

Nota de Investigación/Research Note

Fatty acid composition of juvenile abalone (*Haliotis tuberculata coccinea*) fed formulated diets containing various n3 HUFA levels

Composición de ácidos grasos en juveniles de abulón *Haliotis tuberculata coccinea* alimentados con dietas formuladas con diferentes contenidos de HUFA n3

P Toledo-Agüero¹, MT Viana²

¹ Departamento de Acuicultura, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile, CEAZA.
E-mail: ptoledo@ucn.cl

² Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, Km 107 Carretera Tijuana-Ensenada, 22860 Ensenada, Baja California, México.

Abstract

The effect of feeding different levels of n3 highly unsaturated fatty acids (HUFA) on the fatty acid profile was evaluated in soft tissue from juvenile *Haliotis tuberculata coccinea*. Five diets were formulated with different oil sources (palm, colza, fish, sunflower, and soybean), containing from 2.52% to 12.33% n3 HUFA, while fresh *Ulva rigida* was used as reference diet. The different diets were provided to groups of 20 abalone during 120 days in independent triplicates. Though no significant differences in growth ($P < 0.05$) were registered among all formulated diets, a tendency to accumulate different fatty acids in muscle was observed. The proximate composition of abalone tissue showed that the diet containing 6.8% HUFA resulted in higher lipid accumulation in muscle tissue than that observed in the other treatments. Our results suggest that *H. tuberculata coccinea*, contrary to abalone species from colder environments, does not have high HUFA requirements; however, the fatty acid profile of muscle and viscera tissues of abalone may be modulated by the fatty acid content in diets.

Key words: abalone, fatty acids, lipids, n3 HUFA, nutrition.

Resumen

Se evaluó el efecto de diferentes niveles de ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs, por sus siglas en inglés) n3 en el perfil de ácidos grasos de los tejidos blandos de juveniles de *Haliotis tuberculata coccinea*. Se formularon 5 dietas con diferentes fuentes de aceite (palma, colza, pescado, semilla de girasol y soya), que contenían de 2.52% a 12.33% de HUFA n3, usando *Ulva rigida* como dieta de referencia. Las diferentes dietas se suministraron a grupos de 20 abulones durante 120 días por triplicado. Aunque no se registraron diferencias significativas en el crecimiento ($P < 0.05$) entre todas las dietas formuladas, se observó una tendencia a acumular diferentes ácidos grasos en el músculo de los organismos. La composición proximal del tejido muscular que la observada en los otros tratamientos. Los resultados de este trabajo sugieren que *H. tuberculata coccinea*, a diferencia de algunas especies de abulón de ambientes más fríos, no requiere HUFAs; sin embargo, el perfil de ácidos grasos de los tejidos muscular y visceral del abulón puede estar regulado por el contenido de ácidos grasos en su dieta.

Palabras clave: abulón, ácidos grasos, HUFA n3, lípidos, nutrición.

Introduction

Abalone aquaculture is growing in order to meet increasing demands, and nutritionally formulated diets are becoming critical to substitute macroalgae as their main feed (Fleming *et al.* 1996, Gordon and Cook 2004, Viana 2006). Even though nutritional requirements have been extensively studied, research efforts are still needed to fully understand the nutritional requirements, feeding mechanisms, feed adaptation, and farm management of every abalone species. Thus, the need of effective formulated feeds is not only important to achieve

Introducción

La acuicultura de abulón está creciendo a fin de satisfacer su creciente demanda, y la investigación de dietas nutricionalmente balanceadas se está volviendo crítica para sustituir a las macroalgas como su principal alimento (Fleming *et al.* 1996, Gordon y Cook 2004, Viana 2006). A pesar de que se han estudiado ampliamente los requerimientos nutricionales de las diferentes especies de abulón, aún se requiere profundizar en la investigación para entender completamente los requerimientos de cada una, así como sus mecanismos de alimentación,

better growth performances in abalone, but also to assure a constant food supply (Dunstan *et al.* 1996).

In southern Europe, for example, the Canarian abalone *Haliotis tuberculata coccinea* R. has been harvested for several years without considering its sustainability (fig. 1; Viera *et al.* 2005). Today there is an increasing interest to culture this species to satisfy local and international markets. Few studies on this species are available, but considering that all other abalone species have shown nutritional needs within a certain range (Fleming *et al.* 1996, Viana 2006), it seems pertinent to start with a feed that covers most of the nutritional requirements needed by any abalone species. In such studies, it has been demonstrated that lipids are important as energy source, stored as triglycerides (Durazo-Beltrán *et al.* 2003a, b). Abalone ingest food to cover their energy requirements with a protein/energy (P/E) ratio of 100 mg protein per calorie, as estimated for *H. fulgens* (Gómez-Montes *et al.* 2003), so it is of importance to supply the amount of energy needed in order to spare protein for growth. Thus, even if a lipid content of 5% in the diet seems to be enough to satisfy their nutritional requirements (Mai *et al.* 1995, Durazo-Beltrán *et al.* 2003a, b), previous experiments suggest that *H. fulgens* has the capacity to desaturate and elongate 18:2n6 and 18:3n3 fatty acids to synthesize the essential highly unsaturated fatty acids (HUFA), 20:4n6 (ARA) and 20:5n3 (EPA), respectively (Durazo-Beltrán *et al.* 2003a, b). The same authors were also able to demonstrate that *H. fulgens* abalone fed a lipid-free diet grow in a similar way than those fed a 5% lipid diet without any

adaptaciones alimenticias y estrategias de manejo acuícola. Por ello, la formulación efectiva de alimentos balanceados no sólo es importante para lograr mejores crecimientos, sino también para asegurar un suministro constante de alimento (Dunstan *et al.* 1996).

En el sur de Europa la explotación del abulón canario *Haliotis tuberculata coccinea* R. se ha llevado a cabo durante muchos años sin considerar su sustentabilidad (fig. 1; Viera *et al.* 2005). Actualmente existe un creciente interés en el cultivo de esta especie para satisfacer mercados locales e internacionales. Existen pocos estudios sobre esta especie de abulón, pero considerando que todas las demás especies han mostrado un rango similar de requerimientos nutricionales (Fleming *et al.* 1996, Viana 2006), se ha considerado pertinente iniciar estudios específicos con un alimento que tenga la mayoría de los nutrientes requeridos por otras especies de abulón. En tales estudios se ha demostrado que los lípidos constituyen una importante fuente de energía almacenada en forma de triglicéridos (Durazo-Beltrán *et al.* 2003a, b). Los abulones ingieren su alimento para cubrir sus necesidades energéticas con una proporción proteína/energía (P/E) de 100 mg de proteína por caloría (estimada para *H. fulgens* por Gómez-Montes *et al.* 2003), por lo que resulta importante suministrar suficiente energía para aprovechar mejor la proteína para el crecimiento. Por ello, aún cuando un contenido de lípidos del 5% en la dieta pueda parecer suficiente para satisfacer sus requerimientos nutricionales (Mai *et al.* 1995, Durazo-Beltrán *et al.* 2003a, b), experimentos previos sugieren que *H. fulgens* es capaz de desaturar y elongar los ácidos grasos 18:2n6 y 18:3n3 para sintetizar los ácidos grasos altamente saturados (HUFAs, por sus siglas en inglés) 20:4n6 (ARA) y 20:5n3 (EPA), respectivamente (Durazo-Beltrán *et al.* 2003a, b). Los mismos autores pudieron demostrar que *H. fulgens* alimentado con una dieta sin lípidos crece de manera similar al alimentado con una dieta con 5% de lípidos, sin que por ello se modifique el perfil de ácidos grasos de su tejido muscular. Esto podría ser un indicio de que los lípidos no son componentes importantes en la dieta del abulón; sin embargo, es crítico suministrar lípidos suficientes para que el abulón aproveche mejor la proteína ingerida para su crecimiento, por lo que es relevante estudiar los requerimientos energéticos de cada una de las especies. Por otra parte, de todos los lípidos, las fuentes de HUFAs como ingredientes de las dietas son las que tienen un impacto en el costo de los alimentos balanceados. Su presencia es importante debido a que los ácidos grasos insaturados de cadena larga propician el flujo a través de las membranas, lo cual es particularmente importante en ambientes más fríos (Sargent *et al.* 2002). En consistencia, los peces marinos de aguas más frías requieren mayores cantidades de HUFA n3 que los peces tropicales. *Haliotis tuberculata coccinea* vive en aguas más cálidas (19–26°C) que la mayoría de las especies de abulón, las cuales habitan en ambientes fríos y necesitan más ácidos grasos poliinsaturados. Por ello, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la composición de ácidos grasos de la dieta en la composición final del tejido muscular y visceral del



Figure 1. Abalone *Haliotis tuberculata coccinea* from the Canary Islands, Spain.

