER G.H. 1962.** The fatty acid composition of the lipids of some pacific sardine tissues in relation to ovarian maturation and diet. *J. Lipid Res.* 3: 60-64.
- LAVENS P. and SORGELOOS P. 1996.** Manual on the production and use of level food for aquaculture. *FAO-Fisheries Technical Paper* 361 p. Roma.
- LAVENS P., MERCHIE G. and SORGELOOS P. 1998.** Critical review of the larval fish and crustacean feeding methods with ascorbic acid enriched diets: effects on fish and shrimp growth, stress and disease resistance. *Aquaculture' 98*: 316 p. Abstracts of contributions presented at the *Aquaculture' 98* conference of the World Aquaculture Society, Las Vegas, USA.
- LAUFF M. and HOFER R. 1984.** Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture* 37: 335-346.
- LAZO J.P. 2000.** Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. En: Cruz-Suárez L.E., Ricqui-Marie D., Tapia-Salazar M., Olvera-Novoa M.A. y Civera-Cerecedo R. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Mérida, Yucatán, México. 300-312 pp.
- LAZZARI and BARBERA, 1989.** Farming the Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerilii* R.) in concrete ponds: results and perspectives. In: *Aquaculture: A Biology in progress*. EAS, Vol. 1: 209-213. N. Pauw N., Jaspers E., Ackefors H. and Wilkins N. (Eds.), Bredene.
- LÉGER C. 1988.** Digestion, absorption and transport of lipids. In: *Nutrition and feeding in fish*. Cowey C.B., Mackie A.M. and Bell J.G. (Eds.), Academic Press, London. 299-331 pp.
- LÉGER C., BAUCHART D. and FRANZY J. 1977.** Some properties of pancreatic lipase in *Salmo gaidneri* Rich. Effects of bile salts and Ca<sup>+2</sup>, gelfiltration. *Comp. Biochem. Physiol.* 57: 359-363.

- LÉGER Ph., SORGELOOS P., MILLAMENA O.M. and SIMPSON K.L. 1985.** International study of Artemia XXV. Factors determining the nutritional effectiveness of Artemia. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 93: 71-82.
- LÉGER P., BENGTON D.A., SIMPSON K.L. and SORGELOOS P. 1986.** The use and Nutritional value of Artemia as a food source. In: *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* Vol. 24: 521-623, Barnes M. (Ed.), Aberdeen University Press. Aberdeen – Scotland.
- LÉGER P., BENGTON D.A., SORGELOOS P., SIMPSON K.L. and BECK A.D. 1987.** The nutritional value of Artemia: A review. *Artemia Research and Applications* Vol. 3: Ecology, culturing, use in aquaculture: 357-372.
- LEGGETT W.C. 1986.** The dependence of fish larval survival on food and predator densities. In: NATO ASI Series Vol. G7, The role of freshwater outflow on coastal marine ecosystems, Skreslet S. (Ed.): 117-127 pp. Springer, Berlin.
- LE MILINAIRE C., GATESOUBE F.J. and STEPHAN G. 1983.** *C.R. Acad. Sc. Paris T296, Ser III*: 917-920. En: Mourente G. 1989. Estudio sobre la nutrición larvaria del pez teleosteo marino *Sparus aurata* L. en cultivo. Tesis doctoral.
- LENSI P. 1995.** La politique & diversification de l'aquaculture en Corse: La demarche "nouvelles especes". *Options Méditer. Serie Cahiers.* Vol. 14: 137-148 pp. Proceedings of the Seminar of the SELAM Network of the CIHEAM, Montpellier (France). May 1995. CIHEAM/MEDRAP II (FAO/ UNDP)/IFREMER, Zaragoza.
- LIE Ø., 1993.** Changes in the fatty acid composition of neutral lipids and glycerophospholipids in developing cod eggs. In: *Physiological and Biochemical Aspects of fish development*: 330-337 pp. Walther B.T. And Fyhn H.J. (Eds.), Bergen University, Norway.
- LIE Ø., HEMRE G.I. and BJORNSSON B. 1992.** Fatty acid composition of glycerophospholipids and neutral lipids in six different tissues of halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed capelin at constant temperature. *Fisk. Dir. Skr. Ser Ernaering* 5: 99-109.
- LIE Ø., HAALAND H., HEMRE G-I., MAAGE A., LIED E., ROSEN LUND G., SANDNES K. and OLSEN Y. 1997.** Nutritional composition of rotifers following a change in diet from yeast and emulsified oil to microalgae. *Aquacult. Int.* 5: 427-438.
- LINARES F. and HENDERSON R.J. 1991.** Incorporation of <sup>14</sup>C-labelled polyunsaturated fatty acids by juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) in vivo. *J. Fish Biol.* 38: 335-347.

- LISSIA FRAU A.M. 1964.** Osservazioni sul differenziamento sessuale di *Dentex dentex* (L). (Teleostei, Sparidae). *Boll. Zool.* 31: 783-747.
- LO BIANCO S. 1909.** Notizie biologiche riguardanti specialmente il periodo di maturita sessuales degli animali del Golfo di Napoli. *Mitt. Zool. Neapel* 19: 513-761.
- LOIR M., Le GAC F., SOMARAKIS S. and PAVLIDIS, M. 2001.** Sexuality and gonadal cycle of the common dentex (*Dentex dentex*) in intensive culture. *Aquaculture* 194: 363-381.
- LOURENÇO S., BARBARINO E., MANCINI-FILHO J., SCHINKE K. and AIDAR E. 2002.** Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in bath culture: an evaluation for aquaculture. *Phycologia* 41 (2): 158 – 168.
- LOVELL R.T. 1980.** Nutrition and Feeding. In: *Fish farming handbook*, Brown E.E. and Gratzek J. (Eds.): 207-236 pp. Avi Publishing co., Westport, CT.
- LOVELL R.T. 1987.** Requerimientos minerales de los peces. En: *Nutrición en Acuicultura* (CAICYT). Espinosa de los Monteros J. y Labarta U. (Eds.). Vol. II: 281-288 pp. Madrid.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. 1951.** Method for the quantitation of quantities of protein. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- LUBZENS E. and ZMORA O. 2003.** Production and nutritional value of rotifers. In: *Live feeds in marine aquaculture*, Støttrup J.G. and McEvoy L.D. (Eds.), Cap. 2: 17-64 pp. Blackwell Publishing, Oxford – UK.
- MADRID J.A. y ZAMORA S. 1995.** Ritmos metabólicos y su repercusión sobre la nutrición y alimentación de los peces. *Actas Congreso Nal. Acuicult.* V: 28-37.
- MANICKAM R., VISWANATHAN K. and MOHAN M. 1994.** Effect of probiotics in broiler performance. *Ind. Vet. J.* 71: 737-739.
- MARTÍNEZ M.I., ALARCÓN F.J., MOYANO F.J., DEHESA M.R. and GARCÍA A. 1997.** Evolución del equipamiento enzimático digestivo a lo largo del desarrollo larvario del dentón (*Dentex dentex*). *Actas Congreso Nacional de Acuicultura* Vol. VI: 509-537, Cartagena.
- MARTÍNEZ-TAPIA C., FERNÁNDEZ-PATO C. and CHEREGUINI O. 1990.** Comparative study of larvae survival and growth in sea bream (*Pagellus bogaraveo* B.) using microencapsulated or living feed. *ICES, Mariculture Commite., Technical Publication*, C.M. 1990, F31: 4 p.

- MARUYAMA I., NAKAO T., SHIGENO I., ANDO Y. and HIRAYAMA K. 1997.** Application of unicellular algae *Chlorella vulgaris* for the mass-culture of marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia* 358: 133-138.
- MATSUYAMA H., MANGINDAAN R.E. and YANO T. 1992.** Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. Infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture* 101: 197-203.
- MAY R.C. 1974.** Larval mortality in marine fishes and the critical period concept. In: The early life history of fish, Blaxter, J.H.S. (Ed.). 3-19 pp. Springer, New York.
- MARGALEF R. 1983.** *Limnología*: 77-115 y 247-275 pp. Editorial Omega, Barcelona.
- MARGALEF R. 1989.** *Ecología*: 103-111 pp. Editorial Omega, Barcelona.
- McEVOY L.A., NAVARRO J.C., HONTORIA F., AMAT F. and SARGENT J.R. 1996.** Two novel Artemia enrichment diets containing polar lipid. *Aquaculture* 144: 339-352.
- McEVOY L.A., NAVARRO J.C., BELL J.G. and SARGENT J.R. 1995.** Autoxidation of oil emulsions during the Artemia enrichment process. *Aquaculture* 134: 101-112.
- MÉNDEZ E., ANASTASIADIS P., KENTOURI M., PAVLIDIS M. and DIVANACH P. 1995.** Preliminary data on spawning activity of five mediterranean teleosts species kept in captivity in Crete (Greece). In: *Actas Congreso Nal. Acuicult.*, Castelló F. and Calderer A. (Eds.), Vol. V: 398-403. S. Carles de la Rápita, 1995. Universitat de Barcelona, Spain.
- MELLINGER J. 1995.** L'utilisation des lipids au cours du developpement des poissons. *L'Année Biologique* 34: 137-168.
- METAILLER R. and HOLLOCOU Y. 1991.** Incorporation de quelques probiotiques dans l'alimentation du juvenile de bar (*Dicentrarchus labrax*). Biarritz (France). *Fish Nutrition in Practice*: 429-432 pp.
- MIHELAKAKIS A. and TZOUMAS A.S. 1998.** Integrated fish fanning in the Mediterranean: Case study of NIREUS, Chios aquaculture S.A. in Greece. Charting the Future of Ocean farming Hawaii Univ., Manoa-USA. Sea-Grant-Coll. Program 1998: 358 p.
- MOAL J., SAMAIN J.F. and Le COZ J.R. 1978.** C/N et controle de la physiologie des cultures de phytoplankton. In: *Physiology and Behaviour of marine Organisms*.

*Proceeding 12<sup>th</sup> Environmental Biology Symposium: 7-14 pp.* McLusky D.S. and Berry A.J. (Eds.), Pergamon Press. London.

**MONTERO D., TORT L., IZQUIERDO M.S., ROBAINA L. and VERGARA J.M. 1998.** Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead sea bream caused by alpha-tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. *Fish Physiol. Biochem.* 18: 399-407.

**MORAIS S., NARCISO L., DORES E. And POUSÃO-FERREIRA P. 2004.** Lipid enrichment for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae; effect on larval growth, survival and fatty acid profile. *Aquaculture International* 12: 281-298.

**MORALES A.E. y OLIVA-TELES A. 1995.** Resultados preliminares sobre la utilización metabólica de dietas con dos niveles lipídicos en lubina (*Dicentrarchus labrax*). En: *Actas Congreso Nal. Acuicult.: Vol V: 570-575*, S. Carles de la Rápita. Castelló F. y Calderer A. (Eds.). Universitat de Barcelona. Spain.

**MORALES-NIM B. and MORANTA J. 1997.** Life history and fishery of the common dentex (*Dentex dentex*) in Mallorca (Balearic Islands, Western Mediterranean). *Fish Res.* 30: 67-76.

**MOROZ I.Y. and LUZHIN B.P. 1976.** Dynamics of metabolism in the embryonic and early post-embryonic development of the carp (*Cyprinus carpio*). *J. Ichthyol.* 16: 964-970.

**MOURENTE-CANO G. 1989.** Estudio sobre la nutrición larvaria del pez teleosteo marino Dorada (*Sparus aurata* L.) en cultivo. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Depto. de Bioquímica y Biología Molecular.

**MOURENTE G. CARRASCOSA M.A., VELASCO C. and ODRIOZOLA J.M. 1989.** Effect of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) broodstock diets on egg lipid composition and spawning quality. *EAS Spec. Publ.* 10: 179-180.

**MOURENTE G. and ODRIOZOLA J.M. 1990 a.** Effect of broodstock diets on lipid classes and their fatty acid composition in eggs of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) *Fish Physiol. Biochem.* 8(2): 93-101.