Figura 1. Abulón *Haliotis tuberculata coccinea* de las Islas Canarias, España.

change in their fatty acid profile in muscle tissue. This might suggest that lipids are not important in abalone diets; however, it is critical to supply lipids to spare protein for growth and it is therefore important to study the energy requirements of every single species. On the other hand, of the total lipids, the HUFA sources as feed ingredients do have an impact on the feed cost in formulated diets. Their presence is important since the unsaturated long-chain fatty acids contribute to membrane fluidity, and this is more important in colder environments (Sargent *et al.* 2002). Consistently, marine fish from colder waters need higher amounts of n3 HUFA than tropical fish. *Haliotis tuberculata coccinea* lives in warmer water (19–26°C) than most abalone species that belong to cold environments and have higher needs of polyunsaturated fatty acids. Thus, this study aimed to assess the effect of the diet's fatty acid composition on the final muscle and visceral tissue composition of abalone, by testing formulated diets containing different n3 HUFA levels in juveniles of *H. tuberculata coccinea*.

Material and methods

Diet preparation

Five diets (T₁ to T₅) of equal proximate composition containing different n3 HUFA levels (2.52% to 12.33%) were formulated using palm, colza, fish, sunflower, and soybean oil (table 1). The sardine meal used as protein source was defatted with trichloromethane. All ingredients were pulverized in a mill (Retsch SK100) to a particle size of 200 µm. Fresh *Ulva rigida* was used as a reference diet. The rest of the ingredients were added as previously recommended for other abalone species (Hahn 1989, Gómez-Montes *et al.* 2003). All ingredients were blended with 50% water until a completely homogeneous dough-like mixture was obtained. The diets were then rolled to a thickness of 2 mm, and pieces (10 × 5 mm) were cut and stored in sealed plastic bags at –20°C until required.

Experimental conditions

A total of 334 five-month-old juvenile Canarian abalone (10.17 ± 0.05 mm and 174.0 ± 3.0 mg) were used in groups of 20 individuals for each experimental unit. Abalone were raised as a single batch from an artificial spawning of wild parents, following the method described by Morse *et al.* (1977). Prior to the experimental procedure, all abalone were fed *U. rigida* for 30 days. This seaweed was cultured and enriched in effluents from a fish aquaculture biofilter system at the Instituto Canario de Ciencias Marinas (Taliarte, Spain). Experimental abalone were held in a flow-through tank system with aerated filtered sea-water (salinity = 34) at a flow rate of 0.15 L sec⁻¹ and 22.8 ± 0.5°C. Oxygen and pH were registered weekly, whereas photoperiod (light/dark hours) was measured daily. The light/dark variation during the experimental period ranged from 14.0 to

abulón, probando alimentos balanceados con diferentes niveles de HUFA n3 en juveniles de *H. tuberculata coccinea*.

Material y métodos

Preparación de las dietas

Se formularon 5 dietas (T₁ a T₅) con el mismo contenido proximal pero con diferentes niveles de HUFA n3 (2.52% a 12.33%) usando aceite de palma, colza, pescado, semilla de girasol y soya (tabla 1). La harina de pescado que se utilizó como fuente de proteínas fue desgrasada con triclorometano. Todos los ingredientes se pulverizaron en un molino (Retsch SK100) hasta un tamaño de partícula de 200 µm. Se usó alga marina *Ulva rigida* fresca como dieta de referencia. El resto de los ingredientes fueron agregados como se ha recomendado para otras especies de abulón (Hahn 1989, Gómez-Montes *et al.* 2003). Todos los ingredientes fueron incorporados con 50% de agua hasta obtener una masa homogénea que posteriormente se aplanó a un espesor de 2 mm, se cortó en trozos de 10 × 5 mm, y se almacenó en bolsas selladas a –20°C hasta su utilización.

Condiciones experimentales

Para cada unidad experimental se utilizaron en total 334 abulones canarios juveniles de cinco meses de edad (10.17 ± 0.05 mm y 174.0 ± 3.0 mg) en grupos de 20 individuos. Los abulones fueron criados como un solo lote de un desove artificial de progenitores silvestres siguiendo el método descrito por Morse *et al.* (1977). Antes del experimento todos los abulones fueron alimentados por 30 días con *U. rigida* cultivada y enriquecida con efluentes del biofiltro de un sistema de acuicultura de peces en el Instituto Canario de Ciencias Marinas (Taliarte, España). Los abulones del experimento se mantuvieron en un tanque con sistema de flujo continuo de agua de mar (salinidad = 34, temperatura = 22.8 ± 0.5°C), a razón de 0.15 L seg⁻¹, aereada y filtrada. Se registró el oxígeno y pH cada semana, mientras que el fotoperiodo (horas de luz/oscuridad) se midió diariamente. Durante el experimento el fotoperiodo varió entre 14.0 y 11.1 h d⁻¹ de luz. Durante todo el experimento el contenido de oxígeno en el tanque experimental fue de 7.6 ± 0.1 mg L⁻¹, y el pH de 8.1 ± 0.1. Las unidades experimentales consistieron de tubos individuales de PVC de 19 cm de largo y 10 cm de diámetro, cubiertos con malla por ambos lados, sumergidos dentro de un tanque circular de 2000 L. Cada 20 días se pesó y midió cada abulón usando un calibrador (±0.01 mm) y una báscula (Mettler Toledo AG204, ±0.001 g) digitales. Se tomaron muestras de *Ulva* cada 20 días para determinar su composición proximal, mientras que las dietas formuladas sólo se analizaron una vez. Además, se tomaron 10 abulones de cada unidad experimental al principio y al final del experimento, a los cuales se determinó composición proximal y perfil de ácidos grasos tanto en vísceras como en tejido muscular. Las dietas formuladas fueron suministradas húmedas (50% de

Table 1. Ingredients and proximate composition of formulated diets (T₁₋₅) used to feed *Haliotis tuberculata coccinea*. Several oil sources were used to formulate the diets to contain various n3 HUFA levels. Enriched *Ulva rigida* was used as reference diet (Rd). Values are given in percentage of dry matter.
Tabla 1. Ingredientes y composición proximal de las dietas formuladas (T₁₋₅) usadas para alimentar a *Haliotis tuberculata coccinea*. Se utilizaron diversas fuentes de aceite para formular las dietas con diferentes niveles de HUFA n3. Se usó *Ulva rigida* como dieta de referencia (Rd). Los valores se dan como porcentaje de materia seca.

Ingredients/ Proximate composition	Diets*					
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	Rd
Fish meal	–	20.50	38.00	38.00	38.00	–
Defatted fish meal	38.30	15.60	–	–	–	–
<i>Gelidium</i> spp. meal	9.60	9.53	9.50	9.53	9.53	–
Fish oil	–	–	0.59	–	–	–
Colza oil	3.15	1.69	–	–	–	–
Palm fat	1.05	0.57	–	–	–	–
Sunflower oil	–	–	–	0.59	–	–
Soybean oil	–	–	–	–	0.59	–
Corn starch	15.76	16.32	16.74	16.73	16.73	–
Modified starch	15.76	16.32	16.74	16.73	16.73	–
Gelatine (275 bloom)	13.21	13.00	11.96	11.95	11.95	–
Common ingredients ^a	6.47	6.47	6.47	6.47	6.47	–
Crude protein (%)	44.60	41.48	48.10	42.41	41.32	14.59 ± 1.12
Total lipids (%)	6.28	6.14	5.91	5.68	5.82	4.90 ± 0.70
Ash (%)	14.40	14.59	13.45	14.83	13.92	10.43 ± 0.41
NFE ^b	34.72	37.79	32.54	37.08	38.94	70.08
Gross energy ^c (Kcal g ⁻¹)	4.52	4.46	4.59	4.43	4.46	4.16 ± 0.04
Protein/energy ratio	98.72	93.10	104.81	95.63	92.58	35.02 ± 2.59

* T₁: 2.52% n3 HUFA; T₂: 6.76% n3 HUFA; T₃: 10.79% n3 HUFA; T₄: 12.21% n3 HUFA; T₅: 12.33% n3 HUFA; Rd: enriched *U. rigida*, 9.98% n3 HUFA.

^a Common ingredients: vitamin mixture (2.0%), Stay-C (0.18%), mineral mixture (4.0%), sodium benzoate (0.18%), choline chloride (0.07%), and BHT (0.04%).

^b NFE: nitrogen free extract = 100% – (% crude protein + % total lipids + % ash) (Tacon 1990).

^c Theoretical values: 5.6, 9.5, and 4.1 Kcal g⁻¹ dry weight for protein, lipids, and carbohydrates, respectively (Tacon 1990).

Fish meal, *Gelidium* meal, and fish oil provided by PROAQUA; MAIZENA® Starch; modified starch, Sigma; cow gelatine, Grenetina Diamante; sunflower oil, Orosol; colza oil, RACSA; soy oil, EKO; Premix vitamins, Q-0382-034 Nassa PV; Premix minerals, 100FA239903651 0/1 25; vitamin C, Stay R-C35, Roche; BHT, Sigma.

11.1 light h d⁻¹. Oxygen content in the experimental tank was 7.6 ± 0.1 mg L⁻¹, and pH was 8.1 ± 0.1 throughout the experimental period. The experimental units consisted of individual PVC pipes (19 cm long and 10 cm diameter), with a mesh covering both sides, submerged inside a 2000-L circular tank. Individual length and weight of abalone were measured every 20 days using a digital calliper (±0.01 mm) and a digital balance (Mettler Toledo AG204, ±0.001 g). *Ulva* samples were collected every 20 days to determine their proximate composition, whereas formulated diets were analyzed once. In addition, 10 abalone from each experimental unit were sampled at the start and at the end of the experiment, and their proximate composition and fatty acid profile in both viscera and muscle tissues was determined. Wet formulated diets (50% humidity) were offered at a rate of 5% abalone (wet weight) every night (20:30). All uneaten food was collected the following morning (08:30) and registered as a constant dry weight, whereas fresh *Ulva*, also fed daily, was offered at a rate of 15% abalone (wet

humedad) a una tasa del 5% en peso del abulón (peso húmedo) cada noche (20:30). Todo el alimento que no fue consumido se retiró a la mañana siguiente (08:30) y se registró como peso seco constante, mientras que la *Ulva* fresca también fue suministrada diariamente pero a una tasa del 15% del peso del abulón (peso húmedo). La ingesta de alimento (FI) se determinó como lo reportan López y Viana (1995), siete días antes del pesaje de lo abulones:

$$FI = [G (S/100)] - R \quad (1)$$

donde *G* representa la cantidad de alimento suministrado; *S* la cantidad de alimento recuperado de los contenedores testigos, sin abulón, después de 12 h de inmersión; y *R* es el alimento no ingerido que quedó en los contenedores que contenían a los abulones del experimento. Después se calculó la ingesta media diaria de alimento para cada tratamiento, y ésta se expresó como porcentaje del peso corporal de los abulones. También se registró la ingesta de lípidos y HUFA n3.

weight). Feed intake (FI) was determined as reported by López and Viana (1995) seven days prior to each abalone weighing:

$$FI = [G (S/100)] - R \quad (1)$$

where G represents the amount of offered feed, S is the amount of feed recovered from the blank containers without abalone after 12 h of immersion, and R is the uneaten feed remaining in the containers with the experimental abalone. Mean daily rate of feed intake for each treatment was then calculated and expressed as percentage of body weight of abalone. Lipid and n3 HUFA ingestion was also registered.

Feed conversion efficiency (FCE) was then calculated according to Uki and Watanabe (1992):

$$FCE = \frac{\text{wet weight gain (g)}}{\text{dry weight feed consumed (g)}} \times 100 \quad (2)$$

After 120 days of the feeding experiment, growth was expressed as daily rate of increase in length ($\mu\text{m d}^{-1}$) and weight (mg d^{-1}), and weight gain percentage as follows:

$$\% \text{ weight gain} = \frac{\text{final weight} - \text{initial weight}}{\text{initial weight}} \times 100 \quad (3)$$

Specific growth rate (SGR, $\% \text{ day}^{-1}$) was estimated according to Hopkins (1992):

$$SGR = \frac{\ln w_t - \ln w_i}{t} \times 100 \quad (4)$$

where w_t is the weight at time t and w_i the initial weight.

Chemical analysis

Proximate composition of formulated diets, fresh *Ulva*, and abalone viscera and muscle was determined in triplicate. Percent dry weight was calculated after drying to constant weight at 100°C . Total nitrogen was determined by the Kjeldahl method (AOAC 2000), and multiplied by 6.25 to estimate crude protein content. Gross energy from each diet was calculated from the nutrient composition using the theoretical values reported by Tacon (1990): 5.6, 9.5, and 4.1 Kcal g^{-1} content for protein, lipid, and carbohydrate, respectively. Total lipids were gravimetrically evaluated after chloroform-methanol (2:1, v/v) lipid extraction (Folch *et al.* 1957). Ash content was gravimetrically determined after incinerating the samples for 15 h at 550°C .

Fatty acid methyl esters (FAME) of diets and soft tissue of abalone were prepared according to Christie (1989) by transesterification with 1% sulphuric acid in methanol. FAME were purified using Sep-pack NH_2 filters (Waters SA, Milford, Massachusetts) as described by Fox (1990) and analyzed in a gas chromatograph (Shimadzu GC-14^a, Kyoto, Japan) with a

Después se calculó la eficiencia de conversión alimenticia (FCE) de acuerdo con Uki y Watanabe (1992):

$$FCE = \frac{\text{incremento en peso húmedo (g)}}{\text{peso seco de alimento consumido (g)}} \times 100 \quad (2)$$

Después de 120 días de alimentación experimental se expresó el crecimiento como la tasa diaria de incremento en longitud ($\mu\text{m d}^{-1}$) y peso (mg d^{-1}), y el porcentaje de ganancia en peso de la manera siguiente:

$$\% \text{ ganancia en peso} = \frac{\text{peso final} - \text{peso inicial}}{\text{peso inicial}} \times 100 \quad (3)$$

La tasa específica de crecimiento (SGR, $\% \text{ día}^{-1}$) se estimó de acuerdo con Hopkins (1992):

$$SGR = \frac{\ln w_t - \ln w_i}{t} \times 100 \quad (4)$$

donde w_t es el peso al tiempo t , y w_i es el peso inicial.

Análisis químicos

Las composiciones proximales de las dietas formuladas, la *Ulva* fresca, y las vísceras y el músculo de abulón se analizaron por triplicado. El porcentaje en peso seco se calculó después de secar a 100°C hasta peso constante. El nitrógeno total se determinó mediante el método Kjeldahl (AOAC 2000), y se multiplicó por 6.25 para estimar el contenido de proteína cruda. La energía bruta de cada dieta se calculó a partir de la composición de nutrientes usando los valores teóricos reportados por Tacon (1990): 5.6, 9.5 y 4.1 Kcal g^{-1} de proteínas, lípidos y carbohidratos, respectivamente. Los lípidos totales se evaluaron gravimétricamente tras su extracción con cloroformo-metanol (2:1, v/v; Folch *et al.* 1957). El contenido de cenizas se determinó gravimétricamente tras incinerar las muestras durante 15 h a 550°C .