**MOURENTE G. and ODRIOZOLA J.M. 1990 b.** Effect of broodstock diets on total lipids and fatty acid composition of larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Physiol. Biochem* 8(2): 103-110.

- MOURENTE G. and TOCHER D.R. 1993.** Incorporation and metabolism of  $^{14}\text{C}$  – labeled polyunsaturated fatty acids in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in vivo. *Fish Physiol. Biochem.* 10(6): 443-453.
- MOURENTE G., RODRÍGUEZ A., TOCHER D.R. and SARGENT J.R. 1993.** Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) on lipid and fatty acid compositions and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae during first feeding. *Aquaculture* 112: 79-98.
- MOURENTE G. and TOCHER D.R. 1999.** Estudio de los requerimientos de Ácidos Grasos Altamente Insaturados *n-3* y el estatus antioxidante en larvas de *Dentex Dentex* alimentadas con dieta de *Artemia*. *Aquaculture* 179: 291-307.
- MOURENTE G., TOCHER D.R., DOUGLAS R., DÍAZ E., GRAU A. and PASTOR E. 1999.** Relationships between antioxidants, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products during early development in *Dentex dentex* eggs and larvae. *Aquaculture* 179: 309-324.
- MOYANO F.J., DÍAZ M., ALARCÓN F.J. and SARASQUETTE M.C. 1996.** Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 15(2): 121-130.
- MUIR, J. 1996.** Mediterranean Aquaculture: crisis of Challenge? In: Proceedings of the VIII Annual conference of the European Association of Fisheries Economists: 31- 43 pp. Barcelona, Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. (Ver 111).
- MULLER-FEUGA A., MOAL J. and KAAS R. 2003 a.** The microalgae of aquaculture. In: Live feeds in marine aquaculture, Chapter 6, Støttrup J.G. and McEvoy L.A. (Eds.), Blackwell Science, Oxford - U.K.
- MULLER-FEUGA A., ROBERT R., CAHU C., ROBIN J. and DIVANACH P. 2003 b.** Uses of microalgae in aquaculture. In: Live feeds in marine aquaculture, Chapter 7, Støttrup J.G. and McEvoy L.A. (Eds.), Blackwell Science, Oxford - U.K.
- MUNILLA R., FERREIRO M.J., FERNÁNDEZ-REIRIZ M.J., LABARTA U. and PLANAS M. 1993.** Effect of environmental factor on lipid digestion during early turbot (*Scophthalmus maximus*) development. In: Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development, Walter B.T. and Fhyn H.J. (Eds.): 167-171 pp. Bergen University, Norway.
- MURAI T., YAGISAWA I., HIRASAWA Y., AKIYAMA T. and NOSE, T. 1980.** Protein, fat and carbohydrate sources of practical diet for fingerling chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Aquaculture* Vol 1: 79-86.

- MYKLESTAND S. and HUNG A. 1972.** Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 9: 125-136.
- NAKAGAWA H. 1970.** Studies on rainbow trout egg (*Salmo gairdneri irideus*) II. Carbohydrate in the egg Protein, *J. Fac. Fish Anim. Husb. Hiroshima Univ.* 9: 57-63.
- NAVARRO J.C. 1990.** Caracterización de las cepas españolas de *Artemia* desde el punto de vista de su valor nutritivo y de sus fenotipos electroforéticos. Implicaciones prácticas en Acuicultura. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia.
- NAVARRO-TÁRREGA J.C. 1999.** Estado actual del uso de presas vivas en acuicultura marina: consideraciones sobre la utilización de nauplios de *Artemia*. *Aulas del Mar – Acuicultura, Cultivo y Alimentación de Peces, Capítulo 5*: 82-99. Zamora S. (Ed.), Universidad de Murcia, Cartagena.
- NAVARRO J.C., AMAT F. and SARGENT J.R. 1991.** Fatty acid composition of coastal and inland *Artemia* sp. populations from Spain. *Aquaculture* 102: 219-230.
- NAVARRO-TÁRREGA J.C., JAMES-HENDERSON R., McEVOY L.A., BELL M.V. and AMAT F. 1999.** Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture* 174: 155-166.
- NAVARRO J.M., BELMONTE A. y CULMAREX S.A.L. 1987.** Cultivo de serio la en jaulas flotantes en la bahía de “El hornillo” (Murcia, España). *Cuad. Marisq. Públ. Tec.* Vol. 12: 11-16.
- NAVAS-ANTÓN J.M. 1997.** Efecto del contenido lipídico de las dietas administradas a reproductores de lubina (*D. labrax L.*) sobre el proceso reproductor y sobre la calidad y composición de los huevos. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia - Facultad de Ciencias Biológicas. 198 p.
- NAVAS J.M., BRUCE M., THRUSH M., FARNDAL B.M., BROMAGE N., ZANUY S., CARRILLO M., BELL J.G. and RAMOS J. 1997.** The impact of seasonal alternation in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the European sea bass. *Jor. Fish Biol.* Vol. 51: 760-773.
- N.R.C. (National Research Council) 1981.** Nutrient requirements of coldwater fishes. National Academy Press, Washington, D.C.
- NIKL L., ALBRIGHT L.J. and EVELYN T.P.T. 1991.** Influence of seven immunostimulants on the immune response of coho salmon to *Aeromonas salmonicida*. *Dis. Aquat. Org.* 12: 7-12.