Los ésteres metílicos de ácidos grasos de las dietas y del tejido blando del abulón se prepararon por transesterificación con ácido sulfúrico al 1% en metanol, de acuerdo con Christie (1989); luego se purificaron usando filtros de NH_2 Sep-pack (Waters SA, Milford, Massachusetts), como lo ha descrito Fox (1990), y se analizaron en un cromatógrafo de gases (Shimadzu GC-14^a, Kyoto, Japón) con detector de ionización de flama y una columna capilar (Omega-wax 320, Supelco/Sigma-Aldrich; 30 m \times 0.32 mm, con película de 0.25 mm de espesor), usando hidrógeno como gas transportador. Los ácidos grasos después fueron analizados, de acuerdo con Izquierdo *et al.* (1990), por área y tiempo de retención usando una muestra estándar de 37 PUFAs, y se reportaron como miligramos de cada ácido graso por gramo de materia seca total (alimento o tejido blando).

flame ionization detector and a capillary column (Omega-wax 320, Supelco/Sigma-Aldrich; 30 m × 0.32 mm, film thickness 0.25 mm), using hydrogen as the carrier gas. The fatty acids were then analyzed according to Izquierdo *et al.* (1990), by the area and retention time using a 37-PUFA standard sample and reported as milligrams of each fatty acid per gram of total dry matter (feed or soft tissue).

Statistical analysis

A one-way analysis of variance was used to evaluate possible differences among formulated diet treatments. Statistical differences between the groups were determined using Tukey's test and reported as statistically significant with a $P < 0.05$ for all biological and biochemical parameters tested. Data expressed as percentage were arcsine transformed prior to analysis.

Results

The proximate composition of formulated diets (table 1) showed similar total lipid content ranging from 5.7% to 6.3%, while the reference diet (Rd) contained $4.9\% \pm 0.7\%$ of total lipids. Diets were designed to contain from 2.52% to 12.33% n3 HUFA through treatments T_1 to T_5 . All formulated diets were isoproteic and isoenergetic (from 41.3% to 48.1% crude protein and from 4.4 to 4.6 Kcal g^{-1} , respectively), while Rd contained $14.6\% \pm 1.1\%$ crude protein and 4.2 ± 0.0 Kcal g^{-1} gross energy.

The complete fatty acid profile for the different diets was determined (table 2). The total n3 HUFA (expressed as mg g^{-1} dry weight) in the formulated diets varied from 1.08 (T_1) to 6.92 (T_4) on a dry weight basis, while the n3 HUFA content in the reference diet was 5.3 ± 4.4 . The EPA/ARA and EPA/DHA ratios were also different among the formulated diets (table 2), with values ranging from 0.05 to 6.2 and from 0.01 to 8.86, respectively, while Rd showed EPA/ARA and EPA/DHA ratios of 4.0 and 1.7, respectively. The n6/n3 ratio ranged from 0.6 to 2.3 in formulated diets, while the value for Rd was 0.4 ± 0.2 .

The formulated diets showed significant differences in their water stability among treatments, referred to as dry matter loss after 12 h of water immersion. The T_2 and T_3 diets lost 9.0%, whereas the rest of the diets lost up to 14.5% (table 3). Feed ingestion, calculated in dry matter, was similar among diets, including the reference group. Even though total lipid ingestion was lower for Rd compared with the formulated diets, the n3 HUFA intake was similar among T_2 , T_3 , and T_5 , and lower than that observed for T_4 , while the n3 HUFA ingestion in T_1 represented at least four times lower ingestion than the rest of the treatments. Moreover, the food conversion efficiency was significant higher for Rd than for the rest of the treatments.

Greatest growth, in weight and length, was observed for the Rd treatment, and it was significantly different to the treatments using formulated diets. No significant differences in specific growth rate and total weight increment were detected

Análisis estadístico

Se utilizó un análisis de varianza de una vía para evaluar las posibles diferencias entre los tratamientos con las diferentes dietas formuladas. Las diferencias estadísticas entre grupos se determinaron con una prueba de Tukey y se reportaron como estadísticamente significativas a un nivel de $P < 0.05$ para todos los parámetros biológicos y bioquímicos probados. Los datos, expresados en forma de porcentajes, fueron transformados a su arco seno para su análisis.

Resultados

La composición proximal de las dietas formuladas (tabla 1) mostró contenidos de lípidos similares, entre 5.7% y 6.3%, mientras que la dieta de referencia (Rd) contuvo $4.9\% \pm 0.7\%$ de lípidos totales. Las dietas fueron diseñadas para contener entre 2.52% y 12.33% de HUFA n3 entre el tratamiento T_1 y el T_5 . Todas las dietas formuladas eran isoproteicas e isoenergéticas (41.3% a 48.1% de proteína cruda y 4.4 a 4.6 Kcal g^{-1} , respectivamente), mientras que Rd contenía $14.6\% \pm 1.1\%$ de proteína cruda y 4.2 ± 0.0 Kcal g^{-1} de energía bruta.

Se determinó el perfil completo de ácidos grasos de las diferentes dietas (tabla 2). El HUFA n3 total (expresado como mg g^{-1} de peso seco) en las dietas formuladas varió entre 1.08 (T_1) y 6.92 (T_4) en base a peso seco, mientras que el contenido de HUFA n3 en la dieta de referencia fue de 5.3 ± 4.4 . Las proporciones EPA/ARA y EPA/DHA también eran diferentes entre las distintas dietas formuladas (tabla 2), con valores entre 0.05 y 6.2, y entre 0.01 y 8.86, respectivamente; mientras que Rd contuvo proporciones EPA/ARA = 4.0 y EPA/DHA = 1.7. La proporción n6/n3 varió de 0.6 a 2.3 en las dietas formuladas, mientras que para Rd ésta fue de 0.4 ± 0.2 .

Las dietas formuladas mostraron diferencias significativas en su estabilidad en el agua entre tratamientos, referida como pérdida de materia seca tras 12 h de inmersión. Las dietas T_2 y T_3 tuvieron una pérdida de 9.0%, mientras que el resto de las dietas perdieron hasta 14.5% (tabla 3). La ingesta de alimento, calculada en materia seca, fue similar entre dietas incluyendo el tratamiento de referencia. A pesar de que la ingesta total de lípidos resultó menor con Rd en comparación con las dietas formuladas, la asimilación de HUFA n3 fue similar para T_2 , T_3 y T_5 , y menor que la observada con T_4 , mientras que la ingesta de HUFA n3 con T_1 resultó al menos cuatro veces menor que en el resto de los tratamientos. Además, la eficiencia de la conversión alimenticia con Rd fue significativamente mayor que con el resto de los tratamientos.

Con Rd se observó el mayor crecimiento en peso y en longitud, y éste fue significativamente mayor que con las dietas formuladas. No se detectaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento específica ni en el incremento total de peso entre los tratamientos con dietas formuladas. Al final del experimento el crecimiento total con Rd había sido de

Table 2. Fatty acid content (mg g⁻¹ dry weight) of experimental diets (T₁₋₅) and enriched *Ulva rigida* (n = 5) as reference diet (Rd) for *Haliotis tuberculata coccinea* (nd = not detected).**Tabla 2.** Contenido de ácidos grasos (mg g⁻¹ peso seco) de las dietas experimentales (T₁₋₅), y la *Ulva rigida* enriquecida (n = 5) usada como dieta de referencia, para *Haliotis tuberculata coccinea* (nd = no detectado).