- NIKL L., EVELYN T.P.T. and ALBRIGHT L.J. 1993.** Trials with an orally and immersion-administrated  $\beta$ -1, 3 glucan as an immunoprophylactic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus ishawyscha*. *Dis. Aquat. Org.* 17: 191-196.
- NOESKE T.A. and SPIELER R.E. 1983.** Photoperiod and dial variations of serum cortisol, thyroxine and protein in goldfish (*Carassius auratus*). *J. Fish biol.* 23: 705-710.
- NOUSIAINEN J. and SETÄLÄ J. 1993.** Lactic acid bacteria as animal probiotics. Salminen S. And Von Wright A. (Eds.), Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker. New York. 315-356 pp.
- NOYA M., MAGARIÑOS B. y LAMAS J. 1995.** La administración intraperitoneal y oral de glucano afecta al sistema inmune no específico y a la resistencia de la dorada (*Sparus aurata*), a la pasteurelosis. En: *Actas Congreso Nal. Acuicult.* Vol. V: 734-738.
- OGINO C. and CHEN M.S. 1973.** Protein nutrition in fish 3. Apparent and true digestibility of dietary proteins in carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 39: 649-651.
- OGINO C., CHIOU, J.Y. and TAKEUCHI T. 1975.** Protein Nutrition in Fish IV. Effect of dietary energy sources on proteins by rainbow trout and carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 42: 213-218.
- OLMEDO M., LINARES F., RUIZ N., ALVAREZ-BLAZQUEZ B., PELETEIRO J.B., ORTEGA A. y RODRÍGUEZ J.L. 1997.** Preengorde de alevines de besugo (*Pagellus bogaraveo* B.) nacidos en cautividad. *Actas Congreso Nal. Acuicult.*: 885 – 890 pp, Cartagena.
- OKANAMOTO R. 1969.** Rearing of red sea bream larvae. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 35: 563-566.
- PAQUOTTE P. 1998.** New species for Mediterranean aquaculture: It is an answer to the market demand for differentiated products? In: *33rd International Symposium on New Species for Mediterranean Aquaculture.* Alghero (Italy), April 1998. (Book abstracts).
- PASCUAL E. y YUFERA M. 1987.** Alimentación en el cultivo larvario de peces marinos. En: "Alimentación en Acuicultura" (CAYCYT), Espinosa de los Monteros J. y Labarta U. (Eds.): 251-293 pp.
- PASTOR E., RIERA F., POU S., GRAU A.M. and GRAU A. 1995.** A summary of investigations on reproduction and larval rearing of common dentex (*Dentex dentex* L.), *ICES Mar. Sci. Symp.* 201: 148-152.



- PASTOR E., GRAU A., MASSUTI E., SALA R. y SAMPERA C. 1997.** Aspectos reproductivos, desarrollo embriológico y larvario del dentón (*Dentex dentex*) bajo condiciones controladas. En: *Actas VI Congreso Nal. Acuicult.*, de Costa J., Abellán E., García B., Ortega A. y Zamora S. (Eds.): 429 – 434 pp, Cartagena.
- PASTOR E., GRAU A., RIERA F., PUO S. and GRAU A.M. 2000.** Experiences in the culture of news species in the “Estación de Acuicultura” of the Balearic Government (1980-1998). *Cahiers. Options Méditerr.* 47: 371-379.
- PATIL V., KÄLLQVIST T., OLSEN E., VOGT G. and GISLERØD H.R. 2007.** Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture Int.* 15: 1-9.
- PAVLIDIS M. 1999.** El Dentón una nueva especie para la acuicultura. AquaFlow (F AIR 0407). Red Europea para la difusión de la Información I+D sobre Acuicultura. [Http://aquatic.unizar.es/cgi-bin/cgiAquaFlow](http://aquatic.unizar.es/cgi-bin/cgiAquaFlow). 2 p.
- PAVLIDIS M., LOIR M., FOSTIER A., MOLSA H. and SCOTT A. 2000.** Recent advances in reproductional aspects of *D. dentex* L. FAO/CIHEAM/IEO. *Cahiers. Options Medit.* Vo1. 47: 169-176.
- PAVLIDIS M.A. and MYLONAS C. 2011.** Sparidae: Biology and Aquaculture of Gilthead sea bream and other species. Wiley – Blackwell, Oxford – UK.
- PICKERING A.D. 1993.** Growth and stress in fish production. *Aquaculture* 111 (1-4): 51-63.
- PIORRECK M., BAASCH K.H. and POHL P. 1984.** Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry* 23(2): 207-216.
- PLANAS M. and CUNHA I. 1999.** Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture* 177: 171-190.
- PELETEIRO J.B., OLMEDO M., CAL R.M. and GÓMEZ C. 1994.** Growth under laboratory conditions of wild juvenile black-spot sea bream (*Pagellus bogaraveo* E.). *Aquaculture Europe* Vol. 18(4): 6-10.
- PORRELLO S., ANDALORO F., VIVONA P. and MARINO G. 1992.** Rearing trial of yellowtail (*Seriola dumerilii*) in floating cage. In: *Rèsumès du Colloque Scientifique sur la Pisciculture Intensive et Environnement*, *Aquaculture* 22 p. Bordeaux.

- POUSÃO-FERREIRA P., MORAIS S., DORES E. and NARCISO L. 1999.** Eggs of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) as a potential enrichment product of *Brachionus sp.* in the larval rearing of gilthead sea bream *Sparus aurata* L. *Aquaculture Research* 30: 751-758.
- RADÜNZ – NETO J., CORRAZE G., CHARLON N. and BERGOT P. 1994.** Lipid supplementation of casein-based purified diets for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* 128: 153-161.
- RAINUZZO J.R. 1993.** Lipids in early stages of marine fish. Thesis of Dr. Scientiae Degree. Institute of Chemistry. University of Trondheim, Norway.
- RAINUZZO J.R., OLSEN Y. and ROSEN LUND G. 1989.** The effect of enrichment diets on the fatty acid composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 79: 157-161.
- RAINUZZO J.R., FARESTVEIT R. and JORGENSEN L. 1993.** Fatty acid and amino acid composition during embryonic and larval development in plaice (*Pleuronectes platessa*). In: Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development, Walther B.T. And Fhyn H.J. (Eds.): 290-295 pp. Bergen University, Norway.
- RAINUZZO J.R., REITAN K.I., JORGENSEN L. and OLSEN Y. 1994.** Lipid composition in turbot larvae fed live feed cultured by emulsions of different lipid classes. *Comp. Biochem. Physiol.* 107A: 699-710.
- RAINUZZO J.R., REITAN K.I. and OLSEN Y. 1997.** The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture* 155: 103-115.
- RANA K. 1997.** Recent trends in global aquaculture industry trends in production, markets and marketing. In marketing of Aquaculture Products. Proceedings of the Seminar of the SELAM Network of the CIHEA Thessaloniki (Greece), October 1995. IHEAM/IMBC, Zaragoza. *Options Méditer, Série Cahiers* Vol. 17: 93-102.
- REITAN K.I., RAINUZZO J.R., ØIE G. and OLSEN Y. 1993.** Nutritional effects of algal addition in first feeding of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). In: Lipids in early stages of marine fish, Rainuzzo J.R., Thesis Dr. Scient. Degree.
- REITAN K., RAINUZZO J.R. and OLSEN Y. 1994.** Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J. Phycol.* 30: 972-979.
- REITAN K.I., RAINUZZO J.R., ØIE G. and OLSEN, Y. 1997.** A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture* 155: 207-221.