Fatty acid	Diets*					
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	Rd
18:0	1.98	2.81	4.18	3.77	4.05	1.64 ± 0.68
18:1n9	23.47	17.87	8.86	9.54	6.78	2.56 ± 0.73
18:1n7	7.82	5.96	2.51	2.13	2.30	10.33 ± 3.06
18:2n6	10.06	7.37	3.79	8.78	7.93	2.39 ± 0.83
18:3n6	0.06	0.09	0.17	0.15	0.15	0.14 ± 0.00
18:3n3	3.37	2.29	0.89	0.98	0.47	2.23 ± 0.77
18:4n3	0.08	0.17	0.33	0.29	0.30	0.87 ± 0.47
20:2n6	0.09	0.09	0.16	0.13	0.10	0.14 ± 0.08
20:4n6	0.10	0.26	0.48	0.45	0.52	0.19 ± 0.06
20:3n3	nd	nd	0.07	0.06	nd	0.63 ± 0.13
20:4n3	nd	0.09	0.17	0.15	0.13	0.56 ± 0.73
20:5n3	0.01	0.02	2.72	2.78	3.23	2.31 ± 2.95
22:3n6	nd	0.06	0.14	0.11	0.15	0.07 ± 0.08
22:5n6	nd	0.07	0.11	0.12	nd	nd
22:5n3	0.19	0.33	0.51	0.53	0.18	0.66 ± 0.57
22:6n3	0.89	2.14	2.91	3.40	0.36	0.73 ± 0.51
Total FA mg g ⁻¹	62.26	59.80	59.13	56.69	54.85	48.47 ± 17.27
Σ Saturated	14.23	19.63	27.02	20.93	25.96	13.9 ± 7.02
Σ Monoenoic	33.19	26.88	18.36	16.71	14.33	22.1 ± 5.67
Σ n3	4.53	5.13	7.80	8.36	4.86	8.43 ± 5.31
Σ n6	10.31	7.94	5.01	9.91	9.12	2.75 ± 0.91
Σ n9	23.60	18.02	10.28	10.55	7.45	2.81 ± 1.06
Σ n3 HUFA	1.08	2.57	6.38	6.92	3.89	5.27 ± 4.40
n6/n3	2.28	1.55	0.64	1.19	1.88	0.43 ± 0.21
EPA/ARA	0.05	0.06	5.64	6.19	6.20	3.99 ± 5.47
EPA/DHA	0.01	0.01	0.94	0.82	8.86	1.69 ± 1.85

* T₁: 2.52% n3 HUFA; T₂: 6.76% n3 HUFA; T₃: 10.79% n3 HUFA; T₄: 12.21% n3 HUFA; T₅: 12.33% n3 HUFA; Rd: enriched *U. rigida*, 9.98% n3 HUFA (Rd values are mean ± standard deviation).

among the formulated diet treatments. By the end of the experiment, total growth with Rd was 406.7% (table 3). No significant differences in mortality among treatments were observed throughout the experimental period even though a high variation was registered (30.7–11.1%, table 3).

Significant differences were detected in crude protein contents in viscera, with the lowest values in T₃. In general, lipid content was lower after the experiment for all treatments compared with the initial sample, including Rd (table 4). Ash content in viscera samples resulted in significant differences among treatments, with T₃ showing the highest value (17.9%). Gross energy resulted in significant differences among treatments, where T₃ had the lowest value and T₅ the highest (4.0 and 5.1 Kcal g⁻¹, respectively). On the other hand, muscle tissue showed significant differences in proximate composition (table 4), with T₂ registering the lowest value for crude protein

406.7% (table 3). A lo largo del experimento no se observaron diferencias significativas en la mortalidad entre tratamientos no obstante haberse registrado una gran variación (30.7–11.1%, tabla 3).

Se detectaron diferencias significativas en los contenidos de proteína de las vísceras, con los menores valores para T₃. En general, el contenido de lípidos fue menor después del experimento para todos los tratamientos en comparación con la muestra inicial, incluso con Rd (table 4). El contenido de ceniza en las vísceras mostró diferencias significativas entre tratamientos, con el valor más alto para T₃ (17.9%). La energía bruta también mostró diferencias significativas entre tratamientos, con el menor valor para T₃ y el mayor para T₅ (4.0 y 5.1 Kcal g⁻¹, respectivamente). Por otra parte, el tejido muscular mostró diferencias significativas en su composición proximal (tabla 4), en la que T₂ registró el menor valor de

Table 3. Biological indices of juvenile *Haliotis tuberculata coccinea* abalone after feeding 120 days on formulated diets containing various n3 HUFA levels and enriched *Ulva rigida* as reference diet (Rd). Values (\pm standard deviations) with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).**Tabla 3.** Índices biológicos de los juveniles de abulón *Haliotis tuberculata coccinea* tras ser alimentados por 120 días con dietas con diferentes niveles de HUFA n3, y *Ulva rigida* enriquecida como dieta de referencia (Rd). Los valores (\pm desviación estándar) con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

	Diets*					
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	Rd
Stability (%)	87.03 \pm 0.68 ^b	91.20 \pm 0.86 ^c	91.19 \pm 0.92 ^a	87.48 \pm 0.49 ^b	85.51 \pm 0.52 ^b	–
Feed intake (% body weight)	4.18 \pm 0.47	5.41 \pm 0.55	5.76 \pm 0.69	5.17 \pm 0.50	4.19 \pm 0.57	3.39 \pm 0.64
Lipid intake (mg lipids g ⁻¹ body)	0.24 \pm 0.03	0.29 \pm 0.03	0.31 \pm 0.03	0.27 \pm 0.02	0.22 \pm 0.03	0.21 \pm 0.05
n3 HUFA intake (mg n3 HUFA g ⁻¹ abalone)	0.039 \pm 0.004 ^c	0.13 \pm 0.01 ^b	0.14 \pm 0.01 ^b	0.20 \pm 0.01 ^a	0.17 \pm 0.02 ^b	0.16 \pm 0.09
FCE ^a (%)	72.08 \pm 11.98	64.88 \pm 7.78	48.66 \pm 5.81	70.44 \pm 15.13	95.09 \pm 24.83	256.38 \pm 9.01
Length growth (μ m d ⁻¹)	24.34 \pm 2.90	26.21 \pm 2.21	24.65 \pm 2.18	27.50 \pm 4.32	28.58 \pm 2.55	83.40 \pm 1.26
Weight growth (mg d ⁻¹)	0.82 \pm 0.12	0.98 \pm 0.16	0.77 \pm 0.10	1.01 \pm 0.18	1.13 \pm 0.28	6.25 \pm 0.36
SGR ^b (% d ⁻¹)	0.39 \pm 0.06	0.45 \pm 0.03	0.36 \pm 0.06	0.43 \pm 0.04	0.46 \pm 0.08	1.35 \pm 0.02
Weight increase (%)	60.09 \pm 11.12	71.56 \pm 7.27	54.38 \pm 1.30	68.77 \pm 8.65	75.83 \pm 17.53	406.74 \pm 9.72
Mortality (%)	30.72 \pm 3.64	19.61 \pm 1.96	24.51 \pm 1.68	26.80 \pm 7.54	29.41 \pm 5.88	11.11 \pm 3.21

* T₁: 2.52% n3 HUFA; T₂: 6.76% n3 HUFA; T₃: 10.79% n3 HUFA; T₄: 12.21% n3 HUFA; T₅: 12.33% n3 HUFA; Rd: enriched *U. rigida*, 9.98% n3 HUFA.^a FCE: Food conversion efficiency (weight increase/feed intake) \times 100.^b SGR: Specific growth rate = (ln weight_{final} - ln weight_{initial})/t (days) \times 100.

and the highest for total lipids (66.5% and 1.9%, respectively), showing no change, in both cases, when compared to the initial sample. Ash content was higher in T₁, T₂, and T₃, and the gross energy content in muscle tissue showed significant differences, with T₄ showing the highest content (5.2 Kcal g⁻¹) and T₅ the lowest (4.9 Kcal g⁻¹).