- RENOBELL J., SALA R., PASTOR E., GRAU A. y CRESPO S. 1999.** Crecimiento de la larva del dentón (*D. dentex*) durante la fase de Artemia: efecto del nivel de ácidos grasos n-3. *VII Congreso Internacional de Acuicultura*: 334 - 339. Las Palmas de Gran Canaria.
- RIERA F., PASTOR E., GRAU A.M., POU S., GRAU A. and MASSUTI E. 1993.** Experiencias en el cultivo del dentón. En: *Actas IV Congreso Nal. Acuicultura*, Cerviño A., Landin A., de Coa A., Guerra A. y Torre M. (Eds.): 143-148 pp. Centro de Investigaciones Marinas. Pontevedra, España.
- RIERA F., PASTOR E., GRAU A.M., MASSUTI A., VALENCIA J.M., PALMER G. y POU S. 1995.** Resultados preliminares del engorde del dentón (*D. dentex*) en jaulas flotantes con diferentes tipos de dieta. En: *Actas V Congreso Nal. Acuicultura*, Castelló F. y Calderer A. (Eds.), Vol. V: 606-611, S. Carles de la Rápita, Universitat de Barcelona, Spain.
- RIGOS G., GRIGORAKIS K., NEGAS I., CHRISTOPHILOGIANNIS P., YIAGNISI M., KOUTSODIMOU M., ANDRIOPOULOU A. and ALEXIS M. 1998.** Stress-related pathology seems a significant obstacle for the intensive farming of common dentex (*Dentex dentex* L.). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 18: 15-18.
- ROBAINA L. and IZQUIERDO M.S. 2000.** Methodological strategies for the determination of nutrient requirements in finfish. *Cahiers Options Méditerran.* Vol 47: 25-41.
- ROBERTSEN B., ROERSTAD G., ENGSTAD R. and RAA J. 1990.** Enhancement on non specific disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Fish Diseases* 13: 391-400.
- RODRÍGUEZ C., IZQUIERDO M.S., MORA J., LORENZO A. and FERNÁNDEZ – PALACIOS H. 1993.** Essential fatty acid requirements of larval gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture and Fisheries Management* 24: 295 – 304.
- RODRÍGUEZ C., PÉREZ J.A., LORENZO A., IZQUIERDO M.S. and CEJAS J.R. 1994.** HUFA n-3 requirement of larval gilthead sea bream (*Sparus aurata*) when using high levels of eicosapentaenoic acid. *Comp. Biochem. Physiol.* 107A: 693-698.
- RODRÍGUEZ C., PÉREZ J.A., DÍAZ M., IZQUIERDO M.S., FERNÁNDEZ-PALACIOS H. and LORENZO A. 1997.** Influence of the EPA/DHA ratio in rotifers on gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larval development. *Aquaculture* 150: 77-89.
- RODRÍGUEZ C., PÉREZ J.A., BADÍA P., IZQUIERDO M.S., FERNÁNDEZ-PALACIOS H. and LORENZO-HERNÁNDEZ A. 1998.** The n-3 highly

unsaturated fatty acids requirements of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae when using an appropriate DHA/EPA ratio in the diet. *Aquaculture* 169: 9-23.

**RONNESTAD I., HEMRE G.I. and LIE O. 1998 a.** Alternative sources and dynamics of vitamin A and its incorporation into the eyes during the early endotrophic and exotrophic larval stages of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.), *Comp. Biochem. Physiol.* A119: 787-793.

**RONNESTAD I., HELLAND S. and LIE O. 1998 b.** Feeding Artemia to larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) results in lower larval vitamin A content compared with feeding copepods. *Aquaculture* 165: 159-164.

**ROSENTHAL H. and ALDERDICE D.F. 1976.** Sublethal effects of environmental stressors, natural and pollutional, on marine fish eggs and larvae. *J. Fish. Res. Board Can.* 33: 2047-2965.

**RUEDA F.M. 2002.** Estudio del ayuno como desencadenante del crecimiento compensatorio en el *Pagrus pagrus* L. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, 393 p.

**RUEDA F.M. and MARTÍNEZ F.J. 2001.** A review on the biology and potential aquaculture of *Dentex dentex* L. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 11: 57-70.

**RUZZANTE D.E. 1994.** Domestication effects on aggressive and schooling behavior in fish. *Aquaculture* 120 (1-2): 1-24.

**SAKAMOTO K., OKIMASU E. and AMEMURA A. 1998.** Dietary value of rotifers *Brachionus rotundiformis* cultured with *Synechocystis* sp. SY-4 for larvae Red Seabream *Pagrus major* and Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science* 64 (5): 722 – 726.

**SALHI M., KOLKOVSKI S., IZQUIERDO M.S. And TANDLER A. 1995.** Inclusion of lecithin and polar or neutral lipids high in n-3 HUFA in microdiets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. In: Larvi' 95. Lavens P., Jaspers E. And Roelants I. (Eds.). *EAS Special Publication* N° 24: 184-187, Gent.

**SALHI M., IZQUIERDO M.S., HERNÁNDEZ-CRUZ C.M., BESSONART M. and FERNÁNDEZ-PALACIOS H. 1999.** Effect of different dietary polar lipid levels and different n-3 HUFA content in polar lipids on the gut and liver histological structure of sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 179: 253-264.