The fatty acid profiles of abalone soft tissue varied among treatments (table 5). T₁ and T₂ showed higher values of 18:4n3 than those observed in the rest of the treatments, while 20:3n3 was detected in higher concentrations in T₂, T₃, T₄, and T₅ when compared with the Rd and T₁ values. The fatty acid 20:4n3 was only observed in the Rd treatment, while ARA (20:4n6) was not detected in soft tissue from T₃ and T₅, and in low quantity from T₄. EPA (20:5n3) resulted in decreasing values (1.0–1.5 mg g⁻¹ d.w.) according to the inclusion of n3 HUFA, except in T₂ (4.6 mg g⁻¹ d.w.). The fatty acid 22:5n3 was found in tissue in higher amounts than that contained in all the formulated treatment diets (from 0.3 to 1.7 mg g⁻¹ d.w.). DHA (22:6n3) was also found in all treatments, ranging from 2.3 to 0.9 mg g⁻¹ d.w. Total saturated fatty acid ranged from 42.3 to 13.6 mg g⁻¹ d.w. among treatments. The presence of total n3 fatty acids ranged from 12.0 to 3.0 mg g⁻¹ d.w., with n3 HUFA contributing from 9.0 to 2.3 mg g⁻¹ d.w. Total n6 fatty acid was 4.3 to 1.7 mg g⁻¹ d.w. for abalone soft tissue. The n6/n3 ratio was 1.0 and 0.3 for T₃ and Rd, respectively. Regarding the fatty acid ratios, the EPA/ARA ratio varied significantly (4.2 to 58.5), whereas the EPA/DHA ratio ranged from 2.2 to 0.8.

proteína cruda y el mayor de lípidos totales (66.5% y 1.9%, respectivamente), manteniéndose en ambos casos iguales a los de la muestra original. El contenido de ceniza fue mayor con T₁, T₂ y T₃, mientras que la energía bruta en el tejido muscular mostró diferencias significativas en las que T₄ tuvo el mayor contenido (5.2 Kcal g⁻¹) y T₅ el menor (4.9 Kcal g⁻¹).

Los perfiles de ácidos grasos del tejido blando de abulón variaron entre tratamientos (tabla 5). T₁ y T₂ mostraron mayores valores del 18:4n3 que los demás tratamientos, mientras que el 20:3n3 se detectó en mayores concentraciones con T₂, T₃, T₄ y T₅, en comparación con Rd y T₁. El ácido graso 20:4n3 sólo se observó en el tratamiento Rd, mientras que el ARA (20:4n6) no fue detectado en el tejido blando de los tratamientos T₃ y T₅, y sólo en poca cantidad en el T₄. EPA (20:5n3) mostró valores decrecientes (1.0–1.5 mg g⁻¹ p.s.) conforme se incluyó HUFA n3, excepto con T₂ (4.6 mg g⁻¹ p.s.). El ácido graso 22:5n3 fue encontrado en el tejido en mayores cantidades que en todas las dietas de tratamientos formulados (de 0.3 a 1.7 mg g⁻¹ p.s.). También se encontró DHA (22:6n3) en todos los tratamientos, en un rango de 2.3 a 0.9 mg g⁻¹ p.s. Los ácidos grasos saturados variaron entre 42.3 y 13.6 mg g⁻¹ p.s. entre tratamientos. La presencia de ácidos grasos n3 totales varió entre 12.0 y 3.0 mg g⁻¹ p.s., de los cuales HUFA n3 contribuyó con entre 9.0 y 2.3 mg g⁻¹ p.s. Los ácidos grasos n6 totales en los tejidos blandos de abulón variaron entre 4.3 y 1.7 mg g⁻¹ p.s. La proporción n6/n3 fue 1.0 para T₃ y 0.3 para Rd. En cuanto a las proporciones entre ácidos grasos, se

Table 4. Proximate composition of viscera and muscle tissues of *Haliotis tuberculata coccinea* abalone before and after being fed (120 days) formulated diets containing various n3 HUFA levels and enriched *Ulva rigida* as reference diet (Rd). Values (mean \pm standard error) are given in percentage of dry matter. Values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Tabla 4. Composición proximal de los tejidos de vísceras y músculo del abulón *Haliotis tuberculata coccinea* antes y después de ser alimentado (120 días) con dietas formuladas con diferentes niveles de HUFA n3, y *Ulva rigida* como dieta de referencia (Rd). Valores (media \pm error estándar) en porcentaje de materia seca. Valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

	Initial sample	Diets*					
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	Rd
Viscera							
Crude protein (%)	48.4 \pm 0.0	48.9 \pm 2.0 ^{ab}	47.6 \pm 0.4 ^{ab}	31.6 \pm 0.1 ^b	49.0 \pm 13.4 ^{ab}	63.6 \pm 2.2 ^a	55.6 \pm 0.4
Total lipids (%)	6.7 \pm 0.0	5.8 \pm 0.1 ^a	5.3 \pm 0.0 ^a	2.7 \pm 0.1 ^b	3.2 \pm 0.1 ^d	3.5 \pm 0.2 ^c	2.1 \pm 0.0
Ash (%)	No data	10.5 \pm 0.3 ^c	14.1 \pm 1.4 ^{ac}	18.1 \pm 0.2 ^a	4.4 \pm 1.7 ^b	3.3 \pm 0.6 ^b	4.8 \pm 0.6
NFE ^a (%)	44.8	34.9	33.0	47.7	43.4	29.7	37.6
Gross energy ^b (Kcal g ⁻¹)	5.2 \pm 0.0	4.7 \pm 0.0 ^{ab}	4.5 \pm 0.0 ^{ab}	4.0 \pm 0.0 ^b	4.8 \pm 0.1 ^{ab}	5.1 \pm 0.1 ^a	4.9 \pm 0.0
Muscle							
Crude protein (%)	75.8 \pm 0.6	68.5 \pm 0.1 ^{ab}	66.5 \pm 0.7 ^b	70.4 \pm 0.8 ^{ab}	78.5 \pm 0.2 ^a	74.0 \pm 1.2 ^{ab}	78.5 \pm 0.7
Total lipids (%)	2.0 \pm 0.0	0.9 \pm 0.0 ^{bc}	1.9 \pm 0.0 ^a	1.4 \pm 0.1 ^b	0.8 \pm 0.0 ^c	1.1 \pm 0.0 ^{bc}	0.9 \pm 0.0
Ash (%)	2.67 \pm 1.1	1.5 \pm 0.2 ^c	2.2 \pm 0.4 ^c	3.4 \pm 0.0 ^b	3.6 \pm 0.1 ^b	8.9 \pm 0.3 ^a	8.6 \pm 0.2
NFE ^a (%)	19.5	29.1	29.3	24.8	17.1	16.0	12.0
Gross energy ^b (Kcal g ⁻¹)	5.3 \pm 0.1	5.1 \pm 0.0 ^{ab}	5.1 \pm 0.0 ^{ab}	5.1 \pm 0.0 ^a	5.2 \pm 0.0 ^{ab}	4.9 \pm 0.0 ^b	5.0 \pm 0.0

* T₁: 2.52% n3 HUFA; T₂: 6.76% n3 HUFA; T₃: 10.79% n3 HUFA; T₄: 12.21% n3 HUFA; T₅: 12.33% n3 HUFA; Rd: enriched *U. rigida*, 9.98% n3 HUFA.

^a NFE: Nitrogen free extract = 100% - (% crude protein + % total lipids + % ash) (Tacon 1990).

^b Theoretical values: 5.6, 9.5, and 4.1 Kcal g⁻¹ dry weight for protein, lipids, and carbohydrates, respectively (Tacon 1990).

Discussion

In this study the growth rates obtained with the different experimental diets resulted in lower values than those observed for the reference treatment (table 1). Previous experiments comparing fresh macroalgae and balanced diets (Viana *et al.* 1993) reported higher growth rates in organisms fed balanced diets than those obtained using fresh algae. Shpigel and Neori (1996) reported that algae from a biofilter were found to have a better nutrient content, resulting in extra abalone growth input (300%) compared with similar algae from a running water culture. Therefore, it should be assumed that the nutrients in the formulated diets did not perform as expected. A lipid content of 5–6% in formulated experimental diets is generally recommended for all abalone species (*Haliotis* spp.) (Fleming *et al.* 1996). In this study, the n3 HUFA content in the formulated diets was from 2.52% to 12.33% (T₁ to T₅, respectively). The aim of designing diets with increasing levels of n3 HUFA is to evaluate their possible effect on abalone performance. Our results showed that fresh alga (Rd) induced better growth. Earlier studies have demonstrated that *H. fulgens* is able to synthesize the highly unsaturated long-chain fatty acids in order to compensate for the effects of cold water (Durazo-Beltrán *et al.* 2003b). Here, several diets with clear differences in fatty acid profiles, especially in the n3 HUFA content, failed to show differences in the fatty acid profile in muscle tissue.

observó una gran variación para EPA/ARA (4.2 a 58.5), mientras que para EPA/DHA varió entre 2.2 y 0.8.

Discusión

Las tasas de crecimiento obtenidas con las diferentes dietas experimentales usadas en este estudio fueron menores que las observadas con el tratamiento de referencia (tabla 1). Comparaciones previas entre organismos alimentados con macroalgas frescas y con dietas balanceadas (Viana *et al.* 1993) han reportado mayores crecimientos entre los alimentados con dietas balanceadas que entre los que ingirieron algas frescas. Shpigel y Neori (1996) encontraron que las algas de un biofiltro tenían un mejor contenido de nutrientes, resultando en un crecimiento adicional (300%) en comparación con algas similares provenientes de un cultivo en agua corriente. Por lo tanto, es de suponer que los nutrientes de las dietas formuladas no funcionaron como se esperaba. Por lo general, para cualquier especie de abulón (*Haliotis* spp.) se recomienda un contenido graso de 5–6% en la formulación de dietas experimentales (Fleming *et al.* 1996). En las dietas formuladas para este estudio se utilizó un contenido de HUFA n3 entre 2.52% y 12.33% (de T₁ a T₅, respectivamente). El objetivo de diseñar dietas con crecientes niveles de HUFA n3 es para evaluar su posible efecto en el desarrollo del abulón. Nuestros resultados muestran que las algas frescas (Rd) indujeron un mejor crecimiento. En estudios

Table 5. Fatty acid content (mg g⁻¹ dry weight) of juvenile *Haliotis tuberculata coccinea* after feeding 120 days on formulated diets containing various n3 HUFA levels and enriched *Ulva rigida* as reference diet (Rd) (nd = not detected).

Tabla 5. Contenido de ácidos grasos (mg g⁻¹ peso seco) de juveniles de *Haliotis tuberculata coccinea* tras ser alimentados por 120 días con dietas formuladas con varios niveles de HUFA n3, y *Ulva rigida* como dieta de referencia (Rd) (nd = no detectado).

Fatty acid	Diets*					
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	Rd
18:0	4.99	5.59	3.61	3.43	2.67	2.00
18:1n9	10.30	9.21	4.45	9.07	5.39	3.09
18:1n7	0.32	2.63	nd	0.84	1.75	2.43
18:2n6	2.77	3.05	2.67	1.92	1.86	0.86
18:3n6	nd	nd	nd	nd	nd	0.03
18:3n3	0.89	1.96	0.13	0.31	0.14	0.99
18:4n3	0.91	1.00	0.25	0.17	0.32	0.32
20:2n6	0.04	0.50	nd	nd	nd	0.17
20:4n6	0.25	0.69	nd	0.03	nd	0.43
20:3n3	0.14	0.36	0.25	0.80	0.59	0.14
20:4n3	nd	nd	nd	nd	nd	0.37
20:5n3	1.48	4.61	1.03	1.99	1.47	1.80
22:3n6	0.16	nd	nd	0.02	nd	0.02
22:4n6	0.01	nd	nd	nd	nd	0.06
22:5n3	0.63	1.74	0.34	0.46	0.73	0.88
22:6n3	1.94	2.30	0.63	0.90	1.49	1.10
Total FA mg g ⁻¹	55.75	75.62	25.83	41.47	34.26	31.57
Σ Saturated	29.47	42.25	13.57	21.40	16.91	15.31
Σ Monoenoic	16.52	15.20	6.35	13.04	10.41	8.61
Σ n3	6.00	11.97	2.69	4.63	4.74	5.61
Σ n6	3.29	4.28	2.67	1.98	1.86	1.66
Σ n9	10.64	9.67	4.45	9.13	5.63	3.80
Σ n3 HUFA	4.20	9.01	2.25	4.15	4.28	4.30
n6/n3	0.55	0.36	0.99	0.43	0.39	0.30
EPA/ARA	5.82	6.69	nd	58.47	nd	4.21
EPA/DHA	0.76	2.01	1.63	2.21	0.98	1.64

* T₁: 2.52% n3 HUFA; T₂: 6.76% n3 HUFA; T₃: 10.79% n3 HUFA; T₄: 12.21% n3 HUFA; T₅: 12.33% n3 HUFA; Rd: enriched *U. rigida*, 9.98% n3 HUFA.

The accumulation of HUFA allows organisms to maintain membrane fluidity at lower temperatures. *Haliotis tuberculata coccinea* lives in warmer waters and it seems that this organism does not need high levels of unsaturated long-chain fatty acids, as opposed to those observed in abalone from colder environments. Here, except in abalone from the T₂ treatment (9.0 mg g⁻¹), the total n3 HUFA content ranged from 2.3 to 4.3 mg g⁻¹, values that are lower when compared to the 13.98 mg g⁻¹ of total n3 HUFA reported for *H. fulgens* (Durazo-Beltrán *et al.* 2003a). It is important to point out that abalone fed *U. rigida* showed better growth rates and that the fatty acid profile found in muscle tissue contained 4.3 mg g⁻¹ d.w. of total n3 HUFA and had a n6/n3 ratio of 0.3.

No significant differences in feed intake were observed among treatments, including the reference (Rd) treatment, even when the P/E ratio was 35 compared to 93–105 found in the formulated diets. It is known that for abalone, as well as for

previos se ha demostrado que *H. fulgens* es capaz de sintetizar HUFAs para compensar los efectos de las bajas temperaturas de las aguas donde habita (Durazo-Beltrán *et al.* 2003b). Aquí, las distintas dietas utilizadas, con perfiles de ácidos grasos claramente diferentes particularmente en HUFA n3, no fueron capaces de inducir diferencias en el perfil correspondiente del tejido muscular. La acumulación de HUFAs permite a los organismos mantener el flujo a través de las membranas a bajas temperaturas. *Haliotis tuberculata coccinea* vive en aguas más cálidas y parece no necesitar niveles altos de HUFAs de cadena larga, contrariamente a lo observado en abulones de ambientes más fríos. Aquí, con excepción del abulón del tratamiento T₂ (9.0 mg g⁻¹), el contenido total de HUFA n3 varió de 2.3 a 4.3 mg g⁻¹, que son valores menores al compararse con 13.98 mg g⁻¹ de HUFA n3 total, reportados para *H. fulgens* (Durazo-Beltrán *et al.* 2003a). Es importante señalar que el abulón alimentado con *U. rigida* mostró mejores tasas de crecimiento

other aquatic species, dietary energy levels are important to ensure sufficient available energy for physical activity and maintenance, allowing the protein portion to be used exclusively for growth (Gómez-Montes *et al.* 2003). In our experiments, the highest growth found for Rd, with lower P/E ratio, suggests that for an equal portion of energy more protein was available for growth. In consequence, the feed conversion efficiency was significantly higher for the Rd treatment than for any of the formulated diets. The feed intake reported here (expressed as percentage of body weight) varied from 4.18% to 5.8% for the formulated diets, values much higher than those reported for similar formulated diets in *H. fulgens* (1.4–1.7%) (Gómez-Montes *et al.* 2003), which suggests that feed intake could possibly be overestimated in the present study. Thus, the food conversion efficiency values obtained will not be accurate since these are calculated from the feed intake.

Even though significant differences were not found in the total lipid content in soft tissue (viscera and muscle) between organisms fed the formulated diets, the abalone fed *U. rigida* showed lower amounts of lipids in viscera and muscle, whereas these contents were slightly higher in organisms fed the T₂ diet. Moreover, the n3 HUFA content in abalone muscle was also higher in T₂, being double than that obtained in the Rd treatment and the initial sample.

Our results suggest that *H. tuberculata coccinea*, contrary to abalone species from colder environments, does not have high HUFA requirements; however, the fatty acid profile of muscle and viscera tissues of abalone may be modulated by the fatty acid content in diets.