**SÁNCHEZ-VAZQUEZ, MARTÍNEZ M., ZAMORA S. and MADRID J.A. 1994.** Design and performance of an accurate demand feeder for the study of feeding behaviour in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Physiology and Behavior* 56 (4): 789-794.

- SÁNCHEZ-MUROS LOZANO M.J. 1999.** Efecto del estrés en peces. En: *Aulas del Mar I: cultivo y alimentación de peces*, Capítulo 4: 66-79. Zamora S., Martínez-López F. y Pérez Llamas F. (Eds.), Cartagena. Universidad de Murcia Ediciones.
- SANTAMARÍA C.A., SALA R., GRAU A., PASTOR E. y CRESPO S. 1999.** Aspectos cuantitativos del crecimiento y desarrollo de la larva de dentón (*Dentex dentex*). En: *VII Congreso Internacional de Acuicultura: 242-247*. Las Palmas de Gran Canaria.
- SANTINHA P.J.M., GOMES E.F.S. and COIMBRA J.O. 1996.** Effects of protein level of the diet on digestibility and growth of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.), *Aquaculture Nutrition* 2: 81-87.
- SARGENT J.R. 1995.** Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. In: *Broodstock management and egg and larval quality*, Bromage N.R. and Roberts R.J. (Eds.): 353-372 pp. Blackwell Science, Oxford-U.K.
- SARGENT J.R., HENDERSON R.J. and TOCHER D.R. 1989.** The lipids. In: *fish nutrition*, Halver J. (Ed.): 153-218 pp. Academic Press, New York, 2<sup>a</sup> Ed.
- SARGENT J.R., BELL D.G., BELL M.V., HENDERSON R.J. and TOCHER D.R. 1993.** The metabolism of phospholipids and polyunsaturated fatty acids in fish. In: *Aquaculture. Fundamental and applied research. Coastal and Estuarine Studies*. Lahlou B. and Vitiello P. (Eds.) 43: 103-124 pp. American Geophysical Union, Washington D.C.
- SARGENT J.R., BELL J.G., BELL M.V., HENDERSON R.J. and TOCHER D.R. 1995.** Requirement criteria for essential fatty acids (EFA). *J. Appl. Ichthyol.* 11: 183-198.
- SARGENT J.R., McEVOY L.A. And BELL J.G. 1997.** Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155: 117-127.
- SARGENT J.R., BELL J.G., McEVOY L., TOCHER D. and ESTÉVEZ A. 1999 a.** Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 179: 191-199.
- SARGENT J.R., McEVOY L., ESTEVEZ A., BELL G., BELL M., HENDERSON J. and TOCHER D. 1999 b.** Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179: 217-229.

- SARGENT J.R., TOCHER D.R. and BELL 2002.** The lipids. In: Fish Nutrition, Halver H.E. and Hardy R.W. (Eds.): 181-257. Elsevier, Academic Press, New York, 3<sup>rd</sup> Ed.
- SEGNER H., ROSCH R., SCHMIDT H. and Von POEPPINGHAUSEN J. 1989.** Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus* L. *J. Fish Biol.* 35: 249-263.
- SEGNER H., RÖSCH R., VERRETH J. and WITT U. 1993.** Larval nutritional physiology: studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. *J. World Aquacult. Soc.* 24: 121-133.
- SCHNEIDER M., BAUCHOT M.L. and FISCHER W. 1987.** Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et mer noire. Zone pêche 37, Vol. 1, 760 p.
- SHIELDS, R.J. 2001.** Larviculture of marine finfish in Europe. *Aquaculture* 200: 55-88.
- SHIELDS R.J., BELL J.G., LUIZI F.S., GARA B., GROMAGE N.R. and SARGENT J.R. 1999.** Natural copepods are superior to enriched *Artemia nauplii* as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology; relation to dietary essential fatty acids. *J. Nutr.* 129: 1186-1194.
- SHIMA Y., SUZUKI R., YAMAGUCHI M. and AKOYAMA T. 1977.** *Bull. Freshw. Fish. Res. Lab.* 27 (1): 35-48. En: Mourente G. 1989. Estudio sobre la nutrición larvaria del pez teleosteo marino *Sparus aurata* L. en cultivo. Tesis doctoral.
- SMITH C. and REAY P. 1991.** Cannibalism in teleost fish. Reviews in *Fish Biology and Fisheries* 1: 41-64.
- SIRE M.F. and VERNIER J.M. 1981.** Étude ultrastructurale de la synthèse de chylomicrons au cours de l'absorption intestinale des lipides chez la truite. Influence de la nature des acides gras ingérés. *Biol. Cell.* 40: 47-62.
- SIRE M.F., LUTTON C. and VERNIER J.M. 1981.** New views on intestinal absorption of lipids in teleostean fishes: an ultrastructural and biochemical study in the rainbow trout. *J. Lipids Res.* 22: 81-94.
- SITJA-BOBADILLA A., COMPANY R., PUJALTE M.J., GARAY E., ÁLVAREZ-PELLITERO P. and PÉREZ-SÁNCHEZ J. 1999.** Bacterial and parasitic pathogens in cultured *D. dentex* L. *J. Fish Diseases* Vol. 22: 299-309.
- SKALLI A. 2001.** Estudio Fisiológico y Nutricional de una Nueva Especie de Espárido para el Cultivo Intensivo: el Dentón (*Dentex dentex* L). Tesis Doctoral. Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Depto. De Biología y Ecología. 286 p.

- SORGELOOS P. 1980.** The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. In: *The brine shrimp Artemia. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture* Vol. 3, G., Sorgeloos P., Roels O. and Jaspers E.: 25-46. Universa Press, Wetteren.
- SORGELOOS P. and SWEETMAN J. 1993.** Aquaculture success story. *World Aquacult.* 24(1): 4-14.
- SORGELOOS P., COUTTEAU P. and DHERT P. 1998.** Use of brine shrimp, *Artemia* spp, in larval crustacean nutrition: A review. In: *Reviews in Fisheries Science* 6 (1-2): 55-68.
- SORGELOOS P., DHERT P. and CANDREVA P. 2001.** Use of the brineshrimp, *Artemia* spp., in marine fish larvicultura. *Aquaculture* 200: 147-159.
- SPRECHER H., LUTHRIA D.L., MOHAMMED B.S. and BAYKOUSEHVA S.P. 1995.** Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res.* 36: 2471-2477.
- STEPHANIS J. 1996.** Mediterranean aquaculture industry trends in production, markets and marketing. In: *Options Méditer. Série Cahiers* Vol. 17: 93-102. Marketing of Aquaculture Products, Proceedings of the Seminar of the SELAM Network of the CIHEAM, Thessaloniki (Greece), October 1995.
- STEPHANIS J. and DIVANACH P. 1993.** Farming of Mediterranean finfish species. Present status and potentials. In: From Discovery to commercialization, Carrillo M., Dahle L., Morales J., Sorgeloos P., Svennevig N. and Wylban J. (Eds). *European Aquaculture Society, Spec. Publ.* 19: 290-291. Oostende, Belgium.
- STOFFEL W. CHU F. and AHRENS E.H. et al., 1959.** Analysis of long-chain fatty acids by gas-liquid chromatography: micro-method for preparation of methyl esters. *Anal. Chem.* Vol. 31: 307-308.
- SUBASINGHE R.P., BARG U., PHILLIPS M.J., BARTLEY D. and TACON A. 1998.** Aquatic animal health management opportunities within developing countries. *Journal of Applied Ichthyology* 14: 123-129.
- SWEETMAN J.W. 1992.** Larviculture of Mediterranean marine fish species: current status and future trends. *J. World Aquaculture Society* 23 (4): 330-337.
- SUTHERLAND R. 1997.** Review of the economics of potential systems for farmed production of Atlantic halibut. *Aquaculture Europe* 21(4): 6-11 pp.
- TACON A.G.J. and COWEY C.B. 1985.** Protein and amino acid requirements. In: *Fish Energetics*, Tytler A. y Calow P. (Eds.): 155-183 pp. Croom Helm, London.

- TAKEDA T. and YONE Y. 1971.** Studies on nutrition of red sea bream II. Comparison of vitamine B6 requirement level between fish feed a synthetic diet and fish fed beef lever during prefeeding period. *Rep. Fish Res. Lab. Hyushu. Univ.* 1: 37-47.
- TAKEUCHI T., YOKOYAMA H., WATANABE T. and OGINO C. 1978.** Optimum ratio of dietary energy to protein for rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi* 44: 729-732.
- TAKEUCHI T., ARAKAWA T., SATOH S. and WATANABE T. 1992.** Supplemental effect of phospholipids and requirement of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid for juvenile striped jack. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 707-713.
- TAKEUCHI T., TOYOTA M. and WATANABE T. 1992.** Comparison of lipid and n-3 highly unsaturated fatty acid incorporation between *Artemia* enriched with various types of oil by the direct method. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58 (2): 277-281.
- TAKEUCHI T. 1997.** Requerimientos de ácidos grasos en animales acuáticos con énfasis en larvas de peces y alevines. *Reviews in Fisheries Science* 5 (1): 1-25.
- TAKEUCHI T. and WATANABE T. 1997.** Requirement of carp for essential fatty acids. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 43: 541-551.
- TANDLER A., WATANABE T., SATOH S. and FUKUSHO K. 1989.** The effect of food deprivation on the fatty acid and lipid profile of red sea bream larvae (*Pagrus major*). *Br. J. Nutr.* 62: 349-361.
- TARIFEÑO E., CHONG J., TRONCOSO L., GONZÁLEZ P. and CASTRO J. 1996.** The flatfishes (*Paralichthys microps* Gunter, 1881) and (*Paralichthys adspersus* Steindachner, 1867). Potential species for intensive fish culture in Chile. In: Improvement of the commercial Production of Marine Aquaculture Species. Proceedings of a Workshop on Fish and Mollusc Larviculture, Gajardo G. and Coutteau P. (Eds.): 85-95 pp. Santiago - Chile.
- TERNER C. 1979.** Metabolism and energy conversion during early development. In: *Fish Physiology* Vol III. Hoar W.S., Randall D.J. and Brett J.R. (Eds.): 261-278 pp. Academic Press, New York.
- TESHIMA S., KANAZAWA A. and KAKUTA Y. 1986.** *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 52:155-158. En: Mourente G. 1989. Estudio sobre la nutrición larvaria del pez teleosteo marino *Sparus aurata* L. en cultivo. Tesis doctoral.



- TIBALDI E., BERALDO P., VOLPELLI L.A. and PINOSA M. 1996.** Growth response of juvenile dentex (*Dentex dentex L.*) to varying protein level and protein to lipid ratio in practical diets. *Aquaculture* Vol. 139: 91-99.
- TOCHER D.R. and SARGENT J.R. 1984.** Analysis of lipids and fatty acids in ripe roes of some northwest european marine fish. In: *Lipids* 19 (7): 492-499.
- 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: 213-231.
- TULLI F. And TIBALDI F. 1997.** Changes in aminoacids and essential fatty acids during early larval rearing of dentex. *Aquacult. Int.* 5: 229-236.
- UEBERSCHÄR, 1993.** Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. In: *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. Walther B.T. And Fuhn H.J. (Eds.), University Of Bergen, Norway.
- VANBELLE M., TELLER E. and FOCANT M. 1990.** Probiotics in animal nutrition: A review. *Archiv Für Tieramährung* 40 (7): 543-567.
- Van STAPPEN G. 1996.** Introduction, biology and ecology of *Artemia*. In: Manual on the production and use of live food for aquaculture, Lavens P. and Sorgeloos P.C. (Eds.), *FAO Fisheries Technical Paper* Vol. 361: 79-106 pp, FAO - Rome.
- VERAKUNPIRIYA V., WATANABE T., MUSHIAKE K., KIRON V., SATOH S. and TAKEUCHI T. 1997.** Effect of broodstock diets on the chemical components of milt and eggs produced by yellowtail. *Fisheries Science* 62: 610-619.
- VERGARA J.M., FERNÁNDEZ-PALACIOS H., ROBAINA L., AJUNCEY K., de LA HIGUERA M. and IZQUIERDO M.S. 1996.** The effects of varying dietary protein level on the growth, feed efficiency, protein utilization and body composition of gilthead sea bream fry. *Fisheries Science* 62 (4): 620-623.
- VETTER R.D., HODSON R.E. and ALNOLD C. 1983.** *Can. J. Aquat. Sci.* 40: 627-634. In: Mourente G. 1989. Estudio sobre la nutrición larvaria del pez teleosteo marino *Sparus aurata L.* en cultivo. Tesis doctoral.
- VOLKMAN J.K., JEFFREY S.W., NICHOLS P.D., ROGERS G.I. and GARLAND C.D. 1989.** Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128: 219-240.
- VOSS A. REINHART M., SANKARAPPA S. and SPRECHER H. 1991.** The metabolism of eicosapentaenoic acid to docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *J. Biol. Chem.* 266: 19995-20000.