Acknowledgements

This work was supported by the Instituto Canario de Ciencias Marinas (Gran Canaria, Spain), and special thanks are extended to the Aquaculture Research Group and M Izquierdo. The first author acknowledges receipt of a fellowship from the Spanish Agency for International Cooperation (AECI, Spain) to obtain a Ph.D. degree. We also thank E Durazo and L D'Abramo for their valuable comments.

References

- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of AOAC International (17th ed.). V.1 and 2. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, USA.
- Christie WW. 1989. Gas Chromatography and Lipids: A Practical Guide. The Oily Press, Ayr, Scotland, pp. 67–69.
- Dunstan GA, Baillie HJ, Barrett SM, Volkman JK. 1996. Effect of diet on the lipid composition of wild and cultured abalone. *Aquaculture* 140: 115–127.
- Durazo-Beltrán E, D'Abramo LR, Toro-Vásquez JF, Vásquez-Peláez C, Viana MT (2003a). Effect of triacylglycerols in formulated diets on growth and fatty acid composition in tissue of green abalone (*Haliotis fulgens*). *Aquaculture* 224: 257–270.
- Durazo-Beltrán E, Toro-Vásquez JF, Vásquez-Peláez C, Viana MT (2003b). Effect of the seaweed *Macrocystis pyrifera* and a formulated diet on growth and fatty acid composition in the green

y que sus perfiles de ácidos grasos en tejido muscular contuvieron 4.3 mg g⁻¹ p.s. de HUFA n3 y una proporción n6/n3 de 0.3.

No se encontró que la ingesta de dietas con diferentes composiciones diera lugar a diferencias significativas en el crecimiento de los abulones (peso seco), ni aún en el tratamiento con la dieta Rd (referencia), la cual contenía una proporción P/E de 35 en comparación con 93–105 de las dietas formuladas. Se sabe que para el abulón, como para otras especies acuáticas, los contenidos energéticos de la dieta son importantes para asegurar suficiente energía disponible para su actividad física y mantenimiento, lo que permite que la proteína sea utilizada exclusivamente para el crecimiento (Gómez-Montes *et al.* 2003). En nuestros experimentos, el mayor crecimiento logrado con Rd (cuya proporción P/E es menor) sugiere que para una misma cantidad de energía había más proteína disponible para el crecimiento. Entonces, la eficiencia en la conversión de energía fue significativamente mayor para el tratamiento con Rd que con cualquiera de las dietas formuladas. La ingesta de alimento aquí reportada (expresada como porcentaje de peso corporal) varió de 4.18% a 5.8% con las dietas formuladas. Estos valores son mucho mayores que los reportados con dietas formuladas similares para *H. fulgens* (1.4–1.7%) (Gómez-Montes *et al.* 2003), lo que sugiere que la ingesta de alimento en el presente trabajo pudo haberse sobreestimado. Por esta razón los valores obtenidos de eficiencia en la conversión alimenticia no son precisos, ya que se calcularon a partir de la ingesta alimenticia.

Aun cuando no se encontraron diferencias significativas en el contenido de lípidos de los tejidos blandos (visceras y músculo) entre los organismos alimentados con las dietas formuladas, el abulón alimentado con *U. rigida* mostró menor cantidad de lípidos en visceras y músculo, mientras que tales contenidos fueron ligeramente mayores en los organismos alimentados con la dieta T₂. Además, el contenido de HUFA n3 en el músculo de los abulones también fue mayor con T₂, siendo el doble del obtenido con el tratamiento Rd y del de la muestra inicial.

Nuestros resultados sugieren que, a diferencia de los abulones de ambientes más fríos, *H. tuberculata coccinea* no tiene mayores requerimientos de HUFAs; sin embargo, el perfil de ácidos grasos de los tejidos muscular y visceral del abulón puede aún estar modulado por el contenido de ácidos grasos en sus dietas.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Instituto Canario de Ciencias Marinas (Gran Canaria, España), y se agradece en especial al Grupo de Investigación en Acuicultura y a M Izquierdo. El primer autor agradece la beca de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI, España) para obtener el doctorado. También agradecemos a E Durazo y L D'Abramo por sus valiosos comentarios al manuscrito.

Traducido al español por Manuel Gardea-Ojeda

- abalone, *Haliotis fulgens*, under commercial culture conditions. *Cienc. Mar.* 29: 645–654.
- Fleming AE, Van Barneveld RJ, Hone PW. 1996. The development of artificial diets for abalone: A review and future directions. *Aquaculture* 140: 5–53.
- Folch BJ, Lees M, Sloanestanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497–509.
- Fox C. 1990. Studies on polyunsaturated fatty acid nutrition in larvae of marine fish: the herring, *Clupea harengus* L. Ph.D. thesis, University of Stirling, Scotland, 196 pp.
- Gómez-Montes L, García-Esquivel Z, D'Abramo LR, Shimada A, Vásquez-Peláez C, Viana MT. 2003. Effect of dietary protein: Energy ratio on intake growth and metabolism of juvenile green abalone *Haliotis fulgens*. *Aquaculture* 220: 769–780.
- Gordon HR, Cook PA. 2004. World abalone fisheries and aquaculture. Update: Supply and market dynamics. *J. Shellfish Res.* 23: 935–939.
- Hahn KO. 1989. Survey of the commercially important abalone species in the world. In: Hahn KO (ed.), *Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods*. CRC Press, Boca Raton, pp. 3–11.
- Hopkins KD. 1992. Reporting fish growth: A review of the basics. *J. World Aquacult. Soc.* 23: 173–179.
- Izquierdo MS, Watanabe T, Takeuchi T, Arakawa T, Kitajima C. 1990. Optimum EFA levels in *Artemia* to meet the EFA requirements of red sea bream (*Pagrus major*). In: Takeda M, Watanabe T (eds.), *The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture*. Tokyo Univ. Fisheries, Tokyo, pp. 221–232.
- López LM, Viana MT. 1995. Determination of the quality of food elaborated from unheated and heated fish silages for abalone juveniles of *Haliotis fulgens*. *Cienc. Mar.* 21: 331–342.
- Mai K, Mercer JP, Donlon J. 1995. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. III. Response of abalone to various levels of dietary lipids. *Aquaculture* 134: 65–80.
- Morse DE, Duncan H, Hooker N, Morse A. 1977. Hydrogen peroxide induces spawning in mollusks, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase. *Science* 196: 298–300.
- Sargent JR, Tocher DR, Bell JG. 2002. The lipids. In: Halver JE, Hardy RW (eds.), *Fish Nutrition*. pp. 182–246.
- Shpigel M, Neori A. 1996. The integrated culture of seaweed, fish and clams in modular intensive land-based systems: I. Proportions of size and projected revenues. *Aquacult. Eng.* 15: 313–326.
- Tacon A. 1990. *Standard Methods for the Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp*. Argent Laboratories Press, Washington, 207 pp.
- Uki N, Watanabe T. 1992. Review of the nutritional requirements of abalone *Haliotis* spp. and development of more efficient artificial diets. In: Shepherd SA, Tegner MJ, Guzmán del Próo SA (eds.), *Abalone of the World: Biology, Fisheries and Culture*. Shepherd, Fishing News Books, Oxford, Part IX (38), pp. 504–517.
- Viana MT, López LM, Salas A. 1993. Diet development for juvenile abalone *Haliotis fulgens*. Evaluation of two artificial diets and macroalgae. *Aquaculture* 117: 149–156.
- Viana MT. 2006. Abalone Aquaculture: An overview. In: Kelly A, Silverstein J (eds.), *Aquaculture in the 21st Century*. American Fishery Society, Bethesda, pp. 1–24.
- Viera MP, Gómez Pinchetti JL, Courtois de Vicose G, Bilbao A, Suárez S, Haroun RJ, Izquierdo MS. 2005. Suitability of three red macroalgae as a feed for the abalone *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve. *Aquaculture* 248: 75–82.

Recibido en junio de 2008;
aceptado en febrero de 2009.