- WANG C.S. and HARTSUCK J.A. 1993.** Bile salt-activated lipase. A multiple function lipolytic enzyme. *Biochem. Biophys. Acta* 1166: 1-19.
- WATANABE T. 1978.** Nutritional quality of live food organisms in dietary lipids in aquaculture. *Japan Soc. Sci Fish.:* 93-111.
- WATANABE T. 1982.** Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 73 B: 3 – 15.
- WATANABE T. 1985.** Importance of the study of broodstock nutrition for further development of aquaculture. In: Nutrition and Feeding in Fish: 395-414 pp. Coweyt C.B., Mackie A.M. And Bellt J.G. (Eds.), Academic Press, London.
- WATANABE T. 1987.** Requerimientos de ácidos grasos y nutrición lipídica en los peces. En: Nutrición en Acuicultura II (CAICYT), Espinosa de los Monteros J. y Labarta U. (Eds.): 99-165 pp. Madrid.
- WATANABE T. 1993.** Importance of docosahexanoic acid in marine larval fish. *J. World Aquaculture Society* 24: 152-161.
- WATANABE T., OOWA F., KITAJIMA C. and FUJITA S. 1978.** Nutritional quality of brine shrimp, *Artemia salina*, as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish. *Bull. Jap. Soc. Sic. Fish.* 44: 115-1121.
- WATANABE T., KITAJIMA C. and FUJITA S. 1983.** Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: A review. *Aquaculture* 34 (1-2): 115-143.
- WATANABE T., ARAKAWA T., KTAJIMA C. and FUJITA S. 1984 a.** Effect of nutritional quality of broodstock diets on reproduction of red sea bream. *Bull. Japan. Soc. Scient. Fish.* 50: 495-501.
- WATANABE T., OHASHI S., ITOH A., KITAJIMA C. and FUJITA S. 1984 b.** Effect of nutritional composition of diets on chemical components of red sea bream broodstock and eggs produced. *Nippon Suisan Gakkaishi* 50: 503-515.
- WATANABE T., ITOH A., MURAKAMI A., TSUKASHIMA Y., KITAJIMA C. and FUJITA S. 1984 c.** Effect of nutritional quality of diets given to broodstock on the verge of spawning on reproduction of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi* 50: 1023-1028.

- WATANABE T., TAKEUCHI T., SAITO M. and NISHIMURA K. 1984 d.** Effect of low Protein – high calory on essential fatty acid deficiency on reproduction of rainbow trout. *Bull. Japan. Soc. Scient. Fish.* 50: 1207-1215.
- WATANABE T., IZQUIERDO M.S., TAKEUCHI T., SATOH S. and KITAJIMA C. 1989.** 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 T., FUJIMURA T., LEE M.J., FUKUSHO K., SATOH S., TAKEUCHI T., YOSHIDA N., KITADA T. And ARAKAWA T. 1991.** Effective components in cuttlefish meal and raw krill for improvement of quality of red sea bream (*Pagrus major*) eggs. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57 (4): 681-694.
- WATANABE T. and KIRON V. 1994.** Prospects in larval fish dietetics. A review. *Aquaculture* Vol. 124(1- 4): 223-251.
- WATANABE T. and KIRON V. 1995.** Broodstock management and nutritional approaches for quality offsprings in the red sea bream. In: Broodstock management and egg and larval quality, Bromage N.R. and Roberts R.J. (Eds.): 395-414 pp. Cambridge University Press.
- WEBB K.L. and CHU F.L. 1982.** Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. In: Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition 2: 272-291 pp. Louisiana State University, Baton Rouge, LA.
- WEDEMEYER F.A. and McLEAY D.J. 1981.** Methods for assessing the tolerance of fish to environmental stressors. *Proc Inter. Conf. Environ. Stress. Fish Soc. British Isles.* Academic Press, London.
- WESTERDAHL A., OLSSON J., KJELLEBERG S. and CONWAY, P. 1991.** Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2223-2228.
- WHYTE J.N.C. 1987.** Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60: 231-241.

- WIKFORS G.H., TWAROG J.W. and UKELE R. 1984.** Influence of chemical composition of algal food sources on growth of juvenile oysters (*Crassostrea virginica*). *Biol. Bull.* 167: 251-263.
- YANO T., MATSUYAMA H. and MANGINDANN R.E.P. 1991.** Polysaccharide Induced protection of carp (*Cyprinus carpio*) against bacterie infection. *J. Fish Diseases* 14: 577-582.
- YONE Y. 1971.** Nutritional studies of red sea bream. In: *Proc. First Int. Conf. Aquaculture Nutrition*: 39-64. University of Delaware, Newark, Delaware.
- YOSHIMATSU T., IMOTO H., HAYASHI M, TODA K. and YOSHIMURA K. 1997.** Preliminary results in improving essential fatty acids enrichment of rotifer cultured in high density. *Hidrobiologia* 358: 153-157.
- YUL-RHEE G. 1978.** Effects of N: P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition and nitrate uptake. *Limnol. Ocenogr.* 23(1): 10-25.
- YU T.C. and SINNHUBER R.O. 1976.** Growth responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to dietary w3 and w6 fatty acids. *Aquaculture* 8: 309 – 317.
- ZAR J.M. 1974.** Biostatistical Analysis. Prentice. Hall. Englewood Cliffs, NJ.